

令和 3 年 5 月 29 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：18K07678

研究課題名（和文）ペプチド輸送体による腫瘍選択的能動取込を企図したBNCT用治療・診断プローブ開発

研究課題名（英文）Development of a theranostic probe for boron neutron capture therapy aiming at active and specific uptake via peptide transporter

研究代表者

上田 真史（Ueda, Masashi）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40381967

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ホウ素中性子捕捉療法を行うために十分な量のホウ素を腫瘍組織選択的に送達するために、ペプチドトランスポーター（PEPT）を介して取り込まれる新規ホウ素薬剤の開発を行った。臨床使用されているホウ素薬剤であるBPAにフェニルアラニンを結合させた薬剤（BPA-Phe）を開発・評価したところ、所期の通りPEPTを介して腫瘍細胞内に取り込まれること、BPA-Pheの方がBPAよりも細胞内取り込み量が多いことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホウ素中性子捕捉療法用の薬剤で唯一承認を受けているBPAの問題点として、腫瘍移行性の低さがある。本研究で開発したBPA-PheはBPAよりも細胞内取り込み量が多かったことから、より低い投与量で治療効果を発現できる可能性がある。また、BPA-PheはBPAとは異なる機構で細胞内に取り込まれると考えられることから、BPAでは治療効果の出ないがん種への適用拡大も期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we developed a novel boron-containing reagent targeting peptide transporters in order to deliver sufficient concentration of boron into tumors for boron neutron capture therapy (BNCT). BPA-phenylalanine (BPA-Phe) was obtained by Fmoc solid-phase peptide synthesis. It was revealed that BPA-Phe was uptaken into tumor cells via peptide transporters and showed higher cellular uptake compared to BPA which is the only approved pharmaceutical for BNCT.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 セラノスティクス ペプチドトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (Boron neutron capture therapy, BNCT) は、ホウ素 (^{10}B) と熱中性子との核反応で生じる高 LET 放射線の α 線を用いて、がん細胞を選択的に傷害する治療法である。発生する α 線の飛程は組織中では約 $10 \sim 14 \mu\text{m}$ とされており、細胞一個の直径にほぼ相当する。このため、ホウ素をあらかじめがん細胞に選択的に集積させておき、そこに熱中性子線を照射すれば、ホウ素を取り込んでいない正常細胞では何ら影響がない一方、ホウ素が存在するがん細胞内でのみ特異的に α 線が発生して細胞が傷害され、がん細胞選択的治療が可能となる。実際に臨床研究もおこなわれており、脳腫瘍、頭頸部がんなどを中心に有効性が明らかとなっている。また以前は原子炉由来の中性子が用いられており、利用がかなり限定的であったが、近年は加速器によって中性子が製造できるようになり、BNCT が普及する素地が整いつつある。

現在臨床使用されているホウ素薬剤がボロノフェニルアラニン (BPA) である。しかしながら本化合物の腫瘍移行性は低く、体重 60 kg のヒトに 30 g もの量を投与する必要がある。臨床研究では顕著な副作用は発現していないものの、これを克服するためにクラスター化したホウ素を導入した薬剤や、リポソームなどに内封して投与量を増やす試みも行われているが、前者では選択性や毒性に問題があり、後者では腫瘍間質までは分布できても腫瘍細胞内には移行しにくいことが問題である。

すなわち研究開始当初には、十分量のホウ素を選択的かつ効率的に腫瘍組織中に送達し得る薬剤は存在しなかった。

2. 研究の目的

既存の BNCT 用ホウ素薬剤である BPA は、L-アミノ酸トランスポーター 1 (LAT1) を介して腫瘍細胞内に取り込まれることが知られている。顕著な副作用は報告されていないものの、その腫瘍集積性は不十分である。そこで本研究では、毒性の低い BPA 骨格を生かしつつ、それにアミノ酸を 1 残基結合させたジペプチドホウ素薬剤を開発し、ジノトリペプチドを認識するペプチドトランスポーター 1 (PEPT1) を介して腫瘍組織内に能動輸送することで、腫瘍に選択的かつ高効率にホウ素を送達できるのではないかと考えた。PEPT1 は様々ながん種で高発現が報告されているトランスポーターであり、PEPT1 を標的とすることで、LAT1 を発現していないがん種でも BNCT の対象となる可能性があるなど、適用拡大につながる利点が考えられる。本研究では、PEPT1 を介して腫瘍細胞に高く取り込まれるジペプチドホウ素薬剤の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ジペプチドホウ素薬剤の合成

Fmoc 固相合成法により、BPA にフェニルアラニン (Phe) を結合させた BPA-Phe を合成した。粗ペプチドを HPLC で生成することで目的物を得、その構造は NMR と質量分析により同定した。

(2) がん細胞株における PEPT1 及び LAT1 発現評価

AsPC-1 細胞 (ヒト転移性膵臓がん由来) あるいは MIA PaCa-2 細胞 (ヒト膵臓がん由来) における PEPT1 と LAT1 の発現を、ウェスタンブロッティングにより評価した。一次抗体として抗 PEPT1 抗体あるいは抗 LAT1 抗体を、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗ウサギ抗体を使用し、HRP 基質の化学発光を CCD カメラ搭載ゲル撮影装置で検出した。それぞれのタンパク質の発現強度は、内部標準である β アクチンに対する比で評価した。

(3) 細胞取り込み実験

BPA-Phe の終濃度が $0, 100, 500 \mu\text{M}$ となるようにハクス平衡塩溶液 (HBSS) に溶解させた試料を、AsPC-1 細胞あるいは MIA PaCa-2 細胞に添加し、 $1 \sim 8$ 時間インキュベートした後に trypsin/EDTA を用いて細胞を回収した。回収した細胞の一部を使ってタンパク定量を行い、残りは灰化処理の後に ICP 発光分光装置を用いて細胞内に取り込まれたホウ素量を測定した。データは単位タンパク量あたりに取り込まれたホウ素量 ($\text{B } \mu\text{g}/\text{mg protein}$) で表した。

また、BPA-Phe (終濃度 $100 \mu\text{M}$) に、PEPT1 の基質であるグリシルサルコシン (Gly-Sar) を終濃度が $0, 10, 100 \text{ mM}$ となるように加えた HBSS 溶液を AsPC-1 細胞に添加し、2 時間インキュベートした後に同様の処理を行って細胞内に取り込まれたホウ素量を測定し、BPA-Phe の取り込みに対する Gly-Sar の影響を評価した。

さらに、対照として、BPA (終濃度 $500 \mu\text{M}$) の HBSS 溶液を AsPC-1 細胞に添加し、4 時間インキュベートした後に同様の処理を行って細胞内に取り込まれたホウ素量を測定し、BPA-Phe の 4 時間添加群の結果と比較した。

4. 研究成果

(1) がん細胞株における PEPT1 及び LAT1 発現評価

AsPC-1 細胞および MIA PaCa-2 細胞を用いて実施したウェスタンブロッティングの結果を図 1 に示す。それぞれの細胞における LAT1 あるいは PEPT1 のシグナル強度を β アクチンのシグナル強度に対する比で表したところ、LAT1 については AsPC-1 細胞と MIA PaCa-2 細胞の間に有意差を認めなかったが、PEPT1 については、AsPC-1 細胞の方が MIA PaCa-2 細胞よりも約 1.9 倍有意に高い値を示した (AsPC-1 : 0.13 ± 0.019 , MIA PaCa-2 : 0.070 ± 0.0070 , $n = 4$)。

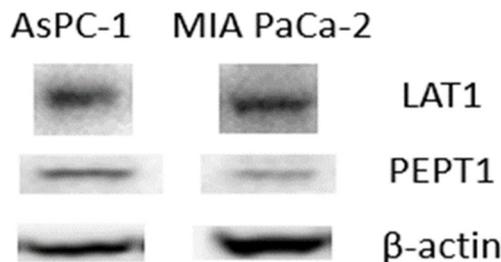


図 1 . AsPC-1 細胞と MIA PaCa-2 細胞における PEPT1 および LAT1 の発現解析

(2) PEPT1 高発現細胞と低発現細胞における BPA-Phe の取り込み比較

ウェスタンブロッティングの結果から、AsPC-1 細胞には PEPT1 の発現が多く、MIA PaCa-2 細胞には少ないことが明らかとなった。そこで両細胞に同濃度の BPA-Phe を添加し、細胞内に取り込まれたホウ素量を経時的に調べた結果を図 2 に示す。AsPC-1 細胞では、BPA-Phe 添加濃度依存的に細胞内ホウ素量が増加した。また、処置時間にも依存して細胞内ホウ素濃度が増加し、4 時間でピークを迎え、8 時間では低下した (図 2 A)。取り込みが最大となった処置時間 4 時間における細胞内ホウ素量は、100 μ M 添加群で 0.26 ± 0.068 μ g/mg protein、500 μ M 添加群で 0.98 ± 0.078 μ g/mg protein であった。一方、MIA PaCa-2 細胞における取り込みは AsPC-1 細胞に比べると低く、処置時間依存的な増加も認めなかった (図 2 B)。これらの結果から、BPA-Phe は PEPT1 発現量に対応した細胞内集積性を示すことが明らかとなった。

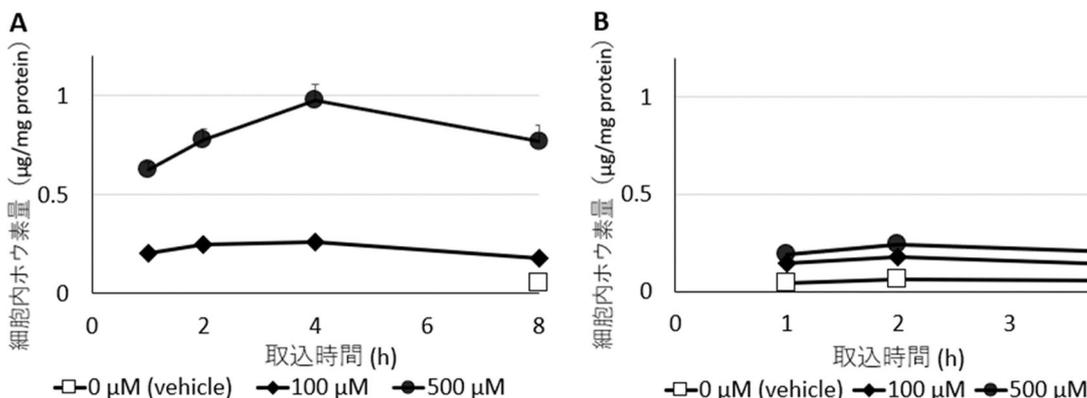


図 2 . BPA-Phe 添加後の AsPC-1 細胞および MIA PaCa-2 細胞中のホウ素量の経時変化

(3) BPA-Phe の細胞内取り込みに対する PEPT1 基質の影響評価

BPA-Phe が PEPT1 を介して細胞内に取り込まれるか否かをより直接的に評価するため、PEPT1 の基質として知られる Gly-Sar 共存下での BPA-Phe の細胞内取り込みを評価した。結果を図 3 に示す。BPA-Phe (100 μ M) を添加することで細胞内ホウ素量は有意に増加したが、Gly-Sar を同時に添加すると、細胞内ホウ素量は Gly-Sar 濃度依存的に有意に減少した (図 3、BPA-Phe のみ : 0.232 ± 0.0871 μ g/mg protein、BPA-Phe + Gly-Sar 10 μ M : 0.0804 ± 0.0444 μ g/mg protein、BPA-Phe + Gly-Sar 100 μ M : 0.0316 ± 0.0524 μ g/mg protein)。PEPT1 の基質である Gly-Sar によって BPA-Phe の細胞内取り込みが低下したことから、BPA-Phe が PEPT1 を介して取り込まれることが明らかとなった。

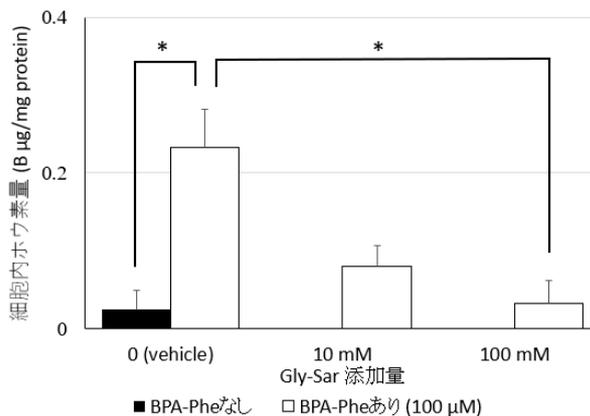


図 3 . BPA-Phe の細胞内取り込みに対する Gly-Sar の影響

(4) AsPC-1 細胞における BPA-Phe と BPA の取り込み比較

AsPC-1 細胞に同濃度の BPA と BPA-Phe を処理し、細胞内ホウ素量を比較した。その結果、BPA-Phe 添加群の細胞内ホウ素量は $0.98 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ 、BPA 添加群の細胞内ホウ素量は $0.64 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ となり、BPA-Phe の方が有意に高いがん細胞集積性を示した(図4)。

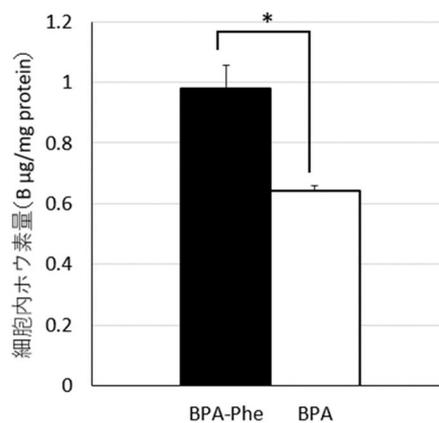


図4 . AsPC-1 細胞における BPA-Phe と BPA の細胞内取り込み

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小橋川共夢、御舩正樹、上田真史
2. 発表標題 ホウ素中性子補足療法のための新規ホウ素製剤としてのBPA-フェニルアラニンの合成と評価
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）生体機能分析学分野ウェブサイト http://analyticalscience.pharm.okayama-u.ac.jp/

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
研究協力者	小橋川 共夢 (Kobashigawa Kiyomu)		

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
---------	---------