

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16405

研究課題名(和文) 関節リウマチモデルマウスにおける光線力学療法による関節炎抑制

研究課題名(英文) Suppression of arthritis by photodynamic therapy in rheumatoid arthritis model mice.

研究代表者

大西 信三 (Onishi, Shinzo)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：00633190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1、RAマウスの足関節炎に、ICGラクトソーム(ICGL)を用いた光線力学療法を行った。ICGLは2mg内にICG 30nmol/mg内包したものを使用した。レーザー照射は125mW/cm²、総照射エネルギー密度は75.2J/cm²とした。壊死細胞評価はTUNEL染色を用いた。光線力学療法群とcontrol群では陽性細胞数に有意差を認められた。2、ICGL投与量において5mg、10mg、20mgで検討した。20mgは皮膚びらんが出現し、5mgは蛍光輝度低下し、複数回照射には10mgが最適と判明した。3、複数回照射では2回の照射で体内のICGL量が大きく低下し、3回の照射でほぼ消失した。

研究成果の概要(英文)：1. Photodynamic therapy using ICG lactosomes (ICGL) was performed toward ankle joint arthritis in RA mice. ICGL contained ICG 30 nmol / mg in 2 mg. The laser irradiation was 125 mW / cm², and the total irradiation energy density was 75.2 J / cm². TUNEL staining was used for necrotic cell evaluation. There was a significant difference in the number of positive cells in the photodynamic therapy group compared with the control group. 2. In ICGL dosage, we compared with 5 mg, 10 mg, 20 mg. In 5 mg decreased fluorescence luminance was seen after irradiation compared with 10mg and 20mg. But in 20mg, Skin erosion appeared. So 10 mg was suit for multiple irradiation. 3. In multiple irradiation, ICGL amount in the body was greatly decreased by two irradiations, and almost disappeared by three irradiations.

研究分野：orthopedics

キーワード：photodynamic therapy ICG Lactosome ICG arthritis nano particle

1. 研究開始当初の背景

(1)光線力学的療法(photodynamic therapy; PDT)

光線力学療法とは、腫瘍親和性光感受性物質が有する腫瘍組織・新生血管への特異的な集積性(Enhanced Permeation and Retention: EPR効果)と、光エネルギーを吸収して励起する事によって生じる一重項酸素の細胞破壊効果を併用し、腫瘍組織を選択的に死滅させる治療法である。1979年に Dougherty らが乳癌に対して始めて以来、多くの研究がなされている。

(2)EPR効果と近赤外線蛍光イメージング

EPR効果とは、径10~200nmのナノ粒子が増殖の速い腫瘍組織の間質腔に、透過性が異常に亢進した毛細血管より漏出・蓄積する現象である。このEPR効果と、800~1000nmの近赤外線は生体透過性が良好で、近赤外蛍光を発する薬剤を生体内投与したのち表面から可視化できることを利用し、ICGが術中診断として臨床使用されている。しかしICGは代謝が早く、画像化は困難であった。

(3)近赤外線蛍光イメージングの新たなキャリア「ラクトソーム」

島津製作所の開発したラクトソームは直径30nmのナノ粒子である。このラクトソームをICG標識することで、体内に長時間滞留させ、腫瘍イメージングが可能となった。

(4)関節炎への応用

RAモデルマウスの関節炎はIL-6, IL-1, TNF等のサイトカインによって血管透過性亢進が起こり、腫瘍同様にイメージングが可能で、ICGより有用であることをこれまで確認した。

2. 研究の目的

ICGラクトソームによる光線力学療法

ICGラクトソームに波長810nmの近赤外光を照射し励起させると、光線力学反応により細胞毒性のある一重項酸素や分解産物が生じる。ICGラクトソームの励起光は現在認可されているポルフィリン系化合物(650nm)より長波長帯にあり、生体への深達度大きい(20~40mm)、遮光の必要が無い、という利点を持つため、体外照射による低侵襲な光線力学療法が可能となる。

ICGラクトソームを投与後、関節炎部への集積をイメージングで確認し、同部位に近赤外光を照射してICGを励起させ、細胞毒性による増生滑膜障害効果、滑膜細胞・マクロファージに対する循環機能改善・サイトカイン放出抑制等による関節炎抑制効果を検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究ではRAモデルであるSKG/Jclマウスを用いる。SPF環境下には関節炎を自然発症しにくいいため、mannanを投与し関節炎を発症させた。

(1)実験1 ICGラクトソーム2mg投与における光線力学療法(単回照射)

誘発後2週で(a)ICGラクトソーム投与なし、(b)ICGラクトソーム投与のみ、(c)近赤外線レーザー照射のみ、(d)ICGラクトソーム投与後近赤外線レーザー照射の4群(それぞれn=5)を設定した。

ICGラクトソームは2mg/匹(ICG 30 nmol / mg内包)を投与し125mW/cm²、総照射エネルギー密度は75.2J/cm²にて左足関節のみにレーザー照射を行った。

レーザー照射後1日で壊死細胞評価のためTUNEL染色を行った。

(2)実験2 複数回照射に最適なICGラクトソーム量の決定(単回照射後判定)

実験1と同様に関節炎を発症させたマウスにおいて、ICGラクトソームを5mg/匹、10mg/匹、20mg/匹(それぞれn=5)を投与し、近赤外線レーザーを実験1と同様に左足関節のみに照射した。

レーザー照射前、照射後7日において、IVIS Spectrum Living Image® Version4.3.1 Xenogen社を励起波長:745nm、蛍光波長:840nmを用い、蛍光イメージング画像を得て蛍光輝度を評価した。また関心領域における測定時の蛍光強度を、ICGラクトソーム投与前の蛍光強度で除し、蛍光強度を算出した。

(3)実験3 ICGラクトソーム10mg単回投与における光線力学療法(複数回照射)

実験1・2と同様に関節炎を発症させたマウスにおいて、ICGラクトソームを10mg/匹を投与した。

近赤外線レーザーを実験1・2と同様に設定し、両足関節にはレーザーを照射し、左足関節には1週間空けて2回目の照射を行った。

レーザー照射前、両足照射後7日、左足2回目照射後7日(両足照射後14日)において、実験2度同様にIVISを用いて蛍光イメージング画像を得て蛍光輝度蛍光強度比を評価した。

4. 研究成果

(1)実験1 ICGラクトソーム2mg投与における光線力学療法(単回照射)

TUNEL染色での陽性細胞数(%)の平均値は(a)2.51(±1.32)%, (b)1.30(±0.63)%, (c)8.21(±2.35)%, (d)34.10(±11.12)%であった。

ICGラクトソーム+近赤外レーザー照射では核が凝縮した多数のTUNEL染色陽性の細胞がみられ、近赤外レーザー照射とICGラクトソーム+近赤外レーザー照射の間に有意差がみられた。

がん細胞に対するICGラクトソームを用いた光線力学療法の研究はあるが、関節炎に対してICGラクトソームを用いた光線力学療法を行ったものは本研究が初めてである。

ラクトソームは、京都大学と島津製作所が共同開発した新規乳酸系両親媒性ポリペプチド高分子ミセル(poly-sarcosine-poly-L-lactic acid)であり、生体内で自然分解され安全性が高い。またラクトソームをICG標識したICGラクトソームは35nmのナノ粒子で生体内に長時間滞留する。

レーザー照射のみでも関節炎の抑制がみられたとする報告が散見される。本研究においては増殖した滑膜細胞におけるTUNEL細胞陽性数がレーザー単独照射と比較して優位差を認めたことから、ICGラクトソームを用いた光線力学療法は、関節炎抑制により高い効果を発揮する可能性がある。

(2)実験2 複数回照射に最適なICGラクトソーム量の決定(単回照射後判定)

ICGラクトソーム5mg/匹では、蛍光強度比がレーザー照射前231倍から照射後7日で85倍に低下した。

10mg/匹では、蛍光強度比がレーザー照射前431倍から照射後7日で171倍に低下したが、蛍光輝度は保たれていた。

20mg/匹では蛍光強度比がレーザー照射前504倍から照射後7日で164倍に低下したが、蛍光輝度は保たれていた。

20mg/匹では皮膚のびらんがみられたが10mg/匹ではみられなかった。

光線力学療法の強度は、投与した光感受性物質の量、レーザー照射強度によって変化する。1回の光感受性物質の投与で、複数回のレーザー照射を行うには、単回レーザーでは消失しきれず、また副作用の出現しない最大

量の光感受性物質が必要となる。

本研究では5mg投与においては、照射1週間後に蛍光輝度が低下しており、複数回照射に十分なICGラクトソームではないと考えられる。また20mgでは皮膚びらんという副作用が出現し、ICGラクトソームの体内密度が高く、光線力学療法の要素の1つである光感受性物質分解時の温熱効果が強すぎると考えられる。

これらのことから、ICGラクトソーム単回投与によるレーザー複数回照射のためには10mgの投与が適切であると考えられた。

(3)実験3 ICGラクトソーム10mg単回投与における光線力学療法(複数回照射)

レーザー照射前の蛍光強度は右552倍、左567倍であったが、両足にレーザーを照射した7日後には蛍光強度比は右40.8倍、左42.5倍と低下した。またさらに左足に2回目の照射を行なった7日後には右15.4倍、左4.6倍となった。

実験2においては左足関節のみにレーザー照射を行ったため、7日後においても高い蛍光強度比が保たれていた。しかし本実験においては両足関節にレーザー照射を行ったため、ICGラクトソームが大量に分解され7日後に大きく蛍光強度比が低下したと考えられる。

また左足関節に対する2回目の照射でさらに蛍光強度比は低下し、ICGラクトソームはほぼ消失していると考えられる。これらから本研究の設定下において、10mgにおけるICGラクトソームの光線力学療法は、同時に2箇所、もしくは同一箇所に1週間隔では2回までが限界と考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

大西信三, RAマウスにおけるICG内包ナノ粒子を用いた光線力学療法, 第32回日本整形外科基礎学術集会, 2017年10月26日, 沖縄

〔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：
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：
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

大西 信三 (ONISHI SHINZO)

筑波大学附属病院 病院講師

研究者番号：00633190

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 研究協力者

()