

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
黒田雄三	主査 教授 黒岩 敏彦 副査 教授 竹中 洋 副査 教授 島原 政司 副査 教授 鳴海 善文 副査 教授 林 秀行
主論文題名 トランスフェリン標的リポソームを用いたラット C6 グリオーマに対する細胞選択的ホウ素集積に関する実験的検討 (Usefulness of liposome-targeting transferrin as a boron delivery agent in boron neutron capture therapy for C6 glioma)	
学位論文内容の要旨	
《研究の背景および目的》 悪性グリオーマに対しては手術、放射線治療、化学療法、免疫化学療法等が一般的な治療として行なわれているが、治療成績の向上を目的に、新たな局所治療の方法が必要とされている。ホウ素中性子捕捉療法(boron neutron capture therapy、以下 BNCT と略す)は、腫瘍細胞を選択的に標的とする粒子線治療であり、これまでもさまざまな悪性腫瘍の制御を目的に臨床応用されてきた。BNCT の抗腫瘍細胞効果は、ホウ素の同位体であるホウ素原子 ^{10}B (Boron-10) と中性子 ^1_0n の反応により、高エネルギーで、細胞1個分の大きさに相当する短距離の飛程を有する α 粒子(ヘリウム原子 He)とリチウム(Li)反跳核が発生することにより生じ、この He(α)と Li が高い殺細胞効果を有することを応用したものである。腫瘍細胞に特異的にホウ素原子を集積させることにより、高い細胞選択性を確保し、周囲の正常細胞への影響を少なくすることができる。腫瘍細胞への高い集積性を有し、高分子で多量のホウ素化合物を運搬でき、生体由来の脂質から構成されるため毒性が低く生体への安全性が高いことなどを考慮し、リポソームが適切な手段であると考えた。リポソームの利用により薬物を分解酵素などから保護しながら運搬できるが、肝臓や脾臓を中心とする細網内皮組織(Reticuloendothelial system、以下 RES と略す)に捕捉されるため、リポソーム表面をさらにポリエチレングリコール(polyethylene glycol、以下 PEG と略す)で修飾した PEG 修飾リポソーム(PEG-liposome)を用い、BSH(Sodium mercaptoundecahydrododecaborate, $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ 、以下 BSH と略す)を包埋した PEG-liposome(BSH)を作製した。またトランスフェリン(transferrin、以下 TF と略す)レセプターは細胞の成長に関連しており、腫瘍細胞に高発現していることが分かっている。ホウ素取り込みの腫瘍細胞への選択性を高めるために、TF-PEG-liposome(BSH)を作製した。この TF レセプターを介した、鉄を細胞内に運ぶという生理学的な能動輸送経路である TF receptor-mediated endocytosis によりホウ素化合物が腫瘍細胞内に取り込まれる。トランスフェリン標的リポソームを用いたホウ素の細胞集積について <i>in vitro</i> で統計学的方法にて検討した。 《材料と方法》 (1) ホウ素化合物に曝露後の細胞内ホウ素取り込み量の経時的変化の検討	

C6 グリオーマ細胞に対し、3 種のホウ素化合物 (BSH, PEG-liposome(BSH), TF-PEG-liposome(BSH))を曝露し、曝露時間の違いによる取り込み量の変化を測定した。0 (未投与)、0.33(20 分)および 1、7、14、24 時間後に細胞を回収し、ホウ素原子の細胞内への取り込み量を ICP 発光分析法を用いて測定した。

(2) ホウ素化合物の細胞内滞留性の検討

50 $\mu\text{g/ml}$ の BSH 群、PEG 群、TF 群の、3種類のホウ素化合物溶液を用い、それら各溶液を、C6 グリオーマ細胞を培養したディッシュ上に投与して 14 時間曝露した後、ホウ素を含まない通常のメディアウムに変更した。その後 1、12、30 時間後に細胞を回収し、ホウ素濃度を測定した。

(3) トランスフェリンレセプターの阻害が細胞内ホウ素濃度変化に及ぼす影響の検討

あらかじめ培養細胞に free TF 50 μg を加えておいた後、TF-PEG-liposome(BSH)を加えた fTF+TF 群と、free TFを加えなかった TF 群の 2 群を比べた。C6 グリオーマ細胞を培養したディッシュ上にホウ素化合物 TF-PEG-liposome(BSH)を投与して 7 時間後または 24 時間後に細胞を回収しホウ素濃度を測定した。

《結 果》

(1)ホウ素化合物に曝露後の細胞内ホウ素取り込み量の経時的変化

PEG 群では、24 時間後に 26.3 \pm 1.0 ng/10⁶cellと BSH 群の 18.7 \pm 0.2 ng/10⁶cell に対して約 1.4 倍の腫瘍細胞へのホウ素の取り込みを認めた。TF-PEG 群では、24 時間後には BSH 群の約 3 倍の 110.5 \pm 2.5ng/10⁶cell とさらに多量のホウ素が細胞内に取り込まれていた。TF-PEG 群では、1 時間後にはすでに 45ng/10⁶cell を超えるホウ素濃度に達していたが、PEG 群では、同濃度に達するのに少なくとも 14 時間を要した。

(2)ホウ素化合物の細胞内滞留性

TF-PEG 群では、細胞内に取り込まれたホウ素濃度の単位時間あたりの減少が少なく、1 時間後でも 84.4 \pm 1.7ng/10⁶cell と高い濃度を維持しており、さらにこの傾向は長時間持続することがわかった。TF-PEG 群では、30 時間経過後にも 69.4 \pm 2.6ng/10⁶cell と高濃度を維持できた。

(3) トランスフェリンレセプターの阻害が細胞内ホウ素濃度変化に及ぼす影響

fTF+TF 群は 7 時間後で 53.7 \pm 1.0ng/10⁶cells となったが、TF 群は 62.8 \pm 2.4ng/10⁶cells であり、ホウ素濃度に有意な差を示した ($p<0.05$)。さらに 24 時間後では、両群はより明確な差を示した ($p<0.05$)。fTF の投与により TF-PEG-liposome(BSH)投与によるホウ素原子の細胞内への取り込みが阻害された。

《考 察》

BNCT による悪性腫瘍治療の成功のためには、腫瘍細胞に高濃度のホウ素化合物が存在していることが求められる。今回の検討から、より腫瘍細胞への選択性を高めた TF-PEG-liposome(BSH)により、短時間で目標濃度への到達が可能となった。また滞留性においても TF-PEG-liposome(BSH)を投与した場合において、多量の BSH が細胞内に集積し、正常細胞との濃度のコントラストを維持している結果を示した。TF-PEG-liposome(BSH)による腫瘍細胞への選択性とそのホウ素濃度差の維持により、効率的な BNCT 治療の可能性を示した。リポソームの Drug delivery system キャリアーとしての安定性、グリオーマ細胞表面での TFレセプターを介したホウ素 ¹⁰B の取り込みまでの体系的な経路は非常に安定したものであり、グリオーマの治療方法として発展するものと考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	黒田雄三
論文審査担当者		主 査 教 授	黒 岩 敏 彦
		副 査 教 授	竹 中 洋
		副 査 教 授	島 原 政 司
		副 査 教 授	鳴 海 善 文
		副 査 教 授	林 秀 行
<p>主論文題名 トランスフェリン標的リポソームを用いたラット C6 グリオーマに対する細胞選択的ホウ素集積に関する実験的検討 (Usefulness of liposome-targeting transferrin as a boron delivery agent in boron neutron capture therapy for C6 glioma)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究は、悪性グリオーマに対する治療成績の向上を目的に、ホウ素中性子捕捉療法におけるホウ素化合物の臨床応用の可能性について論じたものである。毒性が低く生体への安全性が高いことなどを考慮して、生体由来の脂質から構成されるリポソームでホウ素を包埋した化合物を作成し、細網内皮系への取り込みの回避を目的としてポリエチレングリコールで修飾したリポソーム化合物を用いている。また申請者は、さらに細胞への標的性の向上を目的としてトランスフェリンを修飾した物質についても検討を行っている。腫瘍細胞表面に多く発現するトランスフェリンレセプターへのターゲティングを実現することで、周囲の正常細胞とくらべて高いホウ素濃度を迅速に適切な濃度まで上昇させることが可能になり、また長時間維持することが出来、正常細胞との濃度のコントラストを維持している結果を示した。これは放射線局所療法において、腫瘍細胞への効果を高めるだけでなく、周囲脳に対してもより低侵襲的に治療を実施するために必要なことであり、この実験結果により今後の臨床応用の可能性があることを示している。今回の研究結果は、未だ生存率の低い悪性グリオーマにおける新しい放射線治療法であると言え、今後の新たな展開が期待できる。正常な細胞には悪影響を与えずに、腫瘍細胞だけにダメージを与えることができるという、新しい視点をも提供している。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項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> <p>(主論文公表誌) 大阪医科大学雑誌 67(1):16-26,2008</p>			