

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08660

研究課題名(和文) インドシアニングリーン修飾リポソームを用いた小児肝がん新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel treatment for pediatric liver tumor using liposomal formulated indocyanine green derivative

研究代表者

小松 秀吾 (Komatsu, Shugo)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60436417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ICG-Lipoを添加して近赤外線を照射しPDTを行った細胞では、MTT assayにて生存細胞数の有意な減少を認めた。また、マウス皮下腫瘍モデルにICG-Lipoを投与して近赤外線を照射したところ、著明な腫瘍増殖抑制効果が認められた。さらに低用量のCDDPを内包することでICG-Lipo投与群よりもさらに強い腫瘍増殖抑制効果が認められたが、ICG-Lipoと低用量CDDPを単に混合して投与した群での腫瘍増殖抑制効果は、ICG-Lipo単独投与群と著変がなかった。これらの結果より、ICG-LipoにCDDPを内包することで、低用量であっても効果的な腫瘍増殖抑制効果が得られることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により肝腫瘍におけるICG-Lipoを用いた光線力学的治療の有効性が確認された。さらにICG-Lipoに抗腫瘍薬であるシスプラチンを内包することで、低用量の抗腫瘍薬による最大効果・最小副作用の実現が達成され、光免疫治療の分野に新たな道を拓くことが期待された。

研究成果の概要(英文)：A significant decrease in the number of viable cells was observed in the MTT assay in cells that had been irradiated with ICG-Lipo and subjected to PDT using near-infrared light. In addition, ICG-Lipo injected into a mouse subcutaneous tumor model and irradiated with near-infrared light showed a marked inhibition of tumor growth. Furthermore, when low-dose CDDP was included in ICG-Lipo, the tumor growth inhibitory effect was even stronger than that in the ICG-Lipo group. However, the tumor growth inhibitory effect in the group simply treated with a mixture of ICG-Lipo and low-dose CDDP was not significantly different from that in the group treated with ICG-Lipo alone. These results suggest that the inclusion of CDDP in ICG-Lipo can effectively inhibit tumor growth even at low doses.

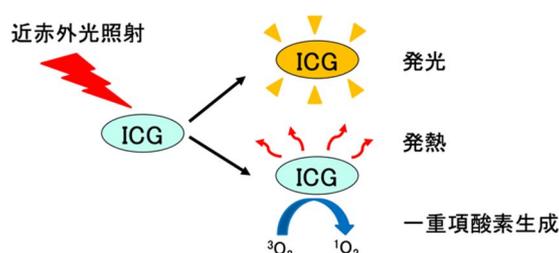
研究分野：小児がん

キーワード：光線力学的治療 インドシアニンググリーン リポソーム

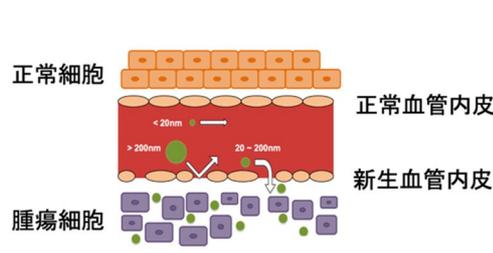
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは ICG の基本骨格にアルキル鎖またはリン脂質を修飾した ICG 誘導体を脂質二重膜に組み込んだリポソーム製剤であるインドシアニングリーン誘導体修飾リポソーム (ICG-Lipo) を開発し、ICG-Lipo と近赤外線 LED 治療装置を用いた光線力学的治療 (Photodynamic Therapy: PDT) の創生に取り組んできた (図 1)。静脈内投与した ICG-Lipo は、Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR) 効果 (腫瘍組織の未成熟な血管から 200nm 以下の粒子が漏れ出る現象) によってがん細胞に特異的集積と約 3 週間にわたる長期間繫留が可能であった (図 2)。また、ICG-Lipo は通常の ICG に比べ腫瘍により蓄積することが動物実験により確認された。がん細胞に集積した ICG-Lipo に対して近赤外光を照射することで、発熱と一重項酸素生成により、がん組織から放出されたネオアンチゲンを樹状細胞が抗原として認識するとともに、細胞傷害性 T 細胞による抗腫瘍免疫応答が誘引されるものと考えられている。



【図 1】 ICG-Lipo の構造と近赤外線照射による発光・発熱・一重項酸素産生のメカニズム



【図 2】 EPR 効果による腫瘍組織への特異的集積

肝芽腫は代表的な小児肝悪性腫瘍であるが、約 20%は初発時に遠隔転移を有する。近年、肝芽腫の肺転移手術において ICG を術前に静注し、術中に赤外線で蛍光励起することにより病変を視認する ICG ナビゲーション手術の有用性が注目されている。肝芽腫は正常肝細胞と同様に非常に強い選択性をもって ICG を取り込むが、正常肝細胞よりも排泄が遅れるため、ICG が病巣内に蓄積する。この特性を利用して、申請者らは肝芽腫の原発巣、肺転移巣の切除に対する ICG 蛍光ガイド下腫瘍切除の有用性を示してきた (Yamada, Hishiki et al, Cancers 2019)。しかし、初発時に肺転移を伴う肝芽腫の治療成績は大量のシスプラチンを含む強力な化学療法と手術を組み合わせた集学的治療をもってしても 5 年 EFS は 60%に満たず、いまだ予後不良である (Hiyama, Hishiki et al J Clin Oncol 2020)。また、成長発達の過程にある幼小児に大量の抗がん剤を使用することで様々な副作用や合併症をきたし、大きな問題となっている。シスプラチン使用による腎毒性のため本来必要な治療を継続できないケースや、治療が奏功し長期生存を得た患者においては永続する聴力障害に悩まされるケースがあり、より強力な抗腫瘍効果を有し、かつ副作用の少ない新規治療の開発は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、肝がんにおける ICG-Lipo を用いた光線力学的治療による抗腫瘍効果の検討と、ICG-Lipo に抗がん剤を内包してナノキャリアとして用いる治療実験を行った。

これまでに ICG-Lipo を用いた光免疫誘導治療の有用性については多くのがん種で報告されてきた。今回申請者らは、ICG-Lipo に抗腫瘍薬を内包化することで、抗腫瘍薬の生体内での優れ

た安定性と腫瘍組織集積性・浸透性が期待され、ICGによる光免疫誘導治療効果に加え、より有用な抗腫瘍効果を見込んでいる。さらに、全身投与量よりはるかに少ない用量で同等の効果を期待でき、至適投与濃度を検討し臨床応用することで、副作用の軽減に寄与できると考えている。

3. 研究の方法

(1) 肝がん培養細胞系における ICG-Lipo の取り込みと近赤外光を用いた光免疫誘導治療効果の検討

ヒト肝腫瘍由来細胞株 HuH6 および HepG2 の培養液中に 800nm 近赤外光パルスビームを照射し光免疫誘導治療を行い、MTT assay で細胞の viability を検討した。また、ICG 修飾を行っていないリポソームや ICG-Lipo 単体での細胞障害を否定するため、これらを単純に培養細胞に添加したのみでは細胞死が惹起されないことを確認した。さらに近赤外光単体での細胞障害性や、リポソームに対して近赤外光を照射した場合の細胞障害性を否定するため、薬剤を添加していない細胞や、単なるリポソームを添加した細胞での近赤外光を照射した場合の細胞障害性がないことを確認した。

(2) 肝がん皮下腫瘍モデルにおける ICG-Lipo 誘導性光免疫誘導治療効果の検討

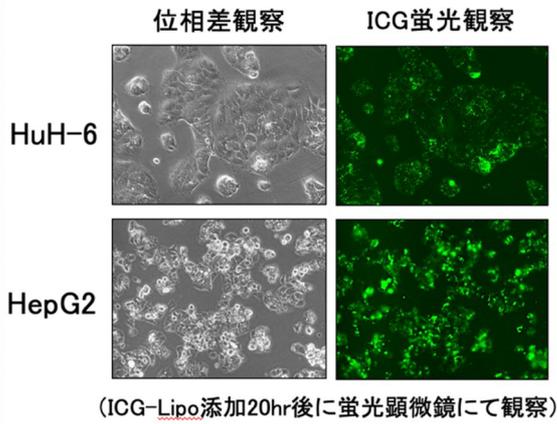
マウス肝腫瘍由来細胞株 (Hep53.4) を C57BL/6Jc1 マウスの皮下に 5×10^6 cells/100ul の濃度で投与し、皮下腫瘍モデルマウスを作成した。腫瘍体積が 50mm^3 を超えたところで ICG-Lipo を腹腔内に投与した。投与 24 時間後から皮下腫瘍部位に 800nm 近赤外光パルスビームを 3 日間照射し (1 回 20 分) 経時的に腫瘍体積を測定した。照射から 28 日後にマウスを犠牲死させ腫瘍を採取し、治療効果判定を行った (コントロールとして ICG 修飾を行っていないリポソームを用い、腫瘍体積を比較した)。

(3) シスプラチン内包化 ICG-Lipo を用いた光免疫誘導治療効果の検討

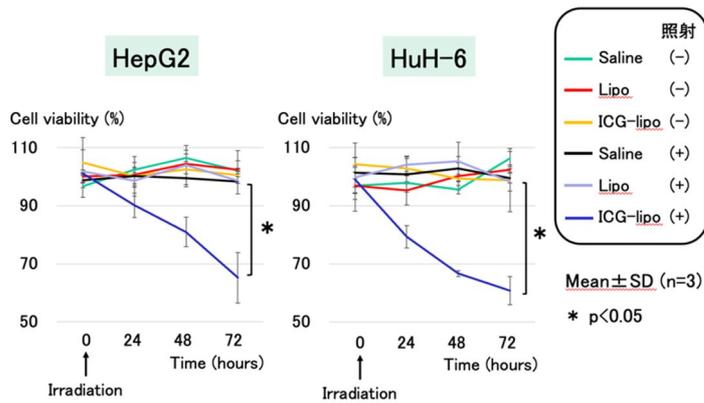
上記 (1) (2) と同様の実験に関して抗腫瘍薬であるシスプラチン (3mg) を内包化した ICG-Lipo を用いて行った。

4. 研究成果

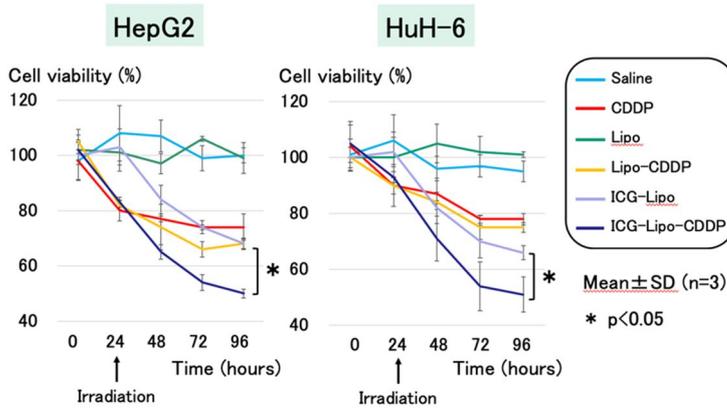
HuH6 および HepG2 細胞に ICG-Lipo を添加して 20 時間後に蛍光顕微鏡で観察した所、ICG-Lipo の細胞への集積が認められた (図 3)。さらに近赤外線を照射し PDT を行った細胞では、MTT assay にて生存細胞数の有意な減少を認めた (図 4)。一方で ICG-Lipo を単純に培養細胞に添加したのみでは細胞死は惹起されず、ICG-Lipo 単体での細胞傷害性は否定的であり、ICG-Lipo に修飾されている ICG が PDT による細胞傷害性に関与していることが示唆された。また、マウス皮下腫瘍モデルに ICG-Lipo を投与して近赤外線を照射したところ、著明な腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 6)。さらに低用量のシスプラチンを内包した ICG-Lipo-CDDP を投与したところ、ICG-Lipo 投与群よりもさらに強い腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 7)。一方で ICG-Lipo と低用量 CDDP を混合して投与した群での腫瘍増殖抑制効果は、ICG-Lipo 単独投与群と著変がなかった。これらの結果より、ICG-Lipo に CDDP を内包することで腫瘍局所に CDDP を高濃度に分布させることが可能となり、低用量であっても効果的な腫瘍増殖抑制効果が得られることが示唆された。また、ICG-Lipo 投与群、ICG-Lipo-CDDP 投与群ともに、経過中に体重減少や血液検査異常などの副作用は認められなかった。



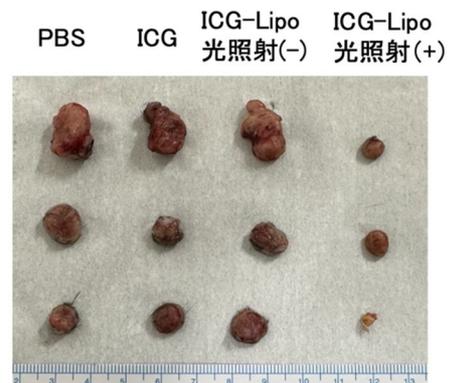
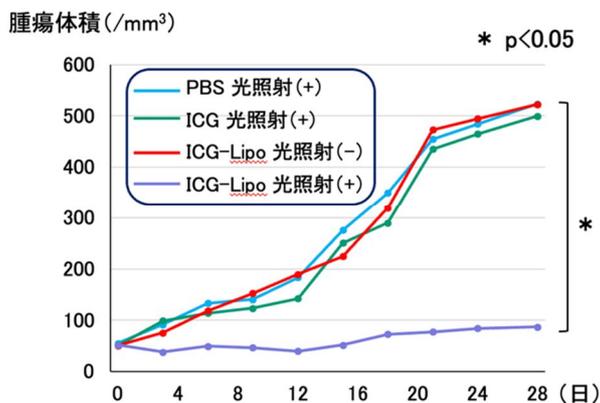
【図3】 ICG-Lipo の細胞への集積



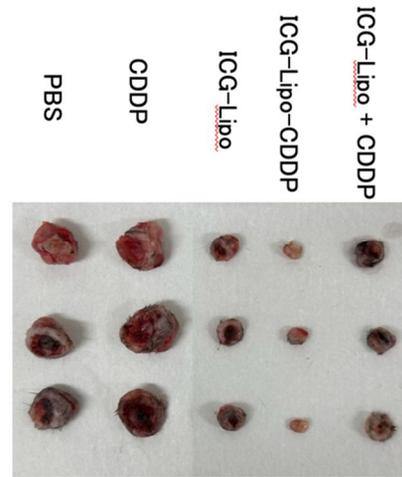
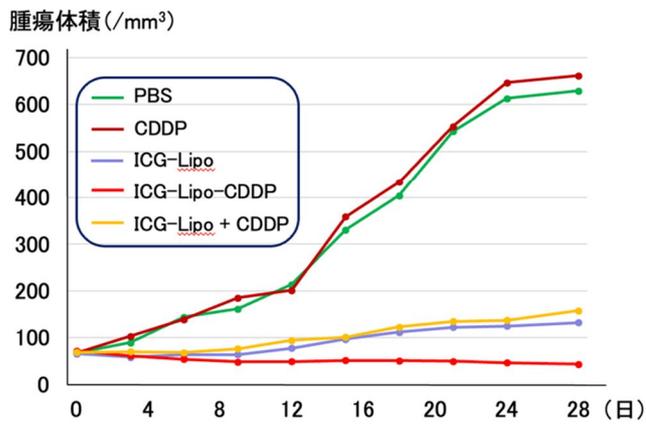
【図4】 ICG-Lipo による PDT 効果



【図5】 ICG-Lipo-CDDP による PDT 効果



【図6】 マウス皮下腫瘍モデルにおける ICG-Lipo の抗腫瘍効果



【図7】マウス皮下腫瘍モデルにおける ICG-Lipo-CDDP の抗腫瘍効果

以上の結果から、肝腫瘍における ICG-Lipo を用いた PDT の有効性が確認された。さらに ICG-Lipo に CDDP を内包することで、低用量の抗がん剤による最大効果・最小副作用の実現が達成され、光免疫治療の分野に新たな道を拓くことが期待された。

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 小松秀吾、田村裕、菅波晃子、照井慶太、武之内史子、笈田諭、吉澤比呂子、文田貴志、菱木知郎
2. 発表標題 Treatment of near-infrared photodynamic therapy using a liposomally formulated indocyanine green derivative for liver tumor cells
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松秀吾、田村裕、菅波晃子、武之内史子、川口雄之亮、西村雄宏、瀧口翔太、照井慶太、菱木知郎
2. 発表標題 肝がんにおけるICG結合型リポソームを用いた光線力学的治療による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第61回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小松秀吾、田村裕、菅波晃子、照井慶太、武之内史子、川口雄之亮、西村雄宏、瀧口翔太、菱木知郎
2. 発表標題 Efficacy of Liposomal Formulated Indocyanine Green Derivative for Photodynamic Therapy of Murine Liver Tumor
3. 学会等名 第65回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2023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
研究分担者	菱木 知郎 (Hishiki Tomoro) (00375776)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	菅波 晃子 (Suganami Akiko) (10527922)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	田村 裕 (Tamura Yutaka) (50263174)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	照井 慶太 (Terui Keita) (70375773)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	中田 光政 (Nakata Mitsuyuki) (90375775)	千葉県がんセンター（研究所）・その他部局等・主任医長 (82504)	

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
---------	---------