

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659337

研究課題名（和文） 抗酸化作用を利用した新規ホウ素ペプチドの開発

研究課題名（英文） Development of boronated peptide using anti-oxidative effect for neutron capture therapy

研究代表者

松村 明 (MATSUMURA AKIRA)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90241819

研究成果の概要（和文）：Boronophenylalanine をペプチド化し、分子あたりのホウ素含有率を上させることを検討した。Fmoc 固相合成法で BPA 5 分子、ないし 10 分子を有するペプチドの合成を行った。またこれらをもとに liposome を構成する lipopeptide を新規に合成し、性能試験を行った。また、グルタチオンによるホウ素化合物の動態修飾を検討した。

研究成果の概要（英文）：We synthesize novel peptide which consist of boronated amino-acid. We succeed the synthesis pentamer and decamer of boronophenylalanine by fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-based solid-phase peptide synthesis. And we developed novel lipopeptide which containing boron, and liposome with it. We found the pre-treatment of glutathione modified the in vivo distribution of boron compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	0	800,000
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	330,000	3,430,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：中性子捕捉療法

1. 研究開始当初の背景

ホウ素と中性子の反応で得られるアルファ粒子線を利用する中性子捕捉療法 (BNCT) では、ホウ素源に、sodium borocaptate (BSH) および Boronophenylalanine (BPA) の二剤を用いる。

(1) これまでわれわれは主に BSH の SH 基に注目し、細胞内の主たる thiol 化合物

であるグルタチオン (GSH) を枯渇させることによって、細胞への BSH 取込み増強効果を見出し、細胞実験および動物実験で証明した (Yoshida et. al Cancer Letters, 263, 2008) 253-258)。

(2) 一方 BPA については、フェニルアラニンの類似体であることから、アミノ酸代謝が盛んな細胞に取り込まれることが知られている。(Yoshida et. al Cancer

Letters, 187, 2002)

(3) これまでの結果から、SH 基をもつグルタチオン類似ホウ素ペプチドを合成することで、BPA と同様のアミノ酸取り込み機序および、抗酸化物質である、グルタチオン代謝（シスチンの取り込み）を利用した腫瘍集積性のある新規ホウ素化合物が合成可能と考えるにいたった。

2. 研究の目的

ペプチドの組み合わせの最適な化合物を模索し、従来ホウ素化合物に比べて、ホウ素濃度、分布、中性子照射による治療効果実験における有用性を検討する。

3. 研究の方法

従来の照射で得られた結果より、ホウ素化合物の限量および外照射の線量増加を行い、非劣性を生存期間および無病再発期間などで証明する。あわせて再発悪性脳腫瘍に対する治療プロトコルを整備し、倫理委員会の承認を得て、治療を行う。

4. 研究成果

(1) グルタチオンによるホウ素代謝動態

ラット（フィッシャー344）腹腔内に BSO を 5 mmol/kg 投与し、0, 3, 6, 12, 24 時間後の組織内 GSH を測定した。同様に、尾静脈より Borocaptate Sodium (BSH) を 100mg/kg 投与し、組織内 GSH の経時変化を測定した。各組織（脳、筋肉、肝臓）はホモジナイズし、8000×g、4℃ で 10 分間遠心し、上清をサンプルとした。血液は、ヘパリン採血し、1000×g、4℃で 10 分間遠心して血球を分離し、4 倍量の 5% SSA を加えて溶血させ、8000×g、4℃で 10 分間遠心した上清をサンプルとした。グルタチオン測定は、Total Glutathione Quantification Kit（（株）同仁化学研究所）を使用した。

結果、BSH 添加後、各組織中のグルタチオン濃度は上昇傾向を示した。また BSO 添付によって組織中グルタチオン濃度は低下する傾向を示した。血球中グルタチオン濃度には、有意な変化は見られなかった。

いずれも肝臓内組織濃度は 24 時間後には正常化する変化であった。BSH 添加時の GSH 変化は、24 時間ではほぼ 0 時間と同等に復した。これらは、BSH の細胞内での wash out が早いことを示唆する。また細胞実験によっても同様の事象が観察されており、BSO 投与によってホウ素化合物の代謝を修飾することが可能であることが示唆された。

(2) 新規ホウ素ペプチドとその応用

ホウ素含有アミノ酸を用いたペプチド合成について検討を行った。Boronophenylalanine をペプチド化し、分子あたりのホウ素含有率を向上させることを検討した。Fmoc 固相合成法で BPA 5 分子、ないし 10 分子を有するペプチドの合成を行った。HPLC での分析を行ったが、ピークが広く化合物の同定が困難であった。BPA の縮合効率が悪い可能性があり縮合剤の検討がこれから必要であると考えている。

引き続き、新規にホウ素含有 Lipopeptide (PBL) をデザインした。今回あらたに合成した化合物 2 種 (A, B) は、いずれも、親水性で、細胞毒性がひくい。これらを構成要素とする liposome を開発することで、ホウ素濃度の向上を目指した。癌組織は正常組織と異なり、血管透過性が亢進しており、これを利用し、サイズを 100nm 前後に調整することで腫瘍血管からは漏出し、腫瘍へと集積する。(Liposome の EPR 効果)。このメカニズムを利用し、血中滞留性をあげることで、腫瘍内ホウ素濃度を向上させる目的でリポソームに修飾可能な新規分子の開発を Fmoc 固相合成法により合成し、行った。

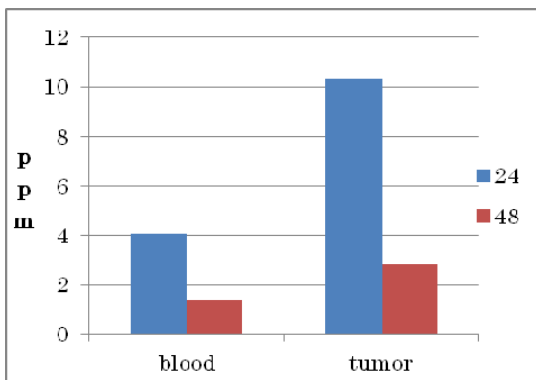
A は細胞膜通過ドメインをもつことで、機能性 liposome の組成となることを目標とした。

①リポソームへの新規Lipopeptideの修飾
化合物 A を 5% を DSPC 45%, cholesterol 45%, DSPE-PEG 5% で混合し、脂質白膜法で作製した Liposome をサイズ排除クロマトグラフィーにより、Liposome 画分、micelle 画分、単分子画分に分離し Lipopeptide の含量を定量した。

蛍光分光光度計により Lipopeptide の指標である Trp を測定した。

②A を構成要素とした-Liposome の in vivo 実験

CT26 マウス大腸癌細胞株 (5×10⁶ cells) を 100 μL をマウス (Bala/c mice) 腹部に皮下注射し、モデルマウスとした。リポソームを脂質濃度 100 mmol/L に PBS を用いて調製し、リポソーム 100 μmL を尾静注により添加後、2, 24, 48 時間ののちに解剖し、各種臓器を採取した。測定には ICP-AES を用いて行った。ICP-AES によりサンプルのホウ素イオン濃度を測定し、ペプチド修飾リポソームの細胞導入効率の検討を行なった。



右 24 時間後、左 48 時間後の血液・腫瘍内ホウ素濃度

24 時間後に T/B 比は約 2.5 となったが、腫瘍集積濃度は 10ppm 程度と治療可能域に至らなかった。48 時間後にはさらに濃度は低下し、細胞実験で認められた選択的ホウ素濃度上昇が持続しない結果であった。粒子が培地でなく、血液中に投与された場合の安定性、および血管内での安定性ないしは他臓器でのトラップなどが考えられる。

③ BSH をもとにした新規ホウ素化合物の合成

B は、BSH を骨格にもつことでホウ素分子含有率を増加させるとともに、BSH の血液滞留性、腫瘍選択性を高める試みを行った。いずれも、TOF-MS および HPLC で高純度、高収率の合成が可能であった。これを用いたホウ素含有 Liposome を PBL の濃度を変えて作製した。

新規 lipopeptide による liposome 性能

A を組成に加えた Liposome は、細胞内導入効率の向上を認めたが、細胞選択性がなく、また動物において急性毒性を示した。B を用いた Liposome は、粒子径は 100nm 前後を示し、ゼータ電位は本化合物の修飾率に関係なく、アニオンを示した。この結果、本化合物による liposome 形成への影響は低く、高密度修飾が可能であった。これを細胞に投与した。BSH 同様に低毒性であることが示された。粒子径を調整することによって、血液対流性の向上およびそれによる passive targeting effect を持つことが期待される。

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 4 件)

- ① Aiyama H, Nakai K, Yamamoto T, Nariai T, Kumada H, Ishikawa E, Isobe T, Endo K, Takada T, Yoshida F, Shibata Y, Matsumura A A clinical trial protocol for second line treatment of malignant brain tumors with BNCT at University of Tsukuba. Appl Radiat Isot. 査読有 69, 2011, 1819-1822 DOI:

10.1016/j.apradiso.2011.04.031

- ② Nakai K, Yamamoto T, Aiyama H, Takada T, Yoshida F, Kageji T, Kumada H, Isobe T, Endo K, Matsuda M, Tsurubuchi T, Shibata Y, Takano S, Mizumoto M, Tsuboi K, Matsumura A Boron neutron capture therapy combined with fractionated photon irradiation for glioblastoma: a recursive partitioning analysis of BNCT patients Appl Radiat Isot. 査読有 69, 2011, 1790-1792 DOI: 10.1016/j.apradiso.2011.03.049
- ③ Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Aburai K, Kawatobi S, Tsurubuchi T, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Okuno H, Matsumura A: Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT. Appl Radiat Isot 査読有、67. 2009、84-7
- ④ Tsurubuchi T, Yamamoto T, Nakai K, Zaboronok A, Yoshida F, Miyakawa M, Shirakawa M, Yamamoto Y, Matsuda M, Matsumura A. Intracellular uptake of a new boronated porphyrin EC032. Appl Radiat Isot. 査読有 67 2009 94-6

[学会発表] (計 10 件)

- ① Shirakawa M, Nakai K, Matsumura A Evaluation of liposome modified to Boron-lipopeptide for BNCT, Workshop “BNCT” DAAD project “research and development in BNCT and charged particle therapy” 2012/3/2 Mainz, Germany.
- ② Nakai K, Shirakawa M, Matsumura A, Matsumura A, Clinical Trial of BNCT in University Tsukuba, Workshop “High LET particle therapy” DAAD project “research and development in BNCT and charged particle therapy” 2012/3/1 Marburg Germany
- ③ Shirakawa M, Nakai K, Matsumura A Evaluation of liposome modified to Boron-lipopeptide for BNCT, Clinical Trial of BNCT in University Tsukuba Workshop “Modern particle Therapy” DAAD project “research and development in BNCT and charged particle therapy” 2012/2/2

- 8 Essen Germany
- ④ Nakai K, Shirakawa M, Matsumura A Clinical Trial of BNCT in University, Tsukuba Workshop “Modern particle Therapy” DAAD project “research and development in BNCT and charged particle therapy” 2012/2/28 Essen Germany
- ⑤ Shirakawa M, Nakai K, Yamamoto T, Yoshida F, Matsumura A evaluation of liosome modified to Boron-lipopeptide for BNCT 6 th young researchers BNCT meeting 2011/12/6 Taiwan
- ⑥ Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Yoshida F, Matsumura A et al, Development of a fuctional liposome modified a novel lipid analog for BNCT. 14th International congress on neutron capture therapy 2010. 10. 25 Buenos Aires, Argentina
- ⑦ Yoshida F, Nakai K, Yamamoto T, Matsumura A, et al Biodistribution of BSH-encapsulated boron liposome in mouse glioma. 14th International congress on neutron capture therapy, 2010. 10. 25 Buenos Aires, Argentina
- ⑧ 中井 啓, 山本哲哉, 松村 明 ほか、脳腫瘍に対する BNCT：筑波大学臨床研究の現況 第7回日本中性子捕捉療法学会学術集会 2010. 8. 5
- ⑨ Nakai K, Matsumura A et al clinical result and adjuvant therapy for glioblastoma with BNCT treated patients. Young Researchers BNCT meeting 2009/9/29 Mainz, Germany
- ⑩ Shirakawa M, Matsumura A et al Evaluation of a novel liposome modified membrane permeability peptide for BNCT. Young Researchers BNCT meeting 2009/9/29 Mainz, Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 明 (MATSUMURA AKIRA)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：20390379

(2) 研究分担者

山本 哲哉 (YAMAMOTO TETSUYA)

筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30375505

中井 啓 (NAKAI KEI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：50436284

吉田 文代 (YOSHIDA FUMIYO)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：30261811

(3) 連携研究者
なし