

201111006B

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 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 松井秀樹

平成 24 (2012) 年 5 月

# 目 次

I. 総合研究報告【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. 総合研究報告【分担研究報告】	9
BSH ペプチドの開発と治療効果の検討に関する研究	10
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 道上 宏之	
ボロン製剤の導入と効果測定に関する研究	12
大阪医科大学医学部脳神経外科学 宮武 伸一	
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	
ホウ素製剤の薬物動態測定に関する研究	16
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 西木 禎一	
腫瘍細胞特異的な分子標的による薬効成分の細胞内導入に関する研究	18
岡山大学大学院自然科学研究科 妹尾 昌治	
難治療癌モデル動物の作製と同モデルに対する製剤の安全性に関する研究	21
熊本大学大学院生命科学研究部 富澤 一仁・魏 范研	
脳疾患動物モデル作製・培養細胞導入に関する研究	24
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 伊達 勲	
肺癌・悪性中皮腫モデル動物作製と治療に関する研究	26
(独)国立病院機構四国がんセンター 井口 東郎	
原子炉及び加速器による中性子源の開発に関する研究	29
京都大学原子炉実験所 小野 公二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

## I. 総合研究報告

### 【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）  
（総合）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（京成大原子炉実験所・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（ $^{10}\text{B}$ ）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

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も、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、その効果を検討した。

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、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ペプチドの脳腫瘍モデルでの検証】

ヌードマウス（メス）を用いて、EGFRvIIIを発現しているU87ΔEGFR細胞をマウス脳内に移植し、マウス脳腫瘍モデルを作製した。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。

#### 【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る。本研究では、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。

また、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

#### 【ナノカプセルの合成と細胞内導入検証】

がんにはその腫瘍組織が成長するための栄養分を必要とするため血管を新生するという

特徴がある。腫瘍における血管は通常の臓器に比較すると脆弱で、血管内皮細胞の間隙が比較的広く透過性が高いと考えられている。また、腫瘍内はリンパ管が発達していないため、血管から漏出した物質が回収されず腫瘍に蓄積する傾向がある。これはEPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果と呼ばれ、ドラックデリバリーシステム (DDS) では基本的概念となっている。リポソームのようなナノカプセル製剤ではこの効果を利用していることが多い。

本研究では、さらに、腫瘍部位に特徴的に発現している抗原やレセプターを分子標的として、これを標的するシステムを構築する。悪性脳腫瘍に特異的に発現しているEGFRを対象とするDDSの確立を目指し、抗EGFR抗体を付加した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。

#### 【ナノカプセルの脳腫瘍モデルでの検証】

ヌードマウス（メス）を用いて、EGFRvIIIを発現しているU87ΔEGFR細胞をマウス脳内に移植し、マウス脳腫瘍モデルを作製した。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集積を確認した。また、臓器内のホウ素濃度をICPにより定量した。

#### 【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。前述の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-

クションして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】

腫瘍の細胞表面の特徴を詳細に知って、腫瘍細胞に特異的な表面に抗体やリガンドを準備し、薬効成分を封入したリポソームへ、腫瘍に特異的で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。

そこで、本研究では、さらに、前述のErbB2 (Her2) を対象として分子標的治療薬の細胞内への内在化を促進して、内包した薬剤の薬効を効率的に発揮するDDSの確立を試みた。また、9種のアナキニド由来細胞株に共通するがん抗原としてCD44を見出し、これを分子標的治療のマーカーする創薬の対象として検討して、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。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。臨床研究を行う前の前臨床研究では、ヒト悪性脳腫瘍細胞を移植した動物脳腫瘍モデルを作製するが、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り、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。したがって実験での効果が臨床研究へ反映され

ず、研究と臨床との間の壁となっている。そこで本研究では、ヒトの悪性脳腫瘍に似た動物モデル（神経膠芽腫モデル）を作製することを目的とした。

岡山大学脳神経外科にて樹立した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、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。

一方、熊本大学では、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の作製を行った。術中に神経膠芽腫患者から摘出したがん組織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。

#### 【卵巣がんモデルの作製】

さらに、他の難治性がんとして、卵巣がん由来細胞株である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た。SKOv3培養細胞( $5 \times 10^6$ 個)をメス無胸腺ヌードマウス(BALB/c Slc-nu/nu、7週齢)に腹腔内接種し、30日後に麻酔下で開腹し、腹腔内諸臓器を肉眼で観察した。

#### (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。また、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、予め熊本大学学内臨床研究倫理委員会でも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。

## 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。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、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。

そこで、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源からの中性子強度、物理特性および生物特性を検索し、 $\alpha$ オートラジオグラフィ(ARG)の高精度化を図った。

## 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 $\Delta$ 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ペプチドの脳腫瘍モデルでの検証】

作製した脳腫瘍モデルマウスに対して、尾静脈よりBSHペプチド投与を行うと、腫瘍内部までの導入効果が確認された。また、ホウ素集積は24時間以上保持されることが確認された。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。

#### 【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、 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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】

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り、効果的なBSHの細胞内送達系が樹立できる可能性が示唆された。

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

#### 【ナノカプセルの合成と細胞内導入検証】

合成したNiリポソーム、およびその表面に抗EGFR抗体をZZタンパクを介して結合させたイム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。

免疫染色の結果、コントロールであるリポ

ソームに対し、抗体を表面に結合したイムノリポソームではホウ素の腫瘍特異的な集積を認め、その集積は24時間以上続いた。

#### 【ナノカプセルの脳腫瘍モデルでの検証】

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。

#### 【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】

ErbB2の人工リガンドEC-1は、乳ガン由来のSK-BR-3細胞のように細胞の種類によりErbB2の細胞内内在化が難しい。また、人工リガンドEC-1はFc融合タンパク質やナノカプセル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、細胞内内在化が難しい場合でも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。これにより、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。

また、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。

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とを示し、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。また、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】

岡山大学で、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。

一方、熊本大学では、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の作製を試みた。

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日では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。



### 【卵巣がんモデルの作製】

SKOv3細胞を接種して30日経過したヌードマウスでは、大網および腸間膜に乳白色の米粒大の腫瘤が多数観察された。ErbB2の発現が認められないヒト胎児腎臓由来HEK293細胞を同数接種した対照群ではこのような病変は観察されなかった。SKOv3細胞接種マウスは接種60日後も外観上変化が認められず、一般健康状態も異常はなかった。

一方で、今後、膵臓がんや肺がん、悪性中皮腫等の難治性悪性腫瘍の胆がんモデル動物におけるがん評価に有効な診断法として、PET/CTが有用であるかについても検討した。

### 5. 原子炉及び加速器による中性子源の開発

開発中のサイクロトロン中性子ビームの調整が完了し、物理データや生物学データを取得した。その結果、中性子ビームのRBEは従来の原子炉中性子ビームよりもやや小さかった。原子炉中性子ではRBEが約3.0であったが、サイクロトロンでは生物反応の指標にも依るが平均すると2.4となった。これは、物理データが示唆する中性子のエネルギースペクトルが高い方へシフトしていることを勘案すると自然に理解可能なRBEであった。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。

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。ホウ素濃度を由来化合物別に分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膠腫の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。

ただし、全血での測定では、投与後の時間経過と共にBPAの血球・血漿間での移動のため不正確になるが、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。

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。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た。

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、マウス脳腫瘍モデルを用いたin vivo実験における新規ホウ素製剤の有効性の検証では、ナノカプセル表面に結合した抗体により、脳腫瘍内に特異的ホウ素を送達し、T(腫瘍部)/N(正常部)>10を達成した。BNCTはホウ素製剤の腫瘍への選択的集積を前提としているが、現在臨床研究で用いられている2種類のホウ素化合物BPAおよびBSHのT/N比は10より小さいことから、本研究で開発した抗体付加型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。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。

脳腫瘍以外の難治性がんへの応用として、卵巣がん由来のSKOv3細胞をヌードマウスに腹腔内接種することにより異処性卵巣がんモデルマウスが作製でき、担がんモデル動物の作製を推進する上で重要な成果となった。開発した新規ホウ素製剤のナノカプセル表面の抗体やペプチドを取り替えることにより、他の難治性がんへ応用できる可能性が示された。

一方で、ヒトの病態に似た神経ヒトの病態に似た神経膠芽腫モデルの作製を検討した。その結果、脳内に浸潤性を認める特徴を有し

たモデル動物を作製することができた。従来の細胞株では、浸潤発育することなく腫瘍が増殖するため、本来の脳腫瘍の形態を示さず、実験結果が臨床結果と一致しない。したがって、本研究の成果はBNCTの基礎実験データを臨床研究へ発展させる上で非常に重要な疾患モデルとなり得ると考えられ、本モデルはBNCTの効果判定に有用であると期待される。

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、物理データや生物学データの取得が終了した。平成24年度にはこの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できる準備が整った。

#### 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た。脳腫瘍、または卵巣がんを対象に、細胞レベルおよび担がんモデル動物を用いて実証した。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. 研究発表

##### 1. 論文発表

Feng B, Tomizawa K, Michiue H, Miyatake S, Seno M, Matsui H, et al: Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials* 30:1746- 1755, 2009.

Takayama K, Tomizawa K, Matsui H, et al: Enhanced intracellular delivery using arginine-rich peptides by the addition of penetration accelerating sequences (Pas). *J Control Release* 138(2):128- 133, 2009.

Miyatake S, Matsui H, Ono K, et al: Pseudoprogession in boron neutron capture therapy for malignant gliomas and meningiomas. *Neuro-Oncology* 11:430- 436, 2009.

Ogawa T, Matsui H. Protein transduction method for cerebrovascular disorders. *Acta Med. Okayama.* 63:1-7, 2009

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.

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ー腫瘍選択性とDDS技術ー。2011年11月、神戸

#### G. 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. 総合研究報告

### 【分担研究報告】

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（ $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ ）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。

本研究で我々は、脳腫瘍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、難治性癌モデル動物を作製するとともに投与した新規ホウ素製剤の治療効果を検討することを目的とした。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、その効果を検討した。

B. 研究方法

【BSHペプチドの合成】

我々が開発したドックデリバリー技術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（U87ΔEGFR）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を試みた。このマルチBSHペプチドを、U87ΔEGFR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。

【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

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。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。

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24時間以上保持されることが確認された。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

細胞内導入効果を有するBSHペプチドの作製に成功した。さらに、細胞導入効率を高めるために、複数のBSHと結合させたマルチBSHペプチドを作製し、成功した。本研究において、このマルチBSHペプチドは腫瘍細胞へ高い導入効果を示し、中性子照射では高い癌殺傷効果を示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

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ー腫瘍選択性とDDS技術ー. 2011年11月、神戸

#### G. 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)

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

現存する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。

これまで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に加え、本事業で最適化した新規ホウ素製剤を使用し、京都大学原子炉で中性子線源を確保し照射を行い、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。

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。

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. 研究発表

1. 論文発表

Kawabata S, Miyatake S, et al: Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma. *J Rad Res* 50:51-60, 2009.

Miyatake S, et al: Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol* 91:199-206, 2009.

Miyatake S, et al: Pseudoprogression in boron neutron capture therapy for malignant gliomas and meningiomas. *Neuro-Oncology* 11:430-436, 2009.

Kimura Y, Miyatake S, et al: Boron neutron capture therapy for papillary cystadenocarcinoma in the upper lip: A case report. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 38:293-295, 2009.

川端信司、宮武伸一、他: ホウ素中性子捕捉療法による悪性神経膠腫の治療効果. 定位放射線治療 13:23-30, 2009.

Kawabata S, Miyatake S, et al: Survival benefit from boron neutron capture therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients. *Appl Radiat Isot* 67:S15-18, 2009.

Miyatake S, et al: Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas. *Appl Radiat Isot* 67:S22-24, 2009.

Kimura Y, Miyatake S, et al: Boron neutron capture therapy for recurrent oral cancer and metastasis of cervical lymph node. *Appl Radiat Isot* 67:S47-49, 2009.

Ito Y, Miyatake S, et al: Disposition of TF-PEG-Liposome-BSH in tumor-bearing mice. *Appl Radiat Isot* 67:S109-110, 2009.

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、宮武伸一: 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、宮武伸一: 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.

Hiramatsu R, Miyatake S, et al: Application of a novel boronated porphyrin (H<sub>2</sub>OCP) as a dual sensitizer for both PDT and BNCT. *Lasers in Surgery & Medicine* 43:52-58, 2011.

Miyata S, Miyatake S-I, 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, Kawabata S, Kuroiwa T, Miyatake S-I, et al: Repeated treatments with bevacizumab for re-current radiation necrosis in patients with malignant brain tumors: a report of 2 cases. *J Neurooncol* 102 (3):471-475, 2011.

Andoh T, Miyatake S, Ichikawa H, 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 SI, 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 SI, Kuroiwa T, 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 38:927-932, 2011.

川端信司、松下葉子、宮田至朗、宮武伸一: 硼素中性子捕捉療法について. PET journal 15: 9- 12, 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. 14<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, Satellite Symposium. 2011年 8月、ワルシャワ

宮武伸一: 脳腫瘍の放射線治療に伴う脳壊死—機序と対策—. 第24回日本放射線学会学術総会 シンポジウム. 2011年 11月、神戸

宮武伸一: Clinical application of BNCT for malignant brain tumor. 6th young researchers boron neutron capture therapy meeting. 2011年 12月、台湾

G. 知的所有権の取得状況

現在のところ無し。

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う。

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。

また、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

アルギニンペプチドのN末端をヘキサ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。

また、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。

これに関連し、R12 ペプチドを蛍光標識し、その細胞内移行を共焦点顕微鏡により経時的に観察すると、投与2～3分後にペプチドの局所的なサイトゾルへの流入が観察された。また、流入開始とほぼ同時に、細胞表面に粒状の特異構造物が形成されることが微分干渉像により観察された。検討の結果、ペプチドにある程度疎水性を持たせることで粒状構造物形成を伴う直接膜透過をより効率的に促進できることが示唆された。また、粒状構造物形成およびペプチド流入は、マクロピノサイトーシス阻害剤存在下および4℃でも阻害されず、膜電位に強く依存することが明らかとなった。さらに、共焦点顕微鏡観察により、通常細胞膜内膜に存在するホスファチジルセリンが粒状構造物外膜にも存在すること、ラフトに多く含まれるスフィンゴミエリンが集積していることが明らかとなった。さらに、電子顕微鏡観察により粒状構造物が多重膜構造となっていることも示された。以上のことから粒状構造物は、膜電位に伴うアルギニンペプチドの細胞への流入とほぼ同時に形成され、膜の反転を含むダイナミックな変化を伴って多重膜構造をとり、ラフト様の特殊な領域を形成することが示唆された。



一方、膜透過性塩基性ペプチドとして汎用されるHIV-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。

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。

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しての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。

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. 研究発表

##### 1. 論文発表

Miyamoto R, Akizawa H, Nishikawa T, Uehara T, Azuma Y, Nakase I, Futaki S, Hanaoka H, Iida Y, Endo K, Arano Y: Enhanced target-specific accumulation of radiolabeled antibodies by conjugating arginine-rich peptides as anchoring molecules. *Bioconjug Chem* 21 (11):2031-2037, 2010.

Katayama S, Hirose H, Takayama K, Nakase I, Futaki S: Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *J Control Rel* 149:29-35, 2011.

Akita H, Kogure K, Moriguchi R, Nakamura Y, Higashi T, Nakamura T, Serada S, Fujimoto M, Naka T, Futaki S, Harashima H: Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: Programmed endosomal escape and dissociation. *J Control Rel* 149:58-64, 2011.

Nakase I, Akita H, Kogure K, Gräslund A, Langel U, Harashima H, Futaki S: Efficient intracellular delivery of nucleic acid pharmaceuticals using cell-penetrating peptides. *Acc Chem Res* in press, 2011.

Hirose H, Takeuchi T, Osakada H, Pujals S, Katayama S, Nakase I, Kobayashi S, Haraguchi T, Futaki S: Transient focal membrane deformation induced by arginine-rich peptides leads to their direct penetration into cells. *Mol Ther* in press, 2012.

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.

#### G. 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)

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

脳腫瘍に対する中性子捕捉療法に向け、開発した新規ホウ素製剤をマウス脳腫瘍モデルに投与し、その薬物動態を明らかにした。さらに、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、新規ホウ素製剤を培養細胞に投与し、腫瘍細胞へのホウ素集積性、ホウ素の細胞内局在を確認した。

分担研究者：

省略

A. 研究目的

脳腫瘍に対する新規ホウ素製剤を用いた中性子捕捉療法に向けて、マウス脳腫瘍モデルを作製するとともに、投与した新規ホウ素製剤の生体内での薬物動態を明らかにする。

さらに、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腫瘍細胞へのホウ素集積性、およびホウ素の細胞内局在を確認し、細胞レベルで検証する。

B. 研究方法

1. マウス脳腫瘍モデルを用いた薬物動態測定

【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、EGFR<sup>vIII</sup>を発現しているU87ΔEGFR細胞をマウス脳内に移植し、マウス脳腫瘍モデルを作製した。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集積を確認した。ま

た、臓器内のホウ素濃度をICPにより定量した。

2. 他の難治性がんへの応用

【EC-1ペプチド結合ナノカプセル合成と検証】

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。前述1で合成した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（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細胞内へのホウ素デリバリーを確認した。細胞内のホウ素量はICP分析により定量した。

【マウス卵巣がんモデルの作製】

次に、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た。

細胞培養： SKOv3培養細胞を用いた。

イムノブロットティング(IB)： 細胞タンパク質をSDS電気泳動法で分離後PVDF膜に転写し、抗ErbB2抗体を用いIB法により解析した。

EC-1付加キメラタンパク質の精製： 目的タンパク質発現ベクターで大腸菌を形質転換後、

常法に従い発現を誘導し、カラムクロマトグラフィを用いて精製した。

マウスへの細胞接種と剖検：細胞 ( $5 \times 10^6$ 個)をメス無胸腺ヌードマウス(BALB/c Slc-nu/nu, 7週齢)に腹腔内接種し、30日後に麻酔下で開腹し、腹腔内諸臓器を肉眼で観察した。

### C. 研究結果

#### 1. マウス脳腫瘍モデルを用いた薬物動態測定

免疫染色の結果、コントロールであるリポソームに対し、抗体を表面に結合したイムノリポソームではホウ素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。

#### 2. 他の難治性がんへの応用

SKOv3細胞をIB法で解析するとErbB2の高発現が確認された。EC-1を付加した約23kDaの組換えキメラタンパク質にSKOv3細胞を暴露すると特異的に細胞内に取込まれた。

一方、EC-1ペプチドを表面に結合させたリポソームを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% 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。

SKOv3細胞を接種して30日経過したヌードマウスでは、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た。ErbB2の発現が認められないヒト胎児腎臓由来HEK293細胞を同数接種した対照群ではこのような病変は観察されなかった。SKOv3細胞接種マウスは接種60日後も外観上変化が認められず、一般健康状態も異常はなかった。

### 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実験において、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。

一方で、このBSH封入抗体付加型ナノカプセルを基本構造として応用し、EC-1ペプチドを表面に結合させたナノカプセルを用いると、卵巣がんで過剰発現している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。この結果から、EC-1は付加したカプセルを普遍的にErbB2発現細胞内に移行させる働きがあると考えられ、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。

また、今回、マウス卵巣がんモデルを作製することができた。ヌードマウスの腹腔内に接種したSKOv3細胞は、大網や腸間膜などの血管が豊富な漿膜に接着後増殖し、腫瘍を形成したと考えられる。

### E. 結論

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きた。マウス脳腫瘍モデルを用いた in vivo 実験における新規ホウ素製剤の有効性の検証では、ナノカプセル表面に結合した抗体により、脳腫瘍内に特異的ホウ素を送達し、 $T(\text{腫瘍部})/N(\text{正常部}) > 10$  を達成した。ホウ素中性子捕捉療法はホウ素製剤の腫瘍への選択的集積を前提としているが、現在臨床研究で用いられている2種類のホウ素化合物BPAおよびBSHのT/N比は10より小さいことから、本研究で開発した新規ホウ素製剤は将来の適応拡大に向けて有望な候補となり得る。脳腫瘍以外の難治性がんへの応用として、卵巣がん由来のSKOv3細胞をヌードマウスに腹腔内接種することにより異処性卵巣がんモデルマウスが作製でき、担がんモデル動物の作製を推進する上で重要な成果となった。開発した新規ホウ素製剤のナノカプセル表面の抗体やペプチドを取り替えることにより、他の難治性がんへ応用できる可能性が示された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Feng B, Matsui H, et al: Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials* 30:1746-1755, 2009.

### G. 知的所有権の取得状況

現在のところ無し。

腫瘍細胞特異的な分子標的による薬効成分の細胞内導入

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

腫瘍の細胞表面の特徴を詳細に知って、腫瘍細胞に特異的な表面に抗体やリガンドを準備し、薬効成分を封入したリポソームへ、腫瘍に特異的で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E-selectin、ErbB2および独自の的方法論で発見したCD44について、その人工リガンドや抗体を利用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

がんにはその腫瘍組織が成長するための栄養分を必要とするため血管を新生するという特徴がある。腫瘍における血管は通常の臓器に比較すると脆弱であり血管内皮細胞の間隙が比較的広く透過性が高いと考えられている。また、腫瘍内はリンパ管が発達していないため、血管から漏出した物質が回収されず腫瘍に蓄積する傾向がある。これをEPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果と呼んでDDSでは重要な基本的概念となっている。リポソーム製剤ではこの効果を利用していることが多いが、本研究ではさらにこの様な腫瘍部位に特徴的に発現している分子標的として、E-selectinを取り上げてこれを標的とするシステムを構築した。さらに、がんの特異的な抗原としてErbB2(Her2)を対象として分子標的治療薬の細胞内への内在化を促進して、内包した薬剤の薬効を効率的に発揮するDDSの確立を試みた。また、9種のヒトグリオーマ由来細胞株に共通するがん抗原としてCD44を見出し、これを分子標的治療のマーカーする創薬の対象として検討して、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。

B. 研究方法

リポソームの作製のためにジパルミトイル

フオスファチジルコリン(DPPC)、コレステロール(Chol)、ガングリオシド、ジセチルフォスフェート(DCP)およびジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン(DPPE)を分子比35:40:5:15:5(総脂質量 456 mg)で混ぜ、コール酸(469 mg)を加えてミセルを形成し易くした。これを30 mLのメタノール/クロロホルム(1:1, v/v)に溶かした。溶媒をロータリーエバポレーターにより37°Cで気化後、フィルムを形成させ真空下で乾燥させた。内包物としては、制がん剤として頻用されているCDDPを用いた。リポソーム表面にはシアリルルイスX(SLX)で修飾し、DDSの標的として腫瘍細胞及び担癌モデルを用いた検討を行った。

さらに、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。

ErbB2の細胞内への内在化を検討するために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。

次に、9種類のヒトグリオーマ由来細胞株の