

(様式 甲5)

|               |                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 二 村 元                                                                                                                                                                                                                                   |
| ( ふ り が な )   | (ふたむら げん)                                                                                                                                                                                                                               |
| 学 位 の 種 類     | 博士 (医学)                                                                                                                                                                                                                                 |
| 学 位 授 与 番 号   | 甲 第 号                                                                                                                                                                                                                                   |
| 学 位 審 査 年 月 日 | 平成 29 年 7 月 5 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   | Evaluation of a novel sodium borocaptate-containing<br>unnatural amino acid as a boron delivery agent for<br>neutron capture therapy of the F98 rat glioma<br><br>(新規非天然合成アミノ酸付加-BSH を F98 グリオーマ移植担脳腫瘍モデルラットに対して投与した際のホウ素中性子捕捉療法の有用性検討) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主) 教授 鳴 海 善 文<br>教授 高 井 真 司<br>教授 荒 若 繁 樹                                                                                                                                                                                              |

## 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、殺細胞効果の高い  $\alpha$  粒子を用いた腫瘍選択的粒子線治療であり、正常脳組織に浸潤性に発育する悪性脳腫瘍に対する効果が期待されている。BNCT の治療効果はホウ素化合物の種類、投与方法、中性子線の投与量に左右される。これまでに臨床試験で使用してきたホウ素化合物、boronophenylalanine (BPA) および dodecaboranethiol (BSH) は、悪性脳腫瘍において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が、未だ不十分である。BPA はフェニルアラニン (必須アミノ酸) 骨格を有し、アミノ酸代謝の亢進した腫瘍細胞に高集積を示すが、一方で正常脳にも分布し、そのダメージが懸念される。また、BSH は BPA の

12 倍にあたる多量のホウ素 ( $^{10}\text{B}$ ) 源を含有するが、生物学的に腫瘍細胞選択性がなく、単に血液脳関門 (BBB) の破綻を利用してのみ腫瘍組織へ移行するため、腫瘍細胞への高い取り込みが期待できない。これらの問題点を解決すべく我々は  $^{10}\text{B}$  含有量の高い BSH に、腫瘍指向性のあるアミノ酸骨格を付加した、アミノ酸付加-BSH の開発に取り組んだ。

付加するアミノ酸としては非天然合成アミノ酸である 1-amino-3-fluorocyclobutane-1-carboxylic acid (ACBC) を用いた。ACBC はアミノ酸トランスポーターに高い親和性を有し、腫瘍細胞に高い指向性を持つことが示されている。また ACBC の  $^{18}\text{F}$  標識体は、がん診療において PET 診断用トレーサーとして臨床例で報告されている。このような ACBC の特徴に着目し、ACBC-BSH を開発した。

脳腫瘍においては、他の抗癌剤と同様に BBB の問題を有するために、分子量の大きな薬剤の腫瘍細胞浸潤部への薬剤送達は難しい。アミノ酸付加-BSH も分子量が大きくなることから、経静脈 (iv) 投与では腫瘍組織への十分な移行が期待できないことが予想された。この問題を解決すべく、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ている Convection enhanced delivery (CED) を投与方法として用いて、ACBC-BSH の有用性について検討した。

## 《方法》

In vitro の実験として F98 glioma cell に BPA、BSH、ACBC-BSH をそれぞれ暴露し、細胞内に取り込まれた  $^{10}\text{B}$  濃度を測定した。また、これらの F98 glioma cell に、抗 BPA 抗体、抗 BSH 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、細胞内での  $^{10}\text{B}$  分布を評価した。

In vivo の実験として、F98 glioma 移植脳腫瘍モデルラットに対し BPA、BSH、ACBC-BSH をそれぞれ iv 投与、若しくは CED 投与し、投与後に腫瘍、正常脳、血液といった各々の臓器の組織内  $^{10}\text{B}$  濃度を測定した。

それらの結果から ACBC-BSH の至適投与条件を検討した。その至適条件で ACBC-BSH を脳腫瘍モデルラットに投与して BNCT を行い、生存期間から薬剤の治療効果を評価した。治療群として、中性子単独照射群、BPA iv 投与+中性子照射群、ACBC-BSH CED 投与+中

性子照射群、BPA iv 投与+ACBC-BSH CED 投与+中性子照射群、および無治療群の 5 群で検討した。

#### 《結果》

In vitro の結果として ACBC-BSH は BSH と比較し、有意差をもって高い細胞内  $^{10}\text{B}$  濃度を示した。免疫組織化学染色では BPA は細胞核を含む細胞内全体に均質に分布を認めたが、BSH、ACBC-BSH は不均一に分布し、核の周囲に特異的に集積を認めた。

In vivo の結果として腫瘍への  $^{10}\text{B}$  集積は、iv では BPA ( $19.7 \pm 1.4 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$ ) が BSH ( $2.0 \pm 1.3 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$ )、ACBC-BSH ( $2.7 \pm 0.5 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$ ) と比較して有意差をもって高い値を示した。また CED では ACBC-BSH ( $21.1 \pm 3.3 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$ ) が BPA ( $10.1 \pm 4.1 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$ )、BSH ( $12.2 \pm 5.6 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$ ) と比較して高い値を示した。

腫瘍内  $^{10}\text{B}$  濃度は BNCT の治療効果に関する重要なファクターであり、高いほど抗腫瘍効果が期待できる。また  $^{10}\text{B}$  の腫瘍/正常組織（正常脳、血液）比は正常組織への安全性に関する重要なファクターであり、高いほど安全性が期待できる。このことから我々は「腫瘍内  $^{10}\text{B}$  濃度」×「 $^{10}\text{B}$  濃度の腫瘍/正常脳比」、「腫瘍内  $^{10}\text{B}$  濃度」×「 $^{10}\text{B}$  濃度の腫瘍/血液比」の値が高い程、抗腫瘍効果が高かつ安全な治療を期待できると考えた。結果として両方の数値とも 3 種類すべてのホウ素化合物において CED 投与群が iv 投与群より高い値を示した。このことから BNCT の治療効果が最も期待できるのは ACBC-BSH CED 投与群であると考えた。既存の治療効果の基準として BPA iv 投与を加えた前述の 5 群で中性子照射実験を行った。5 群での平均生存期間は中性子単独照射群 ( $29.8 \pm 1.9$  日)、BPA iv 投与+中性子照射群 ( $37.4 \pm 2.6$  日)、ACBC-BSH CED 投与+中性子照射群 ( $37.0 \pm 5.2$  日)、BPA iv 投与+ACBC-BSH CED 投与+中性子照射群 ( $44.3 \pm 8.0$  日)、そして無治療群 ( $27.2 \pm 2.4$  日)であった。BPA iv 投与+中性子照射群、ACBC-BSH CED 投与+中性子照射群は中性子単独照射群と比較して両群とも有意差をもって生存期間の延長を認めた。また BPA iv 投与+ACBC-BSH CED 投与+中性子照射群は、BPA iv 投与+中性子照射群と比較し有意差をもって生存期間の延長を認めた。

## 《考察》

ACBC-BSH の CED 投与群が iv 投与よりも、より高い腫瘍への  $^{10}\text{B}$  集積を示したことから、CED 投与群は ACBC-BSH を BBB が保たれている腫瘍浸潤部へ送達することを可能とする投与方法であると考えられる。

免疫組織化学染色の結果から、ACBC-BSH は核の周囲に特異的に集積した。また ACBC-BSH CED 投与群は、「腫瘍内  $^{10}\text{B}$  濃度」×「 $^{10}\text{B}$  濃度の腫瘍/正常脳比」、「腫瘍内  $^{10}\text{B}$  濃度」×「 $^{10}\text{B}$  濃度の腫瘍/血液比」が BPA iv 投与群よりも高い値を示すことから、中性子照射実験において最も高い治療効果が期待された。しかし ACBC-BSH CED 投与群と BPA iv 投与群の治療効果に有意差は認めなかった。この理由としては、腫瘍内  $^{10}\text{B}$  濃度が両者でほぼ同等であったことに加え、正常細胞への影響が出るほどの中性子線量が当たっていなかったことが考えられる。また、ACBC-BSH が核周囲に特異的に集積することは、逆に細胞内に  $^{10}\text{B}$  集積がないか低いスペースが多く存在することを意味する。BPA は細胞内に均一に分布し、DNA が存在する核の中にも分布することから、この不均一な細胞内  $^{10}\text{B}$  分布が ACBC-BSH CED 投与群の治療効果を弱めた可能性も考えられる。

BPA iv 投与+ACBC-BSH CED 投与群が BPA iv 投与群よりも高い治療効果が得られた理由も、上述の細胞内での  $^{10}\text{B}$  分布の違いが相加効果を示したと考えられる。

## 《結論》

ACBC-BSH CED 投与は BPA iv 投与と併用することで、現在臨床研究で行われている BPA iv 投与による BNCT の悪性脳腫瘍に対する治療成績を更に向上させる可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

この数十年の間、多くの癌治療法が認可されて予後は改善した。一方、悪性神経膠腫、なかでも膠芽腫は現在でも極めて予後不良で、生存期間中央値は外科的腫瘍摘出後に放射線・化学療法を併用しても約1年と治療抵抗性を示す疾患である。その原因は神経膠腫細胞の浸潤性性格にあり、多くの場合で摘出腔辺縁部からの再発を認める。そのため、膠芽腫の治療に求められるものは、浸潤部細胞を含めた局所制御能力にたけた治療法であり、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) がその代表的な治療法である。申請者らは、これまでに悪性神経膠腫の治療に BNCT を適用し、従来の放射線・化学治療の成績を上回る治療成績を示してきた。その治療効果はいかにしてホウ素化合物を腫瘍細胞に選択的に集積させるかに依拠する。現在臨床で使用経験のあるホウ素化合物 (boronophenylalanine: BPA、sodium borocaptate: BSH) では、その治療効果は未だ不十分である。その理由は、BPA はフェニルアラニン骨格を有し、アミノ酸代謝の亢進した腫瘍細胞に高集積を示すが、一方で正常脳にも分布するため、正常脳へのダメージが懸念される点、また BSH は BPA の 12 倍のホウ素源 ( $^{10}\text{B}$ ) を含有するが、生物学的に腫瘍選択性がなく、単に血液脳関門 (BBB) の破綻を利用してのみ腫瘍組織へ移行するため、腫瘍への高集積が期待できない点が挙げられる。これらの点を解決すべく申請者らは、 $^{10}\text{B}$  含有量の高い BSH に腫瘍指向性のある物質、非天然合成アミノ酸 ACBC を付加した新規ホウ素化合物 ACBC-BSH を開発し、その治療効果を検討している。さらに、脳腫瘍は BBB の問題を有するため分子量の大きな薬剤の浸潤部への送達 is 難しく、ACBC-BSH も分子量が大きく経静脈投与では腫瘍組織への十分な取り込みが期待できない為、薬剤投与方法として Convection enhanced delivery (CED) を用いこの問題の解決を図っている。その結果、現在臨床研究で使用される BPA iv 単独投与群よりも、BPA iv 投与+ACBC-BSH CED 投与群に中性子を照射した方がより高い治療効果を認めたことから、ACBC-BSH CED 投与の有効性を確認している。本研究で使用している ACBC-BSH は実際の臨床においての実用性も高く、本研究の結果は重要な意味を有するものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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）

Radiation oncology

12(1): 26, 2017 Jan doi: 10.1186/s13014-017-0765-4<オンライン掲載>