

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18451

研究課題名(和文) スーパーアパタイトを用いた新規光線力学療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel photodynamic therapy using super carbonate apatite

研究代表者

玉井 皓己 (TAMAI, Koki)

大阪大学・医学系研究科・招へい研究員

研究者番号：60724250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：まずスーパーアパタイト(sCA)にICGを効率的に装填できることを示した(sCA-ICG)。次に大腸癌細胞株を用いた検討により、sCA-ICGはICG単独よりも効率的に細胞内に取り込まれ、光線(近赤外線)照射によって強い抗腫瘍効果を示す事が明らかとなった。大腸癌担癌マウスを用いた近赤外線照射による治療実験では、1回照射のみで強い抗腫瘍効果をもたらした。一方、正常臓器では24時間程度でICGはwashoutされ、毒性障害もみられなかった。本研究の結果、sCA-ICGを用いた光線力学療法は高齢者社会にマッチした低侵襲な癌治療となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Minimally invasive treatment is getting more and more important in an aging society. In this study, we showed that ICG could be efficiently loaded on super carbonate apatite (sCA). Using colon cancer cells, ICG uptake and anti-tumor effect were examined between the treatments of ICG alone and sCA-ICG. Uptake and anti-tumor effect of ICG in the tumor cells significantly increased in sCA-ICG compared with ICG alone in vitro and in vivo. The HT29 tumors treated with sCA-ICG followed by irradiation of near infrared ray exhibited drastic tumor growth retardation, whereas irradiation of tumors after injection of ICG did not inhibit tumor growth. In addition, sCA-ICG quickly disappeared and did not cause hepatotoxicity or other severe adverse events in mice. This study shows that sCA is a useful vehicle for ICG-based PDT.

研究分野：消化器外科学

キーワード：光線力学療法 ドラッグデリバリーシステム ICG

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 光線力学療法は、腫瘍親和性のある光感受性物質に特定波長の光線を照射することで、活性酸素や発熱を惹起し腫瘍細胞を選択的に破壊する治療である。正常組織へのダメージは少ないため、手術のできない高齢者などに対して有望な癌局所治療として期待されている。2015年4月には米国立衛生研究所の小林らが開発した新規光感受性物質である IR700 が開発から4年という異例の早さで FDA によって承認され (Mitsunaga M et al. Nat Med, 2011)、本邦では同6月に食道癌に対する化学放射線療法後の局所再発例に対し、タラポルフィンナトリウムによる光線力学療法が薬事承認を通過するなど、注目を浴びている分野である。様々な光感受性物質が開発される中、既に臨床で使用され安全性が確認されている ICG の光感受性物質としての役割が見直されるようになった。ICG は血中半減期が非常に短いため、治療剤としての臨床応用は困難とされてきたが、近年の drug delivery system (DDS) の進歩により、腫瘍イメージングや光線力学療法への可能性が期待されている。

(2) ICG は従来の光感受性物質と異なり、半減期が短いため治療後の遮光が不要であり、近赤外光を励起波長にもつため、深部治療が可能である。ICG を腫瘍に集積させるためにはリポソーム等の DDS が必要であるが、それは同時に正常臓器への ICG の停留も引き起こす。一方、スーパー炭酸アパタイト (sCA) は早期に腫瘍に入り、正常臓器からの washout は 24 時間程度と比較的短時間である。これまでに sCA に ICG を搭載して近赤外線により抗腫瘍効果をみた報告はなく、腫瘍組織への ICG の集積と正常組織からの早い washout を期待して本研究課題を申請した。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) sCA を ICG 担体とした時 (ICG 搭載 sCA) の粒子物性と、細胞内取り込みがどこまで上昇するか、in vivo における効率的な投与方法 (臓器分布、腫瘍集積等評価) と治療効果について。(2) sCA と ICG を別ルートで投与方法の場合の治療効果について検討する。(3) 既存の ICG-liposome との比較を行う。以上の検討を行うことで、副作用の少ない光線力学療法の開発に取り組む。

## 3. 研究の方法

sCA と ICG を様々な投与方法で in vitro, in vivo の両面から検討する。細胞株として大腸癌細胞株 HT29 と HCT116 を用いた。

### (1) In vitro

#### ① 細胞毒性の検討

ICG 単独、ICG 内包 sCA について細胞毒性の有無を検討する。Cell count や MTT assay による算出を行う。

#### ② 細胞への ICG 取り込みの検討

ICG 単独、ICG 内包 sCA について投与後 1, 3, 6 時間後に flow cytometry で細胞の取り込みを検討する。(例えば ICG 投与濃度は 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml)。また、蛍光顕微鏡でも確認する。

#### ③ 光線照射による細胞傷害性の検討

ICG 単独、ICG 内包 sCA について最も細胞取り込みに差が出た投与濃度と時間における光線照射の効果を検討する。評価は Cell count や MTT assay による算出を行う。

### (2) In vivo

大腸癌細胞株を免疫不全マウスに移植し、皮下腫瘍を作成する。

#### ① 臓器分布の検討

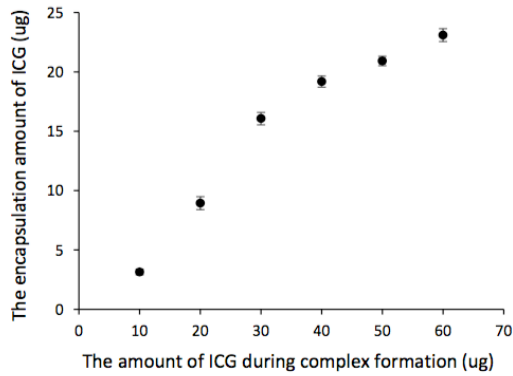
ICG 単独 (尾静脈注射: 尾注)、ICG 搭載 sCA (尾注)、sCA (尾注) と ICG (腹腔内投与) の臓器分布を評価する。ICG 量は過去の論文で用いられた量を参考に、20 $\mu$ g/匹~100 $\mu$ g/匹で検討。IVIS で腫瘍への ICG 集積を評価するとともに、12 時間、24 時間に腫瘍と正常組織 (肝、脾、腎、心、肺、脳) を摘出し、IVIS で測定する。また、蛍光顕微鏡でも腫瘍と正常組織内における ICG 分布を評価する。

#### ② 治療効果の検討

①での腫瘍と正常組織における ICG 取り込みを参考に、腫瘍/正常組織比が最も高い投与方法と時間における光線力学療法を行う。腫瘍径 150~200mm<sup>3</sup> 時点で光線照射を行い、2 日毎の腫瘍径の計測と体重を記録する。約 2 週間フォローし、最終的には腫瘍を取り出し、質量を計測する。光線照射については、800nm 前後の光線を 1W/cm<sup>2</sup> x 5 分を中心を設定する。ICG-liposome を用い、腫瘍/正常組織比が最も高い時間における照射効果を sCA を用いた ICG 光線力学療法の抗腫瘍効果と比較する。DDS への ICG 単独搭載では抗腫瘍効果が不十分のため、光感受性物質である金ナノコロイドや抗癌剤との併用効果についても検討する。

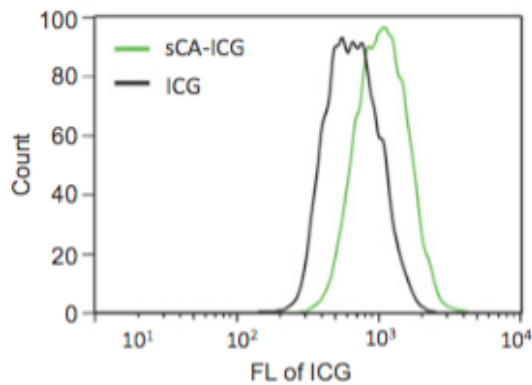
## 4. 研究成果

(1) まず super carbonate apatite (sCA) にインドシアニングリーン (ICG) が搭載可能であるかどうかについて検討を行った。その結果、ICG は効率的に sCA に搭載できることがわかった (sCA-ICG)。sCA 作製時に ICG を 40 $\mu$ g 加えた場合搭載された ICG は 19.2g (48.0%) であった (図 1)。また、sCA-ICG の吸収極大波長は ICG と同じ 778nm であった。更に、光照射による温度上昇、ROS 発生についても検討を行ったところ、共に ICG 単独と比し、sCA-ICG で有意に高いことが分かった。



(図 1) sCA-ICG 作製時の ICG 含有率

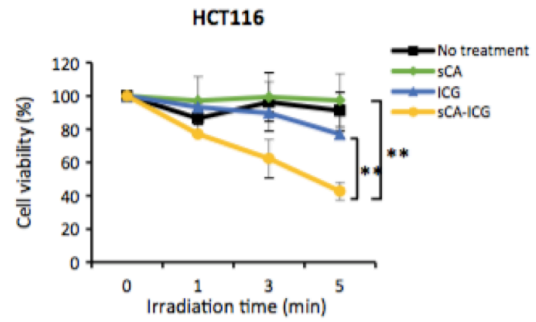
(2) 次に大腸癌細胞株である HCT116、HT29 に対する sCA-ICG の細胞取り込みについて、蛍光顕微鏡で確認し、フローサイトメトリーで定量化した。その結果、sCA-ICG 入り medium で 3 時間または 6 時間培養した群は ICG 入り medium で培養した群と比較して有意に細胞内への ICG の取り込みが高いことが分かった (図 2)。



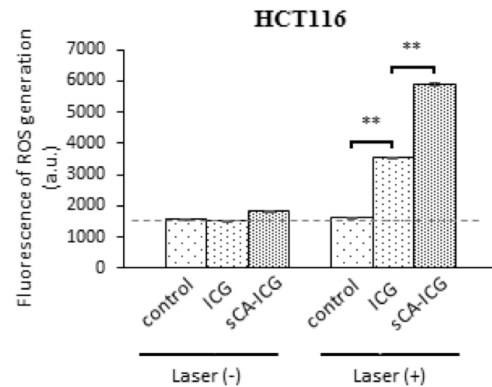
(図 2) sCA-ICG は大腸癌細胞株に有意に取り込まれていた (HCT116, 3 時間後の取り込み)

(3) 次に sCA-ICG または ICG 存在下に 3 時間培養した HT29 または HCT116 への光線照射による抗腫瘍効果の比較を行った。両細胞株ともに、ICG に比し、sCA-ICG 培養群で有意に強い抗腫瘍効果を確認した (図 3)。また、活性酸素種 (ROS) の産生も sCA-ICG 培養群で有意な上昇が見られた (図 4)。

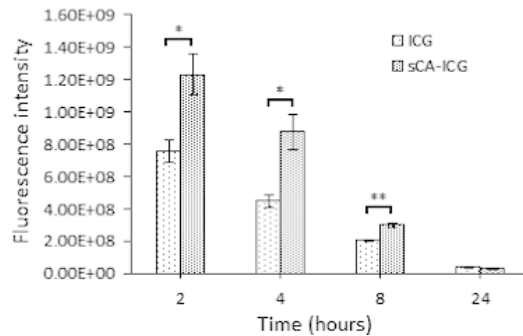
(4) 次に免疫不全マウスに皮下腫瘍を作成し、ICG 単独 (尾静脈注射: 尾注)、sCA-ICG (尾注) の臓器分布を in vivo imaging system を用いて経時的に評価した。その結果、sCA-ICG は ICG 単独に比べ腫瘍組織に有意に多く集積していた (図 5)。肝臓にも集積がみられたが、24 時間以内に速やかに排泄されていた。一方、市販されている ICG-liposome では、24 時間経過後も大部分が腫瘍組織や肝臓をはじめとする正常臓器に残ったままであった。



(図 3) sCA-ICG 存在下の光線照射により大腸癌細胞株の増殖が有意に抑えられた (HCT116)。

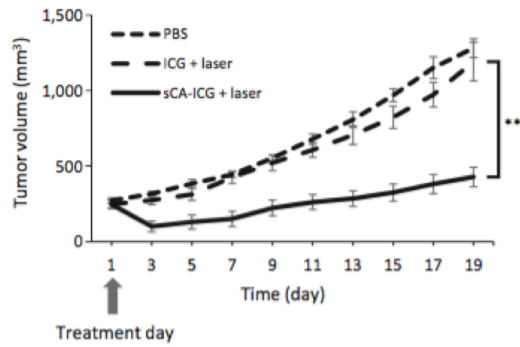


(図 4) sCA-ICG 存在下の光線照射により ROS 産生が有意に亢進した (HCT116)。



(図 5) sCA-ICG は ICG 単独に比べ腫瘍組織に有意に多く集積した (HT29)。

(5) 最後に免疫不全マウスに皮下腫瘍を作成し、光線力学療法の治療効果を評価した。腫瘍径が  $200 \sim 300 \text{mm}^3$  に達した時点で、近赤外線照射を 1 回行い、2 日毎の腫瘍体積と体重を測定し、19 日間観察した。その結果、sCA-ICG 投与群では ICG 単独投与群やコントロール群に比べ、強い抗腫瘍効果を示していた (図 6)。毒性についても評価したが、sCA-ICG 投与による体重減少や血液生化学検査値の異常や組織学的異常は認められなかった。



(図 6) sCA-ICG 投与群で光線照射により強い抗腫瘍効果が認められた (HT29)。

以上の結果から、sCA-ICG 光線力学療法は低侵襲な癌の治療法として有用であると考えられた。

#### <引用文献>

① Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer Cell-Selective *In Vivo* Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting Specific Membrane Molecules. *Nat Med.* 17(12), 2011, 1685-91. DOI:10.1038/nm.2554.

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①玉井皓己、高橋秀和、原口直紹、太田みのり、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹、山本浩文  
super carbonate apatite を使用した ICG 光線力学療法の検討 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017 年 金沢

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

玉井 皓己 (TAMAI Koki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・  
招へい研究員  
研究者番号：60724250

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )