

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591855

研究課題名(和文)新規ヒアルロン酸-ホウ素結合体を用いたホウ素中性子捕捉療法の開発

研究課題名(英文) Boron-conjugated hyaluronan nanoparticles for Tumor Targeting in Boron Neutron Capture Therapy

研究代表者

笠岡 敏 (Kasaoka, Satoshi)

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：90338690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素化合物結合ヒアルロン酸ナノパーティクルの(B-HA-NP)の開発を行った。新規合成したB-HA-NPのホウ素濃度は用いるヒアルロン酸の分子量に依存しており、最大8,050 ppmのホウ素を含有した製剤の調製に成功した。B-HA-NPは37℃血清中においても36 hで95%以上のホウ素の保持効率であり高い安定性を有しており、ヒト繊維芽細胞に対する毒性は50 ppm以下の濃度では見られなかった。京大原子炉における中性子照射によって、BSH溶液や他のリポソーム製剤と比較して、有意に高い抗腫瘍効果が認められ、さらにエレクトロポレーションによる低電圧の印加により、抗腫瘍効果が大きく増強された。

研究成果の概要(英文)： We have developed a novel boron delivery system for BNCT using hyaluronan conjugated with borocaptate (BSH). This BSH-bearing hyaluronan nanoparticles (B-HA-NPs) are expected to deliver boron atoms into melanoma cells by receptor mediated endocytosis for antitumor application in BNCT. Novel BSH-bearing hyaluronan nanoparticles were obtained by the self-assembly in water. The critical micellar concentration of B-HA-NPs (diameter: 90-180 nm) was determined by the fluorescence probe technique using pyrene. B-HA-NPs had high stability in the retention of ¹⁰B during storage at 4-37℃. All borocaptate-loaded formulations had no cytotoxic effects. B-HA-NPs were readily bound to melanoma cells, and were internalized by receptor-mediated endocytosis. Survival of the washed cells preincubated with B-HA-NPs was lowest compared to survival of control cells that were pre-incubated with B-PEG-liposomes, B-HA-liposomes, B-FA-conjugates and BSH solution.

研究分野：製剤学

キーワード：BNCT hyaluronic acid nanoparticle tumor targeting

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の放射線治療研究では、線量をマクロー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、ホウ素中性子捕捉療法 (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。

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。この腫瘍親和性と生体適合性を有したヒアルロン酸を用いたナノキャリアを中性子捕捉療法に応用し、中性子捕捉療法のさらなる発展を狙う。

2. 研究の目的

メラノーマ治療に用いられるホウ素中性子捕捉療法を発展させるために、ヒアルロン酸に BSH を結合させた新規化合物を開発し、従来のシステム的な投与方法に加えて、メラノーマ近傍において微弱な電流を印加し、エレクトロエンドサイトーシスにより、腫瘍細胞内への効率的な送達系の構築を検討する。さらに腫瘍細胞への標的性を向上させるために細胞透過ペプチドやカチオニックリポソームを併用し、従来にない送達性能と治療効果を得られることを狙う。この新規送達システムを用いて、*in vitro* と B16F10 メラノーマを移植したマウスにおいてボロンを送達させた後に、京大原子炉で中性子照射を行い、ホウ素中性子捕捉療法の効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) ボロン化合物結合ヒアルロン酸ナノパーティクルの調製とその物性評価

ボロン担体の第1候補であるボロン化合物結合ヒアルロン酸ナノパーティクル (B-HA-NP) は高い生体適合性を有している。しかし、当研究室で調製してきたミセル担体はボロン含有量が最大でも 1600 ppm と、ボロン担体としての能力が低かった。そこでヘテロ架橋剤として N-Succinimidyl 6-Maleimidobenzoate を用い、アセトニトリル中トリエチルアミン触媒存在下で BSH と反応させた。つぎに、ヒアルロン酸の分子量を M.W. = 4,200, 78,000, 960,000 と変化させたものを用い、TBA 塩に置換して DMSO 中に溶解後に、N-アセチルグルコサミンの6

位の水酸基特異的に架橋剤を介した BSH の結合を行い、目的のナノパーティクルを調製した。ミセル形成の有無についてはピレノの励起波長 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。調製した B-HA-NP の平均粒子径は弾性光散乱法によって測定した。B-HA-NP の安定性は 4、pH=7.4 の緩衝液中、または 37 の血清中で、透析膜から漏れ出たボロン濃度を測定することによって行った。ボロン濃度の測定は ICP-AES によって行った。

(2) ヒアルロン酸結合カチオニックリポソームの調製

ボロン担体の第2候補として、ボロンの有力なキャリアであるカチオニックリポソームを用いた。しかし、カチオニックリポソーム単体ではその正電荷ゆえに腫瘍細胞標的性と安定性が大きく減弱される。そこで、負の電荷を有するヒアルロン酸を電荷のマスキングに利用したりポソームを新規調製した。ヒアルロン酸結合カチオニックリポソームはカチオン脂質に DOTAP を用い、水相に BSH を溶解させた逆相蒸発法でカチオニックリポソームを調製した後に、ヒアルロン酸を電氣的に中性条件で加え、静電結合により調製した。平均粒子径とゼータ電位は弾性光散乱法によって測定した。

(3) 細胞透過性ペプチド結合ミセル、およびリポソームの調製

ボロン担体の第3候補として、ミセルとリポソームにそれぞれステアリン酸と BSH を化学結合させたボロン化合物を組み込んだ担体を新規調製した。ステアリン酸 - BSH 化合物は N-(2-aminoethyl)maleimide hydrochloride を適正条件で反応させて調製した。ミセルは PEG 界面活性剤とステアリン酸 - BSH 化合物を任意の濃度で混合して、超音波処理によって調製した。リポソームは構成脂質に DSPC、DMPE-PEG と 10~40% のステアリン酸 - BSH 化合物を用いてハイドレーション法によって調製した。平均粒子径とゼータ電位は弾性光散乱法によって測定した。ボロン濃度の測定は ICP-AES によって行った。

(4) 各種ボロン担体による BNCT の検討

京大原子炉において、B16F10 マウスメラノーマ細胞と各種ボロン担体を 37 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アッセイによって、その効果を検討した。また、メラノーマ細胞に 20 V/cm の低電圧を印加することによって、細胞内取り込みを惹起させるエレクトロエンドサイトーシスを併用して、その効果も検討した。

4. 研究成果

ボロン担体の候補として、ヒアルロン酸ナノパーティクル (B-HA-NP) ヒアルロン酸結合カチオンリポソーム 細胞透過性ペプチド結合ミセル、およびリポソームを調製した。

B-HA-NP のボロン濃度は用いるヒアルロン酸の分子量に依存しており、分子量 4 kD、80 kD、960 kD でそれぞれ、8050、6100、2800 ppm となり、低分子量ヒアルロン酸を用いるとボロンが高濃度になる傾向であった。また、B-HA-NP のピレンを用いた CAC は、それぞれの分子量で 0.297、0.300、0.772 mg/mL であり、自己集合性の会合体の形成が確認できた。この B-HA-NP の平均粒子径は分子量によりそれぞれ、44.2、78.5、134.6 nm となった。B-HA-NP の安定性を検討すると、pH 7.4、4 の保存状況では 13 d で 95% 以上の保持効率を示し (Fig. 1) 37 血清中においても、36 h で 95% 以上であり高い安定性が示された (Fig. 2)。

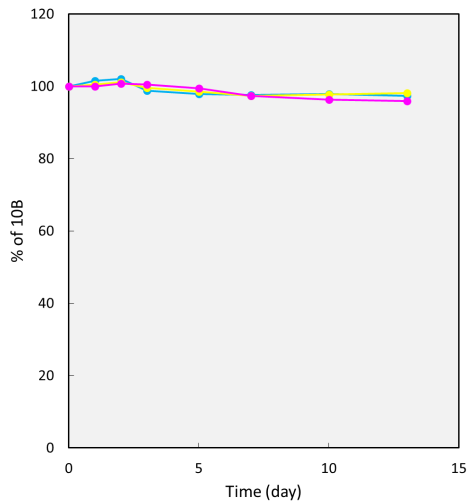


Fig. 1. Percent entrapped of ¹⁰B in B-HA-NP after incubation in pH 7.4 HEPES buffer at 4°C.

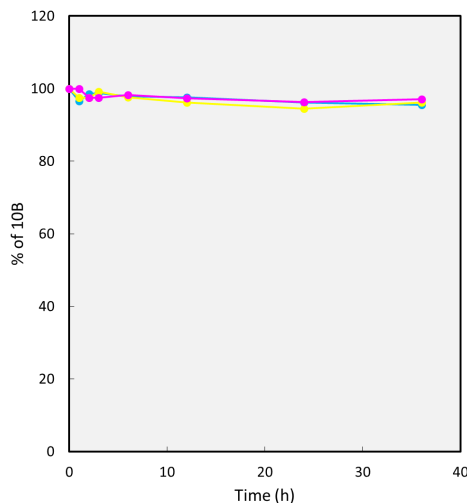


Fig. 2. Percent entrapped of ¹⁰B in B-HA-NP after incubation in 50% serum at 37°C.

また、ヒト皮膚繊維芽細胞への毒性試験の結果から、BNCT 実施条件であるボロン濃度として 50 ppm 以下では毒性は確認できなかった。B-HA-NP 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取り込みを確認した後に、京大原子炉においてコロニー形成アッセイによって BNCT 効果の検討を行った結果、分子量 80 kD、960 kD の B-HA-NP では BSH 溶液群と比較して有意に高い抗腫瘍効果が得られた。さらに、エレクトロポレーションによる LEF 印加によって、殺細胞効果が有意に増加した (Fig. 3)。これらの結果は、CD44 への親和性がヒアルロン酸の分子量に依存しており、低分子のヒアルロン酸は高いボロン結合濃度を示すものの、親和性が十分でないことを示している。一方で、高分子のヒアルロン酸は CD44 を介して結合し、さらに LEF 印加によるエレクトロエンドサイトーシスの惹起により、効果的に細胞内に取り込まれたと考えられる。

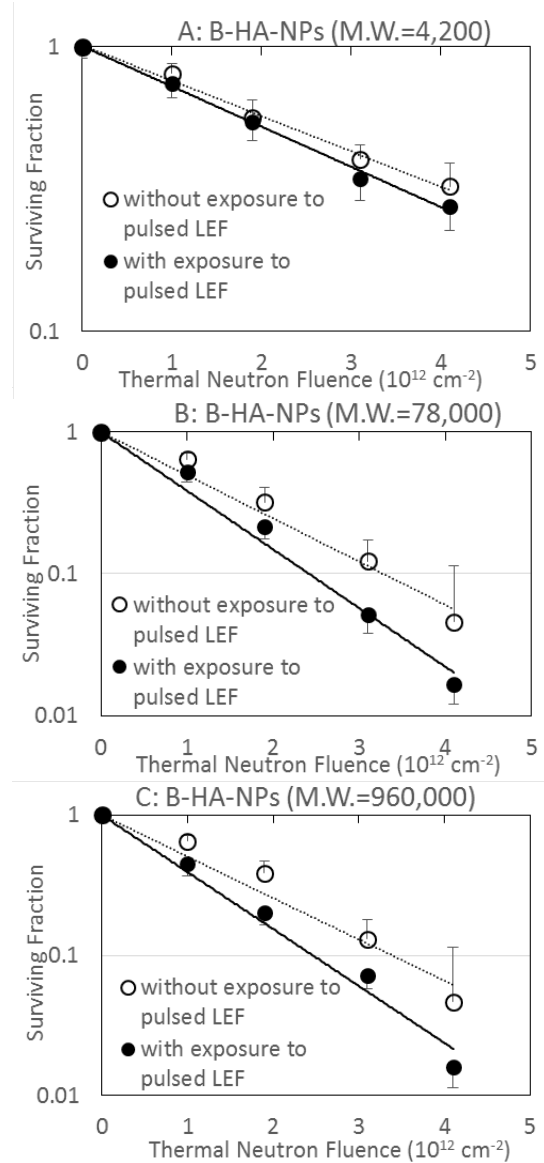


Fig. 3. Suppression of the colony formation of B16F10 cells after in vitro BNCT.

当初の予定では、この後に in vivo における中性子を照射しその効果を詳細に検討する予定であったが、予期しないことにより 2013 年からの京大原子炉の点検が大幅に遅延しており、運転再開が現在においても延期されており、それ以降の照射実験を行うことができなかった。故に、中性子照射実験を一時停止し、その他のボロン担体の開発を行った。第2候補として、マスキングに利用したヒアルロン酸カチオンリポソームを新規調製した。このリポソームの平均粒子径は 159.2 ± 35.2 nm となり、ゼータ電位は -0.95 mV で、BSH の封入率は平均 11.5% であった。この結果から電荷の中和は十分行われており、懸念した平均粒子径の大幅な上昇もなかった。このリポソームを 10% 血清またはヒアルロニダーゼを含有した緩衝液中で 6 時間までインキュベートしたところ、ゼータ電位は 5.9 mV と正電荷を回復していることが確認できた。このリポソームを用いて、細胞内への取込実験を行ったところ、血清処理を行っていないリポソームと比較して、細胞内ボロン濃度が最大 3.5 倍上昇し、ヒアルロン酸の脱離・分解を介したカチオンリポソームの高い取り込みが示された (Fig.4)。

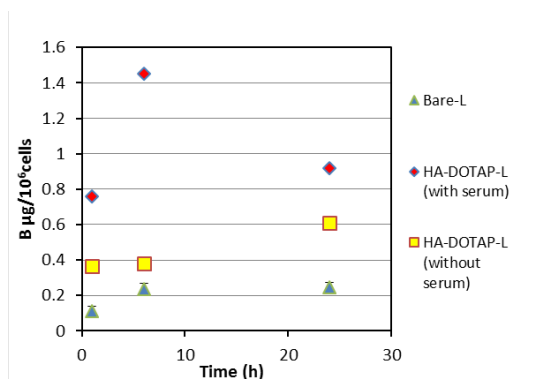


Fig.4 Uptake of ¹⁰B in B16F10 cells after incubation at 37 °C .

第3の候補であるボロンミセルはユニークな特徴を持ち、低分子ミセルの界面活性作用により、細胞透過性ペプチドが全く存在しない条件でも BSH 溶液群と比較して約 8.5 倍のボロン取り込みがみられた。しかし、ミセル状態では毒性が高く、製剤として安定性も低かった。次にボロンリポソームとして構成脂質に DSPC、DMPE-PEG と 10~40% のステアリン酸 - BSH 化合物を用いてハイドレーション法によって調製したところ、リポソーム膜の安定性により毒性も十分に低下させることができた。そこで、このボロンリポソームに腫瘍細胞に対する選択性を有する Buforin 由来の腫瘍細胞選択型の細胞透過ペプチド BR2 を結合したところ、ヒト正常繊維芽細胞にはほとんど取り込まれなかったが、マウスメラノーマ B16F10 細胞には特異的な強い取り込みが観察された (Fig.5)。

A) melanoma cells B) fibroblast cells

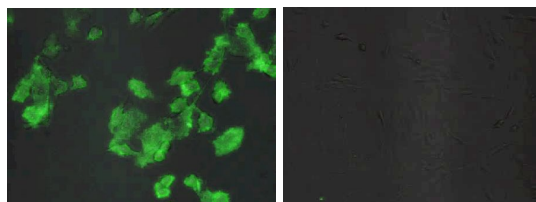


Fig.5 Uptake of liposomes in B16F10 melanoma cells or fibroblast cells after incubation at 37 °C .

これらの結果から の担体の特徴は、高い安定性と低毒性、 の担体の特徴はヒアルロン酸の生体分解性を利用した細胞内取り込みと調製の容易さ、 の担体の特徴は、高い腫瘍細胞標的性にあると考えられる。現在、新規調製した各種の中性子照射実験は行われていないが、京大原子炉の利用が再開後に速やかに未消化の実験を遂行していく予定である。

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 2 件)

S. Kasaoka, K. Masuda, K. Hashimoto, S. Masunaga, Y. Sakurai, H. Tanaka and K. Ono Boron-conjugated Hyaluronan nanoparticles for tumor targeting in boron neutron capture therapy. KURRI progress report 査読無 2012, pp.152

S. Kasaoka, K. Hashimoto, S. Masunaga, Y. Sakurai, H. Tanaka and K. Ono Electroendocytosis of Boron-conjugated hyaluronic acid Nanoparticles for Tumor Targeting in Boron Neutron Capture Therapy KURRI progress report 査読無 2013, pp.156

[学会発表] (計 1 件)

(1) 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 2012 年 9 月 16 日岡山

[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：
出願年月日：
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

笠岡 敏 (SATOSHI KASAOKA)
広島国際大学・薬学部・准教授
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：