

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19517

研究課題名（和文）PET核種の光増感作用を活用したセラノスティックスのための量子ドットナノマシン

研究課題名（英文）Quantum dot nanomachine for theranostics utilizing photosensitization of PET nuclide

研究代表者

松浦 栄次（MATSUURA, EIJI）

岡山大学・中性子医療研究センター・教授

研究者番号：20181688

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、カドミウムフリー量子ドット-光増感剤複合体をPET核種とがん組織中で共存させることで、PET核種に由来する放射線およびチェレンコフ光による量子ドットの励起、それに次ぐ光増感剤の励起・光増感作用により、外部照射を必要としない治療法の確立を目的とするものである。この目的を達成するために、量子ドットのミセル内封、光増感機構を付与するとともに、PET核種である ^{89}Zr の可否とその両者による細胞傷害性について調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、診断用途で用いられてきたPETプローブを生体内でのシンチレーション作用に基づく細胞傷害の誘導・治療への応用を可能とする新技術の実証を主たる目的とするもので、これまでに同種の報告はない。一方で、PET施設は世界中に普及しており、今後さらにその供給は拡大していくものと考えられることから、本研究の目指す成果物に対する臨床的ニーズは高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This research aimed establishment of a cancer treatment using a complex of cadmium free quantum dot-photosensitizer excited by β radiation and Cherenkov light derived from a PET radionuclide colocalized in tumor, and a sequential production of reactive oxygen species. To achieve this purpose, the way of encapsulating quantum dots in micelle and making a complex with a photosensitizer, and cell viability after treatment using a complex of quantum dot-photosensitizer and ^{89}Zr were investigated.

研究分野：核医学分野、がん医療分野

キーワード：PET ^{89}Zr 量子ドット PDT Cherenkov光 DDS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光線力学的治療法 (PDT) とは、外部からの光刺激によって光感受性物質が細胞傷害性を起こし治療効果を発揮する光増感剤を用いた手法であり、1980年代からがん治療に用いられてきた。通常、これらの治療には生体透過性が比較的高い近赤外照射光が用いられるが、透過するのは僅か 2 cm 程度であるため、深部組織に対する効果は期待できない。一方、放射性核種より放出される β 線など荷電粒子の飛程に伴って、Cherenkov 光という 250-600 nm の波長域をもつ微弱な光が観測されることが知られている。この種の PDT の限界を克服し深部組織への適応性を拡大するため、がんの PET 診断に使用される ^{18}F -FDG を用いて、がん病巣へ集積した ^{18}F に由来する Cherenkov 光を利用した実験例が報告されている (Nat Nanotechnol 2015;10(4):370-9)。しかしながら、放出される Cherenkov 光が極めて微弱であること、および、 ^{18}F の半減期が極めて短いため、治療のために高放射能の投与が必要となり、被曝リスクの観点から、新技術の開発が求められてきた。

放射線を利用する画像診断装置等では、 β 線や γ 線により励起され発光する物質 (シンチレーター) により、放射線を光に変換して定量している。このような性質を有するシンチレーター素子には、量子ドット (数 nm ~ 数十 nm サイズの半導体結晶) が用いられる。量子ドットは、蛍光色素として優れた性質を示す。すなわち、粒子サイズを変更することで蛍光波長を変換でき、また、長い蛍光寿命を有するものや光退色に対して堅牢な性質を有するものも存在する。そのため、腫瘍への集積能を付与した量子ドットでは、蛍光イメージングによるがん診断ツールとしての医療応用も期待される。

2. 研究の目的

本研究では、生体深部到達性に制限がなく、かつ、侵襲性の低い、新たな励起機構に基づく光線力学的治療法 (PDT) の確立を目指す。すなわち、PET 核種によって活性酸素種 (ROS) を産生する量子ドット製剤とがん指向性の PET イメージング薬剤を腫瘍局所へ共有させることで、がん特異的に細胞傷害作用をもたらすことのできる新規治療システムの構築を目指す。申請者らは、これまでの研究の過程で、量子ドットが PET 核種に由来する Cherenkov 光および β 線により励起され、発光強度が増大することを見出した。このことから、量子ドットと、その蛍光により励起される光増感剤との複合体を形成させることで、生体内において PET 核種により励起され一重項酸素を産生する治療システムを構築できると考えられる。しかしながら、量子ドットの多くはカドミウムを含むため、その臨床への応用には毒性が懸念される。そこで、生体への毒性が低いことが報告されているカドミウムフリーの量子ドットを用いた開発研究を行う。本研究の最終的な目標は、腫瘍への標的性および光増感剤を付与した量子ドット製剤と PET 核種が腫瘍内で共局在することによってはじめて細胞傷害性を有する、低毒性かつ極めて特異性の高い治療システムを構築することにある。

3. 研究の方法

本研究では、PET 核種として比較的長い半減期 ($T_{1/2}=78.4$ h) を有する ^{89}Zr を、量子ドットはカドミウムフリーの量子ドットとして 650 nm 付近に蛍光極大を有する InP/ZnS および CuInS/ZnS (CIS) を用いた。また、両親媒性ポリマー (DSPE-PEG) から構成されるミセルを用いて以下の検討を行った。

(1) 量子ドットのミセル内封による水溶化

クロロホルム中に溶解した DSPE-PEG とトルエン中に溶解した InP/ZnS または CIS を混合し、減圧により溶媒を留去した。次いで、DMSO に溶解して得られた溶液を攪拌しながら DPBS に加えることでミセル化し、サイズ排除クロマトグラフィーによりミセルに組み込まれなかった基剤を除去した。得られた量子ドットミセルが ^{89}Zr によって励起されるかを確認するため、96 穴プレートに混合し、発光・蛍光イメージング装置 (IVIS) を用いて発光スペクトルを測定した。

(2) 量子ドットのミセルへの光増感剤の修飾

量子ドット-光増感剤複合体を用いた治療を行う上で量子ドットに由来する発光を効率的に吸収し細胞傷害性の一重項酸素を産生可能な光増感剤を選択する必要がある。そこで、今回用いた量子ドットが 650 nm 付近に蛍光極大波長を有することから、一重項酸素量子収率が 0.67 と高く 674 nm に吸収極大を有し効率的に FRET を介した励起ができると考えられる Zinc Phthalocyanine (ZnPc) を選択した。量子ドットに対して 0-40 等量の ZnPc をミセル内包することで、量子ドット-ZnPc 共内封ミセルを調整した。得られたミセルに対して 530 nm、0.2 W の光を照射しラジカル産生量を経時的に調べた。なお、測定には一重項酸素産生量に応じて 410 nm の吸光度が減少する DPBF を用いた。

(3) 量子ドット-光増感剤複合体と PET 核種による治療効果の検証

量子ドット-光増感剤複合体と ^{89}Zr による細胞傷害作用を調べた。96 穴プレートに播種した NCI-N87 細胞に対して、各サンプルを量子ドットとして 0.5 mg/mL、ZnPc として 20 $\mu\text{g/mL}$ 、 ^{89}Zr として 1 MBq を処置し、37 °C で 24 時間インキュベートした後、Cell Counting Kit-8 (CCK8) を用いて生細胞数を調べた。

4. 研究成果

(1) 量子ドットのミセル内封による水溶化

カドミウムフリーの量子ドットとして InP/ZnS および CIS および両親媒性ポリマーとして DSPE-PEG を用いて DPBS 中で水和したところ、InP/ZnS については消光したものの CIS については水和後も蛍光を有した。そのため、以降の実験では CIS を用いることとした。得られた CIS 量子ドットミセルの粒子径をダイナミック光散乱光度計で測定したところ、60 nm 程度の粒子が得られたことが確認された。次に、5 MBq の ^{89}Zr に対して量子ドットミセルを終濃度が 0-10 mg/mL となるように加え、その時の発光強度および波長を発光・蛍光イメージング装置により測定した。得られた結果の一部を下図に示す。 ^{89}Zr 単独では Cherenkov 光のみのスペクトルが確認されたが、CIS 量子ドットが共存することで、量子ドットの蛍光極大と一致する 650 nm 付近にピークを持つ発光スペクトルが確認された (下図 A、B)。また、 ^{89}Zr の存在下で量子ドット濃度依存的に発光強度は増大し、 ^{89}Zr 単独に比べ単位時間当たり約 1.4 倍の光子数を観測した (下図 C)。以上の結果から、 ^{89}Zr によって励起されることで発光を増大し波長を変換可能な量子ドットミセル化法が確立できた。

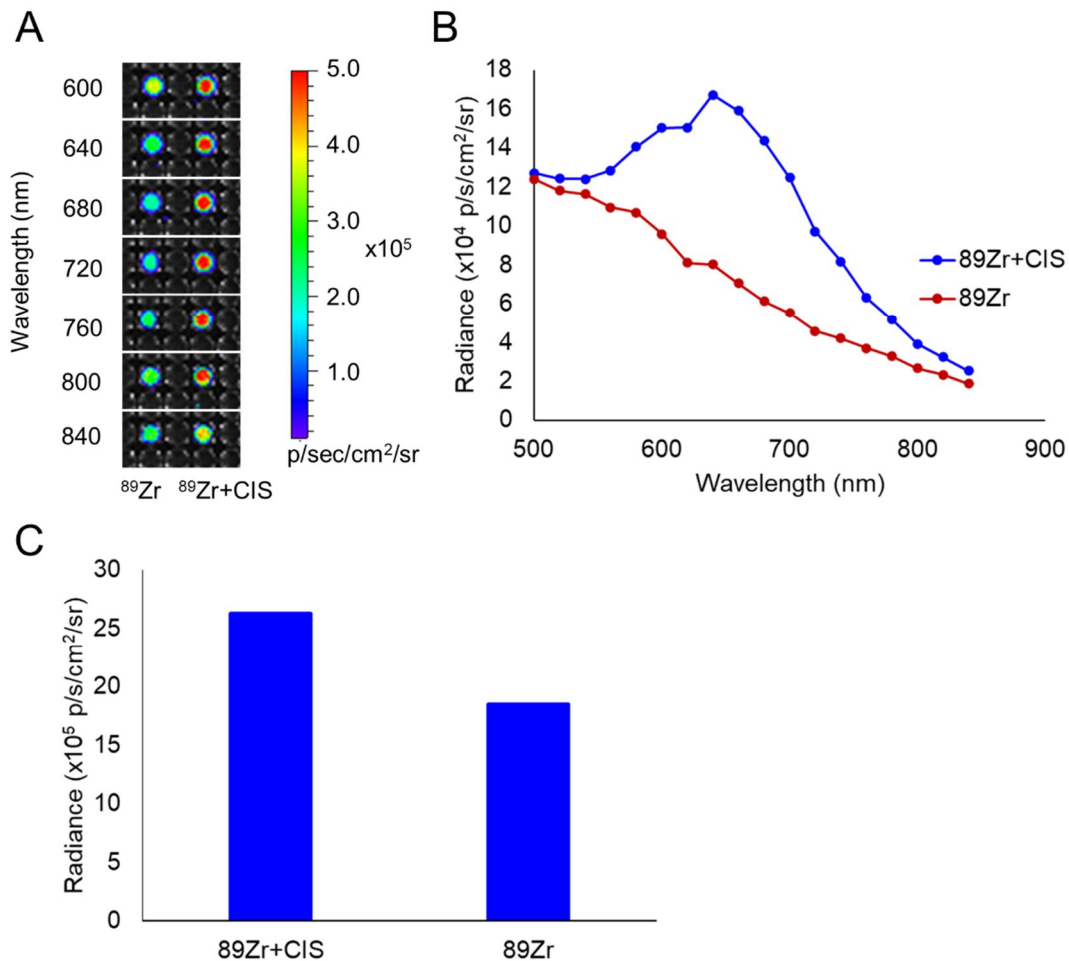


図 . ^{89}Zr および CIS 量子ドットミセル存在下の ^{89}Zr に由来する発光画像 (A) とスペクトル (B) および全波長の発光強度 (C)。

(2) 量子ドットのミセルへの光増感剤の修飾

CIS 量子ドットおよび 0-40 倍量の ZnPc、DSPE-PEG を DMSO に溶解して同様にミセルを調整し、同様に精製したところ、ZnPc に由来する 674nm を極大とする吸収スペクトルの変化より添加量に応じてミセルに内封される量が増えることが確認された。また、その粒子径は、ZnPc の添加量に応じて 80 nm 程度まで増大することが分かった。

次に、各ミセルに対して ZnPc が吸収を持たない 530 nm の波長のレーザー (0.2 W) を照射し、一重項酸素検出試薬である DPBF を用いてラジカル産生量を経時的に調べた。その結果、量子ドットまたは ZnPc のみを内封したミセルに比べ、CIS:ZnPc 量比 1:10 以上で内封したミセルについて、高い速度で吸光度が低下した。このことから、CIS:ZnPc 量比 1:10 以上で調製することで励起された CIS 量子ドットから ZnPc への FRET による効率的なラジカル産生がなされることが示唆された。

(3) 量子ドット-光増感剤複合体と PET 核種による治療効果の検証

培養がん細胞を用いて CIS-光増感剤複合体および ^{89}Zr の処置による細胞傷害作用を調べた。その結果、各単独処置群に比べ、両者を処置することでより高く細胞傷害作用を誘導する傾向にあった。一方で、 ^{89}Zr 単独で強い細胞傷害性が確認された。この理由として、この核種が放出するオージェ電子が傷害作用を有するため、これが寄与したものと考えられる。そのため、処置する核種や放射能濃度、CIS-光増感剤複合体濃度等、さらに条件検討を重ね最適化することで、最終

目標である PET 薬剤および CIS-光増感剤複合体の併用によるがん治療効果誘導が達成されると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----