

Hypoxia-inducible factor inhibitors

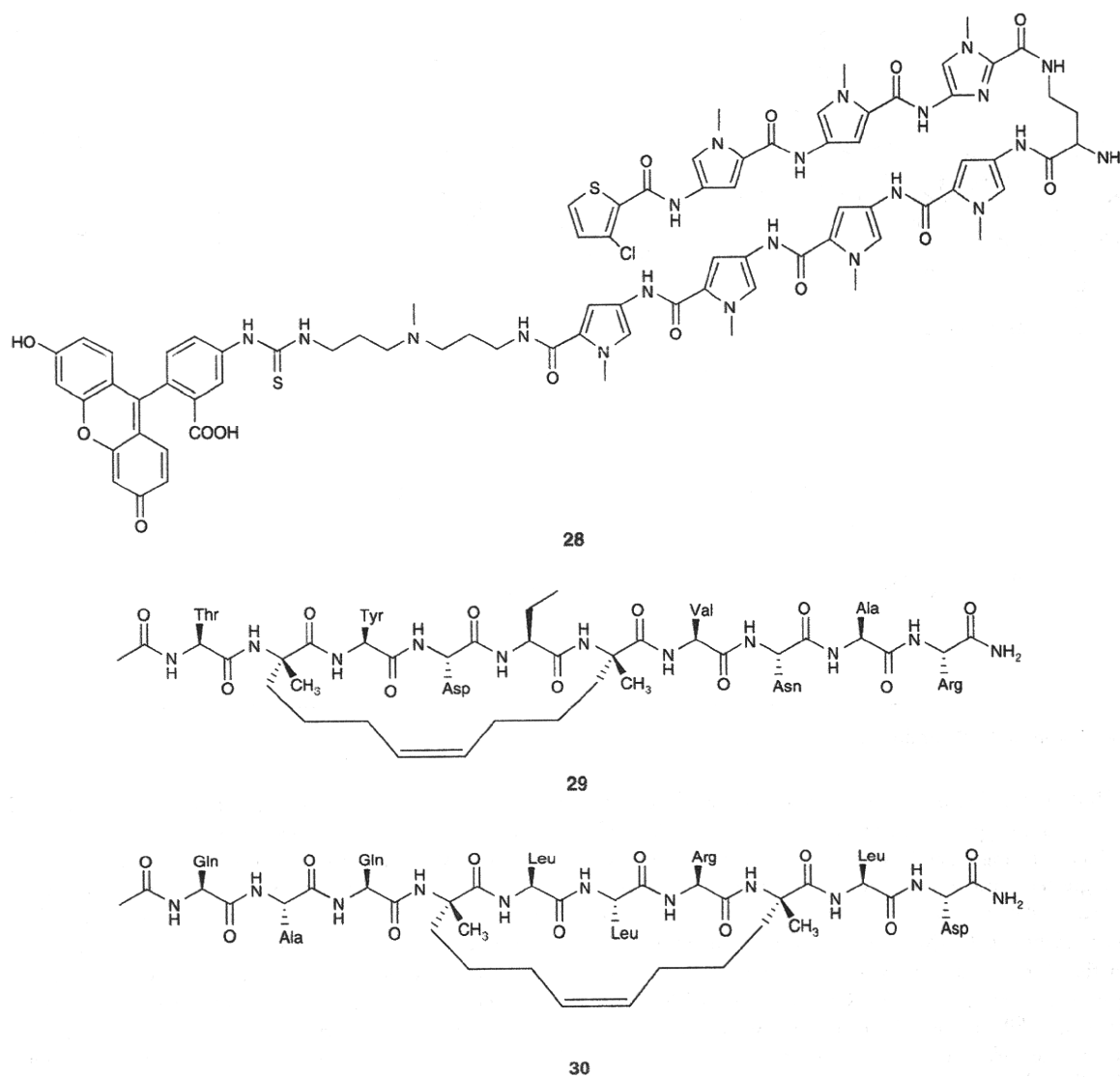


Figure 6. Peptic HIF inhibitors.

5. Natural product-based HIF inhibitors

5.1 Geldanamycin derivatives

Benzoquinone ansamycin antibiotic geldanamycin is a HSP90-specific inhibitor and exhibits potent anticancer activity [82]. Various geldanamycin analogs such as 17-allylaminogeldanamycin (17-AAG/tanespimycin, compound 31 in Figure 7), a less toxic and more stable analog, 17-allyl-amino-17-demethoxygeldanamycin and a water-soluble analog have been reported [83]. Interestingly, geldanamycin and its analogs exert inhibitory effects on HIF activation through the induction of proteasomal degradation of HIF-1 α [84,85]. The action mechanism that has been reported

indicates that tanespimycin induces the reduction of HSP90 binding to HIF-1 α and leads to increased binding of receptor of activated C kinase-1, which recruits elongin C and its E3 ligase complex to HIF-1 α , resulting in degradation through ubiquitin-proteasome pathway [86]. A patent application from Massachusetts Eye & Ear Infirmary claimed the use of 17-AAG for treatment of uveitis through the inhibition of HIF-1 α [87]. 17-AAG suppressed lipopolysaccharide (LPS)-induced upregulation of HIF-1 α in leukocytes from rats with endotoxin-induced uveitis, without affecting the expression of LPS receptor CD14. Consequently, the LPS-induced expression of VEGF was inhibited by tanespimycin.

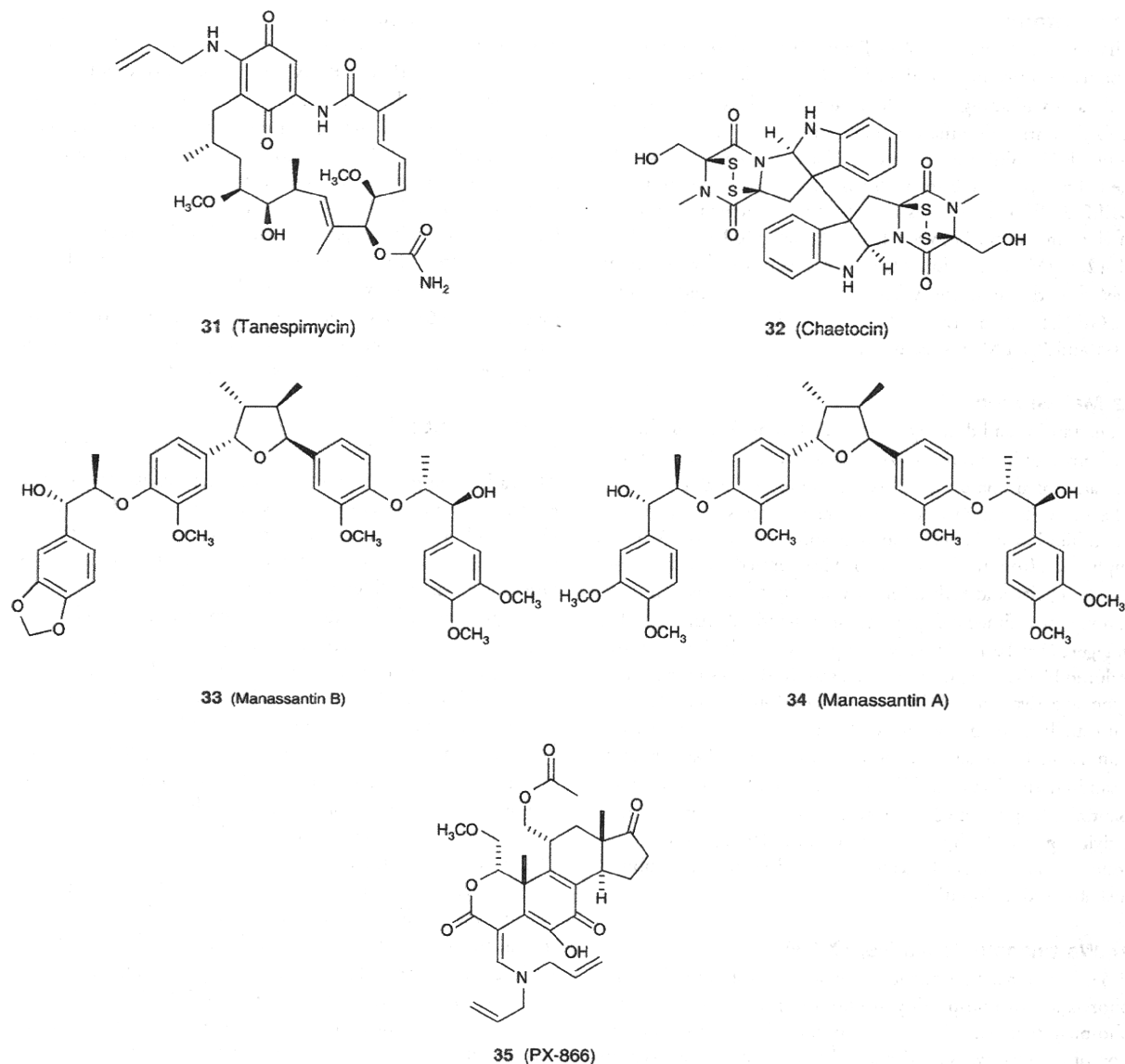


Figure 7. Natural products and derivatives.

In Phase I clinical trials, tanespimycin was tolerated in patients even though HSP90 is present in both normal and cancer cells. Tanespimycin has a 100-fold higher binding affinity to Hsp90 in multichaperone complexes with high ATPase activity derived from tumor cells than Hsp90 in a latent uncomplexed state from normal cells [88]. A Phase II clinical study in patients with metastatic papillary and clear cell renal cell carcinoma showed that tanespimycin did not achieve objective response in the treatment of either cohort patients [89]. Meanwhile, in a Phase II clinical trial with patients with metastatic melanoma, one of eleven patients treated with tanespimycin had SD for 6 months

and median survival for all patients was 173 days. Therefore, further study of tanespimycin in melanoma is now in consideration [90]. A Phase I dose-escalation study in patients with relapsed/refractory multiple myeloma revealed that tanespimycin monotherapy was well tolerated and demonstrated activity at all tested doses (150 – 525 mg/m²) [91].

Phase I or II clinical studies of tanespimycin in combination with other chemotherapeutic agents including sorafenib (renal cancer, melanoma) [92], bortezomib (multiple myeloma), herceptin (Her-2 positive breast cancer) and gleevec (myelogenous leukemia) are currently under investigation.

Hypoxia-inducible factor inhibitors

5.2 Chaetocin

Chaetocin (compound 32 in Figure 7) is a thiodioxopiperazine natural product produced by *Chaetomium* species fungi and has a wide range of biologic activities, including antimicrobial, anti-inflammatory and anticancer effects [93]. In 2006, HIF inhibitor activity of chaetocin was disclosed by Cell Therapeutics Europe S.R.L. [94]. From the result of DELFIA fluorescence assay, chaetocin showed inhibition of the interaction between HIF-1 α and p300 with an IC₅₀ of 12.5 μ M. Inhibition of VEGF expression by chaetocin was carried out using VEGF-luciferase assay and secreted VEGF ELISA assay in Hep3B, and IC₅₀ values were 0.04 and 0.1 μ M, respectively.

5.3 Manassantin

Manassantins and dineolignans isolated from *Saururus chinensis* are known to have various biological activities, such as neuroleptic, anti-inflammatory and ACAT inhibitory activities [95-97]. The anti-inflammatory activity of manassantins is mediated by the inhibition of NF- κ B transactivation activity [98]. A patent application from the University of Mississippi disclosed the anticancer activity and HIF-inhibitory activity of manassantins [99]. Among the claimed compounds, manassantin B (compound 33 in Figure 7) at 10 and 100 nM completely inhibited the hypoxia-induced HIF-1 α expression. Manassantin B also suppressed the hypoxic activation of HIF-1 in T47D cell-based reporter assay with an IC₅₀ of 3 nM. Recently, another patent application from Duke University claimed the use of new and known manassantin derivatives as an HIF inhibitor [100]. Specifically, manassantin A (compound 34 in Figure 7) showed potent inhibitory activity against the hypoxia-induced HIF-1 α expression at the concentration range of 1 nM to 1 μ M, and a complete inhibition was observed at 100 nM.

5.4 Wartmannin derivative, PX-866

PI3K is a signal transduction enzyme that catalyzes the phosphorylation of phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate to form phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate in response to activation of receptor tyrosine kinases, GPCRs or cytokine receptors. TGF- α is a ligand for the EGFR. EGFR activates several signaling pathways including PI3K. Because EGFR activation is associated with fibroproliferative processes in human lung disease, the PI3K-Akt pathway mediates TGF- α -induced pulmonary fibrosis. PX-866 (compound 35 in Figure 7), a wartmannin derivative, has shown inhibition of PI3K to prevent TGF- α -induced pulmonary fibrosis [101]. Induction of lung-specific TGF- α expression in transgenic mice caused progressive pulmonary fibrosis over a 4-week period. The increase in levels of phosphorylated Akt was blocked by treatment with PX866 [102]. A Phase I clinical trial is now underway.

6. RNA antagonist, EZN-2968

EZN-2968 is a RNA antagonist composed of a third-generation oligonucleotide, locked nucleic acid, a technology that

specifically binds and inhibits the expression of HIF-1 α mRNA. EZN-2968 induced a potent, selective and durable antagonism of HIF-1 mRNA and protein expression (IC₅₀, 1 – 5 nM) under both normoxia and hypoxia associated with cell growth inhibition in human prostate and glioblastoma cells. Administration of EZN-2968 to normal mice led to specific, dose-dependent and highly potent downregulation of endogenous HIF-1 α and VEGF in the liver. Tumor reduction was found in nude mice implanted with DU145 human prostate cancer cells treated with EZN-2968 [103-105]. A Phase I clinical study in patients with advanced malignancies revealed that EZN-2968 was well tolerated in previously treated patients. Pharmacokinetic data do not show accumulation of EZN-2968. Final results have not been reported yet [106].

7. Expert opinion

The earliest insight into the transcriptional regulation of EPO gene expression, activated by hypoxia, led to the discovery of HIF-1 and its first biochemical purification and characterization were achieved by Wang and Semenza [107]. Targeting HIF has been studied in two different therapies for the last decade: anemia caused by chronic kidney disease and neovascularization in solid tumors. HIF-1 α a stabilized subunit under normoxia provides a possible approach for treatment of anemia. PHD regulates the HIF-1 α subunit at the protein level in response to cellular oxygen concentration; thus, a wide variety of PHD inhibitors have been developed for erythropoiesis stimulating agents [108]. Patenting activity relating to inhibitors of neovascularization in solid tumors has increased exponentially in the last 7 years.

Although various small molecules have been developed as HIF-1 inhibitors, their inhibition mechanisms still are not clear in many cases. The most important HIF-1 α regulatory systems are PI3K/Akt/mTOR, MAPK, the HSP90 system, topoisomerase I and Trx-1 [109]. Clinical trials have been carried out with several HIF-1 inhibitors, including tenaspimycin, PX-866, PX-12, EZN-2968 and PX-478 in the last 7 years. Among them, tenaspimycin has been most widely studied in clinical trials. HSP90, a target protein of tenaspimycin, is a molecular chaperone, and 48 proteins of the 280 reported Hsp90 client proteins are involved in cell growth and various signal cascades. Several client proteins are oncogenes and responsive to HSP90 inhibitors, and the most sensitive client appears to be Her2, which is followed by mutant EGFR, Raf, Akt, mutant BRAF and wild-type EGFR, in this order. Although monotherapy of tenaspimycin was not effective in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma [99], the strategy using tenaspimycin in combination with other chemotherapeutic agents, which target those HSP90 inhibitor-sensitive clients, is probably effective for inducing antitumor activity. In this regard, the current clinical studies of tenaspimycin in combination with other chemotherapeutic agents including sorafenib (Raf), bortezomib (proteasome), herceptin (Her-2) and gleevec (Bcr-Abl) would result in promising approaches.

Another promising approach seems to be inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway, which may be effective against tumors by two distinct mechanisms, by directly blocking tumor cell growth and by inhibition tumor angiogenesis. Various PI3K inhibitors have been studied in clinical trials and the early findings suggest that the drugs are relatively well tolerated and downregulation of the pathway has been achieved [110]. However, there have been relatively few clinical responses. Signaling pathways in cancer are complex and the blocking of single pathways is not sufficient to suppress malignant growth and progression in tumors. Therefore, a combination strategy is considered to be more potent than single agent therapy.

All of the above molecules except EZN-2968 are likely to have off-target effects. EZN-2968 is a RNA antagonist targeting HIF-1 α mRNA and directly inhibits HIF-1 α expression. Therefore, EZN-2968 is considered to have the best potential for specific HIF-1 α inhibition. Promising results of the clinical studies are expected.

High tumor HIF-1 activity is an independent predictor of poor prognosis after radiotherapy [111]. HIF-1 is upregulated in irradiated tumors and serves as a promising target for radiosensitization. Radiation causes tumor oxygenation to increase, causing, in turn, both the accumulation of tumor-reactive oxygen/nitrogen species and the depolymerization of stress granules. These two events lead to increased expression of

HIF-1 and its target downstream genes. As a result, the increased expression of HIF-1-regulated cytokines delivers survival signals to tumor endothelium, resulting in tumor radioresistance through vascular radioprotection. Tumor radioresistance is predominantly mediated by tumor-stromal interactions and the capacity of a tumor to compensate for radiation-induced vascular damage through ischemic HIF-1-dependent angiogenic signaling. Inhibition of post-radiation HIF-1 signaling with PX-478 is a promising strategy to disrupt this adaptive cascade and to overcome tumor radioresistance [112].

HIF-1 induces a vast array of gene products controlling energy metabolism, neovascularization, survival, pH and cell migration for tumor growth. Nevertheless, the half-life of HIF-1 α protein is only several minutes under normal oxygenated conditions. Therefore, HIF-1 is an attractive therapeutic target with great potential, and HIF inhibitor may have not only cytostatic antitumor effects with fewer side effects but also synergistic effects combined with radiotherapy.

Declaration of interest

The authors have received financial support in part by a Grant-on-Aid for scientific research on priority areas "Cancer Therapy" from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. They declare no other conflict of interest.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

- Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5510-14
- Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, et al. Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12436-41
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5
- Ohh M, Park CW, Ivan M, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000;2:423-7
- Yu F, White SB, Zhao Q, et al. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9630-5
- Cockman ME, Masson N, Mole DR, et al. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000;275:25733-41
- Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, et al. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999;274:6519-25
- Berra E, Richard DE, Gothie E, et al. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett* 2001;491:85-90
- Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem* 2002;16:1466-71
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-72
- **Presents the mechanisms that regulate HIF-1 α degradation by oxygen.**
- Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464-8
- Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002;16:1151-62
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in

Hypoxia-inducible factor inhibitors

- common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5
- **Describes the *in vivo* experiments that validate HIF as a target for cancer.**
16. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:273-86
 17. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441:437-43
 - **Highlights the features of hypoxia signaling.**
 18. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:967-75
 19. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32
 - **Reviews the potential of HIF-1 as a therapeutic target in cancer.**
 20. Kirkpatrick DL, Kuperus M, Dowdeswell M, et al. Mechanisms of inhibition of the thioredoxin growth factor system by antitumor 2-imidazolyl disulfides. *Biochem Pharmacol* 1998;55:987-94
 21. Welsh SJ, Williams RR, Birmingham A, et al. The thioredoxin redox inhibitors 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide and pleurotin inhibit hypoxia-induced factor 1 α and vascular endothelial growth factor formation. *Mol Cancer Ther* 2003;2:235-43
 22. Ramanathan RK, Kirkpatrick DL, Belani CP, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of PX-12, a novel inhibitor of thioredoxin-1, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13:2109-14
 23. ProX Pharmaceuticals. Compositions and methods for using asymmetric disulfides. WO082686; 2009
 24. Ramanathan RK, Abbruzzese J, Dragovich T, et al. A randomized phase II study of PX-12, an inhibitor of thioredoxin in patients with advanced cancer of the pancreas following progression after a gemcitabine-containing combination. *Cancer Chemother Pharmacol* 12 May 2010. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00280-010-1343-8
 25. Welsh S, Williams R, Kirkpatrick L, et al. Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Cancer Ther* 2004;3:233-44
 26. ProX Pharmaceuticals. N-Oxides and derivatives of melphalan for treating diseased states associated with hypoxia inducible factor. WO043359; 2004
 27. ProX Pharmaceuticals. Regulation of HIF protein levels via deubiquitination pathways. WO007828; 2005
 28. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 2000;14:34-44
 29. ProX Pharmaceuticals. Method of pre-selecting patients for anti-VEGF, anti-HIF-1 or anti-thioredoxin therapy. WO023658; 2006
 30. Board of regents of the University of Texas System. Compositions and methods for treating lung cancer. WO102960; 2009
 31. Tibes R, Falchook GS, Von Hoff DD, et al. Results from a phase I, dose-escalation study of PX-478, an orally available inhibitor of HIF-1 α . *J Clin Oncol* 2010;28(Suppl):3076
 32. Teng CM, Wu CC, Ko FN, et al. YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits platelet-rich thrombosis in mice. *Eur J Pharmacol* 1997;320:161-6
 33. Galle J, Zabel U, Hubner U, et al. Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol* 1999;127:195-203
 34. Chun YS, Yeo EJ, Choi E, et al. Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells. *Biochem Pharmacol* 2001;61:947-54
 35. Hif Bio, Inc. Method for inhibiting tumor angiogenesis and tumor growth. WO091648; 2004
 36. Hif Bio, Inc. Compounds, compositions and methods. WO030121; 2005
 37. Hif Bio, Inc. Anti-angiogenesis compounds. WO065010; 2007
 38. Emory University and Scripps Research Institute. HIF-1 inhibitors. WO087066; 2004
 39. Emory University and Scripps Research Institute. HIF inhibitors. WO025169; 2007
 40. Nicolaou KC, Pfefferkorn JA, Roecker, AJ, et al. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1. General principles and solid-phase synthesis of benzopyrans. *J Am Chem Soc* 2000;122:9939-53
 41. Nicolaou KC, Pfefferkorn JA, Mitchell HJ, et al. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 2. Construction of a 10000-membered benzopyran library by directed split-and-pool chemistry using NanoKans and optical encoding. *J Am Chem Soc* 2000;122:9954-67
 42. Nicolaou KC, Pfefferkorn JA, Barluenga S, et al. Natural Product-like Combinatorial Libraries based on privileged structures. 3. The 'Libraries from Libraries' Principle for diversity enhancement of benzopyran libraries. *J Am Chem Soc* 2000;122:9968-76
 43. Emory University. Small molecule inhibitors of HIF and angiogenesis. WO006184; 2010
 44. Emory University and Scripps Research Institute. Small molecule inhibitors of HIF and angiogenesis. WO006189; 2010
 45. National Cancer Institute. Tricyclic compounds as inhibitors of the hypoxic signal pathway. WO118580; 2005
 46. Lee HH, Palmer BD, Boyd M, et al. Potential antitumor agents. 64. Synthesis and antitumor evaluation of dibenzo[1,4]dioxin-1-carboxamides: a new class of weakly binding DNA-intercalating agents. *J Med Chem* 1992;35:258-66
 47. Creighton-Gutteridge M, Cardellina JH II, Stephen AG, et al. Cell type-specific, topoisomerase II-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1 α protein accumulation by NSC 644221. *Clin Cancer Res* 2007;13:1010-18
 48. Cell Therapeutics Euro S.R.L. Use of thiazolidinone derivatives as antiangiogenic agents. WO066846; 2006
 49. University of Texas. Compositions and methods for inhibition of tyrosine kinases. WO030795; 2008

50. Piramal Life Sciences Ltd. Pyridyl derivatives, their preparation and use. WO019656; 2009
51. Yewalkar N, Deore V, Padgaonkar A, et al. Development of novel inhibitors targeting HIF-1 α towards anticancer drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20:6426-9
52. Noguchi T, Fujimoto H, Sano H, et al. Angiogenesis inhibitors derived from thalidomide. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15:5509-13
53. Charlesson LLC. Thalidomide analogs for treating vascular abnormalities. WO154353; 2008
54. Charlesson LLC homepage. Available from: <http://www.charlessonllc.com/index.html>
55. Bayer Schering Pharma AG. Heteroaryl substituted pyrazole derivatives useful for treating hyper-proliferative disorders and diseases associated with angiogenesis. WO141731; 2008
56. Bayer Schering Pharma AG. Aminoalkyl-substituted compounds as HIF inhibitors. WO054762; 2010
57. Bayer Schering Pharma AG. Heterocyclically substituted aryl compounds as HIF inhibitors. WO054763; 2010
58. Bayer Schering Pharma AG. Heteroaromatic compounds for use as HIF inhibitors. WO054764; 2010
59. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology. Compounds that inhibit HIF-1 activity, the method for preparation thereof and the pharmaceutical composition containing them as an effective component. WO004798; 2008
60. Lee K, Kang JE, Park SK, et al. LW6, a novel HIF-1 inhibitor, promotes proteasomal degradation of HIF-1 α via upregulation of VHL in a colon cancer cell line. *Biochem Pharmacol* 2010;80:982-9
61. Lee K, Lee JH, Boovanahalli SK, et al. (Aryloxyacetyl amino)benzoic acid analogues: A new class of hypoxia-inducible factor-1 inhibitors. *J Med Chem* 2007;50:1675-84
62. Won MS, Im N, Park S, et al. A novel benzimidazole analogue inhibits the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385:16-21
63. Shimizu K, Maruyama M, Yasui Y, et al. Boron-containing phenoxyacetanilide derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20:1453-6
64. Ban HS, Shimizu K, Minegishi H, et al. Identification of HSP60 as a primary target of o-carboranylphenoxyacetanilide, an HIF-1 α inhibitor. *J Am Chem Soc* 2010;132:11870-1
65. Centro de Investigacion Principe Felipe. Pharmaceutical composition for inhibiting the transcription factor inducible by hypoxia, modulators of pathological processes of angiogenesis, oncogenesis, inflammation, apoptosis, and cellular therapy. WO112615; 2009
66. Moreno-Manzano V, Rodriguez-Jimenez FJ, Acena-Bonilla JL, et al. FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *J Biol Chem* 2010;285:1333-42
67. Rodriguez-Jimenez FJ, Moreno-Manzano V, Mateos-Gregorio P, FM19G11: a new modulator of HIF that links mTOR activation with the DNA damage checkpoint pathways. *Cell Cycle* 2010;9:2803-13
68. Threshold Pharmaceuticals. Combination therapies for the treatment of cancer. WO064734; 2004
69. Cell Therapeutics Europe S.R.L. Indole derivatives with antitumor activity. WO066923; 2006
70. Bionaut Pharmaceuticals. Anti-neoplastic agents, combination therapies and related methods. WO060951; 2005
71. Bionaut Pharmaceuticals. Pancreatic cancer treatment using Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors. WO028969; 2006
72. Bionaut Pharmaceuticals. Treatments of refractory cancers using Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors. WO029020; 2006
73. Bionaut Pharmaceuticals. Combinatorial chemotherapy treatment using Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors. WO029018; 2006
74. Bionaut Pharmaceuticals. Use of Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors and antagonists thereof. WO044916; 2006
75. Bionaut Pharmaceuticals. Modulators of hypoxia inducible factor-1 and related uses for the treatment of ocular disorders. WO016656; 2007
76. Btg International. Modulators of hypoxia inducible factor-1 and related uses. WO081835; 2007
77. Btg International. Modulators of hypoxia inducible factor-1 and related uses. WO093086; 2008
78. Sri International. Method and composition for inhibiting cell proliferation and angiogenesis. WO113842; 2006
79. Duellman SJ, Caloagan JM, Sato BG, et al. A novel steroidal inhibitor of estrogen-related receptor alpha (ERR α). *Biochem Pharmacol* 2010;80:819-26
80. California Institute of Technology. Compositions and methods for inhibiting expression of hypoxia-inducible genes. WO120582; 2005
81. Aileron Therapeutics. Peptidomimetic macrocycles. WO034028; 2010
82. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, et al. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8324-8
83. Kaur G, Belotti D, Burger AM, et al. Antiangiogenic properties of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin: an orally bioavailable heat shock protein 90 modulator. *Clin Cancer Res* 2004;10:4813-21
84. Majeesh NJ, Post DE, Willard MT, et al. Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1 α protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:2478-82
85. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, et al. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α -degradative pathway. *J Biol Chem* 2002;277:29936-44
86. Liu YV, Baek JH, Zhang H, et al. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O₂-independent and

Hypoxia-inducible factor inhibitors

- HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol Cell* 2007;25:207-17
87. Massachusetts Eye & Ear Infirmary. Inflammatory eye disease. WO105077; 2005
88. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 2003;425:407-10
89. Ronnen EA, Kondagunta GV, Ishill N, et al. A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* 2006;24:543-6
90. Pacey S, Gore M, Chao D, et al. A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs* 5 Aug 2010. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s10637-010-9493-4
91. Richardson PG, Chanan-Khan AA, Alsina M, et al. Tanespimycin monotherapy in relapsed multiple myeloma: results of a phase 1 dose-escalation study. *Br J Haematology* 2010;150:438-45
92. Vaishampayan UN, Burger AM, Sausville EA, et al. Safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the combination of sorafenib and tanespimycin. *Clin Cancer Res* 2010;16:3795-804
93. Isham CR, Tibodeau JD, Jin W, et al. Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood* 2007;109:2579-88
94. Cell Therapeutics Europe S.R.L. Use of diketodithiopiperazine antibiotics for the preparation of antiangiogenic pharmaceutical compositions. WO066775; 2006
95. Rao KV, Puri VN, Diwan PK, et al. Preliminary evaluation of manassantin A, a potential neuroleptic agent from *Saururus cernuus*. *Pharmacol Res Commun* 1987;19:629-38
96. Hwang BY, Lee J-H, Nam JB, et al. Lignans from *Saururus chinensis* inhibiting the transcription factor NF- κ B. *Phytochemistry* 2003;64:765-71
97. Lee WS, Lee D-W, Baek Y-I, et al. Human ACAT-1 and -2 inhibitory activities of saucerneol B, manassantin A and B isolated from *Saururus chinensis*. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:3109-12
98. Lee JH, Hwang BY, Kim KS, et al. Suppression of RelA/p65 transactivation activity by a lignoid manassantin isolated from *Saururus chinensis*. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1925-33
99. The University of Mississippi. *Saururus cernuus* compounds that inhibit cellular responses to hypoxia. WO110348; 2004
100. Duke University. Manassantin compounds and methods of making and using same. WO059858; 2010
101. University of Arizona. Wortmannin analogs and methods using same. WO024183; 2003
102. Le Cras TD, Korfhagen TR, Davidson C, et al. Inhibition of PI3K by PX-866 prevents transforming growth factor- α -induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathology* 2010;176:679-86
103. Enzon Pharmaceuticals, Inc. Potent LNA oligonucleotides for the inhibition of HIF-1 α expression. WO0286859; 2009
104. Enzon Pharmaceuticals, Inc. Oligomeric compounds for the modulation of HIF-1 α expression. WO0093839; 2010
105. Greenberger LM, Horak ID, Filpula D, et al. A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1 α . EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3598-608
106. Patnaik A, Chiorean EG, Tolcher A, et al. EZN-2968, a novel hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) messenger ribonucleic acid (mRNA) antagonist: results of a phase I, pharmacokinetics (PK), dose-escalation study of daily administration in patients (pts) with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2009;27:abstract 2564
107. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1230-7
108. Yan L, Colandrea VJ, Hale JJ, Prolyl hydroxylase domain-containing protein inhibitors as stabilizers of hypoxia-inducible factor: small molecule-based therapeutics for anemia. *Expert Opin Ther Patients* 2010;20:1219-45
109. Diaz-Gonzalez JA, Russell J, Rouzaut A, et al. Targeting hypoxia and angiogenesis through HIF-1 α inhibition. *Cancer Biol Ther* 2005;4:1055-62
110. Liu P, Cheng H, Roberts TM, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:627-44
111. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001;61:2911-16
112. Schwartz DL, Powis G, Thitai-Kumar A, et al. The selective hypoxia inducible factor-1 inhibitor PX-478 provides in vivo radiosensitization through tumor stromal effects. *Mol Cancer Ther* 2009;8:947-58

Affiliation

Hyun Seung Ban¹ PhD, Yoshikazu Uto² PhD & Hiroyuki Nakamura³ PhD
¹Author for correspondence
¹Gakushuin University, Department of Chemistry, Faculty of Science, 1-5-1, Mejiro, Toshima-ku, Tokyo, 171-8588, Japan
²Medicinal Chemistry Research Lab. Sankyo Co., Ltd., 1-2-58, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo, 140-8710, Japan
³Professor, Gakushuin University, Department of Chemistry, Faculty of Science, 1-5-1, Mejiro, Toshima-ku, Tokyo, 171-8588, Japan
Tel: +81 3 3986 0221;
Fax: +81 3 5992 1029;
E-mail: hiroyuki.nakamura@gakushuin.ac.jp

ホウ素の中性子捕捉反応を利用した低侵襲細胞選択的放射線療法

中村 浩之

Minimally Invasive Cytoselective Radiation Therapy Using Boron Neutron Capture Reaction

Hiroyuki NAKAMURA

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

(Received September 1, 2010)

The cell-killing effect of boron neutron capture therapy (BNCT) is due to the nuclear reaction of two essentially nontoxic species, boron-10 (^{10}B) and thermal neutrons, whose destructive effect is well observed in boron-loaded tissues. 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 liposomal boron delivery system (BDS) as a recent promising approach that meet 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. In this review, recent development of liposomal boron delivery system is summarized.

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

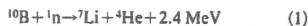
1. はじめに

高齢化の進むわが国の死亡原因の第一位はがんであり、2人に1人ががんを発病し3人に1人ががんで死亡している。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・放射線療法・化学療法の複合治療によって、治療率の改善が図られてきた。特に、近年サイバーナイフやガンマナイフ、重粒子線療法などの技術の進歩により放射線治療を受ける患者数は年々増加しており、最近では年間に18万人以上の患者が放射線治療を受けている。化学療法では分子標的治療薬が開発されいくつかのがんに対しては、副作用が抑えられるようになりつつあるが、しかし多くの場合、依然全身的な副作用との戦いが強い。放射線治療では、技術の進歩によりミリ単位で照射野を制御できるようにはなったが、浸潤しているがんを細胞レベルで照射することはできない。しかしながら、これらの化学療法

と放射線療法の両方の原理をうまく利用し、細胞選択的に照射が可能であるホウ素中性子捕捉療法 (BNCT: boron neutron capture therapy) が次世代放射線療法として注目されている。¹⁾

2. ホウ素中性子捕捉療法の原理

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2.4 MeV とおよそ細胞1つを殺傷するのに十分であり、その飛行は細胞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。



3. ホウ素中性子捕捉療法の歴史と現状

BNCTの概念は、1936年にLocherによって最初に提唱された。²⁾その後、1951年から米国ブルックヘブン国立研究所 (BNL) 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Farr及びSweetらによって開始され、10年間で45例のBNCTが

学習院大理学部化学科 (〒171-8588 東京都豊島区白 1-5-1)

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

本誌説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS10で発表したものを中心に記述したものである。

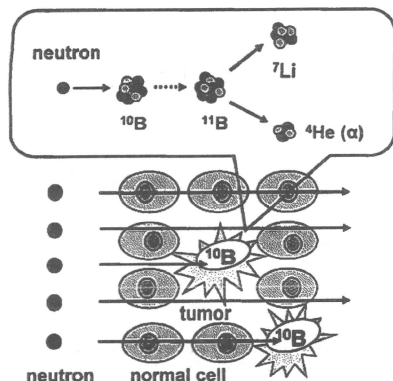


Fig. 1. Concept of BNCT

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ゆえに治療成績が悪く、1961年に治療が中断された。³⁾

日本では、1968年、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（BSH: mercaptoundecahydrododecaborate）を用いて世界で初めて脳腫瘍のBNCTに成功した。⁴⁾ 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。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難いが、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300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）⁵⁾を用いて悪性黒色腫のBNCTに成功した。⁶⁾ 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、京都府立医大の今堀・上田らにより¹⁸F-BPAを用いたPET（positron emission tomography）診断法が開発された。この診断法によって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だけでなく、¹⁸F-BPAが多くの悪性腫瘍に集積することも分かった。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。⁸⁾ 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、再発耳下腺がん患者に対し、BSHとBPAの併用BNCTを行い、9ヵ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みられなかった。この成功をきっかけにBNCTの適応拡大が進められ、頭頸部がん以外にも、肝臓がん、肺がん、胸壁腫瘍などの適応疾患の拡大とともにBNCTの症例数が増加している。⁹⁻¹¹⁾

その一方で、ホウ素薬剤である¹⁰B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社と共同で、¹⁰B濃縮したBSHとBPAの国産化に成功し、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。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



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、ヒツパ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学会奨励賞受賞。

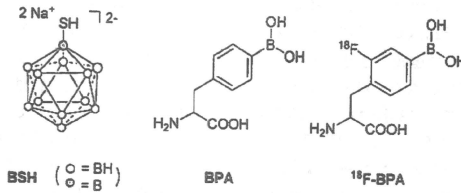


Fig. 2. Structures of BSH, BPA, and ^{18}F -BPA Used for Clinical Treatments

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。現在、BPA を用いた小型加速器 BNCT の臨床治験に向けた研究が、京都大学と住友重機械工業㈱・ステラファーマ㈱の産学共同研究で進められている。

4. 次世代型ホウ素デリバリーシステム

さて、効果的に BNCT を行うためには選択的かつ高濃度でがん細胞にホウ素 10 を送り込むことが必要である。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並びに腫瘍/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 以上でなおかつ、腫瘍/血液並びに腫瘍/正常組織のホウ素濃度比が 5 以上）を達成するために、様々なホウ素キャリアの開発研究が行われてきた。ホウ素キャリアに望まれることは、(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であり、リポソームを用いたホウ素デリバリーシステム (boron delivery system; BDS) が有望であると注目されている。

リポソームを用いる利点として、(i) 一度に大量のホウ素 10 をがん細胞に送り込むことが可能であること、(ii) ホウ素薬剤自体に薬理活性を持たせる必要がないこと、(iii) 受容体選択性を高めるためにリポソーム表面に対応するリガンドを導入することにより能動的な送達 (アクティブターゲティング) が可能であること、が挙げられる。リポソームを用

いたホウ素デリバリー法として、大きく 2 つの方法に分けられる。1 つは、リポソーム内にホウ素薬剤を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 つの方法は、リポソーム膜にホウ素を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。様々なリガンドをリポソーム膜に結合させることにより、能動的に標的がん細胞に取り込ませるような機能をリポソームに持たせることが可能となってきた。

4-1. ホウ素薬剤内封型リポソーム ホウ素薬剤内封リポソーム型 BDS の最初の報告は、柳脩らによる anti-human CEA (carcinoembryonic antigen) モノクローナル抗体を結合させた BSH 内封イムノリポソームであった。AsPC-1 (ヒト膵臓がん) 細胞を移植したヌードマウスを用いた実験では、BSH 封入イムノリポソームを投与し中性子照射したマウスにおいて、腫瘍増量が 50% 以下に抑えられることを見出した。^{12,13)} Hawthorne らは、DSPC (distearoyl phosphatidylcholine) とコレステロールを用いて、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ている。^{14,15)}

ホウ素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葉酸、¹⁶⁾ 細胞増殖因子の 1 つである EGF (上皮細胞増殖因子)、¹⁷⁾ トランスフェリン、^{18,19)} EGF R モノクローナル抗体 (Cetuximab)²⁰⁾ などのリガンドを表面に導入したリポソームの開発研究が行われてきた。Table 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ポソームに関する内封ホウ素薬剤、リポ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。

4.2. ホウ素脂質型リボソーム 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ることで、高濃度 BDS が達成できる可能性が示されてきた。使用されているホウ素封入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。実際に、われわれはリボソーム膜からの内封ホウ素イオンクラスターの漏出を確

認している。また、ホウ素イオンクラスターのリボソームへの封入効率の低さが問題となってきた。そこでわれわれは、リボソームの脂質二分子膜に着目した。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 と化学療法法の複合治療が可能となる。われわれはリボソームの二分子膜を形成しているリン脂質の骨格に着目し、Fig. 3 に示すように水溶性部位であるホスファチジルコリン部位にホウ素原子 9 個と炭素原子 2 個からなるかご状のホウ素イオンクラスター (*nido* 型カルボラン) を導入した二鎖ホウ素イオンクラスター脂質 1 を設計し合成に初めて成功した。²¹⁾ 合成したイオン性ホウ素クラスター脂質 1 は安定なリボソームを形成することが電子顕微鏡などで確認されたが、実際に腫瘍移植マウスを用いた *in vivo* 実験では、ホウ素濃度で

Table 1. Ligand-conjugated Boron-encapsulated Liposomes for Active Targeting

Boron compound	Ligand	Molecular target	Ref.
BSH	anti-human CEA ^a	CEA	12, 13
SPD-5	folic acid	folic acid receptor	16
WSP1	EGF ^b	EGF receptor	17
BSH	TF ^c	TF receptor	18
Na ₂ B ₁₀ H ₁₀	TF	TF receptor	19
Li ₂ B ₁₂ H ₁₂	Cetuximab	EGF receptor	20

^a Carcinoembryonic antigen. ^b Epidermal growth factor. ^c Transferrin.

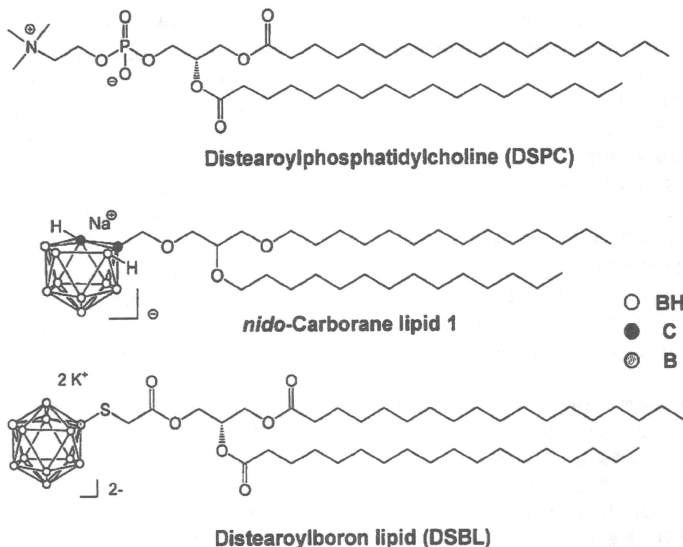


Fig. 3. Structures of a Phospholipid and Boron Lipids

7 mg/kg 投与において中性子照射後に顕著な延命効果がみられたものの、14 mg/kg 投与した場合に重篤な急性毒性がみられた。²³⁾

われわれはこのかご状の *nido* 型カルボランクラスターが毒性に深く関わっていると考えた。そこで、*nido* 型カルボランの代わりに、実際の臨床で用いられている BSH を導入した二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質 DSBL (distearoylboron lipid) を再設計した。このホウ素 12 個からなる 20 面体のホウ素イオンクラスター、dodecaborate 構造を有する BSH は、先にも述べたように脳腫瘍患者の BNCT に使用されており、イオンクラスターであることから高水溶性であり、低毒性で非常に代謝が早く、血中での半減期は数時間であることが分かっている。

しかし、有機合成を考えた場合、この dodecaborate は無機イオンクラスターであり、有機分子への導入は困難であった。われわれは BSH が有するチオール (-SH) 基を手がかりに有機分子を導入することにした。BSH は高水溶性無機イオン化合物でありほとんどの有機溶媒に溶けないが、ナトリウム塩からテトラメチルアンモニウム塩に変えることで高極性非プロトン性溶媒であるアセトニトリルに溶けることが分かった。このことを利用して、アセトニトリル溶媒中で BSH のチオール基のアルキル化反応を行うことで、BSH の有機分子導入に成功した。^{23,24)} 合成した dodecaborate 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を有し、dodecaborate 骨格と S を介して結合している。

5. ホウ素脂質型リポソームの BNCT 効果

5-1. ホウ素脂質のリポソーム化

このようにして合成したホウ素クラスター脂質 DSBL に対し、DSPC、コレステロールを X:1-X:1 で X の値を 0-0.5 の範囲で混合し、逆相蒸発 (REV) 法を用いてリポソームを調製した。エクストルーダーを用いて、100 nm にサイジングした。得られたリポソームのリン脂質とホウ素の濃度を ICP-AES 法を用いて定量し、各々モル比に換算した。Figure 4 に示すように形成したりポソーム膜内の DSBL/DSPC 比は、調整した混合比に比例していることが分かった。さらに、得られたリポソームの粒子径並びにゼータ電位を Table 2 に示したが、DSBL の混合比にかかわらず粒子径は 100 nm 前後に分布してお

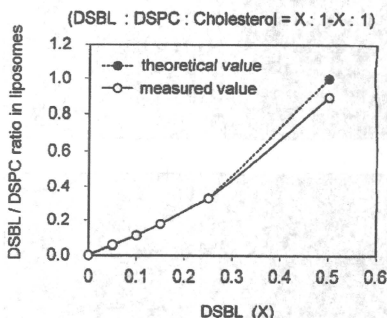


Fig. 4. Composition of DSBL and DSPC in Boronated Liposome Membranes
Boronated liposomes were prepared from DSBL, DSPC, and cholesterol (molar ratio is X:1-X:1).

Table 2. Particle Size, Polydispersity Index, and Zeta Potential of DSBL Liposomes

DSBL X value	Particle size (nm) ^a	Polydispersity index ^a	Zeta potential (mV)
0	94.8±0.62	0.050±0.003	-2.4
0.05	100.5±0.17	0.033±0.011	-42.8
0.1	95.6±1.01	0.022±0.011	-45.7
0.15	99.0±0.20	0.029±0.010	-42.5
0.25	102.0±0.44	0.048±0.005	-45.8
0.5	104.3±0.61	0.034±0.014	-46.7

^a Data are expressed as mean±S.E.M.

り、ゼータ電位は DSBL により負に大きく帯電していることが分かった。また、DSBL (25%) のリポソームに関して、透過型電子顕微鏡測定を行ったところ、直径 100 nm の二分子膜構造を形成していることが分かった。

5-2. Colon 26 細胞への取り込み機構

蛍光脂質 (PKH67) を用いてホウ素リポソームを蛍光標識し、マウス大腸がん細胞 (colon 26) に 37°C で 3 時間インキュベートした。その結果、Fig. 5(A) に示すように細胞質に取り込まれていることが分かった。一方、この蛍光標識ホウ素リポソームを細胞のエンドサイトーシスが起らない条件であるアシ化ナトリウム存在下、4°C で同様に 3 時間インキュベートしたところ、Fig. 5(B) に示すように細胞膜表面に存在しているものの細胞質には取り込まれていないことから、ホウ素リポソームはエンドサイ

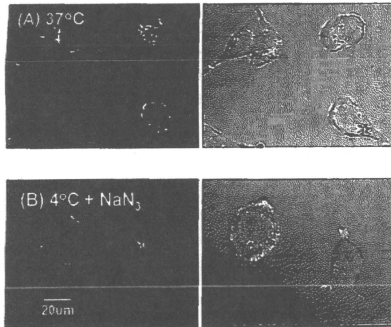


Fig. 5. Intracellular Localization of PKH-labeled Boronated Liposomes

(A) PKH67-labeled DSBL-25% liposomes were incubated at 37°C for 3 h in colon 26 cells, and visualized under a fluorescent confocal microscope. (B) The cells were incubated at 4°C for 3 h with PKH67-labeled DSBL-25% liposomes in the presence of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (1 μM).

トーシスを経由して細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。²⁵⁾

5-3. 腫瘍移植マウスを用いたホウ素リポソームの体内挙動と BNCT 効果 細網内皮系によるリポソームの取り込みを避けるため、調製したリポソームには、PEG 2000 を結合した DSPE (distearoyl phosphatidylethanolamine) を脂質に対して 10% 用いた。DSBL-25% を含むホウ素リポソームを用いて、担がんマウスを用いて体内挙動を調べた。Colon 26 細胞を移植した BALB/c マウス (生後 6 週間, 16–18 g) にホウ素リポソームをホウ素濃度が 20 mg/kg 尾静脈投与した。投与 24–72 時間後に各臓器を分画し、ホウ素濃度を ICP-AES にて測定した。Figure 6 に示すように、脾臓・肝臓では非常に高いホウ素蓄積がみられ、腫瘍内ホウ素蓄積量は、投与 24 時間後にホウ素濃度が 23 ppm であった。

つぎに、Colon 26 細胞を左太腿部に移植した BALB/c マウスにホウ素リポソームをホウ素-10 濃度が 20 mg/kg 投与し、24 時間後にマウスの左太腿部に中性子照射した。BNCT では、標的部位へのホウ素デリバリーと中性子照射のダブルターゲティング治療法であるため、脾臓・肝臓のようにホウ素が高濃度で集積しても、中性子照射をしない限り細胞毒性を示さない。中性子照射は独立行政法人日本

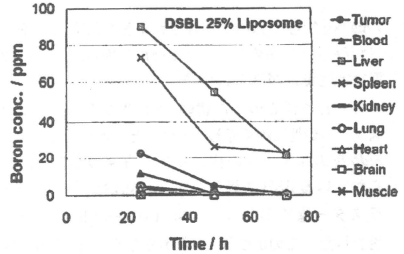


Fig. 6. Time Course of Biodistribution of DSBL-25% PEG Liposomes (20 mg B/kg) Injected into Tumor-bearing Mice (Balb/c, female, 6 weeks old, 14–20 g) via the Tail Vein

原子力研究開発機構東海研究開発センターの原子炉 JRR4 において行い、30 分間照射後 (1.8×10^{12} neutrons/cm²)、経過を 2 週間観察した。本照射実験に用いたマウス照射装置を Fig. 7 に示す。本装置では原子炉運転中にセットしたマウス 16 匹を遠隔で移動させることができ、合計 32 匹のマウスを 1 度に照射することができる。その結果、Fig. 8 に示すように、中性子照射のみのマウス及び中性子照射していないマウス群では、腫瘍が成長したのに対し、ホウ素リポソームを投与し中性子照射したマウス群では、照射後 1 週間で腫瘍の萎縮がみられ、2 週間後も腫瘍の成長を顕著に抑制した。²⁶⁾ 実際には、腫瘍が完全に消失したマウスも数匹みられた。このことから、ホウ素脂質を用いたリポソームによる BDS は、BNCT に対して非常に有効な手法となる可能性が示唆された。

6. 今後の展望

BNCT のためのホウ素キャリアーの開発には、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。現在小型加速器 BNCT の研究が進められ、保険適応型放射線治療法を目指して臨床研究が進められている。この QOL の高い本治療法の適応疾患拡大のためにも、次世代 BNCT に向けた腫瘍部位へのデリバリー効

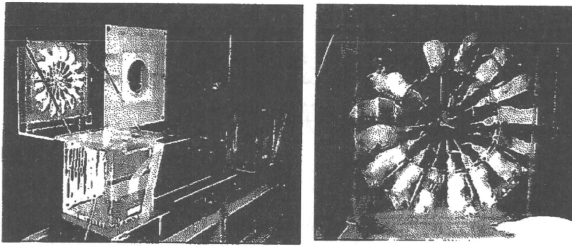


Fig. 7. Neutron Irradiation Apparatus at Japan Atomic Energy Agency Reactor (JRR4)

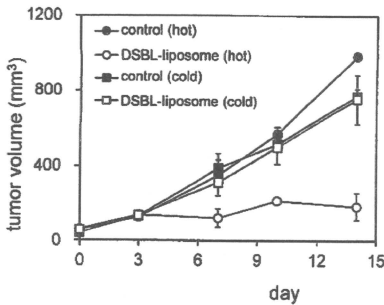


Fig. 8. Tumor Volume in Mice

Mice (Balb/c, female, 6 weeks old, 14–20 g) bearing colon 26 solid tumor with thermal neutron irradiation (hot) for 30 min (1.8×10^{12} neutrons/cm²) and without irradiation (cold) were examined. The irradiation was performed at 24 h after i.v. injection of DSBL-25% PEG liposomes (20 mg B/kg).

率の高いBDSの開発が望まれる。

謝辞 ホウ素脂質型リポソームの開発研究にあたり、日夜研究に励んでくれた学習院大学大学院自然科学研究科の上野 学修士 ('09 卒), Ban Hyun Seung 助教, 猪俣 竜学士, 三好達也学士, 立川将司学士及び理学部化学科の小金井逸人君に感謝します。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薬学部・小田雄介助教, 丸山一雄教授, 動物実験においてご指導・ご協力頂きました筑波大学脳神経外科・中井啓講師, 大阪大学大学院医学系研究科・金田安史教授に感謝いたします。そして、中性子照射実験に関してご尽力頂きました。東京大学大学院工学系研究

科原子力専攻共同利用管理本部・川手 稔氏, 日本原子力研究開発機構産学連携推進部・並木伸爾氏, ¹⁰BSH を供給頂きましたステラファーマ㈱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) Locher G. L., *Am. J. Roentgenol.*, **36**, 1–13 (1936).
- 3) Soloway A. H., Hatanaka H., Davis M. A., *J. Med. Chem.*, **10**, 714–717 (1967).
- 4) Hatanaka H., *J. Neurology*, **209**, 81–94 (1975).
- 5) Snyder H. R., Reedy A. J., Lennarz W. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 835–838 (1958).
- 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., Kawabata S., Kajimoto Y., Aoki A., Yokoyama K., Yamada M., Kuroiwa T., Tsuji M., Imahori Y., Kirihata M., Sakurai Y., Masunaga S., Nagata K., Maruhashi A., Ono K., *J. Neurosurg.*, **103**, 1000–1009 (2005).
- 10) Suzuki M., Sakurai Y., Hagiwara S., Masuna-

リポソームを用いる中性子捕捉治療

ダブルターゲティング：薬物と医療機器テクノロジーの融合

上野 学・潘 鉉承・中村浩之*

Liposomal neutron capture therapy

The cell-killing effect of boron neutron capture therapy (BNCT) is due to the nuclear reaction of two essentially nontoxic species, boron-10 (^{10}B) and thermal neutrons, whose destructive effect is well observed in boron-loaded tissues. Therefore, the high accumulation and selective delivery of ^{10}B into the tumor tissue are the most important requirements to achieve efficient neutron capture therapy for cancer. BNCT has been applied clinically for the treatment of malignant brain tumors, malignant melanoma, head and neck cancer, and hepatoma using two boron compounds: sodium borocaptate (^{10}BSH) and L-*o*-boronophenylalanine (L- ^{10}BPA). These low molecule compounds are easily cleared from the cancer cells and blood, therefore, high accumulation and selective delivery of boron compounds into tumor tissues are most important to achieve effective BNCT and to avoid damage of adjacent healthy cells. Recently, much attention has been focused on liposomal drug delivery system as an attractive intelligent technology of targeting and controlled release of ^{10}B compounds.

In this review, recent development of liposomal boron delivery system is summarized.

低エネルギーの熱中性子はそれ自体では人体には無害であるが、ホウ素 10 と核反応を起こし生成するリチウムとヘリウム (α 線) の有するエネルギーは、細胞を殺傷するのに十分なエネルギーである。したがって、あらかじめホウ素をがん細胞のみに送達することができれば副作用のきわめて少ない治療法となる。これを利用するのがホウ素中性子捕捉療法 (BNCT: boron neutron capture therapy) である。そのためホウ素をいかに高濃度かつ選択的にがん細胞へ送達することが重要となる。BNCT は ^{10}BSH と L- ^{10}BPA の 2 剤を用いて脳腫瘍、悪性黒色腫、頭頸部腫瘍、肝臓がん治療などの治療に臨床用されてきた。しかし、治療効果の向上や適応疾患拡大のためには、より効率的なホウ素デリバリーシステムの開発が望まれている。そのような状況下、リポソームを用いるホウ素デリバリーシステムが注目されている。

本稿では、筆者らが進めてきたホウ素脂質リポソームによるホウ素デリバリーシステムを中心に紹介する。

Manabu Ueno · Hyun Seung Ban · Hiroyuki Nakamura*

key words: boron neutron capture therapy (BNCT), boron delivery system (BDS), boronated liposomes, boron lipids

次世代放射線療法としての中性子捕捉療法

近年、わが国の疾病構造は感染症などの急性疾患が減少した反面、がんや循環器病、糖尿病などの生活習慣病が増加しており、そのなかでも予期せぬがんの発症は多くの国民の潜在的健康不安として存在している。実際に、年間に 30 万人以上ががんで亡くなっており、最も解決の迫られている疾病の一つとなっている。がん治療は外科的手術、放射線療法

法、化学療法の複合的療法が主となっているが、近年サイバーナイフやガンマナイフ、重粒子線療法などの技術の進歩により放射線治療を受ける患者は年間 18 万人に上る。しかし放射線治療では照射範囲の正常組織損傷の問題が常に存在しており、化学療法では強い抗がん作用の反面、全身的な副作用との戦いを強いられている。そのなか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)}。

BNCT の概念は、1936 年に Locher によってはじめて提唱された³⁾。比較的低エネルギーの低い熱中性

* Department of Chemistry, Faculty of Science, Gakushuin University 学習院大学理学部化学科

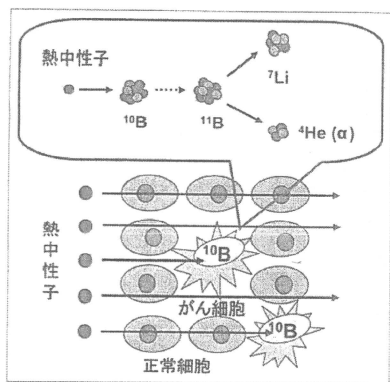


図1 BNCTの原理

表1 さまざまな核種の中性子捕捉断面積

nuclide	cross section capture value*
⁶ Li	942
¹⁰ B	3,838
¹¹³ Cd	20,000
¹³⁵ Xe	2,720,000
¹⁵¹ Sm	11,500
¹⁵³ Eu	59,002
¹⁵⁷ Gd	240,000
¹⁹⁹ Hf	400
H	0.332
C	0.0037
N	1.75
O	<0.0002
P	0.19
S	0.52
Na	0.536
K	2.07

* Cross section capture values in barns

子がホウ素の同位体であるホウ素10と核反応を起し、その際に生成するα線によりがん細胞を死滅させる治療法である。BNCTの特徴として、α線の飛程が細胞一つの大きさ(5~9 μm)とほぼ等しく、細胞一つを殺傷するのに十分なエネルギー(2.4 MeV)であること、熱中性子による正常細胞(人体)への影響が少ないことが挙げられる(式)。このことから予めホウ素分子をがん細胞選択的に取り込ませ、そこに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)。このように、

BNCTは副作用の非常に低い次世代型細胞選択的放射線療法として注目されている。



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(表1)¹⁾。中性子捕捉断面積はバーン(1 barn=10⁻²⁸ cm²)という単位で表される。¹³⁵Xe、¹⁵¹Sm、¹⁵³Eu、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3,838 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挙げる四つの理由からである。① 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。② 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。③ 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。④ 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ますが、その中性子捕捉断面積は¹⁰Bよりも数桁小さな値なので、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²⁾。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集積することが必要であり、実際に臨床上的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。

現在までBNCTは、原子炉から得られる熱中性子を用いて行われている。わが国には、医療用原子炉として京都大学原子炉実験所にあるKURと日本原子力研究機構東海研究開発センターにあるJRR4の2基がある。図2には、JRR4におけるBNCT用

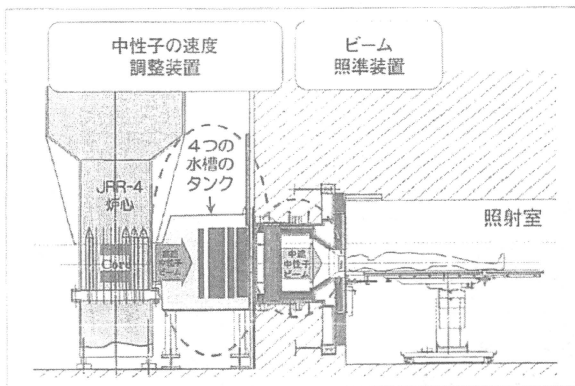


図2 日本原子力研究機構東海研究開発センター内にある原子炉 (JRR4) 医療照射設備
病状に応じて低速中性子から中速中性子までの32通りのビームを発生できる“医療照射設備”を開発

医療照射設備を示したが、これらの設備を用いて BNCT が行われているが、小型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。したがって、BNCT が放射線療法の一つとして一般に普及するためには、病院に併設可能な小型加速器の開発が急務である。現在京都大学では、医療機器としての治療に向けた BNCT 用小型加速器開発研究が進んでいる。

BNCT 用ホウ素薬剤

BNCT ではホウ素薬剤をいかにしてがん細胞にのみ選択的に高濃度で集積させるかが課題である。現在、わが国ではアミノ酸誘導体である BPA (*p*-boronophenylalanine) と、分子内にホウ素原子を 12 個含む 20 面体の特異的な化学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) を用いてそれぞれ悪性黒色腫¹²⁾ および脳腫瘍^{8,9)} の BNCT が行われてきた(図 3)。

1994 年には、京都府医大の今堀・上田らにより¹³⁾ ¹⁸F-BPA を用いた PET (positron emission tomog-

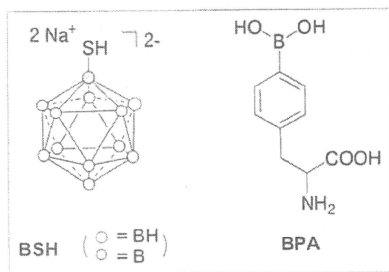


図3 現在臨床に用いられているホウ素薬剤の化学構造

raphy) 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¹⁴⁾ と同時に、BPA が多くの悪性腫瘍に集積することもわかってきた^{11,15)}。2001 年には、大阪大の加藤・由良らと京都大の小野らのグループは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、再発耳下腺がん患者に対し、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みられなかった。この成功をきっかけに BNCT の適応拡大が進められ、頭頸部がん以外にも、肝臓がん、肺がん、胸壁腫瘍などの適応疾患の拡大とともに BNCT の症例数が増加している。

その一方で、ホウ素薬剤である¹⁰B 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社と共同で、¹⁰B 濃縮した BSH と BPA の国産化に成功し、この二つのホウ素薬剤の GMP レベルでの供給体制が整った。現在、BPA を用いた小型加速器 BNCT の臨床治療に向けた研究が進んでいる。

次世代型ホウ素デリバリーシステム

さて、効果的に BNCT を行うためには選択的かつ高濃度でがん細胞にホウ素 10 を送り込むことが必要である。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 以上でなおかつ、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。ホウ素キャリアーに望まれることは、① 500 mg/kg 程度の濃度で投与が可能なくらい毒性が低いこと、② 十分に水溶性であること、③ 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まったく異なるアプローチが必要であり、リポソームを用いたホウ素デリバリーシステムが有望である注目されている。その利点として① 一度に大量のホウ素 10 をがん細胞に送り込むことが可能であること、② ホウ素薬剤自体に薬理活性を持たせる必要がないこと、③ 受容体選択性を高めるためにリポソーム表面に対応するリガンドを導入することにより能動的な送達(アクティブターゲティング)が可能であること、が挙げられる。

リポソームを用いたホウ素デリバリー法として、

大きく二つの方法に分けられる。一つは、リポソーム内にホウ素薬剤を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。もう一つの方法は、リポソーム膜にホウ素を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、さまざまなリガンド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。

1. ホウ素薬剤内封型リポソーム

1991 年に柳衛らによってホウ素薬剤を内封したリポソームははじめて報告された¹¹⁾。エッグ PC (phosphatidylcholine)、コレステロール、DTP-DPPE (3-(2-pyridyldithio)propionyl-dipalmitoylphosphatidylethanolamine) からリポソームを調製し、BSH を封入した後、anti-human CEA (carcinoembryonic antigen)モノクローナル抗体を結合させた BSH 内封イムノリポソームであった。AsPC-1 (ヒト膀胱がん)細胞を移植したヌードマウスに BSH 封入イムノリポソームを投与し中性子照射を行ったところ、腫瘍増殖が 50% 以下に抑えられることを見いだしている¹⁵⁾。Hawthorne らは、DSPC (distearoylphosphatidylcholine) とコレステロールを用いて、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ている^{16,17)}。

ホウ素封入リポソームを細胞選択的かつ能動的に取り込めるために葉酸¹⁸⁾、細胞増殖因子の一つである EGF (上皮細胞増殖因子)¹⁹⁾、トランスフェリン^{20,21)}、EGFR モノクローナル抗体²²⁾などのリガンドを表面に修飾したりリポソームの研究が行われてきた。

2. ホウ素脂質型リポソーム

前述のようにホウ素イオンクラスターを封入した内封型リポソームは高い治療効果が得られる可能性がある。しかしながら、このホウ素イオンクラスターが内封されている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、内

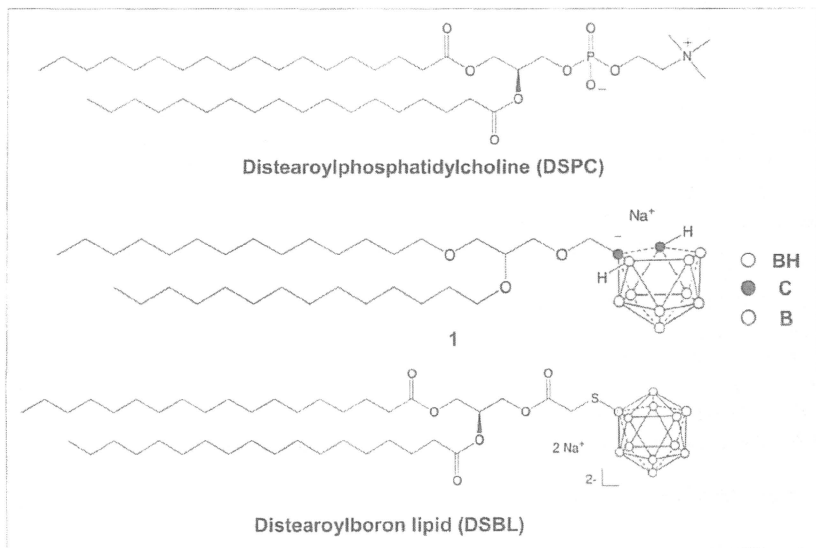


図4 ホウ素脂質の化学構造

封されているホウ素薬剤がリボソーム内部から容易に漏れ出てしまう問題が生じている。分子間相互作用により自己集合化しているリボソームの脂質二分子膜は非常に密度が高いため、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。このようにリボソーム膜内にホウ素を導入させることで、リボソーム内には抗がん剤などさまざまな薬剤が封入できることから、BNCTと化学療法の複合治療も可能となる。

筆者らはリボソームを構成する脂質二分子膜中のリン脂質の骨格に着目した。リン脂質 DSPC の水溶性部位であるホスファチジルコリン部位(図4)にかご状のホウ素イオンクラスター(*nido*型カルボラン)を導入した二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質1を設計し合成にはじめて成功した²⁴。合成したイオン性ホウ素クラスター脂質1は安定なリボソームを形成することが電子顕微鏡などで確認された。しかし *in vivo* 実験においてこのリボソームを腫瘍移植マウスに投与したところ、7 mgB/kg 投与におい

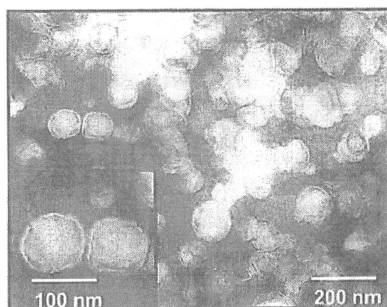


図5 DSBL リボソームの二分子膜構造形成 (電子顕微鏡写真)

て中性子照射後に顕著な延命効果がみられたものの、14 mgB/kg 投与した場合に重篤な急性毒性がみられた^{24,25}。筆者らはこの *nido* 型カルボランが毒性に深く関わっていると考え、その代わりにより低毒性で非常に代謝が早く、実際の臨床に用いられ

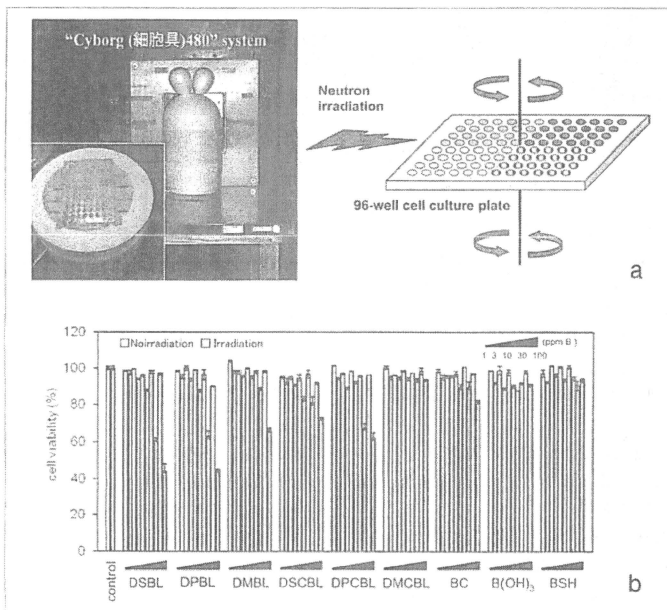


図6 ハイスルーブット細胞レベルBNCT効果アッセイ法(a)とBNCT致死効果(b)

ているBSHを導入した二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質DSBL(distearylboron lipid)を再設計しその開発に成功した^{26,27}。

ホウ素脂質DSBLのリボソーム化

合成したホウ素クラスター脂質DSBL、DSPC、コレステロール(X:1-X:1, X=0~0.5)を用いて逆相蒸発(REV)法によりリボソームを調製した後、100nmのフィルターを用いてサイジングした。ICP-AES法を用いて得られたリボソームのリン脂質とホウ素の濃度を定量し、各々モル比に換算した。その結果、形成したリボソーム膜内のDSBL/DSPC比は、調整した混合比に比例していることがわかった。さらに、得られたリボソームの粒子径ならびにゼータ電位を測定した結果、DSBLの混合比に関わらず粒子径は100nm前後に分布しており、

ゼータ電位はDSBLにより負に大きく帯電していることがわかった。また、DSBL(25%)のリボソームに関して、透過型電子顕微鏡測定を行ったところ、図5に示すように、直径100nmの二分子膜構造を形成していることがわかった。

細胞レベルでのBNCT効果

BNCTのためのホウ素薬剤としての有用性を評価する方法として、筆者らは、図6aに示すように96ウェルプレートを用いたハイスルーブットスクリーニング評価法を開発した。この方法により、1度の中性子照射で480サンプル(5プレート)の評価が可能となる。colon 26細胞を96ウェルプレートで24時間培養し、その後ホウ素リボソームを1~100ppmホウ素濃度(ホウ素10濃縮化合物を使用)に30分間接触させた後、培地を新しく交換し、中