

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2008 ～ 2010
課題番号：	20591728
研究課題名（和文）	中性子捕捉療法及び光線力学的治療双方に利用可能な新規硼素化ポルフィリンの有用性
研究課題名（英文）	Usefulness of novel boronated porphyrins for both BNCT and PDT
研究代表者	
川端 信司	(Kawabata Shinji)
大阪医科大学・医学部・助教	
研究者番号：	20340549

研究成果の概要（和文）：

ホウ素化ポルフィリン化合物では、初回の手術時にPDD用途として術前投与し、術中照射としてPDTを行い、その際の摘出腫瘍の濃度を個々の患者で実測可能である。これにより、後療法としてBNCTを行う際に、この実測値を適応判断・線量評価に使用できるといった利点が考えられた。ホウ素化ポルフィリンは、視認性に富み、腫瘍に高集積を示すことから、PDTおよびBNCT双方での治療効果を大いに期待できる。

研究成果の概要（英文）：

In the boronated porphyrin, we give it as a PDD use at initial surgery in preoperation and perform PDT as intraoperative irradiation and would be able to measure the boron contents of the tumor in the individual patient. An advantage to be able to use this actual value in a judgment of indication, dose assessment was, thereby, thought about when we performed BNCT following surgery. Because the boronated porphyrin is full of visibility and shows high accumulation for the tumor, this compound can expect effect of treatment in the both PDT and BNCT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍、粒子線治療、ポルフィリン、中性子捕捉療法、神経膠腫、光線力学療法、Convection enhanced delivery

1. 研究開始当初の背景

硼素中性子捕捉療法用の新規硼素化合物として硼素化ポルフィリンを用い、治療効果、安全性に関し詳細に検討を加える。また光線

力学的治療・診断の有用性に関し検討を加える。悪性脳腫瘍に対する治療法は現在、可及的外科的切除及び放射線分割外照射が標準的治療法として用いられ、神経膠芽腫の生存期

間中央値は12ヶ月とされる。最近では、大規模臨床試験の結果、テモゾロミドの投与に治療効果があったとされ標準治療となったが、これをもってしても約14ヶ月であり、生存期間の延長は2ヶ月程度にとどまった。近年新たな放射線治療法として、定位的放射線治療やIMRT、粒子線治療などが注目され、悪性脳腫瘍においてもその効果が期待される場所である。しかしながら、強い浸潤性性格を有する悪性脳腫瘍においては、画像誘導下に空間的な線量計画を行うこれらの手法は、多少の延命効果が期待されるものの再発予防・治療という観点からはやはり限界がありその効果は期待しがたく、これらの治療法は単に外科的切除の一助にとどまるものとする。悪性脳腫瘍に対する治療は、その浸潤部においても周囲正常脳細胞と明らかなコントラストを保った腫瘍細胞選択的な治療法が不可欠であり、我々は以前から腫瘍細胞選択性を有する硼素中性子捕捉療法(boron neutron capture therapy; BNCT)に注目し、臨床応用を試みてきた。

硼素中性子捕捉療法(BNCT)の骨子は、腫瘍細胞に boron-10(^{10}B)化合物を取り込ませた後、中性子を照射することで、高線エネルギー付与 (high LET) の α 粒子が飛程10 μm で放出されることにより、硼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 **targeting** にある。特筆すべきは投与する硼素化合物および照射する中性子が、各々単一では無害であることで、両者が相まって始めて殺細胞効果を示す **Binary approach** であることである。我々はこの治療法をさらに改善し、2002年より2007年9月末までに悪性神経膠腫および悪性髄膜腫患者72例に対して、BNCTを用いた治療を行い、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いる。生命予後・機能予後を含めた治療成績の向上には、いかにして硼素化合物を腫瘍細胞に選択的に集積させるかが重要となる。そこで今回我々は、より治療効果の高い新たな硼素化合物として、ポルフィリン骨格を有する硼素化合物(硼素化ポルフィリン)をBNCTに応用した実験的研究を計画した。ポルフィリン誘導体は、機序は未だに明確にされていないものの、悪性腫瘍において積極的な取り込みを示し、高い腫瘍細胞選択性が期待される。ポルフィリンは近年、光線力学療法・診断に需要が高く、一部はすでに臨床応用されている。また生体親和性も高く、毒性を軽減する種々の工夫がなされてきた。今回BNCT用治療薬として用いる硼素化ポルフィリンは、分子量約1300~1700で、硼素(^{10}B)

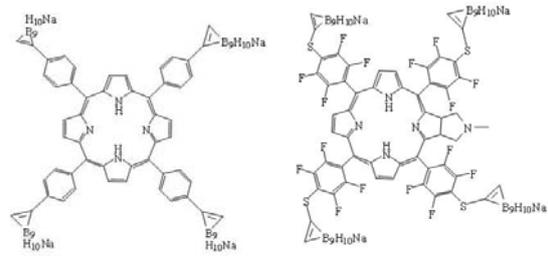


図1. 硼素化合物 H₂TCP (左) および TFCC (または TPFC) (右)

の含有率は約30%である。脳腫瘍においては他の抗癌剤と同様、血液脳関門 (BBB) の問題を有するため、これらの薬剤、特に分子量や薬物サイズが大きな薬剤を単純に脳腫瘍の治療として当てはめることは出来ない。最近では、分子標的を有する硼素化合物として **EGFR targeting** を中心とした研究が成果を上げており、研究者はこれらの研究および成果報告を分担してきた。これらの薬剤は分子量が大きく、経静脈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。

これまでも研究代表者は種々の硼素化ポルフィリンのBNCT用化合物としての有用性を研究してきた。中でも図1に示すH₂TCPは、水溶性で化合物自体の毒性が少なく、CEDにより腫瘍組織への高い選択的集積が見られ、中性子照射実験を行っている。しかしラット脳腫瘍モデルにおいて生存期間の延長が見られたものの、治療効果は不十分であった。その際に原因として考えられたのが、腫瘍細胞内に集積する化合物そのものの絶対量であり、より治療効果を高めるためにはより腫瘍細胞内集積率の高い化合物が必要であると考えた(図2)。

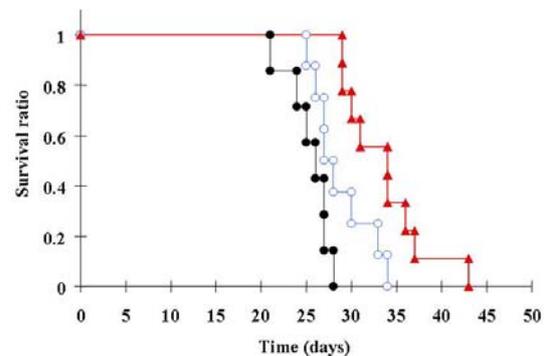


図2. ラット脳腫瘍モデルに対する治療効果。
黒：コントロール、青：硼素非含有化合物+中性子、赤：硼素含有化合物+中性子

今回の申請に向けて我々の行った準備研究では、新規化合物 TFCC 15mg/kg の全身投与

後 24 時間で、対血中濃度比が 6.2、正常脳比が 5.0 と良好な結果が得られているが、やはり絶対量の不足、肝・脾臓への集積が高いことが問題となる。対して現在臨床で使用している硼素化合物 BPA (boronophenylalanine) では、250mg/kg の投与で正常脳比が 3.5 前後で、投与量に依存して集積は高くなるがその比はほぼ一定であり、さらに投与後数時間をピークに速やかにクリアランスされ、治療のタイミングも限られる。これを見ても明らかに BNCT 用新規硼素化合物としての有用性は高いと言える。さらに今回用いる硼素化ポルフィリンは、細胞レベルでの取り込みも高い傾向を示しており (図 3、グリオーマ細胞株に対する H2TCP および TFCC の集積は、それぞれ 8.8、16.4 ng/10⁵cells であり、BPA の 2.6 倍を示した)、よりよい治療効果が期待できる。

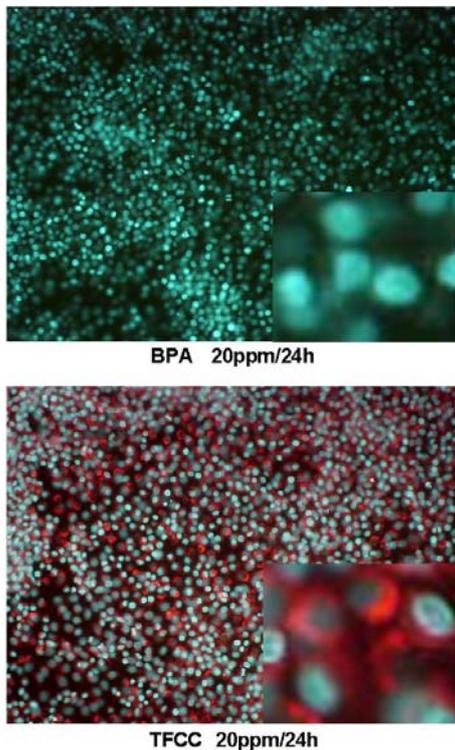


図 3. ラットグリオーマ細胞株における硼素化合物(TFCC or TPFCC) の集積 (蛍光顕微鏡下観察)

今回の研究を通じて我々は、硼素化ポルフィリンの BNCT 用新規ホウ素化合物としての有用性を検討し、臨床応用への可能性を探る。またポルフィリンはそれ自体が蛍光物質であり、硼素化ポルフィリンは薬物動態が視認可能であり、本研究では本薬剤の術中蛍光診断および光線力学療法への応用の可能性も同時に検討する。

CED は BBB を通過しない分子量の大きな薬剤を脳腫瘍に適応する場合の投与方法として注目され、すでに海外では fusion protein を用いた免疫毒素療法で臨床試験段階にあり、著

効例の報告も散見される。CED の原理は、脳内・脳腫瘍内にカテーテルを留置し、ごく微量を持続的に注入することによって発生する bulk flow を応用するもので、動物実験では従来の局注、拡散による薬剤分布と比べ、明らかに分布が均一かつ広範囲に、また安全に投与可能なことが示されている。また CED によって、従来分子量の大きな薬剤が到達困難とされてきた浸潤部細胞をも標的とすることが可能となる。

CED は脳腫瘍および周辺脳を含めて十分量の薬剤を分布させ、殺腫瘍細胞効果を期待する手技であり、そのためには薬剤そのものが腫瘍細胞に選択的毒性を有する必要がある。その点、BNCT に用いる硼素化合物は、薬剤そのものには毒性がないため、正常組織からのクリアランスを待ち、最適なコントラストが得られた時点で中性子照射を行えばよく、今回研究に用いる硼素化ポルフィリンは最適な組み合わせと考える。

また、脳腫瘍モデルに対し CED を用いて硼素化ポルフィリンを投与した動物実験の報告は存在するが、中性子照射や光線力学的診断・治療は行われてこなかった。これらを組み合わせて BNCT 及び光線力学的治療・診断に応用する試みは未だなされておらず、本研究が独創的な研究であるといえる。また今回の研究計画には、中性子照射実験までを含み、他に類をみない研究成果が期待でき、学術的意義は非常に高い。

2. 研究の目的

硼素中性子捕捉療法用の新規硼素化合物として図 1 に示す化合物を用い、治療効果、安全性に関し詳細に検討を加える。また光線力学的治療・診断の有用性に関し検討を加える。我々の行った準備研究では、硼素化ポルフィリン (TFCC (図 1)) 15mg/kg の全身投与後 24 時間で、対血中濃度比が 6.2、正常脳比が 5.0 と良好な結果が得られているが、絶対量の不足、肝・脾臓への集積が高いことが問題となる。今回はこれらの欠点を CED を用いて解決し、中性子照射による治療効果を検討する。また本研究では同時に光線力学的診断・治療に関する有用性を検討する。

3. 研究の方法

硼素化ポルフィリンの作成、抗腫瘍細胞効果の検討

海外研究協力者である MGH. Vicente 教授 (ルイジアナ州立大学 (米国)・化学) とともに、BNCT 用新規硼素化合物として上述のような化合物を作成する。これらの薬剤を用い

てグリオーマ細胞に対し、*in vitro* での集積および中性子照射時の治療効果に関し検討を行う。また光線力学的アプローチによる治療効果の可能性に関し、レーザー光照射を用いて検討する。

硼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 glioma 移植担脳腫瘍モデルラットに対し Convection Enhanced Delivery(CED)により硼素化ポルフィリンを投与した後、組織内硼素濃度を測定する。組織内硼素濃度は 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う。これらの実験により硼素包埋リポソ-ムの CED 投与時の薬物動態の解明と至適投与条件の検討を加える。

主な検討項目は、

- 1, 異なる化合物による集積の違い (化合物 A、B またはその他の新規硼素化ポルフィリン)
- 2, 投与方法による集積の違い (全身投与、局所投与または CED)
- 3, 異なる CED の条件による集積の違い (投与量、投与速度)

硼素化ポルフィリンの可視化および硼素化合物の局在の検討

実験動物健常脳に対し、CED により硼素化ポルフィリン投与後脳を摘出し、正常脳における化合物の分布を確認する。また担腫瘍脳における硼素化ポルフィリンの分布を同様の化合物を用いて確認する。蛍光物質局在の検討には共焦点レーザー顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いる。

中性子照射に関する実験

上記基礎実験での至的薬物投与条件を検討の上、以下の二つの実験を行う。

<治療実験 1 (BNCT への応用) >

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。

未治療

硼素化ポルフィリン (CED) + 中性子照射

硼素化ポルフィリン (CED) + iv BPA + 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う。

<治療実験 2 (光線力学療法、診断) >

担腫瘍ラット・マウスにおける光線力学治療の可能性につき検討する。また蛍光下での観察を *in vivo* で行い術中診断の可能性につき検討する。

未治療および硼素化ポルフィリン投薬のみ、硼素化ポルフィリン投薬+レーザー光照射の

各群において腫瘍縮小・抑制効果を検討する。

中性子照射実験は、京都大学原子炉実験所にて共同利用の申請を行い実施する。

4. 研究成果

硼素中性子捕捉療法 (BNCT) 用の新規硼素化合物として硼素化ポルフィリンを用い、治療効果、安全性に関し詳細に検討を加え、光線力学的治療 (PDT)・診断 (PDD) の有用性に関し検討を加えた。検討には、悪性神経膠腫細胞 (F98、U87)、ラット脳腫瘍モデル等を用いて行った。F98 ラット脳腫瘍モデルに CED を用いて新規硼素化ポルフィリンを投薬し、脳腫瘍および周囲脳・他臓器の硼素濃度を ICP により測定したところ、正常周囲脳に対し 30 倍の硼素集積を認めている。このモデルに対しレーザー光照射により PDT および PDT による治療効果・有用性を検討したところ、良好な視認性および有意な生存期間延長効果を認めた。本年度は特に、H2OCP によるホウ素の高集積および PDT による治療効果を示した。

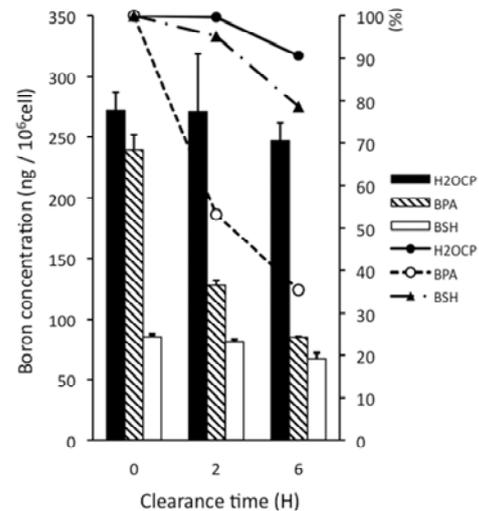


図4. H2OCP を用いた細胞へのホウ素集積

また H2TCP を用いた中性子照射実験での有意な生存期間延長効果に関し考察し、報告を行った。計画当初に有望と考えた TFCC (TPFC) に関しては、細胞および動物実験における非常に高い腫瘍集積から治療効果を期待したが、硼素濃度から概算した生存期間の十分な延長効果を示すことは出来なかった。

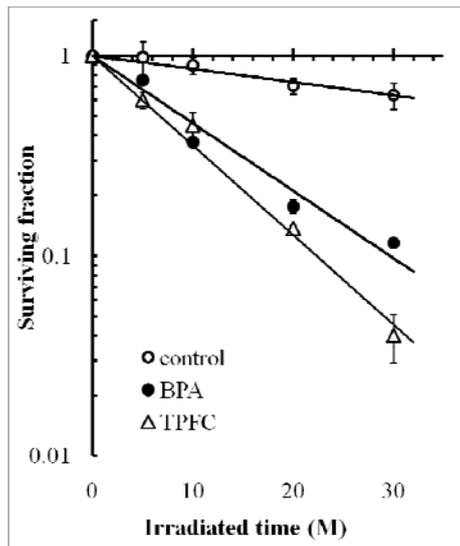


図5. TFCC (TPFC) を用いた細胞への中性子照射

本研究を通じて、ポルフィリン化合物では（初回）手術時にPDD用途として術前投与し、術中照射としてPDTを行い、その際の摘出腫瘍の濃度を個々の患者で実測し、後療法としてBNCTを行う際にこの実測値を適応判断・線量評価に使用できるといった利点が考えられた。

しかしながら、実験でも示したように、ホウ素化合物の高集積はそのまま中性子捕捉療法での線量付与には結びつかず、臨床応用に当たっては基礎研究を積み重ね、各々の薬剤および投薬経路によるCBEファクターの算出が必要であると考えられた。ホウ素化ポルフィリンは、視認性に富み、腫瘍に高集積を示すことから、PDTおよびBNCT双方での治療効果を大いに期待できる。

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12件）

- ① Miyata S, Kawabata S, Hiramatsu R, Doi A, Ikeda N, Yamashita T, Kuroiwa T, Kasaoka S, Maruyama K, Miyatake SI. CT imaging of transferrin targeting liposomes encapsulating both boron and iodine contrast agent by CED to F98 rat glioma for boron neutron capture therapy. **Neurosurgery**. (査読有) 68, 2011, 1380-1387.
- ② Hiramatsu R, Kawabata S, Miyatake S, Kuroiwa T, Easson MW, Vicente MG. Application of a novel boronated porphyrin

(H₂OCP) as a dual sensitizer for both PDT and BNCT. **Lasers Surg Med.** (査読有) 43, 2011, 52-8.

- ③ Kawabata S, Yang W, Barth RF, Wu G, Huo T, Binns PJ, Riley KJ, Ongayi O, Gottumukkala V, Vicente MG. Convection enhanced delivery of carboranylporphyrins for neutron capture therapy of brain tumors. **J Neurooncol.** (査読有) 103, 2011, 175-85.
- ④ 川端信司, 宮武伸一. 中性子捕捉療法. 新時代の脳腫瘍学. 診断・治療の最前線. **日本臨牀** (査読無) 68 (増刊号10), 2010, 427-431.
- ⑤ Kawabata S, Miyatake S, Kuroiwa T, Yokoyama K, Doi A, Iida K, Miyata S, Nonoguchi N, Michiue H, Takahashi M, Inomata T, Imahori Y, Kirihata M, Sakurai Y, Maruhashi A, Kumada H, Ono K. Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma. **J Radiat Res (Tokyo)**. (査読有) 50, 2009, 51-60.
- ⑥ 川端信司, 宮武伸一, 黒岩敏彦, 小野公二. グリオーマに対する中性子捕捉療法. **脳** 21. (査読無) 12, 2009, 102-107.
- ⑦ 川端信司, 宮武伸一, 宮田至朗, 横山邦夫, 大西恭子, 三木義人, 黒岩敏彦, 今堀良夫, 切畑光統, 小野公二. ホウ素中性子捕捉療法による悪性神経膠腫の治療効果. **定位放射線治療**. (査読無) 13, 2009, 23-30.
- ⑧ 川端信司, 宮武伸一, 宮下実, 宮田至朗, 平松亮, 嶽北葉子, 山田佳孝, 池田直廉, 黒岩敏彦, 今堀良夫. ¹⁸F-BPA-PETを用いた悪性脳腫瘍治療後の病態解析. **CI研究**. (査読有) 31, 2009, 145-151.

〔学会発表〕（計33件）

- ① 川端信司ほか, 悪性神経膠腫に対するホウ素中性子捕捉療法に関する最近の取り組み. 第28回日本脳腫瘍学会学術集会, 2010/11/28, 軽井沢
- ② R. Hiramatsu, S. Kawabataほか, Usefulness of the novel boronated porphyrins administered by convection enhanced delivery for photodynamic therapy. 2010 Meeting of Society for Neuro-Oncology, 2010/11/18, モントリオール, カナダ
- ③ 川端信司ほか, 膠芽腫に対するホウ素中性子捕捉療法, X線外照射, 化学療法～第II相臨床試験の近況. 第48回日本癌治療学会学術集会, 2010/10/30, 京都
- ④ 川端信司ほか, 悪性神経膠腫に対するホウ素中性子捕捉療法～多施設共同試験の概要と進捗状況～. 社団法人日本脳神経外科学会第69回学術総会, 2010/10/27, 福岡

- ⑤ R. Hiramatsu, S. Kawabataほか, 悪性神経腫への挑戦: ホウ素化ポルフィリンの convection enhanced deliveryを用いた光線力学的療法. 第69回日本癌学会学術総会, 2010/09/24, 大阪
- ⑥ R. Hiramatsu, S. Kawabataほか, 光線力学的療法の有用性: 新規ホウ素化ポルフィリンの convection enhanced delivery. Neuro 2010, 2010/09/02, 神戸
- ⑦ R. Hiramatsu, S. Kawabata, Y. Yamadaほか, New imaging assessment: functional Diffusion Map for glioblastoma patients treated by Boron Neutron Capture Therapy. The 7th Asian Society for Neuro-Oncology, 2010/06/12, 韓国、ソウル
- ⑧ S. Kawabata, N. Ikedaほか, Modified Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Glioma-Our Modified Protocol and Future Directions-. The 7th Asian Society for Neuro-Oncology, 2010/06/11, 韓国、ソウル
- ⑨ S. Kawabataほか, ¹⁸F-labeled BPA Positron Emission Tomography based Boron Neutron Capture Therapy –our New indications and possibility for any other brain malignancies. The 7th Asian Society for Neuro-Oncology, 2010/06/10~12, 韓国、ソウル
- ⑩ 川端信司 ほか, 脳腫瘍に対する硼素中性子捕捉療法 ~加速器中性子源を目前にして~. 第27回 日本脳腫瘍学会, 2009年11月8日, りんくう国際会議場(大阪)
- ⑪ S. Kawabata ほか, Progression pattern after boron neutron capture therapy and preparation for the accelerator era. Congress of Neurological Surgeons annual meeting 2009, 2009年10月24日, New Orleans, LA, USA
- ⑫ 川端信司 ほか, 放射線壊死の診断と治療. (教育講演) 第6回 日本中性子捕捉療法学会, 2009年9月20日, キャンパスプラザ京都(京都)
- ⑬ 平松亮, 川端信司 ほか, 新規ポルフィリンホウ素化合物(H₂OCP)の細胞内薬物分布・滞留実験ならびに動物臓器内薬物分布実験. 第6回 日本中性子捕捉療法学会, 2009年9月19日, キャンパスプラザ京都(京都)
- ⑭ 川端信司 ほか, 脳腫瘍の硼素中性子捕捉療法: 現状と将来展望. (シンポジウム) 日本放射線腫瘍学会 第22回学術大会, 2009年9月17日, 京都国際会議場 (京都)
- ⑮ S. Kawabata ほか Clinical Results of Modified Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Glioma 3rd WFNO & 6th ASNO joint meeting 2009年5月11日 横浜国

- 際会議場 (神奈川)
- ⑯ S. KAWABATA et al, Survival benefit from Boron Neutron Capture Therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients. 13th International Congress on Neutron Capture Therapy. 平成 20 年 11 月 2 日, Palazzo dei Congressi Florence, Italy
- ⑰ 川端信司 ほか, 悪性脳腫瘍治療後の病態解析における F-BPA-PET の有用性. 第46回 日本癌治療学会学術集会, 平成20年11月1日, 名古屋国際会議場
- ⑱ 川端信司 ほか, 悪性神経腫瘍新規診断例における硼素中性子捕捉療法の治療成績. 第67回 日本脳神経外科学会学術集会, 平成20年10月3日, 岩手県民会館
- ⑲ S. KAWABATA, et al. Clinical study on boron neutron capture therapy for recurrent malignant glioma patients in Japan. CONGRESS OF NEUROLOGICAL SURGEONS 2008 ANNUAL MEETING, 平成20年9月22日, ORANGECOUNTY CONVENTION CENTER (FL, U.S.A.)

〔図書〕 (計1件)

川端信司ほか, 先端医療技術研究所, 臨床医とコメディカルのための「最新クリニカルPET」. 2010年、207 - 210、総ページ427

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川端 信司 (Kawabata Shinji)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20340549

(2) 研究分担者

野々口 直助 (Nonoguchi Naosuke)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 70388263

山田 佳孝 (Yamada Yoshitaka)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 00368101

池田 直廉 (Ikeda Naokado)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50434775