

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249009

研究課題名（和文） 蛋白質セラピー法による脳腫瘍治療技術の開発と機能実証

研究課題名（英文） Development of new therapeutic agents for brain tumor using protein therapy

研究代表者

松井 秀樹 (Matsui Hideki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30157234

研究成果の概要（和文）：

悪性脳腫瘍に対する新しい治療法“中性子捕捉療法（BNCT）”で用いるホウ素製剤を開発した。我々が開発したタンパク質セラピー法を利用しがん細胞内へ薬剤を導入するタイプと、ドックデリバリー（DDS）技術を利用し薬剤を封入したナノカプセルをがん細胞へ選択的に導入するタイプ、の2種類である。両製剤ともに、培養脳腫瘍細胞および、脳腫瘍モデル動物を用いた実験で、がん細胞に選択的に導入された。今後の新たながん治療薬として期待される。

研究成果の概要（英文）：

Boron neutron capture therapy (BNCT) is a novel cancer treatment modality that can selectively target the tumor without causing excessive radiation damage to the normal tissues. In this project, we developed 2 types of new therapeutic agents for BNCT: cell-penetrating peptides using the protein therapy or nanoparticles, which are effective of delivering cargo into cells, to deliver ^{10}B into the tumor cells as BNCT agents. In both in-vitro studies using the cultured tumor cells and in-vivo studies using tumor-bearing mice, these agents were only observed in the tumor. The results suggest that our systems utilizing peptides or nanoparticles provide an effective means of delivering ^{10}B into tumor cells selectively in BNCT.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2009年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2010年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
年度			
年度			
総計	38,500,000	11,550,000	50,050,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：脳腫瘍、悪性グリオーマ、タンパク質セラピー法、タンパク質導入、中性子捕捉療法

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムの時代に入り、ゲノム情報から得られる蛋白質やペプチドの情報を効率

よく治療に利用することが求められる中、我々は、目的のタンパク質やペプチドにポリアルギニンからなる導入シグナル（11R）を

結合することにより、生体内の臓器・細胞に直接に in-vivo 導入する手法「タンパク質セラピー法」を開発した(松井ら 工業所有権 2003 年)。この技術を利用すれば、静脈や腹腔内投与など簡便な手段で、全身臓器の細胞内に、任意のタンパク質、ペプチドや有機・無機化合物を高効率に導入し機能させることができる。我々はこのタンパク質セラピー法を利用して新しい免疫抑制剤、脳保護法、心肥大治療剤などをこれまでに創成してきた。

本研究提案では、この技術をさらに発展させ、特定の組織や細胞に特異的に導入する技術を確立する。我々はこれまでに、バイオナノカプセル (BNC) とこのタンパク質セラピー法を組み合わせ利用し、上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体を標的として、悪性脳腫瘍細胞に特異的にタンパク質導入することに成功している。本研究では、さらに、これを応用して難治性の脳腫瘍 (グリオーマ) に対する画期的な治療法の開発を行う。

2. 研究の目的

我々が開発したアルギニンを導入シグナルとして利用する新しいドラッグデリバリー (DDS) 技術、「タンパク質セラピー法」とナノカプセルを用いて、抗がん剤、がん抑制タンパク質やホウ素化合物を悪性脳腫瘍 (グリオーマ) に選択的に導入し、がん細胞のみを特異的に殺傷する新技術を開発する。さらに、この技術の有効性を、培養細胞および脳腫瘍モデル動物で実証する。

3. 研究の方法

(1) 抗 EGF 受容体抗体付加した BNC の開発

脳腫瘍に標的化するために、抗 EGF 受容体抗体を付加した BNC の作製・精製を行う。脳腫瘍はその大多数が EGF 受容体・構成的活性型 (Variant Type3) を発現しており、発現量が大きいほど悪性度が高い。したがって、EGF 受容体を標的のマーカースとすることにより、BNC を脳腫瘍だけに選択的に導入することができる。

脳腫瘍患者から樹立した脳腫瘍 (グリオーマ) 細胞に開発した BNC を導入し、その導入時間・効率について経時的に比較検討する。

(2) 光学異性体型 p53 C 末端ペプチドの開発

ヒト p53 アミノ酸配列の 361~381 番目に相当する光学異性体 (D-isomer) ペプチドを合成する。このペプチドに細胞内導入シグナルならびに HA2 ペプチドを付加してタンパク質セラピー型にする。これにより高効率に脳腫瘍細胞に導入できる。合成には特殊技術を要するので外注し、精製と活性測定を本研

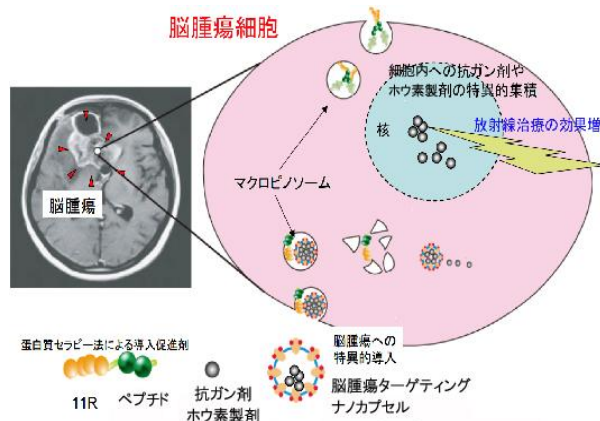
究チームで行う。D-isomer 光学異性体は細胞内のタンパク質分解酵素による分解を受けないので、低濃度で強い抗ガン効果を発揮すると期待される。

(3) 新規中性子捕捉療法の開発

ホウ素は低エネルギーの熱中性子を捕捉し、飛程のきわめて短い α 粒子 (9 μm) とリチウム核 (5 μm) を発生する。これらの飛程 (5~9 μm) は細胞一個分に相当する程度に小さい。また捕捉されなかった中性子は生体を通り抜けてしまうので、周囲の正常組織には殆ど悪影響を及ぼさない。したがって、タンパク質セラピー法によってすべての脳腫瘍細胞の内部へ特異的にホウ素製剤が導入できれば、がん細胞のみを特異的に殺傷できる理想的な中性子捕捉療法 (BNCT; Boron Neutron Capture Therapy) が可能である。

上述の(1)および(2)で開発した「脳腫瘍に特異的に導入するタンパク質セラピー法の技術」を利用し、脳腫瘍に特異的に導入できるホウ素製剤を開発する。

脳腫瘍細胞株をヌードマウス脳に定位脳手術で移植して脳腫瘍モデルを作製する。開発した新規ホウ素製剤を培養細胞および脳腫瘍モデル動物を用いて評価する。



4. 研究成果

(1) 抗 EGF 受容体抗体付加した BNC の開発

脳腫瘍に標的化するために、抗 EGFR 抗体を付加した BNC を作製した。この BNC に抗がん剤であるドキソルビシンを封入することに成功した。作製した抗がん剤封入型 BNC を、脳腫瘍患者から樹立した脳腫瘍細胞の培地に添加し、増殖抑制効果について検討した。濃度依存的に細胞増殖抑制効果は認められたが、抗 EGFR 抗体付加した BNC と付加していない BNC では細胞増殖抑制効果に差は認められなかった。

(2) 光学異性体型 p53 C 末端ペプチドの開発

光学異性体型 p53 C 末端ペプチドにポリアルギニンを付加すると腫瘍細胞内に効率よ

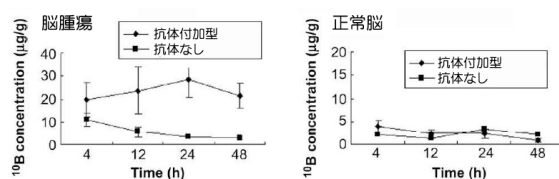
く導入されることを確認した。しかし、このペプチドは、腫瘍細胞の増殖抑制効果を示さなかった。ポリアルギニンを付加した光学異性体型 p53 C 末端ペプチドにさらに HA2 ペプチドを付加したペプチドを開発し、その抗腫瘍効果について検討した。同ペプチドに腫瘍細胞増殖抑制効果ならびにアポトーシス誘導効果があることを突き止めた。

(3) 新規中性子捕捉療法の開発

中性子捕捉療法 (BNCT) において、脳腫瘍を標的化する 2 種類のホウ素製剤を開発した。

ホウ素化合物である BSH ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) には細胞透過性がないため、BNCT に用いるには細胞膜透過性を付加する必要がある。そこで、上述の(1)および(2)のタンパク質セラピー法で得られた結果を基に、腫瘍細胞内へ導入されるように設計した。BSH にポリアルギニンあるいは SV40 の核移行シグナルペプチドを付加し、BSH 化合物を作製することに成功した。さらにこの BSH 化合物が脳腫瘍細胞の細胞内導入されることを確認した。

一方で、(1)の BNC の結果を考慮し改良を加えた。DDS で既に臨床実績のあるリポソームに着目し、リポソーム内に BSH を内包し、その表面に抗 EGFR 抗体を付与したナノカプセルを作製することに成功した。EGFRvIII を発現した細胞株 U87ΔEGFR を用いた in-vitro 実験、および同細胞をマウスの脳に移植したマウス脳腫瘍モデルを用いた in-vivo 実験で、この新規製剤が腫瘍特異的に集積することを確認した。脳腫瘍モデルでは、脳正常部では殆ど細胞内に取り込まれていないのに対し、腫瘍部では効率的に腫瘍組織に取り込まれており (T/N>10)、投与後 24 時間では中性子捕捉療法で必要とされる閾値約 30ppm を達成した。



マウス脳腫瘍モデルで、腫瘍ターゲット能を有する抗体付加型ナノカプセルで高濃度にBSHの集積を認めた。

(4) 得られた成果の意義および今後の展望

我々が用いたタンパク質セラピー法は、米国で開発された類似の TAT 法によるタンパク質導入法に比べ副作用が無く安全であり、かつ導入効率の観点からもはるかに有利である。悪性脳腫瘍は再発率が非常に高く、外科的治療、化学治療などの従来の治療法を組み合わせても依然として完治が困難な難治性のがんの 1 つである。本研究で新しく開発した 2 種類のホウ素製剤は、脳腫瘍に標的化

する可能性が高く、中性子捕捉療法の製剤として有効であると考えられ、新しい治療の開発が期待できる。このように、基礎医学 (生理学) の研究からのシーズを臨床に応用する道を開く橋渡しを行っていることを期待でき、本研究の意義は大きいと考える。

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 14 件)

- ① Feng B, Matsui H. et al., Nanoparticle-based drug delivery systems for solid brain tumors. *Current Nanoscience* 7(1): 47-54, 2011, 査読有.
- ② Feng B, Michiue H., Han XJ, Matsui H. et al., Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging in vivo. *Biomaterials* 31: 4139-4145, 2010, 査読有.
- ③ Araki D, Matsui H. et al., Cell-penetrating D-isomer peptides of p53 C-terminus: long-term inhibitory effect on the growth of bladder cancer. *Urology* 75(4): 813-819, 2010, 査読有.
- ④ Feng B, Michiue H., Han XJ, Matsui H. et al., Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials* 30: 1746-1755, 2009, 査読有.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Hideki Matsui, Tumor specific targeting of boron by protein therapy and immunoliposome, PopCon-2011 Protein and Peptide Conference, 2011年3月28日, Beijing, China
- ② 道上宏之, タンパク質導入法を用いた新規 siRNA delivery system with protein transduction method, 第 62 回日本生理学会中国四国地方会, 2010 年 11 月 20-21 日, 島根大学出雲キャンパス
- ③ 孫凌飛, セラノスティックス利用による癌個別化医療技術の開発と機能実証 -Development of a new theranostics for ErbB2-overexpressing cancer-, 第 87 回日本生理学会, 2010 年 5 月 20 日, 盛岡市民文化ホール
- ④ 松井秀樹, 特別講演「蛋白質導入法と脳腫瘍治療への展望」, 第 27 回日本脳腫瘍学会, 2009 年 11 月 20 日, 全日空ゲートタワーホテル大阪
- ⑤ Bin Feng, Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His, 36th Congress of the International

Union of Physiological Sciences (第36回国際生理学会世界大会)、2009年7月28日、京都 International Conference Center

- ⑥ Hiroyuki Michiue、Inhibition of glioma proliferation by modified p53 protein fused with protein transduction domains、the 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology (WFNO) 第3回国際脳腫瘍学会、2009年5月14日、パシフィコ横浜
- ⑦ Bin Feng、Targeting of sodium borocaptate (BSH) to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His、第60回日本生理学会中国四国大会、2008年11月15日、愛媛大学城北キャンパス メディアホール

[その他]

ホームページ等

<http://seiri1.med.okayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 秀樹 (Matsui Hideki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30157234

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

道上 宏之 (Michiue Hiroyuki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20572499