

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09399

研究課題名(和文) 葉酸受容体標的ホウ素化合物を用いたCED法によるBNCT治療効果向上に関する研究

研究課題名(英文) Investigation regarding the progress of therapeutic effect of BNCT using folate receptor-targeted boron compound which be administered by convection enhanced delivery

研究代表者

平松 亮 (Hiramatsu, Ryo)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：40609707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)における新規ホウ素化合物として新規葉酸受容体標的ホウ素化合物のpteroyl closo-dodecaborate conjugate(PBC)を用い、in vitro boron concentration experiment、in vivo biodistribution experimentを行い現在のホウ素化合物(BPA、BSH)を超える腫瘍細胞内ホウ素取り込み量を示した。In vivo BNCT experimentでは、PBCの投与でCED法を用い、PBC CED+BPA静注後中性子照射群は全ての群と比較して有意差を持って生存期間の延長を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに臨床BNCTに用いられてきたホウ素化合物(BPA、BSH)では、ある程度の治療効果が示せてはいるが、未だ不十分である。そういった背景の中で既存のホウ素化合物を超える効果が期待される新規ホウ素化合物の開発は国内外で活発に行われている。本研究では新規ホウ素化合物として葉酸受容体標的ホウ素化合物であるPBCを用いたin vitro研究にて、BPAおよびBSHを超える腫瘍細胞内ホウ素取り込み量を示せたことは研究成果として学術的意義が非常に高い。本研究での結果を踏まえ、今後臨床応用も視野に入れられる薬剤となったことは社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In vitro boron concentration experiments and in vivo biodistribution experiments were performed using pteroyl closo-dodecaborate conjugate (PBC), a novel folate receptor-targeting boron compound that is expected to be a next-generation boron compound in boron neutron capture therapy (BNCT). The amount of boron uptake in tumor cells exceeded that of current boron compounds BPA and BSH. In vivo BNCT experiments used the CED method as a drug delivery system for PBC. (1) no treatment group, (2) neutron irradiation alone group, (3) neutron irradiation group after intravenous BPA injection, (4) neutron irradiation group after PBC CED, (5) neutron irradiation group after PBC CED + BPA injection, and (5) after PBC CED + BPA injection. The neutron irradiation group (36.6±3.1 days) had a significant difference compared to all groups (22.6±0.7 days, 25.8±2.5 days, 30.5±5.1 days, 30.2±3.3 days). observed an increase in survival time.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：悪性神経膠腫 BNCT 葉酸受容体標的ホウ素化合物 CED

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)の原理は、腫瘍細胞にホウ素 10 (boron-10, ¹⁰B)化合物を取り込ませ、そこにほぼ無害である中性子(熱中性子)を照射することにより、高線エネルギー付与の粒子が放出される(ホウ素中性子捕捉反応)ことで腫瘍細胞のみを破壊するところにある。正常脳細胞は破壊せずに腫瘍細胞のみを破壊するという理想的な腫瘍選択的治療をBNCTが実現可能なのは、放出される粒子が腫瘍細胞ひとつ分に相当する飛程約10ミクロンで放出されるためである。そのため、より腫瘍細胞選択性の高いホウ素化合物が開発されれば、さらなるBNCTの治療成績向上が望める。

我々はこれまでに臨床BNCTを改良し、悪性神経膠腫および悪性髄膜腫患者の治療に適用し、従来の放射線治療を用いた成績を上回る治療成績を示してきたが、現在臨床BNCTで使用経験のあるホウ素化合物(BPA, BSH)では未だ不十分であると考えている。そこで今回我々は、より高い治療効果が期待される新たなホウ素化合物として、葉酸受容体(Folate Receptor;FR)標的ホウ素化合物(pteroyl closo-dodecaborate conjugate (PBC))を研究分担者である、中村浩之教授

(東京工業大学)とともに試作した(図1)。葉酸(Folic Acid;FA)は治療薬への結合の容易さや、FRへの高い親和性により、腫瘍細胞へ選択的に取り込ませるための最適な標的リガンドとして期待

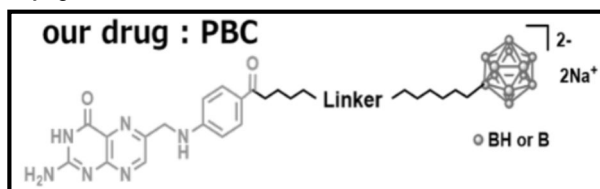


図1、pteroyl closo-dodecaborate conjugate(PBC)

されている。また悪性神経膠腫にFRが高発現していることは報告されており、FR標的化リポソームなどが今までに合成され、BNCTにおける新規ホウ素化合物としての有用性も報告されている(Pan X. et al, J Bioconjugate Chem, 2002)。

研究代表者は、本申請に先立ちPBCを用いた *in vivo* biodistributionで薬剤集積をみたパイロット研究(図2)にて現在臨床BNCTにて用いられているホウ素化合物であるBPAを超える腫瘍内ホウ素取り込み量を確認したため、新規FR標的ホウ素化合物としてPBCを元に研究を開始する予定としていた。

Agent	Route	Time (h)	N	Boron concentrations ± SD (μg ¹⁰ B/g)				Ratio	
				Tumor	Ipsilateral Brain	Contralateral Brain	Blood	T/Br	T/Bl
PBC (1000ppm)	CED _{200μl/24h}	2	3	33.1 ± 9.0	3.3 ± 0.8	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	10.0	79.7
		6	4	64.6 ± 29.6	4.8 ± 3.4	0.9 ± 0.4	0.5 ± 0.1	23.7	113.5
		24	4	19.5 ± 16.9	2.4 ± 2.7	0.5 ± 0.4	0.4 ± 0.03	8.0	49.1
BPA (1000ppm)	iv	2	3	19.9 ± 1.0	6.4 ± 1.4	4.7 ± 0.9	9.9 ± 3.2	3.1	2.0
		6	3	17.0 ± 1.3	4.8 ± 0.4	4.5 ± 1.0	7.0 ± 0.5	3.6	2.4

図2、Boron Concentrations in brain tumors in F98 Glioma Bearing Rats (PBC CED投与後6時間後腫瘍内ホウ素濃度は60μg¹⁰B/g以上とBPAi.v.と比較して3倍以上の高い取り込み量を認めた)

2. 研究の目的

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)とは、非常に殺腫瘍効果の高い粒子を用いた粒子線治療で、理論的には腫瘍細胞のみを選択的に破壊することが可能である。しかしそのためにはホウ素化合

物に高い腫瘍細胞選択性が求められ、それが高ければ高いほど BNCT の治療効果に期待ができる。現在までに臨床 BNCT に用いられてきたホウ素化合物 (BPA, BSH) では、ある程度 of 治療効果が示せてはいるが、未だ不十分である。そこで本研究では、腫瘍選択的粒子線治療である BNCT のさらなる治療成績向上を目指し、理想的な新規ホウ素化合物として開発した葉酸受容体標的ホウ素化合物の有用性に関し検討し、臨床応用への可能性を探った。本研究の中では薬剤送達システムとして Convection Enhanced Delivery (CED) 法を用い脳腫瘍治療での弊害となっている BBB の問題を克服することで、治療効果のさらなる上乗せ効果に関しても検討した。

3 . 研究の方法

1 , FR 標的ホウ素化合物の作成およびその抗腫瘍細胞効果の検討

上述のように研究分担者である中村浩之教授 (東京工業大学) とともに、BNCT 用新規ホウ素化合物として PBC を試作した (図 1)。しかし、さらなる腫瘍選択性の高い新規 FR 標的ホウ素化合物の開発を協力して継続してきた。そこで初年度は、培養細胞実験で PBC を中心とした新規 FR 標的ホウ素化合物と従来のホウ素化合物 (BPA, BSH) とのホウ素取り込み量・滞留量比較実験を行う。また培養細胞を用いた中性子照射実験も行い、新規 FR 標的ホウ素化合物と従来のホウ素化合物 (BPA, BSH) との抗腫瘍効果を colony forming assay にて評価した。

2 , FR 標的ホウ素化合物を用いた CED 法の薬物動態の解明とその至適投与条件の検討

F98 グリオーマ移植担脳腫瘍モデルラットに対し CED 法により FR 標的ホウ素化合物を投与した後、組織内ホウ素濃度を測定した。組織内ホウ素濃度は ICP-AES を用いて腫瘍および腫瘍側正常脳、対側正常脳など組織別に行う。これらの実験により FR 標的ホウ素化合物の CED 投与時の薬物動態の解明と至適投与条件の検討も加えた。摘出組織に対して H&E 染色や免疫染色を行い、正常組織の変化も確認し、また BNCT の治療効果は、集積薬剤の絶対量のみならず細胞内・外の局在にも左右されるため、腫瘍組織での細胞内のホウ素化合物の局在も確認した。以下に検討した項目を示す。

- 1) 異なる CED 法の条件による集積の違い (投与量、投与速度)
- 2) CED 法で投与後の経時的腫瘍・正常脳・各他臓器 (血液、心臓、肺、肝臓、脾臓、筋肉、皮膚など) のホウ素濃度測定 (薬剤投与後の中性子照射時期の検討)
- 3) CED 法による薬剤投与後の脳腫瘍、正常脳それぞれの病理学的検査

3 , 動物モデルに対する中性子照射に関する実験

上記基礎実験での CED 法における至的薬物投与条件を検討した上で、以下の治療実験を行った。

治療実験 (BNCT への応用)

In vitro の実験結果より新規 FR 標的ホウ素化合物の至適投与量や時間を確定し、F98 グリオーマ移植担脳腫瘍モデルラットに対し中性子照射実験 (*in vivo* BNCT study) を行う。*in vivo* BNCT study は生存期間分析で殺腫瘍効果を評価する。

担脳腫瘍ラット・マウスにおける中性子捕捉療法治療実験を以下の群にわけて行う。

- 1) 未治療、2) FR 標的ホウ素化合物 (CED) のみ、3) 中性子照射のみ、4) BPA (iv) + 中性子照射、5) FR 標的ホウ素化合物 (iv) + 中性子照射、6) FR 標的ホウ素化合物 (CED) + 中性子照射

治療効果はラットの生存期間の観察と病理学的検索をもって行った。

4 . 研究成果

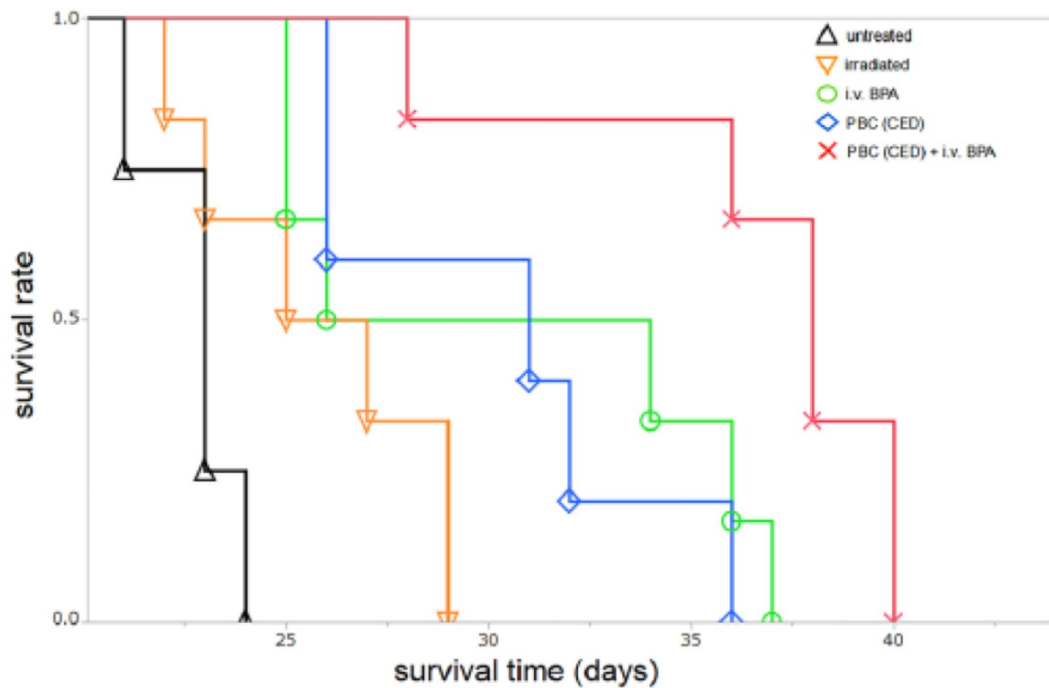
ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) における次世代ホウ素化合物として期待されている新規葉酸受容体標的ホウ素化合物である PBC を用いて、*in vitro* boron concentration experiments と *in*

vivo biodistribution experiments を実施した。腫瘍細胞におけるホウ素の取り込み量は、現在のホウ素化合物である BPA および BSH の量を上回った。その結果を踏まえ *in vivo* BNCT experiments では、PBC の薬物送達システムとして CED 法を使用した。(1) 無治療群、(2) 中性子照射のみ群、(3) BPA 静注後中性子照射群、(4) PBC CED 後中性子照射群、(5) PBC CED + BPA 注射後中性子照射群、および (5) PBC CED + BPA 注射後。中性子照射群 (36.6 ± 3.1 日) は全群 (22.6 ± 0.7 日、 25.8 ± 2.5 日、 30.5 ± 5.1 日、 30.2 ± 3.3 日) と比較して有意差をもって生存時間の延長が認められた (図 3, 4)。今後臨床応用に期待できる結果であったと考える。

図3

Group	n^a	Survival time			%ILS ^b
		Mean \pm SD	Median	Range	Median
Untreated controls	6	22.6 ± 0.7	23.0	21–24	–
Irradiated controls	6	25.8 ± 2.5	26.0	22–29	13.0
i.v. BPA	6	30.5 ± 5.1	30.0	25–37	30.4
PBC (CED)	5	30.2 ± 3.3	31.0	26–36	34.7
PBC (CED)+i.v. BPA	6	36.6 ± 3.1	38.0	28–40	65.2

図4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	鱒淵 昌彦 (Wanibuchi Masahiko) (30343388)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	
研究分担者	中村 浩之 (Nakamura Hiroyuki) (30274434)	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授 (12608)	
研究分担者	川端 信司 (Kawabata Shinji) (20340549)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	古瀬 元雅 (Furuse Motomasa) (70340560)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	野々口 直助 (Nonoguchi Naosuke) (70388263)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	

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
---------	---------