

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：34417
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：18K08661
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胆嚢癌に対する新規治療法の研究開発

研究課題名（英文）Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosome has antineoplastic effects for gallbladder cancer

研究代表者
海堀 昌樹（KAIBORI, Masaki）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333199
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）：ヒト胆嚢癌細胞株（NOZ、中分化型管状腺癌）を移植した担癌マウスにICGラクトソームを投与し、蛍光イメージング装置を用いてICGの蛍光強度を測定したところICGラクトソーム群で腫瘍への有意な集積を認めた。またICGラクトソーム投与後48時間後に近赤外線を照射し、3群で照射後、腫瘍体積を比較してみたところICG群＜PDT一回照射＜PDT2回照射で有意に抗腫瘍効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICGラクトソームは腫瘍選択性と局所滞留機能を有し、術中腫瘍の範囲や腫瘍残存を確認可能である。腫瘍追加切除やPDTを行なう事が可能となり、局所根治性の向上が期待できる。

研究成果の概要（英文）：ICG-lactosomes accumulated in xenograft tumors and PDT had an antitumor effect on these malignant tumors. NIF imaging with ICG-lactosomes and PDT may be useful diagnostic and/or therapeutic agents for gallbladder cancer. this study suggests that ICGlactosomes are useful as novel diagnostic and therapeutic agents for gallbladder cancer. In the future, this research group will optimize the dose and irradiation conditions of the drug and consider the treatment effects on other carcinomas to develop this treatment for clinical applications. PDT with ICG-lactosomes used in the present study can be repeated and be used for endoscopic and laparoscopic treatments for gallbladder cancer.

研究分野：肝臓外科

キーワード：胆嚢癌 ICGラクトソーム Photodynamic Therapy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

手術中の蛍光診断技術は癌部位の適正な切除範囲の同定を可能にする。アミノレブリン酸による蛍光診断は、腫瘍集積性に優れているが、励起光が400nmで組織表面の癌病変しか検出できない (Anticancer research 36-4:1841-1849, 2016; Kaibori M)。一方、ICGはセンチネルリンパ節や組織血流診断に使用されているが腫瘍集積性に乏しい。最近報告者らは腫瘍集積に優れた近赤外領域の蛍光を発する ICG 含有ナノ粒子「ICGラクトソーム」を開発した (Biomaterials 30:5156-5160, 2009; Akira M)。下記に示すように、様々な癌腫に対する腫瘍集積性と PDT 効果が検討されている。報告者らは前述したように、肝細胞癌に対する「ICGラクトソーム」を用いた PDT による抗腫瘍効果を明らかにした。今回、国内外において難治性であり根治切除が困難、また化学療法による奏効率が低率などの理由により、極めて予後不良な胆嚢癌をターゲットに、これら腫瘍集積性と抗腫瘍効果を兼ね備えた「ICGラクトソーム」を用いた光線力学療法を行うこととした。胆嚢癌に対する「ICGラクトソーム」を用いた PDT の検討は国内外を通じて初めての試みであると推察される。

2. 研究の目的

胆嚢癌は手術不能状態で発見されることが多い。手術が唯一の根治法であり、手術が可能となる状態への down-staging となり、conversion therapy としての治療法開発も重要である。胆嚢癌モデルに対する「ICGラクトソーム」の抗腫瘍効果はこれまで国内外を通じて検討されていない。(1)「ICGラクトソーム」による近赤外蛍光法による肝転移やリンパ節転移などの微小癌の局在診断、(2)「ICGラクトソーム」の PDT の開発に資する基礎的動物実験データを集積できる。これらが実臨床に応用されれば、術中癌画像診断や術中 PDT 併用による胆嚢癌根治手術の達成、さらに切除不能胆嚢癌に対して、将来的にはより局所での「ICGラクトソーム」の内視鏡的逆行性胆管造影下 PDT による down-staging より根治切除が可能になれば、胆嚢癌予後改善へ大きく貢献することができる。

3. 研究の方法

(1) ヒト胆嚢癌の培養細胞に対する PDT による抗腫瘍効果 (*in vitro*) の解析

(方法) ヒト胆嚢癌 cell lines (NOZ) に対し、「ICGラクトソーム」と PDT 処理条件と抗腫瘍効果 (細胞死亡率) を検討する。

(2) ヒト胆嚢癌皮下移植マウスを用いて、「ICGラクトソーム」の集積および PDT による抗腫瘍効果の検討

(方法) マウス鼠径部皮下移植モデルに ICGラクトソーム (あるいは ICG 単独) を投与後、本学動物センターでレーザー光の照射を行い (波長 $810 \pm 10\text{nm}$ 、照射パワー密度 $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ 、90 秒、照射エネルギー量 $135\text{J}/\text{cm}^2$ 、単回および 2 回照射)、腫瘍径、腫瘍領域の温度を検討する。

(3) 胆嚢癌に対するパクリタキセル内包ラクトソームの *in vitro* 増殖抑制作用の検討。パクリタキセル (PTX) との比較試験。

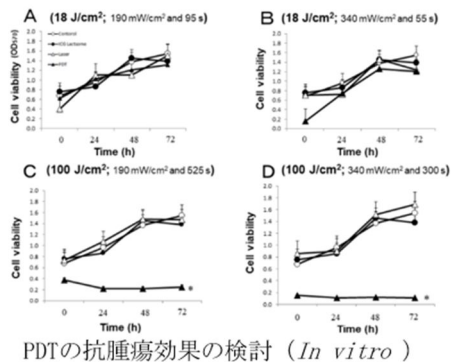
(方法) 96well プレートに NOZ 細胞 $1 \times 10^4 \text{cell}/0.1\text{ml}$ を william's E medium 10% heat inactivated fetal bovine serum を用い 5.0% CO₂、37 度で 24 時間培養 培養開始後 24 時間時に PTX1~1000ng/ml となるよう PTX 群に 10 μl 加え培養 48 時間培養後上記手法で MTT assay を行う。評価: PTX 群と PTX-Lactosome 群における IC₅₀ の検討。

(4) 近赤外線照射による ICG の分解産物

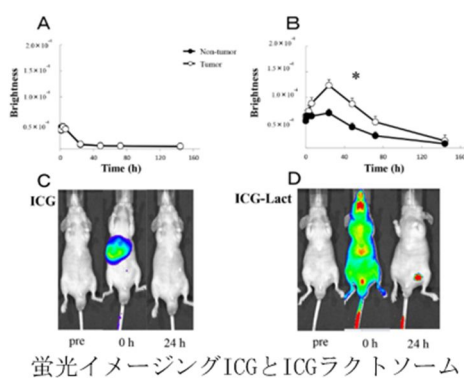
(方法) ICG 水溶液 40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ を使用し近赤外照射パワー密度は $100 \text{ J}/\text{cm}^2, 340\text{mW}/\text{cm}^2$; 300s 照射後、MALDI-TOFMS 法で解析。

4. 研究成果

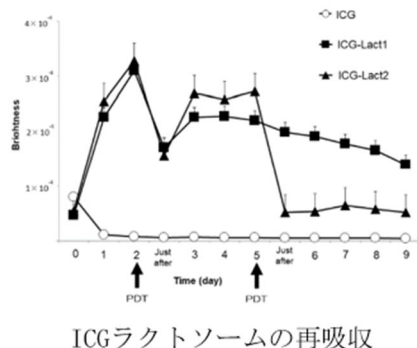
(1) ICG-ラクトソーム添加 NOZ 細胞における細胞生存率に対する低または高フルエンス（それぞれ 18 または 100 J / cm²）によるレーザー照射の影響を調べた。細胞をコントロール、ICG-ラクトソーム、レーザーおよび PDT（ICG-ラクトソーム+レーザー）の 4 つのグループに分けた。（A）18 J / cm²（190 mW / cm² および 95 s）、（B）18 J / cm²（340 mW / cm² および 55 s）、（C）100 J / cm²（D）100 J / cm²（340 mW / cm² および 300 s）。照射後 72 時間で、100 J / cm² の PDT 群（図 C および D）とコントロール群では細胞生存率が ICG-ラクトソームおよびレーザー群で著しく低下した。



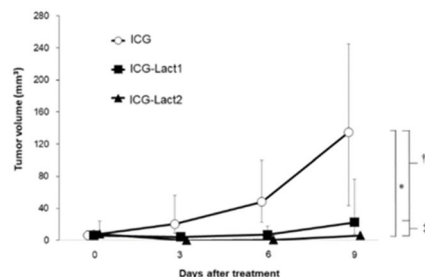
(2) IVIS システムを用いて、インビボ蛍光イメージングを行った。ICG と ICG-ラクトソーム投与マウス皮下腫瘍への蛍光強度を比較した。ICG 投与マウスでは、ICG 蛍光は注射直後に肝臓に蓄積し、1-6 時間以内に肝臓から腸管へ胆管排除を介して移動した。24 時間後、ICG 蛍光の大部分は身体から排出された。腫瘍領域の明るさを正常組織（対側鼠径）領域の輝度と比較すると、2 つの領域間に有意差はなかった。ICG-ラクトソーム投与マウスでは、蛍光は注射直後に全身に分布した。24-72 時間後、高レベルの ICG 蛍光が蓄積され、腫瘍領域内に残り、腫瘍と対側鼠径部との間に有意差があった。1 週間後、ICG 蛍光は依然として腫瘍領域で観察されたが、周囲の組織または他の器官には蛍光は存在しなかった。



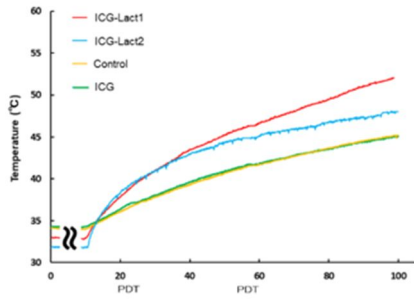
IVIS システムを用い腫瘍への PDT 後の蛍光強度を比較した。ICG-ラクトソーム投与マウス (n=8) で照射後蛍光強度の減少を認めた後 3 日目をピークとする再吸収を認めた。3 日目に 2 回目の照射 (n=4) を行うと蛍光強度の減少を認め再吸収は認めなかった。再照射を行っていない ICG-ラクトソーム群 (n=4) の蛍光強度は緩やかに減少した。抗腫瘍効果の検討は ICG 投与マウスと ICG-ラクトソーム投与マウス 1 回照射群と 2 回照射群（それぞれ n = 8 群）との間で比較した。ICG 群の平均腫瘍容積は、0 日目 (7.0 ± 4.53 mm³) から 9 日目 (142.8 ± 103.5 mm³) に増加した。対照的に、ICG-ラクトソーム 1 回照射群の平均腫瘍体積は、0 日目 (7.3 ± 7.0 mm³) から 9 日目 (33.9 ± 36.9 mm³) まで有意な成長を示さなかった。ICG-ラクトソーム 2 回照射群の平均腫瘍体積は、0 日目 (12.3 ± 3



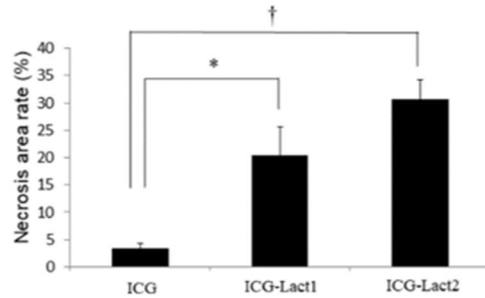
つの群の間に有意差を認めたレーザー照射の間、腫瘍領域の温度は、ICG 投与群とコントロール群に差はなく、1 回照射群が最も温度が高く、続いて 2 回照射群で温度が高くなった。ICG-ラクトソーム群の温度は、ICG およびコントロール群よりも高かった (p < 0.001)。腫瘍の壊死領域の割合を壊死率とし計算した。ICG と ICG ラクトソーム一回照射群において p 値 0, 05



以下、2 回照射群においては p 値 0.001 以下と有意差を認めた。



腫瘍部位の温度変化

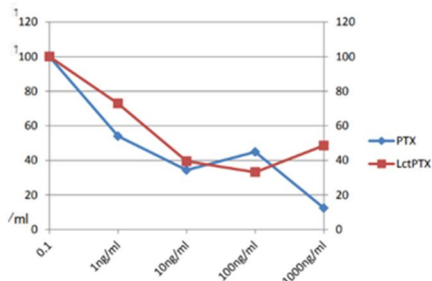


腫瘍壊死の検討

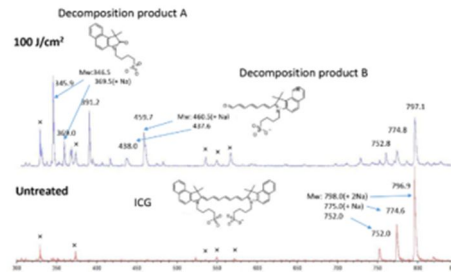
(3) PTX IC50 1.59ng/ml. PTX-Lactosome IC50 4.83ng/ml. *in vitro* 実験では PTX より増殖抑制作用は低く予想され増殖抑制に優れていると考えられる。

(4) 照射後の ICG は主に 2 つの分解産物であることがわかった。ICG 分子の二重結合が切断レーザー照射後に腫瘍部位で近赤外蛍光が失われたことを示した。

全体を通し、*In vivo* 実験にて ICG-Lactosome は腫瘍特異的に蓄積し診断において有効性が示された。*In vivo* 及び *In vitro* におき PDT による腫瘍発育抑制効果が認められた。



PTX-Lactosomeの腫瘍抑制の検討



ICGの分解産物の測定

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 Hishikawa H, Kaibori M, Matsuki K, Okumura T, Ozeki E, Yoshii Y, et al.	4. 巻 54
2. 論文標題 Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosomes has antineoplastic effects for gallbladder cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 5622-5631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27193.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hidehiko Hishikawa, Masaki Kaibori, Takumi Tsuda, Kosuke Matsui, Tadayoshi Okumura, Eiichi Ozeki, Kengo Yoshii
2. 発表標題 Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosomes has antineoplastic effects for gallbladder cancer
3. 学会等名 第3回国際癌研究シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022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
研究分担者	石崎 守彦 (ISHIZAKI Morihiko) (10509467)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	
研究分担者	松井 康輔 (MATSUI Kousuke) (40460828)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	

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