

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22497

研究課題名（和文）腫瘍免疫環境を非侵襲的にイメージングするナノ微粒子の開発

研究課題名（英文）Development of nanoparticle-based contrast agents for non-invasive imaging of tumor immune environment.

研究代表者

三浦 理紗子 (Miura, Risako)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：40881694

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：Cold Tumor に分布するM2 型マクロファージを標的とした多糖ナノゲル型光音響造影剤を開発した。親水性多糖のプルランに、近赤外蛍光色素の IR-820 と M2 型マクロファージ標的部位としてマンノースを修飾した PMI を設計・合成した。PMI は水中で IR-820 の疎水性相互作用によりナノゲルを形成した。M2 分化マクロファージとの相互作用は、マンノース修飾により取り込みが増大していることが明らかとなった。担癌マウスへナノゲルを尾静脈投与し光音響イメージングを行った結果、PMI ナノゲル群は腫瘍集積性を向上し、マンノース未修飾群と比較し高いコントラストでの造影を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、M2 型マクロファージと能動的に相互作用し、高い腫瘍集積性を示すナノゲル型光音響造影剤を開発した。このナノゲル型光音響造影剤は、Hot Tumor との造影能の比較を実施することで、腫瘍免疫環境の違いから Cold Tumor の非侵襲的かつ特異的な造影および診断を実現し得ると期待される。さらに、腫瘍免疫環境を正確かつ早期に画像化することにより、臨床医ががん免疫療法の治療効果を予測し、治療方法を決定する際の重要な有用な情報を提供可能になる。

研究成果の概要（英文）：We have developed polysaccharide nanogel-based photoacoustic imaging contrast agent targeting M2-type macrophages distributed in cold tumor. Pullulan-mannose-IR820 (PMI) was designed and synthesized by modifying pullulan, a hydrophilic polysaccharide, with IR-820, a hydrophobic near-infrared fluorescence dye, and mannose as a ligand for mannose receptors expressed on M2-type macrophages. PMI formed self-assembled nanogels by hydrophobic interaction of IR-820, and the size was 86.1 nm in diameter. PMI nanogel showed light absorption in near-infrared range, same as IR-820. The uptake of PMI nanogel by M2-type macrophages were increased compared to the nanogels without mannose, suggesting the active targeting of PMI nanogel toward mannose receptors expressed on M2-type macrophages. Finally, photoacoustic imaging of tumor-bearing mice was performed, and PMI nanogel showed higher contrast than the nanogel without mannose by improving the tumor accumulation.

研究分野：生体材料

キーワード：多糖 ナノゲル 光音響イメージング 免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は、患者自身の免疫システムを利用する新しい治療法であり、優れた治療効果を示すことが期待される。その一方で、がん免疫療法に抵抗性を示し、抗 PD-1 抗体等の抗体医薬の効果が得られない“Cold Tumor”と呼ばれる難治性で悪性度の高いがんの存在が明らかにされ、Cold Tumor の腫瘍免疫環境では、CD8 陽性キラー T 細胞の浸潤が認められず、免疫抑制能を有する M2 型マクロファージが広く分布していることが報告された<sup>[1]</sup>。従って、腫瘍免疫環境を正確かつ早期に画像化することは、臨床医ががん免疫療法の治療効果を予測し、治療方針を決定する際の重要かつ有用な情報になる。

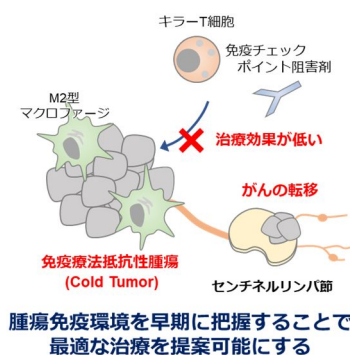


図1. 本研究の背景: 光音響イメージングによる腫瘍免疫環境の可視化。

本研究では、光と超音波の特徴を組み合わせた次世代のイメージング法であり、臨床現場からの期待が大きい「光音響イメージング」をモダリティとして選択し、表面修飾容易で薬剤の内包・送達に優れた自己組織化多糖ナノゲルの高機能化により、Cold Tumor に分布する M2 型マクロファージを標的とする、新しい光音響イメージング造影剤を開発する (図1)。

## 2. 研究の目的

標的指向性を付与した多糖ナノゲル型光音響造影剤の設計と合成を行い、腫瘍免疫環境の非侵襲的な光音響イメージングにより、治療効果の予測やがん治療法の決定に有用かつ重要な画像情報を提供する。

## 3. 研究の方法

親水性多糖であるプルラン ( $M_w = 76,000$ ) に、近赤外蛍光色素である IR-820 と、M2 型マクロファージのリガンドとして機能し得るマンノースを修飾した両親媒性多糖 (Pullulan-mannose-IR820; PMI) を設計した (図2)。まず、プルランのヒドロキシル基に対し無水コハク酸を反応させ、カルボキシル基を導入した Pullulan-COOH (PC) を合成した。続いて、アミノ基末端を有するマンノース誘導体、および IR-820 の修飾リンカーとして

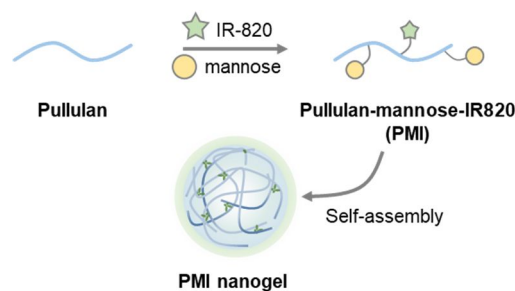


図2. 本研究の概略図: 腫瘍免疫環境を画像化するナノゲル型光音響造影剤の開発。

4-aminothiophenol を縮合させ、続いて、チオール基による IR-820 のクロル基への置換反応により、Pullulan-IR820-mannose (PMI) を合成した。また、マンノースが修飾されていない Pullulan-IR820 (PI) も同様に合成した。

PMI を純水中に溶解し、超音波処理後、遠心およびフィルター処理により凝集体を除去し、単分散な PMI ナノゲル水溶液を得た。PMI ナノゲルの物性評価として、動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering; DLS) により粒径を、電気泳動光散乱法 (Electrophoretic Light Scattering; ELS) により表面電位を測定した。さらに、紫外 - 可視吸収、蛍光スペクトル測定 ( $\lambda_{Ex} = 750 \text{ nm}$ ) を測定した。また、PMI ナノゲル水溶液の光音響イメージング ( $\lambda_{Ex} = 850 \text{ nm}$ ) を行った。

次に、RAW264.7 細胞 (マウス由来マクロファージ様細胞株) との相互作用について評価を行

った。M2 型に分化した RAW264.7 細胞に対して PMI ナノゲル水溶液を添加し、細胞毒性を評価した。続いて、RAW264.7 細胞への PMI ナノゲルの取り込みを、蛍光強度測定および光音響イメージングにより評価した。

最後に、光音響イメージングを用いた腫瘍造影能を評価した。colon26 細胞（マウス由来大腸癌細胞株）を Balb/c マウスに担癌し、担癌 7 日後に PMI ナノゲル水溶液を尾静脈投与した。その投与 24 時間後に腫瘍部位の光音響イメージングを行った。

#### 4. 研究成果

DLS および ELS 測定の結果、プルランは粒径 26.0 nm、電位  $-7.1$  mV であったのに対し、PMI ナノゲルは粒径 86.1 nm、電位  $-32.4$  mV であった。プルランと比較して PMI ナノゲルは明らかに粒径が増大しており、PMI は IR-820 の疎水性相互作用を駆動力に、均一な粒径を有する自己組織化ナノゲルを形成していることが明らかとなった。電位は負に増大しており、これはスルホ基を有する IR-820 が導入されたことに起因すると考えられる。IR-820 単体および PMI ナノゲル水溶液の紫外 - 可視吸収測定を行なったところ、IR-820 単体は 690 nm 付近に吸収極大を示した一方で、PMI ナノゲルは 780 nm および 850 nm に付近に吸収極大を示した。これは、IR-820 単体と PMI ナノゲル内部での IR-820 の会合状態が異なり、会合数が IR-820 単体より少ないことが示唆された。また、蛍光スペクトル測定を行った結果、IR-820 濃度が同等の IR-820 単体、PMI ナノゲルを比較したところ、PMI ナノゲルの蛍光強度は低下しており、これは PMI ナノゲル中の IR-820 会合体が凝集誘起消光を示していると考えられる。また、PMI ナノゲル水溶液の光音響イメージングを行ったところ、IR-820 単体と同等の光音響造影能を有した。以上の結果より、PMI は水中でナノゲルを形成し、吸収、蛍光、光音響に関して IR-820 単体同様の光特性を有することが明らかとなった。

IR-820 単体および PMI ナノゲルの細胞毒性を評価したところ、いずれも IR-820 濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下において細胞毒性を示さないことがわかった。また、蛍光イメージングおよび光音響イメージングの結果より、マンノースを修飾していない PI ナノゲルと比較し、PMI ナノゲルの方が M2 分化マクロファージへの取り込みが向上していることが示された。つまり、マンノース修飾により、PMI ナノゲルは、マンノースレセプターを介して M2 型マクロファージと能動的に相互作用していることが示唆された。

colon26 担癌マウスへ PI ナノゲルおよび PMI ナノゲルを尾静脈投与し、24 時間後に光音響イメージングを行ったところ、PI ナノゲル投与群は PBS 投与群のコントラストと同程度であった一方で、PMI ナノゲル投与群は顕著に高いコントラストを示した。colon26 は Cold Tumor に分類される腫瘍であり<sup>[2]</sup>、PMI ナノゲルは Cold Tumor に分布する M2 型マクロファージとの相互作用により、腫瘍内部への集積性が向上し、高コントラストで造影可能であったと考えられる。

以上の結果より、近赤外蛍光色素と M2 型マクロファージリガンドであるマンノースを修飾した PMI ナノゲルは、Cold Tumor を造影し得る光音響造影剤として非常に有用であることが明らかとなった。今後は、Hot Tumor の造影能との比較や免疫療法による治療効果も合わせて評価を行い、非侵襲的かつ定量的な腫瘍免疫環境の可視化への展開を目指す。

#### 5. 参考文献

<sup>1</sup> Bonaventura, P. *et al.*, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1–10.

<sup>2</sup> Sato, Y. *et al.*, *BMC Cancer* **2021**, *21* (1), 1–12.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦 理紗子、木村 祐、秋吉 一成、近藤 輝幸
2. 発表標題 M2型マクロファー지를標的とする多糖ナノ粒子型光音響造影剤の設計と合成
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦 理紗子、堤 暁生、木村 祐、秋吉 一成、近藤 輝幸
2. 発表標題 M2型マクロファージ標的化光音響応答性多糖ナノ粒子の設計と合成
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤暁生, 三浦理紗子, 木村祐, 秋吉一成, 近藤輝幸
2. 発表標題 腫瘍免疫環境の診断が可能な光音響イメージング応答性ナノゲルの開発と機能評価
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------