

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ナノメディシン研究

研究課題：ホウ素ナノデバイス型中性子
捕捉治療

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 浩之

平成 22 (2010) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

ホウ素ナノデバイス型中性子捕捉治療に関する研究 -----1

中村 浩之

II. 分担研究報告

1. ホウ素ナノデバイスの脳腫瘍適応に関する研究 -----10

松村 明

2. ホウ素ナノデバイスの中皮腫適応に関する研究 -----16

李 千萬

3. ホウ素ナノデバイスの膀胱がん適応に関する研究 -----21

鈴木 実

4. トランスフェリン型ホウ素ナノデバイスの作成に関する研究

丸山 一雄 -----24

5. ホウ素ナノデバイスの肝腫瘍適応に関する研究 -----28

柳衛 宏宣

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----34

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----別冊

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）
総括研究報告書

ホウ素ナノデバイス型中性子捕捉治療に関する研究

研究代表者 中村 浩之 学習院大学理学部・教授

研究要旨

中性子捕捉療法（BNCT）は、低エネルギーである熱・熱外中性子がホウ素との核反応により生ずる強力な粒子線を用いるものであり、低毒性のホウ素化合物を用いるため化学療法のような重篤な副作用はなく、また放射線療法のような照射場内の正常組織へのダメージもきわめて低い治療法で、治療後の患者への負担が極めて小さい特徴をもつ。現在、世界的にBNCT用加速器の開発が行われているが、中でも京都大学と住友重工（株）で共同開発している加速器からは、すでに原子炉と同等の中性子線量が得られており、近い将来病院併設型加速器BNCTの実現により本治療法は一般的放射線療法の1つとなると考える。本研究では、BNCT適応拡大を指向し、各腫瘍に最適なホウ素ナノデバイスの開発研究を進めてきた。本年度は、脂質構造を検討し、血中滞留性の高いトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイスを開発した。また、蛍光標識脂質ならびに蛍光標識化ホウ素ナノデバイスを開発し、細胞および組織レベルでのホウ素ナノデバイスの挙動について明らかにした。中皮腫BNCTを目的として中皮腫に過剰発現しているCD44のリガンドであるヒアルロン酸を修飾したホウ素ナノデバイスの開発を行った。さらに、ホウ素ナノデバイス封入用ホウ素薬剤の開発を行った。

研究分担者

松村 明 筑波大学大学院人間総合科学研究科・
教授、筑波大学付属病院副病院長
李 千萬 大阪大学医学部付属病院未来医療
センター・助教
鈴木 実 京都大学原子炉実験所・特任准教授
丸山一雄 帝京大学薬学部・教授
柳衛宏宣 東京大学大学院工学系研究科・
特任准教授

A. 研究目的

BNCTは、低エネルギーである熱・熱外中性子がホウ素との核反応により生ずる強力な粒子線を用いるものであり、がん部位へホウ素デリバリーと中性子

線照射のダブルターゲティングが可能である。使用するホウ素化合物は低毒性であることから化学療法のような重篤な副作用はなく、また放射線療法のような照射場内の正常組織へのダメージもきわめて低い治療法で治療後の患者への負担が極めて小さい特徴をもつ。高い治療効果を得るためには、腫瘍内ホウ素濃度が30 ppm以上、腫瘍/血液内ホウ素濃度比が5以上を満たす薬剤の開発が目標とされている。本研究ではアクティブターゲティング型多機能性ホウ素ナノデバイスを開発し、BNCT適用拡大を検討する。具体的には、ホウ素ナノデバイスにターゲティング機能リガンドを導入し、膀胱がん、脳腫瘍、肝臓がん、中皮腫を対象とし、これらの動物モデルで腫瘍内ホウ素濃度と治療効果に関して調べ、上記に示した目標値をクリアする適正なホウ素ナノデバイ

スを検討するとともに、BNCT への実用化を目指す。

2年目となる本年度は、特にホウ素ナノデバイスの細胞および組織レベルでの挙動を詳細に調べることに重点を置き、次に示す4つの課題に対して研究を進めた。(1) 蛍光標識ホウ素脂質の開発とナノデバイス化の検討、(2) 蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの開発と生体内挙動解明、(3) ホウ素ナノデバイス封入用ホウ素薬剤の開発、(4) ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの開発。

B. 研究方法

1、蛍光標識ホウ素脂質の開発とナノデバイス化の検討

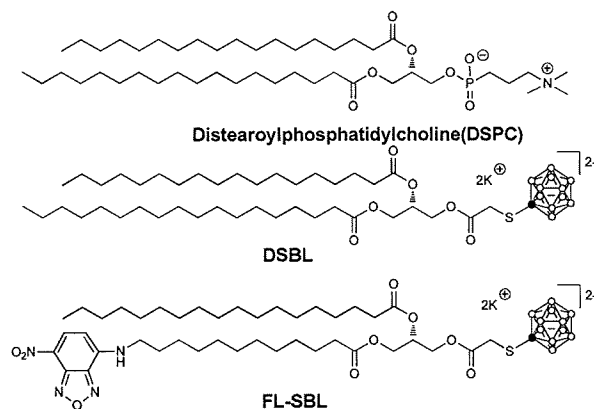


図1 蛍光ホウ素脂質の構造

生体リン脂質の構造に着目し、その水溶性部位にホウ素イオンクラスターを導入することでホウ素脂質の開発を行った。既に20年度において、脂質の親水性部位に水溶性ホウ素クラスターを導入したホウ素脂質を開発し、そのナノデバイス化に成功している。そこで、21年度は、ホウ素脂質の生体内での代謝機構を解明するために、蛍光標識化したホウ素脂質の合成および可視化を目的とした。蛍光標識剤には、NBD-Cl の他にピレンやダンシルクロライド、フルオレセインなどがある。これらの中でも、蛍光がヒトの眼にとって最も観察しやすい緑色であること、分子サイズが小さいこと、そして脂質に導入しやすいことを考慮し、蛍光標識剤はNBD-Cl を用いることと

した。具体的な逆合成解析を図2に示す。

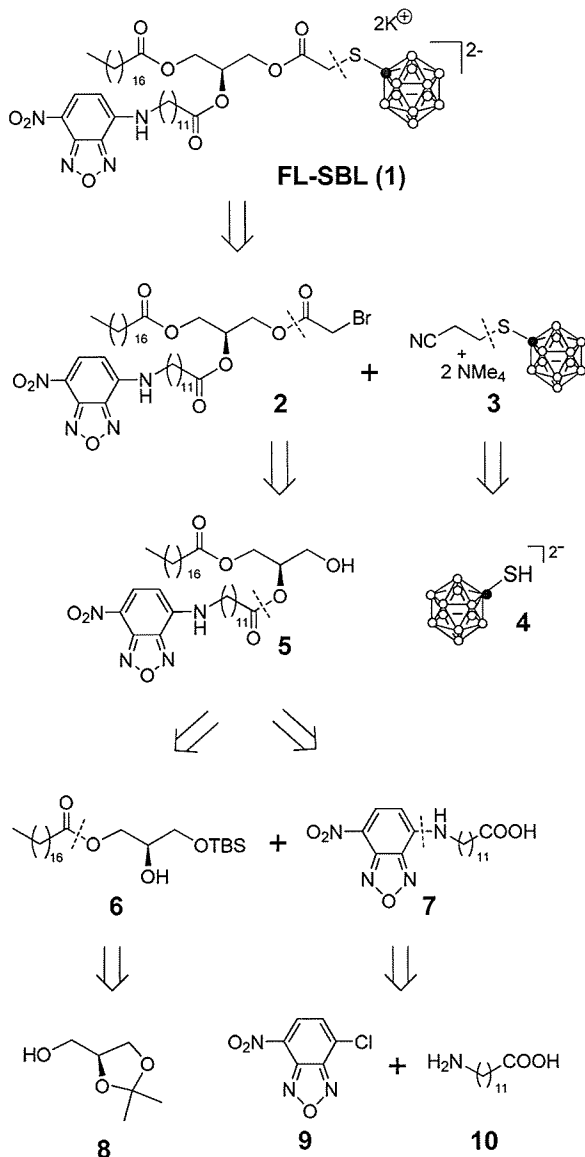


図2 蛍光ホウ素脂質 (FL-SBL) の逆合成解析

(2) 蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの開発と生体内挙動解明

蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの調製は、逆相蒸発法(REV法)で行った。まず、モル比がDSPC : DSBL(25%) : Cholesterol = 0.75 : 0.25 : 1になるように各試薬を秤量し、ナスプラスコに入れた。そこに、クロロホルム : ジイソプロピルエーテル (1 : 1, 体積比) を加えて脂質を溶解させた後に、二つの溶

媒と同じ体積のミリQ水を、溶液が二層になるように静かに入れた。次に、ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 を用いて、超音波処理することで溶液をエマルジョンにした。その後、約 50°C の水浴上で、ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を除去することで、エマルジョンを転相させ、リポソーム懸濁液とした。調製したリポソームは、エクストリューダーを用いてフィルターを加圧通過させ粒子径を約 100 nm にした。その後超遠心分離機にかけ完成とした。次に、ポストインサーション法を用いて 25% DSBL リポソームに蛍光ラベル化を行った。エッペンに 25% DSBL リポソーム (500 μ l) と蛍光ホウ素脂質 (10 μ l) を入れて混ぜたものを、遠心管に移しミリQ水を八分目まで入れた。超遠心分離機 (50000 rpm、1 時間、4°C) に三回かけて蛍光ホウ素ナノデバイスの完成とした。

また、マウスを用いた生体内イメージングを行うためにホウ素ナノデバイス表面を PEG (polyethylene glycol) で修飾した、PEG 修飾ホウ素ナノデバイスを同様の方法で調製した。PEG 修飾リポソームは、膜表面の PEG により形成される水和層およびその立体障害により補体系タンパク質の吸着が抑えられ、単核食細胞系に認識されにくく、血中での安定性、滞留性に優れている。結果的に EPR 効果によって腫瘍組織に集積していくことになる。PEG 修飾リポソームは、各試薬のモル比が DSPC : DSBL (25%) : Cholesterol : PEG DSPE-020CN = 0.75 : 0.25 : 1 : 0.11 になるように秤量し調製に用いた。その後、同様のラベル化法で PEG 修飾リポソームに蛍光ホウ素脂質をラベル化し、蛍光ホウ素ナノデバイスの完成とした。同様に、比較として蛍光脂質 PKH を用いてポストインサーション法により調整した。

蛍光ホウ素ナノデバイスをマウス大腸がん由来細胞 Colon 26 をマウスに移植した担がんマウスモデルに静脈注射した。今までに DSBL リポソームにおけるホウ素の腫瘍内蓄積濃度が一番高かったのは 36 時間後であることを見出している。このことより静脈注射をしてから 36 時間後に臓器を取り出し、組織切

片 (厚さ 10 μ m) を作製した。まず、ビーカーにヘキサンを入れ、液体窒素が入った容器に入れた。一方では、プラスチックの容器 (25 mm \times 30 mm \times 5 mm) に透明で粘着性のある凍結コンパウンドを少し入れた。そこにマウスから取り出した臓器を置き、その上から再び、空気や毛が入らないように注意しながら凍結コンパウンドを入れた。そして、プラスチックの容器ごと冷えているヘキサンに入れ凍結コンパウンドごと臓器を凍らせた。そして、クリオスタット HM560M を用いて切片を作製し、スライドガラスに乗せ観察に用いた。観察に使わない試料は冷凍庫に保存した。

(3) ホウ素ナノデバイス封入用ホウ素薬剤の開発

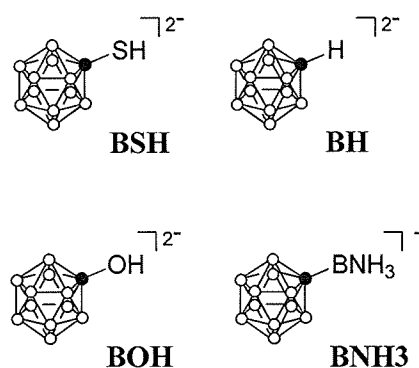


図3 ホウ素ナノデバイス内封ホウ素薬剤の構造

20 年度の研究成果から、ホウ素脂質 DSBL を 10% 含有のホウ素ナノデバイスが最も高い血中滞留性を示すことが分かったため、より高濃度ホウ素デリバリーのためには、さらにホウ素薬剤の内封が重要であること示唆された。したがって、図3に示すようなホウ素イオンクラスターについて合成を行い、それぞれの薬理活性について検討した。

(4) ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの開発

ヒアルロン酸 (1, 100kDa) に対し、エチレンジアミンを重量比 1:1 で混合し、得られたカチオン性ヒアルロン酸をホウ素ナノデバイスと様々な混合比で処理した後、その膜ゼータ電位を測定した。得られ

た、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスに対し、ヒアルロン酸レセプターである CD44-IgG chimera をプレートに固相化し、各種ホウ素製剤の FITC 標識ヒアルロン酸とプレートの結合の阻害率を測定した。

次にマウス中皮腫細胞株 AB22 を 8E6 個/100mL マウス胸腔内に接種し、7 日目に各種ホウ素製剤 10 mgB/kg を胸膜中皮腫モデルマウスの胸腔内に注入し、24 時間後の血液、腫瘍、患側肺のホウ素濃度を測定し、各種ホウ素製剤の濃度を算出した。

C. 研究結果

1、蛍光標識ホウ素脂質の開発とナノデバイス化の検討

BSH 誘導体の合成は文献既知法に従って合成を行った。チオウレア 11 に臭素、塩酸を反応させて化合物 12 とし、合成しておいた $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{12}$ を入れ、塩化セシウムと反応させることによりセシウム塩の化合物 13 を合成した。続いて水素化ホウ素ナトリウム、水酸化ナトリウムと反応させた後、塩化セシウムを用いてセシウム塩の BSH 14 とした。そして、ナトリウム塩の BSH 15、テトラメチルアンモニウム塩の BSH 4 を経た後、ブロモプロピオンニトリルを用いて二つのニトリル鎖が導入された化合物 16 を合成した。最後にテトラメチルアンモニウムヒドロキッドで一つのニトリル鎖を除いて目的化合物 3 を得た(図 4)。

また、化合物 6 の合成は 20 年度に報告した不飽和ホウ素脂質の合成法に従って行った。試薬である (S)-(+)-1, 2- イソプロピリデングリセロールを出発物質とし、この化合物とステアリン酸のエステル化を行い、続いてアセタール保護を脱保護とした後、第一級アルコールを TBS 保護した化合物 6 の合成に成功した。

蛍光色素の導入は次のように行った。12-アミノラウリン酸 10 と NBD-クロリド 9 を反応させ化合物 7 を得た。この化合物と先に合成した化合物 6 とのエステル化を行い、そして TBS 保護の脱保護を行った後、ブロモアセチルブロマイドと反応させてブロモアセテート体 2 を合成した。そして BSH の誘導体 3

とカップリングさせたのち、最後にカリウム *t*-ブトキシドでニトリル鎖を除いて、蛍光標識ホウ素脂質 FL-SBL の合成に成功した。

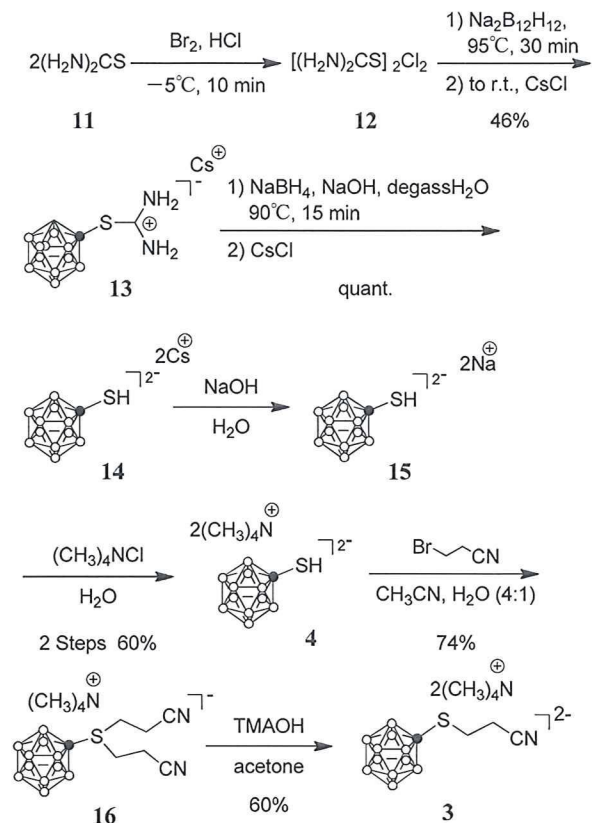


図 4 活性化 BSH の合成

(2) 蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの開発と生体内挙動解明

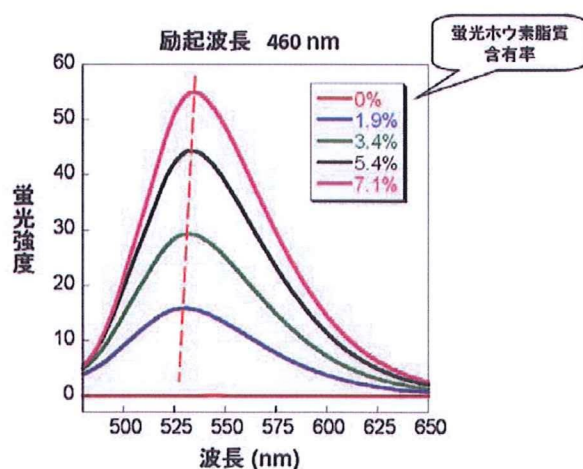


図5 蛍光ホウ素脂質の各含有率における蛍光強度

蛍光ホウ素脂質の含有率依存的に蛍光強度は変化した。また、各含有率における蛍光強度の極大値を見ると、蛍光ホウ素脂質の含有率が高いほど、長波長側にシフトしていることがわかる。これは、含有率が高いほど脂質二分子膜の密度が高くなり、分子間相互作用が大きくなっていることが考えられる。その結果、励起エネルギーに影響を与えていると推測される。

次に、PKH 脂質のみをヒト子宮頸がん由来の細胞である HeLa 細胞に処理 (1 時間) し、蛍光顕微鏡で観察した。図 6 に示すように、PKH のみでは細胞膜上に存在することがわかった。そして、PKH を用いて調製したリポソームを HeLa 細胞に処理 (12 時間) したところ、細胞質に粒子の状態が存在することが観察できた。

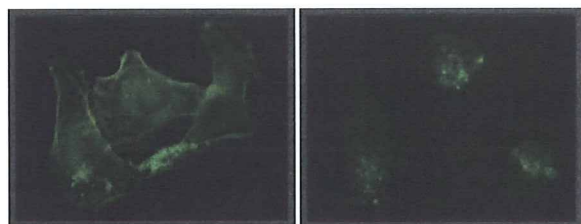
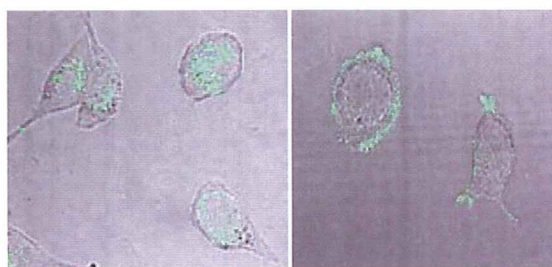


図6 細胞膜に存在する PKH(左)と細胞質に取り込まれた蛍光リポソーム(右)

この細胞内への取り込みがエンドサイトーシスによるものかどうか確かめるために、熱的にエンドサイトーシスが起らない条件であるナトリウムアジド存在下、4 度で同様に PKH を用いて調製したリポソームを colon26 細胞に曝露したところ、図 7 (右) に示すように細胞膜上に蛍光が見られた。37 度では、細胞質に蛍光が見られることから、蛍光ホウ素リポソームは、エンドサイトーシスにより細胞質に取り込まれていることが分かった。

図7 ホウ素ナノデバイスの細胞内取り込み機構
Colon 26 細胞:37 度 (左)と 4 度+ナトリウムアジド (右)

そこで、腫瘍深部の切片を蛍光顕微鏡で観察した (図 8)。図の左が蛍光顕微鏡で観察したもの、右が明視野顕微鏡で観察した図と左の図を重ね合わせたものである。蛍光リポソームが Colon 26 移植マウスの腫瘍内で観察することができた。

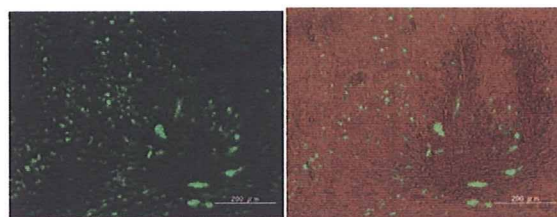


図8 大腸がん細胞 Colon 26 移植マウスの腫瘍深部切片

次に、蛍光ホウ素脂質 FL-SBL と調製したリポソームをそれぞれ HeLa 細胞に処理 (脂質 ; 1 時間、リポソーム ; 12 時間) し蛍光顕微鏡で観察した (図 9)。PKH のときと同様に、脂質のみでは細胞膜上に存在するのに対し、蛍光ホウ素ナノデバイスは細胞質に粒子の状態で見られた。

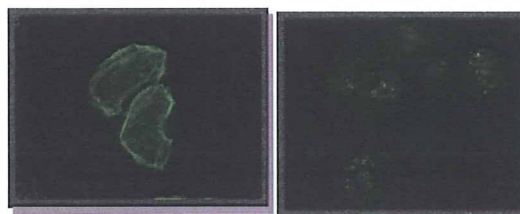


図9 細胞膜に存在する蛍光ホウ素脂質(左)と細胞質に取り込まれた蛍光ホウ素ナノデバイス(右)

また、蛍光ホウ素リポソームにおいても同様の方法

で切片を作製し、腫瘍深部を蛍光顕微鏡で観察した(図10)。図の左が蛍光顕微鏡で観察したもの、右が明視野顕微鏡で観察した図と左の図を重ね合わせたものである。蛍光ホウ素リポソームが Colon 26 移植マウスの腫瘍内に存在していることが観察できた。

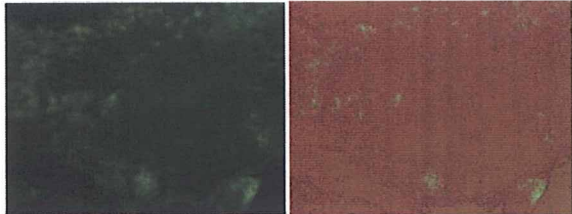


図10 大腸がん細胞 Colon 26 移植マウスの腫瘍深部切片

しかしながら、蛍光寿命が短いため、より詳細な組織学的検討には FL-SBL を使用することは適していないことが示唆されたため、蛍光脂質 PKH を用いてモデル実験にて検討した。PKH 標識リポソームを用いて、腫瘍組織内での分布について調べた。その結果、図11に示すように、PKH 標識リポソーム(緑)は血管内皮細胞マーカーである PECAM-1 (赤)の周辺に局在化していることが明らかとなった。このことから、腫瘍組織内で血管から漏れ出て、その周辺に分布していることが分かる。

腫瘍組織においては、増殖が盛んなため、常に栄養・酸素を必要としている。そのような条件下では、腫瘍血管から離れた部位は、低酸素状態となっており、そのような条件で活性化される HIF (低酸素誘導因子) -1 は、新生血管などを誘導し、がんの悪性化や転移に深くかかわっている。したがって、低酸素状態にあるがん細胞を如何にして効率よく殺傷するかががん治療には重要となっている。そこで、低酸素条件下で集積する HIF-1 タンパクを免疫染色した。図12に示すように、PKH 蛍光リポソームは、低酸素状態にある部位にまで到達していないことが分かってきた。このことは、ホウ素脂質ナノデバイスにさらにホウ素薬剤を内封させることで、間質などを經由してホウ素薬剤を低酸素領域まで送達させる必要があることを示唆するものである。

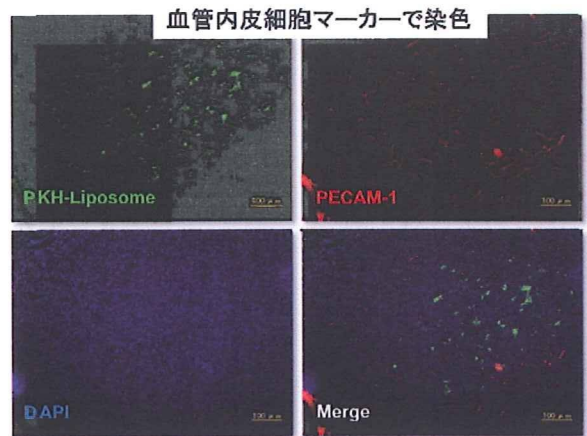


図11 大腸がん細胞 Colon 26 移植マウスの腫瘍深部切片。血管内皮細胞マーカー(PECAM-1)で免疫染色

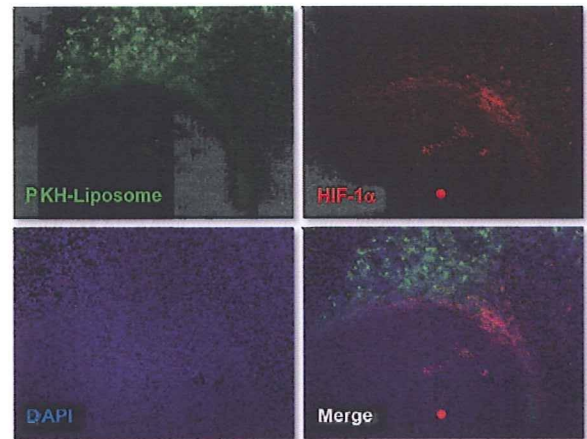


図12 大腸がん細胞 Colon 26 移植マウスの腫瘍深部切片 低酸素マーカー(HIF-1)で免疫染色

(3) ホウ素ナノデバイス封入用ホウ素薬剤の開発

図3に示した各種ホウ素イオンクラスターについてマウス大腸がん細胞 (colon 26) に対する細胞成長阻害活性をMTT法にて調べた。図13に示すように、ホウ素クラスターアミンである BNH3 がもっとも低毒性であり、その50%細胞成長阻害濃度は32.9 mMと、現在臨床に用いられている BSH の2.4 mM に対し、約10倍以上毒性が低いことが分かった。

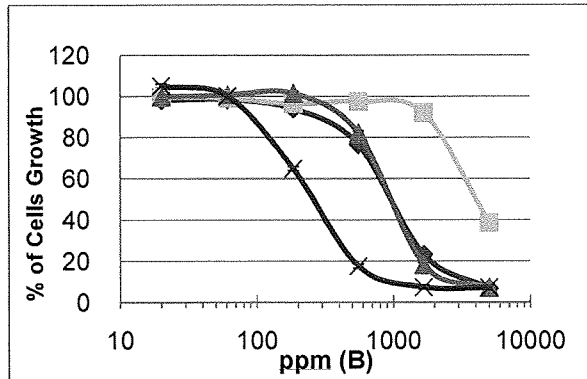


図 13 内封ホウ素薬剤のマウス大腸がん細胞に対する細胞成長阻害活性、×=BSH; ▲=BH; ◆=BOH; ■=BNH3

(4) ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの開発

ヒアルロン酸 2 mg/mL や CD44 の中和抗体である BRIC235 をこの実験系で FITC 標識ヒアルロン酸と混合すると CD44-IgG chimera との競合がおり、BRIC235 やヒアルロン酸では標識ヒアルロン酸のプレートへの結合性は阻害される。そこで、各種ホウ素製剤を標識ヒアルロン酸とともに CD44-IgG chimera 固相化プレートに添加すると、2 mg/mL のヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスは、他のホウ素製剤に比し、有意に標識ヒアルロン酸と CD44-IgG chimera との結合を阻害した。

次に各種ホウ素製剤を胸膜中皮腫モデルマウスの胸腔内に注入し、24 時間後の血液、腫瘍、患側肺のホウ素濃度を測定し、各種ホウ素製剤の濃度を算出した。腫瘍内ホウ素濃度は、DSBL で 24.41 ppm、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスで 8.38 ppm と高い値を示した。一方、T/N 比は、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスで 6.46 と非常に高い値を示した。

D. 考察

ホウ素ナノデバイスの生体内挙動および分布を組織学的に追跡することは、臨床応用を視野に入れた場合非常に重要となる。21 年度は、蛍光標識化ホウ素ナノデバイスの作成として、蛍光標識部位を有する

ホウ素脂質 (FL-SBL) ならびに一般的にリポソーム蛍光標識脂質である PKH を用いて研究を進めた。ホウ素脂質は蛍光発色部位を導入することで、生体内で追跡可能であることが、*in vitro* および *in vivo* 実験で明らかとなった。しかしながら、FL-SBL は蛍光寿命が PKH に比べて短いため、免疫染色による組織学的分析には適していないことが分かった。しかし、FL-SBL はその脂質分子内にホウ素クラスター部位と蛍光部位を有することから、生体内におけるホウ素脂質の代謝機構について解明できる可能性があり、今後検討してゆきたい。

蛍光標識リポソームを用いた組織学的解析の結果、ホウ素ナノデバイスはそれ自身では、腫瘍血管周辺組織へ集積するものの、がんの悪性化に深くかかわっている低酸素領域へは送達されていないことが明らかとなった。20 年度の研究結果より、ホウ素脂質リポソームの方が BSH 内封 DSPC リポソームよりも効率よく腫瘍組織に集積することが分かっている。このことから、ホウ素脂質とホウ素薬剤内封によるホウ素ナノデバイスを新たに開発検討することで、ホウ素薬剤のコントロールリリースによりこれらの低酸素領域へのホウ素デリバリーが可能となると考える。また、これまでは、リポソーム内封薬剤には BSH が主に検討されてきたが、21 年度の研究の結果、アミン体である BNH3 が毒性が最も低く、有効であることが見出されたことは、重要である。

ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスは、20 年度に開発検討を行い、エチレンジアミンの添加量を 0.5 当量以下に抑えることが重要であることが分かった。21 年度は、このヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスを用いて *in vitro* ならびに *in vivo* 実験を行ったが、*in vitro* では CD44 受容体依存的にヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスが取り込まれることを明らかにした。さらに、胸膜中皮腫モデルマウスの胸腔内に注入し、24 時間後の血液、腫瘍、患側肺のホウ素濃度を測定した結果では、ホウ素濃度が 10mg/kg 投与において、腫瘍内ホウ素濃度が 24.41 ppm、正常肺との T/N 比は 6.43、さらに血液中ホウ

素濃度とのT/B比は17と目標値の5以上をいずれも達成した。アスベストにより発症する中皮腫の患者数は今後増加することが予想される。中皮腫に高発現している CD44 のリガンドがヒアルロン酸であることから、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスは、非常に有効な治療法を提供できると考えられるため、中皮腫モデル動物での BNCT 効果を明らかにしてゆきたい。

E. 結論

本年度は、生体内でのホウ素ナノデバイスの挙動ならびに組織学的解析を行い、BNCT に最適なホウ素ナノデバイスの最終的な開発として、ホウ素薬剤内封によるホウ素ナノデバイスの臨床に向けた研究を22年度に行うこと具体的計画が定まった。またトランスフェリン修飾型ホウ素ナノデバイスのGMPレベル製造法を研究分担者の丸山と共同で確立できた。一方で、CD44 をターゲットとしたヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの胸膜中皮腫モデルマウスによる高い選択的集積性に関するデータも得られた。22年度は、京都大原子炉ならびに原研 JRR4 がいずれも稼働することから、各分担研究者と討議を重ね、動物の中性子照射実験による有効性データの検証と臨床化への道筋を立てたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) closo-Dodecaborate Lipid Liposomes as New Boron Delivery Vehicles for Neutron Capture Therapy of Cancers.
M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, Y. Kaneda, A. Matsumura, H. Nakamura, **Bioorg. Med. Chem.** 18, 3059-3065 (2010).
- 2) New Strategy for Synthesis of

Mercaptoundecahydrododecaborate Derivatives via Click Chemistry: Possible Boron Carriers and Visualization in Cells for Neutron Capture Therapy.
M. E. El-Zaria, H. Nakamura, **Inorg. Chem.** 48(24), 11896-11902 (2009).

- 3) Discovery of carboranes as $\beta 1$ and $\beta 2$ activators of 20S proteasome.
H. S. Ban, H. Minegishi, K. Shimizu, M. Maruyama, Y. Yasui, H. Nakamura, **ChemMedChem**, in print.
- 4) Development of Boron Nano Capsules for Neutron Capture Therapy. H. Nakamura, M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, K. Tsuruta, Y. Kaneda, A. Matsumura, **Appl. Radiat. Isotope**, 67, S84-S87 (2009).
- 5) Liposomal Boron Delivery for Neutron Capture Therapy.
H. Nakamura, In *Methods Enzymology, Liposomes, Part G*; Nejat, D. Ed. Academic Press, Vol. Volume 465, 179-208 (2009).

2. 学会発表

- 1) がん中性子捕捉治療のための次世代ホウ素デリバリーシステム
中村浩之、第4回 医薬品原料 国際展 ファーマジャパン、招待講演、東京、2009年7月1-3日
- 2) 次世代 DDS 型中性子捕捉治療に向けたホウ素ナノデバイスの開発
中村浩之、第25回DDS学会学術集会、招待講演、東京、2009年7月3-4日
- 3) ホウ素ナノカプセルの生体内イメージング
○中村浩之、上田記子、田崎理沙、潘 鉉承、白石貢一、横山昌幸、米谷芳枝
第6回日本中性子捕捉療法学会学術大会、京都、2009年9月19-20日
- 4) 不飽和アシル鎖ホウ素脂質による新規 DDS ナノキャリアーの開発
○猪俣竜、上野学、Mohamed E.、潘 鉉承、鈴木亮、丸山一雄、中村浩之
第6回日本中性子捕捉療法学会学術大会、京都、

別紙 3

2009年9月19-20日

- 5) Liposomal Boron Delivery System For Neutron Capture Therapy
H. Nakamura, Young Researchers BNCT Meeting in Mainz 2009, Mainz (ドイツ)、2009年9月29日-10月2日
- 6) ホウ素の創薬化学
中村浩之、中央大学理工学部セミナー、依頼講演、東京、2009年9月19-20日
- 7) ホウ素の特性を活かした創薬研究
中村浩之、第28回メディシナルケミストリーシンポジウム、招待講演、東京、2009年11月25-27日
- 8) DDS型ホウ素デリバリーシステム開発
中村浩之、東京工業大学BNCT薬剤開発研究会、依頼講演、東京、2010年3月18日
- 9) ホウ素の中性子捕捉反応を利用した低侵襲細胞選択的放射線療法
○中村浩之、日本薬学会第130回年会シンポジウム「異分野技術の融合による次世代の医療基盤技術の構築に向けて」、オーガナイザー、岡山、2010年3月28-30日
- 10) 蛍光標識ホウ素ナノカプセルの開発と細胞内イメージング
○上田記子、潘鉉承、中村浩之、日本薬学会第130回年会、岡山、2010年3月28-30日
- 11) BNCTにおける薬剤開発の現状と展望
中村浩之、第2回放射線・粒子線応用研究会、招待講演、東京、2008年11月13日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）
分担研究報告書

ホウ素ナノデバイスの脳腫瘍適応に関する研究

研究分担者 国立大学法人 筑波大学人間総合科学研究科 松村 明 教授

研究要旨

中性子捕捉療法は、細胞選択性を有する放射線治療の概念である。新規ホウ素化合物の開発は、適応拡大、治療効果の向上のために必要な研究開発のひとつに位置づけられる。悪性脳腫瘍におけるホウ素中性子捕捉療法の臨床研究は、本邦が世界に先がけて良好な成績を報告している。しかし腫瘍の再発は免れず、これは悪性脳腫瘍の浸潤性及び放射線抵抗性によるものと考えられる。成績向上のための基礎的検討として、ホウ素化合物代謝への介入的治療効果改善、ホウ素ナノ粒子の薬物動態、治療成績検討を見据えた実験系を確立し照射治療実験の前試験をおこなった。

A. 研究目的

悪性脳腫瘍はホウ素中性子捕捉療法の適応疾患として臨床研究がおこなわれている。神経膠芽腫に代表される悪性脳腫瘍は、その浸潤性と放射線抵抗性により、きわめて予後不良な疾患であり、手術加療、放射線治療、化学療法をもちいた集学的治療を行っても治癒は得難い。ホウ素中性子捕捉療法は、浸潤する腫瘍細胞に対して選択性をもち、理論上浸潤細胞を対象とした治療で、臨床研究が行われ、その生存期間の延長効果が本学から報告されている。しかし、いずれも治癒には至らず、再発や播種を生じている。ホウ素化合物の細胞選択性をさらに向上することは、浸潤細胞への線量を増加させ、治療効果を延長することを期待できる。新規ホウ素化合物を用いた実用化研究を行うに当たり、現時点でのおもな問題点は、①腫瘍/正常 ホウ素濃度比率が十分でないこと、②浸潤能を有する脳腫瘍モデルが小動物で十分確立されていないこと、③さらに浸潤部分での薬物動態を腫瘍塊をわけて解明することが難しいことである。そこで、本研究平成21年度においては、**1新規ナノ粒子の腫瘍内動態の解析**、**2thiol化合物であるグルタチオンを用いたホウ素化合物代謝の修飾**により、腫瘍/血液比の向上を図る手段の探索、

これまで確率したラット脳腫瘍モデルを中心に、**3** 蛍光を用いたホウ素ポルフィリン化合物の検出方法、**4. 新規ホウ素化合物の合成**を合わせて検討した。

B. 研究方法

1 新規ナノ粒子の腫瘍内動態の解析

まずマウスグリオーマ細胞を用いた皮下腫瘍モデルで解析を行った。20mg/kg 40mg/kg の投与を尾静脈より行い、24, 36, 48, 72 時間で各組織の濃度を ICP-AES で計測した。

2 thiol 化合物であるグルタチオンを用いたホウ素化合物代謝の修飾：ラット（フィッシャー344）腹腔内に BSO を 5 mmol/kg 投与し、0, 3, 6, 12, 24 時間後の組織内 GSH を測定した。同様に、尾静脈より BSH を 100mg/kg 投与し、組織内 GSH の経時変化を測定した。各組織（脳、筋肉、肝臓）は 5% スルホサリチル酸（SSA）0.8 ml 中でホモジナイズし、8000×g、4℃ で 10 分間遠心し、上清をサンプルとした。血液は、ヘパリン採血し、1000×g、4℃で 10 分間遠心して血球を分離し、4 倍量の 5% SSA を加えて溶血させ、8000×g、4℃ で 10 分間遠心した上清をサンプルとした。（n=3）グルタチオン測定は、Total Glutathione Quantification Kit（株）同仁化学研究所）を使用した。

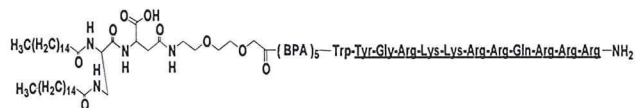
3 蛍光を用いたホウ素ポルフィリン化合物の検出方

法：(細胞実験) ヒトおよびラットグリオーマ細胞をあらかじめ滅菌した 96well 黒プレートで培養する。ホウ素ポルフィリン化合物 (EC032) を培地中に添加し、経時的に細胞破碎液を回収した。これをプレートリーダーで計測した。また同一サンプルを、細胞計数のうえプラズマ発光分析を行い、ホウ素濃度を測定した。これらの値は相対蛍光強度と、ホウ素濃度の相関を検討した。(組織濃度測定実験) ラット脳腫瘍移植モデルを用い、9 L、C 6 ラットグリオーマ細胞をラット脳内に移植した。ホウ素ポルフィリンを投与し、24 時間後に組織を摘出し、超音波破碎のち遠心し、破碎上清を得て、蛍光測定および ICP ホウ素濃度測定を行った。

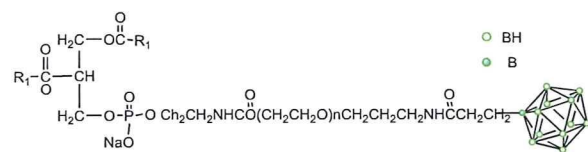
4. 新規ホウ素化合物の合成

3 種類の異なるアミノ酸誘導体と 2 つの脂肪酸から成る新規リン脂質類似体 (リポペプチド) を Fmoc 固相合成法により合成し、さらに優れた膜透過性を有する HIV-TAT を表面修飾したホウ素含有のペプチド修飾リポソームの開発を行った。

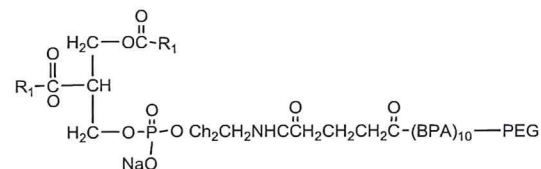
a. B5-TAT-lipopeptide



b. DSPE-PEG-BSH



c. DSPE-B10-PEG



リポソームへの新規脂質アナログの修飾

B5-TAT-lipopeptide を下記処方 で混合し、作製した Liposome をサイズ排除クロマトグラフィーにより、

Liposome 画分、micelle 画分、単分子画分に分離し Lipopeptide の含量を定量した。蛍光分光光度計により Lipopeptide の指標である Trp を測定した。

	DSPC	Cholesterol	DSPE-PEG2000	Bn-TAT-peptide
B5-TAT5%				
PEG-liposome	45	45	5	5
B5-TAT10%				
PEG-liposome	42.5	42.5	5	10

マウス大腸がん細胞を用いたホウ素濃度の検討

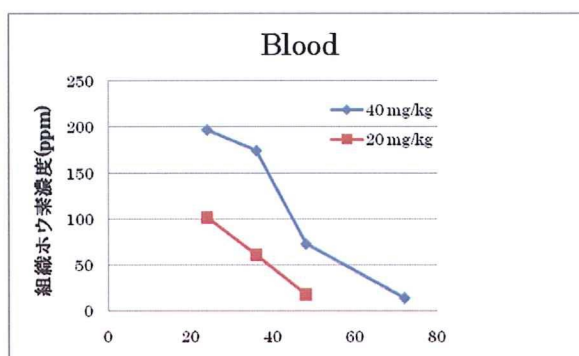
マウス大腸癌細胞を 24 時間培養後、各種処方のリポソームを添加し、37°C、2 時間培養後上清を除き、ICP-AES によりホウ素イオン濃度を測定した。

	DSPC	Cholesterol	DSPE-PEG2000	Bn-TAT-peptide
PEG liposome	47	47	6	-
B5-TAT5%				
PEG-liposome	45	45	5	5
B5-TAT10%				
PEG-liposome	42.5	42.5	5	10

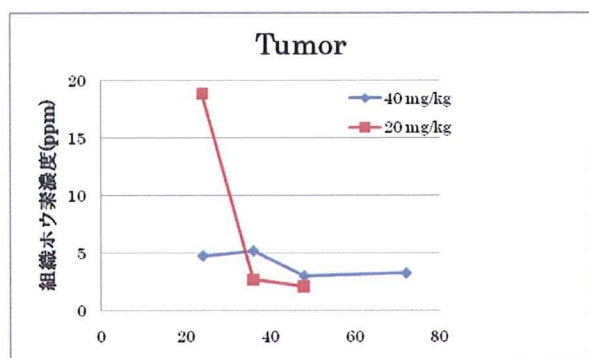
C. 研究結果

1 新規ナノ粒子の腫瘍内動態の解析

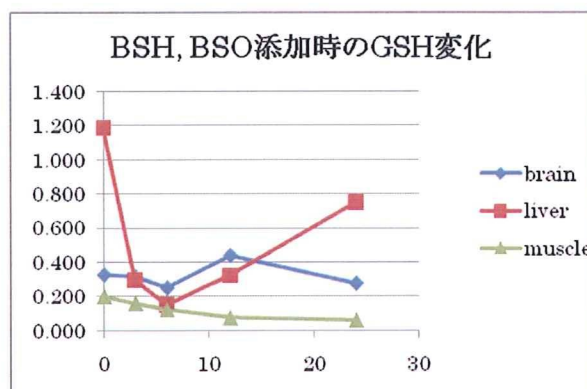
新規ナノ粒子は、安全性は少なくとも 40mg/kg の用量で急性期毒性は観察されなかった。また、血液滞留性は 1 時間から 24 時間までは 20mg/kg 投与で少なくとも 70 ppm の血中ホウ素濃度を維持しており、また 40mg/kg 投与群では 200ppm をこえる濃度を得た。



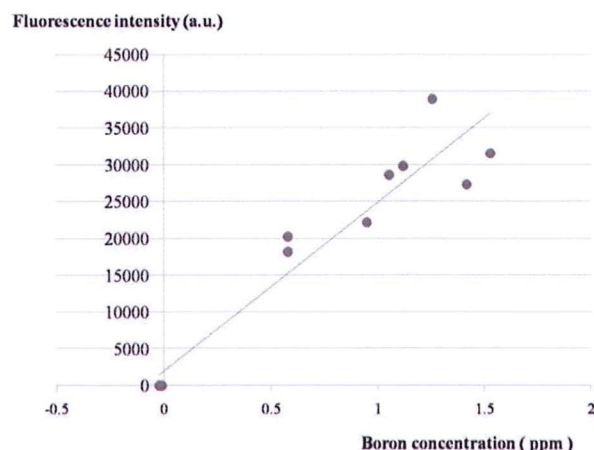
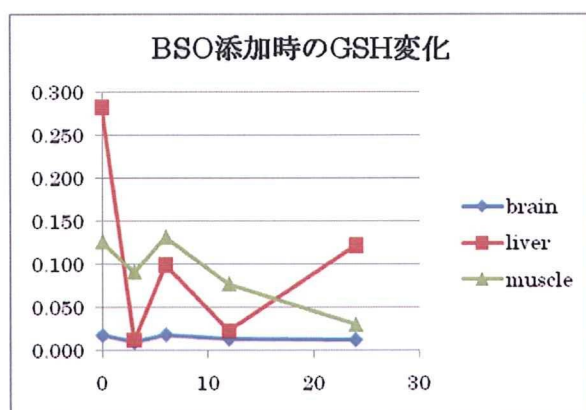
一方で腫瘍内ホウ素濃度は、20mg 投与群の 24 時間値で 20ppm 前後と高値をしめしたものの、その後は数 ppm まで速やかに低下する様子が見て取れた。



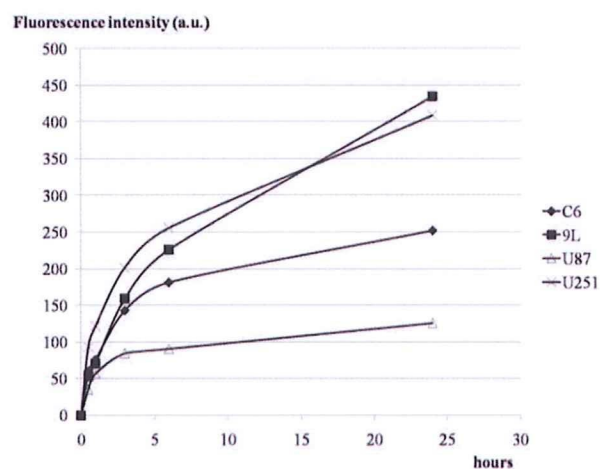
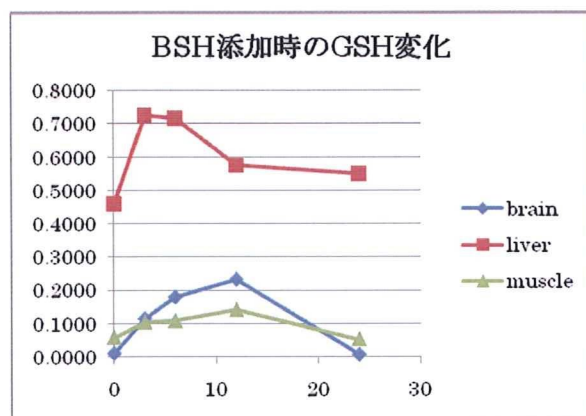
2 thiol 化合物であるグルタチオンを用いたホウ素化合物代謝の修飾：図のように、BSH 添加後、組織中グルタチオン濃度が上昇する傾向が見られた。また BSO 添付によって組織中グルタチオン濃度は低下する傾向を示した。血球中グルタチオン濃度には、あまり大きな変化が見られなかった (data not shown)。



3 蛍光を用いたホウ素ポルフィリン化合物の検出方法：(細胞実験)



蛍光相対強度 (Y軸) とホウ素濃度 (ppm, X軸) 相関係数 $R=0.95$ と良好な相関を示した。したがって比較的簡便な蛍光測定法でホウ素ポルフィリン化合物の動態観察が可能であると考えられる。



また、各種細胞で蛍光強度の経時変化をみたところ、24 時間までは細胞内でのポルフィリン化合物濃度を示すと思われる蛍光強度の上昇をみとめた。

(組織実験)

比較対象としたポルフィリン化合物の Talaporfin Sodium (ホウ素は含有されていない) では、コントロールと比較して鋭敏な化合物由来と考えられる蛍光が観察されたが、他のホウ素化合物では、自家蛍光 (500nm) および長波長側での蛍光がより強く観測され、化合物由来と考えられる蛍光をうまく検出できなかった。

4 新規ホウ素化合物の合成

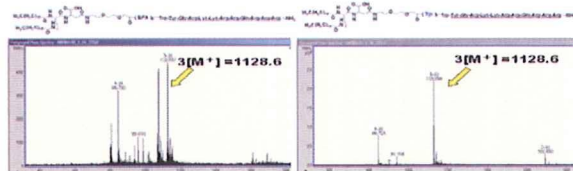
Liposome は EPR 効果により腫瘍に集積する。癌組織は正常組織と異なり、血管透過性が亢進しており、EPR 効果により、サイズを 100nm 前後に調整することで腫瘍血管からは漏出し、腫瘍へと集積する。このメカニズムを利用し、血中滞留性をあげることで、腫瘍内ホウ素濃度を向上させる目的で開発を行った。

B5-TAT-lipopeptide の合成

上記新規脂質アナログの合成に mg 単位、純度 90%以上で成功した。同定は H1-NMR、ESI-MS により行った。

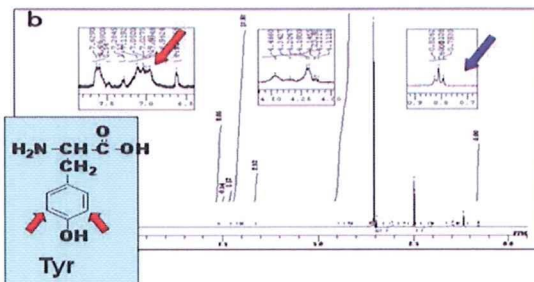
a. ESI-MS

B5-TAT-lipopeptide をヒドロホウ素化により過酸化水素で処理し、BPA 部分がチロシンの化合物と比較することで検討した。結果、同様に 3 価のピーク 1128 を得た。



b. H1-NMR

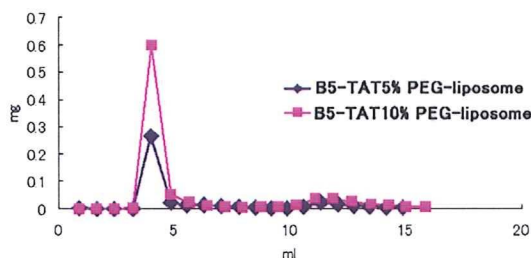
ペプチドの特徴的シグナルであるチロシン位の 2H に対するアシル鎖末端メチル基の 6H の比よりカップリング収率を算出することで同定を行った。



その他 2 種類の脂質アナログに対しては、現在合成中ではあるが、mg 単位での合成を目指した量的問題から引き続き試行中である。

リポソームへの新規脂質アナログの修飾

約 70%の収率で Lipopeptide がミセル、単分子状態に優先して Liposome 中に存在することが明らかとなり、ペプチド修飾 Liposome が構築されていると考えられた。



また、Lipopeptide を 5~10mol%で修飾し得られた liposome の粒子径とゼータ電位を測定した。粒子径は 100nm 前後を示し、ゼータ電位はカチオン性ペプチドである TAT の修飾率増加に相関して増加したことより、lipopeptide の存在を確認された。

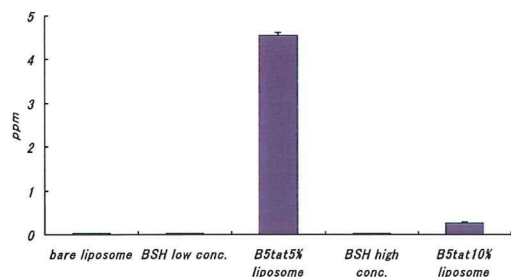
DSPC/Chol/DSPE-PEG/B-TAT (molar ratio)	Particle size (nm, n (G2))	Zeta potential (mV)
Plain liposome 50 / 50 / 0 / 0	147	-40
PEG liposome 47 / 47 / 6 / 0	143	-15
B3-TAT lipopeptide liposome 45.5 / 45.5 / 5 / 5	120.3	17.5
B5-TAT lipopeptide liposome 42.5 / 42.5 / 5 / 10	101.3	20.7
B5-TAT lipopeptide liposome 45.5 / 45.5 / 5 / 5	105.9	21
B5-TAT lipopeptide liposome 42.5 / 42.5 / 5 / 10	147.8	26.4

マウス大腸がん細胞を用いたホウ素濃度の検討

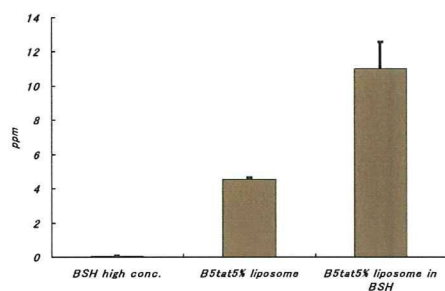
B5-TAT5% で調整された liposome は control として用

別紙 3

いた BSH 溶液の 156 倍の取り込み効率およびホウ素濃度向上が見られた。



また、B5-TAT5% liposome に BSH を封入したリポソームにおいては、さらなるホウ素濃度向上が見られた。



D. 考察

1 新規ナノ粒子の腫瘍内動態の解析

BSH を内包することで、血中濃度を高く保つことには成功しているが、グリオーマ細胞の腫瘍塊では、治療濃度にはいたらなかった。正常脳濃度との比 T/N (brain) で検討すると、40mg/kg 群の TN 比は 772 時間で 12 であった。20mg/kg では 36 時間では 7 と高値を示し、passive targeting の効果を見ているものと考えられた。一方で BSH は培養細胞に溶液を添付した場合、細胞中から早期 (30 分から一時間程度) で一定濃度まで wash out される。(data not shown) このため、ナノカプセルが組織内で degradation された場合には、蓄積されずに wash out されることも考えられ、BSH 内封の利点が薄れる可能性がある。

2 thiol 化合物であるグルタチオンを用いたホウ素化合物代謝の修飾

いずれも肝臓では 24 時間値は正常に復する傾向となった。BSH 添加時の GSH 変化は、24 時間でほぼ 0 時間と同等に復した。これらは、BSH の細胞内での wash out が早いことを示唆する。

3 蛍光を用いたホウ素ポルフィリン化合物の検出方法

細胞実験においては、培地を洗浄することで、比較的良好な蛍光の検出が可能であった。一方組織あるいは生体における分布を蛍光で検出するためには、バックグラウンドの自家蛍光と、検出波長を検討する必要がある。また、絶対濃度を計算するには、その都度コントロールとして組織破碎上清を用いる必要がある。

4 新規ホウ素化合物の合成

今回 B5-TAT-liposome の開発により、臨床へと応用可能な新たな新規ホウ素化合物となる可能性を見出すことができた。今後 in vivo における安全性、薬物動態を明らかにし、さらなる検討の必要があると考えている。また、腫瘍選択性を持たせた化合物・リポソームの開発により幅広い腫瘍へと応用が可能である。以上より本リポソームが BNCT において良好な治療効果を期待でき、様々な応用が可能な薬剤であることが示唆された。

E. 結論

- 1 新規ナノ粒子の腫瘍内動態の解析、
 - 2 thiol 化合物であるグルタチオンを用いたホウ素化合物代謝の修飾
 - 3 蛍光を用いたホウ素ポルフィリン化合物の検出方法、
 4. 新規ホウ素化合物の合成
- を行った。単分子の化合物は探索されてすでに 40 年が経過しているが新規リード化合物となりうるものは出現していない。したがって将来 BNCT 用薬剤として発見、研究開発される可能性は低く、本研究のようなナノ粒子を用いた方策が実用化に近いと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

[論文]

1. Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Aburai K, Kawatobi S, Tsurubuchi T, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Okuno H, Matsumura A: Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT. Appl Radiat Isot 67: 88-90, 2009
2. Tsurubuchi T, Yamamoto T, Nakai K, Zaboronok A, Yoshida F, Miyakawa M, Shirakawa M, Yamamoto Y, Matsuda M, Matsumura A. Intracellular uptake of a new boronated porphyrin EC032. Appl Radiat Isot. 2009 Jul;67(7-8 Suppl):S94-6.

[学会発表]

1. 中井 啓、白川 真、吉田文代、鶴淵隆夫、Alexander Zabornok、山本陽平、山本哲哉、横山祐作、松村 明:ホウ素中性子捕捉療法のための新規ホウ素リポソームの開発 第 68 回 日本脳神経外科学会総会 2009/9
2. 白川 真、松村 明:膜透過性ペプチド修飾リポソームのBNCTへの展開 第 6 回日本中性子捕捉療法学会 2009/9/19-20
3. Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Yoshida F, Tsurubuchi T, Matsuda M, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Matsumura A: Evaluation of a novel liposome modified membrane permeability peptide for BNCT. Young Researchers BNCT meeting 9/29-10/2 Mainz
4. 中井 啓、鶴淵隆夫、白川 真、山本哲哉、吉田文代、松村 明、中村浩之:ホウ素ポルフィリン化合物の組織内濃度測定 専門研究会「中性子線と粒子線の総合的医療利用」2009/2/7

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進事業）
分担研究報告書

ホウ素ナノデバイスの中皮腫適応に関する研究

研究分担者 李 千萬 大阪大学医学部附属病院未来医療センター・学部内講師

研究要旨

胸膜中皮腫に対する BNCT の臨床応用の推進と治療効果の向上を目指し、これまでにマウス胸膜中皮腫モデルを作製し、胸膜中皮腫に豊富に発現する CD44 を標的としたヒアルロン酸ホウ素ナノデバイス (HA-BSH) の合成を行った。HA-BSH は、CD44-IgG chimera 固相化プレートへの蛍光標識ヒアルロン酸の結合を CD44 中和抗体やヒアルロン酸と同様に有意に阻害した。マウス胸膜中皮腫モデルにおける腫瘍への親和性は、既存のホウ素製剤 (BSH) 3.6 ppm, HA-BSH 8.4 ppm, ホウ素脂質 DSBL 24.4 ppm、T/N 比は、BSH 0.85, HA-BSH 1.5, DSBL 6.5、T/B 比は、BSH 6.9, HA-BSH 15.4, DSBL 17.7 であり、DSBL で高い腫瘍内濃度、T/N 比、T/B 比を認めた。一方、HA-BSH では、BSH よりも高い腫瘍内ホウ素濃度を得たが、結合ヒアルロン酸の CD44 リガンドの生体内での賦活化や正常肺組織への集積の回避などの工夫が必要であると考えられた。今後、動物モデルでの詳細な生体内分布の検討と照射実験を行う予定である。

A. 研究目的

胸膜中皮腫は、アスベスト暴露後に発症する腫瘍で、労働災害疾患としてだけでなく、2005 年の工場周辺住民への被害報告以降、非常に社会的関心の強い、悪性腫瘍である。治療は化学療法を基本とする集学的治療を行うが、手術可能例は少なく、また、放射線療法は肺臓炎を惹起することから限定されており、予後不良である。これまでに京都大学原子炉実験所にて胸膜中皮腫に対するホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) が 1 例行われており、呼吸器障害などを認めなかったことから、胸膜中皮腫に対する画期的治療法となる可能性が分担研究者である鈴木らにより報告されている。本研究においては、胸膜中皮腫に対する BNCT の効果を向上させ、BNCT の胸膜中皮腫への適応拡大を進めるために、胸膜中皮腫細胞を標的としたナノデバイス製剤の開発研究を行う。

B. 研究方法

1. ホウ素ナノデバイスの機能評価 (CD44 への結合性)

これまでにヒアルロン酸ホウ素ナノデバイス中のヒアルロン酸含有量を測定し、至適作製法を検討した。

しかしながら、胸膜中皮腫細胞への蛍光標識ヒアルロン酸の結合阻害率を検討すると、ヒアルロン酸含有量と阻害率に相関が認められなかった。そのため、今回 CD44 との結合性に着目し、CD44-IgG chimera を固相化したプレートへの蛍光標識ヒアルロン酸の結合阻害率から、至適ヒアルロン酸結合ホウ素ナノデバイスを検討した。

Recombinant human CD44 Fc chimera を 0.05 $\mu\text{g}/\text{well}$ で丸底 96 well プレートに固相化。Fc receptor Blocking Kit にて前処置後、17.5 μg の FITC 標識ヒアルロン酸 FAHA (100~300 kDa) と BRIC 235 (CD44 中和抗体) 0.5 μg 、321 kDa ヒアルロン酸 80 μg ないしは各ホウ素ナノデバイス製剤を希釈し、10 分間混入後洗浄、蛍光強度を測定した。

2. ホウ素ナノデバイスの胸膜中皮腫モデルにおける腫瘍集積性

マウス胸膜中皮腫細胞株 AB22 8×10^6 個/100 μL を BALB/c マウスの右胸腔に注入し、7 日目に既存のホウ素製剤 (BSH)、ヒアルロン酸ホウ素ナノデバイス

(HA-BSH)、ホウ素脂質 DSBL 10 mgB/kg を患側胸腔に注入。24 時間後にマウスを犠牲死させ、血液を採取後、生理食塩水にて灌流後に腫瘍塊ならびに患側肺を摘出、均質化後、ICP にてホウ素濃度を測定した。

C. 研究結果

1. ホウ素ナノデバイスの機能評価 (CD44 への結合性)

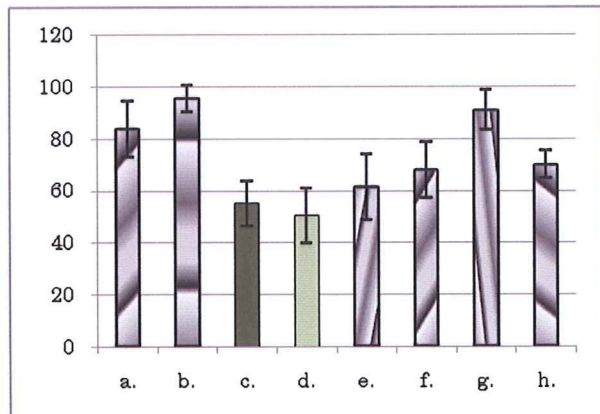


図 1. CD44-IgG chimera 固相化プレートへの

FITC 標識ヒアルロン酸の結合阻害率

a. CD44 中和抗体 BRIC235 12.5 μg/mL, b. 321 kDa ヒアルロン酸 (2 mg/mL), c. ホウ素脂質 DSBL (5 倍希釈), d. ホウ素脂質 DSBL (50 倍希釈), e. 8% ヒアルロン酸含有 BSH (2 mg/mL), f. 8% ヒアルロン酸含有 BSH (0.2 mg/mL), g. 38% ヒアルロン酸含有 BSH (2 mg/mL), h. 38% ヒアルロン酸含有 BSH (0.2 mg/mL) を各 40 μL/well で 17.5 μg の FITC 標識ヒアルロン酸と競合阻害させ、蛍光強度を測定。

FITC 標識された低分子量(100~300 kDa)のヒアルロン酸と CD44-IgG chimera 固相化プレートとの結合は、38% ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイス(2 mg/mL)を競合させると 91.1% の結合阻害率を示し、CD44 中和抗体 BRIC235 (83.9%) や 321 kDa ヒアルロン酸 (95.7%) と同等の CD44 結合能を示した。一方、8% ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイスやホウ素脂質 DSBL の希釈製剤では、有意な阻害活性を示さなかった。

2. ホウ素ナノデバイスの胸膜中皮腫モデルにおける腫瘍集積性

ホウ素ナノデバイス製剤の腫瘍集積性を検討するために、図 2. の如く AB22 マウス胸膜中皮腫細胞株による胸膜中皮腫モデルを作製した。

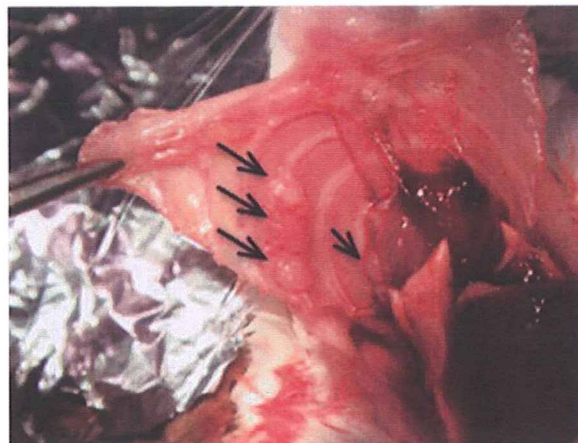


図 2. マウス胸膜中皮腫細胞株による胸膜中皮腫モデル
マウス胸膜中皮腫細胞株 AB22 8×10^6 個/100 μL を BALB/c マウス右胸腔に注入後 8 日目の胸腔内腫瘍。胸郭を頭側に反転した図で、壁側胸膜ならびに胸腔肺尖部近傍に腫瘍が形成されている。

腫瘍塊ならびに患側正常肺組織を摘出後、均質化後 ICP にてホウ素濃度を測定すると、ホウ素脂質 DSBL ならびに 38% ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイスは、既存のホウ素製剤 BSH よりも腫瘍への高い集積性を認めた(24.4, 8.4 vs 3.6 ppm)、特に DSBL は、非常に高い腫瘍内ホウ素濃度を維持した (図 3.)。

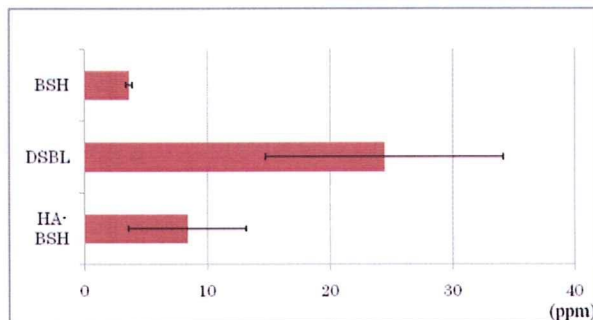


図 3. 腫瘍内ホウ素濃度

また腫瘍/正常組織 ホウ素濃度比も、腫瘍内ホウ素濃度と同様の傾向を示し、DSBL が 6.5, 38% ヒアルロン酸含有ホウ素ナノデバイスが 1.5, BSH が 0.8 であった (図 4.)。

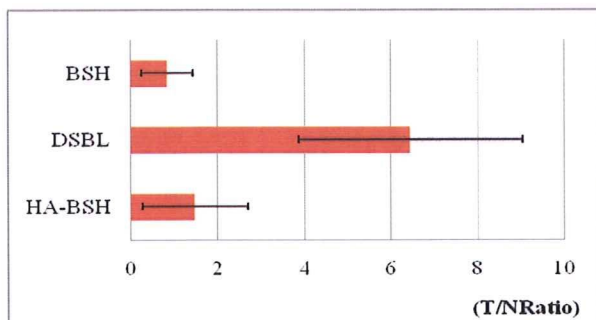


図 4. 腫瘍/正常組織ハロウ素濃度比

腫瘍/血液ハロウ素濃度比も同様の傾向を示し、DSBL が 17.7, 38%ヒアルロン酸含有ハロウ素ナノデバイスが 15.4, BSH が 6.9 であった(図 5.)。

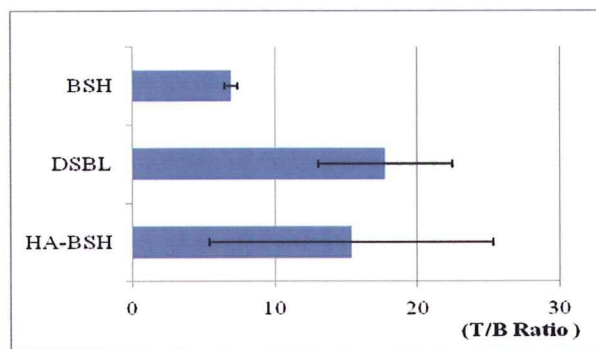


図 5. 腫瘍/血液ハロウ素濃度比

D. 考察

ヒアルロン酸含有ハロウ素ナノデバイスは、*in vitro* の蛍光標識ヒアルロン酸の競合阻害実験により、CD44 へヒアルロン酸と同等の結合性を示した。また、ハロウ素脂質 DSBL は、CD44 に特異的な結合性を示さなかった。

一方、*in vivo* の腫瘍集積性に関する実験においては、ハロウ素脂質 DSBL の方が、ヒアルロン酸含有ハロウ素ナノデバイスに比し、高い集積性を示した。

また、T/N 比、T/B 比を比較すると、ヒアルロン酸ハロウ素ナノデバイスは、ハロウ素脂質 DSBL に比し、T/N 比が低く、DSBL に比し正常肺組織への集積が高い可能性が示唆された。胸膜中皮腫は正常胸膜に比し、有意に高く CD44 を発現している。一方正常肺組織における CD44 は、多くが肺胞に存在するマクロファージで発現しており、また臓側胸膜に覆われた肺組織にヒアルロ

ン酸ハロウ素ナノデバイスが、CD44 を介して結合したとは考え難く。以上より、ヒアルロン酸ハロウ素ナノデバイスの正常肺組織への集積は、他の要因で亢進しているものと考えられた。

E. 結論

平成 21 年度の研究では、胸膜中皮腫を標的としたハロウ素ナノデバイスの *in vitro* における結合性と *in vivo* における腫瘍集積性を検討した。ハロウ素脂質 DSBL は高い腫瘍集積性、T/N 比、T/B 比を示し、今後さらなる詳細な生体内分布を検討し、照射実験を行う予定である。また、ヒアルロン酸含有ハロウ素ナノデバイスは胸膜中皮腫細胞や CD44 への高い結合性を有したが、*in vivo* における腫瘍集積性の改善のため、CD44 リガンドの生体内での賦活化、正常肺組織への集積の回避、胸腔内での滞留性の向上などを検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komoda H, Okura H, Lee CM, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto A, Ichinose A, Sawa Y, Matsuyama A. Reduction of Neu5GC Xenoantigen on human ADSC/MSCs lead to them as safer and more useful cell sources for realizing various stem cell therapies. Tissue Engineering Part A Epub ahead of print, 2009
- 2) Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y. Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction