

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350528

研究課題名(和文) 超分子形成を応用した高機能性BNCT薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of effective BNCT drug by using supramolecular complexation

研究代表者

長崎 健 (Nagasaki, Takeshi)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30237507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素クラスターカルボラン-コウジ酸コンジュゲート体(CKA)とヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HP-β-CD)複合体を新規に調製し、CKA/HP-β-CD複合体は転移能高いメラノーマ細胞のマウス個体における転移を抑制する事を偶然発見した。メカニズム解明を検討する中で、HIF-1発現抑制能を示すことを見出している。そこで、本研究ではメラノーマ転移モデルマウスを用いたCKAのメラノーマ転移抑制能を評価した。リアルタイムPCRの結果から、臓器の中でも特に、脳へのメラノーマの転移をCKAが著しく抑制した。

研究成果の概要(英文)：A novel water-soluble complex between boron cluster carborane-kojic acid conjugate(CKA) and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-betaCD) have been prepared. It was revealed that CKA-HP-betaCD complex inhibited the metastasis of melanoma cells in vivo. It was suggested that the inhibitory ability of CKA to HIF-1alpha contributed to suppress the matastasis. Furthermore, in this study, the quantitative evaluation of the CKA's inhibitory ability was carried out by quantitative real-time PCR in vivo. From the results of real-time PCR, CKA remarkably suppressed melanoma metastasis to the brain among other organs.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：薬物送達システム、ホウ素中性子捕捉療法、がん治療、超分子化学、包接化合物、ターゲティング、ナノメディシン、シクロデキストリン

### 1. 研究開始当初の背景

1950年代に初めての BNCT が実施されてから、中性子照射装置やホウ素分析法そして治療プロトコルの改良などが世界中の研究者により進められてきた。しかし、臨床試験に実際に使用されているホウ素薬剤は BSH (mercaptoundecahydrododeca-borane) と BPA (p-boronophenylalanine) の二化合物のみである。これら化合物は低分子であるために腎臓からの速やかに排泄されるため血中滞留性が低く、がん細胞へ有効濃度集積させるために大量の化合物が使用されている。実際、BPA を投与する場合、水酸化ナトリウムを用いたアルカリ性条件下フルクトースと約 1 時間混合しボロン酸のフルクトースエステル化を行い水溶性を向上させる。その後、塩酸で中和し濾過滅菌の後に点滴ガラス瓶詰めを行うなど、複雑な操作を必要とする。また、体重 40 kg の患者に対し、10 g の BPA を約 450 ml の大量の注射剤として調製し静注するため、患者は勿論のこと医療従事者にも負担の大きい操作・処置を強いられている。一方、近年シクロデキストリン類の医薬への有効利用に関する研究は進展がめざましく、難水溶性薬物のナノ粒子化や薬物の放出制御と標的指向化など医薬品の価値を高めるために多くの研究が行われ、実用化されたものも多い。我々も、既に多糖類 (-1,3-グルカン) を用いた疎水性ホウ素クラスターの水溶化にも成功している。

### 2. 研究の目的

本申請期間内に、以下の目標を達成すべく研究を遂行し、臨床応用に向けた基礎的知見の蓄積を目指す。

- ・ BPA 複合化における最適シクロデキストリン誘導体の選択
- ・ BPA との複合化方法の最適条件決定
- ・ *in vitro* 細胞内 & *in vivo* 腫瘍内デリバリー評価
- ・ 培養細胞およびマウスを用いた毒性評価
- ・ 担がんマウスを用いた薬物体内動態解析
- ・ 担がんマウスを用いた中性子照射による、がん増殖抑制評価、機構解明

### 3. 研究の方法

本研究を遂行するに当たり、現在臨床使用されているフルクトース錯体濃度 (B:1000 ppm) 以上の水溶液調製を目標とし、まずは BPA の水溶性・操作性向上を目指した各種シクロデキストリン誘導体 (CDx) との複合化を行った。最も高濃度で得られた複合体水溶液を用い、*in vitro*, *in vivo* での評価を並行して進め、京都大学原子炉実験所にて増永慎一郎教授の協力のもと中性子照射実験を実施し、その結果を合成、複合化およびデリバリー条件設定にフィードバックしつつ目標達成に向け研究を遂行する予定であったが、期間中東日本大震災の影響も有り京大原子炉の運転は停止し続け、中性子照射実験は

未実施である。

これまでに論文公表されているものも含めて次に示した各種シクロデキストリン類を用い、BPA の水溶性を増加させるために以下に示す複合化方法を網羅的に検討した。

検討対象 CDx: -CD, -CD, -CD, -CD, ジメチル- -CD, ジメチル- -CD, ヒドロキシプロピル- -CD, ヒドロキシプロピル- -CD, ヒドロキシブチル- -CD, ヒドロキシブチル- -CD, スルホブチルエーテル- -CD, カルボキシエチルチオエーテル- -CD, 硫酸化- -CD

検討した複合化方法: 乳化法、飽和水溶液法、混練法、混合粉碎法 (高速振動粉碎、メカノケミカルボンディング)、超音波分散法

各方法における具体的検討項目を以下に示す。

#### 1. 乳化法

CDx の 20~50% 懸濁液を作り、BPA を添加し、ホモジナイザーで乳化させる。ホモジナイザーの条件は、回転数 (3,000~8,000 rpm)、時間 (30分~数時間)、温度等を検討した。

#### 2. 飽和水溶液法

CDx の飽和水溶液を作り、一定量の BPA を混合し、30分~数日攪拌混合した。

#### 3. 混練法

CDx に水を少量加えてペースト状にし、BPA を添加して混練機で練る。得たペーストを乾燥し、複合体粉末を得た。混合時間を種々検討した。

#### 4. 混合粉碎法

CDx と BPA を振動ミルに入れ、高速振動粉碎する。混合重量比や粉碎時間などを最適化する。可溶化する際に、超音波分散時間などを検討した。

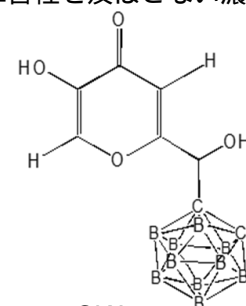
得られた複合体の物性同定を円二色性スペクトルや NMR スペクトルを用い、固体状態においては熱分析 DSC、粉末 X 線などで物理的混合物と CDx 複合体を比較検討した。複合体濃度は ICP 発光測定によりホウ素濃度を定量化し決定した。

更に、水溶液を調製し、ゼータ電位・粒径を測定する。マウス尾静脈投与を想定し、血中滞留性が期待される負電荷を帯びた粒子作製を目指す。また、腫瘍組織へ EPR 効果により集積させるために 100-200 nm の粒子サイズとなる条件を確立した。

BPA/ CDx 複合体の細胞障害性を培養細胞に対して評価した。細胞は、動物実験を想定した Colon-26 (マウス結腸がん) 細胞を用い、培地中への添加濃度を制御し、WST アッセイにより実施し、細胞障害性を及ぼさない濃度領域を決定した。

備品申請したセルアナライザーを用いアポトーシス活性評価を行った。

一方、メラノーマに対して選択性が期待されるもの



の、水溶性に乏しく BNCT 薬剤として評価が困難であったコウジ酸修飾カルボラン化合物 (CKA) のヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンによる高効率水溶化法を見出した。

CKA/HP-βCD 複合体は転移能高いメラノーマ細胞のマウス個体における転移を抑制する事を偶然発見し、メラノーマ転移モデルマウスを用いた CKA のメラノーマ転移抑制能を評価した。

メラノーマ細胞 ( $2.5 \times 10^5$  cells) を C57BL6 マウスに皮下注射し、メラノーマ細胞が定着したと思われる3日後から2日おきに計6回、CKA/HP-βCD 複合体水溶液 (CKA: 1 mg) を尾静脈投与した。その後、マウスから各臓器を摘出し、30 mg を秤量後、RNA を抽出した。そして、リアルタイム PCR を行った。

#### 4. 研究成果

BPA の水溶化実験では種々検討した条件の中で、シクロデキストリンとしては、医薬品グレードが入手可能な誘導体であるヒドロキシプロピル-β-CD、複合化方法としては高速振動粉碎法 (25 Hz, 30 min) を用いた際に、BPA に対する水溶化率 77%、最高濃度 [B] = 1000 ppm を達成した。しかし、フルクトース錯体の水溶性と比較し最大溶解度は 1/10 程度で有り、改善の余地が残されている結果となった。

BPA/ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HP-βCD) 複合体水溶液を用いて、京大原子炉 (KUR) において中性子照射による培養がん細胞の増殖抑制評価や担がんマウスにおける腫瘍増殖抑制効果を評価予定であったが、当初予想されていた KUR の再開が実現せず中性子照射実験は実施することが出来ず、新たな知見を得ることは出来

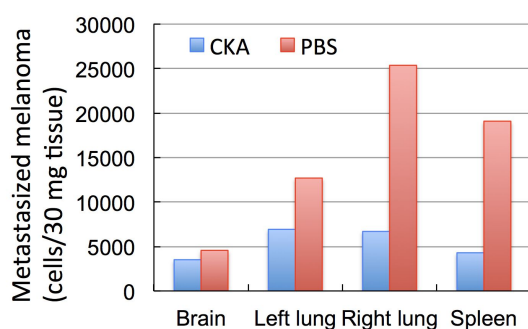


Figure 1. Suppression of melanoma metastasis.

なかつた。

一方、メラノーマに対して選択性が期待されるものの、水溶性に乏しく BNCT 薬剤として評価が困難であったコウジ酸修飾カルボラン化合物 (CKA) のヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンによる高効率水溶化法を見出し、興味深いことに CKA/HP-βCD 複合体は転移能高いメラノーマ細胞のマウ

ス個体における転移を抑制する事を偶然発見した。

リアルタイム PCR の結果から、CKA 投与群のマウス臓器において、PBS 投与群マウスに比べメラノーマ転移抑制が確認された (Fig.1)。臓器の中でも特に、脳へのメラノーマの転移を CKA が著しく抑制した。

CKA は既にかん細胞転移の際に重要な役割を果たす転写因子である HIF-1 の発現を浴せうることが知られている。今回、コウジ酸を有する CKA がメラノーマに対する特異性を示し、メラノーマに効率的に働いたためだと予想される。また、脳への転移が最も抑制されたのは、メラノーマが脳に転移する前に脾臓や肺へ転移することが知られることから、CKA のこれら臓器への転移抑制によるためだと考えられる。

メラノーマに対して選択性が期待される CKA はシクロデキストリンを利用した超分子形成により水溶性を向上させることが出来、メラノーマの転移を著しく抑制することが明らかとなった。今後 BNCT 薬剤以外にもメラノーマ転移抑制剤としても期待される。

#### 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9件)

1. Water-Solubilization of Fullerene Derivatives by β-(1,3-1,6)-D-Glucan and Their Photodynamic Activities toward Macrophages, A. Ikeda, T. Iizuka, N. Maekubo, K. Nobusawa, K. Sugikawa, K. Koumoto, T. Suzuki, T. Nagasaki, and M. Akiyama, 査読有り, Chemistry-An Asian Journal, 12, 1069-1074 (2017). DOI: 10.1002/asia.201700182.
2. Formation of β-(1,3-1,6)-D-glucan-complexed [70]fullerene and its photodynamic activity towards macrophages, A. Ikeda, M. Akiyama, K. Sugikawa, K. Koumoto, Y. Kagoshima, J. Li, T. Suzuki, T. Nagasaki, 査読有り, Org. Biomol. Chem., 15, 1990-1997 (2017). DOI: 10.1039/c6ob02747d
3. Lipid-membrane-incorporated arylboronate ester as agents for boron neutron capture therapy, M. Ueda, K. Ashizawa, K. Sugikawa, K. Koumoto, T. Nagasaki, A. Ikeda, 査読有り, Org. Biomol. Chem., 15, 1565-1569 (2017). DOI: 10.1039/C6OB02142E.
4. Improved isolation procedure for shikonin from the root of the Chinese medicinal plant Lithospermum erythrorhizon and its solubilization with cyclodextrins, H. Azuma, J. Li, R. Youda, T. Suzuki, K. Miyamoto, T. Taniguchi, T. Nagasaki, 査

- 読有り, J. Appl. Res. Med. Arom. Plants, 3, 58-63 (2016). DOI: 10.1016/j.jarmap.2016.01.002
5. Evaluation of Boron-containing Rare Earth Oxides Nanoparticles as an Agent for Boron Neutron Capture Therapy, T. Nagasaki, R. Kawasaki, S. Iizuka, H. Yukawa, Y. Tsujimoto, M. Kirihata, K. Tomita, K. Katagiri, K. Ono, S. Masunaga, Y. Sakurai, 査読無し, KURRI Progress Report 2014, 132 (2015).
  6. Quantitative Detection of Metastasized B16BL6 Cells in Lung by Using TaqMan RT-PCR Assay, T. Nagasaki, J. Kawaguchi, R. Kawasaki, M. Sakuramoto, M. Kirihata, Y. Hattori, S. Masunaga, Y. Sakurai, 査読無し, KURRI Progress Report 2014, 7 (2015).
  7. Anti-inflammatory effect of water-soluble complex of 1'-acetoxychavicol acetate with highly branched  $\alpha$ -1,3-glucan on contact dermatitis, J. Li, Y. Aizawa, K. Hiramoto, E. Kasahara, D. Tsuruta, T. Suzuki, A. Ikeda, H. Azuma, T. Nagasaki, 査読有り, Biomed. Biopharmacoter., 69, 201-207 (2015). DOI: 10.1016/j.biopha.2014.11.026
  8. Hypoxia-induced Factor (HIF)-1 Inhibition and Metastasis Suppression with BNCT by Using Kojic Acid Modified o-Carborane T. Nagasaki, R. Kawasaki, M. Sakuramoto, S. Iizuka, M. Kirihata, Y. Hattori, S. Masunaga, Y. Sakurai, 査読無し, KURRI Progress Report 2013, 124 (2014).
  9. Evaluation of Biocompatible Polylysine Bearing BSH as a Polymeric Agent for Boron Neutron Capture Therapy, T. Nagasaki, R. Kawasaki, M. Sakuramoto, M. Kirihata, K. Ono, S. Masunaga, Y. Sakurai, 査読無し, KURRI Progress Report 2013, 281 (2014).
- 〔学会発表〕(計43件)
1. N. Kusumoto, D. Furukawa, R. Nishino, S. Saeki, T. Nagasaki, Construction on Tomographic Micro-visualizing System of Delivered Drug Concentration inside Biological Tissue using 2-Color Coherence Interferometer, 2017年3月7日、第8回 OCARINA 国際シンポジウム、大阪市立大学学術情報総合センター、大阪府大阪市
  2. 中村亮介、道田佳幸、相澤結、東秀紀、小島明子、長崎健、1'-acetoxychavicol acetate の抗炎症メカニズムに関する研究、「バイオインターフェース先端マテリアルの創生」第7回シンポジウム、2017年2月10日、あべのメディックス、大阪府大阪市
  3. 椎名慎一、立花太郎、東秀紀、長崎健、未分化幹細胞に親和性を有する新規ホウ素中性子捕捉剤の開発、「バイオインターフェース先端マテリアルの創生」第7回シンポジウム、2017年2月10日、あべのメディックス、大阪府大阪市
  4. 楠本修也、古川大介、西野亮平、佐伯壮一、長崎健、2色低コヒーレンス光干渉計を用いた生体組織における DDS 薬剤マイクロ断層可視化システムの構築、「バイオインターフェース先端マテリアルの創生」第7回シンポジウム、2017年2月10日、あべのメディックス、大阪府大阪市
  5. T. Nagasaki, R. Kawasaki, M. Kirihata, Water Soluble Complex of Kojic Acid Modified o-Carborane with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin for Melanoma-targeting Boron Neutron Capture Therapy, The 4th Asian Chemical Biology Conference, 2016年11月28日-12月1日、85 Sky Tower Hotel, Kaohsiung, Taiwan
  6. 福田千紗、東秀紀、長崎健、アントラキノン修飾  $\alpha$ -シクロデキストリンより調製した 1'-acetoxychavicol acetate に対するキャリアとしての応用、第33回シクロデキストリンシンポジウム、2016年9月8-9日、かがわ国際会議場、香川県高松市
  7. 中村亮介、道田佳幸、東谷菜央、相澤結、東秀紀、小島明子、長崎健、1'-アセトキシチャビコールアセテート/シクロデキストリン複合体の抗炎症効果、第33回シクロデキストリンシンポジウム、2016年9月8-9日、かがわ国際会議場、香川県高松市
  8. 福田千紗、東秀紀、長崎健、アントラキノン修飾シクロデキストリンより調製した自己集積性ベシクルの 1'-acetoxychavicol acetate に対するキャリアとしての応用、第14回 ホスト・ゲスト化学シンポジウム、2016年6月4-5日、高知城ホール、高知県高知市
  9. 中村亮介、道田佳幸、東谷菜央、相澤結、東秀紀、小島明子、長崎健、1'-アセトキシチャビコールアセテート/シクロデキストリン複合体の抗炎症効果、第14回 ホスト・ゲスト化学シンポジウム、2016年6月4-5日、高知城ホール、高知県高知市
  10. 仲谷友祐、東秀紀、長崎健、ジヒドロスフィンゴシン 1-リン酸類の免疫賦活効果、「バイオインターフェース先端マテリアルシンポジウム」第6回シンポジウム、2016年2月12日、大阪市立大学田中記念館、大阪府大阪市
  11. 小西貴弘、東秀紀、小島明子、長崎健、クマリルアルコール誘導体の細胞内グルタチオン制御活性及び光線力学療法への応用、「バイオインターフェース先

- 端マテリアルシンポジウム」第6回シンポジウム、2016年2月12日、大阪市立大学田中記念館、大阪府大阪市
12. T. Nagasaki, R. Kawasaki, Y. Hattori, S. Masunaga, Y. Sakurai, K. Tanaka, K. Ono, M. Kirihata, Kojic acid-appended carborane/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex for melanoma-targeted BNCT, 8th Young Researchers BNCT Meeting, 2015年9月13-17日, Almo Collegio Borromeo, Pavia, Italy
  13. T. Nagasaki, R. Kawasaki, Y. Hattori, Y. Sakurai, K. Tanaka, S. Masunaga, K. Ono, M. Kirihata, Melanoma-targeting boron delivery system using kojic acid-carborane conjugate, 2nd International Workshop on BNCT, 2014年12月8-9日, 同志社大学室町キャンパス, 京都府京都市
  14. 長崎健、河崎 陸・増永慎一郎・櫻井良憲・田中浩基・切畑光統、コウジ酸修飾カルボランのメラノーマBNCT薬剤としての評価、平成26年京都大学原子炉実験所専門研究会、2014年9月29-30日、京大原子炉実験所、大阪府熊取町萩原麻未、要田涼太・鈴木 利雄・長崎健、フタロシアニン亜鉛ノ-1,3-グルカン複合体を用いた細胞選択的光線力学療法剤としての評価、第8回バイオ関連化学シンポジウム、2014年9月11-13日、岡山大学津島キャンパス、岡山県岡山市
  15. 櫻本 昌士、増永慎一郎・櫻井良憲・小野公二・切畑光統・長崎 健、ホウ素クラスター修飾ポリリジンをを用いたBNCT用新規高分子型ホウ素薬剤の開発、第8回バイオ関連化学シンポジウム、2014年9月11-13日、岡山大学津島キャンパス、岡山県岡山市
  16. 萩原麻未、要田涼太・鈴木 利雄・長崎健、フタロシアニン亜鉛/aqua 複合体のdectin-1依存的な光線力学効果、第2回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム、2014年9月10日、岡山大学津島キャンパス、岡山県岡山市
  17. T. Nagasaki, R. Kawasaki, Y. Sakurai, S. Masunaga, K. Ono, M. Kirihata, Kojic Acid Modified o-Carborane/Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin Complex as Novel BNCT Drug for Melanoma, 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, 2014年6月14-19日, Porssitalo, Helsinki, Finland
  18. 萩原麻未、長崎 健・鈴木 利雄、フタロシアニン亜鉛ノ-1,3-グルカン複合体の光線力学療法剤としての評価、第30回日本DDS学会、2014年7月30-31日、慶應義塾大学薬学部 芝共立キャンパス、東京都港区

〔図書〕(計1件)

1. 鈴木利雄・長崎 健・井戸垣秀聡、シーエムシー出版、超分子材料の設計と応用展覧、機能性食品素材β-グルカンの開発-機能性食品素材開発から医療材料への応用-, 114-127(2014).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計2件)

名称：カルボラン修飾コウジ酸/シクロデキストリン包接錯体およびその製造方法  
 発明者：上原幸樹・切畑光統・長崎健  
 権利者：ステラファーマ・大阪府立大学・大阪市立大学  
 種類：特許  
 番号：特許第5816896号  
 出願年月日：平成23年1月28日  
 取得年月日：平成27年10月9日  
 国内外の別：国内

名称：疎水性クラスター化合物への水溶性又は水分散性の付与方法  
 発明者：鈴木利雄・植田秀昭・長崎健・切畑光統・沼田宗典・池田篤志  
 権利者：大阪ソーダ・大阪市立大学・大阪府立大学・沼田宗典・奈良先端科学技術大学院大学  
 種類：特許  
 番号：特許第5646505号  
 出願年月日：平成21年11月27日  
 取得年月日：平成26年11月14日  
 国内外の別：国内

〔その他〕

解説

1. 富田恒之、長崎健、ホウ素中性子捕捉療法剤としての含ホウ素希土類酸化物、化学工業、66、512-517(2014).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長崎 健 (Nagasaki Takeshi)  
 大阪市立大学・大学院工学研究科・教授  
 研究者番号：30237807

### (2) 研究分担者

なし ( )  
 研究者番号：

### (3) 連携研究者

増永 慎一郎 (Masunaga Shin-ichiro)  
 京都大学・原子炉実験所・教授  
 研究者番号：80238914

東 秀紀 (MAzuma Hideki)

大阪市立大学・大学院工学研究科・講師  
研究者番号：80311918

(4)研究協力者  
なし( )