平成２５年度　特別経費(プロジェクト分)　概算要求事業　学内公募報告書

（様式２）

「分子イメージング・マイクロドーズ（第０相）臨床試験体制を擁する分子標的治療研究・教育拠点の構築」事業

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 研究者名簿（大学院生をなるべく含むこと） | | 役職 | | 役割 | | PET・RIの  利用 | | 本報告書のホームページでの開示の可否 |
| 研究組織 | 道上宏之（助教）  井口佳哉（大学院生）  赤田しおり（大学院生） | | 助教  大学院生  大学院生 | | 薬剤開発・薬物ﾃﾞｻﾞｲﾝ  有機合成・試薬作製  モデル作製・薬剤投与 | | ＲＩ  ・無 | ＰＥＴ  ・無 | ・否 |
| 区分 | １．機器開発，．がん，３．炎症・再生，４．脳機能，５．その他 | | 登録(該当区分に○) | | ．分子イメージングコース  ２．それ以外の分野 | | 主任教授氏名・印 | | 松井　秀樹　　印 |
| 区分  (該当区分に○) | Phase 0：　実現可能かどうかの提案，イメージング実験が可能かの研究相談，基礎的アプローチ．  Phase I：　Phaseゼロの具体性が出たイメージング準備研究．研究期間：1年～2年．PET使用含まず．  Phase II：　Phase Iを終え、成果の出始めた実現性の高いもの．PETなどの専門家の共同研究体制が確立している．研究期間：1年～2年．PET/SPECTの使用1～2回程度．  Phase III：Phase IIレベルを終え，具体的な合成行程を含めて完成度が高く，本格的研究に入っているもの．研究期間：1年～3年　PET/SPECT使用3回以上． | | | | | | | | |
| プロジェクト名 | DOTA結合ホウ素ペプチドを用いた悪性脳腫瘍に対するホウ素導入効果のPETを用いた検討 | | | | | | | | |
| 利用予定の核種と動物(該当区分に○) | 動物 | .マウス  2.ラット  3.ラビット | | 核種 | | 8F-FDG，18F合成有，11C合成有，64Cu合成有，68Ga合成有，  89Zr合成有，SPECT核種既製品，SPECT核種合成有 | | | |
| 研究計画 | 科研図4**ホウ素中性子捕捉療法（BNCT；図1）**は、**ホウ素同位体10B**をがん細胞へ集積させた後に中性子を照射し、細胞内での10B の核分裂反応により10B を取込んだがん細胞のみを殺傷する。**細胞レベルで「がん細胞選択的」に治療が行える次世代治療法**としての難治性がんへの応用が期待される。本研究で対象とする**悪性脳腫瘍（膠芽腫）**には有効な治療法が無く、BNCT臨床研究が継続している。中性子源確保の困難さがBNCTの普及を妨げていたが、近年病院設置可能な加速器中性子発生装置が開発され、実用化に向け前進している。しかし、BNCTの両輪であるホウ素製剤の開発は遅々として進まない。現在、BPAとBSHの 2種類のホウ素製剤（図2）が臨床研究で用いられている。BPAはアミノ酸代謝の高いがん細胞に取り込まれるが、正常細胞にも取り込まれてしまう。一方、BSHは脳腫瘍BNCTでのみBPAと併用されるが、細胞内取り込みが無いため治療効果が低い。現在までに我々は、BSHを内部に封入した腫瘍特異的な抗原に対する抗体を結合させたリポソーム（**イムノリポソーム**）とBSHに細胞膜通過ペプチド修飾した**細胞膜透過型ホウ素ペプチド**（道上ら、特願2011-230059）の、新規ホウ素製剤を開発に成功し、日本のホウ素製剤開発をリードしている。現在、腫瘍特異的に腫瘍内部に高集積するホウ素製剤が実験レベルで成功している中、既存のホウ素製剤を含め、PETなどのマイクロドーズでの薬物動態評価システムが無いため、実用化に至っていない。  **図１**  　本研究では**脳腫瘍に対して、BSH-(Arg)n peptideを作成し、体内での分布をみるために核種を掲載するためのDOTAを結合したホウ素ペプチド製剤の開発を目標とする（図３）。**開発した**腫瘍特異的・腫瘍高集積のホウ素製剤**の動態を評価するため、**BSHのPETプローブを作製**する。このホウ素プローブを用い、**BNCTホウ素製剤の生体内動態を、細胞レベルから動物疾患モデル、そして人で使用可能な様々なレベルで評価するPETイメージングを中心とした薬物評価システムを開発**する。また、今後、現在臨床研究で、放射線アイソトープによりラベルされたホウ素プロ―べを投与したいと思われる。**厚労省のマイクロドーズ薬剤に関する臨床指針の中で、通常容量の1/100以下の使用量となる臨床試験においては、安全性が認められる薬剤に関しては積極的に行えるため、今後臨床試験へ向けた取り組みを行い、**システムの確立を目指す。 | | | | | | | | |
| 得られた  成果 | スライド1.JPGアミノ酸のアルギニン(Arg)を連続配列したポリアルギニンドメインは、**細胞膜通過ペプチド**と呼ばれ、様々な生理活性物質と結合し、*in vitro* & *in vivo*にて細胞内へと導入可能である。今回我々は、**細胞膜通過ペプチドの最小単位である3個のアルギニンにホウ素製剤BSHを結合させ、さらにPET用金属核種を結合可能なDOTAを結合した、BSH-(Arg)3-DOTA及び BSH-DOTAを作製した。 BSH-(Arg)3や BSH-(Arg)2**は、細胞レベルですべての悪性脳腫瘍細胞に導入されていることを確認した。また時間経過に伴い、細胞内ホウ素濃度が上昇することを誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES)にて確認した。さらに、マウス脳腫瘍モデルに対して、**マウス尾静脈より BSH-(Arg)3・ BSH-(Arg)2・BSHを投与したところ、 BSH-(Arg)3は腫瘍内部へ導入され、腫瘍細胞内部にまで局在していることを免疫染色**にて確認した（図４）。我々の先行研究では、ホウ素が細胞外膜に存在する時と核膜内に存在する場合では、腫瘍の細胞殺傷効果に60～100倍程度の強い細胞殺傷効果を示すことを報告した（Michiue H. et al., Biomaterials. 2014 Mar;35(10):3396-405）。本実験に関する動物の飼育、保管、使用は岡山大学動物実験委員会に承認された (承認番号: OKU-2013314) 手順に従い行った。サイクロトロン、PET装置等の使用はおかやまメディカルイノベーションセンター (OMIC) 分子イメージング部門等利用要項に基づき、承認された (承認番号: OM25-20) 手順に従い行った。また、RIの使用は岡山大学自然生命科学研究センター光・放射線情報解析部門鹿田施設放射線障害予防規程に基づき、承認された (許可承認番号: 25056) 手順に従い行った。小型サイクロトロン (CYPRIS-HM12, 住友重機械工業, 東京) を用いた64Cuの製造および精製にはOMICの設備を利用した。精製後の64CuとBSH-(Arg)3-DOTA およびBSH-DOTAを40 ℃の0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 5.5) 中で30分間反応した。目的の64Cu標識BSH-ペプチドはHPLCで精製した（図５）。  C:\Users\H Michiue\Desktop\2013 OMIC PET\OMIC 報告書\スライド3.JPGスライド2.JPG　担がんモデルマウスに64Cu標識BSH-ペプチド投与後、6, 12, 24時間での薬物動態を小動物用PETカメラ装置 (Clairvivo, 島津製作所, 京都) で撮像した（図６）。 BSH-(Arg)3-DOTAは、腫瘍のある右前頭・頭頂葉に投与後6時間より強く局在していることが確認された。さらに24時間経過しても、腫瘍部に一致した局在が見られた。一方、 BSH-DOTAは、投与後よりわずかにEPR効果にて確認される薬剤が見られるが、明らかなものではなかった。また、投与後、6, 24時間で腫瘍、正常脳、血液、肝臓、腎臓を摘出し、各組織に含まれる放射能濃度をガンマカウンタで測定した。BSH-(Arg)3-DOTA 、BSH-DOTAの双方とも腫瘍の濃度は他の組織と比較して高く、投与後24時間でそれぞれ3.74±2.75、2.92±1.13 %ID/g tissue (n=4) であった 。また、BSH-3R-DOTAの正常脳および血液の濃度は低く、それぞれ、0.46±0.14、1.93±0.43 %ID/g tissue (n=4) であり、 BSH-(Arg)3-DOTA のT/N：8.1、T/B：2.0であった。本研究は、新規ホウ素製剤臨床応用のためのマイクロドーズ臨床研究へ向けた取り組みであったが、T/Nの非常に高い、理想的な製剤開発へ向けての取り組みが出来たと思われる。 | | | | | | | | |
| 本プロジェクトに関連した研究業績，知財，受賞等 | **論文・研究発表**  岡山大学大学院医歯薬学総合研究科医歯科学専攻修士発表会にて井口佳哉により発表（2014/2/3）  **知財**  細胞膜透過型ホウ素ペプチド（道上ら、特願2011-230059）に加えて、新しい核種として申請できるか、知財本部と特許事務所と現在協議中。 | | | | | | | | |
| 研究費の使途 | 消耗品  　Fmoc-NH-SAL-PEG Resin　　　　\141,750.  　Fmoc-L-Lys-mono-amide-DOTA tris \188,475.  　One-shot Top10 Chemically competent E　\45,775.  その他  　OMIC施設使用料　12月分　\319,800.  　　　　　　　　　 1月分　\304,200.　　　　　　　　　　　　　　　　　合計　\ 1,000,000 | | | | | | | | |