

機関番号：12102
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20591705
研究課題名(和文) 膜融合粒子を用いた悪性脳腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法の基礎的研究
研究課題名(英文) Analysis of a particle with membrane fusion protein for boron neutron capture therapy
研究代表者
中井 啓 (NAKAI KEI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：50436284

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍の選択的放射線治療である、ホウ素中性子捕捉療法での応用を目指して、ホウ素化合物送達システムの開発に関する基礎的検討を行った。表面修飾リポソームによるホウ素送達の応用可能性について検討した。また、ホウ素ポルフィリン化合物、膜融合蛋白を用いた膜融合能を有するナノ粒子について腫瘍細胞へのホウ素集積を検討した。

研究成果の概要(英文)：The Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) has been used clinically for the treatment of malignant tumors. Two drugs, p-boronophenylalanine (BPA) and the sulfhydryl borane (BSH) have been used. We developed the new boron delivery system with Liposome encapsulated Boron compounds, borono-porphyrin, and vesicle with membrane fusion proteins. Cell boron concentration was measured. The results showed this delivery system could be applicable for BNCT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：ホウ素 リポソーム 中性子 悪性脳腫瘍 膜融合

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy BNCT)はホウ素化合物の腫瘍集積性と、ホウ素と熱中性子の反応を利用した細胞選択的な粒子線治療である。この効果を増強するために、Liposomeおよび膜融合蛋白を有する粒子による新規ホウ素デリバリーシステムの検討を行う。

2. 研究の目的

不活化センダイウイルスの膜融合能、ホウ素ポルフィリンの高いホウ素重量比を利用した機能性リポソームの作成を目的とする。これを用いて悪性脳腫瘍の培養細胞、がんモデル動物を用いた実験系で有用性を検討する。最終的には中性子照射実験を行い、その効果を実証する。

3. 研究の方法

(1)膜融合粒子の作成

Liposomeと膜融合タンパクを有する不活化センダイウイルスとを融合させFusion-Liposomeを作成する。また、導入効率の向上を目的に、膜通過ドメインを有するLipopeptideを新規に合成しLiposomeの表面修飾とする。

(2)膜融合粒子の評価

Liposome内水相に、ホウ素ポルフィリンを含むホウ素化合物水溶液を封入し、細胞培地にくわえ、ホウ素濃度を測定し、細胞内集積を検討する。

(3)ポルフィリン化合物の検討

HVJ-Eへの封入薬剤としてホウ素クラスターを有するポルフィリンを検討する。封入効率、細胞の毒性、送達率、蓄積性を検討する。

4. 研究成果

膜融合蛋白・膜通過ドメインをもつホウ素ペプチドを利用し、中性子捕捉療法に用いるホウ素薬剤を腫瘍選択的に投与するための検討を行った。

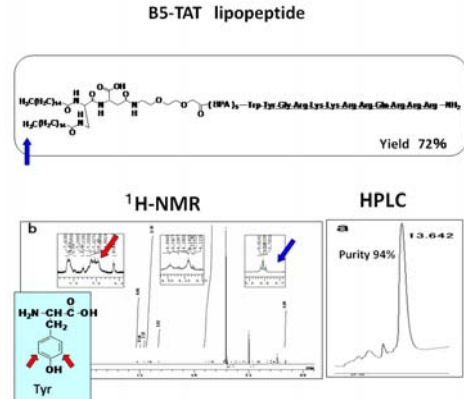
(1) 膜融合蛋白を有する粒子の検討

膜融合蛋白を不活化センダイウイルス HVJ-Eより抽出し、脂質組成と組み合わせてliposomeの構築を行った。従来型のHVJ-Eは、ホウ素含有は可能であったが、治療濃度に到達するためには、局所投与が必要であった。静脈投与を念頭において、膜融合蛋白を抽出し脂質と混じることでリポソームを構築した。形態学的に粒子の生成が確認することができた。また細胞実験においては、治療濃度(20-40ug/wet cell g)の濃度に到達することが確かめられた。しかし、動物実験における静脈投与では、合成過程で用いる界面活性剤のためと推察されるが、膜融合能の機能評価に至らず、したがってホウ素投与量にも限界があった。内包するホウ素化合物の組成の検討や、他の膜融合蛋白ないし腫瘍選択性のための機能的分子の更なる応用を検討したい。

(2) 膜通過ドメイン修飾リポソームの検討

膜通過ドメインを有するホウ素ペプチドを合成し、機能評価を行った。膜通過ドメインペプチドおよび boronophenylalanine(BPA)を有する lipopeptide の合成に mg 単位、純度 90%以上で成功した。同定は ¹H-NMR、

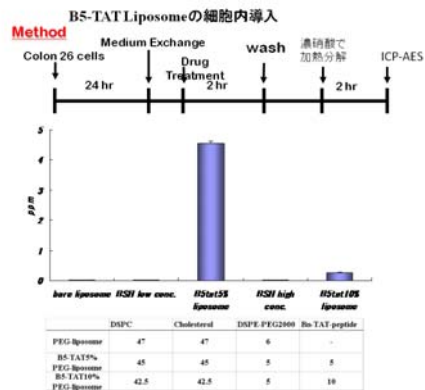
ESI-MS により行った。ESI-MS においては、Boron-lipopeptide をヒドロホウ素化により過酸化水素で処理し、BPA 部分がチロシンの化合物と比較することで検討した。結果、同様にピークを得た。(図1)



【図1 Lipopeptide の合成と収率検討】

合成した lipopeptide を用いたリポソームを構成した。組成は、DSPC、コレステロール、DSPE-PEG に本化合物を混じ、薄膜振盪法でリポソームを構成した。リポソームへの新規脂質アナログの修飾約 70%の収率で Lipopeptide がミセル、単分子状態に優先して Liposome 中に存在することが明らかとなり、ペプチド修飾 Liposome が構築されていると考えられた。

細胞実験でホウ素濃度を検討すると、ホウ素 Lipopeptide 5% を混じて調整された liposome は control として用いた borocaptate Sodium 溶液の 156 倍の取り込み効率およびホウ素絶対濃度の向上が見られた。(図2)

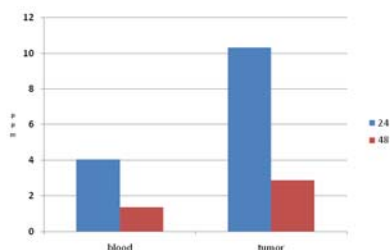


【図2 Lipopeptide の細胞内導入】

担癌マウスを用いた実験では、ホウ素濃度は治療可能濃度には至らなかったものの、腫瘍/血液比で 2.5 と若干の腫瘍選択性を認めた。しかし、血液滞留が持続せず、48時間

では濃度が低下していた。EPR 効果が不十分であると考えられ、安定して腫瘍血管から漏出するサイズおよび脂質組成をさらに検討する必要がある。(図3)

B5-TAT liposome bio-distribution



【図3 Lipopeptide の腫瘍内導入】

(3) ホウ素ポルフィリンの検討

組織内濃度を、ポルフィリンのもつ蛍光強度から推測する検討を行った。ホウ素ポルフィリン化合物には、これまで臨床治験の早期 phase を獲得したものもあり、これまでもいくつかの化合物が報告されている。有用な化合物を見出す可能性はある。細胞実験では、添加したホウ素化合物について、そのけっこう強度をプレートリーダーで測定するとともに、ICP でホウ素濃度を測定した。試験的に合成された数種のホウ素ポルフィリンを用いたが、ホウ素原子を単体で含むホウ素ポルフィリン一種では非常によく相関し、経時変化の追跡が可能であったのに対し、他のホウ素ポルフィリンにおいては、蛍光法によっては、定量的測定が困難であった。

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4件)

- ① Nakai K, Kumada H, Yamamoto T, Tsurubuchi T, Zaboronok A, Matsumura A. Feasibility of Boron Neutron Capture Therapy for malignant spinal tumors. Appl Radiat Isot 67(7-8 Suppl):S43-6, 2009 査読有

- ② Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Aburai K, Kawatobi S, Tsurubuchi T, Yamamoto Y, Yokoyama Y, Okuno H, Matsumura A. Synthesis and evaluation of a novel liposome containing BPA-peptide conjugate for BNCT. Appl Radiat Isot S88-90, 2009 査読有

- ③ Yamamoto T, Nakai K, Kageji T, Kumada H, Endo K, Matsuda M, Shibata Y, Matsumura A: Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma. Radiother Oncol 91: 80-84, 2009 査読有

- ④ Yoshida F, Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Shibata Y, Tsuruta W, Endo K, Tsurubuchi T, Matsumura A: Combined use of sodium borocaptate and buthionine sulfoximine in boron neutron capture therapy enhanced tissue boron uptake and delayed tumor growth in a rat subcutaneous tumor model. Cancer letters 263 : 253-8, 2008 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- ① Shirakawa M, Yamamoto T, Nakai K, Matsumura A et al Development of a functional liposome modified a novel lipid analog for BNCT. 14th International congress on neutron capture therapy 2010.10.29 Buenos Aires, Argentina
- ② Nakai K, Yamamoto T, Matsumura A et al. Boron neutron capture therapy combined with fractionated photon irradiation for glioblastoma. 14th International congress on neutron capture therapy 2010.10.28 Buenos Aires, Argentina

- ③ Endo K, Yamamoto T, Nakai K, et al.
JRR-4 facility for animal irradiation
experiments. 14th International
congress on neutron. 14th International
congress on neutron capture therapy
2010. 10. 28 Buenos Aires, Argentina,
- ④ 中井 啓、松村 明ほか 中性子捕捉療法
のための新規ホウ素リポソームの開発
第68回日本脳神経外科学会総会
2009. 10. 15 東京
- ⑤ 中井 啓、山本哲哉、松村 明ほか 初
発神経膠芽腫に対する中性子捕捉療法 第
6回日本中性子捕捉療法学会 2009. 9. 20
大阪
- ⑥ Nakai K, Nakamura H, Lee C, Yasufumi K,
Matsumura A. 'Development of Boron
Nano-Capsules for Neutron Capture
Therapy (invited lecture)'. The
particle 2008. Orlando, 2008. 5. 12
Orlando (USA)

[図書] (計2件)

- ① 松村 明、中井 啓、メジカルビュー
社、NS NOW 5グリオーマ その最新治
験 「ホウ素中性子捕捉療法」
2009, 125-29
- ② 松村 明、中井 啓「DIGITAL MEDICINE」
第7巻第6号 「ホウ素中性子捕捉療法
(BNCT)の現状とこれからの展開」2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 啓 (NAKAI KEI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：50436284

(2) 研究分担者

松村 明 (MATSUMURA AKIRA)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授
研究者番号：90241819

山本 哲哉 (YAMAMOTO TETSUYA)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：30375505