

整理番号	2020-J-066	報告者氏名	河崎 陸
------	------------	-------	------

研究課題名

ホウ素中性子捕捉療法を志向した含ホウ素希土類酸化物-ホウ素化多糖ナノ粒子ハイブリッドの創製とその悪性脳腫瘍治療への応用

<代表研究者> 機関名：広島大学大学院先進理工系科学研究科 職名：助教 氏名：河崎 陸

<共同研究者> 機関名：大阪市立大学大学院 職名：教授 氏名：長崎 健

機関名：京都大学複合原子力科学研究所 職名：助教 氏名：真田 悠生

機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

目的としているホウ素中性子捕捉療法に用いる含ホウ素希土類酸化物-ホウ素化多糖ナノ粒子ハイブリッドの基盤となるホウ素化多糖ナノゲルの作製及び、含ホウ素酸化物ハイブリッドの作製に主眼を置いて検討を進めてきた。

ここでホウ素中性子捕捉療法とはホウ素原子と中性子線の間で起こる核反応により生じる細胞障害性の粒子線を用いたがん放射線療法である。さらに、これら粒子線の飛程が細胞の大きさに相当するため、腫瘍選択的なホウ素薬剤の送達によりがん細胞選択的な殺傷を実現する。つまり、BNCTの治療効果はホウ素薬剤のがん細胞への送達能に依存する。現在、臨床用ホウ素薬剤として、L-boronophenylalanine (L-BPA) や Sodium borocaptate (BSH) が用いられているものの、その治療性能は十分とはいえない。そのため、腫瘍組織へと効率的な送達を可能にするホウ素薬剤の開発が強く求められている。

そこで本研究では、優れたホウ素薬剤の開発とその悪性脳腫瘍への応用を目指した。この研究期間内では有機-無機ハイブリッド型のホウ素薬剤の開発とがんモデルとして結腸がん細胞における有効性を検討した。具体的には、ホウ素薬剤として期待されているホウ素薬剤である L-BPA や疎水性ホウ素クラスターであるカルボランを分子組織化の会合因子とする両親媒性多糖を合成し、基盤材料となるナノホウ素薬剤を作製した。これと同時に内部に封入する含ホウ素酸化物ナノ粒子の作製についても行った。L-BPA をデキストランへと修飾した Dex-BPA やカルボランをプルランに修飾した Pul-Car は水中で EPR 効果に適した直径 100 nm 程度の球状構造をもつナノ粒子を形成した。一方で無水ホウ酸結晶を物理的に破碎し、超音波処理を施すことにより、その粒子径を 10 nm 程度に制御できることを明らかとしている。この無水ホウ酸結晶表面をオレイン酸で処理することにより、表面疎水化された無水ホウ酸を得た。この無水ホウ酸は Dex-BPA ナノ粒子、Pul-Car ナノ粒子存在下でインジェクションすることで安定なハイブリッド粒子を形成することがわかった。このハイブリッド粒子は高いホウ素濃度を示すことを誘導結合プラズマ発光 (ICP 発光) から明らかとなった。

特に無水ホウ酸を含む Pul-Car は高いホウ素濃度を実現したため、細胞へと相互作用させた後、中性子線を照射した結果、臨床薬である L-BPA/フルクトース錯体よりも高い治療性能を示すことを明らかとした。これらの結果から、本システムは BNCT 用ナノホウ素薬剤として期待できる。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

ポスター発表

・第15回バイオ関連化学シンポジウム（オンライン）

ヒアルロン酸-蛍光性カルボラン複合体による BNCT

河崎 陸・山名 啓太・真田 悠生・増永 慎一郎・櫻井 良憲・鈴木 実・坂東 香里・田畑 杏里・

吉川 浩平・東 秀紀・長崎 健・池田篤志

学術論文

・Tumor-targeting Hyaluronic Acid/Fluorescent Carborane Complex for Boron Neutron Capture Therapy, Keita Yamana,# Riku Kawasaki,*# Yu Sanada, Anri Tabata, Kaori Bando, Kouhei Yoshikawa, Hideki Azuma, Yoshinori Sakurai, Shin-ichiro Masunaga, Minoru Suzuki, Kouta Sugikawa, Takeshi Nagasaki,* Atsushi Ikeda,* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 559, 210-216, (2021).

<研究の目的、経過、結果、考察 (5000 字程度、中間報告は 2000 字程度) >

研究の目的

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は我が国が世界をリードしてきた放射線療法の一つである。BNCT では質量数 10 のホウ素原子と人体への影響のない熱中性子線・熱外中性子の間で起こる核反応 (ホウ素中性子捕捉反応、BNCR) によって生じる粒子線のエネルギーを利用した治療法である。さらに、この粒子線のエネルギーの有効な範囲が細胞の大きさひとつ分に相当することから、ホウ素薬剤をがん細胞へと選択的に送達することでがん細胞選択的な殺傷が可能のため、極めて低い侵襲性を実現する。さらに、本治療法においてがん細胞の殺傷を誘導するものはゲノム DNA への直接的な損傷であるため、殺傷能力が極めて高く、その抗腫瘍効果は高いポテンシャルが期待されている。しかしながら、現在、BNCT に用いられている低分子化合物を基盤としたホウ素薬剤である L-boronophenylalanine (L-BPA) や Sodium borocaptate (BSH) は高い治療効果を示す反面、水に対する溶解性や血中滞留性、腫瘍集積性、そして腫瘍選択性に乏しく、送達上の課題が残されていることから、その治療性能には改善の余地があるといえる。そのため、BNCT をより標準的ながん治療法として適用するためには、治療性能の高いホウ素薬剤の開発が極めて重要なファクターであり、喫緊の課題である。

本研究では、分子組織化に基づくナノ粒子形成を介した血中滞留性の向上、EPR 効果を介した腫瘍組織への集積性の向上を実現させるため、疎水的なホウ素薬剤である L-BPA やカルボランを分子組織化の会合因子としたナノホウ素薬剤を設計し、このナノホウ素薬剤を基盤としたハイブリッドタイプのナノホウ素薬剤を作製し、その BNCT 用ナノホウ素薬剤としての機能を評価することを目的とした。

経過と結果そして考察

1. L-BPA 修飾デキストランの合成とナノ粒子形成評価

基盤となる両親媒性多糖の合成を行なった。多糖としてデキストランを用いて、L-BPA を強塩基存在下で反応させた。この際に L-BPA の修飾率が物性に与える影響について検討するために修飾率の異なる L-BPA 修飾デキストラン (Dex-BPA) を系統的に合成した。合成については核磁気共鳴分光法により評価し、その修飾率が 40/100 単糖ユニット (Dex-BPA-40) あるいは 50/100 単糖ユニット (Dex-BPA-50) であることを明らかとした。

ここで得られた Dex-BPA を水中に分散させ、超音波処理を行うことでナノ粒子を形成させた結果、本システムはそれぞれ 100 nm 前後のナノ粒子を形成することが動的散乱測定の結果より明らかとなった。さらに、これらのナノ粒子の粒子径はサンプル調整後、一週間程度安定に存在していることから、コロイド科学的にも安定であることが示された。さらに、透過型電子顕微鏡観察結果からも、それぞれ 100 nm 前後の球状のナノ構造体が確認されたことから、Dex-BPA は水中で確かに EPR 効果に適した直径 100 nm 程度の粒子を形成していることが明らかとなった。さらに、結合誘導プラズマ発光の結果から本システムが 100~1000 ppm 程度のホウ素濃度の分散液を調製できることが分かり、ホウ素薬剤として十分機能し得ることを明らかとした。

2. カルボラン修飾プルランの合成とナノ粒子形成評価

また一分子中にホウ素原子を 10 個含む疎水性ホウ素クラスターであるカルボランを基盤として用いたナノ材料の作製についても併せて検討を行なった。カルボン酸を末端構造にもつカルボランを合成し、多糖であるプルランに対してエステル化反応により結合させることでカルボラン修飾プルラン (Pul-Car)。その結果、10/100 単糖程度カルボランが導入されたことが核磁気共鳴分光法により確認された。

ここで得られた Pul-Car を水中に分散させ、超音波処理を行うことでナノ粒子を形成させた結果、本システムは直径 100 nm 程度のナノ粒子を形成し、その形態が球状であることをそれぞれ動的散乱測定および透過型電子顕微鏡観察により確認した。それだけでなく、本システムは水中で極めて

安定に存在し、サンプル作製後、一週間程度その粒子径に変化は見られず、多分散度の値も粒子が比較的、単分散であることを支持している。さらには、結合誘導プラズマ発光の結果より、本システムが 300-3000 ppm 程度の高いホウ素濃度の溶液を作製できることを明らかとした。すなわち、本システムは BNCT 用ホウ素薬剤として十分機能し得ることを示した。

3. 表面疎水化無水ホウ酸ナノ粒子の作製とその物性評価

1. 2. で作製したナノホウ素薬剤は疎水性の分子や粒子を疎水性相互作用によりその内部に複合化できることから、複合化する含ホウ素酸化物を作製した。無水ホウ酸をボールミルに封入し、メノウボールで破碎した。破碎後、オレイン酸を添加し、表面を疎水化させた。ヘキササンで抽出後、プローブ型ソニケーターでさらに粉碎させた。遠心分離により精製を行なったのち、テトラヒドロフランに再分散させた。ここで破碎時間を 20-60 分、超音波処理の時間を 10-30 分の間で変化させ、粒子径が最も小さくなる条件を検討した。その結果、最も小さくなった条件（破碎時間、60 分間、超音波処理 30 分間）では、20 nm 程度の粒子を形成していることが動的光散乱測定や透過型電子顕微鏡観察により分かった。

このようにして得られた表面疎水化無水ホウ酸ナノ粒子の基礎物性について、熱重量分析測定、赤外分光測定、X 線回折測定により評価を行なった。まず、熱重量分析測定を行なったところ、200-300 度付近にオレイン酸の燃焼に由来する重量変化が観測されたことから、確かにオレイン酸が表面を被覆していること、その重量変化が全体の 50% 程度であったことから、無水ホウ酸とオレイン酸の重量比がおよそ一対一であることを示している。さらに、赤外分光測定の結果から、無水ホウ酸の B-O 結合の振動や B-O-B の歪みに由来するピークが観測されたことから、ナノ粒子中に無水ホウ酸が含まれることが明らかとなった。さらには、水和することで観測される B-O-H の振動ピークが極めて少なかったことから、ホウ酸の大部分はナノ粒子作製過程で水和することなくその構造を維持していることが示唆された。さらに、X 線回折測定からナノ粒子中の結晶構造について検討を行なった。その結果、バルクの状態の無水ホウ酸はピークがブロードであったため、明確なピークが観測されなかった。一方で、表面疎水化処理を行なった無水ホウ酸ナノ粒子には結晶構造に起因するシャープなピークが観察されたことから、調製過程で物理的な刺激やエネルギーを得ることでアモルファスであった結晶構造が高い結晶性を獲得したと考えられる。

4. ナノホウ素薬剤—無水ホウ酸ナノ粒子ハイブリッドの作製とその物性評価

1. 2. で作製したナノホウ素薬剤と無水ホウ酸ナノ粒子を混合することにより、ハイブリッドナノ粒子の作製を行なった。水中に分散させたナノホウ素薬剤 (Dex-BPA もしくは Pul-Car) に対して、テトラヒドロフラン中に分散させた表面疎水化無水ホウ酸ナノ粒子をインジェクションすることでハイブリッドナノ粒子を調製した。この際にナノホウ素薬剤内に封入するキャパシティーについて検討するため、ナノホウ素薬剤の濃度を固定し、無水ホウ酸ナノ粒子の濃度を変化させた。動的光散乱測定の結果、Dex-BPA の場合、ナノホウ素薬剤と無水ホウ酸ナノ粒子の重量比が 1 : 0.01 まで安定にハイブリッド粒子を形成した。それ以上の濃度では封入しきれなくなった表面疎水化ホウ酸ナノ粒子が凝集体を形成し、沈殿を生じた。一方で、Pul-Car はナノホウ素薬剤と無水ホウ酸ナノ粒子の重量比が 1 : 0.1 まで安定にハイブリッド粒子を形成することを明らかとした。形成したハイブリッド粒子はいずれも水中に安定に分散した。さらに透過型電子顕微鏡観察の結果から、ナノホウ素薬剤内部に無水ホウ酸ナノ粒子が集積している構造が見られた。これらの結果から、ハイブリッド粒子の形成に成功したものと考えた。また誘導結合プラズマ発光分析の結果から複合化によりホウ素濃度が向上していることを確認している。

以降の細胞実験や動物実験では、より高いホウ素濃度を実現し、ホウ素薬剤としての性能に期待できる Pul-Car の系について検討を行うこととした。

5. ハイブリッド粒子のがん細胞との相互作用および中性子線照射に基づく殺細胞効果

4. で作製したハイブリッド粒子のがん細胞との相互作用について検討を行なった。まず、本システムの生体適合性について検討するためにマウス線維芽細胞 (L929) とマウス結腸がん細胞 (Colon26) に対する細胞毒性を評価した。その結果、比較的高濃度 (1 mg/mL) に至るまで細胞毒性は観察され

ず、生体において安全に使用できることが示された。次に、蛍光修飾したカルボラン修飾プルランを合成し、ハイブリッド粒子を作製した。ハイブリッド粒子をマウス結腸がん細胞である Colon26 細胞に曝露し、細胞内の導入についてフローサイトメトリーにより定量した。その結果、確かにハイブリッド粒子に由来する蛍光が観察され細胞内にハイブリッド粒子が導入されていることが示された。さらに導入後の細胞を王水により溶解させることでホウ素濃度を誘導結合プラズマ測定により定量した。その結果、確かにホウ素濃度の上昇が曝露したホウ素濃度依存的に増大している様子が確認された。

次に細胞内動態について、共焦点レーザー顕微鏡観察を行うことで検討した。その結果、曝露後 24 時間の時点ではハイブリッド粒子に起因する蛍光シグナルが細胞内部に点在している様子が確認され、確かに細胞内に導入されていることを示した。

このようにハイブリッド粒子はがん細胞と相互作用を示すことが明らかとなったので、実際に細胞内に導入後、中性子線照射を行うことで BNCT 用ホウ素薬剤としての性能について評価を行なった。この際に臨床薬である L-BPA/フルクトース錯体とその治療性能を比較した。その結果、ハイブリッド粒子は Colon26 に対して濃度依存的に殺細胞効果を誘導した。それだけでなく、その半数阻害濃度は L-BPA と比較して三倍程度と高い治療性能を実現した。これらのことから、本研究で作製したハイブリッド粒子は BNCT 用ナノホウ素薬剤として有用であることが示唆された。

6. ハイブリッド粒子の担腫瘍マウスにおける体内動態評価および抗腫瘍活性評価

培養細胞の系において、ハイブリッド粒子が優れた治療性能を実現したため、担腫瘍マウスにおける腫瘍集積性を評価した。Colon26 細胞を Balb/c マウスに移植することで腫瘍を形成させた。腫瘍形成後、ハイブリッド粒子をマウス尾静脈より投与し、各臓器（腫瘍、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、皮膚、血液）への集積性を評価した。集積性については各臓器を王水により完全に溶解させた後、誘導結合プラズマ測定によりホウ素の絶対定量を行った。その結果、腫瘍組織への集積は投与後 24 時間で極大になることを明らかとした。さらには 24 時間後に血中からホウ素がほとんど検出されなくなったことから、中性子照射を 24 時間後に行うことが最も理想的で安全に行うことが可能であると考えた。さらには正常組織として採用した皮膚に対する集積も極めて少ないことから、正常組織への損傷も最小限に抑えることが可能であると考えた。

現在、本システムの BNCT 用薬剤としての性能について、担腫瘍マウスにおける抗腫瘍活性から評価を行なっている。現時点（照射後 7 日）では、臨床用ホウ素薬剤である L-BPA/フルクトース錯体よりも高い治療性能を示していることから、ハイブリッド粒子は BNCT 用ホウ素薬剤として期待できる結果が得られるものと考えている。

今後の検討課題

本助成期間でハイブリッド粒子の BNCT 用ホウ素薬剤としての有用性が示されつつある。今後の検討ではナノホウ素薬剤の内部に封入する機能性無機材料として MRI 造影能をもつ Gd 系の粒子等を組み合わせたりすることで、本システムの機能を拡充するとともに BNCT によるロバストながん治療法を提案し、脳腫瘍への応用を目指す。