

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07324

研究課題名(和文)細胞内局在を標的とした新規ホウ素薬剤の開発とBNCT

研究課題名(英文) New BNCT with development of new boron drugs targeting intracellular localization

研究代表者

市川 康明(竹内康明)(Ichikawa, Yasuaki)

岡山大学・中性子医療研究センター・教授

研究者番号：30126833

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)：次世代のがん治療であるホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、ホウ素と中性子の核反応により細胞を破壊する。中性子発生装置が医療承認され、今後のBNCTの成功の可否はホウ素薬剤に大きく依存する。BNCTにより発生した数マイクロメートル飛程の2次粒子は、腫瘍細胞へ細胞障害を誘導する際に、ホウ素薬剤が細胞内局在によりその効果が異なると、これまで報告してきた。更に我々は、これまで細胞内導入困難とされてきた第一世代ホウ素薬剤BSHを今回A6Kペプチドと呼ばれるDDSと複合体形成することにより、細胞内へと導入することに成功した。新規薬剤を用いた今後のホウ素薬剤開発への発展へ繋げる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BNCTにおいて、ホウ素薬剤の細胞内外の局在、及び細胞内の局在はその治療効果に大いに左右する。ホウ素薬剤は、甲状腺に対するヨウ素剤(1)のように単体での取り込みは期待できない。そこで、ホウ素薬剤とどのような生理活性物質を組み合わせるのが重要である。今回我々は、細胞内導入能のない、細胞選択性のない第一世代ホウ素薬剤BSHに着目し、この二つの弱点を改善する薬剤開発に至った。その際、臨床使用されているペプチドDDSのA6Kペプチドに着目して、混合するだけで用事調整可能な薬剤を作製した。この薬剤による、経時的細胞内局在、脳腫瘍モデルマウスを用いた検証を行い、今後の薬剤の薬剤発展性に貢献した。

研究成果の概要(英文)：The next-generation cancer treatment, boron neutron capture therapy (BNCT), destroys cells through a nuclear reaction between boron and neutrons. The neutron generator has been medically approved, and the success of BNCT in the future depends largely on the boron drug. It has been previously reported that secondary particles with a range of several micrometers generated by BNCT have different effects depending on the intracellular localization of boron drugs when inducing cytotoxicity into tumor cells. Furthermore, we have succeeded in introducing the first-generation boron drug BSH, which has been difficult to introduce into cells, into cells by forming a complex with DDS called A6K peptide. This will lead to the development of future boron drug development using new drugs.

研究分野：ホウ素中性子捕捉療法

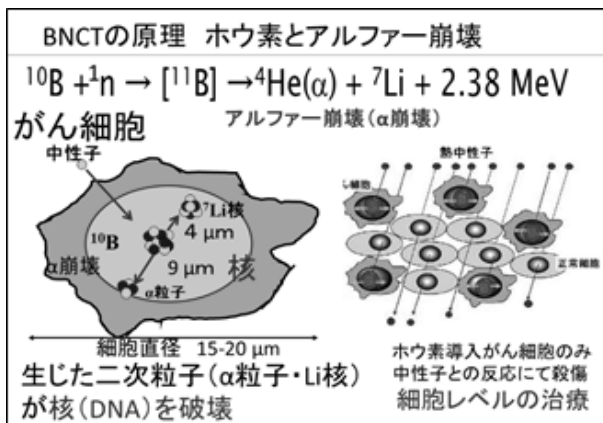
キーワード：ホウ素薬剤 中性子捕捉反応 薬物送達システム アルファ崩壊 BSH 細胞内局在 細胞内導入 ペプチドDDS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

BNCTは、予めがん細胞にホウ素の同位体 B10 を取り込ませた腫瘍組織に中性子線を照射し、生じる核分裂反応に由来する粒子線により DNA の損傷をひき起こし、がん細胞だけを殺傷する低浸襲性の標的がん治療法（右図）であり、実用化が永らく期待されてきた。BNCT の中性子源としては 1950 年代から利用されてきた原子炉に代わり、近年、加速させた陽子をターゲット（Li7 または Be9）に当てて中性子線を発生させる加速器型中性子線発生装置が開発され、一部は治験中である（住友重機械工業社製）。

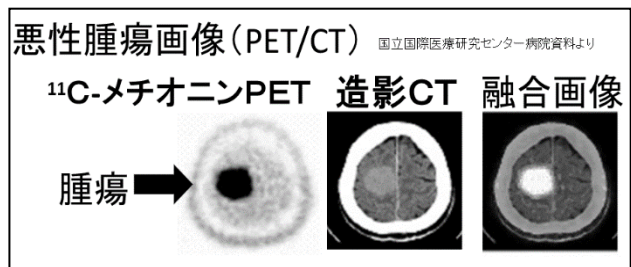


放射線治療分野においては、強度変調放射線治療（IMRT: intensity-modulated

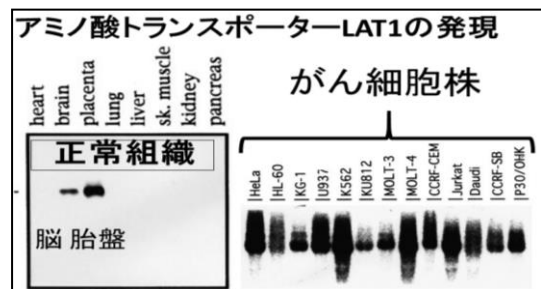
radiotherapy) や陽子線治療・重粒子治療の発達が目覚ましいものの、難治性がんには未だ有効な放射線治療が無いものもある。BNCT は難治性がんに対する革新的放射線粒子線治療法として期待されているが、がん細胞内に充分量のホウ素を効率よく腫瘍特異的に送達する薬剤の開発に問題を残しており、医療技術的には未完成である。

臨床試験で使用中の2種類のホウ素薬剤		
現在 治験中	 BPA p-boronophenylalanine	 BSH Sodium mercapto undecahydrodecaborate
分子組成	C ₉ H ₁₂ BNO ₄ (B cont. 4.8%)	Na ₂ B ₁₂ H ₁₁ SH (B cont. 57%)
溶解度(水、20℃)	1.6 mg/mL	67% w/v (670mg/ml)
正常脳への集積	あり (BBB通過可)	ほぼなし(BBB通過不可)
腫瘍への集積	アミノ酸代謝能動的取込	血管透過性・滞留性亢進 (EPR効果)
細胞内部への取込	あり	なし
臨床使用量	500 mg/kg (24 mgB/kg)	100 mg/kg (57 mgB/kg)
薬物動態 イメージング法	あり(¹⁸ F-BPA PET)	なし

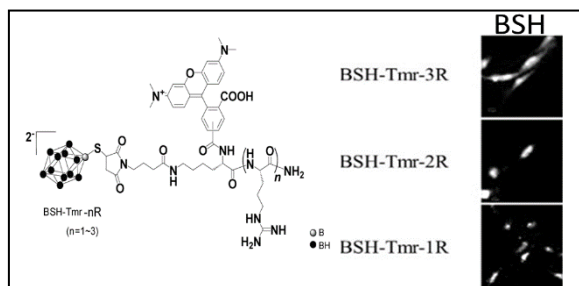
ホウ素薬剤に注目すると現在、臨床試験まで到達している薬剤は上図 2 剤しかない。現在治験中薬剤 BPA(p-boronophenylalanine: ホウ素フェニルアラニン)はアミノ酸フェニルアラニンに 1 個のホウ素が結合したホウ素アミノ酸誘導体である。腫瘍細胞は、正常細胞と比較して一般的にアミノ酸代謝が亢進しており、様々なアミノ酸取り込みが高いとされている。一例として ¹¹C-Met(メチオニン)PET (右図) はメチオニン取り込み能の高い腫瘍への取込が確認され腫瘍評価に用いられている。同様にフェニルアラニンの誘導体である BPA も腫瘍に特異的に取り込まれ、さらに正常細胞と比較して腫瘍細胞にフェニルアラニンの取り込みを行うアミノ酸トランスポーターLAT1 が強発現していることより、BPA は腫瘍特異的なホウ素分子標的薬とも言える (右図)。アミノ酸を標的としたホウ素薬剤は非常に素晴らしい取り込み能を示している一方で、腫瘍細胞の中には、一部取り込み能の低いものも存在し、BNCT 後の再発の原因となっている。



2. 研究の目的



我々は、アミノ酸とは異なる導入経路による細胞内導入法を有するホウ素薬剤を作製することを選択し、本研究を遂行することとした。BPAは、細胞質内に広く拡散し、一部は核へも到達し、明確な細胞内局在を示さない。今回対象とするBSH（前頁下図）は高い水溶性、高いホウ素含有率のホウ素立体小分子であるが、細胞内導入能が無い為、これまで効果が低いとされてきた。そこで、細胞膜通過ペプチド(CPP)と呼ばれる細胞外膜を通過させ細胞導入を可能にするペプチドを結合させることで、BSHを細胞内導入することに成功した（上図）。本薬剤は、投与1時間では細胞質に局在し、その後6時間にて核へ局在を変化させ、その後時間経過にて、核へ蓄積する薬剤である。ホウ素薬剤において、このような細胞内局在による効果を評価した研究はこれまでに無く非常に今後の発展が期待できる分野である。特に、右図のように臨床応用を考慮したBSHにアミノ酸アルギニン（Arginine）を1個、2個、3個結合させた、BSH-1R、BSH-2R、BSH-3Rは細胞膜を通過し、細胞内に局在し、それぞれ、細胞内エンドソーム（BSH-1R）、核局在（BSH-2R）、核及び細胞質局在（BSH-3R）を示す。また、新規ホウ素薬剤に関しては、本プロジェクトに於いて評価する。



3. 研究の方法

実験① 新規ホウ素薬剤合成

詳細については特許申請前であるため割愛するが既に細胞内オルガネラを標的としたホウ素薬剤の合成を行っており、これまで示したBSH-11R製剤やBSH-(R)n製剤の合成手法の確立を目指す。

実験② 細胞内ホウ素濃度測定

各ホウ素製剤投与による時間経過による細胞内ホウ素濃度測定を行う。また、低酸素状態、低血糖状態での腫瘍環境における各製剤の取込について、ICP(高周波誘導結合プラズマ)を用いてホウ素濃度測定を行う。

実験③ シミュレーションによる細胞内ホウ素局在による核へのエネルギー付与計算

中性子照射に伴う、各細胞内小器官におけるホウ素中性子捕獲反応による核へのエネルギー付与及び各オルガネラへのエネルギー付与を計算にて行う。

実験④ 中性子照射による殺細胞効果の検証

各ホウ素製剤を投与後に京都大学原子炉実験所の原子炉中性子源また放射線医学総合研究所の加速器中性子源を用いて中性子照射を行う。中性子照射時間及び中性子照射強度を変化させることにより、シミュレーションによる効果判定を実測にて行う。

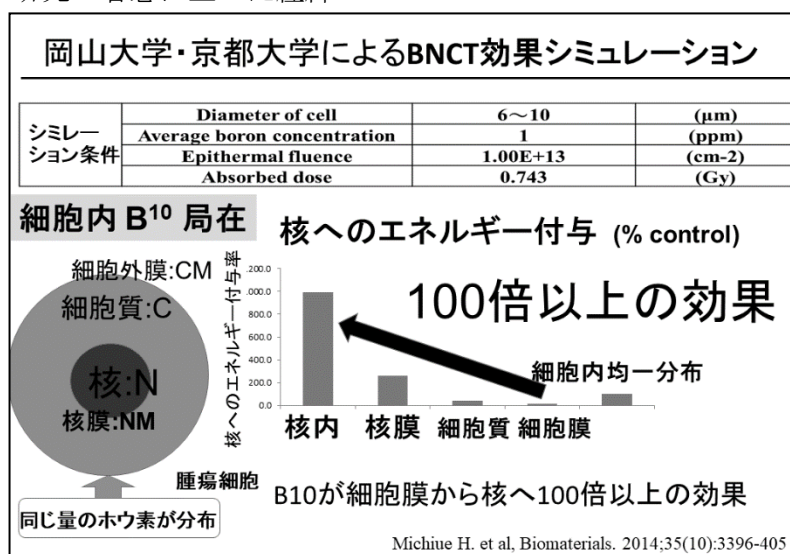
研究推進に当たって（役割分担）

市川（研究代表者） 研究立案 報告書作成 物理線量評価 中性子線照射 論文作成
道上（研究分担者） 報告書作成 薬剤作製 細胞実験 薬剤分布評価 論文作成

	平成30年度(2018年)	平成31年度(2019年)	平成32年度(2020年)
実験(市川)	研究立案/線量評価	中性子線照射/線量評	結果解析・報告書/論文作

		価	成
実験(道上)	細胞準備/細胞内評価	薬剤細胞内分布評価	照射解析・報告書/論文作成
到達目標	線量計算体系構築 腫瘍細胞準備	中性子照射準備 細胞内ホウ素観察	効能/効果判定・解析・薬物濃度評価・報告書作成
到達困難な場合	In silico simulation による細胞内分布評価	薬剤変更による効能効果判定・線量評価	In silico simulation との相違についての検証

本研究の着想に至った経緯



2014年 Biomaterials 誌において（上図、一部論文より改変）,我々は同じ量の 10B ホウ素が①細胞内に均一に存在する場合、②細胞外膜に存在する場合、③細胞質に存在する場合、④核膜に存在する場合、⑤核内に存在する場合の計 5 パターンでのホウ素局在を設定し、中性子照射によりホウ素中性子捕獲反応が起こったときの核へのエネルギー付与を計算した。その結果、驚いたことに、②の細胞膜局在の時と⑤の核内局在時では、おおよそ 100 倍以上の核エネルギー付与が異なることを示した。これは、ホウ素薬剤が細胞に入らないか、細胞内に導入され核へ局在しているかで、効果が大きく違うことを示している。今回は、核へのエネルギー付与のみならず、各オルガネラへのエネルギー付与を計算し、さらに各オルガネラへ局在するホウ素薬剤を作成する。

4. 研究成果

第一世代ホウ素薬剤の BSH は、高い安定性、高い水溶性、高い分子内ホウ素含有率として、日本初の悪性脳腫瘍 BNCT で用いられてきた。これまでの数多くの研究の中で、腫瘍選択性が無い事、腫瘍細胞内へ導入されてない事の 2 点が大きな問題として取り上げられ、臨床研究において、近年その使用は殆どない。近年、第二世代ホウ素薬剤の BPA（ホウ素フェニルアラニン）は、アミノ酸輸送体を介した腫瘍特異的な細胞内導入のある薬剤として臨床開発が進み、2020 年 3 月や薬剤製造認可がされ、2020 年 6 月の世界初の BNCT 医療の原動力となっている。我々は、細胞内でのホウ素薬剤の局在を評価するにあたって、BSH の問題点を解決する薬剤科初に取り組んだ。

【A6K ペプチド DDS による BSH 細胞内導入】

今後も臨床応用も考慮して、BSH 細胞内導入のために A6K ペプチド DDS を利用した。A6K ペプチドは、Alanine (A) 6 個と Lysine (K) 1 個からなる両親媒性のペプチドであり、既に核酸医薬のデリバリーツールとして、臨床応用されている。核酸医薬 siRNA の負の電荷と、A6K の持つ正の電荷にて、静電相互作用にて複合体形成が起り、複合体が細胞膜に結合し、エンドサイトーシスにて細胞内導入されると報告されている。我々は、BSH が 2 荷の負電荷を有する点に着目し、BSH と A6K の複合体作成に挑戦した。様々な手法での混合条件を検討し、A6K と BSH を 1 ; 10 で混合することにより、電子顕微鏡観察による粒子化を観察し、非常に高効率に細胞内導入されることを確認した。さらに、細胞毒性を見たところ、BSH を新たな化合物を作る事なく、BSH を保ったまま導入されたが、これに関する明らかな細胞毒性は認めなかった。悪性神経膠腫 U87 delta EGFR 細胞内での経時的な細胞内ホウ素濃度を評価したところ、投与後 30 分にて優位な上昇を認め、その効果は 24 時間持続した。同時に細胞免疫染色にて共焦点レーザー顕微鏡下にて観察したところ、核外、細胞質内に明らかな BSH 局在を確認した。特に、核周囲の細胞質に局在していると思われた。エンドソームマーカーと同時に観察したところ、多くの BSH との共局在が確認され、導入はエンドサイトーシスにて行われていることが証明された。これは、これまでの核酸医薬 siRNA と同じ結果であり、A6K デリバリーを裏付けるものである。

【マウス脳腫瘍モデルでの A6K/BSH デリバリー】

悪性神経膠腫 U87 delta EGFR 細胞を mouse BALB/c nu/nu の脳内に移植した脳腫瘍モデルマウスに対して尾静脈より、BSH 薬剤または A6K/BSH 薬剤を投与し、観察を行った。投与後 12 時間において、マウス脳腫瘍部において、腫瘍の局在と一致して A6K/BSH 群における BSH の局在が確認された。薬剤分布は、腫瘍部及び腫瘍部の広がる腫瘍・正常部の境界にまで広がっていたが、正常脳および対側大脳半球には、薬剤を認めなかった。一方、細胞内導入の無い、腫瘍選択性のない BSH は、腫瘍部及び正常部、どちらにおいても明らかな分布を認めなかった。薬剤投与後の経時的な腫瘍及び正常脳におけるホウ素濃度を測定したところ、A6K/BSH 群における高い、腫瘍部でのホウ素濃度が確認され、正常と腫瘍部のホウ素濃度比 (tumor/normal ratio) を確認したところ 投与後 1 時間にて T/N 比 6.8, 2 時間にて 2.8、最終 24 時間でも 40 と高い腫瘍選択性を示した。特に投与後 2 時間における腫瘍部でのホウ素濃度は $24.8 \mu\text{g}^{10}\text{B}/\text{tissue g}$ と BNCT の効果が十分期待できる数値であった。

【中性子照射による抗腫瘍効果の証明】

京都大学複合原子力科学研究所 (KURNS) にて、U87 delta EGFR 細胞に対して、ホウ素薬剤投与後に、中性子照射を行い、照射後 24 時間、48 時間並びに 2 週間での、治療効果の検討を行った。使用した A6K/BSH 群は、低濃度の $100 \mu\text{M}$ A6K/1 mM BSH と 高濃度の $200 \mu\text{M}$ A6K/2 mM BSH を使用した。対象として、ホウ素薬剤の無いコントロールグループと、BSH 2mM の群を設定した。中性子照射は、1MW 原子炉時に 5 分、15 分、30 分間の照射時間にて行い、それぞれで検討をした。A6K/BSH 群においては、照射 15 分、30 分にて優位に細胞増殖抑制効果を得た。一方、細胞内導入の無い BSH 群においては、その効果は認めなかった。

更にコロニーフォーメーション・アッセイにて、A6K/BSH 群での細胞増殖抑制効果は顕著に示され、BNCT による抗腫瘍効果は確認された。

以上より、BPA に続く新たなホウ素薬剤のラインナップとして、新規ホウ素薬剤 A6K/BSH が誕生し、今後の薬剤開発への第一歩と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Michiue Hiroyuki, Kitamatsu Mizuki, Fukunaga Asami, Tsuboi Nobushige, Fujimura Atsushi, Matsushita Hiroaki, Igawa Kazuyo, Kasai Tomonari, Kondo Natsuko, Matsui Hideki, Furuya Shuichi	4. 巻 330
2. 論文標題 Self-assembling A6K peptide nanotubes as a mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) delivery system for boron neutron capture therapy (BNCT)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 788 ~ 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2020.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hakata Yoshiyuki, Michiue Hiroyuki, Ohtsuki Takashi, Miyazawa Masaaki, Kitamatsu Mizuki	4. 巻 29
2. 論文標題 A leucine zipper-based peptide hybrid delivers functional Nanog protein inside the cell nucleus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 878 ~ 881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Latt Hein Min, Matsushita Hiroaki, Morino Miku, Koga Yuuri, Michiue Hiroyuki, Nishiki Teiichi, Tomizawa Kazuhito, Matsui Hideki	4. 巻 379
2. 論文標題 Oxytocin Inhibits Corticosterone-induced Apoptosis in Primary Hippocampal Neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 383 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2018.03.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 SHIBA Hiroyuki, TAKEUCHI Koji, HIRAMATSU Ryo, FURUSE Motomasa, NONOBUCHI Naosuke, KAWABATA Shinji, KUROIWA Toshihiko, KONDO Natsuko, SAKURAI Yoshinori, SUZUKI Minoru, ONO Koji, OUE Shiro, ISHIKAWA Eiichi, MICHIE Hiroyuki, MIYATAKE Shin-Ichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Boron Neutron Capture Therapy Combined with Early Successive Bevacizumab Treatments for Recurrent Malignant Gliomas - A Pilot Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 487 ~ 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2018-0111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Hiroyuki Michiue, Nobushige Tsuboi, Keiichiro Hayashi, Hideki Matsui, Kazuhiko Kurozumi
2. 発表標題 New drug discovery with drug re-positioning system toward GBM treatment
3. 学会等名 2019 Society of Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Michiue, Asami Fukunaga, Mizuki Kitamatsu, Natsuko Kondo, Yoshinori Sakurai, Atsushi Fujimura, Kazuyo Igawa, Hideki Matsui, Shuichi Furuya
2. 発表標題 New peptide Drug Delivery System with BSH toward future BNCT clinical application
3. 学会等名 10th Young Reserchers BNCT Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 ペプチドDDSを用いた新規ホウ素 薬剤製剤化への取り組み
3. 学会等名 第3回NTRCシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上宏之, 井川和代, 古矢修一, 市川康明, 吉橋幸子, 瓜谷章, 渡辺賢一, 鬼柳善明, 土田一輝
2. 発表標題 The cell biological evaluation with Nagoya University BNCT system
3. 学会等名 第16回日本中性子捕捉療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Michiue
2. 発表標題 The role of calcineurin in controlling cell function in hair generation
3. 学会等名 National Symposium and Workshop in Anti-Aging Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Michiue
2. 発表標題 Translational research in hair generation from lab to life
3. 学会等名 National Symposium and Workshop in Anti-Aging Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) のメラノーマ治療における位置づけ～BNCTの基礎より最新の研究まで～
3. 学会等名 第6回岡山メラノーマ治療研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 再発メラノーマに対するBNCTを含めた新規集学的治療の取り組み
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之 福永麻美 北松瑞生 近藤夏子 櫻井良憲 藤村篤史 井川和代 松井秀樹 古矢修一
2. 発表標題 ペプチドDDSを用いた新規ホウ素薬剤の構築
3. 学会等名 第15回日本中性子捕捉療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 New multidisciplinary treatment with Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) against melanoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 New self-assembling peptide Drug Delivery System with BSH toward clinical application
3. 学会等名 18th International Congress on Neutron Capture Therapy (ICNCT-18) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 New A6k boron drug delivery system for clinical application of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)
3. 学会等名 2018 Annual Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 BNCTを用いた新規岡山大学メラノーマ集学的治療へ向けた取り組み
3. 学会等名 第2回中性子医療研究センターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 BNCT治療の現実とこれから
3. 学会等名 第2回中性子医療研究センターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上宏之
2. 発表標題 脳腫瘍幹細胞由来の腫瘍血管を標的とした新規抗血管新生療法の開発
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 グルコースホウ素薬剤	発明者 道上宏之 高口豊	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-051323	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	道上 宏之 (Michiue Hiroyuki) (20572499)	岡山大学・中性子医療研究センター・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関