

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19982

研究課題名(和文)新規ホウ素化ポルフィリンの光線力学的治療およびホウ素中性子捕捉療法への有用性

研究課題名(英文) Application of a novel boronated porphyrin as a dual sensitizer for both PDT and BNCT

研究代表者

平松 亮 (Hiramatsu, Ryo)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：40609707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規ホウ素化ポルフィリンであるH20CP単一薬剤による光線力学的治療(Photodynamic therapy:PDT)およびホウ素中性子捕捉療法(Boron neutron capture therapy:BNCT)両治療への有用性を確認した。またポルフィリンと同じく大員環化合物であり、腫瘍親和性を有したクロリンが結合したホウ素化クロリンもホウ素化ポルフィリン同様にPDTおよびBNCT両治療に応用可能であり同様の実験を行い、有用性を示した。またその他の新規ホウ素化ポルフィリン/クロリンの薬剤絞り込みも同時に行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, H20CP as a novel boronated porphyrin has been proven to be a promising photosensitizer for PDT. H20CP has also been proposed as a potentially effective replacement of BPA or BSH, or as a replacement of both BPA/BSH. This study provides more evidence that H20CP could be an effective novel dual sensitizing agent for use in both PDT and BNCT. And Boronated chlorin as well as a boronated porphyrin is a large-ring compound and has a tumor affinity. So, boronated chlorin has also been proven to be a dual sensitizing agent for use in both PDT and BNCT. In this study, we also searched a useful drug for a dual sensitizing agent.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：悪性神経膠腫 BNCT PDT ホウ素化ポルフィリン CED ホウ素化クロリン

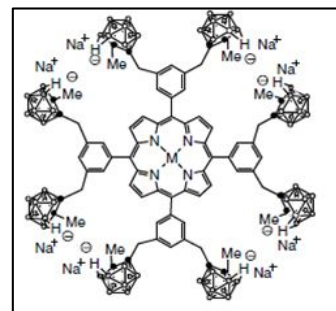
1. 研究開始当初の背景

(1) PDT とは、ポルフィリン関連化合物が有する腫瘍組織・新生血管への特異的な集積性と光の励起により発生する一重項酸素の強い細胞破壊効果を利用した治療法である。現在我が国では光感受性物質(フォトフィリン)による PDT として、早期肺癌・早期胃癌・早期食道癌・早期子宮頸癌に保険適応されており、大変良好な成績をあげている。脳腫瘍においては 5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた**術中蛍光ガイド下脳腫瘍摘出術**が膠芽腫患者の脳腫瘍摘出率および無増悪生存期間の延長に寄与したことが欧州より報告され、本邦においても 2013 年より悪性神経膠腫の腫瘍摘出術中における腫瘍組織の可視化(=**光線力学的診断 (Photodynamic diagnosis:PDD)**)として 5-ALA が認可され、現在多くの施設でこの薬剤が悪性神経膠腫の開頭術に使用されるようになってきている。また悪性脳腫瘍に対する PDT として 2013 年にタラポルフィンナトリウム(レザフィリン)が保険認可されており今後開頭術で摘出不能な機能野への治療として期待されている。一方 BNCT は、腫瘍細胞にホウ素 10 (boron-10, ^{10}B)化合物を取り込ませ、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ことにより、ホウ素が集積した腫瘍細胞のみを選択的に破壊するという、いわば細胞生物学的な標的治療である。BNCT の歴史は新しいものではないが、治療に利用できる中性子線が一部の限られた医療用原子炉からしか得られなかったことが大きな障壁となり、有効性が期待されつつも長年の間一部の利用者からの限定的な報告にとどまってきた。これを克服するために中性子を作り出すための加速器発生装置が国内外で開発され、現在既放射線治療再発悪性神経膠腫患者を対象とした加速器 BNCT による治験を実施している。**加速器中性**

子源は、原子炉中性子源に匹敵する中性子発生装置を医療用原子炉よりもはるかに小型でかつ安価に設置できるため、医療用原子炉とは異なり病院内の設置も可能となる。そのため現在の加速器 BNCT 治験が医療として認可されれば、今まで障壁となっていた医療用原子炉から脱却でき広く BNCT が広まるきっかけとなるであろう。これは 2011 年 3 月 11 日に起こった東北地震に関連して起こった福島第一原子力発電所事故後クローズアップされている**脱原子炉にもつながら**る内容でありこの治験の結果が待たれるところである。

(2) ポルフィリンは 電子を多く有しており、また両親媒性でミセル形成することが可能であるため lipoprotein(特に low-density lipoprotein(LDL)) に親和性が高い。一方腫瘍組織は LDL 活性が高く、そのためホウ素化ポルフィリンは腫瘍親和性を有している。そこで我々はこの腫瘍親和性を有したポルフィリンに着目し、ポルフィリンにホウ素クラスターを導入した**新規ホウ素化ポルフィリン** (octa-anionic 5,10,15,20-tetra[3,5-(nido-carboranyl)methyl]phenyl]porphyrin= H_2OCP) (**図 1**) を試作(ルイジアナ州立大学化学研究科との共同研究)し、この**薬剤単一**で PDT, BNCT **両治療**

図 1
ホウ素化ポルフィリン(H_2OCP)



に応用する実験的研究を計画した。ホウ素化ポルフィリンは PDT, BNCT に使用できる薬剤として以外に開頭術の際に、蛍光ガイド下腫瘍摘出術にも利用可能な薬剤で、一剤で開頭術および後療法に応用可能であり、悪性神経膠腫に対する治療には理想的な薬剤と思わ

れる。研究代表者はこの**新規ホウ素化ポルフィリン(H₂OCP)**を用い、PDTに関してはすでに *in vitro* study を行いその有効性を報告している(引用文献)。またその報告の中ではF98 rat glioma cellを用いた細胞内ホウ素濃度も確認しており、現在臨床で使用されているホウ素化合物のboronophenylalanine(BPA), sodium borocaptate(BSH)よりも細胞内ホウ素濃度が高い結果を示した(図2)。これはポルフィリン環の特性である腫瘍親和性がBPA, BSHより高いことを示唆し、今後この薬剤を BNCT

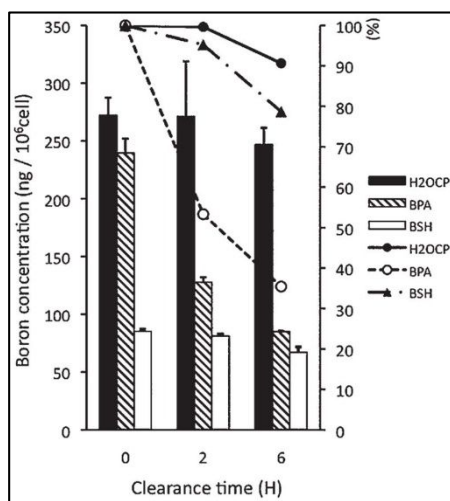


図2 F98 rat glioma cellを用いたホウ素細胞内取り込み実験(H₂OCPはBPA, BSHより細胞内ホウ素濃度を高くまた細胞外へのホウ素漏出をより少なく認めた)

の臨床応用するにあたり治療効果の向上が期待できる結果であった。しかし脳腫瘍治療の場合問題となってくるのは血液脳関門(BBB)である。BBBが存在するため他の抗癌剤同様浸潤部への薬剤送達は難しく、分子量が大きな**ホウ素化ポルフィリン**を単純に脳腫瘍の新規治療として期待することは出来ない。研究代表者はこれまでに BNCT 用ホウ素化合物として標的リポソームや、ホウ素化ポルフィリンの開発研究および成果報告に携わり、こういった分子量の大きい薬剤が経

静脈的投与では腫瘍集積が思わしくないことがわかっており、近年、中枢神経系悪性脳腫瘍に対する薬物投与方法として注目される **Convection enhanced delivery (CED)を応用することで解決してきた**。今回の研究では、動物実験を通じて**新規ホウ素化ポルフィリン(H₂OCP)**のCEDによる腫瘍組織および浸潤部腫瘍細胞内への導入し、ICP-AESによる腫瘍および正常組織内分布、BSH 特異的免疫染色による腫瘍細胞への薬物集積、励起光による腫瘍細胞の視認性および組織学的検討などを詳細に実施し、薬剤の至適投与条件を確認した。

2. 研究の目的

悪性神経膠腫、特に膠芽腫は5年生存率が10%以下と極めて予後不良で、その多くの場合で摘出腔隣接部からの局所再発を認める。そのため後療法には、腫瘍摘出後の周辺組織内に残存する浸潤腫瘍細胞に対しても高い制御が求められる。その中で**光線力学的療法(PDT)・ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)**といった細胞選択的局所制御能力にたけた治療法が注目されている。PDTは腫瘍に取り込まれる光感受性物質(主にポルフィリン誘導体)に励起光を照射することによって生ずる光化学反応を利用した治療で、一方BNCTは腫瘍に取り込まれたホウ素化合物に中性子を照射することによって放出される高線量エネルギー付与を利用した治療法である。本研究では、**このどちらにも適用可能な新規ホウ素化ポルフィリン(H₂OCP)単一薬剤による両治療への有用性に関し基礎的な検討**を加え、臨床応用への可能性を探った。

3. 研究の方法

(1) **新規ホウ素化ポルフィリンの作成、薬剤毒性評価および抗腫瘍細胞効果の検討**

国外研究協力者である Vicente 教授（ルイジアナ州立大学・化学研究科）とともに、PDT 用新規光感受性物質および BNCT 用新規ホウ素化合物として**新規ホウ素化ポルフィリン（H₂OCP）**を試作している。H₂OCP の合成はすでに確立しており高い合成吸収率となっている（引用文献）。そこで H₂OCP を用いた細胞内への停留時間、暴露濃度・時間の変化による薬剤細胞集積の特性を確認した。また PDT および BNCT での治療効果は、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、ポルフィリン環の蛍光特性を生かし蛍光顕微鏡による腫瘍細胞への薬物集積部位の確認を行い、さらにレーザーおよび中性子照射を行い実際の薬剤の殺腫瘍細胞効果も確認した。これらの実験と同時にさらなる候補化合物の作成を継続し、より効果の期待できる薬剤を模索した。

(2) 新規ホウ素化ポルフィリンのCED投与時の薬物動態の解明と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 Convection Enhanced Delivery (CED) により新規ホウ素化ポルフィリンを投与した後、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脳、対側脳など組織別に行った。

(3) 新規ホウ素化ポルフィリンの局在および正常脳に対する毒性の検討

実験動物健常脳に対し新規ホウ素化ポルフィリン(H₂OCP)を用いた CED を施行し、その投与後の脳を摘出し正常脳における化合物の分布を、ポルフィリン環の蛍光特性を生かし蛍光顕微鏡を用い確認し、また担腫瘍脳における新規ホウ素化ポルフィリン(H₂OCP)の分布を、健常脳と同様の CED 投与条件を用いて同様に確認した。さらに担脳腫瘍動物（ラットおよびマウス）モデルにおける新規ホウ素化ポルフィリン(H₂OCP)の全身投与および CED 投与時の正常脳に対する安全性を検討し組織学的検索も加えた。

すべての動物実験は、大阪医科大学動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

4. 研究成果

(1) H₂OCP を用いた細胞内ホウ素取り込み量

比較実験：H₂OCP と現在までに臨床 BNCT で使用されてきたホウ素化合物(BPA, BSH)との比較で腫瘍細胞への集積特性（停留時間、暴露濃度・時間の変化による薬剤細胞集積）について確認を行った。結果は BPA よりも多い細胞内ホウ素取り込み量を、また BSH と同等の停留能力を有していることが証明された。

(2) H₂OCP を用いた In vitro / vivo PDT study

および Ex vivo PDT study：H₂OCP を用いた PDT に関しては *In vitro* study にて 10 μg ¹⁰B/ml H₂OCP に 18 時間暴露後、8J/cm² のレーザー照射を行い surviving fraction にて 0.05 以下の非常に高い殺腫瘍効果を確認した。また *Ex vivo* study でも *in vitro* study と同様の結果で H₂OCP を用いた PDT 治療を行った群が未治療群と比較して有意差をもって生存期間の延長（生存中央値はそれぞれ 14 日、12 日（log-rank test, P<0.05））を認めめた。

(3) H₂OCP を用いた蛍光顕微鏡写真：ホウ素化ポルフィリンの細胞内局在も確認し、細胞内に取り込まれていることを証明した。

(4) H₂OCP を CED にて投与した腫瘍内および各臓器内ホウ素濃度測定

(Biodistribution)：CED 直後、24 時間後、48 時間後の腫瘍ホウ素濃度がそれぞれ 0.94±0.69、0.38±0.38、0.11±0.14 μg ¹⁰B/ml で、対側正常脳は 0.31±0.16、0.18±0.20、0.07±0.09 μg ¹⁰B/ml で腫瘍/正常脳 (=T/N 比) はそれぞれ 3.61、1.65、3.67 であり *in vitro* study の結果と解離を認めた。また全身各臓器内ホウ素濃度はどれも低いものであった。

(6) その他新規ホウ素化ポルフィリンおよびクロリンの模索：東京工業大学中村教授より新規ホウ素化ポルフィリンの提供を、国外研

究協力者であるレイジアナ州立大学の Vicente 教授より新規ホウ素化クロリンの提供を受け H₂OCP と同様の実験を行った。ポルフィリンと同じく複素環式芳香族炭化水素であるクロリンが結合したホウ素化クロリンもホウ素化ポルフィリン同様に PDT および BNCT 両治療に応用可能であり期待されており、この新規ホウ素化クロリンも薬剤絞り込みの中に含め検討を行った。

<引用文献>

Hiramatsu R, Kawabata S, Miyatake S, Kuroiwa T, Easson MW, Vicente MGH., Application of a novel boronated porphyrin (H₂OCP) as a dual sensitizer for both PDT and BNCT., *Lasers Surg Med.*, 2011 Jan;43(1):52-8.
Gottumukkala V, Luguay R, Fronczek FR, Vicente MG., Synthesis and cellular studies of an octa-anionic 5,10,15,20-tetra[3,5-(nido-carboranyl methyl)phenyl]porphyrin (H(2)OCP) for application in BNCT., *Bioorg Med Chem.*, 2005 Mar 1;13(5):1633-40.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Futamura G, Kawabata S, Nonoguchi N, Hiramatsu R, Toho T, Tanaka H, Masunaga S, Hattori Y, Kirihata M, Ono K, Kuroiwa T, Miyatake S-I, Evaluation of a novel sodium borocaptate-containing unnatural amino acid as a boron delivery agent for neutron capture therapy of the F98 rat glioma., *Radiat Oncology*, 査読有, 2017 Jan 23;12(1):26
DOI: 10.1186/s13014-017-0765-4.

Miyatake S-I, Kawabata S, Hiramatsu R, Kuroiwa T, Suzuki M, Kondo N, Ono K, Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Brain Tumors., *Neurologia medico-chirurgica*, 査読有, 2016 15;56(7):361-371.

DOI: 10.2176/nmc.ra.2015-0297.

中村浩之、立川将士、平松亮、川端信司、

黒岩敏彦、ホウ素クラスター含有水溶性プロトポルフィリン誘導体の合成と PDT 効果、*日本レーザー医学会誌*、査読無、2016、37(2);210

Hiramatsu R, Kawabata S, Tanaka H, Sakurai Y, Suzuki M, Ono K, Miyatake S-I, Kuroiwa T, Hao E, Vicente MGH. Tetrakis(p-carboranylthio-tetrafluorophenyl)chlorin (TPFC): application for photodynamic therapy and boron neutron capture therapy., *J Pharm Sci.*, 査読有, 2015 Mar;104(3):962-70.
DOI: 10.1002/jps.24317.

〔学会発表〕(計12件)

川端 信司、鈴木 実、田中 浩基、平松 亮、上原 幸樹、佐藤 岳実、黒岩 敏彦、小野 公二、宮武 伸一、再発悪性神経膠腫に対する加速器 BNCT 第一相試験の結果、2016 年 12 月 4 日~6 日、第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会、「甲府富士屋ホテル(山梨県・甲府市)」

川端 信司、平松 亮、松下 葉子、古瀬 元雅、鈴木 実、増永 慎一郎、小野 公二、宮武 伸一、黒岩 敏彦、ホウ素中性子捕捉療法による再発悪性神経膠腫に対する臨床試験、2016 年 10 月 6 日~8 日、第 75 回日本癌学会学術総会、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

平松 亮、竹内 孝治、川端 信司、松下 葉子、古瀬 元雅、鈴木 実、増永 慎一郎、小野 公二、宮武 伸一、黒岩 敏彦、新規ホウ素化ポルフィリン(BNH₂-PpIX)の有用性、2016 年 10 月 6 日~8 日、第 75 回日本癌学会学術総会、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

Kawabata S, Hiramatsu R, Takeuchi K, Shiba H, Matsushita Y, Kuroiwa T, Tanaka H, Sakurai Y, Suzuki M, Ono K, Miyatake S-I, Clinical results of reactor-based BNCT using BPA for the patients with

recurrent malignant glioma、2016年10月2日～7日、17th International Congress on Neutron Capture Therapy、「Missouri (USA)」

川端 信司、平松 亮、黒岩 敏彦、田中 浩基、鈴木 実、小野 公二、上原 幸樹、佐藤 岳実、宮武 伸一、加速器中性子源を用いたホウ素中性子捕捉療法の再発悪性神経腫瘍に対する第一相試験、2016年9月29日～10月1日、第75回日本脳神経外科学会学術集会、「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」

Takeuchi K、Kawabata S、Hiramatsu R、Matsushita Y、Kuroiwa T、Tanaka H、Sakurai Y、Suzuki M、Ono K、Miyatake S-I、Boron neutron capture therapy for high-grade skull base meningioma、2016年6月14日～17日、7th International Congress of the World Federation of Skull Base Societies、「Osaka (Japan)」

川端 信司、宮武 伸一、竹内 孝治、平松 亮、松下 葉子、野々口 直助、古瀬 元雅、鈴木 実、小野 公二、黒岩 敏彦、ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)による再発悪性神経腫瘍の治療～現状と展望、2015年12月6日～8日、第33回日本脳腫瘍学会学術集会、「グランドプリンスホテル京都(京都府、京都市)」

川端 信司、宮武 伸一、平松 亮、松下 葉子、古瀬 元雅、黒岩 敏彦、鈴木 実、小野 公二、再発悪性神経腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法の臨床試験、2015年10月29日～31日、第53回日本癌治療学会学術集会、「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

川端 信司、宮武 伸一、竹内 孝治、平松 亮、二村 元、松下 葉子、池田 直廉、野々口 直助、古瀬 元雅、鈴木 実、小野 公二、黒岩 敏彦、悪性神経腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法を用いた新たな治療

戦略、日本脳神経外科学会第74回学術総会、2015年10月14日～16日、「ロイトン札幌(北海道・札幌市)」

平松 亮、川端 信司、田中 浩基、櫻井 良憲、鈴木 実、小野 公二、宮武 伸一、黒岩 敏彦、Hao Erhong、Vicente. MGH、新規ホウ素化クロリンを用いた PDT および BNCT の効果、第12回日本中性子捕捉療法学会学術大会、2015年9月4日～5日、「神戸学院ポートアイランドキャンパス(兵庫県・神戸市)」

Hiramatsu R、Kawabata S、Tanaka H、Sakurai Y、Suzuki M、Ono K、Miyatake S-I、Kuroiwa T、Hao E、Vicente MGH、Tetrakis(*p*-carboranylthio-tetrafluorophenyl)chlorin (TPFC) : Application for photodynamic therapy and boron neutron capture therapy、2015年5月25日～29日、15th International Congress of Radiation Research、「Kyoto (Japan)」

川端 信司、宮武 伸一、平松 亮、松下 葉子、野々口 直助、古瀬 元雅、黒岩 敏彦、田中 浩基、櫻井 良憲、鈴木 実、小野 公二、原子炉を中性子源としたホウ素中性子捕捉療法による再発悪性神経腫瘍の臨床試験成績、第24回定位放射線治療学会、2015年5月15日「長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 亮 (Hiramatsu Ryo)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：40609707

(2) 研究協力者

M. Graça H. Vicente

Department of Chemistry, Louisiana State University