

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09191

研究課題名(和文) インドシアニングリーン蛍光肝癌に対する近赤外レーザー光による光線力学療法の確立

研究課題名(英文) Photodynamic therapy using indocyanine green and infrared laser for liver cancer.

研究代表者

金子 順一 (Kaneko, Junichi)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：50328118

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)：新規に肝転移マウスモデルを開発した。大腸がん細胞を同マウス脾臓に直接投与することで肝転移巣を発生させ、その接種量と接種から転移巣を確認するまでの期間と共に安定したモデルを開発し生産することに成功した。同モデルに対しICG(インドシアニンググリーン)を静注し肝転移巣周囲の正常肝細胞にICGを集積させることに成功した。ICG静注後24時間経過後にラット右肋間辺りから肝右葉に見られる発光をターゲットにするNIR(近赤外光)レーザー照射し3から4日後の同部位の病理学的解析では、腫瘍周囲の肝細胞はアポトーシスを起こしていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光線力学的療法(PDT)は、照射部位だけに高い抗腫瘍効果を示す局所治療のため侵襲が少なく機能温存が期待される。新規PDTの候補となる蛍光薬剤ICG(インドシアニンググリーン)は、特異的に肝癌(肝細胞癌、転移性肝腫瘍)、いわゆるICG蛍光肝癌に集積することは治療の腫瘍選択性を高める意味で学術的意義がある。従来治療法である手術、化学療法、放射線治療とは異なった全く新しいIPDTを開発するという点は特に低侵襲であること、従来治療法との併用療法が可能であること、また従来頻用されている蛍光薬剤でもあることから低費用という観点で社会的意義があることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a mouse model that has small colorectal liver metastases by tumor cells implantation via spleen. Indocyanine green (ICG) remained in normal liver cells around liver metastasis 24hr after ICG administration. We found that photodynamic therapy with near-infrared laser irradiation showed apoptosis in the liver cells surrounding colorectal liver metastasis. Higher output power is needed to make apoptosis in the colorectal liver metastasis.

研究分野：肝胆膵外科・肝移植

キーワード：インドシアニンググリーン 光線力学的療法 近赤外光レーザー

1. 研究開始当初の背景

従来の光線力学療法の問題点は、光感受性物質が吸光する光の波長の特性のため、光が 2-3mm 程度の浅部までしか到達せず組織透過性が低い。効果は皮膚や粘膜などの表層のみに限られる。近赤外光は波長 800nm 前後で組織透過性が最も高く 3-5cm 程度の深部まで到達するとされる。最近の研究から、近赤外光感受性物質の 1 つである ICG が肝癌(肝細胞癌、転移性肝腫瘍)に特異的に強く集積することが発見された (Ishizawa T et al., Cancer 2009, 図 1)。さらに近赤外光は肝組織をよく透過することがわかってきた(Kaneko J et al. J Invest Surg., 2009)。私たちは肝細胞癌に対しては肝細胞癌マウスモデルを開発し、近赤外レーザー光の組み合わせで光線力学的療法が確立する可能性を示した (Kaneko J et al. J Gastroenterol. 2014, 図 2, 3)。この肝細胞癌マウスモデルは ICG が集積した腫瘍とその周囲組織の蛍光強度比率(コントラスト比)は 255:1 と極めて高く。今までの他の光感受性物質と腫瘍との報告では Ogawa らのモデル、蛍光強度比率 4 から 7:1 (Cancer Res. 2009)や、Mitsunaga らのモデル、蛍光強度比率 7:1 (Nat Med. 2011)があるが、本モデルは最も高い蛍光強度比率であった。この高い蛍光強度比は、励起光(近赤外レーザー光)を照射したときインドシアニングリーン蛍光腫瘍細胞のみ破壊することができ周囲正常組織の影響が少なく腫瘍選択性が高い理想の治療が実現する可能性がある。肝細胞癌マウスモデル開発後に私たちは 2014 年から 3 年間で課題番号 26462039 基盤 C により肝細胞癌マウスモデルの光線力学的療法成立の機序を解明した。腫瘍内に一重項酸素が発生し、インドシアニンググリーン蛍光腫瘍が近赤外レーザーを吸光することで腫瘍自体が発熱(48.5)することを発見した(Shirata C, Kaneko J et al. Sci Rep 2017)。しかし、肝癌に対する光線力学療法の確立を目指すにはいくつかの学術的な問いが残されている。例えば腫瘍細胞が ICG

ICG fluorescence
(human hepatocellular carcinoma)

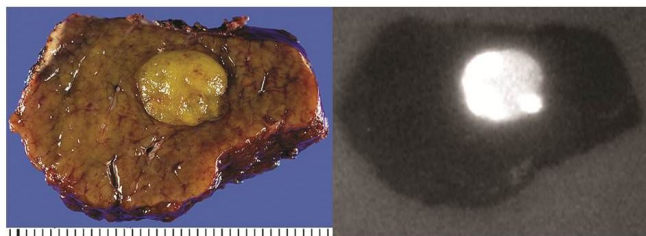


図 1. ICG 蛍光臨床例(肝細胞癌)。左:肉眼像、右:腫瘍に選択的に集積した ICG の白色蛍光

1)。さらに近赤外光は肝組織をよく透過することがわかってきた(Kaneko J et al. J Invest Surg., 2009)。私たちは肝細胞癌に対しては肝細胞癌マウスモデルを開発し、近赤外レーザー

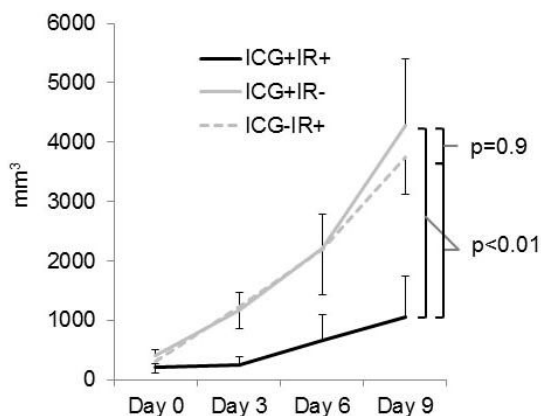


図 3. レーザー照射による腫瘍増殖抑制。ICG+IR+(ICG 投与後照射)は腫瘍増殖が抑制された(一番下の黒線)。縦軸は腫

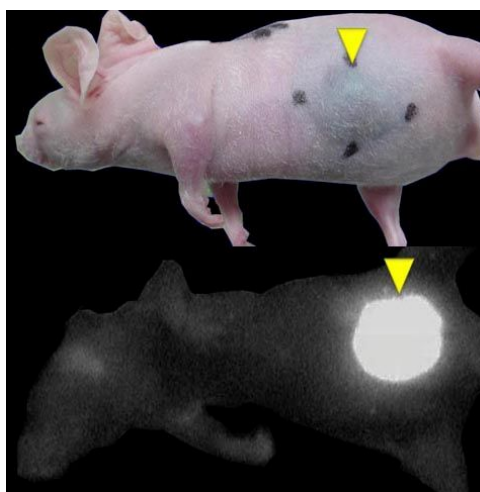


図 2. ICG 蛍光(移植人肝細胞癌)上:肉眼像、下:腫瘍に選択的に集積した ICG の白色蛍光

を取り込む機序について胆汁排泄障害が

疑われているがはっきりしていない。また、もっとも効果的な近赤外レーザー光の出力と周波数を比較した研究は無く、周囲正常組織への安全性の証明、適切な照射方法についての報告はない。

2. 研究の目的

本研究は光線力学療法（PDT）の確立を目指し、ICG が肝癌に集積する機序の解明、近赤外レーザーの適切な出力と安全性の確認、照射方法の開発、の3点を解明することが目的である。本研究の学術的な特色は、ICG が肝機能評価用等の試薬として薬事承認され、眼科領域ではICG が蛍光観察のための薬剤として臨床に応用されており、長年にわたり臨床において利用されていることから、人体において安全性が確立している薬物である。同じく臨床において近赤外光は、既に経皮的動脈血酸素飽和度の測定（パルスオキシメーター）光として広く臨床で利用されている。また骨を超える透過性を持つことから全身麻酔中の脳表面の酸素飽和度を測定する近赤外線脳酸素モニターも広く利用されている。この臨床で頻用される両者の新しい発想の組み合わせで利用することは独自性と創造性があると考えており、学術的な背景を証明すれば臨床応用に早期に実現できると考えている。ICG が特異的に肝癌（肝細胞癌、転移性肝腫瘍）に集積することは治療の腫瘍選択性を高め、従来治療法とは異なった全く新しい光線力学療法を開発するという点は独自性があると考えている。

3. 研究の方法

申請者はすでに、マウス肝細胞癌 ICG モデルを開発し完成させている（東京大学動物倫理委員会承認番号 医-P10-118）、本モデルを用いて、現存するマウス肝細胞癌 ICG モデル（HepG2, SKHep1, HuH-7）に対して、マウスに ICG (0.5mg/kg) を尾静脈より静注し、ICG が腫瘍のみに集積する 15 分以上経過後に、一部のマウスは、開腹し肝腫瘍が近赤外光により蛍光を発光することを、赤外線観察カメラで確認する。確認後にマウスに対し、近赤外光レーザー光（図 3）(800nm 前後、候補は 810nm) 照射を a-1 群 (50mW)、a-2 群 (100mW)、a-3 群 (150mW)、a-4 非照射群、b-1 群 (100mW) に分けて実験をする。それぞれの群に対して照射（局所温度測定し摂氏 42 度を超えない）を 3 日間の期間で毎日行い、移植された腫瘍への効果を観察する。近赤外光照射終了後、ペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔下でマウスから採血する。マウス肝細胞癌 ICG モデルから摘出した腫瘍を、蛍光顕微鏡を用いた蛍光観察を行い、ICG が腫瘍のどの部位に取り込まれ、また残存しているかを分析する。さらに転移性肝がんモデルマウスも開発する。詳しくは、大腸がん細胞を同マウス脾臓に直接投与することで肝転移巣を発生させ、その接種量と接種から転移巣を確認する。また前述と同条件でレーザー光を照射することで光化学反応を引き起こし、病理学的にアポトーシスを確認する。

4. 研究成果

光線力学療法（PDT）は、腫瘍親和性のある光感受性物質を投与し腫瘍にレーザー光を照射することで光化学反応を引き起こし、一重項酸素（活性酸素の一種）の酸化作用により実現される。PDT は、照射部位だけに高い抗腫瘍効果を示す局所治療のため侵襲が少なく機能温存が期待される。

本研究では光感受性物質であるインドシアニングリーン（ICG）を用い、新規に開発した大腸癌細胞株肝転移マウスモデルにおいて近赤外レーザー光（NIR）ICG、PDT 効果について検討した。こ

これは、転移性肝がんにおいて正常背景肝の転移性肝がんの周囲に ICG が特異的に取り込まれることがすでに報告されている。今回新規に肝転移マウスモデルを開発した。大腸がん細胞を同マウス脾臓に直接投与することで肝転移巣を発生させ、その接種量と接種から転移巣を確認するまでの期間と共に安定したモデルを開発し生産することに成功した。これは本研究による成果の一つである。

さらに、本研究による成果の二つ目である、同モデルに対し ICG を静注し肝転移巣周囲の正常肝細胞に ICG を集積させることに成功した。詳しくは、肝転移モデルに大腸がん細胞を直接後、約 10 日前後で ICG 静注し、sacrifice されたマウスにおいて適切な大きさの肝転移巣の発生と、その周囲に ICG が特異的に蓄積することが確認された。これに対し、本研究の最終目標である PDT が成立するか確認した。詳しくは、静注後 24 時間経過後に NIR 照射し 3 から 4 日後に確認する。NIR を照射する位置はラット右肋間辺りから肝右葉に見られる発光をターゲットにする。病理学的解析では、ICG を照射した場合、周囲の肝細胞はアポトーシスを起こしていた。一方、現時点では癌細胞自体にアポトーシスを起こしている所見が得られていない。NIR 装置の高出力化と照射時間延長が課題である。

<引用文献>

1. Kaneko J, Inagaki Y, Ishizawa T, Gao J, Tang W, Aoki T, et al. Photodynamic therapy for human hepatoma-cell-line tumors utilizing biliary excretion properties of indocyanine green. *Journal of gastroenterology*. 2014;49(1):110-6.
2. Shirata C, Kaneko J, Inagaki Y, Kokudo T, Sato M, Kiritani S, et al. Near-infrared photothermal/photodynamic therapy with indocyanine green induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through oxidative stress. *Scientific reports*. 2017;7(1):13958.
3. Kaneko J, Kokudo T, Inagaki Y, Hasegawa K. Innovative treatment for hepatocellular carcinoma (HCC). *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2018 Oct 22;3:78.
4. Inagaki Y, Kokudo T, Kamiya M, Uno SN, Sato M, Kaneko J, et al. A novel liver-specific fluorescent anti-cancer drug delivery system using indocyanine green. *Sci Rep*. 2019;9(1):3044.
5. Kaneko J, Ichida A, Kawaguchi Y, Hasegawa K. Pancreaticoduodenectomy: how to handle a replaced right hepatic artery. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2023 Apr 10;12(2):280-283. doi: 10.21037/hbsn-23-117.
6. 金子順一、白田力、稲垣善則、桐谷翔、風見由祐、國土貴嗣ら . Indocyanine green 蛍光肝細胞がんに対する近赤外レーザー照射による光線力学療法、分子細胞治療フロンティア外科分子細胞治療研究会編 2020 年 飯田橋パピルス

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inagaki Y, Kokudo T, Kamiya M, Uno SN, Sato M, Kaneko J, Kokudo N, Urano Y, Hasegawa K.	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel liver-specific fluorescent anti-cancer drug delivery system using indocyanine green.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3044-3044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39269-0	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 -

1. 著者名 Kaneko Junichi, Ichida Akihiko, Kawaguchi Yoshikuni, Hasegawa Kiyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Pancreaticoduodenectomy: how to handle a replaced right hepatic artery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatobiliary Surgery and Nutrition	6. 最初と最後の頁 280 ~ 283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/hbsn-23-117	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 外科分子細胞治療研究会(癌分子治療の臨床応用)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 飯田橋パピルス	5. 総ページ数 243
3. 書名 分子細胞治療フロンティア2020	

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

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