

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04637

研究課題名(和文) 近赤外光を用いる光音響法によるがんの生体分子イメージング法と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a cancer-targeted diagnosis-therapy workflow system utilizing photoacoustic effect with near-infrared light

研究代表者

佐治 英郎 (Saji, Hideo)

京都大学・薬学研究科・特任教授

研究者番号：40115853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：臨床利用に優れた性質をもつ近赤外光を利用した光学的手法による、新しいがんの診断・治療ワークフローシステムの構築を目的とした。すなわち、近赤外光を吸収して超音波を発生する光音響効果を示すがん集積型化合物を創製し、それを用いて、体深部のイメージングを可能とする新規光音響診断法、及び、その光音響シグナル発生過程で生じる熱による細胞死滅作用を利用したがん治療法の開発を目指した。その結果、低分子、ポリマー、抗体、金属ナノ粒子を母体とする、強い光音響効果を示す化合物を見出し、また、近赤外光照射により細胞傷害作用を示すに十分な温度上昇を認めたことから、光音響効果を利用したがん診断・治療の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at the establishment of a novel cancer-targeted diagnosis-therapy workflow system by optical approach with near-infrared light suitable for clinical use. Thus, we planned to synthesize cancer-targeted photoacoustic (PA) probes which generate acoustic waves by irradiating near-infrared light, and apply these probes to in vivo PA imaging and cancer therapy utilizing heat generated in the PA wave-generating process. As a result, we succeeded in developing novel in vivo PA imaging probes based on small molecules, polymers, antibodies, and metal nanoparticles with intense PA signals. Furthermore, these probes produced heat enough for cytotoxic effect by irradiation of near-infrared light.

研究分野：放射線科学、物理系薬学

キーワード：分子イメージング 光音響法 近赤外光 光線照射療法

1. 研究開始当初の背景

蛍光プローブを用いる光イメージング法は、他のイメージング法に比して、簡便であること、撮像に要する時間が極めて短いために真のリアルタイムイメージができること、比較的感度が高いことなどの利点がある。そこで、本法は組織切片や小動物を対象とする研究領域では広く用いられている。しかし、一方で、人を対象とする臨床領域へ展開するためには、光は生体透過性が極めて低く、現在用いられているプローブ（蛍光試薬）では体表面およびその近傍しかイメージングできず、体内のより深部までイメージングできる方法の開発が課題となっている。

そこで、本研究ではこの課題を解決するために、光よりも生体組織透過性が高くなるに高い近赤外レーザー光と超音波イメージング法を組み合わせた光音響イメージング、すなわち、図1に示すように、照射されたパルスレーザーによる光エネルギーを吸収した分子（プローブ）が熱を放出し、その熱による周囲溶媒の体積膨張により付随的に発生する音響波（超音波）を検出する方法が有効と考えた。これまでに我々が、生体透過性の高く、生体構成成分による光吸収が少ない近赤外領域に光吸収域を有し、がん組織移行性を示す新規化合物の開発に成功していること（*Nanomedicine*,10:187 (2014)、*Cancer Sci.*, 105:1056 (2014)、*Cancer Med.*, 3:775 (2014)、*J Fluoresc.*, 22:719 (2012)）、また、最近光音響法によるイメージング装置が開発されてきたことから、本研究を着想するに至った。実際、光音響イメージング法は新しい生体イメージング法として注目され、国際的に研究が進みつつあるが、本研究の成果はこの分野を先導し、インビボ光音響イメージングの臨床応用の基盤構築に貢献するものと考えられる。

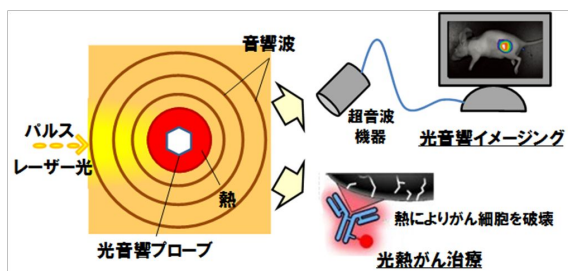


図1: 光音響システムの概要および診断・治療への展開

また、臨床において、診断と治療を別々に行うのではなく、同時に行うことができれば極めて効率的であり、またそれは個別医療を可能とするものとなる。このような観点から、最近、同じ化合物を用いて診断と治療を融合して行うセラノスティック (Therapeutic + Diagnostic) 法の構築が希求されている。そこで、光音響プローブが音響シグナルを示す過程で生じる熱を利用すれば、その熱および熱によって発生する圧力波によりがん細胞を死滅させることが期待できることから、本研究では光音響法の治療への展開をも着想し、上

記のイメージングと合わせて、生体に安全な近赤外光を利用して、がんの診断と治療を同時に達成できる、光音響セラノスティック法の基盤を構築する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床利用に優れた性質を有する近赤外光を利用した光学的手法による、新しい効率的ながんの診断・治療のワークフローシステム（セラノスティック (Therapy + Diagnostic) 法）構築のために、近赤外光を吸収して超音波を発生する光音響効果を生じるがん集積型化合物（分子プローブ）を創製し、それを用いて、現在の光イメージング法の課題である体深部のイメージングを可能とする新規がん分子イメージング法（光音響イメージング法）及び、その光音響シグナル発生過程で生じる熱による細胞死滅作用を利用したがん治療法を開発することにある。これにより、新規分子標的診断・治療法を提供し、がんの診断・治療の発展に寄与し得る。

上記の目的を達成するために、光音響法に基づくがん分子イメージングおよび治療法の構築を以下のように達成する。医薬品化学・計算化学・薬物動態学的な観点から、モル吸光係数が高く、量子収率が低く、強い光音響シグナルを示し（シグナルユニット（図2））、かつがん組織集積性の高いがんイメージングに有効な光音響イメージング分子プローブ（図2）を創製する。合成したプローブについて、担がんマウスを用いて光音響イメージングの可能性を評価する。において高いがん組織集積性および正常組織とのコントラストを示した光音響分子プローブに関して、光照射により生じる熱を利用したがん治療の有効性を、がん細胞移植モデル動物を用いて評価する。



図2: 機能性ユニット結合型分子プローブの設計概念

3. 研究の方法

(1) 新規光音響分子プローブの合成

研究代表者らがこれまでに開発した近赤外蛍光色素 IC7-1-Bu を光音響イメージングに適用するために、強い励起光照射に対する安定性を有するよう、IC7-1-Bu に励起三重項状態クエンチャーである 4-nitrobenzyl amine を導入したプローブ (a) (図3)を設計・合成した。

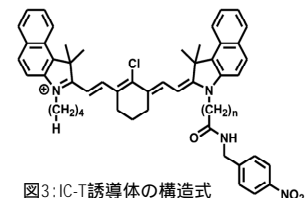


図3: IC-1誘導体の構造式

また、がん標的光音響イメージングプローブの開発にあたり、図2に示されるように、光音響シグナルユニットとして、蛍光色素のひとつであるインドシアニングリーン(ICG)

を選択し、標的認識ユニットとして、(b) モノクローナル抗体(抗 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 抗体; パニツムマブ)や(c) 水溶性ポリマー(ポリエチレングリコール、ポリサルコシン、ポリオキサゾリン)に、適切なリンカーを介して導入したプローブを設計・合成した。さらに、酸化鉄ナノ粒子(IONP)について、それ自体が光音響シグナルを生じることから、(d) IONP に単鎖抗体(抗 HER2 単鎖抗体)を導入したプローブを設計・合成した。

(2) 光音響イメージングプローブとしての有効性評価

(1)で合成した各プローブ(a-d)を担がんモデルマウス(IC-T 誘導体の場合は HeLa 担がんマウス、抗 EGFR 抗体-ICG の場合は A431 担がんマウス、水溶性ポリマーの場合は Colon26 担がんマウス、抗 HER2 単鎖抗体修飾 IONP の場合は N87, SUIT2 担がんマウス)に投与し、一定時間後に光音響イメージング実験を実施した。

(3) 光音響分子プローブのがん治療用薬剤としての可能性評価

(1)で合成した ICG 標識抗 EGFR 抗体について、近赤外レーザー光(808 nm, 2W/cm²)を照射し、温度変化をサーモグラフィにより評価した。

4. 研究成果

(a) 励起三重項状態クエンチャー導入光音響イメージングプローブ

4-nitrobenzyl amine を導入したプローブを合成し、それに近赤外レーザー光を照射した結果、高い光安定性が示され、かつ、HeLa 担がんマウスで腫瘍に高く集積したことから、がんの光音響分子イメージングプローブになり得ることを見出した。本成果は、*J Biomed Opt* 誌に掲載された。

(b) モノクローナル抗体を母体分子とする光音響イメージングプローブ

EGFR に対するモノクローナル抗体(Panitumumab)に ICG を約 3 分子導入した化合物を合成し、EGFR を標的とする光音響イメージングプローブとしての有用性を評価した。EGFR を高発現する、A431 細胞を移植した担がんモデルマウスに化合物を静脈内投与し、インビボ光音響イメージング実験を実施した結果、A431 腫瘍からの光音響シグナルを認めた。また、過剰量の Panitumumab の同時投与により、がん部位からの光音響シグナルは有意に抑制されたことから、EGFR 特異的ながん集積性が示され

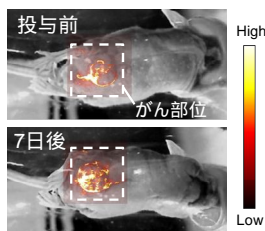


図4: ICG 標識 Panitumumab によるがんの光音響イメージング

た(図4)。

本成果は、*Biochem Biophys Res Commun* 誌に掲載された。

(c) 水溶性ポリマーを母体構造とする光音響イメージングプローブ

医薬品添加剤として頻用される、生体適合性の高いポリエチレングリコール(PEG)の ICG 標識体について、Enhanced Permeability and Retention(EPR)効果を介したがんへの集積性を期待して、光音響イメージングプローブとしての可能性を評価した。分子量の異なる4種類のPEGにICGをそれぞれ約1分子結合させたPEG-ICGを合成し、Colon26 担がんマウスでの体内動態評価および光音響イメージング実験を実施した。その結果、分子量が増大するに従い、がんへの集積量の増加と血中滞留時間の延長を認めた。がん集積量が高く、比較的良好ながん/血液比を示した分子量 20 kDa のPEG-ICGを用いた光音響イメージングでは、がん部位での選択的な光音響信号の増加を認めた。以上より、PEG-ICG は、がんの光音響プローブとして有効であることが示された。本成果は、*J Control Release* 誌に掲載された。しかしながら、血管からも強い光音響シグナルが認められたことから、コントラストの改善が課題として考えられた。

次に、ポリサルコシン(PSar)を用いた検討を実施した。PSarを被膜とするナノ粒子が、がん部位への高い取込みを示すというこれまでの報告(*Biomaterials*:30:5156 (2009))から、PSar 自体のがん組織への能動的な取込み機構の関与が示唆された。そこで、ICG 標識 PSar を設計・合成し、Colon26 細胞への取込みを評価した。その結果、PSar-ICG は PEG-ICG と比較して、添加直後から Colon26 細胞に有意に高く取込まれた。エンドサイトーシス阻害剤を用いた取込み阻害実験により、部分的にマクロピノサイトーシスの関与が示唆された。続いて、Colon26 担がんモデルマウスを用いたインビボ光音響イメージング実験を実施した結果、がん部位を明瞭に描出し、また、PEG-ICG とは異なり、血管からの光音響シグナルが微弱であったことから、高いコントラストのイメージを取得することが出来た。本成果は、*Bioconjugate Chem* 誌に掲載された。

さらに、より高感度ながんの光音響イメージングには、光音響プローブの ICG 結合数とがん/血液比を上げることが望まれる。そこで、水溶性人工高分子ポリオキサゾリン(POZ)がPEGに比べてより多くのICGを結合でき、かつ血液から早期にクリアランスされる可能性があることに着目し、光音響イメージングのための ICG キャリアとしての POZ の有効性を検討した。すなわち、POZ と ICG との結合体(POZ-ICG)について、POZ の分子量、

POZ の側鎖の加水分解割合、および、POZ に対する ICG の結合数が Colon26 担がんマウスでのがんへの集積性に与える影響を検討した。その結果 POZ-ICG は、同等の分子量の PEG-ICG よりも早く血液からクリアランスされ、そのがん集積量は分子量の増大に伴い増加する一方で、加水分解割合の増大と一定数以上の ICG の結合によって低下することを認めた。また、ICG 結合数の増加に伴い、ICG 1 分子あたりの光音響シグナルが増加することを認めた。検討した POZ-ICG 群の中で、がん集積量が高く、PEG-ICG よりも高いがん/血液比を示した POZ-ICG (分子量 50 kDa、加水分解割合 5%、ICG 結合数 7.8 個)を用いた光音響イメージング実験では、がん部位での選択的な信号の増加を認め、またその増加は投与量ならびにがんへの集積量に依存することを見出した。以上より POZ-ICG は、PEG-ICG に比べて多くの ICG を結合でき、がんの高感度な光音響プローブとして有効である可能性が示された。本成果は、*Sci Rep* 誌に掲載された。

(d) 酸化鉄ナノ粒子を母体構造とする光音響イメージングプローブ

IONP は超常磁性金属であり、陰性磁気共鳴 (MR) 造影剤として利用される、生体適合性の高いナノ粒子である。IONP は近赤外領域の波長の光を吸収し、光音響シグナルを生じることが知られていることから、本研究では IONP を光音響シグナルユニットとして選択し、その粒子表面に、がんの悪性度との関わりが知られる EGFR2 (HER2) に対する低分子化抗体 (単鎖抗体) を導入したプローブを設計、合成した。本プローブは、インビトロおよびインビボにおいて、HER2 特異的ながん集積性を示した。また、インビボ光音響イメージング実験において、HER2 陰性がん組織 (SUIT2) と比較して HER2 陽性がん組織 (N87) において有意に高い光音響シグナルを示したことから、HER2 特異的な光音響イメージングプローブとして有効である可能性が示された。本成果は、*Nanomedicine, NBM* 誌に掲載された。

また、上記 (b) で示した、ICG 標識 Panitumumab の溶液に対して、近赤外レーザー光を照射し、その溶液の温度変化をサーモグラフィを用いて評価した。その結果、リン酸緩衝液のみに光照射した場合と比較して、有意に高い温度上昇を認め、それはがん細胞に対して傷害を与えるのに十分であったことから、本プローブを用いた、光音響法に基づく新たながん治療への応用が期待された。

最後に、本研究課題では、高い光安定性を有する低分子光音響プローブを新たに見出すとともに、ICG あるいは IONP を光音響シグナル素子として、抗体や水溶性ポリマー等をキャリア (標的認識ユニット) とする複数

の光音響分子プローブを開発した。また、光音響シグナルの高感度化にも成功し、今後の光音響分子プローブ開発において有益な知見を提供しうる。また、近赤外レーザー光照射により ICG 由来の発熱を認め、これを用いたがん治療の可能性を示した。今後、インビボでの治療実験を進め、新しい効率的ながんの診断 - 治療のワークフローシステム (セラノスティック (Therapy + Diagnostic) 法) を構築していく予定である。

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)

[発表論文]

J Biomed Opt, **20**, 96006 (2015)

S. Onoe, T. Temma, K. Kanazaki, M. Ono, H. Saji.

Development of photostabilized asymmetrical cyanine dyes for in vivo photoacoustic imaging of tumors.

Nanomedicine, NBM, **11**, 2051-2060 (2015)

K. Kanazaki, K. Sano, A. Makino, Y. Shimizu, F. Yamauchi, S. Ogawa, N. Ding, T. Yano, T. Temma, M. Ono, H. Saji.

Development of anti-HER2 fragment antibody conjugated to iron oxide nanoparticles for in vivo HER2-targeted photoacoustic tumor imaging.

Biochem Biophys Res Commun, **464**, 820-825 (2015)

K. Sano, M. Ohashi, K. Kanazaki, N. Ding, J. Deguchi, Y. Kanada, M. Ono, H. Saji.

In vivo photoacoustic imaging of cancer using indocyanine green-labeled monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor.

J Control Release, **226**, 115-123 (2016)

K. Kanazaki, K. Sano, A. Makino, F. Yamauchi, A. Takahashi, T. Homma, M. Ono, H. Saji.

Feasibility of poly(ethylene glycol) derivatives as diagnostic drug carriers for tumor imaging.

Sci Rep, **6**, 33798 (2016)

K. Kanazaki, K. Sano, A. Makino, T. Homma, M. Ono, H. Saji.

Polyoxazoline multivalently conjugated with indocyanine green for sensitive in vivo photoacoustic tumor imaging.

Bioconjugate Chem, **28**, 1024-1030 (2017)

K. Sano, M. Ohashi, K. Kanazaki, A. Makino, N. Ding, J. Deguchi, Y. Kanada, M. Ono, H. Saji.

Indocyanine green-labeled polysarcosine for in vivo photoacoustic tumor imaging.

[学会発表]

World Molecular Imaging Congress 2015

(2015年、9月、Honolulu)

K. Sano, K. Kanazaki, A. Makino, A. Takahashi, F. Yamauchi, T. Homma, H. Watanabe, T. Temma, M. Ono, H. Saji

Development of polyethylene glycol conjugated with indocyanine green as a photoacoustic tumor imaging probe.

第15回放射線医薬品・画像診断薬研究会
(2015年、9月、京都)

金崎健吾、佐野紘平、牧野顕、小野正博、佐治英郎

インドシアニングリーン結合ポリエチレングリコールを母体とした腫瘍診断用光音響プローブの開発

第136回 日本薬学会(2016、3月、横浜)

佐野紘平、大橋愛美、金崎健吾、牧野顕、丁寧、出口諒、金田侑子、小野正博、佐治英郎

光音響腫瘍イメージングのためのインドシアニンググリーン結合ポリサルコシンの開発

第136回 日本薬学会(2016、3月、横浜)

金崎健吾、佐野紘平、牧野顕、本間務、小野正博、佐治英郎

高感度な光音響腫瘍イメージングを目指したインドシアニンググリーン多点結合ポリオキサゾリンの開発

第65回日本薬学会近畿支部総会・大会

(2015年、10月、富田林)

佐野紘平、金崎健吾、丁寧、小野正博、佐治英郎

腫瘍発現分子のインビボ光音響/磁気共鳴デュアルイメージングを目指した酸化鉄粒子を基盤とする分子プローブの創製

第11回日本分子イメージング学会総会・学術集会(2016年、5月、神戸)

佐野紘平、金崎健吾、牧野顕、小野正博、佐治英郎

腫瘍の高感度光音響イメージングを目的としたインドシアニンググリーン多点結合ポリオキサゾリンの開発研究

[特許]

重合体、前記重合体を有する光音響イメージング用造影剤(特願2015-194334)

佐治英郎、佐野紘平、牧野顕、金崎健吾、山内文生、小河賢史、福井樹

[その他]

ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byotai>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐治 英郎 (SAJI, Hideo)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号: 40115853

(2) 研究分担者

小野 正博 (ONO, Masahiro)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号: 80336180

佐野 紘平 (SANO, Kohei)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 00546476

木村 寛之 (KIMURA, Hiroyuki)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 50437240

(3) 連携研究者

渡邊 裕之 (WATANABE, Hiroyuki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 40710786