

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04906

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とした中性子捕捉剤と分子イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of new boron drugs and molecular imaging targeting for cancer stem cell

研究代表者

松井 秀樹 (Matsui, Hideki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30157234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己会合性ペプチドを薬剤送達方法として利用し、これにホウ素剤を添加して送達する技術を創生した。この手法により培養した悪性神経膠芽腫ならびに培養乳がん細胞に対しホウ素剤を導入できる事を示した。本法はがん幹細胞への特異性がより高いことを示した。In vivo脳腫瘍モデルマウスを作成し、このモデルマウスに対して、ホウ素導入薬剤を尾静脈から注射すると、ホウ素が腫瘍内に導入され蓄積する事を示した。ホウ素剤に陽イオンキレート剤を結合させ、これを介して<sup>64</sup>Cu同位体を結合させ、これが分子イメージング試薬として機能する事を示した。

研究成果の概要(英文)：We developed a new drug delivery method which deliver boron into cancer cells. The method showed an efficient delivery of <sup>10</sup>B into cultured Glioblastoma and Mammary cancer cell lines. The efficiency and the specificity were higher for cancer stem cells than ordinary cancer cells. We further developed molecular agent for PET imaging of boron compound.

研究分野：細胞生理学

キーワード：薬剤送達法 ペプチドシグナル ホウ素中性子捕捉療法 脳腫瘍 がん幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、転移性、浸潤性の難治性がんや再発がんにも有効な治療法として期待される次世代の粒子線治療法である。日本が世界の研究をリードしている数少ない医療分野の一つでもある。BNCTの実用化に向け、解決しなければならない大きな課題は中性子源として原子炉が必要なことであった。しかし2009年、住友重機(株)により、病院設置可能なサイクロトロン型中性子発生装置が開発され、臨床試験が進行している。今後さらなる小型化により拠点病院への設置が期待され、この問題は格段に進歩したと言える。

一方、残る2つの課題は、臨床応用に適したホウ素製剤の開発ならびにホウ素剤の分子イメージング技術の開発である。BNCTのがん殺傷効果は癌細胞内のホウ素(10B)の存在に依存する。従ってがん細胞内への効率的なホウ素の導入が必須である。特に癌再発の主な原因である癌幹細胞(Cancer Stem Cell)へのホウ素の導入は治療成功の鍵である。また、BNCTの実用化にあたっては、ホウ素剤のがんへの導入と薬物動態を確認する分子イメージング技術が不可欠である。

現在臨床研究で用いられているホウ素化合物はBPAとBSHである。BPAはアミノ酸にホウ素原子が結合したものであり、アミノ酸輸送体によってがん細胞に能動的に取り込まれ、蓄積する。しかし、細胞により導入が異なりBPAだけでは完全にがんを殺傷することは困難とされている。

一方、BSHはホウ素12個からなる結晶体である。一分子当たりのホウ素数が多く、効率よくホウ素を導入できる。しかし、BSHは細胞内への能動的取り込みがない。また、BSHの分子イメージング試薬は未開発である。BSHをリード化合物とするBNCT薬剤開発は今後の発展に重要なステップとなる。

### 2. 研究の目的

本研究では、悪性腫瘍細胞に対し高い細胞内導入効率をもち、実用化に適した製造コストを実現できる新しいホウ素製剤の開発を目指す。さらに、ホウ素剤の体内薬物動態やがん細胞内集積の様子をリアルタイムでモニターできる分子イメージング試薬を作成する。作製したホウ素試薬を用いて中性子照射を行い、その治療効果を実証する。また腫瘍モデル動物にて分子イメージングが可能な事を実証する。

### 3. 研究の方法

我々が開発し、特許化しているアルギニン11個からなる細胞内導入シグナル11Rを3(5または7)個に短縮したシグナル分子を、ホウ素剤BSHと結合したmono BSH-3(5、7)Rを作成する。このようにして作製したホウ素製剤によって、癌幹細胞内への特異的なホウ素導入を実現する。また、さらにmono BSH-3(5、

7)Rに陽イオンキレータを結合させ、これを介して<sup>64</sup>Cu同位体を結合させる。この試薬がBSHのPET分子イメージング試薬として機能する事を証明する。最後に、担癌モデルマウスに開発した新規ホウ素試薬を投与し、中性子線を照射して治療効果を検証する。

### 4. 研究成果

#### 新規ホウ素ペプチド作製

これまでに成功した8個のBSH分子に細胞膜通過ペプチド(アルギニン11個の連鎖、以下11R)を結合したmulti-BSH-11Rを改良した。細胞膜通過ペプチドを11個のアルギニン(11R)から7個、5個、3個に減らして、単体BSHに結合したホウ素剤monoBSH-7(5 or 3)Rの作成に成功した。アルギニンのC末端にNpys(3-nitro-2-pyridinesulfonyl)化したシステインを付加し、BSHのSH基との間でジスルフィド結合により共有結合させた。前述した11個のポリアルギニン(11R)からなる細胞膜通過ペプチドを開発し特許を得ると共に、最小の細胞膜通過ペプチド3Rを選択して、臨床応用可能なBSH-peptideの作製に成功した。

#### ホウ素ペプチドの細胞内濃度測定・担癌モデルによる腫瘍内部の局在観察

上記にて作成したBSH-peptideを種々の悪性神経膠腫細胞株へ投与し、細胞内の取込及び細胞内局在を確認した。細胞内取り込みの評価はICP-AES(誘導結合プラズマ発光分光分析装置)細胞内局在はBSH抗体(大阪府立大学切畑教授提供)による細胞免疫染色にて観察した。3種の長さ(3R,5R,7R)の細胞膜通過ペプチドにて検証するも、すべてのペプチドにおいて細胞内導入が観察された。アルギニン(R)鎖が短いほど導入効率は下がったが、今後の工業的大量合成を考慮して3R以下を細胞膜通過ペプチドとして選択した。BSH-3R, BSH-2R, BSH-Rを新規に合成し、BSHにて細胞内導入効果を比較して、BSH-2RとBSH-3Rで明確な細胞内導入が観察された。ICPによる細胞内ホウ素濃度の観察を行ったところ、ペプチド修飾の無いBSHと比較して10倍以上の細胞内ホウ素濃度測定結果を得た。WST-1アッセイによる細胞毒性試験を施行し、コントロールのBSH投与群と比較して、明らかな細胞毒性は認めなかった。次に、マウス脳腫瘍モデルを作成し、マウス尾静脈よりBSH, BSH-2R, BSH-3Rを投与し、投与後24時間にてマウス脳のBSH薬剤局在を確認したところ、BSH-3Rのみが脳腫瘍部位特異的に観察された。

PET(陽電子放出断層撮影)分子イメージング試薬の開発と脳腫瘍モデルでの評価  
BSHおよびBSH-3Rに対して、金属キレータであるDOTA(テトラアザシクロドデカン・テトラ酢酸)を連結したPET-probe前駆体を作成した。OMIC(おかやまメディカルイノベー

ションセンター)内のサイクロトロンによってCuを放射化し核種<sup>64</sup>Cuを作成した。<sup>64</sup>Cuの物理的半減期は12.7時間でありPETには最適である。0.1 M リン酸緩衝液中でキレーターを介してホウ素剤に<sup>64</sup>Cuを結合させてイメージングプローブとした。マウス脳腫瘍モデルに対して、BSH-DOTA-<sup>64</sup>CuとBSH-3R-DOTA-<sup>64</sup>Cuの2種類のPET薬剤を投与し、経時的観察を行った。BSH-3R群において、腫瘍特異的な信号が強度に観察された。

#### 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8件)

Iguchi Y, Michiue H, Kitamatsu M, Hayashi Y, Takenaka F, Nishiki T, Matsui H, Tumor-specific delivery of BSH-3R for boron neutron capture therapy and positron emission tomography imaging in a mouse brain tumor model. *Biomaterials*. 2015 Jul;56:10-7.

doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.03.061.

Kondo N, Michiue H, Sakurai Y, Tanaka H, Nakagawa Y, Watanabe T, Narabayashi M, Kinashi Y, Suzuki M, Masunaga S, Ono K. Detection of  $\gamma$ H2AX foci in mouse normal brain and brain tumor after boron neutron capture therapy. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2016 Mar-Apr;21(2):108-12.

doi: 10.1016/j.rpor.2014.10.005.

Hayashi K, Michiue H, Yamada H, Takata K, Nakayama H, Wei FY, Fujimura A, Tazawa H, Asai A, Ogo N, Miyachi H, Nishiki T, Tomizawa K, Takei K, Matsui H. Fluvoxamine, an anti-depressant, inhibits human glioblastoma invasion by disrupting actin polymerization. *Sci Rep*. 2016 Mar 18;6:23372.

doi: 10.1038/srep23372.

Otani Y, Ichikawa T, Kurozumi K, Inoue S, Ishida J, Oka T, Shimizu T, Tomita Y, Hattori Y, Uneda A, Matsumoto Y, Michiue H, Date I.

Fibroblast growth factor 13 regulates glioma cell invasion and is important for bevacizumab-induced glioma invasion. *Oncogene*. 2018 Feb 8;37(6):777-786.

doi: 10.1038/onc.2017.373.

⑤ Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Inoue S, Maruo T, Otani Y, Fujii K, Ishida J, Shimazu Y, Yoshida K, Michiue H, Antonio Chioocca E, Date I.

Annexin A2 regulates angiogenesis and invasion phenotypes of malignant glioma. *Brain Tumor Pathol*. 2015 Jul;32(3):184-94. doi: 10.1007/s10014-015-0216-6.

(学会発表)(計11件)

Matsui Hideki, Development of the new

boron agent, BSH-peptide, towards clinical application, 15th International Congress of Radiation Research(ICRR 2015), 2015/5/25-29, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

Michiue Hiroyuki, The Development of BSH Fused Cell-penetrating Peptide towards Clinical Application, 15th International Congress of Radiation Research(ICRR 2015), 2015/5/25-29, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

Hiroyuki Michiue, Mizuki Kitamatsu, Natsuko Kondo, Yoshinori Sakurai, Hideki Matsui, The next generation Boron agents with BSH fused Cell Penetrating Peptide toward clinical application, 9th Young Researchers' BNCT Meeting in Kyoto, 2017/11/13-15, Kyoto University Uji Obaku Plaza (Kyoto)

(図書)(計0件)

(産業財産権)

出願状況(計3件)

名称: PET用ホウ素化合物

発明者: 松井秀樹、道上宏之、北松瑞生ら

権利者: 上記

種類: 特許

番号: 特願 2014-144412

出願年月日: 平成 26 年 7 月 14 日

国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: 細胞膜透過型ホウ素ペプチド

発明者: 松井秀樹、道上宏之、北松瑞生ら

権利者: 上記

種類: 特許

番号: 第 6 3 2 0 4 6 9

取得年月日: 平成 3 0 年 4 月 1 3 日

国内外の別: 国内

(その他)

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 松井秀樹(Matsui Hideki)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 30157234

(2)研究分担者 道上宏之(MICHIE Hiroyuki)  
岡山大学・中性子医療研究センター・准教授  
研究者番号: 20572499

(3)  
連携研究者 宮武伸一(MIYATAKE Shin-ichi)  
大阪医科大学・医学部・特別職務担当教員(教授)

研究者番号: 90209916

連携研究者 松下博昭(MATSUSHITA Hi roaki)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 60732394

連携研究者 北松瑞生(KITAMATSU Mizuki)  
近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：60379716