

## 199. BNCT 用ホウ素化多糖ナノゲルの開発と転移がん治療

河崎 陸

広島大学 大学院先進理工系科学研究科 応用化学プログラム 有機超分子化学研究室

Key words : ホウ素中性子捕捉療法, ドラッグデリバリーシステム, 有機—無機ハイブリッド, ナノゲル

### 緒言

近年、極めて侵襲性の低いがん治療法として、ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy : BNCT) が注目を集めている [1]。BNCT では、質量数が 10 のホウ素原子 ( $^{10}\text{B}$ ) と中性子線の間で起こる核反応によって生じる細胞障害性の粒子線 ( $\alpha$ 線と Li 核) によりがん細胞を死滅させる。これら二つの粒子線によって誘導されるゲノム DNA への損傷は効率的な細胞死を誘導できるだけでなく、粒子線のエネルギーの有効範囲が細胞の大きさ一つ分 ( $<10\ \mu\text{m}$ ) に相当するため、腫瘍選択的なホウ素薬剤の送達によってがん細胞選択的な殺傷を実現する (図 1a)。すなわち、BNCT の治療効果の成否を分ける大きな鍵はホウ素薬剤の癌細胞への送達能によって決定する。現在、臨床研究において、L-boronophenylalanine (L-BPA) と 1-mercaptopododecaborate (BSH) がホウ素薬剤として用いられている (図 1b)。しかしながら、いずれのホウ素薬剤についても、水溶性や血中滞留性、腫瘍選択性、腫瘍集積性など送達上の課題が残されている [2]。さらには、これら二つの化合物は低分子化合物であるため、腫瘍組織への集積予測のためのイメージング機能の付与が困難とされている。

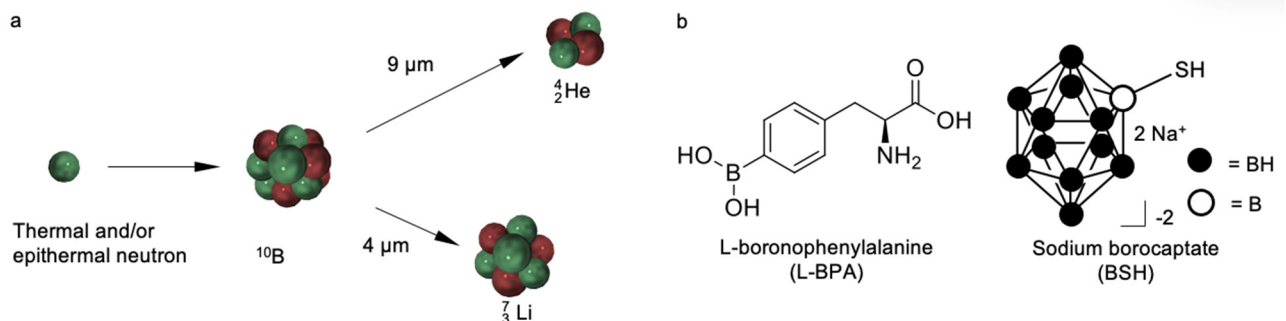


図 1. BNCT の原理とホウ素薬剤

- a) BNCT の原理。  
b) 臨床に用いられているホウ素薬剤。

これらの背景の下、これらの課題を解決し得るホウ素薬剤の開発が求められており、これまでにポリマーベースのホウ素薬剤やナノ粒子を基盤としたホウ素薬剤の開発が進められてきた。これらのホウ素薬剤は血中滞留性の向上により EPR 効果と呼ばれる受動的な腫瘍集積性を獲得することで治療性能の向上に成功している。ここで、中性子線束が極めて疎であることから、中性子捕捉効率の向上に基づく更なる治療効果の改善において、ホウ素原子の高密度集積が有効であると考えられている。そこで本研究では、一粒子当たりのホウ素含有量が多く、極めて密にホウ素が集積したナノ材料の開発とその BNCT 用薬剤としての機能評価および転移がん治療への適用を目指した。

具体的には、生体適合性に優れ、体内に分解酵素をもたない直鎖状多糖であるプルランに部分的に疎水性官能基として、ホウ素クラスターであるカルボランを導入することで両親媒性多糖 (カルボラン置換プルラン) を合成し、自己組

織化に基づきヒドロゲル微粒子（ナノゲル）を形成させる。このホウ素化多糖ナノゲル内部に超分子的な相互作用を用いて、ホウ素酸化物を複合化することで極めて高度にホウ素が集積したハイブリッドナノゲルを作製し、その物性評価およびBNCT 薬剤としての機能評価を行った（図2）。

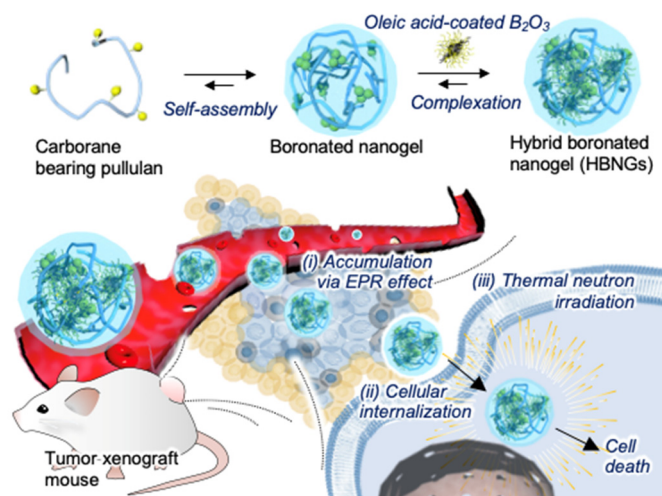


図2. 本研究の概念図

## 方法

### 1. ハイブリッドナノゲルの作製とその物性評価

カルボラン置換プルランを縮合することで合成した。合成は核磁気共鳴分光法 ( $^1\text{H-NMR}$ ) により確認した。ここで得たカルボラン置換プルランを超純水中に分散させ、超音波照射によって、ナノゲルを形成させた [3]。ナノゲルの基礎物性については、動的光散乱測定 (DLS)、 $\zeta$  電位測定、透過型電子顕微鏡観察 (TEM) により行った。

一方で、オレイン酸被覆ホウ素酸化物ナノ粒子については、メカノケミストリーの手法により作製した [4]。バルクの酸化ホウ素をメノウ容器に封入し、ボールミルを用いて粉碎した (30 Hz, 30 min)。処理後、オレイン酸を添加し、超音波処理によりホウ素酸化物表面に配位させた。ヘキサンで余剰なオレイン酸を洗浄し、遠心分離により目的物を回収した。オレイン酸被覆ホウ素酸化物ナノ粒子の物性は DLS、TEM、赤外分光高度計 (IR)、熱重量測定 (TG)、X 線回折測定 (XRD) により行った。

ハイブリッドナノゲルは水中に分散させたナノゲル (0.1 mg/mL) とテトラヒドロフランに分散させたオレイン酸被覆ホウ素酸化物 (0.1 mg/mL) をインジェクションすることにより調製した [5]。得られたハイブリッドナノゲルは DLS、TEM によりキャラクターゼーションを行った。また調製したホウ素濃度については誘導結合プラズマ発光 (ICP 発光) により定量した。

### 2. ハイブリッドナノゲルのがん細胞に対する BNCT 活性

ハイブリッドナノゲルのホウ素キャリアとしての適性を評価するため、中性子線非照射下のがん細胞 (マウス結腸がん細胞、Colon26) と正常細胞 (マウス上皮細胞、L929) に対する細胞障害性を WST-8 法により評価した。次に細胞内導入後に中性子線を京都大学複合原子力科学研究所 (KUR) にて照射 (1 MW, 70 min) し、その殺細胞効果を WST-8 法により行った。ここで対象群として、臨床用ホウ素薬剤である L-BPA/fructose 複合体を用いた。

さらに細胞内取込み量および細胞内の滞留性について、ICP 発光分析、細胞内動態については蛍光標識したハイブリッドナノゲルを用い、共焦点レーザー顕微鏡観察 (CLSM) により明らかとした。これらの値については L-BPA/fructose 錯体と比較した。

### 3. ハイブリッドナノゲルの担腫瘍マウスにおける BNCT 活性

ハイブリッドナノゲルの腫瘍組織への集積の極大時間を見積もるために担腫瘍マウスに対する体内動態評価を行った。担腫瘍マウスは Balb/c マウス (4 週齢、雄) に対して、Colon26 細胞を右大腿部皮下へと移植、10 日間飼育することで作製した [6]。ハイブリッドナノゲル分散液を担腫瘍マウスの尾静脈より投与し、各時間 (3、6、24 時間) に臓器を回収した (腫瘍、血液、脳、皮膚、肝臓、心臓、脾臓、腎臓)。回収した臓器 100 mg を王水で溶解させ、ICP 発光により、ホウ素量を定量した。また、24 時間後の腫瘍組織における腫瘍内動態について、CLSM を用いて観察した。

体内動態評価により、見積もられた集積の極大時間において KUR の重水台車を用いて、中性子照射を行い、処置後の腫瘍縮退効果について検討した。

## 結果および考察

### 1. ハイブリッドナノゲルの作製とその物性評価

$^1\text{H-NMR}$  測定の結果から、カルボランは 100 単糖当たり 8.2 個のカルボランが導入されたことが明らかとなった。この疎水化多糖を水中に分散させ、超音波処理を行い、DLS 測定を行った結果、比較的単分散で直径 220 nm 程度のナノゲルを形成していることを明らかとした。また、TEM を用いた形態観察の結果より DLS の結果に一致する球状の集合体が観察された。この粒子径は EPR 効果に適した粒子系を示していることから、腫瘍集積性が期待できる。

一方で、オレイン酸被覆ホウ素酸化物ナノ粒子の粒径はボールミルの作動時間依存的に小さくなり、最終的に 10 nm 前後の小さな粒子を形成していることが TEM と DLS の結果から明らかとなった。また IR 測定結果から、対称な  $\text{COO}^-$  と非対称な  $\text{COO}^-$  の伸縮に由来するピークが  $1,710\text{ cm}^{-1}$  と  $1,410\text{ cm}^{-1}$  に観測されたことから、オレイン酸はホウ素酸化物表面に被覆したものと判断した。さらに TG 測定からオレイン酸の燃焼に由来する重量現象が観測されていることから表面の疎水化に成功したと結論付けた。

ナノゲルとオレイン酸被覆ホウ素酸化物ナノ粒子を混合することでハイブリッドナノゲルを調製した。ハイブリッドナノゲルの粒径は直径 180 nm とナノゲルと比較して小さくなっていた。これはオレイン酸被覆ホウ素酸化物ナノ粒子が疎水性コアとして働くことでナノゲルのポリマーネットワークが強くバインドした為と考えられる。さらに、TEM の観察結果から、ナノゲル内部に複数のホウ素酸化物ナノ粒子がパッキングしていることを明らかとした (図 3)。この様子は高度にホウ素が集積することで中性子の捕捉効率を向上させ、さらには治療性能の向上に期待できる。

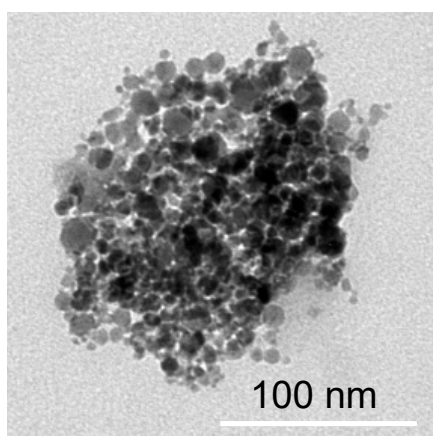


図 3. ハイブリッドナノゲルの形態観察像  
スケールバー : 100 nm。

## 2. ハイブリッドナノゲルのがん細胞に対する BNCT 活性

ハイブリッドナノゲルのキャリアとしての安全性について評価を行った結果、L929、Colon26 双方において、中性子線非照射下では細胞死は誘導されなかったことから、毒性の低いナノキャリアとして応用可能であることが示唆された。また Colon26 において、中性子線照射による殺細胞効果はハイブリッドナノゲルの方が、臨床薬である L-BPA/fructose 錯体よりも高い活性を示した。この活性の違いについて検討するために細胞内導入量および、細胞内滞留性、細胞内動態を評価した。細胞内の導入量をハイブリッドナノゲルと L-BPA/fructose 複合体で比較するとハイブリッドナノゲルの方が 2 倍程度高いことが分かった。またその細胞内滞留性を比較するとハイブリッドナノゲルは 4 倍以上長時間滞留することが明らかとなった。この効率的な導入に併せて、長期的な滞留性は *in vivo* において、がん細胞へと長時間ホウ素薬剤を留めることで中性子捕捉効率の向上による治療性能の向上が可能である。また CLSM の結果から、L-BPA/fructose 錯体は核内、ハイブリッドナノゲルはエンドソーム、核膜周辺への集積が確認され、いずれのホウ素薬剤も DNA への効率的な損傷誘導が可能であるため、ホウ素送達において有用であるといえる。

## 3. ハイブリッドナノゲルの担腫瘍マウスにおける BNCT 活性

ハイブリッドナノゲルの腫瘍集積性について検討するために体内動態評価を行った。マウス尾静脈より投与したハイブリッドナノゲルの臓器集積性（腫瘍、血液、脳、皮膚、肝臓、心臓、脾臓、腎臓）について検討した。その結果、時間とともに腫瘍組織へのホウ素の集積が増大し、血中のホウ素濃度が低下することが観察された。これは血中滞留性の向上による EPR 効果に基づく腫瘍組織への集積に起因しているものと考えている。また代謝系である肝臓や脾臓への集積と比較しても腫瘍組織への集積が高いことも明らかとなった。ここで正常組織への損傷を最小限に抑える指標として用いられる腫瘍組織/正常組織比と腫瘍組織/血中濃度比がそれぞれ、4 と 20 と高い値を示したため、本システムを用いた BNCT は侵襲性の低いがん治療が可能であることが示唆される。

最後に中性子線照射に基づく治療効果について評価を行った。体内動態評価で見積もった腫瘍組織への集積の極大時間において KUR の重水台車設備を用いて中性子線を照射した。その後、腫瘍の体積を計測した（図 4）。その結果、ハイブリッドナノゲルを用い、中性子線を照射した群は対照として用いた L-BPA/fructose 錯体よりも高い治療効果を実現するだけでなく、移植したがんの根治に至る個体も観察された。さらに、その後 3 ヶ月間、腫瘍の再成長も観察されず、極めて高い治療効果を実現している。このようにホウ素の高密度に集積したホウ素薬剤の利用により、極めて高い治療性能を有する BNCT 薬剤の開発に成功した。

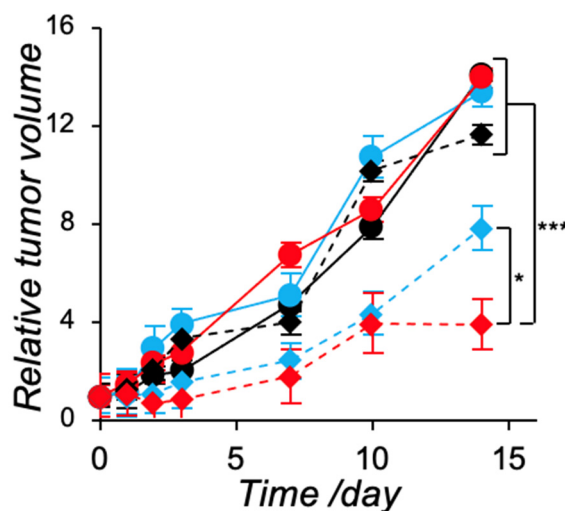


図 4. ハイブリッドナノゲルの BNCT 活性

黒：PBS、赤：ハイブリッドナノゲル、青：L-BPA/fructose 錯体。

○：中性子非照射、◇：中性子照射。マンホイットニー-U 試験 (n=6)

\* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻生体機能工学研究室の長崎健教授、東秀紀講師、坂東香里氏、田畑杏梨氏、吉川浩平氏、京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻の生体機能高分子研究室の秋吉一成教授、佐々木善浩准教授、澤田晋一助教、京都大学複合原子力科学研究所の鈴木実教授、田中浩基教授、櫻井良憲准教授、高田卓志助教、真田悠生助教である。

本研究は上原記念生命科学財団、JST-A-STEP の助成を受けて行われた。この場を借りて、厚く御礼申し上げる。

## 文献

- 1) R. F. Barth, A. H. Soloway, R. G. Farichild, R. M. Brugger, Boron neutron capture therapy for cancer. Realities and prospects, *Cancer* 70, (1992) 2995-3007. DOI: 10.1002/1097-0142(19921215)70:12<2995::aid-cnrcr2820701243>3.0.co;2-# ,PMID: 1451084
- 2) K. Yokoyama, S. Miyatake, Y. Kajimoto, S. Kawabata, A. Doi, T. Yoshida, T. Asano, M. Kirihata, K. Ono, T. Kuroiwa, Pharmacokinetic study of BSH and BPA in simultaneous use for BNCT, *J. Neuroncol.* 78, (2006) 227-232. DOI: 10.1007/s11060-005-9099-4, PMID: 16557351
- 3) R. Kawasaki, Y. Sasaki, K. Katagiri, S. Mukai, S. Sawada, K. Akiyoshi, Magnetically guided protein transduction by hybrid nanogel chaperones with iron oxide nanoparticles, *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, (2016) 11377-11381. DOI: 10.1002/anie.201602577, PMID: 27295070
- 4) R. Ramachandran, D. Jung, N. A. Bernier, J. K. Logan, M. A. Waddington, A. M. Spokoyny, Sonochemical synthesis of small boron oxide nanoparticles, *Inorg. Chem.* 57, (2018) 8037-8041. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.8b01189, PMID: 29939022
- 5) R. Kawasaki, Y. Sasaki, T. Nishimura, K. Katagiri, K. Morita, Y. Sekine, S. Sawada, S. Mukai, K. Akiyoshi, Magnetically navigated protein transduction in vivo using iron oxide-nanogel chaperone hybrid, *Adv. Healthcare Mater.* 10, (2021) 2001988. DOI: 10.1002/adhm.202001988, PMID: 33694289
- 6) R. Kawasaki, R. Ohdake, K. Yamana, T. Eto, K. Sugikawa, A. Ikeda, Photodynamic therapy using self-assembled nanogels comprising chlorin e6-bearing pullulan, *J. Mater. Chem. B* 9, 6357-6363. DOI: 10.1039/D1TB00377A, PMID: 34286817