

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07256

研究課題名(和文)次世代BNCTに適応した安全・高効率なマルチ機能型ホウ素ナノ製剤の開発と検証

研究課題名(英文)Development and Validation of Safe and Efficient Multi-functional Boron Nanoformulation for Next-generation BNCT

研究代表者

松本 孔貴(Matsumoto, Yoshitaka)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70510395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法で使用されるBPA-f複合体はアミノ酸トランスポーターによって腫瘍内に優先的に取り込まれるが、アンチポート機構により腫瘍内での保持が制限される。我々は、シアル酸を標的としたホウ素製剤として、フェニルボロン酸(PBA)を修飾した高分子ナノ粒子(PBA-NP)を採用した。PBAは中性子捕獲能力とがん細胞ターゲティング能力の2つの機能を発揮でき、PBA-NPはポリ乳酸とPEGのセグメントで構成されるコアとシェルからなる超分子構造を有する。PBA-NPはBPA-fの100倍の低用量でも、効率的な腫瘍ターゲティングにより、強力な抗腫瘍効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在臨床のBNCTで用いるホウ素製剤であるステボロニン(BPAとソルビトールとの複合体)は、集積する癌種が制限されること、アンチポート機構による腫瘍からのクリアランスが早いことなどが課題として挙げられている。今回開発および効果を検証したPBA-NPは、ステボロニンとは異なる癌細胞選択的機序機能を有しており、これまでBNCT適応外とされた癌種や患者に対して、BNCTを提供できる可能性を有する。また、血中および腫瘍内への滞留性が優れることから、ステボロニンのような照射前から照射中に渡る連続的な薬剤投与は不要となり、薬剤投与の簡便化と安全性の向上に資すると考える。

研究成果の概要(英文)：BPA-f complexes used in boron neutron capture therapy are preferentially taken up in tumors by amino acid transporters, but their retention in tumors is limited by anti-port mechanisms. We employed phenylboronic acid (PBA)-modified polymeric nanoparticles (PBA-NPs) as a sialic acid-targeted boron formulation. The PBA can exhibit dual functionalities, i.e., PBA exhibiting a neutron capture capacity and hypersialyated cancer cell targeting effect. Our developed Nano possesses a supramolecular structure composed of a core and shell comprised of poly(lactic acid) (PLA) and poly(ethylene glycol) (PEG) segments, respectively. The PBA moiety is installed at the PEG end, providing an unusually strong targeting effect, supposedly via multivalent binding onto the cancer cell membrane. As in BNCT, we verified the feasibility of PBA-NP against a B16 melanoma-bearing mouse model. The PBA-NP achieved a potent antitumor effect even at a 100-fold lower dose than BPA-f.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法(BNCT) ホウ素製剤 フェニルボロン酸(PBA) シアル酸 ナノ粒子 DDS 超分子構造

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

既存のホウ素薬剤である BPA および BSH が臨床利用されて約 30 年以上経つが、依然としてこれに代わる次世代のホウ素薬剤は市場に出していない。理由として、原子炉に依存した中性子線源による実験環境の不足と DDS 技術における欠点が上げられ、研究代表者らも体験してきた。BNCT 領域と DDS 領域の専門家として密に研究論議を交わし、本研究にて開発・検証予定のマルチ機能型ホウ素ナノ粒子がこれまでの課題を打破し、次世代加速器型 BNCT の発展への寄与が可能であると考え、基礎的データ構築が必要との着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、キレート部位を有する新しい高分子を合成し、ボロン酸などの環状エステル形成に伴う安定なホウ素含有ナノ粒子にイメージング能と活性酸素除去能を創り込み、高効率で副作用の無いマルチ機能型 BNCT 用ナノ粒子(Multi-functional boron nano-particle : M-BNP)の設計と加速器 BNCT による生物学的検証を行い、上記の問いに対する 1 つの理想解として次世代 BNCT に適した安全かつ高効率なホウ素薬剤を提示する。

また、このような「新規中性子線源の開発」および「DDS 技術の進歩」を臨床レベルに応用させるには、高エネルギーを有する次世代型 BNCT の治療効果、これまでの適応以外のがん種への治療効果、現在臨床で使用されている BPA を凌ぐ腫瘍集積性と治療効果(Compound Biological Effectiveness Factor : CBE), を裏付ける生物学的検討が必要不可欠であることから、上記を明らかとする実験計画を遂行する。

3. 研究の方法

(1) ポリマーの合成と特性評価

本研究で使用したポリマーの合成スキームとプロトコルを補足図 S1 に示す。コントロールポリマーである MeO-PEGb-PLA は、アルコキッド開始剤を MeO-PEG-OH から調製したこと以外は、同様に合成し、続いて DL ラクチドをアニオン重合し、ローダミン B イソチオシアネートで末端を共役させた。¹H 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、JNM ECS 400 NMR スペクトロメーターを用いて、テトラメチルシラン (TMS) 含有 (1%, vol/vol) クロロホルム-d を用いて得られた。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の測定は、屈折率検出器を備えた TOSO HLC-8120 GPC システムを用いて行った。溶離液としてトリエチルアミン含有 (5%, vol/vol) THF を用い、40 で 0.35mL/min の流速で測定した。

(2) ナノ粒子の調製

MeO-PEGb-PLA (コントロールポリマー)、PBA ピナコルエステル-PEG-b-PLA (脱保護前)、PBA-PEG-b-PLA (脱保護後) から、それぞれ NanoMeO、NanoPBA-I、NanoPBA-II を調製した。いずれのナノ粒子も、前述の各ポリマーを DMF (200mg/mL) に溶解し、これを同量の Milli-Q 水で希釈した後、Milli-Q 水に対する透析で精製することにより調製した。透析液は 12 時間ごとに新鮮な Milli-Q 水と交換し、3 日間放置した。透析後、精製したナノ粒子溶液の少量のアリコート凍結乾燥した。透析後、精製されたナノ粒子溶液の少量のアリコートを凍結乾燥し、重量を測定して結果の濃度を決定した。最後に、精製したナノ粒子溶液をさらに濃縮した D-PBS 溶液に加えて、生理的塩分濃度 (150mM NaCl) および中性 pH (7.4) を有する所望の最終ポリマー濃度を得た。

(3) DLS および SPR 技術を用いたナノ粒子の特性評価

ナノ粒子の動的光散乱 (DLS) 測定は、Zetasizer Nano ZS を用いて行った。すべての DLS 測定は、後方散乱角 173°, ポリマー濃度 2 mg/mL で実施した。表面プラズモン共鳴 (SPR) の測定は、Biacore 3000 バイオセンサーを用いて行った。CMP-Neu5Ac は、標準的なアミンカップリング法により CM5 センサーチップに固定化された。CM5 チップの表面は、HEPES 緩衝生理食塩水 (HBS) 中で NHS と EDC を 7 分間塗布することで活性化された。次に、活性化した CM5 センサーチップに、CMP-Neu5Ac を 20mg/mL の濃度で、NaHCO₃ 緩衝液 (0.1M, pH8.4) 中で 5 分間固定化した。最後に、Neu5Ac を固定化した CM5 チップを、NaHCO₃ 緩衝液 (0.1M, pH8.4) 中で 40 mg/mL の濃度のウシ血清アルブミン (BSA) で 10 分間ブロックした。対照面として、BSA を単独で固定化したものを基準チャンネルに使用した。流速は固定化、分析、再生の間、5 μ L/min に維持した。

(4) CLSM による膜の局在化と細胞の内在化の観察

細胞 (6x10⁴ 細胞/プレート) を 35mm ガラスベースディッシュにプレーティングし、一晩インキュベートした後、最終濃度 4mg/mL のローダミン標識ナノ粒子と混合した。C-Apochromat 63x オイル対物レンズと、560nm のロングパス発光フィルターを備えた 555nm のダイオードレーザーを搭載した Zeiss LSM 700 を用いて、細胞のタイムコース共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) 観察を行った。

(5) B16メラノーマ担持マウスモデルの準備と取り扱い

C57BL6/j (雌, 4週齢) マウスを購入した。全てのマウスは、筑波大学実験動物資源センターの飼育環境(14時間/10時間の明暗サイクル, 日中の5時から19時の間に200Lxの照明, 23.5 ± 2.5 の温度, $52.5 \pm 12.5\%$ の湿度)で7日間順応させた。その後、マウスの毛を右後脚の背側で剃った。翌日、イソフルラン麻酔(空气中2-2.5%)下で、B16-F10細胞(10^7 cells/mL, $50 \mu\text{L}$ /マウス)を右大腿部に皮下接種した。腫瘍を7日間成長させた後、無作為化して対照群と実験群に分けた。腫瘍の体積(V)は、以下の式を用いて推定した。

$$V = a \times b^2 / 2$$

ここで、aおよびbはそれぞれ、ノギスで測定した腫瘍の長軸と短軸である。照射日(0日)の全マウスの平均腫瘍体積は約 80 mm^3 であり、これを初期腫瘍体積(V_0)とした。皮下注射はすべて首の背側に27ゲージの針付き注射器を用いて行った。すべての動物実験は、提出された動物実験計画書(承認番号: 18-190 および 19-199)に基づいて行われ、筑波大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

(9) 薬物動態

B16メラノーマを有するマウスに、生理食塩水、BPA-f、NanoPBA-I、NanoPBA-IIを皮下注射した。注射後の所定の時間に、イソフルラン麻酔(空气中2-2.5%イソフルラン)下で心臓を穿刺してマウスを犠牲にした。血液サンプルは、ヘパリンを塗布した針と注射器を用いて採取した。肺、肝臓、胃、脾臓、小腸、大腸、皮膚、腎臓、脳、腫瘍は適宜採取した。すべてのサンプルは、採取後すぐに湿潤重量を測定した。これらのサンプルを硝酸と過酸化水素(最終濃度はそれぞれ40%と5%w/v)に加え、95℃で2時間加熱し、さらに室温で一晩インキュベートして完全な消化を誘導した。消化されたサンプルを孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のシリンジフィルターでろ過した後、ICP-MSを用いて測定した。

(10) B16メラノーマモデルに対する BNCT

前述のように、筑波大学実験動物資源センターでB16メラノーマ搭載マウスを用意した。その後、マウスを京都大学放射線核医学総合研究所に輸送した。生理食塩水、BPA-f、NanoPBA-I、NanoPBA-IIを皮下注射した。生理食塩水(2時間)、BPA-f(2時間)、NanoPBA-I(24時間)、NanoPBA-II(24時間)、NanoPBA-I(48時間)、NanoPBA-II(48時間)の計6群を用意した。括弧内の時間は、注射から照射までの時間間隔を表す。マウスは、尾部と大腿部をオートクレーブテープで固定して、特注のアクリル製ホルダーに入れた。そのホルダーをアクリル板の穴の周りにマジックテープで固定した。そのアクリル板を、中性子を遮蔽する ${}^6\text{LiF}$ (${}^6\text{Li}$ 濃縮度96%)を40wt%含む厚さ5mmの熱可塑性プラスチック板に固定した。アクリル板と熱可塑性プラスチック板の中央には丸い穴が開いており、マウスの右大腿部をこの穴の上に伸ばして露出させ、そこから腫瘍に中性子を60分間、平均 $3.44 \pm 0.22 \times 10^{12}$ neutrons/cm² ($n = 6$)照射した。

(11) ナノ粒子の安定性

ナノ粒子の安定性は、オプションの拡散測定ソフトウェアパッケージを搭載したFV1000D共焦点顕微鏡を用いた蛍光相関分光法(FCS)の測定によって決定した。カバーガラス(No.1S, 0.16-0.19 mm厚)上に20 μL のローダミン6Gまたはローダミン標識試料を置き、水浸対物レンズ(60x, 1.2 NA, Olympus)を用いて559nmのレーザーで励起した後、2 $\mu\text{s}/\text{pixel}$ の速度で連続的にポイントスキャンを行った。得られた信号は複数の時間区間(65ms/区間)に分割され、明らかなノイズを含むいくつかの時間区間はさらなる分析から除外された。その後、残余の時間区間を個別に自己相関曲線に変換し、その自己相関曲線を平均化して1つの自己相関曲線とし、キュムラントフィッティングを行って拡散係数を推定した。FCS測定のキャリブレーションには、ローダミン6G標準液(280 $\mu\text{m}^2/\text{s}$)を用いて、構造因子と対応する共焦点ボリュームを決定した。FCS測定で試料を分析した後、同じ試料を蛍光顕微鏡で観察し、血清中の凝集を検出した。再構成されたマウスの血液中のナノ粒子の凝集は、以下の手順で確認した。まず、抗凝固剤としてEDTAを用いて、マウスの心臓を穿刺して全血を採取した。全血中のEDTAの最終濃度は50mMであった。採取した全血を500 $\times g$ で5分間遠心分離し、沈殿物中の赤血球を回収した後、PBSで10倍に希釈した。次に、別のマウスから、抗凝固剤を使用せずに心臓穿刺で全血を採取した。採取した全血を直ちに1000 $\times g$ で10分間遠心分離し、血栓を形成させた。その上澄み液から、抗凝固剤および凝固因子を含まない血清を採取した。最後に、マウス赤血球(10倍希釈)、マウス血清、ナノ粒子をPBSで1:8:1(vol/vol/vol)の割合で混合し、37℃で所定の時間インキュベートした後、蛍光顕微鏡で観察した。

(12) 腫瘍切片における核トラックの検出

B16メラノーマを有するマウスにナノ粒子を皮下注射し、イソフルラン麻酔下(大気中2-2.5%イソフルラン)で注射後2時間(BPA-f)、24時間(NanoPBA-IおよびNanoPBA-II)、48時間(NanoPBA-IおよびNanoPBA-II)で腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は、TISSUE TEK OCT compoundを入れたクライオモールドに浸した後、イソペンタン/ドライアイスバスを用いてスナップフリーズした。凍結したブロックをCM1950クライオスタットを用いて6 μm の厚さで複数のクライオセクションにスライスした。次に、連続したクライオセクションを別々に2つの異なる

る表面に置いた。すなわち、先行するクライオセクションを BARYOTRAK CR-39 固体核検出器の上に置き、クライオセクションをスライドガラスの上に置いた。CR-39 固体核検出器を埋め込んだクライオセクションは、さらなる処理を行うまで -80 °C で保存し、その後、熱中性子の照射を行った。腫瘍内の 10 B 濃度は BPA-f とナノ粒子間で有意に異なっていたため（それぞれ c.a. 10 ppm および 0.4-0.9 ppm）、濃度差を妥協して腫瘍内の位置を直接比較するために、ナノ粒子群は BPA-f 群と比較して 20 倍の総中性子フルエンスで照射した。その後、照射したクライオセクションをセルスクレーパーと水道水を用いて CR-39 表面から穏やかに除去し、水酸化カリウム、エタノール、Milli-Q 水（それぞれ 15wt%, 80vol%, 20vol%）を含む溶液を用いて CR-39 表面をエッチング処理し、50 で 8 分間インキュベートしました。その後、エッチングした切片を BZ-X710 顕微鏡の位相差モードで観察し、ピットを可視化した。このピットは、熱中性子照射によって核分裂を起こした 10 B の位置を示している。スライドガラスに置いたクライオセクションは、スライス直後にサイトセッタースプレーをかけて固定し、その後、ヘマトキシリン・エオジン（H&E）で染色した。なお、スライドガラスに置かれた H&E 染色切片は、形態を保持するために放射線を照射していないことに留意されたい。H&E で染色したクライオセクションは、BZ-X710 顕微鏡の明視野モードで観察した。ピット（CR-39）と H&E で染色したクライオセクション（スライドガラス）から得られた画像を Photoshop ソフトウェア（Adobe, CA, US）を用いて合成した。ピットを含む層を、H&E を含む層の上に配置した。

(13) 組織学的評価

マウスに BNCT を投与してから 48 時間後に、イソフルラン：IPA 1：4（vol/vol）の混合液を用いて、イソフルラン麻酔下で腫瘍を採取した。固定した腫瘍をエタノール、クロロホルム、パラフィンに順次包埋し（64 °C）、その後常温に冷却して腫瘍包埋パラフィンブロックを作製し、ミクロトームを用いて 3 μm の厚さにスライスした後、MAS コートスライドガラスにマウントした。パラフィン切片は脱パラフィン、再水和後、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。

(14) ナノ粒子の in vitro 細胞毒性

細胞（ $4 \times 10^3 - 10^4$ cells/well、倍加時間に応じて適切に調整）を 96 ウェルプレートにプレATINGし、一晚インキュベートした後、ナノ粒子と混合し、さらに 48 時間インキュベートした。その後、各ウェルを PBS で 3 回注意深く洗浄し、続いて 10%（vol/vol）のセルカウティングキット-8 を含む新鮮な培地を保持するために使用した。その後、2 時間インキュベートし、Varioskan Flash マルチモードリーダーを用いて 450nm で吸光度値を読み取った。ブランク培地から得られた平均吸光度をバックグラウンド値とし、PBS treated 細胞から得られた平均吸光度を 100%細胞生存率とした。

4. 研究成果

(1) ナノ粒子の調製と in vitro での特性評価

MeO-PEG-b-PLA から Nano MeO（以下、「Nano」はナノ粒子を表す）を調製することができた。また、PBA ピナコルエステル-PEG-b-PLA から、ピナコル部分の脱保護処理前（I）と処理後（II）に、NanoPBA-I と NanoPBA-II を調製した。ナノ粒子の流体力学的直径は 40~100nm の範囲にあり、粒度分布はかなり狭いものであった。最も長い PLA 鎖を持つポリマーが最も小さなナノ粒子を生成し、その逆もまた同様であった。意外なことに、NanoPBA-I の PBA 部分はピナコルエステルでブロックされていたが、NanoPBA-I は NANA と強い親和性と安定した結合を示し、ナノ粒子の注入に反応してシグナルが急速に上昇してプラトーに達し（ $t = 50$ 秒）、注入を終了した後も（ $t = 230$ 秒）安定して維持された。この結果は、NanoPBA-I が精製後も完全に機能する PBA 部位を有していることを示している。おそらく、ピナコルエステルの保護は水に不安定であるため、すでに脱保護されていると考えられる。精製過程でピナコルエステルが脱保護されていることは、NanoPBA-I の時系列の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルから確認できた。適切ながんモデルを選択するために、いくつかのがん細胞株を総シアル酸アッセイで定量した。これまでの報告と同様に、MDA-MB-231（ヒト乳がん細胞株）と B16-F10（マウスメラノーマ細胞株）は、その表面にシアル酸を過剰に発現しているように見えた。特に、B16-F10 は、BAOEC（初代ウシ大動脈内皮細胞）に比べて 20 倍以上高いシアル酸レベルを示したことから、B16-F10 を選択して、さらに実証的な生物学的評価を行った。NanoPBA-I と NanoPBA-II は、インキュベーション後 5 分以内に、B16-F10 と MDA-MB-231 の細胞膜に局在することができたが、BAOEC の細胞膜には両ナノ粒子が局在しなかった。逆に、細胞の種類にかかわらず、ナノ MeO は細胞膜に局在しなかった。さらに、B16-F10 細胞において、PBA 部位が NanoPBA-I の細胞内への取り込みを著しく促進し、12 時間のインキュベーションで BPA-f の約 3.5 倍の細胞内への取り込みが見られたことを示している。NanoPBA-II は、NanoPBA-I よりもはるかに低い内在化レベルを示したが、それでも BPA-f よりも優れていた。さらに、L-アミノ酸トランスポーター-1（LAT-1）阻害剤（トリヨードチロニン）やシアル酸切断酵素（ノイラミニダーゼ）との共作により、BPA-f と NanoPBA の B16-F10 細胞への細胞内封入の上昇は、それぞれ LAT-1 とシアル酸によって媒介されることが確認された。

(2) ナノ粒子の薬物動態

本研究では、腫瘍への選択的な蓄積が主要な関心事であるため、腫瘍におけるナノ粒子の薬物動

態が重要である。B16 メラノーマを有するマウスに BPA-f またはナノ粒子を皮下注射し、血液、腫瘍、正常臓器中の ^{10}B 濃度を時間依存的に定量化した。なお、NanoPBA-I および NanoPBA-II は、BPA-f ($24 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{kg}$) に比べて 100 分の 1 の低用量 ($0.24 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{kg}$) で生体内投与に適用されたが、これは低濃度でのナノ粒子の実現性を示すために意図的に行ったものではなく、ナノ粒子がすでに最大溶解濃度に達していたために必然的に行ったものである。これは、ポリマー中のホウ素の担持量が 0.65 個/ポリマーと非常に少ないためである。また、 ^{10}B を含まない化合物を使用したため、ポリマー中のホウ素は、天然の同位体組成である 20%の ^{10}B と 80%の ^{11}B で構成されていた。必然的に、 $0.24 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{kg}$ がナノ粒子のほぼ最高用量となった。血中および腫瘍中の BPA-f は、注射後 1 時間でプラトーに達し (血中 3.9ppm, 腫瘍中 15.7ppm), その後急速に減少した。したがって、BPA-f は、低分子化合物の典型的なクリアランスプロファイルに従っていると考えられた。さらに、BPA-f の場合、血中と腫瘍中の ^{10}B 濃度には、時間に関係なく高い相関関係 (Pearson's correlation value = 0.824) が認められた。これは、よく知られている推測、すなわち、アンチポート機構により、血中の BPA-f 濃度が腫瘍中の BPA-f 濃度に直接的かつ即座に影響を与えるという推測と一致する。BPA-f とは対照的に、NanoPBA-I は血中でのクリアランスが非常に弱く、投与量の差があるにもかかわらず、注射後 12 時間の血中 ^{10}B 濃度は NanoPBA-I 群の方が BPA-f 群よりも高かったという。NanoPBA-I とは対照的に、NanoPBA-II は血中から速やかに消失したため、少なくとも投与後 48 時間までは、NanoPBA-I よりも ^{10}B 濃度が 10 倍低かった。腫瘍中の ^{10}B 濃度は、「NanoPBA-I」と「NanoPBA-II」が BPA-f よりも高い値を示さなかったことを除いて、血液中の ^{10}B 濃度と同様の傾向を示した。正常臓器では、初期投与量に有意な差があったため、BPA-f 群はナノ粒子群に比べて注入後の早い時点で ^{10}B レベルが著しく高かった。その後、ナノ粒子のクリアランスが減少したため、BPA-f 群とナノ粒子群との差は小さくなった。BPA-f 群とナノ粒子群の差は徐々に縮まった。注目すべきは、脾臓と腸において、ナノ粒子群は BPA-f 群と同程度か、さらに高い ^{10}B レベルを示したことである (注射後の後期時点)。マウスの脾臓と腸でシアル酸の発現レベルが上昇していることを考慮すると、これは妥当な結果である。

(3) BNCT での腫瘍成長プロファイルと体重変化

照射後のマウスの腫瘍成長プロファイルを図 1 に示す。低分子化合物とは異なり、ナノ粒子は徐々に代謝されるため、最大の殺腫瘍効果を得るためには、照射のタイミングを適切に調整する必要がある。そこで、薬物動態データに基づいて、BPA-f 群には注射後 2 時間に照射し、NanoPBA-I 群および NanoPBA-II 群では注射後 24 時間または 48 時間に照射した。投与量が大きく異なるにもかかわらず、「NanoPBA-I」($0.24 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{kg}$) は、100 倍量の BPA-f ($24 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{kg}$) と同等の抗腫瘍効果を示したが、同等量の BPA-f ($0.24 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{kg}$) では、腫瘍量の減少はわずかであった。NanoPBA-I の場合、有意な差はなかったものの、注射後 24 時間の照射では、注射後 48 時間の照射よりもわずかに高い抗腫瘍効果が得られた。一方、NanoPBA-II の場合は、照射のタイミングに関わらず、腫瘍の体積に顕著な変化は見られなかった。照射後 48 時間目に採取した腫瘍の組織像も、NanoPBA-I と NanoPBA-II の対照的な効果を裏付けるものであった。核が歪んだり縮んだりするような損傷は、NanoPBA-I 群でのみ観察された。さらに、中性子線を照射していない対照実験では、これらのナノ粒子を注入しても、腫瘍の体積に知覚できるような変化は起こらないことが明らかになった。また、マウスの体重変化は、照射群では照射直後にのみある程度の変動が見られたが、非照射対照群では明らかな体重の減少が見られなかったことから、ナノ粒子が全身毒性を発揮していないことが示唆された。ナノ粒子の *in vitro* での細胞毒性は、 $7.8 \text{ mg}/\text{mL}$ までは無視できると思われた。

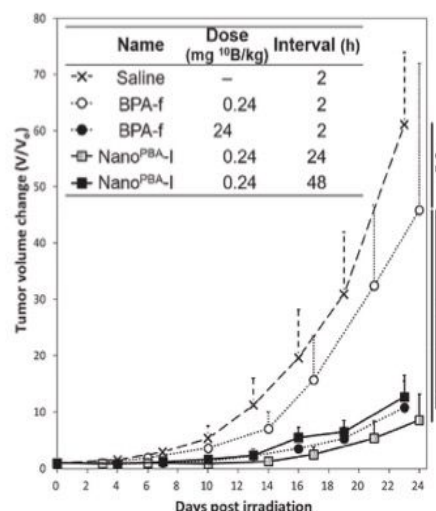


Figure 1 antitumor effect after BNCT using NanoPBA-I and BPA-f.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松本孔貴, 金雅寛, 鈴木実, 福光延吉, 櫻井英幸	4. 巻 72
2. 論文標題 シアル酸過剰発現腫瘍に対して優れたBNCT治療効果を発揮するフェニルボロン酸修飾高分子ナノ粒子の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 230 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Vares Guillaume, Jallet Vincent, Matsumoto Yoshitaka, Rentier Cedric, Takayama Kentaro, Sasaki Toshio, Hayashi Yoshio, Kumada Hiroaki, Sugawara Hirotaka	4. 巻 27
2. 論文標題 Functionalized mesoporous silica nanoparticles for innovative boron-neutron capture therapy of resistant cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 102195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nano.2020.102195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka Keiichi, Matsumoto Yoshitaka, Ishikawa Hitoshi, Fukumitsu Nobuyoshi, Numajiri Haruko, Murofushi Keiko, Oshiro Yoshiko, Okumura Toshiyuki, Satoh Toyomi, Sakurai Hideyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Impact of RhoA overexpression on clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma treated with concurrent chemoradiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 221 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrz093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Yoshitaka, Furusawa Yoshiya, Aoki-nakano Mizuho, Matsufuji Naruhiro, Hirayama Ryoichi, Kanai Tatsuaki, Ando Koichi, Sakurai Hideyuki	4. 巻 183
2. 論文標題 ESTIMATION OF RBE VALUES FOR CARBON-ION BEAMS IN THE WIDE DOSE RANGE USING MULTICELLULAR SPHEROIDS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 45 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rpd/ncy269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Yoshitaka, Ando Koichi, Kato Takamitsu A, Sekino Yuta, Ishikawa Hitoshi, Sakae Takeji, Tsuboi Koji, Sakurai Hideyuki	4. 巻 183
2. 論文標題 DIFFERENCE IN DEGREE OF SUB-LETHAL DAMAGE RECOVERY BETWEEN CLINICAL PROTON BEAMS AND X-RAYS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 93 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rpd/ncy270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Furusawa Yoshiya, Matsumoto Yoshitaka, Hirayama Ryoichi, Ohsawa Daisuke, Konishi Teruaki	4. 巻 183
2. 論文標題 DOSE-RATE AND CELL-KILLING SENSITIVITY OF HIGH-LINEAR ENERGY TRANSFER ION BEAM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 219 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rpd/ncy267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Yoshitaka	4. 巻 68
2. 論文標題 Metastasis of Cancer from the viewpoint of radiation therapy?Anti-Metastatic Effects of High LET Particle Beam?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RADIOISOTOPES	6. 最初と最後の頁 731 ~ 740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3769/radioisotopes.68.731	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kumada Hiroaki, Takada Kenta, Naito Fujio, Kurihara Toshikazu, Sugimura Takashi, Matsumoto Yoshitaka, Sakurai Hideyuki, Matsumura Akira, Sakae Takeji	4. 巻 2160
2. 論文標題 Beam performance of the iBNCT as a compact linac-based BNCT neutron source developed by University of Tsukuba	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AIP Conference Proceedings	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5127705	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Yoshitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Relative Biological Effectiveness and Fractionation of Proton-Beam Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proton Beam Radiotherapy: Physics and Biology	6. 最初と最後の頁 209 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-7454-8_16	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshitaka Matsumoto, Yoshiya Furusawa, Mizuho Aoki-Nakano, Naruhiro Matsufuji, Ryoichi Hirayama, Tatsuaki Kanai, Koichi Ando and Hideyuki Sakurai	4. 巻 183
2. 論文標題 Estimation of RBE values for carbon-ion beams in the wide dose range using multicellular spheroids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 45-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rpd/ncy269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshitaka Matsumoto, Koichi Ando, Takamitsu A Kato, Yuta Sekino, Hitoshi Ishikawa, Takeji Sakae, Koji Tsuboi and Hideyuki Sakurai	4. 巻 183
2. 論文標題 Difference in degree of sub-lethal damage recovery between clinical proton beams and X-rays	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 93-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rpd/ncy270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshitaka Matsumoto, Yoshiya Furusawa, Akiko Uzawa, Ryoichi Hirayama, Sachiko Koike, Koichi Ando, Koji Tsuboi and Hideyuki Sakurai	4. 巻 190
2. 論文標題 Antimetastatic effects of carbon-ion beams on malignant melanomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 412-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RR15075.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaharu Sato, Yoshitaka Matsumoto, et al	4. 巻 1
2. 論文標題 Commissioning status of the linac for the iBNCT project	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 LINAC2018 Proceedings	6. 最初と最後の頁 174-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18429/JACoW-LINAC2018-MOP0082	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 杉村高志、池上清、帯名崇、久保田親、栗原俊一、小林仁、佐藤将春、柴田崇統、高木昭、高崎栄一、内藤富士雄、南茂今朝雄、方志高、福井祐治、福田将史、二ツ川健太、本田洋介、三浦太一、宮島司、熊田博明、田中進、名倉信明、松本孔貴、大場俊幸、小林 武、堀利彦、矢部 伸浩、山口 晃典、櫻山久志、豊島寿一、吉沢寿夫、長谷川和男
2. 発表標題 iBNCT 加速器の現状報告 2019
3. 学会等名 16th Annual Meeting of Particle Accelerator Society of Japan
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松本孔貴、菅原裕、関野雄太、福光延吉、石川仁、櫻井英幸
2. 発表標題 温水還流加温と比較して、低出力温熱治療 (オンコサーミア) は効率的な殺細胞効果と放射線増感効果を示す
3. 学会等名 第22回癌治療増感研究シンポジウム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松本孔貴
2. 発表標題 最新の粒子線治療との相乗効果を目指したマテリアル開発
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2020 医工連携から社会実装・スタートアップへ (招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsumoto, Kim Ahram, Nobuyoshi Fukumitsu, Minoru Suzuki, Yukio Nagasaki and Hideyuki Sakurai
2. 発表標題 In vivo evaluation of a phenylboronic acid-installed, activity targeted novel BNCT agent against B16 melanoma-bearing mouse model
3. 学会等名 3rd NTU-UT Radiation Oncology Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsumoto
2. 発表標題 Dose rate effect ~from classical low dose rate effect to Flash therapy~
3. 学会等名 Hitachi Users Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsumoto
2. 発表標題 Non-clinical trial of iBNCT
3. 学会等名 Seminar of Boron Neutron Capture Therapy in Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松本孔貴、林淳子、関野雄太、福光延吉、斎藤高、石川仁、櫻井英幸
2. 発表標題 温水還流加温と比較して、低出力温熱治療（オンコサーミア）は効率的な殺細胞効果と放射線増感効果を示す
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第36回大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松本孔貴
2. 発表標題 第5回臨床家にも理解る放射線生物学～温熱はどうしてがん治療に有効なのか？～
3. 学会等名 第7回つくば放射線治療を学ぼう会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsumoto, Kim Ahram, Minoru Suzuki, Nobuyoshi Fukumitsu, Yukio Nagasaki and Hideyuki Sakurai
2. 発表標題 Evaluation of phenylboronic acid-installed polymeric nanoparticle as an actively targeted BNCT agent against a syngeneic melanoma model
3. 学会等名 第22回癌治療増感研究シンポジウム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松本孔貴、金雅覽、福光延吉、鈴木実、長崎幸夫、櫻井英幸
2. 発表標題 B16メラノーマ担持マウスモデルを用いたフェニルボロン酸修飾シアル酸ターゲティング新規BNCT剤の評価
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsumoto, Kim Ahram, Nobuyoshi Fukumitsu, Minoru Suzuki, Yukio Nagasaki and Hideyuki Sakurai
2. 発表標題 Evaluation of a phenylboronic acid-decorated, sialic acid-targeting novel BNCT agent against B16 melanoma-bearing mouse mode
3. 学会等名 The 10th Young Researchers BNCT Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsumoto, Kenjiro Hattori, Hidetoshi Arima, Keiichi Motoyama, Taishi Higashi, Nobuyoshi Fukumitsu, Teruhito Aihara, Hitoshi Ishikawa, Hiroaki Kumada and Hideyuki Sakurai
2. 発表標題 Folate-modified cyclodextrin improved the active tumor accumulation of BSH and showed a strong therapeutic effect of BNCT
3. 学会等名 PTCOG 58 Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshitaka MATSUMOTO, Yoshiya FURUSAWA, Huizi LI, Ryoichi HIRAYAMA, Akiko UZAWA, Koichi ANDO, Shin-ichiro MASUNAGA, Koji TSUBOI and Hideyuki SAKURAI
2. 発表標題 The effect of uneven fractionation using high LET carbon-ion beams for tumor metastatic abilities
3. 学会等名 ISIT2018 International Symposium on Ion Therapy 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本孔貴, 斎藤高, 関野雄太, 石川仁, 榮武二, 坪井康次, 櫻井英幸
2. 発表標題 陽子線治療と抗がん剤の併用効果の検証～従来法と新規イメージングシステムの比較～
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第31回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshitaka MATSUMOTO, Kenjiro HATTORI, Hidetoshi ARIMA, Keiichi MOTOYAMA, Taishi AZUMA, Hitoshi ISHIKAWA, Nobuyoshi FUKUMITSU, Teruhito AIHARA, Hiroaki, KUMADA, Koji TSUBOI and Hideyuki SAKURAI
2. 発表標題 Folate-modified cyclodextrin improves the intratumoral accumulation of existing boron compounds.
3. 学会等名 ICNCT18 18th International Congress on Neutron Capture Therapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsumoto, Koichi Ando, Takamitsu A Kato, Yuta Sekino, Takeji Sakae, Koji Tsuboi and Hideyuki Sakurai
2. 発表標題 Difference in SLDR and DNA damage repair after split-irradiation with proton beams and X-rays.
3. 学会等名 PTCOG 57 Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本孔貴
2. 発表標題 第5回臨床家にも理解の放射線生物学～温熱はどうしてがん治療に有効なのか?～
3. 学会等名 第7回つくば放射線治療を学ぼう会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本孔貴, 林淳子, 関野雄太, 福光延吉, 斎藤高, 石川仁, 櫻井英幸
2. 発表標題 新規温熱治療オンコサーミアと放射線の併用による抗腫瘍効果
3. 学会等名 第47回放射線による制癌シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本孔貴, 古澤佳也, 平山亮一, 鶴澤玲子, 増永慎一郎, 安藤興一, 榮武二, 石川仁, 坪井康次, 櫻井英幸
2. 発表標題 放射線の生物効果における量と質と線量投与時期-細胞致死と転移抑制から-
3. 学会等名 第21回 癌治療増感研究シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaharu Sato, Yoshitaka Matsumoto, et al
2. 発表標題 Commissioning status of the linac for the iBNCT project
3. 学会等名 29th Linear Accelerator Conference-LINAC18 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 重松直之、高仲強、中村直樹、金本彩恵、阿部英輔、石川一樹、利安隆史、浅利崇生、高橋渉、川村麻里子、梅澤玲、中嶋綾、安藤謙、白井克幸、林真也、相部則博、角美奈子、長谷川正俊、有賀久哲、芳賀昭弘、黒河千恵、小澤修一、中村光宏、平田秀成、佐藤浩央、平山亮一、吉田由香里、松本孔貴、岩田宏満	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社 学研メディカル秀潤社	5. 総ページ数 209
3. 書名 やさしくわかる放射線治療学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長崎 幸夫 (Nagasaki Yukio) (90198309)	筑波大学・数理物質系・教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------