

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16698

研究課題名（和文）中性子捕捉療法におけるアミノ酸トランスポーターを介した薬剤相互作用と生物学的効果

研究課題名（英文）Drug Interactions and Biological Effects via Amino Acid Transporters in Neutron Capture Therapy

研究代表者

斯波 宏行 (Hiroyuki, Shiba)

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：60910693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：悪性髄膜腫は手術や放射線治療による根治が困難であり、予後も不良だったが、我々はホウ素中性子捕捉療法(BNCT)の有効性を実証してきた。BNCTの効果はホウ素化合物によって左右され、悪性髄膜腫の予後を大幅に改善させる結果にはまだ至っていない。新規ホウ素化合物の開発も極めて複雑である。我々はこれらの課題を克服すべく、現在使用されているホウ素化合物BPAと既存の医薬品の併用を考案した。BPAと抗てんかん薬ラモトリギンの併用によって腫瘍細胞のホウ素の取り込み量が増加し、BNCTの効果を高められるという仮説を立て、今回の研究によって仮説の正しさを証明した。今後、臨床に応用する手順の確立が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、これまで治療困難とされてきた悪性脳腫瘍に対する新たな治療の選択肢として注目されている。ただ、BNCTの治療効果は、使用するホウ素化合物によって左右され、現在使用されているboronophenylalanine(BPA)では、まだ十分な効果とは言えない。過去に各国で様々な新規ホウ素化合物が考案されてきたが、実用化には至っていない。我々は既存の医薬品とBPAを併用するという費用対効果に優れた新たな手法を考案し、今回の研究でその実現可能性を見出した。臨床での応用にはまだ時間を要するが、この本邦独自の手法によって、BNCTの治療効果の更なる向上が期待される。

研究成果の概要（英文）：Malignant meningioma (MM) is a rare brain tumor with high risk of recurrence. The treatment of that is difficult and has been discouraging. We have shown that boron neutron capture therapy (BNCT) may be a promising treatment option for this tumor. The efficacy of BNCT relies on boron compounds. We are not satisfied with the efficacy of BNCT today. Because producing new boron compounds are very complicated and cost much, we decided to use conventional boron compounds and existing drugs. We discovered that combined use of boronophenylalanine (BPA) and lamotrigine (LTG; one of antiepileptic drugs) made MM cell lines increase boron uptake. BPA is localized to tumor cells by L-type Amino Acid Transporter 1 (LAT1). It has been already shown that LTG upregulate the expression of LAT1. LTG can improve the efficacy of BNCT by promoting the expression of LAT1. In the future, we have to find the way to visualize LAT1 expression, which make us predict therapeutic effects of BNCT for patients.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：悪性脳腫瘍 ホウ素中性子捕捉療法 アミノ酸トランスポーター 薬物相互作用 ドラッグリポジショニング 抗てんかん薬

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy; BNCT) は、細胞選択性を有する粒子線治療である。BNCT で使用するホウ素化合物として、必須アミノ酸であるフェニルアラニン骨格とした p-フェニルアラニン (BPA) が承認されている。BPA は、がん組織で高発現する L-型アミノ酸輸送体 (LAT1) によって、がん細胞に取り込まれる。これまで、我々は悪性脳腫瘍に対して BNCT を施行し、その有効性を実証してきた。BNCT は悪性脳腫瘍の新たな治療法として注目されているが、その治療効果は使用するホウ素化合物に依存する。BPA を用いた BNCT では、悪性脳腫瘍の予後が大幅に改善したと言い難い。

BNCT の治療効果向上のため、BPA 以外にも様々なホウ素化合物が考案されてきたが、いずれも実用化には至っていない。ホウ素化合物が生体内で使用できる安全性、正常細胞に集積せず腫瘍細胞にのみ集積する選択性、安価に大量生産できる量産性など、複数の条件を満たす必要があるためである。我々は、新規ホウ素化合物の開発以外に、BPA と既存の医薬品の併用によって BNCT の治療効果を向上させる方法を考案した。本研究では、BPA の標的手法および集積機序に着目し、薬物相互作用の解明を通じてホウ素集積機構に介入することで、既存薬を当初の用途とは異なる用途に転用するドラッグリポジショニングの観点から、BPA と併用した場合の治療効果を向上させる最適な薬剤を探索する。

2. 研究の目的

本研究は、臨床で広く使用されている既存薬剤と BPA を併用することで BNCT の治療効果を向上させることを目的としている。この手法は、従来の「新規ホウ素化合物を開発する」というアプローチとは全く異なる。研究の目的は、薬剤相互作用による BNCT の治療効果および有害事象への影響を探索的に評価するスクリーニング手法を構築し、BNCT の治療効果を改善し得る最適な併用薬剤を模索することである。また、相互作用による正常組織での生物学的反応を解明することも目指している。本研究は、研究代表者独自の視点に基づく基礎研究である。

具体的には、抗てんかん薬ラモトリギンを併用した場合の BPA を用いた BNCT の増感効果について、中性子照射実験を行い、その有効性を評価する解析手法を検討する。また、スクリーニング手法の構築に向けて、持続的細胞モニタリングシステムを用いた評価を追加し、マルチパラメータから効果を推測するモデルの検討も行う。

3. 研究の方法

LAT1 は正常細胞よりも悪性腫瘍細胞に高発現しており、他施設の研究では、抗てんかん薬ラモトリギンが LAT1 の発現を促進する可能性が指摘されている。我々は、「ラモトリギンと BPA を併用することで、一時的に増加した悪性脳腫瘍の LAT1 がより多くのホウ素を取り込み、BNCT の治療効果が向上する」という仮説を立てた。悪性髄膜種においても LAT1 が発現していることが報告されており、本研究では悪性髄膜種の細胞株を用いた実験を行う方針とした。

悪性髄膜種の細胞株 IOMM-Lee を使用し、以下の 3 群を設定した。

BPA のみに曝露した群 (第 1 群)

ラモトリギン 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に曝露後に BPA に曝露した群 (第 2 群)

ラモトリギン 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に曝露後に BPA に曝露した群 (第 3 群)

曝露終了後、各群の IOMM-Lee の細胞数を測定し、硝酸で溶解した。その溶解液中のホウ素量を誘導結合プラズマ発光分析 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy; ICP-AES) で測定し、細胞数 (1×10^5) あたりのホウ素取り込み量を計算した。その結果、第 1 群よりも第 2 群で、第 2 群よりも第 3 群で、IOMM-Lee のホウ素取り込み量が増加していた。

次に、各群の IOMM-Lee に発現している LAT1 を Western Blot 法で検出し、LAT1 とアクチン との発現比を ECL Plus System で測定した。その結果、ホウ素の取り込み量と LAT1 の発現との間に相関を認め、当初の仮説が実証された。

さらに、本研究期間内においてはラットグリオーマ細胞株 F98 を用いた実験も計画した。具体的には、以下の 3 群を設定した。

F98 を通常の medium で培養し BPA を曝露

F98 を DMSO 含有 medium で培養し BPA を曝露

F98 をラモトリギン 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (DMSO で溶解) を含む medium で培養し BPA を曝露

BPA の曝露濃度は 10 $\mu\text{g B/mL}$ とした。BPA 曝露後、2.5、6、24 時間後に細胞を回収し、ICP-AES でホウ素含有量を確認し、ホウ素濃度 ($\mu\text{g B}/10^9\text{個}$) を算出した。その結果からホウ素濃度が最大となる時間を確認し、その条件下で中性子照射実験を実施した。照射後の細胞を持続モニタリングシステムで経時的に観察し、評価を行った。

4. 研究成果

ラットグリオーマ細胞株 F98 に対するホウ素薬剤曝露実験では、F98 を通常の培養液で培養し、ホウ素薬剤を 24 時間曝露させた群と比較して、F98 をラモトリギン 12 $\mu\text{g/mL}$ を含む培養液で培養し、BPA を 24 時間曝露させた群では、有意にホウ素濃度が上昇した。また、同濃度の DMSO のみで培養した後に BPA を曝露した群においても、毒性を示唆するような細胞減少は認められなかった。この結果から、ラモトリギン 12 $\mu\text{g/mL}$ を含む培養液で培養し、さらに 24 時間 BPA を曝露することで、細胞へのホウ素取り込みが増加することが示唆された。この曝露時間を至適条件と判断して、中性子照射実験を行った。

細胞持続モニタリングの評価では、ラモトリギン含有培養液で培養後に BPA を曝露した群と通常の培養液で培養後に BPA を曝露した群との間で、中性子照射による効果の差は確認できなかった。原因としては、照射実験時に十分なホウ素の取り込みが得られなかった点や細胞毒性などが考えられる。今回は至適条件を一つの条件に絞って実験を行ったため、その他の条件下での実験は行われていないが、BPA の曝露濃度を変化させるなどの再検討が必要である。また、細胞持続モニタリングに関しては有意な差は出なかったものの、各群間の微細な差まで検出が可能であり、解析に十分な情報量を提供できることが示された。今後の実験においても、更なる応用の幅が期待される。

悪性脳腫瘍患者では症候性てんかんを発症することが多く、治療中に抗てんかん薬を投与することは一般的である。悪性脳腫瘍患者に対して日常の診療で使用される薬剤と BPA の併用によって BNCT の治療効果を向上させる意義は大きい。今回の研究では、ラモトリギンの最大濃度を 12 $\mu\text{g/mL}$ としたが、これはラモトリギンの血中濃度としても治療域に含まれ、投与によって患者に有害事象が生じるリスクが低いことが示唆される。

悪性髄膜種以外にも、悪性脳腫瘍には様々な種類があり、腫瘍細胞に LAT1 が発現しているものも存在する。悪性脳腫瘍に対して BNCT を行う場合、事前に BNCT の効果を予測、評価することが重要である。BNCT を行う前に核医学検査で LAT1 の発現を調べ、それに応じた適切なラモトリギンの投与量を設定することで、BNCT の治療効果をさらに高めることができる。我々の研究は、BNCT の治療効果向上だけでなく、治療効果をあらかじめ数値化し、患者一人一人に適した治療計画を効率的かつ柔軟に作成することを可能とするものである。

まとめ

本研究では、抗てんかん薬ラモトリギンと BPA の併用によって BNCT の治療効果を向上させる可能性を探った。ラットグリオーマ細胞株 F98 を用いた実験では、ラモトリギンを含む培養液で BPA を曝露した群において、通常の培養液で BPA を曝露した群と比較して、有意にホウ素濃度が上昇することが示された。この結果は、ラモトリギンが LAT1 の発現を促進し、BPA の細胞内取り込みを増加させる可能性を示唆している。

中性子照射実験では、細胞持続モニタリングの評価において、ラモトリギン含有培養液で培養後に BPA を曝露した群と通常の培養液で培養後に BPA を曝露した群との間で効果の差は確認できなかったが、今後の研究では BPA の曝露濃度や曝露時間などの条件を再検討する必要がある。また、細胞持続モニタリングは微細な差を検出できることが示されたため、今後の実験においても有効な評価手段となると考えられる。

悪性脳腫瘍患者において、抗てんかん薬と BPA の併用によって BNCT の治療効果を向上させることは、患者にとって大きな意義を持つ。今回の研究では、ラモトリギンの最大濃度を 12 $\mu\text{g/mL}$ とし、これは治療域に含まれ、安全性が示唆された。将来的には、核医学検査で LAT1 の発現を調べ、それに基づいてラモトリギンの適切な投与量を設定することで、BNCT の効果をさらに高めることが期待される。

本研究は、BNCT の治療効果向上だけでなく、治療効果を数値化し、個々の患者に最適な治療計画を立案するための基盤を築くものである。今後も、様々な悪性脳腫瘍に対して、BPA と他の既存薬剤の併用効果を評価し、新たな治療法の確立を目指して研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsujino Kohei, Kashiwagi Hideki, Nishimura Kai, Kayama Ryo, Yoshimura Kohei, Fukuo Yusuke, Shiba Hiroyuki, Hiramatsu Ryo, Nonoguchi Naosuke, Furuse Motomasa, Takami Toshihiro, Miyatake Shin-Ichi, Hu Naonori, Takata Takushi, Tanaka Hiroki, Suzuki Minoru, Kawabata Shinji, Nakamura Hiroyuki, Wanibuchi Masahiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Improved Boron Neutron Capture Therapy Using Integrin α 3-Targeted Long-Retention-Type Boron Carrier in a F98 Rat Glioma Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 377 ~ 377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology12030377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi Hideki, Hattori Yoshihide, Kawabata Shinji, Kayama Ryo, Yoshimura Kohei, Fukuo Yusuke, Kanemitsu Takuya, Shiba Hiroyuki, Hiramatsu Ryo, Takami Toshihiro, Takata Takushi, Tanaka Hiroki, Watanabe Tsubasa, Suzuki Minoru, Hu Naonori, Miyatake Shin-Ichi, Kirihata Mitsunori, Wanibuchi Masahiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Multi-Targeted Neutron Capture Therapy Combined with an 18 kDa Translocator Protein-Targeted Boron Compound Is an Effective Strategy in a Rat Brain Tumor Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1034 ~ 1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15041034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------