

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390311

研究課題名(和文) 癌特異的膜乳化エマルジョンの肝動脈注入を用いた中性子捕捉療法の開発

研究課題名(英文) Development of neutron capture therapy using intra-arterial injection of cancer specific emulsion by membrane emulsification technique

研究代表者

柳衛 宏宣 (Yanagie, Hironobu)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30212278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：中性子捕捉療法(BNCT)に応用できる腫瘍選択性エマルジョンを開発することが目標である。VX-2ウサギ肝腫瘍モデルにおいて、界面活性剤HCO40を用いた肝動注24時間後/72時間後の腫瘍内10B濃度は、それぞれ170/58.3ppm、であり有効ボロン濃度30ppmを到達できた。10BSH封入WOWエマルジョンを肝動注後にBNCTを実施し、腫瘍でのアポトーシスを確認できた。Naturalボロンが結合したエストロゲン化合物を用いBNCTで細胞障害効果を認めた。WOWエマルジョンの表面修飾を行い一次ターゲティング送達能力を上昇させるよりも二次ターゲティングに用いる化合物の合成がより効果的と思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to develop a novel tumor selective emulsion for applying boron neutron capture therapy(BNCT). We had been able to achieve 170/58.3 ppm in 24hrs/72hrs, respectively, which was exceeded more than 30ppm, as the effective boron concentration for BNCT in VX-2 rabbit hepatic tumour model. Apoptosis was recognized in the tumour by BNCT after intra-arterial hepatic injection of 10BSH entrapped WOW emulsion. Cancer cell cytotoxicity of mouse breast cancer cell line was recognized by BNCT using natural boron binding estrogen compound, and this cytotoxicity was lower than the effect using 10Borono-phenylalanine(BPA). These results showed that it was more effective to develop the cancer selective accumulating compounds as second targeting than to develop the cancer selective modification of surface of WOW emulsion as first targeting.

研究分野：消化器外科

キーワード：中性子捕捉療法 ボロン化合物 ガドリニウム化合物 WOWエマルジョン エストロゲン骨格 二段階肝動注ターゲティング法 腫瘍マーカー 肝臓癌と乳癌

1. 研究開始当初の背景

進行癌、再発癌に対して、外科手術を中心に化学療法、放射線療法、免疫療法を併用した集学的治療を行っているが、悪性度が高く容易に肝転移など遠隔転移を起こす AFP 産生胃癌や大腸癌、膵臓癌および AFP 産生原発性肝臓癌は血管増生が強いにもかかわらず集学的治療に抵抗性である。我々は、標準的治療の化学療法や放射線治療の効果のない難治性癌細胞に選択的に中性子捕捉剤を癌細胞に集積させ中性子捕捉療法を行い、集学的治療を加味して癌の根絶を図りたい。中性子捕捉療法は、それだけでは細胞障害効果を持たないボロン(B)化合物と熱中性子が反応することにより生じる粒子が、高 LET 効果で 10 μ m 範囲の癌細胞を崩壊させることができる。また、ガドリニウム(Gd)化合物と熱中性子と反応すると電子線が 2mm の範囲の癌細胞を崩壊させることができる。このため、B や Gd 化合物を癌選択的に送達することが大切である。

中性子捕捉療法は、標準的な化学療法や放射線治療の効果の無くなった状況でも腫瘍増殖抑制効果が期待できるため新規の集学的治療として期待が高まってきている。

我々は、1987 年より中性子捕捉剤の腫瘍への active targeting DDS の開発を展開してきている。すなわち、柳衛は、ボロン化合物封入抗 CEA イムノリポソームを CEA 産生性ヒト膵臓癌細胞と反応させ、中性子捕捉療法を用いてを選択的な腫瘍増殖抑制効果を認め (Br. J. Cancer, 1991, 1997)、AFP 産生性ラット肝臓癌腫瘍への抗 AFP モノクローナル抗体-ボロン複合体の targeting を示し (Can Res & Clin Oncol, 1994)、腫瘍指向性キャリアーの開発も行っている。

肝臓癌などの臨床の現場では、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、抗癌剤などの水溶液が封入されず、腫瘍に貯留されないため治療効果が少ないのが現状である。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世界に先駆け開発し (特許 1992-2733729 号、特許 1992-2655033 号、特開 1996-17499、特開 2003-164754)、WOW エマルジョンの 50 μ m ~ 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。さらにウサギ肝腫瘍モデルにおいて、ボロン化合物 (BSH) 封入 WOW エマルジョンの肝動注による腫瘍集積性を見出し肝臓癌に対する中性子捕捉療法の可能性を示した (特願 2005-221612 号)。

我々は、DDS としてリポソームの表面にポリエチレングリコールなどで修飾することにより、細網内皮系 (RES) による捕捉を回避し、血中滞留性が著しく向上する Stealth

Liposome を開発した。その結果、腫瘍組織への抗癌剤及び中性子捕捉剤の送達が促進され、抗腫瘍効果も著しく増加するようになった。

2. 研究の目的

標準的治療の化学療法や放射線治療の効果のない難治性癌細胞に選択的に中性子捕捉剤を癌細胞に集積させ中性子捕捉療法を行い、集学的治療を加味して癌の根絶を図りたい。我々は、膜乳化法という先駆的な技術を応用し、WOW エマルジョンのサイズを 50 μ m ~ 100 nm まで調節可能とし、腫瘍特異的なリガンドを結合させることにより、癌選択的な“オーダーメイドなインテリジェント中性子捕捉剤デリバリーシステム”を開発し、難治性癌の集学的治療の効果増強を展開する。今回、腫瘍選択的な Targeting の技術の開発とマイクロからナノサイズまで、癌血管の状況にあわせてオーダーメイドでサイジングが可能な膜乳化法という先駆的なナノテクノロジー技術を用いることにより、癌組織内に優位に選択的に中性子捕捉剤を送達し、より効果的な標的抗腫瘍効果と副作用の軽減を得ることができるデリバリーシステムを開発したい。

3. 研究の方法

シラス多孔質ガラスフィルターによる膜乳化法を用いてオーダーメイドサイジングな腫瘍指向性 WOW エマルジョン (WOW と記す) を作成する。

(1) 封入薬剤プラットフォームの確立として中性子捕捉療法剤 (BPA など) を封入した WOW の作成を行う。WOW エマルジョン中のボロンおよびガドリニウム濃度の測定は ICP-Masspectroscopy 法にて行う。ポリグリセリン縮合体 (PGCR)、HC060、HC040 などの界面活性剤の種類を変え、界面活性剤を用いた WOW エマルジョンの安定性及び分散性の検討を行う。

(2) 腫瘍指向性抗体およびリガンドプラットフォームの確立として我々が樹立した抗ヒト AFP や CEA などに対するモノクローナル抗体のハイブリドームを用いて腫瘍指向性モノクローナル抗体の腫瘍選択性を検討する。WOW に腫瘍指向性リガンドを結合させていく。

(3) 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 (ウサギ)。動注療法により、担癌ウサギへの中性子捕捉剤封入 WOW エマルジョンを導入し、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、中性子捕捉療法を施行し癌増殖抑制効果の検定を行う。中性子捕捉療法は、原子炉として京都大学原子炉実験所 (大阪府熊取町) を用いる。癌組織及び正常肝組織における毒

性試験、癌増殖抑制治療効果の病理学的な検討（免疫組織染色、電子顕微鏡）治療効果の判定を行う。アポトーシスの解析：Hoechst / TUNEL 染色を行う。

（４）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

新生血管に富む原発性肝臓癌および AFP 産生胃癌や大腸癌、膵臓癌に対して、中性子捕捉療法を応用すべく、腫瘍選択性を高めた癌特異的膜乳化エマルジョンを開発することを目標にして実験を実施した。

（１）中性子捕捉能を有するガドリニウム化合物(Gadoteridol)を封入した WOW エマルジョンを作成した。ウサギ肝動注モデルにおいてガドリニウム化合物封入 WOW エマルジョンの肝動注を行うことにより、投与 24 時間後、72 時間後の腫瘍内濃度は、それぞれ 329ppm、312ppm、正常肝濃度は、それぞれ 199ppm、130ppm、であり、中性子捕捉療法の有効ガドリニウム濃度の 100ppm を腫瘍内では到達しており、治療効果が期待できる。また、通常のリピオドールとの混和液の投与 24 時間後の腫瘍内濃度は 1.8ppm であり、WOW エマルジョン化することにより、優位に腫瘍内にガドリニウム原子を送達できることができた。肝動注モデルにおいては、Oil-O-Red 脂肪染色を用いて腫瘍内に WOW エマルジョンの集積を認めた。特に腫瘍血管に富む腫瘍外壁において著明な集積を認めた。WOW エマルジョンの肝動注においては、投与 72 時間後には正常の肝静脈およびディッセ腔からの排泄があり、正常肝組織における蓄積は減少していると思われた。

（２）我々が樹立した抗 CEA モノクローナル抗体(2C-8)を用いたヒト癌細胞との反応性においては、ペルオキシダーゼ反応により膵臓癌細胞 AsPC-1、BXPC-3、胃癌細胞 MKN28 との強い反応性を示した。

（３）現在調整しているボロン(BSH)封入 WOW エマルジョンにおいて、臨床応用できる製剤としての Enriched BSH 封入 WOW エマルジョン製剤を確立するために、内水相を蒸留水としてエマルジョンを作成し、ウサギ肝腫瘍 VX-2 モデル腫瘍へ肝動注後ボロン集積濃度を検討した。界面活性剤を HCO40 あるいは PGCR を用いることにより、投与 24 時間後、72 時間後の腫瘍内濃度は、それぞれ 170/186ppm、58.3/40.5ppm、腫瘍周囲正常肝濃度は、それぞれ 31.9/72.8ppm、24.7/56.7ppm であり、中性子捕捉療法の有効ボロン濃度の 30ppm を腫瘍内では到達しており治療効果が期待できる。HCO40 を用いた場合は、エマルジョンの膨化は起こらず PGCR を用いた場合と比較して、正常肝組織におけ

るボロンの沈着が生じにくい結果を得た。このことは、正常の肝静脈およびディッセ腔からの排泄があり、正常肝組織における蓄積は減少していると思われた。

Table1. ^{10}B concentration (ppm) of VX-2 hepatic tumor bearing rabbit model after intrarterial injection of ^{10}B -WOW emulsion.

WOW Blood	Tumour		Normal liver
		Near Tumour	Another Lobe

HCO40			
Day1	170.8 ± 27.3	31.9 ± 4.3	33.9 ± 30.9
0.73±0.4			
Day3	58.3 ± 23.1	24.7 ± 17.1	8.02 ± 1.7
0.33 ± 0.1			
Day7	12.9 ± 7.5	2.9 ± 0.6	1.7 ± 0.4
0.12 ± 0.0			
PGCR			
Day1	186.0 ± 115.2	72.79 ± 2.5	69.1 ± 42.1
1.27 ± 0.5			
Day3	40.47	56.7	15.1
0.14			
Day7	40.66	37.3	13.8
0.14			

The ^{10}B conc. were determined by ICP-Mas. at Jyuntendo University.

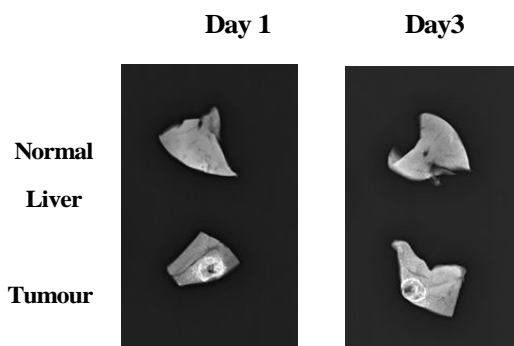


Figure1: IPSO component in WOW was accumulated in the VX-2 tumour by intra-arterial injection of ^{10}B SH entrapped WOW with HCO40 surfactant by Soft X ray radiography.

（４）疎水性界面活性剤として HCO40 を用いることにより ^{10}B SH 封入 WOW エマルジョンを作成し、肝動注後の脂肪染色を行った。VX-2 腫瘍の高血管性により投与 3 日には正常肝組織と比較して優位の染色性を認めた。即ちボロン化合物を腫瘍内に送達可能であることを示せた。さらには、VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルに対して、 ^{10}B SH 封入 WOW エマルジョンを肝動注後に京都大学原子炉実験所において熱中性子照射を実施し、HE 染色および TUNEL 染色を用いて組織レベルでの細胞障害効果を確認できた。

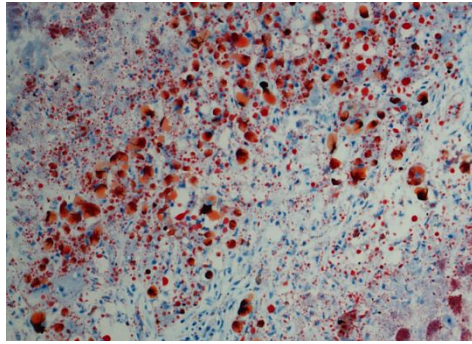


Figure 2. Oil-O Red staining; The deposit of ^{10}BSH entrapped WOW emulsion were accumulating in the VX-2 tumours after day 3 intra-arterial injection by Oil-O Red staining.

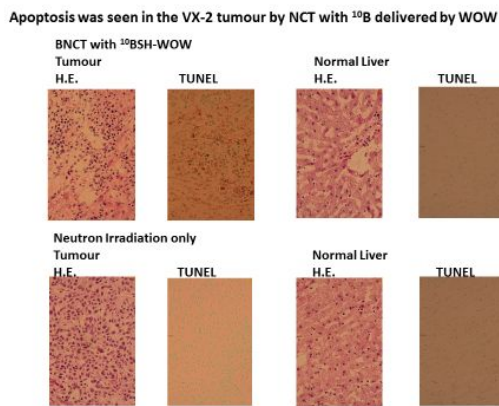


Figure 3. Apoptosis is one of the main mechanism of tumor growth suppression

(5) WOW エマルションによる一次ターゲティング後に、癌選択的ボロン化合物を用いた二次ターゲティングを目指すことが、より効果的な癌細胞選択的ボロン送達を達成できると考えられた。二次ターゲティングを行うにあたり、腫瘍選択性のある化合物のひとつとしてボロン原子を結合したエストロゲン化合物を用い、腫瘍血管に富んだ乳癌の転移性肝腫瘍に対する反応性を検討した。Natural ボロンが結合したエストロゲン化合物を用いた京都大学原子炉実験所における熱中性子照射の反応では、 ^{10}BPA との反応よりは弱いものの細胞障害効果を認めた。このため、Enriched ボロンを結合させたエストロゲン化合物の合成を進めることが必要と考えられた。

(6) 二次ターゲティングに用いる化合物について検討し、以下の結果を得た。

アミノ酸トランスポーターによる腫瘍集積性を有するボロノフェニルアラニン (^{10}BPA) の水溶液を作成し WOW エマルションに封入したが、水溶性が低くボロン濃度が 250ppm までしか上昇しなかった (^{10}BSH 封入 WOW エマルションの場合は 13000ppm に達す

る)。

新規ボロン化合物の合成を試みた。転移性乳癌は肝臓への転移を優位に生じることより、乳癌細胞の核内受容体への送達が可能なおエストロゲン骨格を基盤として検討した。今回の合成において6種類の化合物が合成できた(細胞毒性および抗腫瘍効果を確認ののちに特許調査予定)

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4件)

Yanagie H, et al (9人、8番目): Pharmacokinetics of core-polymerized, boron-conjugated micelles designed for boron neutron capture therapy for cancer, *Biomaterials*. 査読有, 33(13) May; 3568-77, 2012.

Dewi N, Yanagie H, Takahashi H, et al (17人、2番目、17番目): Tumor growth suppression by gadolinium-neutron capture therapy using gadolinium-entrapped liposome as gadolinium delivery agent. *Biomed Pharmacother*. 査読有, 67(6) Jul; 451-7, 2013.

Yanagie H, Takahashi H, et al (22人、1番目、21番目): Pilot Clinical Study of Boron Neutron Capture Therapy for Recurreced Hepatic Cancer using Intra-Arterial Injection of ^{10}BSH Entrapped WOW Emulsion, *Applied Radiation & Isotopes*, 査読有, 88: 32-37, 2014 DOI:10.1016/j.apradiso.2014.01.014. Epub 2014 Jan 30.

Dewi N, Yanagie H, Takahashi H, et al (18人、3番目、18番目): In vivo evaluation of neutron capture therapy effectivity using calcium phosphate-based nanoparticles as Gd-DTPA delivery agent; *J Cancer res Clin Oncol*, 査読有, 142(4), 767-775, 2016.

(学会発表)(計31件)

Yanagie H, Takahashi H, et al: Pilot Clinical Study of Boron Neutron Capture Therapy for Recurreced Hepatic Cancer and Gastric Cancer, 15th International Conference of Neutron Capture Therapy, 10th, Sep. 2012, Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan

Yanagie H, Takahashi H, et al: Tumour Growth Suppression with Intra-arterial Administration of BSH Entrapped Transferrin Binding PEG Liposome as

Selective Boron Carrier in VX-2 Rabbit Hepatic Cancer Model for Neutron Capture Therapy, 15th International Conference of Neutron Capture Therapy, 13th, Sep. 2012, Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan

Novriana D, Yanagie H, Takahashi H, et al: In Vivo Study of Gadolinium-based Neutron Capture Therapy, 15th International Conference of Neutron Capture Therapy, 13th, Sep. 2012, Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan.

Yanagie H, Takahashi H, et al: Planning of Neutron Capture Therapy for Local Recurred Breast Cancer According to Estimation of Boron Uptake in Tumour by F-BPA Positron Emission Tomography. 13th, Sep. 2012, Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan.

Yanagie H, Takahashi H, et al: Experiences of Pilot Clinical Study on Boron Neutron Capture Therapy for Recurred Gastrointestinal Cancers, 4th BNCT Trilateral Meeting 「invited」, 1st December, 2012, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan

柳衛宏宣、他：三元複合体を用いた胃癌細胞への遺伝子デリバリーシステムの検討、第85回日本胃癌学会総会、平成25年2月28日、大阪国際会議場、大阪

Yanagie H, Takahashi H, et al: Novel Arterial-Injection-Chemotherapy using Epirubicin Entrapped WOW Emulsion for Hepatocellular Carcinoma, 3rd International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 3 - 7 March 2013, Sorrento, Italy

Yanagie H, Takahashi H, et al: Application of Boron Neutron Capture Therapy for Intensive Treatment to Recurred Gastro-intestinal Cancers, 1st KURII International Workshop on Neutron Capture Therapy, 27th -28th, March, 2014, Star Gate Hotel Osaka, Osaka, JAPAN

Yanagie H, Takahashi H, et al: Basic Research of WOW Emulsion to Hepatic Cancer including Application for BNCT, 6th BNCT Trilateral Meeting 「invited」, 13th December, 2013, Taipei Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan

Novriana D, Yanagie H, Takahashi H, et

al: Application of Gadolinium Drug Delivery in Neutron Capture Therapy: In vivo study, 7th Young Researchers Meeting on NCT, 21st, September, 2013, Granada, SPAIN

柳衛宏宣 (招待講演)、中性子捕捉療法のがん治療への応用展開、FIRST Joint International Symposium 次世代のがん治療を考える、平成26年2月21日、東京大学伊藤国際学術研究センター、東京

Yanagie H, Takahashi H, et al: Clinical Experiences of Boron Neutron Capture Therapy to Recurred Rectal Cancers, 16th International Conference on Neutron Capture Therapy, 14th -19th, June 2014, Helsinki, FINLAND.

N. Dewi, Yanagie H, Takahashi H, et al: In vivo evaluation of Gd-DTPA-incorporated calcium phosphate nanoparticles for neutron capture therapy agent, 16th International Conference on Neutron Capture Therapy, 14th -19th, June 2014, Helsinki, FINLAND.

Yanagie H, Takahashi H, et al: Feasible evaluation of WOW emulsion as intra-arterial boron delivery carrier for Neutron Capture Therapy to Hepatocellular Carcinoma, 16th International Conference on Neutron Capture Therapy, 14th -19th, June 2014, Helsinki, FINLAND.

Yanagie H, Takahashi H, et al: Detection of Local Recurred Breast Cancer by Boron Uptake in Tumour by 18F-BPA Positron Emission Tomography for Application to Boron Neutron Capture Therapy, EANM'14 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 18th-22th, October 2014, Gothenburg, SWEDEN

Yanagie H, Takahashi H, et al: Experiences of Tumour Growth Suppression with Boron Delivery Systems in Rabbit Hepatic Cancer Model for Neutron Capture Therapy, ICRR2015, 28th May, 2015, Kyoto, JAPAN

Yanagie H, Takahashi H, et al: Translational Research of Boron Neutron Capture Therapy for Primary Hepatocellular Carcinoma with Intra-arterial Injection of Boron Entrapped WOW Emulsion, The 6th Asia Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting (APPLE), 4th July, 2015, Osaka, JAPAN

Yanagie H, Takahashi H, et al:
Translational Research of Boron Neutron
Capture Therapy to Hepato-cellular
Carcinoma with Intra-arterial Boron
Delivery using WOW emulsion, The 1st
Academic Meeting of Taiwan Society of
Neutron Capture Therapy, 5th, December,
2015, San-Xia New Taipei City, TAIWAN

〔図書〕(計2件)

Yanagie H, et al. Springer, Berlin,
Germany Textbook of Neutron Capture
Therapy, 2012, 553

柳衛宏宣、中村浩之 他、養賢堂、システ
ム創成サイエンス入門シリーズ：中性子捕
捉療法における薬剤送達システム、2013、
153-164

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳衛 宏宣 (YANAGIE Hironobu)
東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・
研究員
研究者番号：30212278

(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(工学部)・
教授
研究者番号：70216753