

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32206

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893226

研究課題名(和文)ホウ素含有型ナノデバイスによる腫瘍細胞選択的粒子線治療の基礎研究

研究課題名(英文) Study of radiotherapy to selectively treat only malignant tumor cells with nano particle including boron

研究代表者

白川 真 (Shirakawa, Makoto)

国際医療福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：40707759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000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、膜透過性ペプチド(TAT)に着目し、細胞内への高濃度ホウ素デリバリーが可能なキャリアーを新たに開発した。既に開発に成功したホウ素含有ペプチド脂質類似体を用いてリポソームを調製し、その物性および細胞内導入能、中性子線照射による殺細胞効果の評価を行った。

本リポソームは約100nmに調製することが可能であり、TATの細胞内導入能により、腫瘍細胞内への高濃度ホウ素導入に成功した。そこで、腫瘍細胞へ本リポソームを投与し、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に殺細胞効果を示し、生存率は1%以下となった。

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 membrane permeability peptide (TAT) and developed the new carrier that is able to deliver the high concentration boron in the tumor cell. We prepared liposome using the boron peptide lipid analog which already succeeded in development. And the liposome were evaluated the physical property or ability of introduction into cell or cytotoxicity reaction by neutron irradiation.

The liposome which prepared at approximately 100nm succeeded in the introduction of high concentration boron into tumor cell by TAT peptide analog. So, we administered the liposome to tumor cell, and irradiated neutron beam. As a result, the liposome significantly showed cytotoxicity reaction in comparison with each control group. And the survival rate of tumor cell became less than 1%.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ホウ素中性子補足療法 リポソーム

### 1. 研究開始当初の背景

現在、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(BNCT)が注目されている。すでに、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、浸潤性の腫瘍を根治するには至っていない。

その原因として二つの要素が考えられる。一つは中性子線の組織深達度が強くないため、体表から数センチで減弱してしまうこと。二つ目は、ホウ素薬剤の性能にある。比較的エネルギーの低い熱中性子線 (<0.53 eV) とホウ素 ( $^{10}\text{B}$ ) との反応で得られる線とリチウム核 ( $^7\text{Li}$ ) を利用する BNCT では、悪性腫瘍細胞に取り込まれた  $^{10}\text{B}$  化合物の濃度が重要である。(Fig.1)

BNCT に理想的なホウ素薬剤として具体的には次の条件が挙げられる。

- (1) 悪性腫瘍におけるホウ素濃度が 30 ppm 以上であること。
- (2) 腫瘍 / 正常組織および腫瘍 / 血液の濃度比が 3 - 4 以上であること。
- (3) 中性子線照射時までの間の血液中や正常組織からの速い除去率と腫瘍組織における高い滞留性。

そこで、我々はドラッグデリバリーシステム(DDS)を利用して、上記条件をすべて満たす新規ホウ素薬剤の開発を行っている。

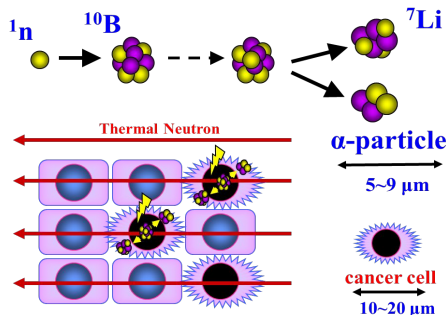


Fig.1) Principle of BNCT  
 $^{10}\text{B} + ^1_0\text{n}(\text{中性子}) \rightarrow ^7_3\text{Li} + \alpha\text{線} + 2.79\text{MeV}$

### 2. 研究の目的

悪性腫瘍治療のための BNCT に必要な薬剤開発を目的とした模索を行う。

現在、試験的に用いられている薬剤による BNCT では、臨床経過をみると、腫瘍組織に十分な中性子線量を照射していても再発を認めるケースがある。これは細胞レベルでの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と示唆されている。この問題点を解決するためには、新規薬剤の開発が必要であり、効果的な BNCT を実現するための手法として、本研究では DDS を利用する。

つまり、本研究の主な目的は、腫瘍細胞内に高い  $^{10}\text{B}$  濃度を達成しうる高機能ナノデバイスの開発である。

### 3. 研究の方法

本研究では BNCT における薬剤開発において合成に成功した新規ペプチド脂質類似体 (B5-TAT-lipopeptide) を用いる。

B5-TAT-lipopeptide は、HIV(人免疫不全ウイルス)の逆転写酵素由来のペプチド TAT とホウ素含有アミノ酸である BPA をアミド結合させたペプチド脂質類似体である。(Fig.2)

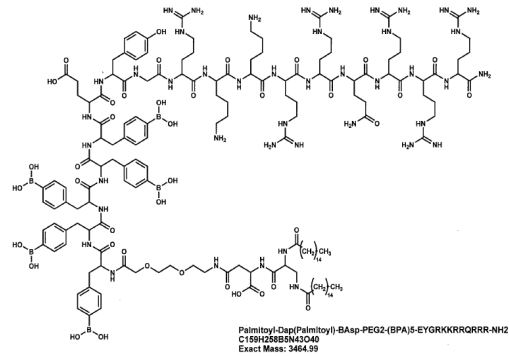


Fig.2) Structure of the B5-TAT-lipopeptide conjugated to the HIV-TAT peptide, p-boronophenylalanine (BPA) and phospholipid analog.

- (1) B5-TAT-lipopeptide を用いた、ペプチド修飾リポソームを作製し、物性評価を行う。

粒子径の測定  
 ゼータ電位の測定  
 内水相の容積の測定

- (2) 模索した粒子設計により、最適化され、調製したリポソームを用いて、CT26 細胞(マウス大腸癌由来細胞)に投与し、その細胞内取り込みを評価するとともに、正常細胞への影響を検討する。

- (3) CT26 細胞に B5-TAT-lipopeptide 修飾リポソームを投与後 2 時間において、中性子線照射を行い、殺細胞効果を評価する。

### 4. 研究成果

- (1) BPA5-TAT-lipopeptide を各組成比で調製したリポソームを用いて、物性評価を行った。(Table.1)

	DSPC	Cholesterol	DSPE-PEG2000	Bn-TAT-peptide
Plain liposome	50	50	-	-
PEG-liposome	47	47	6	-
B5-TAT5% PEG-liposome	45	45	5	5
B5-TAT10% PEG-liposome	42.5	42.5	5	10

Table.1) composition of B5-TAT-lipopeptide modified liposome. (molar ratio)

#### 粒子径

EPR 効果(Enhanced Permiability Retention effect)を最もよく得ることのできる粒子径 100nm のリポソームを調製することに成功した。

動的光散乱法(DLS)による測定および透過型電子顕微鏡(TEM)による観察により確認を行った。(Table.2 , Fig.3)

### ゼータ電位

エンドサイトーシスによるリポソームの細胞内導入が期待できるカチオン性を示した。カチオン性ペプチドである TAT の修飾率増加に相関してゼータ電位が増加したことより、B5-TAT-lipopeptide が脂質膜上に存在することを確認した。

(Table.2)

	Particle size (um, u/G2)	Zeta potential (mV)
Plain liposome	147	-4
PEG liposome	143	-15
B5-TAT-lipopeptide 5% liposome	105.9	21
B5-TAT-lipopeptide 10% liposome	147.8	26.4

Table.2) Physicochemical property of functionalized liposome.



Fig.3) Electron micrographs of the B5-TAT lipopeptide liposome after extrusion through a polycarbonate membrane with a 100 nm pour size.

### 内水相の容積

B5-TAT-lipopeptide 5% liposome と、その内水相に BSH を封入したリポソームを用いて、ホウ素の細胞内導入を測定した。その結果、細胞内ホウ素濃度が上昇したことから、B5-TAT-lipopeptide 5% liposome の内水相に化合物の封入が可能であることが示された。

(Fig.5)

### (2) 培養細胞へのホウ素導入効果

B5-TAT-lipopeptide 修飾リポソーム投与におけるホウ素濃度は  $4.5\mu\text{g}^{10}\text{B}/1\times 10^6$  cells、さらに BSH 内封 B5-TAT-lipopeptide 修飾リポソーム投与におけるホウ素濃度は  $11\mu\text{g}^{10}\text{B}/1\times 10^6$  cells のホウ素集積効果を示した。また、Plain リポソームおよび BSH 溶液の in vitro におけるホウ素集積効果は base line レベルであった。(Fig.4)

既存の BNCT 薬剤である BSH と比較して、B5-TAT-lipopeptide 修飾リポソームは、高いホウ素移行能を持つことが示された。

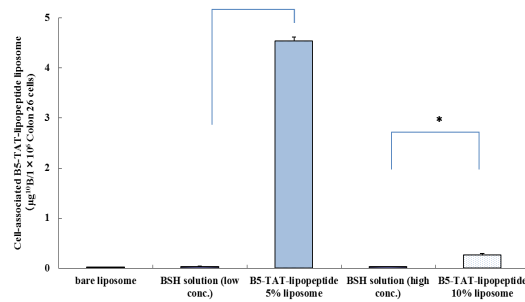


Fig.4) Efficiency cell affinity of functionalized liposome. Boron concentration of boron compounds that is added to cell is BSH solution (low conc.) equal B5-TAT-lipopeptide 5% liposome and BSH solution (high conc.) equal B5-TAT-lipopeptide 10% liposome. \*P<0.05

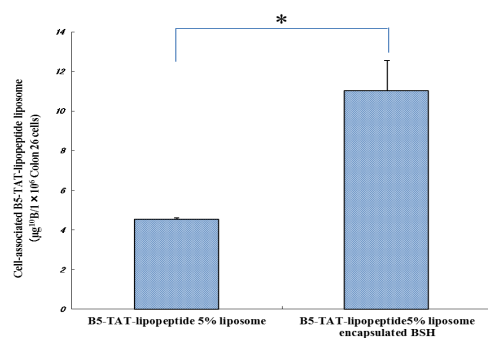


Fig.5) Efficiency cell affinity of B5-TAT-lipopeptide liposome encapsulated BSH. \*P<0.05

### (3) 中性子線照射による殺細胞効果 (in vitro)

B5-TAT-lipopeptide 修飾リポソームの殺細胞効果を CT26 細胞への中性子線照射により検討した。検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

結果、B5-TAT-lipopeptide 修飾リポソームは各コントロール群に対し有意に殺細胞効果を示した。B5-TAT-lipopeptide 修飾リポソーム投与後 45 分間 (9.6Gy) の照射により CT26 細胞の生存率は 1%以下となった。(Fig.6)

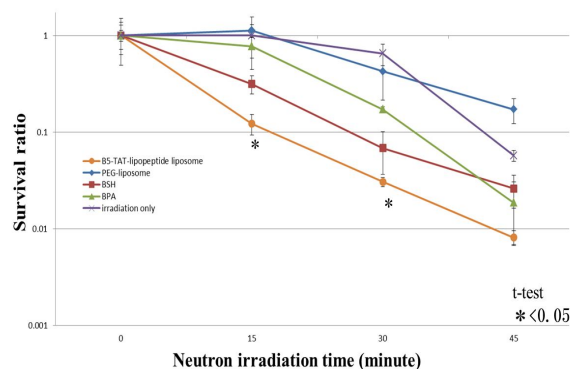


Fig.6) Cytotoxicity reaction of B5-TAT-lipopeptide modified liposome with thermal neutron irradiation.

The CT26 cells were irradiated with 2.8Gy for 15minute, 7.0Gy for 30minute and 9.6Gy for 45minute.Data are represented as ratio of control. Each assay was done in five (mean  $\pm$  S.D.).

\*P<0.05 (PEG-liposome, BSH, BPA, irradiation only vs. B5-TAT-lipopeptide liposome)

## 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 1 件)

Makoto Shirakawa, Kei Nakai, Fumiyo Yoshida, A. Zoboronok, Tetsuya Yamamoto, Akira Matsumura. : "Evaluation of boron content liposome modified protein-transduction domains for boron neutron capture therapy." International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering: 査読有: Volume 4, Issue 9, pp74-79.(2014)

Website: www.ijetae.com (ISSN 2250-2459, ISO 9001:2008 Certified Journal, Volume 4, Issue 9, September 2014)

[学会発表](計 5 件)

伊藤隆宏, 佐藤美里, 白川真: 悪性腫瘍に対する抗がん剤封入新規リポソームの評価、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25-28 日、神戸学院大学(兵庫県神戸市)

白川真: ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) 応用を見据えた腫瘍親和性ペプチド修飾リポソームの開発、第 4 回国際医療福祉大学学会学術大会、2014 年 8 月 30-31 日、国際医療福祉大学(栃木県大田原市)

白川真, 中井啓, 山本哲哉, 吉田文代, Alexander Zaboronok, 山本陽平, 岡本英未子, 松村 明: PEG 化ホウ素化合物による中性子捕捉療法、第 10 回日本中性子捕捉療法学会、2013 年 9 月 7-8 日、岡山大学(岡山県倉敷市)

Makoto Shirakawa, Kei Nakai, Tetsuya Yamamoto, Fumiyo Yoshida, Yohei Yamamoto, Akira Matsumura "Synthesis of boron compound for liposomal Boron Delivery System.": 7th young researcher's Boron Neutron Capture Therapy, 2013.9. 22-26(Granada, Spain)

白川真: ドラッグデリバリーシステムを利用した抗がん剤内封ナノ粒子の開発研究、第 3 回国際医療福祉大学学会学術大会、2013 年 8 月 30-31 日、国際医療福祉大学(栃木県大田原市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

白川 真 (SHIRAKAWA MAKOTO)

国際医療福祉大学 薬学部 助教

研究者番号: 40707759

[研究成果報告書(概要、英文)]

As a low invasive treatment for the malignant tumors, boron neutron capture therapy is featured. This study focused on membrane permeability peptide (TAT) and developed the new carrier that is able to deliver the high concentration boron in the tumor cell.

We prepared liposome using the boron peptide lipid analog which already succeeded in development. And the liposome were evaluated the physical property or ability of introduction into cell or cytotoxicity reaction by neutron irradiation.

The liposome which prepared at approximately 100nm succeeded in the introduction of high concentration boron into tumor cell by TAT peptide analog. So, we administered the liposome to tumor cell, and irradiated neutron beam. As a result, the liposome significantly showed cytotoxicity reaction in comparison with each control group. And the survival rate of tumor cell became less than 1%.

[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、膜透過性ペプチド(HIV-TAT)に着目し、細胞内への高濃度ホウ素デリバリーが可能なキャリアーを新たに開発した。

既に開発に成功したホウ素含有ペプチド脂質類似体(B5-TAT-lipopeptide)を用いてリポソームを調製し、その物性および細胞導入能、中性子線照射による殺細胞効果の評価を行った。

本リポソームは約 100nm に調製することが可能であり、HIV-TAT の細胞内導入能により、腫瘍細胞内への高濃度ホウ素導入に成功した。そこで、腫瘍細胞に本リポソームを投与し、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に殺細胞効果を示し、その生存率は 1%以下となった。