

# ホウ素含有 Lipo-peptide を用いた新規ホウ素送達システムの開発

筑波大学大学院医学研究科  
中 井 啓

## 1. 研究目的および背景

ホウ素中性子補足療法 (BNCT) は熱中性子や熱外中性子の照射を中性子反応断面積の大きい非放射性同位体  $^{10}\text{B}$  と組み合わせることによって、細胞・組織のホウ素濃度に比例した線量を与えることが可能な腫瘍選択的放射線療法である。研究段階ではあるものの、臨床研究として、開発の経緯となった悪性黒色腫、悪性脳腫瘍から徐々にその適応を拡大し、頭頸部、体幹の悪性疾患にまで対象を広げつつある。

この治療法の主たる作用原理は、中性子が衝突した  $^{10}\text{B}$  が  $^4\text{He}$  ( $\alpha$  線) と  $^7\text{Li}$  粒子を生じ、 $\alpha$  線が近傍の DNA に直接作用により損傷を与え、結果として細胞死を引き起こすとされている。この飛程は短く、細胞 1 個以内 ( $10\mu$  以下) であるため、ホウ素を含む細胞のごく近傍のみがその影響を受ける。腫瘍にホウ素が多く含まれ、正常部分のホウ素濃度が低い環境を実現できれば、理論上、腫瘍選択的な治療が可能となる。したがって治療効果の高い BNCT を実現するには、ホウ素薬剤の高い腫瘍選択性が必須である。

効果的治療のために必要なホウ素濃度は組織 g あたり 20–30 $\mu\text{g}$  であるとされている。しかし現在用いられているホウ素化合物 2 種類、Boronophenylalanine および Borocaptate Sodium では、安全性こそ確認されているものの、満足すべき腫瘍選択性は得られていない。40 年余にわたって、BNCT に適したホウ素化合物の探索が行われてきているが、現在まで低毒性、水溶性、正常組織での低分布等、これらすべてを満たす理想的な薬剤は開発されていない。

われわれは他の悪性腫瘍でも応用され始めている選択性の高い DDS 技術を用いたホウ素送達システムの開発に可能性を見出した。本研究においては、DDS デバイスのひとつ、脂質 2 重膜の小胞であるリポソームを用い、さらにペプチド表面修飾により、腫瘍細胞内ホウ素濃度および腫瘍/血液比の向上を図ることとした。これまでにペプチド表面修飾およびリポソーム構成には成功しており、これらの生体応用への検討を行うこととした。

## 2. 方法

### 1. リポソームへの新規 Lipopeptide の修飾

B5-TAT-lipopeptide5% を DSPC 45% ,cholesterol 45%, DSPE-PEG 5% で混合し、脂質白膜法で作製した Liposome をサイズ排除クロマトグラフィーにより、Liposome 画分、micelle 画分、単分子画分に分離し Lipopeptide の含量を定量した。

蛍光分光光度計により Lipopeptide の指標である Trp を測定した。

### 2. B5-TAT-Liposome の in vivo 実験

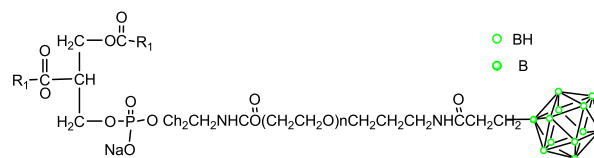
CT26 マウス大腸癌細胞株 ( $5 \times 10^6$  cells) を 100 $\mu\text{L}$  をマウス(Bala/c mice)腹部に皮下注し、モデルマウスとし

た。リポソームを脂質濃度 100 mmol/L に PBS を用いて調製し、リポソーム 100 $\mu$ mL を尾静注により添加後、2,24,48 時間ののちに解剖し、各種臓器を採取した。測定には ICP-AES を用いて行った。臓器に灰化用チューブに移し、濃硝酸 0.8mL 加えて、115 $^{\circ}$ C 2hr 加熱分解した。脱イオン水 0.8mL を加え、非水系フィルターでろ過し、サンプルとした。ICP-AES によりサンプルのホウ素イオン濃度を測定し、ペプチド修飾リポソームの細胞導入効率の検討を行なった。また、ホウ素標準液を、10%硝酸で希釈し、0、0.01、0.1、1、10ppm の標準液を各 50mL 作り、検量線の作成を行なった。

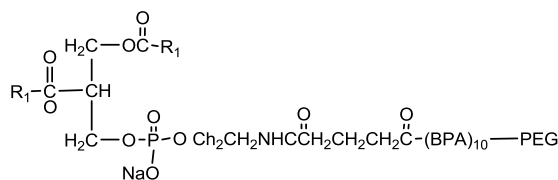
### 3. 新規ホウ素化合物の合成

新規合成分子を用いる DDS 薬剤を開発することによって、ホウ素濃度の向上を目指した。癌組織は正常組織と異なり、血管透過性が亢進しており、これを利用して、サイズを 100nm 前後に調整することで腫瘍血管からは漏出し、腫瘍へと集積する。(Liposome の EPR 効果)。このメカニズムを利用して、血中滞留性をあげることで、腫瘍内ホウ素濃度を向上させる目的でリポソームに修飾可能な新規分子の開発を Fmoc 固相合成法により合成し、行った。

#### a.DSPE-PEG-BSH

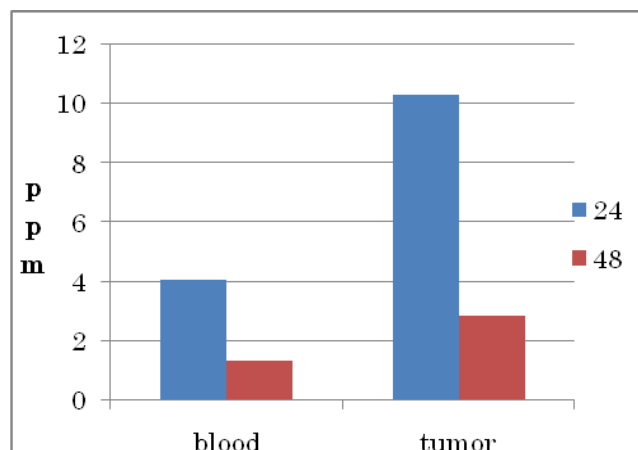


#### b.DSPE-B10-PEG



## 3. 結果と考察

### 1. B5-TAT-Liposome の in vivo 実験



右 (青) 24時間後、左 (赤) 48時間後の血液・腫瘍内ホウ素濃度

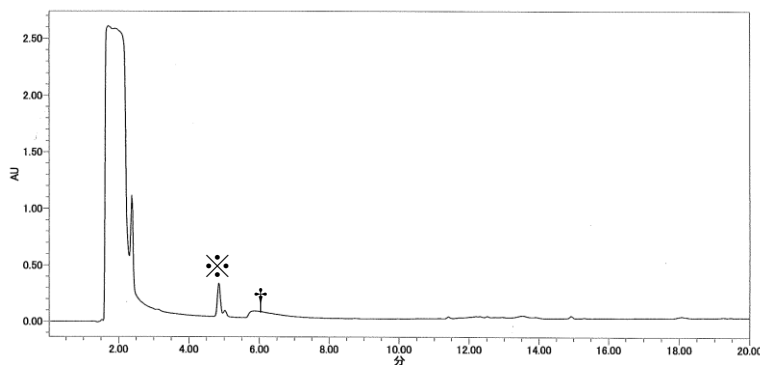
24 時間後に T/B 比は約 2.5 となったが、腫瘍集積濃度は 10ppm 程度と治療可能域に至らなかった。48 時間後にはさらに濃度は低下し、細胞実験で認められた選択的ホウ素濃度上昇が持続しない結果であった。粒子が培地でなく、血液中に投与された場合の安定性、および血管内での安定性ないしは他臓器でのトラップなどが考えられる。結果として EPR 効果が不十分であると考えられ、安定して腫瘍血管から漏出するサイズおよび脂質組成をさらに検討する必要がある。

## 2. 新規ホウ素化合物の合成

### a. DSPE-PEG-BSH の合成

クルードの HPLC 上にて 5 分に検出されたピーク (※) は、MS にて 1000 以下の分子量のみで 3000 付近にピークが全くなかったため、目的物でないと判断した。

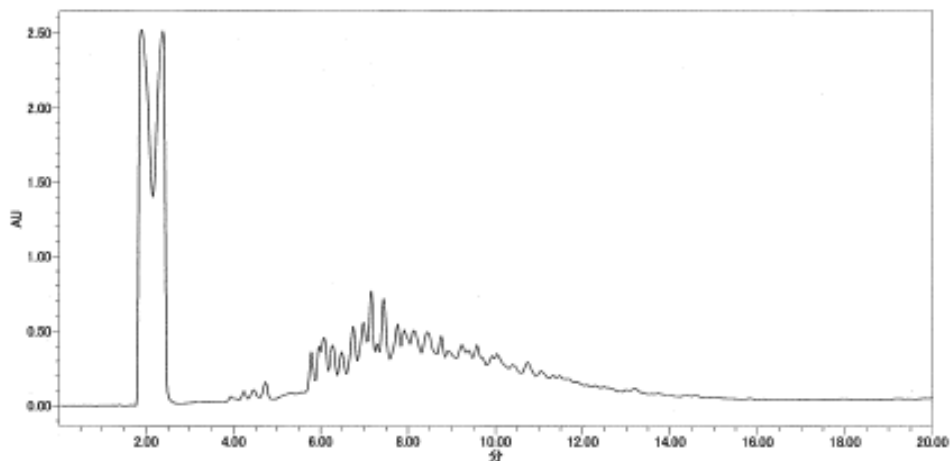
6 分付近のあるブロードのピーク (†) は、原料(DSPE のみ)のピークがその付近に全く検出されないため、おそらくこのピークが目的物ではないかと考えられる。しかし親水性が強いためにシャープなピークが得られにくかったのだと推察される。

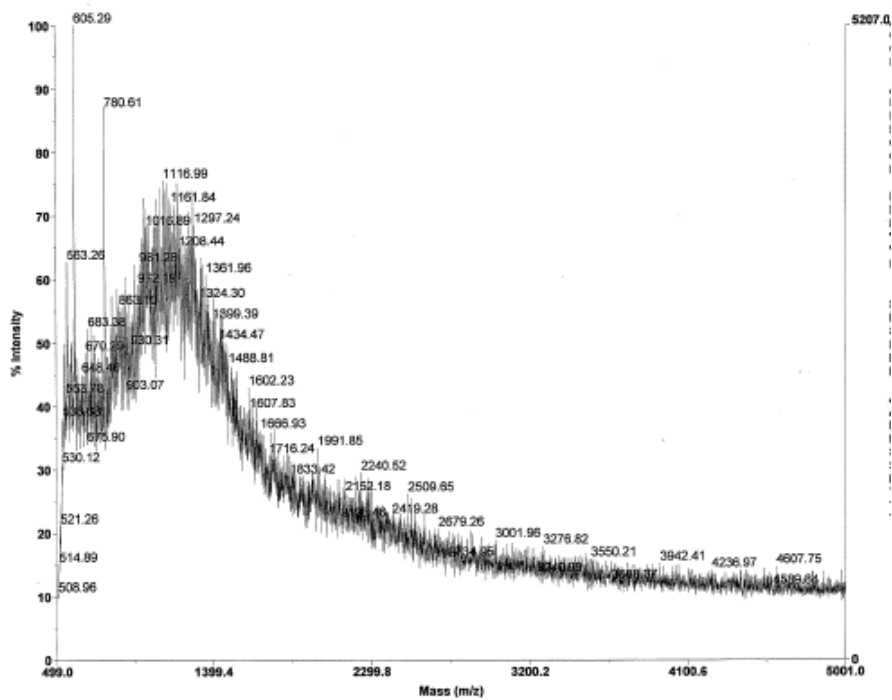


### b. DSPE-B10-PEG の合成

ブロードなピークで、かなり多くのピークの集合体となっている。

BPA の縮合効率が悪い可能性があり縮合剤の検討がこれから必要であると考えている。





これら新規ホウ素分子の合成については、手法および収率向上のために検討が必要である。また今回は検討に至らなかったが各種 imaging 技術を用いた生体内分布測定なども検討に値すると思われる。

#### 4. まとめ

今回の検討においては、

1. ホウ素含有 **Lipopeptide** を用いたリポソームによる腫瘍選択的ホウ素分布は粒子の安定性、血流滞留性の向上を軸にさらなる検討を行う必要がある。
2. BPA をペプチドとして構成分子を合成する手法についても最適化が必要である。
3. 有用な化合物のスクリーニング手法についても imaging 技術などをさらに検討してゆく必要があろう。