

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293007

研究課題名(和文) ホウ素化コレステロールとナノキャリア高機能化による次世代中性子捕捉療法の構築

研究課題名(英文) Development of Boronated Cholesterols and their Highly Functionalized Nano Carriers for New Generation Neutron Capture Therapy

研究代表者

中村 浩之(Nakamura, Hiroyuki)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：30274434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素化コレステロールの合成に成功し、次世代中性子捕捉療法のためのホウ素高集積化リポソームの開発に成功した。ホウ素クラスターカウンターカチオンに多価カチオン性のスペルミジニウムカチオンを用いた時に最も効率よくリポソームに内封されることを見出した。さらに、細胞内ホウ素クラスターの局在イメージングに、蛍光イメージング技術とラマン分光イメージング技術を確立した。また、腫瘍への高効率ホウ素デリバリーシステム構築のために、マレイミド結合型ホウ素クラスター(MID)の開発に成功し、MIDが生理条件下においてシステインだけでなくリジンにも結合することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Boronated cholesterols were successfully synthesized. Using these cholesterol, high content boron liposomes were developed for new generation neutron capture therapy. A counter cation of boron ion clusters (closo-dodecaborates) was found to be essential for the encapsulation efficacy of boronated liposomes: a sperimidinium form of closo-dodecaborates was highly encapsulated into liposomes prepared from phospholipids. Furthermore, boron imaging technologies in the cells have been developed using a combination of in cell click fluorescent imaging technique and Raman imaging technology. Biopolymer-based boron delivery system was also developed for selective and efficient delivery of boron to tumor in vivo based on the EPR effect. Maleimide-closo-dodecaborate (MID) was successfully synthesized. MID conjugated not only a free SH group of cysteine residues but also lysine residues in proteins and its serum albumin conjugates were found to be accumulated into tumor selectively.

研究分野：有機化学

キーワード：がん治療 イメージング 中性子捕捉療法 リポソーム 生体分子 放射線 蛍光

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、低エネルギーである熱・熱外中性子がホウ素との核反応により生ずる強力な粒子線を用いるものであり、がん部位へホウ素デリバリーと中性子線照射のダブルターゲティングが可能な低侵襲型治療法である。BNCT は、必要とする熱中性子を原子炉から得ていたことから、燃料や設置の制限が問題点であった。我が国では、世界で初めて BNCT 用小型加速器の開発に成功し、さらに、2012 年 11 月からホウ素薬剤 BPA と加速器を用いた脳腫瘍を対象とした BNCT の第 1 相臨床試験が始められており、一般的放射線治療法の 1 つとして医療認可を目指している。

BPA は、血中滞留性が低いため腫瘍からのクリアランスが非常に速いという問題点があり、実際の臨床においては、中性子照射中においても BPA を静脈注射で投与している。また、BNCT を行うにあたり、対象患者にあらかじめ ^{18}F -BPA を用いた PET 診断を行うことにより、BNCT が適応可能か否かを判断し、その線量計画が立てられている。したがって、BPA に非感受性患者は BNCT 適応外となるわけであるが、実に対象患者のおよそ 60% が適応外と診断されているのが現状である。

したがって、BPA の腫瘍からのクリアランスが非常に速いといった課題を克服するために、(1) 単回投与で腫瘍への集積が可能で、なおかつ (2) BPA に非感受性患者に対して適応可能な新しいホウ素薬剤の開発が、急務となっている。これらの要件を満たすホウ素薬剤が開発できれば、BNCT の適応疾患拡大へと繋がる。

本申請者は、既に大量の薬剤分子を集合体として一気に送ることのできるリポソームを用いたホウ素送達システムを考案してきた。通常リポソームの脂質二分子膜は、リン脂質とコレステロールより構成されている。本申請者は、これまでリン脂質の構造に着目し、ホウ素脂質を世界で初めて開発し、そのリポソーム化に成功した。さらに、蛍光標識化したホウ素脂質を開発し、ホウ素リポソームの生体内分布を調べたところ、腫瘍血管から離れたハイポキシア領域へは到達していないことを明らかにするとともに、(Org. Biomol. Chem. 2012)、腫瘍組織内での内封ホウ素薬剤のリリースによる細胞膜および細胞間質の透過による BDS を新たに検討してきた。その結果、内封ホウ素薬剤との融合により、がん移植モデルマウスにおいて、腫瘍の完全消失を達成した (Bioconjugate Chem. 2013)。しかし、総脂質投与量は、7g/60kg 体重と臨床適応可能なレベルの 2 倍以上治療に必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍に持続的集積性の高いホウ素デリバリーシステム (BDS) を開発するものであり、BPA 非感受性がん患者に対する BNCT 適応疾患拡大を目指す。

本研究では、リポソーム膜のもう 1 つの成分であるコレステロールに着目し、ホウ素化コレステロールを開発する。申請者は、本研究を開始するにあたり予備的な実験において、ホウ素化コレステロールが細胞核周辺に集積することを既に見出していた。これは、DNA への損傷効率が高いことを意味し、高い BNCT 効果が期待できる。本研究では、ホウ素高集積化による実用可能な根治を目指した低侵襲型ホウ素デリバリーがん治療システムを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

リポソーム総投与量の低減とより高い BNCT 抗腫瘍効果を達成するには、(i) リポソームのホウ素高集積化、(ii) 腫瘍内ホウ素を細胞核付近に到達させることで DNA 殺傷効果を向上、(iii) 腫瘍選択的ホウ素デリバリー、の 3 つの戦略を考案し、本研究期間中に次の 4 つの課題について検討した。

(1) ホウ素化コレステロールの開発とナノキャリア化

高い治療効果のためには、腫瘍内ホウ素濃度が 30 ppm 以上、腫瘍/血液内ホウ素濃度比が 3 以上を満たす薬剤の開発が目標となる。そこで、リポソーム二分子膜へのホウ素内封として、新たにホウ素化コレステロールを開発し、リポソームを調製しナノキャリア化を検討した。

(2) ホウ素薬剤の可視化技術の開発

ホウ素薬剤が実際の腫瘍組織内にどのように分布しているか？細胞レベルで検証することが本治療効果の向上に必須である。特にホウ素薬剤が細胞核付近に分布することは、効率的な DNA 殺傷効果、すなわち BNCT 抗腫瘍効果に繋がる。本研究では、①細胞レベルでのホウ素コレステロール化蛍光標識の可視化技術を開発した。

(3) ホウ素クラスターのカウンターカチオンの検討と高集積化

ホウ素イオンクラスターのカウンターカチオンを通常臨床に用いられているナトリウム塩から、多カチオン性ポリアミンに変えることで、リポソーム内封効率を向上させ、ホウ素高集積化リポソームを開発した。

(4) 生体高分子を利用したアクティブターゲティング

血清アルブミンは、健常人の血液中には 40-50g/L 含まれており、血中の脂質や薬剤を運ぶタンパク質であることから、これまで

ドラッグデリバリーシステムのキャリアとして注目され研究されてきた。ナノ粒子のがん集積性が、腫瘍血管の不完全な構造による漏出と腫瘍組織におけるリンパ管回収系の未発達によるものであること (EPR 効果) に起因することを染色した血清アルブミンによって明らかにされて以来、血清アルブミンに抗がん剤を結合させた薬剤開発が精力的に行われてきた。実際に、血清アルブミンにパクリタキセルを結合させた「Abraxane」が、転移性乳がんや再発胃がんや進行性非小細胞肺癌の治療薬として認可されている。本研究では、血清アルブミンにホウ素を容易に導入できる手法の開発を目的に、マレイミド結合ホウ素クラスターを分子設計し、合成した。血清アルブミンは、分子内に 35 個のシステイン (Cys) を持つが、そのうち 34 個のシステインはジスルフィド結合を形成しており、Cys34 のみフリーの SH 基を有する。マレイミドは生理条件下でシステインの SH 基に選択的に結合することが知られている。

4. 研究成果

(1) ホウ素化コレステロールの開発とナノキャリア化

図 2 に示すような合成スキームでホウ素化コレステロールの合成に成功した。

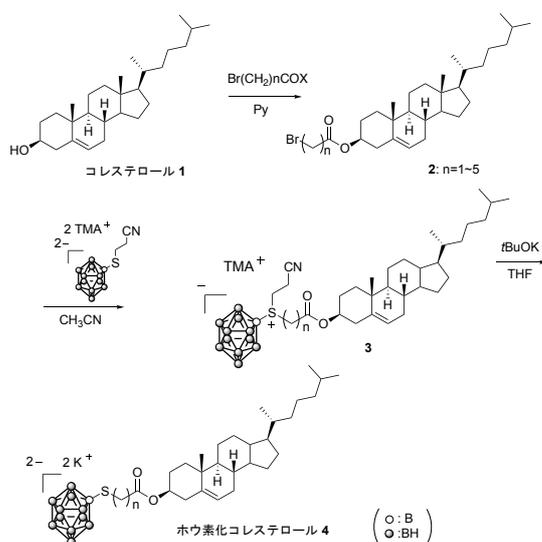


図 2. ホウ素化コレステロール合成スキーム

さらに、中性子照射実験を可能とするため、 ^{10}B 濃縮ドデカボレートを用いた合成方法も確立した。合成したホウ素化コレステロールを用いて、ホスファチジルコリン脂質 (DSPC) とのリポソーム化を検討した。REV 法を用いて、リポソームを調整し、エクストルーダーにて 100 nm に粒子系を調整した結果、安定なホウ素化コレステロールを調製することに成功した。

(2) ホウ素薬剤の可視化技術の開発

ホウ素コレステロールに細胞内クリック反応で蛍光色素を導入する方法を確立した。この手法により、細胞内でのホウ素コレステロールの局在を明らかにした。蛍光顕微鏡を用いた画像解析の結果、コレステロールは細胞内の核膜周辺など脂質が局在する部分に多く局在することがわかった。さらに、ホウ素クラスターの B-H 結合に起因するラマン吸収が、生体分子の吸収に重ならない波長帯に吸収体を持つことに着目し、疎水性ホウ素クラスターであるカルボラン、イオン性ホウ素クラスターであるドデカボレートのラマンスペクトルを測定したところ、濃度依存性を見出すことに成功した。この結果をもとに、本研究で開発したホウ素化コレステロールの細胞内ラマンイメージングを行い、細胞内クリック反応を用いた蛍光イメージング画像と比較した結果、局在の一致を確認することができた (論文投稿準備中)。

(3) ホウ素クラスターのカウンターカチオンの検討と高集積化

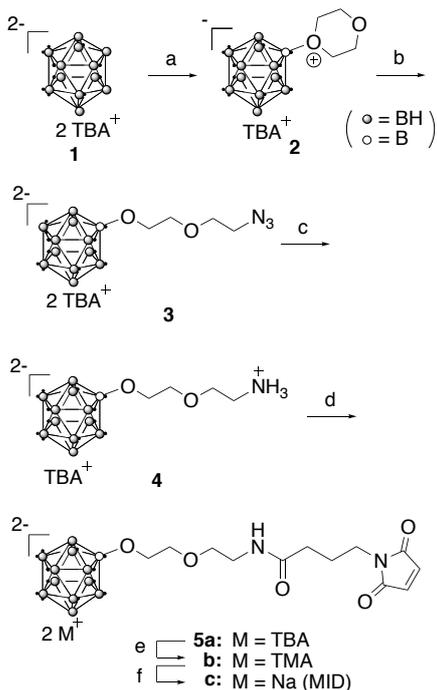
ホウ素イオンクラスターのカウンターカチオンを通常臨床に用いられているナトリウム塩から、多カチオン性ポリアミンに変えることでリポソーム内封効率を向上させることに成功した。実際に、ナトリウム塩の場合、ホウ素リポソーム溶液はホウ素濃度で 3000 ppm が限界であったのに対し、スペルミン塩を用いることで、14,000 ppm まで高集積化させることができ、その結果、投与するリポソーム総量を 740 mg/kg から 94 mg/kg にまで、削減させることに成功した。このことにより、臨床応用に十分可能なレベルまで、リポソーム投与量を削減できたことは、非常に大きな成果である。

(4) 生体高分子を利用したアクティブターゲティング

血清アルブミンに導入するためにマレイミドを分子内に持つクロソドデカボレート maleimide-functionalized *closo*-dodecaborate (MID) を分子設計した。MID の合成スキームを図 3 に示す。20 面体の 2 価ホウ素陰イオンクラスターである *closo*-dodecaborate のテトラブチルアンモニウム (TBA) 塩 (1) をジオキサンで処理し化合物 (2) とした後、テトラブチルアンモニウムアジド (TBAN_3) で開環反応させることでアジド体 (3) を得た。アジド体 (3) を還元してアンモニウム塩 (4) に変換した後、4-マレイミドブタン酸とアミド縮合させ、イオン交換処理を施し、MID のナトリウム塩 (5c) を合成した。

はじめに、*N*-アセチルシステインに対して、中性条件下 (PBS buffer; pH 7.4) MID を作用させると、反応は 1 時間で終わり *N*-アセチ

ルシステイン-MID 結合体が生成することを質量分析 (ESI-TOF-MS) により確認した。次に、牛血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA) に対し同様の条件下で MID を様々な濃度 (0.1-100 当量) で反応させた。BSA-MID 複合体の生成を、抗 BSH 抗体を用いたウェスタンブロット法にて分析したところ、濃度依存的に MID が BSA に結合していることがわかった。さらに興味深いことにシステインの SH 基のブロッキング剤存在下でも、MID は BSA に結合し、リジンの NH₂ 基のブロッキング剤存在下では、MID の BSA への結合が抑制された。このことから、MID はリジン残基にも結合していることが示唆された。



反応条件: (a) NaBF₄, HCl, 1,4-dioxane; (b) TBAN₃, CH₂Cl₂, 87% in two steps; (c) Ph₃P, H₂O, THF, quant.; (d) 4-maleimidobutyric acid, BOP, Et₃N, THF, 77%; (e) TMACl, CH₃OH/EtOH, 94%; (f) Na⁺-Amberlite, H₂O, 93%.

図 3. MID の合成スキーム

次に、マウス大腸がん細胞 (colon 26) を左太腿に移植した Balb/c マウスを用いて、MID-BSA の時間依存的な体内分布を調べた。MID-BSA の投与量が 3-30 mg[B]/kg となるように、生理食塩水に溶解し尾静脈より注射した (*i. v.*)。投与後、1-48 時間において、血液、腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓をそれぞれ摘出し、硝酸中で灰化させ、それぞれの組織に集積したホウ素濃度を ICP-OES (Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry) を用いて測定した。比較対象として、MID ならびに BSH をそれぞれ 30 mg[B]/kg 投与した。その結果、MID-BSA の各臓器の集積濃度は、投与量に高く依存した。30 mg[B]/kg 投与量で比較した場合、BSH は血液濃度が速やかに低下するのに対し、MID

は MID-BSA と同程度の時間依存的な血中濃度を示した。また、興味深いことに、MID-BSA を 30 mg[B]/kg 投与量で投与した場合、腫瘍内ホウ素濃度が 12 時間後には 62 ppm と非常に高い濃度で集積する一方で、肝臓、腎臓、脾臓への集積は腫瘍よりも低く抑えられた。以前、筆者らが開発した BSH 内封リポソーム薬剤では、腎臓や脾臓への集積が腫瘍よりも数倍高い値が得られていたことから、MID-BSA が高い EPR 効果をもつだけでなく、リポソーム製剤よりも生体適合性が高く細網内皮系から回避されることで、腫瘍選択性が向上していることが示唆された。さらに、熱中性子照射により BNCT 抗腫瘍効果を調べたところ、MID-血清アルブミン複合体を 7.5 mg[B]/kg で投与した場合においても、高い BNCT 抗腫瘍効果が得られ、熱中性子照射後 2 週間において、腫瘍の消失が観察された。これらのことから、MID-血清アルブミン複合体は中性子捕捉療法のための有望なホウ素キャリアと考えられる。

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 6 件)

- ① C. Verdía-Báguena, A. Alcaraz, V. M. Aguilera, A. M. Cioran, S. Tachikawa, H. Nakamura, F. Teixidor, Clara Viñas, Amphiphilic COSAN and I2-COSAN crossing synthetic lipid membranes: planar bilayers and liposomes. Chem. Commun. 50, 6700-6703 (2014) 査読有 DOI:10.1039/c4cc01283f
- ② S. Tachikawa, T. Miyoshi, H. Koganei, M. E. El-Zaria, C. Viñas, M. Suzuki, K. Ono, H. Nakamura, Spermidinium closo-dodecaborate-encapsulating liposomes as efficient boron delivery vehicles for neutron capture therapy. Chem. Commun. 50(82) 12325 - 12328 (2014) 査読有 DOI:10.1039/c4cc04344h
- ③ H. Nakamura, H. Koganei, T. Miyoshi, Y. Sakurai, K. Ono, M. Suzuki, Antitumor Effect of Boron Nitride Nanotubes in Combination with Thermal Neutron Irradiation on BNCT. Bioorg. Med. Chem. Lett. 25(2), 172-174 (2015) 査読有 DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.12.005
- ④ H. Koganei, S. Tachikawa, M. E. El-Zaria, H. Nakamura, Synthesis of Oligo-closo-dodecaborates by Hüisgen

Click Reaction as Encapsulated Agents for Preparation of High-Boron-Content Liposomes for Neutron Capture Therapy. *New J. Chem.* 39, 6388 - 6394 (2015) 査読有
DOI: 10.1039/C5NJ00856E

- ⑤ M. Sasai, H. Nakamura, N. Sougawa, Y. Sakurai, M. Suzuki, A. Matsuyama, C. M. Lee, Novel hyaluronan formulation enhances the efficacy of boron neutron capture therapy for murine mesothelioma. *Anticancer Res.* 36(3), 907-912 (2016) 査読有
DOI:無
- ⑥ S. Kikuchi, D. Kanoh, S. Sato, Y. Sakurai, M. Suzuki, H. Nakamura, Maleimide-Functionalized closo-Dodecaborate Albumin Conjugates (MID-AC): The Unique Ligation at both Cysteine and Lysine Residues Enabling to Efficient Boron Delivery to Tumor for Neutron Capture Therapy. *J. Control. Release*, 237, 160-167 (2016) 査読有
DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.07.017

[学会発表] (計40件)

- ① H. Nakamura, Development of liposomes for efficient boron neutron capture therapy International Symposium on Integrated Molecular/Materials Science and Engineering (IMSE2014), **Invited Lecture**, 南京 (中国) 2014年11月1~3日
- ② 中村浩之、外部エネルギーによる生体内局所増感型ナノデバイスの開発 -QOL の高い低侵襲がん治療を目指して-、第14回東北大学多元物質科学研究所研究発表会、**招待講演** (仙台) 2014年12月5日
- ③ H. Nakamura, Albumin-bound closo-Dodecaborate as a Promising Boron Carrier to Tumor. The 2nd International Workshop on BNCT, **Invited Lecture** (京都) 2014年12月9~10日
- ④ 中村浩之、DDSによるがん治療の最前線、川崎医科大学川崎医学会セミナー、**招待講演** (倉敷) 2015年2月26日
- ⑤ H. Nakamura, Development of Liposomes for Efficient Boron Neutron Capture Therapy, 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015), **Invited Lecture**, (Kyoto) 2015年5月25-29日
- ⑥ 中村浩之、何故新しいホウ素薬剤は開発されないのか? —これからの Boron Delivery Systemを考える— 第12回日本中性子捕捉療法学会学術大会 **招待講演** (神戸学院大学、神戸) 2015年9月4

~5日

- ⑦ H. Nakamura, Highly Boronated Liposomes as Efficient Boron Delivery Vehicles for Neutron Capture Therapy ZING Conferences, **Invited Lecture** (Spain) 2015年10月4日-7日
- ⑧ H. Nakamura, Overview and Prospect of Boron Agents for Neutron Capture Therapy, 1st Academic meeting for Taiwanese Society of Neutron Capture Therapy, **Invited Lecture** (Taipei) 2015年12月5日
- ⑨ 中村浩之、ホウ素を使ってがんを挑む ~ホウ素創薬の最前線~ 第8回「国際的キャリア展望に向けた生命化学研究者による講演会」**招待講演** (岡山大学) 2016年1月27日
- ⑩ H. Nakamura, Development of Efficient Boron Delivery Nano Carriers for Neutron Capture Therapy. IAEA-Southern Tohoku Hospital Group Joint Workshop on BNCT, **Invited Lecture** (郡山) 2016年3月7日
- ⑪ 中村浩之、外部エネルギーと局所増感型ナノデバイスによる低侵襲がん治療、LSC研究発表会、**特別講演** (神戸学院大学) 2016年3月18日
- ⑫ H. Nakamura, Development of Boron Delivery Nano Vehicles for Neutron Capture Therapy of Cancers. The Chinese University of Hong Kong, Seminar, **Invited Lecture**, Hong Kong, May 4, 2016.
- ⑬ H. Nakamura, Boron compounds suitable for BNCT, 1st NRW-Fukushima Joint Symposium on Advances in Medicine, **Invited Lecture**, Essen (Germany) September 1-2, 2016
- ⑭ H. Nakamura, Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect-Based Efficient Boron Delivery Systems for BNCT. 17th International Congress on Neutron Capture Therapy, **Keynote Lecture**, Missouri (USA) October 2-7, 2016.
- ⑮ 中村浩之、リポソーム包埋型およびアルブミン結合型ホウ素キャリアー、大阪医科大学附属病院がんセンター先端医療開発部門 シンポジウム、**招待講演** (大阪医科大学、大阪) 2016年11月25日
- ⑯ 中村浩之、世界をリードする次世代低侵襲がん治療: 中性子捕捉療法、第2回神奈川県ヘルスケア・ニューフロンティア講座「次世代医療に向けた医理工学融合研究とその産業応用」、**招待講演** (東京工業大学大岡山キャンパス、東京) 2016年12月13日
- ⑰ H. Nakamura, Nanocarrier-Based Efficient Boron Delivery to Tumor for BNCT. 2st Taiwan Neutron Capture

Therapy (TSNCT-2), **Invited Lecture**, Taipei (Taiwan) January 14 (2017)

- ⑱ 中村浩之、中性子捕捉療法のためのナノキャリア型ホウ素デリバリーシステムの開発、第19回癌治療増感研究シンポジウム、招待講演(奈良)2017年2月3~4日

他22件

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: ホウ素含有化合物とタンパク質とのコンジュゲートを含む医薬組成物

発明者: 中村浩之

権利者: 国立大学法人 東京工業大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-156726

出願年月日: 2015年8月7日

国内外の別: 国内

名称: ホウ素含有化合物とタンパク質とのコンジュゲートを含む医薬組成物

発明者: 中村浩之

権利者: 国立大学法人 東京工業大学

種類: PCT

番号: JP2016/71899

出願年月日: 2016年7月26日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計1件)

名称: ホウ素 10 同位体を含むホウ素化合物を内封したリポソーム

発明者: 中村浩之、立川将士

権利者: 国立大学法人 東京工業大学、学校法人 学習院

種類: 特許

番号: 特許第 5780637 号

取得年月日: 2015年7月24日

国内外の別: 国内

[その他]

プレスリリース

- ① 先端技術「がん細胞だけ破壊」実用へ
日経産業新聞 2016年1月13日

- ② がん放射線療法薬剤候補 投与1回で効果
日経産業新聞 2016年8月4日

③ 海外メディア報道

●2016/8/22 Health Care Business に掲載
Toshiba to develop boron neutron capture therapy (BNCT) system

https://www.dotmed.com/news/story/32543?p_begin=0

●2016/8/19 Lab+Life Scientist に掲載

Special delivery - a boron carrier for targeted tumour therapy

<http://www.labonline.com.au/content/research-development/article/special-delivery-a-boron-carrier-for-targeted-tumour-therapy-211675039>

●2016/8/19 Lab+Life Electronic Specifier に掲載

Boron carrier for targeted tumour therapy

<http://www.electronicspecifier.com/medical/boron-carrier-for-targeted-tumour-therapy>

●2016/8/15 American Laboratory に掲載
Boron Neutron Capture Therapy Effectively Targets Tumors, Reduces Risk of Blood Contamination

<http://www.americanlaboratory.com/190110-Boron-Neutron-Capture-Therapy-Effectively-Targets-Tumors-Reduces-Risk-of-Blood-Contamination/?catid=1414>

●2016/8/12 Science Daily に掲載

Boron carrier for targeted tumor therapy

<https://www.sciencedaily.com/releases/2016/08/160810104416.htm>

●2016/8/11 Medical News Today に掲載

Boron carrier for targeted tumour therapy

<http://www.medicalnewstoday.com/releases/312264.php>

他4件

ホームページ

<http://syn.res.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 浩之 (NAKAMURA, Hiroyuki)
東京工業大学・科学技術創成研究院・
化学生命科学研究所・教授
研究者番号: 30274434

(2) 研究分担者

布施 新一郎 (FISE, Shin-ichiro)
東京工業大学・科学技術創成研究院・
化学生命科学研究所・准教授
研究者番号: 00505844

佐藤 伸一 (SATO, Shinichi)
東京工業大学・科学技術創成研究院・
化学生命科学研究所・助教
研究者番号: 20633134