

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462183

研究課題名(和文) 中性子捕捉療法ホウ素担体としての標的アデノウイルスベクターの確立

研究課題名(英文) Development of targeting adenovirus vector as boron carrier for boron neutron capture therapy

研究代表者

濱 聖司 (HAMA, Seiji)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・研究員

研究者番号：40397980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

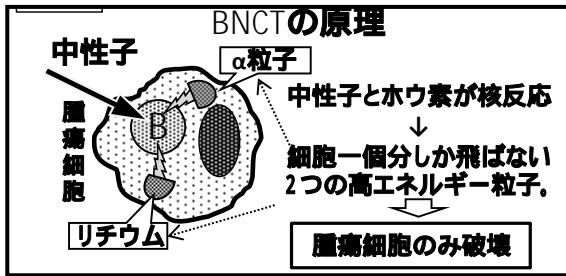
研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマに対する細胞選択的な放射線治療であるホウ素中性子捕捉療法の治療効果を向上させる為に、アデノウイルスベクターにホウ素化合物を結合させて感染させる研究を行い、ホウ素化合物として活性化ドデカボレート類(ADB)を分子設計して合成し、感染効率に影響を与えない反応条件を検討した。また、アデノライブラリシステムで腫瘍標的アデノウイルスベクターを作製する予備実験として、臨床検体から初代継代する研究を行い、下垂体腫瘍細胞から短期間の培養実験が行えることを確認した。更に、加速器を用いた中性子照射実験も開始している。その他、臨床データを解析して放射線治療に関わる様々な知見を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：We have conducted the research using adenovirus vector in order to enhance the effect of Boron neutron capture therapy (BNCT) for malignant glioma patients. We synthesized the novel boron compound "activated dodecabolate: ADB", and analyzed the condition of reaction between adenovirus and ADB in order not to down the efficiency of infection of adenovirus vector after conjugation of ADB. To make targeting adenovirus vector from clinical sample using adenovirus library system, we performed the preliminary experiment for primary cell culture of pituitary adenomas, indicated current cell culture method was suitable for short-term study but not for long-term study. We performed the preliminary study of the accelerator system for neutron irradiation. We also have clarified some factors that influenced on the prognosis after radiation therapy for glioma patients.

研究分野：脳神経外科学

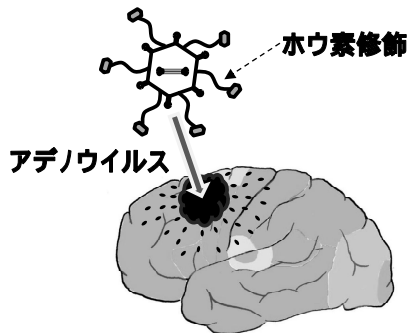
キーワード：中性子捕捉療法 アデノウイルスベクター 悪性グリオーマ ホウ素化合物 アデノウイルスライブラリー 中性子 ガンマ線

1. 研究開始当初の背景



悪性神経膠腫は正常脳組織内に染み込みながら大きくなるため、手術で全摘出は困難で、術後に放射線療法を行っても再発は避けられない。そこで考え出されたのがホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) である。中性子は単独では細胞を障害しないが、ホウ素などの安定同位元素に衝突すると核反応を起し、発生した飛程が短い重荷電粒子によって、ホウ素が取り込まれた細胞だけが破壊される。腫瘍細胞だけにホウ素を取り込ませ、中性子を照射すれば、腫瘍細胞のみを破壊できる。

BNCT の治療効果を高めるために、脳腫瘍細胞内に十分量のホウ素を選択的に取り込ませることが必要である。しかし、脳腫瘍は血液脳関門によって、血中に入った薬剤が腫瘍細胞に移行しにくい性質がある。そこで、我々はアデノウイルスベクター表面をホウ素修飾し、脳腫瘍に直接感染させることで、血液脳関門を介することなく、脳腫瘍内に選択的にホウ素を取り込ませることに着目した。



2. 研究の目的

アデノウイルスベクターを BNCT におけるホウ素担体とするための研究を行った。問題となるのは、アデノウイルスの感染効率に影響を与えることなく結合出来るホウ素化合物の作製と、アデノウイルスが腫瘍細胞に感染する際の選択性の確保になる。

については、現在あるホウ素化合物をウイルスに結合させ、ウイルス感染細胞のホウ素濃度を ICP-MS で測定したが、現時点では感度以下の結果であり、現在あるホウ素化合物をアデノウイルスに結合させても、ウイルス感染で十分量のホウ素化合物を細胞内に導入することが難しいことが判明した。そこで、感染効率に影響を与えない条件下で十分量のホウ素化合物をアデノウイルスに結合させる手法を確立することが必要となった。

については、目的とする脳腫瘍細胞を標

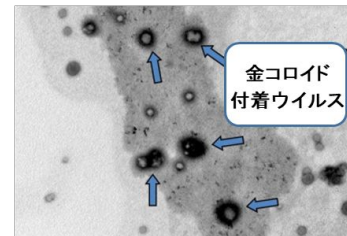
的とする方法として、国立がん研究センター研究所で開発されたアデノウイルスライブラリーに注目した。臨床検体を用いてアデノウイルスライブラリーで標的アデノウイルスベクターが作成できるかどうかの検討を目指した。更に、すでに出来上がっている標的アデノウイルスベクターにホウ素化合物を結合させ、標的とする培養細胞の選択性と感染効率が保たれているかどうかを明らかにすることも目指した。

更に、脳腫瘍における放射線感受性について、臨床面からの検討も行った。

3. 研究の方法

アデノウイルスベクターにホウ素化合物を結合させる手法として、ウイルスの表面構造にある遊離のチオール基に着目した。今までの研究で、チオール基結合化合物を検討する予備実験として、金コロイドを用いた実験を行った。この金コロイドはマレイミド基を有しており、マイケル付加反応でチオール基に結合する。そこで、電子顕微鏡による観察で、ウイルス自体への金コロイド付着を確認し、金コロイドが付着したウイルスは細胞内に感染して侵入することも確認できている。

電顕像: ウイルス感染した培養細胞



核内に金コロイドが集積

これらの結果をもとに、アデノウイルス表面に結合させるホウ素化合物の分子設計を行い、作成を試みた。

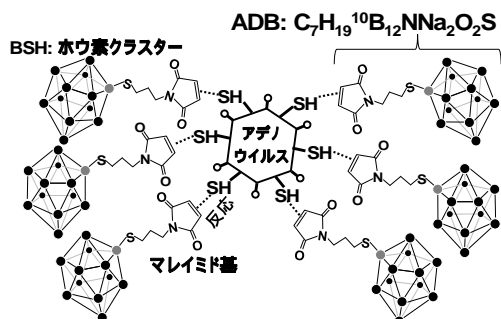
標的アデノウイルスベクターについては、臨床検体から初代継代化し、アデノウイルスライブラリーを使って作成を試みた。アデノウイルスライブラリーを用いる為には、数日~数週間の安定した継代が必要であり、まずは臨床検体の初代継代化の予備実験を行う必要があった。そこで、下垂体腺腫細胞は様々な下垂体前葉ホルモンを分泌することが知られている。この下垂体腺腫細胞の初代継代化の予備実験に使用すると、培養液中のホルモン濃度の変化を見ることで培養期間や継代における細胞の安定性の確認が出来ると考え、最初に非機能性、機能性下垂体腺腫細胞を使って初代継代化の予備実験を行った。

中性子照射を行う為の加速器実験についても検討を進めていった。

臨床面からも悪性脳腫瘍と放射線感受性に関わる因子を中心に解析を行った。

4. 研究成果

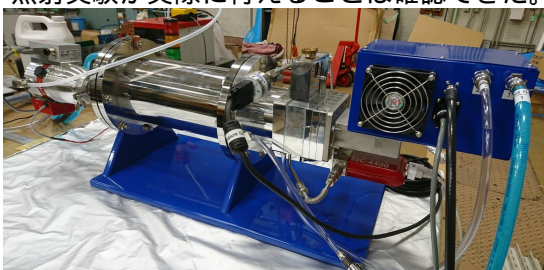
アデノウイルスの感染効率に影響を与えること無く結合出来るホウ素化合物の作製については、大阪府立大学が中心となって、アデノウイルスに生きたままで化学修飾できるホウ素化合物として、活性化ドデカポレート類(ADB)を分子設計し、合成した。現在、



化学修飾がウイルスの感染効率に及ぼす影響を最小限にする反応条件を求め、アデノウイルスベクターをホウ素化合物で化学修飾し、悪性グリオーマ培養細胞に感染させ、感染細胞のホウ素濃度測定を行っている。現在、ホウ素濃度測定と並行して、学会発表と論文投稿の準備を進めている。

アデノウイルスライブラリーを用いた標的アデノウイルスベクターの作製のための準備を進めた。まずは、下垂体腫瘍細胞を使って、脳腫瘍における初代継代の条件設定を行った。従来の初代継代方法をもとに臨床検体から下垂体腺腫細胞を培養細胞にすると、数日程度はホルモン分泌が得られることが分かった。この実験の結果から、非機能性下垂体腺腫であっても、複数の下垂体前葉ホルモンが少量、分泌することが判明した。このことは、血中のホルモン値に影響を及ぼさず、臨床症状を呈さない程度の、微量のホルモンであっても検出できる程の研究は行えることは分かった。しかし、数日～数週間の経過で培養液中のホルモン値は著減することから、アデノウイルスライブラリーを行うために必要な数日～数週間の安定した長期培養には不向きであることが判明した。悪性脳腫瘍でも同様の方法で初代継代化を試みるが、数日～数週間の経過で細胞は増殖を停止し、死に至る結果であった。そこで、せめて数週間の期間を培養できる条件を、現在も検討している。

更に、中性子捕捉療法への応用を目指すために、大阪大学核物理研究センターにある中性子加速器の照射実験の準備を進め、中性子照射実験が実際に行えることは確認できた。



臨床検体を用いた解析も行った。(1) 悪性グリオーマ患者の手術・放射線化学療法後の予後因子を解析する為に perfusion computed tomography を使って permeability surface area product (PS) を測定したところ、PS の最大値が悪性グリオーマ患者の予後決定因子になっていることを突き止めた。(2) あらゆる細胞から分泌される膜小胞体: エクソソームに含まれる分子が様々な癌で注目されている。その一つ、細胞膜タンパク質の Glypican-1 の発現を、開頭腫瘍摘出術後に放射線化学療法を施行された悪性グリオーマ患者で検討すると、髄腔内播種と関連し、予後不良因子であることが判明した。(3) 悪性グリオーマに対する手術と放射線照射に併用される最も代表的な抗癌剤の一つ、temozolomide は、末梢血中の好中球減少が40%を越えた症例群で治療予後が良好であることが判明した。それらの結果についても論文にて発表している。

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 5 件)

Usui S, Hama S, Tominaga A, Kinoshita Y, Kurusu K. Effect of Gonadotropin and Adrenocorticotrophic Hormone Secretion on Invasiveness of Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas: A Cell Culture Study. *World Neurosurg.* 2016 Dec;96:578-584.e1. doi: 10.1016/j.wneu.2016.08.113. Epub 2016 Sep 4.

Saito T, Sugiyama K, Ikawa F, Yamasaki F, Ishifuro M, Takayasu T, Nosaka R, Nishibuchi I, Muragaki Y, Kawamata T, Kurusu K. Permeability Surface Area Product Using Perfusion Computed Tomography Is a Valuable Prognostic Factor in Glioblastomas Treated with Radiotherapy Plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide. *World Neurosurg.* 2017 Jan;97:21-26. doi: 10.1016/j.wneu.2016.09.072. Epub 2016 Sep 28.

Saito T, Sugiyama K, Hama S, Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Onishi S, Muragaki Y, Kawamata T, Kurusu K. High Expression of Glypican-1 Predicts Dissemination and Poor Prognosis in Glioblastomas. *World Neurosurg.* 2017 Sep;105:282-288. doi: 10.1016/j.wneu.2017.05.165.

Saito T, Sugiyama K, Takeshima Y, Amaty VJ, Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Muragaki Y, Kawamata T, Kurusu K. Prognostic implications of the subcellular localization of survivin in glioblastomas treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. J Neurosurg. 2018 Mar;128(3):679-684. doi: 10.3171/2016.11.JNS162326. Epub 2017 Apr 21.

Saito T, Sugiyama K, Hama S, Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Muragaki Y, Kawamata T, Kurusu K. Prognostic importance of temozolomide-induced neutropenia in glioblastoma, IDH-wildtype patients. Neurosurg Rev. 2018 Apr;41(2):621-628. doi: 10.1007/s10143-017-0903-3. Epub 2017 Sep 9.

〔学会発表〕(計 6 件)

齋藤太一, 田村学, 村垣善浩, 丸山隆志, 久保田有一, 新田雅之, チエルノフミハイル, 岡本沙織, 杉山 一彦, 栗栖 薫, 伊関洋, 岡田芳和. 三角部 (pars triangularis) を含む前頭葉神経膠腫症例は 前頭葉言語野の同定が困難である. 2014 年 10 月 9 日 日本脳神経外科学会第 73 回学術総会. シンポジウム

高安武志, 濱聖司, 山崎文之, 野坂亮, 杉山一彦, 栗栖薫 悪性グリオーマへの p16 導入による survivin 発現低下を伴った核異常と中心体過剰複製. 2014 年 11 月 30 日 第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会

齋藤 太一, 杉山 一彦, 井川 房夫, 山崎文之, 高安 武志, 野坂 亮, 村垣 善浩, 川俣 貴一, 栗栖 薫 Perfusion CT による透過性表面積画像是テモゾロマイド/放射線治療を受けた膠芽腫症例の有用な予後予測因子である. 2016 年 9 月 29 日 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会. 口頭

齋藤 太一, 杉山 一彦, 井川 房夫, 山崎文之, 高安 武志, 野坂 亮, 村垣 善浩, 川俣 貴一, 栗栖 薫, Survivin の局在はテモゾロマイド併用放射線治療を受けた膠芽腫の予後予測因子である. 2016 年 12 月 5 日 第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会

碓井 智, 木下康之, 富永 篤, 濱 聖司, 栗栖 薫 ゴナドトロピンと ACTH 分泌の影響 : 細胞培養研究 2017 年 2

月 24 日 第 27 回 日本間脳下垂体腫瘍学会

濱聖司 細胞培養法を用いた下垂体腺腫のホルモン多分泌能の解析 2017 年 6 月 8 日 第 54 回 日本リハビリテーション医学会学術集会

〔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

濱 聖司 (HAMA, Seiji)
広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・研究員
研究者番号 : 40397980

(2) 研究分担者

星 正治 (HOSHI, Masaharu)
広島大学・平和科学研究センター・名誉教授
研究者番号 : 50099090

切畑 光統 (KIRIHATA, Mitsunori)
大阪府立大学・産学官連携研究機構 BNCT 研究センター・特認教授
研究者番号 : 60128767

栗栖 薫 (KURISU, Kaoru)
広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・教授
研究者番号 : 70201473

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

青木 一教 (AOKI Kazunori)
国立研究開発法人国立がん研究センター・分子細胞治療研究分野・分野長
研究者番号：60270675

高安 武志 (TAKAYASU Takeshi)
広島大学・病院・医科診療医
研究者番号：20760755

碓井 智 (USUI Satoru)
広島大学・病院・医科診療医
研究者番号：00571803