

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500406

研究課題名（和文）高分子ナノミセル型インドシアニンググリーンを用いたがん診断・治療技術の開発

研究課題名（英文）Indocyanine-green conjugated micelles for cancer theragnosis

研究代表者

増本 一真 (MASUMOTO KAZUMA)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50464136

研究成果の概要（和文）：

がん組織特異的に集積する光増感剤として、Indocyanine green (ICG)の高分子ミセル化を図った、新しいナノドラッグデリバリー型製剤 (Lac-ICG) を開発し、その光線力学的診断 (Photodynamic diagnosis: PDD) や光線力学的治療 (Photodynamic therapy: PDT) における有用性につき基礎的検討を行った。Lac-ICG の蛍光をイメージングすることにより、Lac-ICG の生体投与後48-72時間で、腫瘍と正常組織とを高いコントラストで識別できた。またLac-ICG を光増感剤として用いてPDTを行ったところ、優れた抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要（英文）：

We developed an Indocyanine-green conjugated micelles (Lac-ICG) as a novel DDS (drug delivery system)-type photosensitizer that can selectively accumulate in cancer tissues. We examined the usefulness of Lac-ICG in photodynamic diagnosis (PDD) and photodynamic therapy (PDT). 48-72h after administration of Lac-ICG into tumor-bearing mouse models, tumors were clearly distinguished from the surrounded normal tissue on the basis of the Lac-ICG fluorescence. In addition, PDT using Lac-ICG exerted excellent anti-tumor effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：ナノ材料創製、医用光・熱工学

キーワード：光線力学的治療、光線力学的診断、高分子ミセル、インドシアニンググリーン、EPR効果、蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

光線力学的治療(PDT)は、光増感剤の光励起に際して産生される活性酸素（主に一重項酸素）を利用した低侵襲がん治療法で、既に臨床応用されている。現在、本邦で保険適用されている光増感剤（フォトフリン®とレザフィリン®）は、正常組織への非特異的集積

に起因する全身副作用（皮膚光線過敏症）を誘発するため、被投与患者は、2～4週間の遮光期間を強いられる。このことは患者QOLの低下と入院日数の不効率を招来するため、PDTは、がん治療法手段として選択されない場合が多く、優れた制がん効果を有するのに普及していない。

一方、光増感剤の光励起時には、光増感剤特異的な蛍光を発する現象が知られており、この蛍光を手がかりにした腫瘍局在診断（光線力学的診断(PDD)）も原理的に可能である。すなわち、PDDとPDTの組み合わせにより、一期的な局所診断・限定治療を実現できる。しかし、現在臨床使用されている光増感剤は、腫瘍への特異的集積度が低く、腫瘍に隣接した正常組織への不可避免的な残留によってPDDは技術的に困難である。したがって、PDT、PDDに関する上述の問題点を克服することのできる、がん組織特異的に集積する光増感剤の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究ではドラッグデリバリーシステム(DDS)機能を有する光増感剤の開発研究を進め、光増感剤としてインドシアニングリーン(ICG)を用いて、高分子ミセルとの融合によるDDS化を図った全く新しいナノDDS型光増感剤を開発する。ICGは、高い一重項酸素産生効率と蛍光発生効率を示す上、近赤外光(~800 nm)励起が可能のため生体深部(~30 mm)病変へのアプローチが期待できる。あわせてICGの生体投与における安全性が確立されている。一方、高分子ナノミセルは、血中滞留性に優れ、がんへのターゲティングに必要とされるサイズ(20 ~ 200 nm)に容易に合成でき、さらに外殻形成高分子鎖の設計自在性によりEPR効果*¹を格段に向上させる。以上の仕組みにより、診断・治療効果を格段に向上させ、副作用のない新規PDT、PDD技術を確立する。

*¹. EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果：がん組織は、正常組織に比べて血管壁の透過性が亢進しており、数十~数百ナノメートルの小孔（ポア）を有する一方で、リンパ系の構築が未発達であるために、高分子物質が集積し、滞留しやすい環境になっている。

3. 研究の方法

(1) 高分子ナノミセル型インドシアニンググリーン (micelle-ICG) の作製（「研究成果」に記載）

(2) micelle-ICG の基本的光学特性の測定：PDD や PDT 機能を発揮できるか否かを判断するため、光学特性（吸収スペクトラム、蛍光スペクトラム）を計測した。

(3) micelle-ICG と近赤外光を用いた腫瘍検知と制がん効果の検証

①micelle-ICG の蛍光を利用した PDD による腫瘍描出能の評価：肺腺癌細胞株 A549 をマウスの背部に移植し、担がんマウスモデルを作製して micelle-ICG または ICG を投与した後、ICG の励起波長である 780nm の光を照射し、蛍光ピークである 810nm のバンドパスフィルターを通過した光を高感度 CCD カメラ (IVIS, PerkinElmer) で検知した。

②micelle-ICG を光増感剤として利用したときの PDT 効果（腫瘍増殖抑制効果）の評価：担がんマウスモデルに対して、micelle-ICG または ICG を投与した後、808nm の半導体レーザーで PDT を実施して、腫瘍体積の経時的変化を測定した。

4. 研究成果

(1) 高分子ナノミセル型インドシアニンググリーン (micelle-ICG) の作製：

疎水基としてポリ乳酸、親水基としてポリサルコシンを基本骨格とするブロック共重合体 (図1の PLLA30-Psar90) の、分子間相互作用により自己組織化によって形成される高分子ミセルに、内核としてポリ乳酸 (図1の PLLA) に ICG を結合させた分子を内包させることで、20—30 nm の粒子構造を呈する micelle-ICG (Lac-ICG) を合成した。

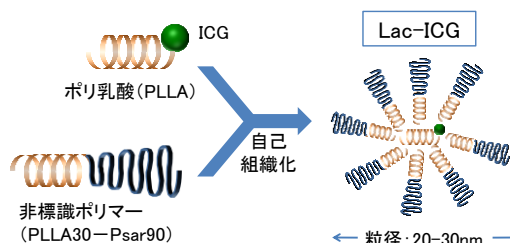


図1. 高分子ミセル型ICG(Lac-ICG)の合成法

(2) micelle-ICGの基本的光学特性の測定：

ICGとLac-ICGの吸光度が等しくなる溶液濃度で、蛍光を測定したところ、Lac-ICGの蛍光強度はICGの約3倍大きいことがわかった。ICG溶液にアルブミンを添加することでICGの蛍光強度が増大することが知られているが、アルブミンを添加した場合でもLac-ICG溶液の蛍光強度はICGよりも大であった。

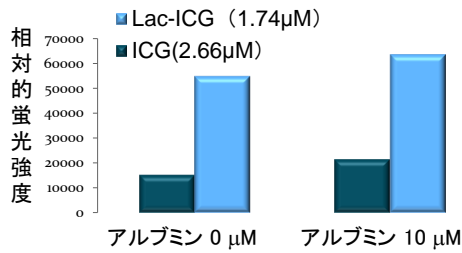


図2. Lac-ICGの蛍光特性

次に、In vivo PDTの実験に向けて、ICGの暗毒性*2を測定した。すなわち、ICGをA549細胞の培地に添加して、24時間後の残存細胞を調べたところ、ICGのLD₅₀は125 μMであった。

*2. 暗毒性：光励起なしの（光照射しない）状況における光増感剤自体の細胞毒性のことで、光増感剤を薬剤と見なした場合の薬剤毒性と同義。

（3）micelle-ICG と近赤外光を用いた腫瘍検知と制がん効果の検証

①micelle-ICGの蛍光を利用したPDDによる腫瘍描出能の評価：

Lac-ICGまたはICGを血中濃度換算で1 μMとなるよう投与した後、ICG蛍光に基づく腫瘍イメージングを行った。その結果、ICG投与マウスでは投与後24時間経つと蛍光が見られなかったが、Lac-ICG投与マウスでは薬剤投与後24時間以降、特に48から72.時間で腫瘍部位が高いコントラストをもって描出され、周辺組織と明瞭に識別できた。他方、ICG単体では、腫瘍をイメージングすることはできなかった。（図3）。

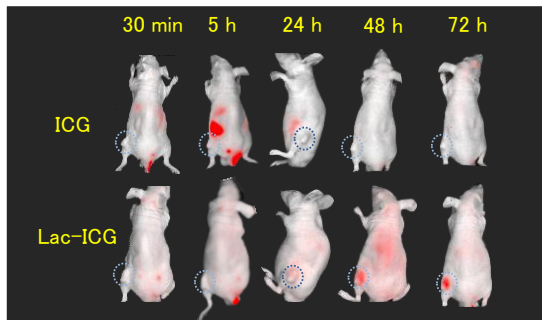


図3. ICG蛍光に基づく腫瘍イメージング

本法によって皮下に存在する腫瘍細胞を非侵襲的に診断することが可能であることが示された。

②micelle-ICGを光増感剤として利用したときのPDT効果（腫瘍増殖抑制効果）の評価：

PDT 効果向上を狙い、新たな Lac-ICG を開発した。すなわち、PDT 用の高分子ミセル型 ICG では、PDD で使用した高分子ミセル型 ICG と基本構造は同じであるものの、内包する ICG 濃度を 15 倍にまで高めた、高分子ミセル型 ICG を構築した（Lac-ICG(H)）。

担がんマウスモデルに対して、Lac-ICG(H) または ICG を血中濃度換算で 30 μM とするよう投与した後、808nm の半導体レーザーで PDT を実施した。

図 4 に、PDT 後の腫瘍体積の経時変化を示す。Lac-ICG(H)を使用した PDT 実施群の腫瘍体積増大率を他の群と比較してみると、対照群の約 1.8 倍、ICG 単体 PDT 実施群の約 1.7 倍の腫瘍増殖抑制効果があることが示された。

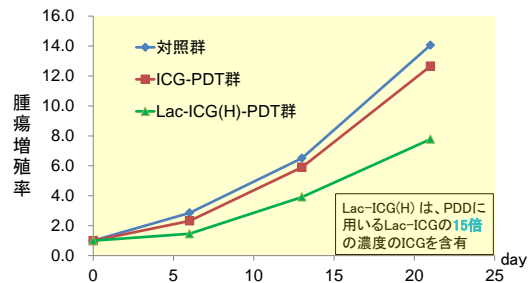


図4. PDTによる腫瘍増殖の抑制効果

結論

本検討によって、Lac-ICG は生体投与 48 ~72 時間で腫瘍は正常組織に対し高いコントラストを示すことがわかった。また、DDS 機能を有する Lac-ICG 使用した PDT は、ICG を用いる場合に比べ約 1.7 倍の腫瘍抑制効果があることが示唆された。これらは Lac-ICG の優れた血中滞留性と EPR 効果によるものと推定される。今後、担がんモデルではなく正所性の腫瘍モデルにおける有用性を検証し、診断・治療の医療技術としての確立を目指していく。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

① 本光恵太、内藤朱美、辻本広紀、守本祐司、高分子ミセル（ラクトソーム）による蛍光イメージング術、第 58 回 防衛衛生学会、

2013年1月31日、東京

② 内藤朱美、本光恵太、辻本広紀、守本祐司、薬物キャリアシステムを搭載した光増感剤による高効率の光線力学療法、第58回防衛衛生学会、2013年1月31日、東京

③ 内藤朱美、本光恵太、辻本広紀、小関英一、四ノ宮成祥、守本祐司、高分子ミセル型インドシアニングリーンでのPDD,PDTにおける優位性、第23回日本光線力学学会学術講演会、2013年6月8日、旭川

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増本 一真 (MASUMOTO KAZUMA)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50464136

(2) 研究分担者

守本 祐司 (MORIMOTO YUJI)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授
研究者番号：10449069

加藤 文度 (KATOU FUMINORI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：60204492

長田 哲次 (NAGATA TETSUJI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60264058