

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659639
 研究課題名（和文） 癌特異的原子抑制治療としてのインテリジェントガドリニウム中性子捕捉療法の開発
 研究課題名（英文） Development of Intelligent Gadolinium Neutron Capture Therapy as Cancer Specific Atomic Suppression Therapy
 研究代表者
 柳衛 宏宣 (YANAGIE HIRONOBU)
 東京大学・大学院工学系研究科・准教授
 研究者番号：30212278

研究成果の概要（和文）：

ガドリニウム封入弱アニオンリポソームの静脈投与を用いて Colon 26 大腸癌腫瘍に Gd を送達させ、熱中性子照射 ($5 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$) (GdNCT) を行い腫瘍増殖抑制効果を認めた。ガドテリドールを PEI/PEG-C の三元複合体に封入し、腫瘍内投与では、投与 2 時間後および 12 時間後の Gd 濃度は、Gd/PEI/PEG-C/JTS-1 では 21.9 ppm、12.3 ppm であり、投与 12 時間後では対照群に比較して約 2 倍の集積性を認めた。ガドテリドール存在下で X 線照射を行うと Gd:1.96 mg の条件では 29% 抑制を認めた。

研究成果の概要（英文）：

The Colon 26 tumour growth suppression was revealed in treated with gadolinium (Gd)-entrapped liposome with thermal neutron irradiation ($5 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$) (Gd Neutron Capture Therapy). We prepared Gd mixed complex consisted with polyethyleneimine (PEI), polyethylene glycol derivatives having carboxylic acid (PEG-C), and JTS-1 (fusogenic peptide), and the Gd concentration in 2 hours / 12 hours after intratumoral injection are 21.9 / 12.3 ppm. The concentration of Gd is two times higher compared with the control group. The cytotoxic effect was showed 29% suppression by 1.96-mg of Gadteridol with X ray irradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

 キーワード：(1) ガドリニウム化合物 (2) 中性子捕捉療法 (3) Drug delivery System
 (4) Liposome (5) 三元複合体 (6) PEG-C (7) JTS-1 (8) X線照射

1. 研究開始当初の背景

現在の癌治療は外科治療・化学療法・放射線療法・免疫療法など多種多彩な治療法が実施され、癌患者の治療成績は確実に向上しているが、未だ完全な癌克服法が見出されていないのが現状であり、社会復帰等の生活の質(QOL)改善には各種治療法を組合せる集学的

治療で効果を向上させることが求められている。

中性子捕捉療法 (Neutron Capture Therapy; NCT) は熱中性子線をボロン (^{10}B) 化合物あるいはガドリニウム (Gd) 化合物に照射することにより得られる重電荷粒子 (α 線, Li) あるいは電子線を使用する物理化学

的な癌治療法である。 α 線, Li核のエネルギー飛程は $10\mu\text{m}$ であり、癌細胞にボロン原子を選択的に集積させることができれば正常細胞に障害を与えず理論的には細胞単位での癌特異的治療が可能である。そのためには ^{10}B や Gd 化合物の癌細胞選択的そして高効率デリバリーシステムが必要不可欠である。副作用を軽減させるための投与量の低減および負担金額の軽減という問題を克服するために、腫瘍集積性向上を計るべく ^{10}B や Gd 化合物の DDS 製剤化研究が国内外で活発に展開されている。

中性子捕捉療法においては、ガドリニウム化合物に熱中性子あるいは熱外中性子を照射することにより生じる電子線により癌細胞障害を生じることがわかっている (GdNCT)。ガドリニウムは一般臨床において MRI の増感剤として使用されている化合物 である。中性子捕捉療法は熱外中性子の届く生体内約 7cm においては、その強力な殺細胞効果を生じるが、深部の癌になると急速にその効果を現弱してしまうのが問題点として提起されている。

現在までに、我々は、ボロンデリバリーシステムを開発し、癌細胞、腫瘍組織におけるボロン濃度を有効域まで増加させることに成功してきている。我々は、ボロン化合物を封入した封入抗 CEA イムノリポソームを CEA 産生性ヒト膵癌細胞と反応させ、BNCT を用いて選択的な腫瘍増殖抑制効果を認めた (Brit.J. Cancer 1991, 1997)。AFP 産生性ラット肝癌腫瘍への抗 AFP モノクローナル抗体-ボロン複合体の targeting を示した (Cancer Res & Clin. Oncol. 1994)。さらにリポソームの表面をポリエチレングリコールで修飾することにより、ステルスリポソームを作製し、BNCT を用いて腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた (J.Cancer Detec & Prev. 2000, Appl. Rad & Isotopes 2004, Biomedicine & pharmacotherapy 2006)。また、ボロン化合物として、新規ポリ酸ボロン化合物 ($^{10}\text{B}_{32}$) を合成し、日本原子力研究所の原子炉において熱中性子を照射し、ヒト膵臓癌細胞株 AsPC-1 に対して、細胞障害効果を認め $^{10}\text{B}_{32}$ は中性子捕捉効果を有することを確認した。さらに、新規のボロンデリバリーシステムとして BSH 封入 WOW エマルジョンを作成し、VX-2 腫瘍担癌ウサギモデルを用いて、BSH 封入 WOW エマルジョンを動脈投与後、腫瘍における集積性を日本原子力研究所の熱中性子照射設備を用いて中性子ラジオグラフィを施行して検討し、WOW エマルジョンを用いることにより腫瘍組織内に選択的にボロン原子を集積させることができることがわかり、ボロンデリバリーの有効なキャリアーであることを証明した (特許出願中, NIM-A 2009)。

これらのデリバリーシステムの開発と臨床経験に基づき投与経路と投与キャリアの選択を行うことにより癌種に対応したオーダーメイド的な Gd デリバリーシステムを構築できる。医用材料として、類似のポリマーが検討された例はなく、ボロンおよびガドリニウム中性子捕捉用キャリアーとさらには化学療法を併用しようとする試みはこれまで皆無であり、文字通り新規な治療法を切り開く挑戦的な研究となりえる。

日本では、主要な死因が感染症から生活習慣関連病へと移行する中で、癌は 1981 年以来日本人の死亡原因の第 1 位となり、2002 年の統計によれば癌による年間死亡者数は 29.5 万人を超え、総死亡の 30.7% となっている。この中で、放射線療法は、治癒後の患者の機能保存、QOL が良いことから高い評価を受けており、癌治療におけるその役割の重要性が増してきている。このような状況のもと NCT はこれまでの治療方法とは異なり、より強力な医工薬分野での連携による技術革新の余地が残されている。また、癌選択的な Gd デリバリーシステムを利用することにより Gd 化合物の核内移行を促進させ、中性子捕捉療法と X 線療法の効果を大きく改善させる可能性をもち、中性子捕捉療法を集学的癌治療のひとつとして確立・発展させるための基礎的知見を蓄積するが出来ると思われる。

2. 研究の目的

中性子捕捉療法 (Neutron Capture Therapy ; NCT) は熱中性子線をボロン (^{10}B) 化合物あるいはガドリニウム (Gd) 化合物に照射することにより得られる重電荷粒子 (α 線, Li) あるいは電子線を使用する物理化学的な癌治療法である。 α 線, Li核のエネルギー飛程は $10\mu\text{m}$ であり、癌細胞にボロン原子を選択的に集積させることができれば正常細胞に障害を与えず理論的には細胞単位での癌特異的治療が可能である。そのためには ^{10}B や Gd 化合物の癌細胞選択的そして高効率デリバリーシステムが必要不可欠である。現在、NCT は悪性脳腫瘍、悪性黒色腫、頭頸部癌に臨床試験が開始されており、我々は、難治性癌である多発性肝細胞癌、進行・再発乳癌および肺癌への適応拡大を目指している。

中性子捕捉療法においては、ガドリニウム化合物に熱中性子あるいは熱外中性子を照射することにより生じる電子線により癌細胞障害を生じる (GdNCT)。中性子捕捉療法は熱外中性子の届く生体内約 7cm においては、その強力な殺細胞効果を生じるが、深部の癌になると急速にその効果を現弱してしまうのが問題点として提起されている。

そこで、本研究では、中性子捕捉療法で使用するガドリニウム化合物が、X線にも励起される性質を応用し、X線照射により大量の反応活性種（ラジカル）を発生し腫瘍増殖抑制効果を生じることを検討し、腫瘍の浅部では中性子捕捉療法を、深部ではX線療法を併用できるガドリニウム封入デリバリーシステムを構築し、電子線を生じる中性子捕捉療法(GdNCT)とラジカルを生じるX線放射線療法を同時に誘導できる強力な抗癌放射線治療システムを開発するための基礎的知見、及び安全使用量を蓄積し、癌化学療法・免疫療法と併用できる高機能性集学的中性子捕捉療法の開発につなげることを目的とする。癌選択的なGdデリバリーシステムを構築することにより、癌細胞内にGdを送達でき、一般臨床で使用しているX線照射で殺癌細胞効果が証明できれば、通常のX線照射設備のあるところでは容易に治療計画を立てることができ、さらに病院併設型加速器を用いたNCT事業的にも世界へ発信できる研究となり得る。

3. 研究の方法

[平成23年度]

①糖鎖の種類、数、分子量、膜融合ペプチド(JTS-1 など)等の異なるタイプのSugar-PEG-Cを合成する。

②種々のSugar-PEG-Cやポリカチオンとの混合物において、三元複合体の得られたものについて、その調製条件と複合体組成、表面電位等との相関を調べる。

③Gd化合物三元複合体に細胞取込を増強する各種リガンドを組み込んだコンジュゲート体を各種培養癌細胞培地上清に添加し、細胞内への導入効率・細胞選択性などを検討する。この際マイクロ波試料前処理装置を使用し細胞溶解液を調製し、細胞内Gd濃度をICP-発光測定装置により定量する。

④in vitro 細胞取込実験で条件最適化後、取り込んだ細胞に対して中性子捕捉照射を実施し、MTS assay や Colony formation assay にて細胞障害性を検討する。本実験は茨城県東海村日本原子力研究開発機構 JRR-4 研究炉にて実施する。

⑤Gd封入リポソームを用いて、担癌マウスにおける腫瘍内Gd濃度を高めたうえで、熱中性子を照射し、中性子捕捉反応において癌細胞障害効果・腫瘍増殖抑制効果を誘導できることを確認する。また、三元複合体を用いたGdデリバリーシステムのin vitro 癌細胞への中性子照射効果を確認後、担癌マウスを用いた動物実験で同様に中性子照射実験を行い、腫瘍へのGd原子の集積の確認、腫瘍増殖抑制効果の検討を行い、臨床試験にむけた基礎データの取得を行う。

⑥Gd複合体を取り込んだ細胞に対してX線照射を実施し、MTS assay や Colony formation assay にて細胞障害性を検討する。本実験は東京大学大学院にて実施する。さらに担癌マウスを用いた動物実験で同様にX線照射実験を行い、腫瘍へのGd原子の集積の確認、腫瘍増殖抑制効果の検討を行い、臨床試験にむけた基礎データの取得を行う。

[平成24年度]

①各種の担癌マウスを用いた動物実験での中性子およびX線照射による癌抑制作用の検討を実施し、高分子設計、複合体調製に再びフィードバックし、癌選択的なGd中性子捕捉療法(GdNCT)とX線両方を同時併用できる強力な抗癌治療システムを開発するための基礎的知見を蓄積し、近い未来に高効率な癌治療システムの開発につなげる。

4. 研究成果

我々は中性子捕捉療法を基盤とする新規の化学放射線療法を推進しているが、従来の放射線治療において用いられているX線量を軽減させた形で同当の効力を引き出す治療法、すなわち、(1) 金属原子にX線を照射することにより発生する電子線を用いて直接癌細胞を障害させる治療法、(2) 生じた光粒子を用いて光線力学的治療(PDT)にて間接的に癌細胞を障害させる治療法、との併用効果についても検討している。

(1) ガドリニウム封入リポソームを用いたGdNCTによる腫瘍蔵書kう抑制効果：

ナノレベルでのデリバリーシステムを用いてガドリニウム中性子捕捉療法(GdNCT)の抗腫瘍効果を検討した。我々は、静脈投与による全身投与にてガドリニウムを腫瘍部位まで送達するために、血管内皮と容易に結合しない表面電荷が弱アニオンリポソーム(サイズ：100nm~200nm)にGd化合物を封入させ、Colon 26マウス大腸癌腫瘍にリポソームを送達させることに成功した。動物用MRIを用いてGd封入リポソーム投与後2時間においてGdの腫瘍集積性を見出した。同時間のGd水溶液の静脈投与においては、集積は認めなかった。この条件下で京都大学原子炉実験所にて熱中性子照射($5 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$)を行い腫瘍増殖抑制効果を認めた。腫瘍組織は、著明な線維化をきたしていた。

(2) 三元複合体を用いたデリバリーシステムの検討:

① 非ウイルスベクターとして合成ポリマーを用いた遺伝子キャリアを開発した経験より、プラスミド DNA やプラチナ抗癌剤をポリエチレンイミン(PEI)に反応させ、さらに血中滞留性と分散性を格段に上昇させるためカルボキシル基結合ポリエチレングリコール(PEG-C)と反応させ、細胞内送達を可能にするキャリアを開発した。さらに膜融合タンパク JTS-1を加えることにより、エンドゾームからの消化を防ぎ、細胞質への送達効率を増加させた。Xgal 染色およびリンフェラーゼ反応により、プラスミド DNA/PEI 担体よりも、プラスミド DNA/ PEI /PEG-C /JTS-1 の遺伝子発現量の増加を認めた。

② カルボキシル基結合ポリエチレングリコール(PEG-C)を基盤とした多元複合体ポリマーに、モリブデン化合物(PM-8)を封入し、腫瘍内注入した場合、PM-8 化合物そのものを局所注射するよりも Mo 濃度の優位な貯留性を認めた。

③ カルボキシル基結合ポリエチレングリコール(PEG-C)を基盤とした多元複合体ポリマーに金属化合物を封入し送達できることに基づき、ガドリドールを PEI/PEG-C の三元複合体に封入し、腫瘍内送達能を検証した。作成した三元複合体のサイズは、約 120nm で均一であった。腫瘍内投与の場合、投与 2 時間後および 12 時間後の Gd 濃度は、それぞれ Gd/PEI では 53.7ppm、22.5ppm、Gd/PEI/PEG-C/JTS-1 では 21.9ppm、12.3ppm、Gd 溶液では 17.4ppm、6.8ppm であり、投与 2 時間後 Gd/PEI では Gd 溶液投与に比較して約 3 倍の集積性を認めた。静脈投与では投与 2 時間後および 12 時間後における Gd 濃度は、それぞれ Gd/PEI では 4.0ppm、1.2ppm、Gd/PEI/PEG-C/JTS-1 では 9.8ppm、2.7ppm、Gd 溶液では 1.1ppm、0.0ppm であり、投与 2 時間後 Gd/PEI では Gd 溶液投与に比較して約 4 倍の集積性が認められた。LacZ 染色を用いて Gd/PEI よりも Gd/PEI/PEG-C/JTS-1 が分散性に優れていることがわかり、投与 Gd 量をそろえることにより Gd/PEI/PEG-C/JTS-1 の増強効果が期待できる。

④ Preliminary に「ガドリドール」(279.3mg/ml; MW:558.69)存在下で X 線照射を行うと、非照射群と比較して Gd: 3.93mg の条件では 21% 抑制、Gd: 1.96mg の条件では 29% 抑制を認めた。GdNCT による腫瘍増殖抑制効果と合わせた Gd-X 線併用効果も期待できる。

(3) 今後の展開と展望:

以上の実験データより、Gd 化合物を同様に多元複合体ポリマーに封入し、腫瘍内局注および静脈投与した場合の腫瘍内 Gd 濃度を測定し、引き続き GdNCT による腫瘍増殖抑制効果を確認し、中性子捕捉療法と X 線療法あるいは PDT 療法との併用効果を検討し、新規ガドリニウムデリバリーシステムを確立していきたい。引き続き新規治療開発へと展開していく予定である。

ガドリニウム原子を基盤として、中性子捕捉療法と X 線療法あるいは PDT 療法を励起し、連携できる 2 つの治療法をかくりつできることは、癌選択的な照射効果を期待できかつ患者の副作用を軽減でき、癌に対する放射線治療の効率改善に向けた基礎的知見を提供することが出来る。また、細胞内動態制御を目指したデリバリーシステム開発は抗癌剤のデリバリーに留まらず種々の薬剤や遺伝子治療薬の効率的デリバリーシステム開発の一翼を担うことが出来る。さらに先端医療における医工連携のモデルケースとなるべく開発を進め、医療分野への工学からの新たな貢献が期待されると共に、新規学問領域そして産業を創生するように展開していきたい。

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. Yanagie H, Kumada H, Nakamura T, Higashi S, Ikushima I, Morishita Y, Shinohara A, Fujiwara M, Suzuki M, Sakurai Y, Sugiyama H, Kajiyama T, Nishimura R, Ono K, Nakajima J, Minoru O, Eriguchi M, & Takahashi H: Feasibility Evaluation of Neutron Capture Therapy for Hepatocellular Carcinoma using Selective Enhancement of Boron Accumulation in Tumour with Intra-arterial Administration of Boron-Entrapped Water-in-Oil-in-Water Emulsion. Applied Radiation & Isotopes, 69(12), 1854-7, 2011, Epub 2011 May 20. PMID: 21752660

2. 柳衛宏宣、高橋浩之: 中性子捕捉療法を目指した再発・進行乳癌における FBPA-PET 診断、Isotope News、69(11)、

2011、4-7

3. Novriana D, Yanagie H, Zhu H, Demachi K, Shinohara A, Yokoyama K, Sekino M, Sakurai Y, Morishita Y, Iyomoto N, Nagasaki T, Horiguchi Y, Nagasaki Y, Nakajima J, Ono M & Takahashi H: Tumour Growth Suppression by Gadolinium Neutron Capture Therapy Using Gadolinium-Entrapped Liposome as Gadolinium Delivery Agent, *Biomed Pharmacother*, 2013 in press.

4. Yanagie H, Shibai A, Inoue S, Miyazaki A, Shinohara A, Yokoyama K, Sakurai Y, Kishi T, Satoh M, Sugiyama H, Hisa T, Kawate M, Yamase T, Ono M, Eriguchi M and Takahashi H: Production of Polyoxoboronate as Novel Boron compound for Boron Neutron Capture Therapy, *Solid State Science*. (Elsevier) (submitted).

[学会発表] (計8件)

1. Yanagie H, Furuya Y, Taniike K, Kumada H, Nakamura T, Horiguchi H, Ogata H, Sugiyama H, Uchiyama K, Ono K, Ono M, Eriguchi M, and Takahashi H: Feasible Evaluation of Neutron Capture Therapy for Local Recurrent Breast Cancer According to Boron Uptake in Tumour with Estimating by F-BPA Positron Emission Tomography. ACR 2011, April. 4. 2011, Orlando, FL, U. S. A.

2. Yanagie H, Shibai A, Inoue S, Miyazaki A, Shinohara A, Yokoyama K, Sakurai Y, Kishi T, Satoh M, Sugiyama H, Hisa T, Kawate M, Yamase T, Ono M, Eriguchi M and Takahashi H: Production of Polyoxoboronate and BSH Delivery Systems for Boron Neutron Capture Therapy. 17th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BORON, BORIDES AND RELATED MATERIALS (ISBB2011). 15th September 2011, Istanbul, TURKEY

3. Yanagie H, Furuya Y, Taniike K, Kumada H, Nakamura T, Horiguchi H, Ogata H, Sugiyama H, Uchiyama K, Ono K, Ono M, Eriguchi M, and Takahashi H: Feasible Evaluation of Neutron Capture Therapy for Local Recurrent Breast Cancer According to Boron Uptake in Tumour with Estimating by F-BPA Positron Emission Tomography. 東大病院先端医療開発部局合同

第7回 22世紀医療センターシンポジウム・第8回 医工連携研究会・第4回 ティッシュ・エンジニアリング部シンポジウム 「再生医療・細胞医療の早期実用化にむけた開発戦略」. 平成23年12月17日(土), 東京大学医学部教育研究棟鉄門記念講堂、文京区、東京都

4. 柳衛宏宣、東 秀史、瀬口浩司、生嶋一朗、藤原光輝、鈴木 実、増永慎一郎、櫻井良憲、田中浩基、木梨友子、丸橋 晃、小野公二、江里口正純、小野 稔、高橋浩之: 肝臓癌への BNCT の実施経験例の検討、平成23年度京都大学原子炉実験所専門研究会 「研究炉及び加速器中性子源を用いた中性子捕捉療法の高効率化に関する研究会」、2012年2月18日、京都大学原子炉実験所、熊取、大阪府

5. Novriana D, Yanagie H, Zhu H, Demachi K, Shinohara A, Yokoyama K, Sekino M, Sakurai Y, Morishita Y, Iyomoto N, Nagasaki T, Horiguchi Y, Nagasaki Y, Nakajima J, Ono M & Takahashi H: In Vivo Study of Gadolinium-based Neutron Capture Therapy. 15th International Conference of Neutron Capture Therapy. 13th, Sep., 2012 Tsukuba, Japan

6. 柳衛宏宣、芝井亜弥、榮光子、江里口正純、久智行、古谷嘉隆、杉山弘高、小山義之、小野稔、中島淳: 三元複合体を用いた胃癌細胞への遺伝子デリバリーシステムの検討、第85回日本胃癌学会総会、平成25年2月28日、大阪国際会議場、大阪

7. Yanagie H, Higashi S, Ikushima I, Morishita Y, Mizumachi R, Murata Y, Sakurai Y, Mouri K, Shinohara A, Nagata M, Nagasaki T, Imagawa T, Terao T, Hisa T, Sugiyama H, Nakajima T, Kakimi K, Arimori K, Nishimura R, Eriguchi M, Takamoto S, Ono M, Nakajima J, and Takahashi H: Novel Arterial-Injection-Chemotherapy using Epirubicin Entrapped WOW Emulsion for Hepatocellular Carcinoma. 3rd International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials 3-7 March 2013, Sorrento, Italy

8. 柳衛宏宣、東 秀史、瀬口浩司、生嶋一朗、藤原光輝、鈴木 実、増永慎一郎、櫻井良憲、田中浩基、木梨友子、丸橋 晃、小野公二、江里口正純、小野 稔、高橋浩之: 原発性肝細胞癌に対する 中性子捕捉療法への応用に向けた ボロン封入 WOW エマルジョンシステムの検討、東京大学先端医療シーズ開発フォーラム、平成25年1月25日、東京大学国際

学術研究センター、東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者：

柳衛 宏宣

(YANAGIE HIRONOBU)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：30212278

(2) 研究分担者

高橋 浩之

(TAKAHASHI HIROYUKI)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：70216753

伊豫本 直子

(IYOMOTO NAOKO)

九州大学大学院工学研究員

エネルギー量子工学部門

研究者番号：40508173