

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：35413

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15463

研究課題名(和文)細胞膜流動性認識型新規ボロンハイブリッドリポソームを用いた中性子捕捉療法の開発

研究課題名(英文) Selective Accumulation of Boron-conjugated Liposomes Com-posed of Dimyristoylphosphatidylcholine to B16F10 Murine Mel-anoma Cells in Relation to Fluidity of Cell Membranes.

研究代表者

笠岡 敏 (Kasaoka, Satoshi)

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：90338690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではボロン化合物を合成し、膜流動性感受性ボロンリポソームの構成脂質として用いた。膜流動性感受性ボロンリポソームは有機溶媒を用いることなく、超音波処理だけでボロンを高濃度含有することができた。また、各種FITC標識ボロンリポソームの取り込みにおいて、メラノーマ細胞に対しては高い蛍光が見られたのに対し、繊維芽細胞ではほとんど観察されず、腫瘍細胞選択性が認められた。このリポソームは、37 °Cでの血清内24 hと4 °Cでの緩衝液中30 dのインキュベート後も高い安定性を示した。さらに、熱中性子照射によって、BSH水溶液群と比較して膜流動性感受性ボロンリポソームによる有意に高い殺細胞効果が示された。

研究成果の概要(英文)：Membrane-fluidity sensitive boron liposomes (MFSBLs) had a mean diameter of 59.6 nm and a zeta potential of -11.3 mV. High encapsulation efficiency value from 55% to 89% of B-10 in MFSBLs were obtained. MFSBLs had high stability (95-99%) in the retention of B-10 during storage at 4 °C for 30 d. All borocap-tate-loaded formulations had low cytotoxic effects in human fibroblast cells. MFSBLs were efficiently fused to melanoma cells, but were inefficiently fused to human fibroblast cells. Thus, it is essential to elevate the B-10 concentration in melanoma cells, while maintain low levels of B-10 in normal fibroblast cells. The tumor/normal ratio (T/N ratio) was 3.0. MFSBLs showed higher suppression of growth of melanoma cells than BSH solution. This result suggested novel MFSBLs composed of DMPC is useful for B-10 carrier on BNCT for melanoma.

研究分野：製剤学

キーワード：リポソーム 中性子捕捉療法 膜流動性

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の放射線治療研究では、線量をマクロの腫瘍に集中する技術開発に大きな努力を傾注し、大きな成果を収めた。これをさらに発展させるためには、線量を腫瘍細胞レベルで選択的に集中することが望ましい。その一つに、ボロン中性子捕捉療法 (BNCT) が挙げられる。しかし、¹⁰B と反応する低速の中性子自身を制御し、ある領域に集中させることは極めて困難である。従って、BNCT の成否はボロン化合物が、選択的に腫瘍組織や腫瘍細胞に集積するかにかかってくる。ボロン化合物としては Boronophenylalanine (BPA) や Borocaptate Sodium (BSH) のような代表的なものから、その誘導体である BPA-ol など、種々の改良が行われているが、体内動態・腫瘍標的性に問題がある。

私はボロン化合物の薬物動態・腫瘍標的性を改善させる目的で種々のリポソームなどの担体の開発を行ってきた。しかし、リポソーム単独では EPR 効果に伴う受動的な標的性しか期待できず、また、結合した各種リガンドによるエンドサイトーシス等を利用した内在化経路でも、安全性・腫瘍標的性・経済的効率性をいずれも十分に満たしたものは開発できていない。

近年、Kamiokaらはリポソーム脂質とミセル分子を緩衝液中で超音波処理するだけで極めて容易に調製することが可能な「ハイブリッドリポソーム」そのものが、抗がん剤を全く包含せずとも抗腫瘍効果を示すことを報告している。これはリポソームの構成脂質として、37 で「柔らかく」流動性が高い Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) を用いたときに起こり、「固い」Distearoylphosphatidylcholine (DSPC) では見られない。この現象は、正常細胞と比べて腫瘍細胞が特異的に「柔らかく」高い膜流動性を有しているため、正常細胞とは膜融合することなく、腫瘍細胞へ選択的なりポソーム脂質の膜融合・膜内蓄積を惹起することに起因する。この結果、細胞膜流動性の変化が Fas、FADD、カスパーゼ8 のシグナル伝達に伴い、アポトーシスを誘導することが示されている。

2. 研究の目的

悪性腫瘍治療に用いられるボロン中性子捕捉療法を発展させるために、腫瘍細胞の特異的な膜流動性に起因する腫瘍細胞選択的融合性を持つハイブリッドリポソームを応用し、新規の腫瘍細胞送達性をもったボロン担体の開発を行う。このリポソーム自身は脂質を主成分としており極めて生体適合性が高い。この低毒性に加えて、腫瘍細胞選択的膜融合に伴うアポトーシス誘導と、ハイブリッドリポソームに包含したボロン化合物の腫瘍細胞膜集積後の中性子照射に伴う殺細胞効果の相乗効果によって、従来

にない送達性能と治療効果を得られることを狙う。

3. 研究の方法

ボロンハイブリッドリポソーム (BHLs) の調製とその物性評価

ボロン化合物として、臨床においても頻用されており、高い安全性が確認されている BSH を用いた。BSH は 1 分子中に 12 個のボロンをかご状に有しており、1 分子当たりのボロン原子導入効率が優れている。BSH を含有するボロン化合物として、2 化合物を合成した。一つ目の化合物は一本の疎水基を有するボロン界面活性剤であり、流動性が高く細胞膜移行性が高いが、リポソームからの脱離も大きく安定が低い。ボロン界面活性剤の調製方法は以下の通りである。BSH をアセトンに溶解した後に、BSH のチオール基とドデシルアミンの amino 基に対するヘテロ架橋剤である N-succinimidyl 4-maleimidobutyrate を加え、トリエチルアミン存在下で室温にて 2 時間インキュベートした。その後、アセトンを減圧留去して、BSH に NHS 基を導入したボロン化合物を調製する。これにドデシルアミンを pH8.0 で 2 h 反応させて、ボロン界面活性剤を調製した (Fig. 1)。

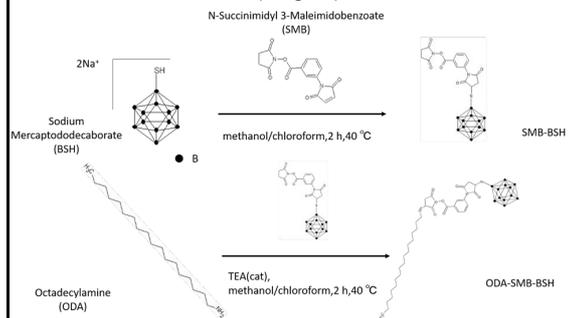


Fig. 1. ODA-SMB-BSH の合成方法

二つ目の化合物はボロン脂質であり、疎水基の大きさゆえに、膜流動性は若干低下し、細胞膜移行性がやや減少するが、リポソーム内での保持効率が高く安定なりポソームを調製できる。このボロン脂質の調製は、dimyristoylphosphatidylethanolamine-maleimide (DMPE-Mal) と BSH をアセトン中で結合させ、分離・溶媒除去することで行った。

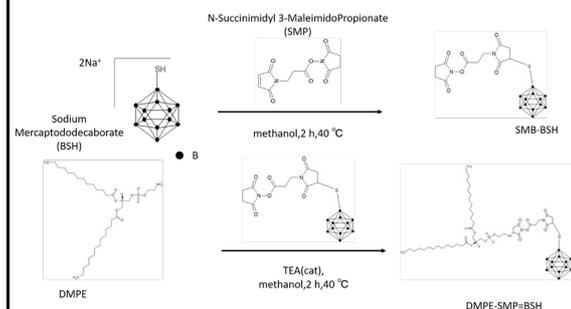


Fig. 2. DMPE-SMP-BSH の合成方法

ボロンハイブリッドリポソーム(BHLs)の調製は dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)、polyoxyethylene dodecyl ether (C12(E0)23)とボロン化合物を任意の脂質構成比で5%グルコース水溶液中に分散させ、プローブ型超音波発生器を用いて数分間超音波照射して、BHLsを調製した。調製後、超遠心(300,000×g)で取り込まれなかったボロン化合物を除去し、上清中と沈殿中のボロン濃度をICP-AESで測定して、リポソーム内へのボロン封入率を検討した。

BHLsの物性評価

BHLsの調製直後の粒子径を弾性光散乱法で測定した。酵素法による一般的なリン脂質定量と、ICP-AESによるボロン定量により、リポソーム中に含有されるボロン量を決定し、ボロン担体としての特性を評価した。また、4保管中のボロン含有率も併せて検討し、ボロン化合物等の構成脂質を決定した。さらに、生体内の安定性を検討するために、血清中での¹⁰Bの漏出も経時的に測定した。

BHLsのB16F10マウスメラノーマ細胞と正常細胞への取り込みの確認と毒性の検討

腫瘍細胞としてB16F10マウスメラノーマ細胞と正常細胞としてヒト繊維芽を用い、それぞれ 7.5×10^5 cellsを60mmのディッシュに播種し、各種ボロン製剤と2.5ppmの濃度で24hインキュベートした。3回PBSでウォッシュした後に、ICP-AESを用いてボロン濃度を測定することでボロンの取り込み効率を検討した。また、WST-8アッセイを用いて、BHLsの各濃度での、各種細胞における細胞増殖率を検討し、毒性の評価を行った。

In vitroでのB16F10マウスメラノーマ細胞、ヒト繊維芽細胞におけるBHLsのBNCT効果の検討

6well plateにB16F10マウスメラノーマ細胞 2.0×10^5 cells/cm²播種し、2h、37でインキュベートした。その後¹⁰B濃度が2.5~10ppmになるように各種BHLsを添加し、37で24hインキュベートした。細胞剥離後、遠心し、上清除去したのち、再懸濁を行い、テフロンチューブに細胞 5.0×10^4 cells/mlとなるように入れ、京大原子炉(KUR)重水中性子照射設備で熱中性子照射(1.8×10^{12} フルエンス/cm²)を行った。照射後、60mm dishに200 cells/3ml播種し、7日間CO₂インキュベーター37で培養し、0.1% crystal violetで染色後、コロニー数をカウントし、細胞生存率を算出した。

4. 研究成果

BHLsの物理的特性

ボロン化合物の混合比(ODA-SMB-BSH :

DMPE-SMP-BSH)が5:0、4:1、3:2の3種類のBHLsの¹⁰B回収率及び¹⁰B封入率を検討した(Table 1)。一本鎖であるODA-SMB-BSHのみをリポソーム膜に組み込んだBHLs(5:0)の¹⁰B封入率と比べて、二本鎖であるDMPE-SMP-BSHを含有させたBHL(4:1、3:2)の¹⁰B封入率が有意に上昇した。特にODA-SMB-BSH : DMPE-SMP-BSH=4 : 1のBHLにおける¹⁰B封入率が89.4%と3種類のBHLの中で最も高値を示した。一方、一本鎖であるODA-SMB-BSHを100%含んだBHLsにおける¹⁰B封入率は55.4%と大幅に減少した。

Table 1. ボロン化合物の構成比の違いによるBHLsの¹⁰B回収率と封入率

ODA:DMPE (m/m)	¹⁰ B回収率(%)	¹⁰ B封入率(%)
5:0	41.07	55.42
4:1	65.80	89.37
3:2	55.60	77.53

これは、ボロン化合物として一本鎖であるODA-SMB-BSHを100%含んだBHLsは、水溶性が高く、リポソーム膜表面に組み込まれにくい一方で、リポソーム膜から脱離しやすいためであると考えられる。混合比が4:1のBHLでは二本鎖コーン型であるDMPEに架橋剤のSMBを用いてBSHを反応させたDMPE-SMB-BSHを含有させることにより、ボロン化合物の脂溶性が高くなる。このことにより、二本鎖であるDMPE-SMB-BSHをODA-SMB-BSHの「楔」とし、ODA-SMB-BSHのリポソーム膜から脱離を抑え、¹⁰B封入率が向上したと考えられる。また、ODA-SMB-BSH:DMPE-SMP-BSH=4:1のBHLsのゼータ電位は -11.3 ± 2.1 mv、粒子径は 59.6 ± 6.4 nmであった。負の電荷を有するボロン化合物を含有するため、リポソーム粒子が負に帯電していた。また、平均粒子径は60nm未満であり、サイジング等を行うことなく、十分に小さいサイズを有するリポソームを調製できることが明らかとなった。各種BHLsの4における緩衝液内安定性試験において、1~30dの間、ほぼ100%の¹⁰B保持率であり、高い安定性を示した(Fig. 3)。同様に、BHLsを24h、37でインキュベートしたとき、血清内安定性は、90%以上のボロン保持効率があり、高い血清内安定性も有することが明らかとなった。BHLsは比較的脂溶性が低い、一本鎖ODA-SMB-BSHを多く含むため、安定性が低くなることが予想されたが、今回の結果から、十分安定な製剤であることが確認できた。

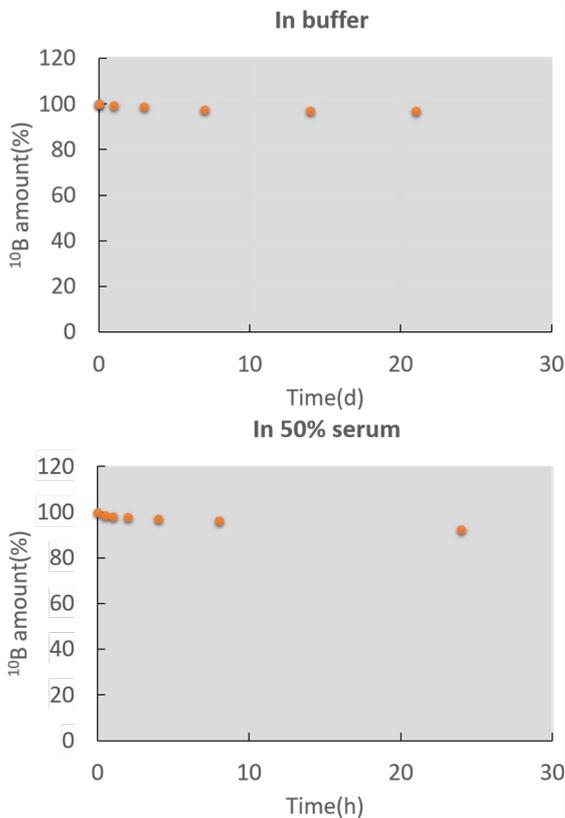


Fig.3. BHLs の緩衝液または血清中での安定性

各種 BHLs の細胞毒性試験

ODA-SMB-BSH:DMPE-SMP-BSH の混合比が 5:0、4:1、3:2 の BHLs 添加による、24 h 後のコントロールに対する細胞増殖率は、¹⁰B 濃度 5 ppm において、B16F10 マウスメラノーマ細胞では各々 65.4 ± 6.0%, 70.6 ± 4.2%, 98.2 ± 5.8% であり、一方、ヒト繊維芽細胞では各々 97.3 ± 1.6%, 84.0 ± 5.5%, 85.8 ± 6.5% だった (Fig.4)。B16F10 マウスメラノーマ細胞において、ポロン化合物の混合比が 5:0 と 4:1 の BHLs 添加による細胞増殖率が、3:2 の BHL 添加による細胞増殖率と比較して有意に低下した。これは、一本鎖 ODA-SMB-BSH の含有量が多くなることでリポソームの膜流動性が高くなり、膜流動性の高い腫瘍細胞と膜融合しやすくなり、アポトーシスが惹起されたためであると示唆された。また、各種 BHLs は ¹⁰B 濃度 5 ppm において繊維芽細胞での細胞増殖率が 85% 程度と、弱い毒性が認められたが、2.5 ppm ではヒト繊維芽細胞での細胞増殖率が 100% であった。このことから ¹⁰B 濃度 2.5 ppm 以下においてはヒト繊維芽細胞に対して毒性がほとんどないと考えられる。加えて、2.5 ppm でも B16F10 マウスメラノーマ細胞での細胞増殖率が 80% 程度であったことから、低 ¹⁰B 濃度でも各種 BHL の腫瘍細胞に対して抗腫瘍効果が認められた。また、データには示していないが、BHLs の細胞流動性に依存した腫瘍選択的な増殖抑制効果は構成脂質を DMPC とした場合にみられ、その他の DSPC や DPPC などの相転移温度が

41 以上の脂質を用いた場合は、選択性が消失することが明らかとなっている。

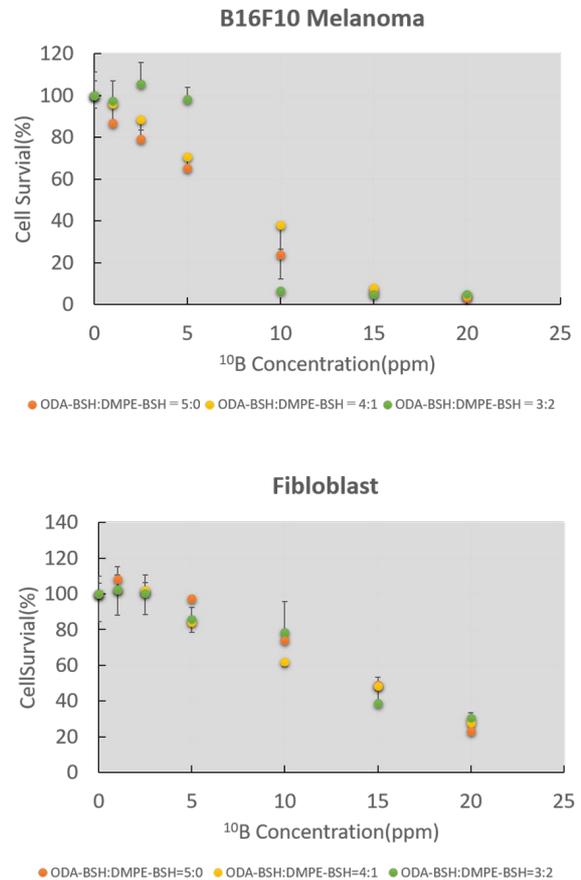


Fig.4. 各 BHLs の細胞毒性試験結果

各種 FITC 標識 BHLs の細胞への取り込み

FITC で蛍光標識した 5:0 及び 4:1 の BHLs を細胞流動性の高い B16F10 マウスメラノーマ細胞と 24 h インキュベートすることで、高い取り込みが観察された (Fig.4)。一方、繊維芽細胞ではほとんど蛍光が観察されず、腫瘍細胞選択性が認められた。

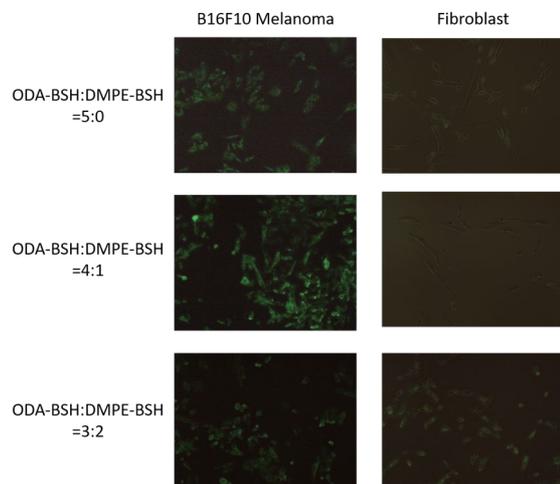


Fig.5. 各種 BHLs の B16F10 マウスメラノーマ及びヒト繊維芽細胞への蛍光取り込み

これに対し、ODA-SMB-BSH:DMPE-SMP-BSH=3:2のFITC標識BHLにおいてはB16F10マウスメラノーマ細胞及び、ヒト繊維芽細胞共に同程度の微弱な蛍光が観察され、腫瘍細胞選択性が認められなかった。これは、リポソーム膜に組み込まれる二本鎖のDMPE-SMP-BSHの含有量が多くなると、DMPCで構成されているBHLsの膜が固くなり、膜流動性が低下することで膜流動性の高い腫瘍細胞にも取り込まれにくくなると考えられる。

各種BHLsの細胞に対する¹⁰B取り込み

ODA-SMB-BSH:DMPE-SMP-BSH=5:0、4:1、3:2のBHLの¹⁰B取り込み量はB16F10マウスメラノーマ細胞では各々 0.794 ± 0.071 、 0.733 ± 0.035 、 0.315 ± 0.033 ¹⁰B $\mu\text{g}/10^6$ cellsであり、ODA-SMB-BSH:DMPE-SMP-BSH=5:0、4:1のBHLはODA-SMB-BSH:DMPE-SMP-BSH=3:2のBHLと比較して有意に高かった(Fig.5)。また、ヒト繊維芽細胞でも各々 0.228 ± 0.014 、 0.244 ± 0.003 、 0.187 ± 0.003 ¹⁰B $\mu\text{g}/10^6$ cellsとなり、B16F10マウスメラノーマ細胞と同様に3:2のBHLsと比較して、5:0、4:1のBHLの¹⁰B取り込み量は有意に高かった。また、B16F10マウスメラノーマ細胞(T)、ヒト繊維芽細胞(N)における¹⁰B取り込みのT/N比は、各々 3.48 ± 0.11 、 3.01 ± 0.14 、 1.68 ± 0.15 となり、5:0または4:1のBHLsが3:2のBHLsと比較して有意に高く、腫瘍細胞選択的な¹⁰B送達能力を有することが明らかとなった(Fig.6)。

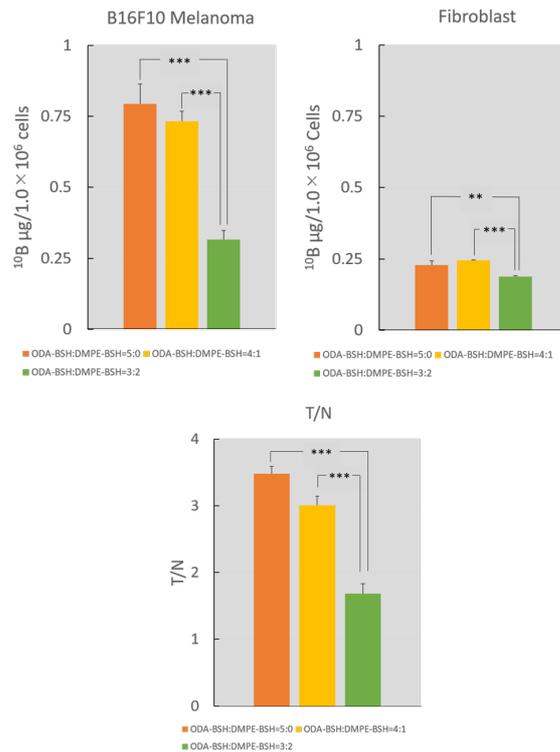


Fig.6. 各種BHLsのB16F10マウスメラノーマ及びヒト繊維芽細胞への¹⁰B取り込み

以上の製剤の安定性、細胞毒性試験、蛍光及び¹⁰B取り込み実験の結果より、中性子照射実験に用いるBHLsはODA-BSH:DMPE-BSHの混合比が4:1であるものを用いた。

B16F10マウスメラノーマ細胞に対する中性子照射による殺細胞効果

BHLsをボロン濃度として2.5~10.0ppm添加し、24hインキュベートした後に、熱中性子を 1.8×10^{12} フルエンス/ cm^2 照射した後に、コロニーアッセイで殺細胞効果を評価した。B16F10マウスメラノーマ細胞における、ポジティブコントロールに用いた5ppmのBSH水溶液の細胞生存率は84.5%であったのに対して、5ppmで添加したMFSBLsの細胞生存率は0%であり、2.5ppmにおいても細胞生存率が0%であった(Fig.7)。これらの結果から、臨床に用いられているBSH水溶液と比較して、BHLsは極めて低濃度である2.5~5ppmで高い抗腫瘍効果が認められた。

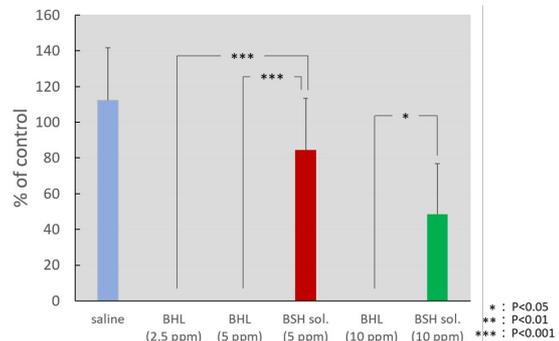


Fig.7. 中性子照射後のB16F10マウスメラノーマ細胞における各種ボロン製剤の殺細胞効果

この低濃度でのBNCT効果の理由としては、膜流動感受性が高いBHLsが腫瘍細胞に対して膜融合し、中性子非照射でもアポトーシスを起こす、BHLs単独での抗腫瘍効果との相乗効果が挙げられる。その他の原因として、腫瘍細胞に取り込まれるBHLと腫瘍細胞の核との距離がある。中性子照射による核反応の二つの重粒子線の飛程は脳腫瘍細胞ほぼ一個分の大きさに相当しており、飛程距離がそれぞれ約 $9 \mu\text{m}$ 及び約 $5 \mu\text{m}$ であり、その重粒子線のエネルギーは飛程が長くなるに連れて減衰していく。加えて、腫瘍細胞の核との距離が近ければ近いほど二つの重粒子線による核反応が腫瘍細胞の核と衝突する確率が上がる。一般的にBNCTにおけるBSHのようなボロン製剤には腫瘍組織内¹⁰B濃度が20~40ppmであることが求められているが、その腫瘍組織内¹⁰B濃度とはほとんど細胞の間隙にあるボロン製剤の¹⁰B濃度を示し、その多くは腫瘍細胞に直接取り込まれていない。一方、本研究で開発したボロン製剤であるBHLsは腫瘍細胞膜に膜流動感受的に組み込まれているため、腫瘍細胞の核との距離が近

い。そのため、線が核と衝突する確率が高く、エネルギーの減衰も小さいため、より効果的に腫瘍細胞を傷害できる。以上より、低濃度でも中性子照射による極めて高い殺細胞効果が得られた理由として、BHLs そのものもつアポトーシス誘導能と¹⁰Bの腫瘍細胞膜局在性が、この結果に深く関わっていると考えられる。

本研究で開発した新規 BHLs は有機溶媒を用いることなく超音波処理だけで¹⁰Bを高濃度含有した。調製した BHLs は高価なりガンドや抗体を一切用いないにも関わらず、膜流動感受性、腫瘍選択性を有し、中性子照射による極めて高い殺細胞効果が認められた。本研究では、京大原子炉におけるマシンタイムが最終年度の2回のみとなり、十分に中性子を照射できなかった。今後、照射条件をフルエンス毎に詳細に検討し、BHLs を用いた効果的な中性子捕捉療法を開発していきたい。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

國澤敦、笠岡敏、沖島由起、田中佑典、吉川広之、田中佑典、吉川広之、増永慎一郎、小野公二

中性子捕捉療法を目的とした膜流動感受性ボロンハイブリッドリポソームの開発

2018 年 日本薬学会第 138 年会
(石川県・金沢市)

平町隆明、笠岡敏、小石雅也、二木秀仁、田中佑典、吉川広之、田中佑典、吉川広之、増永慎一郎、小野公二

中性子捕捉療法を目的とした BR2 ペプチド結合ボロンハイブリッドリポソームの開発

2018 年 日本薬学会第 138 年会
(石川県・金沢市)

土井康寛、笠岡敏、上地弘輝、松岡純平、福島光博、杉本祐規、田中佑典、吉川広之、増永慎一郎、小野公二

中性子捕捉療法を目的とした腫瘍標的型細胞透過性ペプチド結合ボロンリポソームの開発

2016 年 日本薬学会第 136 年会
(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠岡 敏 (Kasaoka, Satoshi)
広島国際大学・薬学部・准教授
研究者番号：90338690

(2) 研究協力者

増永 真一郎 (Masunaga, Shinichiro)
京大原子炉