

## 中性子捕捉療法のための新しいホウ素薬剤の開発 —血清アルブミンホウ素キャリア—



中村 浩之

Nakamura Hiroyuki

(東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所)

### 1 中性子捕捉療法とは

「一億総活躍社会の実現」を掲げる我が国では、低侵襲治療法の開発は、国民の社会あるいは日常生活への速やかな復帰や、健康で充実した質の高い生活を送るためだけでなく、また医療費の抑制のために大きな貢献をもたらすと期待される。中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy: BNCT) は、患者にホウ素薬剤を投与し、患部を中性子ビーム孔に数十分間かざすだけで治療が終わることから、患者への負担が非常に少ないがんの低侵襲治療法の1つとして注目されている。BNCTで用いる熱・熱外中性子は0.025 eVと非常に低エネルギーであるが、がん細胞内に取り込まれたホウ素<sup>10</sup>Bと核反応を起こすことによりLi核やHe核(α粒子)などの粒子線を生じる。これらの粒子線のエネルギーはおよそ2.4 MeVと非常に高いだけでなく、飛程が5-9 μmとおよそ1つの細胞内に収まることから、BNCTはがん細胞選択的な放射線治療が可能であり、通常の放射線療法に比べ、正常組織へのダメージが極めて低い治療法と期待されている(図1)。

BNCTでは、これまで2つの薬剤が臨床研究に用いられてきた(図2(A))。BSH(mercaptoundecahydrododecaborate)と呼ばれるホウ素薬剤は、分子内に12個のホウ素原子を含む20面体の特異な化学構造を持つ、非常に低毒性であるホウ素イオンクラスターである。1968年に帝京大学の畠中亘らは、こ

のBSHを用いて世界で初めて脳腫瘍のBNCTに成功した<sup>1)</sup>。健全な脳には血液脳関門現象があり、血液中の水溶性物質は正常な脳組織には取り込まれにくい。脳腫瘍はこの血液脳関門が破断している。BSHは、それ自身はがん細胞に対する選択性は低いが、この破断した血液脳関門から脳組織内に取り込まれると考えられている。畠中らの成功以来、日本はこの分野をリードしてきており、現在まで脳腫瘍の治療実績は250症例を超えている。悪性度の高い膠芽細胞腫(glioblastoma)では2年生存率がおよそ40%、5年生存率ではおよそ20%であるが、比較的悪性度の低い星状細胞腫(astrocytoma)では、5年生存率はおおよそ60%と、標準的な治療の~15%に比べBNCT治療効果は優れているといえる。

BPA(p-boronophenylalanine)と呼ばれるホウ素薬

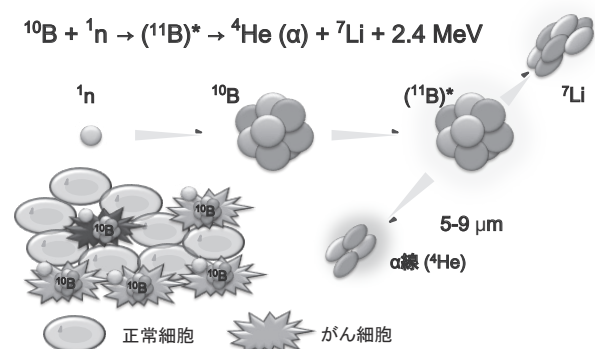


図1 中性子捕捉療法 (BNCT) の概略

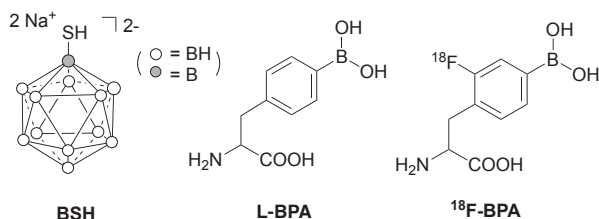
剤は、1958年に Snyder らによってチロシンの類縁体として合成された化合物であるが、1987年、神戸大学の三島豊らはこのラセミ体の BPA を用いて悪性黒色腫 (melanoma) の BNCT に成功した<sup>2)</sup>。その後、L 体の方が melanoma 細胞によく集積することが明らかとなり、現在では L-BPA が臨床に用いられている。現在まで悪性黒色腫の治療実績はおよそ 30 症例で 5 年生存率は 60% を超えており、非常に治療効果が高い。melanoma 細胞はメラニン色素の生合成が活性化されていることから、その原料であるチロシンの類縁体である BPA も取り込むであろうと考えられたわけだが、BPA はこの取り込み機構以外にもアミノ酸トランスポーター (LAT-1) を介して取り込まれることが分かってきた。実際に、石渡らによって開発された <sup>18</sup>F-BPA を用いた PET 診断により、あ

らかじめ BPA に感受性の高い患者を選択し治療計画を立てることができるようになっただけでなく、LAT-1 が活性化されている脳腫瘍や頭頸部癌など他のがんへの適応拡大が検討されるようになった。その結果、2001 年には大阪大学の加藤逸郎並びに京都大学の小野公二らのグループは、BSH と BPA の両剤を併用することで、世界で初めて頭頸部癌の BNCT に成功し<sup>3)</sup>、これを機に肝臓癌や中皮腫など適応疾患拡大へと臨床研究が展開している<sup>4-6)</sup>。

## 2 小型加速器中性子源による治験の開始

BNCT における大きなパラダイムシフトは、2010 年に住友重機械工業(株)と京都大学によって世界で初めて開発に成功した BNCT 用小型加速器中性子源である (図 3)。BNCT は、これまで必要とする熱中性子を原子炉から得ていたことから、燃料や設置の制限が問題点であったが、開発された BNCT 用小型加速器中性子源は病院内に設置できるため、都市部でも治療を受けられる可能性が出てきた。京都大学原子炉実験所に設置された BNCT 用小型加速器中性子源を用いて、2012 年から BPA の脳腫瘍並びに頭頸部癌を対象とした加速器 BNCT の第 1 相臨床試験が開始され、更に総合南東北病院に設置された国産第 2 機となる BNCT 用小型加速器中性子源を用いて、2016 年 2 月から第 2 相臨床試験が進められている。2017 年 2 月には厚生労働省の先駆けパッケージ戦略の 1 つに指定され、世界に先駆けて一般的放射線治療法の 1 つとして医療認可を目指している。

(A) 臨床に用いられてきたホウ素薬剤



(B) 本研究で開発したホウ素薬剤: MID

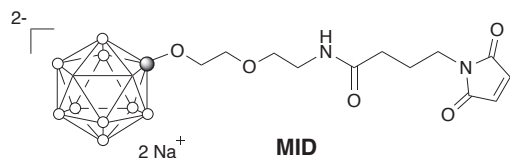


図 2 BNCT に用いられてきたホウ素薬剤と筆者らが開発した MID の化学構造式

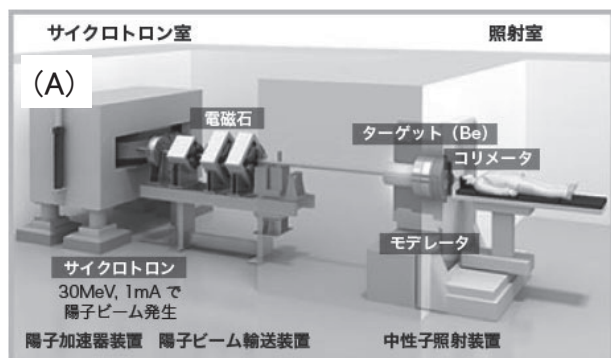


図 3 世界初の病院併設型 BNCT 治療施設。(A) 中性子源概略図と (B) 実際の照射治療室

(一般財団法人 脳神経疾患研究所 附属 南東北 BNCT 研究センターホームページより転載許諾済)

### 3 新しいホウ素薬剤—アルブミンホウ素キャリアの分子設計

先にも述べたように BPA は、アミノ酸トランスポーターである LAT-1 を介して取り込まれることから、LAT-1 ネガティブながんには BPA による BNCT の適応が困難である。実際に、BNCT 対象患者の中で、BPA が適応できる患者は 60% 程度といわれている。そこで、BPA 非感受性がん患者に対する BNCT 適応疾患拡大のためにも、新しいホウ素薬剤の開発が急務である。

さて、血清アルブミンは、健常人の血液中には 40-50 g/L 含まれており、血中の脂質や薬剤を運ぶタンパク質であることから、これまでドラッグデリバリーシステムのキャリアとして注目され研究されてきた。1986 年、松村保広・前田浩によって染色した血清アルブミンが腫瘍組織に集積する現象が報告され<sup>7)</sup>、腫瘍血管の不完全な構造による漏出と腫瘍組織におけるリンパ管回収系の未発達によりナノ粒子が腫瘍組織に集積すること (EPR 効果) が明らかとなった。以来、血清アルブミンに抗がん剤を結合させた薬剤開発が精力的に行われ、我が国では血清アルブミンにパクリタキセルを結合させた「Abraxane」が、転移性乳癌 (2010 年)、難治性がんである再発胃癌や進行性非小細胞肺癌 (2013 年) の治療薬として認可されている。また、血清アルブミンは脳腫瘍にも取り込まれることから、脳腫瘍の外科手術ナビゲーション治療用に、蛍光ラベル化アルブミン薬剤が臨床試験中である。

筆者らは、以前ホウ素脂質の開発に成功し、この脂質を用いたホウ素リポソームの開発に成功してきた<sup>8)</sup>。リポソームを用いたホウ素デリバリーシステムは、先にも述べた EPR 効果を利用するものであり、実際に大腸癌 (Colon26) 細胞皮下移植マウスに対して、高い BNCT 治療効果を見出している<sup>9)</sup>。本研究では、血清アルブミンの腫瘍組織集積性に着目し、血清アルブミンホウ素キャリアの開発に着手した。血清アルブミンは、分子内に 35 個のシステイン (Cys) を持つが、そのうち 34 個のシステインはジスルフィド結合を形成しており、Cys34 残基のみフリーの SH 基を有する。マレイミドは生理条件下でシステインの SH 基に選択的に結合することが知られている。そこで、筆者らはマレイミドを分子内に持つクロソドデカボレート (maleimide-

functionalized *closo*-dodecaborate (MID) : 図 2 (B)) を分子設計した。本稿では、筆者らが分子設計並びに合成に成功した MID と血清アルブミンの複合体によるホウ素デリバリーシステムに関して紹介する<sup>10)</sup>。

### 4 MID の予想外な反応性の発見

入手容易な 20 面体の 2 価ホウ素陰イオンクラスター *closo*-dodecaborate のテトラブチルアンモニウム (TBA) 塩から 5 段階で有機合成した MID のナトリウム塩を中性条件下 (PBS buffer; pH 7.4)、牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) に対し反応さ、BSA-MID 複合体の生成を、抗 BSH 抗体を用いたウェスタンブロット法にて解析した結果、濃度依存的に MID が BSA に結合していることが分かった。更に興味深いことにシステインの SH 基ブロッキング剤で処理した BSA に対して MID は結合するのに対し、リジンの NH<sub>2</sub> 基のブロッキング剤で処理した BSA では、MID の結合が抑制された。このことから、MID はリジン残基にも結合していることが示唆された。通常、リジンのアミノ基は生理的条件下では、プロトン化されており、マレイミドに対して求核性を持たないが、MID は分子内に二価の陰イオンを持つため、リジンのプロトン化されたアミノ基からプロトンを奪うことによって求核性が現れ、MID のマレイミド基と反応したと考えている。

### 5 がん移植マウスにおける MID-BSA の体内分布

マウス大腸癌細胞 (colon26) を移植したマウスを用いて、MID-BSA の時間依存的な体内分布を調べた。MID-BSA の投与量が 3-30 mg[B]/kg となるように、生理食塩水に溶解し尾静脈より注射した。投与後、1-48 時間において、血液、腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓をそれぞれ摘出し、硝酸中で灰化させ、それぞれの組織に集積したホウ素濃度を ICP-OES (Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry) を用いて測定した。比較対象として、MID 並びに BSH をそれぞれ 30 mg[B]/kg 投与した。その結果を図 4 に示す。MID-BSA の各臓器の集積濃度は、投与量に高く依存した。30 mg[B]/kg 投与



量で比較した場合、BSHは血液濃度が速やかに低下するのに対し、MIDはMID-BSAと同程度の時間依存的な血中濃度を示した。また、興味深いことに、MID-BSAを30 mg[B]/kg投与量で投与した場合、腫瘍内ホウ素濃度が12時間後には62 ppmと非常に高い濃度で集積する一方で、肝臓、腎臓、脾臓への集積は腫瘍よりも低く抑えられた。以前、筆者らが開発したBSH内封リポソーム薬剤では、腎臓や脾臓への集積が腫瘍よりも数倍高い値が得られていたことから<sup>3)</sup>、MID-BSAが高いEPR効果を持つだけでなく、リポソーム製剤よりも生体適合性が高く細網内皮系から回避されることで、腫瘍選択性が向上していることが示唆された。結果として、MID-BSAの投与量を抑えることへと繋がり、15 mg[B]/kgで投与した場合でも、腫瘍内ホウ素濃度が38 ppmとBNCT高腫瘍効果が得られるのに十分なホウ素濃度30 ppm以上の値を得ることができた。更に、興味深いことに、BSHは時間依存的に腫瘍内から排泄されるのに対し、MID単体を投与した場合においても、投与12時間後にMID-SAと同様に腫瘍内ホ

ウ素濃度が最大となった。このことは、尾静脈より注射されたMIDが血中を滞留する間に血中のアルブミンと反応し、その結果血中でMID-SA複合体が形成され、このMID-SAがEPR効果により腫瘍内に集積したと考えられる。実際に、MIDをマウス血液に1時間暴露した後、その血液を、抗BSH抗体を用いてウェスタンブロットにより解析したところ、およそ血清アルブミンの分子量(60 kDa)付近にバンドが見られたことから、MIDが血液中で血清アルブミンと結合することが分かった。この結果は、治療前にあらかじめ患者から採取した血液に、MIDを作用させることで患者自身の血清アルブミンと複合体を形成させ、再び同患者に投与することが可能となることから、血液製剤における安全性の問題に関しても、回避することができると考えられる。

## 6 In vivo 抗腫瘍効果

がん移植マウスにおける体内分布測定実験におい

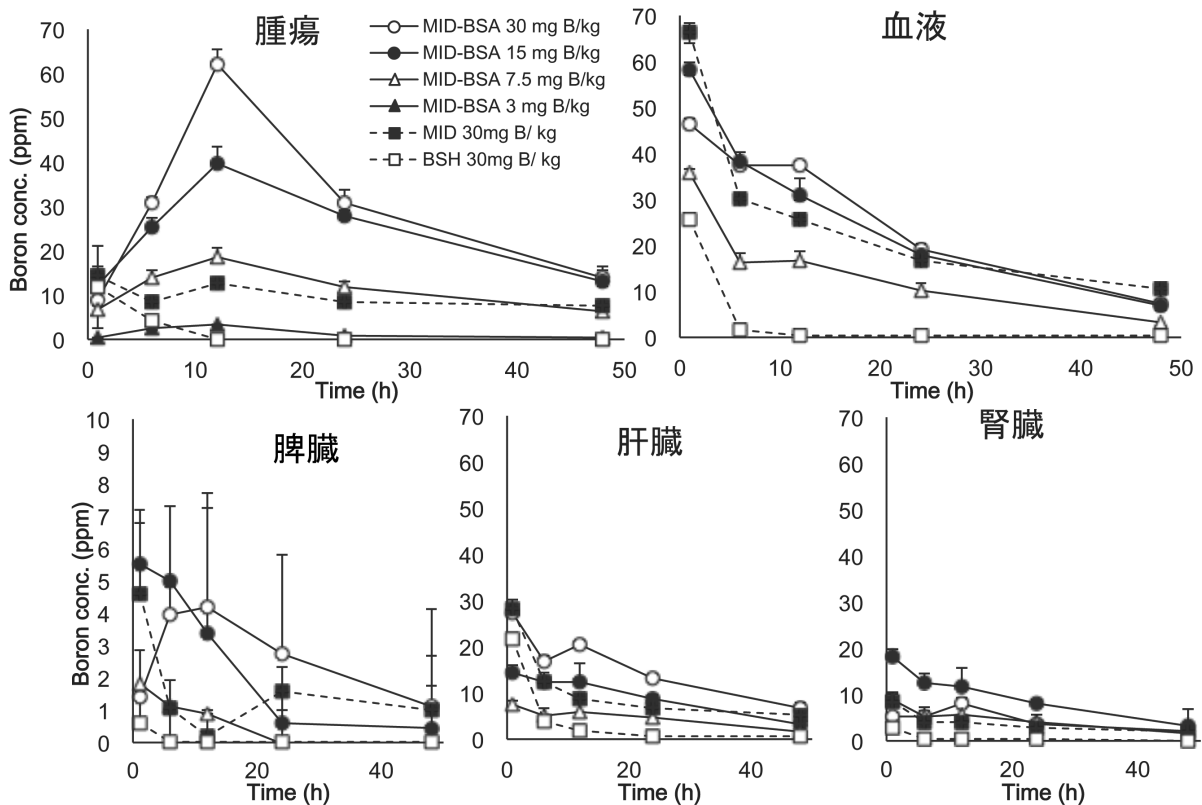


図4 がん移植マウス内の各臓器におけるホウ素濃度分布

て、MID-BSA が腫瘍内に必要とされるホウ素集積量が十分に得られたことから、次に中性子照射による BNCT 抗腫瘍効果に関して調べた。京都大学原子炉実験所において、PBS バッファーに溶解させた MID-BSA を colon 26 を左太腿に移植した Balb/c マウスに対して尾静脈より注射し、12 時間後熱中性子線を 50 分照射した ( $1.3\text{-}2.2 \times 10^{12}$  neutrons/cm<sup>2</sup>)。照射後、4 週間腫瘍の大きさを観察した。図 5 は腫瘍の経時的体積変化を示しているが、熱中性子のみを照射した群 (●) では、マウスの腫瘍は日数と共に増大したのに対し、MID-BSA を投与し熱中性子を照射した群では、ホウ素投与量が 15 mg[B]/kg (○) 並びに 30 mg[B]/kg (□) いずれの場合も、照射後 1 週間頃から腫瘍の増殖抑制が見られ、2 週間後には腫瘍の萎縮が見られた。更に興味深いことに、ホウ素投与量が 7.5 mg[B]/kg のマウス群 (△) では、腫瘍内ホウ素濃度が 20 ppm であったにもかかわらず、非常に高い BNCT 抗腫瘍効果が得られており、17 日後には腫瘍の消失が観察された。このことから、MID-BSA は EPR 効果によって腫瘍血管から腫瘍組織に移行した後、腫瘍内に効率よく取り込まれていることが示唆された。また、MID-BSA は血中ホウ素濃度が比較的高いにもかかわらず、熱中性子照射周辺部位において血管損傷等による有害事象は観察されなかった。筆者らの BSH 内封リポソームによる照射実験においても、こういった有害事象は観察されていない。通常、臨床に用いられてきた BSH や BPA

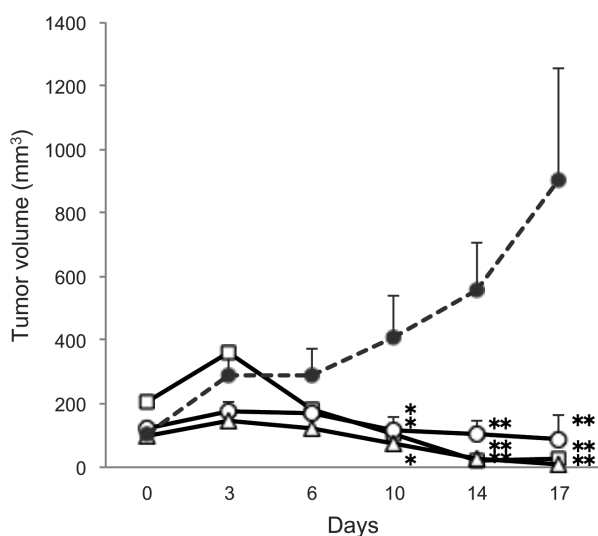


図 5 MID-BSA を投与したがん移植マウスの BNCT 抗腫瘍効果

では、血管損傷等の点から腫瘍 / 血液のホウ素濃度比 3 以上とされているが、おそらく、BSH 内封リポソームも MID-BSA も血中滞留中では、赤血球や白血球などの血液成分や血管壁にほとんど接触しておらず、そのためこういった有害事象が最小限に止まったのではないかと推測している。また、肝臓や腎臓にも MID-BSA の集積が観察されたが、MID の毒性は非常に低いため (IC<sub>50</sub> > 1 mM) 熱中性子が照射されない限り、細胞毒性は示さない。更に、各臓器におけるホウ素濃度が時間と共に低下しており、48 時間後にはいずれの臓器からも排泄されていることから、MID-BSA は安全性の高いホウ素薬剤であると考えられる。

## 7 今後の展望

本稿で述べたホウ素クラスター結合マレイミド (MID) は、BSH と同様に水溶性が高く、また細胞毒性が低い新しいホウ素薬剤である。MID はタンパク質のシステイン残基の SH 基だけでなく、リジン残基にも結合することから、血清アルブミンなどのタンパク質に対し、多くのホウ素クラスターを生理条件下で導入することが可能である。MID を結合させた血清アルブミンはリポソーム製剤とは異なり、皮下腫瘍移植マウスにおいて腫瘍内に非常に高濃度で集積する一方で、脾臓、肝臓、腎臓などの臓器への集積は非常に低く、熱中性子照射による BNCT 抗腫瘍効果では、この MID-血清アルブミン複合体を 7.5 mg[B]/kg で投与した場合においても、高い BNCT 抗腫瘍効果が得られ、熱中性子照射後 2 週間において、腫瘍の消失が観察された。MID は、血中の血清アルブミンとも速やかに反応して複合体を形成することから、患者の血液をあらかじめ採取し MID を結合させてから投与することができ、安全な血液製剤として用いることができる。今後は、BPA に感受性の低いがん細胞に対して、MID-血清アルブミン複合体の有効性を検証していくことで、BNCT の適応疾患拡大へと繋げていきたいと考えている。

## 【謝辞】

本研究は、科学研究費 (B) 並びにテルモ財団の助成を受けて遂行したものである。本研究を進める

にあたり、日夜実験に励んでくれた加納大輔君、菊地俊介君、石井里武君、佐藤伸一助教に感謝する。また、熱中性子照射実験に協力いただいた京都大学原子炉実験所・鈴木実教授、櫻井良憲准教授、そして、抗 BSH 抗体を分与いただいた大阪府立大学・切畑光統教授に心より感謝する。

## 参考文献

---

1) Hatanaka, H., *J. Neurol.*, **209**, 81 (1975)

- 2) Mishima, Y., *et al.*, *Lancet.*, **2**, 388 (1989)
- 3) Kato, I., *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, **61**, 1069 (2004)
- 4) Aihara, T., *et al.*, *Head Neck.*, **28**, 850 (2006)
- 5) Suzuki, M., *et al.*, *Radiother. Oncol.*, **88**, 192 (2008)
- 6) Zonta, A., *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, **67**, S67 (2009)
- 7) Matsumura, Y., *et al.*, *Cancer Res.*, **46**, 6387 (1986)
- 8) Koganei, H., *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, **24**, 124 (2013)
- 9) Tachikawa, S., *et al.*, *Chem. Commun.*, **50**, 12325 (2014)
- 10) Kikuchi, S., *et al.*, *J. Control. Release*, **237**, 160 (2016)