

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670571

研究課題名(和文)膜融合蛋白・核移行シグナル結合性癌特異的原子抑制Gd中性子捕捉療法の開発

研究課題名(英文)Development of cancer specific Gd neutron capture therapy using membrane fusion protein & nuclear localization signal

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ガドリニウム中性子捕捉療法においては、ガドリニウムが熱中性子を捕捉し、ガンマ線およびオージェ電子を放出することにより、癌細胞障害効果を得る。癌細胞内にガドリニウムを集積させるために、ポリエチレングリコールにて被包されポリカチオン-リン酸カルシウムを用いてガドテリドール結合ナノミセル(Ca-Pナノミセル)を合成した。Ca-Pナノミセルでは、投与24時間後まで腫瘍集積性が持続する。Colon26マウス皮下腫瘍モデルに対して、尾静脈から投与後に、京都大学原子炉実験所にて熱中性子を照射すると約50%の腫瘍増殖抑制効果を得た。癌選択的なGd中性子捕捉療法への応用展開を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：Cancer cell cytotoxicity was obtained by gamma ray and auger electron derived the reaction between Gadolinium(Gd) and thermal neutron in Gd neutron capture therapy(NCT). It is necessary to accumulate the Gd atoms in the cancer cell, especially, in nucleus, for selective damage to cancer cells without the affect to neighbor normal tissues, so it is important to develop the Drug Delivery System.

We prepared Gadoteridol entrapped poly-cationized-calcium phosphate nano micelle coating with polyethylene glycol (Ca-P nano micelle). Gd concentration in tumour was keeping higher compare to original Gd solution until 24hrs after intravenous injection(IV). After IV injection of Gd Ca-P nano micelle, 50 % of tumour growth suppression was shown in Colon 26 mouse subcutaneous tumour model with thermal neutron irradiation at Kyoto University Research Reactor Institute. We hope to develop the Gd NCT as selective novel cancer therapy.

研究分野：消化器外科

 キーワード：ガドリニウム化合物 中性子捕捉療法 Drug Delivery System ナノミセル ポリエチレングリコール
リン酸カルシウム ポリエチレンイミン 膜融合ペプチド

1. 研究開始当初の背景

現在の癌治療は外科治療・化学療法・放射線療法・免疫療法など多種多彩な治療法が実施され、癌患者の治療成績は確実に向上しているが、未だ完全な癌克服法が見出されていないのが現状であり、社会復帰等の生活の質(QOL)改善には各種治療法を組合せる集学的治療で効果を向上させることが求められている。

中性子捕捉療法 (Neutron Capture Therapy;NCT) は熱中性子線をボロン(10B)化合物あるいはガドリニウム(Gd)化合物に照射することにより得られる重電荷粒子(α線, Li)あるいは電子線を使用する物理化学的な癌治療法である。α線, Li核のエネルギー飛程は10μmであり、癌細胞にボロン原子を選択的に集積させることができれば正常細胞に障害を与えず理論的には細胞単位での癌特異的治療が可能である。そのためには10BやGd化合物の癌細胞選択的そして高効率デリバリーシステムが必要不可欠である。副作用を軽減させるための投与量の低減および負担金額の軽減という問題を克服するために、腫瘍集積性向上を計るべく10BやGd化合物のDDS製剤化研究が国内外で活発に展開されている。我々は、NCTの難治性癌である多発性肝細胞癌、進行・再発乳癌および肺癌への適応拡大を目指している。

NCTにおいては、ガドリニウム化合物に熱中性子あるいは熱外中性子を照射することにより生じる電子線により癌細胞障害を生じることがわかっている(GdNCT)。ガドリニウムは一般臨床においてMRIの増感剤として使用されている化合物である。NCTは熱外中性子の届く生体内約7cmにおいては、その強力な殺細胞効果を生じるが、深部の癌になると急速にその効果を現弱してしまうのが問題点として提起されている。

そこで、本研究では、NCTで使用するGd化合物が、X線にも励起される性質を応用し、X線照射により大量の反応活性種(ラジカル)を発生し腫瘍増殖抑制効果を生じること検討し、腫瘍の浅部ではNCTを、深部ではX線療法を併用できるGd封入デリバリーシステムを構築し、電子線を生じる中性子捕捉療法(GdNCT)とラジカルを生じるX線放射線療法を同時に誘導できる強力な抗癌放射線治療システムを開発するための基礎的知見、及び安全使用量を蓄積し、癌化学療法・免疫療法と併用できる高機能性集学的中性子捕捉療法の開発につなげることを目的とする。昨年度までの実験でGd封入WOWエマルジョン肝動注を用いたGdNCTで著明な抗腫瘍効果を確認できた。より高濃度のGd化合物を癌細胞内へ送達するために、膜融合蛋白であるJTS-1やTATおよび核移行シグナルであるNLSをデリバリーシステムに結合させ、癌選択的なGdデリバリーシステムを構築することにより、癌細胞内にGdを送

達でき、一般臨床で使用しているX線照射で殺細胞効果が証明できれば、通常のX線照射設備のあるところでは容易に治療計画を立てることができ、さらに病院併設型加速器を用いたNCT事業的にも世界へ発信できる研究となり得る。

研究代表者の柳衛は、ボロン化合物を封入した封入抗CEAイムノリポソームをCEA産生性ヒト肝癌細胞と反応させ、BNCTを用いてを選択的な腫瘍増殖抑制効果を認めた(Brit.J. Cancer 1991, 1997)。AFP産生性ラット肝癌腫瘍への抗AFPモノクローナル抗体-ボロン複合体のtargetingを示した(Cancer Res & Clin. Oncol. 1994)。さらにリポソームの表面をポリエチレングリコールで修飾することにより、ステルスリポソームを作製し、BNCTを用いて腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた(Appl. Rad & Isotopes 2004, Biomedicine & pharmacotherapy 2006)。また、ボロン化合物として新規ポリ酸ボロン化合物(10B32)を合成し、熱中性子を照射にて、ヒト肝癌細胞株AsPC-1に対して細胞障害効果を認め10B32は中性子捕捉効果を有することを確認した(Int Cong. of Boron & Related Materials, 2011)。

新規のボロンデリバリーシステムとしてBSH封入WOWエマルジョンを作成できた。VX-2腫瘍担癌ウサギモデルを用いて、BSH封入WOWエマルジョンを動脈投与後、腫瘍組織内に選択的にボロン原子を集積させることができることを、中性子ラジオグラフィを用いて証明し、さらにBNCTにより腫瘍増殖抑制効果を確認でき、WOWエマルジョンはボロンデリバリーの有効なキャリアであることを証明した(特許公開, NIM-A 2009)。さらにGd封入WOWエマルジョン肝動注を用いたGdNCTで著明な抗腫瘍効果を確認できた(14th Int Cong. of NCT 2010)。

また、柳衛は、非ウイルスベクターとして合成ポリマーを用いた遺伝子キャリアを開発した経験より、プラスミドDNAやプラチナ抗癌剤をポリエチレンジイミン(PEI)に反応させ、さらに血中滞留性と分散性を格段に上昇させるためカルボキシル基結合ポリエチレングリコール(PEG-C)と反応させ、細胞内送達を可能にするキャリアを開発した(Abst. European Cong. of Gene Therapy 2005)。さらに膜融合タンパクJTS-1を加えることにより、エンドゾームからの消化を防ぎ、細胞質への送達効率を増加させた(Abst. Int Cong. of Cancer Gene Therapy 2006)。また、Gd封入リポソームの静脈投与後のGdNCTにて腫瘍増殖抑制効果を認めた(15th Int Cong. of NCT 2012)。

2. 研究の目的

応用し、X線照射により大量の反応活性種(ラジカル)を発生し腫瘍増殖抑制効果を生じること検討し、腫瘍の浅部では中性子捕捉療法を、深部ではX線療法を併用できるガ

ドリニウム封入デリバリーシステムを構築する。電子線を生じる中性子捕捉療法(GdNCT)とラジカルを生じる X 線放射線療法を同時に誘導できる強力な抗腫放射線治療システムを開発するため、より高濃度の Gd 化合物を癌細胞内へ送達するために、膜融合蛋白である JTS-1 をデリバリーシステムに結合させる。効率的な癌治療システムとして化学療法・免疫療法と併用できる高機能性集学的中性子捕捉療法の開発に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、癌細胞内への Gd 原子を効率よく送達するために、膜融合蛋白である JTS-1 を結合させ、Gd 化合物/ポリカチオン/Sugar-PEG-三元複合体の調製条件と発現活性との相関を調べ、動物モデルを用いた in vivo での実験により、ターゲティングの可能な新しい Gd デリバリーシステムを開発する。細胞内へ原子を効率よく取り込む膜融合蛋白である JTS-1 を合成・結合させ、様々な糖鎖タイプの Sugar-PEG-C を合成し、Gd 化合物/ポリカチオン/Sugar-PEG-三元複合体の調製を試みる。

(2) 癌細胞特異性の高いナノデリバリーシステムを用いた Gd デリバリーシステムを構築する。

4. 研究成果

我々は中性子捕捉療法を基盤とする新規の化学放射線療法を推進している。ガドリニウム化合物を用いた中性子捕捉療法においては、ガドリニウムが熱中性子を捕捉し、ガンマ線およびオージェ電子を放出することにより、癌細胞障害効果を得る。このため、癌細胞内、特に癌細胞の核にガドリニウムを集積させれば、より効果的な中性子捕捉反応が期待できる。

(1) ガドリニウム化合物を腫瘍組織に集積できる Drug Delivery System を検討した。血管に富む腫瘍を形成する癌においては、現在までにある Liposome 等の DDS キャリアーで容易に集積できるが、血管性に乏しい、例えば、膵臓癌などの腫瘍においては、さらに小さなナノサイズのキャリアーで腫瘍周囲の繊維組織・間質組織をすり抜けて癌細胞まで到達しなければならない。今回は、ポリエチレングリコールにて被包されポリカチオン-リン酸カルシウムにガドテリドール結合ナノミセル(Ca-P ナノミセル)を合成し、ガドリニウムを封入させた。ガドテリドール水溶液では、静脈投与後に、経時的に血中濃度の低下を見て投与3時間で血中にて測定不可能となるが、Ca-P ナノミセルでは、投与24時間後まで腫瘍集積性が持続することが確認できた。Preliminary に Colon26 マウス皮下腫瘍モデルに対して、尾静脈からの投与後に、

京都大学原子炉実験所にて $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$ の熱中性子を照射すると約 50%の腫瘍増殖抑制効果を得ることができた。今回のガドテリドール結合 Ca-P ナノミセル投与後の中性子捕捉療法によるマウスへの有害事象はなかった。

(2) Colon26 マウス皮下腫瘍モデルに対して、尾静脈からの投与回数、すなわち、静脈投与回数を6時間毎の反復投与にて3回に増やし、ICP-Mas を用いて投与24時間後の腫瘍内濃度が80ppmまで増加することを確認できた。さらに京都大学原子炉実験所において、腫瘍以外の生体を放射線防御を施行しつつ、 $2 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$ の熱中性子を照射し、単回投与と同様の腫瘍増殖抑制効果を見いだせた。

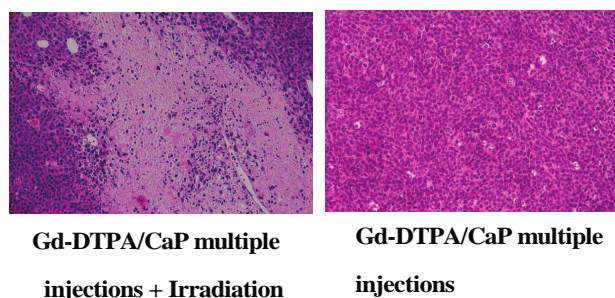


Figure 1. Evaluation of Antitumor Effectivity (H&E Staining)

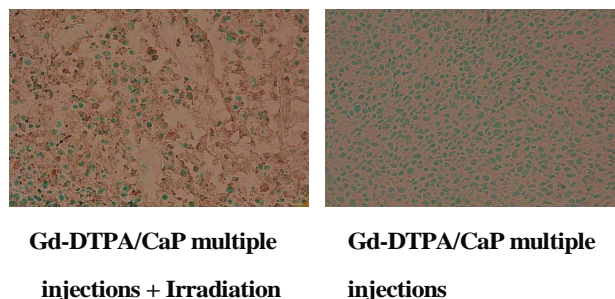


Figure 2. Evaluation of Antitumor Effectivity (TUNEL Staining)

(3) 膜融合蛋白としてインフルエンザウイルスペプチドである JTS-1 を用いて、Gd 化合物を JTS-1 組み込み高分子ポリマーに封入し、腫瘍内局注にて腫瘍組織内保留性を確認できた。

(4) ガドリニウム化合物を腫瘍組織に集積できる Drug Delivery System(DDS) を検討した。

血管性に乏しい膵臓癌などの腫瘍に対する DDS として、ポリエチレングリコールにて被包されポリカチオン-リン酸カルシウムにガドテリドール結合ナノミセル(Ca-P ナノミセル)を合成し、ガドリニウムを封入させた。Colon26 マウス皮下腫瘍モデルに対して、ガドテリドール結合 Ca-P ナノミセルを尾静脈からの投与し、経時的に血中濃度を測定した。

単回投与と複数回投与の比較を行い、複数回投与にて、腫瘍内ガドリニウム濃度の上昇を認めた。ガドテリドール結合 Ca-P ナノミセル複数回投与後のマウスへの有害事象はなかった。

Preliminary な実験として、ガドテリドール錯体をカチオン性ポリマーであるポリエチレンイミンと膜融合ペプチド JTS-1 と反応させ複合体を形成し、Colon26 マウス皮下腫瘍モデルに対して腫瘍内投与を行い、腫瘍内滞留性を検討した。この結果、ガドリニウム錯体単独投与と群と比較して腫瘍内集積性を見出した。

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)

Mi P, Dewi N, Yanagie H, Takahashi H, et al (13人、3番目、7番目): Hybrid Calcium Phosphate-Polymeric Micelles Incorporating Gadolinium Chelates for Imaging-Guided Gadolinium Neutron Capture Tumor Therapy ; ACS Nano, 9(6): 5913-5921,2015

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4件)

Dewi N, 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,16th, June.2014,Helsinki,FINLAND

Dewi N, Yanagie H, Takahashi H, et al : Tumor growth suppression by neutron capture therapy using Gd-DTPA-incorporated calcium phosphate nanoparticles as gadolinium drug agent, 11th Congress on Neutron Capture Therapy,5th, July,2014,Osaka,JAPAN

Dewi N, Yanagie H,Takahashi H,et al: Tumour growth suppression by gadolinium capture therapy with multipleinjections of Gd-DTPA-containing calcium phosphate-based nanoparticles, 8th Young Researchers ' BNCT Meeting,16th September,2015,Pavia,ITALY

Dewi N, Yanagie H,Takahashi H,et al: In vivo evaluation of gadolinium neutron capture therapy effectivity with multiple injections of calcium phosphate-based nanoparticles incorporating Gd-DTPA, 12th Congress on Neutron Capture Therapy,4th, September,2015,Kobe,JAPAN

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