

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10333

研究課題名(和文) 脳腫瘍幹細胞標的型ホウ素ペプチドを用いた新しいホウ素中性子捕捉療法

研究課題名(英文) New BNCT against brain tumor stem cell with BSH-peptide

研究代表者

道上 宏之 (Michiue, 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、先行研究にて細胞膜透過機能を有するペプチド CPPを複数個のBSHと結合させたmulti-BSH-CPPを作成した。本プロジェクトにて、臨床応用へ向けて、さらに臨床応用へ向けたホウ素製剤へ向けて発展を行った。

a) 最小CPPを結合させたホウ素化合物BSH-3Rの開発に成功した。合成上非常に簡便であり、臨床応用な化合物である。 b)BSH-3Rは腫瘍内部への取り込み能を有しており、さらに時間経過により、核へと導入が確認された。c)本薬剤の動物における薬物動態評価を行うために、金属キレーター及び放射線各種<sup>64</sup>Cuを用いた、BSH-3R-DOTA-<sup>64</sup>CuのPET用プローブを作成した。

研究成果の概要(英文)：We already succeeded to create new boron compound with cell penetrating peptide (CPP) for boron neutron capture therapy (BNCT). The CPP fused multi-BSH was synthesized in previous project, but it was very difficult to apply to high-volume synthesis for clinical use. In this time, we made up new BSH-CPP with possibility of clinical application and showed new boron drug imaging system for pharmacokinetic evaluation.

A) We made up BSH-3R with fused minimum number of CPP, 3R for clinical use. B) We observed intra-cellular localization of BSH-3R in human glioma cells and finally this boron compound localized at the nucleus of glioma cells. C) We created new positron emission tomography (PET) probe, BSH-3R-DOTA-<sup>64</sup>Cu. This BSH-3R-DOTA-<sup>64</sup>Cu was consisted of boron compound part (BSH), CPP part (3R), metal chelate part (DOTA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) and radioactive substance part (<sup>64</sup>Cu).

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) ホウ素製剤 細胞膜通過ペプチド 陽電子放射断層撮影 (PET)

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、殆ど予後の改善が見られな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・放射線療法の集学的治療が標準治療であり、標準治療にホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) の追加が有効、との報告がある。

BNCT の原理はホウ素を細胞へ取りこませ、中性子照射する。それにより、核分裂反応 ( $^{10}\text{B} + \text{n} \rightarrow ^7\text{Li} + 4\text{He}$ ) が起こり、Li 粒子と  $\alpha$  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の Li 粒子や  $\alpha$  粒子は数ミクロンしか拡がらない。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。私は、大阪医科大学先端医療開発部門特務教授の宮武らとの共同研究にて、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。さらに、2009 年より多施設共同研究の初発膠芽腫に対する BNCT 臨床研究メンバーの一員として参加し、岡山大学病院より 5 名の初発膠芽腫患者に対して BNCT を行った。

近年 BNCT の一般臨床応用を考慮し、原子炉を脱却した BNCT の発展が望まれていた。近年、病院設置型の加速器中性子発生装置が住友重機械工業より開発・販売され、医療認可間近である。しかし BNCT は中性子照射だけでは治療できない。半分以上の治療効果が腫瘍細胞へのホウ素の取り込みに依存する。これまでの臨床研究において、2 種類のホウ素製剤が使用されてきた。しかしながら、腫瘍細胞全てに取り込ませるホウ素製剤は、これまでになく、BNCT における現在の最も深刻な問題点である。私はこの問題点に注目し、ペプチドを利用した新規のホウ素製剤の開発とホウ素製剤の薬物動態を評価する PET 用プローブの開発を本研究課題とした。

## 2. 研究の目的

本申請は、「脳腫瘍幹細胞を標的としたホウ素ペプチド開発とホウ素薬物動態評価のための PET 核種開発」に関する研究である。膠芽腫に対する BNCT 臨床研究が有効とされているが、腫瘍内部へ導入されるホウ素薬剤や腫瘍部におけるホウ素濃度を評価するシステムがない。本研究において、悪性神経膠腫・脳腫瘍幹細胞へ利用可能なペプチドで運搬する新規ホウ素ペプチドの開発ならびに PET によるホウ素ペプチドの薬物動態評価を行う。我々は、先行研究にて細胞膜透過機能を有するペプチド CPP (Cell-penetrating peptide) を複数個の BSH と結合させた multi-BSH-CPP を作成

し、論文作成、特

許取得を行った (Michiue H. et al., Biomaterials 2014, 35(10):3396-405, 「細胞透過型ホウ素ペプチド」2011 年 10 月 19 日出願、特願 2011-230059)。

本研究目的は、このホウ素ペプチドを (BSH-CPP) を臨床応用へ向けて、さらに臨床応用へ向けたホウ素製剤へ向けて発展させることであった。具体的には、下記の項目を満たすホウ素製剤開発を行った。腫瘍内部への取り込み能を有している薬剤、容易な合成方法により合成可能である薬剤、毒性を有しない安全な薬剤、腫瘍細胞特異的に導入され正常細胞に導入されない薬剤、腫瘍細胞、特に腫瘍幹細胞に高効率に導入される薬剤。これら、5 つの条件を達成したホウ素薬剤開発を目標とした。

## 3. 研究の方法

### ①ホウ素ペプチドの設計・合成

細胞膜透過ペプチドの使用により細胞内に導入されることを当研究室より報告し、この技術を「プロテインセラピー」と名付け、さまざまな生理活性物質を細胞内に導入させた。現在までに、この技術を応用し、多数の BSH ホウ素化合物に細胞膜透過ペプチドを結合することに成功し、特許取得・論文作成を行った。臨床応用を目標とした場合、合成の簡素化・大量合成法の確立・合成コストの削減などを考慮に入れた新規のホウ素製剤を本研究にて行った。我々の先行研究にて、細胞膜透過ドメインを 11 個のアルギニン (11R) より 3 個アルギニン (3R) へ減らしても、導入効率は落ちるものの、細胞内で機能することを報告した (Hitsuda T. & Michiue H. et al., Biomaterials. 2012)。3R ドメインは、合成を考慮した場合、非常に簡便であり、合成コストも大幅に削減できる。さらに、3R よりも短い細胞膜透過ペプチドを探索するためにホウ素製剤 BSH と 2R・1R と結合させた BSH ペプチドを作成し、本研究に使用した。

### 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

悪性神経膠腫細胞内および担癌モデルを用いた腫瘍内部へのホウ素ペプチドの取り込みを、ICP-AES (誘導結合プラズマ発光分光分析装置) およびホウ素製剤 BSH に対する免疫染色にて行った。BNCT 反応は、核分裂による細胞殺傷効果が細胞の直径の半分程度であるため、細胞内に導入されているか否かにより、大きくその効果が影響を受ける。そのため、細胞内への導入を確認評価した。

### ホウ素ペプチド PET 用プローブ作成と担癌モデルを用いた PET 薬物動態評価

薬物動態評価を行う上で、定量性・高感度を有するのは PET イメージングである。我々の施設のある「おかやまメディカルイノベー

ションセンター」(OMIC)では、GMP 基準の PET 用核種を作製する施設を有する。本研究では、金属キレータの DOTA に放射線核種  $^{64}\text{Cu}$  を結合させたホウ素ペプチド核種を作製し、臨床応用へ向けたホウ素薬物動態評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### ①ホウ素ペプチドの設計・合成

最小の細胞膜通過ペプチドとなる 1R, 2R, 3R をデザインし、近畿大学理工学部北松瑞生講師の協力の下、ホウ素薬剤 BSH とこれらのペプチドとの合成実験を行った。いずれの薬剤の作製にも成功した (BSH-1R, BSH-2R, BSH-3R)。悪性脳腫瘍細胞株 U87delta EGFR へ投与を行い、細胞増殖アッセイにて毒性の検証を行ったが、コントロール BSH と比較して、明らかな毒性を認めなかった。またいずれの製剤も、水への溶解性を認めた。

##### 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

BSH-3R, BSH-2R, BSH-R, BSH を U87deltaEGFR 細胞へ投与し、細胞内 BSH 経時変化局在を観察した。BSH-3R, および BSH-2R は細胞内導入が確認された。更に経時変化により核への局在の移動が確認された。脳腫瘍モデルマウスに投与し組織染色を行ったところ BSH-3R のみが 2-4 時間においても腫瘍特異的な局在が確認された。

##### ホウ素ペプチド PET 用プローブ作成と担癌モデルを用いた PET 薬物動態評価

BSH-3R-DOTA および BSH-DOTA を作成した。DOTA は 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid の略であり、金属キレータとして使用されている、サイクロトロンにより作成した  $^{64}\text{Cu}$  と PBS 条件下の非常に穏やかな条件で混合することのみで配位させることが可能である。BSH-3R-DOTA- $^{64}\text{Cu}$  並びに BSH-DOTA- $^{64}\text{Cu}$  の 2 種類の PET-probe を作成した。U87deltaEGFR を脳内に移植した脳腫瘍モデルマウスに対して、尾静脈投与し、投与後 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 後に小動物用 PET を用いて観察を行った。BSH-3R-DOTA- $^{64}\text{Cu}$  は投与後 6 時間にて、腫瘍部/正常脳比 (T/N 比) 15.5 という非常に高い腫瘍取り込みを示した。一方 BSH-DOTA- $^{64}\text{Cu}$  は、6 時間値が T/N 比 3.1 であった。その後 24 時間後であっても、BSH-3R-DOTA- $^{64}\text{Cu}$  は T/N 比 8.2 に対して、BSH-DOTA- $^{64}\text{Cu}$  の T/N 比は 3.7 であった。また同時に ICP での確認を行ったが、ほぼ同じ T/N 比を示した。

BSH-3R は、BSH に細胞内導入ペプチドを結合することにより細胞内導入型の BSH 機能を有した新規の化合物である。さらに *in vivo* での薬物動態評価を可能にする BSH-3R-DOTA- $^{64}\text{Cu}$  を用いた PET-probe の作製にも同時に成功し、今後の BNCT 分野での新

たな薬剤開発へつながる研究となった。

#### 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 査読有 8 件 査読無し 0)

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*. 査読有 2015;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  $\gamma\text{H2AX}$  foci in mouse normal brain and brain tumor after boron neutron capture therapy. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2016 査読有 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. 査読有 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;37(6):777-786. 査読有 doi: 10.1038/onc.2017.373.

Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Inoue S, Maruo T, Otani Y, Fujii K, Ishida J, Shimazu Y, Yoshida K, Michiue H, Antonio Chiocca E, Date I. Annexin A2 regulates angiogenesis and invasion phenotypes of malignant glioma. *Brain Tumor Pathol*. 2015 Jul;32(3):184-94. 査読有 doi: 10.1007/s10014-015-0216-6.

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;37(6):777-786. 査読有 doi: 10.1038/onc.2017.373.

Otani Y, Ishida J, Kurozumi K, Oka T, Shimizu T, Tomita Y, Hattori Y, Uneda A, Matsumoto Y, Michiue H, Tomida S, Matsubara T, Ichikawa T, Date I. PIK3R1Met326Ile germline mutation correlates with cysteine-rich protein 61 expression and poor prognosis in glioblastoma. Sci Rep. 2017 Aug 7;7(1):7391. 査読有 doi: 10.1038/s41598-017-07745-0.

Yamada H, Takeda T, Michiue H, Abe T, Takei K. Actin bundling by dynamin 2 and cortactin is implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma cells. Int J Oncol. 2016 Sep;49(3):877-86. 査読有 doi: 10.3892/ijo.2016.3592. Epub 2016 Jun 30.

〔学会発表〕(計 11 件)

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)

Hiroyuki Michiue, Yoshiya Iguchi, Mizuki Kitamatsu, Hiroaki Matsushita, Tei-ichi Nishiki, Hideki Matsui, BSH-peptide delivery system and drug pharmacokinetics by positron emission tomography (PET) imaging, 8th Young Researchers' BNCT Meeting in Pavia, 2015/11/15, Pavia in Italy

Hiroyuki Michiue, Keiichiro Hayashi, Atsushi Fujimura, Hiroaki Matsushita, Tei-ichi Nishiki, Hideki Matsui, Anti-depressant, SSRI found by drug repositioning system, blocked glioblastoma invasion with targeting to inhibit actin polymerization

22<sup>nd</sup> annual scientific meeting and education day of the society for neuro-oncology November 16-19, 2017, Marriott Marquis, San Francisco, California in USA

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)  
名称: P E T用ホウ素化合物  
発明者: 道上宏之、松井秀樹、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 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

(2) 研究分担者 ( )  
研究者番号:

(3) 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

(4) 研究協力者 ( )