

令和 3 年 8 月 27 日現在

機関番号：55501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05327

研究課題名(和文)セラノスティクスがん医療のためのPET-BNCTデュアル機能性ポルフィリンの開発

研究課題名(英文)Development of PET-BNCT dual-functional porphyrin for theranostics drugs

研究代表者

廣原 志保 (Shiho, Hirohara)

宇部工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号：70413804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がんセラノスティクス薬剤の開発として、がん予防、がん診断およびがん治療能を有する様々な色素を内包した高分子ミセルを合成した。フッ素クロリンH2-TFPCを内包した高分子ミセルは、*in vitro*評価において高いがん診断(PDD)効果と高いがん治療(PDT)効果を示し、がんセラノスティクス薬剤として期待できることが分かった。またsubphthalocyanine内包高分子ミセルは高いPDT効果を示すという問題はあったが、*in vitro*でのBNCT感受性は確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん医療の分野において、がん診断と治療が同時に行うことができるセラノスティクス薬剤の開発、ならびに難治性がんに対する治療法の開発は急務である。

本研究で開発した色素内包高分子ミセルは、がん診断能やがん治療能を有する色素や薬剤を簡単に内包できる水溶性化合物である。また、本研究で開発した高分子ミセルは、薬剤自身の毒性も止めることから、副作用の少ない様々な用途のがん医療薬をつくることが可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We synthesized micelles containing dye such as porphyrins for theranostics drug. Fluorochlorin (H2-TFPC)-encapsulating micelles showed high cancer diagnosis (PDD) and high cancer treatment (PDT) effects, and were found to be promising as cancer theranostics drugs. In addition, subphthalocyanine-encapsulating micelles showed BNCT sensitivity in cell tests, although there was a problem that they showed a high PDT effect.

研究分野：生体関連

キーワード：セラノスティクス 高分子ミセル 色素

### 1. 研究開始当初の背景

わが国は超高齢化社会に向かい、それにもないがんによる死亡数も増加している。そのため、完治可能な期間でのがんの発見と、高齢の患者に対応した非常に低侵襲的で非観血的ながん治療の開発、さらにはがん診断とがん治療を同時に行うことのできるセラノスティクス確立が急務となっている。また、わが国のがん対策基本法の重点的取り組み課題として、難治性がんに期待される放射治療法の一つであるホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) の開発が重点戦略となっている。この BNCT 用ホウ素薬剤として、ポロノフェニルアラニンなど一部の成功例はあるが、がん集積率が十分とは云えない。

一方、我々はがん治療の1つである PDT 用薬剤開発の一環として長年、がん集積性を高めた糖連結ポルフィリンを 150 種類以上合成し、医理工連携のもと *in vivo* 評価を行ってきた<sup>1),2)</sup>。現在では市販薬剤の数万倍の薬効を示す化合物の開発にも成功している。この知見と医理工連携を活かすことで、可視光領域の機能を中性子線まで拡大し、難治性がんに適用可能なセラノスティクス創成することが可能である。

### 2. 研究の目的

わが国は超高齢化社会に向かっており、それに伴いがんによる死亡率も増加している。そのため、完治可能な期間での早期がん発見し、がん発見と同時に低侵襲性かつ非観血的に治療するがんセラノスティクスが求められている。また、国策として難治性がんの治療法の開発も求められている。

そこで、本研究ではこれまでの我々のポルフィリンを用いたがん治療の知見をもとに、共同研究者の小幡(山梨大)が開発したポリマーとがん予防能、がん診断能、がん治療能またはがんセラノスティクス能を有するポルフィリンなどの色素を内包した高分子ミセルを合成した。合成した色素内包高分子ミセルについて、様々ながん細胞株を用いた蛍光顕微鏡観察(がん診断能評価)、細胞毒性試験(薬剤自身の毒性試験、がん治療能評価)を行い、セラノスティクス薬剤としての性能評価を行った。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 色素内包高分子ミセル溶液の調整

共同研究者の小幡(山梨大)が開発した疎水性セグメント、PH 応答性セグメント及び親水性セグメントからなる両親媒性ブロックコポリマー (P(*St<sub>m</sub>-co-DMAEA<sub>k</sub>*)-*b*-PPEGA<sub>n</sub>) と、がん診断(PDD, MRI)能とがん治療(PDT, X 線)能を有するフッ素ポルフィリン (M-TFPP, M= 2H, Zn, Pd, Gd)またはフッ素クロリン(M-TFPC, M= 2H, Zn, Pd, Gd)を DMF に溶解させ、この溶液を、少量の PBS で透析膜 (MWCO = 12000-14000 Da) に移し入れ、PBS で 3 日間透析した。透析後の溶液をサンプル瓶にすべて移し、ポリマー濃度が 2.0 mg/mL なるように PBS を加えた。このメンブランフィルタ ( $\phi = 0.2 \mu\text{m}$ ) で濾過して M-TFPC@P(*St<sub>m</sub>-co-DMAEA<sub>k</sub>*)-*b*-PPEGA<sub>n</sub> 溶液を調製した(図 1)。

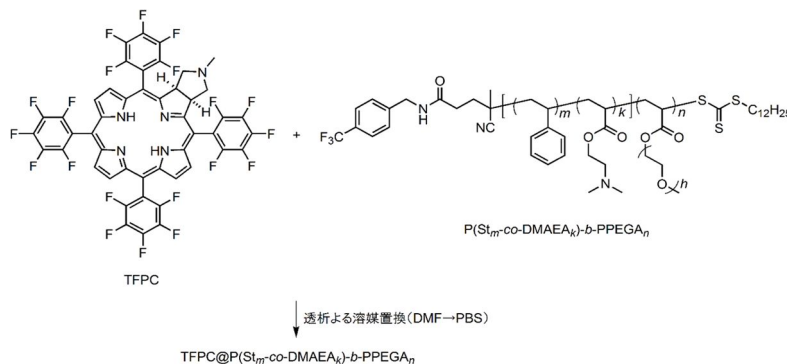


図 1 H<sub>2</sub>-TFPC@P(*St<sub>m</sub>-co-DMAEA<sub>k</sub>*)-*b*-PPEGA<sub>n</sub> の調整

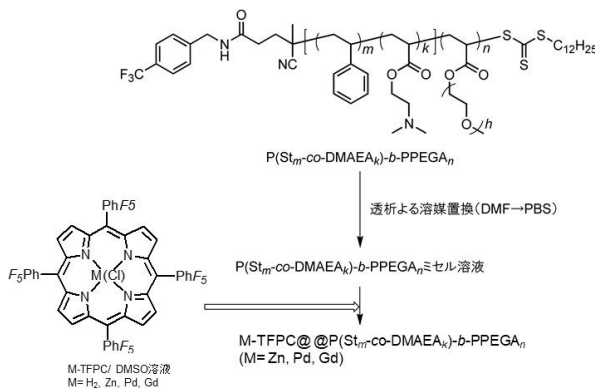


図 2 M-TFPC@P(*St<sub>m</sub>-co-DMAEA<sub>k</sub>*)-*b*-PPEGA<sub>n</sub> の調整

同様の方法で proto porphyrin (PPIX)、2-[2-[2-Chloro-3-[2-[1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-ylidene]-ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]-ethenyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium hydroxide や inner salt sodium salt (IR783)、1,1',3,3',3'-4,4',5,5'-di-benzo-2,2'-indotricarbocyanine perchlorate (IR780)、indocyanine green (ICG)および subphthalocyanine の高分子ミセル溶液をと調整した。得られた高分子ミセルについて、PBS 中でのミセルサイズを求めた。

### 3-2. 色素内包高分子ミセル溶液の調整 2

いくつかの色素において 3-1 の調整法ではミセル中にほとんど色素が内包しなかった。そのため、先に P(St<sub>m-co</sub>-DMAEA<sub>k</sub>)-b-PPEGA<sub>n</sub> をミセル化した後、色素を導入する方法を検討した(図 2)。

### 3-3. 細胞取り込み試験

pH 応答性セグメントの鎖長を変化させた H<sub>2</sub>-TFPC@P(St<sub>m-co</sub>-DMAEA<sub>k</sub>)-b-PPEGA<sub>n</sub> について、ラット胃がん様変異株(RGK-1)を用いた細胞取り込み試験を行った。

6 穴プレート内の所定の箇所に RGK-1 細胞株(3.7 × 10<sup>6</sup> cells/well (1500 μL))を播種し、このプレートに H<sub>2</sub>-TFPC@P(St<sub>m-co</sub>-DMAEA<sub>k</sub>)-b-PPEGA<sub>n</sub> の色素濃度が 0.5 μM になるように 37°C、5% CO<sub>2</sub> で 24 時間薬剤接触させた。余剰分の薬剤を除去した後、DMSO で細胞中の色素を抽出し、この抽出液の蛍光強度(励起波長 430 nm, 検出波長 650 nm)により、細胞への薬剤取り込み量を求めた。また、F<sub>DMAEA</sub> が 0.51 の高分子ミセルについて薬剤接触 4 時間後の細胞の蛍光顕微鏡観察も行った。

### 3-4. 細胞毒性試験

RGK-1 細胞株、ヒト子宮頸部がん由来培養細胞株(HeLa)、ヒト乳癌細胞株(4T1)、RGK-1 細胞株および悪性度の異なるヒト脳腫瘍株(U251, T98G)を用いた暗所毒性および光細胞毒性を行った。96 穴プレートにがん細胞株を 5 × 10<sup>3</sup> cells/well 播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> で終夜培養した。各穴の培地を除去後、各 well に所定の添加溶液([dye]=0.02 ~ 2.00 μM)もしくは vehicle を 100 μL 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 24 時間培養した。各 well から余剰分の薬剤を除去後、新しい培地 100 μL を加えた。100 W ハロゲンランプ(λ>500 nm)を用いて光量 20 J/cm<sup>2</sup> を照射した。光照射 24 時間後、WST-8 アッセイにより細胞生存率を求めた。比較物質として、糖連結クロリン(TFPC(SGlc)<sub>4</sub>)および色素のみについても同様の試験を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. 色素内包高分子ミセル溶液の調整

図 1 の調整法で、pH 応答性セグメントの鎖長を変化させた H<sub>2</sub>TFPC@P(St<sub>m-co</sub>-DMAEA<sub>k</sub>)-b-PPEGA<sub>n</sub> を調整した。一方、TFPP 金属錯体、TFPC 金属錯体、IR783 や subphthalocyanine は、図 1 の調整法では高分子ミセル中にほとんど色素は内包せず、図 2 の調整法で目的の色素が定量的に内包された高分子ミセルを調整することに成功した。表 1 に、H<sub>2</sub>TFPC@P(St<sub>m-co</sub>-DMAEA<sub>k</sub>)-b-PPEGA<sub>n</sub> の色素の仕込み量、生成したミセル中の色素濃度、ミセルの粒形を示す。F<sub>DMAEA</sub> が 0.51 以上の高分子ミセルでは、ミセル粒形が急激に小さくなる傾向が見られた。

表 1 Characterization of Dye-loaded Blockcopolymer micelle in PBS

Micelle	Preparation			Micelle Soln.			
	F <sub>DMAEA</sub>	[Copolymer] <sub>0</sub> <sup>a</sup> (mg/ mL)	[Dye] <sub>0</sub> <sup>b</sup> (μM)	[Dye] <sub>0</sub> <sup>c</sup> (μM)	E.E. <sup>d</sup> (%)	D <sub>H</sub> <sup>e</sup> (nm)	
TFPC@PSt <sub>40</sub> -b-PPEGA <sub>84</sub>	0	2.0	20.0	2.00	54.5	24.45	
TFPC@ P(St <sub>39-co</sub> -DMAEA <sub>5</sub> )-b-PPEGA <sub>100</sub>	0.12	2.0	20.0	2.23	59.7	24.28	
TFPC@ P(St <sub>36-co</sub> -DMAEA <sub>10</sub> )-b-PPEGA <sub>93</sub>	0.21	2.0	20.0	2.18	52.8	25.45	
TFPC@ P(St <sub>30-co</sub> -DMAEA <sub>12</sub> )-b-PPEGA <sub>93</sub>	0.29	2.0	20.0	1.72	47.3	23.44	
TFPC@ P(St <sub>33-co</sub> -DMAEA <sub>19</sub> )-b-PPEGA <sub>101</sub>	0.36	2.0	20.0	2.34	59.0	21.98	
TFPC@ P(St <sub>36-co</sub> -DMAEA <sub>27</sub> )-b-PPEGA <sub>102</sub>	0.43	2.0	20.0	3.47	10.1	17.49	
TFPC@ P(St <sub>32-co</sub> -DMAEA <sub>34</sub> )-b-PPEGA <sub>104</sub>	0.51	2.0	20.0	3.76	11.3	14.33	
TFPC@ P(St <sub>30-co</sub> -DMAEA <sub>45</sub> )-b-PPEGA <sub>99</sub>	0.60	2.0	20.0	5.16	13.4	8.71	
TFPC@ P(St <sub>22-co</sub> -DMAEA <sub>63</sub> )-b-PPEGA <sub>103</sub>	0.74	2.0	20.0	3.79	14.8	8.71	
TFPC@ P(St <sub>13-co</sub> -DMAEA <sub>92</sub> )-b-PPEGA <sub>101</sub>	0.88	2.0	20.0	2.49	63.6	9.91	
PPIX@PSt <sub>40</sub> -b-PPEGA <sub>84</sub>	0	2.0	12.5	1.11	44.1	-	
PPIX@ P(St <sub>33-co</sub> -DMAEA <sub>19</sub> )-b-PPEGA <sub>101</sub>	0.36	2.0	12.5	0.93	37.5	-	

<sup>a</sup> The block copolymer (Copolymer) concentration of the copolymer/DMF solution used in the preparation. <sup>b</sup> The Dye concentration of the Dye/DMF solution used in the preparation. <sup>c</sup> The Dye concentration of the resulting micelle/PBS solution. <sup>d</sup> Encapsulation efficiency calculated as [Dye]/[Dye]<sub>max</sub> × 100 (%). <sup>e</sup> Size distribution of micelles in PBS (pH 7.4). The polymer concentration was 1000 mg/mL.

### 4-2. 細胞取り込み量

H<sub>2</sub>TFPC@P(St<sub>m-co</sub>-DMAEA<sub>k</sub>)-b-PPEGA<sub>n</sub> および比較物質 H<sub>2</sub>-TFPC と糖連結 TFPC(H<sub>2</sub>-TFPC(SGlc)<sub>4</sub>)の RGK-1 細胞株を用いた細胞取り込み試験の結果を図 3 に示す。F<sub>DMAEA</sub> が 0.51 の

高分子ミセルが、最も高い取り込み量を示した。

図3で最も高い取り込み量を示した高分子ミセル( $F_{\text{DMAEA}}=0.51$ )に対し、薬剤接触4時間後の蛍光顕微鏡観察を行った(図4)。その結果、高分子ミセルは核以外に散在していることがわかり、非常に強い赤色蛍光を示すことがわかり、PDDとして利用できることが分かった。また、データは載せていないが、IR787を内包した高分子ミセルも色素だけに比べて、がん細胞に高い取り込みを示し、近赤外領域での診断薬としても期待できることが分かった。

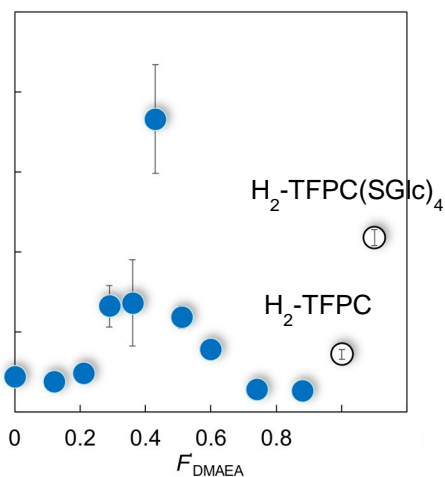


図3 Cellular uptake of H<sub>2</sub>TFPC@P(St<sub>m</sub>-co-DMAEA<sub>k</sub>)-b-PPEGA<sub>n</sub> by RGK-1 cells after 24 h incubation. N= 3.

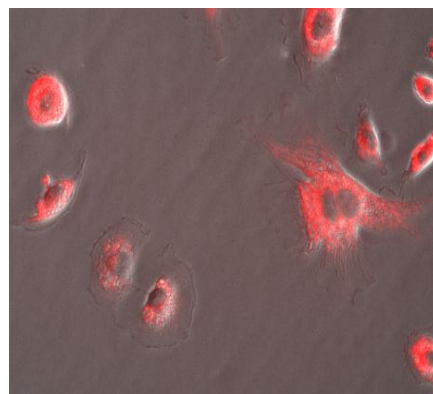


図4 Intracellular localization of TFPC@P(St<sub>36</sub>-co-DMAEA<sub>20</sub>)-b-PPEGA<sub>92</sub> ( $F_{\text{DMAEA}}= 0.51$ ). Fluorescence imaging of RGK-1 cells incubated for 4h.

#### 4-3. 細胞毒性試験

すべての高分子ミセルにおいて、薬剤自身の毒性はないことが分かった。光細胞毒性試験の結果、どのがん細胞株においても色素のみに比べて色素内包高分子ミセルの方が、高い光細胞毒性効果を示した。

pH 応答性セグメントの鎖長を変化させた H<sub>2</sub>TFPC@P(St<sub>m</sub>-co-DMAEA<sub>k</sub>)-b-PPEGA<sub>n</sub> の RGK-1 細胞株を用いた光細胞毒性試験の結果、 $F_{\text{DMAEA}}$  が 0.51、0.43 の高分子ミセルが最も高い光細胞毒性効果を示した(図5)。

T98G 細胞株を用い、subphthalocyanine を内包した高分子ミセルに対する BNCT の予備試験を行った。その結果、subphthalocyanine 内包高分子ミセルは、BNCT 感受性は示したが、それ以上に subphthalocyanine の PDT 効果(光感受性)が高く、BNCT 薬剤として利用するには難しい結果となった。今後、PDT 能がなく BNCT 能のみを示す薬剤を内包した高分子ミセルを開発していく予定である。

本研究は、がん医療能を示す様々な色素を内包した高分子ミセルを合成した。H<sub>2</sub>TFPC 高分子ミセルは、*in vitro* 評価において高いがん診断(PDD)能と高いがん治療(PDT)能を示し、がんセラノスティクス薬剤として期待できることが分かった。今後は、BNCT に最も適した薬剤を探し、それ薬剤を内包した高分子ミセルを合成していく予定である。

#### 4-4. 引用文献

1. S. Hirohara, et. al., Synthesis, Photophysical Properties, and Biological Evaluation of trans-Bisthioglycosylated Tetrakis(fluorophenyl)chlorin for Photodynamic Therapy, *J. Med. Chem.*, **58(21)**, 8658–8670 (2015).
2. S. Hirohara, Development of porphyrin derivatives for theranostics, *JJLSM*, **41(4)**, 394–401 (2021).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomomi Kubo, Ayano Hashimoto, Kohei Sharyo, Makoto Obata, Masato Tamura, Hirofumi Matsui, Shiho Hirohara	4. 巻 7(2)
2. 論文標題 Evaluation of the performance of glycosylated porphyrin platinum complex as an X-ray sensitizer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ALA-Porphyrin Science	6. 最初と最後の頁 13, 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiho Hirohara, Keigo Uda, Tomomi Kubo, Masao Tanihara, Hirofumi Matsui, Makoto Obata, Kiyomi Kakiuchi	4. 巻 7(2)
2. 論文標題 Click Synthesis of Tetraphenylporphyrin Derivatives bearing 2-Deoxy-2-iodo-D-glucose as an FDG Analogue for Photodynamic Therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ALA-Porphyrin Science	6. 最初と最後の頁 25-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makoto Obata, Satoshi Masuda, Masaki Takahashi, Kohei Yazaki, Shiho Hirohara	4. 巻 147
2. 論文標題 Effect of the hydrophobic segment of an amphiphilic block copolymer on micelle formation, zinc phthalocyanine loading, and photodynamic activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur. Polym. J.	6. 最初と最後の頁 110325-110335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.eurpolymj.2021.110325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiho Hirohara	4. 巻 41(4)
2. 論文標題 Development of porphyrin derivatives for theranostics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JJSLSM	6. 最初と最後の頁 394-401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2530/jslsm.jslsm-41_0022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 両親媒性ブロック共重合体	発明者 220	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-151697	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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 分 担 者	小幡 誠  (Obata Makoto)  (70343267)	山梨大学・大学院総合研究部・教授   (13501)	
研究 分 担 者	小倉 俊一郎  (Ogura Shunichiro)  (90343160)	東京工業大学・生命理工学院・准教授   (12608)	

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