

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：35409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21327

研究課題名(和文)腫瘍細胞選択的粒子線治療に用いる新規治療薬PEG化ホウ素化合物の開発研究

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic agent using boron compound-modified PEG derivative for particle-beam radiation therapy (Boron Neutron Capture Therapy)

研究代表者

白川 真 (SHIRAKAWA, Makoto)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号：40707759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍に対する低侵襲性の治療法として、ホウ素中性子捕捉療法が注目されている。本研究は、ホウ素送達法としてリポソームに着目し、腫瘍内への高濃度ホウ素デリバリーを可能とするホウ素含有ポリエチレングリコール誘導体(PBL)の開発と、これを用いたリポソームの各種評価を行った。PBLは効率よく脂質膜へと修飾でき、得られたリポソームはin vitroにおいて低毒性であることが確認された。また、担癌マウスに本リポソームを投与後24時間において腫瘍内ホウ素濃度20ppmおよび腫瘍血液比5以上を達成した。そこで、中性子線照射を行った結果、各コントロール群に対し有意な抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：As a low invasive treatment for the malignant tumors, boron neutron capture therapy is featured. This study focused on liposome and developed the novel boron cluster-modified PEG lipid derivative (PBL) that is able to deliver the ^{10}B at high concentration in the tumor. PBL could be modified to lipid film efficiently, and the liposome that prepared with it was low toxicity in vitro. And, the liposome succeeded in 20 ppm of boron concentration and above 5 of T/B ratio in 24 hours after administration to cancer-bearing mice. As a result, when irradiated neutron beam to it, the liposome showed a significant antitumor effect in comparison with each control group.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 リポソーム

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、その原理から低エネルギーの熱中性子線を腫瘍組織に照射し、予め腫瘍組織に取り込ませたホウ素(^{10}B)化合物との核反応によって生成する飛程のきわめて短い α 線とリチウム核によって、選択的に腫瘍細胞のみに障害を与えることができる(Fig.1)。

そこで重要となるのが、 ^{10}B を腫瘍へと効率的に送達でき得るホウ素薬剤の開発と中性子源の確保である。すでに中性子源として原子炉を用いた臨床研究も行われており、一定の治療効果が得られている。

しかしながら、再発例も多く、脳腫瘍など浸潤性の腫瘍を根治するには至っていない。そこで現在、中性子源として加速器が、ホウ素薬剤として様々な化合物の開発が行われている。

我々はドラッグデリバリーシステム(DDS)デバイスのひとつであるリポソームを利用して、 ^{10}B を効率的に腫瘍へと送達できる薬剤の探索を行っている。

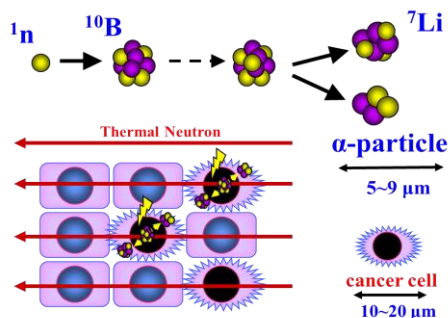


Fig.1) Principle of BNCT
 $^{10}\text{B} + ^1_0\text{n}(\text{中性子}) \rightarrow ^7_3\text{Li} + \alpha\text{-線} + 2.79\text{MeV}$

2. 研究の目的

現在、臨床試験ではホウ素クラスター化合物(BSH)とホウ素含有アミノ酸(BPA)の2剤が用いられるのみである。両化合物ともに、低毒性ではあるものの腫瘍内ホウ素濃度が不十分である、若しくはホウ素薬剤の分布が不均一であることから、その治療効果は十分とは言えない。

我々はドキシル®等でその有用性がすでに臨床において実証されているリポソームのBNCT応用を実施するため、リポソーム構成成分として、ホウ素含有脂質類似体(PBL, Fig.2)の開発を行った(ホウ素クラスター修飾PEG脂質誘導体およびこれを用いたリポソーム; 白川真, 中井啓, 松村明. 特許 6206925号)。

本研究では、PBLを用いたリポソームの最適化と *in vitro* および *in vivo* 評価を目的とした。

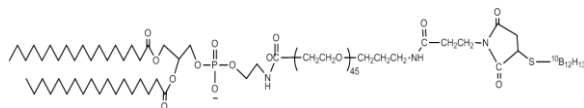


Fig.2) Structure of the Boron cluster-modified PEG lipid derivative (PBL).

3. 研究の方法

(1) 一般的なりポソーム調製法を用いて脂質膜へPBL修飾を行ない、効率的なホウ素リポソーム作製法を検討する。

(2) 得られたホウ素リポソームに対して、その脂質膜へのPBL最大修飾率を求めるとともに、物性評価を行なうことで粒子設計の最適化を図る。

- ①修飾率の算出
- ②粒子径およびゼータ電位の測定
- ③安定性の確認

(3) 模索した粒子設計により、最適化されたPBL修飾リポソームを用いて、CT26(マウス大腸癌由来細胞)、C6(ラットグリオーマ細胞)、V79(チャイニーズハムスター肺由来細胞)に投与し、その細胞内取り込みを評価するとともに、各細胞種への影響を検討する。

(4) V79細胞にPBL修飾リポソームを曝露後、中性子線照射を行ない、BNCTによる殺細胞効果を評価する。

(5) 担癌マウスにPBL修飾リポソームを投与後、各時間ごとに無作為に選出し、採血ならびに各臓器を摘出することで、ホウ素血中動態および体内動態を確認する。

(6) 担癌マウスにPBL修飾リポソームを投与後、中性子線照射を行い、BNCTによる抗腫瘍効果を評価する。

4. 研究成果

(1) PBLを脂質膜へ修飾させるリポソーム調製法を検討した結果、凍結融解法が最も効率的に修飾されることが確認された(Table.1)。

Table.1) Modification rate of PBL into liposome.

調製法	超音波処理法	凍結融解法	逆相蒸発(REV)法
修飾率(%)	57.8	73.8	59.1

(2)①PBLを各組成比(1~5mol%)でリポソームを調製した結果、その修飾率は3%までは変わらず、5%で調製すると、ミセルが作製されることが確認された(Fig.3, Table.2)。

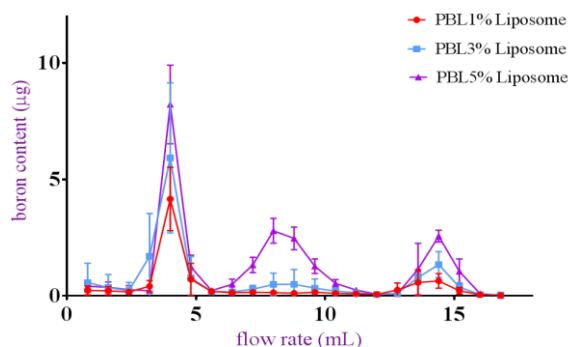


Fig.3) Quantity of PBL modified into liposome. The prepared

liposome was subjected to size exclusion chromatography and measured emission intensity of Boron in PBL by using ICP. Each fractions are in order of liposome, micelle, monomolecular

Table.2) Incorporation rate of PBL into liposome.

PBL ratio (mol%)	1	3	5
Incorporation (%)	65.6±7.4	60.9±16.6	37.6±3.3

②PBL 修飾リポソームに対して EPR 効果 (Enhanced Permeability Retention effect)を最もよく得ることのできる粒子径 100~200nm に整粒させることに成功した(Fig.4)。また、PBL の修飾率の増加に相関して、ゼータ電位が減少することを確認した(Table.3)。

Table.3) Physicochemical property of PBL liposome.

	Molar ratio of PBL (%)	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
PBL-Liposome	1	155.5	-22.7
	3	149.0	-36.1
	5	148.1	-41.5

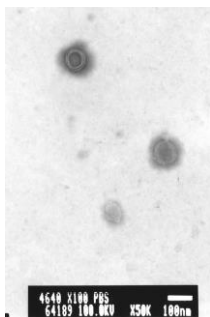


Fig.4) Electron micrographs of the PBL liposome after extrusion through a polycarbonate membrane with a 100 nm pour size.

③BSH 内封 PBL 修飾リポソームを血清入り培地中でインキュベートした結果、測定時間内において、内封薬物の漏出および PBL の脂質膜からの脱離が起きないことを確認した(Fig.5)。

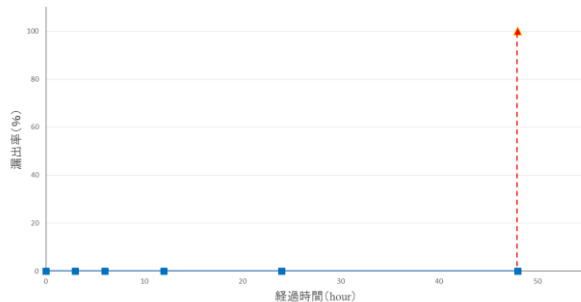


Fig.5) Leakage rate of Boron compounds from liposome. When used this liposome, the leakage rate was almost 0 % until 48 hour.

(3) 最適化された PBL 修飾リポソームを各種細胞に 24 時間曝露した結果、どの細胞種においても毒性は確認されなかった(Fig.6)。

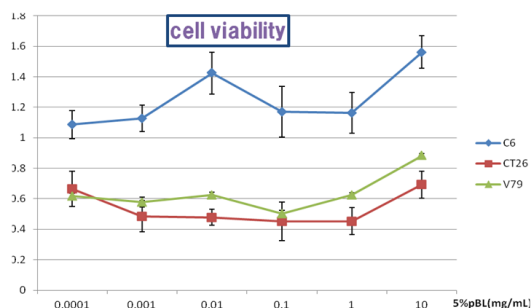


Fig.6) Cytotoxicity of PBL liposome.

(4) PBL 修飾リポソームを V79 細胞へ投与後、中性子線照射を行った結果、PBL 修飾リポソームはコントロール群に対し有意に殺細胞効果を示すとともに、細胞内への取り込みがないことが確認された(Fig.7)。

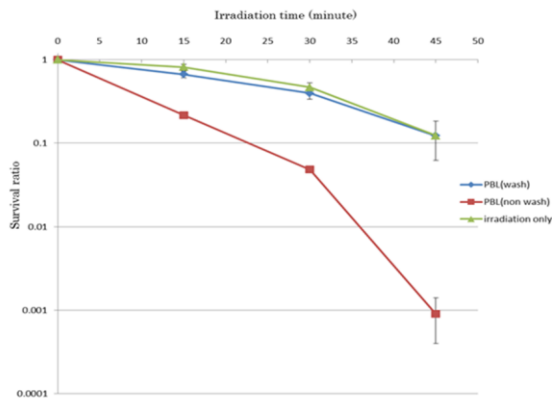


Fig.7) Cytotoxicity reaction by thermal neutron irradiation with PBL modified liposome. The V79 379A cells were irradiated with 5.6Gy for 15minute, 12.1Gy for 30minute and 18.4Gy for 45minute. Data are represented as ratio of control. Each assay was done in five (mean S.D.).

(5) 担癌マウスに PBL 修飾リポソーム (5mgB/kg)を投与した結果、腫瘍内ホウ素濃度 20ppm を達成した(Fig.8)。

また、投与後 24 時間においては、T/B(腫瘍/血液)比 5 以上を同時に達成した(Table.4)。

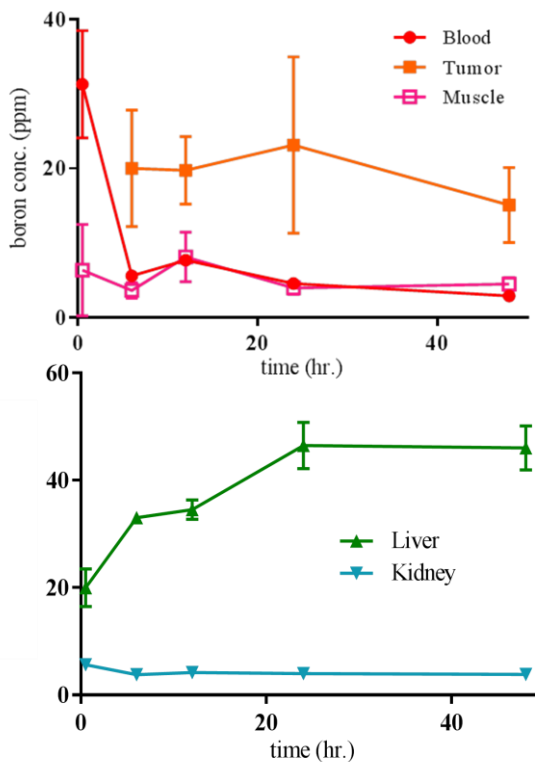


Fig.8) Time courses of blood residence, liver, kidney and muscle uptake, and tumor accumulation of ¹⁰B delivered by PBL-liposome.

Table.4) ^{10}B transition of the time-dependent tumor/blood ratio and tumor/normal tissue ratio.

Time (hour)	6	12	24	48
T/B ratio	3.7±1.6	2.6±0.5	5.0±2.3	5.1±1.2
T/N ratio	5.5±0.9	3.0±2.1	6.6±4.8	3.6±1.8

(6) 担癌マウスにPBL修飾リポソームを投与後、中性子線照射を行った結果、PBL修飾リポソームは各コントロール群に対し有意な抗腫瘍効果が確認された(Fig.9)。

また、照射後22日経過したマウスの皮膚(腫瘍)と肝臓、腎臓に対し、HE染色による観察を行なった(Fig.10)。

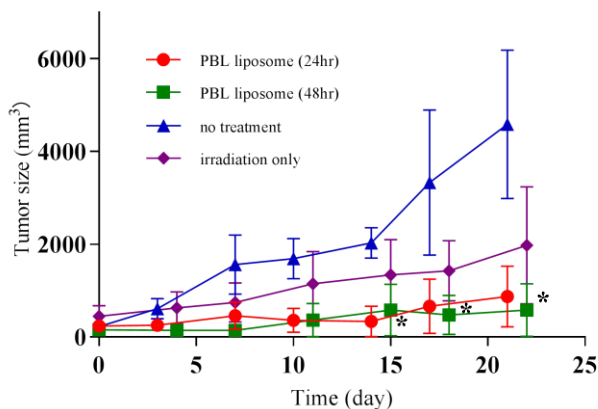


Fig.9) Antitumor effect of the PBL-liposome. The tumor diameter was determined over time after the irradiation until Day 21 or 22 so as to compare the effect of inhibiting tumor growth with the control group.

* $P < 0.05$ (PBL-liposome vs. irradiation only, no treatment). The tumor sizes were determined according to the following formula.

(Long diameter (mm)) x (Short diameter (mm))² / 2 = tumor size (mm³)

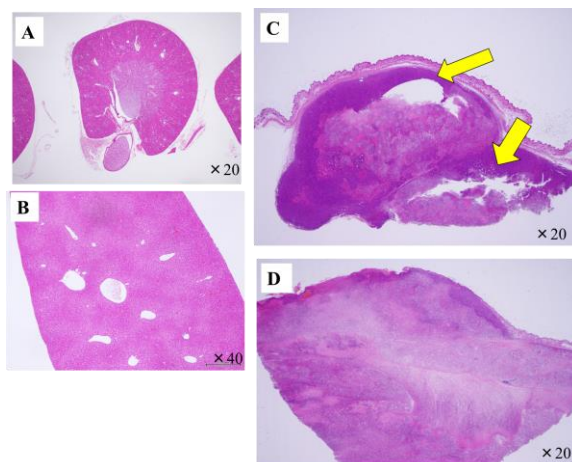


Fig.10) Histocytological tissue specimen by HE staining. (A) kidney of mice administrated PBL-liposome. (B) liver of mice administrated PBL-liposome. (C) tumor of mice administrated PBL-liposome.

(D) tumor of mice that did not care.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 8 件)

①白川真, 柏田啓江, 中井啓, 吉田文代, 栗林ひかり, 南田幸子, 松村明, 富田久夫: 新規ホウ素リポソーム製剤の生体内分布とその治療効果の評価、日本薬学会第138年会、2018

年3月25-28日

② M. Shirakawa, K. Nakai, F. Yoshida, S. Nakamura, M. Harada, T. Yamamoto, A. Matsumura, H. Tomida.: Improvement of encapsulation method of boron compounds for development of DDS formulation at high boron assembly., 9th young researcher's Boron Neutron Capture Therapy (Kyoto, Japan), 2017.11.

③白川真, 中井啓, 吉田文代, 中村駿二, 原田茉莉, 山本哲哉, 松村明, 富田久夫: ホウ素高含有 DDS 製剤開発のためのリポソーム調製法の基礎的検討、第14回日本中性子捕捉療法学会、福島(郡山), 2017.9.

④白川真, 松村明, 富田久夫: 第4の選択~新規がん治療法の実現に向けて~、第8回川崎医科大学学術集会、岡山(倉敷), 2017.8

⑤白川真, 野村彰一, 小笠原菜子, 中井啓, 吉田文代, 山本哲哉, 松村明, 富田久夫: 中性子補足療法のための高ホウ素濃度化リポソームの開発、日本薬学会第137年会、宮城(仙台)、2017.3.

⑥ M. Shirakawa, K. Nakai, F. Yoshida, T. Ito, M. Sato, T. Yamamoto, A. Matsumura, H. Tomida., Property and in vitro study of a liposome modified boron lipid for combination therapy., 17th International Congress on Neutron Capture Therapy (Missouri, USA), 2016. 10.

⑦白川真, 中井啓, 吉田文代, 小笠原菜子, 山本哲哉, 松村明, 富田久夫: 新規ホウ素リポソームへのBSH封入に関する基礎的検討、第13回日本中性子捕捉療法学会、東京、2016.8.

⑧白川真, 中井啓, 吉田文代, 伊藤隆宏, 佐藤美里, 松村明: 新規ホウ素リポソームへのドキシソルビシン封入による物性および in vitro 評価、第12回日本中性子捕捉療法学会、神戸、2015.9.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: BORON CLUSTER-MODIFIED PEG LIPID DERIVATIVE, AND MOLECULAR ASSEMBLY USING SAME

発明者: MAKOTO SHIRAKAWA, KEI NAKAI, AKIRA MATSUMURA

権利者: UNIVERSITY OF TSUKUBA

種類: 特許権

番号: 2889302, 60 2013 021 407.7

取得年月日: 2017年8月8日

国内外の別: 国外(European patent)

[その他]

ホームページ

<http://rdv.fukuyama-u.ac.jp/view/UdrRK/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 真 (SHIRAKAWA, Makoto)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号: 40707759