

令和 2 年 9 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19574

研究課題名(和文)難治性硬癌に対する中性子捕捉療法を目指したボロンアルブミンデリバリーの開発

研究課題名(英文)Development of Boron-Albumin Delivery Systems for Neutron Capture Therapy to Refractory Solid Cancer

研究代表者

柳衛 宏宣(Yanagie, Hironobu)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・客員研究員

研究者番号：30212278

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):我々は、膵癌等の硬癌では癌細胞周囲の間質組織が厚いために有効な抗腫瘍効果が出ていないことより、癌細胞に発現しているアルブミン受容体を介してボロン化合物を選択的にデリバリーし、中性子捕捉療法を用いて腫瘍制御を図りたい。ボロン-アルブミン複合体(10BSH-PEG-BSA)を合成し、熱中性子照射にてAsPC-1膵癌細胞障害効果を見出した。AsPC-1皮下担癌マウスにて10BSH-PEG-BSAを腫瘍内投与し中性子ラジオグラフィにて腫瘍の10B原子集積を確認できた。PEG-BSAにより多くの10BSHを結合することで10B濃度を増加させ、熱中性子照射の治療効果および安全性を確認し発展したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌等の硬癌では癌細胞周囲の間質組織が厚いために有効な抗腫瘍効果が出ていない。このために、ボロン原子をがん選択的に送達し、集学的治療として中性子捕捉療法によるがん治療を確立したい。中性子捕捉療法は、現行の治療体系に追加できる癌治療である。我々は、癌細胞に発現しているアルブミン受容体を介してボロン原子を選択的にデリバリーし、中性子捕捉療法を効果的に実施する研究を続けている。ボロン原子を癌選択的にデリバリーし中性子捕捉療法を実施できれば、腫瘍制御性も高まり、かつ正常組織の副作用も軽減することができ、患者様のQuality of Lifeを高めることができ、非常に有効である。

研究成果の概要(英文):It is necessary to accumulate the 10B atoms selectively into the cancer cells for effective cancer specific cytotoxicity by boron neutron capture therapy (BNCT). Recently, albumin delivery have attracted attentions in DDS (for example, Abraxane).

In this study, we prepared boronated PEG-binding bovine serum albumin(BSA), and examined the delivering capacity of 10B atoms to human pancreatic cancer cell line, AsPC-1. The original 10B concentration was  $250.0 \pm 4.9$  ppm in 10BSH-PEG-BSA. AsPC-1 cells were suspended in 125 ppm 10B-PEG-BSA, and showed 40% cancer cell cytotoxicity by BNCT( $2 \times 10^{12}$  n/cm<sup>2</sup>). We also showed the accumulation and retention in the tumour after 3hours intra-tumoral injection of 10BSH-PEG-BSA by using Neutron Capture Auto-Radiography. These data indicated that the 10B-PEG-BSA has the possibility to deliver the 10B atoms to cancer cells, and increase 10B uptake levels in cancer cells by increasing the 10B binding sites of PEG-BSA for effective BNCT.

研究分野：消化器外科、乳癌外科、ドラッグデリバリーシステム、中性子捕捉療法

キーワード：中性子捕捉療法 ボロン化合物 ボロノドデカボラン アルブミン複合体 アルブミン受容体 ポリエチレングリコール 膵臓癌 腫瘍内局注療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

中性子捕捉療法 (Neutron Capture Therapy ; NCT) はボロン化合物( $^{10}\text{B}$ )あるいはガドリニウム化合物( $^{157}\text{Gd}$ )に熱中性子照射することで得られる重荷電粒子を使用する物理化学的な癌治療法である。 $^{10}\text{B}$  ボロンを用いる BNCT では、生じるアルファ線のエネルギー飛程は  $10\ \mu\text{m}$  であるため、癌細胞に  $^{10}\text{B}$  ボロン原子を選択的に集積させることができれば正常細胞には障害を与えず、理論上では細胞単位での癌特異的治療が可能である。また、 $^{157}\text{Gd}$  を用いる GdNCT では、生じる Auger 電子のエネルギー飛程は  $1\ \mu\text{m}$  および 線は数ミリであるため、同様に癌細胞に選択的に  $^{157}\text{Gd}$  原子を集積させることが必要である。BNCT においては、癌幹細胞は薬剤耐性、放射線耐性になっているが、 $^{10}\text{B}$ SH を細胞中に送達することにより非増殖細胞の BNCT による障害効果が期待できる。つまりボロン化合物が細胞内へ集積できれば、容易に **Double Strand Break** を生じ癌細胞死を誘導できる。また、癌細胞選択的な放射線治療であるため、従来の放射線治療と比較して副作用が少ないと考えられている。

研究代表者は、1989年より、 $^{10}\text{B}$  封入抗 CEA -Immunoliposome を世界に先駆け作成し、BNCT を用いて膵臓癌細胞障害および腫瘍増殖抑制効果を示してきた (Br. J. Cancer, 1991, 1997)。また、リポソーム表面をポリエチレングリコール(PEG)で修飾しステルスリポソームを作製し、BNCT を用いて腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた (Appl. Rad. & Isotopes 2004, Biomedicine & Pharmacotherapy 2006, J. Controlled Release 2004)。ボロン化合物として新規ポリ酸ボロン化合物( $^{10}\text{B}_{32}$ )を合成し、BNCT にてヒト膵臓癌細胞株に対して細胞障害効果を認めた (Int Cong. of Boron & Related Materials, 2011)。さらに肝臓癌に対する BNCT の研究として、AFP 産生ラット肝臓腫瘍への  $^{10}\text{B}$  結合抗 AFP 複合体の集積性を示した (J. Can. Res. & Clin. Oncol., 1994)。また、VX-2 腫瘍担癌ウサギモデルに対して、 $^{10}\text{B}$ SH 封入 WOW エマルションを作成し、BNCT により腫瘍増殖抑制効果を確認した (NIM-A 2009, Br. J. Radiol. 2017)。また、研究代表者は、遺伝子治療の非ウイルスベクターの開発にも従事してきており、非ウイルスベクターとしてプラスミド DNA をポリエチレンイミンと反応させ、さらに血中滞留性と分散性を上昇させるためカルボキシル基結合 PEG と反応させ、細胞内送達キャリアを開発した。さらに膜融合タンパク JTS-1 を加えることにより、エンドゾームからの消化を防ぐことで細胞質への送達効率を増加させた (Abst. Int Cong. of Cancer Gene Therapy 2006)。

研究代表者は、より効果的な NCT を行うためには、 $^{10}\text{B}$  化合物の癌選択的そして高効率デリバリーシステムが必要であることに注目している。アルブミンデリバリーシステムは、癌細胞にアルブミン受容体が見いだされ注目を集めている。臨床においては、ヒト血清アルブミンにパクリタキセルを結合させナノ粒子化した“アブラキサン (Abraxane)”が、乳癌、胃がん、非小細胞肺癌、治癒切除不能な膵臓癌、で適応承認がとられている。

今回、研究代表者は、アルブミンにポリエチレングリコールを結合させ、血中滞留性を増加させた複合体に  $^{10}\text{B}$  化合物を結合させ、新規のアルブミンデリバリーシステムを構築し ( $^{10}\text{B}$ -PEG-BSA)、より高濃度の  $^{10}\text{B}$  化合物を癌細胞核内へ送達させることを検討する。遺伝子導入にて成功している膜融合蛋白である JTS-1 等を結合させて新規のアルブミンデリバリーシステムを構築し、中性子捕捉反応による癌細胞障害効果と腫瘍増殖抑制効果を検証していきたい。本研究において、新規のアルブミンデリバリーシステムを構築することは、通常の DDS で送達できない血管性に富まない繊維組織の多い進行癌 (肝転移性難治性癌 (転移性乳癌、AFP 産生転移性胃癌) や膵臓癌等) への高機能性集学的中性子捕捉療法の開発 (適応拡大) を進めることになる。基礎的・安全性的知見を蓄積しつつ、病院併設型加速器を用いた NCT 事業的にも世界へ発信できる研究となり得る。

研究代表者たちの主な中性子捕捉剤 ( $^{10}\text{B}$  /  $^{157}\text{Gd}$ ) の DDS 製剤は以下のものである。

(1) Micro-carrier: WOW emulsion: Appl Radiat Isot. 88:32-7, 2014., Br. J. Radiol. 2017, 20170004. doi: 10.1259/bjr.2017000, PMID: 28406315., Appl Radiat Isot. 163:1-8, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109202>

(2) Nano-carrier:

1) Immunoliposome: Brit J. Cancer, 75(5):660-665, 1997., Brit. J. Cancer,

3(4):522-526, 1991.

- 2) Polyethylene-glycol binding liposome: J Control Release. 11;98(2):195-207, 2004., Biomed. Pharmacother., 60(1):43-50, 2006.
- 3) Bare Liposome: Biomedicine and Pharmacotherapy, 56 :93-99, 2002., Biomed Pharmacother. 67(6):451-7, 2013.
- 4) Nano Micelles: ACS Nano, 23;9(6):5913-21, 2015., J Cancer Res Clin Oncol. 142(4):767-75, 2016., Biomaterials. 33(13):3568-77, 2012.
- 5) Anti-AFP MoAb: J Cancer Res Clin Oncol.,120 : 636-640, 1994.  
Boron Cluster: Appl Radiat Isot. 69(12):1765-7, 2011.

## 2. 研究の目的

研究代表者は、**Immunoliposome**、**Stealth liposome**、**Nano-Micelle**、等のドラッグデリバリーシステム(**DDS**)について研究を遂行しているが、難治性癌である膵臓癌、乳癌、未分化胃癌、転移性大腸癌、などにおいては、腫瘍組織自体に血管に富まない繊維組織が多い構造になっており、一般的なナノサイズの **DDS** では癌細胞に薬剤を送達することが非常に難しい。このため、さらに低分子での **DDS** を用いて薬剤を送達する必要性がある。ボロン中性子捕捉療法(**BNCT**)は、ボロン化合物に熱中性子照射することで得られるアルファ線を使用する物理化学的な癌治療法である。アルファ線のエネルギー飛程は **10 $\mu$ m** であるため、癌細胞にボロン原子を選択的に集積させることができれば正常細胞には障害を与えず、容易に **Double Strand Break** を生じ癌細胞死を誘導できる。アルブミンデリバリーシステムは、癌細胞にアルブミン受容体が見いだされ抗癌剤のデリバリー等で注目を集めている。

**BSH** は、癌細胞内に拡散させることができれば中性子捕捉療法により癌幹細胞のような非増殖細胞を破壊できる。本研究では、より高濃度の **<sup>10</sup>B** 化合物を癌細胞内へ送達する方法として、新規のアルブミンデリバリーシステムを導入し、**BSH** の細胞内・核内への選択的ターゲティングを施すことで、通常の **DDS** で送達できない血管性に富まない繊維組織の多い進行癌への高機能性集学的中性子捕捉療法の開発を進めることを目的とする。基礎的・安全性的知見を蓄積しつつ、病院併設型加速器を用いた中性子捕捉療法の応用へと展開したい。

## 3. 研究の方法

癌細胞選択的なアルブミンデリバリーシステム **DDS** の合成：ポリエチレングリコール結合アルブミン(**PEG-BSA**)の合成を行う。細胞特異的に高いアルブミン導入をもたらす最適条件の検討を行う：核内移行複合体の効果を確認する。核内移行複合体の検討：膜融合蛋白(**JTS-1**)を混和させ細胞核内移行への検討を行う。マレイミド基を用いて **<sup>10</sup>B** 共結合ポリエチレングリコール結合アルブミン(**<sup>10</sup>B-PEG-BSA**)の合成を行う。**ICP-AES** あるいは京都大学複合原子力科学研究所の即発線測定系を用いた **<sup>10</sup>B-PEG-BSA** の **<sup>10</sup>B** 定量を行う(**in vitro**)。 **In vitro** 熱中性子照射による **NCT** の治療効果を確認する。中性子ラジオグラフィによる腫瘍組織内および細胞内 **<sup>10</sup>B** デリバリーの **Imaging** を行う。担癌マウスモデルにおける熱中性子照射による **NCT** の治療効果を確認する。

## 4. 研究成果

膵臓癌においては、癌細胞周囲に線維組織等の間質組織が厚いために、通常の抗癌剤を封入したナノデリバリーシステムを用いても、有効な抗腫瘍効果が出ていない状況である。我々は、癌細胞に発現しているアルブミン受容体を介してボロン化合物を選択的にデリバリーし、中性子捕捉療法を用いて腫瘍制御を図りたい。

### (1) PEG 結合 BSA の合成

ポリエチレングリコール(**PEG**)結合ウシ胎児血清アルブミン(**BSA**)は、**Abuchowski et al.**らの方法により合成した。この方法を用いると **PEG** の活性基と **BSA** のアミノ基を

単会反応で共有結合することができる。PEG2000-BSA と PEG5000-BSA の分子量は、それぞれ 93 kDa と 120 kDa であった。Multi-angle light scattering photometers( Dawn Model F, Wyatt Technology, CA, USA )を用いて、BSA に結合する PEG の数は、PEG2000-BSA では 14 個、PEG5000-BSA では 11 個と決定できた。FITC-ラベル化 PEG-BSA は、Fluorescent Spectrometry を用いて、BSA に結合する FITC の数は、PEG2000-BSA では 9.4 個、PEG5000-BSA では 7.9 個と決定できた。

### (2) エンドサイトーシスの発現

**HeLa 細胞と AsPC-1 細胞 ( $2 \times 10^5$ ) を FITC 蛍光ラベル化 PEG-BSA と 6 時間・37 度にて反応させた。**

FITC 蛍光標識したポリエチレングリコール(PEG5000)修飾アルブミン(BSA)を B16 Melanoma 細胞・HeLa 細胞に反応させて flow-cytometry にて細胞内蛍光強度を観察すると、37 度では増強、4 度では抑制され、Endocytosis の機序を認めた。また、PEG と蛍光標識した BSA では、蛍光強度の増加はなかった。

### (3) PEG による網内系取り込み抑制

BSA の PEG 化により網内系 Monocytes の取り込み抑制を確認できた。AsPC-1 細胞においては、BSA 単独あるいは FITC/BSA 混和では取り込みはないが、FITC-PEG-BSA の共有結合体では顕著な蛍光強度の時間依存的な増強を認めた。

### (4) ボロノドデカボラン結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン( $^{10}\text{B}$ BSH-PEG-BSA)の合成

ボロノドデカボラン結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン( $^{10}\text{B}$ BSH-PEG-BSA)の合成を行った。ボロノドデカボラン( $\text{Na}_2 \text{ } ^{10}\text{B}_{12} \text{H}_{11} \text{SH}$ : $^{10}\text{B}$ SH)を  $\gamma$ -maleimido-butyryloxy-succinimide (GMBS)を用いて PEG-BSA に結合させ、ボロン複合体( $^{10}\text{B}$ BSH-PEG-BSA)を作成した。京都大学複合原子力科学研究所の即発線測定系による  $^{10}\text{B}$  濃度は、 $250.0 \pm 4.9$  ppm であった。 $^{10}\text{B}$ -PEG5000-BSA の分子量は 120kDa であった。 $^{10}\text{B}$ -PEG5000-BSA に結合している PEG 数は 10 個と計算された。PEG-BSA 直接結合している  $^{10}\text{B}$  原子数は、24 個と推定された。

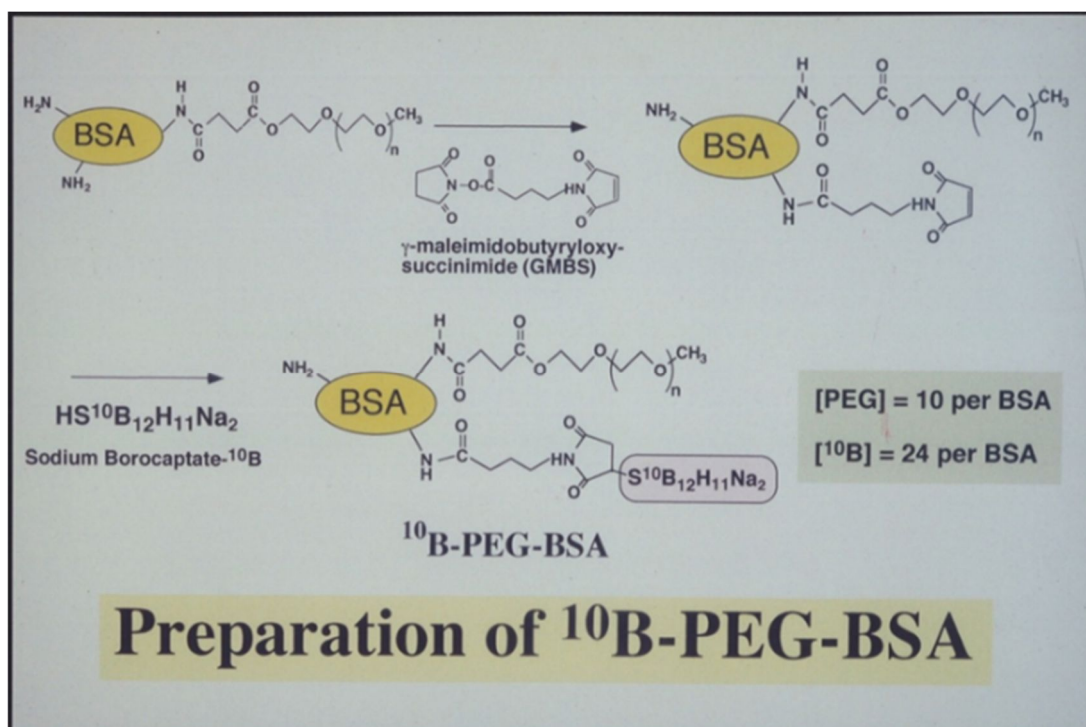


図 1.  $^{10}\text{B}$ BSH-PEG-BSA の合成シエーマ

### (5) 熱中性子照射による細胞障害効果(In vitro)

$^{10}\text{B}$ BSH-PEG-BSA をヒト膵臓癌細胞株 AsPC-1 細胞( $2 \times 10^5$  /well)と反応させ(9 hrs)、洗浄



後の  $^{10}\text{B}$  濃度は  $4.97 \pm 0.49$  ppm であった。 $^{10}\text{BSH-PEG-BSA}$  を AsPC-1 細胞 ( $2 \times 10^5$  /well) と反応させ ( $125$  ppm)、 $2 \times 10^{12}$  n /  $\text{cm}^2$  の熱中性子照射にて 40%細胞障害効果を見出した (Table 1)。

Table 1. Growth inhibition of AsPC-1 cells treated with  $^{10}\text{B-PEG BSA}$

Thermal Neutron ( n / $\text{cm}^2$ )	% Cell Growth	
	$^{10}\text{B-PEG BSA}$	BSA
0	$94.5 \pm 8.9$	$98.1 \pm 11.4$
$1 \times 10^{12}$	$64.8 \pm 19.4$	$98.5 \pm 14.5$
$2 \times 10^{12}$	$58.4 \pm 14.3$	$90.5 \pm 8.5$

AsPC-1 cells were suspended in  $125$  ppm  $^{10}\text{B-PEG BSA}$  and irradiated with  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$  n /  $\text{cm}^2$  of thermal neutrons and incubated for 8 hr. Cell growth was measured. The results are shown in the mean + s.e. of triplicate assays.

### (6) 中性子ラジオグラフィ

$^{10}\text{BSH}$  合成複合体を用いて担癌マウスモデルへの応用が可能かを検討するために、AsPC-1 細胞をヌードマウスに皮下投与し担癌マウスモデルを作成して、 $^{10}\text{BSH-PEG-BSA}$  ( $250$  ppm) を腫瘍内投与し、投与 3 時間後に 40 ミクロン厚のマウスの全身切片作成を行った。作成切片を  $-20$  度で凍結乾燥させ、CR39 アルファ線 Detector 板に張り付け、日本原子力研究機構 JPARC において冷中性子を照射し ( $2 \times 10^{10}$  n/ $\text{cm}^2$ )、中性子ラジオグラフィを行った。NaOH 法にて、エッチングを行い、腫瘍局所にボロン原子が集積していることが判明した (図 2)。 $^{10}\text{BSH-PEG-BSA}$  においては腫瘍内投与により濃度が約 40ppm であることより、腫瘍内投与法においては、熱中性子反応を生じる量のボロン原子を腫瘍組織内に送達できることが判明した。

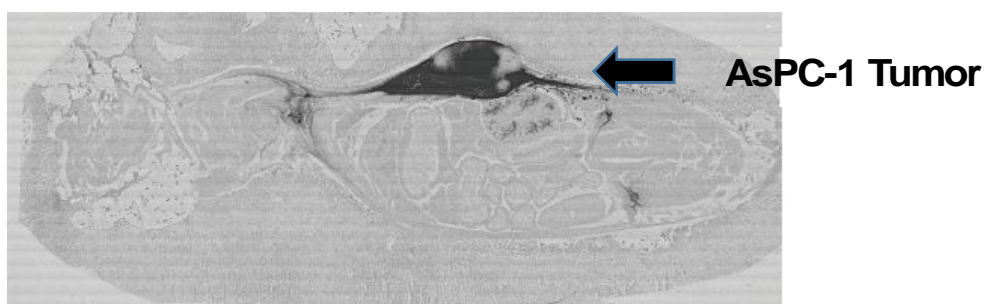


図 2 .  $^{10}\text{BSH-PEG-BSA}$  腫瘍内投与 3 時間後の中性子ラジオグラフィ (NCAR) 図

### (7) JTS-1 による増強効果について

AsPC-1 皮下腫瘍に対して、非ウイルスベクターであるカチオン性ポリマーを用いて、腫瘍内投与における腫瘍内保留性について検討した。今回は、ガドリニウム化合物を用いて、ポリマーとしては、ポリエチレンイミンを用いた。さらに、JTS-1 を混和後に複合体の分散化を促す糖鎖結合 PEG にて被包した。腫瘍投与経路の違いはあるが、Gd 水溶液単独と比較して、腫瘍内に滞留傾向がみられた。すなわち、静脈投与後 2 時間、腫瘍内局注後 12 時間に、腫瘍内 Gd 濃度の増加を認めた。PEG-BSA により多くの  $^{10}\text{BSH}$  を結合させ複合体  $^{10}\text{B}$  濃度を増加させ、JTS-1 を添加することにより、PEG 化アルブミンデリバリーシステムを用いて、非臨床試験での治療効果および安全性を確認し、さらなる展開に発展したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	高橋 浩之  (Takahashi Hiroyuki)  (70216753)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授    (12601)	