

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15805

研究課題名（和文）ホウ素中性子捕捉療法の難治性非腫瘍性疾患への適応拡大のための基盤技術開発

研究課題名（英文）Boron Drug Development to Expand the Indication of Boron Neutron Capture Therapy to Refractory Non-neoplastic Diseases

研究代表者

渡邊 翼（Watanabe, Tsubasa）

京都大学・複合原子力科学研究所・特定准教授

研究者番号：30804348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：抗体1分子あたり約3.8個のモジュールを結合させることができた(抗体1分子あたり約46個のホウ素原子)。。コンセプト検証を行うため簡便に抽出ができるCD8+T細胞を最初の標的とし、マウス脾臓からCD8+T細胞の細胞分離を行った。抗CD8a抗体のホウ素化を行いCD8+T細胞へ結合させ、中性子の照射を行った。CD8+T細胞のCD8a蛋白の発現は通常のタンパク質よりも量が少なく9万個であり理論上3%の確率でホウ素中性子捕獲反応が起こる。中性子照射後のアポトーシスをフローサイトメーター・RNA測定を用いて評価すると、理論値とほぼ一致し平均2.8%のアポトーシス細胞の増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既報のホウ素化抗体は、結合させられるホウ素クラスターの量が少なかったが、今回我々が開発したホウ素化モジュールによる抗体のホウ素化により抗体の抗原認識を損ねることなくより多くのホウ素原子を抗体に結合させることができた。ホウ素中性子捕捉療法は現在アミノ酸誘導体を主体としたホウ素薬剤のみが臨床応用可能であるが、抗体を用いた任意の細胞に対するホウ素原子の送達が可能となれば、ホウ素中性子捕捉療法の対象疾患を拡大することができる。今後、本モジュールのさらなる改良を目指し、より多くのホウ素原子を薬物送達の担体となる抗体へ結合させ、臨床応用の可能性を検討する。

研究成果の概要（英文）：Approximately 3.8 modules could be bound per antibody molecule (approximately 46 boron atoms per antibody molecule). For proof of concept, we first targeted CD8+ T cells, which can be easily extracted, and isolated CD8+ T cells from mouse spleens. The expression of CD8a protein in CD8+ T cells is 90,000, which is less than the amount of normal protein, and a theoretical 3% probability of boron neutron capture reaction occurs. The apoptosis after neutron irradiation was evaluated using flow cytometer RNA measurement, and an average increase of 2.8% of apoptotic cells was observed, which was almost consistent with the theoretical value.

研究分野：放射線腫瘍学・放射線生物学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

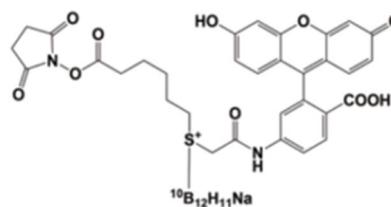
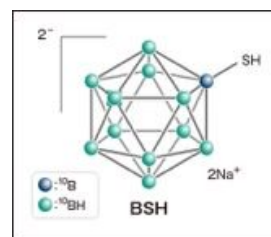
ホウ素中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy, BNCT)とはホウ素原子が中性子を取り込み線とリチウム原子核に核分裂を起こす物理反応(ホウ素中性子捕捉反応)を利用した治療である。分裂後の粒子の飛程は極めて短く細胞直径を超えず、ホウ素を癌細胞選択的に取り込ませられれば癌細胞を特異的に死滅させることが可能として癌治療として開発が進められてきた。癌治療として発展してきたホウ素中性子捕捉療法であるが、ホウ素原子の細胞選択的送達が可能であれば細胞選択的に生物効果が高い重粒子線とその細胞のみに照射することができるホウ素中性子捕捉反応の医学応用は癌に限らず、病因となっている細胞集団が明らかとなっている病気であれば、癌ではない病気に対しても、病因となっている細胞集団に対して選択的にホウ素を送達することにより本治療法を用いて治療ができるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

上記アイデアを背景に、任意の細胞に対して選択的にホウ素を送達する手段としては抗体薬物複合体を用いることとし、本研究の目的を BNCT の非腫瘍性疾患への適応拡大のためのホウ素化抗体作成とした。非腫瘍性疾患のうち、関節リウマチは病因や症状増悪に深く関与する細胞群が同定されている疾患の1つである。病因となる細胞群は Th17 細胞と呼ばれインターロイキン 17 を産生し、CCR6・CCL20・IL23R・TNFSF11 を発現していることがわかっている。また、これら病因となる細胞群の局在(関節)も明らかである。そこで、Th17 細胞に対して投与だけでは悪影響を及ぼさない細胞選択的なホウ素薬剤を作成し、ホウ素薬剤後関節のみに中性子を照射することによって関節リウマチの病因を除去し症状増悪を防ぐことができるのではないかと仮説を立て、研究をすすめることとした。抗体を利用した BNCT は過去芳しくない結果が報告されているが(Yang et al. Appl Radiat Isot 2009)、この失敗は実験者らのホウ素化抗体設計の失敗に起因し、必要十分量のホウ素を標的細胞に届けられなかったことが原因である。抗体を用いた BNCT を見込みがないと断言する研究者が見受けられるがこの考えは間違いである。本研究では BNCT を起こす必要ホウ素数の送達を第一目標に抗体のホウ素化モジュール開発をすすめた。

### 3. 研究の方法

中性子捕捉反応確率は細胞に到達したホウ素原子数、中性子フルエンス、反応確率(3.30E-09, 定数)の積である。研究用原子炉の中性子フルエンスはマウス照射条件(15 分照射)で 1.00E+12cm<sup>-2</sup>、1 つのタンパク質は通常平均 50 万個程度(5-200 万個)の発現があるため、抗体 1 分子あたり 600 個のホウ素原子があれば、ホウ素が送達された標的細胞に対して平均 1 回の中性子捕捉反応が起こる。1 分子あたり 12 個のホウ素原子を持つホウ素クラスター(BSH, 右図)を利用し、抗体 1 分子あたり 50 個のホウ素クラスターの結合が最終目標となる。抗体へ結合させるモジュールとして右図のような



FITC 及び BSH を構造として持つホウ素化モジュールを作成し、抗体の修飾を行った。抗体の量を BCA アッセイにより定量化し、結合させたホウ素化モジュールの量は FITC の量

光を用いて蛍光光度計により定量化した。

#### 4 . 研究成果

実験の結果、抗体 1 分子あたり約 3.8 個のモジュールを結合させることができた(抗体 1 分子あたり約 46 個のホウ素原子)。まずは本モジュールを用いて実験を継続することとした。コンセプト検証を行うため簡便に抽出ができる CD8+T 細胞を最初の標的とし、マウス脾臓から CD8+T 細胞の細胞分離を行った。抗 CD8a 抗体のホウ素化を行い CD8+T 細胞へ結合させ、中性子の照射を行った。CD8+T 細胞の CD8a 蛋白の発現は通常のタンパク質よりも量が少なく 9 万個であり理論上 3%の確率でホウ素中性子捕獲反応が起こる。中性子照射後のアポトーシスをフローサイトメーター・RNA 測定を用いて評価すると、理論値とほぼ一致し平均 2.8%のアポトーシス細胞の増加が認められた。Th17 細胞の標的タンパク質発現数が 50 万個だと仮定すると、Th17 細胞を同モジュールでも 5 倍のアポトーシスを起こすことができるため、マウス実験を行うこととした。本ホウ素化モジュールを用いて Th17 細胞選択的なタンパク質 IL-23R に対する抗体をホウ素化させ、関節リウマチモデルマウス SKG/Jcl へホウ素化抗体を注射して中性子を照射し、照射後の関節炎のスコアを評価した。スコアは BNCT 群で減少したものの中性子照射単独の対象群よりも有意な低下は得られなかった。抗体 1 分子当たりのホウ素原子数が不足しておりホウ素化モジュールの改良をすすめた。モジュール骨子をクマリンを主とした構造に変更し、改良モジュールは初期型の 2 倍のホウ素原子(24 個のホウ素原子)結合に至った。本モジュールは抗体 1 分子あたり初期モジュール同等程度(約 4 個)に結合する(抗体 1 分子あたり約 96 個)。研究期間内での進捗は以上であるがこれでもホウ素原子数は十分ではない。そこで発想を転換させ抗体を複数クローンを使い、標的タンパク質の異なる部位へ複数の抗体を結合させ、細胞あたりのホウ素原子数を稼ぐことを予定している(約 6 クローンで 50 万個の標的タンパクがあれば平均約 1 回の中性子捕捉反応を起こすことができる)。本研究で得られた結果を発展させるべく研究を続ける予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsubasa Watanabe, Genki Edward Sato, Michio Yoshimura, Minoru Suzuki, Takashi Mizowaki	4. 巻 28
2. 論文標題 The mutual relationship between the host immune system and radiotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 201～208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Watanabe Tsubasa, Yoshikawa Tomohiro, Tanaka Hiroki, Kinashi Yuko, Kashino Genro, Masunaga Shin-ichiro, Hayashi Toshimitsu, Uehara Koki, Ono Koji, Suzuki Minoru	4. 巻 0
2. 論文標題 Pharmacokinetic Study of 14C-Radiolabeled p-Boronophenylalanine (BPA) in Sorbitol Solution and the Treatment Outcome of BPA-Based Boron Neutron Capture Therapy on a Tumor-Bearing Mouse Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13318-023-00830-y	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 Watanabe Tsubasa, Sanada Yu, Hattori Yoshihide, Suzuki Minoru	4. 巻 64
2. 論文標題 Correlation between the expression of LAT1 in cancer cells and the potential efficacy of boron neutron capture therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 91～98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrac077	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 渡邊翼
2. 発表標題 LAT1 expression in tumor cells and LAT1 expression levels in different types of human tumors
3. 学会等名 2023 Taiwan-Japan Neutron Capture Therapy Academic Conference of Elite (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊翼
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法の課題と生物学的側面から考える克服法の模索
3. 学会等名 第2回日本量子医科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊翼
2. 発表標題 Exploratory study to expand the indication of BNCT based on LAT1 expression in tumors
3. 学会等名 YBNCT BNCT young researchers' meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊翼
2. 発表標題 腫瘍のLAT1発現に着目したホウ素中性子捕捉療法の適応拡大戦略
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊翼
2. 発表標題 腫瘍のLAT1発現を軸としたホウ素中性子捕捉療法の適応拡大にむけた探索的研究
3. 学会等名 第18回日本中性子捕捉療法学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊翼
2. 発表標題 ホウ素中性子捕捉療法の課題と解決法の模索
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊翼
2. 発表標題 BNCTの生物学
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会 夏季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔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

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