

令和元年6月19日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06811

研究課題名（和文）ホウ素中性子捕捉療法の治療に用いるホウ素薬剤の腫瘍組織分布不均一性機序を解明する

研究課題名（英文）Elucidating the cause of the heterogeneous distribution of boron drugs used for boron neutron capture therapy

研究代表者

渡邊 翼（Tsubasa, Watanabe）

京都大学・複合原子力科学研究所・助教

研究者番号：30804348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：ホウ素中性子捕捉療法に主に用いられるホウ素薬剤4-Borono-L-phenylalanine (L-BPA)の腫瘍組織内での分布を検討した。マウス由来腫瘍細胞T3M4をマウス皮下へ投与し腫瘍組織を形成させ、L-BPAの投与を行い、腫瘍組織を取り出して解析した。その結果、(1) アミノ酸トランスポーターLAT1の腫瘍内での発現パターンは一樣で、壊死領域・血管構造などとの明らかな相関は認められなかった。(2)血管構造が少ない腫瘍組織領域においても比較的多くのL-BPAが分布していることがわかった。(3) 腫瘍間質内のL-BPAの集積の程度は血管内のL-BPAの集積と同程度であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、4-Borono-L-phenylalanine (L-BPA)を主に臨床の場でも用いるホウ素中性子捕捉療法の治療抵抗性を考える上で重要な知見であると考えられる。従来、血流の違い・低酸素領域・がん細胞それぞれのアミノ酸要求やアミノ酸トランスポーターの発現の程度の違いなどに影響され、腫瘍組織内でのL-BPAの分布は著しく不均一ではないかと予想されていた。しかし、我々が用いたマウスモデルでの結果によると予想に反してL-BPAは腫瘍組織内で比較的均一に分布していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We examined the distribution of 4-Borono-L-phenylalanine (L-BPA), which is mainly used for boron neutron capture therapy, in the tumor tissue. Syngeneic mice tumor cell lines, T3M4, was used to analyse the distribution of L-BPA in the tumor tissue. The summary of our findings are as follows: (1) The distribution of the L-type amino acid transporter (LAT1) was homogeneous in the tumor tissue of our mice model regardless of necrotic area and vascular structures. (2) L-BPA can reach even in the area with poor vascular structures. (3) L-BPA distribution of the tumor parenchyma was similar to that of inside the blood vessel.

研究分野：放射線生物学、放射線治療学、ホウ素中性子捕捉療法

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 BNCT L-BPA 腫瘍組織内薬剤不均一分布

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究の目的研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法とは、ホウ素原子の同位体( $^{10}\text{B}$ )が速度の遅い中性子を取り込み、線と $^7\text{Li}$ 粒子に分裂する物理反応(中性子捕捉反応)を応用したがん治療法である。この中性子捕捉反応後に放出される各粒子の飛程は $10\ \mu\text{m}$ 未満と一般の細胞の直径に満たず、中性子を用いるエネルギーが小さいためそれ自身の生物学的影響は少ない。従って、 $^{10}\text{B}$ 原子を薬剤の形で内包させたホウ素薬剤を作成し、ホウ素原子をがん細胞内へ選択的に送達することができれば、その後中性子を体外から腫瘍組織へ照射することにより周囲の正常組織には影響が少なく、がん細胞のみを選択的に照射することが理論的には可能である。この理論は中性子が発見された1932年からわずか4年後にすでに提唱されたが、当時はホウ素薬剤の開発もされておらず、また臨床へと応用しにくい原子炉をベースとした中性子源のみしかないとため実際に臨床へ応用するには様々な課題を克服する必要がある。主に本邦の研究者・医学者による理想的なホウ素薬剤を開発するためのたゆみない研究努力と、中性子を患者へ安定的に照射できる装置の開発努力とが実を結び、ホウ素中性子捕捉療法実用化の可能性が現実のものとなってきた。

体内に発生した1つのがん細胞が時間をかけて増殖して大きくなり腫瘍組織を形成するが、がん細胞が増殖する過程で遺伝子の突然変異や血流・代謝産物の多寡といった腫瘍組織内における微小環境への適応が起こり、腫瘍組織内のがん細胞はそれぞれ異なった形質を獲得している。これを腫瘍組織の不均一性と呼ぶ。この腫瘍内のがん細胞は均一な集団ではないということが放射線・化学療法を含めたがん治療抵抗性の原因の一助となっている。この治療抵抗性の原因はホウ素中性子捕捉療法に用いる薬剤の腫瘍内分布にも他の化学療法に用いる薬剤と同様に影響を及ぼしている可能性があるが、腫瘍組織の不均一性とホウ素中性子捕捉療法に用いるホウ素薬剤の腫瘍内分布についての相関関係に焦点を当てた研究・報告はこれまでなかった。

上記の如くホウ素中性子捕捉療法は中性子照射後ホウ素原子が存在する場所から $10\ \mu\text{m}$ 未満とごく狭い領域を選択的に照射できる特殊な放射線治療であるが故に、もしも腫瘍組織の中でホウ素薬剤をまったく取り込まないがん細胞が存在すれば、ホウ素中性子捕捉療法による根治性は弱まってしまう可能性が懸念として考えられる。ただし、たとえがん細胞がまったくホウ素薬剤を取り込んでいないとしても、腫瘍組織内でがん細胞が密に隣り合っている場合は近傍に位置するがん細胞がホウ素薬剤を取り込んでいれば中性子捕捉反応によって生じた核粒子がホウ素薬剤を取り込んでいない細胞にも到達する。また、腫瘍組織内においてがん細胞が存在しない領域(間質)にもホウ素薬剤は分布しており、間質液はがん細胞を取り囲んでいるため、間質液に存在するホウ素薬剤もがん細胞に殺細胞効果を与えることができるのに対して、正常細胞はがん細胞にくらべて細胞の直径が大きく、かつ核/細胞質比が小さいため、間質液中のホウ素薬剤が正常組織へ与える影響は少ないという点には留意が必要である (Minoru Suzuki *et al.* Japanese Journal of Cancer 2000;91:1058, Koji Ono *et al.* Journal of Radiation Research 2019;60:29-36.)。

ホウ素中性子捕捉療法に用いられるホウ素薬剤のうち、現在主に用いられる薬剤は4-Borono-L-phenylalanine (L-BPA)と呼ばれるアミノ酸の1つチロシンの水酸基をホウ酸により置換したアミノ酸の誘導体である。L-BPAはアミノ酸トランスポーターを介して腫瘍組織内の間質液からがん細胞内へと取り込まれていることが知られている。アミノ酸需要が高いがん細胞において発現が亢進しているL-アミノ酸トランスポーター1(L-type amino acid transporter 1, LAT1)が主にL-BPAの取り込みに関与し、より代謝が活発ながん細胞ほどよりL-BPAを取り込むと考えられる。

### 2. 研究の目的

これらの背景をもとに、本プロジェクトにより、L-BPAの腫瘍内分布に影響を与える因子として、がん細胞のアミノ酸トランスポーター(LAT1)の発現、腫瘍組織内の血流分布、腫瘍組織内の低酸素領域に着目し、腫瘍内の不均一性がホウ素中性子捕捉療法に用いるホウ素薬剤の腫瘍内分布へ与える影響をマウスを用いた実験により調べ、ホウ素中性子捕捉療法を用いてヒトの腫瘍を根治するための足がかりを得たいと考えた。

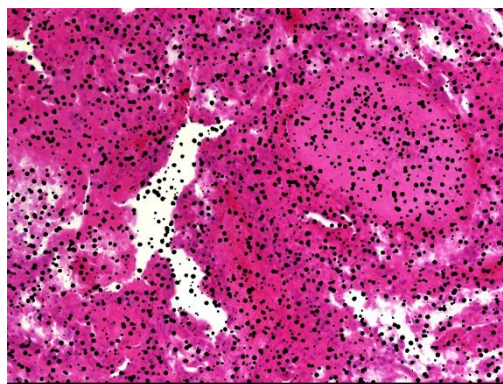
本プロジェクトの意義を考える際の例として、L-BPAの腫瘍組織内におけるマイクロ分布を把握・制御することの重要性を示唆する事象をあげる。L-BPAの分布を画像化するためにフッ素の同位体( $^{18}\text{F}$ )をL-BPAに結合させたpositron emission tomography(PET)用の薬剤の作成もされており、この薬剤を用いることにより生体内でのL-BPAの挙動を侵襲が少なく画像化できるようになっている。このL-BPAのPET製剤を用いてがん患者の腫瘍組織内におけるL-BPAの分布を画像化し治療効果を予測できる可能性がある。実際にごん患者においてPETの画像にて腫瘍組織に十分にL-BPAが集積している場合に、ホウ素中性子捕捉療法後に優れた効果を認める臨床例が多い一方で、PETの画像では腫瘍組織に十分にL-BPAが集積しているように見えても、ホウ素中性子捕捉療法を行った後の治療効果が十分ではなく再発に至ってしまう症例も経験する。原因としてPETにより画像化されるL-BPAの腫瘍組織内分布の解像度には限界があるため、腫瘍組織内のマイクロレベルでのL-BPAの分布をうまく反映できていない可能性が示唆される。本プロジェクトによりL-BPAの腫瘍組織における不均一機序の原因を同定できれば、L-BPAの腫瘍内における不均一分布を改善する糸口を見つけられることにつながり、ホウ素中性子捕捉療法の抗腫瘍効果を将来的に高めることができる可能性がある。

### 3. 研究の方法

まず、固体飛跡検出器 CR39 を用いて L-BPA の組織内分布を正確に同定できる実験系を構築した。次に、LAT1 の発現が多いことがしられるマウス由来腫瘍細胞 T3M4 をマウス皮下へ投与して腫瘍組織を形成させ、L-BPA の投与を行い、腫瘍組織を取り出した。腫瘍組織の切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン染色・免疫組織染色を行い組織構造と LAT1 などのタンパクの発現の位置関係を調べるとともに、同じ組織サンプルを用いて固体飛跡検出器 CR39 により オートラジオグラフィーの手法を用いてホウ素原子の切片中の位置を正確に可視化し、L-BPA の分布の腫瘍組織内におけるマイクロレベルでの分布を解析した。血管構造は腫瘍組織を取り出す前にヘキストを静脈内へ注入することで同定した。

### 4. 研究成果

固体飛跡検出器 CR39 上の オートラジオグラフィーの手法を用いて形成される L-BPA の  $^{10}\text{B}$  原子由来のピットの円形度を、正円に近いもののみを選択することで実際の L-BPA の組織中の位置と検出されるピットの位置の誤差は 3-7  $\mu\text{m}$  程度となる実験系を構築できた。LAT1 の発現の腫瘍組織内でのパターンは一様で、壊死領域・血管構造などのとの明らかな相関は認められなかった。オートラジオグラフィーにより L-BPA の腫瘍組織内での分布を可視化したところ、血管構造が多い腫瘍組織の領域ではより多くの L-BPA が分布していた一方で、予想に反し血管構造が少ない腫瘍組織の領域(壊死領域も含む)にも比較的多くの L-BPA が分布していることが分かった。壊死領域の L-BPA の分布の程度は腫瘍間質内の分布と同程度であった。L-BPA が低分子であることから、血管構造が少ない腫瘍組織領域においても拡散により均一に分布できているものと考えられる。オートラジオグラフィーから推測される腫瘍間質内の L-BPA の集積度合いは、血管内の L-BPA の集積度合いとほぼ同程度であった(右図: オートラジオグラフィーの結果, 腫瘍細胞 T3M4)。



以上のことから、少なくとも我々が用いたマウス皮下腫瘍モデルにおいては L-BPA は腫瘍組織内にて血流が少ない領域にも比較的均一に分布していることがわかった。L-BPA の腫瘍組織内での分布は不均一であるという仮定の下で進めたプロジェクトであったため、この結果には驚いた。また、腫瘍組織内の壊死領域にも比較的 L-BPA が分布していたことも予想に反する結果であった。

これらの結果を踏まえ、今後予定している実験は以下の通りである。オートラジオグラフィーの手法による L-BPA の位置測定精度をさらに向上させるとともに、トランスポーターの腫瘍組織内での分布・腫瘍組織内での血流分布を定量化し、オートラジオグラフィーにより同定された L-BPA の分布との相関性を比較する、より大きな腫瘍組織を用いて臨床に近い L-BPA の腫瘍組織内分布の状況を再現して同様の検討を行う、他の腫瘍モデル(LAT1 の発現が少ない腫瘍細胞ラインなど)を用いて同様の実験を行い比較検討を行う、LAT1 だけでなく他のアミノ酸トランスポーターの発現(LAT2, ATB0,+など)と L-BPA の分布との関連も明らかにする、Hif-1 および Pimonidazole での染色も加え腫瘍微小環境の違いと L-BPA の分布の違いを明らかにしていく。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Hiroki Tanaka, Takushi Takata, Y Ishi, T Uesugi, Y Kuriyama, Tsubasa Watanabe, Yoshinori Sakurai, Shinji Kawabata, Shin-ichiro Masunaga, Minoru Suzuki. "Development of proton beam irradiation system for small animals using FFAG accelerator" Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment 2019;922:230-234. 査読有り  
<https://doi.org/10.1016/j.nima.2018.12.081>

Koji Ono, Hiroki Tanaka, Yuki Tamari, Tsubasa Watanabe, Minoru Suzuki, Shin-ichiro Masunaga. "Proposal for determining absolute biological effectiveness of boron neutron capture therapy - the effect of  $^{10}\text{B}(n, \gamma)^7\text{Li}$  dose can be predicted from the nucleocytoplasmic ratio or the cell size" Journal of Radiation Research 2019;60:29-36. 査読有り  
<https://doi.org/10.1093/jrr/rry080>

Yuki Wada, Katsumi Hirose, Takaomi Harada, Mariko Sato, Tsubasa Watanabe, Akira Anbai, Manabu Hashimoto, Yoshihiro Takai. "Impact of oxygen status on  $^{10}\text{B}$ -BPA uptake into human glioblastoma cells, referring to significance in boron neutron capture therapy" Journal of Radiation Research 2018;59:122-128. 査読有り  
<https://doi.org/10.1093/jrr/rrx080>

Shin-ichiro Masunaga, Keizo Tano, Yu Sanada, Yoshinori Sakurai, Hiroki Tanaka, Minoru

Suzuki, Natsuko Kondo, Tsubasa Watanabe, Takushi Takata, Akira Maruhashi, Koji Ono. "Effect of Tirapazamine, Metformin or Mild Hyperthermia on Recovery from radiation-induced damage in pimonidazole-unlabeled quiescent tumor cells", World Journal of Oncology 2017;8:137-146. 査読有り

<https://doi.org/10.14740/wjon1058w>

Hiroki Tanaka, Yoshinori Sakurai, Takushi Takata, Tsubasa Watanabe, Shinji Kawabata, Minoru Suzuki, Shin-Ichiro Masunaga, K Taki, K Akabori, K Watanabe, Koji Ono. "Note: Development of real-time epithermal neutron detector for boron neutron capture therapy", Review of Scientific Instruments 2017;88:056101. 査読有り

<https://doi.org/10.1063/1.4982036>

〔学会発表〕(計 2件)

Tsubasa Watanabe, Gabriele Niedermann

25. Jahrestagung der DEGRO (Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie e.v.), Münster, Germany (June 2019), 番号 VS13-5-jD (口頭発表)

IDO-inhibierung potenziert die Effekte von kombinierter Strahlentherapie und Immuncheckpoint-Blockade

Tsubasa Watanabe, Gabriele Niedermann

ESTRO conference 38 (European Society for Radiotherapy & Oncology), Milan, Italy (April 2019), 番号 OC-0152 (口頭発表)

IDO inhibition strongly enhances effects of combined hRT and PD1/PD-L1 checkpoint blockade

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。