

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390293

研究課題名(和文)腫瘍選択性を有するテララーメイド型の中性子捕捉剤の開発

研究課題名(英文)tumor specific new boron agent for BNCT

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、難治性がんの治療法として期待されている。本研究では、BNCT実用化に向け切望されている、様々ながんに対する特異的で高導入効率をもつホウ素製剤の開発を目指す。従来のホウ素製剤とは異なる、導入率を高めるために開発中の多量体ホウ素化合物に腫瘍標的ペプチドを結合させた全く新しいタイプのホウ素試薬を作製する。作製したホウ素試薬を用い腫瘍モデル動物で照射を行い効果を検証する。予想される成果が得られれば、「テララーメイド型の粒子線治療」の実現に向け大きな一歩となる。

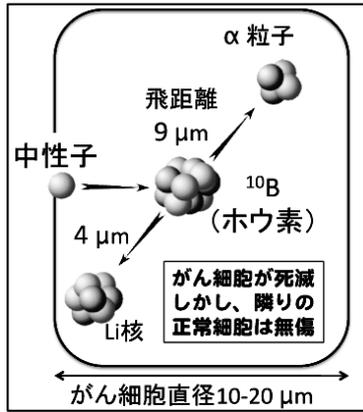
研究成果の概要(英文)：New anti-cancer therapy with boron neutron capture therapy (BNCT) is based on the nuclear reaction of boron-10 with neutron irradiation. In BNCT clinical trial, two boron compounds, BPA (boronophenylalanine) and BSH (sodium borocaptate), were used for BNCT. BPA is taken up into cells through amino acid transporters that are expressed highly in almost all malignant cells, but BSH cannot pass through the cell membrane and remains outside the cell. To overcome this disadvantage of BSH in BNCT, we used a cell-penetrating peptide system for transduction of BSH. CPP (cell-membrane penetrating peptide) is very common peptide domains that transduce many physiologically active substances into cells in vitro and in vivo. BSH-fused CPPs can penetrate the cell membrane and localize inside a cell. BSH-CPP is one of the most promising boron agent in next generation BNCT.

研究分野：癌

キーワード：がん ホウ素中性子捕捉療法 粒子線治療 悪性脳腫瘍 ホウ素製剤研究 細胞内導入

1. 研究開始当初の背景

BNCTは、悪性度の高い浸潤性・転移性のがんの有効であると期待される粒子線治療法である。予めホウ素同位体(10B)を取込ませた腫瘍組織に中性子線を照射することにより細胞内で核反応を誘発し、粒子とLi核を発生させる(右図)。これらの粒子は飛距離が4~9 μmで、細胞一個の大きさより小さい。したがって、がん細胞にだけ10Bが導入されていれば、1回の照射でがん細胞のみを殺傷し、すぐ隣の正常細胞を損傷することはない。

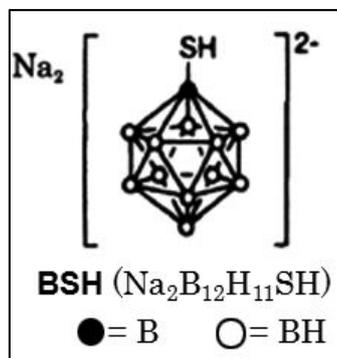


したがって、がん細胞にだけ10Bが導入されていれば、1回の照射でがん細胞のみを殺傷し、すぐ隣の正常細胞を損傷することはない。

BNCTの実用化に向け、解決しなければならない大きな問題は3つある。その一つは、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、連携研究者の小野(京大、原子炉実験所)らにより、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、臨床試験が開始された。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、この問題は解決の目途が立ったと言える。

一方、残る二つは、十分な治療効果を約束できるホウ素製剤の開発と、治療対象となるがんの適応拡大である。BNCTに使われるホウ素化合物は改良が重ねられ、その一つ12個の10Bをバスケット状に結合させたBSHと呼ばれる化合物は有効性が示されている(右図)。

しかし、腫瘍組織への取込みが受動的で標的能力が低いため、がん細胞殺傷能力が弱く正常細胞もダメージを受けてしまう。また、これまで国内外で約600例臨床施行されているBNCTの対象は、現在のところ悪性脳腫瘍(神

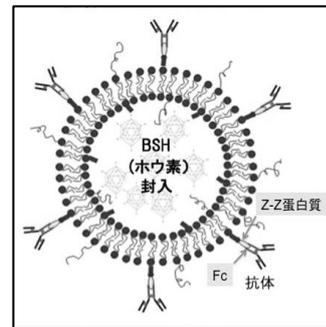


経膠腫) 皮膚悪性黒色腫、頭頸部癌の3種類に限られている。

これらの問題のうち、我々はまず、現行のBSHを用いてがん細胞を特異的に認識するホウ素試薬の開発に焦点を絞り、悪性脳腫瘍を対象として研究に着手した。同腫瘍細胞に高発現している変異型上皮細胞増殖因子受容体(EGFRvIII)に対する抗体を表面に結合させた脂質小胞に、BSHを封入したイムノナノカプセルを作製し、脳腫瘍モデルマウスに尾静脈内投与したところ、10Bを腫瘍特異的に集積させることに成功した(Feng・松井ら, Biomaterials 30:1746, 2009)。

このイムノナノカプセルの特長は、表面への抗体固定法にIgGのFc領域と結合するプロ

テインAのZZドメインを採用した点にある(右図)。これにより、BSHを内包するカプセルを基本構造とし、治療しようとす



る腫瘍に応じて容易に抗体を付け替えられるモジュール構造をもつホウ素製剤の製造が可能となる。そればかりでなく、有用な抗体が現存しない腫瘍に対しては、がん細胞に特異的に結合するリガンドをFc領域融合蛋白質として結合させることもできる。このように、我々のこれまでの成果を発展させ、様々な種類のがんに対応できる汎用性の高いイムノナノカプセル型ホウ素試薬を開発することが本研究の第一の目的である。

BNCTに用いる腫瘍特異的ホウ素製剤の有効候補は、BSH内包イムノナノカプセルである。しかし、標的抗原の発現性によっては十分な量の10Bを細胞に送達できない可能性が残る。そこで我々は、別の送達メカニズムにより10Bを高効率に細胞内に導入する方法として、我々がすでに開発している蛋白質導入法(蛋白質セラピー)を利用しBSHそのものを細胞内に導入する着想に至った。

蛋白質セラピーは、細胞膜通過能をもつオリゴペプチドを付加することで、様々な分子を細胞内に導入できる方法である(reviews:

松井ら, Curr Protein Pept Sci 4:151, 2003; 松下・松井, J Mol Med (Berl) 83:324, 2005) ）。しかし、1 分子の BSH に細胞膜通過ペプチドを結合しても、10B 導入率はナノカプセルに比べ圧倒的に低いことは容易に予測できる。これを解決するために、全く新しい視点からアプローチし、既存の BSH をリンカーペプチドで連結させ、1 試薬あたりの 10B の数を飛躍的に増大させることに成功し、BNCT はペプチドベクター（薬剤キャリアペプチド・細胞膜通過ペプチド・腫瘍標的化ペプチド）を利用した BSH-peptide 開発により数段高い効果が期待される。

これらを踏まえ本研究では、マルチ BSH に細胞膜通過ペプチドとがん細胞標的ペプチドを共有結合させることにより、イムノナノカプセルとは異なる経路でがん細胞に高効率に 10B を送達できる標的ペプチド結合型ホウ素製剤の開発を試みることを第二の目的とする。

2. 研究の目的

医学の最重要課題の一つ、転移性・浸潤性の難治がんに対する BNCT 法の早期実現に貢献することが、学術的な特色である。丸山ら(帝京大)のトランスフェリン結合型リポソームのように、能動的に標的化を行うリポソーム製剤は存在する。しかし、抗体を容易に付け替えることが可能なモジュール構造をもつイムノナノカプセルは例がない。言うまでもなく、特許出願中のマルチ BSH は先例がない。これらが本研究の独創的な点である。

本研究において、モデル動物で治療効果を示すイムノナノカプセル型ホウ素試薬あるいは標的ペプチド型ホウ素試薬が完成すれば悪性脳腫瘍や卵巣がんに対する BNCT の実用化に拍車がかかるだけでなく、膵臓がん等の難治性がんの治療法開発の糸口となり波及効果は高い。日本がリードしている BNCT 分野での優位性を堅持し、難治性ガン撲滅において世界の医療に貢献するためにも、BNCT によるがん治療法の確立は重要であり、切望されている様々な種類のガンに対する特異的なホウ素剤の開発は急務である。

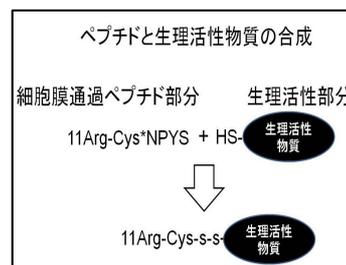
そこで、本研究では新規ホウ素剤の開発を主に置いた研究を行う。特に細胞膜通過ペプチ

ドと呼ばれる、特殊なペプチドを用いて、安全に且つ大量にホウ素薬剤の腫瘍細胞内へと運搬する、新規のホウ素薬物開発を行う。さらに、動物体内で薬物動態評価できるシステムを構築し、臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

申請者は、現在まで、細胞膜通過ペプチドを用いた「**プロテインセラピー**」の開発研究を実施し、様々な生理活性物質を細胞内に導入・細胞制御を行うことに成功している。我々は 11 個のポリアルギニン(11Arg または 11R) からなる細胞膜通過ペプチドを開発し、様々な生理活性物質を細胞内に導入してきた実績をもつ(松下・松井ら, J Neurosci 21:6000, 2001; 野口・松井ら, Nat Med 10:305, 2004; 道上・松井ら, J Biol Chem 280:8285, 2005; 道上・松井ら, FEBS Lett 579:3965, 2005)。この 11Arg 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 基の間でジスルフィド結合を生じさせること

により共有結合させ(右図)この BSH-11R の細胞内導



入に成功している。この結合反応を用いて、スクリーニングで選定した悪性脳腫瘍標的ペプチドと 11R をマルチ BSH に結合させる。EC-1 ペプチドと 11R を結合させた卵巣がんに対するマルチ BSH も同様に作製する(Michiue H et al., J Biol Chem. 280, 8285-9, 2005)。

これまでに、**1 個の BSH に細胞膜通過ペプチドを結合させた BSH-peptide の作製**に成功し、細胞内導入を確認した。より効率よく細胞内へと BSH を運ぶために、**多数の BSH とペプチドを融合させたマルチ BSH ペプチドを作成に成功しており、その効果について検証する**。これにより多数の BSH を一つのペプチドにて運ぶことが可能となり、効率よく細胞内へと導入可能である。BBB が破壊されている脳腫瘍部でのみ BSH-peptide が漏出す

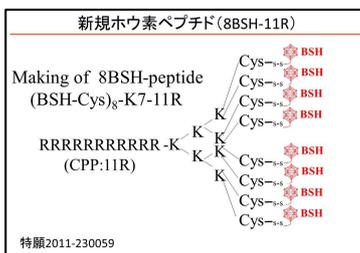
るため、腫瘍細胞内へと取り込まれる。本研究は、BSH をペプチドを用いたホウ素製剤を作成することを中心に行うものとする。

4. 研究成果

BNCT は悪性脳腫瘍をはじめとするがん治療において臨床研究が施行されているが、現行のホウ素製剤は低 10B 含有率および腫瘍選択性が低いため、十分な治療効果を示すに至っていない。したがって、これらの問題を解決する新規ホウ素製剤の開発は BNCT の発展に欠かすことができない。本研究では、1 分子あたりに占める 10B の割合が高く、腫瘍細胞内部への導入能を持つ BSH-ペプチドを開発した。

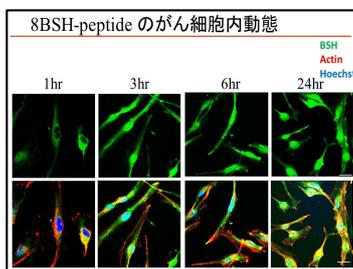
(1) 初期型 BSH-peptide の開発

BSH は側鎖に SH 基を有しており、この SH をアミノ酸やペプチドや他の反応基との結合に使用する。当初、BSH-11R を作成していたが、分子内のホウ素含有率を上げるために 1 個の 11R ペプチドに多数の BSH を結合させた 8BSH-11R を作成した(右図)。



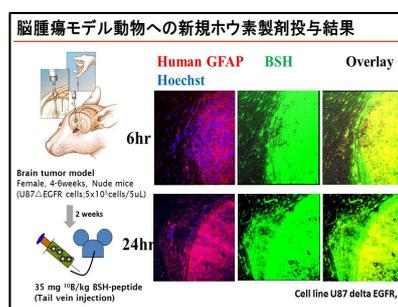
BSH-peptide は、申請者らが代表者となり 2011 年 10 月 19 日に特許庁への特許出願 (特願 2011-230059) を完了している。

これにより、BSH を安全に、高効率に細胞内に導入できる薬剤の開発の一步を得た。数種のホウ素ペプチドを作成後、この 8BSH-11R をホウ素ペプチドの第一候補として、細胞内導入実験を行なった(右図)。この結果、時間経過とともに BSH が細胞内の細胞質から核へと移動している像が確認された。これにより、8BSH-11R は細胞内に導入されるだけでなく、かくへときょくざいするほうそせいざいであることが確認された。これは、我々の BNCT



シミュレーションにて同じ量のホウ素が、細胞膜に存在する場合と核に存在する場合は、中性子照射により生じた核分裂によるエネルギーが細胞に与えるダメージが 100 倍程度違うことからしても、大きな効果であると思われる。すなわち、細胞に入らない BSH と細胞に入り尚且つ核に局在する BSH は効果が 100 倍程度違うことを示している。この製剤をマウス脳腫瘍モデルに対して尾静脈より注射し、腫瘍部及び周囲の正常部のホウ素の取り込みを確認した。その結果、腫瘍部に一致してホウ素の取り込みが確認され、その効果は 24 時間経過しても継続していることが観察された(右図)。

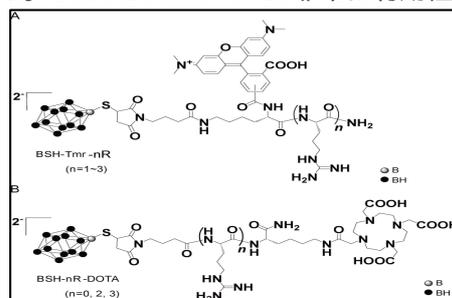
以上より、この 8BSH-11R すなわち BSH-peptide



は非常に有用なホウ素化合物であることが本研究にて証明された。

(2) 臨床研究へ向けた BSH-ペプチドの構造

(1)で示した 8BSH-11R は非常に有効性が高いものであったが、構造が複雑であったため、大量合成へ発展させるには少々難があった。そこで、臨床応用へ発展可能な BSH-CPP を作成することとした。CPP はアミノ酸のアルギニン (R) が長く連なっているが、11R の導入効率が最も高い。しかしながら、9R、7R、5R とアルギニンの長さを減らしていても細胞内導入は可能である (Hitsuda et al, 2012, Biomaterials)。本研究の BSH-ペプチドに利用したペプチドドメインは、アルギニン (R) が 1~3 個の Short-アルギニンドメインである。これまでに報告した 3R より短い、2R、1R でも細胞内、及び動物モデルにおける腫瘍内への導入が



可能であるかを検証するために、BSH-3R, BSH-2R, BSH-R を作成した。

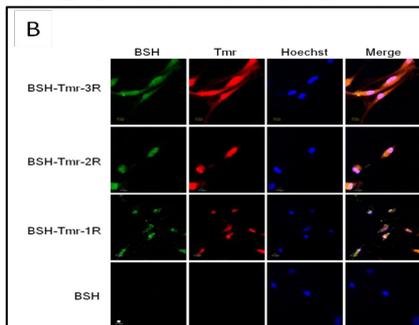
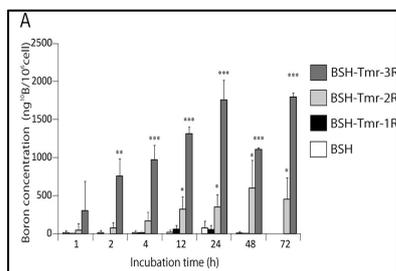
(3) BSH-peptide の細胞内導入効果の検討

(1) にてデザインされた BSH-peptide に蛍光色素 (TMR) を結合させ、悪性脳腫瘍細胞へと投与した。3 種類の BSH-Tmr-ペプチド BSH-Tmr-1R, BSH-Tmr-2R, BSH-Tmr-3R および BSH (0R) を用いてグリオーマ細胞 U87 EGFR への 10B 導入を検討した。10 μ M のペプチド濃度で培養した細胞内の 10B 濃度を ICP-AES で測定した。2R および 3R では 10B は細胞内に導入されている。細胞内 10B 濃度は経時的に増加しており、24 時間において、それぞれ 354.3 ± 157.3 , 1757.5 ± 261.2 ng10B/106 cell (n=4) であった。一方、0R および 1R では 10B はごく少量しか細胞内に導入されておらず、24 時間での細胞内濃度はそれぞれ 74.2 ± 91.5 , 57.1 ± 52.5 ng10B/106 cell (n=4) であった

(右図 A)。以上より、BSH 及び、BSH-1R は細胞内導入がされず、2R, 3R は細胞内 BSH が導入されていることが確認された。

さらに、10 μ M BSH-ペプチド投与後 24 時間で、グリオーマ細胞内の BSH 局在を免疫染色で確認した。BSH は抗 BSH 抗体 (緑) にて免疫し、核染色 (青) を追加した。共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、2R および 3R は細胞質領域および核内に BSH の局在が認められた。また、BSH-ペプチドに結合している Tmr (赤) も共局在していることより、BSH-ペプチドが細胞内で分解されず安定していることを示している。

一方、0R および 1R は BSH の蛍光



は観察されないか、ごく微量の蛍光であったため、細胞内への導入は、ほとんどないと考えられた。

R の長さは細胞内導入実験の結果より 2R および 3R で細胞内に導入されることを免疫細胞染色及び細胞内 10B 濃度測定により証明した

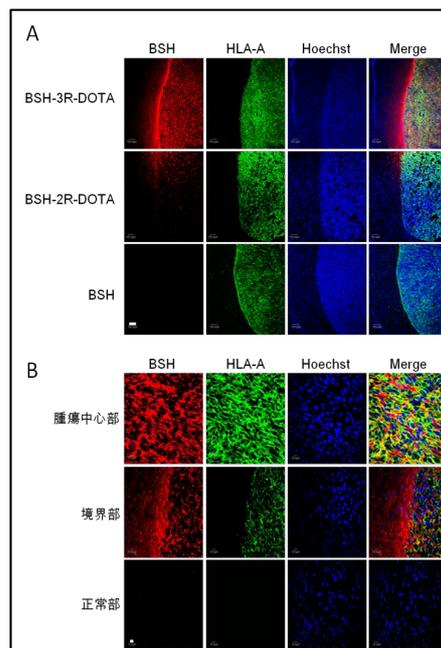
(4) 脳腫瘍モデル作製と薬剤生体内分布

本実験に関する動物の飼育、保管、使用は岡山大学動物実験委員会に承認された (承認番号: OKU-2013058) 手順に従い行った。担がんモデルマウス (BALB/C nu/nu, メス, 7-9 週齢, 16-20 g, 日本エスエルシー, 静岡) は U87 EGFR 細胞懸濁液 (1×10^5 cells/ μ L) 3 μ L を脳内に直接注入して作製した。12 日後、200 μ L の BSH-2R-DOTA、BSH-3R-DOTA の 2 種類の BSH-ペプチドおよび BSH (200 nmol/mouse) を尾静脈より投与した。投与後、24 時間にてマウス脳を固定し、免疫組織染色後共焦点レーザー顕微鏡で BSH の局在を観察した。

免疫染色は、BSH-ペプチドを抗 BSH 抗体 (赤)、マウス脳内へ移植したヒトグリオーマ細胞を抗 HLA-A 抗体 (緑) にて染色し、核染色 (青) を追加した。共焦点レーザー顕微鏡にて脳内 BSH 局在を観察したところ、低倍率では、BSH-3R-DOTA、BSH-2R-DOTA は腫瘍部で局在が

観察され、正常部ではほとんど認めなかった (右図 A)。特に

BSH-3R-DOTA では強く腫瘍内部に局在が確認された。高倍率においては、BSH-3R-DOTA は、腫瘍中心部および辺縁部ともに腫瘍細胞内部



に BSH の局在が確認された (上記図 B)。細胞内部の局在を見たところ、細胞質領域では、BSH-3R-DOTA の導入が確認された。

(5) 以上より、BSH-3R は細胞レベル及び組織レベルにおいて、BSH の細胞内導入効果をもたらす有用な修飾であることが証明された。本研究では、臨床研究を考慮した新規ホウ素ペプチドの開発に成功した。

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 11 件)

Michiue H, Sakurai Y, Kondo N, Kitamatsu M, Bin F, Nakajima K, Hirota Y, Kawabata S, Nishiki T, Ohmori I, Tomizawa K, Miyatake S, Ono K, **Matsui H**. The acceleration of boron neutron capture therapy using multi-linked mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) fused cell-penetrating peptide. *Biomaterials*. 2014 Mar;35(10):3396-405 (査読有り)

Ookubo N, **Michiue H**, Kitamatsu M, Kamamura M, Nishiki T, Ohmori I, **Matsui H**. The transdermal inhibition of melanogenesis by a cell membrane permeable peptide delivery system based on poly-arginine. *Biomaterials*. 2014 May;35(15):4508-16. (査読有り)

Fujimura A, **Michiue H**, Cheng Y, Uneda A, Tani Y, Nishiki T, Ichikawa T, Wei FY, Tomizawa K, **Matsui H**. Cyclin G2 promotes hypoxia-driven local invasion of glioblastoma by orchestrating cytoskeletal dynamics. *Neoplasia*. 2013 Nov;15(11):1272-81. (査読有り)

Hitsuda T, **Michiue H**, Kitamatsu M, Fujimura A, Wang F, Yamamoto T, Han XJ, Tazawa H, Uneda A, Ohmori I, Nishiki T, Tomizawa K, **Matsui H**.

A protein transduction method using oligo-arginine (3R) for the delivery of transcription factors into cell nuclei. *Biomaterials*. 2012 Jun;33(18):4665-72 (査読有り)

Candan G, **Michiue H**, Ishikawa S, Fujimura A, Hayashi K, Uneda A, Mori A, Ohmori I, Nishiki T, **Matsui H**, Tomizawa K. Combining poly-arginine with the hydrophobic counter-anion 4-(1-pyrenyl) butyric acid for protein transduction in transdermal delivery. *Biomaterials*. 2012 Sep;33(27):6468-75 (査読有り)

[学会発表](計 12 件)

第 9 2 回日本生理学会大会 (2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日) (神戸国際会議場・展示場 (神戸ポートアイランド)) **松井秀樹**ら「The

development of whitening peptide with peptide percutaneous drug delivery system」

日本中性子捕捉療法学会学術大会 2014 年 7 月 5 日 ~ 6 日 (大阪大学コンベンションセンター) **松井秀樹**ら「Short-Arginine domain を用いた新規 BSH-peptide による臨床応用へ向けた取り組み」

15th International Congress on Neutron Capture Therapy (2012 年 9 月 10 日 ~ 14 日)

(Tsukuba International Congress Center) **Hideki Matsui** et al, 「Multi-linked BSH fused cell-penetrating peptide (multi-BSH-peptide) accelerated Boron Neutron Capture Therapy」

[産業財産権]

出願状況 (計 3 件)

名称: アクチン重合定量測定法を利用した抗浸潤薬新規スクリーニング法

発明者: **松井秀樹** 山田浩司 道上宏之ら

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-137489

出願年月日: 出願日 2012 年 6 月 19 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

名称: 「抗がん剤」(フルボキサミンを配合することを特徴とする抗脳腫瘍治療薬剤 第二医薬用途)

発明者: **松井秀樹** 道上宏之 山田浩司ら

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-263317

出願年月日: 出願日 2012 年 11 月 30 日

取得年月日: 公開日 2014 年 6 月 12 日

国内外の別: 国内

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・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20572499

(3) 連携研究者

小野 公二 (Ono Koji)

京都大学原子炉実験所中性子医療高度化研究部門・教授
研究者番号: 90122407

宮武伸一 (Miyatake Shin-ichi)

大阪医科大学・先端医療開発部門・教授
研究者番号: 90209916