

201011010A

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

蛋白質セラピー法と中性子捕捉療法による
難治性がん治療法開発に関する研究

(H21-ナノ-一般-004)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松井秀樹

平成23(2011)年5月

目 次

I. 総括研究報告

- 蛋白質セラピー法と中性子捕捉療法による難治性がん治療法開発
に関する研究 ----- 1
松井 秀樹

II. 分担研究報告

1. ボロン製剤の導入と効果測定に関する研究 ----- 2
宮武 伸一
2. 原子炉及び加速器による中性子源の開発に関する研究 ----- 3
小野 公二
3. 肺癌・悪性中皮腫モデル動物作製と治療に関する研究 ----- 4
井口 東郎
4. 難治療癌モデル動物作製に関する研究 ----- 5
富澤 一仁
5. 脳疾患動物モデル作製・培養細胞導入に関する研究 ----- 6
伊達 勲
6. ホウ素製剤の薬物動態測定に関する研究 ----- 7
西木 禎一
7. 分子標的による細胞内導入に関する研究 ----- 8
妹尾 昌治
8. 光学異性体ペプチド合成に関する研究 ----- 9
二木 史朗
9. 難治性癌モデル動物に対する治療効果の検討に関する研究
道上 宏之 ----- 10

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 11

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 15

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総括研究報告書

蛋白質セラピー法と中性子捕捉療法による難治性がん治療法開発

研究代表者 松井 秀樹 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

蛋白質セラピーを応用し、中性子捕捉療法に新規ホウ素製剤を開発することにより難治性がん治療法を検討する。新規ホウ素製剤の機能を脳腫瘍またはその他の難治性がんモデル動物で実証するとともに、それらの生体内薬物動態の測定や安全性試験を行い、臨床試験への橋渡しを行う。

研究分担者：

宮武伸一（大阪医大医学部・准教授）
小野公二（京大原子炉実験所・教授）
井口東郎（四国がんセンター・臨床研究部長）
富澤一仁（熊本大院医学薬学研究部・教授）
伊達 勲（岡山大院医歯薬学総合研究科・教授）
西木禎一（岡山大院医歯薬学総合研究科・助教）
妹尾昌治（(株)ピークル・取締役）
二木史朗（京大薬学研究所・教授）
道上宏之（岡山大院医歯薬学総合研究科・助教）

A. 研究目的

これまでに我々が開発した蛋白質セラピー法を応用・高機能化し、がん細胞に特異的に標的化され、しかも高効率に細胞内導入できる機能を有する中性子捕捉療法(BNCT)に用いるボロン（ホウ素）製剤を開発する。本研究全体では、開発したホウ素製剤の機能を代表として脳腫瘍、また、その他の難治性がんモデル動物で実証するとともに、それらの生体内薬物動態の測定や小動物を使った安全性試験を行い、臨床試験への橋渡しを行うことを目的とする。

B. 研究方法

ホウ素剤開発では、ホウ素のイオン集合体 BSH ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$)に膜透過性ペプチドを結合させて細胞導入効率を飛躍的に高めた BSH ペプチドと、ナノカプセル内部に BSH を封入し、抗体で標的化した抗体付加型ナノカプセル BSH（イムノリポソーム）の2種類を作製する。作製したホウ素製剤を培養腫瘍細胞や脳腫瘍モデル動物に投与し、中性子照射を行い効果を実証していく。

C. 研究結果

本年度、悪性脳腫瘍に特異的に送達する Multi-BSHペプチド、および、抗体付加

型ナノカプセルの作製に成功し、ホウ素デリバリーをマウス脳腫瘍モデルで検証した。一方で、BNCTに用いる京都大学原子炉実験所で開発中のサイクロトロン中性子ビームの生物学データの取得が完了し、平成23年度にはサイクロトロン中性子による、ヒト癌患者を対象とした臨床試験研究が開始出来る準備が整った。

D. 考察

次年度は、BSHペプチド、BSH封入抗体付加型ナノカプセルともに、中性子照射による治療実験に入る予定である。

E. 結論

長期休止後、点検のため使用できなかった原子炉が平成23年6月より再稼働する。23年度は、この2年間の結果を基に最適なホウ素投与濃度・投与方法で2種類の新規ホウ素製剤を腫瘍細胞に取り込ませ、腫瘍細胞レベル、さらに、担がん動物モデルが準備でき次第、腫瘍モデル動物レベルにて実際に中性子照射による治療実験を行い、BNCTでの効果を実証する。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

Feng B, Matsui H. et al., Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging in vivo. *Biomaterials* 31: 4139-4145, 2010.
Feng B, Matsui H. et al., Nanoparticle-based drug delivery systems for solid brain tumors. *Current Nanoscience* 7(1): 47-54, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところ無し。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

1. ボロン製剤の導入と効果測定

分担研究者 宮武 伸一 大阪医科大学 脳神経外科学・准教授

新規ホウ素製剤を脳腫瘍モデル動物に投与し、京都大学原子炉実験所でサイクロトロン中性子源により照射を行い、新規ホウ素製剤の治療実験を行う。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

我々は、長年に渡り動物を用いた前臨床研究や、2002年以降は悪性脳腫瘍症例の患者に対し、中性子源を利用した中性子捕捉療法による臨床研究を行ってきた。そのノウハウを利用し、今回の共同研究への参加を行う。本事業で最適化した新規ホウ素製剤を至適量、脳腫瘍モデル動物に投与し、京都大学原子炉にて中性子線源を確保し照射を行い、その効果を調べる。

B. 研究方法

ヒト由来の悪性脳腫瘍細胞株をヌードマウスの脳内に移植し、脳腫瘍を形成させ、臨床像に近い悪性脳腫瘍モデルを作製する。この脳腫瘍モデルマウスに、開発した新規 BSH ペプチド、あるいは、ナノカプセル内部に BSH を封入し、抗体で標的化した抗体付加型ナノカプセル BSH（以下、イムノリポソーム）のいずれかを投与する。経時的な濃度測定を行い、照射までの至適時間や至適量を決定する。投与前に京都大学原子炉実験所でシミュレーションを行い、濃度にあった中性子照射時間を検討する。

サイクロトロン中性子源により照射を行い、腫瘍縮小効果、生存期間を調べる。

C. 研究結果

共同研究者らにより、腫瘍動物モデルの検討、および、新規ホウ素製剤の最適化が本年度も行なわれている。我々は、現存するホウ素化合物BPAおよび BSHを用いてヒトグリオーマ患者に対して中性子捕捉療法を実施しており、最適な腫瘍動物モデルおよび新規ホウ素製剤が準備でき次第、中性子照射や治療のメソッドを本研究に応用するようそのノウハウを利用する。

D. 考察

燃料交換・総点検のため長期間運転を停止していた原子炉が平成23年度6月より稼働されることになり、稼働後、実験を進めていく予定である。

E. 結論

平成23年度にはサイクロトロン中性子による癌モデル動物を用いた新規ホウ素製剤の治療実験が開始出来る準備が整った。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

宮武伸一. 悪性脳腫瘍に対する最新放射線治療とその成績－放射線治療における外科治療の役割－.脳神経外科ジャーナル19: 899-906, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し。

2. 原子炉及び加速器による中性子源の開発

分担研究者 小野 公二 京都大学 原子炉実験所・教授

現在、京都大学原子炉実験所で開発中のサイクロトロン中性子の生物特性を検索し、ホウ素中性子捕捉療法の高効率化に不可欠なホウ素濃度やその分布の簡便な検索法を開発する。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

ホウ素中性子捕捉療法は1～2回の照射によって治療が完了する。途中での補正が適わないので、中性子の物理線量は言うに及ばず、生物効果も勘案した線量を正確に推定することが殊の外重要である。中性子の生物効果はエネルギーによって異なり中性子源毎にこれらを正確に把握することが不可欠である。本研究では京都大学原子炉実験所で開発中のサイクロトロン中性子の生物特性を検索する。ホウ素化合物のマイクロ分布や簡便な測定法の開発はこれまた不可欠な研究要素である。

B. 研究方法

(1) 加速器中性子の生物効果特性の実験動物および株化培養細胞による検索
BNCT適応の拡大を視野に入れ、4種の株化培養細胞を、更にマウスの放射線口腔死を指標としてRBEを求める。またヒト型ファントムの照射を行い、全身被曝について検索する。

(2) BPAの簡便測定法として開発した手法について実験犬を用いてその精度を検証するまた、新規のホウ素化合物の開発に欠かせない組織中でのホウ素化合物のマイクロ分布の検索法の開発のためにαオートラジオグラフィ(ARG)技術の改良を行う。

C. 研究結果

(1) 加速器中性子ビームのRBEはγ線に対する感受性が元々高かったヒト新生児皮膚繊維芽細胞株では2.0と小さかったが、他は2.3、2.5、2.6であった。また、放射線口腔死を指標として求めたRBEは2.8であった。これらより、中性子のRBEは2.5と決まった。脳腫瘍のBNCTを想定して行ったヒト型ファントムでの全身各部位の被ばく線量の検

索では、首が1.57 Gy-Eq、胸、へそ、そけい部、膝、くるぶしなどの部位での推定線量は約0.35～0.78 Gy-Eqであった。

(2) 実験犬にホウ素化合物BPAとBSHを二重投与し、BPA濃度を蛍光強度で測定、総ホウ素濃度を即発γ線分析あるいはICPで測定することによって化合物由来別のホウ素濃度を分別測定できた。ただ、全血での測定では、投与後の時間経過と共にBPAの血球・血漿間での移動があるようで、不正確になるが血漿中濃度では精度が確認された。ARGの精度を上げて細胞間の分布の差を検出するには、ARG画像と染色標本の画像を正確に重ね合わせるが必要になる。ランドマークとして血管に着目して技術を改良し、目的達成の目途が立った。

D. 考察

開発中のサイクロトロン中性子ビームの生物学データの取得が完了した。これにより、治験の実施に向けた非臨床試験が纏まった。ホウ素濃度を由来化合物別に弁別測定する手法の開発は、BSHとBPAの併用を基本とする悪性神経腫瘍のBNCTでは不可欠の技術であり、これまでの濃度・時間変化曲線からの推定による精度を格段に向上させるものである。

E. 結論

平成23年度にはサイクロトロン中性子による、ヒト癌患者を対象とした臨床試験研究が開始出来る準備が整った。

F. 健康危険情報；総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

Y. Fujita, K. Ono, et al. Induction of multinucleation in oral squamous cell carcinoma tissue with mutated p53 surviving boron neutron capture therapy. *Int J Radiat Biol*, 87(3):293-301,2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

3. 肺癌・悪性中皮腫モデル動物作製と治療

分担研究者 井口 東郎（独）国立病院機構四国がんセンター・腫瘍内科
（四国がんセンター臨床研究部） | 臨床研究部長

モデル動物作製の成功は、治療実験において大きな意味合いを持つ。肺ガンモデル、及び悪性中皮腫モデルや難治性悪性腫瘍疾患である悪性脳腫瘍や膵臓癌などの担癌動物の作製し、テーラーメイド医療につながるモデルを作製する。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

膵臓がん（膵がん）の予後は画像診断や治療法が発達した今日も未だ十分ではない。予後不良の原因として、早期診断が難しい、治療抵抗性や進展が早いといった膵がん自体の生物学的悪性度がある。これらの背景から、本研究は膵がんの予後改善につながる診断・治療体系の確立を目的とする。

B. 研究方法

膵がんの80%超は切除不能で、切除不能膵がんには化学療法が施行される。ただ、膵がんには保険適応の抗がん剤はGEMとS-1の2剤しかなく、治療の選択肢は未だ限られている。膵がん化学療法ではGEM単剤が1次治療としての標準治療に位置づけられているが、2剤を同時に使うGEM+S-1(GS)療法はGEM単剤の標準治療よりも奏効率及び生存期間で優れているとの報告も散見される。本年度は、高度肝転移を有する膵がん14例を対象としてGS療法を施行し、その治療成績について検討を加えた。

C. 研究結果

GS療法(GEM1000mg/m², d1 & 8; S-1 60mg/m², d1-14; q3wks)の投与クール数は1~19クール(平均7.9クール)であったが、このうち6例が病勢の進行及び有害事象によって早期脱落となった。CR/PR/SD/PDは各々1/5/3/5で、奏効率(CR, PR)は43% (6/14)であり、また、6ヶ月及び1年生存率は各々71% (10/14)及び21% (3/14)であった。CA19-9はその値が50%以上改善した症例で生存期間の有意延長をみる為、CA19-9 50%以上改善率が膵がんの治療効果を表す一つの指標として使われ

る。本検討では、14例中12例で治療前のCA19-9値上昇を認め、このうち8例が治療後に50%以上の改善を示した。14例全体での無増悪生存期間(PFS)及び全生存期間(OS)は各々186日及び261日であった。CA19-9 50%以上改善率を指標とした改善群(n=8)及び非改善群(n=4)におけるPFS及びOSは、改善群で各々239日及び323日、一方、非改善群で各々44日及び123日で、改善群でPFS及びOSが有意に延長していた。有害事象については、グレード3以上の血液毒性及び非血液毒性を各々7/14(50%)及び1/14(7%)に認め、3例で投与量の減量を行った。

D. 考察

GEMで治療した遠隔転移を伴った膵がんの生存期間の中央値は5ヶ月前後と報告されているが、今回対象とした高度肝転移を有する膵がんは、肝転移が生命予後を規定する為、その生存期間は5ヶ月よりも更に短くなると予測される。その中で、今回の検討では、14例全体の生存期間は261日ではあるが、GS療法のもとでCA19-9値が50%以上改善を示した症例が8例みられ、これら症例の生存期間は323日と5ヶ月を大きく上回る成績であった。また、毒性については、有害事象による中止が1例及び減量が3例であり、GS療法の忍容性についても問題はなかったと考えられる。

E. 結論

予後的に期待できない高度肝転移を有する膵がんの治療法としてGS療法はひとつの選択肢となり得る。

F. 健康危険情報：総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

Okusaka T, Iguchi H, et al. *Cancer Sci* 102(2):425-431, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

4. 難治療癌モデル動物作製

分担研究者 富澤 一仁 熊本大学大学院生命科学研究部・教授

神経膠芽腫は、確定診断後の平均余命が1年未満と最も治療に抵抗性の癌の一種である。これまでヒトの病態に似た神経膠芽腫モデルは、存在しなかった。本研究では、神経膠芽腫患者から摘出した腫瘍からがん幹細胞を単離培養し、同細胞をヌードマウスに植立したモデル動物を作製した。同モデルでは、ヒト同様播種性に癌細胞が浸潤していることを確認した。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

ヒト神経膠芽腫の病態を呈するモデル動物を作製する。

B. 研究方法

術中に神経膠芽腫患者から摘出したがん組を非コーティング培養皿内で無血清培地を用いた浮遊細胞塊形成法を用いて培養した。細胞塊を形成した細胞を単離培養し、がん幹細胞の樹立を試みた。

樹立した細胞が、がん幹細胞であるか検証するために、神経幹細胞のマーカーであるNestin, Sox2、グリア細胞のマーカーであるGFAP、ならびに神経細胞のマーカーであるMAP2で免疫染色した。また樹立した細胞100個をヌードマウスの脳内に植立し、神経膠芽腫を形成するか検討した。

（倫理面への配慮）

神経膠芽腫患者から摘出した腫瘍から細胞株を樹立するために、予め学内臨床研究倫理委員会で実験計画について承認を得て（承認番号：ゲノム第110号）、患者の同意を得て実施した。

C. 研究結果

神経膠芽腫患者から樹立した細胞塊を形成する細胞は、NestinならびにSox2陽性であった。一方、GFAPならびにMAP2は陰性であることから幹細胞の特徴を有した細胞であることが明らかになった。

また、この樹立した細胞をヌードマウスの脳内に植立すると、植立後14～18日で

ほぼ全マウスが死亡した。死亡したマウスから脳を摘出後、薄切片を作製し、免疫染色ならびにH.E.染色を行った。植立した細胞は、播種性にマウス脳内に浸潤していた。また腫瘍は、GFAP陽性であったが、MAP2は陰性であった。

D. 考察

神経膠芽腫患者腫瘍から樹立したがん幹細胞をヌードマウスに植立することにより、ヒト神経膠芽腫の特徴を有したモデル動物を作製することができた。本モデルは、中性子捕捉療法の効果判定に有用であることが期待される。

E. 結論

ヒト神経膠芽腫の特徴を有したモデル動物の作製に成功した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li et al., Ciliary transition zone activation of phospho-Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* 13:402-411, 2011.

2. Arragain et al., Identification of eukaryotic and prokaryotic methyltransferases for biosynthesis of 2-methylthio-N6-threonyl carbamoyladenine in tRNA. *J Biol Chem* 285:28425-28433, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「幹細胞の分化誘導方法」

出願番号：2010-077641。出願日：2011年3月10日。出願人：熊本大学

5. 脳疾患動物モデル作製・培養細胞導入

分担研究者 伊達 勲 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経外科・教授

悪性脳腫瘍、特に神経膠芽腫と呼ばれる疾患は、実際は脳へ浸潤する形態を有する。しかしながら、その形態をモデル動物で再現することは困難である。今回我々は、ヒト悪性脳腫瘍細胞をマウスに移植し、新規の悪性脳腫瘍モデルを作製する。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

悪性脳腫瘍、特に神経膠芽腫と呼ばれる疾患は、実際は脳へ浸潤する形態を有する。しかしながら、その形態をモデル動物で再現することは困難である。今回我々は、ヒト悪性脳腫瘍細胞と動物腫瘍細胞をマウスに移植し、新規の悪性脳腫瘍モデルを作製、開発する。

B. 研究方法

ヒトバリエーションIII型EGF受容体を発現させたU87ΔEGFR細胞ならびにU87 Parental cell line、動物脳腫瘍のcell lineを用いて検討を行う。ヌードマウスは8週齢メスを使用する。これらのcell lineに対して、浸潤増殖因子を導入したセルラインを作製する。その後、ヌードマウス脳内へ移植しその経過をみる。脳腫瘍が形成されたのちに、脳を摘出し正常脳への浸潤の程度や脳損傷についての検討を行う。病理組織における検討を免疫染色やin situ hybridizationなどにより行い、臨床像に近い悪性脳腫瘍モデルを作製する。

C. 研究結果

ヒトEGF受容体に対するモノクローナル抗体は、同受容体を発現しているU87ΔEGFR細胞において、ウエスタンブローディング法や免疫染色で同受容体を認識した。

U87ΔEGFR細胞株やU87 parental cell

line、動物脳腫瘍のcell lineに新規浸潤関連遺伝子を導入し、細胞浸潤効果や細胞増殖効果についての検討を行った。動物脳腫瘍のcell lineに新規浸潤関連遺伝子を導入した細胞は実際のgliomaにみられる浸潤性を認め、より臨床像に近い動物腫瘍モデルの作製に成功した。

D. 考察

ヒトバリエーションIII型EGF受容体は、悪性脳腫瘍においてその発現が強くみられる遺伝子である。しかしながら、EGF受容体はヒト細胞株を脳内で発現させる作用を増強させるものの、浸潤能を高める作用はない。今回我々は、ホウ素中性子捕捉療法を行うに当たって、臨床の脳腫瘍患者に近い疾患モデル動物を作製することに成功した。今後、このようなモデルを用いることにより、臨床での治療効果を予測した実験を行うことが可能となると考える。

E. 結論

U87細胞株や動物脳腫瘍細胞株を利用した新規脳腫瘍モデルの作製とその発展について検討を行う。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

Onishi M, Date I, et al. Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol.* 28:13-24, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところ無し。

6. ホウ素製剤の薬物動態測定

分担研究者 西木 禎一 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生理学
・助教

新規ホウ素製剤である BSH を内包した抗体付加型ナノカプセルを動物担癌モデルに投与し、その生体内動態を確認する。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

脳腫瘍に対する新規ボロン剤を用いた中性子捕捉療法の開発を目指し、モデル動物を作製するとともに投与した新規ボロン剤の薬物動態を明らかにする。

B. 研究方法

【BSH 封入ナノカプセルの合成】

EGFR 抗体付加型 BSH 封入ナノカプセルを合成した。種々の脂質成分を混合し逆相蒸発法（REV 法）にて BSH を内包したリポソーム（ナノカプセル）を合成した。この Ni リポソーム表面に、抗 EGFR 抗体を ZZ タンパクを介して結合させたイムノリポソームを作製した。リポソームおよびイムノリポソームの平均粒径は、それぞれ約 110、および 130nm であった。

【マウス脳腫瘍モデルへの投与】

4-6 週メス、ヌードマウスを用いて、EGFRvIII を発現している U87ΔEGFR をマウス脳内に移植し、脳腫瘍モデルマウスを作製した。2 週間後、合成したイムノリポソームを尾静脈より投与し、種々の時間経過後、各臓器を摘出し、免疫染色にて臓器内のホウ素デリバリーを確認した。また、臓器内のホウ素濃度を ICP により定量した。

C. 研究結果

免疫染色の結果、コントロールであるリ

ポソームに対し、イムノリポソームでは¹⁰Bの腫瘍特異的な集積を認め、24時間以上その集積は続いた。ICPによる各組織でのホウ素濃度測定では、脳正常部ではイムノリポソーム、リポソームともにほとんど細胞内へ取り込まれていないのに対し、腫瘍部ではイムノリポソームは、効率的に腫瘍組織に取り込まれていることがわかった。イムノリポソーム投与後24時間では腫瘍内ホウ素濃度は約30ppmに達した。一方、血液中のホウ素濃度は投与後4時間でピークであったが、12時間で速やかに減少していた。

D. 考察

本研究で合成した BSH 封入ナノカプセルは、マウス脳腫瘍モデルを用いた *in vivo* 実験で、標的とした脳腫瘍部位に特異的に集積され、目標であった 30ppm のホウ素濃度を達成し 24 時間以上一定濃度を保持した。現在、さらに生体安全性を考慮し、改良を進めている。

E. 結論

in vivo 実験での結果を基に、最適なホウ素投与濃度・投与方法で¹⁰Bを腫瘍細胞に取り込ませ、腫瘍モデル動物を用いて実際に中性子照射による治療実験に今後入る予定である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表；なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

7. 分子標的による細胞内導入

分担研究者 妹尾 昌治 株式会社ビークル・取締役

分子標的医療で、リポソームやナノカプセルに抗体やリガンドを提示すると同時に薬効成分を封入して、がんの特異的なあるいは過剰に発現している抗原や受容体を標的にして治療を行うには、その標的分子の性質により、その後の方法論を考える必要がある。本研究では、標的分子としてがんでの過剰発現が頻見されるErbB2について、その人工リガンドを応用して細胞特異的に薬剤導入できるベクターを開発する。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

がんの特異的な抗原として知られる ErbB2 (Her2)は分子標的治療のマーカーとして創薬の対象となっている。本研究では、ErbB2に親和性を持つ人工ペプチド EC-1 を用いて細胞種によりErbB2の細胞内への内在化に差があることを示すと同時に、抗体の Fc 領域との融合タンパク質としたり DDS ベクターの表面に多価で提示したりする事により細胞内へ取り込まれるようになることを明らかにする。

B. 研究方法

1. ErbB2人工リガンドのFc融合タンパク質
ErbB2の人工リガンドEC-1はpEGFP-N1のCMVプロモーターの下流にヒトIgGのFc領域をコードする部分と融合タンパク質がコードされるように遺伝子を組み込み、Hek293細胞で発現させその培養上清から回収した。細胞表面上に異なる数のErbB2を発現する細胞株MCF7, MDA-MB-453, SK-BR-3, SK-OV-3に対してEC-Fcが結合する様子を共焦点顕微鏡により観察した。

2. ErbB2の細胞内への内在化
EC-1、EC-Fc融合タンパク質を用いてErbB2の細胞内への内在化について検討を行った。さらに、EC-FcをプロテインAのZZモチーフを持つバイオナノカプセルZZ-BNCの表面上に提示したものを調製し、ErbB2への親和性を評価した。さらにこのEC-Fc/ZZ-BNCを用いてSK-BR-3細胞への内在化について検討を行い、EC-1ペプチドの形とErbB2への親和性および細胞内への内在化に関して検討した。

C. 研究結果

ErbB2の人工リガンドEC-1は細胞の種類によりErbB2の内在化を引き起こさない場合がある。

本研究の場合、SK-BR-3細胞はErbB2の細胞内内在化が難しい。また、人工リガンドEC-1はFc融合タンパク質やBNC表面に提示する多価でErbB2に結合する形にすることで、親和性を約100倍向上させると共に、細胞内への内在化を促進させる事ができる事が分かった。

D. 考察

細胞表面分子を標的とする技術としてヒト化抗体が医薬として重用されている(例;ハーセプチン)。本研究ではハーセプチンがErbB2を標的とし、薬効の大きい部分がADCC効果にある。ErbB2過剰発現細胞の中には、ErbB2の細胞の内在化に差があり、内在化の傾向が弱い細胞ほどハーセプチンによる標的効果が期待できる。そこで、ErbB2の分子標的には細胞内への内在化が起こるものに対しては、制がん剤を同時にデリバリーできるものの方がより高い効果を期待できると考えられる。本研究結果は、リガンドを多価で提示する事はErbB2の細胞内内在化を促進する傾向に有る事を明らかにした。このことは、ADCC効果を期待できない場合は、リポソームやナノカプセルに制がん剤を封入する剤型で、抗体やリガンドを多価で細胞を認識するデザインをとる事により大きな薬効を少ない副作用で期待できる可能性が示されたと考えられる。

E. 結論

細胞表面上の標的分子を多価で結合させる抗体やリガンドのデザインは細胞内導入を促進し、分子標的効果を効率よく上げることができることを示した。従って、分子標的を行う場合の指針として重要な知見が得られた。

F. 健康危険情報；総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

Vaidyanath A, Seno M, et al. Enhanced internalization of ErbB2 in SK-BR-3 cells with multivalent forms of an artificial ligand. *J Cell Mol Med* in press, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し。

8. 光学異性体ペプチド合成

分担研究者 二木 史朗 | 京都大学化学研究所・教授

BSHは中性子捕捉剤として理想的だが、水溶性で分子サイズが大きいのでそのままでは細胞に入らない。膜透過ドメイン(PTD)との結合により、細胞移行効率が向上することが明らかとなっているが、この光学異性体ペプチドなどを用いることで、一層の細胞移行性の向上をねらった。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

高い細胞膜透過性を示す膜透過ドメインとその光学異性体ペプチドの合成を行う。

B. 研究方法

これまでに、BSHの細胞内送達に9～11個のアルギニンペプチドからなるPTDの利用が有効であることが知られていたが、これらを脂質修飾したり、疎水性の配列を付加することにより、一層の細胞内移行効率の向上を図った。

C. 研究結果

アルギニンペプチドのN末端をヘキササン酸やデカン酸などで修飾することにより、ペプチドの細胞内移行効率は大きく向上することが分かった。これらのうち、ヘキササン酸修飾ペプチドは、溶解性、細胞毒性、細胞内移行能を総合して、より優れた性質を持っていることが分かった。細胞の生理的取込系であるエンドサイトーシスが機能しない低温条件下でもヘキササン酸修飾ペプチドの細胞内移行が見られたことから、このペプチドは細胞膜と相互作用し、これを直接透過することにより細胞内移行を達成することが示唆された。

一方、アルギニンペプチドのN末端側に透過促進配列 (Pas: FFLIPKG) を付加することにより、細胞内移行が高まり、この光学異性体ペプチド (D

体ペプチド) は一層高い移行活性を示し、抗ガンペプチドとの連結によりガン細胞の増殖の有意な抑制が見られることをこれまでに明らかにしているが、この際、PTDと抗がんペプチドとの連結体の疎水性と親水性のバランスが細胞内活性発現に重要であることを新たに見いだした。

D. 考察

光学活性ペプチドが高活性を示す理由は、細胞内プロテアーゼによる分解の抑制などによる体内滞留性の向上と考えられるが、これにPTD結合体が適度な親水性・疎水性のバランスを有することで溶解性と細胞膜との相互作用のトータルでの兼ね合いが向上し、細胞移行効率が向上する可能性がある。

E. 結論

光学活性ペプチドに適切な親水性・疎水性のバランスを加えることにより、より効果的なBSHの細胞内送達系が樹立できる可能性がある。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

Katayama et al: *J Control Rel* 149:29-35,2011.

Akita et al: *J Control Rel* 143:311-317,2010.

Miyamoto et al: *Bioconj Chem* 21:2031-2037, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

9. 難治性癌モデル動物に対する治療効果の検討

分担研究者 道上 宏之 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生理学
・助教

難治性癌モデル動物での新規ホウ素製剤の治療効果を検討するために、新規 BSH ペプチドを腫瘍モデル動物に投与し、その生体内動態を調べる。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

脳腫瘍に対する新規ボロン剤を用いた中性子捕捉療法の開発を目指し、難治性癌モデル動物を作製するとともに投与した新規ボロン剤の治療効果を検討する。本年度は作製した新規 BSH ペプチドを脳腫瘍動モデルに投与し、生体内動態を調べる。

B. 研究方法

【BSH ペプチドの合成】

我々が開発したドラックデリバリー技術 (DDS) である蛋白質セラピー法は、細胞の生理作用を利用して積極的に細胞に物質を取り込ませる画期的な技術である。本研究ではこの技術を応用した細胞膜透過性ホウ素製剤 (BSH ペプチド) を開発する。ホウ素のイオン集合体 BSH ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) に膜透過性ペプチドを結合させて細胞導入効率を飛躍的に高めた細胞膜透過性ホウ素製剤 (BSH ペプチド) を合成した。

【マウス脳腫瘍モデルへの投与】

ヌードマウスを用いて、EGFRvIII を発現している U87ΔEGFR をマウス脳内に移植し、脳腫瘍モデルマウスを作製した。合成した BSH ペプチドを尾静脈より投与し、種々の時間経過後、各臓器を摘出し、免疫染色にて臓器内のホウ素デリバリーを確認した。

C. 研究結果

BSH ペプチドでは、昨年度、BSH1ケと細胞膜透過ペプチドの結合に既に成功している。本年度は、細胞内へのBSH送達の高効率化を図るために、多数のBSHとペプチドの結合を行った (以下、Multi-BSH ペプチド)。Multi-BSH ペプチドは単体のBSHペプチドに比べ、約10倍も高効率に腫瘍細胞内へ導入され、脳腫瘍モデルマウスを用いた本研究では腫瘍特異的に導入され、かつ24時間以上細胞内に保持されることが確認された。

D. 考察

BSH 送達の高効率化のため、多数のBSH とペプチドを結合させた Multi-BSH ペプチドの合成に成功した (岡山大学研究推進産学官連携機構知的財産本部を通じ、特許書類作成申請中)。この Multi-BSH ペプチドは脳腫瘍部位に特異的に導入され、24 時間以上保持された。

E. 結論

in vivo 実験での結果を基に、最適なホウ素投与濃度・投与方法で腫瘍細胞にBSH ペプチドを取り込ませ、腫瘍モデル動物を用いて実際に中性子照射による治療実験に今後入る予定である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表；なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の著者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宮武伸一	BNCTによる悪性脳腫瘍、頭頸部腫瘍の治療	川端信司、 宮武伸一	臨床医とコメディカルのための「最新クリニカルPET」	先端医療技術研究所	東京	2010	207-210
井口 東郎	3.切除不能例に対する治療 B.インフォームド・コンセントのポイント	奥坂拓志、 羽鳥隆	膵癌診療ポケットガイド	医学書院	東京	2010	154-164
Yuh Sugii, Masaharu Seno et al.	Clustering Genes, Tissues, Cells and Bioactive Chemicals by Sphere SOM	Josphat Igadwa Mwasiagi	Self Organizing Maps - Applications and Novel Algorithm Design	InTech	Croatia	2011	371-386
Haidong Tan, Masaharu Seno			Exploring the mechanism for biological evolution: DNA methyltransferase is the pushing power of DNA and protein evolution.	Lambert Academic Publishing	Germany	2011	

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
Feng B., Tomizawa K., Matsui H.	Nanoparticle-based Drug Delivery Systems for Solid Brain Tumors	Current Nanoscience	7(1)	47-54	2011
Feng B, Tomizawa K., Michiue H., Miyatake S., Matsui H. et al	Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging in vivo.	Biomaterials	31	4139-4145	2010
Araki D., Tomizawa K., Matsui H. et al	Cell-penetrating D-isomer peptides of p53 C-terminus: Long-term inhibitory effect on the growth of bladder cancer.	Urology	75(4)	813-819	2010

Fujita Y., <u>Ono K.</u> , et al	Induction of multinucleation in oral squamous cell carcinoma tissue with mutated p53 surviving boron neutron capture therapy.	Int J Radiat Biol	87(3)	293-301	2011
Hamada N., <u>Ono K.</u> , et al	Recent advances in the biology of heavy-ion cancer therapy.	J Radiat Res	51(4)	365-83	2010
Masunaga S., <u>Ono K.</u> , et al	Usefulness of Hexamethylenetetramine as an Adjuvant to Radiation and Cisplatin in the Treatment of Solid Tumors: its Independency of p53 Status.	J Radiat Res	51	27-35	2010
Kinashi Y., <u>Ono K.</u> , et al	Ascorbic acid 2-glucoside reduces micronucleus induction in distant splenic T lymphocytes following head irradiation.	Mutation Research	695	69-74	2010
Masunaga S., <u>Ono K.</u> , et al	Influence of manipulating hypoxia in solid tumors on the radiation dose-rate effect in vivo, with reference to that in the quiescent cell population	Jpn J Radiol	28(2)	132-142	2010
Masunaga S., <u>Ono K.</u> , et al	Evaluation of the Radiosensitivity of the Oxygenated Tumor Cell Fractions in Quiescent Cell Populations within Solid Tumors.	Radiat Res	174(4)	459-466	2010
Inoue M., <u>Ono K.</u> , et al	Clinical effectiveness of boron neutron capture therapy for a recurrent malignant peripheral nerve sheath tumor in the mediastinum.	J Thorac Oncol	5(12)	2037-2038	2010
小野公二, 他	加速器中性子源によるホウ素中性子捕捉療法の展望	映像情報 medical	42(12)	1028, 1038-41	2010
Okusaka T., <u>Iguchi H.</u> , et al	Phase II study of erlotinib plus gemcitabine in Japanese patients with unresectable pancreatic cancer.	Cancer Sci	102(2)	425-431	2011
Nasu J., <u>Iguchi H.</u> , et al	A case of small undifferentiated intramucosal gastric cancer with lymph node metastasis.	Gastric Cancer	13(4)	264-266	2010
Yamaguchi K., <u>Iguchi H.</u> , et al	Clinical implication of the antidiuretic hormone (ADH) receptor antagonist mozavaptan hydrochloride in patients with ectopic ADH syndrome.	Jpn J Clin Oncol	41(1)	148-152	2011
Seike T., <u>Iguchi H.</u> , et al	Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis.	Clin Exp Metastasis	28(1)	13-25	2011
仁科智裕、井口東郎	2章 分子標的薬の副作用マネジメント 9 消化器症状	消化器がん化学療法看護完全マスターBOOK (消化器外科 NURSING)	臨時増刊	224-233	2010
仁科智裕、井口東郎	2章 分子標的薬の副作用マネジメント 10 消化器穿孔	消化器がん化学療法看護完全マスターBOOK (消化器外科 NURSING)	臨時増刊	234-238	2010

井口東郎	診断と治療 (8)電解質異常	コンセンサス癌治療	9	36-39	2010
Hiramatsu R., <u>Miyatake S.</u> et al	Application of a novel boronated porphyrin (H ₂ OCP) as a dual sensitizer for both PDT and BNCT.	Lasers in Surgery & Medicine	43	52-58	2011
Yamashita T., <u>Miyatake S.</u> , et al	Asialoerythropoietin attenuates neuronal cell death in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia in a gerbil model.	Neurol Res	50	957-962	2010
宮武伸一	悪性脳腫瘍に対する最新放射線治療とその成績 -放射線治療における外科治療の役割-	脳神経外科ジャーナル	19	899-906	2010
川端信司、宮武伸二	中性子捕捉療法 (新時代の脳腫瘍学 診断治療の最前線。 V 脳腫瘍の治療 脳腫瘍の放射線治療)	日本臨牀	68 巻 増刊号 10	427-431	2010
川端信司、宮武伸二	BNCTによる悪性脳腫瘍、頭頸部腫瘍の治療	臨床医とコメディカルのための「最新クリニカルPET」	先端医療技術研究所	207-210	2010
Aoki T, <u>Miyatake S.</u> et al	Phase II study of ifosfamide, carboplatin, and etoposide in patients with a first recurrence of glioblastoma multiforme.	J Neurosurg	112	50-56	2010
Li A., <u>Tomizawa K.</u> et al	Ciliary transition zone activation of phospho-Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors.	Nat. Cell Biol	13	402-411	2011
Arragain S., <u>Tomizawa K.</u> et al.	Identification of eukaryotic and prokaryotic methyltransferases for biosynthesis of 2-methylthio-N ⁶ -threonylcarbamoyladenosine in tRNA.	J Biol Chem.	285	28425-28433	2010
Onishi M., <u>Date I.</u> et al	Angiogenesis and invasion in glioma.	Brain Tumor Pathol	28	13-24	2011
Vaidyanath A., <u>Seno M.</u> et al.	Enhanced internalization of ErbB2 in SK-BR-3 cells with multivalent forms of an artificial ligand.	J Cell Mol Med	WEB公開中		2011
Hamamoto K., <u>Seno M.</u> et al	Extracellular matrix modulates insulin production during differentiation of AR42J cells: functional role of Pax6 transcription factor.	J Cell Biochem	112 (1)	318-329	2011
Tan H., <u>Seno M.</u> et al	The conformational polymorphism of green fluorescent protein.	Molecular Biology	印刷中		2011
Tan H., <u>Seno M.</u> et al	Construction of a high-efficiency multi-site-directed mutagenesis.	African J Biotechnol	10 (3)	449-452	2011

Haidong T., <u>Seno M.</u> et al	Optimization of Bacterial Plasmid Transformation Using Nanomaterials Based on the Yoshida Effect.	Int J Mol Sci	11 (12)	4962-4972	2010
Tan H., <u>Seno M.</u> et al	First Report of <i>Cucumber mosaic virus</i> in Sweet Cherry in the People's Republic of China.	Plant Disease	94 (11)	1378	2010
Hirai M., <u>Seno M.</u> et al	E-selectin targeting to visualize tumors in vivo.	Contrast Media Mol Imaging	5(2)	70-77	2010
Hirai M., <u>Seno M.</u> et al	Novel and simple loading procedure of cisplatin into liposomes and targeting tumor endothelial cells.	Int J Pharm	391	274-283	2010
Otani T., <u>Seno M.</u> et al	Production of biologically active IgG hinge-tag soluble epidermal growth factor receptors (ErbB).	Biotechnol Lett	32	361-366	2010
Katayama S., <u>Futaki S.</u> et al	Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors	J Control Release	149(1)	29-35	2011
Akita H., <u>Futaki S.</u> et al	Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: Programmed endosomal escape and dissociation	J Control Release	143	311-317	2010
Miyamoto R., <u>Futaki S.</u> et al	Enhanced target-specific accumulation of radiolabeled antibodies by conjugating arginine-rich peptides as anchoring molecules	Bioconjug Chem	21(11)	2031-2037	2010

Nanoparticle-based Drug Delivery Systems for Solid Brain Tumors

Bin Feng^{1,2}, Hideki Matsui² and Kazuhito Tomizawa^{3,*}

¹Department of Biotechnology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China, ²Department of Physiology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan, ³Department of Molecular Physiology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8558, Japan

Abstract: The treatment of brain tumors including glioblastoma multiformes (GBMs) remains a challenge. The main option is still surgery to remove the bulk of the tumor and adjuvant treatments for the infiltrating parts. The blood brain barrier (BBB), however, restricts the access of chemotherapeutic agents to the tumor. The use of nanoparticle-based drug delivery systems (DDSs) has an increasing impact on disease diagnosis and therapy. By altering their size, composition, and surface chemistry, nanoparticles can be developed into a universal platform with multifunctional capabilities to meet the tunable requirements of different DDS. Thus, nanoparticles have the potential for targeted delivery of therapeutic cargo to brain tumors combined with simultaneous detection and imaging functions, providing a new strategy for effective therapy. The purpose of this article is to provide an updated review on the current progression and future possibilities of treating brain tumors with nanoparticles.

Keywords: Nanoparticles, targeted drug delivery, blood-brain barrier, imaging; therapy.

1. INTRODUCTION

Brain tumors are a heterogeneous group of neoplasms, each with its own characteristics, treatment, and prognosis. For most intracranial tumors, the clinical diagnostic approach and initial treatment are similar [1]. Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most malignant and aggressive brain tumors. The local infiltration of high-grade glioblastomas prevents the complete resection of all malignant cells. Although at present, treatment mainly consists of surgery and radiotherapy [2], it is difficult to remove all the cancerous tissues without severely damaging the brain, and healthy brain tissue is less tolerant to conventional radiotherapy than tumor tissue. Moreover, glioblastomas are resistant to radiation. Although surgery together with chemotherapy is generally performed for brain tumors, malignant brain tumors are the most lethal primary tumors because of difficulties with the targeted delivery of anti-tumor drugs [3]. The delivery of drugs to the brain needs a special strategy to bypass the blood brain barrier (BBB). Current drug delivery methods for the brain include: chemical modification of drug and prodrugs; temporary disruption of the BBB; local delivery to the brain; convection-enhanced delivery (CED); and carrier/receptor-mediated delivery [4].

Drug delivery systems (DDS) such as lipid- or polymer-based nanoparticles can be designed to improve the pharmacological and therapeutic properties of drugs administered parenterally [5]. Nanoparticles were first developed three decades ago. Their initial applications were mainly as vaccine carriers and chemotherapeutic agents [6,7]. The use of nanoparticles in DDS will allow practitioners to use drugs to target specific areas of the body. In the treatment of malignancies, the use of nanoparticles as DDS is having a measurable impact. Medical imaging can also utilize DDS to illuminate tumors, the brain, or cellular functions in the body. The utility of nanoparticle-based DDS to improve human health is potentially enormous.

Nanoparticle-based drug delivery has emerged as a potential method for improving the detection and treatment of brain tumors given the non-toxicity and simplicity in surface modifications of nanoparticles [8]. Nanoparticles are stable, solid, colloidal particles consisting of biodegradable polymer or lipid materials and range in

size from 10 to 1,000 nm. Desirable properties such as a small size, a high payload, tumor-specific targeting, a long blood circulation time, and the ability to cross the BBB, can be achieved with nanoparticle delivery systems. Moreover, multi-functionality including the detection, treatment and tracking of tumors is another advantage of nanoparticles, leading to informed decisions about further treatment [9]. Nanoparticles can provide many ideal devices for the delivery of specific compounds to brain tumors, loading them into nanoparticle-based carriers *via* a variety of chemical methods including encapsulation, adsorption, and covalent linkage. These nanoparticles are probably internalized into brain tissue, bypassing the BBB, *via* endocytosis by endothelial cells, using different molecularly-based nanoparticle-brain tumor cell interactions.

Nanoparticle research involves the design, synthesis, and characterization of materials and devices that have a functional organization in at least one dimension on a nanometer scale. Advances in nanoparticle research have produced an array of nanoscaled polymeric, liposomal, and inorganic materials as potential drug carriers [10-12]. Using a variety of nanoparticles of different chemical compositions, different groups are exploring proof-of-concept approaches for the delivery of anti-cancer drugs, oligonucleotides, genes, and magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents.

Nanoparticles can concentrate in tumor masses, at inflammatory sites, and at infectious sites by virtue of the enhanced permeability and retention (EPR) effect on the vasculature [13]. The EPR effect provides an opportunity for a more selective delivery of nanoparticles (lipid or polymer-conjugated anticancer drugs) to the tumor [14,15]. It is possible for nanoparticles to selectively deliver several different drugs to malignant tissue [16].

The BBB is the most important barrier involved in the regulation of molecules accessing the brain. The BBB is composed of relatively impermeable endothelial cells with tight junctions, enzymatic activity, and active efflux transport systems. The BBB represents an insurmountable obstacle for a large number of drugs, including antibiotics, antineoplastic agents, and a variety of drugs acting on the central nervous system (CNS), especially neuropeptides [17,18]. The opening of tight junctions in cancer cells is one of the most important abnormalities in brain cancer, and becomes more pronounced as the malignancy worsens. However, hyperpermeability occurs mainly in new vessels, whereas barrier function is retained in the growing margins of the tumor [19,20]. The use of nanoparticles to deliver drugs to the brain by infiltrating the BBB

*Address correspondence to this author at the Department of Molecular Physiology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8558, Japan; Tel: +81 96 373 5050; fax: +81 96 373 5052; E-mail address: tomikt@kumamoto-u.ac.jp

may provide a way to solve this problem. Nanoparticles are excellent tumor-targeting vehicles because of a unique inherent property of solid tumors. Due to their rapid growth, many solid tumors have a fenestrated vasculature and poor lymphatic drainage, resulting in an EPR effect [14], which allows nanoparticles to accumulate specifically at the cancerous site.

Beyond the passive tumor-targeting properties caused by the EPR effect, intratumoral localization of nanoparticles can be further improved by active targeting through the conjugation of the particles with tumor-specific small molecules, such as folic acid [21], thiamine [22], and even antibodies or lectins [23]. The nanoparticles may be special vehicles for the treatment of brain tumors especially primary and metastatic tumors.

2. LIPOSOMES IN DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR BRAIN TUMORS

Liposomes, comprised of naturally occurring non-cytotoxic phospholipids and cholesterol, have been recognized as a potential drug delivery vehicle for three decades [24]. Liposomes are unilamellar phospholipid vesicles and their high interior ability to encapsulate water-soluble compounds surpasses that of all other nanomaterial-based drug delivery platforms [25]. Also, by altering lipid composition, size, and surface chemistry, liposomes can be developed into multifunctional constructs to meet the tunable requirements of different DDS, for example, combining diagnostic and therapeutic capabilities, thus providing a universal platform that can simultaneously detect, image, and target diseased cells.

2.1. Immunoliposomes (Antibody-directed Liposomes)

Treatment of brain cancer remains a challenge despite recent improvements in surgery and multimodal adjuvant therapy. Drug therapy has been particularly inefficient, due to the BBB and the non-specificity of the potentially toxic drugs. Immunoliposomes have emerged as a potential carrier for brain delivery, able to overcome the current problems.

In recent years, drug delivery research has increasingly focused on antibody-targeting liposomes in the treatment of cancers including glioblastomas [26]. Targeted liposomes provide an advantage over untargeted liposomes not because of increased localization to tumor sites but because of increased interaction with the target cell population once localized [27]. Immunoliposomes have come to be recognized as a promising tool for the site-specific delivery of drugs and diagnostic agents. It has been demonstrated that the specific delivery of drugs to target cells is far more efficient with immunoliposomes than with liposomes lacking an antibody [27].

In the development of antibody-targeting liposomes, the antibody is first directly conjugated on the liposome surface resulting in immunoliposomes that exhibit specificity in binding but low blood circulation times. Longer blood circulation times of immunoliposomes *in vivo* combined with successful targeting was demonstrated with polyethylene glycol (PEG)-coated liposomes [27]. However, the targeting of immunoliposomes *in vivo* is far more complicated. The rapid uptake of liposomes by the reticuloendothelial system (RES) and the endothelial barriers separating blood and tissues largely prevent immunoliposomes from reaching their target cells [28]. As systemic administration is the most practical route for treatment, immunoliposomes overcoming these physiological barriers are highly desirable. Avoidance of this obstacle is possible if PEG-derivatized lipids are inserted within the bilayer of conventional liposomes and antibodies are attached *via* a thioether bond to the PEG terminus [29-31], as these modifications considerably prolong circulation time in blood. Liposomes coated with the inert and biocompatible polymer PEG are widely used and are commonly called long-circulating or sterically stabilized liposomes. Park *et al.* [32] prepared doxorubicin (dox) encapsulated immunoliposome with anti-HER2, immunoliposome-dox was significantly superior to all other treatment including free dox, liposomal

dox, and anti-HER2 monoclonal antibody (mAb). Tumor inhibition, regression, and cures were observed in the tumor xenograft. These long-circulating liposomes have considerable potential as drug carriers for cancer therapy [33,34]. Increased liposome accumulation has been found in tumor-bearing mice.

For the targeted delivery of drugs to brain tumors, the key is to choose an efficient marker on the tumor cells as the target. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a 170-kDa transmembrane tyrosine kinase whose gene is often amplified in human GBMs. EGFRvIII, which has an in-frame deletion of exons 2-7 of the extracellular domain of the EGFR gene, is constitutively expressed and amplified in up to 57% of GBMs [35]. EGFR is overexpressed in GMB, but undetectable or weakly expressed in normal brain cells. Therefore, EGFR is an attractive molecular target for the specific delivery of therapeutic agents to high-grade gliomas [36,37]. An antibody (anti-CD19) can be directly linked to a liposome through covalent conjugation to a functional group on the liposome or can be post-inserted into a preformed liposome *via* the micelles of an antibody-lipid conjugate [38,39]. The efficiency of liposomal and other nanoplateform systems has also been enhanced by the molecular targeting of the interleukin-13 receptor, transferrin receptor, and LDL surface receptor pathways [40].

Doxorubicin and paclitaxel are FDA-approved anticancer drugs that are limited by physicochemical properties that make them difficult to administer or have intolerable side effects. Encapsulated in nanoparticles, modified paclitaxel has an improved side effect profile compared to conventional paclitaxel and the potential life-threatening cardiotoxicity associated with doxorubicin is reduced. Other liposomal anticancer drugs are currently in various stages of development [41]. In a recent *in vivo* murine U87-MG GBM model, liposomal topotecan has been shown to improve overall survival by a factor greater than 20-fold [42].

Although the toxicity of immunoliposomes themselves is generally minimal, immune responses caused by Fc region of murine-derived antibodies and crossreactivity with normal organs are the potential sources of toxicity. Besides, accumulation of cargos in organs including liver, spleen and bone marrow are the major complications of toxicity [27]. Improvement of target specificity or using lower molecular weight targeting moieties such as Fab' and scFV may solve the problem.

2.2. Immunoliposomes in Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Brain Tumors

Besides anticancer and chemotherapeutic drug delivery to brain tumors, boron neutron capture therapy (BNCT) provides a way to selectively destroy malignant cells and spare normal cells. BNCT is a binary method for the treatment of cancer based on the tumor-selective delivery of ^{10}B followed by radiation with low energy thermal neutrons. BNCT has been applied clinically to the treatment of malignant brain tumors, malignant melanoma, head and neck cancer, and hepatoma [43]. It is assumed that the selective accumulation of ^{10}B in tumors followed by radiation with low energy thermal neutrons will cause the killing of cancer cells and induce a therapeutic effect [44]. For targeted ^{10}B delivery in BNCT, immunoliposomes have been employed by linking tumor-targeting ligands such as antibodies or receptor ligands such as folate [45], transferrin [46] and epidermal growth factor (EGF) [35].

To construct an easy-to-prepare and universal ^{10}B delivery system for BNCT, BSH-encapsulated liposomes were prepared with nickel lipid, and EGFR antibodies were conjugated to the liposomes using the antibody affinity motif of protein A (ZZ) as an adaptor (Fig. 1A). The His-tag at the C-terminus of the recombinant ZZ was used not only for purification, but also for interaction with Ni-NTA (Nickel-[N-(5-amino-1-carboxypentyl)-iminodiacetic acid]) lipids [47]. In animals bearing U87ΔEGFR glioma cells, a high ^{10}B level was obtained in the tumor after the intravenous administration of the BSH-encapsulated nickel-immunoliposomes compared to

liposomes (Fig.2A). Immunohistochemical (IHC) analysis using an anti-BSH monoclonal antibody also revealed that BSH was delivered effectively into the cancerous part of the brain (Fig.2B). To extend the function of immunoliposomes in boron delivery systems, a fusion protein composed of ZZ and *Gaussia princeps* luciferase (GLase) for antibody binding and imaging, was expressed. Immunoliposomes were constructed with DSPE-PEG-MAL (N-[(3-maleimide-1-oxopropyl)aminopropyl] polyethyleneglycol-carbamyl] distearylphosphatidyl-ethanolamine) for covalent GLase-ZZ conjugation (Fig. 1B). Fluorescence dye (8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt, HPTS)-encapsulated immunoliposomes conjugated with ZZ-GLase showed more fluorescence in U87 ΔEGFR cells. *In vivo*, HPTS fluorescence and strong bioluminescence could be detected at the tumor site, suggesting that the new biofunctional immunoliposome system provides the potential for drug delivery and imaging *in vivo* [48].

2.3. Liposomes in Gene Therapy

Cationic liposomes have the potential to effectively deliver DNA or RNA and are one of the most promising vectors for human gene therapy. Cationic liposomes are usually formed with positively charged lipids in combination with a neutral helper lipid such as DOPE or cholesterol [49,50].

As nonviral vectors, liposome-based gene delivery systems combine the advantages of safety and the potential for tissue-selective drug targeting. Numerous cationic liposomes have been developed for gene transfection, and some have been used in gene therapy in preclinical and clinical trials [51]. For the application of cationic liposome-mediated gene delivery, it is necessary to identify more potent liposomal formulations, because assays *in vitro* are not always predictive, and the relative efficacy of different formulations depends on the site at which the formulation is administered. Nu-

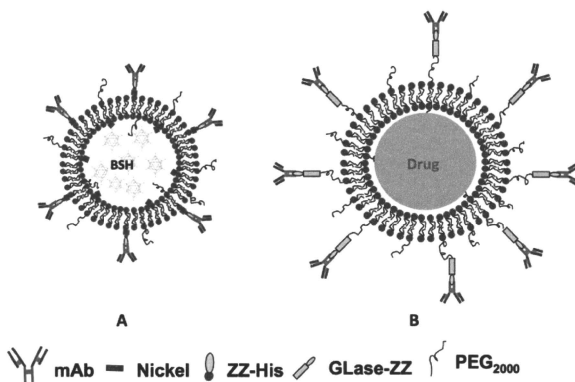


Fig. (1). Scheme of the immunoliposomes. (A) Nickel-immunoliposome (B) Bifunctional immunoliposome.

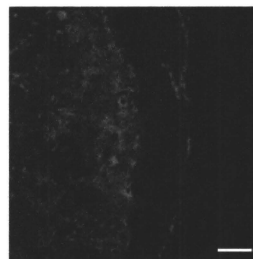
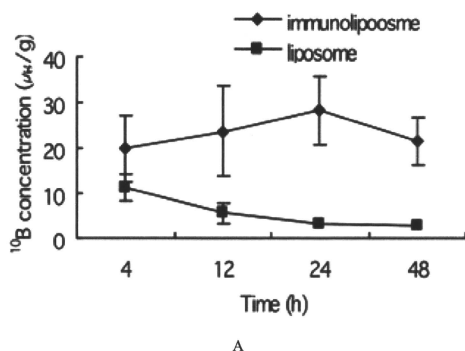


Fig. (2). Targeted boron delivery using nickel-immunoliposomes (A) Time course of ^{10}B 's distribution in tumors. ^{10}B concentrations were measured after 400 μL of immunoliposome or liposome was injected into tumor-bearing mice *via* a tail vein at a dose of 35 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$. (B) IHC analysis of BSH's distribution in tumors. The slice was prepared 4 h post immunoliposome injection. Anti-BSH mouse mAb and Cy3-conjugated mouse IgG were used as the primary and secondary antibody. Bar = 200 μm .

merous reports have described cancer gene therapy by direct intratumoral injection using DNA-cationic liposome complexes, and formulations that are active in one tissue may not be optimally active by a different route of administration [52].

Studies on clinical gene therapies for malignant gliomas using liposomal delivery systems are very few. Suicide gene (the herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-tk) and cytokine gene therapies are performed for malignant gliomas [53,54]. Cationic liposome-mediated interferon-beta (*IFN-β*) gene transfer has been found to induce regression of experimental glioma. Wakabayashi T *et al.* performed a pilot clinical trial to evaluate the safety and effectiveness of *IFN-β* gene therapy in five patients with high-grade glioma. The surgical margin of the resection cavity was infiltrated with 1 ml of liposomes containing the human *IFN-β* gene. Two patients showed more than a 50% reduction while others had stable disease 10 weeks after treatment initiation [55].

Zhang *et al.* [56] encapsulated anti-luciferase shRNA expression plasmids inside PEGylated immunoliposomes (PILs). The PILs are delivered across the blood-brain barrier and across the tumor cell membrane *in vivo* by a mAb to the rat transferrin receptor (TfR). The TfR mAb-targeting PILs inhibited luciferase gene expression in brain cancer cells by 90%.

3. OTHER NANOPARTICLES

3.1. Polymeric Nanoparticles

From "Starburst" dendrimeric polymers to self-assembled polymeric micelles, polymeric nanoparticles have been developed to encapsulate drug molecules for DDS for many decades [57]. Typical biodegradable nano-DDS consist of colloidal polymeric nanoparticles with drug molecules that are encapsulated, mixed, absorbed, or attached onto the polymer matrix [58]. Poly (D,L - lactide-co-glycolide) (PLGA) carrier nanoparticles have been shown to intracellularly deliver therapeutic molecules for sustained drug release. Paclitaxel-loaded biodegradable PLGA foams with a microporous matrix were fabricated by a pressure quenching approach to provide a sustained drug release. These foams could be employed as potential implants for post-surgical chemotherapy against malignant glioma [59]. The encapsulation efficiency for paclitaxel-loaded PLGA nanofibers is more than 90% and *in vitro* efficacy tests against C6 glioma cells indicate that they may be promising drug delivery devices for the treatment of GBM [60].

Block-copolymer micelles composed of PEG-poly(α,β -aspartic acid) and PEG-poly(β -benzyl-L-aspartate) are additional classes of polymeric nanoparticles. They are formed spontaneously in aqueous solutions through the process of self-assembly when the polymer concentration is above the critical micellar concentration [61]. These molecular self-assembled polymeric micelles have exhibited high aqueous solubility and stability [10]. Drug molecules are loaded within the micellar core either through the physical encapsulation process or by direct conjugation. Passive nano-DDS delivery to diseased sites was achieved due to enhanced permeation and retention effects. Biomolecules such as peptides, oligonucleotides, oligosaccharides, and antibodies are all potential candidates for active targeting. Lf (lactoferrin) receptor (LfR) has been demonstrated on the BBB in different species and involved in the transport of Lf across the BBB *in vitro* and *in vivo* [62]. PEG-poly (lactide) (PEG-PLA) nanoparticles were constructed to conjugate with Lf and a lipophilic fluorescent dye, coumarin-6, was incorporated. Uptake by a mouse brain endothelial cell line (bEnd.3 cell line) *in vitro* and localization in brain tissue sections were visualized by fluorescence microscopy *in vivo* compared with pegylated nanoparticles [63].

The RGD (Arg-Gly-Asp) sequence has been identified as an essential binding motif to facilitate interaction between drug delivery systems including micelles and some integrins which connect cells to proteins of the extracellular matrix [64]. Among these in-

tegrins, α_v integrin receptors, which are found to be highly expressed on activated endothelial cells and tumor cells (such as U87MG glioblastoma cells) but not in resting endothelial cells and most normal organ systems, constitute a potential target for tumor imaging and therapy. Zhan *et al.* [65] synthesized c(RGDyK)-modified PEG-PLA micelles to encapsulate paclitaxel. c(RGDyK)-PEG-PLA micelles accumulated in the subcutaneous tumor tissue, and when loaded with paclitaxel (c(RGDyK)-PEG-PLA-paclitaxel), exhibited the strongest tumor growth inhibition, suggesting c(RGDyK)-PEG-PLA micelles to be a potential drug delivery system in the treatment of integrin $\alpha_v\beta_3$ over-expressing glioblastomas.

Intravenously injected doxorubicin-loaded poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 (Tween[®]) have been shown to prolong survival in rats with intracranially transplanted glioblastomas from the cell line 101/8 [17]. In addition, polybutyl cyanoacrylate nanoparticles coated with poloxamer 188 (Pluronic[®]) considerably enhanced the anticancer effect of doxorubicin against intracranial glioblastomas in rats [66].

3.2. Metallic Nanoparticles for Imaging and Treatment of Brain Tumors

Metallic nanoparticles have been used as contrast probes for imaging, diagnostics, and therapeutic platforms in brain tumors. Due to the relatively high resolution and good contrast between healthy and diseased tissues, nanoparticle-based MRI is currently used in both basic research and clinical settings. Superparamagnetic particle conjugates have been used to locate brain tumors earlier and to target the tumors more accurately [67]. Iron oxide nanoparticle-based MRI contrast agents show excellent potential for imaging in the CNS. Depending on the size of the nanoparticles, the iron oxide contrast agents are termed superparamagnetic iron oxides (SPIO) or ultra-small superparamagnetic iron oxides (USPIO). SPIO have proved to be an important tool for enhancing magnetic resonance contrast, allowing researchers to monitor not only anatomical changes, but physiological and molecular changes as well. Dextran-coated USPIO have also been delivered to human brain tumors with Sinerem[®] (a contrast agent for MRI) and showed gradual signal enhancement [68,69].

Magnetic nanoparticles can be used as a homing device to deliver drugs and contrast agents to a site by controlling the external magnetic field [70]. Magnetic nanoparticles have also been used for the transfection of DNA sequences [71], a process termed magnetofection. The therapy of GBM using magnetic nanoparticles is a recognized procedure and is often combined with chemotherapy. Selected heating of the brain tumor can be achieved by magnetic nanoparticles localized to the tumor and thermoablation is based on magnetic field-induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. In a rat tumor model with RG-2-cells implanted into the brain, thermotherapy was performed by exposing them to an alternating magnetic field following injection of amniosilane-coated iron oxide nanoparticles. Thermotherapy with amniosilane-coated nanoparticles led to up to 4.5-fold prolongation of survival [72]. Thermotherapy using magnetic nanoparticles was tolerated well by patients with minor or no side effects. A median maximum intratumoral temperature of 44.6°C was recorded with regression of tumor growth, indicating that this therapy can be used safely and effectively in human GBM [73].

3.3. Bionanocapsules

Bio-nanocapsules (BNCs) are virus-like empty nanoparticles made of phospholipids and envelope proteins derived from the hepatitis B virus (HBV). BNCs are recombinant yeast-derived hepatitis B virus surface antigen particles, which have been used as a recombinant hepatitis B vaccine for the last 20 years throughout the world, suggesting that BNCs are safe DDS.