

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19H04480  
研究課題名（和文）放射性抗がん剤ドラッグデリバリーシステムを用いた低侵襲化学粒子線治療技術の研究  
  
研究課題名（英文）Study of minimally invasive treatments using a proton beam combined with a radiation sensitive drug delivery system  
  
研究代表者  
寺川 貴樹（Terakawa, Atsuki）  
  
東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・教授  
  
研究者番号：10250854  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、放射線感受性のドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発を行い、陽子線照射との併用により陽子線治療効果の増強を目的とした。DDSとしてはシスプラチン内包したリポソーム型薬剤キャリアを開発した。さらに、アスコルビン酸や金ナノ粒子等の添加によりリポソームに放射線感受性の機能を付与した。陽子線およびX線を用いたリポソームへの放射線照射実験を実施し、キャリアの分解による薬剤の放出を最大約30%促進させる効果が確認された。さらに細胞レベルの実験でも陽子線単独照射と比べて細胞致死効果の増強が確認された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、陽子線治療と放射線感受性ドラッグデリバリーシステム（DDS）を用い、正常組織への影響を最小限に留め、難治癌に対して優れた治療効果をもたらす癌治療法の開発を目指している。放射線照射で内包薬剤が放出される放射線感受性DDSの基礎開発に成功しており、陽子線照射と併用することで単独の陽子線治療の効果を増強することが期待される。炭素線治療は高い治療効果をもたらすが同時に正常組織への副作用も大きく設備費用的問題もある。本研究は陽子線の低副作用の利点を維持しつつ、DDSとの併用で炭素線に迫る効果を誘発する点において、学術的、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop radiation sensitive drug delivery system (DDS), and to increase the efficacy of proton therapy by combining proton irradiation with the DDS. We developed a liposome containing cisplatin as a DDS. Radiation sensitivity was added to the DDS by using ascorbic acid or gold nanoparticles. We performed experiments of proton or X-ray irradiation to the liposomes, and confirmed that the amount of release of cisplatin increased up to about 30% for the radiosensitive liposome compared to that for the non-irradiated control. In addition, cell irradiation experiments using the liposomes and proton beams showed enhancement of cell death effects compared to that of proton irradiation alone.

研究分野：粒子線治療

キーワード：陽子線治療 薬剤運搬体 シスプラチン リポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

近年の癌治療戦略において、必要な時に、必要な部位で、必要な抗がん剤を送達するドラッグデリバリー (DDS) 技術が注目されている。従来の全身投与に比べて低副作用・高治療効果の有望な結果が得られているが、一般に腫瘍細胞の薬剤耐性の問題などで、抗がん剤単独での完治は困難である。一方、放射線治療の分野では、従来の X 線に比べて物理学的・生物学的に優位な特徴を持つ陽子線や炭素線によるがん治療 (粒子線治療) が注目されている。粒子線治療では、荷電粒子ビームのブラッグピークと呼ばれる線量分布によって、がんの線量を集中させ正常組織への影響を最小限に抑えることができる。さらに炭素線は生物学的効果が高く、骨軟部肉腫等の放射線抵抗性腫瘍の治療を可能にし普及が期待されている。しかしながら、炭素線の供給には大型加速器、大型照射装置および施設などコスト面でのハードルが高い。それに対して陽子線は加速器や照射装置などの問題が軽減できるが、放射線抵抗性を持つ低酸素腫瘍細胞への効果が X 線とほとんど同じであり、優れた線量集中性を有する陽子線でも放射線抵抗性の難治がんに現状では適用困難である。

## 2. 研究の目的

本研究では、放射線増感効果を有する抗がん剤を DDS 化するとともに、さらに粒子線照射で DDS が変性あるいは破壊され薬剤を放出する放射線感受性の機能を DDS に持たせる。それにより、腫瘍へ線量集中が可能な陽子線照射と同時に腫瘍内の DDS のみを破壊し薬剤を高濃度にする治療技術戦略を狙う。その結果、正常組織には通常の陽子線の比較的少ない影響に留めたまま、腫瘍に対しては陽子線と抗がん剤が同時に働き強力な治療効果を誘発させることが期待される。すなわち、本研究では DDS と陽子線をベースにして炭素線治療の効果に匹敵する治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

薬剤キャリアとして毒性の低さや多岐にわたる機能性の観点からリポソームを選択する。使用薬剤はコレステロール、メタノール、クロロホルム、PBS(-)、DPPC(富士フィルム和光純薬) である。内包する薬剤には抗がん剤として用いられているシスプラチン (富士フィルム和光純薬) を使用する。クロロホルムにリン脂質を溶かし、ロータリーエバポレーターでクロロホルムを減圧除去し、リン脂質の薄膜を作成する。そこに PBS とシスプラチンを加えリン脂質を水和・膨潤させた後、超音波処理することでリポソームを作成する。リポソームのはエクストルーダーを用いてフィルター処理を行うことで揃え、最小で約 100nm 径の粒形のリポソームを作成した。リポソームの放射線感受性の付与に関して、アスコルビン酸、金ナノ粒子、放射線感受性モノマー等を使用する方法を用いた。

シスプラチン含有リポソームの薬剤溶出特性を評価するために陽子線照射実験を行った。陽子線照射実験は東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンターで実施した。陽子線治療の臨床で用いられる線量分布を想定し、陽子線照射装置を開発して 5 mm幅の拡大ブラッグピーク (SOBP) 形成し、リポソームサンプルを照射した。陽子線のエネルギーは 80MeV とし、SOBP 領域でサンプルが照射されるために、ポリマーゲル線量計を作成して陽子線の 3 次元線量分布を評価し照射条件を決定した。付与線量は臨床時の治療条件を想定し 15Gy とし、また線量率は 2Gy/分とした。さらにリポソーム粒子内に薬剤がどのように内包されているのかを評価するため、50 $\mu$ m 程度の粒形のリポソームを作成しマイクロ PIXE ( Particle Induced X-ray Emission ) 分析を行った。マイクロ PIXE 分析は、約 1 $\mu$ m のビームスポットの 3 MeV 陽子ビームを用いて行う元素分析技術で、約 1 $\mu$ m の空間分解能で多元素の濃度分布画像を取得することができる。また薬剤の放出率等の定量評価のため、サンプルの誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) を行った。

## 4. 研究成果

リポソーム内へのシスプラチンの含有について評価するために、リポソーム懸濁液を PBS 洗浄後に遠心分離を行い、上澄み液とリポソームに分画した。そして、それぞれのサンプルを ICP-MS 分析し Pt 濃度を導出した。その結果、リポソームの Pt の濃度平均は 6.0 $\pm$ 0.4 $\mu$ g/ml であった。これはシスプラチンを溶解した PBS 溶液に関して全量比で約 4.3% に相当する保持効率である。リポソーム作成手法である薄膜法では脂質二重膜の中にさらに脂質二重膜が形成されるような多重膜リポソーム (MLV; Multilamellar liposome) が作成される。MLV の保持効率は数% から数 10% ほどになると言われている [1]。Nian-Qiu Shi らの実験でも MLV の薬剤保持効率は 5 から 15% になるとされている [2]。そのため本実験での 4% という保持効率は妥当であると考えられるが、保持効率改善のためのリポソーム作成法の検討は必要である。MLV 形成の可能性について検討するため、マイクロ PIXE 分析可能な粒径である 50 $\mu$ m のリポソームを作成し (図 1 (左)) Pt の空間濃度分布を評価した。分析したリポソームの中には、図 1 (右) に示すように、Pt の分布がリポソームの表層付近だけでなく、内部に幾つかの層状に分布しているように見られるサ

ンプルも確認された。粒径は異なるが100nm 径のリポソームでも MLV 形成の可能性は排除できないと考えられた。

シスプラチン内包リポソームを PBS 溶液に浮遊させたサンプルに対して陽子線照射を行い、シスプラチン放出に関する評価を行った。リポソームにはアスコルビン酸と金ナノ粒子を用いて放射線感受性を付与させ、リポソームサンプルを入れたバイアルをSOBPの中央に相当するの深度に設定して15Gy照射した。図2はリポソーム試料作製からの経過時間に対するPBS中のシスプラチン濃度を示す。未照射サンプルおよび同線量のX線照射のデータも比較対照として示した。未照射のリポソームにおいて、作成直後からシスプラチンが徐々に放出されるが約40時間以降は放出がほぼなくなり、PBS溶液中のシスプラチン濃度(Pt濃度)は一定であった。一方、X線および陽子線照射条件では、作成から48時間後または96時間後に照射を行ったが、いずれにおいても未照射と比べ30%前後のシスプラチンの増加が確認された。放射線照射によってリポソームが破壊あるいは構造的な変化が加わり、より多くの薬剤放出を誘発したことが示唆された。一方、X線照射と陽子線照射の比較では顕著な違いは認められなかった。またリポソームを用いた細胞レベルによる陽子線照射実験を実施し、細胞致死効果に関して薬剤放出率依存的に相加的増強が確認された。そのメカニズムについては分析中であるが、表面プラズモン共鳴による電子放出により細胞損傷やフリーラジカル生成等の可能性が示唆された。

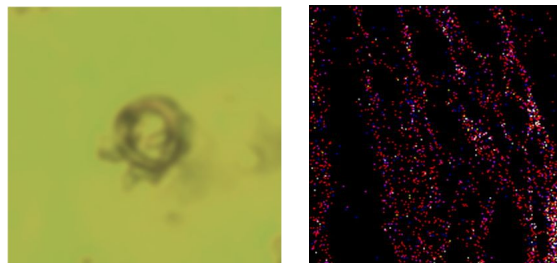


図1 50 $\mu$ m 径リポソーム(左)とマイクロPIXEによるリポソーム粒径表面付近のPtの2次元空間濃度分布(右)

シスプラチン内包の放射線感受性リポソームから放出されたシスプラチン(Pt)に関する時間的濃度変化。未照射、X線照射および陽子線照射の条件でPt濃度を評価した。実線は未照射データの対数フィットした結果である。

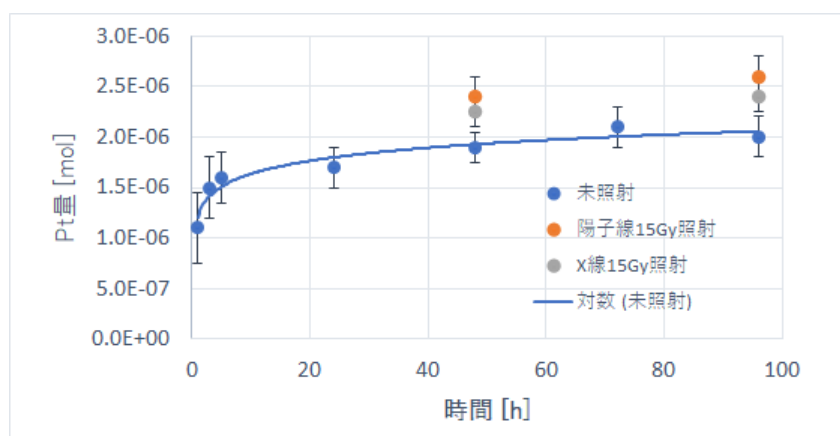


図2 シスプラチン内包の放射線感受性リポソームから放出されたシスプラチン(Pt)に関する時間的濃度変化。未照射、X線照射および陽子線照射の条件でPt濃度を評価した。実線は未照射データの対数フィットした結果である。

[1] 辻井薫秋吉一成. リポソーム応用の新展開 人工細胞の開発に向けて. 株式会社エヌ・ティー・エス, 2005.

[2] Nian-Qiu Shi and Xian-Rong Qi. Preparation of Drug Liposomes by Reverse-Phase Evaporation, pp. 1-10. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Terakawa A., Wakayama Y., Kajiyama A., Hosokawa Hibiki., Nagao R., Narumi K., Hosokawa Hiroyuki., Fujise Y., Ushijima H., Hattori Y., Tsutsui R., Suzuki H., Nakamura T., Hoashi R., Saifurrahman H., Tanaka Kazuo., Hitomi K., Nagano Y., and Nogami M.	4. 巻 1
2. 論文標題 Three-Dimensional Dose Measurement in Proton Therapy Using a Polymer Gel Dosimeter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CYRIC Annual Report 2018-2019	6. 最初と最後の頁 133-10284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuhiro Nogami, Keitaro Hitomi, Toshiyuki Onodera, Kio Matsumoto, Kenichi Watanabe, Atsuki Terakawa, Keizo Ishii	4. 巻 477
2. 論文標題 Feasibility study of TlBr semiconductor detectors for PIXE applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nuclear Instrument and Methods in Physics Research B	6. 最初と最後の頁 43-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nimb.2019.10.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 若山雄太, 寺川貴樹, 田中香津生, 鳴海慶一郎, 牛島寛章, 服部祥堯, 筒井亮佑, 鈴木大夢, 中村智花, 佐藤和宏, 三浦洋亮
2. 発表標題 80 MeV 陽子線拡大ブラックピーク測定における MAGAT ゲルの LET 依存性
3. 学会等名 第8回3Dゲル線量計研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺川貴樹, 松田洋平, 伊藤正俊, 石井慶造
2. 発表標題 東北大学 CYRIC の大型サイクロトロンによる 6 MeV H <sup>+</sup> 2 加速 テスト
3. 学会等名 第35回PIXEシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺川貴樹, 若山雄大, 梶山愛, 牛島寛章, 服部祥堯, 田中香津生, 人見啓太郎, 野上光博
2. 発表標題 陽子線治療におけるポリマーゲル線量計を用いた3次元線量分布評価
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Ishii, A. Terakawa, H. Ushijima, K. Hitomi, N. Nagano, M. Nogami
2. 発表標題 Application of a medical PET cyclotron to PIXE analysis
3. 学会等名 16th International Conference on Particle-Induced X-ray Emission (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Ishii, A. Terakawa, K. Hitomi, M. Nogami
2. 発表標題 Development of 20-MeV proton PIXE analysis in helium atmosphere
3. 学会等名 24th International Conference on Ion Beam Analysis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuki Terakawa
2. 発表標題 Proton-therapy research experiments at CYRIC
3. 学会等名 Kick-off Workshop (Online) of JK Collaboration Project (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	田中 香津生  (Tanaka Kazuo)  (20780860)	東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・ リサーチフェロー    (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------