

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～ 2008

課題番号：19790904

研究課題名 (和文) Double ligand PEG-リポソームを用いた新規 BNCT の開発

研究課題名 (英文) The potential of double ligand-cojugated polyethyleneglycol liposomes encapsulating sodium borocaptate (BSH) for boron neutron capture therapy.

研究代表者

笠岡 敏 (KASAOKA SATOSHI )

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号：90338690

研究成果の概要：

本研究では BBB 透過リガンドとして、ブラジキニン B1 受容体アゴニストである合成ペプチド及び、腫瘍標的リガンドとして、ラミニン様ペプチドを用いた。これら二つのリガンドを PEG-リポソームの PEG 末端に結合させ、リポソームを調製した。このリポソームを用いることで、*in vitro*における、BBB 透過性及び、腫瘍細胞内取り込み能が確認された。よって、この新規リポソームによって、脳腫瘍に対する効果的な BNCT 開発の可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：リポソーム、BBB、BNCT

## 1. 研究開始当初の背景

① 21 世紀に目指すべき放射線治療法として、線量が癌細胞レベルで選択的に集中する放射線治療が考えられる。その一つに、ボロン中性子捕捉療法 (BNCT) が挙げられる。こ

の BNCT の成否はボロン化合物がどの程度、選択的に癌組織や癌細胞に集積するかにかかってくる。

② ここで、ブラジキニン B2 受容体のアゴニストである Receptor-Mediated

Permeabilizer-7 (RMP-7)を用いることで、優れたBBB透過性が報告されている。

③ また、トランスフェリン (TF) を血中滞留性が高いPEG-リポソームに結合したTF-PEG-リポソームは、腫瘍細胞に高発現したトランスフェリンレセプターを介した能動的ターゲティングが可能である。したがって、この様な癌指向性運搬体に、 $^{10}\text{B}$ 化合物を封入すれば、全身投与によって癌組織・癌細胞に $^{10}\text{B}$ 化合物を送達させることが可能となり、有効な中性子捕捉療法が展開できると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、PEG-イムノリポソームによって初めて可能となるが、腫瘍標的リガンドと、さらに、BBB透過を目的として、RMP-7のような血管透過リガンドを、PEG鎖の末端に結合させ、二つのリガンドが協調し、BBB透過能と腫瘍標的化能を併せ持つリポソームの開発が目的である。本研究ではリガンドとして、広範囲の組織に発現しているブラジキニンB2受容体ではなく、腫瘍及び、炎症組織の血管に特異的に発現しているブラジキニンB1受容体に注目し、そのアゴニストペプチドを用いた。また、腫瘍標的化リガンドとして、TFの代わりに、腫瘍細胞に高発現している67kDラミニン受容体アゴニストペプチドを合成した。これは、現在原因を検討中であるが、予備実験においてTFとその他のリガンドを結合した場合、結合率が急激に減少したためである。

## 3. 研究の方法

(1) Double ligand PEG-リポソーム (以下D-リポソーム) の調製は、逆相蒸発法、ミセル移行法を用いて行った。

① DSPE/CHを構成脂質とし、必要とする薬物を封入したリポソームをREV法で調製した。

② マレイミド基をPEG末端に有するMAL-PEG-DSPE、Eを用い、pH7.0のHEPES緩衝液中でミセルを形成した。

③ 二種類のligand(ラジキニンB1受容体アゴニスト (以下peptide-B) [Sar-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-D-Phe-Cys-OH]または、腫瘍標的ペプチド(以下 peptide-L) [Dat-Ile-Gly-Ser-Har-Cys-OH])を別々に②で調製したミセルに添加し、25°Cで1hインキュベートした。ここで、peptide-Bのみがリガンドとして結合したリポソームをB-リポソーム、peptide-Lのみを結合したリポソーム

をL-リポソームとする。

④ ③でリガンドを包埋したリポソームに、リガンドを結合させていないPEG-DSPEのミセルを添加し、同様にインキュベートした。

④ 超遠心により、リポソームに包埋されなかったミセルを除去した。

調製したリポソームのリガンド結合率、モデル薬物封入物はそれぞれ蛍光強度を測定することで行った。

(2) BBB透過実験には、BBBキット™(ファーマコセル)を用いて検討した。ただし、BBBにブラジキニンB1受容体を発現させるために、ラットグリオーマC6細胞と24h共培養したconditioned mediumを用いて、腫瘍病態BBBモデルを作成した。血管側にカルボキシフルオレセインを封入した各種リポソームを添加して、経時的に脳側の蛍光強度を測定した(図1)。

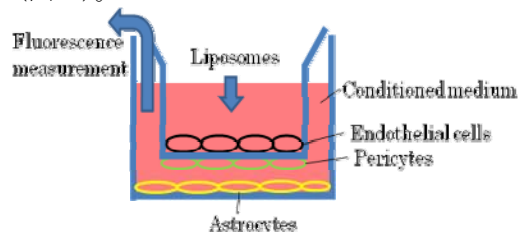


図1 腫瘍病態BBBモデル

## 4. 研究成果

(1) 適宜蛍光ラベルした各リガンドのリポソームへの導入効率は、4-35%であり、2種類のリガンドをつけることによって、大きなリガンド導入効率の有意な低下は見られなかった(図2)。一方で、反応条件によって大きく導入効率が変化する傾向がみられた。本研究では、各ミセルの添加量をリポソーム脂質の5mol%、ミセルとの反応条件を4°C、24hとし、以下の透過実験を行った。

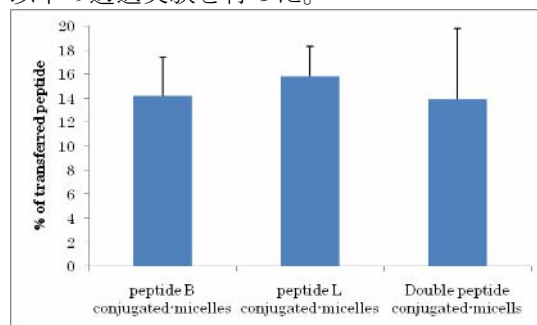


図2 リポソームへの各種ペプチドの結合率

(2)Ligandとして、bradykinin B1 アゴニストである合成ペプチドとラミニンフラグメントに相当する合成ペプチドを用いた場合、予備実験として行った U251 細胞と共培養した HUVEC での透過実験では、PEG-リポソームに対して、24h で 1.8-4.3 倍の透過効率が得られた。また、正常 BBB モデルでは、各リポソーム間の BBB 透過率に有意な差は見られなかった (図 3)。

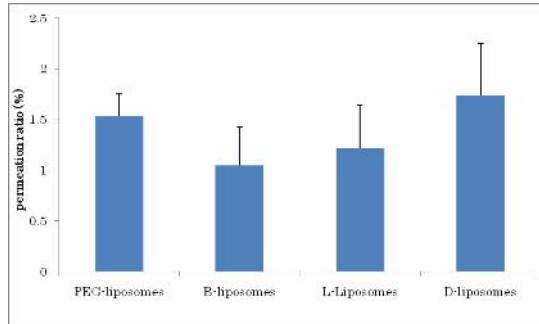


図 3 正常 BBB モデルにおける各種リポソームの透過率

一方、腫瘍病態 BBB モデルでは、正常 BBB モデルと比較して、D-リポソームの透過率が約 8.5 倍になった。また、腫瘍病態 BBB モデルにおいて、D-リポソームは PEG-リポソームの約 4.5 倍の透過率となった (図 4)。一方で、同条件において、透過リガンドのブラジキニン様ペプチド単独を結合したリポソームは PEG-リポソームと比較した場合、約 1.8 倍の透過率であり、これらの差が生じた原因について現在検討中である。

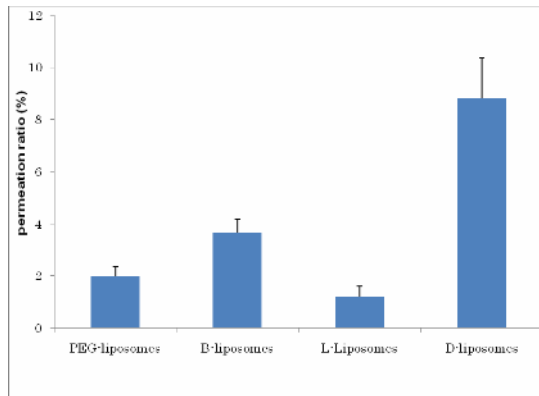


図 4 腫瘍病態 BBB モデルにおける各種リポソームの透過率

また、リポソームが透過した脳側の培地上清を、ラットグリオーマ C6 細胞に添加し、細胞内取り込みを蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞内に蛍光が確認できたので、BBB 透過後も細胞内取り込み能を有していることが示唆された (図 5)。

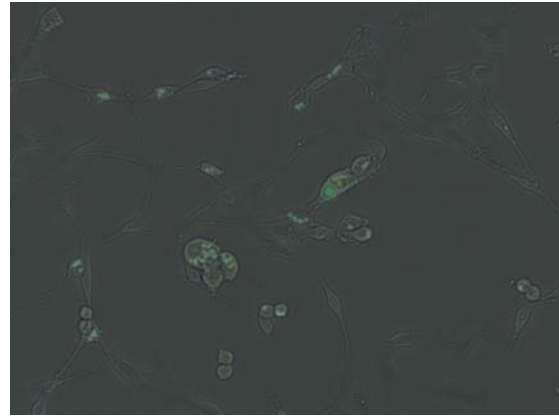


図 5 BBB モデル透過後における D-liposomes のラットグリオーマ C6 細胞への取り込み

以上の結果から、本研究で開発した D-リポソームにより、BNCT の適用症例である悪性脳腫瘍において、高い標的化能を有することが期待できる。今後、BSH などのボロン化合物を封入し、BNCT による抗腫瘍効果を検討する予定である。

#### 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 2 件)

Ito Y, Kimura Y, Shimahara T, Ariyoshi Y, Shimahara M, Miyatake S, Kawabata S, Kasaoka S, Ono K.

Disposition of TF-PEG-Liposome-BSH in tumor-bearing mice.

Applied radiation and isotopes, 2009 [Epub ahead of print] (査読あり)

Shimahara T, Ito Y, Ariyoshhi Y, Kimura Y, Shimahara M, Kawabata S, Kasaoka S, Ono K and Miyatake S.

Delivery of sodium borocaptate (BSH) to oral squamous cell carcinoma cells by transferring-PEG liposomes

Bulletin of the Osaka Medical College 55(1):21-29, 2009 (査読なし)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：  
○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 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・助教  
研究者番号：90338690

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：