

氏 名	福村 匡央
(ふりがな)	(ふくむら まさお)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	乙 第 27 号
学 位 審 査 年 月 日	令和 6 年 1 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 名	5-Aminolevulinic acid increases boronophenylalanine uptake into glioma stem cells and may sensitize malignant glioma to boron neutron capture therapy (5-アミノレブリン酸はグリオーマ幹細胞においてボロノフェニルアラニンの取り込みを増加させ、悪性グリオーマに対するホウ素中性子捕捉療法の効果を高める可能性がある)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 二瓶 圭二 教授 山本 和宏 教授 植野 高章

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背景》

悪性神経膠腫は脳実質内腫瘍の中で最も有病率が高く致死的な脳腫瘍である。過去の研究から、悪性神経膠腫にも神経膠腫幹細胞 (Glioma stem cells; GSCs) と呼称される自己複製能のある幹細胞が存在することが報告されており、他のがん種同様にこの幹細胞の存在が悪性神経膠腫の治療抵抗性と腫瘍再発の一因になっていると考えられている。そのため、GSCs を標的とする新しい治療戦略の開発は悪性神経膠腫の治療成績の向上に寄与する可能性がある。

ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy; BNCT) は、ホウ素の非放射性同位体である ^{10}B が中性子を捕捉して α 粒子線と Li 反跳核を生み出す核分裂反応を利用した高 LET (Linear Energy Transfer) 放射線治療である。中性子捕捉反応で生じるこれらの粒子線の飛程が細胞一個分未満 ($8\ \mu\text{m}$) であることから、腫瘍細胞選択的に取り込まれる ^{10}B 化合物を使用すれば腫瘍細胞選択的な粒子線治療が実現できるとされている。

現在臨床 BNCT で使用されている代表的なホウ素化合物はフェニルアラニン誘導体であるボロノフェニルアラニン (boronophenylalanine; BPA) であり、難治性の頭頸部がんに対する BNCT 用治療薬として本邦ではすでに保険承認がなされている。もし BPA の細胞内蓄積量を腫瘍細胞特異的に増加させることができれば、BPA-BNCT の治療効果を高めることが期待できる。

5-アミノレブリン酸 (Aminolevulinic acid; ALA) は、悪性神経膠腫や膀胱癌などの摘出手術の際に病変部位と広がりを見極めるための術中光線力学診断 (photodynamic diagnosis; PDD) 用薬剤として承認されている。これは外因性の ALA が腫瘍細胞に選択的に取り込まれ、腫瘍細胞でのみ光感受性物質である Protoporphyrin IX (PpIX) の過剰な蓄積が起こることを利用した蛍光診断法である。申請者はメタボローム解析を用いた先行研究の結果、悪性神経膠腫幹細胞 (glioma stem cell; GSC) 株を培養する培地への ALA の添加によって必須アミノ酸であるフェニルアラニンの取り込みが有意に上昇したことから、BNCT 用薬剤である BPA の GSC への取り込み量を ALA の併用によって増加させることで BPA-BNCT の悪性神経膠腫に対する治療効果を増強できるのではないかと仮説を立て、本研究を実施した。

《方法》

ヒト GSC 株の HGG13、HGG30 およびマウス GSC 株の TS を ALA 含有培地 (終濃度 : 0、33、100、300、900 μM) で 24 時間培養した後に、終濃度 1 mM の BPA 含有培地に交換して 6 時間培養を行い、GSC 内のホウ素濃度 ($\mu\text{g Boron } (^{10}\text{B})/\text{g}$) を ICP を用いて測定することで GSC への BPA の取り込みに対し、ALA の前負荷が与える影響について検

討した。また HGG13、HGG30 を ALA 含有培地 (0、300、900 μ M) で 24 時間培養した後、定量 PCR を用いて BPA の取り込みに関与していることが知られるアミノ酸トランスポーターである SLC3A2、LAT1、ATB⁰⁺ の遺伝子発現量を mRNA レベルで測定した。

HGG13 を脳内移植して作成した神経膠腫モデルマウスに対して、80 mg/kg b.w. (ヒトでの 20 mg/kg 相当量) の ALA または PBS (対照群) を経口投与し、その 24 時間後に BPA (250 mg/kg b.w.) を腹腔内投与した。BPA 投与 2.5 時間後に腫瘍、正常脳、および血液を採取し組織に含まれるホウ素濃度 (μ g ¹⁰B/g) を測定するとともに、腫瘍から mRNA を抽出して定量 PCR を用いて SLC3A2、LAT1、ATB⁰⁺ の発現量を調べた。

HGG13 マウス神経膠腫モデルを作成し、GSC 移植 7 日後に BPA-BNCT の治療実験を行った。①未治療群、②ALA 単独投与群、③中性子単独照射群、④ALA 投与後中性子照射群、⑤BPA-BNCT 群、⑥ALA 投与後 BPA-BNCT 群の 6 群を設定し、個体の生存解析を行って各群の治療効果を評価した。なお ALA 投与を行う 3 群 (②④⑥) には ALA (80 mg/kg b.w.)、ALA 非投与の 3 群 (①③⑤) には PBS を経口投与し、その 24 時間後に BNCT 実施群 (⑤⑥) には BPA 250 mg/kg b.w. を、BNCT を行わない群には PBS (①～④) をそれぞれ腹腔内投与し、その 2.5 時間後に中性子照射を実施した。

《結果》

ALA (300 μ M または 900 μ M) の前負荷により、GSC 3 株 (HGG13、HGG30、TS) 全てにおいて BPA の取り込みが有意に増加した ($p < 0.01$)。

ALA の前負荷によってアミノ酸トランスポーターである ATB⁰⁺ の発現が、GSCs (HGG13 および HGG30) において有意に増加していた ($p < 0.05$)。

HGG13 株をヌードマウス脳内に移植した神経膠腫モデルにおいて、BPA 投与後の ¹⁰B 濃度を測定したところ、ALA 前投与群では対照群と比べ、腫瘍組織内の ¹⁰B 濃度および正常脳組織に対する腫瘍内の ¹⁰B 濃度比 (Tumor/Brain ratio) が高くなる傾向を示し (23.2 vs. 20.7; $p = 0.23$, 5.5 vs. 4.7; $p = 0.41$)、また血液に対する腫瘍内 ¹⁰B 濃度比 (Tumor/Blood ratio) については有意な上昇を認めた (5.8 vs. 4.3; $p = 0.03$)。HGG13 マウス神経膠腫モ

デルの腫瘍組織におけるアミノ酸トランスポーターの発現量を定量した結果、ALA 前投与群の腫瘍組織における ATB⁰⁺遺伝子発現量は対照群の約 1.59 倍に増加していることが判明した ($p<0.01$)。

BPA-BNCT 治療実験においては、①未治療群、②ALA 単独投与群、③中性子単独照射群、④ALA 投与後中性子照射群、⑤BPA-BNCT 群、⑥ALA 投与後 BPA-BNCT 群の 6 群それぞれの生存期間中央値 (Median survival time; MST) はそれぞれ 17 日、17 日、17 日、16.5 日、25 日、28 日で、ALA 投与後 BPA-BNCT 群 (⑥) は、ALA 非併用 BPA-BNCT 群 (⑤) と比較して生存期間の有意な延長が認められた ($p=0.02$)。

《考察》

In vitro での ALA 前負荷は、検討したすべての GSC 株 (HGG13、HGG30、TS) において BPA 投与後の細胞内 ¹⁰B 濃度を有意に上昇させ、ALA は GSC への BPA 取り込みを促進させる薬理効果を有することが示された。一方、GSC を有血清・接着培養環境下で分化させた非 GSC では、ALA の前負荷を行っても BPA の蓄積量に有意な上昇は見られなかった。我々は以前の研究で、ALA の取り込みを担っている細胞膜トランスポーターである PEPT1 および PEPT2 の発現量が、GSCs では非 GSCs と比べ約 10 倍高いことを報告しており、GSCs と非 GSCs における ALA 取り込み能の違いが BPA 取り込み促進効果の有無に反映されたのではないかと推測している。

また HGG13 を脳に移植して形成された腫瘍における BPA 投与後の biodistribution を解析した結果、ALA 前投与群は対照群に比べ腫瘍内 ¹⁰B 濃度が高い傾向が見られたが、in vitro での結果と比較すると、ALA による BPA の取り込み促進効果は少なかった。その理由として、in vivo では ALA を経口投与したため生物学的利用能の制限により BPA の取り込みに対する影響が少なかった可能性や、移植した GSC が腫瘍を形成する過程において、GSCs の多くは宿主脳の組織微小環境の影響を受けてその幹細胞性を失い、大半は非 GSCs に分化する点を挙げている。著者らの in vitro 実験の結果でも、ALA は GSCs における BPA 取り込みを有意に増加させるが、非 GSCs では増加させないことを示しており、in vivo

腫瘍の大半を占めるのは非 GSC であることが、in vitro と in vivo の結果の違いに反映されたのではないかと考察している。

悪性腫瘍細胞への BPA の取り込みには中性アミノ酸トランスポーターである SLC3A2、LAT1、ATB⁰⁺などが関与しており、その中でも ATB⁰⁺の寄与度が最も高いとの報告がある。本研究でも HGG13 および HGG30 が発現しているこれら 3 種類のトランスポーターのうち、ATB⁰⁺の発現が ALA を前負荷することによって有意に上昇することが確認された。さらに、HGG13 をマウス脳内に移植して作成した神経膠腫モデルにおいても、ATB⁰⁺は ALA の前投与によって発現が上昇した唯一のトランスポーターであった。以上の結果より、ALA が GSC における ATB⁰⁺の発現を上昇させることが、ALA の併用によって悪性神経膠腫への BPA の取り込みが促進される機序の一つであると考えられた。

親水性アミノ酸である ALA の正常脳細胞への移行は血液脳関門 (Blood-brain barrier; BBB) によって制限を受け、正常脳細胞の大半が分裂休止期 (G₀) にあるため、正常細胞にはほとんど取り込まれない。一方、BBB が破壊された血管あるいは BBB を持たない腫瘍新生血管によって支配され、かつ細胞分裂能の高い悪性脳腫瘍細胞は ALA を積極的に取り込むため、正常脳細胞と悪性腫瘍細胞とでは ALA の取り込みに大きなコントラストが生まれる。ALA を用いた PDD は、悪性神経膠腫や膀胱癌以外の様々な癌にも応用可能であることが既に報告されているが、様々なアミノ酸トランスポーターを高発現しアミノ酸代謝活性が上昇している腫瘍細胞ほど ALA の取り込み能も高く、その代謝産物である PpIX が腫瘍細胞内に高蓄積する事実は ALA の腫瘍指向性をよく説明している。実際、本研究でも悪性神経膠腫モデルを用いて正常細胞 (正常脳や血液) への BPA の biodistribution を定量評価したが、ALA 併用による正常組織中の BPA 濃度の上昇は認めなかった。この事実は、ALA 併用 BPA-BNCT によって正常組織への被曝線量を抑えつつ、腫瘍細胞選択的に BNCT の生物学的効果比を向上可能であることを示唆している。

《結論》

現在の標準治療によって腫瘍中に存在する腫瘍幹細胞を排除できないことが悪性神経

膠腫の再発の一因と考えられていることから、放射線化学療法に対する感受性が低い GSC を標的化できる新規治療法の開発は、同疾患の治療予後を改善させる上で重要な研究課題と言える。BNCT は腫瘍選択的な高 LET 放射線治療であり、もし GSCs に十分な量の BPA を取り込ませることができれば、GSCs を効率的に排除することが期待できる。本研究によって、GSCs が BPA を細胞内へと輸送するトランスポーターである ATB⁰⁺の発現を上昇させる作用を ALA が有していることが判明し、ALA を併用することによって BPA-BNCT に対する GSC の治療感受性を有意に改善できる可能性が示された。

論文審査結果の要旨

放射線治療や化学療法などの現行の標準治療に高い治療耐性を示す神経膠腫幹細胞 (GSC) の存在が悪性神経膠腫再発の一因であり、このがん幹細胞の治療耐性の克服は同疾患の再発抑制につながると考えられている。高線エネルギー付与粒子線治療であるホウ素化フェニルアラニンを用いたホウ素中性子捕捉療法 (BPA-BNCT) の治療効果 (生物学的効果比) は、腫瘍細胞に取り込まれた BPA の細胞内濃度に依存する。申請者らは生体アミノ酸である 5-アミノレブリン酸 (ALA) を事前に投与しておくことで、ヒトおよびマウスの GSC 細胞株への BPA 細胞内蓄積量が ALA の濃度依存性に増加することを明らかにした。またヒト GSC 株をヌードマウス脳内へ移植して作成した悪性神経膠腫モデルを用いて BPA-BNCT の *in vivo* 治療実験を行ない、BPA-BNCT の実施前日に ALA を投与すると、BPA-BNCT 単独治療群と比較して個体の生存期間が有意に延長することを示した。

ALA、BPA の双方が腫瘍細胞へ選択的に集積する性質を有する化合物であることから、ALA 併用 BPA-BNCT は腫瘍細胞選択的にその生物学的効果比向上が期待できる合理的な治療戦略であり、本研究は併用薬剤の使用によって BPA-BNCT の増感効果を企図した新規性の高い治療開発につながると評価できる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 14 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Scientific Reports 13(1): 2023