

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10175

研究課題名(和文) インドシアニングリーン・ラクトソームを用いたがん診断・治療技術の開発

研究課題名(英文) Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosome exerts antineoplastic effects for hepatocellular carcinoma

研究代表者

松井 康輔 (MATSUI, Kosuke)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：40460828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：最近になり、多くの抗癌剤や術式が開発されているが、肝細胞癌患者の予後改善には不十分である。このため、肝細胞癌に対する新たな診断、治療が予後改善のために必要とされている。光感受性物質である ICG は近赤外線による励起により蛍光を発生し、光線力学療法のためにも用いられる薬剤である。今回の研究では、ラクトソームと呼ばれるナノキャリアを用いて、腫瘍特異的に ICG を集積させ、肝細胞癌に対する診断能及び PDT による治療効果を調査し、その結果、有意な腫瘍蓄積性と抗腫瘍効果を認める事が出来た。

研究成果の概要(英文)：Anticancer agents and operative procedures have been developed in patients with hepatocellular carcinoma (HCC), but the prognosis remained poorly. It is necessary to develop the novel diagnosis and therapy for HCC and to improve its prognosis. Lactosome is core-shell type polymeric micelle. By enclosing a labeling agent or an anticancer agent in this, it enables drug delivery. In this study, we investigated the diagnostic and therapeutic efficiencies of indocyanine green (ICG) loaded lactosome in near-infrared fluorescence (NIF) imaging and photodynamic therapy (PDT) for HCC.

Results demonstrated that ICG lactosome was accumulated in the tumors in implanted animals and PDT had antineoplastic effects. NIF imaging and PDT with ICG lactosome can be useful as a novel diagnostic and therapeutic agent for HCC.

研究分野：消化器外科

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 光線力学療法 肝細胞癌 インドシアニンググリーン

### 1. 研究開始当初の背景

肝癌は日本で4番目に多い癌腫であり、他癌腫に比べて生存率が低く、再発率が高い。予後は悪く、5年生存率はstageで約50%、stageでは10%に満たない。このうち、肝細胞癌は肝癌の約90%を占め、肝細胞癌に対する治療診断の発展は臨床的に大きな意義があり、新たな診断治療分野の開発が望まれている。通常、肝細胞癌の診断方法は、血液検査、超音波検査、CT、MRI、血管造影検査が施行される。また、手術に際しては根治切除のために手術中の癌局在診断が重要となる。インドシアニングリーン(以下ICG)は通常、肝予備能を測定する際に用いられる薬剤であり、日常臨床で使用されている。また近赤外線(760nm~800nm)で蛍光を発する特性を有しており、静脈やリンパ管投与し、冠動脈バイパス手術時の血流評価や乳癌のセンチネルリンパ節生検などにも臨床応用されている。さらに、胆汁排泄性を有し、術中に肝細胞癌の局在を診断する方法(ICG蛍光法)や胆管造影などを行う事も出来る薬剤である(Surgery 150:91-8;2011 Kaibori M)。しかし、この従来のICG蛍光法による肝細胞癌診断は肝細胞癌組織の分化度や非癌部肝組織の線維化によって、ICGの集積様式は多様であり、癌に対する診断的位置づけは不安定である。実際に我々は臨床において、これまでに肝癌切除標本を用いて以下の結果を獲得している。1)非癌部組織の線維化が軽度である場合にはICGは肝癌組織に集積せず非癌部優位に集積する(図1)。2)逆に非癌部組織の線維化が高度である場合(肝硬変)にはICGは肝癌組織に優位に集積し、非癌部への排泄は低下する。(図2)(Kaibori M, et al. Evaluation of fluorescence imaging with indocyanine green for an intraoperative cancer navigation in hepatocellular carcinoma; under article submission)

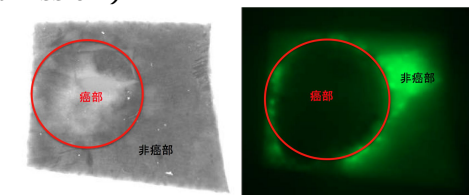


図1

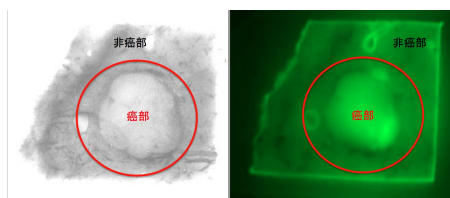


図2

これに対してICG標識ナノ粒子(以下ICGラクトソーム)は、粒径を30nmに調整したラクトソームと呼ばれる物質をナノキャリアとしてICGを標識したものである。ICGラクトソームは、その調整された粒径により

癌組織周辺の血管透過性亢進部から漏出し、その場で滞留するEPR効果(Enhanced Permeability and Retention effect)を生じる。このため、非癌部の状態に影響されことなく癌部に安定して集積することが可能となり、肝細胞癌だけでなく、他の腫瘍全般に対してICGラクトソーム蛍光法による診断が可能となる。

次に肝細胞癌の治療法について、その方針は(1)手術療法、(2)経皮的局所療法、(3)肝動脈塞栓術が主体となる。このうち手術療法に関しては「癌の血管侵襲」、「主腫瘍よりの肝内転移」そして「切除断端部の癌遺残」を正確に手術中に診断し、手術により癌組織を確実に取り切れるかが極めて重要である。このため、ICGラクトソームによる術中局在診断の精度が上昇することの意義は極めて大きい。また、肝細胞癌は術後5年以内の再発率が約80%と高く、上記の治療法を患者の肝予備能や併存疾患有無などの全身状態に応じて組み合わせることで繰り返し行われているのが現状である。このためICGラクトソームにより微小な再発部位を的確に検出し、同部へのpin pointな治療の開発の必要性は非常に高いと考える。そこで我々が着目したのが光線力学療法である。これは光感受性物質を投与し、その後特定の波長の光を当てることで癌細胞を殺傷する治療法である。ICGが光感受性物質としての特性を持つことから、ICGラクトソームによる安定した腫瘍への薬剤集積が得られれば、肝癌に対する光線力学療法(Photodynamic Therapy; PDT)の一定の治療効果が期待できると考えられる。

### 2. 研究の目的

前述のごとく、肝癌の診断治療は近年発展し、死亡率は減少傾向であるが、再発治療抵抗性肝癌には新たな診断治療の発展が望まれる。我々が検討するICGラクトソームは、ラクトソームをナノキャリアとして近赤外蛍光材ICGを標識したものである。EPR効果から癌部に集積し、従来のICG蛍光法よりも的確に癌の局在診断を可能とする。また癌部に集積したICGに対して光線力学療法PDTを行うことにより抗腫瘍効果も獲得できる。今回、ICGラクトソームの癌診断及び治療効果を検討し、再発治療抵抗性肝癌への新たな治療法開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)ヒト肝細胞癌同所移植マウスを用いてin vivoでのICGラクトソームの集積様式を比較検討した。モデル作成としては、マウスに対して吸入麻酔を行い、左鼠径部にDMEN100 $\mu$ lに溶かしたHuh-7細胞(ヒト高分化型肝細胞癌)5 $\times$ 10<sup>6</sup>を皮下注射した。そして、打ち付け約3週間後、腫瘍サイズが50-1000mm<sup>3</sup>の時点で各々の実験を行った。イメージング  
モデルマウスの尾静脈よりICG0.2mg/mlを

有した ICG ラクトソーム 20mg/ml (ラクト群 5 匹) または通常の ICG 0.2mg/ml (ICG 群 5 匹) を 100  $\mu$ l 投与した。その後、マウスを吸入麻酔で鎮静し、0, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 144h 後にイメージングを行なった。イメージングは IVIS システムを用いて行なった。マウスに植え付けた腫瘍に対して 780nm の励起光を照射し、845nm のフィルターで蛍光を得た。さらに腫瘍部位と非腫瘍部位の光量を測定し比較検討した。

(2) ICG ラクトソームを用いた光線力学療法の抗腫瘍効果を *in vitro* にて検討した。

細胞は同じく Huh-7 を使用し、96 穴のプレートに  $2 \times 10^4$  cells / 100  $\mu$ l DMEN ずつまき、その後、24 時間培養した。プレートはコントロール群、レーザー単独群、ICG ラクトソーム単独群、PDT 群の 4 つにグループ分けした。次の日、コントロール群とレーザー群は PBS に交換、ICG ラクトソーム単独群と PDT 群は 2mg/ml の ICG ラクトソームと交換した。そしてレーザー群と PDT 群は  $810 \pm 10$  の近赤外線光を照射した。レーザーの出力は 190mW/ $\text{cm}^2$  で 95 秒、340 mW/ $\text{cm}^2$  で 55 秒の 18J/ $\text{cm}^2$  当てるものと、190 mW/ $\text{cm}^2$  で 525 秒、340 mW/ $\text{cm}^2$  で 300 秒の 100J/ $\text{cm}^2$  当てるものの計 4 パターンを照射した。照射の間、溶液の温度変化をサーモカメラで測定した。照射の後は、それぞれの溶液を新しい培養液に交換し、0~96 時間培養し、顕微鏡にて細胞形態を観察し、細胞障害度を MMT assay にて測定し比較した。

(3) ヒト肝細胞癌同所移植マウスを用いて *in vivo* での光線力学療法の抗腫瘍効果を比較検討した。マウスを吸入麻酔で鎮静し、ICG ラクトソーム又は ICG を 200  $\mu$ l、マウス尾静脈より静脈注射した。そして、投与 48 時間後に ADL-15 を用いてレーザー照射を行なった。プローベはマウス腫瘍の 1cm 直上に固定した。照射パワー密度は 500 mW/ $\text{cm}^2$ 、照射時間は 200 秒とした。PDT 加療中のマウス腫瘍の温度はサーモカメラで測定した。治療後、腫瘍サイズとマウス体重を 2 日おき、8 日まで測定した。腫瘍サイズについては、長径  $\times$  短径 2 乗  $\div$  2 の公式で類推し比較した。

#### 4. 研究成果

##### 結果

##### イメージング

ICG 投与マウスでは投与直後から肝への著明な蛍光集積を認めた。その後 1 時間後、3 時間後、6 時間後と、胆汁排泄された ICG が腸管へと流れる様子が観察できた。24 時間後にはほとんどが体外に排出されたが、わずかに腫瘍への集積を認めた。腫瘍部位と対側の鼠径部の光量を測定し比較したところ、両者の間では有意差は得られなかった。次に ICG-Lactosome 投与マウスでは、投与直後から体全体に蛍光集積が観察された。24 時間後になると腫瘍部への集積が観察され、周囲背景組織に比べても優位な集積であった。48、

72 時間後も集積は継続し、1 週間後には正常組織からはほとんど ICG-Lactosome は排泄され、腫瘍部位のみ集積が継続した。腫瘍部位と対側の鼠径部の光量を測定し比較したところ、両者の間では有意差が認められた。

##### Vitro PDT

ICG ラクトソーム群では形態的な明らかな変化を認めた。細胞の形状は円形で、液面状に浮いており、その数も明らかに少なかった。しかし、これ以外の群に関しては明らかな変化は認められなかった。

MTT-1 の結果では、明らかな違いを認めた。

18 J/ $\text{cm}^2$  まで照射した PDT 群では、有意差は認めなかったが、100J/ $\text{cm}^2$  まで照射した PDT 群ではコントロール群、ラクトソーム単独群、レーザー単独に比して照射直後で著明な細胞障害性を認めた。24 時から 96 時間の経過でも 100J/ $\text{cm}^2$  まで照射した高出力及び低出力 PDT 群は細胞活性が低いままであった。その他の群は、徐々に増加する傾向であった。統計学的にも 100J/ $\text{cm}^2$  まで照射した高出力及び低出力 PDT 群は他の群と比較して有意差を認めた。温度では、PDT 群ではいずれも温度の上昇が観察された。このうちハイパワーで照射したものとローパワーで照射したものはそれぞれ傾きが等しく、100J/ $\text{cm}^2$  まで照射したものでは、ハイパワー照射で最大 45.5 度、ローパワーで最大 42.0 度まで上昇を確認した。一方、それ以外の群では温度上昇は観察されなかった。

##### In vivo PDT

ICG 群の平均腫瘍体積は 0 日から 14 日で 176.6 から 1373.5  $\text{mm}^3$  と著明な成長を認めた。これとは対照的に、ICG ラクトソーム群では 162.9 から 542.8  $\text{mm}^3$  と緩徐な成長であった。両群での腫瘍サイズには有意差を認めた。腫瘍部の温度測定では、ICG 群では 43.8~49.3 度までの上昇、ICG ラクトソーム群では 50.8~53.9 度の温度上昇が観察された。両群を比較すると、有意差をもって、ラクトソーム群の温度が高かった。

##### 病理

ICG ラクトソーム群では ICG 群に比べて、HE 染色では壊死範囲が広く、TUNEL 染色ではアポトーシスが多く観察された。

##### 考察

今回の実験ではラクトソーム投与群で腫瘍への有意な集積を観察する事ができ、肉眼的な腫瘍部位の同定も容易であった。また、*in vitro* 及び *in vivo* での PDT 実験では ICG ラクトソーム投与群において明らかな腫瘍発育抑制効果を認めた。

これらの結果は、ICG がラクトソームによって選択的に腫瘍に蓄積した結果と考える。ICG ラクトソームは EPR 効果により HCC だけではなく、その他の腫瘍にも選択的に蓄積することが出来る。ICG ラクトソームを用いれば、我々は蛍光イメージングや PDT を用いて様々な腫瘍を診断治療することが可能となる。ICG を用いた PDT による腫瘍抑制効果の

機序としては、光化学反応にて生じる温熱効果、一重項酸素、ICG 分解産物の影響があるとされている。試験管内での温度実験の結果では、細胞障害性が確認された 100J/cm<sup>2</sup>までの照射群で、温度上昇はハイパワー、ローパワー共に 42 度以上の温度上昇を観察した。これは、腫瘍細胞を障害するに足る温度であった。また、同様に、生体での PDT の実験でも、ICG ラクトソーム投与群では有意な温度上昇が観察された。以上の結果より、今回の実験で、腫瘍抑制に対して温熱効果の作用は大きいものと考えられる。今回の実験では、腫瘍発育を抑制は出来たが、治癒する事は困難であった。また、条件によっては熱傷を伴うマウスも認められ、今後は薬剤投与量や、近赤外線照射量の最適化を行なう必要はあると考えられる。結論としては、ラクトソーム ICG を用いた蛍光イメージング及び光線力学療法は肝細胞癌診療において、新たな診断、治療の一助となると考えられる。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takumi Tsuda, Masaki Kaibori, Hidehiko Hishikawa, et al. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosome has antineoplastic effects for hepatocellular carcinoma. PLoS One. 査読有り 2017 Aug 31;12(8):e0183527. doi: 10.1371/journal.pone.0183527. eCollection 2017.

〔学会発表〕(計 1 件)

津田 匠、インドシアニングリーン・ラクトソームを用いた肝細胞癌診断・治療の検討、第 37 回 日本レーザー医学会総会、2016 年〔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〕

特に無し

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

松井 康輔 ( MATSUI, Kosuke )  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40460828

(2)研究分担者

海堀 昌樹 ( KAIBORI, Masaki )  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30333199

(3)連携研究者

小関 英一 ( OZEKI, Eiichi )  
島津製作所  
研究者番号：30192529

(4)研究協力者

津田 匠 ( TSUDA, Takumi )  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00580440