

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462198

研究課題名(和文) 中性アミノ酸プレローディングによる中性子捕捉療法(BNCT)の確立

研究課題名(英文) Amino Acid Pre-loading for Boron Neutron Capture Therapy

研究代表者

山本 哲哉 (YAMAMOTO, Tetsuya)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30375505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：中性子捕捉療法(BNCT)で用いるBPAの取り込みは腫瘍細胞膜のアミノ酸共輸送を介した交換輸送速度に依存し、細胞内が高いアミノ酸濃度を有する場合、BPAの細胞内への取り込みが増加することが知られている。本研究では、アミノ酸エステル類のプレローディングによる腫瘍細胞のBPA取り込み増強による抗腫瘍効果を中性子線照射実験により実証し、BNCTの新たな治療戦略を確立することを目的とした。プレローディング後の中性子照射実験では、L-Phe-O-Etで高い殺細胞効果が得られ、次いで、BPA+L-tyr-O-Etが良好であり、アミノ酸エステルの同時投与によってアミノ酸交換輸送が誘発されることが示された。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) can provide the delivery of tumor cell-selective high-linear energy transfer (LET) particle radiotherapy to tumor mass and the microscopic invasion while avoiding radiation damage to the surrounding normal brain tissue. The rationale of BNCT is based on the nuclear interaction of ^{10}B with thermal neutrons with the release of high LET and ^7Li particles through the boron neutron capture reaction, $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$. The very short path length ($<9\mu\text{m}$) of α -particles and ^7Li enables high-LET irradiation of tumor cells without undesirable damage to ^{10}B -unloaded normal cells. In this study, we assumed that neutral amino acid would exhibit increasing effect of intracellular BPA level by co-loading. Neutron irradiation after Preloading of L-Phe-O-Et showed strongest cytotoxic effect and L-tyr-O-Et also showed cytotoxic effect.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：BNCT

1. 研究開始当初の背景

中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy: BNCT) では、腫瘍細胞にホウ素化合物 Boronophenylalanine (BPA) が取り込まれ、外部から照射した中性子と反応してアルファ線を発生すると、腫瘍細胞に局限した 10 ミクロン程度の領域に選択的抗腫瘍効果を示す。いっぽう、BPA の取り込みは腫瘍細胞膜のアミノ酸共輸送を介した交換輸送速度に依存し、細胞内が高いアミノ酸濃度を有する場合、そのアミノ酸の細胞外排泄にともない共輸送による BPA の細胞内への取り込みが増加することが知られている。

本申請者は、細胞内にアミノ酸エステル類を前投与 (プレローディング) することによって細胞内のアミノ酸濃度を上昇させ、これによって生じる細胞内外のアミノ酸濃度の勾配が交換輸送を誘発することに着目した。先行研究 (H22-24 年度基盤 C 研究代表者 山本) において、アミノ酸エステル類 (L-Tyr-O-Et、L-Phe-O-Et、L-Met-O-Et) を一定の *in vitro* 条件下でプレローディングした結果、アミノ酸交換輸送の速度増加が誘発され、腫瘍内 BPA 濃度を上昇させることに成功した。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を進展させ、アミノ酸エステル類のプレローディングによる腫瘍細胞の BPA 取り込み増強による抗腫瘍効果を生中性子線照射実験により実証し、BNCT の新たな治療戦略を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

研究開始当初、中性子線照射は別の研究計画で進められている国内での加速器中性子線照射装置を利用する予定であった。しかし、その研究開発が遅れ、中性子線照射実験を海外施設の共同実験に切り替えることとした。本研究では、ロシア共和国連邦にあるノボシビルスク大学 (The Budker Institute of Nuclear Physics (INF) of the Academy of Sciences of the Russian Federation (ASRF)) と連携し、ノボシビルスク大学の加速器中性子線照射装置を利用した。

(1) Boric acid を用いた加速器中性子線照射装置の生物学的特性評価

ノボシビルスク大学の加速器中性子線照射装置における生物学的特性については明らかとなっていない。そこで、本照射装置の生物学的特性を調査すべく、boric acid を用いて中性子線照射による細胞生存率を算出することとした。

対象の細胞は、Chinese hamster ovary cells (CHO-K1)、Chinese hamster lung fibroblasts (V79)、human glioma (U251MG) である。ホウ酸 (boric acid) の濃度を 4 種類 (0 ppm、10 ppm、20 ppm、40 ppm) に変化させて各細胞に投与してプラスチックバイアルに封入

し、中性子線照射用の有機硝子ファントムにセットした (Fig. 1)。

加速器中性子線照射装置における照射条件は、proton energy: 2.0 MeV、proton current: 1.5-3.0 mA、epithermal neutron flux: $3.0 \times 10^8 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、epithermal neutron irradiation time: 3 hours とした。

中性子線照射後、コロニーフォーメーションアッセイ (CF-assay) を行い、各細胞の細胞生存率を算出した。

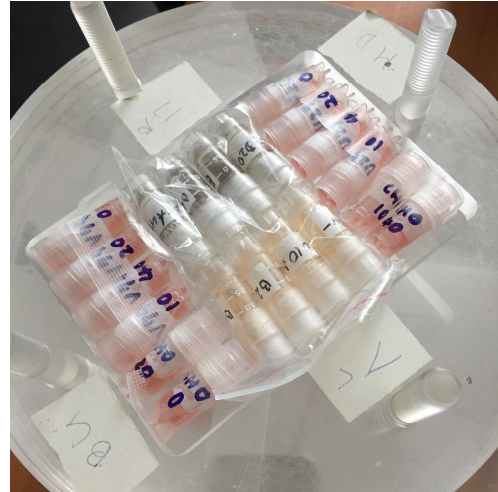


Fig. 1 各細胞が封入されたプラスチックバイアルおよび中性子線照射用の有機硝子ファントム

(2) BPA とアミノ酸エステルとの同時投与における中性子線照射実験

方法(1)で得られた細胞生存率の結果から、BPA とアミノ酸エステルとの同時投与における中性子線照射実験は U251MG で検討することとした。

U251MG を継代・培養し、BPA とアミノ酸エステル類 (L-Tyr-O-Et、L-Phe-O-Et、L-Trp-O-Et) を各 1.0 mM で細胞に投与した (loading time: 2 hours)。サンプルは、BPA (-)、BPA (+)、BPA + L-Tyr-O-Et、BPA + L-Phe-O-Et、BPA + L-Trp-O-Et とした。

加速器中性子線照射装置における照射条件は、proton energy: 2.0 MeV、proton current: 2.0 mA、epithermal neutron flux: $3.0 \times 10^8 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、epithermal neutron irradiation time: 2 hours とした。

中性子線照射後、コロニーフォーメーションアッセイ (CF-assay) を行い、U251MG の細胞生存率を算出した。

4. 研究成果

(1) ホウ素濃度と細胞生存率

Fig. 2 に、中性子線照射による各細胞 (CHO-K1、V79、U251MG) の細胞生存率曲線を示す。各細胞の細胞生存率は、ホウ素濃度の上昇に比例して減少し、ホウ素濃度 40 ppm において最小を示した。細胞別に比較すると、CHO-K1 と U251MG における細胞生存率の減少は大きく、0 ppm (コントロール)

に対して 40 ppm (ホウ素濃度最大)では約 1/50 に減少し、高い殺細胞効果が得られた。

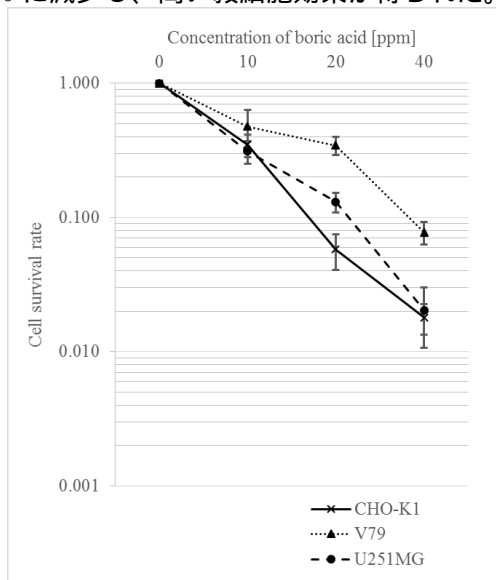


Fig. 2 中性子線照射による各細胞の細胞生存率曲線

(2)BPA とアミノ酸エステルとの同時投与における中性子線照射実験

Fig. 3 に、中性子線照射による各サンプルの細胞生存率曲線を示す。各サンプルの細胞生存率は、中性子線の照射時間 (epithermal neutron flux) に比例して減少した。生存率をサンプル別に比較すると、BPA+L-Phe-O-Et で最も減少し、BPA (-) に対して約 1/40 に減少し、高い殺細胞効果が得られた。次いで、BPA+L-tyr-O-Et と BPA (+) が BPA (-) に対して約 1/18 に減少した。これは、アミノ酸エステルの同時投与によって細胞内のアミノ酸濃度が上昇し、細胞内外におけるアミノ酸交換輸送が誘発されたことが要因であると考えられる。一方、BPA (-) と BPA+L-Trp-O-Et の生存率の減少は約 1/2.5 であった。L-Trp-O-Et でアミノ酸交換輸送が誘発されなかった要因は、U251MG に対する細胞毒性が影響していることが考えられる。そのため、今後は L-Trp-O-Et の細胞毒性を詳細に検討する必要がある。

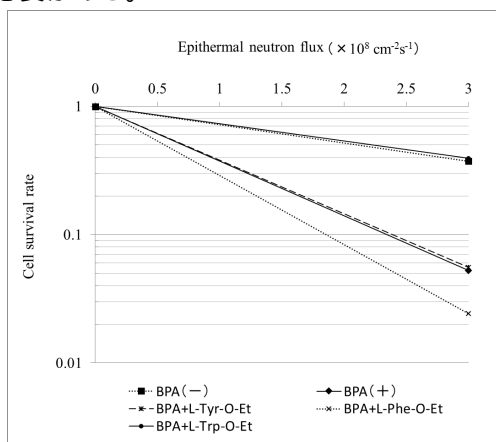


Fig. 3 中性子線照射による各サンプルの細胞生存率曲線

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Ishikawa M, Yamamoto T, Matsumura A, Hiratsuka J, Miyatake S, Kato I, Sakurai Y, Kumada H, Shrestha SJ, Ono K: Early clinical experience utilizing scintillator with optical fiber (SOF) detector in clinical boron neutron capture therapy: its issues and solutions. *Radiat Oncol.* 11:105, 2016
DOI: 10.1186/s13014-016-0680-0.

Yoshida F, Yamamoto T, Nakai K, Zaboronok A, Matsumura A: Additive effect of BPA and Gd-DTPA for application in accelerator-based neutron source. *Appl Radiat Isot.* 106: 247-50, 2015
DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.07.030.

Zaboronok A, Yamamoto T, Nakai K, Yoshida F, Uspenskii S, Selyanin M, Zelenetskii A, Matsumura A. Hyaluronic acid as a potential boron carrier for BNCT: Preliminary evaluation. *Appl Radiat Isot.* 106: 181-4, 2015
DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.08.020.

Okamoto E, Yamamoto T, Nakai K, Fumiyo Yoshida, Matsumura A: Detection of DNA double-strand breaks in boron neutron capture reaction. *Appl Radiat Isot.* 106:185-8, 2015
DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.08.019.

Sato E, Yamamoto T, Shikano N, Ogura M, Nakai K, Yoshida F, Uemae Y, Takada T, Isobe T, Matsumura A: Intracellular boron accumulation in CHO-K1 cells using amino acid transport control. *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 88, 99-103, 2014
DOI: 10.1016/j.apradiso.2013.12.015.

〔学会発表〕(計 7 件)

山本哲哉: グリオーマ地域連携の現状と課題. 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会. 福岡国際会議場, 福岡県福岡市, 2016.9.29

山本哲哉: 0 番元素の使い方 中性子を利用したものづくりや医療 「中性子で難治性ガンを狙い撃つ」 ついにはじまった! 病院内併設加速器中性子装置による新たな治療. 日本中性子学会市民講座, 名古屋市科学館, 愛知県名古屋市, 2016.12.3

Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Aihara T, Sato E, Isobe T, Matsumura A, Symposium: Neutron and X-rays. Invited lecture. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for glioblastoma, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Royal Hawaiian Hotel, Honolulu,

USA, 14th-18th Dec 2015
Yamamoto T, Symposium: Evening session.
Review “Spectroscopic Tools for the
Treatment of Cancer”, The 2015
International Chemical Congress of Pacific
Basin Societies, Sheraton Waikiki Hotel,
Honolulu, USA, 14th-18th, Dec 2015

Yamamoto T, Invited lecture. Clinical
Workshop for Hadron therapy and NCT.
Clinical trials for glioblastoma: BNCT and
proton therapy in Tsukuba., 8th Young
Researchers BNCT Meeting, Cortile del
Broletto, Pavia, Italy, 15th-18th Sep 2015

Yamamoto T, Invited lecture. Boron
Neutron Capture Therapy in neurooncology:
Clinical results and development
perspectives, Congress of the Railroad
Neurosurgeons, International Symposium
“Modern Aspects of Neurosurgery” with a
Scientific and practical school of young
scientists, Irkutsk University Hospital, Irkutsk,
Russia, 27th-28th Jul 2015

山本哲哉：特別講演 脳原発悪性腫瘍に
おける治療上の課題と最近の動向．東京
理科大学総合研究機構(RIST TUS)トラ
ンスレーショナルリサーチ部門第7回公
開セミナー/研究交流会，東京理科大学，
千葉県柏市，2014.1.11

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

山本 哲哉 (YAMAMOTO, Tetsuya)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30375505

(2)研究分担者

中井 啓 (NAKAI, Kei)
茨城県立医療大学・保険医療額部・准教授
研究者番号：50436284

松村 明 (MATSUMURA, Akira)
筑波大学・医学医療系(副学長)・副学長
研究者番号：90241819

磯辺 智範 (ISOBE, Tomonori)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：70383643

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

吉田 文代 (YOSHIDA, Fumiyo)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：30261811

佐藤 英介 (SATO, Eisuke)
杏林大学・保健学部・助教
研究者番号：00439150