

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
土居 温	主査 教授 黒 岩 敏 彦
	副査 教授 鳴 海 善 文
	副査 教授 谷 川 允 彦
	副査 教授 林 秀 行
	副査 教授 島 原 政 司
主論文題名 Tumor-specific targeting of sodium borocaptate (BSH) to malignant glioma by transferrin-PEG liposomes: a modality for boron neutron capture therapy (硼素中性子捕捉療法における硼素化合物(BSH)包埋型トランスフェリン-PEGーリポソームの有用性)	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》</p> <p>悪性グリオーマは強い浸潤性発育のため、従来の手術、放射線療法、化学療法による集学的治療を行っても、その根治は期待しがたく治療上の何らかの <b>break-through</b> がなければ治療成績の向上は望めない。そこで我々は、悪性グリオーマの治療法として硼素中性子捕捉療法(BNCT)の研究を進めてきた。本治療法の骨子は、腫瘍細胞に <math>^{10}\text{B}</math> 化合物を取り込ませ、中性子照射により、飛程 <math>10\ \mu\text{m}</math> の高エネルギー <math>\alpha</math> 粒子を放出させて腫瘍細胞のみを選択的に破壊するという、いわば細胞生物学的な <b>targeting</b> にある。この治療法により、すでに数十例の悪性グリオーマの治療を行い良好な治療成績を示している。BNCT 自体は上述のようにすでに臨床応用されているが、いかにして <math>^{10}\text{B}</math> 化合物を腫瘍細胞に選択的に取り込ませることができるかの検討が続いている。今回我々は、boron delivery system (BDS)として sodium borocaptate (BSH)を包埋した transferrin (TF)修飾型の polyethylene glycol-liposome (TF-PEG-BSH) に着目し BNCT における効果について検討を行った。</p> <p>《対象および方法》</p> <p>1) <i>in vitro</i> での検討</p> <p>i) 細胞への <math>^{10}\text{B}</math> 取り込み実験および保持効果</p> <p>U87<math>\Delta</math>ヒトグリオーマ細胞を各々の BDS (単独 BSH, PEG-BSH, TF-PEG-BSH)で含有硼素濃度が <math>30\ \mu\text{g}\ ^{10}\text{B}/\text{ml}</math> になるように調節したメEDIUMで培養し、経時的(0.5, 2, 6, 12, 24 時間後)に PBS で洗浄後に trypsin にて回収し、inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) を用いて腫瘍の硼素濃度 (<math>\text{ng}/10^6\ \text{cells}</math>) を測定した。さらに保持効果を調べるために前述と同様に培養後 12 時間で硼素を含まないメEDIUMと交換し、同様の方法で経時的(メEDIUM交換後 1, 6, 12 時間)に腫瘍の硼素濃度を測定した。</p> <p>ii) 中性子照射実験</p> <p>1)- i)と同様に各々の BDS を用いて 24 時間培養した後に細胞を回収し、中性子を任意の時間(5, 10, 15, 30, 45 分間)照射後、colony-forming assay を用いて surviving fraction (SF)を検討した。</p> <p>iii) BSH の細胞内分布の検討</p> <p>Chamber slide 内で 1)- i)と同様に各々の BDS を含むメEDIUMで培養した細胞を抗 BSH モノク</p>	

ローナル抗体を使用して染色し、confocal laser scanning microscopy を用いて細胞内分布について検討した。

## 2) *in vivo* での検討

### i) 脳腫瘍モデルでの $^{10}\text{B}$ 取り込み実験

定位的フレーム (Model 900; David Kopf) を使用し、 $5 \times 10^5$  個の U87  $\Delta$  ヒトグリオーマ細胞をヌードマウスの右大脳基底核に移植した。移植 2 週間後に各々の BDS を  $35 \text{ mg } ^{10}\text{B}/\text{kg}$  で経静脈的に投与、経時的 (6, 24, 48, 72 時間後) に腫瘍、正常脳、血液を採取して ICP-AES を用いて硼素濃度を測定した。

### ii) 中性子照射実験

2) - i) と同様に各々の BDS を脳腫瘍モデルに経静脈的に投与して、単独 BSH 投与後 6 時間群、PEG-BSH 投与後 72 時間群、TF-PEG-BSH 投与後 72 時間群、および非照射コントロール群の 4 グループを準備した。これらに対して頭部のみ中性子を照射し、その後の抗腫瘍効果を Kaplan-Meier 曲線を作成して検討した。

統計学的解析は Mann-Whitney analysis で行い、平均値  $\pm$  標準偏差で示した。P 値 0.05 以下を有意とした。

## 《結果》

### 1) *in vitro* での検討

#### i) 細胞への取り込み実験および保持効果

各々の BDS による硼素濃度は 12 時間でプラトーに達した。TF-PEG-BSH 群の硼素濃度は PEG-BSH 群、単独 BSH 群と比較して有意に高かった。

PEG-BSH 群、単独 BSH 群における硼素保持効果はメディアウム交換後 1 時間で急速に低下した一方で、TF-PEG-BSH 群は 12 時間経過しても高い硼素濃度を示した。

#### ii) 中性子照射実験

TF-PEG-BSH 群が 10、15、30、45 分照射で他の群と比較して有意に腫瘍抑制効果を示した。

#### iii) BSH の細胞内分布の検討

コントロール群では全く認められず、単独 BSH 群はほとんど認められず、PEG-BSH 群ではいくつかの細胞内に BSH が確認された。一方で、TF-PEG-BSH 群では全ての細胞が細胞質だけでなく核に至るまで染色された。

### 2) *in vivo* での検討

#### i) 脳腫瘍モデルおよび取り込み実験

PEG-BSH 群と TF-PEG-BSH 群は投与後 6 時間で高い血中硼素濃度を示したが、その後 72 時間にかけて BNCT 可能なレベルまで低下した。対側正常脳の硼素濃度は全群において各時間低値を示した。PEG-BSH 群は投与後 6 時間で最高腫瘍内硼素濃度 ( $25.48 \pm 8.62 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示し、その後経時的に低下した。単独 BSH 群も同様に 6 時間で高く ( $9.31 \pm 1.85 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、その後低下した。一方 TF-PEG-BSH 群は、6 時間では単独 BSH 群と同程度の腫瘍内硼素濃度 ( $8.24 \pm 1.81 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) であったが、24 時間後に高い腫瘍内硼素濃度 ( $24.07 \pm 12.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示し、更には 72 時間後まで濃度を維持した。

上記の薬剤動態の結果、腫瘍と正常脳硼素濃度比 (T/N 比) において TF-PEG-BSH は 48 時間と 72 時間で他の 2 群と比較して有意に高い T/N 比 (48 時間:  $13.8 \pm 2.09$ , 72 時間:  $17.85 \pm 5.93$ ) を示した。

#### ii) 中性子照射実験

非照射群、単独 BSH 群、PEG-BSH 群間の生存曲線には有意差は認められなかった (中央生存値  $16.2 \pm 2.3$  日、 $17.2 \pm 3.6$  日、 $17 \pm 2.4$  日)。しかし、TF-PEG-BSH 群では他の 3 群と比較して有意な生存の延長が示された (中央生存値  $21.8 \pm 1.3$  日)。

## 《考察》

TF-PEG-liposome は受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。また、悪性腫瘍細胞には正常細胞よりも多くの TF 受容体が発現しているとされ、これによって腫瘍細胞内へ特異的に取り込まれる。また保持効果によって、*in vitro*のみならず *in vivo*においても正常細胞内での硼素濃度が十分低下するまで腫瘍細胞内硼素濃度が維持されることで高い T/N 比が実現されることが確認された。今回包埋した硼素化合物である BSH は非常に安定した正十二面体構造であるため、従来から BSH はリン脂質二重層である細胞の表面にほとんどが接合すると言われてきた。しかし *in vitro*の照射実験過程において洗浄により細胞表面に接合した硼素化合物を取り除いても同様の結果であったことから、少なくとも TF-PEG-BSH は多くの  $^{10}\text{B}$  を腫瘍細胞内へ取り込ませることが示唆された。これらの結果から、TF-PEG-BSH の radiation biological effect (RBE)は通常の単独 BSHと比較して高いと考えられた。そして *in vivo*での照射実験においても TF-PEG-BSH を用いた BNCT では高い生存率が示された。

現在まで悪性グリオーマの治療には手術、従来の放射線療法、および化学療法が行われているが、十分な結果が得られていない。昨今テモゾロマイドを用いた新たな臨床報告があったが、その効果は微々たるものである。BNCT は従来にない異なる角度からのアプローチであり、全てに組み合わせることが可能な治療法である。そのため悪性グリオーマの補助療法として、BNCT の更なる発展が期待される。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	土 居 温
論文審査担当者		主 査 教 授 黒 岩 敏 彦	
		副 査 教 授 鳴 海 善 文	
		副 査 教 授 谷 川 允 彦	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 島 原 政 司	
主論文題名			
<p>Tumor-specific targeting of sodium borocaptate (BSH) to malignant glioma by transferrin-PEG liposomes: a modality for boron neutron capture therapy  (硼素中性子捕捉療法における硼素化合物(BSH)包埋型トランスフェリン-PEG-リポソームの有用性)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>悪性神経膠腫の治療法の一つに硼素中性子捕捉療法(BNCT)がある。本治療法の骨子は腫瘍細胞に取り込まれた<sup>10</sup>B化合物に中性子を照射し、放出された飛程10 μmのα粒子により腫瘍細胞のみを選択的に破壊するというものである。BNCTの成否は、いかにして<sup>10</sup>B化合物を腫瘍細胞に選択的に取り込ませられるかという点にかかっている。現在使用可能な硼素化合物としては、腫瘍組織内集積機序の異なる2種類の化合物 sodium borocaptate (BSH)、boronophenylalanine (BPA)がある。これまでに申請者らはこれら2剤の併用療法について研究し、臨床応用を行って良好な結果を得ており、現在では悪性神経膠腫の有用な治療として認知されるに至っている。今回申請者らはより効果的なBNCTを実現させるべくトランスフェリン-polyethylene glycol (PEG)-リポソームに着目し、基礎実験として <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での取り込み実験を行い、腫瘍への硼素のより選択的かつ高い集積を立証している。また実際に <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での照射実験によって高い腫瘍抑制効果があることを確認している。さらに細胞内分布を調べることによって、トランスフェリン-PEG-リポソームが多くの硼素化合物を細胞内へ取り込ませることでより高いBNCT効果を実現していることを立証している。尚、特筆すべきはトランスフェリン-PEG-リポソームが既に drug delivery system として広く臨床応用が為されており、本研究が早期の臨床応用へ直結していることである。本研究結果は今後のBNCTの方向性を示すものであり、臨床的にも極めて重要な意味を有するものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第11条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
Journal of neuro-oncology 87(3): 287-294, 2008			