

201111006A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松井秀樹

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	-----	1
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	-----	2
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科		松井 秀樹
II. 分担研究報告	-----	7
1. ボロン製剤の導入と効果測定に関する研究	-----	8
大阪医科大学医学部脳神経外科学		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	-----	9
京都大学原子炉実験所		小野 公二
3. 動物モデルに対する治療実験及び製剤の安全性試験に関する研究	-----	10
熊本大学大学院生命科学研究部		魏 范研
4. 脳疾患動物モデル作製・培養細胞導入に関する研究	-----	11
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科		伊達 勲
5. ホウ素製剤の薬物動態測定に関する研究	-----	12
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科		西木 禎一
6. CD44 を分子標的とする DDS に関する研究	-----	13
岡山大学大学院自然科学研究科		妹尾 昌治
7. 光学異性体ペプチド合成に関する研究	-----	14
京都大学化学研究所		二木 史朗
8. BSH ペプチドの開発と治療効果の検討に関する研究	-----	15
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科		道上 宏之
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	21

I. 総括研究報告

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、中性子捕捉療法に用いる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した。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ことを目的とした。

研究分担者：

宮武伸一（大阪医大医学部・准教授）
小野公二（京都大原子炉実験所・教授）
魏 范研（熊本大生命科学部・助教）
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（岡山大院自然科学研究科・教授）
二木史朗（京都大院薬学研究科・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

ホウ素中性子捕捉療法（Boron Neutron Capture Therapy; BNCT）はがん細胞に予めホウ素（ ^{10}B ）を取り込ませておき、次に中性子線を照射することでアルファ崩壊を起こし、腫瘍細胞のみを破壊する画期的な治療法である。BNCTの治療効果を上げるためにはホウ素をがん細胞のみに特異的に、かつ高濃度取り込ませることが重要であるが、これまで使われてきたホウ素化合物にはこのような機能は不十分で十分な治療効果が上がっていない。

そこで本研究では、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BNCTに用いるボロン（ホウ素）製剤を創出することを目的とした。我々がこれまでに開発した蛋白質セラピー法を応用・高機能化して腫瘍細胞に標的化する「BSHペプチド」、ならびに癌特異的に導入される「抗体付加型BSH封入ナノカプセル」の2種類の新規ホウ素製剤を開発する。次に、この新規に開発したホウ素製剤が脳腫瘍、またはその他の難治癌に対して有効であるか、細胞レベルおよび担がんモデル動物を用いて実証するとともに、同ホウ素製剤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研究全体の目的とした。

B. 研究方法

事業の最終年度である本年度は、過去2年間で得られた結果を基に引き続き2種類のホウ素製剤を作製し最適化を行うとともに、中性子照射を行い、新規ホウ素製剤の治療効果等、有効性を検討し、安全性を評価した。

1. BSHペプチドの開発と機能検証

【BSHペプチドの合成と細胞内導入検証】

悪性脳腫瘍に対するBNCTは、他に有効な治療法がない現在、脚光を浴びている。現在、治療で使われているホウ素製剤のBPA（ホウ素フェニルアラニン）は、がん細胞に多く発現しているアミノ酸トランスポーターを介して、増殖能の高いがん細胞へと取り込まれる。一方で、ホウ素12個からなるBSH（ $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ ）は、血液脳関門が破壊されている腫瘍部で脆弱な腫瘍血管より漏出するが細胞内への導入はない。そのため、BSHを用いた場合、ホウ素中性子捕捉反応によって生ずる効果は低いと考えられている。我々は、脳腫瘍に対する新規ホウ素製剤を用いたBNCTの開発を目指し、BSHをペプチド修飾して細胞内に導入可能な新規製剤を開発し、その効果を検証した。

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、細胞膜透過性ホウ素製剤（BSHペプチド）を開発した。細胞膜通過ペプチドと呼ばれるアルギニン（Arg）11個からなるペプチドとホウ素化合物BSHをSS結合にて融合し、BSHペプチドを作製した。この製剤を悪性脳腫瘍細胞株であるU87ΔEGFRに投与し、細胞内のホウ素の局在、及び濃度を測定した。

さらに、製剤あたりのホウ素濃度を上げるために、リジンを使用した枝分かれ配列を利用して、多数のBSHを一つのペプチドに結合させることを試みた。このマルチBSHペプチドを、同様にU87ΔEGFRに投与し、腫瘍細胞内への導入効果を検討した。さらに、京都大学原子炉実験所で中性子線源を確保し照射を行い、合成したBSHペプチドの癌殺傷効果を検討した。

【BSHペプチドの脳腫瘍幹細胞に対する効果】

さらに、本研究で開発したBSH-11Rを用いて中性子照射を行い、 γ 線に対し抵抗性を持つ脳腫瘍幹細胞に対する治療効果を評価した。比較検討には、臨床研究で使用している現存のホウ素化合物BPAおよびBSHを用いた。

既存のglioma cell lineを無血清培地で培養することでspheroidを作成し、腫瘍幹細胞に富んだ集団 (sphere cells) を作成した。この集団と、通常の血清培地を用いて単層培養を行った集団 (monolayer cells) を使用し、ホウ素中性子捕捉反応による治療効果について評価した。また、あらかじめ細胞内のホウ素化合物の取り込み具合を確かめるため、各化合物をホウ素=10 ppmに調整した培地に24時間暴露し、その後、誘導結合プラズマ分析 (ICP) を用いて細胞内に取り込まれたホウ素量を測定しておいた。

【光学異性体ペプチドの合成】

前述のように、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ため、そのままでは細胞に入らない。本研究で開発したBSHペプチドのように、アルギニン (Arg) のような膜透過ドメイン (PTD) との結合により、細胞移行効率が向上する。これまでに、BSHの細胞内送達には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。そこで本年度は、担癌ヌードマウスを用い、種々の長さのアルギニンペプチドの腫瘍集積性に関して検討した。

2. BSH封入ナノカプセルの開発と機能検証

【ナノカプセルの他の難治性がんへの応用】

難治性がんのひとつ卵巣がんではErbB2が過剰発現している。分担者の妹尾らは、ErbB2の特異的人工ペプチドリガントEC-1を付加したEGFPがErbB2発現細胞に結合する細胞内に移行することを示した。これらから、EC-1を応用すれば、卵巣がん細胞に新規ホウ素製剤を特異的に導入できると考えられる。

そこで、卵巣がんを高発現しているErbB2レセプターを標的とし、BSHを内包したリポソ-

ム表面にErbB2認識ペプチドのEC-1を結合することにより腫瘍細胞へターゲティングができるかを検討した。過去2年間で開発したNiリポソームを応用し、種々の脂質成分を混合してREV法にてBSH封入リポソーム (ナノカプセル) を合成した。このリポソーム表面に、種々の濃度でEC-1ペプチドを結合させ、EC-1ペプチド結合リポソームを作製した。培養細胞には卵巣がん由来株化細胞SKOv3を用い、作製したEC-1ペプチド結合リポソームとインキュベーションしてSKOv3細胞内へのホウ素導入を確認した。細胞内のホウ素量はICP分析により定量した。

【腫瘍特異的な分子標的による細胞内導入】

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9種のヒトグリオーマ (脳腫瘍) 由来細胞株に共通に過剰発現が認められたがん抗原CD44を、分子標的治療のマーカーする創薬の対象として検討を行った。抗CD44モノクローナル抗体をリポソーム表面に提示したイムノリポソームによりCD44特異的な腫瘍選択的かつ効率的な薬剤輸送システムを開発することを目指した。

3. 新規ホウ素製剤の安全性試験

BSHに10個のポリアルギニンを付加したBSHペプチドを作製した。一方、BSHを封入したナノカプセルに抗EGFRモノクローナル抗体を反応させ、抗体付加型ナノカプセルを作製した。合成したこれらの新規ホウ素製剤を、12週齢オスICRマウスの尾静脈に1.0mg/kg、10mg/kg、50mg/kgで一日1回10日間連続投与し、マウスの体重、摂食量、行動についてコントロールマウスと比較検討した。さらに、投与終了後に全血採血し、血中GOT、GPT、クレアチニンならびに血糖値について、コントロールマウスと比較検討した。

4. 難治性癌モデル動物の作製

【脳疾患動物モデルの作製】

悪性脳腫瘍を標的としたBNCTは、予後の改善が見込まれる治療法である。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、実際の患者で見られるような浸潤型の脳腫瘍像

をモデル動物で再現することは困難である。そこで本研究では、臨床の脳腫瘍患者に近い新規の悪性脳腫瘍モデルの作製を試みた。

樹立した2種類の浸潤様式の異なる細胞株 J3T-1およびJ3T-2を用い、実験を行った。この2種類の細胞株は、犬悪性脳腫瘍細胞株J3Tをマウス皮下化に移植し、形成されてきた腫瘍をそれぞれ別々に培養し得られた細胞株である。この2種類の細胞株をヌードマウスまたはヌードラットに移植し、脳腫瘍の浸潤形式を評価した。ヌードマウスは8週齢メスを使用し、ヌードマウス脳内へ移植しその経過観察を行った。脳腫瘍が形成された後に、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った。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の作製を試みた。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、大学における動物実験の実施に関する規定に基づき、適正に行った。

5. 原子炉及び加速器による中性子源の開発

BNCTは1~2回の照射によって治療が完了するため、途中での線量投与計画の補正が難しい。したがって、中性子の物理線量のみならず、生物学的光子等価線量を正確に推定することが非常に重要である。線量の推定にはエネルギーによって異なる中性子の生物効果の正確な把握が不可欠であると同時に、腫瘍でのホウ素濃度や分布の推定もまた、重要な要素である。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高度利用には、高い腫瘍集積比を有し腫瘍で均一に分布する新規ホウ素化合物が必要である。その開発のために、本研究では、ホウ素分布を細胞レベルで簡便に検索できる α オートラジオグラフィ(ARG)技術を開発した。

C. 研究結果

1. BSHペプチドの開発と機能検証

【BSHペプチドの合成と細胞内導入検証】

悪性脳腫瘍細胞株 U87 Δ EGFR に BSH ペプチドを投与すると、細胞内導入後、細胞質より核へと局在が変化した。ICP 測定の結果、ペプチド1個当たり1個のBSHを結合したのから、最大8個のBSHと結合したマルチBSHペプチドでは、結合BSHの数に比例して、細胞内に導入されるホウ素濃度が上昇した。マルチ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た。

合成したBSHペプチドを細胞内導入後、中性子照射を行うと、100倍以上高濃度のBSHよりもがん細胞に対する殺傷効果が強いことが判明した。

【BSHペプチドの脳腫瘍幹細胞に対する効果】

ICPでの測定では、BSHはそれぞれの細胞集団で差異は認められなかったが、BPAではsphere cellsの方がmonolayer cellsよりも取り込みは少なかった。しかし、細胞内に取り込まれたホウ素含有量は、同じ培地ホウ素濃度にも関わらず、BPAがBSHよりもはるかに高かった。中性子照射を行うと、BPAを暴露した方が優れた治療効果を得られたが、 γ 線で認められた抵抗性は克服できなかった。しかしBSH-11Rを用いたホウ素中性子反応であれば抵抗性を克服し、かつ大きな治療効果が得られた。

BSHは主に細胞外に存在し、BPAはアミノ酸トランスポーターを介し細胞内に取り込まれる。今回の結果より、BSHではホウ素が細胞内に存在していないことから、sphere cellにおいてもICPでの測定値も小さく、また治療効果も乏しかった。BPAは細胞内にホウ素が多く取り込まれていることで治療効果は優れていたが、sphere cells及びmonolayer cellsでのホウ素の取り込みに差が生じていたため、結果として γ 線での治療抵抗性は克服されなかった。しかしホウ素が細胞内に存在すれば、脳腫瘍幹細胞であっても治療効果が望める結果でもあり、またBSH-11Rのようにペプチドを付加した化合物であれば、sphere cellsにも効率よく細胞内に取り込まれ、抵抗性も克服可能であることが分かった。

【光学異性体ペプチドの合成】

担癌ヌードマウスを用いた腫瘍集積性の検証から、光学活性ペプチドr8(D型のオクタアルギニン)との結合により、腫瘍集積性が向上し、副作用が軽減されることが示唆された。この系のBSHのがん細胞へのターゲティングにも応用が期待される結果となった。

2. BSH封入ナノカプセルの開発と機能検証

【ナノカプセルの他の難治性がんへの応用】

EC-1ペプチドを表面に結合させたりリポソームをSKOv3細胞とインキュベーションさせた結果、投与したリポソームの濃度に依存してホウ素が細胞内へ取り込まれた。特に細胞核内で高濃度のホウ素集積が確認できた。ペプ

チドが結合していないリポソームに比べ、0.01%、0.1%、1%のEC-1ペプチドが表面に結合したリポソームは、それぞれ約3.2倍、3.9倍、5.0倍のホウ素集積性を示した。

【腫瘍特異的な分子標的による細胞内導入】

抗CD44抗体とこれを提示するリポソームは細胞内へエンドサイトーシスにより効果的に取り込まれた。薬剤を内包させた場合の効果は良好であり、単剤に比べ100倍の細胞毒性を示せた事により本剤型を完成させることで有効なDDSを構築できると考えられる。ホウ素製剤を利用することによりBNCTの発展へ可能性を示すことができた。

悪性度の高いグリオーマにおいて、EGF受容体より特異性の高いCD44が候補分子として見つかったことにより、今後の新たなDDSのデザインが可能となった。BNCTにおいてもBSHを運ぶキャリアとして十分に期待できる。

3. 新規ホウ素製剤の安全性試験

開発したBSHペプチド、ならびにヒトバリアントⅢ型EGF受容体モノクローナル抗体付加型ナノカプセルは、1.0～50mg/kgで全身投与しても、マウスを用いた安全性試験において、摂食量、体重に影響を及ぼさなかった。また投与後異常行動も認められなかった。

さらに、BSHペプチドならびに抗体付加型ナノカプセルを投与したマウスの血中GOT、GPT、クレアチニンならびに血糖値はコントロールマウスと比較し、有意差を認めなかった。

4. 難治性癌モデル動物の作製

【脳疾患動物モデルの作製】

2種類の浸潤様式の異なる細胞株J3T-1およびJ3T-2をヌードマウス・ヌードラット脳内に移植し、その結果を組織染色・脳内イメージングにて評価した。その結果、J3T-1では腫瘍および脳内の血管に依存した腫瘍増殖を認めた。一方、J3T-2は腫瘍血管の分布と全く異なる浸潤形態を示した。腫瘍部と正常部の境界は非常に不明瞭であった。実験で使用した細胞株は実際の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であるという結果を得た。

5. 原子炉及び加速器による中性子源の開発

本研究で、 α オートラジオグラフィ(ARG)の高精度化と簡便化がある程度実現した。ARGの精度を上げて細胞間の分布の差を検出するにはARG画像と蛍光染色画像を正確に重ね合わせるこ

とが不可欠であるが、凍結固定前に、試料を生理食塩水で良く洗浄すること、血管をランドマークに使うことで精度を向上させることが可能となった。

α 粒子の飛跡が細胞長程度の為、未だ、位置精度に難がある。今後、ホウ素原子の位置を細胞内のそれに特定するための画像処理などにスマートな解を発見できれば、ホウ素原子の細胞内位置を極小の誤差精度で特定でき、新規ホウ素化合物の開発を大きく促進出来ると考えられた。

D. 考察

本研究では、すべてのがん細胞内へ特異的に高濃度でホウ素をデリバリー可能な、中性子捕捉療法向け新規ホウ素製剤の創出を目標としている。

細胞膜通過ペプチドでBSHを修飾することにより、細胞内導入効果を有するBSHペプチドを作製した。脳腫瘍幹細胞を用いた中性子照射実験では、 γ 線照射には抵抗性を示す脳腫瘍幹細胞であっても、このBSHペプチドを用いて効率よく細胞内にホウ素を取り込ませれば、抵抗性を克服し、治療効果が見込めることが分かった。さらに、細胞導入効率を高めるために、複数のBSHと細胞膜通過ペプチドを結合させたマルチBSHペプチドの合成に成功した。マルチ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と導入され、既存のBSHに比べると中性子照射において遥かに高いがん殺傷効果を示した。

一方、脳腫瘍以外の難治性がんへの応用として、過去2年間で開発してきた抗体付加型BSH封入ナノカプセルを応用し、表面に結合した抗体をペプチドに置換した。その結果、卵巣がん等の他の難治性がんへ応用できる可能性が示された。本研究で開発したBSH封入ナノカプセルは将来の適応拡大に向けて有望な候補となり得る。本事業で開発したこれら2種類の新規ホウ素製剤の安全性はマウスを用いて実証された。

悪性脳腫瘍の浸潤形態は、血管新生と密接な関係にあり、色々な浸潤形態が報告されている。本研究において、浸潤形式の異なる2種類の細胞株による脳腫瘍モデルを作製し、ホウ素中性子捕捉療法を行うに当たり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。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。

また、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源の調整が完了し、新規ホウ素製剤の開発を加速するマイクロ分布検索の手法確立に目途がついた。

E. 結論

本研究では、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BNCTに用いる2種類のホウ素製剤を創出し、脳腫瘍や卵巣がんを対象に、細胞レベルおよび担がんモデル動物でその機能を実証した。マウスを用いて安全性試験を行い、臨床試験への橋渡しを行った。

F. 健康危険情報；現在のところ無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Feng B, Tomizawa K, Matsui H: Nanoparticle-based drug delivery systems for solid brain tumors. *Current Nanoscience* 7(1):47-54, 2011.

Ogawa T, Michiue H, Matsui H, et al: Protein therapy using heme-oxygenase-1 fused to a polyarginine transduction domain attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 31(11):2231-42, 2011.

2. 学会発表

Michiue H, Feng B, Wang F, Mori A, Miyatake S-I, Kawabata S, Tomizawa K, Matsui H: Development of novel peptide BSH compound for boron neutron capture therapy against malignant glioma. The 6th young researchers boron neutron capture therapy (YBNCT) meeting. 2011年12月、台湾

Wang F, Michiue H, Feng B, Mori A, Miyatake S-I, Kawabata S, Tomizawa K, Seno M, Matsui H: Delivery of boron compound to malignant glioma using immunoliposome for boron neutron capture therapy (BNCT). The 6th young researchers boron neutron capture therapy (YBNCT) meeting. 2011年12月、台湾

道上宏之、森亜希子、王飛霏、秋田直樹、Feng Bin、松井秀樹: イムノリポソームを用いた悪性脳腫瘍に対するホウ素DDSの挑戦. 第8回日本中性子捕捉療法学会. 2011年9月、徳島

松井秀樹、道上宏之、森亜希子 他. 日本放射線腫瘍学会 第24回学術大会 シンポジウム「腫瘍選択的ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)-現在地からの挑戦-」中性子捕捉療法 (BNCT)

のための新規ホウ素製剤の開発－腫瘍選択性とDDS技術－. 2011年11月、神戸

H. 知的所有権の取得状況

道上宏之、松井秀樹ら.

「細胞膜透過型ホウ素ペプチド」

(特願 2011-230059)

II. 分担研究報告

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

ホウ素化合物であるBPA及びBSHに加え、新規化合物であるBSH-11Rを使用し、京都大学原子炉実験所にて中性子照射実験を行い、脳腫瘍幹細胞に対するホウ素中性子捕捉反応の治療効果に対し、評価を行った。γ線照射では抵抗性を認めた脳腫瘍幹細胞であったが、効率よく細胞内にホウ素を取り込ませれば、抵抗性を克服し、十分治療効果が見込めることを見出した。

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った。本事業で最適化した新規ホウ素製剤を使用し、γ線に対し抵抗性を持つ脳腫瘍幹細胞を用いて京都大学原子炉で中性子線源を確保し照射を行い、その効果を調べた。

B. 研究方法

既存のglioma cell lineを無血清培地で培養することでspheroidを作成し腫瘍幹細胞に富んだ集団(sphere cells)を作成した。この集団と、通常の血清培地を用いて単層培養を行った集団(monolayer cells)を使用し、ホウ素中性子捕捉反応による治療効果について評価した。使用する化合物は臨床で使用されているBPA及びBSHに加え、新規化合物であるBSH-11Rを使用し、比較検討した。また、あらかじめ細胞内のホウ素化合物の取り込み具合を確かめるため、各化合物をホウ素=10ppmに調整した培地に24時間暴露し、その後ICPを用いて細胞内に取り込まれたホウ素量を測定しておいた。

C. 研究結果

ICPでの測定では、BSHはそれぞれの細胞集団で差異は認められなかったが、BPAではsphere cellsの方がmonolayer cellsよりも取り込みは少なかった。しかし、細胞内に取り込まれたホウ素含有量は、同じ培地ホウ素濃度にもかかわらず、BPAの方がBSHよりもはるかに高かった。中性子照射を行うと、BPAを暴露した方が優れた治療効果を得られたが、γ線で認められた抵抗性は克服できなかった。しかしBSH-11Rを用いたホウ素中性子反応であれば抵抗性を克服し、

かつ大きな治療効果が得られた。

D. 考察

BSHは主に細胞外に存在し、BPAはアミノ酸トランスポーターを介し細胞内に取り込まれる。今回の結果より、BSHではホウ素が細胞内に存在していないことから、sphere cellにおいてもICPでの測定値も小さく、また治療効果も乏しかった。BPAは細胞内にホウ素が多く取り込まれていることで治療効果は優れていたが、sphere cells及びmonolayer cellsでのホウ素の取り込みに差が生じていたため、結果としてγ線での治療抵抗性は克服されなかった。しかしホウ素が細胞内に存在すれば、脳腫瘍幹細胞であっても治療効果が望める結果でもあり、またBSH-11Rのようにペプチドを付加した化合物であれば、sphere cellsにも効率よく細胞内に取り込まれ、抵抗性も克服可能であることが分かった。

E. 結論

放射線に抵抗性の有する脳腫瘍幹細胞でもホウ素中性子捕捉反応にて殺腫瘍効果を得ることが可能であり、また脳腫瘍幹細胞に効率よくホウ素を取り込ませることの可能なBSHペプチドは、今後の悪性脳腫瘍に対する治療戦略において、大きな可能性を秘めている。

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

宮武伸一. II. 悪性脳腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法. 癌と化学療法 38:927-932, 2011.

2. 学会発表

宮武伸一: Review of BNCT studies related to treatment of malignant brain tumors. BNCT: Past, Current and Future. 14th International Congress of Radiation Research Satellite Symposium. 2011年8月、ワルシャワ

H. 知的所有権の取得状況

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高度利用には、高い腫瘍集積比の新規ホウ素化合物が必要で、その開発のために、ホウ素分布を細胞レベルで簡便に検索できる α オートラジオグラフィ(ARG)技術を開発した。

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。従って、途中での線量投与計画の補正が難しいので、中性子の物理線量は言うに及ばず、生物学的光子等価線量を正確に推定することが殊の外重要である。線量の推定にはエネルギーによって異なる中性子の生物効果の正確な把握が不可欠であると同時に、腫瘍でのホウ素濃度や分布の推定もまた、重要な要素である。特にホウ素中性子捕捉療法の将来を考えた時、高い腫瘍集積比を有し腫瘍で均一に分布する新規ホウ素化合物の開発は、最重要の研究課題であり、そのためにホウ素分布を細胞レベルで簡便に検索できる技術の開発は喫緊の課題である。本研究では α オートラジオグラフィ(ARG)の高精度化を図った。

B. 研究方法

担癌および非担癌マウスにホウ素化合物BPAあるいはBSHを投与、一定時間後に殺し組織を摘出、凍結した。この凍結組織からクライオスタットにて薄切組織切片を作成、CR-39上に展開固定した。原子炉中性子 $\sim 10^{13}$ を試料に照射、その後、CR-39上の薄切組織をヘキスト染色し、組織・細胞の蛍光顕微鏡画像を記録・保存した。次に、CR-39に化学処理を行い、中性子とホウ素原子核との核反応で放出された α 粒子などの高LET粒子によるCR-39上の飛跡を表出した。顕微鏡の明視野観察によってこの飛跡の画像を記録・保存した。先の蛍光像における血管像などを頼りに正確に重ね合わせ、組織上の飛跡の位置を決定、ホウ素の分布やその濃淡（ホウ素濃度の高低）を検索した。

C. 研究結果

1. 組織の凍結固定前の摘出組織に血液などが多

く付着している場合には、固定時にそれが染み出し、凍結され、薄切片の外に α 粒子などの飛跡を作り、ヘキスト蛍光画像と飛跡画像の一致度を著しく損なう。

- 薄切片の作成時に、偶然、組織片に亀裂が生じた場合には、ヘキスト蛍光画像と α 粒子などの飛跡画像は良く一致する。
- 組織に血液が付着している場合は、組織を生理食塩水で丁寧に洗浄することによって位置の不一致は少なくなり、飛跡画像の位置精度が顕著に向上する。
- 画像上の飛跡は $\sim 9\mu\text{m}$ であるので真のホウ素原子の位置とずれがある。この改良が今後の課題である。

D. 考察

研究結果4を残して、 α オートラジオグラフィ(ARG)の高精度化と簡便化が実現した。今後、4に関するスマートな解を見つけ出すことが出来れば、ホウ素原子の細胞内の位置を極小の誤差の精度で特定でき、新規ホウ素化合物の開発を大きく促進出来ると考えている。

E. 結論

新規ホウ素化合物開発を加速するマイクロ分布検索の手法の確立に目途がついた。

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

Tanaka H, Ono K, et al: Experimental verification of beam characteristics for cyclotron-based epithermal neutron source (C-BENS). *Applied Radiation and Isotopes* 69:1642-1645, 2011.

Ueda H, Ono K, et al: The optimization study of Bonnersphere in the epi-thermal neutron irradiation field for BNCT. *Applied Radiation and Isotopes* 69:1657-1659, 2011.

H. 知的所有権の取得状況

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. 動物モデルに対する治療実験及び製剤の安全性試験

分担研究者 魏 范研 熊本大学大学院生命科学研究部・助教

昨年度までに開発したBSHペプチドおよびバリエーションⅢ型EGF受容体の特異的に認識するモノクローナル抗体付加型ナノカプセルBSHの安全性について、マウスを用いて実証した。これらBSHは、50mg/kg以下の濃度では安全であることを確認した。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

BSHペプチドおよびモノクローナル抗体付加型ナノカプセルBSHの安全性についてマウスを用いて確認する。

B. 研究方法

ヒトバリエーションⅢ型EGF受容体に対するモノクローナル抗体を作製した。BSHを封入したバイオナノカプセルと上述モノクローナル抗体を反応させ、抗体付加型ナノカプセルBSHを作製した。またBSHに10個のポリアルギニンを付加したBSHペプチドを作製した。これらBSHを12週齢オスICRマウスの尾静脈に1.0mg/kg、10mg/kg、50mg/kgで一日1回10日間連続投与し、マウスの体重、摂食量、行動についてコントロールマウスと比較検討した。さらに、投与終了後に全血採血し、血中GOT、GPT、クレアチニンならびに血糖値について、コントロールマウスと比較検討した。

C. 研究結果

ヒトバリエーションⅢ型EGF受容体モノクローナル抗体付加型ナノカプセルBSHならびにBSHペプチドは、1.0～50mg/kgで全身投与しても、摂食量、体重に影響を及ぼさなかった。また投与後異常行動も認められなかった。

さらに、抗体付加型ナノカプセルBSHならびにBSHペプチドを投与したマウスの血中GOT、GPT、クレアチニンならびに血糖値はコントロールマウスと比較し、有意差を認めなかった。

D. 考察

抗体付加型ナノカプセルBSHならびにBSHペプチドは、50mg/kg濃度以下では副作用を認めないことが明らかになった。両BSHともその有効濃度は10mg/kgであり、有効濃度で投与した場合、安全であることが推察された。

E. 結論

ヒトバリエーションⅢ型EGF受容体付加型ナノカプセルBSHならびにBSHペプチドの安全性が実証された。

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

Wei FY, et al: Deficit of tRNA^{Lys} modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. *J Clin Invest* 121 (9):3598-3608, 2011.

Wei FY, and Tomizawa K: Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of type 2 diabetes. *Endocrine J* 58(10):819-825, 2011.

Wei FY, and Tomizawa K: Development of type 2 diabetes caused by a deficiency of a tRNA^{Lys} modification. *Islets* 4, 2012, in press.

H. 知的所有権の取得状況

現在のところ無し。

4. 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した。

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、開発した。

B. 研究方法

当科にて樹立した2種類の浸潤様式の異なる細胞株J3T-1およびJ3T-2を用いた実験を行った。この2種類の細胞株は、犬悪性脳腫瘍細胞株J3Tをマウス皮下化に移植し、形成されてきた腫瘍をそれぞれ別々に培養し得られた細胞株である。この2種類の細胞株をヌードマウスまたはヌードラットに移植し、脳腫瘍の浸潤形式を評価した。ヌードマウスは8週齢メスを使用し、ヌードマウス脳内へ移植しその経過観察を行った。脳腫瘍が形成された後に、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った。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した。

C. 研究結果

2種類の浸潤様式の異なる細胞株J3T-1およびJ3T-2をヌードマウス・ヌードラット脳内に移植し、その結果を組織染色・脳内イメージングにて評価した。

J3T-1は腫瘍および脳内の血管部に依存した

腫瘍増殖を認めた。また、腫瘍部と一致する血管は血管径が非常に拡大していた。

一方、J3T-2は腫瘍血管の分布と全く異なる浸潤形態を示した。腫瘍部と正常部の境界は非常に不明瞭であった。本実験で使用した細胞株は実際の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であるという結果を得た。

D. 考察

悪性脳腫瘍の浸潤形態は、血管新生と密接な関係にあり、色々な浸潤形態が報告されている。今回の研究で我々は、浸潤形式の異なる2種類の細胞株による脳腫瘍モデルを作製し、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。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

J3T-1&2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っていく。

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

Inoue S, Date I, et al: Novel Animal Glioma Models that Separately Exhibit Two Different Invasive and Angiogenic Phenotypes of Human Glioblastomas. *World Neurosurg* Nov.7, 2011.

H. 知的所有権の取得状況

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

5. 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・助教

脳腫瘍以外の難治性がんに対する新規ホウ素製剤を用いた中性子捕捉療法の開発を目指し、開発した新規ホウ素製剤の投与を行い、腫瘍細胞内へのホウ素集積性、および、ホウ素の細胞内局在を確認し、薬物動態を明らかにした。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

脳腫瘍以外の難治性がんに対する新規ホウ素製剤を用いた中性子捕捉療法の開発を目指し、開発した新規ホウ素製剤の薬物動態を明らかにする。

B. 研究方法

難治性がんのひとつ卵巣がんではErbB2が過剰発現している。分担者の妹尾らは、ErbB2の特異的人工ペプチドリガントEC-1を付加したEGFPがErbB2発現細胞に結合する細胞内に移行することを示した。これらから、EC-1を応用すれば、卵巣がん細胞に新規ホウ素製剤を特異的に導入できると考えられる。

そこで本年度は、ErbB2レセプターを標的とし、BSHを内包したリポソーム表面にErbB2認識ペプチドのEC-1を結合することにより腫瘍細胞へターゲティングができるかを検討した。種々の脂質成分を混合して逆相蒸発法（REV法）を用い、BSHを内包したリポソーム（ナノカプセル）を合成した。このリポソーム表面に、種々の濃度（0.01%、0.1%、1%）でEC-1ペプチドを結合させ、EC-1ペプチド結合リポソームを作製した。培養細胞には卵巣がん由来株化細胞SKOv3を用い、作製したEC-1ペプチド結合リポソームとインキュベーションしてSKOv3細胞内に取り込まれたホウ素量をICP分析により定量した。

C. 研究結果

EC-1ペプチド結合リポソームをSKOv3細胞と

インキュベーションさせた結果、投与したりポソームの濃度に依存して細胞内へ取り込まれた。特に細胞核内で高濃度のホウ素集積が確認できた。ペプチドが結合していないリポソームに比べ、0.01%、0.1%、1% EC-1ペプチド結合リポソームは、それぞれ約3.2倍、3.9倍、5.0倍のホウ素集積性を示した。

D. 考察

本研究で作製したEC-1ペプチド結合リポソームは、卵巣がん過剰発現しているErbB2レセプターに特異的に結合し、腫瘍細胞内へとホウ素を高濃度に導入することができた。

E. 結論

我々はこれまでに、SKOv3をヌードマウスに接種し、異処性モデルマウスが作製できるか検討している。その結果、SKOv3細胞をヌードマウスに腹腔内接種することにより接種後30日目のヌードマウスでは、大網および腸間膜に乳白色の米粒大の腫瘍が多数観察され、異処性卵巣がんモデルマウスを作製できる可能性が示された。EC-1は付加した分子を普遍的にErbB2発現細胞内に移行させる働きがあると考えられ、本研究で開発した新規ホウ素製剤を卵巣がん細胞に導入する際の有望な候補となり得る。

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；なし。

H. 知的所有権の取得状況

現在のところ無し。

6. CD44を分子標的とするDDSの研究

分担研究者 妹尾 昌治 岡山大学大学院自然科学研究科・教授

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、標的分子として脳腫瘍細胞株で共通に過剰発現が認められたCD44について、抗体を提示して細胞特異的に薬剤導入できるベクターを開発した。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

9種のヒトグリオーマ由来細胞株A172、CCF-STTG1、GI-1GIi36、KG-1-C、T98G、TM31、U251MG、U373MGに共通するがん抗原としてCD44を見出しているが、これを分子標的治療のマーカースする創薬の対象として検討する。本研究では、抗CD44モノクローナル抗体をリポソーム表面に提示したイムノリポソームによりCD44特異的な腫瘍選択的かつ効率的な薬剤輸送システムを開発することを目的とした。

B. 研究方法

9種類のヒトグリオーマ由来細胞株の中から、in vivoで腫瘍形成が可能でシスプラチン感受性の高いものを選択し、抗CD44モノクローナル抗体を提示するイムノリポソームにより標的となる細胞に対してCD44の内在化について検討して、効率的な薬効を期待できる剤型をデザインした。さらにこの剤型の有効性についてin vivoモデルにより検証した。

C. 研究結果

ヒトグリオーマ由来細胞株の中でU251MG細胞は、シスプラチン感受性で抗CD44抗体が結合したCD44分子の細胞内移行が認められた。一方、抗CD44抗体結合シスプラチン内包イムノリポソームの細胞毒性はIC50で2.3 μ Mであった。これはシスプラチン単体の約100倍、シスプラチン内包リポソームの約4倍の毒性である。細胞との接触時間を評価しても細胞毒性を示すために必要な時間はイムノリポソームとシスプラチン単体ではほぼ同等であった。また、イムノリポソームにcy5.5を内封してin vivoにおける腫瘍での拡散効果を検討すると単純なリポソームでは時間経過に伴い腫瘍からの拡散が見られたのに対

し、イムノリポソームでは、時間が経過しても腫瘍への滞留が維持された。このことから、抗CD44抗体をリポソーム表面に付加することによって、より効果的に腫瘍に集積し、in vivoでより長く、CDDPも少量で効果を発揮できることが明らかになった。

D. 考察

抗CD44抗体とこれを提示するリポソームが細胞内へエンドサイトーシスにより効果的に取り込まれることが示されたことから、このCD44を制がん剤内包リポソームにより標的することは十分な薬理効果を期待させる。シスプラチンを内包させた場合の効果は良好であり、単剤に比べ100倍の細胞毒性を示せた事により本剤型を完成させる事で有効なDDSを構築できると考えられる。

E. 結論

グリオーマは悪性度が高く予後の悪い腫瘍であるが、EGF受容体より特異性の高いCD44が候補分子として見つかった事により、今後の新たなDDSのデザインが可能となった。シスプラチンの例を見ても投与量の幅が広がる事により患者のQOLを高めて治療効果が上がることが十分に期待できる。

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

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* 15(11):2525-2538, 2011.

2. 学会発表

Uchida et al: CD44 protein targeting on the surface of glioma cells. 日本分子生物学会第34回日本分子生物学会年会、2011年12月

H. 知的所有権の取得状況

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. 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の細胞内送達に数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。今回、担癌ヌードマウスを用い、種々の長さのアルギニンペプチドの腫瘍集積性に関して検討した。動物実験は、京都大学における動物実験の実施に関する規程に基づき適正に行った。

C. 研究結果

膜透過性塩基性ペプチドとして汎用されるH IV-1 Tatペプチド、ペネトラチン、オクタアルギニン(R8)をAlexa Fluor 660でラベルし、尾静脈注射により担癌マウスに投与し、24h後の各ペプチドの腫瘍残存性に関してIVIS Spectrum Systemを用いて、検討した。その結果、R8が最もガン細胞への集積が高いことが分かった。

次に、アルギニン残基数が、2～16のペプチド(R2, R8, R12, R16)の腫瘍集積性を検討したところ、やはり、R8が最も良い結果を与えた。更に、R8, R12の光学活性ペプチド(D体ペプチド)を合成したところ、D型のオクタアルギニン(r8)が最も高い腫瘍集積性を示した。R8の体内分布を調べたところ、肝臓、腎臓、肺などにも集積するが、腫瘍にも同等の集積性を示した。

次に、抗ガン剤ドキシソルビシン(Dox)とr8のコ

ンジュゲートを作製し、ガンの増殖抑制活性を検討した。Dox単体では抗腫瘍増殖活性がみられるのには6mg/kg必要であったが、この際、マウスの体重の顕著な減少が伴い、副作用が大きいことが示唆された。これに対し、r8-DoxコンジュゲートではDox量として4mg/kgで同等の抑制能が認められ、また、体重の減少は認められなかった。

D. 考察

光学活性ペプチドr8との結合により、腫瘍集積性が向上し、副作用が軽減されることが示唆された。ガン組織への集積に関する理由に関しては血中での分解性の少なさが関与している可能性がある。

E. 結論

光学活性ペプチドr8との結合により、腫瘍集積性が向上し、副作用が軽減されることが示唆された。この系のBSHのガン細胞へのターゲティングにも応用が期待される。

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

Nakase I, Konishi Y, Ueda M, Saji H, Futaki S: Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo. *J Control Rel* in press, 2012.

H. 知的所有権の取得状況

二木史朗ら、「腫瘍集積型抗癌剤」
(特願 2010-285707)

8. BSHペプチドの開発と治療効果の検討

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・助教

細胞内導入可能な新規のホウ素ペプチド（BSHペプチド）を作製し、細胞内への導入効果や疾患モデルマウスに対する投与による導入効果を検討した。さらに、中性子照射により、従来のホウ素製剤との抗腫瘍効果の比較検討を行った。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

悪性脳腫瘍に対する中性子捕捉療法は、他に有効な治療法が無い現在、非常に脚光を浴びている。治療で使われているホウ素製剤のBPA（ホウ素フェニルアラニン）は、がん細胞に多く発現しているアミノ酸トランスポーターを介して、増殖能の高いがん細胞へと取り込まれる。一方ホウ素12個からなるBSHは、血液脳関門が破壊されている腫瘍部で脆弱な腫瘍血管より漏出するも、細胞内への導入は無い。そのためBSHを用いた場合、ホウ素中性子捕捉反応によって生ずる効果は低いと考えられる。今回我々は、BSHをペプチド修飾して細胞内に導入可能な製剤を作製し、その効果を検討した。

B. 研究方法

細胞膜通過ペプチドと呼ばれるアルギニン（Arg）11個からなるペプチドとホウ素製剤BSHをSS結合にて融合し、BSHペプチドを作製した。この製剤を悪性脳腫瘍細胞株に投与し、細胞内の局在及び細胞内ホウ素濃度を測定した。さらに、製剤あたりのホウ素濃度を上げるために、リジンを使用した枝分かれ配列を利用し、多数のBSHを一つのペプチドに結合させることに成功した。このマルチBSHペプチドを、悪性脳腫瘍細胞株に投与し腫瘍部および腫瘍細胞内への導入効果を検討した。さらに、中性子照射を行い、その癌殺傷効果を検討した。

（倫理面への配慮）動物実験に関しては岡山大学に動物実験計画書を提出し、岡山大学動物実験委員会並びに遺伝子組み換え動物取扱による岡山

大学倫理委員会の承認のもと行った。

C. 研究結果

投与されたBSHペプチドは、細胞内導入後、細胞質より核へと局在が変化した。BSH1個当たり1個のペプチドを結合したのものから、最大8個のBSHと結合したマルチBSHペプチドでは、結合BSHの数に比例して、ホウ素濃度が上昇した。細胞内導入後に中性子照射を行うと、100倍以上高濃度のBSHよりもがん細胞に対する殺傷効果が強いことが判明した。また、脳腫瘍動物モデルに対して、尾静脈より投与を行うと、腫瘍内部までの導入効果が確認され、さらにBSHペプチドは、腫瘍に強く局在し、正常部位には認められなかった。

D. 考察

細胞膜通過ペプチドにより、ホウ素製剤BSHの細胞内導入効果を得ることに成功した。ホウ素製剤BSHは低分子であるのに対して、ペプチドは分子量が高いため、1分子当りのホウ素濃度を高くする製剤の開発に成功した。

E. 結論

高い癌殺傷効果を有するBSHペプチドの作製に成功した。

F. 健康危険情報；総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 学会発表

Michiue H, Matsui H et al: Development of novel peptide BSH compound for boron neutron capture therapy against malignant glioma. The 6th young researchers boron neutron capture therapy meeting. 2011年12月、台湾

H. 知的所有権の取得状況

道上宏之、松井秀樹ら。「細胞膜透過型ホウ素ペプチド」（特願 2011-230059）

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
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
Ogawa T., Michiue H., Matsui H., et al	Protein therapy using heme- oxygenase-1 fused to a polyarginine transduction domain attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage.	J Cereb Blood Flow Metab	31(11)	2231-42	2011
Hiramatsu R., Miyatake S., 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(1)	52-58	2011
Miyata S., Miyatake S., et al	Computed tomography imaging of transferrin targeting liposomes encapsulating both boron and iodine contrast agents by convection-enhanced delivery to F98 rat glioma for boron neutron capture therapy.	Neurosurgery	68(5)	1380-1387	2011
Furuse M., Miyatake S., et al	Repeated treatments with bevacizumab for recurrent radiation necrosis in patients with malignant brain tumors: a report of 2 cases.	J Neurooncol	102(3)	471-475	2011
Andoh T., Miyatake S., et al	Boron neutron capture therapy for clear cell sarcoma (CCS): Biodistribution study of p-borono-l-phenylalanine in CCS-bearing animal models.	Appl Radiat Isot	69(12)	1721-1724	2011
Nonoguchi N., Miyatake S., Ono K., et al	The distribution of vascular endothelial growth factor-producing cells in clinical radiation necrosis of the brain: Pathological consideration of their potential roles.	J Neurooncol	105(2)	423-431	2011
Kawabata S., Miyatake S., Ono K., et al	Phase II clinical study of boron neutron capture therapy combined with X-ray radiotherapy/ temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme -Study design and current status report.	Appl Radiat Isot	69	1796-1799	2011

Takahashi K., Miyatake S., et al	Enhanced expression of coproporphyrinogen oxidase in malignant brain tumors: CPOX expression and 5-ALA-induced fluorescence.	Neuro-Oncology	13(11)	1234-1243	2011
宮武伸一	II. 悪性脳腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法	癌と化学療法	38(6)	927-932	2011
川端信司、宮武伸一 他	硼素中性子捕捉療法について	PET journal	15	9-12	2011
Fujita Y., Ono K., 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
Tanaka H., Ono K., et al	Experimental verification of beam characteristics for cyclotron- based epithermal neutron source (C-BENS).	Appl Radiat Isot	69	1642-1645	2011
Imoto M., Ono K., et al	Evaluation for activities of component of Cyclotron-Based Epithermal Neutron Source (C-BENS) and the surface of concrete wall in irradiation room.	Appl Radiat Isot	69	1646-1648	2011
Ueda H., Ono K., et al	The optimization study of Bonner sphere in the epi-thermal neutron irradiation field for BNCT.	Appl Radiat Isot	69	1657-1659	2011
Tsukamoto T., Ono K., et al	A phantom experiment for the evaluation of whole body exposure during BNCT using cyclotron-based epithermal neutron source (C-BENS).	Appl Radiat Isot	69	1830-1833	2011
Wei F.Y., Matsui H., Michiue H., Tomizawa K., et al	Deficit of tRNA ^{Lys} modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice.	J. Clin. Invest.	121(9)	3598-3608	2011
Wei F.Y., and Tomizawa K.	Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of type 2 diabetes.	Endocrine J.	58(10)	819-825	2011
Wei F.Y., and Tomizawa K.	Development of type 2 diabetes caused by a deficiency of a tRNA ^{Lys} modification.	Islets	4	印刷中	2012
Onishi M., Date I., et al	Angiogenesis and invasion in glioma.	Brain Tumor Pathol	28	13-24	2011
Inoue S., Date I., et al	Novel Animal Glioma Models that Separately Exhibit Two Different Invasive and Angiogenic Phenotypes of Human Glioblastomas.	World Neurosurg		印刷中	2011
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	15(11)	2525-2538	2011
Hamamoto K., Seno M., 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