

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390013

研究課題名(和文)低侵襲型がん治療を可能とするホウ素送達システム

研究課題名(英文)Development of Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy as a Minimally Invasive Cancer Therapy

研究代表者

中村 浩之(Nakamura, Hiroyuki)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：30274434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：中性子捕捉療法は、低エネルギーである熱・熱外中性子がホウ素との核反応により生ずる強力な粒子線を用いてがん細胞を殺傷する治療法であり、正常組織へのダメージもきわめて低く、治療後の患者への負担が極めて小さい特徴をもつ。本研究では、蛍光標識ホウ素脂質を合成し、そのリポソームを用いて生体内局在を明らかにした。また、ホウ素脂質DSBLを10%含むホウ素ナノカプセルが血中滞留性が最も良いことが分かった。BSHを内封したホウ素ナノカプセルをがん移植マウスに投与したところ、このホウ素リポソームは高濃度で腫瘍内に蓄積し、中性子照射によって高い抗腫瘍効果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Boron neutron capture therapy (BNCT) is based on the capture reaction of thermal neutrons and nonradioactive  $^{10}\text{B}$ , which produces an  $\alpha$ -particle and a lithium-7 nuclei ion with approximately 2.4 MeV. We developed the liposomes with high boron contents as efficient boron delivery vehicles for BNCT. We optimized DSBL contents in the liposome preparation and found that 10% DSBL liposome is stable in blood circulation. Furthermore, we succeeded in encapsulation of BSH into the vacant inner of the 10% DSBL liposomes, producing the liposomes with high boron contents. We examined boron biodistribution in the tumor-bearing mice by injection of BSH-encapsulating DSBL liposomes via the tail vein. High boron accumulation was observed in the tumor tissue 36 h after injection of the liposomes. Significant tumor growth suppression was observed in the boron-loaded mice after neutron irradiation.

研究分野：有機化学

キーワード：中性子捕捉療法 リポソーム ドラッグデリバリーシステム ホウ素ナノカプセル

## 1. 研究開始当初の背景

国民の2人に1人ががんを患い、3人に1人ががんで亡くなる現在、患者のからだに対する侵襲度が低い治療法の開発が急務となっている。ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、低エネルギーである熱・熱外中性子がホウ素との核反応により生ずる強力な粒子線を用いるものであり、がん部位へホウ素デリバリーと中性子線照射のダブルターゲティングが可能であり、使用するホウ素化合物は低毒性であることから化学療法のような重篤な副作用はなく、また放射線療法のような照射場内の正常組織へのダメージもきわめて低い低侵襲型治療法で治療後の患者への負担が極めて小さい特徴をもつ。1968年世界に先駆けて日本で初めて脳腫瘍の治療に成功して以来世界をリードしてきた。2005年に京大原子炉 (KUR) で行われた治療症例は、脳腫瘍36件、頭頸部がん41件、肝臓がん5件、他5件と合計87症例にもなる。現在、世界的に中性子捕捉治療用加速器の開発が行われており、とりわけ京都大学では住友重工と共同でBNCT用加速器が開発され現在前臨床試験中である。近い将来病院併設型加速器中性子捕捉療法が実現することにより本治療法は一般的放射線療法の1つとなると考える。現在、BPAとBSHの2つのホウ素薬剤を用いて頭頸部腫瘍が臨床に用いられているが、高い治療効果のためには、腫瘍内ホウ素濃度が30 ppm以上、腫瘍/血液内ホウ素濃度比が5以上を満たす薬剤の開発が目標となる。そこで、研究代表者は、大量の薬剤分子を集合体として一気に送ることのできるリポソームを用いたホウ素送達システムを考案するに至った。リポソームの脂質二分子膜をホウ素脂質で置き換えることにより、

(1) 分子同士がファンデルワールス力により高密度自己集合化

(2) 薬剤内封によるホウ素と抗がん剤の

## ダブルターゲティング

(3) 二分子膜表面修飾によるホウ素ナノカプセルの高機能化

が、狙える。研究代表者は、既に世界初のホウ素脂質開発ならびにナノカプセル化に成功している (*Bioconjugate Chem.* 17, 1310-20, 2006)。PEG化したホウ素ナノカプセルは、マクロファージなどの細網内皮系から逃れ、がん移植マウスを用いた中性子照射実験では、照射後2週間後に腫瘍の大きさが実際にコントロールマウスの4分の1にまで抑えられた (DDS学会誌 特集号, p474-482, 2010年)。しかしながら、3週間後に再び腫瘍が大きくなるマウスも見られ、4週間後にがんが消失したマウスはおよそ30%であった。中性子照射後の再発には、

- 十分なホウ素濃度が細胞レベルで送達されていない
- 腫瘍血管から離れた腫瘍組織 (ハイポキシア領域) への送達が不十分

の2つの理由が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、根治を目指したホウ素送達システムの確立を目標とした。この目標を達成するために、本研究期間中に次の2つの課題について検討した。

(1) 腫瘍内ホウ素濃度: > 30 ppm、腫瘍/血液ホウ素濃度 (T/B) 比: > 4

高い治療効果を得るためには、上に挙げた数値が1つの目標となる。現在のホウ素ナノカプセルでは、高い血中滞留性を得るためには、リン脂質に対してホウ素脂質 25%以下で調製している (B/P 比 = 1/4)。高濃度ホウ素送達およびハイポキシア領域へのホウ素送達のためには、腫瘍組織内での内封ホウ素薬剤のリリースによる細胞膜および細胞間質の透過によるホウ素送達が鍵となると考える。そこで、内封ホウ素薬剤を検

討しホウ素高度集積化を検討した。

#### (2) ホウ素薬剤の可視化技術の開発

ホウ素薬剤が実際の腫瘍組織内にどのように分布しているか？細胞レベルで検証することが本治療効果の向上に繋がる。そのためにホウ素薬剤の可視化技術の開発は重要である。本研究では、蛍光標識を導入したホウ素脂質の可視化について検討した。

### 3. 研究方法

#### (1) 蛍光標識ホウ素脂質の開発 (ホウ素脂質の可視化)

ホウ素脂質の生体内での分布機構を解明するために、蛍光標識化したホウ素脂質の合成および可視化を目的とした。蛍光標識剤には、NBD-Cl の他にピレンやダンシルクロライド、フルオレセインなどがある。これらの中でも、蛍光がヒトの眼にとって最も観察しやすい緑色であること、分子サイズが小さいこと、そして脂質に導入しやすいことを考慮し、蛍光標識剤は NBD-Cl を用いることとした。

#### (2) 高い血中滞留性を有するホウ素脂質ナノカプセルの調製法の開発

高い血中滞留性を得るために、リン脂質に対してホウ素脂質の割合を 5%~25% で調製する。ホウ素脂質/リン脂質 (DSPC) / コレステロール / DSPE-PEG2000 = 0.05-0.25/0.9-0.75/1/0.1 の成分比で逆相蒸発法によりホウ素ナノカプセルを調整し、エクストルーダーにより 100 nm にサイジング) に対して、実際にマウスに尾静脈より投与し、血中滞留性を ICP 測定により評価することで最適なホウ素ナノカプセルの成分比を決定した。

#### (3) 蛍光標識ホウ素ナノカプセルの調製と細胞内および体内動態イメージングの検証

リン脂質 ( DSPC ) / コレステロール / DSPE-PEG2000 = 1/1/0.1 の成分比で逆相蒸発法により調製したリポソームに蛍光ホ

ウ素脂質 FL-SBL をポストインサーション法によりラベル化し、それぞれ HeLa 細胞に処理 (FL-SBL ; 1 時間、リポソーム ; 12 時間) し蛍光顕微鏡で観察した。また、このリポソームをマウス大腸がん由来細胞 Colon 26 をマウスに移植した担がんマウスモデルに静脈注射した。静脈注射をしてから 36 時間後に臓器を取り出し、組織切片 (厚さ 10 μm) を作製した。

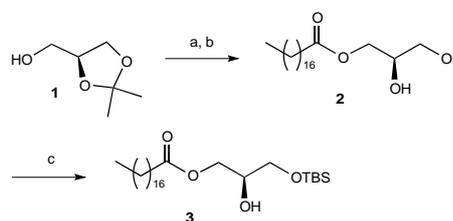
#### (4) 内封ホウ素薬剤の検討

高濃度ホウ素送達およびハイポキシア領域へのホウ素送達のために、内封ホウ素薬剤を検討する。具体的には、12 個のホウ素からなるホウ素イオンクラスターにそれぞれチオール基 ( BSH )、水酸基 ( BOH )、アミノ基 ( BNH3 )、そして置換基を持たない BH について合成を行い、それぞれの薬理活性 ( 細胞毒性およびがん移植マウスにおける各臓器集積性 ) について検討した。次に、それぞれのホウ素薬剤を内封したホウ素ナノカプセルを調製し、ナノカプセルのホウ素高集積化およびがん移植マウスを用いた腫瘍集積性、中性子照射による抗腫瘍効果を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 蛍光標識ホウ素脂質の開発 (ホウ素脂質の可視化)

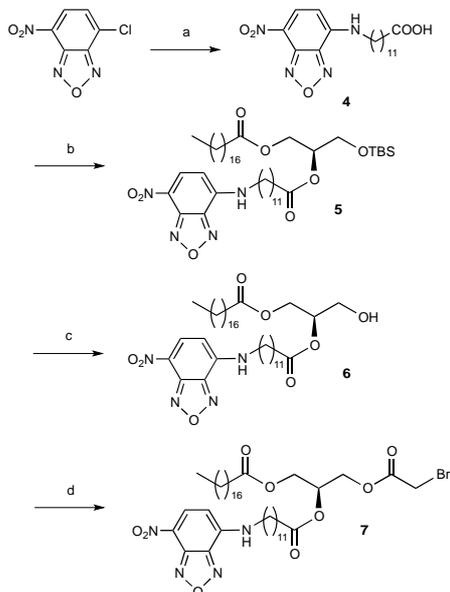
蛍光標識ホウ素脂質は Scheme 1 から Scheme 3 に示した方法で合成に成功した。まず、光学活性なアルコール 1 を出発原料とし、3 段階で長鎖脂肪酸エステル 3 を合成した。



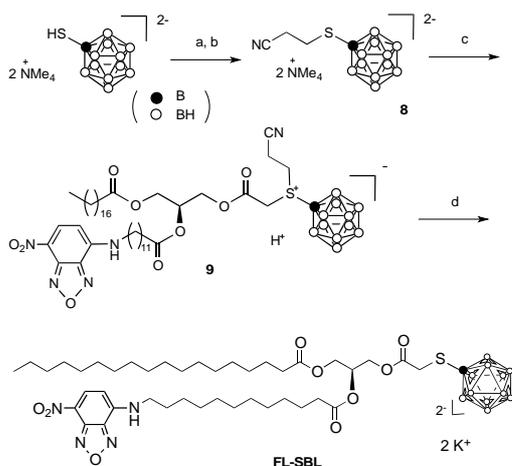
Scheme 1. Reagents and conditions: (a) octadecanoic acid, DMAP, DCC, CHCl<sub>3</sub>, 69%. (b) Amberlyst 15, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 79%. (c) TBDMSCl, imidazole, THF, 26%

また、Scheme 2 に示すように、蛍光剤の NBD-Cl を出発原料とし、カルボン酸基を導入

して化合物 4 とした後、Scheme 1 で合成した長鎖脂肪酸エステル 3 と反応させることによって、化合物 5 を得た。化合物 5 の TBS 基を脱保護し、プロモアセチルブロミドと反応させ化合物 7 を合成した。



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) 12-aminododecanoic acid, NaHCO<sub>3</sub>, EtOH, 37°C, 56%. (b) 3, DCC, DMAP, CHCl<sub>3</sub>. (c) HF-pyridine, pyridine, THF. (d) bromoacetyl bromide, pyridine, CHCl<sub>3</sub>.



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) 2-bromopropionitrile, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O. (b) tetramethylammonium hydroxide, dry acetone, 73%. (c) 7, CH<sub>3</sub>CN. (d) *t*-BuOK, THF.

次に、Scheme 3 に示すように、ホウ素イオンクラスター-B<sub>12</sub>H<sub>11</sub>SH の第 4 級アミン塩を化合物 8 へと変換した後、Scheme 2 で合成した化合物 7 と反応させ化合物 9 とした後、シアノエチル基を塩基条件下で除去することで、目的の蛍光標識ホウ素脂質 FL-SBL を合成することに成功した。

## (2) 高い血中滞留性を有するホウ素脂質ナノカプセルの調製法の開発

ホウ素脂質 DSBL の割合を 5%~25% の成分比で逆相蒸発法により調製したホウ素ナノカプセルをエクストルーダーにより 100 nm にサイジングして、実際にマウスに尾静脈より投与し、血中滞留性を ICP 測定した結果、図 1 に示すように、ホウ素脂質 DSBL 含有率が 10% 以下において、高い血中滞留性が得られることが分かった。

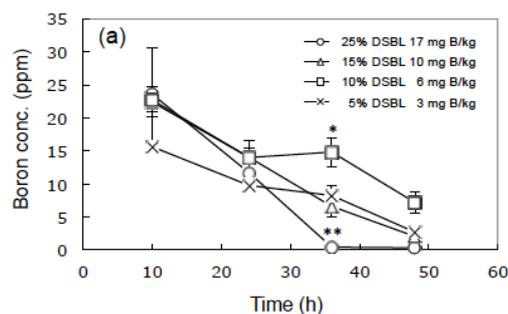


図 1. 投与後の血中内のホウ素濃度変化

## (3) 蛍光標識ホウ素ナノカプセルの調製と細胞内および体内動態イメージングの検証

次に、蛍光標識ホウ素脂質 FL-SBL をポストインサクション法によって調製したホウ素ナノカプセルをマウス大腸がん細胞に暴露し蛍光顕微鏡で観察した。その結果、図 2 に示すように、蛍光標識ホウ素脂質 FL-SBL のみを暴露した場合は、細胞膜に局在するのに対し、ナノカプセル化した場合は細胞内へ取り込まれることが明らかになった。

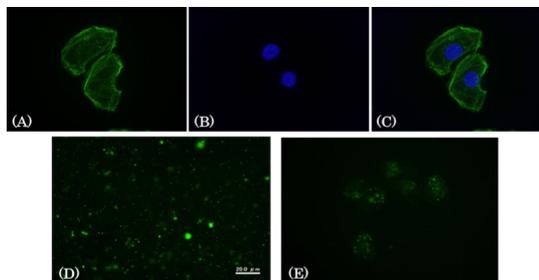


図 2. 蛍光標識ホウ素ナノカプセルの細胞内局在

そこで、蛍光標識ホウ素ナノカプセルを大腸がん移植マウスに静脈注射してから 36 時間後に臓器を取り出し、組織切片 (厚さ 10

μm)を作製し蛍光顕微鏡で観察したところ、図3に示すように、腫瘍組織に集積していることが分かった。その一方で、腫瘍の低酸素部位には到達していないことも明らかとなった。このことから、ホウ素の封入にはリポソーム膜だけでなく、内封することでトランスサイトosisにより腫瘍の低酸素領域へホウ素デリバリーする必要があることが明らかとなった。

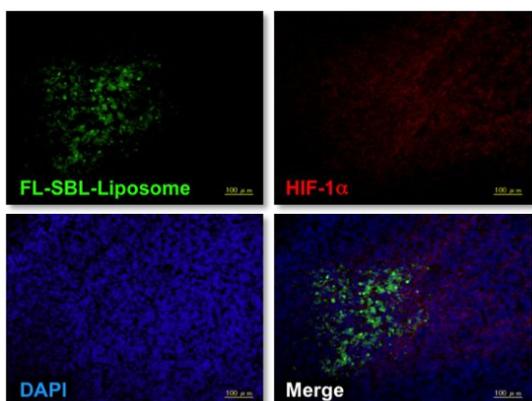


図3. マウス腫瘍組織内における蛍光標識ホウ素ナノカプセルの局在

#### (4) 内封ホウ素薬剤の検討と抗腫瘍効果

内封ホウ素薬剤には、ホウ素イオンクラスター  $B_{12}H_{11}SH$  および  $B_{12}H_{11}NH_3$  が効果的であることが分かった。

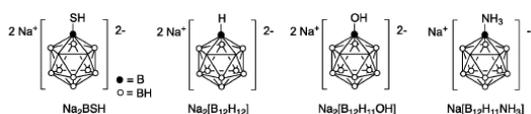


図4. 内封ホウ素クラスターの構造

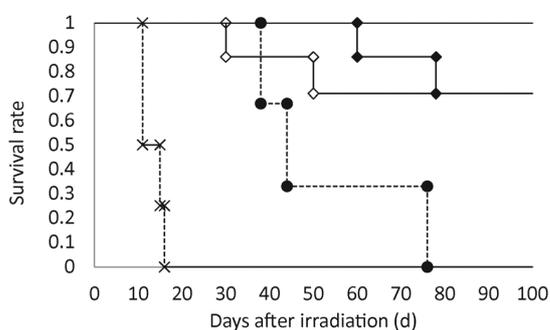


図5. BNCT 施行後のがん移植マウス生存曲線  
がん移植モデルマウスに対し、ホウ素内封ナ

ノカプセルを投与し、36 時間後に中性子照射を行い、100 日間にわたり観察した。その結果、図5に示すように、30 mg[B]/mg 投与群において、100%の生存が観察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- 1) ホウ素化合物・薬剤の歴史と現状  
中村浩之、*RADIOISOTOPES*, 64(1) 47-58 (2015). 査読有  
DOI:org/10.3769/radioisotopes.64.47
- 2) Spermidinium *c/oso*-dodecaborate-encapsulating liposomes as efficient boron delivery vehicles for neutron capture therapy. S. Tachikawa, T. Miyoshi, H. Koganei, M. E. El-Zaria, C. Viñas, M. Suzuki, K. Ono, H. Nakamura, *Chem. Commun.* 50, 12325-12328 (2014). 査読有 DOI:10.1039/c4cc04344h
- 3) Amphiphilic COSAN and I2-COSAN crossing synthetic lipid membranes: planar bilayers and liposomes. C. Verdiá-Báguena, A. Alcaraz, V. M. Aguilera, A. M. Cioran, S. Tachikawa, H. Nakamura, F. Teixidor, Clara Viñas, *Chem. Commun.* 50, 6700-6703 (2014). 査読有 DOI:10.1039/c4cc01283f
- 4) Development of High Boron Content Liposomes and Their Promising Antitumor Effect for Neutron Capture Therapy, H. Nakamura, *Yakugaku Zasshi*, 133(12) 1297-1306 (2013). 査読有 DOI: 10.1248/yakushi.13-00222-5
- 5) Boron Cluster Lipid Liposomes as New Vehicles for Boron Delivery System of Neutron Capture Therapy H. Nakamura, *Future Med. Chem.* (invited) 5(6), 715-730 (2013). 査読有 DOI:10.4155/FMC.13.48
- 6) Towards new boron carriers for boron neutron capture therapy: metallacarboranes and their cholesterol conjugates. M. Bialek-Pietras, A. B. Olejniczak, S. Tachikawa, H. Nakamura, Z. J. Lesnikowski, *Bioorg. Med. Chem.* 21, 1136-1142 (2013). 査読有 DOI:

10.1016/j.bmc.2012.12.039

- 7) Development of High Boron Content Liposomes and Their Promising Antitumor Effect for Neutron Capture Therapy of Cancers H. Koganei, M. Ueno, S. Tachikawa, L. Tasaki, H. S. Ban, M. Suzuki, K. Shiraishi, K. Kawano, M. Yokoyama, Y. Maitani, K. Ono, H. Nakamura, **Bioconjugate Chem.** 24, 124-132 (2013). 査読有 DOI: 10.1021/bc300527n
- 8) Design and synthesis of fluorescence-labeled closo-dodecaborate lipid: liposome formation and in vitro and in vivo imaging targeting to tumor for boron neutron capture therapy H. Nakamura, N. Ueda, H. B. Ban, M. Ueno, S. Tachikawa, **Org. Biomol. Chem.** 10, 1374-1380 (2012). 査読有 DOI: 10.1039/c1ob06500a

〔学会発表〕(計30件)

主な招待講演

- 1) ホウ素創薬の最前線  
中村浩之、CBI学会2013年大会、【**基調講演**】タワーホール船堀(東京都・江戸川区)2013年10月31日
- 2) がんを治す薬 一人々の夢実現に向けて  
中村浩之、読売サイエンスフォーラム-学習院大学理学部の研究力- 「ここまで来た! がん研究最前線」、【**特別講演**】学習院大学(東京都・豊島区)2013年7月27日
- 3) ホウ素高集積化リポソームによる中性子捕捉治療抗腫瘍効果の改善  
中村浩之、日本薬学会第133回年会シンポジウム「ナノテクノロジーを駆使した革新的診断・治療システムの構築に向けて」、**セッションオーガナイザー**、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)2013年3月27-30日
- 4) 中性子を用いた次世代放射線がん治療  
中村浩之、学際生命科学東京コンソーシアム 第7回シンポジウム 【**招待講演**】東京医科歯科大学(東京都・文京区)2013年3月16日
- 5) Development of inhibitors targeting

hypoxia cell signaling

H. Nakamura, 2th COLLOQUE FRANCO-ROUMAIN DE CHIMIE MEDICINALE 【**招待講演**】ヤシ(ルーマニア)2012年10月3-5日

〔図書〕(計2件)

- 1) 第7章 7.1 中性子捕捉療法にける薬剤送達システム 中村浩之、柳衛宏宣、医学物理の理工学(下巻)上坂充、中川恵一、金井達明、西尾禎治、共編養賢堂290(153-164) (2013).
- 2) Boron Compounds: New Candidates for Boron Carriers in BNCT H. Nakamura, M. Kirihata, **Neutron Capture Therapy -Principles and Applications** W. A. G. Sauerwein, A. Wittig, R. Moss, Y. Nakagawa Eds. 554(99-116) Springer, Heidelberg (2012).

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ホウ素10同位体を含むホウ素化合物を内封したリポソーム  
発明者: 中村浩之、立川将士  
権利者: 学習院大学  
種類: 特許  
番号: 特願2011-128379  
出願年月日: 2011年6月8日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 浩之 (NAKAMURA, Hiroyuki)  
東京工業大学・資源化学研究所・教授  
研究者番号: 30274434

(2) 研究分担者

佐藤 伸一 (SATO, Shinichi)  
東京工業大学・資源化学研究所・助教  
研究者番号: 20633134

(3) 連携研究者

鈴木 実 (SUZUKI, Minoru)  
京都大学原子炉実験所・教授  
研究者番号: 00319724  
潘 鉉承 (BAN, Hyun Seung)  
学習院大学・理学部・助教  
研究者番号: 60433710