

Development of Boron Delivery System for Neutron Capture

Therapy of Cancer

Hiroyuki Nakamura

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gakushuin University,
Mejiro, Toshima-ku, Tokyo 171-8588, Japan

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a binary cancer treatment based on the nuclear reaction of two essentially nontoxic species, ^{10}B and thermal neutrons. The neutron capture reaction by ^{10}B produces an α -particle and a lithium-7 ion bearing approximately 2.4 MeV, and these high linear energy transfer particles afford precise cell killing. Therefore, the marked accumulation and selective delivery of boron into tumor tissues are the most important requirement to achieve an effective BNCT of cancers. We focused on a liposomal boron delivery system. Accumulation of boron in the liposomal bilayer is highly potent, because drugs can be encapsulated into the vacant inner cell of a liposome. Furthermore, functionalization of liposomes is possible by combination of lipid contents. Therefore, boron and drugs may be simultaneously delivered to tumor tissues for both BNCT and chemotherapy. We recently developed the *nido*-carborane lipid, which has a double-tailed moiety conjugated with *nido*-carborane as a hydrophilic function. The longer survival of tumor-bearing mice injected with the boronated liposomes was observed after BNCT. However, significant toxicity was also observed in the mice injected at higher boron concentrations. In this paper, we report synthesis of *closo*-dodecaborate containing boron lipids. Our design of the boron lipids is based on biomimetic composition of phosphatidylcholines. Mercaptoundecahydrododecaborate ($\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}^{2-}$, BSH) was chosen as an alternative hydrophilic function of boron lipids. BSH is a water-soluble divalent anion cluster and significantly lowered toxicity, and has thus been utilized for clinical treatment of BNCT. We prepared the boronated liposomes from diacylphosphatidylcholines and boron lipids and examined their BNCT effect using tumor bearing mice. Suppression of tumor growth was observed in the mice injected with the boronated liposomes two weeks after neutron irradiation.

中性子捕捉治療のためのリポソーム型ホウ素デリバリーシステム

中村浩之

Liposomal Boron Delivery System for Neutron Capture Therapy

Hiroyuki NAKAMURA

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gakushuin University,
1-5-1 Mejiro, Toshima-ku, Tokyo 171-8588, Japan

(Received September 18, 2007)

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a binary cancer treatment based on the nuclear reaction of two essentially nontoxic species, ^{10}B and thermal neutrons. High accumulation and selective delivery of boron into tumor tissue are the most important requirements to achieve efficient neutron capture therapy of cancers. This review focuses on the liposomal boron delivery system (BDS) as a recent promising approach that meets these requirements for BNCT. BDS involves two strategies: (1) encapsulation of boron in the aqueous core of liposomes and (2) accumulation of boron in the liposomal bilayer. Various boronated liposomes have been developed and significant boron accumulation into tumor tissue with high tumor/blood boron ratios has been achieved by BDS.

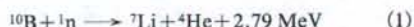
Key words—boron neutron capture therapy (BNCT); boron delivery system (BDS); liposome; polyethylene glycol; boron cluster

1. はじめに

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、ある程度治癒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うま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 (Eq. 1)。したがって、あらかじ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。



BNCT の概念は、1936 年に Locher によって最初に提唱された。³⁾ その後、1950 年代にはアメリカにおいて悪性神経膠腫を対象とした最初の試験治療研究が行われたが、硼素化合物の腫瘍選択性と中性子遮蔽の不十分さゆえに成功しなかった。⁴⁾ 1968 年、

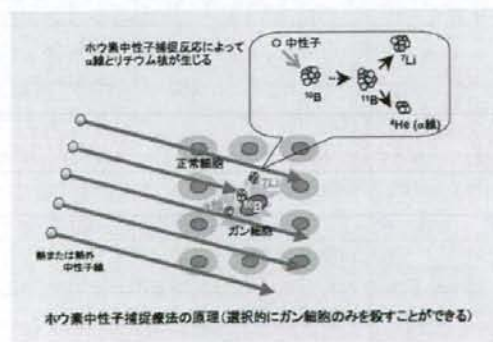


Fig. 1. Concept of BNCT (authorized by FFAg-DDS Research Organization).

学習院大学理学部化学科 (〒171-8588 東京都豊島区目白 1-5-1)

e-mail: hiroyuki.nakamura@gakushuin.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S6 で発表されたものを中心に記述したものである。

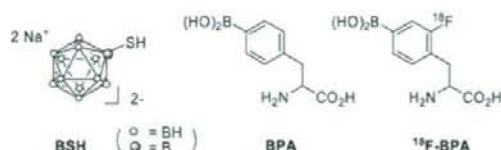


Fig. 2. Structures of BSH, BPA, and ¹⁸F-BPA

帝京大学の(故) 畠中らは、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。⁵⁾ それ以来、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。一方、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の BNCT に成功した。⁶⁾ 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、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ようになった。⁷⁾ また、大阪府立大の切畑らはステラケミファ株式会社と共同で、ホウ素-10 濃縮した BSH と L 体 BPA の国産化に成功し、現在ではこの 2 つのホウ素薬剤を用いて様々ながんへの適応拡大研究が京都大の小野らによって進められている。⁸⁻¹⁰⁾ さらに、川崎医科大の平塚らは、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いる。

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 は放射線療法の一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 の開発が吹米を始め、日本でも京都大・森らによって NEDO「次世代 DDS 型悪性腫瘍治療システムの開発」プロジェクト (プロジェクトリーダー: 筑波大・松村 明, 平成 17-19 年度) により進められている。

さて、BNCT においてホウ素 10 を含む分子をいか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訳であるが、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並びに腫瘍/正常組織のホウ素濃度比が 5 以上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リポソーム DDS (drug delivery system) を用いた新しいホウ素デリバリーシステム [以下 “BDS (boron delivery system)” と略す] について紹介する。

2. リポソームを用いたホウ素デリバリー (BDS)

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. 3 に示すように、大きく 2 つの戦略に分けられる。1 つは、ホウ素薬剤をリポソーム内に封入する方法である。この方法は、一般的なりポソームを用いた 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 つの方法として、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) 効果を高めたり、^{11,12)} 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。

2-1. ホウ素内封型 BDS

2-1-1. リポソームを用いた初めての BDS アプローチ リポソームを用いた BDS は、1991 年に柳衛らによって最初に報告された。¹³⁾ 彼らは、エッグ PC (phosphatidylcholine)、コレステロール、DTP-DPPE [3-(2-pyridylthio) propionyl-dipalmitoylphosphatidylethanolamine] (1:1:0.05) からリポソームを調製し、BSH を封入したのち、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-pyridylthio) propionate] 存在下、反応させ BSH 内封イムノリポソームを合成した。BSH 濃度で 250 mM から得られたリポソームを分析した結果、1 つのモノクロナール抗体に対し



中村 浩之

学習院大学理学部教授。1967 年神戸市生まれ。東北大学理学部卒業。同大学院理学研究科博士前期課程修了。1995 年九州大学有機化学基礎研究センター助手。1997 年東北大学大学院理学研究科助手。この間、ピッツバーグ大学化学科に留学。2002 年学習院大学理学部助教授。2006 年より現職。1999 年日本化学会進歩賞、2007 年がん分子標的治療研究会奨励賞受賞。

て 1.3×10^5 個のホウ素原子を含むと見積もられている。AsPC-1 (ヒト膵臓がん) 細胞にこのイムノリポソーム溶液を接触させ中性子照射を行ったところ、60%以上の高い細胞致死効果が得られた。さらに、AsPC-1 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 7.8 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。¹⁴⁾

2-1-2. PEG 化リポソームによる受動的ターゲティング 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 $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ 、 $\text{Na}_2(n\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ 、 $\text{Na}_2(i\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ 、 $\text{K}_4\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{H}$ 、 $\text{Na}_3\text{B}_{20}\text{H}_{19}$ といった様々なホウ素イオンクラスター (Fig. 4) を封入したりポソームを報告した。右わき腹にあらかじめ EMT6 細胞を移植した BALB/c マウスに対し、ホ

ウ素薬剤を封入したりポソーム溶液 (200 μl) を静脈注射し、経時的なホウ素の生体内分布を調べた。¹⁵⁾ BSH、 $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ を封入したりポソームをそれぞれホウ素濃度で体重に対して 6 mg/kg, 7 mg/kg 投与した場合、いずれも実際の治療に必要なレベルの腫瘍内ホウ素濃度は得られなかった。例えば Table 1 に示すように BSH の場合、30 時間後でも腫瘍/血液 (T/B) ホウ素濃度比は 2 であり、腫瘍内ホウ素濃度は 8.8 ppm であった。また、20 個のホウ素原子からなるクラスター $\text{Na}_2(n\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ では、予想通りリポソーム内封ホウ素濃度が高めることができ、投与ホウ素濃度は 15 mg/kg で 48 時間後には 13.6 ppm、T/B 比は 3.3 であった。興味深いことに、 $\text{Na}_2(n\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ の異性体である $\text{Na}_2(i\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ の場合、投与ホウ素濃度 11 mg/kg で 48 時間後には 13.9 ppm と同じ濃度レベルを保ちながら、T/B 比は 12 を示した。言うまでもなく、 $\text{Na}_2(i\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ のバッファー溶液のみを投与しても腫瘍への高い蓄積はみられず、24 時間後腫瘍内ホウ素濃度は 1.9 ppm で T/B 比はおよそ 1 であったことから、リポソームにより腫瘍選択的にホウ素デリバリーが達成

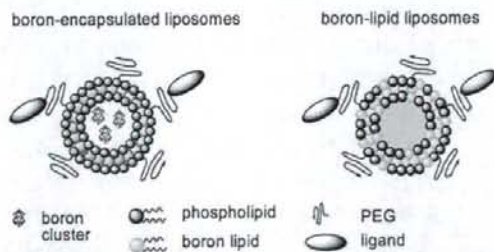


Fig. 3. Boron-encapsulated Liposomes and Boron-lipid Liposomes

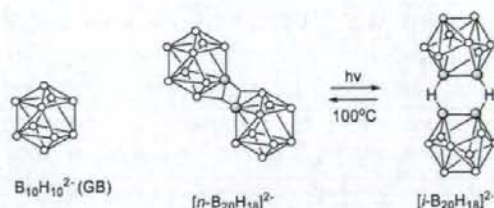


Fig. 4. Isomerization of $\text{B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$

Table 1. Murine Tissue Boron Concentrations from Delivery of Borane Salts by Liposomes^{a)}

Boron salts-vehicle	Injected boron dose (mg/kg of body weight)	Boron conc. in tumor (ppm)	Tumor/Blood ratio
BSH-liposome	7	8.8 ^{b)}	2 ^{b)}
$\text{Na}_2(n\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ -liposome	15	13.6	3.3
$\text{Na}_2(i\text{-B}_{20}\text{H}_{18})$ -liposome	11	13.9	12
$\text{Na}_3[1-(2'\text{-B}_{10}\text{H}_9)-2\text{-NH}_3\text{B}_{10}\text{H}_8]$ -liposome	11	25.4	5.3
$\text{Na}_3[1-(2'\text{-B}_{10}\text{H}_9)-2\text{-NH}_3\text{B}_{10}\text{H}_8]$ -PEG-liposome	22	46.7	2.4
Unencapsulated $\text{Na}_3[1-(2'\text{-B}_{10}\text{H}_9)-2\text{-NH}_3\text{B}_{10}\text{H}_8]$	10	4.4	5.0
Lipid 1-liposome	6	25	8.4
$\text{Na}_3[1-(2'\text{-B}_{10}\text{H}_9)-2\text{-NH}_3\text{B}_{10}\text{H}_8]$ -lipid 1-liposome	18	32	6.0

a) Tissue boron concentrations were determined by ICP-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy) and the 48 h-tumor boron concentrations and tumor/blood ratios are shown in the table. b) At 30 h-time point.

されていることが分かる。この高い腫瘍蓄積性は、これらの2つの $B_{20}H_{18}^{2-}$ イオンによるものでこれらが腫瘍細胞内に取り込まれたのち、細胞内様々な要素と反応して結合を形成しているのではないかと考えられている。

また、彼らは Fig. 5 に示すように $B_{20}H_{18}^{2-}$ イオンが塩基存在下、液体アンモニアと反応しユニークなアピカル-エカトリアル異性体イオン、 $[1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_8]^{3-}$ を生成することを見出した。このナトリウム塩を DSPC リポソームに封入し、担がんマウス内のホウ素分布を調べたところ、投与ホウ素濃度 11 mg/kg において腫瘍内ホウ素濃度は、30 時間後で 32.3 ppm, 48 時間後でも 25.4 ppm であり、T/B 比は 5.3 を達成した。¹⁶⁾ コントロールとして $[1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_8]^{3-}$ イオンのバッファー溶液 (ホウ素濃度 10 mg/kg) を投与した場合は、16 時間後に腫瘍内ホウ素が最大値 8.4 ppm となり、その後徐々に低下し 48 時間後には 4.4 ppm となった。リポソームを用いた DDS では、PEG をリポソーム表面に結合させることにより、細網内皮系によるリポソームの取り込みを避けることができ、その結果リポソームの血中滞留性を高めることが既に知られている。そこで、彼らは PEG 2000 を結合した DSPE (distearoyl phosphatidylethanolamine) を DSPC に対して 10% 用いて $Na_3 [1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_8]$ を内封した PEG 化リポソームを調製した。このリポソームをホウ素濃度 22 mg/kg で投与したところ、これまでのホウ素イオンクラスター封入りリポソームよりも血中滞留性が向上し、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分かった。また 48 時間後の T/B 比は 2.4 であった。

2-1-3. 葉酸結合型リポソーム このように、リポソーム表面を PEG 化することに、血中滞留性が向上し、EPR 効果により効率的に腫瘍組織にホウ素が蓄積することが見い出されたが、Lee らはさらに腫瘍組織部位に集積したホウ素封入り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りリポソームを開発した。¹⁷⁾ 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でのみ発現している糖タンパクである。一方、FR は多くのがんにおいて過剰発現が認められている。¹⁸⁾ 葉酸はこの FR に対し、非常に高い結合力 ($K_a = -10^{10} M^{-1}$) 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。そこで、彼らは、エッグ PC (phosphatidylcholine)、コレステロール、PEG-コレステロール、葉酸-PEG-DSPE (60 : 35 : 4.5 : 0.5) から調製した葉酸結合型ホウ素内封型リポソームを調製した。まず、BSH をリポソーム内に封入し、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、BSH (ホウ素濃度 $4 \mu M$) では $231 \mu g/10^6 cell$ であった。一方、同条件下 1 mM の葉酸を加えた場合、細胞内ホウ素濃度は $53 \mu g/10^6 cell$ であった (Table 2)。このことから、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、葉酸存在下ではその取り込み機構が競合し、その結果ホウ素蓄積濃度が低下していることが明らかとなった。同様の方法で、Hawthorne らが開発した $Na_3 [1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_8]$ を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームを KB 細胞に接触させたところ、細胞レベルの実験では、その腫瘍細胞蓄積性は BSH より低下した。また、彼らは Fig. 6 に示すように、カルボラン骨格を有する様々なポリアミン誘導体を合成し、それらの塩酸塩を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームを調製し、細胞内蓄積性について検討した。その結果、Table 2 に示すように SPD-5 や ASPD-5 では BSH を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームのおよそ 3 倍程度の

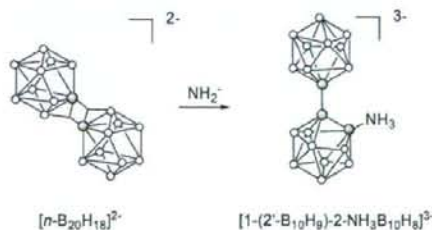


Fig. 5. Conversion of $(n-B_{20}H_{18})^{2-}$ into $[1-(2'-B_{10}H_9)-2-NH_3B_{10}H_8]^{3-}$

Table 2. Uptake of Liposomal Boron Compounds by Cultured KB Cells^{a)}

Boron compounds	f-L-[Boron]	L-[Boron]	f-L-[Boron] + 1 mM folic acid
BSH	231	14	53
Na ₃ [1-(2'-B ₁₀ H ₉)-2-NH ₃ B ₁₀ H ₈]	108	2.2	18
SPD-5	671	76	297
ASPD-5	770	75	352
SPM-5	132	17.6	33
ASPM-5	154	67	132
SPM-5,10	1584	154	1331

a) Cellular uptake of boron, following a 2 h incubation at 37°C with a variety of boronated agents, each containing 4 μM total boron, entrapped in either FR-targeted (f-L-[boron]) or nontargeted control liposomes (L-[boron]). The values indicated were micrograms of boron per 10⁹ cells.

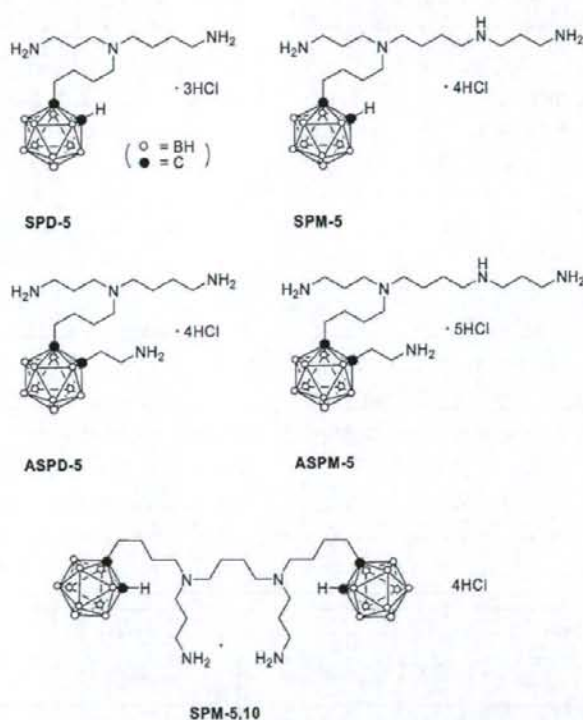


Fig. 6. Structures of Boronated Polyamine Derivatives

腫瘍細胞内蓄積効果がみられた。さらに、SPM-5, 10 を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームでは、驚くことに細胞内ホウ素濃度は 1584 μg/10⁹ cell と BSH を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームのおよそ 7 倍となった。ところが、葉酸を加えた競合実験では BSH や Na₃[1-(2'-B₁₀H₉)-2-NH₃B₁₀H₈] を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームほど高い細胞内取り込み競合阻害効果はみられないものの、ある程度の競合阻害効果 (50%程度) はみられたのに対し、

SPM-5,10 を封入した葉酸結合型ホウ素リポソームではその競合阻害効果がほとんどみられていないことから、ホウ素化合物 SPM-5,10 は、葉酸受容体を介して取り込まれているのではなく、リポソームから漏れ出て直接細胞内に取り込まれている可能性も考えられる。

2-1-4. EGF 結合型リポソーム 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が研究されている。¹⁹⁾ Kullberg らは、Fig. 7 に示すようなホウ素化合物、WSP1 及び WSA1 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。²⁰⁾ WSP1 は炭素原子 2 個とホウ素原子 10 個からなる安定で lipophilic なホウ素クラスターであるカルボランと phenanthridine からなり、WSA1 はカルボランと acridine からなり、いずれも水溶性のホウ素化合物である。In vitro 実験では、Table 2 に示すようにリポソームに封入された WSP1、WSA1 はいずれも細胞内ホウ素取り込み量が、それぞれ 1.80 ppm, 0.29 ppm と低いのにに対し、EGF 結合型リポソームでは、2.21 ppm, 6.29 ppm と特に WSA1 封入型で非常に高い腫瘍細胞蓄積性がみられた。

2-1-5. TF 結合型リポソーム Transferrin (TF) は、血液中に 2.5 mg/ml 含まれている鉄輸送タンパクである。1つのトランスフェリンには2つの鉄イオンが結合でき、細胞表面に発現している TF 受容体と結合することにより、細胞内に鉄を送り込む。腫瘍細胞の多くでこの TF 受容体が高発現している。丸山らは、この 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。²¹⁾ 1つのリポソームにはおよそ 20 個の TF が結合していると見積もられている。さらに、この技術を BDS に応用し、BSH を TF-PEG リポソーム内に封入し in vitro で細胞内ホウ素取り込みを検討したところ、Fig. 8 に示すように TF-PEG リポソームの方が PEG-リポソームよりも 10 倍以上高いホウ素集積性が見られた。²²⁾ また、培地中に TF に添加した競合条件下では、このホウ素の集積性が阻害された。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、血中ホウ素濃度は BSH 封入した TF-PEG リポソーム及び TF-PEG リポソームの両方とも経時的に低下した。一方、腫瘍内ホウ素濃度は PEG リポソームでは 48 時間後は 35 ppm に到達し、その後時間の経過とともに低下していき、72 時間後には 20 ppm となったのに対し、TF-PEG リポソームの場合 72 時間後においてもおよそ 35 ppm と高い蓄積性を示した。また、ホウ素濃度の T/N 比は、PEG リポソームでは 48 時間で 2.0、72 時間後で 2.5 であった。TF-PEG リポソームでは 48 時間でホウ素濃度の T/N 比は 2.5 と PEG リポソームの場合とほとんど変わらなかったが、72 時間後では 6.0 と非常に高い値が得られた。このように、腫瘍内ホウ素濃度及びホウ素濃度の T/N 比とも、目標値を達成した初めての報告例である。さらに、丸山らは Colon 26 細胞を移植したマウスを用いて BNCT 効果を調べた。上で述べたように 72 時間後

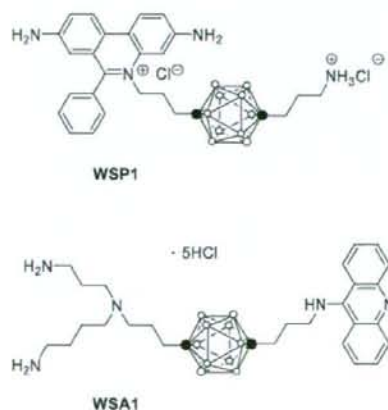


Fig. 7. Schematic Structure Formula of A, WSP1 (water soluble boronated phenanthridine, upper) and B, WSA1 (water soluble boronated acridine, lower)

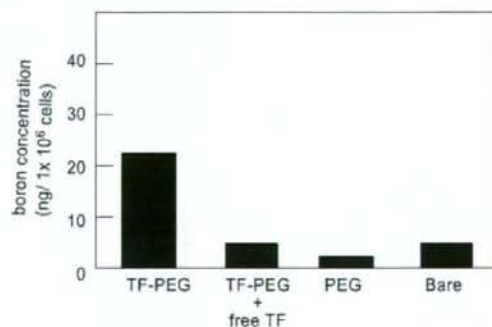


Fig. 8. Receptor Specific Binding and Internalization of TF-PEG Liposome to Colon 26 cells

Colon 26 cells (1×10^6 cells) were incubated with TF-PEG liposomes with an average of 20 TF molecules per liposome, PEG liposomes or bare liposomes, containing $30 \mu\text{g}$ in ^{10}B concentration, respectively, for 1 hr at 4°C . Blocking tests of TF-PEG liposomes-cell binding were performed with excess dose ($50 \mu\text{g}$) of free TF.

の血中ホウ素濃度が十分低いことから、ホウ素リポソームを投与してから72時間後に中性子照射を中性子束 2×10^{12} thermal neutrons/cm² で37分間行った。ホウ素濃度 35 mg/kg 投与した場合、PEGリポソーム、TF-PEGリポソームともに非常に高いBNCT効果が得られ、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た。中性子照射後5週間観察したが、再発はみられなかった。また、ホウ素濃度 35 mg/kg 投与した場合は照射後120日間、死亡はみられなかった。一方、ホウ素濃度 20 mg/kg 投与した場合は、BNCT効果はやや低下し、中性子照射100日後ではPEGリポソームを投与したマウスの生存率は20%であったのに対し、TF-PEGリポソームを投与したマウスの生存率は70%とTFを結合したことによる能動的ターゲティング効果が顕著に見い出された。このように、リポソームを用いたホウ素デリバリーシステムをBNCTに応用することで、非常に高い治療効果が期待されることが実証された。

また、増永・小野らはこのTF-PEGリポソーム技術を応用して、Na₂B₁₀H₁₀を封入したTF-PEGリポソームのSCC VIIマウス扁平上皮がん細胞に対するBNCT効果を検討した。²³⁾ 彼らは、増殖期にある細胞(P-cell)だけでなく静止状態の細胞

(Q-cell)に対するBNCT効果を*in vitro*で検討したところ、TF-PEGリポソームの方がPEGリポソームよりも効果的であり、Q-cellにも有効性が見い出された。さらに、SCC VII細胞を移植したマウスを用いて decahydrodecaborate (GB) 及び BSH を封入したTF-PEGリポソームの生体内ホウ素分布を調べたところ、腫瘍内ホウ素濃度は投与後(投与ホウ素濃度: 35 mg/kg) 24時間で蓄積量が最大となり、BSH封入TF-PEGリポソームでは21.1 ppmであったのに対し、GB封入TF-PEGリポソームでは35.6 ppmとGB封入リポソームの方が腫瘍集積性が高いことが分かった。しかしながら、T/B比はいずれの場合もおよそ0.5であり、血中の方がホウ素濃度が高いことが分かった。GB封入TF-PEGリポソームを投与したマウスのT/B比が2.5となった72時間後では、12.6 ppmと腫瘍内蓄積量も低下した。

2-1-6. 抗体結合型リポソーム LeeらはFig. 9に示すようにPEG-コレステロールにマレイン酸イミドを結合した化合物、Mal-PEG-Cholを新たに合成し、これを含むリポソームに対し、EGFRモノクローナル抗体を結合させたCetuximab-PEGリポソームを開発した。²⁴⁾ 彼らは、HSPC (hydrogenated bsoy phosphatidylcholine)、コレステロー

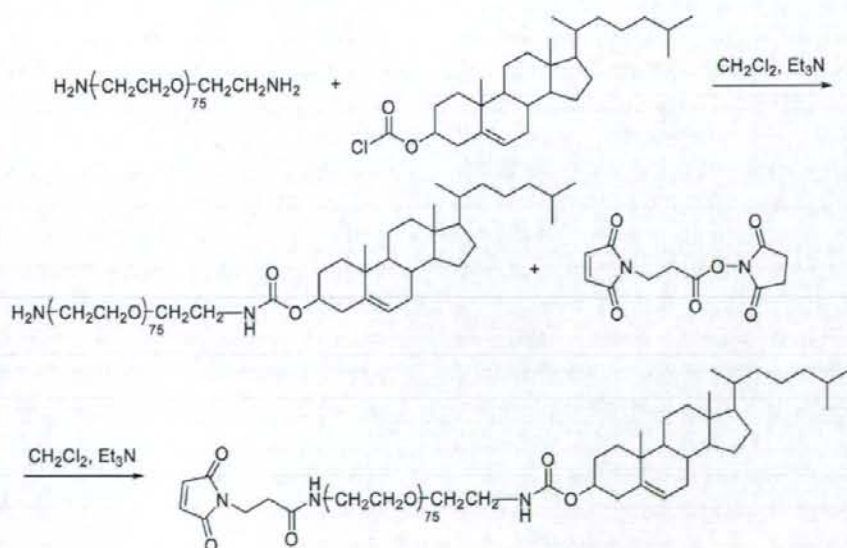


Fig. 9. Synthetic Scheme for Mal-PEG-Chol

ル、PEG-DSPE, Mal-PEG-Chol (60 : 35 : 5 : 0.5) から調製した PEG-リポソームに対し、Cetuximab を直接作用させリポソーム表面にチオエーテル結合により修飾した、脂質 $1 \mu\text{M}$ 当たり、25-35 μg の抗体が結合していると見積もられている。In vitro の蛍光ラベル実験では、この Cetuximab-PEG リポソームは EGFR を発現している細胞 (F98_{EGFR}) において取り込みがみられたが、EGFR を発現していない野生型細胞 (F98_{WT}) では取り込みがみられなかった。このことにより EGFR が発現している細胞選択的にターゲティングできることが示された。

2-2. ホウ素脂質型 BDS 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ポソームを用いて、高い治療効果を得られる BDS 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封入リポ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ポ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ポ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。リポ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、リポソーム膜内にホウ素を導入させることで、リポ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 と化学療法のコমビネーション治療が可能となる。ここでは、Hawthorne らによる初めての一本鎖ホウ素イオンクラスター脂質によるホウ素リポソームの開発研究と、われわれが初めて開発した二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質とこれから合成したりポソームを用いた BDS について紹介する。

2-2-1. 一本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 リポソーム膜内にホウ素を導入した BDS の最初の報告は、Hawthorne らによって開発された一本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 **1** (Fig. 10) を用いたものであった。²⁵⁾ Figure 11 に示すように、デカボランに 1-octadecyne を反応させ、*closo* 型カルボラン誘導体としたのち、エタノール溶液中水酸化カリウムと処理することによりイオン性の *nido* 型カルボ

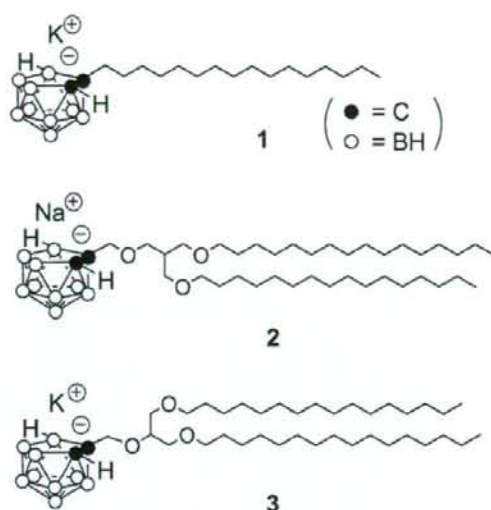


Fig. 10. Structures of *nido*-Carborane lipids

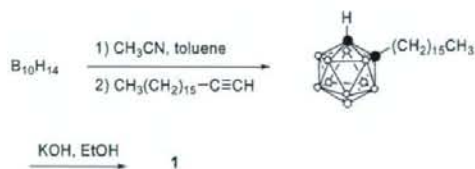


Fig. 11. Synthesis of the Carborane Lipid 1

ラン脂質 **1** を合成した。この化合物は炭素鎖 16 の脂溶性部位と水溶性の *nido* 型カルボラン部位からなる両親媒性分子である。彼らは、DSPC、コレステロール、*nido* 型カルボラン脂質 **1** (3 : 3 : 1) からリポソームを調製した。この際、*nido* 型カルボラン脂質 **1** のリポソーム封入率はおよそ 80% であった。EMT6 細胞を移植したマウスを用いて生体内ホウ素分布を調べたところ、Table 1 に示すように投与ホウ素濃度 6 mg/kg では腫瘍内ホウ素濃度が投与後 6 時間で 22 ppm、その後 16-30 時間はおおよそ 34 ppm で一定であった。48 時間後には 25 ppm に低下したものの T/N 比は 8.4 であった。一方、DSPC、コレステロール、*nido* 型カルボラン脂質 **1** (1 : 1 : 1) から調製したりポソームでは、脂質 **1** の封入率は 53% と低下し、ホウ素濃度 10 mg/kg で投与したところ、最大腫瘍内ホウ素濃度は 17 ppm と低下した。さらに、彼らが既に見出したイオンクラスター、 $\text{Na}_3[1-(2'-\text{B}_{10}\text{H}_9)-2-\text{NH}_3]$

$B_{10}H_{12}$] を内封したリポソームを DSPC, コレステロール, *nido* 型カルボラン脂質 **1** (1:1:0.6) から調製した。このリポソームを投与ホウ素濃度 18 mg/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。また 48 時間後の T/N 比は 6.0 であった。

2-2-2. 二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 一方、われわれはリポソームの二分子膜へ効率よくさらに、そのホウ素リポ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よいと考えた。そこで、Fig. 10 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。²⁰ ホウ素イオンクラスター脂質 **2** の合成スキームを Fig. 12 に示す。まず、C17 の炭素鎖を持つアルコールをジクロリドと反応させ、2 本鎖脂質部分をエーテル結合で合成しオレフィン **4** としたのち、ヒドロホウ素化反応によりオレフィン **4** をアルコール **5** と変換した。プロパルギルブロミド及び水素化ナトリウムを用いてアセチレンを導入しプロパルギルエーテル **6** としたのち、トルエン加熱還流下でアセチレン部分に対しデカボランカップリングを行い、カルボラン誘導体 **7** としたのち、塩基と処理することにより、イオン性ホウ素クラスター脂質 **2** を得ることに成功した。合成したイオン性ホウ素クラスター脂質 **2** に関してそのベシクル形成について検討した。ホウ素クラスター脂質 **2** (1.0

mg)、蛍光物質であるカルセイン (0.5 mg) を水 (5 ml) に加え、溶液が透明になるまで熟して溶かした。冷却後、Shephadex G-75 カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。得られたフラクションをそれぞれ電子顕微鏡で測定しベシクル形成を確認した。電子顕微鏡は JEOL 100c を用いた。その結果、Fig. 13 に示すように、フラクション 1 からは 400–600 nm の大きさのベシクルが、フラクション 2 からは 150–200 nm の大きさのベシクルが形成していることが分かった。

次に、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、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。血清中に上で得られたベシクル溶液を体積比で血清/ベシクル溶液=9/1 になるように加え、37°C でマグネチックスターラーを用いてかく押し、0–18 時間で各時間における蛍光強度を測定した。また、各時間におけるベシクル溶液の蛍光強度を測定後、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を同時に測定した。結果を Fig. 14 に示した。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分かった。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°C では血清中では安定であることが分かった。実際に DDS で用いられている

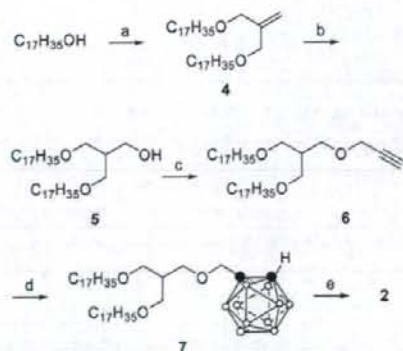


Fig. 12. Synthesis of the Carborane Lipid **2**

Reagents: (a): (1) NaH, THF, (2) $CH_2=C(CH_2Cl)_2$, 93%, (b): (1) $BH_3 \cdot Me_2S$, (2) H_2O_2 , NaOH, 71%, (c): (1) NaH, THF, (2) propargyl bromide, 58%, (d): $B_{10}H_{14}$, CH_3CN , toluene, 80%, (e): NaOMe, MeOH, 57%.

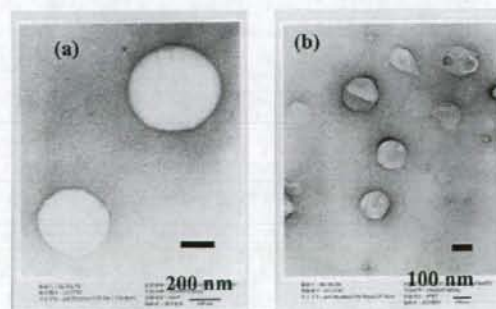


Fig. 13. Transmission Electron Micrographs of the Vesicle Formation Prepared from the *nido*-Carborane Lipid **2** in the Fractions 1 (a) and 2 (b) after Sephadex G-75 Column Chromatography

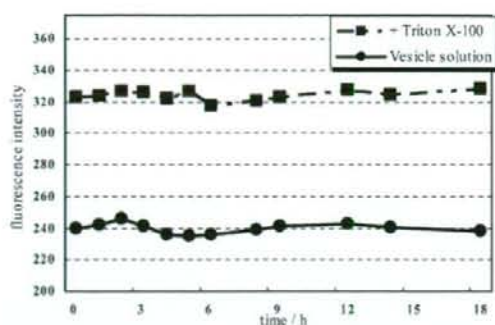


Fig. 14. The Fluorescence of the Vesicle of the Fraction 2, in which Calcein was Encapsulated by the *nido*-Carborane Lipid 2, in a Bovine Serum Albumin (BSA)

The square plot shows the fluorescence intensity of the BSA solution containing the vesicle fraction 2 and the circle plot shows that of the solution after destruction of vesicles by the addition of Triton X-100.

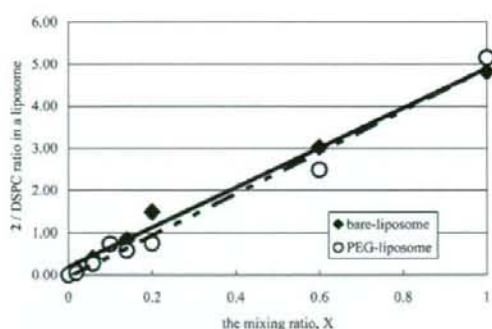


Fig. 15. Incorporation of the *nido*-Carborane Lipid 2 into Liposome Membranes

The bare-liposome was prepared from DSPC, CH, and 2 (the mixing ratio of 1 : 1 : X, X=0-1), and the PEG-liposome was prepared from DSPC, CH, 2, and PEG-DSPE (the mixing ratio of 1 : 1 : X : 0.11, X=0-1).

DSPC リポソームへのイオン性ホウ素クラスター脂質 2 の取り込み濃度について検討した。まず、DSPC (distearoylphosphatidylcholine; COATSOME MC-8080)、コレステロール (CH)、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、リポソームを調製したのち、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、CH、ホウ素クラスター脂質 2、PEG-DSPE (distearoylphosphatidylethanolamine; COATSOME ME-8080) を 1 : 1 : X : 0.11 で X の値を 0-1 の範囲で混合し、PEG-リポソームを調製したのち、そのリン脂質とホウ素の濃度を定量した。結果を Fig. 15 に示す。DSPC (distearoylphosphatidylcholine; COATSOME MC-8080)、コレステロール (CH)、ホウ素クラスター脂質 2 から調製した bare-リポソームでは、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ポソーム内のホウ素濃度も比例して増加することが分かった。また、興味深いことに DSPC とホウ素クラスター脂質 2 のリポソーム中の組成比は 1 : 5 でリポソームを形成することが分かった。DSPC、CH、ホウ素クラスター脂質 2、PEG-DSPE から調製した PEG-リポソームでも同様の傾向がみられた。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ポソーム内のホウ素濃度も比例して増加し、その DSPC とホウ素クラスター脂質 2 のリポソーム中の

組成比は 1 : 5 であった。

2-2-3. TF 結合型ホウ素脂質リポソームと BDS

このように、このホウ素イオンクラスター脂質は、安定なリポソームを形成し、蛍光物質であるカルセインを封入したリポソームでは血清中におけるカルセインのリリースはみられなかった。このホウ素イオンクラスター脂質 2 とジステアロイルホスファチジルコリンリン脂質、さらに共同研究者の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ポソームを応用し、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームを合成し、坦がんマウスを用いた体内分布並びに中性子捕捉治療を行った。²⁷⁾ 中性子捕捉治療のためにホウ素-10 濃縮型イオンクラスター脂質の合成を Fig. 12 に示す合成ルートに従って行った。

DSPC (distearoylphosphatidylcholine; COATSOME MC-8080)、コレステロール、DSPE-PEG-OME (distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol-OME; DSPE-020C)、DSPE-PEG-CO₂H (DSPE-034GC)、合成したイオン性ホウ素クラスター脂質 2 を 1 : 1 : 0.11 : 0.021 : 0.25 の比率で調整し、これら脂質 150 mg を、クロロホルムとジイソプロピルエーテルの 1 : 1 溶液 2 ml に溶かした。ヨウ素 125 でラベルしたイヌリン溶液を加え、得られたエマルジョンを 1 分間超音波に通したのち、減圧下有機溶媒を溜去した。得られた脂質ゲルをエクストルーダーを用いて 100 nm のポリカーボネート膜を通してサイズを整え、超遠心 (200000 g) 20 分

で精製し、PBS buffer に加え懸濁液とした。このようにして得られたホウ素クラスターリポソームを Mes buffer にけん濁させ (およそ $5 \mu\text{mol/ml}$), ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC; $21 \mu\text{mol}$), *N*-hydroxysulfosuccinimide (S-NHS; $28 \mu\text{mol}$) を加えた。混合物を室温で 15 分間かく拌し、Sephadex G25 カラムを通してリポソームフラクションを分離した。得られたリポソーム溶液にトランスフェリンを加え室温で 3 時間かく拌した。反応混合物を超遠心 (200000 g) 20 分で精製し、PBS buffer に加え懸濁液とした。この懸濁液に塩化鉄溶液を加え、再び超遠心 (200000 g) 20 分で精製し、

PBS buffer に加え懸濁液とした。

上で調製したホウ素クラスターリポソーム及びトランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームを用いてマウス内での各臓器における分布を測定した。ヨウ素 125 でラベルしたイヌリンを含むホウ素クラスターリポソームを雄 BALB/c マウス (生後 6 週, 体重 $16-18 \text{ g}$) に注射したのち、1-48 時間においてマウスの血液、肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓を各々取り出し、各組織の放射活性を測定した。結果を Fig. 16 に示した。横軸には投与後の時間、縦軸には投与量に対する各臓器内濃度 (% Dose) を示した。濃度はヨウ素 125 ラベルイヌリンの放射能測

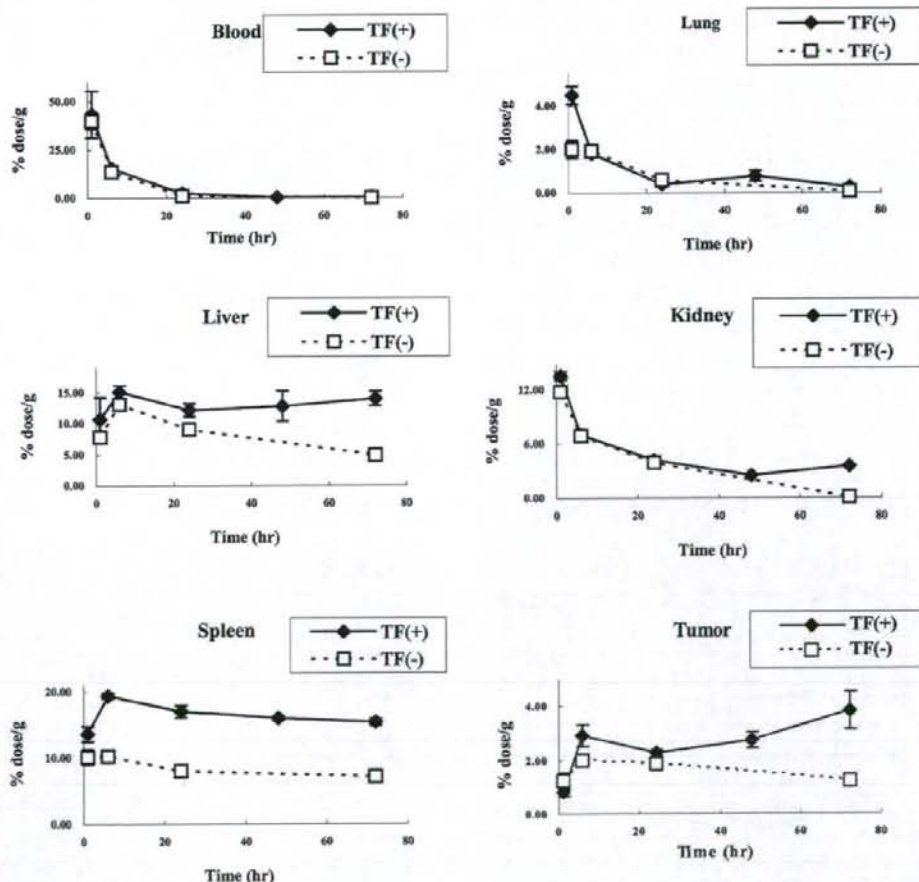


Fig. 16. Time Course of Biodistribution of Tf(-)-PEG-CL Liposome (TF(-)) and the Tf(+)-PEG-CL liposome (TF(+))

Liposomes encapsulating ^{125}I -tyraminyl inulin ($500 \mu\text{g}$ lipid/ $200 \mu\text{L}$) were injected into male BALB/c mice (7 weeks old, weighing $20-25 \text{ g}$) via the tail vein. The distribution of liposomes was measured by determining the radioactivity of each tissue. The percent dose/g in each tissue is plotted on the vertical axis and the time (h) after administration is plotted on the horizontal axis.

定により算出した。血液中の濃度変化は、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソーム及び非修飾型ホウ素クラスターリポソームともに速やかに低下した。一方、肝臓・腎臓・脾臓ではトランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームの方がより高濃度で蓄積していることが分かった。肺では両者とも血中濃度の低下に伴って低下することが分かった。興味深いことに、腫瘍ではトランスフェリン非修飾型ホウ素クラスターリポソームが時間に伴って濃度が減少しているのに対し、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームでは時間経過と関係なく蓄積しており、72時間後でもトランスフェリン非修飾型ホウ素クラスターリポソームのおよそ3倍の濃度であることが分かった。

次に、がんマウスを用いて中性子捕捉治療効果について検討した。左足に Colon 26 細胞を移植した BALB/c マウス（生後 6 週間、16–18 g）にトランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームをホウ素-10 濃度で 7.2 mg/kg、14.4 mg/kg それぞれ静脈投与し、72 時間後各臓器を分画しホウ素濃度をプロンプトγ法により測定した。各臓器内ホウ素濃度を Fig. 17 に示した。ホウ素-10 濃度で 7.2 mg/kg、14.4 mg/kg 投与したマウスでは、72 時間後、筋肉・心臓・脳ではホウ素蓄積はほとんどみられなかった。肺・血液ではおよそ 10 ppm、肺では投与濃度に比例して 14.4 mg/kg 投与の場合、およそ 35

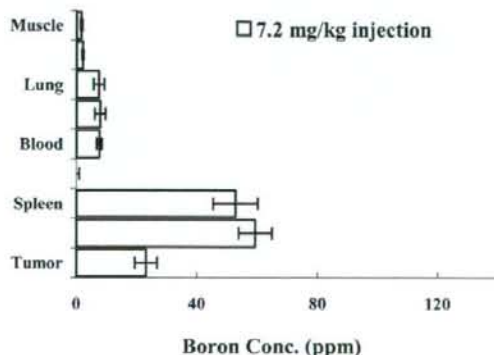


Fig. 17. ^{10}B Concentration in Various Tissues 72 h after Injection of Tf(+)-PEG-CL Liposomes into Tumor-bearing Mice

^{10}B -enriched Tf(+)-PEG-CL liposomes were injected into tumor-bearing mice, in which colon 26 cells were transplanted into the left thigh, *via* the tail vein at a dose of 7.2 mg ^{10}B /kg (200 μl of liposome solution).

ppm ホウ素蓄積がみられた。一方、Fig. 15 では肺・血液でほとんどイソリンの蓄積がみられないことから、ホウ素クラスターリポソームが分解しホウ素イオンクラスター脂質が蓄積したと考えられる。脾臓・肝臓では非常に高いホウ素蓄積がみられ、その濃度は投与量に比例している。腫瘍内ホウ素蓄積量をみてみると 7.2 mg/kg 投与した場合は 22 ppm、14.4 mg/kg 投与の場合には 40 ppm であった。

さらに、トランスフェリン修飾型ホウ素クラスターリポソームをホウ素-10 濃度で 7.2 mg/kg 投与した担がんマウスを 72 時間後、麻酔しアクリル製マウスホルダーに入れ、左足部分を中性子照射した。中性子照射は京都大学原子炉において行い 2×10^{12} neutrons/cm 2 で 37 分間照射した。コントロール実験としてホウ素クラスターリポソームを投与していないマウスも同様に中性子照射した。照射後の生存曲線を Fig. 18 に示した。ホウ素クラスターリポ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ポ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 倍延命効果がみられた。

これらの結果は、米国 NCI (National Cancer Institute) の Nanotech News for Cancer Therapy で紹介された。²⁸⁾ しかしながら、さらに腫瘍内ホウ素濃度を高めるために、このホウ素クラスターリポソームを 14 mg/kg 投与したところ、50%のマウスに急性毒性がみられた。

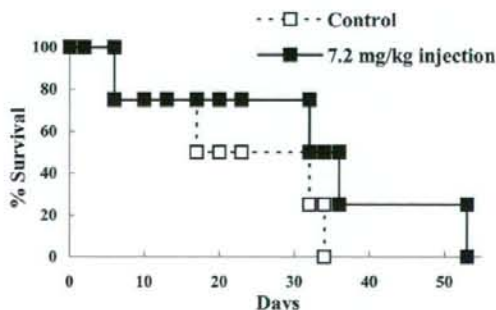


Fig. 18. Survival Curve of Tumor-bearing Mice after Neutron Irradiation for 37 min in KUR Atomic Reactor

The mice were injected with 7.2 mg ^{10}B /kg of the Tf(+)-PEG-CL liposome and incubated for 72 h before irradiation. Control indicates survival rates of tumor-bearing mice after neutron irradiation without administration of Tf(+)-PEG-CL liposomes.

一方, 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, 彼らのホウ素リポ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みられたことを報告している。²⁹⁾

2-2-4. 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分かった。残る問題は毒性である。われわれは, 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, Fig. 19 のような硫黄置換型 undecahydrododecaborate を有する次世代ホウ素イオンクラスター脂質 **8** 及び **9** を設計した。³⁰⁾ 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 (**8**) 又はカルバメート基 (**9**) を有し, undecahydrododecaborate 骨格と S 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 Fig. 20 に示すような合成スキームで合成に成功した。そのリポソーム安定性を調べたところ, Fig. 21 に示すように, ジバルミトイル型ホウ素脂質の場合, 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分かった。また, 正常マウスへの投与ホウ素濃度 20 mg/kg では急性毒性はみられなかった。現在, 実用化に向け

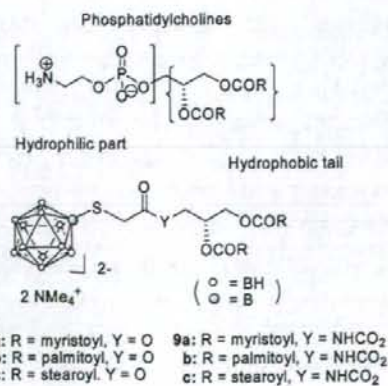


Fig. 19. Design of Advanced Boron Lipids based on Biometric Composition of Phosphatidylcholines

て研究を進めている。

また, 最近 Gabel らは Fig. 22 に示すように窒素置換型 undecahydrododecaborate 骨格を有する二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質の開発に成功しており, この脂質からリポソーム形成を Cryo-TEM に

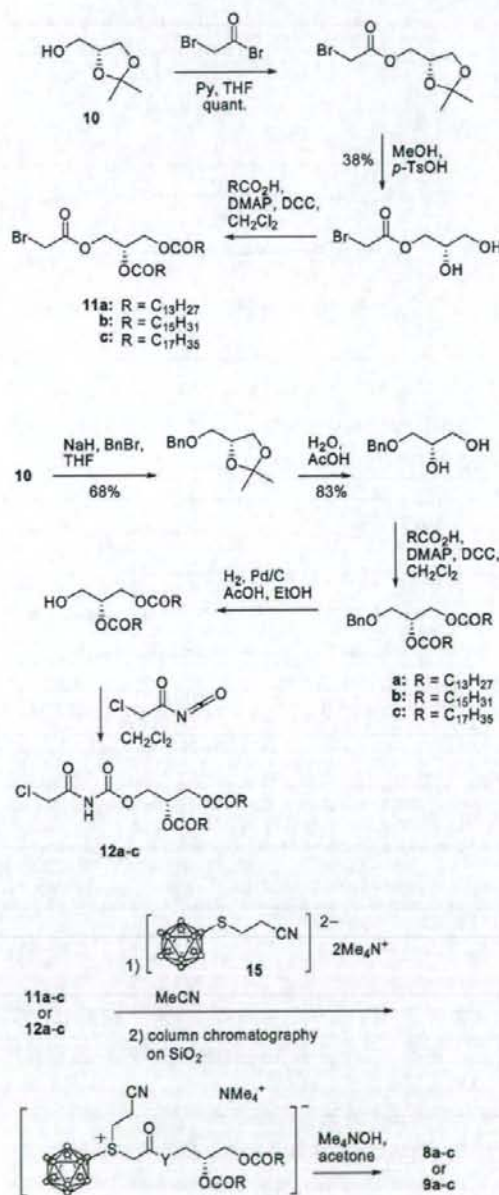


Fig. 20. Synthesis of the Boron Lipids **8** and **9**

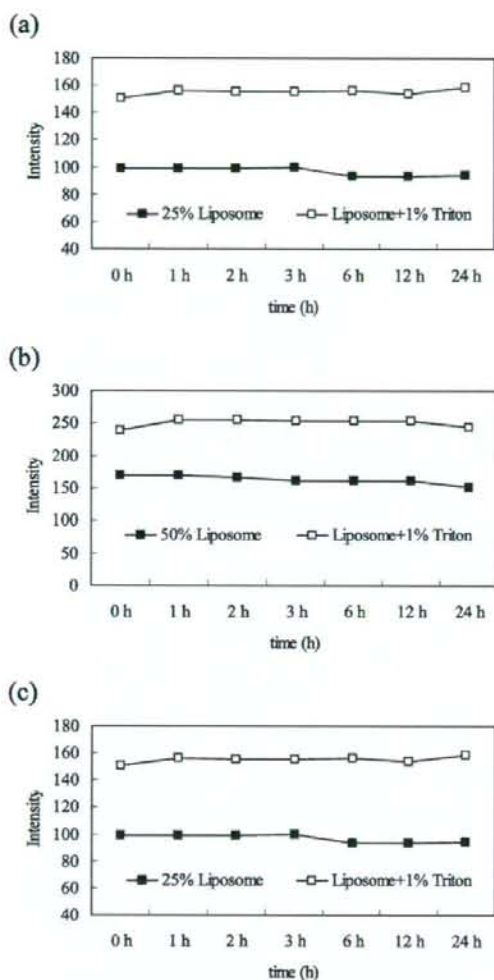


Fig. 21. Time-dependent Fluorescence Intensities of Calcein-encapsulated Liposomes Composed of **8b** with Various Ratios ((a) $X=0.25$, (b) $X=0.5$, (c) $X=0.75$) in FBS

Fluorescence intensity is plotted on the vertical axis and incubation time is plotted on the horizontal axis. The black plots show the fluorescence intensity of the FBS solution containing liposomes and the white plots show that of the solution after destruction of liposomes by the addition of Triton X-100.

よって確認している。彼らのホウ素リポソームも同様、細胞レベルで毒性は 5.6 mM と低いことが報告されている。³¹⁾

3. 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

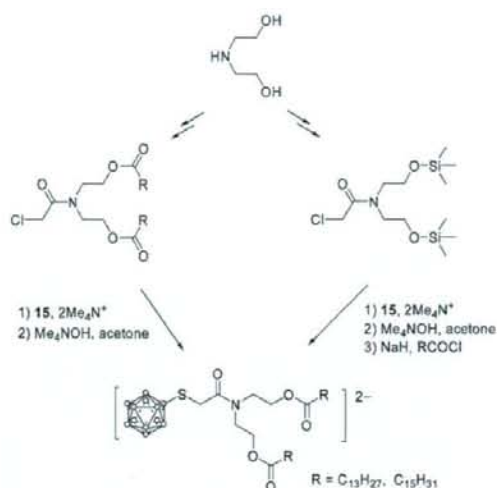


Fig. 22. Synthesis of Boron Lipids

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。そのために、ここ数十年で低毒性小分子ホウ素化合物の開発だけでなく、リポソームを用いた BDS の開発が盛んに研究されてきた。本稿では、ホウ素のリポソーム内封型 BDS とホウ素脂質を用いたリポソーム膜導入型 BDS について紹介した。また、本稿では紹介できなかったが、リポソーム膜の安定性には、リン脂質やホウ素脂質の特性だけでなくコレステロール含有率が重要であることに着目し、このコレステロールにホウ素を導入することで、リポソーム膜に集積させようというアプローチについても研究されている。³²⁻³⁴⁾ 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いない。核燃料の問題から現在 BNCT に適応できる小型加速器の開発が精力的に行われている。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 つになるであろう。そのためにも治療効果の高い BDS の開発が期待される。

謝辞 二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質の開発に関する研究に当たり、日夜研究に励んでくれた学智院大学大学院自然科学研究科化学専攻の宮島祐

介修士('06卒), Jong-Dae Lee 博士(JSPS Fellow), 上野 学学士, 丸山美奈子学士, Ban Hyun Seung 博士, 及び理学部化学科の野村直裕君に感謝します。また, トランスフェリンリポソームの調整において多大なるご指導を頂きました帝京大学・丸山一雄教授, 中性子照射実験においてご指導・ご協力頂きました京都大学・小野公二教授, 増永慎一郎准教授, 筑波大学・松村 明教授, 中井 啓講師, 大阪大学・金田安史教授に感謝いたします。そして, BSH の修飾法についてご助言頂きましたブレーメン大学(ドイツ)・Gabel Detlef 教授, ¹⁰BSH を供給いただきました榊ステラケミファに感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Barth R. F., Coderre J. A., Vicente M. G., Blue T. E., *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3987-4002 (2005).
- 2) Soloway A. H., Tjarks W., Barnum B. A., Rong F.-G., Barth R. F., Codogni I. M., Wilson J. G., *Chem. Rev.*, **98**, 1515-1562 (1998).
- 3) Locher G. L., *Am. J. Roentgenol.*, **36**, 1-13 (1936).
- 4) Farr L. E., Sweet W. H., Robertson J. S., Foster C. G., Locksley H. B., Sutherland D. L., Mendelsohn M. L., Stickley E. E., *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.*, **71**, 279-293 (1954).
- 5) Hatanaka H., Nakagawa Y., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **28**, 1061-1066 (1994).
- 6) Mishima Y., Ichihashi M., Hatta S., Honda C., Yamamura K., Nakagawa T., *Pigment Cell Res.*, **2**, 226-234 (1989).
- 7) Imahori Y., Ueda S., Ohmori Y., Kusuki T., Ono K., Fujii R., Ido T., *J. Nucl. Med.*, **39**, 325-333 (1998).
- 8) Kato I., Ono K., Sakurai Y., Ohmae M., Maruhashi A., Imahori Y., Kirihata M., Nakazawa M., Yura Y., *Appl. Radiat. Isot.*, **61**, 1069-1073 (2004).
- 9) Miyatake S., Tamura Y., Kawabata S., Iida K., Kuroiwa T., Ono K., *Neurosurgery*, **61**, 90-91 (2007).
- 10) Suzuki M., Sakurai Y., Hagiwara S., Masunaga S., Kinashi Y., Nagata K., Maruhashi A., Kudo M., Ono K., *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **37**, 376-381 (2007).
- 11) Mumtaz S., Ghosh P. C., Bachhawat B. K., *Glycobiology*, **1**, 505-510 (1991).
- 12) Vaage J., Mayhew E., Lasic D., Martin F., *Int. J. Cancer*, **51**, 942-948 (1992).
- 13) Yanagie H., Tomita T., Kobayashi H., Fujii Y., Takahashi T., Hasumi K., Nariuchi H., Sekiguchi M., *Br. J. Cancer*, **63**, 522-526 (1991).
- 14) Yanagie H., Tomita T., Kobayashi H., Fujii Y., Nonaka Y., Saegusa Y., Hasumi K., Eriguchi M., Kobayashi T., Ono K., *Br. J. Cancer*, **75**, 660-665 (1997).
- 15) Shelly K., Feakes D. A., Hawthorne M. F., Schmidt P. G., Krisch T. A., Bauer W. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 9039-9043 (1992).
- 16) Feakes D. A., Shelly K., Knobler C. B., Hawthorne M. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 3029-3033 (1994).
- 17) Pan X. Q., Wang H., Shukla S., Sekido M., Adams D. M., Tjarks W., Barth R. F., Lee R. J., *Bioconjugate Chem.*, **13**, 435-442 (2002).
- 18) Antony A. C., *Annu. Rev. Nutr.*, **16**, 501-521 (1996).
- 19) Allen T. M., Brandeis E., Hansen C. B., Kao G. Y., Zalipsky S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1237**, 99-108 (1995).
- 20) Kullberg E. B., Carlsson J., Edwards K., Capala J., Sjöberg S., Gedda L., *Int. J. Oncol.*, **23**, 461-467 (2003).
- 21) Ishida O., Maruyama K., Tanahashi H., Iwatsuru M., Sasaki K., Eriguchi M., Yanagie H., *Pharm. Res.*, **18**, 177-180 (1997).
- 22) Maruyama K., Ishida O., Kasaoka S., Takizawa T., Utoguchi N., Shinohara A., Chiba M., Kobayashi H., Eriguchi M., Yanagie H., *J. Control. Release*, **98**, 195-207 (2004).
- 23) Masunaga S., Kasaoka S., Maruyama K., Nigg D., Sakurai Y., Nagata K., Suzuki M., Kinashi Y., Maruhashi A., Ono K., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **66**, 1523-1527 (2006).
- 24) Pan X., Wu G., Yang W., Barth R. F., Tjarks W., Lee R. J., *Bioconjug. Chem.*, **18**, 101-108 (2007).
- 25) Feakes D. A., Shelly K., Hawthorne M. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 1367-1370 (1995).
- 26) Nakamura H., Miyajima Y., Takei T., Kasao-

- ka T., Maruyama K., *Chem. Commun.*, 1910–1911 (2004).
- 27) Miyajima Y., Nakamura H., Kuwata Y., Lee J.-D., Masunaga S., Ono K., Maruyama K., *Bioconjug. Chem.*, **17**, 1314–1320 (2006).
- 28) http://nano.cancer.gov/news_center/nanotech_news_2006-09-05a.asp
- 29) Li T., Hamdi J., Hawthorne M. F., *Bioconjug. Chem.*, **17**, 15–20 (2006).
- 30) Lee J.-D., Ueno M., Miyajima Y., Nakamura H., *Org. Lett.*, **9**, 323–326 (2007).
- 31) Hustus E., Awad D., Hohnholt M., Schffran T., Edwards K., Karlsson G., Damian L., Gabel D., *Bioconjug. Chem.*, **18**, 1287–1293 (2007).
- 32) Feakes D. A., Spinler J. K., Harris F. R., *Tetrahedron*, **55**, 11177–11186 (1999).
- 33) Thirumamagal B. T. S., Zhao X. B., Bandyopadhyaya A. K., Narayanasamy S., Johnsamuel J., Tiwari R., Golightly D. W., Patel V., Jehning B. T., Backer M. V., Barth R. F., Lee R. J., Backer J. M., Tjarks W., *Bioconjug. Chem.*, **17**, 1141–1150 (2006).
- 34) Nakamura H., Ueno M., Lee J.-D., Ban H. S., Justus E., Fan P., Gabek D., *Tetrahedron Lett.*, **48**, 3151–3154 (2007).

Synthesis and characterization of polar functional group substituted mono- and bis-(*o*-carboranyl)-1,3,5-triazine derivatives

Chai-Ho Lee,^{a,*} Guo Fan Jin,^a Ji Ho Yoon,^a Young Ju Jung,^a Jong-Dae Lee,^b
Sungdong Cho,^b Hiroyuki Nakamura^c and Sang Ook Kang^{d,*}

^aDepartment of Chemistry and Institute of Basic Natural Science, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749, Republic of Korea

^bDepartment of Chemistry, College of Natural Science, Chosun University, Dong-gu, Kwangju 501-759, Republic of Korea

^cDepartment of Chemistry, Gakushuin University, Toshima, Tokyo 171-8588, Japan

^dDepartment of Chemistry, Korea University, 208 Seochang, Chungnam 339-700, Republic of Korea

Received 15 October 2007; accepted 26 October 2007

Available online 30 October 2007

Abstract—Synthesis, structural characterization, and biological activity studies of *o*-carborane-substituted 1,3,5-triazines (**9–12**) containing polar functional groups such as methoxyethyl and *t*-butoxycarbonylmethyl amine units are described. De-methylation of di(methoxyethyl)amine functionalized triazines **9** and **10** resulted in the production of di(hydroxyethyl)amine derivatives **13** and **14**. NMR (¹H and ¹³C) and X-ray crystallographic studies confirmed the structures derived from the sequential *o*-carborane substitution on the 1,3,5-triazine core. Preliminary in vitro studies revealed that compounds **9**, **10**, **13**, and **14**, despite their low cytotoxicity, accumulated at high levels in B-16 melanoma cells.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1,3,5-Triazines are a class of nitrogen-containing heterocyclic compounds with remarkable chemical stability.¹ The stability of these compounds along with their anti-tumor activities has led to their utilization in several specialized biomedical applications.² As a surrogate for 1,3,5-triazine, 2,4,6-tris(*N*-methyl-*N*-hydroxymethyl-amino)-1,3,5-triazine (known as trimelamol) was proposed as a potent anti-tumor agent.³ The 1,3,5-triazine ring has three distinct nucleophilic centers,⁴ making it possible to attach various functional groups to the ring

by simple nucleophilic substitution reactions at each of the cyanyl chloride ($-N=C-Cl$) units.⁵ It has been demonstrated that *o*-carboranyl anions can function as nucleophiles⁶ to facilitate substitution on the carbon atoms of 1,3,5-triazine. Given this behavior, and our previous success⁷ in sequentially incorporating *o*-carboranyl units to 1,3,5-triazine, in the present work we sought to utilize the triazine core as a template for the production of potential boron neutron capture therapy (BNCT) agents. For a compound to have potential as

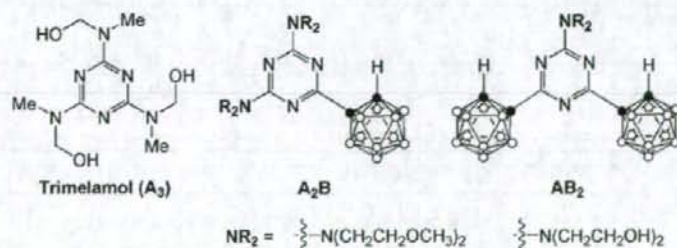
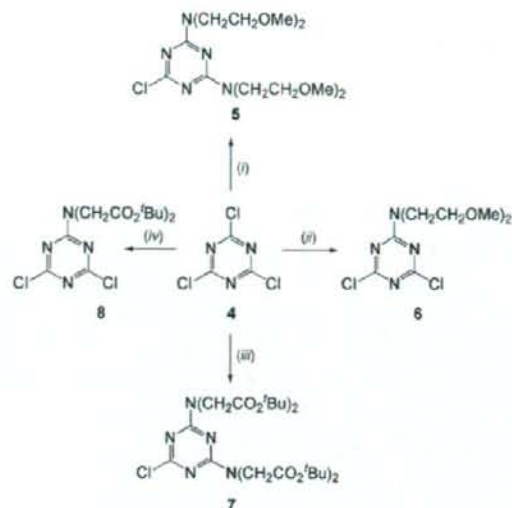


Figure 1. A₂B and AB₂ triazine systems.

* Corresponding authors. Tel.: +82 41 860 1334; fax: +82 41 867 5396 (S.O.K.); e-mail: sangok@korea.ac.kr



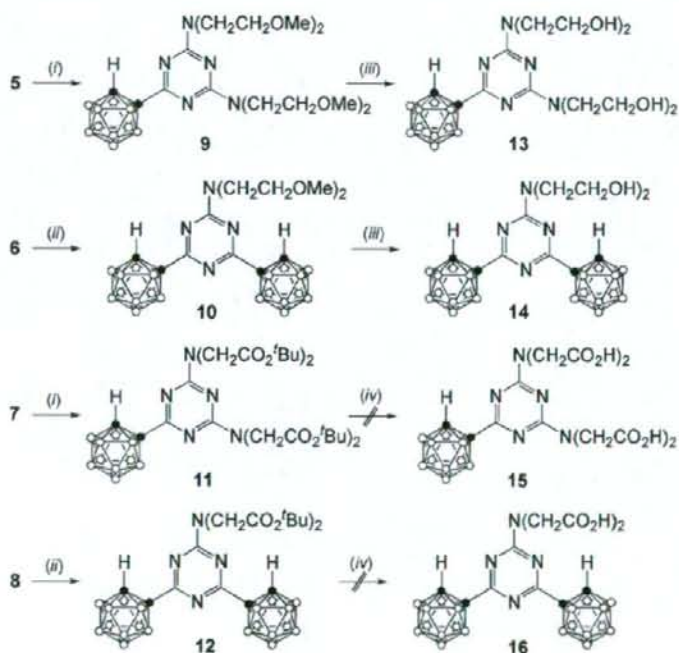
Scheme 1. Reagents and conditions: (i) $\text{HN(CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)$ (2 equiv), $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (2 equiv), THF, rt; (ii) $\text{HN(CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C(CH}_3)_3)$, $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$, THF, -10°C ; (iii) $\text{HN(CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)$ (2 equiv), $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$ (2 equiv), THF, rt; (iv) $\text{HN(CH}_2\text{CO}_2\text{C(CH}_3)_3)$, $(i\text{-Pr})_2\text{EtN}$, THF, -10°C .

a BNCT agent, it should be water-soluble, have low cytotoxicity, and take up boron in cancer cells.⁸ Due to the lipophilic character of the *o*-carboranyl unit,⁹

the introduction of a second functional group into the *o*-carboranyl triazine that endows the molecule with water solubility is highly desirable. The fact that trimellamol, which contains three hydroxyl methyl moieties, is a water-soluble bioactive agent³ suggests that introducing one or more hydroxyalkyl units to the *o*-carboranyl triazine may enhance its solubility in aqueous solution. As shown in Figure 1, conversion of the second functional group of *o*-carboranyl triazine to a hydroxyethyl group yielded a molecule 10–100 times more soluble in water than previously reported A_2B -type molecules without a polar functional group (7.24×10^{-6} mol/mL (av.)),¹⁰ where A and B represent the aminoalkyl- and *o*-carboranyl substituents of the triazine, respectively.

To incorporate polar groups into the triazine system, we first attempted to prepare hydroxyethyl- and hydroxycarbonylmethyl amine surrogates. Thus, a series of mono- and bis-substituted precursors (**5–8**) containing di(methoxyethyl)- and di(*t*-butoxycarbonylmethyl)-amine functional groups was prepared by the reaction of compound **4** with di(methoxyethyl)- and di(*t*-butoxycarbonylmethyl)amine, respectively, in 1:1 and 1:2 stoichiometry (Scheme 1).¹¹

When lithiated *o*-carborane was reacted with precursors **5–8** in 1:1 or 1:2 stoichiometry, the corresponding mono- and di-substituted *o*-carboranyl triazines (**9–12**) were formed in 12–80% yield (Scheme 2).¹² Finally, the desired free alcohol species **13** and **14** were prepared in



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) Lithio-*o*-carborane (1 equiv), THF, -78°C to rt; (ii) lithio-*o*-carborane (2 equiv), THF, -78°C to rt; (iii) BBr_3 , CH_2Cl_2 ; (iv) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$.

57–71% yield by reacting **9** and **10** with BBr_3 , respectively.¹³ On the other hand, the free acid forms of **15** and **16** were not obtained when we attempted the de-alkylation of **11** and **12** under trifluoroacetic acid conditions; rather, it appeared that **11** and **12** were easily decomposed under acidic conditions.¹³

Selected physical and spectroscopic properties of *o*-carboranyl-1,3,5-triazine derivatives **9–14** are listed in

Table 1. The presence of the *o*-carboranyl ring was confirmed by the characteristic absorption bands at around $2563\text{--}2606\text{ cm}^{-1}$ assignable to B–H bonds in the infrared spectra. In the ^1H NMR spectra of **9–14**, signals diagnostic for methylene protons of NCH_2 were observed at around δ 3.56–4.25. Key signals detected in the ^{13}C NMR spectra of **9–14** include resonances at around δ 57.2–61.5 (C- β), 59.0–69.9 (NCH_2), 72.4–75.7 (C- α), and 163.4–175.6 (triazine ring). Sequential

Table 1. Summary of selected physical and spectral properties of the *o*-carboranyl-1,3,5-triazine derivatives **9–14**

$R_1 = \text{Carboranyl}, \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3), \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$
 $R_2 = \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3), \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$

No.	Compound	Mp ^a (°C)	Yield ^b (%)	IR (B–H)	NMR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$)				
					C(NCH_2)	C(OCH_2)	C(triazine)	C(α)	C(β)
1	9	97–98	18	2584	3.57 (m) 49.0	3.84 (m) 69.9	163.4, 167.5	72.7	4.5 (s) 59.0
2	10	120–122	80	2563	3.56 (t) 49.0	3.83 (t) 69.9	163.5, 167.5	72.8	4.42 (s) 59.0
3	11	104–106	12	2606	4.20 (d) 50.5 (d)		164.9, 166.5	73.9	4.43 (s) 56.2
4	12	102–104	72	2582	4.24 (s) 51.2		164.4, 167.2	72.4	4.36 (s) 56.2
5	13	106–107	54	2600	3.81 (t) 51.6 (d)	3.87 (t) 59.0	164.0, 167.3	73.5	5.28 (s) 57.6
6	14	108–110	71	2600	3.81 (t) 51.6 (d)	3.87 (t) 59.0	164.0, 167.3	73.5	5.28 (s) 57.6

^a Melting points are uncorrected.

^b Purified yields.

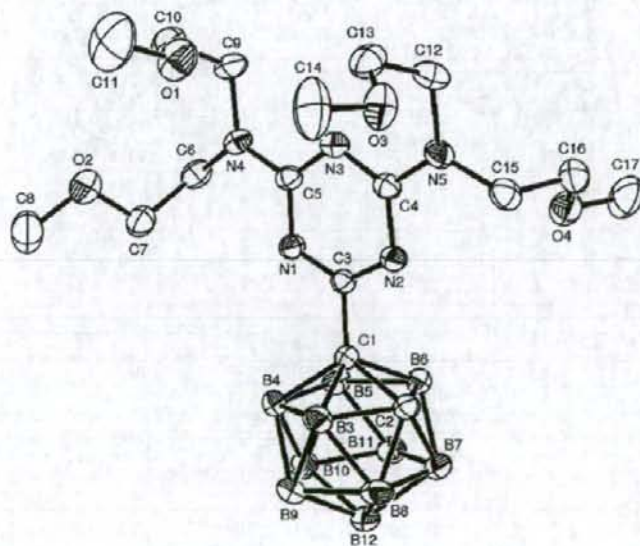


Figure 2. Molecular structure of compound **9**. The thermal ellipsoids are drawn at the 30% probability level.