

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591933

研究課題名(和文) 蛍光化リポソーム薬物送達システムを用いた消化器癌治療の基礎的検討

研究課題名(英文) Fundamental analyses of our near-infrared fluorescent liposome system as therapeutic agents against gastrointestinal malignancies

研究代表者

林 秀樹 (Hayashi, Hideki)

千葉大学・フロンティア医工学センター・教授

研究者番号：20312960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規に開発した疎水性近赤外蛍光プローブICG-C18を用いたリポソームシステムが、薬物送達システムとして消化器癌治療に応用可能かどうかに関する基礎的な検討を行った。マウスの腫瘍モデルを用いた検討で、200nmの平均粒径に整形した蛍光化リポソームは、EPR効果により腫瘍に集積し、近赤外光の照射により腫瘍の発育抑制を認めた。シスプラチンを内包化したリポソームを同様のモデルで検証したところ、発育抑制効果の増強を認めた。ジニトロフェノールを内包化した蛍光リポソームを作製し、in vitroで近赤外光照射による内包内容の放出効率を評価したところ、1.5～4%程度であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We tested the basic effectiveness of our near-infrared fluorescent (NIRF) liposome system with newly-made hydrophobic form of Indocyanine green (ICG-C18) in gastrointestinal cancer therapy using tumor bearing mouse model. When NIRF liposomes of 200nm in mean diameter were administered to mice inoculated with esophageal carcinoma cell line, the liposomes were revealed to accumulate in the tumor with EPR effect. NIR light irradiation to the tumor after administration of the liposomes showed significant suppression of the tumor growth. Administration of the liposomes containing cisplatin indicated enhanced tumor growth suppression. In vitro analysis of the liposomes containing Dinitrophenol revealed that 1.5 to 4% of the contents were released after irradiation of NIR light.

研究分野：消化器外科学

キーワード：インドシアニングリーン 光線温熱療法 光線力学療法 ハプテン

### 1. 研究開始当初の背景

近年、近赤外蛍光を発光する性質を持つ色素インドシアニンググリーン (ICG) を用いた生体イメージングが注目され、様々な領域の手術ナビゲーションに利用されるようになってきた。ICG は生体内に投与されると、血中あるいは組織液中のリポタンパクと結合し近赤外蛍光が励起される性質を持つ。しかしながら ICG の蛍光発光の効率、結合するタンパクの状態や濃度に大きく左右されること、本来水溶性の色素であることから、一旦生体内に投与されると、短時間の内に組織中を広く拡散することなどから、標的とする生体構造の十分な観察精度が得られるのは比較的短い時間に限られていた。

そこで我々は、科学研究費補助金による研究課題「蛍光化リポソームを用いたダブルイメージングによるセンチネルリンパ節診断法の開発」(平成 21~23 年度)において、独自に ICG の親水側鎖の一つをアルキル鎖に置換し水に不溶とし(疎水性 ICG=ICG-C18)これを脂質二重膜中に取り込んだ袋状の粒子体(リポソーム)を試作した。脂質二重膜を作製する際にこの ICG-C18 とリン脂質を蛍光発光の至適条件で配合することにより、生体外でも生体中でも同様に高い効率で近赤外蛍光が励起されるプローブとなることが明らかとなった。このようにして作製した蛍光化リポソームを平均粒径 200nm に調整することにより、リンパ節滞留時間の長いセンチネルリンパ節トレーサーとして、また、平均粒径 50 $\mu$ m 程度の大きな粒子に整形することにより、消化管壁内に投与可能で長時間拡散することのない蛍光組織マーカーとして利用可能であることが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、我々が新たに開発した蛍光化リポソームが消化器癌治療における薬物送達システムとしてどの程度の有効性が期待できるかの基礎的な検討を行う。すなわち、本蛍光化リポソームの薬物送達システムとしての腫瘍集積性、また集積した部位における光線力学療法・温熱療法の効率の検討、内包化物質の放出効率の検討を行い、最終的に抗癌剤及び免疫賦活剤を用いた抗腫瘍効果を小動物を用いた実験系で検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 平成 21~23 年度科学研究費補助金研究課題「蛍光化リポソームを用いたダブルイメージングによるセンチネルリンパ節診断法の開発」にて開発を行った ICG-C18 をリポソーム化、粒径 200nm に整形し、食道癌細胞株 (SCCVII) の培養液中に添加、ICG-C18 リポソームを細胞中に取り込ませた後、800nm 近赤外光 pulse beam を照射し、細胞の viability を検討する。また、SCCVII 細胞を C3H/He マウスに移植した後、ICG-C18 リポソームを尾静脈より投与し、移

植腫瘍病巣へ 800nm 近赤外光 pulse beam を照射し、腫瘍の発育抑制効果の観察を行う。

(2) ICG-C18 をリポソーム化する際に抗腫瘍剤であるシスプラチンを内包化し、これを C3H/He マウス - SCCVII 食道癌細胞移植モデルに投与し、腫瘍の発育抑制効果の比較を行う。

(3) ICG-C18 をリポソーム化する際に免疫賦活剤であるジニトロフェノール (DNP) を内包化し、in vitro で 800nm 近赤外光 pulse beam を照射、遊離した DNP 量を吸光度法により計測、内包内容の放出効率を検討する。

(4) 490nm の励起波長で 520nm をピークとする蛍光を発するフルオレセインが、塩化コバルト溶液中で蛍光が消光する性質を利用し、フルオレセイン内包化 ICG-C18 リポソームに 800nm 近赤外光 pulse beam を照射、蛍光強度の減弱から内包内容の放出効率を検討する。

### 4. 研究成果

(1) SCCVII の培養液中に 10-100 $\mu$ M の ICG-C18 リポソームを添加し、24 時間培養を行うことで、蛍光顕微鏡下に蛍光色素の細胞内への取り込みが確認できた。この ICG-C18 リポソームを取り込んだ細胞に 800nm 近赤外光 pulse beam を照射したところ、取り込ませていない細胞と比較し、96 時間後に最大で 50% の viability の低下を認めた(図 1)。また、SCCVII 細胞を移植した C3H/He マウスに ICG-C18 リポソームを投与し、800nm 近赤外光 pulse beam を照射したところ、移植後 28 日までに処置をしていない腫瘍と比べ、統計学手有意な発育抑制を認めた(図 2)。

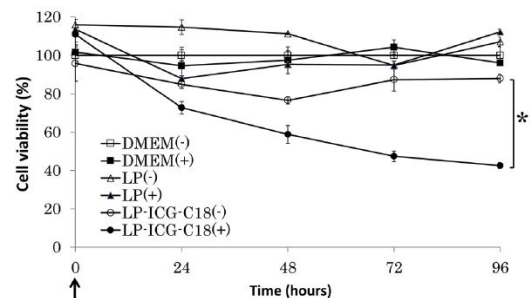


図 1 SCCVII 培養細胞の Viability の推移 (0 = 矢印の時点で近赤外光照射)

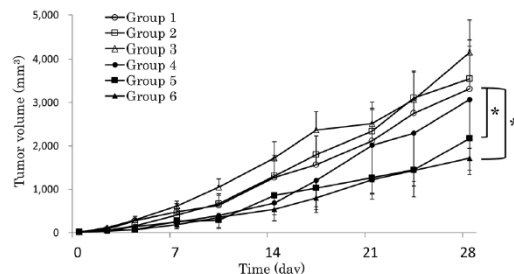


図 2 C3H/He マウス移植 SCCVII 細胞腫瘍の発育曲線 ( が無処置、 が ICG-C18 リポソーム投与群)

(2) ICG-C18 リポソーム作成時に抗腫瘍剤であるシスプラチンをリポソーム内に封入、これを SCCVII 細胞を移植した C3H/He マウスに投与、800nm 近赤外光 pulse beam を照射したところ、ICG-C18 リポソームのみを投与したマウスと比較し、腫瘍の発育抑制を認めた(図3)。

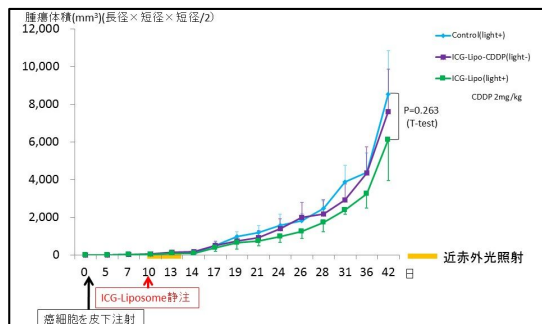


図3 C3H/He マウス移植 SCCVII 細胞腫瘍の発育曲線( が無処置、 が ICG-C18 リポソーム投与群、 が ICG-C18 リポソーム-シスプラチン投与群)

(3) ICG-C18 リポソーム作成時に DNP を添加し内包化し、内包化の効率を吸光度法にて検討したところ、内包化効率は平均 105.7 $\mu$ g/ml であった。この DNP 内包化リポソームに 10 分の 800nm 近赤外光 pulse beam 照射を照射した後、ゲルカラムを用いて遊離 DNP 量を計測したところ、平均 1.6 $\mu$ g、20 分で 3.6 $\mu$ g、30 分で 4.3 $\mu$ g の DNP が検出され、放出効率は 1.5 ~ 4% 程度であった。

(4) ICG-C18 リポソームの近赤外光 pulse beam 照射による内包内容の放出効率及びその機序を明らかにするため、蛍光色素であるリポソーム中にフルオレセインを内包させ、これを塩化コバルト溶液に分散させ近赤外光 pulse beam を照射、照射前後で吸光度の変化を計測した。その結果、照射前と比較し、約 25% (30 秒照射) ~ 60% (300 秒照射) の吸光度の低下 (480nm) を認めた(図4)。

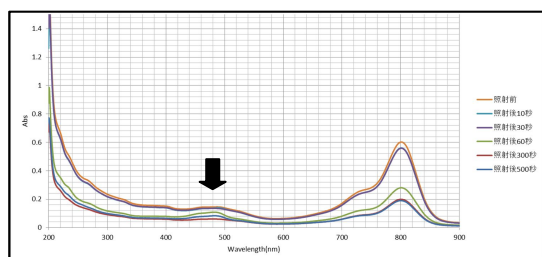


図4 近赤外光 pulse beam 照射前後の吸光度の変化 (矢印がフルオレセインの吸光波長)

しかしながら、分散液の温度が 80 付近まで上昇が見られたため、分散液の温度をモニタリングしながら 40 前後が維持できるよう、断続的な照射を行ったところ、蛍光の消光は全く見られなかった。このことから、現在の設定条件における本リポソームシステムの内包内容放出は、活性酸素の生成によるものはわずかなものであり、主体は溶液の温度上昇によるものと考えられた。

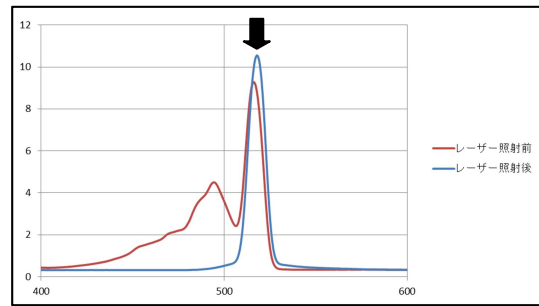


図5 分散液を 40 に保って近赤外光 pulse beam を照射した前後の蛍光強度の変化(矢印がフルオレセインの蛍光波長)

## 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 11 件)

1. Development of a non-blurring, dual-imaging tissue marker for gastrointestinal tumor localization. Hayashi H, Toyota T, Goto S, Oishi A, Gao T, Ee LB, Hatayama H, Nomoto T, Fujinami M, Matsubara H. Surg Endosc (査読有), 29(6) 1445-1451, 2015.
2. Detection of Peritoneal Dissemination with Near-infrared Fluorescence Laparoscopic Imaging Using a Liposomal Formulation of a Synthesized Indocyanine Green Liposomal Derivative. Hoshino I, Maruyama T, Fujito H, Tamura Y, Suganami A, Hayashi H, Toyota T, Akutsu Y, Murakami K, Isozaki Y, Akanuma N, Takeshita N, Toyozumi T, Komatsu A, Matsubara H. Anticancer Res (査読有), 35(3) 1353-1359, 2015.
3. Treatment of near-infrared photodynamic therapy using a liposomally formulated indocyanine green derivative for squamous cell carcinoma. Maruyama T, Akutsu Y, Suganami A, Tamura Y, Fujito H, Ouchi T, Akanuma N, Isozaki Y, Takeshita N, Hoshino I, Uesato M, Toyota T, Hayashi H, Matsubara H. PLoS One (査読有), 10(4) e0122849, 2015.
4. Application of a Novel Near Infrared-Fluorescence Giant Vesicle- and Polymerosome-based Tissue Marker for Endoscopic and Laparoscopic Navigation. Hatayama H, Toyota T, Hayashi H, Nomoto T, Fujinami M. Anal Sci (査読有), 30(2) 225-230, 2014.
5. Near-infrared-fluorescence imaging of lymph nodes by using liposomally formulated indocyanine green

- derivatives. Toyota T, Fujito H, Suganami A, Ouchi T, Ooishi A, Aoki A, Onoue K, Muraki Y, Madono T, Fujinami M, Tamura Y, Hayashi H. *Bioorg Med Chem* (査読有), 22(2) 721-727, 2014.
6. 【獣医学におけるレーザー診療】 ICG-Lipo の化学的・生物学的特性. 菅波晃子, 豊田太郎, 岡崎茂俊, 林秀樹, 岡本芳晴, 田村裕. *日本レーザー医学会誌*, 35(1) 39-45, 2014.
  7. Clinical evaluation of an endoscopic image processing system using estimation of spectral reflectance for detecting gastric mucosal lesions. Sakama A, Zenbutsu S, Inoue M, Nakaguchi T, Tsumura N, Watanabe Y, Horibe D, Kuboshima M, Tsuyuguchi T, Miyake Y, Matsubara H, Hayashi H. *Chiba Medical Journal* (査読有), 89E 21-27, 2013.
  8. 安全で質の高い低侵襲化外科治療をもたらす近赤外蛍光イメージング. 林秀樹, 豊田太郎, 田村裕, 松原久裕. *電子情報通信学会技術研究報告*, MI2013-44 35-40, 2013.
  9. Preparation and characterization of phospholipid-conjugated indocyanine green as a near-infrared probe. Suganami A, Toyota T, Okazaki S, Saito K, Miyamoto K, Akutsu Y, Kawahira H, Aoki A, Muraki Y, Madono T, Hayashi H, Matsubara H, Omatsu T, Shirasawa H, Tamura Y. *Bioorg Med Chem Lett* (査読有), 22(24) 7481-7485, 2012.
  10. 新しい近赤外蛍光色素を用いた消化管腫瘍に対する手術ナビゲーションの開発. 林秀樹, 田村裕, 豊田太郎, 真殿智行, 大内友貴, 後藤翔一, 松原久裕. *映像情報メディカル*, 44(6) 503-509, 2012.
  11. 蛍光色素観察のためのポータブル重畳投影システムの構築. 鈴木拓, 中口俊哉, 大坪誠治, 林秀樹, 草野満夫. *MEDICAL IMAGING TECHNOLOGY* (査読有), 30(4) 165-171, 2012.
- 〔学会発表〕(計 16 件)
1. Detection of peritoneal dissemination with fluorescence laparoscopic imaging using a synthesized liposomal ICG : I. Hoshino, T. Maruyama, Y. Tamura, A. Suganami, H. Hayashi, Y. Akutsu, K. Murakami, Y. Isozaki, N. Akanuma, N. Takeshita, T. Toyozumi, Y. Matsumoto, H. Matsubara. 第 73 回日本癌学会 (パシフィコ横浜, 神奈川検, 横浜市) (2014.9.26)
  2. リポソーム化 ICG を用いた審査腹腔鏡の有用性の検討: 星野敢, 丸山哲郎, 林秀樹, 阿久津泰典, 村上健太郎, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 豊住武司, 高橋理彦, 松原久裕. 第 69 回日本消化器外科学会総会 (郡山市民文化センター, 福島県, 郡山市)(2014.7.18)
  3. センチネルリンパ節同定のための新しい近赤外蛍光リポソームの開発: 大石知, 豊田太郎, 田村裕, 高涛, Lau Bik Ee, 松原久裕, 林秀樹. 第 6 回蛍光 Navigation Surgery 研究会 (神戸国際会議場, 兵庫県, 神戸市) (2013.10.19)
  4. Photodynamic therapy with ICG-liposome for squamous cell carcinoma in mice : T. Maruyama, Y. Akutsu, Y. Tamura, I. Hoshino, Y. Isozaki, N. Takeshita, N. Akanuma, M. Uesato, A. Suganami, H. Hayashi, H. Matsubara. 第 72 回日本癌学会 (パシフィコ横浜, 神奈川検, 横浜市) (2013.10.4)
  5. リポソーム化構造改変 ICG のセンチネルリンパ節同定における有用性の検討: 林秀樹, 大石知, 豊田太郎, 田村裕, 高涛, LauBikEe, 松原久裕. 第 15 回 Sentinel Node Navigation Sugery 研究会 (釧路プリンスホテル, 北海道, 釧路市) (2013.9.21)
  6. ICG-Liposome を用いた食道扁平上皮癌に対する光線力学的療法の開発: 丸山哲郎, 阿久津泰典, 星野敢, 森幹人, 上里昌也, 羽成直行, 菅波晃子, 田村裕, 林秀樹, 松原久裕. 第 68 回日本消化器外科学会総会 (シーガイアコンベンションセンター, 宮崎検, 宮崎市) (2013.7.18)
  7. ICG Liposome を用いた扁平上皮癌に対する光線力学的温熱療法の開発.: 丸山哲郎, 阿久津泰典, 田村裕, 星野敢, 森幹人, 上里昌也, 羽成直行, 菅波晃子, 林秀樹, 松原久裕. 第 113 回日本外科学会 (福岡国際会議場, 福岡県, 福岡市) (2013.4.11)
  8. 独自に開発した ICG-Liposome による扁平上皮癌に対する光線力学的温熱療法の開発: 丸山哲郎, 阿久津泰典, 星野敢, 森幹人, 上里昌也, 羽成直行, 菅波晃子, 田村裕, 林秀樹, 松原久裕. 第 25 回日本バイオセラピー学会 (倉敷市芸文館, 倉敷市, 岡山検) (2012.12.14)
  9. 新しい蛍光色素を用いた低拡散性近赤外蛍光・X線デュアルイメージング組織マーカーの開発: 林秀樹, 松原久裕, 田村裕, 大内友貴, 後藤翔一, 豊田太郎. 第 25 回日本内視鏡外科学会 (パシフィコ横浜, 神奈川検, 横浜市) (2012.12.8)
  10. 新規蛍光色素を用いた低拡散性近赤外蛍光・X線デュアルイメージング組織マーカーの開発: 後藤翔一, 大内友貴, 豊田太郎, 田村裕, 真殿智行, 松原久裕, 林秀樹. 第 5 回蛍光 Navigation Surgery

研究会(京都キャンパスプラザ, 京都府, 京都市) (2012.10.20)

11. ICG-Liposome を用いたマウス扁平上皮癌に対する光線力学療法: 丸山哲郎, 阿久津泰典, 星野敢, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 村上健太郎, 森幹人, 羽成直行, 上里昌也, 菅波晃子, 田村裕, 林秀樹, 松原久裕. 第 71 回日本癌学会 (ロイトン札幌, 北海道, 札幌市) (2012.9.20)
12. 丸山哲郎, 阿久津泰典, 星野敢, 森幹人, 羽成直行, 藤戸寛迪, 菅波晃子, 田村裕, 林秀樹, 松原久裕. 独自に開発した ICG-Liposome による扁平上皮癌に対する光線力学的温熱療法の開発. 第 67 回日本消化器外科学会総会 (富山国際会議場, 富山県, 富山市) (2012.7.20)
13. 低拡散性近赤外蛍光・X線デュアルイメージング病巣マーカーの開発: 林秀樹, 藤戸寛迪, 田村裕, 豊田太郎, 藤浪真紀, 松原久裕. 第 67 回日本消化器外科学会総会 (富山国際会議場, 富山県, 富山市) (2012.7.20)
14. ナノ粒子 ICG-Liposome と光学力学的による扁平上皮癌に対する温熱療法の開発: 丸山哲郎, 阿久津泰典, 星野敢, 森幹人, 羽成直行, 藤戸寛迪, 菅波晃子, 田村裕, 林秀樹, 松原久裕. 第 66 回日本食道学会 (軽井沢プリンスホテルウエスト, 長野県, 佐久市) (2012.6.22)
15. Development of a non-blurring, dual-imaging (X-ray/fluorescence) tissue marker for tumor localization ahead of and during laparoscopic gastrectomy: Hayashi H, Toyota T, Tajima K, Goto S, Yamaoka T, Gao T, Matsubara H. 第 20 回 International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (Brussels, Belgium), (2012.6.20)
16. 近赤外蛍光プローブを用いた消化管腫瘍に対するナビゲーションサージャリー: 林秀樹, 藤戸寛迪, 豊田太郎, 田村裕, 真殿智行, 松原久裕. 第 112 回日本外科学会 (幕張メッセ, 千葉県, 千葉市) (2012.4.13)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tms.chiba-u.jp/div.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀樹 (HAYASHI, Hideki)

千葉大学・フロンティア医工学センター・教授

研究者番号: 20312960

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

豊田 太郎 (TOYOTA, Taro)

東京大学・総合文化研究科・准教授

研究者番号: 8042237

田村 裕 (TAMURA, Yutaka)

千葉大学大学院・医学研究院・准教授

研究者番号: 50263174