

した照射実験により、トランスフェリン修飾ホウ素脂質ナノカプセルを用いた新規 DDS による治療効果を明らかにしていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Impact of accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) on the treatment of multiple liver tumors and malignant pleural mesothelioma. Suzuki M, Tanaka H, Sakurai Y, Kashino G, Yong L, Masunaga S, Kinashi Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Sato T, Maruhashi A, Ono K. *Radiother Oncol*. In press
- 2) Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas. Miyatake SI, Kawabata S, Yokoyama K, Kuroiwa T, Michiue H, Sakurai Y, Kumada H, Suzuki M, Maruhashi A, Kirihata M, Ono K. *J Neurooncol*. 2009;91:199-206.
- 3) Treatment results of boron neutron capture therapy using intra-arterial administration of boron compounds for recurrent head and neck cancer. Fuwa N, Suzuki M, Sakurai Y, Nagata K, Kinashi Y, Masunaga S, Maruhashi A, Imahori Y, Kodaira T, Tachibana H, Nakamura T, Ono K. *Br J Radiol*. 2008;81:749-52.
- 4) A novel concept of treatment of diffuse or multiple pleural tumors by boron neutron capture therapy (BNCT). Suzuki M, Endo K, Satoh H, Sakurai Y, Kumada H, Kimura H, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhashi A, Ono K. *Radiother Oncol*. 2008;88:192-195.

2. 学会発表

- 1) 肺腫瘍、肝腫瘍の現在地. 鈴木 実、第5回日本中性子捕捉療法学会学術大会、教育講演、倉敷、2008年7月25-26日
- 2) 悪性胸膜中皮腫に対する硼素中性子捕捉療法 (BNCT) : 加速器 BNCT と原子炉 BNCT の比較. 鈴木 実、田中浩基、櫻井良憲、劉勇、菓子野元郎、木梨友子、増永慎一郎、丸橋 晃、小野公二、日本放射線腫瘍学会第21回学術大会、札幌、2008年10月16-18日
- 3) IGRT 時代における硼素中性子捕捉療法 (BNCT) の役割 (シンポジウム 癌の粒子線治療・各療法の特徴とその将来を展望する). 鈴木 実、菓子野元郎、劉勇、木梨友子、増永慎一郎、田中浩基、櫻井良憲、丸橋 晃、小野公二、第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月28-30日
- 4) Boron neutron capture therapy (BNCT) for diffuse or multiple pleural tumors: Case reports of two cases. Suzuki M, Endo K, Satoh H, Sakurai Y, Kumada H, Kimura H, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhashi A, Ono K. 13th International Congress on Neutron Capture Therapy, Florence (イタリア)、2008年11月2-7日
- 5) IGRT, IGRT era における BNCT-加速器中性子源開発後の先に描く将来展望. 鈴木 実、第105回関西 Cancer therapist の会、教育講演、大阪、2008年12月3日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出 版 地	出版年	ペー ジ
中村浩之	中性子捕捉治療に向けた ホウ素ナノキャリア設計.	岡田弘晃	機能性DDSキャ リアの製剤設計	シーエムシ ー出版	東京	2008	279- 288

2. 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Nakamura, M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, K. Tsuruta, Y. Kaneda, A. Matsumura	Development of Boron Nano Capsules for Neutron Capture Therapy.	Appl. Radiat. Isotope			2009 印刷中
中村浩之	がん中性子捕捉療法と次世代ホウ素デリバリーシステム.	臨床血液	49(5)	294-301	2008
H. Nakamura, J.-D. Lee, M. Ueno, Y. Miyajima, H. S. Ban	Synthesis of <i>closo</i> -Dodecaboryl Lipids and their Liposomal Formation for Boron Neutron Capture Therapy.	NanoBiotechnology (invited)	3(2)	135-145	2008
H. Nakamura	Development of Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy of Cancer.	Progress in Drug Delivery System XVII		19-24	2008
H. Nakamura	Liposomal Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy.	YAKUGAKU ZASSHI	128	193-208	2008
C.-H. Lee, G. F. Jin, J. H. Yoon, Y. J. Jung, J.-D. Lee, S. Cho, H. Nakamura, S. O. Kang	Synthesis and Characterization of Polar Functional Group Substituted Mono- and Bis-(<i>o</i> -carboranyl)- 1, 3,5-triazine Derivatives.	Tetrahedron Lett.	49(1)	159-164	2008
Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Aburahi K, Kawatobi S, Tsubouchi T, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Okuno H, Matsumura A	Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT.	Proc. 13th International Congress on Neutron Capture Therapy "A new option against cancer"		212-214	2008

Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Aburahi K, Kawatobi S, Tsurubuchi T, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Okuno H, Matsumura A	Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT.	Applied Radiation and Isotope			2009 印刷中
Yamamoto T, Nakai K, Matsumura A	Boron neutron capture therapy for glioblastoma.	Cancer letters	262	143-52	2008
Yoshida F, Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Shibata Y, Tsuruta W, Endo K, Tsurubuchi T, Matsumura A	Combined use of sodium borocaptate and buthionine sulfoximine in boron neutron capture therapy enhanced tissue boron uptake and delayed tumor growth in a rat subcutaneous tumor model.	Cancer letters	263	253-8	2008
Suzuki M, Tanaka H, Sakurai Y, Kashino G, Yong L, Masunaga S, Kinashi Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsumutsui H, Sato T, Maruhashi A, Ono K	Impact of accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) on the treatment of multiple liver tumors and malignant pleural mesothelioma.	Radiother Oncol			2009 印刷中
Miyatake SI, Kawabata S, Yokoyama K, Kuroiwa T, Michiue H, Sakurai Y, Kumada H, Suzuki M, Maruhashi A, Kirihata M, Ono K	Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas.	J Neurooncol.	91	199-206	2009
Fuwa N, Suzuki M, Sakurai Y, Nagata K, Kinashi Y, Masunaga S, Maruhashi A, Imahori Y, Kodaira T, Tachibana H, Nakamura T, Ono K	Treatment results of boron neutron capture therapy using intra-arterial administration of boron compounds for recurrent head and neck cancer.	Br J Radiol.	81	749-52.	2008
Suzuki M, Endo K, Sakatoh H, Sakurai Y, Kumada H, Kimura H, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhashi A, Ono K.	A novel concept of treatment of diffuse or multiple pleural tumors by boron neutron capture therapy (BNCT).	Radiother Oncol.	88	192-195	2008
Basappa, S. Murugan, K. Sugahara, C.M. Lee, G.B. Dam, T.H. Kuppevel, M. Miyasaka, S. Yamada, K. Sugahara	Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells	Glycobiology			2009 印刷中

Y. Fumimoto, A. Matsuyama, H. Komoda, H. Okura, C.M. Lee, A. Nagao, T. Nishida, T. Ito, Y. Sawa	Creation of a rich subcutaneous vascular network with implanted adipose tissue-derived stromal cells and adipose tissue enhances subcutaneous grafting of islets in diabetic mice.	Tissue Engineering			2009 印刷中
Y. Tomimaru, Y. Takeda, S. Kobayashi, S. Marubashi, C. M. Lee, M. Tanemura, H. Nagano, T. Kitagawa, K. Dono, K. Umeshita, K. Wakasa, M. Monden	Comparison of Postoperative Morphological Changes in Remnant Pancreas Between Pancreaticojejunostomy and Pancreaticogastrotomy After Pancreaticoduodenectomy	Pancreas	38	203-207	2009

厚生労働省科学科研費補助金

医療機器開発推進研究事業

：ナノメディシン研究

「研究成果の刊行に関する一覧表」

に記入した書籍等の別刷

研究課題：ホウ素ナノデバイス型中性子
捕捉治療

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 浩之

平成21（2009）年4月

ファインケミカルシリーズ

機能性DDSキャリアの製剤設計

Drug delivery using functional DDS carriers

監修：岡田弘晃

Supervisor : Hiroaki Okada

HIGH TECHNOLOGY
INFORMATION

シーエムシー出版

10 中性子捕捉治療に向けたホウ素ナノキャリア設計

10.1 はじめに

中村浩之*

低エネルギーの熱中性子はエネルギーの高い高速中性子とは異なり、人体には無害である。しかしながら熱中性子とホウ素-10との反応は、リチウムとヘリウム (α 線) を生じ、これらのエネルギーは2.79 MeVとおよそ細胞1つを殺傷するのに十分である(式1)。また、それらの粒子の飛程は細胞1つの直径(5~9 μm)であることから、予めホウ素分子をがん細胞にのみ選択的に取り込ませそこへ中性子照射を行えば、がん細胞のみを選択的に破壊することができる(図1)。これを利用するのがホウ素中性子捕捉療法(BNCT: boron neutron capture therapy)であり、次世代型細胞選択的放射線療法として注目されている^{1,2)}。



BNCTの概念は、1936年にLocherによって最初に提唱された³⁾。そして、1968年に帝京大学の(故) 島中らは図2に示すように分子内に12個のホウ素原子を含む20面体の特異な構造を有する水溶性ホウ素イオンクラスターであるBSH (mercaptoundecahydrododecaborate) を用いて世界で初めて脳腫瘍のBNCTに成功した⁴⁾。島中らの成功以来、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症例を越えている。一方、1987年神戸大学の三島らはア

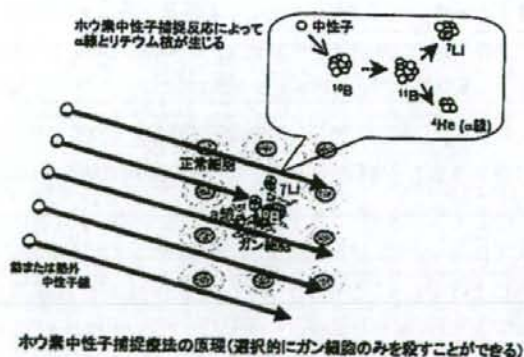


図1 ホウ素中性子捕捉療法の原理
(FFAG-DDS研究機構より転写許可済み)

* Hiroyuki Nakamura 学習院大学 理学部 教授

機能性DDSキャリアの製剤設計

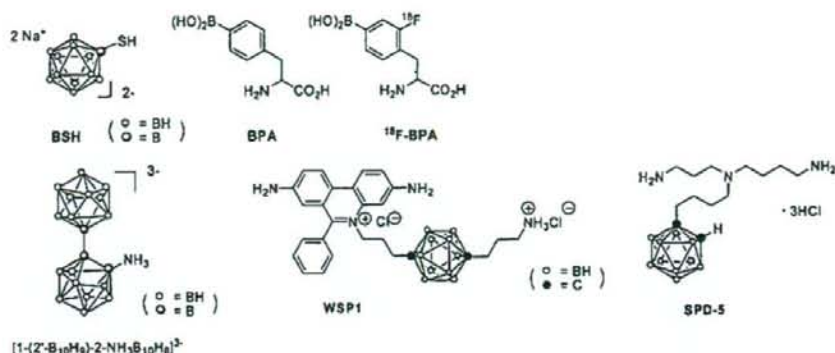


図2 様々なホウ素化合物

ミノ酸誘導体であるBPA (*p*-boronophenylalanine) を用いて悪性黒色腫のBNCTに成功した⁵¹。現在までに、悪性黒色腫の治療実績はおよそ30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。また、外科的手術と異なり機能温存できることからQOLの高さもBNCTの利点である。

1994年には、今堀らにより¹⁸F-BPAを用いたPET (positron emission tomography) 診断法が開発され、予め腫瘍部位のホウ素蓄積量を見積もることができるようになった⁶¹。2001年、大阪大学の加藤・由良は京都大学の小野らと共同で、BSHとBPAの両剤を併用することで、世界で初めて頭頸部がんのBNCTに成功した。この成功をきっかけにBNCTの適応拡大が進められており、口腔多発がんや咽頭後リンパ節転移がんへBNCTが施され経過も良好である⁷⁻⁹⁾。

BNCTに用いる熱中性子は現在のところ原子炉から得ているが、加速器から十分な熱中性子が得られるようになれば、都市型病院への併設が可能となることから、BNCTは放射線療法の1つとして一般に普及することが期待される。この病院併設型加速器BNCTの開発が欧米をはじめ、日本でも京都大学を中心に進められている。

さて、BNCTにおいてホウ素10を含む分子を如何にしてがん細胞にのみ選択的に高濃度で送り込むかが治療効果の決め手となるわけであるが、具体的には、腫瘍内ホウ素濃度が30 ppm以上でなおかつ腫瘍/血液のホウ素濃度比ならびに腫瘍/正常組織のホウ素濃度比が5以上であることが目標値となっている。これを達成するために、様々なホウ素薬剤の開発研究が行われてきた。本稿では、最近注目されているホウ素ナノキャリアを用いた新しいホウ素デリバリーシステムについて紹介する。リボソームDDSを用いたホウ素デリバリーの方法として図3に示すように、大きく2つの戦略に分けられる。1つは、ホウ素薬剤をリボソーム内に封入する方法である。こ

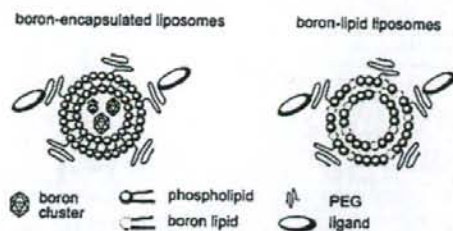


図3 ホウ素ナノキャリア設計

の方法は、一般的ナリポソームを用いたDDSを応用するものであり、BSHなどのホウ素化合物を封入する。もう1つの方法は、ホウ素をリポソーム膜に埋め込む方法である。この方法では、リポソーム内にさらに抗がん剤などの薬剤を封入することができるため、化学療法との複合治療が期待できる。いずれの場合も、リポソーム膜をPEG化することでEPR (enhanced permeability and retention) 効果を高め^{10,11)}、様々な分子をリポソーム膜に結合させることにより、能動的に標的細胞に取り込ませるような機能を持たせることが可能となってきた。

10.2 ホウ素薬剤内封型リポソームを用いたホウ素デリバリーシステム

ホウ素薬剤を内封したリポソームは、1991年に柳衛らによって最初に報告された¹²⁾。彼らは、エッグPC (phosphatidylcholine)、コレステロール、DTP-DPPE(3-(2-pyridyldithio)propionyl-dipalmitoylphosphatidylethanolamine) (1:1:0.05) からリポソームを調製し、BSHを封入した後、そのリポソームをanti-human CEA (carcinoembryonic antigen) モノクロナール抗体とSPDP (N-hydroxysuccinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate) 存在下反応させ、BSH内封イムノリポソームを合成した。AsPC-1 (ヒト膵臓がん) 細胞を移植したヌードマウスを用いてBNCT効果を調べたところ、BSHを封入していないイムノリポソームを投与した群に比べて、BSH封入イムノリポソームをホウ素濃度およそ7.8mg/kg (マウスの体重20gと仮定して計算) 投与し1時間後に中性子照射したマウスでは、腫瘍増殖が50%以下に抑えられた¹³⁾。また、Hawthorneらは、DSPC (distearoyl phosphatidylcholine) とコレステロールを用いて、BSHをはじめ様々なホウ素イオンクラスターを封入したリポソームを報告した^{14,15)}。その中でもNa₃[1-(2'-B₁₀H₉)-2-NH₃B₁₀H₈]を内封したPEG化リポソームでは、EMT6細胞を移植したBALB/cマウスに対して、ホウ素濃度22mg/kgで投与した場合、血液中ホウ素濃度は6時間後で87.2ppm、48時間後でも19.3ppmであった。一方、腫瘍内ホウ素濃度は、6時間後で27.4ppmであったのに対し、48時間後では46.7ppmと時間の経過とともにEPR効果によりホウ素が蓄積することがわかった。

表1 ホウ素薬剤内封アクティブターゲティングリボソーム

内封ホウ素薬剤	リガンド	分子標的	文献
BSH	anti-human CEA ^a	がん胎児性抗原 (CEA)	12, 13
SPD-5	葉酸	葉酸受容体	16
WSP1	EGF ^b	EGF受容体	17
BSH	TF ^c	TF受容体	18
Na ₂ B ₁₀ H ₁₀	TF	TF受容体	19
Li ₂ B ₁₂ H ₁₂	Cetuximab	EGF受容体	20

^aCarcinoembryonic antigen. ^bEpidermal growth factor. ^cTransferrin.

さらにホウ素封入りリボソームを細胞選択的にかつ能動的に取り込ませるためにanti-human CEA以外にも様々なリガンドがその表面に導入されたリボソームの開発研究が行われてきた。表1にこれまで報告された主なホウ素薬剤内封アクティブターゲティングリボソームに関する内封ホウ素薬剤、リボソーム表面修飾リガンドとその分子標的についてまとめた。これらの中でも丸山らが開発したBSH内封型TFリボソームは、colon 26マウス大腸がん細胞を移植したマウスを用いた生体内分布実験では、投与後72時間経っても腫瘍内ホウ素濃度は35 ppmで腫瘍/血液比も6.0と非常に高い値が得られている。また、投与72時間後に中性子照射を中性子束 2×10^{12} thermal neutrons/cm²で37分間行いBNCT効果を調べたところ、ホウ素濃度35 mg/kg投与した場合、マウス腫瘍は中性子照射後萎縮し始め、10~14日後にはいずれの場合も消失し、中性子照射後5週間の観察期間内で再発は見られなかったと報告している¹⁸⁾。

10.3 ホウ素脂質型リボソームを用いたホウ素デリバリーシステム

このように、多面体構造のホウ素クラスターイオンを封入したリボソームを用いて、高い治療効果を得られるホウ素デリバリーシステムが達成できる可能性が示されてきた。しかしながら、使用されているホウ素薬剤封入りリボソームは非常に高いイオン濃度であり高浸透圧的な溶液であることから、これ以上の高濃度化は困難であると同時に、このような条件下でのリボソーム膜安定性の問題が生じている。さらに、このような高いホウ素クラスターイオン濃度のリボソームを調製する際には、封入効率の低さが無視できなくなってくる。リボソームの脂質二分子膜は、分子間相互作用により自己集合化しているため密度が高く、この二分子膜へホウ素分子を導入できれば、非常に高濃度でホウ素をデリバリーできると考えられる。さらに、リボソーム膜内にホウ素を導入させることで、リボソーム内に抗がん剤など様々な薬剤が封入できることから、BNCTと化学療法との複合治療が可能となる。ここでは、一本鎖ホウ素イオンクラスター脂質および二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質から調製したホウ素ナノキャリアについて紹介する。

から調製し、投与ホウ素濃度18mg/kgと高い濃度で投与したところ、腫瘍内ホウ素濃度が30時間後には48 ppmに到達し、48時間後も32 ppmと高いホウ素濃度を維持した。

10.3.2 二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質

一方、我々はリボソームの二分子膜へ効率よくさらに、そのホウ素リボソームが安定に生成するためには、二分子膜を形成しているリン脂質のように脂溶性部位が二本鎖であれば良いと考えた。そこで、図4のように二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質2を設計した²²⁾。合成したイオン性ホウ素クラスター脂質2から得られたベシクルの血液中での安定性を調べるため、37℃で血清中における封入されたカルセインの蛍光強度の変化を観測した。カルセインを封入したホウ素クラスターベシクルの血清溶液の蛍光強度が0~18時間の測定時間内では、ほとんど変化しないことがわかった。また、Triton X-100でベシクルを破壊し、ベシクルからリリースされたカルセインの蛍光強度も測定時間内では一定であることから、カルセインを封入したホウ素クラスターベシクルは、37℃では血清中では安定であることがわかった。次にDSPC、コレステロール、ホウ素クラスター脂質2を1:1:XでXの値を0~1の範囲で混合し、リボソームを調製した後、そのリン脂質とホウ素の濃度を定量した。ホウ素の定量にはICP-AES法を用いた。同様に、DSPC、コレステロール、ホウ素クラスター脂質2、PEG-DSPE (distearylphosphatidylethanol amine) を1:1:X:0.11でXの値を0~1の範囲で混合し、PEG-リボソームを調製した後、そのリン脂質とホウ素の濃度を定量した。図5に示したようにDSPC、コレステロール、ホウ素クラスター脂質2から調製したbare-リボソームでは、混合するホウ素クラスター脂質2の割合を0~1に増加するに従って得られるリボソーム内のホウ素濃度も比例して増加することがわかった。また、興味深いことにDSPCとホウ素クラスター脂質2のリボソーム中の組成比は1:5でリボソームを形成することがわかった。DSPC、コレステロール、ホウ素クラスター脂質2、

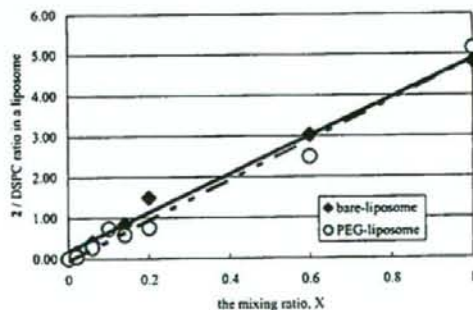


図5 ホウ素脂質2とDSPC混合比とリボソーム膜構成比の相関

PEG-DSPEから調製したPEG-リボソームでも同様の傾向が見られた。

10.3.3 TF結合型ホウ素リボソームとホウ素デリバリー

ホウ素イオンクラスター脂質2とDSPC、さらに丸山らが開発したトランスフェリンを修飾したがん細胞標的型リボソーム²³⁾を応用し、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリボソームを合成し、担癌マウスを用いた体内分布ならびに中性子捕捉治療を行った²⁴⁾。Colon 26細胞を移植したBALB/cマウス(生後6週間, 16~18g)にトランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリボソームをホウ素-10濃度で7.2 mg/kg静脈投与し、72時間後各臓器を分画しホウ素濃度をプロンプト法により測定した。図6に示すように、脾臓・肝臓では非常に高いホウ素蓄積が見られ、また腫瘍内ホウ素蓄積量は、ホウ素濃度で7.2 mg/kg投与した場合は23 ppm、14.4 mg/kg投与した場合は41 ppmに到達した。

さらに、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリボソームをホウ素-10濃度で7.2 mg/kg投与した担癌マウスを72時間後、中性子照射した。中性子照射は京都大学原子炉において行い 2×10^{12} neutrons/cm²で37分間照射した。ホウ素クラスターリボソームを投与していないマウスでは、中性子照射後の平均寿命が22日であったのに対し、ホウ素クラスターリボソームをホウ素濃度で7.2 mg/kg投与したマウスでは、平均寿命32日とおよそ1.5倍延命効果が見られた。一方、14.4 mg/kg投与したマウスでは、ホウ素リボソームの毒性が見られ顕著な延命効果は得られなかった。Hawthorneらも、最近同様な二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質3を開発しているが、彼らのホウ素リボソームは投与ホウ素濃度6 mg/kgで72時間以内にマウスの急性毒性が見られたことを報告している²⁵⁾。

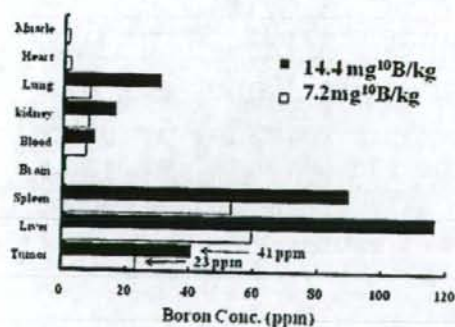


図6 ホウ素脂質2から調製したTF結合型ホウ素ナノキャリアの投与72時間後の各臓器内ホウ素濃度分布

10.3.4 低毒性二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質の開発

このように、二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質は安定なホウ素リポソームを形成し、腫瘍へも効率よく集積することがわかった。残る問題は毒性である。我々は、このホウ素リポソームの毒性は、二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質の水溶性部位である*nido*型カルボランによるものではないかと考えた。そこで、より低毒性で非常に代謝が早く実際の臨床で用いられているBSHに注目し、図4のようなundecahydrododecaborateを有する次世代ホウ素イオンクラスター脂質4および5を設計した²⁶⁻²⁸。この脂質は、脂溶性部位に生体リン脂質と同じ立体構造を有しており、リンカー部位にエステル基(4)またはカルバメート基(5)を有し、undecahydrododecaborate骨格と硫黄原子を介して結合している。これらの二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質を合成し、リポソームを調製したところ、ジステアロイル型ホウ素脂質4cの場合、図7のように直径100nmのリポソームが得られ、全脂質の75%まで加えても血清中で安定なリポソームを形成することがわかった。また、正常マウスへの投与ホウ素濃度20mg/kgでは急性毒性は見られなかった。現在、実用化に向けて研究を進めている。また、最近Gabelらもundecahydrododecaborate骨格とリンカー部位にアミド基を有するホウ素イオンクラスター脂質6を開発し、そのリポソーム形成を同様に電子顕微鏡で確認している²⁹。

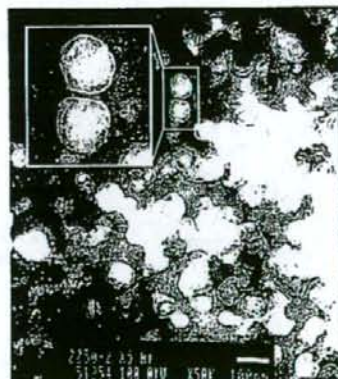


図7 ホウ素脂質4cから調製したホウ素ナノキャリアの電子顕微鏡写真

10.4 今後の展望

BNCTのためのホウ素キャリアの開発には、いわゆるナノモルレベルで薬理効果が要求される抗がん剤のようなドラッグデザインではなく、ミリモルレベルで投与できるのに十分な低毒性であり、なおかつ腫瘍細胞に集積することが必要とされる。BNCTにおいて1950年代に開発されたBSH, BPAという2剤以外には、まだ臨床応用されたホウ素薬剤は残念ながら登場してない。熱中性子源が原子炉から加速器に移行できれば都市部病院併設型加速器によるBNCTが可能となり、将来放射線療法の一般的治療法の1つになると考える。本稿で紹介したホウ素ナノキャリアは、大量のホウ素を腫瘍部位へ運ぶことが可能であるだけでなく、リガンドを導入することにより様々な癌種に対応した設計が可能であることから、BNCTの治療効果を高める上でも非常に有効なアプローチであると期待される。

文 献

- 1) R. F. Barth, J. A. Coderre, M. G. Vicente, T. E. Blue, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3987-4002 (2005)
- 2) A. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. Barnum, F-G. Rong, R. F. Barth, I. M. Codogni, J. G. Wilson, *Chem. Rev.*, **98**, 1515-1562 (1998)
- 3) G. L. Locher, *Am. J. Roentgenol.*, **36**, 632 (1936)
- 4) H. Hatanaka, Y. Nakagawa, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **28**, 1061-1066 (1994)
- 5) Y. Mishima, M. Ichihashi, S. Hatta, C. Honda, K. Yamamura, T. Nakagawa, *Pigment Cell Res.*, **2**, 226-234 (1989)
- 6) Y. Imahori, S. Ueda, Y. Ohmori, T. Kusuki, K. Ono, R. Fujii, T. Ido, *J. Nucl. Med.*, **39**, 325-333 (1998)
- 7) I. Kato, K. Ono, Y. Sakurai, M. Ohmae, A. Maruhashi, Y. Imahori, M. Kirihata, M. Nakazawa, Y. Yura, *Appl. Radiat. Isot.*, **61**, 1069-1073 (2004)
- 8) S. Miyatake, Y. Tamura, S. Kawabata, K. Iida, T. Kuroiwa, K. Ono, *Neurosurgery*, **61**, 90-91 (2007)
- 9) M. Suzuki, Y. Sakurai, S. Hagiwara, S. Masunaga, Y. Kinashi, K. Nagata, A. Maruhashi, M. Kudo, K. Ono, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **37**, 376-381 (2007)
- 10) S. Mumtaz, P. C. Ghosh, B. K. Bachhawat, *Glycobiology*, **1**, 505-510 (1991)
- 11) J. Vaage, E. Mayhew, D. Lasic, F. Martin, *Int. J. Cancer*, **51**, 942-948 (1992)
- 12) H. Yanagie, T. Tomita, H. Kobayashi, Y. Fujii, T. Takahashi, K. Hasumi, H. Nariuchi, M. Sekiguchi, *Br. J. Cancer*, **63**, 522-526 (1991)
- 13) H. Yanagie, T. Tomita, H. Kobayashi, Y. Fujii, Y. Nonaka, Y. Saegusa, K. Hasumi, M.

- Eriguchi, T. Kobayashi, K. Ono. *Br. J. Cancer*, **75**, 660-665 (1997)
- 14) K. Shelly, D. A. Feakes, M. F. Hawthorne, P. G. Schmidt, T. A. Krisch, W. F. Bauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **89**, 9039-9043 (1992)
- 15) D. A. Feakes, K. Shelly, C. B. Knobler, M. F. Hawthorne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **91**, 3029-3033 (1994)
- 16) X. Q. Pan, H. Wang, S. Shukla, M. Sekido, D. M. Adams, W. Tjarks, R. F. Barth, R. J. Lee, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 435-442 (2002)
- 17) E. B. Kullberg, J. Carlsson, K. Edwards, J. Capala, S. Sjöberg, L. Gedda, *Int. J. Oncol.*, **23**, 461-467 (2003)
- 18) K. Maruyama, O. Ishida, S. Kasaoka, T. Takizawa, N. Utoguchi, A. Shinohara, M. Chiba, H. Kobayashi, M. Eriguchi, H. Yanagie, *J. Control. Release*, **98**, 195-207 (2004)
- 19) S. Masunaga, S. Kasaoka, K. Maruyama, D. Nigg, Y. Sakurai, K. Nagata, M. Suzuki, Y. Kinashi, A. Maruhashi, K. Ono, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **66**, 1523-1527 (2006)
- 20) X. Pan, G. Wu, W. Yang, R. F. Barth, W. Tjarks, R. J. Lee, *Bioconjugate Chem.*, **18**, 101-108 (2007)
- 21) D. A. Feakes, K. Shelly, M. F. Hawthorne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **92**, 1367-1370 (1995)
- 22) H. Nakamura, Y. Miyajima, T. Takei, T. Kasaoka, K. Maruyama, *Chem. Commun.*, 1910-1911 (2004)
- 23) O. Ishida, K. Maruyama, H. Tanahashi, M. Iwatsuru, K. Sasaki, M. Eriguchi, H. Yanagie, *Pharm. Res.*, **18**, 177-180 (1997)
- 24) Y. Miyajima, H. Nakamura, Y. Kuwata, J.-D. Lee, S. Masunaga, K. Ono, K. Maruyama, *Bioconjugate Chem.*, **17**, 1314-1320 (2006)
- 25) T. Li, J. Hamdi, M. F. Hawthorne, *Bioconjugate Chem.*, **17**, 15-20 (2006)
- 26) J.-D. Lee, M. Ueno, Y. Miyajima, H. Nakamura, *Org. Lett.*, **9**, 323-326 (2007)
- 27) H. Nakamura, M. Ueno, J.-D. Lee, H. S. Ban, E. Justus, P. Fan, D. Gabek, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 3151-3154 (2007)
- 28) H. Nakamura, J.-D. Lee, M. Ueno, Y. Miyajima, H. S. Ban, *NanoBiotechnology*, **3**, 135-145 (2008)
- 29) E. Justis, D. Awad, M. Hohnholt, T. Schaffran, K. Edwards, G. Karlsson, L. Damian, D. Gabel, *Bioconjugate Chem.*, **18**, 1287-1293 (2007)

がん中性子捕捉療法と次世代ホウ素デリバリーシステム

中村 浩之

Key words: Boron neutron capture therapy (BNCT), DDS, Cancer, Liposome

1. はじめに

高齢化の進む我が国の死亡原因の第一位はがんであり、その年間死亡者数はおよそ 30 万人である。がん検診の普及、早期診断・早期治療、さらには初期治療としての手術・放射線・化学療法の進歩によって、ある程度治療率の改善がみられるものの、化学療法では全身的な副作用との戦い、放射線治療では照射野内の正常組織損傷の問題が常に存在する。このような中で、化学療法と放射線療法の両方の原理を上手く利用したホウ素中性子捕捉療法 (BNCT: boron neutron capture therapy) が注目されている^{1,2)}。

低エネルギーの熱中性子はエネルギーの高い高速中性子とは異なり、人体には無害である。しかしながら熱中性子とホウ素 10 との反応は、リチウムとヘリウム (α線) を生じ、これらのエネルギーは 2.79 MeV とおよそ細胞 1 つを殺傷するのに十分であり、その飛程は細胞 1 つの直径 (5~9 μm) である (式 1)。したがって、予めホウ素分子をがん細胞にのみ選択的に取り込ませそこへ中性子照射を行えば、がん細胞のみを選択的に破壊することができる (Fig. 1)。これを利用するのが BNCT である。



では、なぜホウ素分子なのか？中性子を原子核に照射した際に、中性子を捕捉する大きさ“中性子捕捉断面積”を主な元素について比較した (Table 1)³⁾。中性子捕捉断面積はバーン (1 barn = 10⁻²⁴ cm²) という単位で表される。¹³⁵Xe, ¹⁴⁹Sm, ¹⁵¹Eu, ¹⁵⁷Gd などがきわめて大きい値を示している。¹⁰B の中性子捕捉断面積は 3,837 バーンとそれほど大きな値は示していないのに、中性子捕捉療法に有望であるのは主に次に挙げる 4 つの理由からである。

ある。(i) ¹⁰B は非放射性で天然のホウ素に約 20% 含まれるため入手容易である。(ii) 上で述べたように核反応の際の α線の飛程が 1 個の細胞内に限られる。(iii) ホウ素の広範な化学反応性と安定性により種々の生物活性分子や生体関連物質への導入が可能である。(iv) 重金属のような高い毒性を示さない。一方、生体中の元素も中性子を捕捉して放射線を生じるが、その中性子捕捉断面積は ¹⁰B よりも数桁小さな値なので (Table 1) 通常は無視できる。しかしながら水素と窒素は生体中に高濃度に存在するため、中性子の照射線量に大きく影響する。したがってこれらの影響を最小限にするためにも、腫瘍組織内の ¹⁰B 濃度が 20~35 μg/g、もしくは ¹⁰B 原子が 10⁹ 個/細胞であれば、放射線量のおよそ 85% が ¹⁰B の中性子捕捉反応から生じると計算されている⁴⁾。最終的には照射できる中性子線量の上限は、水素と窒素が中性子を捕捉して出す放射線に周囲の正常組織がどれほど耐えられるかに依存する。このためにも ¹⁰B ががん細胞に選択的に取り込まれることが重要である。

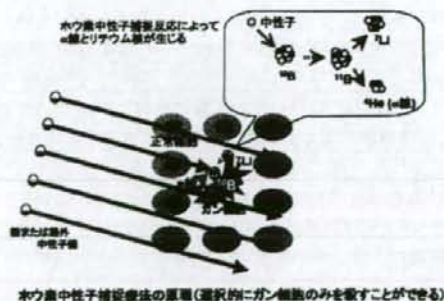


Fig. 1 Concept of BNCT (authorized by FFAG-DDS Research Organization)

Table 1 Capture Cross Section Values of Various Nuclides for Thermal Neutrons

nuclide	cross section capture value ^a	nuclide	cross section capture value ^a
⁶ Li	942	H	0.332
¹⁰ B	3838	C	0.0037
¹¹³ Cd	20,000	N	1.75
¹³⁶ Xe	2,720,000	O	<0.0002
¹⁴⁹ Sm	41,500	P	0.19
¹⁵¹ Eu	59,002	S	0.52
¹⁵⁷ Gd	240,000	Na	0.536
¹⁷⁴ Hf	400	K	2.07

^a Cross section capture values in barns.

的に集積することが必要であり、実際に臨床上の立場から腫瘍組織内¹⁰B濃度が30 μg/g以上、¹⁰B濃度の腫瘍組織/血液および腫瘍組織/正常組織の比がいずれも5以上が望ましいとされている。

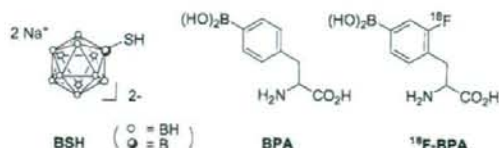


2. BNCTの特徴

一般的な放射線療法であるX線やガンマ線を用いた治療法では、腫瘍部位に狙いを定めても、直径数mmくらいの中の内には均一に照射される。したがって、体外から照射する放射線を用いると、近接する腫瘍細胞と正常細胞はほぼ同じ物理的なダメージを受けることになる。脳腫瘍の治療では広い範囲の正常脳組織内に点在する腫瘍細胞だけを選択的に治療する必要があるが、腫瘍部だけに絞り込んで照射しようとしても、その周辺にある正常脳組織の障害は避けられない。一方、BNCTでは体内であらかじめ送り込んでおいた¹⁰Bの中性子捕捉反応で発生するα線と⁷Li粒子は、発生してから止まるまでの距離(飛程)が、ほぼ細胞1個分の長さと同じため、腫瘍細胞で発生したα線と⁷Li粒子も周囲の正常脳組織にほとんど影響を与えない。さらに、BNCTで発生するα線と⁷Li粒子はX線やガンマ線に比べて生物学的な効果が2~3倍程度高く、治療効果が高いことが期待される。したがって正常脳組織にあまりダメージを与えないで腫瘍組織を細胞選択的に破壊することができる。また、通常1回(2時間以内)の照射で治療が終了するのBNCTの特徴である。

3. 脳腫瘍 BNCT の世界初の成功例

BNCTの概念は、1936年にLocherによって最初に提唱された⁹。その後、1951年から米国ブルックヘブン国

**Fig.2** Structures of BSH, BPA, and ¹⁸F-BPA.

立研究所(BNL)において悪性神経腫瘍を対象とした最初の試験治療研究がFarrおよびSweetらによって開始され、10年間で45例のBNCTが行われた。また、1953年からマサチューセッツ工科大学(MIT)でも治療が開始され、18例のBNCTが行われたが、ホウ素化合物の腫瘍選択性と中性子遮蔽の不十分さ故に治療成績が悪く、1961年に治療が中断された¹⁰。

一方、日本では1959年からBNCTに関する基礎研究が始められ、1968年に帝京大学の(故)畠中ら、Fig.2に示すように非常に低毒性であるホウ素イオンクラスター(BSH: mercaptoundecahydrododecaborate)を用いて世界で初めて脳腫瘍のBNCTに成功した⁷。BSH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有しており、それ自身はがん細胞に対する選択性は低いが、高水溶性・低毒性である(Fig.2)。健全な脳には血液脳関門現象(blood-brain barrier)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壊れているためBSHのような水溶性の化合物が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症例を越えている。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云える。

4. 悪性黒色腫へのBNCT

1987年、神戸大学の三島らはアミノ酸誘導体であるBPA(p-boronophenylalanine)を用いて悪性黒色腫(メラノーマ)のBNCTに成功した¹¹。BPAは必須アミノ酸であるフェニルアラニンの類縁体として増殖の盛んながん細胞に選択的に取り込まれると考えられている。BPAは、中性領域下での溶解性が低いため、臨床ではD-フルクトースとの複合体として用いられている。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%を越えており、非常に治療効果が高い。また外科的手術と異なり機能温存できることからQOLの高さもBNCTの利点である。

Before BNCT

9 months after BNCT



Fig. 3 BNCT for parotid cancer patient (authorized by Prof. K. Ono at KUR BNCT research group).

5. PET 診断用 ^{18}F -BPA 開発および BPA と BSH の併用療法と適応拡大

1994年、京都府医大の今堀・上田らにより ^{18}F -BPA を用いた PET (positron emission tomography) 診断法が開発され、あらかじめ腫瘍部位のホウ素蓄積量を見積もることができるになると同時に多くの悪性腫瘍に集積することも分かった⁹⁾。さらに、京都大の小野らと今堀らの共同研究によって BPA を用いた悪性神経膠腫の世界最初の BNCT を実施した。BPA は増殖しているがん細胞には選択的に取り込まれるものの、休止期腫瘍細胞への取り込みは低いことが弱点であったが、BSH との併用により克服できるようになった。

2001年、大阪大の加藤・由良らは小野らと共同して世界に先駆けて頭頸部悪性腫瘍の BNCT に成功した。頭頸部悪性腫瘍は現在でも手術が中心であり、審美障害、嚥下・咀嚼障害などの機能障害が後遺することがある。彼らは、再発耳下腺癌患者に対し、BSH と BPA の併用 BNCT を行ったところ、9ヶ月後にはがんが完全に消失し、皮膚への放射線障害もほとんど見られなかった (Fig. 3; 京大炉 BNCT 研究グループ・小野教授より提供)。この成功をきっかけに BNCT の適応拡大が進められており、口腔多発癌患者や外側咽頭後リンパ節転移患者へ BNCT が施され経過も良好である。さらに、川崎医科大学の平塚らは、術前照射を行い BNCT と外科手術の組み合わせで高い治療効果を報告しており、京都大の鈴木・小野らは肝臓癌、肺癌、胸壁腫瘍へ BNCT を適応拡大している (Fig. 4; 京大炉 BNCT 研究グループ・小野教授より提供)¹⁰⁻¹²⁾。

一方、ホウ素薬剤である ^{10}B 濃縮した BSH と L 体 BPA は、海外からの輸入に頼っていたため、臨床に必要なホ

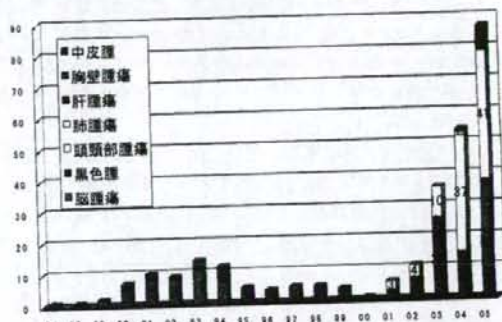


Fig. 4 Cases of BNCT at Kyoto University reactor institute (authorized by Prof. K. Ono at KUR BNCT research group).

ウ素薬剤の確保がしばしば困難であった。大阪府立大の切畑らはステラケミファ (株) と共同で、 ^{10}B 濃縮した BSH と BPA の国産化に成功し、現在ではこの2つのホウ素薬剤の GMP レベルでの供給体制が整った。

6. 次世代ホウ素デリバリーシステム

さて、BNCT において ^{10}B を含む分子を如何にしてがん細胞にのみ選択的に高濃度で送り込むかが治療効果の決め手となることは言うまでもない。実際の臨床では、BSH と L 体 BPA を併用して、腫瘍内ホウ素濃度が 25~100 ppm、腫瘍/血液のホウ素濃度比ならびに腫瘍/正常組織のホウ素濃度比が 2~3 で行われている。はじめに述べたように、BNCT の望まれる条件 (腫瘍内ホウ素濃度が 30 ppm 以上でなお且つ、腫瘍/血液ならびに腫瘍/正常組織のホウ素濃度比が 5 以上) を達成するために、さまざまなホウ素キャリアーの開発研究が行われてきた。

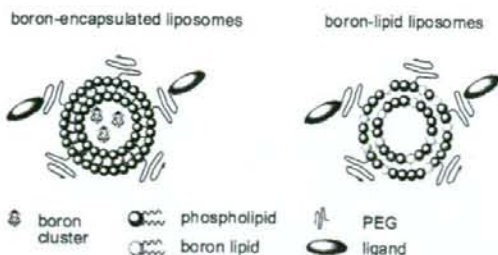


Fig. 5 Boron-encapsulated liposomes and boron-lipid liposomes

ホウ素キャリアーに望まれることは、(i) 500 mg/kg 程度の濃度で投与が可能なくらい毒性が低いこと、(ii) 十分に水溶性であること、(iii) 腫瘍細胞への蓄積が選択的であること、が挙げられる。これらの条件を満たすためには、従来の抗がん剤開発とは全く異なるアプローチが必要になってくる。我々は、リポソーム DDS (drug delivery system) を用いたホウ素デリバリーがこれらの条件を満たす有力なアプローチであると考え研究を進めてきた。

リポソーム DDS を用いたホウ素デリバリーの方法として Fig. 5 に示すように、大きく 2 つの戦略に分けられる。一つは、ホウ素薬剤をリポソーム内に封入する方法である。この方法は、一般的なリポソームを用いた DDS を応用するものであり、BSH などのホウ素化合物を封入する。もう一つの方法として、我々はホウ素をリポソーム膜に埋め込む方法を考えた。この方法では、リポソーム内にさらに抗がん剤などの薬剤を封入することができるため、化学療法との複合治療が期待できる。いずれの場合も、リポソーム膜を PEG 化することで EPR (enhanced permeability and retention) 効果を高めたり^{13,14)}、さまざまな分子をリポソーム膜に結合させることにより、能動的にターゲティングできるような機能を持たせることが可能となってきた。

6.1. ホウ素薬剤内封入型リポソーム

リポソームを用いたホウ素デリバリーは、1991年に東大の柳衛らによって最初に報告された¹⁵⁾。彼らは、エッグ PC (phosphatidylcholine)、コレステロール、DTP-DPPE (3-(2-pyridyldithio)propionyl-dipalmitoylphosphatidylethanolamine) (1:1:0.05) からリポソームを調製し、BSH を封入した後、そのリポソームと anti-human CEA (carcinoembryonic antigen) モノクローナル抗体を結合させ、BSH 内封入型リポソームを合成した。AsPC-1 (ヒト膵臓がん) 細胞を移植したヌードマウスに対し、BSH 封入型リポソームをホウ素濃度およそ

7.8 mg/kg (マウスの体重 20 g と仮定して計算) 投与し 1 時間後に中性子照射したマウスでは、腫瘍増殖が 50% 以下に抑えられた¹⁶⁾。

1992 年、Hawthorne らは DSPC (distearoyl phosphatidylcholine) とコレステロールを用いて、BSH だけでなくさまざまなホウ素イオンクラスターを封入したリポソームを報告した。それらの中でも $\text{Na}_3[1-(2\text{-B}_{10}\text{H}_9)-2\text{-NH}_2\text{B}_{10}\text{H}_5]$ を内封した PEG 化リポソームを、EMT6 細胞を移植した BALB/c マウスに対し、ホウ素濃度 22 mg/kg で投与したところ、血液中ホウ素濃度は 6 時間後で 87.2 ppm、48 時間後でも 19.3 ppm であった。一方、腫瘍内ホウ素濃度は、6 時間後で 27.4 ppm であったのに対し、48 時間後では 46.7 ppm と時間の経過とともに EPR 効果によりホウ素が蓄積することがわかった。また 48 時間後のホウ素濃度の腫瘍組織/血液 (T/B) 比は 2.4 であった^{17,18)}。

Lee らはさらに腫瘍組織部位に集積したホウ素封入リポソームを細胞選択的にかつ能動的に取り込ませるために、表面に葉酸修飾したホウ素封入リポソームを開発した¹⁹⁾。葉酸結合タンパクである folate receptor (FR) は正常組織では非常に限られた部位のみ発現している糖タンパクである一方、多くのがんにおいて過剰発現が認められている²⁰⁾。葉酸はこの FR に対し、非常に高い結合力 ($K_d \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$) を有するため、表面に葉酸が結合したリポソームは FR を過剰発現している卵巣がんなどに選択的に取り込まれることが報告されている。葉酸を結合させたりポソーム内に BSH を封入し、培養細胞である KB 細胞に 2 時間接触させたところ、細胞内ホウ素濃度は培地中のホウ素濃度依存的に高くなり、同条件下で葉酸を加えた場合、細胞内ホウ素濃度が低下したことから、葉酸結合型ホウ素リポソームの細胞内取り込みが、葉酸受容体である FR を介していることが示唆されている。

Kullberg らは、ホウ素化合物をリポソームに封入した EGF 結合型ホウ素リポソームを開発した²¹⁾。細胞増殖因子の 1 つである EGF (上皮細胞増殖因子) は、細胞表面に発現しているその受容体と結合して、細胞増殖シグナルを伝達する。この EGF 受容体は多くの腫瘍細胞表面で高発現している。そこで、EGF をリポソーム表面に結合させることにより、この EGF-EGF 受容体の相互作用を利用して、腫瘍細胞への能動的なターゲティングを狙うものである²²⁾。いずれの場合も、動物実験に関してはまだ報告されていない。

丸山らは、Transferrin (TF)-TF 受容体の相互作用を利用して、TF をリポソーム表面に結合させた TF-PEG リポソームを開発し、腫瘍細胞への能動的なターゲティングに成功した²³⁾。TF は、血液中に 2.5 mg/ml 含まれ