

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03538

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍の選択的な可視化と治療を実現する近赤外光セラノスティクスナノ粒子

研究課題名(英文) Near-Infrared Theranostic Nanoparticles for Selective Observation and Treatment of Brain Tumor

研究代表者

上村 真生 (Kamimura, Masao)

東京理科大学・基礎工学部材料工学科・講師

研究者番号：80706888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非侵襲的に体内深部まで到達可能な近赤外(NIR)光を用いて、悪性脳腫瘍を含むがんの選択的な治療と診断を行うためのセラノスティクス用ナノ粒子を開発した。このナノ粒子は、NIR光照射下で、強い蛍光を発するために診断(イメージング)に使用することができる。また、同時に活性酸素や熱を発生するために、これらを用いてがんを治療することもできる。このため、本研究により得られたセラノスティクス用ナノ粒子は、脳腫瘍を含めた体内深部のがんの診断と治療、さらにはその後の経過観察にも効果的に利用可能であり、全く新しいがん診断・治療法の開拓につながるアプローチになることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たながん治療法である光線力学療法(PDT)は、光照射に反応して活性酸素(ROS)を発生する光増感剤によって腫瘍組織を破壊する治療方法であるが、PDT用の光増感剤は組織透過性が低い可視光に反応してROSを発生するため、既往のPDTは脳内深部まで浸潤したがん細胞を治療することが難しい。また最近では、光照射をトリガーとして腫瘍を加温することで治療する「光温熱療法(PTT)」の併用も検討されているが、やはり光の透過性が問題となっていた。そのため、これらを解決し、人体にほとんど害の無い近赤外光をトリガーとした診断・治療を行う本研究の成果は、がん診断・治療に革新をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) is a cancer treatment method that destroys cancer tissues via photosensitizers and light irradiation. Because of the most of PDT uses visible light for excitation, current PDT suffers from the lack of penetration depth. To solve this problem, we developed photosensitizer immobilized rare-earth-doped ceramic nanophosphors (RED-CNPs) for cancer theranostics. The RED-CNPs show tissue-penetrable over-1000 nm near-infrared (OTN-NIR) and visible upconversion emission under NIR excitation. In addition, upconversion red emission can excite photosensitizers, chlorin e6 (Ce6) and it generates ROS in deep tissue. Furthermore, NIR excitation light also can be used for light source of photothermal therapy (PTT). IR780 dye show effective temperature increasing under NIR light irradiation. The prepared materials showed effective cancer treatment and imaging results. Based on these findings, the obtained material is promising candidate for novel cancer theranostics agent.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：光線力学療法 光温熱療法 近赤外光イメージング セラノスティクス ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

神経腫瘍に代表される悪性脳腫瘍は、極めて難治性であることがよく知られている。悪性脳腫瘍は、がん細胞が脳内深部まで広範囲に浸潤するため、その浸潤・転移の様子を精確に観察することが困難である。また、脳は記憶や運動などを司る重要な部位であるため、腫瘍を外科手術で切除できる範囲も限られる。そのため、現在の悪性脳腫瘍の治療では外科的切除の後、放射線療法と化学療法(抗がん剤投与)を併用するのが一般的であるが、その治療効果は必ずしも十分ではなく、悪性度が最も高いグレード4の膠芽腫においては5年後生存率が約6%であるなど、極めて治癒が難しいことが深刻な問題となっている。

そこで近年、既往の三大がん療法(外科手術・化学療法・放射線療法)に加えて、新たな治療法である、「光線力学療法(Photodynamic Therapy: PDT)」が注目されている。PDTは、光照射に応答して活性酸素(ROS)を発生する光増感剤を患者に投与し、腫瘍部位に集積した光増感剤を光照射で活性化することで発生するROSによって腫瘍組織を破壊する治療方法である。これまでもPDTは様々ながんの治療効果を示しており、2015年には日本国内において悪性脳腫瘍に対しても保険適用になるなど、その高い治療効果が注目を集めている。

しかしながら、PDTに使用される光増感剤は、組織透過性が低い可視光(400-700 nm)に応答してROSを発生するため、既往のPDTは脳内深部まで浸潤したがん細胞を治療することが難しい。また最近では、がん細胞が熱に弱い(43°C以上で死滅)ことを利用して、光照射をトリガーとして腫瘍を加温することで治療する「光温熱療法(Photothermal Therapy: PTT)」の併用も検討されているが、腫瘍のみを局所加温することが難しいことや、腫瘍内部の温度上昇を体外から計測することが不可能であるため、効果的な治療方法として確立されていないのが現状である。

国内外の研究動向としては、近年、様々ながん医療技術が開発されているが、未だにグリオーマのような悪性脳腫瘍に対する決定的な診断・治療法は無く、極めて難治性であることが深刻な問題となっている。ナノバイオマテリアルによる新しいがん治療技術としては、ナノ粒子DDSが優れたがん治療効果を示しており、世界中の研究者が研究を進めている。抗がん剤を内包したナノ粒子DDSは臨床試験レベルまで進んでいるものもあるが、脳腫瘍に対してはその治療効果は未だに不十分であり、より効果的な材料の開発が望まれている。また、前述のPDTやPTTなどの光を用いた新しいがん治療法は、患者の体に負担を与えにくい治療技術として期待されているが、生体組織透過性が低い可視光を用いた技術がほとんどであるため、脳内深部の腫瘍の治療が難しいのが現状である。さらに、脳腫瘍の診断(=観察)においても、一般的に可視蛍光を示す蛍光物質による可視化が行われるが、脳内深部に浸潤したがん細胞を観察することが困難であるため、腫瘍を完全に発見することは極めて難しい。そのため、このような背景の下、脳内深部の腫瘍に適用可能な観察・治療技術の実現が強く求められている。これらの技術が実現されることで、これまでに発見や治療が難しかった部位の腫瘍の診断と治療が可能になると期待されている。

## 2. 研究の目的

悪性脳腫瘍に代表される深部のがんは、外科的切除に限界があり、完全な治癒が困難であることが深刻な問題となっている。新たながん治療法であるPDTは光照射に応答してROSを発生する光増感剤によって腫瘍組織を破壊する治療方法であるが、PDT用の光増感剤は組織透過性が低い可視光に応答してROSを発生するため、既往のPDTは脳内深部まで浸潤したがん細胞を治療することが難しい。また最近では、光照射をトリガーとして腫瘍を加温することで治療するPTTの併用も検討されているが、やはり光の透過性が問題となっていた。

そこで本研究では、非侵襲的に体内深部まで到達可能な近赤外(NIR)光を用いて、悪性脳腫瘍を含むがんの選択的な治療と診断を行うためのセラノスティクス用ナノ粒子を開発することを目的とした。このナノ粒子は、NIR光照射下で、強い蛍光を発するために診断(イメージング)に使用することができる。また、同時に活性酸素や熱を発生するために、これらを用いてがんを治療することもできる。このため、本研究で開発するセラノスティクス用ナノ粒子は、脳腫瘍を含めた体内深部のがんの診断と治療、さらにはその後の経過観察にも効果的に利用可能であり、全く新しいがん診断・治療法の開拓につながるアプローチになることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 光増感剤固定 RED-CNP の合成

まず、セラノスティクスのためのナノ粒子を作製した。希土類イオンの一種であるイッテルビウムとエルビウムを共ドーブしたNaYF<sub>4</sub>ナノ粒子を、熱分解法により作製した。つぎに、その粒子表面にPEGの側鎖にポリスチレンのブロック構造を有するポリマー(PEG-*b*-PSt)(Mn = 5000/5000)と光増感剤のCe6を固定することで、水中環境でも使用可能なセラノスティクス用ナノ粒子を作製した。さらに、このナノ粒子の、NIR光(980 nm)照射下での蛍光測定や活性酸素の発生を評価した。

## (2) 光温熱色素固定粒子の作製

(1)のセラノスティクスナノ粒子の作製手順において、PEG-*b*-PSt および Ce6 と同時に、IR780 色素を混合することでナノ複合体を得た。その後、このナノ粒子の、NIR 光 (808 nm) 照射下での光温熱効果を評価した。

## (3) in vitro および in vivo のセラノスティクス性能の評価

(1)および(2)で作製したナノ粒子のがん細胞に対する PDT、PTT の効果を、培養細胞 (マウス大腸がん由来 Colon-26 細胞) を用いて評価した。Colon-26 細胞を 96 穴マイクロプレートに播種、24 h 培養した後、ナノ粒子を各 well に加えてさらに 24 h 培養した。その後、980 nm レーザーまたは 808 nm レーザーを照射し、WST 法によって細胞生存率を評価した。さらに、マウス (BALB/c) に Colon-26 細胞を皮下投与することで担がんモデルマウスを作製し、ナノ粒子を腫瘍部位に投与して NIR 光 (980 nm) を照射した後、腫瘍のサイズを計測することで、腫瘍部位への PDT の効果を評価した。また同時に、蛍光 in vivo イメージングシステムを用いて、腫瘍サイズの変化を蛍光観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 光増感剤固定 RED-CNP の合成

作製したセラノスティクスナノ粒子の粒径分布を動的光散乱方法で評価した結果、粒径約 60 nm であった。この粒子は生体内環境に相当する緩衝溶液中で安定に分散できることがわかった。また、NIR 光 (980 nm) 照射下で強い NIR 蛍光 (1550 nm) を観察することができた。さらに、活性酸素を発生することも確認することができた。これらの検討から、得られたナノ複合体は、生理条件下で高い分散安定性と蛍光特性、活性酸素産出能を示すことが明らかになった。

### (2) 光温熱色素固定粒子の作製

作製したセラノスティクスナノ粒子は、生体内環境と同等のイオン強度環境において、IR780 色素が漏れ出すことなく安定であることを確認した。さらにこのナノ粒子に近赤外光 (808 nm) を詳細したところ、照射から 1 分程度でがんを死滅させることが可能な温度域 (>43°C) に達することができることがわかった。

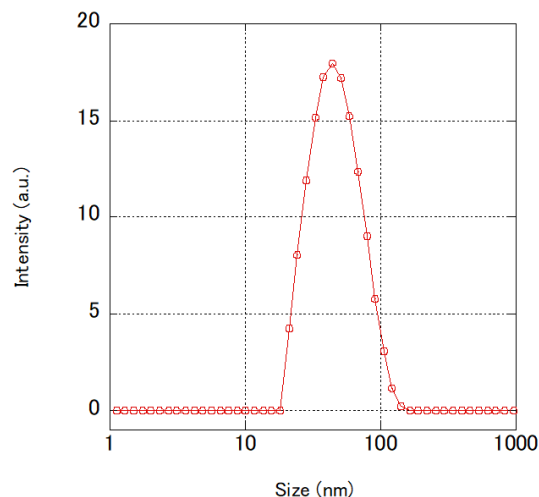


図1. 作製したセラノスティクスナノ粒子の粒径分布 (動的光散乱測定)。

## (3) in vitro および in vivo のセラノスティクス性能の評価

(1)および(2)で得られたセラノスティクスナノ粒子を用いて、in vitro (培養細胞) および in vivo (マウス) の評価実験を行った。まず、培養細胞に各ナノ粒子を添加し、980 nm レーザー (PDT) と 808 nm レーザー (PTT) を用いてそれぞれ治療効果を評価した。この結果、まずナノ粒子を添加しただけでは、細胞には顕著な毒性は見られなかった。このため、本研究で作製したナノ粒子は生体に対して安全な材料であることが示された。また、各波長のレーザーのみを照射した場合にも細胞の生存率に大きな影響はなく、安全な実験系であることが確認された。そして、がん細胞にナノ粒子を添加し、各レーザー光を照射したところ、980 nm (PDT) および 808 nm (PTT) それぞれの場合において細胞生存率が大きく減少する様子が観察された。この結果から、NIR 光を

起点とした PDT および PTT がそれぞれ効果を示していることがわかった。さらに、2つの波長のレーザー光を両方とも照射した場合、PDT と PTT の相乗効果によって、顕著ながん細胞の死滅の様子が観察された。

また、in vivo においても、担がんマウスにナノ粒子を投与して NIR 光を照射したところ、腫瘍の成長を大幅に抑制できることが明らかとなった。さらにこのナノ粒子は、NIR 蛍光 (1550 nm) を発するため、腫瘍のサイズ変化を体外から経時的に追跡することにも成功した。

これらの結果から、本研究で得られたナノ粒子デバイスは、組織透過性が高い NIR 光を用いて体内深部の腫瘍を PDT と PTT で効果的に治療し、さらにその経過を NIR 蛍光で観察することも可能であるため、新たながんセラノスティクス技術の基盤材料として、脳腫瘍を含む体内深部のさまざまながん診断・治療に有効であると期待される。

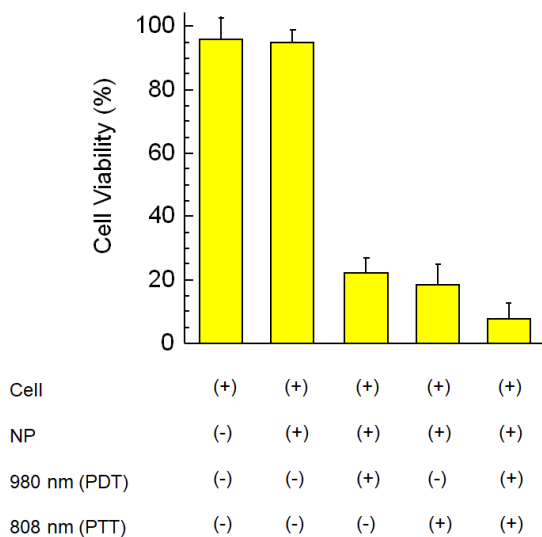


図 2. 培養がん細胞に対する治療効果 (WST アッセイ)。

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 KAMIMURA Masao	4. 巻 37
2. 論文標題 Recent Progress of Near-Infrared Fluorescence <i>in vivo</i> Bioimaging in the Second and Third Biological Window	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 691 ~ 697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20SCR11	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12件（うち招待講演 8件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masao Kamimura
2. 発表標題 Near-Infrared Responsive Polymer Nanoparticles for Theranostics
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masao Kamimura, Kohei Soga
2. 発表標題 Development of Near-Infrared Fluorescent Nanoparticles for <i>in vivo</i> Bioimaging in the Second and Third Biological Window
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村 真生、曾我 公平
2. 発表標題 生体深部を捉える近赤外光駆動型高分子ナノ粒子
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村真生
2. 発表標題 波長1000 nmを超える近赤外蛍光を用いる in vivoイメージング
3. 学会等名 第44回レーザー顕微鏡研究会 & シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村真生
2. 発表標題 Over-1000 nm (OTN) 近赤外光を用いた in vivo イメージング
3. 学会等名 第23回酸素ダイナミクス研究会・第26回医用近赤外線分光法研究会 合同研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Kamimura, Kohei Soga
2. 発表標題 Poly(ethylene glycol) Modified Near-Infrared Nanophosphors for Deep Tissue in vivo Bioimaging
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Kamimura, Kohei Soga
2. 発表標題 Polymer Conjugated Fluorescent Nanoparticles for Over-1000 nm Near-Infrared (NIR-II/III) in vivo Imaging
3. 学会等名 TERMIS-AP + ABMC7 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村真生
2. 発表標題 体内深部を可視化する近赤外光バイオイメージング
3. 学会等名 第69回医用高分子研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Kamimura
2. 発表標題 Polymer Conjugated Nanophosphors for Over-1000 nm Fluorescence in vivo Imaging
3. 学会等名 1st G'L'owing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K2018)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村真生
2. 発表標題 光応答性マテリアルによるバイオ分析法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masao Kamimura
2. 発表標題 Polymer Conjugated Fluorescent Nanoparticles for Over-1000 nm Near-Infrared Bioimaging
3. 学会等名 第67回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masao Kamimura, Kohei Soga
2. 発表標題 Near-Infrared Light Triggered Theranostics Based on Polymer Modified Nanophosphors
3. 学会等名 The 35th International Conference of Photopolymer Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	曾我 公平  (Soga Kohei)  (50272399)	東京理科大学・基礎工学部・教授    (32660)	

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