

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009 年度
 課題番号：19390450
 研究課題名(和文) 癌のリンパ行性転移の撲滅を目指して～リンパ系ドラッグデリバリーシステムの開発～
 研究課題名(英文) New lymphatic imaging with indocyanine green (ICG) dye labeled hyaluronic acid derivative
 研究代表者
 古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)
 北海道大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：00399924

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、ゼラチン導入ヒアルロン酸を作成し、これと、近赤外観察カメラを用いたセンチネルリンパ節生検などで近年臨床応用が盛んになされている、インドシアニングリーン (ICG) とを複合体化させることに成功した。

本複合体粒子の物性と、実際に動物の体内に投与した場合の動態について検討を行ったところ、複合体化により十分な蛍光強度の増大・持続時間の延長が得られ、ICG 単体よりも効率よくリンパ系に分布する可能性が高いことが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we succeeded in invention of new lymphatic imaging complex, consists of hyaluronic acid derivative labeled by indocyanine green (ICG) dye, which is clinically used in neae-infrared bioimaging, such as sentinel lymph node biopsy.

Investigations into physical characteristics and in vivo kinetics of this complex have revealed that ICG fluorescence was enhanced and sustained enough for clinically use due to formation of the complex, and it is likely that the complex has more tendency to be transported to lymphatics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学、ドラッグデリバリーシステム、悪性黒色腫、皮膚癌、リンパ行性転移、ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

癌の転移対象の臓器として、所属リンパ

節があげられる。所属リンパ節に最初に転移をきたしやすい癌の一つ、皮膚悪性黒色

腫は、進行度が所属リンパ節に転移陽性を示した症例では 5 年生存率が著しく低下する。本邦では、現在インターフェロン β の局所注射を併用した抗癌剤治療 (DAV フェロン療法) が保険診療で行われており、インターフェロン β の有効性が統計的にも示されている。

また、近年では悪性黒色腫をはじめとする皮膚悪性腫瘍の診断において、センチネルリンパ節生検や、所属リンパ節郭清後の四肢のリンパ浮腫に対するリンパ管造影など、近赤外蛍光色素であるインドシアニングリーン (ICG) と赤外観察カメラとを用いた方法が数多く臨床応用されている。

そこで、インターフェロン β や ICG などのリンパ移行性を持たない薬剤を、効果的に薬剤をリンパ管・リンパ節へ移行させることを可能とするような、局所から所属リンパ節を標的とする理想的なドラッグ・デリバリーシステム (DDS) を開発することを計画した。

2. 研究の目的

ICG はその分子内にアミノ基やカルボキシル基などの官能基を有していないため、体内分解可能なアミド結合などを介して化学修飾することができない。そこで、化学結合ではない、物理結合により ICG を DDS 修飾することを考えた。用いる高分子材料としてヒアルロン酸 (Hyaluronic acid : HA) を取り上げた。

この理由は、ヒアルロン酸が 1) リンパ管内皮細胞がその分子に対して受容体を有していること、2) 分子の代謝経路がリンパ系を介すること、3) リンパ管を経由する分子の移動が、リンパ液の運搬や腫瘍のリンパ行性転移に関与すること、4) 既に臨床応用されていることなど

である。本研究では、近赤外蛍光標識したリンパ系イメージング剤として、ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体を作製した。ICG はタンパク質と相互作用する性質があるため、臨床応用が可能なタンパク質としてゼラチンを取り上げ、ゼラチンをヒアルロン酸に導入することを考えた。

得られた複合体の物性とマウス足底部皮下に注射した場合の下肢におけるリンパ移行性について、ICG 単体と比較検討した。

3. 研究の方法

(1) ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体の調整と物性の検討

熱加水分解で得られた分子量の異なる 2 種類のヒアルロン酸に、それぞれ低分子量ゼラチンをカルボキシル基活性化法で反応させた。凍結乾燥で回収したゼラチン導入ヒアルロン酸を ICG で標識した。得られた複合体粒子について、動的光散乱光度計による粒子の大きさの測定、および電気泳動光散乱光度計とアフアニティクロマトグラフィーを用いた粒子表面の構造に関する検討を行った。

(2) 水晶発振子マイクロバランス (Quartz

Crystal Microbalance) 法による分子間相互作用の測定と解離定数の解析

ゼラチンおよびアルブミンと、ICG との分子間相互作用を、分子間相互作用測定 QCM 装置を用いて測定した。また、アルブミンに対する ICG、ヒアルロン酸、および当複合体との分子間相互作用の測定も行った。

(3) 吸光スペクトルの測定

複合体溶液について、分光光度計を用いて、500~900 nm の範囲で吸光スペクトル

を測定した。なお、比較対象として ICG 溶液の吸光スペクトルを測定した。同様に濃度が 40 mg/ml のウシ血清アルブミン存在下で測定を行った。

(4) 近赤外観察カメラによる、マウス下肢における本複合体の動態の観察

ラット後肢足底部皮下に局所注射し、PDE でその動態を観察するとともに膝窩リンパ節における病理組織学的検討も行った。

4. 研究成果

(1) 複合体の物性

ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体について、ゼラチン導入率、複合体の粒子径、および粒子の表面電位の測定を行った (表 1)。各ゼラチングラフト化ヒアルロン酸のゼラチン導入率の間には、ヒアルロン酸分子量の大きさによる有意差は認められなかった。また、各複合体の粒子径、および ζ -potential の間には、ヒアルロン酸分子量の大きさによる有意な違いは認められなかった。

	ヒアルロン酸分子量	ゼラチン導入率 (w%)	粒子径 (nm)	ζ -potential (mV)
ICG-gelatin-HA(18)	18,000	7.5±2.7	162.8±37.9	-39.8±1.2
ICG-gelatin-HA(9)	9,000	8.7±2.3	163.0±34.4	-36.4±0.7

表 1

(2) ICG に対するアルブミンとゼラチンの分子間相互作用の比較

ICG に対するアルブミンとゼラチンの分子間相互作用における解離定数を比較した (図 1)。その結果、ICG とゼラチンとの相互作用が、アルブミンに比して有意に大きいことがわかった。

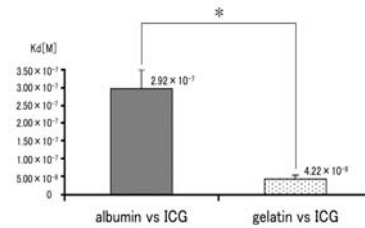


図 1

(3) 複合体化による ICG とアルブミンの分子間相互作用の減少

アルブミンに対する、ヒアルロン酸、ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体および ICG の分子間相互作用における解離定数を比較したところ、いずれの群間でも有意差を認めた (図 2)。すなわち、ICG に比べて、ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体の方が、分子間相互作用が小さくなった。このことは、複合体化により ICG とアルブミンの相互作用が減少していることを示している。

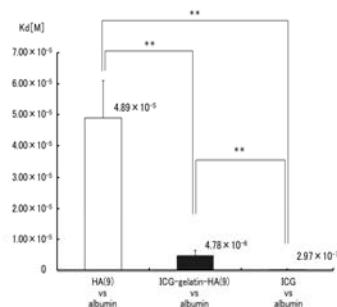


図 2

(4) 吸光スペクトルにおける吸収曲線の変化の検討

本複合体の吸光スペクトル曲線は、ICG とアルブミンとの混合溶液と同様に 800 nm 付近にピークを認めた。加えて、複合体とアルブミンとの混合溶液のピークの高さは、ICG とアルブミンとの混合溶液に比

べて高い値を示した（図3）。

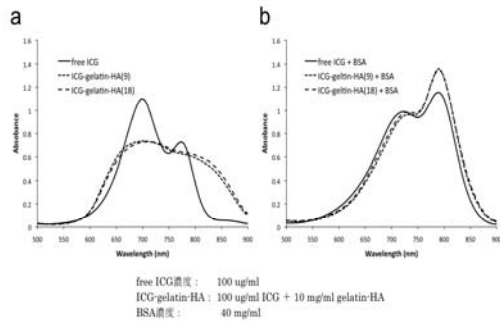


図3

すなわち、ICG が複合体化することで ICG 分子が単量体の状態で存在している割合が増えたことを示していると考えられ、ゼラチングラフト化ヒアルロン酸により複合体化することで、ICG のもつ蛍光強度を増大させることができたと考えられる。

(5) マウス膝窩リンパ節における蛍光強度の変化

本複合体投与群では、足底から膝窩リンパ節に至るリンパ管と考えられる線状の蛍光像を認めた。また、蛍光強度はいずれの群も20分でピーク値となり、その後、徐々に減少してゆき7時間でリンパ節周囲とほぼ同じ値となった。しかしながら、複合体投与群では蛍光強度は ICG 単体投与群に比べて大きな値を示した（図4）。蛍光強度の増加は投与後約2時間持続しており、センチネルリンパ節生検など臨床的には十分な持続時間である。また、蛍光強度の増加により、将来的には ICG としての投与量を減らすことも可能になり、DDS 化による利点は得られていると考えられる。

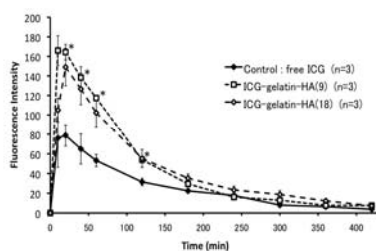


図4

(6) 組織学的検討

膝窩リンパ節における ICG および各複合体の局在を、近赤外蛍光顕微鏡で観察したところ、ICG および各複合体溶液のいずれの投与群においても、リンパ管内皮細胞と同じくリンパ管内皮細胞ヒアルロン酸レセプター (LYVE-1) を発現している内皮細胞に裏打ちされた空間である、皮膜下リンパ洞をはじめとするリンパ洞に蛍光を認めた。またいずれの投与群においても濾胞や深部皮質には蛍光を認めなかった（図5）。

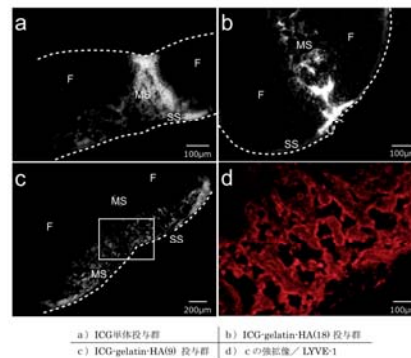


図5

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）

〔学会発表〕（計7件）

①大澤昌之、古川洋志、白井智明、城潤一郎、田畑泰彦、山本有平：新しいリンパ系イメージング材としてのインドシアニングリーン標識ヒアルロン酸誘導体の開発. 第18回北海道大学形成外科アカデミー、札幌市、2009.12.12

②大澤昌之、古川洋志、白井智明、城潤一郎、田畑泰彦、山本有平：リンパ系イメージング材としての近赤外蛍光標識ヒアルロン酸誘導体の開発. 第21回北海道MMC研究会、札幌市、2009.11.28

③大澤昌之、古川洋志、白井智明、城潤一郎、田畑泰彦、山本有平：近赤外蛍光標識ヒアルロン酸誘導体の物性に関する検討：リンパ向性ドラッグデリバリーシステムの開発 第3報. 第18回日本形成外科学会基礎学術集会、東京都、2009.10.2

④大澤昌之、古川洋志、高藤正義、田畑泰彦、山本有平：癌のリンパ行性転移の撲滅を目指してーリンパ系ドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発ー. 第15回北海道大学形成外科アカデミー、札幌市、2008.12.13

⑤大澤昌之、古川洋志、高藤正義、田畑泰彦、山本有平：ICGで標識可能なゼラチン導入ヒアルロン酸の開発：リンパ向性ドラッグデリバリーシステムの開発 第2報. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会、東京都、2008.10.3

⑥大澤昌之、上田寛樹、古川洋志、田畑泰彦、山本有平：マウスにおけるヒアルロン酸の所属リンパ節への動態：リンパ行性ドラッグデリバリーシステムの開発ー第1報. 第34回日本マイクロサージャリー学会、福島市、2007.10.18

⑦大澤昌之、上田寛樹、古川洋志、田畑泰彦、山本有平：マウスにおけるヒアルロン酸の所属リンパ節への動態：リンパ行性ドラッグデリバリーシステムの開発ー第1報. 第16回日本形成外科学会基礎学術集会、神戸市、2007.10.12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00399924

(2) 研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70271674
小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70374486
舟山 恵美 (FUNAYAMA EMI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10533630
林 利彦 (HAYASHI TOSHIHIKO)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00432146

(3) 連携研究者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50211371