

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 4 月 27 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010 年度 ～ 2011 年度

課題番号：22791229

研究課題名（和文） 新規皮膚透過性メラノーマ標的化ボロン送達システムを用いた中性子捕捉療法の開発

研究課題名（英文） Hyaluronan-Conjugated nanoparticles as carrier of sodium borocaptate for tumor targeting in boron neutron capture therapy

研究代表者 笠岡 敏 (SATOSHI KASAOKA)

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号：90338690

研究成果の概要（和文）：

メラノーマに対するボロン中性子捕捉療法に用いるボロン製剤の調製を行った。リポソームとミセルの各種ボロン製剤はヒアルロン酸と結合しており、治療に十分なホウ素含量を有していた。また、各種ヒアルロン酸製剤は高い安定性を有する一方、極めて低い細胞毒性であることがわかった。また、全てのヒアルロン酸製剤がメラノーマ細胞内に能動的に取り込まれ、中性子照射によって高い抗腫瘍効果を得られることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a strategy for targeting sodium borocaptate in melanoma boron neutron capture therapy. The boron-retention capacity of boron formulations was very high. All borocaptate-loaded nanoparticles had no cytotoxic effects. Hyaluronan-Conjugated nanoparticles readily bound to melanoma cells, and were internalized by receptor-mediated endocytosis. Thermal neutron irradiation yielded tumor growth suppression on B16F10 murine melanoma and COLO679 human melanoma with the Hyaluronan-Conjugated nanoparticles.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 22 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 23 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線化学

キーワード：BNCT メラノーマ DDS ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の放射線治療研究では、線量をマクロの腫瘍に集中する技術開発に大きな努力を傾注し、3次元X線集光照射や重

粒子の利用などで、大きな成果を収めた。これをさらに発展させるためには、線量を腫瘍細胞レベルで選択的に集中することが望ましい。その一つに、ボロン中性

子捕捉療法 (BNCT) が挙げられる。しかし、 ^{10}B と反応する低速の中性子自身を制御し、ある領域に集中させることは極めて困難である。従って、BNCT の成否はボロン化合物が、選択的に腫瘍組織や腫瘍細胞に集積するかにかかってくる。近年、リポソームを用いた経皮 DDS の研究が急速に発展している。従来、リポソームのような粒子は、強固なバリアー能を持つ角質層を透過することは非常に困難であった。しかし、調製時にエタノールを 40% 程度含有するリポソーム製剤「エソソーム」などの開発によって、角質層自体の透過性の亢進、リポソーム膜の可塑性の向上等の複合的な効果によって、効果的な皮膚透過製剤として注目されている。

また、Han らは、薬物の受動的経皮拡散ではなく、能動的経皮拡散を目的としたイオントフォレーシスをリポソームに応用することで、リポソームの透過性を大幅に亢進させている。

さらに、BNCT において、ボロン化合物は腫瘍細胞内に取り込まれることが理想であるが、腫瘍標的性を高めるために、多くの腫瘍に高発現している CD44 に対するヒアルロン酸の高い親和性が注目されている。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの DDS を再構築し、新規の複合型皮膚透過性メラノーマ標的化ボロン送達システムを用いた BNCT を開発する。つまり、①ヒアルロン酸結合型ボロン化合物封入ナノパーティクル (リポソーム及びミセル) による CD44 を介した腫瘍標的性と皮膚透過性亢進、②エレクトロポレーションによる皮膚透過性亢進、③ヒアルロン酸の負電荷を利用したイオントフォレーシスによる皮膚透過性亢進、この 3 つのストラテジーを併用することで、従来にないメラノーマ BNCT を開発する。

3. 研究の方法

(1) ヒアルロン酸結合型ボロン化合物封入リポソームの調製とその物性評価

BSH を内相に封入したトランスファーリポソームを逆相蒸発法で調製した。調製したリポソームの粒子径、ヒアルロン酸結合量、ボロン封入量をそれぞれ、光散乱法、ELISA 法、ICP-AES 法で測定した。

(2) ヒアルロン酸結合型ボロン化合物封入リポソームのメラノーマ細胞への取り込み

CD44 が高発現しているヒトメラノーマ COL0679 細胞への新規エソソームの取り込み効率を ICP-AES 法を用いてボロン濃度を測定することで検討した。ここで、CD44 を介したリポソームは取り込まれた後の細胞内挙動が全く不明だったので、リポソーム内にカルボキシフルオレセインを添加し、細胞内挙動の検討を蛍光顕微鏡によって行った。

(3) ヒアルロン酸結合型ボロン化合物封入リポソームによる BNCT の検討

京大原子炉において、メラノーマ細胞と各種ボロンリポソームを 37°C でインキュベートした後に、任意の中性子量を照射し、7-10 日後にコロニー形成試験によって、その効果を検討した。

(4) ヒアルロン酸-ボロン化合物ミセルの調製とその物性評価

皮膚透過型の担体としては、リポソームの他に粒子径・粘度・電荷をコントロールしやすい自己会合型ミセルも候補担体として検討する必要がある。そこでボロン化合物として BSH を使い、ヒアルロン酸に架橋剤を介して直接結合する方法を考案した。しかし、従来のヒアルロン酸のカルボキシル基を活性化エステルとし、架橋剤を介して BSH を結合する方法では、ヒアルロン酸受容体への親和性を損ねる可能性があった。そこで、ヒアルロン酸 TBA 塩を調製した後に、N-アセチルグルコサミンの 6 位の水酸基特異的にエステル結合し、架橋剤を介して BSH を結合させる方法によって、目的のポリマーまたはミセルを結合した。ポリマー、またはミセルの形成は架橋剤と BSH の疎水性に大きく依存するので、架橋剤を適宜選択して、ミセル形成の有無についてはビレンの励起波長 333nm と 337nm における蛍光強度を測定することによって確認した。

(5) 低分子ヒアルロン酸を用いたボロン担体の調製

近年、低分子ヒアルロン酸によって、CD44 などヒアルロン酸受容体への親和性、または皮膚透過性が変化することが徐々に明らかとなっている。そこで、ミセルのシェル部分に低分子 (MW: 3000~5000) のヒアルロン酸を結合したボロン担体の調製を行い、メラノーマ細胞への取り込み量の変化を ICP-AES によって評価した。

(6) ヒアルロン酸-ボロン化合物ミセルのメラノーマ細胞への取り込み

ヒアルロン酸に直接ローダミン B をレーザー量結合させた蛍光修飾ヒアルロン酸を調製し、これに同様の方法で BSH を結合させた。

(7) ヒアルロン酸-ボロン化合物ミセルによる BNCT の検討

京大原子炉において、メラノーマ細胞とヒアルロン酸-ボロン化合物結合体を37°Cでインキュベートした後に、任意の中性子量を照射し、7-10日後にコロニー形成試験によって、その効果を検討した。

4. 研究成果

皮膚透過DDSに利用できるボロン担体の調製及び、その特性化を行った。ボロン担体の候補として、ヒアルロン酸を膜表面に結合させたリポソームを逆相蒸発法で調製した。ボロン化合物としてBSHとBPAの二種を検討したが、BPAについては十分なホウ素量を確保することができず、BSHを用いて調製することとした。調製方法は、ヒアルロン酸をEDCとNHSで活性化エステルとし、リポソームの場合はDSPEと反応後、ミセル移行法で膜表面に包埋させた。ボロン含有量はリポソームでいずれの場合も2,500~3,000 ppm程度であり、粒子径は115±24 nmであった。いずれの担体もメラノーマ細胞内への特異的な取り込みが確認でき、ヒアルロン酸結合リポソーム (HA-Ls) を用いて、京大原子炉においてコロニー形成アッセイによるBNCT効果の検討を行った結果、BSH溶液群、PEGリポソーム群よりも有意に高い抗腫瘍効果を得ることができた (Fig. 1)。

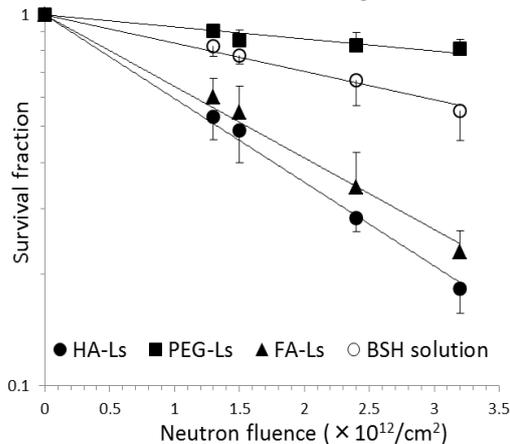


Fig.1. Suppression of the colony formation of B16F10 cells after in vitro BNCT. Values are means±S.D.

次に、ヒアルロン酸を高分子シェルに有し、コアの部分にボロン化合物を用いた高分子ミセル (Hyaluronan-BSH Nanoparticles : HBNPs (Fig. 5)) について検討を行った。これらはリポソームの欠点、つまりサイジングを行ったものでも粒子径が100nmを超えるので、サイズが大きいものは皮膚透過性が極めて低下しやすいという問題を解決する手段として採用した。また、ヒアルロン酸をホウ素の支持担体として用いるだけでなく、CD44を

介した能動的取り込みにも同時に活用する製剤として設計した。調製方法はヒアルロン酸を EDC と NHS で活性化エステルとし、N-(2-aminoethyl)maleimide を架橋剤として BSH と化学結合させたものを水とさせることで、ミセルを形成させた。しかし、このヒアルロン酸のカルボキシル基を介する結合方法では、ボロン担体を結合度が上昇することにより、その結合部位が CD44 との結合部位と相関があるため逆に CD44 への親和性が低下する欠点が生じた。そこで、ヒアルロン酸のカルボキシル基ではなく受容体結合に影響が軽微なヒドロキシル基に注目し、その結合を行った。BSH のチオール基とヒアルロン酸のヒドロキシル基に対するヘテロ架橋剤である N-Succinimidyl 6-Maleimidobenzoate によってそのナノパーティクルを調製した結果、ボロン含有量は1,600ppm程度を示し、BNCT に用いることができる含量を確保できた。またヒアルロン酸の繰り返し単位あたりの BSH 結合率は 0.3 を超え、ヒアルロン酸-ボロン結合体はピレンを用いた c.m.c. の測定を行うと 0.61 mg/mL と集合体を形成しており、平均粒子径は 158.4 nm であった (Fig. 2)。

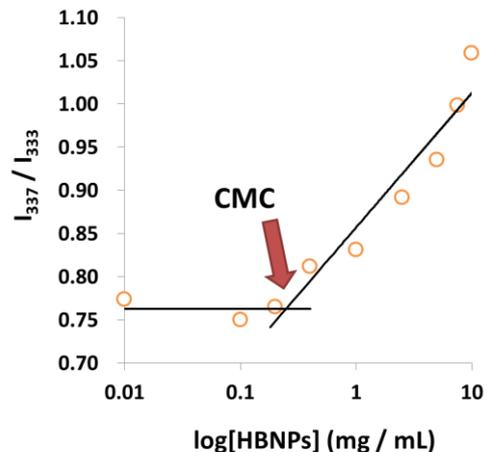


Fig.2. The determination of the CMC from the fluorescence intensity ratio I_{337}/I_{333} from excitation spectra vs. log concentration of the HBNPs (pH 7.4).

このナノパーティクルの安定性を検討すると、pH7.4、4°Cの保存状況では90%以上のボロンが保持されており、37°Cにおいても、72時間で90%以上の保持効率を示し、安定性が確認された (Fig. 3)。

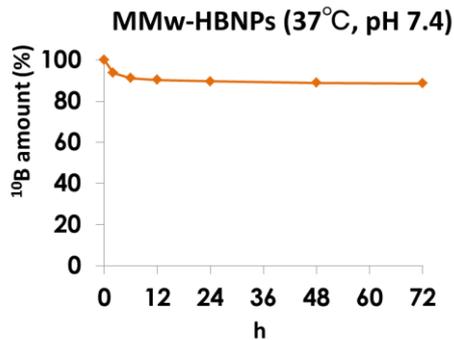


Fig.3. Percent entrapped of ¹⁰B in HBPNs after incubation with pH 7.4 HEPES buffer at 37°C.

また、ヒト皮膚繊維芽細胞への毒性試験の結果から、ボロン濃度として50 ppm以下の実験条件では正常細胞への毒性は認められなかった (Fig. 4)。

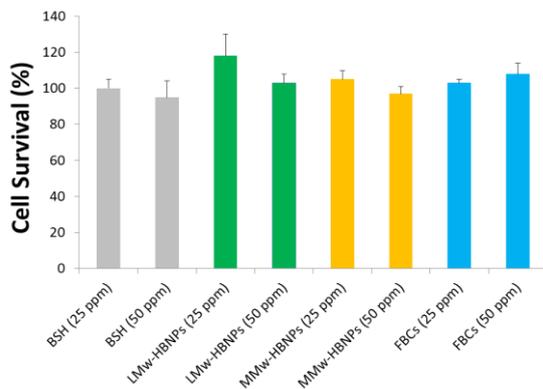


Fig.4. Cell viability of HBPNs, BSH solution and Folate-BSH conjugates in human fibroblast cells after four 48 hours of treatment.

このナノパーティクルにローダミンを結合させることで、メラノーマ細胞内への高い取り込みが確認でき、この二種の担体を用いて、京大原子炉においてコロニー形成アッセイによるBNCT効果の検討を行った結果、BSH溶液群、葉酸結合体群よりも有意に高い抗腫瘍効果を得ることができた (Fig. 6, 7)。

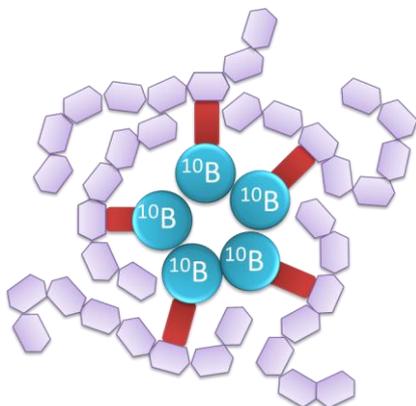


Fig.5. Schematic illustration of the HBPNs.

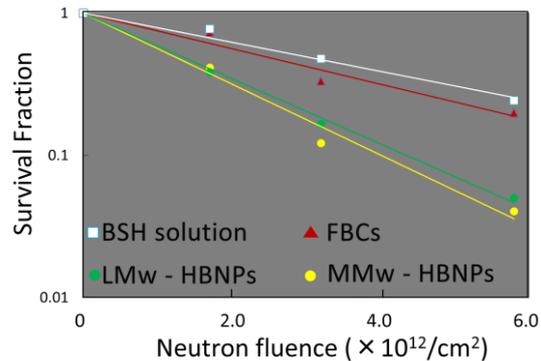


Fig.6. Suppression of the colony formation of B16F10 cells after in vitro BNCT. Values are means±S.D.

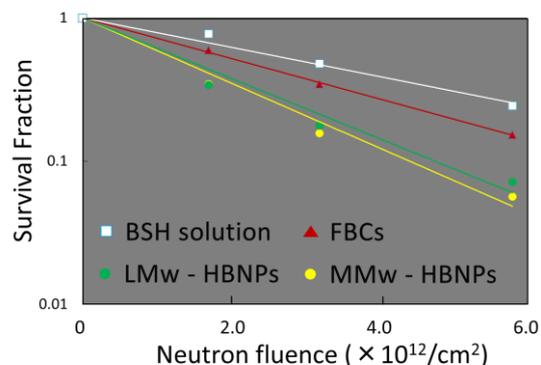


Fig.7. Suppression of the colony formation of COLO679 cells after in vitro BNCT. Values are means±S.D.

この結果で興味深いことは、低分子 (MW:3,000~5,000 kDa) のヒアルロン酸を用いた LMw-HBPNs は研究当初の予想として、単体では CD44 への親和性が低いことから、BNCT の効果が低下するものと考えていた。さらに、低分子ヒアルロン酸は単体では CD44 と結合するものの、それに引き続いてクラスター化を伴うエンドサイトーシスが起きにくいことも予想していた。しかし、結果として低分子ヒアルロン酸でも、MW80,000kDa のヒアルロン酸を用いた場合と同等の殺細胞効果が認められた。これは、低分子ヒアルロン酸がミセルを形成することにより、全体として高分子様の巨大粒子となり、その CD44 への親和性、細胞内取り込み能が維持されたためであると思われる (Fig. 5)。調製時において、低分子ヒアルロン酸は粘度の低さから扱いが容易で、皮膚透過能も高いことが予想されるので、今後、低分子ヒアルロン酸についても開発を行う。現在、調製した各種ヒアルロン酸製剤を用いて、皮膚透過性などの検討を行っており、これらを用いて、メラノーマ三次元皮膚モデルに対する BNCT 効果の検討を

行う予定である。

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 1 件)

Miyata S, Kawabata S, Hiramatsu R, Doi A, Ikeda N, Yamashita T, Kuroiwa T, Kasaoka S, Maruyama K, Miyatake S.

Computed tomography imaging of transferrin targeting liposomes encapsulating both boron and iodine contrast agents by convection-enhanced delivery to F98 rat glioma for boron neutron capture therapy.

Neurosurgery 査読有り、68巻、2011年1380-1387

DOI: 10.1227/NEU.0b013e31820b52aa

[学会発表] (計 3 件)

(1)大亀沙希子, 笠岡 敏, 中西莉沙, 小森麻央, 吉川 広之, 櫻井 良憲, 増永 慎一郎, 小野 公二

新規ヒアルロン酸結合型PEGリポソームを用いたがん化学療法及び中性子捕捉療法の開発

日本薬学会 2011年3月29日 静岡

(2)増田 健二, 笠岡 敏, 吉川 広之, 櫻井 良憲, 増永 慎一郎, 小野 公二

新規ヒアルロン酸-BSH コンジュゲートを用いたホウ素中性子捕捉療法の開発

中性子捕捉療法学会 2011年9月16日徳島

(3)増田 健二, 笠岡 敏, 吉川 広之, 櫻井 良憲, 増永 慎一郎, 小野 公二

ヒアルロン酸-ホウ素化合物結合体を用いたホウ素中性子捕捉療法の開発

日本薬学会 2012年3月31日 札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者 笠岡 敏 (SATOSHI KASAOKA)

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号: 90338690

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: