

- and survival in a rat myocardial infarction model.
Tissue Engineering Part C Methods Epub ahead of print, 2009
- 3) Basappa, Murugan S, Sugahara KN, Lee CM, ten Dam GB, van Kuppevelt TH, Miyasaka M, Yamada K, Sugahara K.
Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells.
Glycobiology 19(7): 735-742, 2009
- 4) Kim A, Enomoto T, Serada S, Ueda Y, Takahashi T, Ripley B, Miyatake T, Fujita M, Lee CM, Morimoto K, Fujimoto M, Kimura T, Naka T.
Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin.
International Journal of Cancer 125(10): 2316-2322, 2009
- 5) Okura H, Komoda H, Fumimoto Y, Lee CM, Nishida N, Sawa Y, Matsuyama A.
Transdifferentiation of human adipose tissue-derived stromal cells into insulin-producing clusters.
Journal of Artificial Organs 12(2): 123-130, 2009
- 6) Fumimoto Y, Matsuyama A, Komoda H, Okura H, Lee CM, Nagao A, Nishida T, Ito T, Sawa Y.
Creation of a rich subcutaneous vascular network with implanted adipose tissue-derived stromal cells and adipose tissue enhances subcutaneous grafting of islets in diabetic mice.
Tissue Engineering Part C Methods 15(3): 437-444, 2009
2. 学会発表
- 1) Work in progress at Medical center for Translational Research, Osaka University Hospital. Lee CM, Myoi A, Sawa Y.
Translational Research Symposium in Pavia University Pavia, Italy 2009年2月2-4日
- 2) Hyaluronan for CD44 targeting therapy of Mesothelioma. Lee CM, Sougawa N, Tanaka H, Myoi A, Kaneda Y, Sawa Y. 12th Annual San Diego Glycobiology Symposium San Diego, CA, US 2009年3月12-14日
- 3) 代謝拮抗剤を含む生体内吸収性ファイバーの抗腫瘍効果. 宇山 浩、美濃貴之、李 千萬、澤 芳樹 第25回日本医工学治療学会 大阪 2009年4月10-12日
- 4) Vaccination with increased immunogenicity of tumor antigen MUC1 engineered to express α -gal epitopes elicited significant inhibition of tumor growth. Degichi T, Sawa Y, Ito T, Mori M, Doki Y, Tanemura M, Miyoshi E, Machida T, Kobayashi S, Marubashi S, Lee CM, Takeda Y, Nagano H. 100th American Association for Cancer Research, Annual Meeting 2009 Denver, CO, US 2009年4月18-22日
- 5) Experimental study of Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Mesothelioma. Lee CM, Sougawa N, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y. International symposium on malignant mesothelioma 2009 Washington DC, US 2009年6月25-27日
- 7) マウス癌細胞株の肺および肝臓への転移にはコンドロイチン硫酸 E 様構造が関与する。菅原一幸、山田修平、Fuchuan Li, Basappa, Murugan S, 橋口太志、水元秀二、小栗佳代子、岡山 實、菅原一樹、Lee CM、宮坂昌之、ten Dam G、van Kuppevelt T.
- 8) Biodegradable nonwoven anticancer drug delivery system for the therapy and prevention of tumor relapse. Lee CM, Sasai M, Fuji T, Tabata Y, Uyama H, Kaneda Y, Sawa Y. 10th US-Japan symposium on drug delivery system Maui, HA, US 2009年12月16-20日

H. 知的財産権の出願・登録状況

癌治療用薬剤送達ビヒクルおよびその製造方法なら
びにそれを用いたホウ素製剤に関する特許出願予定。

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膀胱がん適応に関する研究

研究分担者 鈴木 実 京都大学原子炉実験所・特定准教授

研究要旨

2つの研究を実施した。

3種類のトランスフェリン（Tf）結合型ホウ素ナノデバイス、Tf-ホウ素脂質、BSH-Tf-リン脂質、BSH-Tf-ホウ素脂質の3種類のホウ素化合物をそれぞれ100, 500, 1,000 ppm使用し、マウス膀胱癌細胞 MBT-2 細胞に対する毒性を検討し、硼素中性子捕捉療法（以下、BNCT）治療実験に使用するホウ素ナノデバイス、その濃度を決定した。

臨床試験にむけて、膀胱癌に対する BNCT の治療計画研究を実施し、一定の細胞内ホウ素濃度が達成可能であれば、線量分布の観点からは適用可能であることが明らかになった。

A. 研究目的

平成21年度は、以下の2つの研究を実施した。それぞれの研究目的は以下の通りである。

1. 平成22年度のBNCT治療実験に使用するホウ素ナノデバイスとその至適濃度を決定する。
2. 臨床試験開始にむけて、骨盤部（膀胱が含まれる）CT画像を用いて、BNCTによる線量分布を検討する治療計画研究を実施した。

B. 研究方法

1. ホウ素ナノデバイスおよび至適濃度の検討

3種類のトランスフェリン結合型ホウ素ナノデバイス、Tf-ホウ素脂質、BSH-Tf-リン脂質、BSH-Tf-ホウ素脂質の3種類のホウ素化合物をそれぞれ100, 500, 1,000 ppmを使用した。

対象とする細胞には、マウス膀胱癌細胞であるMBT-2細胞を使用した。細胞毒性の検討は、WST-1 assayを用いて検討した。

2. 膀胱癌 BNCT 線量分布の検討

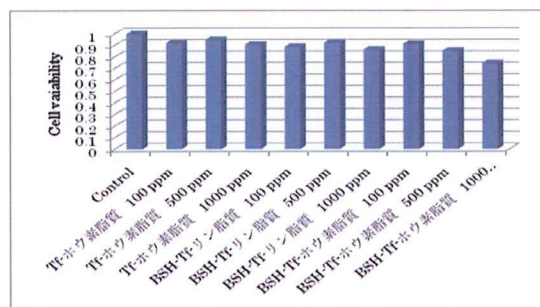
骨盤部CT画像をBNCT治療計画装置に取り込み、膀胱壁をtargetとして線量分布を検討した。計算条件 Target（膀胱壁）の硼素濃度：80.5 ppm（ボロフェニルアラニン1,300ppm膀胱内投与の細胞内取り込み試

験結果を使用した。周囲組織の硼素濃度を0 ppm、コリメーターサイズは14 cmとした。京都大学原子炉実験所研究炉（以下、KUR）の熱外中性子ビーム使用とした。照射条件は、以下の4条件、Condition 1: 膀胱内を空気に置換 前方1門 1h 照射、Condition 2: 膀胱内に尿が滞留 前方1門 1h 照射、Condition 3: 膀胱内を空気に置換 後方1門 1h 照射、Condition 4: 膀胱内を空気に置換 前後2門 1h x 1h 照射とした。

C. 研究結果

1. ホウ素ナノデバイスおよび至適濃度の検討

Tf-ホウ素脂質、BSH-Tf-リン脂質は、濃度依存性はなく約85-95%のviabilityであり、低い毒性であったが、BSH-Tf-ホウ素脂質では、濃度依存性に毒性を示す傾向があり1,000 ppmの投与では74%のviabilityまで低下した。（下図参照）



2. 膀胱癌 BNCT 線量分布の検討

結果は下表にまとめた。

Table 1. Summary of DVH parameters for the tumor by various irradiation methods

Irradiation methods	Irradiation time	Tumor (Bladder wall)		
		Minimum dose (Gy-Eq)	Mean dose (Gy-Eq)	Maximum dose (Gy-Eq)
1 Ant. Port (Air-filled bladder)	1 hr	3.1	9.1	24.9
1 Ant. Port (Water-filled bladder)	1 hr	1.1	7.9	29.2
1 Post. Port (Air-filled bladder)	1 hr	0.9	2.2	6.4
A-P Ports (Air-filled bladder)	2 hr (1h x 1h)	6.0	11.3	25.9

膀胱は腹側に偏して位置しており、背側からの照射による benefit は小さい。膀胱を空気で置換し、かつ体積を小さめに調節することにより、前方1門照射で比較的均一に膀胱壁全体を照射できる可能性がある。

D. 考察

現在まで臨床試験が実施されている BNCT においては、硼素化合物は、静脈より点滴にて全身投与されている。現在、臨床試験で使用されているボロノフェニルアラニン（以下、BPA）を 500mg/kg 投与した場合の血中硼素濃度は、20-30ppm であり、この濃度に、生体内で腫瘍、腫瘍細胞が曝露されていることになる。我々は、すでに深部腫瘍である肝腫瘍に対しては、より高濃度での硼素化合物の投与が必要であると考え、肝動脈よりの動注により、硼素化合物の腫瘍内集積が向上することを既に報告しており、臨床試験も実施している。

本研究で対象疾患としている膀胱上皮内癌は膀胱上皮に癌細胞が拡がり、膀胱内腔に直接癌細胞が表出している状況である。従って、BCG 膀胱注療法と同じ考え方で、膀胱内に直接高濃度の硼素化合物を投与することにより、癌細胞に高濃度の硼素を集積させることが可能である。また、全身循環に、硼素化合物が入らないことから、周囲の腸管、皮膚の硼素濃度は0であることとみなせるので、有害事象発生の可能性を低く抑えることが可能である。

本研究で明らかになったように、高濃度のホウ素ナノデバイスにより腫瘍細胞内に高濃度のホウ素濃度が達成可能であれば、膀胱上皮内癌に対して BNCT は有効

な治療法の1つの選択肢としてなり得ると思われる。

E. 結論

ホウ素ナノデバイスの膀胱内投与における膀胱上皮内癌における BNCT は有効な治療法の1つの選択肢となり得る可能性がある。今後、同所性移植膀胱癌モデルマウスにより BNCT の治療効果を明らかにする予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Impact of accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) on the treatment of multiple liver tumors and malignant pleural mesothelioma. **Suzuki M**, Tanaka H, Sakurai Y, Kashino G, Yong L, Masunaga S, Kinashi Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Sato T, Maruhashi A, Ono K. *Radiother Oncol.* 2009;92:89-95

2) A feasibility study of the post-irradiation dose estimation with SPECT technique for BNCT. Sakurai Y, Tanaka H, **Suzuki M**, Kinashi Y, Masunaga S, Maruhashi A, Ono K.. *Appl Radiat Isot.* 2009 Jul;67(7-8 Suppl):S218-21.

3) Effectiveness of boron neutron capture therapy for recurrent head and neck malignancies. Kato I, Fujita Y, Maruhashi A, Kumada H, Ohmae M, Kirihata M, Imahori Y, **Suzuki M**, Sakurai Y, Sumi T, Iwai S, Nakazawa M, Murata I, Miyamaru H, Ono K. *Appl Radiat Isot.* 2009 Jul;67(7-8 Suppl):S37-42.

4) Survival benefit from boron neutron capture therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients. Kawabata S, Miyatake SI, Nonoguchi N, Hiramatsu R, Iida K, Miyata S, Yokoyama K, Doi A, Kuroda Y, Kuroiwa T, Michiue H, Kumada H, Kirihata M, Imahori Y, Maruhashi A, Sakurai Y, **Suzuki M**, Masunaga SI, Ono K.. *Appl Radiat Isot.* 2009 Jul;67(7-8 Suppl):S15-8.

5) Boron neutron capture therapy for recurrent oral cancer and metastasis of cervical lymph node. Kimura Y, Ariyoshi Y,

Shimahara M, Miyatake S, Kawabata S, Ono K, **Suzuki M**, Maruhashi A. Appl Radiat Isot. 2009 Jul;67(7-8 Suppl):S47-9.

6) Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas. Miyatake SI, Kawabata S, Yokoyama K, Kuroiwa T, Michiue H, Sakurai Y, Kumada H, **Suzuki M**, Maruhashi A, Kirihata M, Ono K.. Appl Radiat Isot. 2009 Jul;67(7-8 Suppl):S22-4.

7) Improvement of dose distribution in phantom by using epithermal neutron source based on the Be(p,n) reaction using a 30MeV proton cyclotron accelerator. Tanaka H, Sakurai Y, **Suzuki M**, Takata T, Masunaga S, Kinashi Y, Kashino G, Liu Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Takada M, Maruhashi A, Ono K. Appl Radiat Isot. 2009 Jul;67(7-8 Suppl):S258-61.

8) Bystander effect-induced mutagenicity in HPRT locus of CHO cells following BNCT neutron irradiation: Characteristics of point mutations by sequence analysis. Kinashi Y, **Suzuki M**, Masunaga S, Ono K. Appl Radiat Isot. 2009 Jul;67(7-8 Suppl):S325-7.

9) Characteristics comparison between a cyclotron-based neutron source and KUR-HWNIF for boron neutron capture therapy. Tanaka H, Sakurai Y, **Suzuki M**, Masunaga S, Kinashi Y, Kashino G, Liu Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Maruhashi A, Ono K. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 267 (2009) 1970–1977

10) A simple and rapid method for measurement of (10)B-para-boronophenylalanine in the blood for boron neutron capture therapy using fluorescence spectrophotometry. Kashino G, Fukutani S, **Suzuki M**, Liu Y, Nagata K, Masunaga SI, Maruhashi A, Tanaka H, Sakurai Y, Kinashi Y, Fujii N, Ono K. J Radiat Res. 2009;50:377-382.

11) Gamma-ray irradiation enhanced boron-10 compound accumulation in murine tumors. Liu Y, Nagata K, Masunaga S, **Suzuki M**, Kashino G, Kinashi Y, Tanaka H, Sakurai Y, Maruhashi A, Ono K. J Radiat Res (Tokyo). 2009. Nov;50(6):553-7

12) Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therapy on oral squamous cell carcinoma. Fujita Y,

Kato I, Iwai S, Ono K, **Suzuki M**, Sakurai Y, Ohnishi K, Ohnishi T, Yura Y. Radiat Oncol. 2009 Dec 11;4:63

2. 学会発表

- 1) 加速器中性子源導入による硼素中性子捕捉療法 (BNCT)の臨床的品質保証体制 鈴木 実、田中浩基、櫻井良憲、劉勇、菓子野元郎、木梨友子、増永慎一郎、小野公二、丸橋 晃、第68回日本医学放射線学会総会、横浜、2009年4月19日
- 2) 加速器中性子源による硼素中性子捕捉療法 (BNCT)の治療手順 (案) 鈴木 実、劉勇、菓子野元郎、木梨友子、増永慎一郎、小野公二、田中浩基、櫻井良憲、丸橋 晃 第6回日本中性子捕捉療法学会学術大会 京都、2009年9月20日
- 3) BNCT が肺腫瘍、肝腫瘍に対して果たす役割. 鈴木 実、日本放射線腫瘍学会第22回学術大会 京都、2009年9月18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

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

研究分担者 丸山一雄 帝京大学薬学部・教授

研究要旨： ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）は細胞選択性に優れた治療法として注目されている。本療法を効果的な治療法として確立していくためには、細胞内ホウ素デリバリー技術が必要となる。この観点から、様々ながん種に高発現しているトランスフェリン（TF）レセプターをターゲットとするTF修飾PEG-リポソームはBNCTに適したホウ素デリバリーキャリアであると期待される。そこで、TF修飾PEG-リポソームのGMP対応可能な調製法の確立を試みた。その結果、エタノールインジェクション法と限外ろ過法によりTF修飾PEG-リポソームの調製および精製が可能になった。今後更なる検討が必要であるが、作業工程の簡略化・調製時間の大幅な削減が可能になり、大量調製に向けた調製法が確立できた。

A. 研究目的

ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）は細胞選択性に優れた治療法として注目されている。本療法をより効果的な治療法として確立していくためには、多くのがん細胞にホウ素化合物を送達することが重要である。このような観点から、がん細胞を標的としたホウ素デリバリーキャリアとしてトランスフェリン（TF）修飾PEG-リポソームの開発を行ってきた。TF修飾PEG-リポソームは様々ながん種に過剰発現しているトランスフェリン（TF）レセプターをターゲット可能であることから種々のがんに適応可能なDDSキャリアとして期待される。そこで、本研究ではこのTF修飾PEG-リポソームのGMP製造に向けて、エタノールインジェクション法による調製を検討した。また、TFの結合法は、従来法ではDSPE-PEG-COOHを活性化してTFのリジン残基のアミノ基と反応させるが、GMP製造では、活性化剤の使用を避けること、さらには活性化剤の完全な除去を求められるので、中間体であるDSPE-PEG-NHSを用いることとした。また、リポソームの精製（未反応のTFの除去、未封入のホウ素化合物の除去、リポソームの濃縮）に限外ろ過法を用いた。

B. 研究方法

1. BSH封入TF修飾PEG-リポソームの調製

1,2-distearoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine (DSPC) 18.7 mg Cholesterol 9.2 mg 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-hydroxysuccinimidylpolyethyleneglycol (DSPE-PEG-NHS) 15.8 mg をエタノール 500 μ L に溶解させ、80 $^{\circ}$ C に加温した 125mM BSH 溶液 5 mL に加えた。その後、速やかに氷冷し、TF 7.24 mg を加え、室温にて 2 時間放置することでリポソームへの結合を行った。

2. リポソームの精製

流速を 20 mL/分となるよう調節し、限外ろ過膜（分子量分画 500 kDa）を用いて discontinuous diafiltration-Sequential Dilution method により精製し、5 分間隔で廃液をサンプリングした。この廃液中に含まれるリポソーム未結合の TF を 280 nm の吸光を指標に測定した。さらに、廃液中に含まれるエタノールをガスクロマトグラフィにて測定した。

3、TF のリポソーム表面修飾の確認

リポソーム懸濁液をリン酸緩衝液 (PBS) で100 倍希釈し、rabbit-anti-human TF (10 mg/mL) を10 μ L 加え、室温で1 時間放置した後に動的光散乱法にてリポソームの凝集を確認した。

4、TF 修飾 PEG-リポソームの機能評価

脂質 60 mg に対して 1.6 mg の C18 DiO を加えることでリポソームを蛍光ラベルした。このリポソームを Colon26 細胞 (マウス大腸がん細胞) に加え、30 分間培養した。この細胞を PBS で洗浄し、フローサイトメトリーにて解析を行った。

C. 研究結果

1、エタノールインジェクション法による TF 修飾 PEG-リポソーム調製法の確立

GMP 対応の TF 修飾ホウ素ナノデバイスを調製するにあたり、人体に有害な有機溶媒を使用しない調製法が必要である。そこで、エタノールインジェクション法によりリポソームを調製後、限外ろ過法によりリポソームの精製を行った。

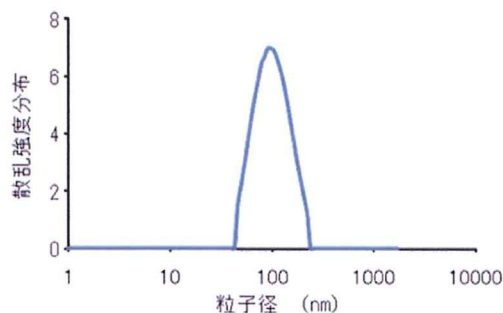


Fig.1 エタノールインジェクション法により調製したリポソームの粒子径 (106.5 \pm 40.8 nm)

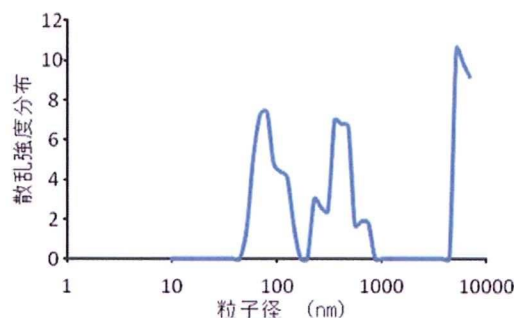
リポソームの調製・粒子径の調整には脂質の相転移温度 (DSPC: 55 $^{\circ}$ C) 以上に加熱する必要があるが、一方で、NHS は熱に不安定である。様々な条件を検討した結果、エタノールインジェクションのみで平均粒子径が約 100 nm の均一なリポソーム調製が可能となった

(Fig. 1)。粒子径が 200 nm 以下の PEG-リポソームは腫瘍集積性を示す (EPR 効果) ことから、腫瘍を標的とす

るホウ素デバイスに最適な粒子径が容易に調製可能となった。

次に、TF のリポソーム表面への修飾を確認するため、rabbit-anti-human TF を加えることによる、リポソームの凝集を確認した。

Fig.2 TF の修飾の確認



その結果、TF 修飾 PEG-リポソームの凝集が確認された (Fig. 2) このことから、リポソーム表面に TF を修飾可能であることが示された。このように TF を修飾できたのは、エタノールインジェクション法のみで速やかにリポソーム調製可能になったことで NHS の活性が失われなかったためと考えられた。

2、限外ろ過法による TF 修飾 PEG-リポソームの精製

GMP 対応の TF 修飾ホウ素ナノデバイスを調製するにあたり、作業工程を簡略化するため、カラム、超遠心を用いない方法を確立することが望ましい。そこで、限外ろ過法による TF 修飾 PEG-リポソームの精製を試みた。

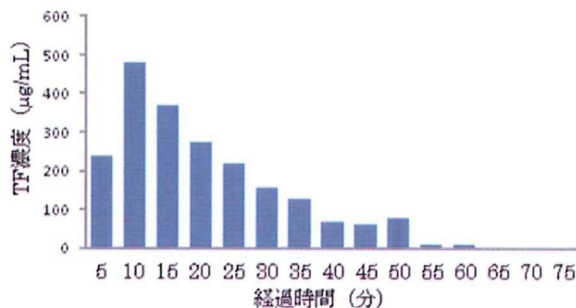


Fig. 3a 限外ろ過廃液中の TF 濃度

その結果、限外ろ過廃液中の TF は 60 分間 (循環した液量 1.2 L) の限外ろ過により完全に除去された

(Fig. 3a)。このことから、リポソーム未結合のTFは60分(1.2L)の限外ろ過で除去可能であることが示された。次に、エタノール濃度について検討したところ、75分経過時点においても完全には除去できなかった

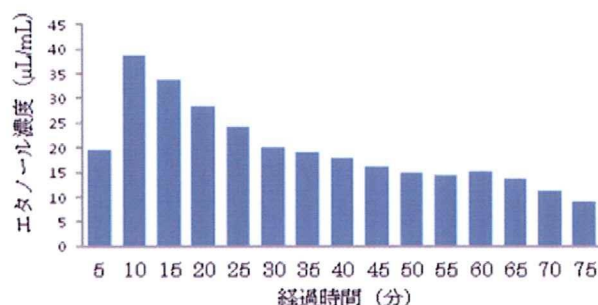


Fig. 3b 限外ろ過廃液中のエタノール濃度

(Fig. 3b)。しかし、限外ろ過後のTF修飾PEG-リポソーム中に残存しているエタノール濃度を測定したところ、1 μL/mL(初期濃度 91 μL/mL)であったことから使用したエタノールの99%以上を除去できた。以上の結果から、限外ろ過法(分子量分画 500kDa)によりTF修飾PEG-リポソームの精製が可能であることが示された。

3、調製したTF修飾PEG-リポソームの機能評価

今回確立した調製法ではリポソーム調製時に80℃まで加熱する。その後、直ちにTFを加えるため、熱変性に伴いTFが失活する恐れがある。そこで、TF修飾PEG-リポソームの腫瘍細胞への取り込みを指標にTFの機能を評価した。その結果、PEG-リポソームと比較して、TF修飾PEG-リポソームにおいて高い取り込みが認められた(Fig. 4a)。このことから、今回確立したリポソーム調製法はTFの活性を失うことなく修飾可能であると考えられる。さらに、平均蛍光強度を解析したところ、TF修飾PEG-リポソームにおいて高い平均蛍光強度を示した(Fig. 4b)。このことから、従来と同様にTFはがん細胞に対する有用なアクティブターゲティング分子であることが示された。

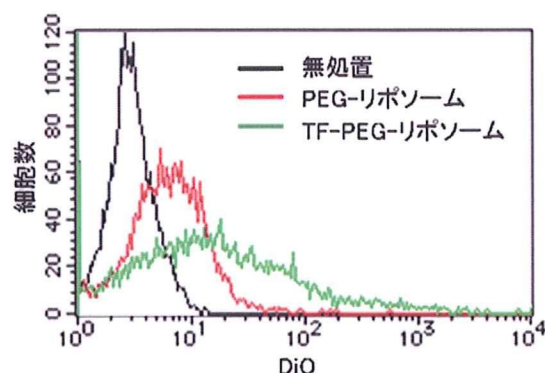


Fig. 4a フローサイトメトリー解析

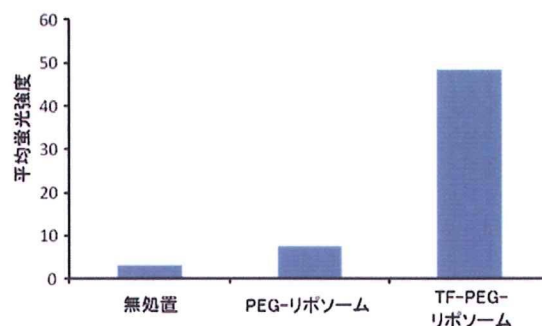


Fig. 4b 平均蛍光強度

D. 考察

1、エタノールインジェクション法によるTF修飾PEG-リポソーム調製法の確立

GMP対応のリポソームを調製するためには、クロロホルムを使用しない、もしくは完全な除去を求められる。したがって、従来のリポソーム調製法である逆相蒸発法は使用困難である。今回確立したエタノールインジェクション法は人体に有害な有機溶媒を用いることなくTF修飾PEG-リポソームを調製可能であった。また、従来法では約2日要した調製時間もリポソーム精製まで含めて約4時間で完了できるようになり、TF修飾PEG-リポソームの大量調製に有利になると考えられた。さらに、エタノールインジェクション法のみで平均粒子径約100nmのリポソームを調製可能になったことから、粒子径のコントロールが不要になり、作業工程の簡略化に寄与できるものと考えられた。

2、限外ろ過法によるTF修飾PEG-リポソームの精製

従来、TF修飾PEG-リポソームの精製にはカラムによ

別紙 3

る分離と超遠心による濃縮が必要であった。リポソームを大量調製することを考慮すると、これらの操作には容量に限度があるため、適した方法とは言えない。そこで、今回は限外ろ過法による TF 修飾 PEG-リポソームの精製を行った。その結果、リポソーム未結合の TF をわずか 1 時間で完全に除去可能であり、迅速かつ簡単に TF 修飾 PEG-リポソームの精製が可能になった。

3. 調製した TF 修飾 PEG-リポソームの機能評価

今回調製した TF 修飾 PEG-リポソームのがん細胞への取り込みを評価したところ、TF の修飾により細胞内取り込み量が増加したことから、TF ががん細胞に対する有用なアクティブターゲティング分子であることが示された。BNCT に適したホウ素キャリアの特性として、優れた腫瘍集積性と腫瘍細胞への選択的なデリバリーが必要と考えられる。PEG-リポソームの特性である腫瘍集積性と TF による腫瘍細胞への選択性を兼ね備えた TF 修飾 PEG-リポソームは BNCT に適したホウ素キャリアになるものと期待される。

E. 結論

エタノールインジェクション法によるリポソーム調製と限外ろ過法によるリポソーム精製は GMP 対応の BSH 封入 TF 修飾 PEG-リポソームを調製する上で、有用な技術である。今後はこれらの技術を用いて調製した TF 修飾 PEG-リポソームの機能を解析していく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Application of transferrin-liposomes for intracellular drug delivery, K. Maruyama, in Drug Delivery Systems for Targeted Drug Therapy (Ed by Y. Park, J. Liang, J. Balthasar, V. Yang) American Association of Pharmaceutical Scie.,

Washington D. C. in press

2. リポソーム技術を基盤とする”デリバリーシステムと免疫療法”の構築, 丸山一雄, 鈴木亮, 小田雄介, 宇都口直樹 Drug Delivery System 23(6), 657-665, 2008.

2. 学会発表

1. 丸山一雄 BNCT と樹状細胞免疫の併用治療のむけて、平成 21 年度京都大学原子炉実験所専門委員会、大阪、2010 年 2 月 19-20 日、口頭発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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肝腫瘍適応に関する研究

研究分担者 柳衛宏宣 東京大学大学院工学系研究科原子力国際専攻・特任准教授

研究要旨

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、ホウ素化合物を選択的に腫瘍組織に集積させ熱・熱外中性子を照射することにより癌細胞障害効果を生じさせる粒子線治療である。本研究は、中性子捕捉療法を難治性癌である原発性肝臓癌および転移性肝腫瘍に対しての画期的な集学的治療として応用すべく、ボロンデリバリーシステムの研究開発を進めている。本年度は、ウサギ VX-2 肝腫瘍モデルに対してボロン封入ステルスリポソーム（脂質結合型、内封型）を肝動注にて投与し、腫瘍および正常肝組織における集積性を検討した。今回の検討では、脂質結合型＞内封型の腫瘍におけるボロン集積を示した。内封型においては 48 時間後の投与において腫瘍組織濃度が正常肝組織の 2 倍の集積を認めた。また、今回のリポソーム投与量では正常肝組織の障害効果を認めず、BNCT による治療実験へと進めていく。

過観察し、移植肝腫瘍モデルを形成した。

A. 研究目的

薬害肝炎および性交渉に代表される B 型肝炎・C 型肝炎ウイルスの感染に基づく肝硬変により高頻度で発生する原発性肝臓癌や、欧米化による脂質摂取量の増加や食生活の変化に起因する大腸癌の発生および肝転移は、病期の進んだものにおいては治療が非常に困難な病態を呈してくる。このため手術療法、化学療法、放射線治療、免疫療法を合わせた集学的治療をいかにオーダーメイド医的に組み合わせられるかが重要なカギとなってくる。

今回、我々は、新規粒子線治療のひとつである中性子捕捉療法を難治性肝腫瘍に応用すべく、ボロン原子をいかに腫瘍選択的に集積できるかを検討し、より効果的な肝腫瘍に対するボロンデリバリーシステムの開発研究を進めていく。

B. 研究方法

1. ウサギ肝動注モデル

ウサギ肉腫腫瘍 VX-2 を In vitro において培養した。VX-2 細胞をまずウサギ足部に注射後、腫瘍を形成した。その腫瘍を、麻酔下にウサギ肝臓に接種し、2 週間経

2. ボロン封入 Stealth Liposome 投与における肝腫瘍への集積性の検討

ボロン封入 Stealth Liposome (脂質結合型、内封型) (学習院大学作成) を、肝動注し、投与 24 時間後、48 時間後における肝腫瘍内ボロン濃度、正常肝組織内ボロン濃度、血中ボロン濃度および各種臓器内ボロン濃度を ICP-Masspectroscopy を用いて測定した。

3. ボロン封入 Stealth Liposome 肝動注後の肝腫瘍および正常肝組織における病理学的検討

ボロン封入 Stealth Liposome を肝動注し、投与 24 時間後、48 時間後における肝腫瘍および正常肝組織の変化を病理学的に検討した。

C. 研究結果

1. リポソームの調整

ボロン封入 Stealth Liposome を学習院大学中村研究室において作成していただき供与を受けた。

ボロン封入 Stealth Liposome (ボロン脂質結合型 25% DSBL Liposome : Liposome 1 と表記)

別紙 3

Liposome 1 の構成成分比は以下のとおりである。

(DSPC:DSBL:Cholesterol:PEG-2000 =
0.75:0.25:1.0:0.11 (mol ratio))
このリポソームに封入されたボロン濃度は2700 ppm である。

ボロン封入 Stealth Liposome (ボロン内封型 DSPC+BSH entrapped liposome : Liposome 2 と表記)

Liposome 2 の構成成分比は以下のとおりである。
(DSPC:Cholesterol:PEG-2000 = 1.0:1.0:0.11 (mol ratio)+BSH(125m mol/l))
このリポソームに封入されたボロン濃度は4700ppm である。

2. 肝動注モデルの作成

2-1 ウサギ肝動注モデル：移植肝腫瘍として2週間の経過観察後に形成された腫瘍は、腫瘍径が1.5 cm サイズであり、中心壊死は軽度生じているが、肝細胞癌と同様に周辺の血管に富んでおり、モデルに適していると考えられる。また、VX-2 ウサギ肝腫瘍は腹水の貯留を認めなかった。VX-2 ウサギ肝腫瘍モデルは、腫瘍サイズおよび肝動注手技においても、適したモデルと思われた。

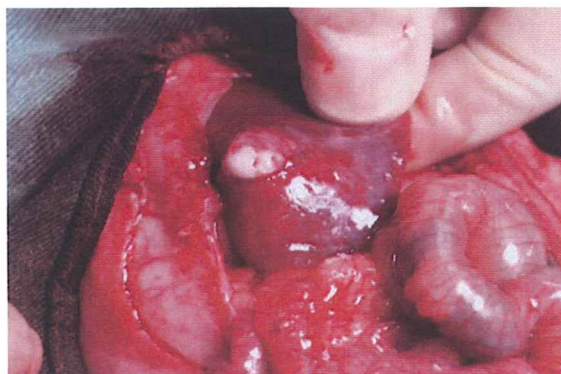


図1. VX-2 細胞を用いた肝腫瘍形成。肝左葉に白色調のVX-2 腫瘍が認められる。

2-2 肝動注の実際：肝動注手技としては、全身麻酔下で開腹し、肝臓に向かう固有肝動脈を見出し、カテーテルあるいは注射針を挿入して、Stealth liposome

の肝動注を行った。

肝動注において6ml 投与の時点で動脈の攣縮が生じ、最大しか投与できないことが判明した。そのため担癌ウサギあたりボロン(BSH)濃度 15mg / kg の投与量で投与することにした。Liposome 1 は5.6ml、Liposome 2 は3.3ml 投与した。

3. Stealth Liposome の肝動注を用いた肝臓癌モデルにおける集積性の検討

Stealth Liposome の癌集積性を調べるために、我々が中性子捕捉療法で用いている ICP-Massspectroscopy を用いたボロンの定量法を用いることにした。

3-1 肝臓における腫瘍と正常肝組織においては、ボロン脂質結合型および内封型のいずれのリポソームにおいても、腫瘍への優位なボロン集積に関する差はなかった。Tumor/Blood ratio は Lip1-24 : 2.33, Lip1-48 : 11.73, Lip2-24 : 1.21, Lip2-48 : 1.37, Tumor/Normal liver ratio は Lip1-24:0.79, Lip1-48 : 1.04, Lip2-24 : 1.95, Lip2-48 : 1.18 であった。

3-2 肝臓におけるボロン原子の投与絶対量を合わせた場合、肝臓に対するボロンのデリバリー量としては、脂質結合型の方が内封型と比較して約2倍多かった。ただし、内封型のリポソームのボロン濃度が1.74倍高いために、投与脂質量は半分となるため、動脈-門脈系の血管内に単純に流れるのみで組織にリポソームが到達していないものがあるために濃度が低いと思われた。

3-3 ボロン内封型においては、投与24時間後に於いて、正常肝組織の約2倍の集積(平均31ppm)を認めた。

3-4 脾臓において著明なりポソームの貯留を認めた。

Table 1. Measurement of boron concentration of tumour and each organ after intra-arterial injection of boron entrapped stealth liposome in VX-2 hepatic cancer bearing rabbit model

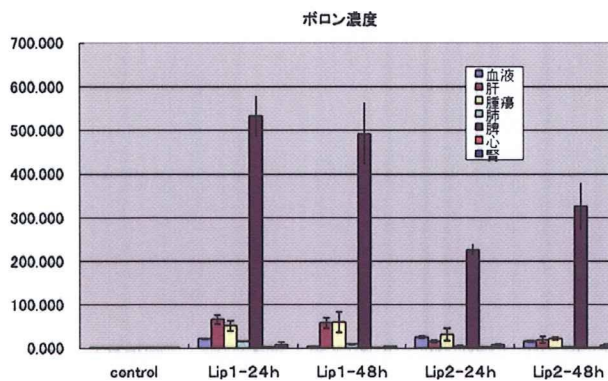
別紙 3

	Blood	Liver	Tumour
ont	0.19±0.01	0.17±0.002	0.42±0.04
Lip1-24	22.29±0.54	66.09±10.54	52.14±12.07
Lip1-48	5.17±0.34	58.30±12.04	60.62±23.89
Lip2-24	26.29±1.83	16.38±3.10	31.92±14.23
Lip2-48	16.84±1.63	19.57±7.816	23.02±3.47

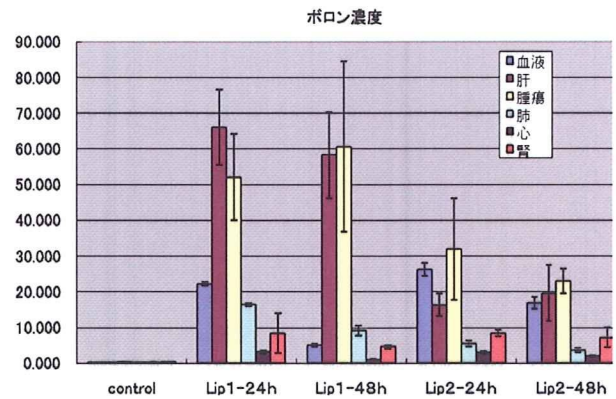
	Lung	Heart	Kidney
Cont	0.20±0.02	0.36±0.02	0.47±0.03
Lip1-24	16.58±0.39	3.25±0.46	8.49±5.63
Lip1-48	9.26±1.44	1.10±0.10	4.65±0.57
Lip2-24	5.52±0.75	3.10±0.42	8.47±1.00
Lip2-48	3.79±0.60	2.07±0.21	7.25±2.75

	Spleen
Cont	0.18±0.06
Lip1-24	532.31±46.01
Lip1-48	492.58±70.05
Lip2-24	227.02±11.68
Lip2-48	325.94±53.07

The boron concentration of tumor and organs were measured by ICP-Massspectroscopy at Jyuntendo University



ボロン封入 stealth liposome 肝動注後の VX-2 担癌ウサギも出るにおける腫瘍および各種臓器のボロン濃度 (ppm) (Lip-1 : ボロン脂質結合型、Lip-2 : ボロン内封型)



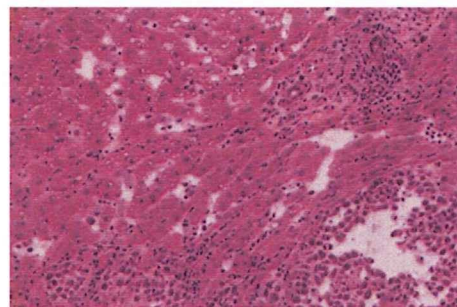
ボロン封入 stealth liposome 肝動注後の VX-2 担癌ウサギも出るにおける腫瘍および各種臓器(脾臓を除く)のボロン濃度 (ppm) (Lip-1 : ボロン脂質結合型、Lip-2 : ボロン内封型)

4. 病理組織学的検討

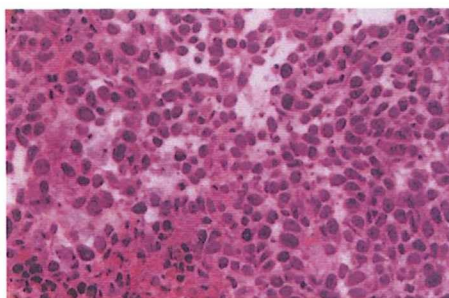
光学顕微鏡的および電子顕微鏡的観察により、リポソーム 1、リポソーム 2 のいずれのリポソームを投与した場合も正常肝組織障害を認めなかった。

また、投与 24 時間後においては腫瘍と正常肝組織との境界部分においてもリポソームと思われる脂肪滴の空泡を認めたが、48 時間後においては肝小葉の肝静脈周囲にのみ認められ、ドレナージが進んでいると思われる。

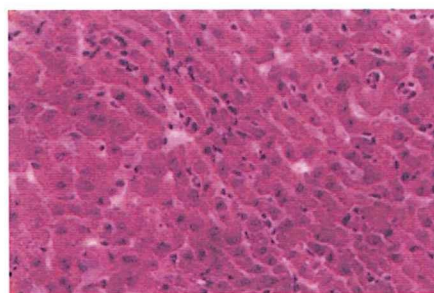
4-1. HE 染色



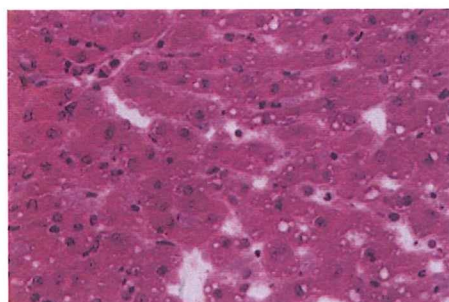
BSH Lip1 24hr x200 Normal liver / tumour border



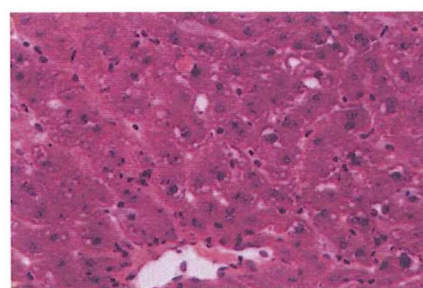
BSH Lip1 24hr x400 tumour



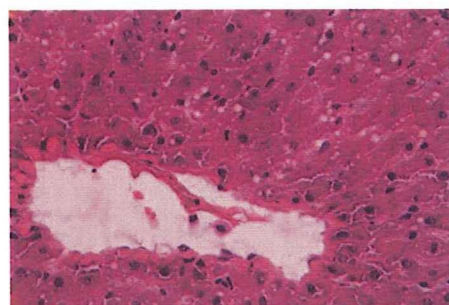
BSH Lip1 48hr x400 Normal liver /
tumour border



BSH Lip1 24hr x400 Normal liver / tumour border



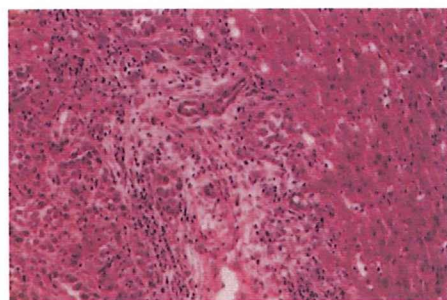
BSH Lip1 48hr x400 Normal liver (hepatic
vein site)



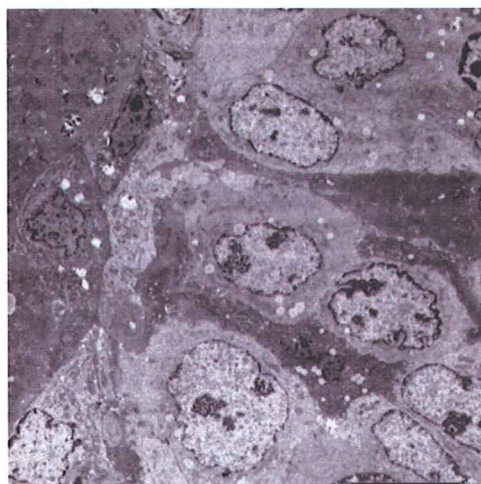
BSH Lip1 24hr x400 Normal liver (hepatic
vein site)

4-2. 電子顕微鏡像

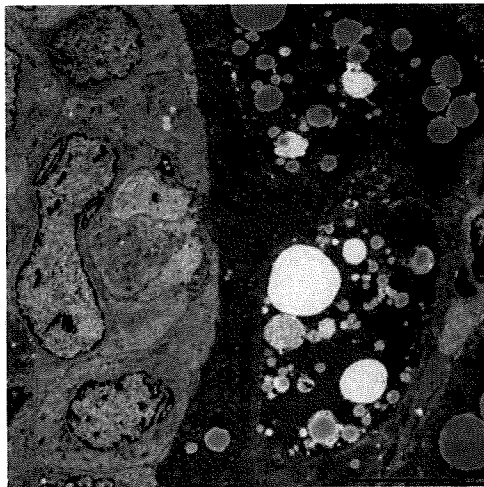
電子顕微鏡的観察においては、BSH Stealth liposome (ボロン脂質結合型)の肝動注24時間後において、対照群と比較して肝腫瘍内にリポソームを思わせる脂質の空胞を認めた。



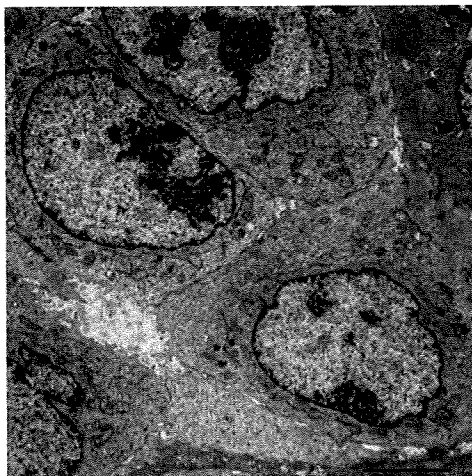
BSH Lip1 48hr x200 Normal liver /
tumour border



BSH Lip1 24hr



BSH Lip1 24hr



Control

D. 考察

我々は、臨床において肝動注の手技を実際に行うことを考え、確実に肝動注が行える肝腫瘍モデルの実験動物として、今回はウサギ VX-2 腫瘍を選択した。この腫瘍は hypervascular な腫瘍であり、原発性肝臓癌および病期の進行した転移性肝腫瘍を想定できる優れたモデルであり、治療実験を含めた前臨床試験に有用であると思われる。

今回2つのタイプの Stealth Liposome (脂質結合型、内封型)を用いて肝腫瘍モデルへの集積性を検討した。肝臓におけるボロン原子の投与絶対量を合わせた場合、肝臓に対するボロンのデリバリー量としては、脂質結合型の方が内封型と比較して約2倍の送達量を示した。

また、ボロン内封型においては、投与24時間後において、正常肝組織の約2倍の集積(平均31ppm)を認めた。脾臓において著明なリポソームの貯留を認めた。さらに、病理学的な検討より、リポソームの腫瘍内への集積を認め、このリポソーム投与量では正常肝組織の病理的なダメージは認められなかった。

これらの実験結果より、照射範囲と照射時期を最適化できれば、正常肝組織へのダメージを軽減し治療効果を上げられる可能性があると思われる。さらに、正常肝組織を回避でき、かつ腫瘍選択性のあるターゲティングが期待される。

E. 結論

ホウ素ナノデバイス製剤の肝臓がんへの適応検討というテーマで、本年度はウサギの肝腫瘍モデルを作成し、ボロン封入リポソームを肝動注し、腫瘍、正常肝組織、血液を含め各種臓器へのボロン集積性を ICP-MAS にて測定した。来年度においてはウサギの肝腫瘍モデルをさらに作成し、本年度の最適ボロン封入リポソームを肝動注後、中性子ラジオグラフィによるボロンイメージングを行う予定である。上記投与方法にてボロン封入リポソームを投与後、京都大学原子炉実験所にて熱中性子・熱外中性子を照射後、抗腫瘍効果・アポトーシスの誘導効果を検証する計画である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) Dosimetric evaluation for neutron capture therapy to hepatocellular carcinoma using intra-arterial administration of boron-entrapped water-in-oil-in-water emulsion. Yanagie H, Kumada H, Nakamura T, Higashi S, Ikushima I, Morishita Y, Shinohara A, Fujiwara M, Suzuki M, Sugiyama H, Kajiyama T, Nishimura R, Ono K, Eriguchi M, Takahashi H. Proceedings of 7th International Conference on Biomedical Engineering, Hierlemann

別紙 3

edt, IASTED, pp126-130, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
H. Nakamura	Liposomal Boron Delivery for Neutron Capture Therapy.	Nejat, D	Methods Enzymology, Liposomes, Part G	Academic Press	Burlington	2009	179-208
K. Maruyama	Application of transferrin-liposomes for intracellular drug delivery	Y. Park, J. Liang, J. Balthasar, V. Yang	Drug Delivery Systems for Targeted Drug Therapy	American Association of Pharmaceutical Science.	Washington D.C	2010	印刷中

2. 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, Y. Kaneda, A. Matsumura, H. Nakamura	closo-Dodecaborate Lipid Liposomes as New Boron Delivery Vehicles for Neutron Capture Therapy of Cancers.	Bioorg. Med. Chem.	18	3059-3065	2010
M. E. El-Zaria, H. Nakamura	New Strategy for Synthesis of Mercaptoundecahydrododecaborate Derivatives via Click Chemistry: Possible Boron Carriers and Visualization in Cells for Neutron Capture Therapy.	Inorg. Chem	48(24)	11896-11902	2009
H. S. Ban, H. Minegishi, K. Shimizu, M. Maruyama, Y. Yasui, H. Nakamura	Discovery of carboranes as $\beta 1$ and $\beta 2$ activators of 20S proteasome.	ChemMedChem			2010 印刷中
H. Nakamura, M. Ueno, H. S. Ban, K. Nakai, K. Tsuruta, Y. Kaneda, A. Matsumura	Development of Boron Nano Capsules for Neutron Capture Therapy.	Appl. Radiat. Isotope	67	S84-S87	2009
M. Shirakawa, T. Yamamoto, K. Nakai, K. Aburai, S. Kawatobi, T. Tsurubuchi, Y. Yamamoto, Y. Yokoyama, H. Okuno, A. Matsumura	Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT.	Appl Radiat Isot	67	88-90	2009
T. Tsurubuchi, T. Yamamoto, K. Nakai, A. Zaboronok, F. Yoshida, M. Miyakawa, M. Shirakawa, Y. Yamamoto, M. Matsuda, A. Matsumura	Intracellular uptake of a new boronated porphyrin EC032.	Appl Radiat Isot.	Jul;67(7-8 Suppl)	S94-S96	2009

別紙 4

H. Komoda, H. Okura, C. M. Lee, N. Sougawa, T. Iwayama, T. Hashikawa, A. Saga, A. Yamamoto, A. Ichinose, Y. Sawa, A. Matsuyama	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			2010 印刷中
H. Okura, A. Matsuyama, C. M. Lee, A. Saga, A. Kakuta-Yamamoto, A. Nagao, N. Sougawa, N. Sekiya, K. Takekita, Y. Shudo, S. Miyagawa, H. Komoda, T. Okano, Y. Sawa	Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model.	Tissue Engineering Part C Methods			2010 印刷中
Basappa, S. Murugan, K. N. Sugahara, C. M. Lee, G. B. ten Dam, T. H. van Kuppevelt, M. Miyasaka, K. Yamada, K. Sugahara	Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells.	Glycobiology	19(7)	735-742	2009
A. Kim, T. Enomoto, S. Serada, Y. Ueda, T. Takahashi, B. Ripley, T. Miyatake, M. Fujita, C. M. Lee, K. Morimoto, M. Fujimoto, T. Kimura, T. Naka	Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin.	International Journal of Cancer	125(10)	2316-2322	2009
H. Okura, H. Komoda, Y. Fumimoto, C. M. Lee, N. Nishida, Y. Sawa, A. Matsuyama	Transdifferentiation of human adipose tissue-derived stromal cells into insulin-producing clusters.	Journal of Artificial Organs	12(2)	123-130	2009
Y. Fumimoto, A. Matsuyama, H. Komoda, H. Okura, C. M. Lee, A. Nagao, T. Nishida, T. Ito, Y. Sawa	Creation of a rich subcutaneous vascular network with implanted adipose tissue-derived stromal cells and adipose tissue enhances subcutaneous grafting of islets in diabetic mice.	Tissue Engineering Part C Methods	15(3)	437-444	2009
M. Suzuki, H. Tanaka, Y. Sakurai, G. Kashino, L. Yong, S. Masunaga, Y. Kinashi, T. Mitsumoto, S. Yajima, H. Tsutsui, T. Sato, A. Maruhashi, K. Ono	Impact of accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) on the treatment of multiple liver tumors and malignant pleural mesothelioma.	Radiother. Oncol.	92	89-95	2009
Y. Sakurai, H. Tanaka, M. Suzuki, Y. Kinashi, S. Masunaga, A. Maruhashi, K. Ono	A feasibility study of the post-irradiation dose estimation with SPECT technique for BNCT.	Appl. Radiat. Isot.	Jul;67(7-8 Suppl)	S218-S221	2009
I. Kato, Y. Fujita, A. Maruhashi, H. Kumada, M. Ohmae, M. Kirihata, Y. Imahori, M. Suzuki, Y. Sakurai, T. Sumi, S. Iwai, M. Nakazawa, I. Murata, H. Miyamaru, K. Ono	Effectiveness of boron neutron capture therapy for recurrent head and neck malignancies.	Appl. Radiat. Isot.	Jul;67(7-8 Suppl)	S37-S42.	2009

別紙 4

S. Kawabata, S. I. Miyatake, N. Nonoguchi, R. Hiramatsu, K. Iida, S. Miyata, K. Yokoyama, A. Doi, Y. Kuroda, T. Kuroiwa, H. Michiue, H. Kumada, M. Kirihata, Y. Imahori, A. Maruhashi, Y. Sakurai, M. Suzuki, S. I. Masunaga, K. Ono	Survival benefit from boron neutron capture therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients.	Appl. Radiat. Isot.	Jul;67(7-8 Suppl)	S15-S18	2009
Y. Kimura, Y. Ariyoshi, M. Shimahara, S. Miyatake, S. Kawabata, K. Ono, M. Suzuki, A. Maruhashi.	Boron neutron capture therapy for recurrent oral cancer and metastasis of cervical lymph node.	Appl. Radiat. Isot.	Jul;67(7-8 Suppl)	S47-S49	2009
S. I. Miyatake, S. Kawabata, K. Yokoyama, T. Kuroiwa, H. Michiue, Y. Sakurai, H. Kumada, M. Suzuki, A. Maruhashi, M. Kirihata, K. Ono	Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas.	Appl. Radiat. Isot.	Jul;67(7-8 Suppl)	S22-S24	2009
H. Tanaka, Y. Sakurai, M. Suzuki, T. Takata, S. Masunaga, Y. Kinashi, G. Kashino, Y. Liu, T. Mitsumoto, S. Yajima, H. Tsutsui, M. Takada, A. Maruhashi, K. Ono	Improvement of dose distribution in phantom body using epithermal neutron source based on the Be(p,n) reaction using a 30MeV proton cyclotron accelerator.	Appl. Radiat. Isot.	Jul;67(7-8 Suppl)	S258-S261	2009
Y. Kinashi, M. Suzuki, S. Masunaga, K. Ono	Bystander effect-induced mutagenicity in HPR T locus of CHO cells following BNCT neutron irradiation: Characteristics of point mutations by sequence analysis.	Appl. Radiat. Isot.	Jul;67(7-8 Suppl)	S325-S327.	2009
H. Tanaka, Y. Sakurai, M. Suzuki, S. Masunaga, Y. Kinashi, G. Kashino, Y. Liu, T. Mitsumoto, S. Yajima, H. Tsutsui, A. Maruhashi, K. Ono	Characteristics comparison between a cyclotron-based neutron source and KUR-HWNIF for boron neutron capture therapy.	Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B	267	1970-1977	2009
G. Kashino, S. Fukutani, M. Suzuki, Y. Liu, K. Nagata, S. I. Masunaga, A. Maruhashi, H. Tanaka, Y. Sakurai, Y. Kinashi, N. Fujii, K. Ono	A simple and rapid method for measurement of ^{10}B -para-boronophenylalanine in the blood for boron neutron capture therapy using fluorescence spectrophotometry.	J. Radiat. Res.	50	377-382	2009
Y. Liu, K. Nagata, S. Masunaga, M. Suzuki, G. Kashino, Y. Kinashi, H. Tanaka, Y. Sakurai, A. Maruhashi, K. Ono	Gamma-ray irradiation enhanced boron-10 compound accumulation in murine tumors.	J Radiat. Res.	Nov;50(6)	553-557	2009
Y. Fujita, I. Kato, S. Iwai, K. Ono, M. Suzuki, Y. Sakurai, K. Ohnishi, T. Ohnishi, Y. Yura	Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therapy on oral squamous cell carcinoma.	Radiat. Oncol.	Dec 11	4-63	2009

別紙 4

丸山一雄、鈴木亮、小田雄介、宇都口直樹	リポソーム技術を基盤とする”デリバリーシステムと免疫療法”の構築	Drug Delivery System	23(6)	657-665	2008
H. Yanagie, H. Kumada, T. Nakamura, S. Higashi, I. Ikushima, Y. Morishita, A. Shinohara, M. Fujiwara, M. Suzuki, H. Sugiyama, T. Kajiyama, R. Nishimura, K. Ono, M. Eriguchi, H. Takahashi	Dosimetric evaluation for neutron capture therapy to hepatocellular carcinoma using intra-arterial administration of boron-entrapped water-in-oil-in-water emulsion.	Proceedings of 7th International Conference on Biomedical Engineering, Hierlemann edt, IASTED		126-130	2010

