

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791502

研究課題名(和文) ペプチドDDSを用いた新規ホウ素製剤による悪性脳腫瘍治療研究

研究課題名(英文) New BNCT with boron-peptide against malignant brain tumor

研究代表者

道上 宏之(Michiue, Hiroyuki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20572499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、悪性腫瘍細胞に対してホウ素を取りこませ、中性子照射により、腫瘍殺傷効果を得る治療法である。本研究は「ホウ素製剤を悪性脳腫瘍細胞内部に、そして、腫瘍選択的にペプチドを用いて運搬し、中性子照射により腫瘍を効率よく殺傷する」ことを主目的とする。本研究の成果はペプチドベクターを用いた薬剤運搬のための革新的方法となる。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) is an encouraging treatment under clinical investigation. In malignant cells, BNCT consists of two major factors: neutron radiation and boron uptake. To increase boron uptake in cells, we established new boron compound with peptide. New BSH-peptide will be very important drug for next generation BNCT.

研究分野：癌

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

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍特に膠芽腫は、予後の改善が見られない悪性度の高い疾患の一つである。治療抵抗性の原因として、腫瘍と正常部の境界が無く、腫瘍が正常脳へ浸潤拡大することが原因として挙げられる。膠芽腫に対して手術療法・化学療法・放射線療法の複合的な治療が第一選択であり、加えてホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) により予後が延長するとの報告がある (Kawabata S. et al, J Radiat Res, 2009)。

BNCT の原理はホウ素同位体 (元素記号 ^{10}B) を細胞へ取りこませ、中性子線を照射する。それにより、核反応 (ホウ素中性子捕捉反応) が起こり $^{10}\text{B} + ^1_0\text{n} \rightarrow ^7_3\text{Li} + ^4_2\text{He}$ により Li 粒子と α 粒子が発生する。核反応により発生する高エネルギー付与率の Li 粒子や α 粒子は数ミクロンしか進行しない。そのため、悪性腫瘍細胞内でのホウ素中性子捕捉反応は、悪性腫瘍細胞のみを破壊し、周囲の正常細胞を傷つけない。この原理は正常脳領域への不規則で高度な浸潤傾向を示す膠芽腫には最も適した治療法になると考えられる。しかし以前より、BNCT 臨床応用には3つの問題点が指摘されていた。

現在のBNCTの臨床応用・一般臨床への応用へ向け

	問題点	解決方法
①	中性子源として原子炉を利用しているため危険	共同研究者らにより病院設置可能な加速器が完成し、治験準備中
②	BNCT治療の結果が単施設での症例報告レベル	2009年よりGBM患者に対し多施設共同研究(大阪医大・岡山大学、等)にてBNCT治療の臨床研究施行中
③	治療に適切なホウ素製剤が完成していない	現時点では、2種類のホウ素製剤が使用されているが、腫瘍特異性が無い、腫瘍部でのホウ素濃度が低い、細胞内へ取り込まれない等 未解決!!!

については、共同研究者の京大原子炉実験所粒子線腫瘍学研究所長小野らが**病院設置可能なサイクロトロン型加速器の中性子源の開発成功**により、BNCT が日常医療で利用できる現実性が高くなってきた。については、私は、2007年12月末まで、**大阪医科大学脳神経外科の宮武らと共に、集積機序の異なるホウ素化合物(BSH と BPA)を用いて悪性脳腫瘍患者に対し BNCT を施行し、中央生存期間 23.5 ヶ月という素晴らしい成績**を発表した (Kawabata S. et al, J Radiat Res, 2009)。その後、2009年より多施設共

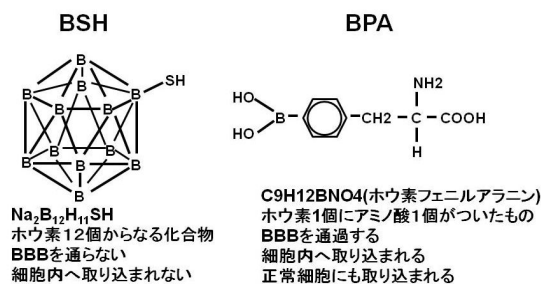
同研究の新規診断膠芽腫に対するBNCT臨床研究が開始され私もプロジェクトの一員として参加している。

現在、 と は解決のめどが見ついたが、についてはよりよい化合物開発が望まれ、それによる更なるBNCTの臨床成績の改善が期待される。

2. 研究の目的

現在臨床研究で用いられているホウ素化合物は、BPA と BSH の2種類がある。BPA はホウ素1個に対し、アミノ酸のフェニルアラニンを融合させたもので、BPA は、アミノ酸の代謝の多い悪性腫瘍細胞に能動的に取り込まれ、蓄積する。しかしながら、悪性腫瘍であっても、休止期にあり、細胞分裂が止まっている腫瘍細胞には取り込まれないこと、BBB を通過するため、正常細胞にも取り込まれること、などが弱点として挙げられる。一方、BSH はホウ素12個からなる大きなホウ素化合物である。BBB を通過しないため、BBB の破たんしている脳腫瘍部位に特異的に漏出する。しかし、BSH は細胞内への能動的取り込みがないため、細胞と細胞の間質に局在するのみである。ホウ素中性子捕捉反応は、細胞内での殺細胞効果であることを考えると、細胞外にしか存在しない BSH の効果は低いと考えられる。これらの問題によりいまだ治療にとって最適なホウ素製剤は完成していない。

現在の臨床研究で使用されている2種類のホウ素製剤



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 (Michiue H et al., J Biol Chem. 280, 8285-9, 2005)。「**プロテインセラピー**」の**長所は、遺伝子に影響を与えず、タンパク質やペプチドのみならず、様々な生理活性物質を自由に細胞内導入**できることである。今回私は、BSHの運び手として細胞膜通過ペプチドを利用することにより、今後の臨床応用へと発展することが可能と考えた (Michiue H et al., Cancer Biology & Therapy, 2009, (23):2306-13)。新規**ペプチドベクター**は、細胞内に導入がこれまで不可能であった様々な物質を細胞内導入することを可能にする新しいシステムである。

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第一世代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ペプチドキャリアに細胞膜通過ペプチドを結合させた第二世代キャリアペプチド化BSH-peptideの**開発ほぼ成功している。多数のBSHを一つのペプチドにて運ぶことによ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。さらに、腫瘍標的化ペプチドを使用し、腫瘍特異性を持った第三世代BSH-peptideへと発展させることができる。

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。**BSH-peptideは、申請者が代表者となり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。**

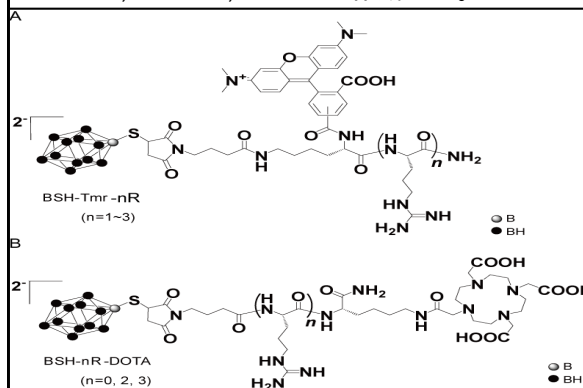
4. 研究成果

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) 合成したBSH-ペプチドの構造

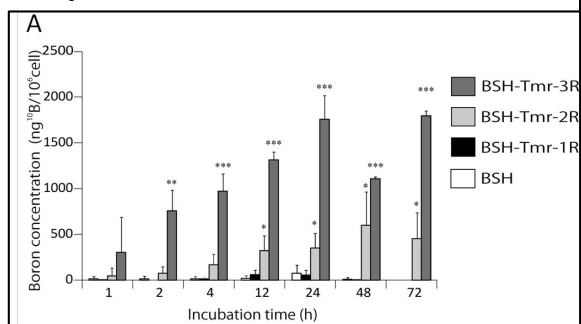
本研究のBSH-ペプチドに利用したペプチドドメインは、アルギニン (R) が1~3個のShort-アルギニンドメインである。これまでの我々の報告で、11このアルギニンを結合させた11Rが最も細胞内への導入効率がいいものの、3Rであっても細胞内に導入できることを報告した。さらに、3Rより短い、2R、1Rでも細胞内、及び動物モデルにおける主要内への導入が可能であるかを検証するために、BSH-3R, BSH-2R, BSH-Rを作成した。



(2) BSH-peptideの細胞内導入効果の検討

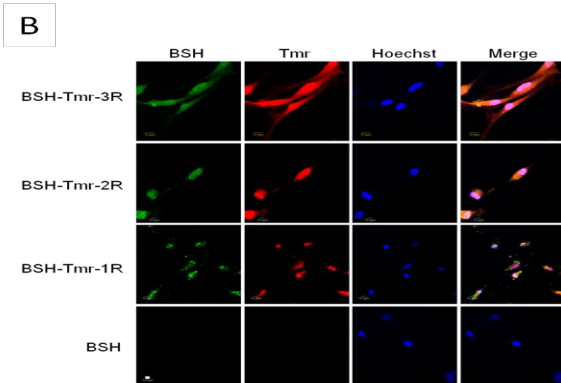
(1)にてデザインされたBSH-peptideに蛍光色素(TMR)を結合させ、悪性脳腫瘍細胞へと投与した。3種類のBSH-Tmr-ペプチドBSH-Tmr-1R, BSH-Tmr-2R, BSH-Tmr-3RおよびBSH (0R)を用いてグリオーマ細胞U87 EGFRへの10B導入を検討した。10 μMのペプチド濃度で培養した細胞内の10B濃度をICP-AESで測定した。2Rおよび3Rでは10Bは細胞内に導入されている。細胞内10B濃度は経時的に増加しており、24時間において、それぞれ354.3 ± 157.3, 1757.5 ± 261.2 ng10B/106 cell (n=4)であった。一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

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

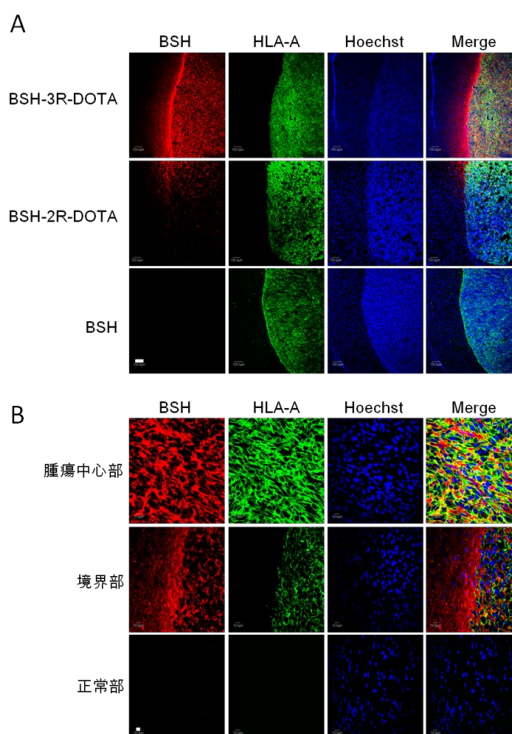


(3) 脳腫瘍モデル作製と薬剤生体内分布

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) 手順に従って行った。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 \times 10⁵ 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 (上記図 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。



(4) 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就職であることが証明された。

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 18 件)

Hakata Y, Tsuchiya S, Michiue H,

Ohtsuki T, Matsui H, Miyazawa M, Kitamatsu M.

A novel leucine zipper motif-based hybrid peptide delivers a functional peptide cargo inside cells. (査読有り)

Chem Commun (Camb). 2015 Jan 7;51(2):413-6.

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)

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)

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)

Michiue H, Date I.

The use of the ubiquitin-proteasome system in neurosurgery and the clinical applications of protein therapy.

No Shinkei Geka. 2014 Oct;42(10):899-906. (査読なし、依頼原稿)

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)

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)) **道上宏之**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) **道上宏之**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」

第 3 1 回日本脳腫瘍学会学術大会 (2013 年 12 月 8 日 ~ 10 日) (フェニックス・シーガイア・リゾート) **道上宏之**ら「脳血液関門通過可能なアクチン重合抑制薬による膠芽腫に対する抗浸潤効果の検討「ドラッグスクリーニングより前臨床試験までの検討」

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

(Tsukuba International Congress Center)

H. Michiue 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: 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: **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

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

道上 宏之 (MICHIEU, 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