

氏 名	辻野 晃平
(ふりがな)	(つじの こうへい)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 77 号
学 位 審 査 年 月 日	令和 5 年 7 月 12 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Improved Boron Neutron Capture Therapy Using Integrin $\alpha v\beta 3$ -Targeted Long-Retention-Type Boron Carrier in a F98 Rat Glioma Model (インテグリン $\alpha v\beta 3$ を標的とする長時間滞留型ホ ウ素キャリアを用いたラット神経膠腫モデルに対す るホウ素中性子捕捉療法の有用性)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 藤阪 保仁 教授 大須賀 慶悟 教授 二瓶 圭二

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背 景》

ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy; BNCT) は、高悪性度神経膠腫の治療として有望視されてきた。BNCT は、ホウ素-10 と中性子による捕獲反応により腫瘍細胞を選択的に破壊する粒子線治療である。生成される高 LET (linear-energy-transfer; LET) 粒子線の飛程が $4\text{--}9\text{ }\mu\text{m}$ であり、細胞一つあたりの直径約 $10\text{ }\mu\text{m}$ に相当することから、殺細胞効果はホウ素を取り込んだ細胞に限定される。つまり、BNCT は細胞レベルで標的を選択することが可能である。高悪性度神経膠腫は、脳実質に腫瘍細胞が浸潤しているため、手術での可及的摘出を行なっても腫瘍細胞は残存する。残存腫瘍細胞の治療に、標準治療として術後化学放射線治療が行われるがその治療成績は満足できるものではない。そこで、浸潤部の腫瘍細胞を選択的に標的とする効果と安全性の高い治療が必要であり、

高悪性度神経膠腫に対する原子炉を使用した BNCT 臨床試験で、有効性が示されてきた。また、加速器を中性子源とする高悪性度神経膠腫に対する BNCT も有効であると示唆されており、今後の普及が期待される。

これまで臨床試験で使用されてきたホウ素キャリアは、ボロノフェニルアラニン (Boronophenylalanine; BPA) であり、腫瘍細胞に高発現している L-type amino acid transporter (LAT-1) を介して腫瘍細胞に取り込まれる。しかし、BPA 不応性の腫瘍細胞も存在し、BNCT の治療成績向上には新規ホウ素キャリアの開発が不可欠である。

過去に、ドラッグデリバリーシステムとして注目されている血清アルブミンとホウ素-10 クラスターである maleimide-functionalized *clos* σ -dodecaborate (MID) の複合体である maleimide-functionalized *clos* σ -dodecaborate (MID) albumin conjugate (MID-AC) を開発し、F98 ラット神経膠腫モデルに対する中性子捕捉療法用の新規ホウ素キャリアとしての有用性を報告した。MID-AC は、血清アルブミンの腫瘍組織への集積性により長時間腫瘍内ホウ素濃度を維持する一方で、細胞選択性を有しない欠点があった。

本研究では、高悪性度神経膠腫で高発現しているインテグリン $\alpha v \beta 3$ を生物学的標的として着目し、これを標的とする環状アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (cRGD) を MID-AC に結合した cRGD-MID-AC を開発した。U87MG マウス皮下腫瘍モデルに対する cRGD-MID-AC を使用した BNCT で腫瘍縮小効果を得ることができた。脳腫瘍、特に脳実質内腫瘍である悪性神経膠腫においては、脳血液関門の存在があるため薬剤送達に不利な環境である。そのため、同所移植である脳腫瘍モデルでの有用性を検討した。

《方 法》

F98、C6 ラット神経膠腫細胞、9L ラット神経膠肉腫細胞に 10 μ g B/mL の BPA、cRGD-MID-AC、cRGD + MID (cRGD と MID を単純に混合) を 1、6、24 時間曝露後に、細胞内ホウ素濃度を測定した。細胞内ホウ素滞留率を測定するために、各細胞に 10 μ g B/mL の各薬剤を 24 時間曝露後に、ホウ素非含有培地に取り替え、1、6、24 時間培養を行った。次に F98 ラット神経膠腫細胞に 10 μ g B/mL の各薬剤を 2.5 時間曝露後に中性子

照射を行い、コロニー形成法を用いて細胞生存率 (Survival Fraction; SF) を測定した。F98 ラット神経膠腫細胞を X 線照射した際の SF = 0.1 を得るための物理線量から X 線等価となる線量を算出し、F98 ラット神経膠腫細胞に対する各ホウ素キャリアの生物学的効果比(Compound Biological Effectiveness; CBE)を計算した。*In vivo* study では、F98 ラット神経膠腫モデルに対して BPA または cRGD-MID-AC を静脈内投与し、静脈内投与終了後 2.5 時間後、8 時間後、24 時間後それぞれの組織内ホウ素濃度を測定した。また、F98 ラット神経膠腫モデルを未治療群 (n = 5)、中性子照射単独群 (n = 4)、BPA 静脈内投与後 2.5、8 時間後中性子照射群 (2.5 時間後; n = 6, 8 時間後; n = 5)、cRGD-MID-AC 静脈内投与後 2.5、8 時間後中性子照射群 (2.5 時間後; n = 7, 8 時間後; n = 6) の 6 群に分け、生存期間で治療効果を評価した。

《結 果》

細胞内ホウ素濃度は、各薬剤曝露後全ての細胞株において、BPA が cRGD-MID-AC、cRGD + MID と比較して有意に高かった。しかし、24 時間曝露後の時間経過によるホウ素滞留率は、cRGD-MID-AC はほとんど全ての時間で BPA と比較して有意に高かった (9L 24 + 24 時間を除く)。また、*in vitro* 中性子照射実験では、cRGD-MID-AC と BPA の CBE 値はそれぞれ 2.26、2.69 であった。F98 ラット神経膠腫モデルに対する cRGD-MID-AC 静脈内投与後 2.5、8 時間後の腫瘍内ホウ素濃度は、 10.1 ± 1.6 、 17.0 ± 1.0 $\mu\text{g B/g}$ 、BPA 静脈内投与後はそれぞれ 20.6 ± 2.2 、 18.2 ± 2.9 $\mu\text{g B/g}$ であった。また、cRGD-MID-AC 静脈内投与後 2.5、8 時間後の正常脳へのホウ素集積は BPA と比較して極めて低く、腫瘍への高い選択性が示された (腫瘍/正常脳 ホウ素集積比 : cRGD-MID-AC 投与後 2.5、8 時間後 ; 12.5、18.5、BPA 静脈内投与後 2.5、8 時間後 ; 3.8、3.4)。 *In vivo* 中性子照射実験では、未治療群と比較して BPA、cRGD-MID-AC を用いた中性子照射群は有意に生存期間を延長した (生存期間中央値: 未治療群; 30 日、BPA 静脈内投与後 2.5 時間後中性子照射群; 42 日 (p 値 = 0.0011)、BPA 静脈内投与後 8 時間後中性子照射群; 40 日 (p 値 = 0.0079)、cRGD-MID-AC 静脈内投与後 2.5 時間後中性子照射群; 43 日 (p 値=0.0033)、cRGD-MID-AC 静脈内投与後

8 時間後中性子照射群; 38.5 日(p 値=0.0499))。また、cRGD-MID-AC 静脈内投与後 8 時間後中性子照射群では、BPA を用いた中性子照射群では見られなかった長期生存 (90 日以上生存) 個体が確認された。

《考 察》

インテグリン $\alpha v \beta 3$ は腫瘍細胞の浸潤、増殖、血管新生に関与しているとされており、神経膠腫において、悪性度が高いほどインテグリン $\alpha v \beta 3$ の発現が高いとされているため、cRGD-MID-AC は高悪性度神経膠腫の BNCT 用ホウ素キャリアとして有用である可能性がある。

本薬剤の最大の特徴は、MID-AC 同様、細胞内ホウ素濃度が長時間保持され、滞留率が高いことにある。BPA は滞留率が低く、実臨床では、BNCT においても中性子照射中の持続投与が必要である。一方、cRGD-MID-AC は曝露終了後も細胞内にホウ素を長時間滞留させることができるため、持続投与が不要である。cRGD-MID-AC の細胞内ホウ素濃度は BPA と比較して有意に低いにも関わらず、*In vitro* 中性子照射実験では、cRGD-MID-AC は BPA と同程度の殺細胞効果を有することがわかった (BPA CBE 値: 2.69、cRGD-MID-AC CBE 値: 2.26)。また、以前の研究では U87MG に対する *in vitro* 中性子照射実験で、BNCT において cRGD-MID-AC の殺細胞効果は MID-AC よりも高く、U87MG 皮下腫瘍モデルにおいても MID-AC と比較して cRGD-MID-AC を用いた BNCT の高い抗腫瘍効果が報告されている。F98 ラット神経膠腫モデルにおいても cRGD-MID-AC を静脈内投与した際の腫瘍内ホウ素濃度は高く ($17.0 \pm 1.0 \mu\text{g B/g}$ MID-AC: $8.5 \mu\text{g B/g}$; Kashiwagi, H. et al. Investigation New Drugs 2022, 40, 255-264 を参照)、cRGD を MID-AC に導入することで治療効率向上が期待できる。

In vivo 中性子照射実験で、cRGD-MID-AC 静脈内投与後 8 時間後中性子照射群でのみ長期生存個体が確認されたのは、cRGD-MID-AC 曝露後の時間経過により腫瘍細胞内のホウ素蓄積が促進され、BNCT 後の生存期間に寄与した可能性がある。

cRGD-MID-AC は PET (Positron Emission Tomography; PET) イメージングにおいても

注目されており、 ^{18}F -Galacto-RGD PET はマウス腫瘍モデルや頭頸部癌患者においてインテグリン $\alpha\text{v}\beta 3$ の発現が評価できることがすでに明らかになっている。また、悪性神経膠腫患者における galacto-RGD の取り込みと対応するサンプルにおけるインテグリン $\alpha\text{v}\beta 3$ 発現の間に相関があることが示されてることから、将来的にこれらの技術を応用し、本薬剤を用いたインテグリン標的の BNCT を臨床応用する際には、対象症例・疾患を識別することも可能である。

《結 論》

cRGD-MID-AC は、MID-AC の腫瘍集積機序に加え、インテグリン標的による腫瘍選択性が加わったことでラット神経膠腫モデルに対する BNCT の治療効果を向上の可能性が示唆された。MID-AC と同様に長時間の腫瘍内ホウ素濃度維持により中性子照射の自由度が増し、BNCT の治療効率向上に寄与する可能性がある。また BPA とは異なる腫瘍集積機序を持つことから、これらを併用することで更なる治療効果の向上を期待することができる。

論文審査結果の要旨

高悪性度神経膠腫に対するホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture therapy; BNCT) が新規治療法として期待される。BNCT 治療成績向上のためには、ボロノフェニルアラニン (Boronophenylalanine; BPA) の他に、新規ホウ素キャリアの開発が重要である。申請者は、高悪性度神経膠腫に高発現するインテグリン $\alpha v \beta 3$ を生物学的標的とした cyclic arginine-glycine-aspartate (cyclic RGD; cRGD) を、F98 ラット神経膠腫モデルに対する BNCT での有用性を報告した maleimide- functionalized *closo*-dodecaborate albumin conjugate (MID-AC) に結合させた cRGD-functionalized *closo*-dodecaborate albumin conjugate (cRGD-MID-AC) を開発した。

cRGD-MID-AC は、血清アルブミンの enhance permeability and retention (EPR) 効果を利用し腫瘍への集積性と滞留性を高めると同時に、腫瘍細胞選択性を有する新規ホウ素キャリアであり、その有用性を F98 ラット神経膠腫モデルを用い評価した。

In vitro study では、cRGD-MID-AC は BPA と比較して、1) 細胞内ホウ素滞留率が高いこと、2) 細胞内ホウ素濃度が低いにも関わらず中性子照射により、BPA を用いた BNCT と同程度の殺細胞効果を有すること、が示された。

In vivo study では、cRGD-MID-AC を静脈内投与 8 時間後に腫瘍内ホウ素濃度が最大となることが示された。F98 ラット神経膠腫モデルに対する中性子照射実験では、未治療群と比較して全ての BNCT 群で有意に生存期間を延長した。中でも cRGD-MID-AC 静脈内投与 8 時間後の中性子照射群で、長期生存個体を確認した。

本研究では、高悪性度神経膠の克服を目指した新規ホウ素キャリアの cRGD-MID-AC の *In vitro*、*In vivo* での有用性が示され、BNCT での臨床応用が期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 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) Biology (Basel) 12(3):377, 2023 Feb doi:10.3390/biology12030377.