

平成 21 年 5 月 6 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：平成 18 年度～平成 20 年度

課題番号：18390360

研究課題名（和文） 膜乳化ナノ技術による癌透過性エマルジョンを用いた耐性阻止分子標的治療の検討

研究課題名（英文） Development of molecular targeting therapy using cancer permeable WOW emulsion by membrane emulification

研究代表者

江里口 正純(ERIGUCHI MASAZUMI)

昭和大学・薬学部・客員教授

研究者番号：10114406

研究成果の概要：

膜乳化法という先駆的なナノテクノロジー技術を応用し、癌血管選択的なインテリジェントデリバリーシステムを開発するための基礎研究を行った。我々が現在までに進めている中性子捕捉療法(BNCT)はボロン原子と熱中性子の核反応により細胞障害を生じる($^{10}\text{B} + ^1_0\text{n} \rightarrow ^7_3\text{Li} + ^4_2\text{He}(\alpha) + 2.31\text{ MeV}$)。その反応飛呈は約 $10\mu\text{m}$ であり、ボロン原子を腫瘍選択的に集積できれば、周囲の正常組織を傷害せずに癌細胞を選択的に破壊することが出来る。我々は、難治癌のひとつである肝細胞癌に対して中性子捕捉療法を応用すべく、VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルに対し、ボロンキャリアーとしてWOWエマルジョンを用いることにより癌組織選択的にボロン原子を集積することに成功した。 $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ (BSH)水溶液とLipiodolのエマルジョンをシラス多孔質ガラスフィルター(SPG膜)を通しボロン封入WOWエマルジョンを作製した。このエマルジョンをVX-2 ウサギ肝腫瘍モデルに対して固有肝動脈より投与し、ICP-Massspectroscopy腫瘍組織および正常肝組織におけるボロン濃度を測定し、さらに組織学的検討を行った。ボロン封入WOWエマルジョンを肝動注1, 3, 7日後の腫瘍組織におけるボロン濃度はそれぞれ141ppm、61ppm、28ppmであり対照群のボロンLipiodol混和液の肝動注1, 3, 7日後の腫瘍組織におけるボロン濃度はそれぞれ58ppm、24ppm、9ppmであった。組織学的にWOWエマルジョン投与群では腫瘍組織においてLipiodol混和液よりのサイズの小さい均一な脂肪滴を認めた。さらに、電顕像においてWOWエマルジョン投与群では腫瘍細胞内にWOWエマルジョンの取り込み像を認めた。以上の結果より、肝臓癌において癌選択的にボロン原子を集積させるにはWOWエマルジョンがより優れている事がわかり、中性子捕捉療法におけるボロンキャリアーとして応用が可能である。

原発性肝癌の治療においては肝切除が行える症例は約 30% と少なく、術前・後に施行される肝動注化学療法では抗癌剤とリピオドールを混和して注入するが、この手法では抗癌剤は容易にリピオドールと分離し腫瘍内に貯留していない現状であり、標準治療の確立が急務である。我々は 2 段階膜乳化法という WOW エマルジョンのサイズをマイクロ～ナノオーダーまで個別のサイジング可能な最新の手法を用いて、臨床応用を目指し GLP レベルのエピルピシン封

入 WOW エマルションを作製し前臨床試験を施行中である。南九州に存在するシラスを用いて熱および酸処理することによりシラス多孔質ガラスフィルター（SPG 膜）を開発した。この SPG 膜を用いて、エビルピシン封入 WOW エマルションを作製した。我々が作製した WOW エマルションは約 70 μm に均一なサイジングができており現在までに約 10 ヶ月間安定性を確認している。このエビルピシン封入 WOW エマルションをウサギ VX-2 肝腫瘍モデルに肝動注した場合に著明な腫瘍増殖抑制効果を認めた。HE 染色・脂肪染色により腫瘍組織におけるリポドールの沈着を認め、電子顕微鏡像において腫瘍細胞内に WOW エマルションの集積像を認めることもできた。腫瘍細胞へのエビルピシンの集積は WOW エマルションを用いて増加し Endocytosis の機序も考えられる。この WOW エマルションを用いての肝臓癌に対する標準治療への応用が期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H18 年度	6,400,000	917,000	7,317,000
H19 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
H20 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	15,200,000	3,557,000	18,757,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：(1)膜乳化法、(2)WOW エマルション、(3)中性子捕捉療法、(4)ボロン化合物、(5)ファルモルピシン、(6)肝動注化学療法

1. 研究開始当初の背景

肝臓癌の治療においては肝臓癌の Hyper-vascularity の性質を利用し Lipiodol に抗癌剤を混入させ、動注療法が行なわれているが、我々はシラス多孔質ガラスフィルター (SPG 膜) を用いた膜乳化法を世界に先駆け開発し、50 μm ~ 100nm までのサイジングを可能とし、粒子径を均一にすることに成功し、癌組織により近くエマルジョンを到達させ、血管透過性の亢進を誘導し、癌栄養血管より癌細胞にエマルジョンを送達させることに成功した。この W/O/W エマルションを用いることにより、臨床研究において原発性肝臓癌の患者において、従来の動注療法に比較して延命効果を顕著に認めている。

膜乳化法という先駆的なナノテクノロジー技術を用いて細胞内に選択的に薬剤を送達する方法を併用できれば、より効果的な分

子標的抗腫瘍効果と副作用の軽減を得ることができ、インテリジェント化 DDS の分子標的治療や遺伝子治療への応用は、今後の難治性癌の集学的治療の開発に変革をもたらすと思われる。ヒトに安全な分子標的治療および遺伝子治療を含めた集学的治療用インテリジェントドラッグデリバリーシステムの開発は意義のあるものであり、難治性癌の手術を含めた集学的治療を臨床応用へと進めていきたい。

2. 研究の目的

難治性癌の集学的治療の目的で、抗癌剤や分子標的薬・癌抑制遺伝子を生体細胞に導入する場合、抗腫瘍効果をいかに効果的に発現させるか、かついかにして害作用や副作用を軽減させるかという問題が重要であり、より適切な "ドラッグデリバリーシステム (DDS)"

の開発が待たれるところである。我々は、膜乳化法という先駆的なナノテクノロジー技術を応用し、癌血管選択的なインテリジェントデリバリーシステムを開発し、分子標的治療を図りたい。

3. 研究の方法

(1) シラス多孔質ガラスフィルター (SPG膜) による膜乳化法を用いて W/O/W エマルジョンを作成する。すなわち、新規白金抗癌剤 (Oxaliplatin, Diplatin etc.)・分子標的薬 (PM-7, TOB, 薬剤耐性遺伝子産物阻害薬)・癌抑制遺伝子 (p53, tob etc.)・中性子捕捉療法剤 (BSH, B32, etc) を封入した W/O/W エマルジョンの作成を行う。W/O/W エマルジョン中のボロン、プラチナ原子の濃度測定は ICP-Massspectroscopy 法にて行う。

動注療法モデルとして最も臨床的に行われている肝動脈の注入モデルを作成する。

(2) 肝動注カテーテルを全身麻酔下に留置し、動注療法による担癌中・大動物への投与を行い、癌組織及び正常肝組織における毒性試験、治療効果の病理学的な検討 (免疫組織染色、電子顕微鏡) および経時的な超音波検査による腫瘍サイズの計測を行い、治療効果の判定を行う。蛍光ラベルした W/O/W エマルジョンを肝動注後、癌及び正常肝組織切片からどのような細胞に集積しているかを共焦点顕微鏡下で調べる。(高橋)

以上の実験結果と検討を基に臨床応用の可能性を探索する。

4. 研究成果

(1) Accumulation of Boron Compounds to Tumor with Intrarterial Administration of Boron Entrapped Water-in-Oil-in-Water Emulsion by Using Neutron Capture Autoradiography

Abstract

The cytotoxic effect of boron neutron capture therapy (BNCT) is due to a nuclear reaction between ^{10}B and thermal neutrons. It is necessary to accumulate the ^{10}B atoms to the tumor cells selectively for effective BNCT. In order to achieve an accurate measurement of ^{10}B concentrations in the biological samples, we employed a technique of neutron capture autoradiography (NCAR) of sliced samples of tumor and normal tissues using CR-39 plastic track

detectors. The CR-39 alpha-track detectors attached with samples were exposed to thermal neutrons in the thermal column of the JRR3 reactor of Japan Atomic Nuclear Institute. We obtained NCAR images for VX-2 tumor in rabbit liver after injected BSH entrapped water-in-oil-in-water (WOW) emulsion by intrarterial injection via proper hepatic artery. The ^{10}B concentrations in the VX-2 tumor and normal liver of rabbit were estimated by means of alpha-track density measurements. In this study, we can increase the selective accumulation of ^{10}B atoms in the VX-2 tumor by intrarterial injection of boron entrapped WOW emulsion until 7 days after injection. Therefore, we will be able to apply boron entrapped WOW emulsion to BNCT for hepatocellular carcinoma, and NCAR technique for detection of effective ^{10}B carrier in BNCT for cancer.

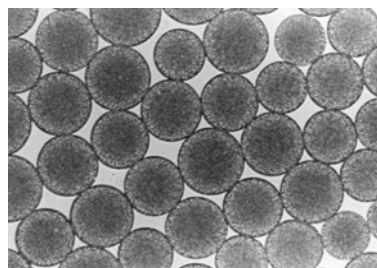


Figure 1. Microphotograph of WOW emulsion

Results & Discussion

We prepared BSH entrapped WOW emulsion. The mean ^{10}B concentration was 13000 ppm by ICP-MAS. The size of WOW was controlled to 50 μm .

The ^{10}B concentration in VX-2 tumour was 141 ppm, 61 ppm by WOW emulsion after day1, day3 intrarterial injection, respectively. The ^{10}B concentration of tumour was 58, 24ppm by Lipiodol mix emulsion after day1, day3 same injection, respectively (Table 1).

The histological staining showed the superior accumulation of the fat droplets of WOW emulsion in tumour site compared with Lipiodol mix emulsion. Electromicroscopic figure of hepatocellular carcinoma after arterial-injection chemotherapy using WOW emulsion: The microdroplets of iodized poppy-seed oil was retained in the cytoplasm of cancer cell in the same conformation as preparation time, but there was no

accumulation of fat droplets in Lipiodol emulsion.

Table 1. ^{10}B concentration of VX-2 hepatic tumor bearing rabbit model after intrarterial injection of ^{10}B -WOW emulsion or ^{10}B -Lipiodol mix

WOW	Tumour	Normal Liver	Blood
Day-1	141.8	6.1	1.2
Day-3	61.7	4.3	0.1

Lipiodol	Tumour	Normal Liver	Blood
Day-1	58.0	14.6	0.4
Day-3	24.5	3.9	0.2

The ^{10}B concentrations of samples were determined by ICP-masspectroscopy of Juntendo University

From observed track densities and Fig. 2, we can estimate the ^{10}B accumulations in the organs. ^{10}B accumulations were estimated for the strongly concentrated part of the tumor at day 3 after injection by WOW emulsion.

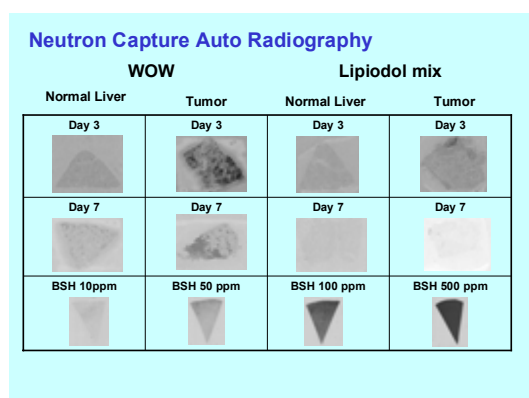


Figure 2. Neutron capture auto- radiography. The NCAR was showed that accumulation periods of Boron atoms to VX-2 tumor was extended by using WOW emulsion.

According to clinical administration of WOW emulsion drug encapsulated anti-cancer reagent in inner droplets, was surprisingly effective for both terminal and multi-originated in HCC when the drug was injected to suffered liver through a catheter inserted in liver artery. ^{10}B entrapped WOW emulsion is possible to delivery and reserve the boron atoms to the cancer cell in tumour tissues. These results are shown that ^{10}B

entrapped WOW emulsion most useful for intrarterial boron delivery carrier on BNCT to cancer. We are ongoing to planning the in vivo evaluation of ^{10}B entrapped WOW emulsion, and the clinical trial of BNCT for HCC patients, and hope to perform first BNCT trial with WOW emulsion in near future.

(2) 膜乳化テクノロジーによる WOW エマルションを用いた原発性肝癌に対する肝動注療法

[はじめに] 原発性肝癌の術前・後に施行される肝動注化学療法では抗癌剤とリピオドールを混和して注入するが、この手法では抗癌剤は容易にリピオドールと分離し腫瘍内に貯留していない現状であり、標準治療の確立が急務である。我々は2段階膜乳化法という WOW エマルションのサイズをマイクロ～ナノオーダーまで個別のサイジング可能な最新の手法を用いて、臨床応用を目指し GLP レベルのエピルピシン封入 WOW エマルションを作製し前臨床試験を施行中であるので報告する。

[方法] 南九州に存在するシラスを用いて熱および酸処理することによりシラス多孔質ガラスフィルター (SPG 膜) を開発した。この SPG 膜を用いて、エピルピシン封入 WOW エマルションを作製した。

[結果・考察] 我々が作製した WOW エマルションは約 $70\ \mu\text{m}$ に均一なサイジングができており現在までに約 10 ヶ月間安定性を確認している。このエピルピシン封入 WOW エマルションをウサギ VX-2 肝腫瘍モデルに肝動注した場合に著明な腫瘍増殖抑制効果を認めた。HE 染色・脂肪染色により腫瘍組織におけるリピオドールの沈着を認め、電子顕微鏡像において腫瘍細胞内に WOW エマルションの集積像を認めることもできた。腫瘍細胞へのエピルピシンの集積は WOW エマルションを用いて増加し Endocytosis の機序も考えられる。この WOW エマルションを用いての肝臓癌に対する標準治療への応用が期待できる。

我々は、シラス多孔質ガラスフィルター (SPG 膜) を用いた膜乳化法を応用して、サイズの均一な肝臓癌の腫瘍血管に選択的に取り込まれる W/O/W エマルションの開発を行っており、Epilubicin、をはじめとしてエマルジョンに封入している。このエマルジョンは Liposome における封入率が約 10 ~ 20% であるのに対して、水溶性薬剤であれば 100% 薬剤が封入できる利点があり、癌局所の濃度を超選択的に高めることが出来る。膜乳化法による癌血管選択的な W/O/W エマルジョンを用いて DDS のインテリジェント化を行うことにより、効果的に薬物及び遺伝子の癌組

織移行の改善と抗癌作用の増大を達成出来ると思われる。これらの新しい治療法および新技術を融合することにより、次世代の集学的治療法のさらなる展開を行っていきたい。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

Yanagi H, Ogata A, Sugiyama H, Eriguchi M, Takamoto S, Takahashi H : Application of drug delivery system to boron neutron capture therapy for cancer, Expert Opin Drug Deliv.,5,4, 427-443, 2008.

Ogata A, Yanagi H, Ishikawa E, Morishita Y, Mitsui S, Yamashita A, Hasumi K, Takamoto S, Yamase T, Eriguchi M : Antitumour effect of polyoxomolybdates: induction of apoptotic cell death and autophagy in in vitro and in vivo models, Br J Cancer,98,2, 399-409, 2008.

Sakae M, Ito T, Yoshihara C, Iida-Tanaka N, Yanagi H, Eriguchi M, Koyama Y. : Highly efficient in vivo gene transfection by plasmid/PEI complexes coated by anionic PEG derivatives bearing carboxyl groups and RGD peptide, Biomed Pharmacother ,62,7, 448-453, 2008.

Furuya Y, Yasuhara H, Naka S, Yamazaki K, Yanagi H, Wakahara T, Akimoto H. : Intestinal evisceration through the anus caused by fragile rectal wall., Int J Colorectal Dis.,23,7,721-722, 2008.

Suzuki R, Takizawa T, Kuwata Y, Mutoh M, Ishiguro N, Utoguchi N, Shinohara A, Eriguchi M, Yanagi H, Maruyama K.: Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome, Int J Pharm,346, 2009/1/2, 143-150, 2008.

Yanagi H, Sakurai Y, Ogura K, Kobayashi T, Furuya Y, Sugiyama H, Kobayashi H, Ono K, Nakagawa K, Takahashi H, Nakazawa M, Eriguchi M.: Evaluation of neutron dosimetry on pancreatic cancer phantom model for application of intraoperative boron neutron-capture therapy., Biomed Pharmacother,61,8, 505-514, 2007.

S. Mitsui, A. Ogata, H. Yanagi, H. Kasano, T. Hisa, T. Yamase and M. Eriguchi: Antitumor

activity of polyoxomolybdate, [NH₃Pri]₆[Mo₇O₂₄]-3H₂O, against, human gastric cancer model, Biomedicine & Pharmacotherapy,60, 353-358, 2006.

H. Yanagi, A. Ogata, S. Mitsui, T. Hisa, T. Yamase and M. Eriguchi: Anticancer activity of polyoxomolybdate, Biomedicine & Pharmacotherapy,60, 349-352, 2006.

Yanagi H, Maruyama K, Takizawa T, Ishida O, Ogura K, Matsumoto T, Sakurai Y, Kobayashi T, Shinohara A, Rant J, Skvarc J, Ilic R, Kühne G, Chiba M, Furuya Y, Sugiyama H, Hisa T, Ono K, Kobayashi H, Eriguchi M: Application of boron-entrapped stealth liposomes to inhibition of growth of Tumour cells in the in vivo boron neutron-capture therapy model, Biomedicine & Pharmacotherapy,60, 43-50, 2006.

Hashimoto M, Morimoto M, Saimoto H, Shigemasa Y, Yanagi H, Eriguchi M, Sato T: Gene transfer by DNA/mannosylated chitosan complexes into mouse peritoneal macrophages, Biotechnol Lett,28,11, 815-821, 2006.

Yanagi H, Higashi S, Ikushima I, Nishimura R, Mizumachi R, Murata Y, Morishita Y, Kajiyama T, Shinohara A. and Eriguchi M: Application of Boron-Entrapped WOW Emulsion as boron delivery carrier for boron neutron capture therapy on VX-2 rabbit hepatic cancer model, European Journal of Surgical Oncology,32,11, S19, 2006.

H. Yanagi, H. Kumada, Y. Sakurai, T. Nakamura, Y. Furuya, H. Sugiyama, K. Ono, S. Takamoto, M. Eriguchi, and H. Takahashi : Feasible Evaluation of Neutron Capture Therapy for Local Recurrent Breast Cancer, Applied Radiation & Isotopes, in press.

Yanagi H, Tanabe T, Sumimoto H, Sugiyama H, Matsuda S, Nonaka Y, Ogiwara N, Sasaki K, Tani K, Takamoto S, : Tumor growth suppression by adenovirus-mediated introduction of a cell growth suppressing gene to in a pancreatic cancer model, Biomed Pharmacother., in press.

Yanagi H, Hisa T, Ogata A, Miyazaki A, Nonaka Y, Nishihira T, Osada I, Sairenji T, Sugiyama H, Furuya Y, Kidani Y, Takamoto S, Takahashi H, Eriguchi M : Improvement of sensitivity to platinum compound with siRNA

knockdown of upregulated genes in platinum complex-resistant ovarian cancer cells in vitro, Biomed Pharmacother.,in press.

柳 衛 宏 宣 : 癌抑制遺伝子癌細胞内導入療法、日本臨床、印刷中

〔学会発表〕(計 8 件)

Yanagie H, Kumada H, Sakurai Y, Furuya Y, Sugiyama H, Ono K, Takamoto S, Eriguchi M, and Takahashi H: Feasible Evaluation of Neutron Capture Therapy for Local Recurrent Breast Cancer, 13th ICNCT,2008.11, Florence, Italy

Yanagie H, Kakimi K, Hosoi A, Ogata A, Sakurai Y, Mouri K, Eguchi K, Morishita Y, Shinohara A, Sugiyama H, Takamoto S, Eriguchi M, and Takahashi H: Inhibition of Tumor Growth of Mouse Colon Cancer Cell Line by Boron Neutron Capture Therapy & Immunotherapy, 13th ICNCT,2008,11, Florence, Italy

Yanagie H, Mikado S, Yasuda N, Higashi S, Ikushima I, Mizumachi R, Murata Y, Morishita Y, Shinohara A, Ogura K, Sugiyama H, Takamoto S, Eriguchi M, and Takahashi H: Accumulation of Boron Compounds to Tumor with Intrarterial Administration of Boron Entrapped Water-in-Oil-in-Water Emulsion by Using Neutron Capture Autoradiography, 13th ICNCT,2008,11, Florence, Italy

H. Yanagie, S. Higashi, I. Ikushima, T. Terao, Y. Morishita, R. Nishimura, M. Nagata, T. Nagasaki, K. Kakimi, T. Imagawa, T. Nakashima, K. Arimori, M. Eriguchi, & S. Takamoto: Application of Epirubicin Entrapped WOW Emulsion by Double Emulcification Technique to Arterial-Injection-Chemotherapy for Hepatocellular Carcinoma, 第 67 回日本癌学会総会,2008,10, 名古屋

Hironobu Yanagie, Hiroyuki Takahashi: Application of Boron Delivery System to Boron Neutron Capture Therapy for Cancer, GoNERI 1st Memorial International Symposium,2008,10, 東京

Mikado Shoji, Yanagie Hironobu, Yasuda Nakahiro, Higashi Syushi, Ikushima Ichiro, Mizumachi Ryuji, Murata Yuji, Morishita Yasuyuki, Nishimura Ryouhei, Shinohara

Atsuko, Ogura Koichi, Sugiyama Hirotaka, Takamoto Sinichi, Eriguchi Masazumi, Takahashi Hiroyuki: Application of Neutron Capture Autoradiography to Boron Delivery Seeking Techniques for Selective Accumulation of Boron Compounds to Tumor with Intrarterial Administration of Boron Entrapped Water-in-oil-in-water Emulsion, ITMNR6,2008,9, Kobe, Japan

Hironobu Yanagie, Kazuhiro Kakimi: Application of WOW emulsion as Immune-stimulation carrier for cancer therapy, 19th International Congress on Anti Cancer Treatment,2008,2, PARIS, FRANCE

Yanagie H, Mizumachi R, Murata Y, Morishita Y, Higashi S, Ikushima I, Nishimura R, Kajiyama T, Ono K, & Eriguchi M: Selective Enhancement of Boron Accumulation with Boron-Entrapped Water-in-oil-water Emulsion in VX-2 Rabbit Hepatic Cancer Model for BNCT, 12th ICNCT,2006,9, Takamatsu, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

江里口 正純 (ERIGUCHI MASAZUMI)

研究者番号 : 10114406

(2)研究分担者

高橋 浩之 (TAKAHASHI HIROYUKI)

東京大学・大学院工学系研究科原子力国際専攻・教授

研究者番号 : 70216753

(3)連携研究者

柳衛 宏宣

東京大学・大学院工学系研究科原子力国際専攻・特任准教授

研究者番号 : 30212278