

令和 6 年 6 月 1 2 日現在

機関番号：37401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20516

研究課題名（和文）光感受性物質含有複合脂質膜を用いたがん治療・検出薬の開発に関する研究

研究課題名（英文）Therapeutic and detective effects of hybrid liposomes containing photosensitizers against cancer

研究代表者

奥村 真樹（Okumura, Masaki）

崇城大学・生物生命学部・助教

研究者番号：90965592

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：ハイブリッドリポソーム（HL）にインドシアニンググリーン（ICG）を含有させた HL/ICG のがん細胞に対する治療・検出効果を検討した。また、光感受性物質に励起光を照射することで発生する活性酸素を用いたがん治療（光線力学的療法；PDT）への HL/ICG の応用について検討した。乳がんおよび食道がんに対する HL/ICG の融合・蓄積が観察された。さらに、HL/ICG は HL と同様に乳がん細胞の増殖を抑制し、PDT による追加の治療が可能であることを明らかにした。大腸がんおよび乳がん皮下移植モデルマウスに対する PDT を実施したところ、顕著な腫瘍の縮小が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの死亡者数は増加傾向にあり、副作用のない治療薬の開発が急務である。本研究は、ハイブリッドリポソームのがん選択的な作用を利用した HL/ICG を用いたがん検出や制がん剤としての有用性を明らかにすることで、新たながん診断・治療薬の開発を目指している。本研究結果は、HL/ICG の乳がんや食道がんに対する増殖抑制効果や担がんモデルマウスの腫瘍検出能を明らかにしており、今後の発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the theranostic (detective and therapeutic) effects of HL-containing indocyanine green on colorectal, esophageal, and breast cancer. In addition, the application of photodynamic therapy (PDT) with HL/ICG was examined. Fusion and accumulation of HL/ICG into esophageal cancer (TE-4) cells and breast cancer (4T1-Luc) cells were observed using a fluorescence microscope. Remarkable inhibition of the enlargement was obtained in the model mice treated with PDT after intravenous administration of HL/ICG based on tumor weight.

研究分野：医用生体工学、腫瘍診断・治療学

キーワード：ナノメディシン ナノ粒子 ハイブリッドリポソーム 光線力学的療法 PDT セラノスティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん治療で用いられる抗がん剤は、経済面や副作用が問題となっている。近年、開発が盛んな分子標的薬も例外ではない。そのため、経済性や安全性に優れた新しい治療薬の開発が求められている。

また、腫瘍親和性の高いナノ粒子などを用いて腫瘍を検出・治療を同時に行うセラノスティクス製剤の開発が行われている。セラノスティクス製剤を用いることでがん検出と治療を同時に行え、患者の経済的・身体的負担を軽減することが可能である。

本研究で使用するハイブリッドリボソーム (HL) は、抗がん剤を使用することなく、種々のがんに対してアポトーシスを誘導し、治療効果を発揮することが報告されている。また、生命倫理委員会で承認後の臨床試験において、高い安全性と治療効果が明らかとなっている。

申請者らはこれまでに、HL に近赤外蛍光試薬であるインドシアニングリーン (ICG) を含有した HL/ICG を創製し、大腸がんおよび乳がんに対するがん治療効果や検出効果を明らかにしてきた (M. Okumura *et al.*, *Drug Deliv.*, 25, 1192 (2018)., M. Okumura *et al.*, *Anticancer Res.*, 38, 5645 (2018).)。

これらの研究成果をもとに、本研究では乳がんおよび食道がんに対する HL/ICG のがん検出・治療効果を検討した。さらに、近年注目されている光感受性物質にレーザー光を当て発生した活性酸素による治療を行う光線力学的療法 (PDT) への応用について大腸がんおよび乳がんを検討した。

2. 研究の目的

本研究では、がんに選択的に蓄積する HL の特徴を生かした光感受性物質含有 HL を創製し、がんに対する細胞・動物レベルでの治療・検出効果について研究を行い、副作用の少ない治療法の確立を目的としている。

3. 研究の方法

(1) HL および HL/ICG の調製

HL は、リン脂質 (DMPC) とミセル分子 ($C_{12}(EO)_{25}$) を秤量し、5% グルコース溶液中で超音波照射を行い、 $0.20\mu\text{m}$ フィルターでろ過滅菌したものを使用した。HL/ICG には、上記の DMPC、 $C_{12}(EO)_{25}$ に加えインドシアニンググリーン (ICG) を秤量し、HL と同様の方法で調製した。

(2) HL および HL/ICG のがん細胞に対する増殖抑制効果の検討

HL/ICG ががん細胞に対して HL と同様の制がん効果を有しているか検討するため、食道がん (TE-4) 細胞に対する WST-8 溶液を用いた増殖抑制試験を行った。さらに、アポトーシスの誘導経路の確認のため、DNA 断片化率およびカススペース活性化率についてフローサイトメトリー解析を行った。

(3) HL/ICG のがん細胞への融合・蓄積の観察

HL/ICG の細胞への融合・蓄積について検討するため、蛍光顕微鏡による観察を行った。対照として、HL の素材である DMPC に ICG を含有させた DMPC/ICG および ICG 単体を用いた。細胞をディッシュに播種し、24 時間後に試料を添加した。一定時間後に Hoechst33342 で細胞の核を染色し、蛍光顕微鏡を用いて HL/ICG の融合・蓄積について評価した。

(4) HL/ICG の光線力学的療法(PDT)によるがん治療

HL/ICG の PDT への応用のため、がん細胞に融合・蓄積させた HL/ICG に対して近赤外レーザーモジュールを用いて励起光を照射 (808nm , $100\text{mW}/\text{cm}^2$) した。照射し、一定時間後に WST-8 溶液を用いて細胞生存率の算出を行った。

(5) 担がんモデルマウスに対する HL/ICG の PDT による治療実験

がん細胞を免疫不全マウス (BALB/c-R/J マウス) の後背部皮下に移植を行い、腫瘍の定着後に HL/ICG を尾静脈より投与した。投与の翌日に近赤外レーザーを腫瘍に照射した。投与と照射を 2 週間行い、投与期間中の腫瘍体積の変化および摘出した腫瘍の重量により治療効果を評価した。

4. 研究成果

- (1) 食道がん (TE-4) 細胞および乳がん (4T1-Luc) 細胞に対する増殖抑制試験を実施したところ、HL および HL/ICG は DMPC と比較して有意に低い濃度で増殖を抑制した。HL と HL/ICG の 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) を比較したところ、ほぼ同様の濃度であったことから、HL/ICG は HL と同様の制がん効果を有していることが示された。さらに、HL は TE-4 細胞に対して濃度依存的に DNA 断片化率を上昇させることが明らかとなった。アポトーシス実行因子であるカスパー-3,-8,-9 の活性化率を解析したところ、HL で処理した TE-4 細胞で有意に活性化率が上昇していた。
- (2) TE-4 細胞および 4T1-Luc 細胞に対する HL/ICG の融合・蓄積について、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。TE-4 細胞および 4T1-Luc 細胞を HL/ICG を添加したところ、ICG の蛍光が強く観察され、HL/ICG が融合・蓄積していることが示された。TE-4 細胞では、対照群である DMPC/ICG や $C_{12}(EO)_{25}/ICG$ 、ICG 単体において蛍光はほとんど観察されず、HL/ICG の優れた腫瘍選択性を示唆している。
- (3) 4T1-Luc 細胞に対する HL/ICG の光線力学的療法 (PDT) による増殖抑制効果を検討した。HL/ICG を添加した 4T1-Luc 細胞に励起光を照射 ($100mW/cm^2$, 1,3 min) したところ、未照射と比べ照射時間に依存して細胞生存率の低下が得られた。
- (4) 4T1-Luc 細胞皮下移植モデルマウスに対する HL/ICG の PDT による治療実験を実施した。対照群には、5% グルコース (Control) および HL を投与した。治療の経過期間中にマウス体重の減少はみられなかった。腫瘍体積においては、HL/ICG-PDT 群において有意に腫瘍体積が抑制することができた。摘出した腫瘍の重量を測定したところ、HL/ICG-PDT 群の腫瘍重量は Control, HL/ICG (未照射) 群と比べて有意に低かった。
- (5) 大腸がん (HCT116) 細胞に対する HL/ICG の PDT による治療を *in vitro* および *in vivo* で試みた。HCT116 細胞に HL/ICG を添加して近赤外レーザーを照射したところ、未照射と比較して有意に細胞生存率の低下が得られた。また、HL に近赤外レーザーを照射した細胞と比較しても生存率は有意に低下していた。さらに、HCT116 細胞皮下移植モデルマウスを作成し、HL/ICG の PDT を実施したところ、Control 群と比較して顕著な腫瘍重量の減少が明らかとなった。摘出した腫瘍を切片化し、酸化ストレスに関する免疫染色の観察の結果、PDT を実施した腫瘍に酸化ストレスによる障害を受けた細胞が多数観察された (M. Okumura *et al.*, *J. Carcinog. Mutagen.*, 13, 1000395-1 (2022).)。

以上の結果をまとめると、HL/ICG は食道がん細胞および乳がん細胞に対して選択的に融合・蓄積し、HL と同様の増殖抑制効果を示した。さらに、乳がんおよび大腸がん融合・蓄積した HL/ICG に励起光を照射することで HL よりも細胞生存率や腫瘍重量の低下が確認された。

これらの結果は、HL/ICG が大腸がん、食道がん、乳がんに対する新たなセラノスティクス製剤としての可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hideaki Ichihara, Masaki Okumura, Yoko Matsumoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Photodynamic Therapy Effects of Hybrid Liposomes Including Indocyanine Green against a Xenograft Mouse Model Mice of Colorectal Cancer in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 1000395-1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35248/2157-2518.22.13.395	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11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 香月勇紀、宮本英、奥村真樹、市原英明、松本陽子
2. 発表標題 インドシアニングリーン含有ハイブリッドリポソームによる光線力学療法
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋純女、奥村真樹、市原英明、松本陽子
2. 発表標題 トレハロースリポソームの脳腫瘍に対する治療効果
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋田武龍、奥村真樹、市原英明、松本陽子
2. 発表標題 インドシアニンググリーン含有リポソームによるがん治療および非侵襲診断薬の開発
3. 学会等名 化学工学会 第53回秋季大会
4. 発表年 2022年

1．発表者名 Masaki Okumura, Keiji Kuwabara, Hideaki Ichihara, Yoko Matsumoto
2．発表標題 Trehalose liposomes induce apoptosis for glioblastoma cells via a caspase-independent pathway
3．学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4．発表年 2022年

1．発表者名 橋田武龍、奥村真樹、松本陽子、市原英明
2．発表標題 インドシアニングリーン含有リボソームの光線力学的療法による乳がん治療に関する基礎研究
3．学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4．発表年 2023年

1．発表者名 橋本友也、田端 拓実、奥村真樹、松本陽子、市原英明
2．発表標題 胆管がんに対する新規カチオンリボソームの制がん効果
3．学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4．発表年 2023年

1．発表者名 高井洵奈、香月勇紀、奥村真樹、松本陽子、市原英明
2．発表標題 ハイブリッドリボソームを用いた食道がんの光線力学的療法に関する基礎研究
3．学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4．発表年 2023年

1．発表者名 橋田武龍、奥村真樹、松本陽子、市原英明
2．発表標題 インドシアニングリーン含有リボソームの光線力学的療法による転移性乳がんの治療に関する基礎研究
3．学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 橋本友也、奥村真樹、松本陽子、市原英明
2．発表標題 胆管がんに対する新規カチオンリボソームを用いた治療薬の開発
3．学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 高井洵奈、奥村真樹、松本陽子、市原英明
2．発表標題 光感受性物質含有リボソームの食道がんに対するセラノスティクスに関する基礎研究
3．学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 Masaki Okumura, Yoko Matsumoto, Hideaki Ichihara
2．発表標題 Photodynamic therapy of hybrid liposomes including indocyanine green against metastatic breast cancer
3．学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4．発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

崇城大学 研究業績データベース
<http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp/k03/resid/S000442>

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

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