

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592084

研究課題名(和文) 血管内皮選択的 BNCT を用いた脳血管再狭窄予防法の開発

研究課題名(英文) Prevention of Vascular Restenosis After Vascular Angioplasty by Endothelial specific BNCT

研究代表者

中井 啓 (Nakai, Kei)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50436284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：候補薬剤送達システムとして、新規ホウ素含有脂質を合成し、リポソームに調整することで、ホウ素含有リポソームを作成した。EPR効果および接触細胞に対する接着機能を併せ持つ粒子を設計作成した。培養細胞および培地にホウ素含有粒子を添加し、中性子照射を行うことで、殺細胞効果をホウ素なし粒子に比べて高いことを証明し、また、細胞取り込み実験においてはリポソーム内をさらにホウ素クラスター水溶液を封入することによって、およそ新規粒子はさらに2.5倍のホウ素濃度を達成することを示した。

研究成果の概要(英文)：We aimed at securing sufficient concentrations of $(10)\text{B}$ in boron neutron capture therapy (BNCT) by developing a new drug delivery system. We have designed and developed a novel lipid analog and succeeded in using it to develop the new boron containing liposome. The liposome is expected that have EPR effect and adhesive property by sizing and surface modification. Cells were cultured with B containing medium, and neutron irradiation revealed the radiobiological effect of boron neutron capture. borocaptate sodium solution was encapsulated in this liposome, then it achieves the 2.5 times higher boron concentration than nano-particle only.

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管内科学 ホウ素中性子捕捉療法 リポソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究課題の申請時の背景・動機

動脈硬化による頸部内頸動脈血管治療後の、再狭窄に対する対策として、心血管系と異なり、薬剤溶出ステントや、放射線治療などの試みはこれまで行われていない。今後は治療人口の増加とともに、頸動脈病変においても治療後の再狭窄予防の必要性が増すことが見込まれる。

平成 17～19 年度に、萌芽研究「選択的アルファ線照射による脳血管形成術後の再狭窄予防に関する基礎的研究」を行い、ラット治療モデルの確立、血管内皮へのホウ素化合物の分布検討、照射実験を行った。基本的化合物の選定、薬剤投与とタイミングの検討をおこない、治療可能性およびそのプロトコールについて検討した。血管組織に対するホウ素濃度の検討を始めて行い、また、再狭窄に関する機序の検討を行い、炎症に起因する新生内膜増殖が血管リモデリングよりも優位であることを示した。上図に示すごとく、動物実験で、BNCT 群は内膜増殖が完全に抑制されていた。これらの研究を、実用化に向けて行うことが必要と考えた。また、平成 22 年より日本原子力研究開発機構の中性子線の実験および臨床利用が再開され、中断していた研究の遂行が可能となった。

(2) 本課題申請後、震災により東海村の原子炉実験は停止した。このため、中性子線として、京都大学原子炉実験所の共同利用の手続きを行い、細胞実験を主とし、

- 新規ホウ素化合物の安全性
- 細胞における放射線生物学的効果

を検証することとした。

2. 研究の目的

(1) 中性子捕捉療法による新生内膜増殖抑制効果で、あきらかにすべき点として、以下の 3 点を当初目標とした。

- 治療有効性 血管損傷内膜増殖モデルで、対照群と比較し、BNCT 群の再狭窄率が有意に低いことを実験的に検証して示す。
- 安全性 (臓器選択性) 血管外膜、や周囲正常組織における放射線障害の検

出、検討により、組織標的治療が可能であることを示す。

- 新規ホウ素化合物応用の可能性血管内皮細胞や平滑筋細胞を標的として、さらに新規ホウ素化合物 3)、ホウ素ポルフィリンやリポソームを主体としたナノ粒子が応用可能かどうかを検討する。

(2) 実際には新規に設計、合成したホウ素含有ナノ粒子の性能評価を行うこととした。以下の 2 種類について検討した。

機能性リポソーム (B5-TAT-lipopeptide: BTL modified Liposome)

長期血中滞留性リポソーム (PEG-BSH-lipid: PBL modified Liposome)

3. 研究の方法

(1) 機能性リポソーム (接着分子の表面修飾)

- ペプチド修飾法、Fmoc 固相合成法を用いて、ホウ素薬剤 BPA とペプチドの複合分子、新規ホウ素含有 lipopeptide の合成を行った。
- リポソームは Bangham 法で作成した。ナスフラスコに HSPC、Chol、PEG を量り取り CHCl₃ に溶解した。薄膜を作成し、PBS で懸濁液を作成、サイジングして調整した。Lipopeptide は post insertion 法を用いて修飾した。

(2) 長期血中滞留性リポソーム

- BSH を既存の PEG 脂質とジスルフィド結合でつなぎ、PEG 鎖長は現在最も血中滞留性のよいと報告されている同程度の分子量 (2000 前後) となるように設計合成した (PEG-BSH-Lipid; PBL)。(1) と同様にリポソームを調整した。

(3) リポソーム物性評価

リポソーム膜中の lipopeptide の含量をサイズ排除クロマトグラフィーで分離定量した。

粒子径と 電位を測定した。

(4) 細胞ホウ素濃度検討

ペプチド修飾によるリポソーム導入効率をマウス大腸癌細胞 (CT26) を用いて検討した。ICP-AES によりサンプルのホウ素イオン濃度を測定した。

(5) 照射実験

細胞実験では、あらかじめホウ素存在かで培養した細胞を、京都大学実験原子炉で 2.65×10^{12} thermal neutron/cm² を各時間(15分、30分、45分)照射した。コロニー形成試験で評価した。

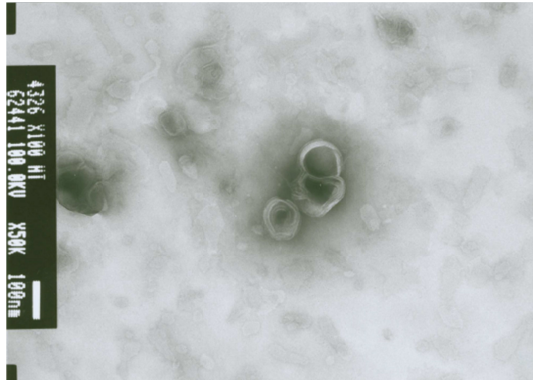
動物実験では、リポソームを担癌マウスに投与し、その BNCT 治療効果を検討した。担癌モデルは、BALB/cA mice (4 weeks old, weighting 16-20g) にマウス大腸がん colon26 細胞を右大腿部に播種して作製した。作成した担癌マウスにリポソームを尾静注射し、24 時間後に中性子照射を KUR で行った。中性子線量は、 $4.5-7.0 \times 10^{12}$ neutron/cm² であった。

4. 研究成果

(1) 機能性リポソーム (B5-TAT-lipopeptide: BTL modified Liposome)

リポソームへの組み込み率は B5-TAT5% PEG-liposome : 66.1% の収率であった。粒子径は 100-200nm であり、電位は 17.5-20.7mV であった。

電顕像



細胞導入効果は、B5-TAT5% liposome におけるホウ素濃度は 0.0337ppm、B5-TAT10% liposome におけるホウ素濃度は 0.165ppm であり、B5-TAT10% liposome は同濃度の BSH 溶液 0.0348ppm に対して、約 4.7 倍の細胞導入効果を示した。

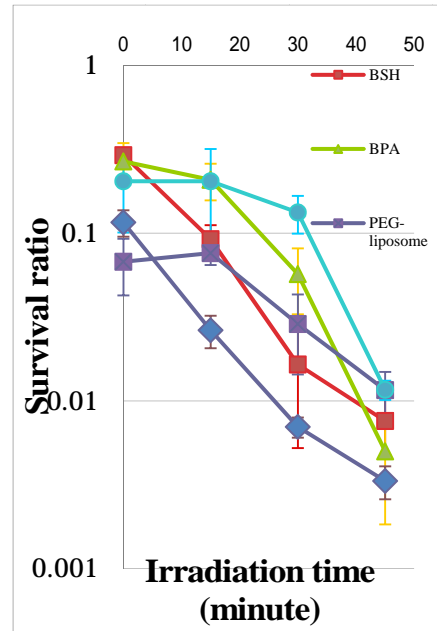


図 1

B5-TAT-Lipopeptide Liposome および中性子照射によるコロニー形成試験

BSH: mercaptoundecahydrododecaborate(水溶液), BPA: p-boronophenylalanine (Fructose 錯体溶液)

細胞照射実験では、BSH, BPA 水溶液, 照射のみの群に比較して細胞生存率の低下を中性子照射時間依存的に認めた。(図 1)

(2) 長期血中滞留性リポソーム

粒子径は 100-200nm であり、電位は -42.3 - -36.5mV であった。サイズ排除クロマトグラフィーによる、PBL のリポソームへの組み込み率は PBL 5%modified Liposome : 73.8%、PBL 10%modified Liposome : 63.7% であった。

動物実験における腫瘍増殖抑制試験を示す。腫瘍増殖抑制効果を担がん動物、飼育の許された 3 週間の範囲で維持していることが確認できた。

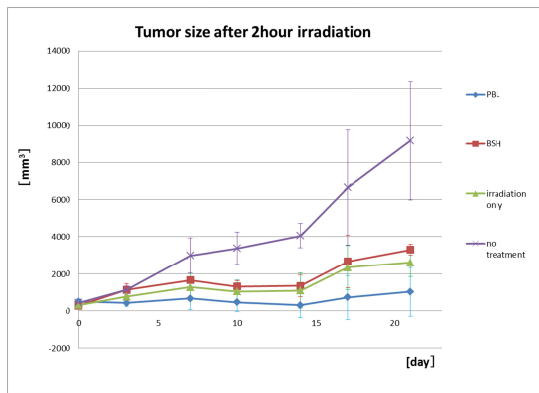


図 2

PBL および中性子照射による皮下担がんラットの腫瘍増殖抑制試験

PBL : 血中滞留性リポソーム, BSH: mercaptoundecahydrododecaborate(水溶液), BPA: p-boronophenylalanine (Fructose 錯体溶液)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Y. Yamamoto, T. Yamamoto, Y. Horiguchi, K. Endo, M. Shirakawa, T. Satoh, M. Koka, K. Nakai, Y. Nagasaki, A. Matsumura, ntra-tumor Distribution of Metallofullerene Using Micro-particle induced X-ray Emission (PIXE)、Applied Radiation and isotope, e-pub, 2014, Jan 8、査読有 DOI:10.1016/j.apradiiso.2013.12.037.

中井 啓、松村 明、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) の現状と将来への展望 =BNCT の原理、医療への発展における取り組み=, 光アライアンス、24 巻、2013, pp. 41-45, 査読無

[学会発表](計7件)

山本陽平、中井 啓、高 振宇、松村 明、江夏昌志、佐藤隆博、Micro-PIXE/PIGE 法を用いた培養細胞におけるホウ素・ガドリニウム動態-中性子捕捉療法に向けた基礎的検討、第8回高崎量子応用研究シンポジウム、高崎、2013/10/11

K. Nakai, T. Yamamoto, A. Matsumura, H. Sakurai, H. Kumada, T Aihara、Granada

workshop on Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: World clinical trials / 7th young researchers BNCT meeting、2013/09/26、Granada Spain

高 振宇、堀口 諭吉、中井 啓、松村 明、長崎 幸夫、活性酸素種消去能を有するボロン含有ナノ粒子の作製と評価、第10回日本中性子捕捉療法学会、2013/09/17、岡山

山本 陽平、中井 啓、白川 真、吉田 文代、佐藤 隆博、江夏 昌志、山本 哲哉、松村 明、Micro-PIXE/PIGE 法を用いた培養細胞におけるホウ素・ガドリニウム動態の検討、第10回日本中性子捕捉療法学会、2013/09/17、岡山

K. Nakai, Y. Yamamoto, M. Shirakawa, F. Yoshida, M. Miyakawa, A. Matsumura, H. Tanaka, Y. Sakurai, S. Masunaga, DNA breaks and cellular response induced by Gadolinium neutron reaction. , 15th International Congress on Neutron Capture Therapy, 11, Sept., 2012. つくば

Y. Yamamoto, K. Nakai, Y. Horiguchi, K. Endo, M. Shirakawa, T. Yamamoto, F. Yoshida, Y. Nagasaki, A. Matsumura ; Imaging of Metallofullerene Distribution Using Micro-particle induced X-ray emission for Gadolinium Neutron Capture Therapy :15th International Congress on Neutron Capture Therapy, 11, Sept., 2012. つくば

中井 啓、山本陽平、白川 真、山本哲哉、吉田文代、松村 明、Gd 中性子捕捉反応の基礎的検討。 京都大学原子炉専門研究部会、2012.2.17-18、大阪府熊取

〔図書〕(計 3 件)

Wataro Tsuruta and Tetsuya Yamamoto,
Akira Matsumura, Springer-Verlag Berlin Heiderberg, TEXTBOOK for BNCT: Prevention of Vascular Restenosis After Vascular Angioplasty, 2012, 553 : pp.513-520
Kei Nakai and Akira Matsumura, Springer-Verlag Berlin Heiderberg, TEXTBOOK for BNCT: Feasibility for Intramedullary Spinal Glioma, 2012, 553 : pp.407-415
Yamamoto T, Nakai K, Kumada H: Tumors of the Central Nervous System, Volume 2 Gliomas: Glioblastoma (Part 2) Series: Tumors of the Central Nervous System, Vol. 2 1st Edition., Chapter 25. GLIOBLASTOMA: BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY, Hayat, M.A. (Ed.), Springer, 2011. Pp229-240, 458 pages

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ホウ素クラスター修飾PEG脂質誘導体およびこれを用いたリポソーム

発明者: 白川 真 中井 啓 松村 明

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: (特願 2012-184283)

出願年月日: 2012 年 08 月 2 3 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

臨床研究については、随時下記 URL で案内
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/neurosurgery/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中井 啓 (NAKAI, KEI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 50436284

(2)研究分担者

松村 明 (MATSUMURA, AKIRA)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 90241819

山本 哲哉 (YAMAMOTO, TETSUYA)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 30375505

吉田 文代 (YOSHIDA, FUMIYO)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号: 30261811