

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500544

研究課題名(和文)細胞内動態制御による硼素中性子捕捉効果増強に関する研究

研究課題名(英文)Improvement of BNCT effect by control of intracellular distribution

研究代表者

長崎 健(Nagasaki, Takeshi)

大阪市立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30237507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メラノーマ細胞選択性を付与するためにコウジ酸構造を導入したホウ素クラスター化合物(CKA)の核内移行性の偶発の発見に基づき、メラノーマBNCT用薬剤としての評価を行った。CKAはメラノーマ選択的に取り込まれ、細胞内において核局在性を示すことを免疫染色により確認した。メラノーマ担がんマウスにCKA/HP- $\beta$ -CD複合体を腹腔内投与したところ、1時間後に高い腫瘍集積性を示した。実際に担がんマウスに投与1時間後に中性子照射を行ったところ、p-Boronophenylalanineと同等もしくはそれ以上の延命効果が見出され、核内集積性がBNCT効果に大きく寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Kojic acid possesses a whitening ability to melanocytes. This fact suggests that kojic acid could work as effective ligand for melanoma-targeting. We used kojic acid-carborane conjugate (CKA). Because CKA shows little water-solubility, various cyclodextrins were used as a solubilizer. As the inclusion complex of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) provided the highest concentration of CKA solution, herein, the CKA/HP- $\beta$ -CD complex was estimated as a boron carrier for melanoma-targeting BNCT. In B16BL6 cells, CKA was interestingly localized in the nucleus. When 1500 ppm of 10B solutions were used, average survival rate were 19 and 22 days with L-BPA/fructose and CKA/HP- $\beta$ -CD complex, respectively. Moreover, long survival rates (25 days) were observed with 4500 ppm of 10B solutions of CKA/HP- $\beta$ -CD complex. Kojic acid-appended carborane is promising to be an efficient boron agent toward melanoma BNCT.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 ホウ素クラスター 核局在性 抗がん性 ターゲティング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 京都大学は住友重機械工業(株)と共同で開発した電力によって熱中性子を発生させる加速器による BNCT の治験を計画し、動物実験を進めていた。小型簡素化され電力で熱中性子が調達できれば、病院内への加速器設置が可能となり、BNCT の普及が一気に進む。しかし、その治療を成功させるためには、ホウ素キャリアのがん細胞選択的そして高効率デリバリーシステムが必要不可欠であった。

(2) 熱中性子照射により発生する線および Li 核の飛程は 10 mm 以下であり、その染色体破壊能力を最大限発揮するためにはがん細胞内動態を核に集積させることが有効であると考えられるが、これまでホウ素化合物デリバリーにおいてそのような細胞内動態に着目した研究は皆無であった。

## 2. 研究の目的

本研究はこれまでにないホウ素クラスター高分子薬剤を合成し、それらの細胞内局在を制御し、細胞内動態と中性子捕捉反応による細胞障害性の相関に関する知見を得ることで、選択的かつ効率的 BNCT の開発へ貢献することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 当初は BSH 修飾ポリアミン水溶液を調製し、必要に応じて、ヒアルロン酸などのポリアニオンコーティングも行い腫瘍組織へ EPR 効果により集積を先ず目的とした、実際に、高分子型ホウ素薬剤の合成とコーティングによる腫瘍組織への集積および BNCT 処理による効率的な腫瘍増殖抑制効果を確認することに成功した。そして、この高分子型ホウ素薬剤に核内局在性システムのコンジュゲート化を進めるべく準備を行っていた。しかし、同時並行で進めていたリガンド修飾型ホウ素薬剤であるコウジ酸修飾カルボラン (CKA、図 1) の核内集積性を偶然に発見したことにより、CKA を用いた細胞内動態と BNCT 効果の相関性を検討することとなった。

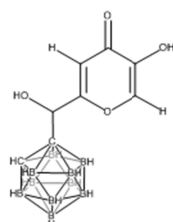


Fig.1 Compound of CKA

(2) 現在、臨床に用いられているホウ素薬剤には L-Boronophenylalanine (L-BPA) や Sodium borocaptate (BSH) などがあり、これらのホウ素薬剤には腫瘍集積性や腫瘍選択性などの問題が残されている。また、悪性黒色腫(メラノーマ)はメラノサイトががん化することによって生じるがんである。このメラノーマは予後の悪いがんとされており、進行すると外科手術や化学療法では治療困難とされている。そこで本研究では、従来、メラノサイトに対して特異的な親和性を有すると云われているコウジ酸をメラノーマに対するリガンドとして用いることでメラノーマ細胞に対する効率的なホウ素の集積を見込み、コウジ酸構造にホウ素クラスターであるカルボランを修飾した CKA を用いて BNCT 用ホウ素薬剤としての評価を行った。

(3) まず、難水溶性化合物である CKA を各種シクロデキストリン類を用いて水溶化を行った。得られた水溶液の細胞障害性評価を B16BL6 (マウスメラノーマ細胞), colOn26 (マウス大腸がん細胞), C2C12 (マウス筋芽細胞) に対して WST-8 法を用いて行った。メラノーマ選択的な取り込みがコウジ酸構造に依存することを示す為、コウジ酸構造をもたない o-カルボランとの取り込み比較と遊離コウジ酸による競合阻害実験を行った。CKA のカルボランを認識する抗体を用いた免疫染色によって細胞内動態を観察した。BNCT 治療効果を確認するためにまず、急性毒性試験を健常マウスに対して行った。次に腫瘍への集積性を確認するために、メラノーマモデルマウスに対して体内動態評価を行った。更に、メラノーマモデルマウスに対し、京都大学原子炉実験所にて中性子照射を行い、マウスの延命効果を確認した。

## 4. 研究成果

(1) CKA をヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HP-β-CD) を用いて水溶化を行うことで、最高で 9000 ppmB の高濃度溶液の調製に成功した。得られた水溶液の細胞障害性評価からメラノーマへの毒性が相対的には強いものの、いずれの細胞に対してもあまり細胞障害性を示すことはなく、低毒性であることが示された。

細胞内取り込み評価を行った。B16BL6において、細胞内取り込み量は最も高い値を示し CKA のメラノーマ選択性が示された。o-カルボランとの取り込み比較と遊離コウジ酸による競合阻害実験の結果より CKA の取り込みにコウジ酸構造が寄与することが示された。

(2) CKA のカルボランを認識する抗体を用いた免疫染色によって、CKA の核内局在性を確認した(図2)。この細胞内における蛍光強度は時間とともに強くなり、細胞死を起し細胞膜の消失した核で最も強い蛍光を示していたことから、細胞内に取り込まれ、核内に集積することで細胞毒性を示していることが示唆される。ブドウに含まれる植物フラボノイドの一種であるレスベラトロールが核内に移行することで DNA の二重らせん構造を安定化させるのに寄与している酵素中心に存在している銅(II)イオンをキレートすることで活性酸素種(ROS)を発生させることでアポトーシスを誘導することが報告されている。このコウジ酸も同じように銅(II)イオンをキレートすることが知られているため、同様の作用機序で細胞死を誘導していると考えられる。また、BNCT ではホウ素と中性子の間で起こる核反応によって細胞膜を破るにはエネルギーが不十分であるため、実際には核内に存在している DNA の二重らせん構造を効率的に二ヶ所切断することが求められている。そのため、CKA/HP-β-CD は DNA 近傍に存在するため、核反応によって生じる α線や Li 核などの粒子線の衝突確率を高めることができ、効率的なホウ素中性子捕捉療法の治療効果を得ることが可能であると考えられる。

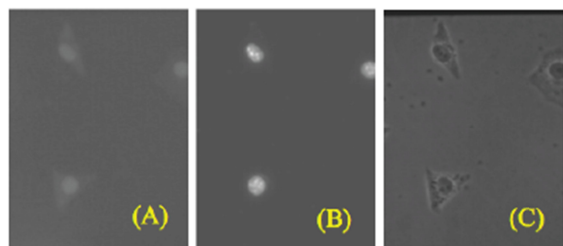


Fig. 2 Intracellular distribution of CKA/HP-β-CD in melanoma cells. Anti-BSH antibody were pretreated with Zenon Alexa Fluor 488 Mouse IgG1 Labeling Kit. CKA/HP-β-CD were co-incubated for an hour and cells were fixed with 4% PFA. After that, cells were treated with Triton-X100. A) Anti-BSH antibody; B) DAPI; C) Phase

(3) 投与直後には肝臓や腎臓などの代謝系に多

く集積しているものの、投与1時間後にはその大部分が代謝により体外へと排泄されている。これに対して、腫瘍組織は1時間後に最も多い集積を示しており、他臓器と比較しても半減期が長いことが分かる。また、腫瘍選択性を腫瘍組織と正常組織(筋肉組織)の比である T/N 比と腫瘍組織と血中濃度の比である T/B 比を求めると T/N 比は時間依存的に増大し、T/B 比は投与1時間後に最も高い値を示し、腫瘍選択性をもつことが示された。このことから、投与1時間後に中性子を照射することでホウ素濃度が最も高い時間に BNCT を行えるだけでなく、正常組織への損傷を最小限に抑えることが可能である。

(4) 体内動態の結果ホウ素の集積する極大時間が決定されたので、実際に投与1時間後に京都大学原子炉実験所(5 MW・ $4.5 \times 10^{12}$  neutron/cm<sup>2</sup>)中性子照射量にて、中性子を照射し、照射後のマウスのサバイバルにより BNCT 評価を行った。まず、治療効果の中性子照射量依存性を検討するために、CKA/HP-β-CD 投与群のマウスの中性子照射時間を半分・4分の1にした群と延命効果を比較した。すると、中性子照射時間依存的に延命効果が改善されていることが示された。また、中性子照射のみの群、CKA/HP-β-CD 投与し中性子を照射しない群では延命効果が得られていないことから、BNCT により延命効果が改善されていることが示された。それだけでなく、現在臨床に用いられている L-BPA と同程度あるいはそれ以上の延命効果を達成した(図3)。

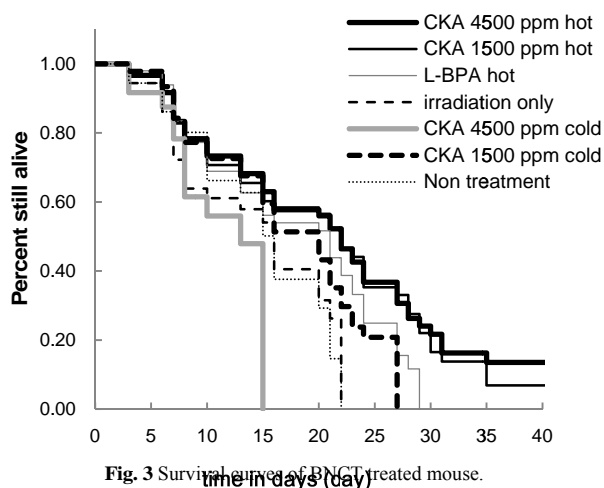


Fig. 3 Survival curves of BNCT treated mouse.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

R. Kawasaki, T. Nagasaki, J. Li, H. Azuma, S. Masunaga, Y. Sakurai, M. Kirihata, Y. Hattori, Mechanism involved in tumor tissue of colon 26 carcinoma-bearing mice irradiated with neutron in the presence of BSH-appended polyamine, KURRI Prog. Rep. 2012, , 2013, 259

富田恒之、長崎健、新規ホウ素含有ナノ粒子の開発と BNCT への応用、Isotope News、718 巻、2013、12-18

N. Dewia, H. Yanagie, H. Zhu, K. Demachi, A. Shinohara, K. Yokoyama, M. Sekino, Y. Sakurai, Y. Morishita, N. Iyomoto, T. Nagasaki, Y. Horiguchi, Y. Nagasaki, J. Nakajima, M. Suzuki, K. Ono, K. Kakimi, H. Takahashi, Tumor growth suppression by gadolinium-neutron capture therapy using gadolinium-entrapped liposome as gadolinium delivery agent, 査読有, Vol. 67, 2013, 451-457

DOI: 10.1016/j.biopha.2012.11.010

R. Kawasaki, T. Nagasaki, J. Li, Y. Zhu, H. Azuma, S. Masunaga, M. Kirihata, Y. Hattori, N. Kadono, Kojic acid-appended carborane/hydroxyl- propyl- $\beta$ -cyclodextrin complex for BNCT of murine melanoma, 査読無, KURRI Prog. Rep. 2011, 2012, 153

長崎 健、体内で放射線を発生させる新規放射線療法のための無機ホウ素クラスターマテリアル、未来材料、査読無、12 巻、2012、34-39

T. Kawazu, H. Kanzaki, A. Uno, H. Azuma, T. Nagasaki, HVJ-E/importin- $\beta$  hybrid vector for overcoming cytoplasmic and nuclear membranes as double barrier for non-viral gene delivery, Biomed. Biopharmacother., 査読有, Vol. 66, 2012, 519-524

DOI: 1 10.1016/j.biopha.2012.02.005

Y. Yamaguchi, N. Kato, H. Azuma, T. Nagasaki, J. Ohkanda, Protein recognition of hetero-/homoleptic ruthenium (II) tris(bipyridine)s for  $\alpha$ -chymotrypsin and cytochrome c, Bioorg. Med. Chem. Lett., 査読有, Vol. 22, 2012, 2354-2358

DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.12.087

T. Hashimoto, T. Kawazu, T. Nagasaki, A. Murakami, T. Yamaoka, Quantitative comparison between poly(L-arginine) and poly(L-lysine) at each step of polyplex-based gene transfection using a microinjection technique, Sci. Technol.

Adv. Mater., 査読有, Vol. 13, 2012, 015009

H. Azuma, Y. Aizawa, N. Higashitani, T. Tsumori, A. Kojima-Yuasa, I. Matsui-Yuasa, T. Nagasaki, Biological activity of water-soluble inclusion complexes of 1'-acetoxycyanoacetic acid with cyclodextrins, Bioorg. Med. Chem., 査読有, Vol. 19, 2011, 3855-3863

DOI: 10.1016/j.bmc.2011.04.038

M. Umano, K. Uechi, T. Uriuda, S. Murayama, H. Azuma, A. Shinohara, Y. Liu, K. Ono, M. Kirihata, H. Yanagie, T. Nagasaki, Tumor Accumulation of  $\epsilon$ -Poly-Lysines-Based Polyamines Conjugated with Boron Clusters, Appl. Radiat. Isot., 査読有, Vol. 69, 2011, 1765-1767

T. Kawazu, K. Hakamada, Y. Oda, J. Miyake, K. Maruyama, T. Nagasaki, Ultrasound-mediated Transfection with Liposomal Bubbles Delivers Plasmid DNA Directly into Nucleus, Chem. Lett., 査読有, Vol. 40, 2011, 298-299

T. Hamada, R. Sugimoto, T. Nagasaki, M. Takagi, Photochemical control of membrane raft organization, Soft Matter, 査読有, Vol. 7, 2011, 220-224

DOI: 10.1039/C0SM00797H

〔学会発表〕(計 30 件)

河崎 陸, 東 秀紀, 長崎 健, 小野 公二, 櫻井 良憲, 増永 慎一郎, 切畑 光統, メラノーム選択性ホウ素クラスター修飾コウジ酸の新規 BNCT 用薬剤としての評価, 日本化学会第 94 春季年会, 2014/3/26-29, 名古屋市名古屋大学東山キャンパス

T. Nagasaki, Stimuli-responsive drug delivery system: photoresponsive gene delivery system for gene therapy and boron delivery system for neutron capture therapy, 7th KIFEE International Symposium on Environment, Energy and Materials, 2014/3/16-19, Muromachi Campus, Doshisha University, Kyoto

河崎 陸, 小野 公二, 増永 慎一郎, 櫻井 良憲, 切畑 光統, 東 秀紀, 長崎 健, コウジ酸修飾カルボランでメラノーム選択的ホウ素中性子捕捉療法を実現する, 第 16 回生命化学研究会, 2014/1/9-10, 熱海市 KKR 熱海

T. Nagasaki, R. Kawasaki, Y. Hattori, Y. Sakurai,

K. Tanaka, S. Masunaga, K. Ono, M. Kirihata, Melanoma-targeted boron delivery by kojic acid-appended carborane/cyclodextrin complexes for BNCT of malignant melanoma, 日台三者学術交流会, 2013/12/13, 荣民総医院, 台北, 台湾

長崎 健, 河崎 陸, 服部能英, 櫻井良憲, 田中浩基, 増永慎一郎, 小野公二, 切畑光統, コウジ酸をリガンドとするメラノーマ BNCT 薬剤の開発に向けた基礎的検討, 平成 25 年度京都大学原子炉実験所専門研究会 研究炉及び加速器中性子源を用いた中性子捕捉療法の高高度化に関する研究会, 2013/12/10, 京大原子炉

T. Nagasaki, R. Kawasaki, K. Ono, S. Masunaga, Y. Sakurai, M. Kirihata, Carborane-Kojic Acid Conjugate for Melanoma-Targeting Boron Neutron Capture Therapy, 2013 MRS Fall Meeting & Exhibit, 2013/12/2, Hynes Convention Center, Boston, MA, USA

T. Nagasaki, Origin of double targeting concept is molecular machinery: photoresponsive gene carrier and boron carrier for BNCT, New Trends of Nano- or Bio-materials Design in Supramolecular 2013, 2013/9/20-21, Centennial Hall, School of Medicine, Kyushu University, Fukuoka

櫻本昌士, 河崎陸, 湯川寛子, 長崎健, 櫻井良憲, 田中浩基, 増永慎一郎, 小野公二, 切畑光統, ホウ素クラスター修飾架橋  $\epsilon$ -ポリリジンの高分子型ホウ素中性子捕捉療法薬剤への利用, 第 62 回高分子学会年次大会, 2013/5/29-31, 京都国際会館 京都市

河崎陸, 小野公二, 増永慎一郎, 櫻井良憲, 切畑光統, 東秀紀, 長崎健, コウジ酸修飾カルボラン/シクロデキストリン包接錯体の BNCT 用新規キャリアとしての評価, 第 10 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 2013/5/25-26, 和歌山大学システム工学部 和歌山市

山本大介, 李家イ, 鈴木利雄, 東秀紀, 長崎健, -1,3-グルカンを用いたコエンザイム Q10 の水溶化と細胞増殖促進効果, 日本化学会第 93 回春季年会, 2013/3/22-25, 立命館大学

草津市

要田涼太, 李家イ, 鈴木利雄, 東秀紀, 長崎健, -1,3-グルカンを用いたシコニンの水溶化と選択的細胞障害性, 日本化学会第 93 回春季年会, 2013/3/22-25, 立命館大学 草津市

櫻本昌士, 河崎陸, 湯川寛子, 増永慎一郎, 小野公二, 櫻井良憲, 切畑光統, 東秀紀, 長崎健, BSH 修飾架橋  $\epsilon$ -ポリリジンの高分子型ホウ素中性子捕捉療法薬剤としての評価, 日本化学会第 93 回春季年会, 2013/3/22-25, 立命館大学 草津市

湯川寛子, 河崎陸, 櫻本昌士, 増永慎一郎, 小野公二, 櫻井良憲, 切畑光統, 東秀紀, 長崎健, ホウ素中性子捕捉療法用新規薬剤としてのホウ素含有希土類金属酸化物の評価, 日本化学会第 93 回春季年会, 2013/3/22-25, 立命館大学 草津市

李家イ, 鹿子嶋祐太, 鈴木利雄, 東秀紀, 長崎健, 1'-Acetoxychavicol acetate/ $\beta$ -1,3-グルカン複合体の接触皮膚炎に対する抗炎症効果, 日本化学会第 93 回春季年会, 2013/3/22-25, 立命館大学 草津市

長崎健, グルカンによる難水溶性薬剤の免疫担当細胞へのデリバリー, シコニン研究会, 2013/3/15, 神戸市

長崎健, 生物産生多糖の医療用マテリアルとしての可能性, 産学官金連携セミナー, 2013/1/22, 大阪市工業研究所 大阪市

T. Nagasaki, T. Kawazu, K. Hakamada, Y. Oda, J. Miyake, K. Maruyama, Evaluation of Importance of Nuclear Import in Artificial Viral Gene Delivery Using Programmable Cellular Image Trace, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry, 2012/11/28-30, TITECH, Tokyo

長崎健, 河崎 陸, 櫻井良憲, 田中浩基, 増永慎一郎, 小野公二, 切畑光統, メラノーマ選択性コウジ酸修飾カルボランのホウ素中性子捕捉療法用新規キャリアとしての評価, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012/11/26-27, 仙台国際センター

李家イ, 東秀紀, 平本恵一, 笠原恵美子, 長崎健, 1'-Acetoxychavicol acetate/ $\beta$ -1,3-グルカ

ン複合体の接触皮膚炎に対する抗炎症効果、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012/11/26-27, 仙台国際センター  
長崎健, 川津猛, 袴田和巳, 三宅淳, 小田雄介, 丸山一雄, 非ウイルス性遺伝子デリバリーにおける核膜律速の直接的観察法, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 2012/9/24-26, 仙台市民会館

- ⑲ 飯塚達也, 池田篤志, 菊地純一, 鈴木利雄, 長崎健, 多糖により水溶化したフラレン誘導体の光線力学活性の評価, 第 61 回高分子討論会, 2012/9/19-21, 名古屋工業大
- ⑳ 河崎 陸, 櫻井良憲, 田中浩基, 増永慎一郎, 小野公二, 切畑光統, 長崎健, コウジ酸修飾  $\alpha$ -カルボラン/シクロデキストリ包接体のホウ素中性子捕捉療法用薬剤としての評価, 第 61 回高分子討論会, 2012/9/19-21, 名古屋工業大
- 他 8 件

〔図書〕(計 1 件)

長崎 健, 化学同人, ひらく、ひらく「バイオの世界」14 歳からの生物工学入門, 2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ホウ素中性子捕捉療法用組成物およびその製造方法

発明者: 長崎 健、富田恒之  
権利者: 大阪市立大学、東海大学  
種類: 特許

番号: 特願 2013-44160

出願年月日: 2013/3/6

国内外の別: 国内

取得状況 (計 3 件)

名称: -1,3-グルカン/カルボラン複合体  
発明者: 新海征治、為末真吾、広瀬良治、櫻井和朗、長崎 健、沼田宗典  
権利者: JST  
種類: 特許  
番号: 特許第 5159125 号  
取得年月日: 2012/12/21  
国内外の別: 国内

名称: 核酸複合体及びそれを用いる細胞内への核酸導入方法

発明者: 長崎 健、新海征治、宇野篤、西田守  
権利者: チッソ、長崎健

種類: 特許

番号: 特許第 4989039 号

取得年月日: 2012/5/11

国内外の別: 国内

名称: シトクロム c 捕捉型アポトーシス抑制剤

発明者: 長崎 健、東秀紀、築部浩、篠田哲史  
権利者: JST

種類: 特許

番号: 特許第 4767295 号

取得年月日: 2011/6/24

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/bfc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長崎 健 (NAGASAKI, Takeshi)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 3 0 2 3 7 5 0 7

(2) 研究分担者

高橋 雅也 (TAKAHASHI, Masaya)

大阪市立工業研究所・電子材料研究部・研究員

研究者番号: 9 0 4 1 6 3 6 3

(3) 研究連携者

増永 慎一郎 (MASUNAGA, Shin-ichiro)

京都大学・原子炉実験所・教授

研究者番号: 8 0 2 3 8 9 1 4

(4) 研究連携者

東 秀紀 (AZUMA, Hideki)

大阪市立大学・大学院工学研究科・講師  
研究者番号: 8 0 3 1 1 9 1 8