

メラノーマ中性子捕捉療法に向けたコウジ酸修飾ホウ素クラスター薬剤の開発に関する研究

大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻
生体機能工学分野
東 秀紀

1. 研究目的

代表的な癌治療法である化学療法や放射線療法は癌細胞を破壊する際に正常細胞までもダメージを与えてしまう。一方、ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) ではホウ素を癌細胞のみに送り込めば、正常細胞には影響しない熱中性子を照射することにより癌細胞のみを選択的に破壊することが可能である。BNCT 薬剤の主要な課題はターゲットである腫瘍組織に対し、治療に必要なホウ素量を選択的にデリバリーし、尚且つ正常組織における毒性を最小限にとどめることである。しかしながら、現在臨床研究で用いられているホウ素キャリアである L-BPA や BSH は安全性が高いものの、腫瘍への選択性や蓄積性が十分ではなく、その改善が求められている。

悪性黒色腫 (メラノーマ) は、リンパ節をはじめ他臓器への転移が起りやすく、進行癌の場合には既存の治療法では予後の悪い癌であり、BNCT の適用が期待されている。しかしながら、メラノーマをターゲットとしたホウ素キャリアの報告例はほとんどないのが現状である。本研究の目的は、メラノサイト親和性が古くから提唱されているコウジ酸をリガンドとして用い、メラノーマ細胞への選択的なホウ素デリバリーシステムを開発することである。古くから日本酒を仕込む杜氏には色白が多いと言われており、近年ではコウジ酸の美白効果が注目されているように、コウジ酸はメラノサイト親和性を有し、メラノサイトへの効率的取込機構の存在が示唆されている。そこで本研究では、大阪府立大学切畑光統教授との共同研究にて開発した、コウジ酸にホウ素クラスターを導入したコウジ酸修飾カルボラン (CKA) を用い、メラノーマに対する BNCT 用の新規ホウ素キャリアとしての評価を行った。CKA は難水溶性であるため、水溶性ホスト分子で安全性が確認されている 2-ヒドロキシプロピル化 β -シクロデキストリン (HP β -CD) を用いた簡便な水溶化方法 (Fig. 1) と共にその成果を報告する。

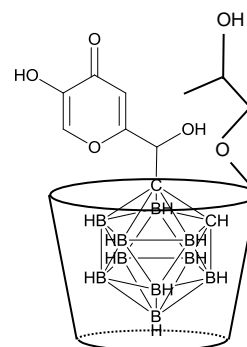


Fig. 1 水溶性 CKA/HP β -CD 複合体

2. 方法

高速振動粉碎法による CKA の水溶化

10 μmol の CKA 及び各種 CD を粉碎用ボールと共に振動粉碎用容器に封入し、振動ミル(Retsch 製、MM200) を用いて 25 Hz で 1 時間、高速振動粉碎を行った。得られた粉末に対し、10 mL の MilliQ で抽出を行い、25°C、10,000 rpm で 10 分間遠心後、上清を回収して 0.22 μm のメンブレンフィルターで濾過滅菌を行い、CKA/CD 水溶液を調製した。また、ICP 発光分析によりホウ素濃度を求め、各種 CD による CKA の可溶化率を算出した。

混合法による CKA の水溶化

CKA と HP β -CD を等モルかつ最大濃度が 100 mM 以下になるように MilliQ 水 1.5 mL に加え、ボルテックスミキサーで 1 時間攪拌、更に超音波処理を 1 時間行った。得られた水溶液から前述と同様の操作で精製し、CKA/HP β -CD 水溶液を調製した。

CKA/HP β -CD の細胞毒性評価

B16-BL6 メラノーマ細胞もしくは colon26 細胞を 1 well 当たり 5,000 cells となるよう 96 well プレートに播種し、24 時間培養した。ホウ素濃度が 0~160 ppm となるように調製した CKA/HP β -CD 含有培養液に交換し、24 時間培養後の細胞生存率を WST-8 法により評価した。

CKA/HP β -CD のメラノーマ親和性及び細胞内動態評価

B16-BL6 もしくは colon26 細胞 (8 x 10⁵ cells) を 35 mm dish に播種し、24 時間培養した。ホウ素濃度 10 ppm の CKA/HP β -CD 含有培養液に交換し、所定時間培養後、細胞内に含まれるホウ素量を ICP 発光分析により定量した。また、35 mm の glass bottom dish に B16-BL6 細胞を 500,000 cells ずつ播種し、24 時間培養後、ホウ素濃度 40 ppm の CKA/HP β -CD 含有培養液に交換し、所定時間後のホウ素キャリアの細胞内動態について、Zenon® IgG 標識試薬で蛍光標識した抗 BSH 抗体を用い、免疫染色法により評価した。

メラノーマモデルマウスの作製

B16-BL6 細胞をハンクス液 100 μL 当たり 3 x 10⁵ もしくは 2.5 x 10⁵ cells になるよう懸濁し、C57-BL6 マウス (雌・4 週齢) の右大腿部に皮下注射した。2 週間飼育後、担癌形成を確認し、前者は体内動態評価、後者は BNCT 評価の実験に使用した。

CKA/HP β -CD の体内動態評価

作製した担癌マウスに対し、ホウ素濃度 1,500 ppm の CKA/HP β -CD 溶液を 200 μL ずつマウスの腹腔内へ投与した (N = 6)。所定時間後に血液、腫瘍及び各臓器を摘出して洗浄後、それぞれ 100 mg に含まれるホウ素量を ICP 発光分析により測定し、T/N (腫瘍組織/正常組織) 比及び T/B (腫瘍組織/血液) 比を算出した。

BNCT 評価

作製した担癌マウスに対し、ホウ素濃度 1,500 ppm の CKA/HP β -CD もしくは L-BPA 溶液を 200 μ L ずつマウスの腹腔内へ投与した (N = 3)。投与 90 分後、中性子を 90 分間 (4.4×10^{12} fluence/cm 2) 照射し、それぞれの非照射群と共に以後の延命効果を比較した。

3. 結果

CD を用いた CKA の水溶化

高速振動粉碎法による各種 CD と CKA との複合体作製の結果を Table 1 に示した。CKA のみでは水溶化率が約 20% であるのに対し、メチル化 β -CD (Me β -CD) や HP β -CD では 80% 以上の可溶化率となり、これら 2 つの CD は CKA の水溶化に適したホスト分子であることが確認された。また、混合法による水溶化の場合でも CKA と等モル量の HP- β -CD を用いて 84% という高い可溶化率を示し、どちらの方法でも高効率で CKA の水溶化が可能であった。しかしながら、混合法の方がスケールアップが容易であるため、以後の実験では混合法により作製した CKA/HP β -CD を使用した。

Table 1 各種 CD による CKA の水溶化率

サンプル	CKA (mg)	B 濃度 (ppm)	水溶化率 (%)
CKA ^a	2.84 (1.08)	24.3	22.5
CKA/ α -CD ^a	2.84 (1.08)	49.3	45.7
CKA/Me β -CD ^a	2.84 (1.08)	89.7	83.1
CKA/HP β -CD ^a	2.84 (1.08)	88.9	82.3
CKA/HP β -CD ^b	41.5 (15.8)	8,800	83.8

括弧内は含有ホウ素量,

^a高速振動粉碎法 (10 mL), ^b混合法 (1.5 mL).

CKA/HP β -CD の細胞毒性評価

CKA/HP β -CD を BNCT 用ホウ素キャリアとして使用するには中性子非照射下で生体や細胞に対して低毒性であることが必要である。Fig. 2 は CKA/HP β -CD の B16-BL6 もしくは colon26 細胞に対する細胞毒性を示したグラフである。ホウ素濃度 40 ppm まで毒性を示さないことからこのホウ素キャリアは中性子非照射下では低毒性であることが確認された。

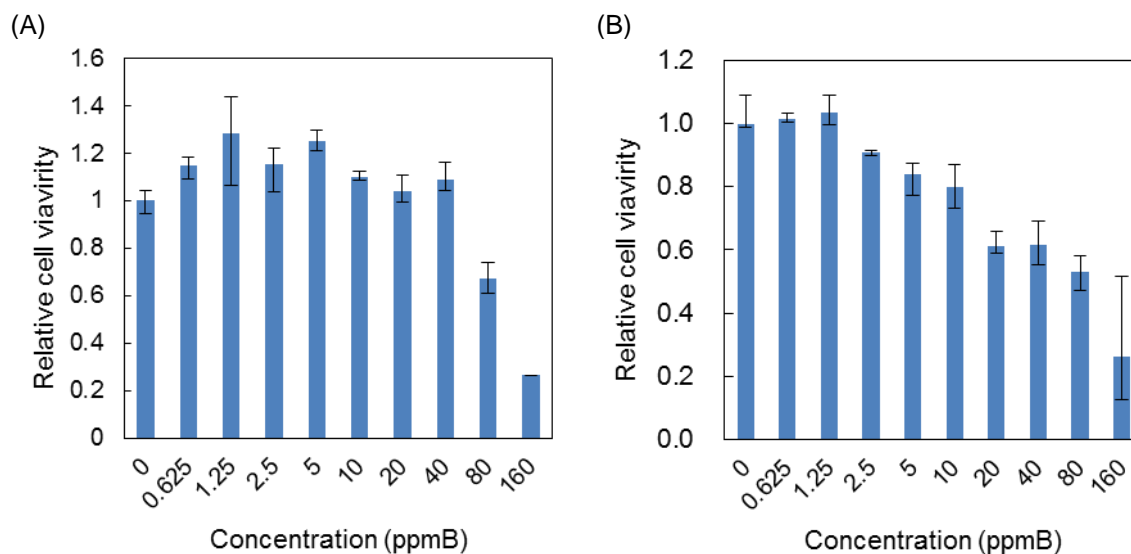


Fig. 2 CKA/HP β -CD の 24 時間処理における細胞毒性 (A) B16-BL6 細胞, (B) colon26 細胞.

CKA/HPβ-CD のメラノーマ親和性及び細胞内動態評価

B16-BL6 細胞もしくは colon26 細胞に対する CKA/HPβ-CD の細胞内取り込み評価の結果を Fig. 3A に示した。B16-BL6 細胞では colon26 細胞に比べ、約 50 倍のホウ素取り込みが確認された。更に、100 倍量のコウジ酸存在下ではホウ素取り込み量が約 1/4 まで低下した (Fig. 3B)。以上の結果から、メラノーマ親和性を有するコウジ酸で修飾することでホウ素クラスターが効率よくメラノーマ細胞に取り込まれたと考えられる。

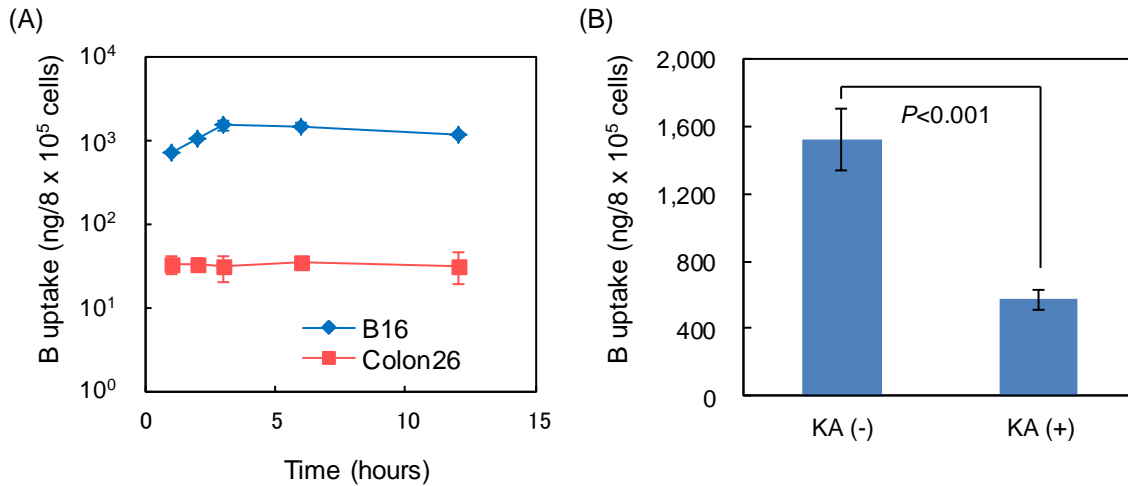


Fig. 3 CKA/HPβ-CD のメラノーマ親和性
(A) 所定時間後における 8×10^5 cells 当たりのホウ素取り込み量; (B)コウジ酸 (KA, 100 倍量) 存在下での B16-BL6 細胞に対するホウ素取り込み量.

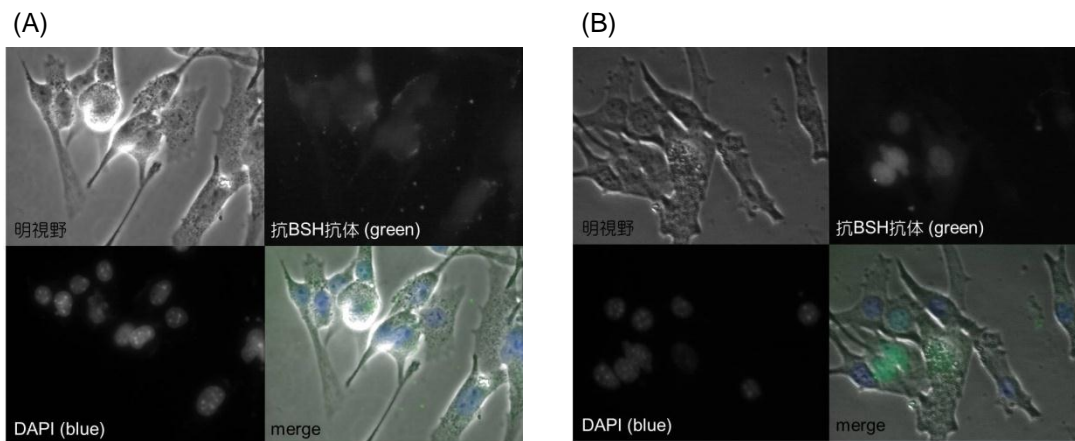


Fig. 4 CKA/HPβ-CD の細胞内動態
Zenon® IgG 標識した抗 BSH 抗体 (green) 及び DAPI (blue) で染色, (A) 1 時間後, (B) 6 時間後.

また、抗 BSH 抗体を用いた免疫染色法により、CKA の細胞内動態を調べた (Fig. 4)。今回用いた抗 BSH 抗体は BSH ($K_d = 2.4 \times 10^{-7}$) に比べて低いながらも、CKA に対してもアフィニティーを示す ($K_d = 1.9 \times 10^{-6}$)。Fig. 4 の結果から、暴露 1 時間では CKA は細胞表面に存在が確認され、6 時間後では特に核で局在が確認されることから、CKA は細胞内に取り込まれた後、核内に移行していることが示唆された。

CKA/HP β -CD の体内動態評価

メラノーマ移植マウスに CKA/HP β -CD を投与後、0.5~5 時間後の血液及び各臓器に存在するホウ素量を Fig. 5A に示した。低分子化合物であるため、肝臓及び腎臓に高い集積が見られるものの、それ以外の臓器や皮膚組織に比べ、腫瘍への高い集積性が確認された。また Fig. 5B 及び 5C より、投与後 1 時間が T/N 及び T/B 比において最も優れていると考えられる。

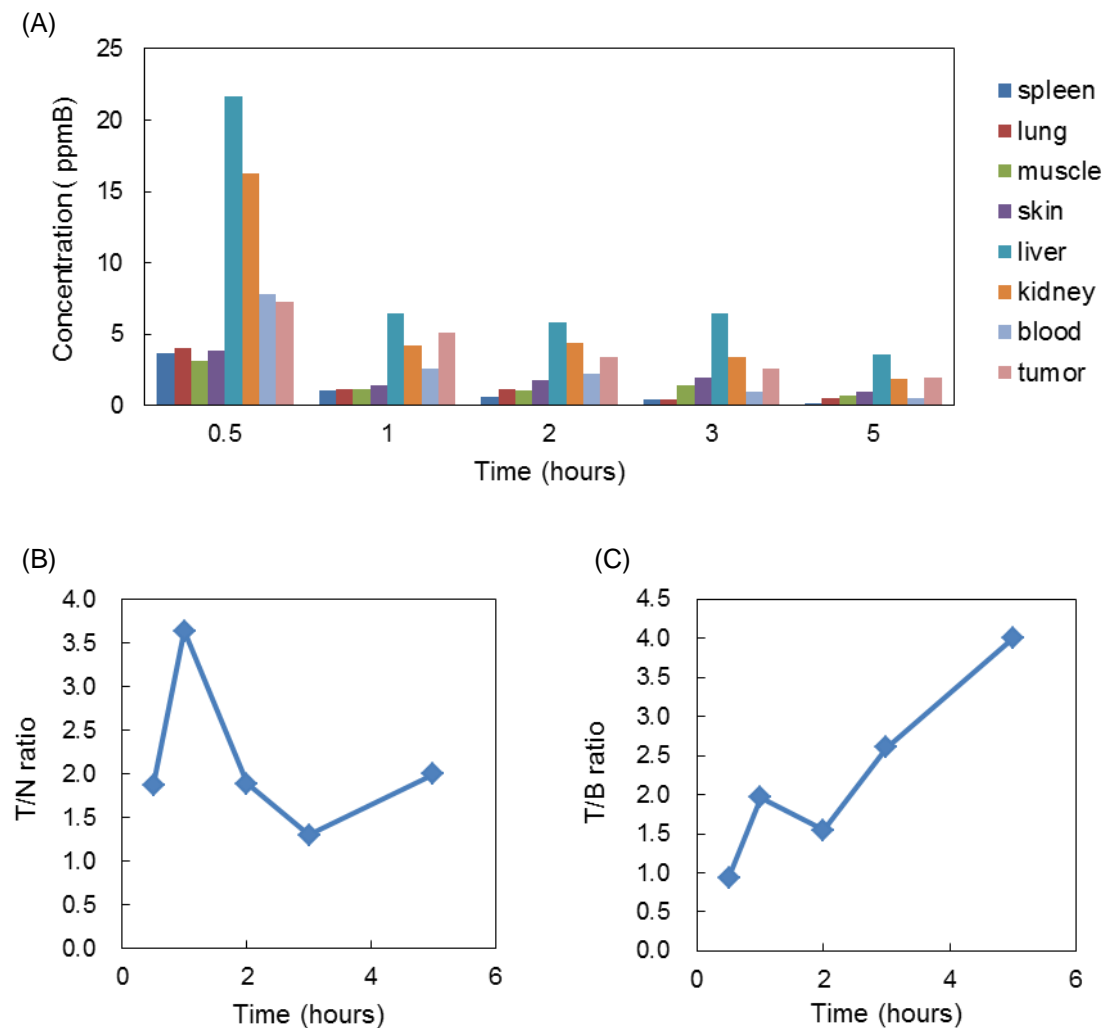


Fig. 5 CKA/HP β -CD の腫瘍集積性

(A) 所定時間後の各臓器 100 mg 当たりのホウ素量, (B) T/N 比, (C) T/B 比.

BNCT 評価

メラノーマ移植マウスに CKA/HP β -CD を投与して 90 分後、中性子照射を 90 分間行った時の延命効果を Fig. 6 に示した。未処理あるいは中性子照射のみに比べ、CKA/HP- β -CD で BNCT を行った群で延命効果が確認された。

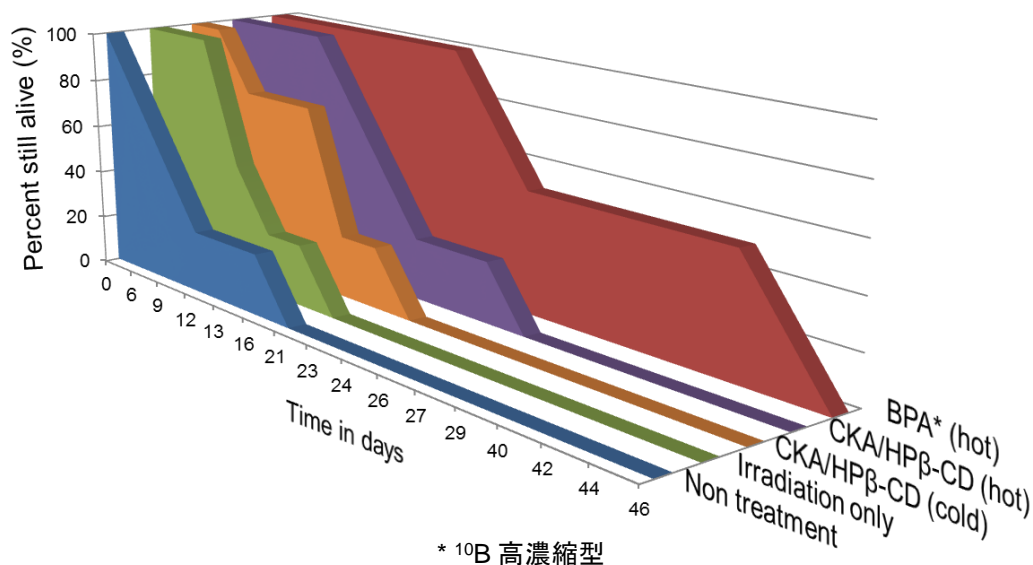


Fig. 6 BNCT による CKA/HP β -CD の延命効果

4. 考察

メラノーマに対する新規ホウ素クラスターとして、コウジ酸修飾カルボラン CKA の BNCT 評価を行った。難水溶性の CKA は等モル量の HP β -CD を用いて高速振動粉碎法もしくは混合法で簡便に 80%以上の可溶化率で水溶化できることがわかった。スケールアップの容易な混合法の場合、最大でホウ素濃度 2.7×10^4 ppm の水溶液が調製可能であり、現在臨床試験が行われている水溶性の BSH が 1,000 ppm で用いられていることを考えると CKA/HP β -CD は BNCT 薬剤として十分な水溶性を有していると考えられる。

CKA/HP β -CD はメラノーマ親和性を示し、免疫染色の結果より、ホウ素クラスターの核への集積が確認された。コウジ酸のメラノーマ細胞への取り込み機構は不明であるが、コウジ酸に核移行能がある可能性が示唆された。ホウ素クラスターが核集積することで、BNCTにおいて、より細胞障害性が高くなると期待できる。

メラノーマ移植マウスに対して BNCT を行った結果、未処理もしくはあるいは中性子照射のみに比べて CKA/HP β -CD で延命効果が確認された。また、現在臨床に用いられている L-BPA と比較すると延命効果が低いが、今回用いた L-BPA は ^{10}B が高濃縮されたものであり、一方 CKA は天然同位体比のものを用いており、腫瘍へのホウ素集積性が約 5 ppm で更に ^{10}B が実質 20%であることを考慮すると、今後、 ^{10}B 高濃縮型 CKA を用いることでメラノーマに対する高い BNCT 効果が期待できる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、助成いただきました公益財団法人医用原子力技術研究振興財団、また CKA 及び抗 BSH 抗体を提供していただきました大阪府立大学大学院生命環境科学研究科の切畑 光統教授に厚く御礼申し上げます。