

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500395
 研究課題名（和文）インドシアニンググリーン-金ナノ粒子結合体を用いた血管内病変の診断・治療技術開発
 研究課題名（英文）Development of the therapeutic and diagnostic technology for vascular lesion using a complex of gold-nanospheres and indocyanine green.

研究代表者
 守本 祐司（MORIMOTO YUJI）
 順天堂大学・医学部・講師
 研究者番号：10449069

研究成果の概要：

電磁波エネルギーに反応する多機能ナノデバイスとして、生体安全性の確立されている色素、インドシアニンググリーン（ICG）と金ナノ粒子（GNP，～60 nm）の結合体（ICG-GNP）を創製し、基本特性を評価した。その結果、ICG-GNP は細胞内に取り込まれ、近赤外光によって励起される蛍光標識の役割を果たすことを確認した。本結果より、ICG-GNP は動脈硬化診断・治療に適用できることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：金ナノ粒子、インドシアニンググリーン、ポリエチレングリコール、吸光、蛍光、プラスモン共鳴

1. 研究開始当初の背景

動脈血栓性脳梗塞の主たる病態は、頸動脈における動脈硬化性プラークを基盤にした血栓症であり、不安定化した動脈硬化プラークを早期に検出し安定化させること、および血栓閉塞した動脈を早期に再灌流させることがきわめて重要である。

脳梗塞部位の血流再疎通を促進する治療として、現状では血栓溶解療法あるいはカテーテル治療が選択されているが、有効性と合併症（出血等）に関しての問題が多い。また、

脳梗塞予防目的にプラーク改善を促す治療として、頸動脈ステント留置術が盛んにおこなわれるようになってきたが、プラーク粉砕による医原性塞栓症を少なからず引き起こす。一方、動脈硬化病変の非侵襲的イメージングとしては、CT、MRIなどが試みられているが、プラークの不安定性といった質的診断について精度の高い情報は得られていない。したがって、低侵襲かつ副作用なしで効果の高い治療法ならびに病変部性状の詳細な診断・評価技術の確立が強く期待されている。近年、近赤外線カメラと近赤外蛍光標識と

してインドシアニングリーン (Indocyanine green: ICG) を用いる、いわゆる ICG 近赤外蛍光血管造影が、血流やリンパ管流を診断するのに有効であることが報告されるようになってきた。我々も本法を利用したリンパ管造影で、ラット下肢の異常リンパ管を早期に、しかも高空間分解能で検知できることを示した。さらに予備的実験で、ウサギ胸背部～臀部における体表に近い動脈および穿通枝を的確に同定することに成功した。ICG 蛍光は近赤外 (800 nm 付近) 領域にあるため、生体深達度が高く、体表から数 cm に位置する血管走行を描出することができる。また、本検査手技は、低侵襲かつ簡便で、所要時間は 10 分にも満たない。

一方、ナノテクノロジーの急速な進歩にともなう、ナノサイズ (数 nm ~ 百数十 nm) 金粒子 (Gold nanoparticle: GNP) を利用したユニークな研究報告がでてきている。GNP は、プラズモン共鳴により特異な光吸収スペクトラムを呈するが、この光吸収は、GNP の形状、大きさ、粒子内部構造などによって大きく変化する。最近、いくつかの研究グループが、近赤外領域に光吸収を持つ GNP を合成して、これを細胞に添加し、近赤外光照射することで、ハイパーサーミア効果による殺細胞効果・細胞増殖抑制効果が発揮されることを報告している (West. Nano Lett 2005, Zharov. Biophys J 2006,)。また、腫瘍組織内に金属を留置することで放射線感受性が亢進することは古くより知られていたが、GNP を取り込んだ腫瘍でも放射線感受性が亢進することが示された (Cho. Phys Med Biol 2005, Hainfeld. Phys Med Biol 2004)。

2. 研究の目的

本研究では、ICG と GNP の結合体 (ICG-GNP) を創製し、電磁波を作用させることによって、動脈硬化性プラークの診断・治療を可能にする新規ナノデバイスの構築を目指す。ICG-GNP を生体へ投与することで、プラークは ICG 蛍光により描出される。そこで近赤外光あるいは放射線を照射して GNP を励起させ、活性化マクロファージなど炎症細胞の細胞死を誘導してプラーク病変部を退縮させる。一方で、ICG は高量子収率の光感受性色素でもあるため、近赤外光照射によって光線力学反応が惹起され細胞増殖が抑制される。結果、プラーク病変部の退縮を一段と促進する。

3. 研究の方法

(1) ICG-GNP 創製

ICG は tricarbocyanine タイプの色素であ

り、通常の構造体において陰イオンである SO_3^- 基を有するので、陽イオンとのイオン結合が期待できる。この場合、陽イオンとしてアミンが適当であることから、最初にアミンアルコールを架橋剤にして GNP との結合を試みる。

しかし、ICG の構造式から類推すると、アミンによる標識が、選択的におこなわれる確率は低い。したがって、上述の方法で結合がうまくいかないようなら、ICG-Sulfo-OSu を検討してみる。ICG-Sulfo-OSu は、ICG の母核 (tricarbocyanine) を有し、アミンの選択的標識が可能な活性エステルである。

(2) ICG-GNP の基本的光学特性の測定

合成されたナノデバイスの光学特性であるが、概略的には、ICG による光吸収と蛍光、および GNP による光吸収と光散乱の 4 つのパラメータで推測できる。しかし、単一 GNP 粒子に対する ICG 結合量の多寡により、光学特性は大きく変化する。そのため実際に測定し、期待される生体作用を発揮できるか否かを判断するため、光学特性データを収集する必要がある。したがって測定項目としては、ICG-GNP 溶液の光吸収スペクトラム、蛍光スペクトラム、さらに近赤外光照射時の一重項酸素発生量、熱発生量、などが挙げられる。

(3) ICG-GNP の細胞内への取り込み

ICG-GNP に近赤外光を照射することによって生じる蛍光を用いて、ICG-GNP の細胞内への取り込み、細胞内小器官への分布などを観察するとともに、毒性評価もおこなって、基本的な生体作用を知る。

4. 研究成果

(1) ICG-GNP 創製

①アミンアルコールを架橋剤にして ICG と GNP (60 nm) との結合を試みたが、結合安定性が低く、ICG と GNP が非特異的に結合するのみであった。

②上記結果を受けて、ICG ではなく、ICG の母核 (tricarbocyanine) を有しアミンの選択的標識が可能な活性エステルである、ICG-Sulfo-OSu を用いて合成をおこなったところ、ICG-GNP 結合体を作製できた。

③ICG は生体投与後リポタンパク等と結合し循環するため、この現象を利用して ICG キリングシステムとして機能させるべく、アルブミン (A1b) -GNP 結合体の作製も試みた。架橋剤として、スクシンイミド基を有したポリエチレングリコール (PEG) 製剤である OPSS-PEG-NHS を用いて合成をおこなったところ、A1b-GNP 結合体を作製できた。

(2) ICG-GNP の基本的光学特性の測定

①作成した ICG-GNP の吸光スペクトラムは、二峰

性の吸収ピーク (~530 nm、~650 nm) を有し、それぞれ、GNP に由来するプラズモン共鳴と、ICG のモノマーに起因するものと推測された。これは、GNP が ICG に高濃度 (>10 μ M) で結合しているため、ICG モノマー由来の吸収 (~780 nm) 増加のためには、ICG を低濃度にする必要があることが示唆された。

②吸収 (~780 nm) ならびに蛍光 (ex. 785 nm, em. 810 nm) 強度は、弱~強の順に並べると下記のようになった。

Alb-GNP 結合体+ICG 混合液 < ICG 単独 < ALB+ICG 混合液

この結果は、Alb-GNP 結合体+ICG 混合液 においては、GNP のプラズモン共鳴で光吸収が生じ、ICG への光吸収が減じていることを示唆する。

(3) ICG-GNP の細胞内への取り込み

上記開発した ICG-GNP が、動脈硬化病変における貪食細胞 (活性化マクロファージ) に取り込まれることで、血管病変の診断・治療が可能となる。そこで本研究では、コンセプトブルーフのための基礎的検討を行った。すなわち、細胞膜受容体のリガンドを付加した ICG-GNP を構築し、細胞内への取り込みを検証した。

① mAB-ICG-GNP の合成

細胞受容体として EGFR (上皮成長因子受容体) を選択し、乳がん細胞 (SKBR3) を用いて検討した。

まず、EGFR のモノクローナル抗体 (mAB) と ICG-Sulfo-OSu をアミド結合させた混合物 (mAB-ICG) を作製した。次に mAB-ICG を、NHS 活性エステル試薬を用いて GNP (60 nm) と結合させ、最終 complex (mAB-ICG-GNP) を合成した。

②細胞内への集積

mAB-ICG-GNP の SKBR3 への取り込みを観察した。図 1a, b に示すように、mAB-ICG-GNP は細胞内に取り込まれ、細胞質内に分布することがわかった。すなわち、mAB-ICG-GNP による細胞標識を行えることが示された。

本結果は、ICG-GNP による血管病変の診断・治療が可能であることを示唆する。

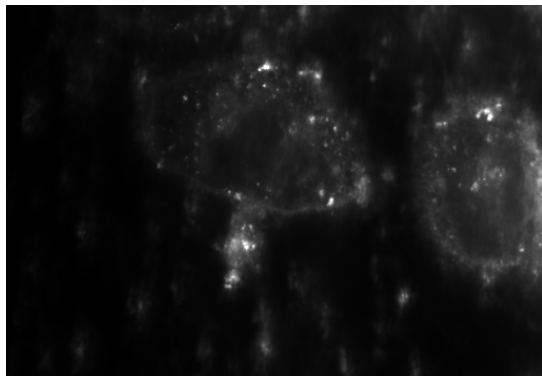


図 1a mAB-ICG-GNP の細胞内分布 (GNP 撮像モード)

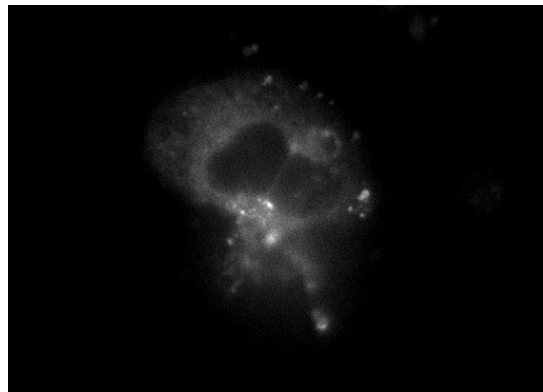


図 1b mAB-ICG-GNP の細胞内分布 (ICG 蛍光撮像モード)

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 2 件)

①Y. Morimoto (他 4 名、5 番目). Novel lymphography using indocyanine green dye for near-infrared fluorescence labeling. *Annals of Plastic Surgery*, 査読あり, 58, 652-655, 2007

②Y. Morimoto (他 8 名、2 番目). Detection of skin perforators by indocyanine green fluorescence near infrared angiography. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 査読あり, 122, 1062-1067, 2008

[学会発表] (計 3 件)

①Y. Morimoto (他 5 名、1 番目), Real time molecular imaging using gold nanoparticles and a dark-field microscope, 98th Annual Meeting 2007-American Association for Cancer Research, 2007 年 4 月 18 日, 米国

②Y. Morimoto (他 5 名、6 番目), Novel lymphography using indocyanine green dye for near-infrared fluorescence labeling, , 98th Annual Meeting 2007-American Association for Cancer Research, 2007 年 4 月 18 日, 米国

③Y. Morimoto (他 6 名、4 番目)、高コレステロール餌ウサギモデルにおける動脈硬化の検討、第 39 回 日本動脈硬化学会総会、2007 年 7 月 14 日、大阪

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守本 祐司 (MORIMOTO YUJI)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号：10449069

(2) 研究分担者

中井完治 (NAKAI KANJI)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号：20420838

(3) 連携研究者