

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05353

研究課題名（和文）光音響イメージングに必須の近赤外蛍光色素複合化ベタイン型ポリマープローブの創製

研究課題名（英文）Development of betaine-polymer probes conjugated with NIR dyes essential for photoacoustic imaging

研究代表者

近藤 輝幸（Kondo, Teruyuki）

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：20211914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：光音響イメージングは、腫瘍の「形態情報」に加え、腫瘍の低酸素環境や悪性度などの「機能情報」が得られる次世代の生体イメージング法として、臨床現場からの期待が大きい。本研究では、研究代表者が「分子標的 MRI プローブ」として開発した生体適合性に優れ、腫瘍部位に高集積するホスホリルコリンポリマー（PMPC）ナノ粒子プローブを基盤とし、レポーター部位として4種類の近赤外蛍光色素を導入した革新的「光音響イメージングナノ粒子プローブ（NIR-PMPC）」を開発した。最適化した 800RS-PMPC ナノ粒子プローブにより、担癌マウスの *in vivo* 3D 光音響イメージングに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した NIR-PMPC プローブを用いる次世代の「光音響イメージング（PAI）」の実現は、腫瘍の高度画像診断や手術中の画像診断（術中ナビゲーション）への応用に加え、患者の負担軽減、薬物療法の最適化、さらには「がん（悪性腫瘍）」による死亡率の低減と医療費抑制に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：Three-dimensional representation of a tumor with respect to its size, shape, location, and boundaries is still a challenge in photoacoustic (PA) imaging using artificial contrast agents as probes. We carried out PA imaging of tumors in mice using 800RS-PMPC, a highly selective tumor-targeting methacrylate polymer having phosphorylcholine side chains, as a probe. The conjugate 800RS-PMPC forms compact nanoparticles (dDLS = 14.3 nm), retains the biocompatibility of the parent polymer (PMPC) and exhibits unprecedented PA performance. When applied to mice bearing a 6 × 3 × 3 mm<sup>3</sup> tumor buried 6 mm beneath the skin, the probe 800RS-PMPC selectively accumulates in the tumor and emits PA signals that are strong enough to be unambiguously distinguished from noise signals of endogenous blood/hemoglobin. The PA image thus obtained under high-threshold conditions allows 3D characterization of the tumor in terms of its size, shape, location, and boundaries.

研究分野：ナノ粒子造影剤の開発と生体イメージングへの応用

キーワード：光音響イメージング 高分子プローブ 近赤外蛍光色素 ナノ粒子 ベタイン

## 1. 研究開始当初の背景

光音響現象の起源は、1980年に電話の発明で有名な Alexander Graham Bell による論文発表にさかのぼる<sup>1)</sup>。光音響現象は、物質が光を吸収して電子的に励起される過程、電子的励起が熱にエネルギー変換・緩和される過程、熱から音や熱弾性変形などの「マクロな物理現象」に変換される過程、の3つに分けることができる。光音響・熱現象に起因する種々の検出法(光音響法、光熱偏向法、光熱変位法、光熱反射法、光熱放射法、光焦電法)は、図1の様

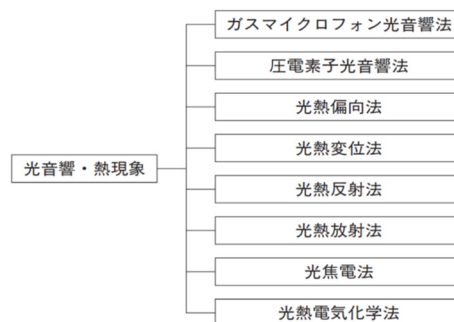


図1. 光音響現象の分類.

様に分類される。最近、光イメージングと超音波イメージングとを融合した“光音響イメージング”(Photoacoustic Imaging, PAI)に、臨床現場から大きな期待が寄せられており、2010年のNature誌にも、次世代のイメージング法として紹介されている<sup>2)</sup>。その原理は、励起光を照射した光吸収体が熱膨張する際に発生する光音響波を超音波として捉える技術である(図2)。

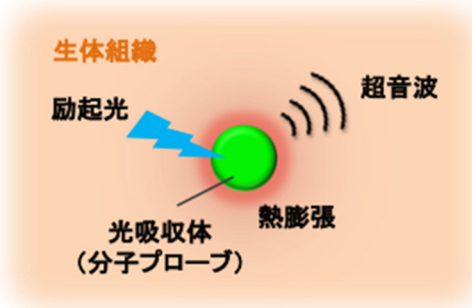


図2. 光音響イメージング (PAI) の原理.

PAIの研究・開発が始まった当初は、生体内には、 $\mu\text{m}$ サイズのヘモグロビンが大量に存在し、PAIに有効な光吸収体であること、および酸素化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの吸・発光スペクトルの波長が異なることから、造影剤を用いることなく、急速に成長する腫瘍部位の「低酸素環境」のPAIによる画像化が可能であると考えられた。

しかしながら、ヒトに対するPAIによる画像化では、表層に近い太い血管しか画像化できないことが明らかになった。すなわち、腫瘍部位で急速に成長する新生血管は細く、光音響信号を発生するヘモグロビンの絶対量が著しく不足しており、PAIによる腫瘍部位の選択的画像化は不可能であることが明らかになった<sup>3)</sup>。従って、PAIによる腫瘍部位の選択的画像化を実現する革新的PAIプローブの創製が急務である。

## 2. 研究の目的

以上の背景の下、本研究では、これまで申請者が推進してきた「生体医工学」研究の成果に立脚した革新的光音響イメージングプローブを創製し、次世代PAIの臨床応用に貢献することを目的とする。

近赤外蛍光色素(Near-Infrared dyes, NIR-dyes)をレポーターとして導入した生体適合性ポリマーナノ粒子は、腫瘍の*in vivo* 蛍光/光音響(Photoacoustic, PA)イメージングに有効なプローブと考えられ、粒径を適切に制御( $\sim 100\text{ nm}$ )できれば、EPR効果(Enhanced Permeability and Retention Effect)により、効率的に腫瘍部位に集積することが期待される。しかしながら、レポーターとして導入した近赤外蛍光色素の疎水性/親水性によるポリマーナノ粒子の物性は、生体内での環境に大きく影響を受けることが予想される。従って、色素を導入していないポリマーナノ粒子の生体内での動態を、リアルタイムで追跡する技術を確立する必要がある。

研究代表者は、これまでに細胞膜脂質の構成要素であるホスホリルコリン基を側鎖に持つホスホリルコリンポリマー PMPC (poly(2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine)) を、安定同位元素である  $^{13}\text{C}$  (および  $^{15}\text{N}$ ) で標識した新規  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC プローブを開発し、分子標的 MRI (Magnetic Resonance Imaging)

法により PMPC プローブの生体内での動態をリアルタイムで直接観測可能であることを明らかにし、報告している(図3)<sup>4)</sup>。

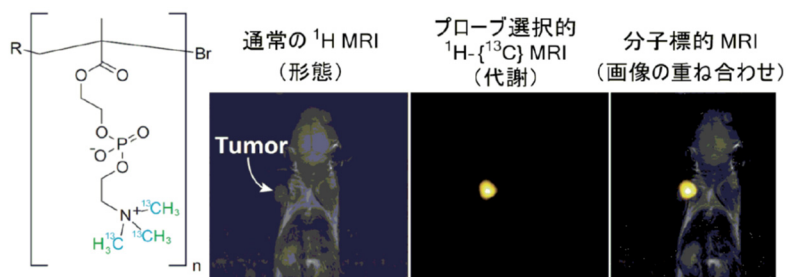


図3.  $^{13}\text{C}$ -PMPC プローブを用いる担癌マウスの分子標的 MRI 画像.

そこで本研究では、PMPC を基盤とする新しい蛍光 / 超音響イメージングプローブの開発に取り組み、疎水性 / 親水性が異なる4種類のシアニン系近赤外蛍光色素 (NIR-dyes) を、それぞれ PMPC のポリマー末端に導入した NIR-PMPC プローブの合成を行う(図4)。続いて、合成した NIR-PMPC プローブについて、まず、粒径と表面電位の測定により、水、緩衝溶液、および生理食塩水中での安定性、およびタンパク質への吸着能、細胞毒性について *in vitro* で評価する。

さらに、担癌モデルマウスに、合成した NIR-PMPC プローブを尾静脈投与し、蛍光イメージングにより、腫瘍集積性と臓器滞留性を *in vivo* で評価する。その結果、最適な NIR-PMPC プローブを選択し、マウス生体深部の微小癌の *in vivo* PAI に対する有効性を明らかにする。

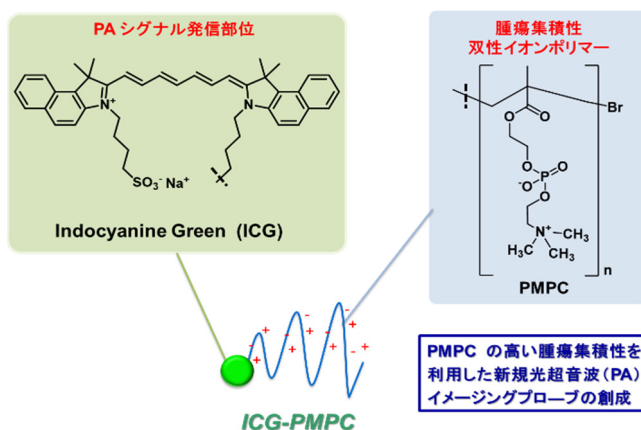


図4. ICG-PMPC の概念図.

なお、腫瘍部位の PAI による画像

化の最大の課題は、先述した内在性のヘモグロビン由来の PA 信号がバックグラウンドノイズとして発生することである。そこで、腫瘍に高集積した 800RS-PMPC プローブからの PA 信号のみを観測し、画像化可能な方法を見出す。

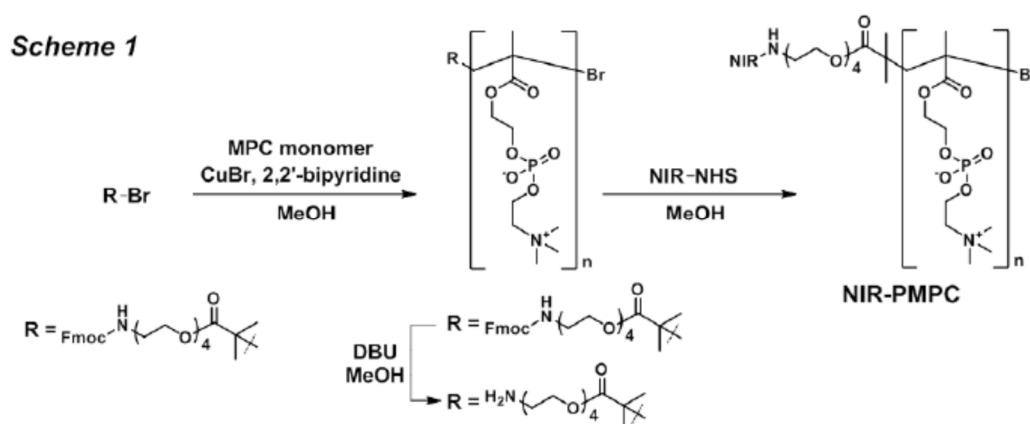
### 3. 研究の方法

2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) の原子移動ラジカル重合 (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP) により、ポリマー末端にアミノ基を有する  $\text{H}_2\text{N}$ -PMPC を合成した。次に、臨床応用されているインドシアニングリーン (ICG)、およびシアニン骨格を有する3種類の親水性に優れた近赤外蛍光色素 (Cy7, IRDye<sup>®</sup> 800RS, IRDye<sup>®</sup> 800CW) のスクシンイミジル誘導体と  $\text{H}_2\text{N}$ -PMPC との縮合反応により、4種類の新しい「近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマーナノ粒子プローブ (ICG-PMPC, Cy7-PMPC, 800RS-PMPC, 800CW-PMPC)」を合成した。ナノ粒子プローブの粒径と表面電位は、動的分散法 (Dynamic Light Scattering, DLS) により測定した。また、水晶発振子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance, QCM) 法により、NIR-PMPC

のウシ血清アルブミン ( Bovine Serum Albumin, BSA ) への吸着能について評価した。さらに、マウス由来の大腸癌細胞 ( colon 26 ) を右肩皮下に移植した表層担癌モデルマウスに、NIR-PMPC をそれぞれ尾静脈投与し ( 20 nmol/mouse )、48 時間後まで経時的にマウス全身の *in vivo* 蛍光イメージングを行い、腫瘍集積性と臓器滞留性を明らかにした。

#### 4 . 研究成果

NIR 色素として、臨床応用されている疎水性のインドシアニンググリーン ( ICG ) に加え、シアニン系の親水性に優れた NIR 色素 ( Cy7, 800RS, 800CW ) を選択した。各色素のスクシニイミジル誘導体と  $\text{H}_2\text{N-PMPC}$  との縮合反応により、4 種類の新規 NIR-PMPC プローブ ( ICG-PMPC, Cy7-PMPC, 800RS-PMPC, 800CW-PMPC ) の合成を行った ( スキーム 1 )。



合成した 4 種類の NIR-PMPC について、動的光散乱法 ( DLS ) により粒径を測定した結果、疎水性の ICG を導入した ICG-PMPC は、会合体 (  $d_{\text{DLS}} = 148 \pm 0.6 \text{ nm}$  ) を形成するのに対し、水溶性のシアニン色素を導入した Cy7-PMPC、800RS-PMPC、800CW-PMPC は、いずれも  $\text{H}_2\text{N-PMPC}$  と同程度の粒径 (  $d_{\text{DLS}} = 12 \sim 16 \text{ nm}$  ) を示し、コンパクトな単量体として存在していることが明らかとなった。これらの DLS 測定による結果は、透過型電子顕微鏡 ( TEM ) 撮影による画像とも良く一致していた。以上の結果より、PMPC 末端に水溶性の近赤外蛍光色素を導入することにより、NIR-PMPC の親水性が向上し、会合体の形成が完全に抑制されることが明らかとなった。

続いて、水晶発振子マイクロバランス ( QCM ) 法により、4 種類の NIR-PMPC の BSA との結合能を評価した。その結果、ICG-PMPC は BSA に強く結合 ( 吸着 ) するのにに対し ( BSA 1.0 mol 当たり  $129 \pm 9.0 \text{ mmol}$  )、親水性の近赤外蛍光色素を導入した 3 種類の NIR-PMPC の BSA への吸着量は、いずれも検出限界以下であった。従って、水溶性の近赤外蛍光色素を導入した NIR-PMPC では、色素部位での親水性の向上により、疎水性を駆動力とするタンパク質への吸着が著しく抑制され、高い生体適合性を有することが明らかとなった。

以上の評価から、最も PAI に有効なプローブとして、800RS-PMPC を選択した。マウス大腸癌細胞 ( Colon 26 ) をマウス右大腿部の皮下深部 ( 6 mm ) に微小担癌したマウスに、800RS-PMPC プローブを尾静脈投与し、投与 2 日後に小動物用の光音響画像化装置を用いて PAI 撮像を行った。その結果、800RS-PMPC プローブが腫瘍部位に選択的かつ効率良く集積していること、および内在するヘモグロビン由来の PA 信号を無視できる画像化条件において、800RS-PMPC プローブが集積している腫瘍の表面部分がホットスポット ( A, B, C, and D ) として観測

されることが明らかになった(図5)<sup>5)</sup>。

さらに、PAI により得られた画像を三次元解析した結果、腫瘍組織の「大きさ」と「形状」の形状(6 × 3 × 3 mm<sup>3</sup>)、および「皮下からの深さ(6 mm の位置)」は、現在、臨床で使用されている磁気共鳴イメージング(MRI)により画像化した腫瘍の「大きさ」と「形状」と「位置」が極めて良く一致していることが明らかになった。また、本プローブの急性毒性はなく(投与時の痙攣、肺塞栓等による死亡はゼロ。)投与濃度における細胞毒性も全く観察されませんでした。

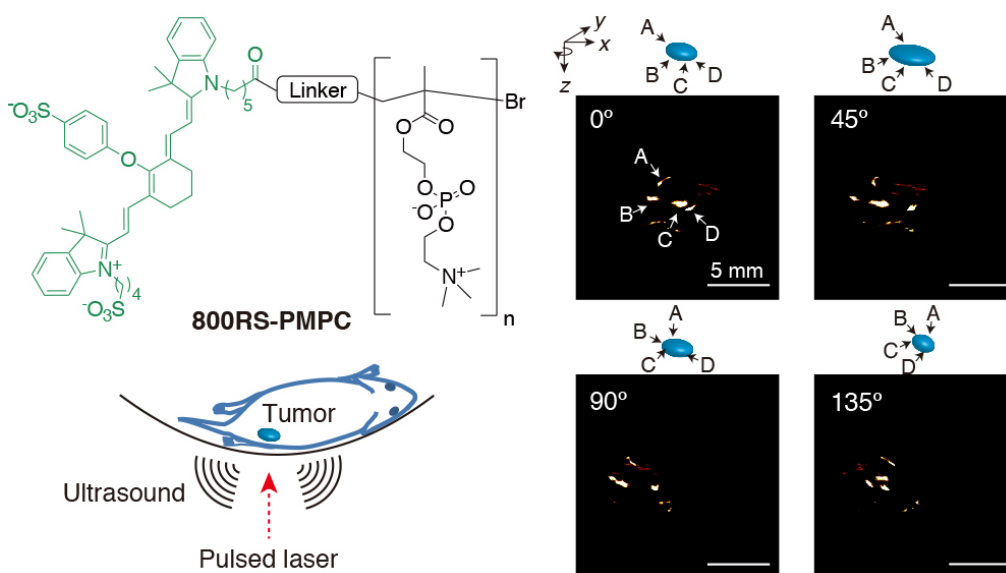


図5 . 800RS-PMPC プローブを投与したマウス腫瘍部位の *in vivo* PA 画像化. (左上)800RS-PMPC の構造. (左下) z 軸方向から光照射した PA 画像化法の概略. (右) z 軸を中心に回転させたマウス腫瘍部位の PA 画像. 上部に腫瘍の形状図を示した.

これまで、腫瘍の「形態」の診断には MRI が、腫瘍の「機能」や「悪性度」の診断には PET を代表とする核医学的手法が主流であった。医学・工学・光学を融合して生まれた「光音響イメージング(PAI)」は、原理的には装置が簡素・簡便であり被曝のリスクもゼロであることから、地域医療の中心を担う小規模病院や診療所でも導入可能である。

本研究で開発した NIR-PMPC プローブを用いる次世代の「光音響イメージング(PAI)」の実現は、腫瘍の高度画像診断や手術中の画像診断(術中ナビゲーション)への応用に加え、患者の負担軽減、薬物療法の最適化、さらには「がん(悪性腫瘍)」による死亡率の低減と医療費抑制に大きく貢献すると思われる。

## 文献

- (1) Bell, A. G. *Manuf. Build.* **1881**, *13*, 156–158.
- (2) Monya, B. *Nature* **2010**, *463*, 977–980.
- (3) Toi, M. *et al. Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41970.
- (4) (a) Yamada H, Hasegawa Y, Imai H, Takayama Y, Sugihara F, Matsuda T, Tochio H, Shirakawa M, Sando S, Kimura Y, Toshimitsu A, Aoyama Y, Kondo T. *J Am Chem Soc.* **2015**, *137*, 799–806; (b) For a review, see: Kondo T, Kimura Y, Yamada H, Aoyama Y. *Chem Rec.* **2017**, *17*, 555–568.
- (5) Yamada, H.; Kondo, T. *et al. Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19363.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umehara Yui, Kageyama Toki, Son Aoi, Kimura Yu, Kondo Teruyuki, Tanabe Kazuhito	4. 巻 9
2. 論文標題 Biological reduction of nitroimidazole-functionalized gold nanorods for photoacoustic imaging of tumor hypoxia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 16863 ~ 16868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9ra00951e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asahi Wataru, Kurihara Ryohsuke, Takeyama Kotaro, Umehara Yui, Kimura Yu, Kondo Teruyuki, Tanabe Kazuhito	4. 巻 2
2. 論文標題 Aggregate Formation of BODIPY-Tethered Oligonucleotides That Led to Efficient Intracellular Penetration and Gene Regulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 4456 ~ 4463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscabm.9b00631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hara Daiki, Umehara Yui, Son Aoi, Asahi Wataru, Misu Sotaro, Kurihara Ryohsuke, Kondo Teruyuki, Tanabe Kazuhito	4. 巻 19
2. 論文標題 Tracking the Oxygen Status in the Cell Nucleus with a Hoechst-Tagged Phosphorescent Ruthenium Complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 956 ~ 962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201700685	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitajima Natsuko, Umehara Yui, Son Aoi, Kondo Teruyuki, Tanabe Kazuhito	4. 巻 29
2. 論文標題 Confinement of Singlet Oxygen Generated from Ruthenium Complex-Based Oxygen Sensor in the Pores of Mesoporous Silica Nanoparticles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 4168 ~ 4175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.8b00811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Hisatsugu, Matsumoto Natsuki, Komaki Takanori, Konishi Hiroaki, Kimura Yu, Son Aoi, Imai Hirohiko, Matsuda Tetsuya, Aoyama Yasuhiro, Kondo Teruyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Photoacoustic in vivo 3D imaging of tumor using a highly tumor-targeting probe under high-threshold conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19363 ~ 13371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76281-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Teruyuki Kondo
2. 発表標題 Ru- and Rh-Catalyzed 1,1-Addition of Organic Disulfides and Diborons to Terminal Alkynes
3. 学会等名 The 2nd JGP Chem & ChemEn International Workshop: Sustainability-Oriented Organic Synthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teruyuki Kondo
2. 発表標題 Ruthenium-Catalyzed Synthesis of Nitrogen-Containing Functional Monomers
3. 学会等名 The 6th AGORA BASF (AGORA DAY) at Kyoto University (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤 輝幸
2. 発表標題 ナノ粒子の化学が貢献する医用生体イメージング～
3. 学会等名 機能性色素部会・エレクトロニクス部会合同 公開講演会「機能分子材料のバイオ医療応用」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤 輝幸
2. 発表標題 生体イメージングに貢献するナノ粒子の化学 ~ 超音響イメージングから未破裂脳動脈瘤のリスク評価まで ~
3. 学会等名 第11回GFRGプロジェクト シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松居悠太、小巻尚紀、山田久嗣、青山安宏、今井宏彦、木村祐、近藤輝幸
2. 発表標題 近赤外色素を導入した13C - 標識ポリマープローブによる腫瘍内活性酸素種のイメージング
3. 学会等名 第14回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松居悠太、山田久嗣、青山安宏、木村 祐、近藤輝幸
2. 発表標題 近赤外蛍光色素を導入した双極性ホスホリルコリンポリマーによる活性酸素種の超音響イメージング
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上知広、山田久嗣、今井宏彦、青山安宏、木村 祐、近藤輝幸
2. 発表標題 新規ホスホリルセリンポリマープローブの合成と化学交換飽和移動(CEST) - MRIによる機能評価
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 村上知広、山田久嗣、今井宏彦、青山安宏、木村 祐、近藤輝幸
2. 発表標題 化学交換飽和移動(CEST)MRIに有効なホスホリルセリンポリマープローブ：側鎖ホスホリル基がCEST効果に及ぼす影響
3. 学会等名 日本化学会第100俊記念会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋理奈、木村祐、孫安生、今井宏彦、松田哲也、近藤輝幸
2. 発表標題 新規腫瘍特異的MRI造影剤としての抗HER2抗体複合化Gd203ナノ粒子の合成とin vitro機能評価
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 第13回 学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北嶋夏子、梅原由衣、孫安生、田邊一仁、近藤輝幸
2. 発表標題 りん光発光性ルテニウム錯体を固定化したメソ孔シリカナノ粒子プローブの開発と機能評価
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 第13回 学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井拓実、梅原由衣、孫安生、木村祐、近藤輝幸
2. 発表標題 腸管免疫細胞へのデリバリーを目指したキトサン修飾リン酸カルシウムナノ粒子の合成
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 第13回 学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小巻尚紀、山田久嗣、木村祐、孫安生、山東信介、青山安宏、近藤輝幸
2. 発表標題 双極性ポリマープローブを用いた腫瘍の蛍光イメージング:イオン対がプローブの体内動態・腫瘍選択性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 第13回 学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤輝幸
2. 発表標題 医学・医療に貢献する「化学の力」
3. 学会等名 第51回有機金属若手の会夏の学校(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松居悠太、山田久嗣、青山安宏、木村祐、近藤輝幸
2. 発表標題 近赤外蛍光色素を導入した双極性ホスホリルコリンポリマーを用いた活性酸素種の光音響イメージング
3. 学会等名 第8回 CSJ化学フェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤輝幸
2. 発表標題 躍進する化学 ~有機合成を基盤とする生体イメージングプローブの開発~
3. 学会等名 平成30年度 北陸地区講演会と研究発表会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松居悠太、小巻尚紀、山田久嗣、青山安宏、木村祐、近藤輝幸
2. 発表標題 近赤外蛍光色素を導入したホスホリルコリンポリマープローブによる腫瘍内活性酸素種の光音響イメージング
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上知広、山田久嗣、今井宏彦、青山安宏、木村祐、近藤輝幸
2. 発表標題 新規ホスホリルセリンポリマーの合成と機能評価
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 近藤 輝幸 (分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 1000
3. 書名 錯体化合物事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学 大学院工学研究科 物質エネルギー化学専攻 基礎物質化学講座 先端医工学分野 (近藤研究室)  <a href="https://www.abe.ehcc.kyoto-u.ac.jp/">https://www.abe.ehcc.kyoto-u.ac.jp/</a></p>
--

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	山田 久嗣  (Yamada Hisatsugu)  (80512764)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・講師    (16101)	

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