

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16339

研究課題名（和文）腫瘍への自己集積増幅機能を持つセラノスティクスナノプラットフォームの創製

研究課題名（英文）Development of tumor self-accumulating functionalized theranostics nanoplatform

研究代表者

蛭田 勇樹 (Hiruta, Yuki)

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・講師

研究者番号：60710944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん部位を見分けて近赤外光の吸収・蛍光が急激に大きくなる“Activatable”近赤外蛍光プローブ、がん細胞への選択的取り込みを可能にするpH応答性ポリマーミセルを開発した。これらを用いた蛍光イメージングと光熱療法によるがんセラノスティクス（Theranostics = 治療 Therapeutics + 診断Diagnostics）への応用可能性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「光」を利用した「治療」技術は、次世代のがん医療の創生に向けて急速に発展を遂げている。本技術は、生体透過性の高い近赤外蛍光プローブを用いるため、既存の光を利用した治療技術よりも生体深部のがん組織に対する有効な治療、また、イメージングによる診断技術へ応用できる可能性を持つ。近赤外光の生体透過性には限界があるが、医療機器（内視鏡など）との組み合わせにより、適用可能ながんは広がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research, an "activatable" near-infrared fluorescent probe, in which the absorption of near-infrared laser increases drastically with distinguishing cancer sites, and pH-responsive polymeric micelles that enable selective uptake into cancer cells were developed. The applicability of fluorescence imaging and photothermal therapy for cancer theranostics (theranostics = therapeutics + diagnostics) was verified.

研究分野：物理系薬学

キーワード：セラノスティクス 蛍光イメージング 光熱療法 pH応答性ポリマー 近赤外蛍光プローブ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在、がんの診断技術として核医学、MRI、超音波、光を利用したイメージングが主に進展している。既存のイメージングプローブのほとんどは、シグナルが一定の強度で発せられており、イメージング対象でのみシグナルを発生させるという概念はなかったが、近年、「がんだけを光らせる」ことが可能な蛍光プローブが開発されてきた。がん選択的な治療法に関しては、がん特異的なモノクローナル抗体に抗がん剤、放射性同位元素を結合した複合体が開発されている。しかし、抗がん剤が代謝、排泄を行う臓器に毒性を起すことや、抗体の血中半減期が長く放射性同位元素が発する放射能の被曝のため、これらの薬剤は投与量に限界がある。それに対し、近赤外吸収を持つフタロシアニン色素 IR700 を抗体に結合させ、近赤外レーザーを照射することで瞬時にがん細胞を破壊する光免疫療法 (Photoimmunotherapy: PIT) が新たな治療法として報告された。抗体が、がん細胞表面に選択的に結合すること、近赤外光を照射した部位のみに治療効果があることから副作用の小さな治療法であると言える。このように、「光」を利用した「診断」および「治療」技術は、次世代のがん医療の創製に向けて研究が進められている。

光熱療法 (photothermal therapy; PTT) は、光増感剤の集積かつ強い近赤外光を照射した部位を特異的に発熱させ、熱に弱い固形がんの深部から温熱療法によってがんを死滅させる方法であり、正常組織への侵襲性が低く、副作用の小さな治療法になると考えられている。また、生体透過性の高い近赤外蛍光色素 (インドシアニングリーン: ICG など) が光増感剤として利用できることから、がんの蛍光イメージングへの応用も期待されている。ICG は、アメリカ食品医薬品局 (FDA) 承認薬であり、安全性が高く臨床応用に適した光増感剤に成り得るが、常に近赤外吸収・蛍光性であるため、がん選択的な蛍光イメージング・PTT ができない、低分子化合物であるため、血中半減期が短く、がんへの集積性がないため、がん部位での十分な発熱が望めないといった課題がある。

2. 研究の目的

本研究では、論理的な精密分子設計により、ICG と同様のシアニン系色素を母骨格とした pH 応答性近赤外蛍光プローブ、がん細胞への選択的取り込みを可能にする pH 応答性ポリマーミセルを創製した。そして、蛍光イメージングと PTT によるがんセラノスティクス (Theranostics = 治療 Therapeutics + 診断 Diagnostics) への応用可能性を検証した。

がん細胞への選択的取り込みを可能にするために、pH 応答性混合電荷ポリマーを開発した。正電荷と負電荷からなる両性イオン基を持つコポリマーは、水分子と静電的に強い相互作用を引き起こし、表面に強い水和膜を形成することで、タンパク質などとの非特異吸着を抑えることができる。これにより、生体内における血中透過性に優れたドラッグキャリアの開発に応用されている。この両イオン性ポリマーに pH 応答性を付与し、ポリマー自身の電荷を pH に応じて変化させることができれば、DDS でのより高い到達効率の実現、タンパク質や細胞への吸着脱着の制御などが可能となり、がんのイメージングへの応用が期待される。本研究では、がん組織内の微小弱酸性環境に応答して細胞へ取り込まれやすくなる pH 応答混合電荷ポリマーを開発した。

正常細胞周辺環境 pH (pH 7.4) とがん細胞周辺弱酸性環境 (pH 6.8 前後) を見分けることができる近赤外蛍光プローブを開発した。近年プロトン付加を作用原理とするシアニン系色素が報告されているが、正常組織とがん細胞周辺環境の微小な pH 変化の認識は難しく、pH の差異を認識して急激に蛍光・光発熱特性を変化するプローブが望まれる。本研究で開発する分子は、正常組織周辺 (pH \approx 7.4) においては、近赤外光を吸収せず、蛍光性を示さない。一方、固形がん周辺環境 (pH \leq 6.8) において近赤外光を吸収し、蛍光性を回復することで、腫瘍部位高選択的な蛍光イメージング、光増感作用による発熱により、熱に弱いがん細胞を死滅させることが可能になる。

3. 研究の方法

(1) pH 応答性混合電荷ポリマー

カチオン性のモノマーとして [2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride (MTAC)、pH 応答性のアニオン性のモノマーとしてカルボン酸モノマー、中性のスペーサーの役割を持つモノマーの組成比を変えてラジカル重合した。アニオン性モノマーとして、Mono-2-(methacryloyloxy)ethyl succinate, mono-2-(methacryloyloxy)ethyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate、スペーサーの役割を持つ中性モノマーとして 2-hydroxyethyl methacrylate, 2-ethoxyethyl methacrylate, butyl methacrylate を用いて pH 応答性への影響を比較した。pH 滴定により pK_a を評価した。ポリマーの表面電荷は、データ電位測定によって測定した。HeLa 細胞への取り込みは、FITC ラベル化して、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) pH 応答性近赤外蛍光プローブ

pH 応答性近赤外蛍光プローブを合成し、 $^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, HRMS により同定した。紫外可視近赤外分光光度計により吸収スペクトル、分光蛍光光度計により蛍光スペクトルを測定した。蛍光プローブの pH 応答性は、プローブを添加し、HeLa 細胞をニゲリシンの入った pH 6.4 および 7.4 の高濃度高濃度 K^+ HBSS バッファー中で共焦点レーザー顕微鏡で観察し蛍光強度を比較した。pH 選択的な PTT は、プローブを添加し、HeLa 細胞をニゲリシンの入った pH 6.4 および 7.4 の高濃度高濃度 K^+ HBSS バッファー中で 808 nm レーザーを照射し、Live-Dead 染色液を滴下し、蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) pH 応答性混合電荷ポリマー

pH 応答性混合電荷ポリマーは、その組成比を変えることで、 $\text{p}K_a$ が 4.5 から 6.1 まで変化した。基本的に、ポリマーの疎水性が高いほど $\text{p}K_a$ が高くなった。アニオン性モノマーの疎水性が高いと、水溶液中でコンパクトなコンフォメーションをとり、電荷と電荷の相互作用を高める。それによりカルボン酸部分の解離を抑制するため、 $\text{p}K_a$ が高くなると考えられる。また、中性のスペーサーモノマーの組成比を多くすると $\text{p}K_a$ が高くなった。混合電荷ポリマーに疎水部位を導入した場合、カチオン性部位とアニオン性部位の静電相互作用は疎水部位のスペーサーによって小さくなる。よって、アニオン性基のマイナスチャージとカチオン性基のプラスチャージによる安定化が抑えられるので、アニオン性基のマイナスチャージが外れやすくなり、 $\text{p}K_a$ が中性側にシフトしたと考えられる。また、中性のスペーサーモノマーとして BMA を用いた場合、疎水性が高いことでミセルを形成した。

開発したポリマーは、pH 変化に応答しアニオン性基のマイナスチャージを失うことによって、ポリマー全体としてプラスチャージとなり、表面電荷が変化する分子設計となっている。中性付近の pH では、ほぼ 0 mV の値を示しているが、pH が下がるにつれて、正電荷が大きくなっていった。これは、混合電荷ポリマーが pH 変化に応答し、アニオン性基のマイナスチャージが外れることによって、ポリマーが全体的にプラスチャージとなり、表面電荷が変化したことを意味する。混合電荷状態からプラスチャージになることによって、細胞への吸着制御が可能かどうかを確認するため、ヘパリンとの相互作用を動的散乱法 (DLS) により評価した。ヘパリンは、アニオン性の組織成分であり、細胞膜との相互作用におけるモデル実験にも利用されている。高い pH と比べ、低 pH 環境において、合成した混合電荷ポリマーとヘパリンの混合溶液の流体力学的直径が増大することが分かった。これは、混合電荷ポリマーが pH 変化に応答し、アニオン性基のマイナスチャージが外れることによって、ポリマーが全体的にプラスチャージとなることで、マイナスチャージを持つヘパリンに吸着したことを意味する。in vitro 評価のため、開発したポリマー末端を蛍光色素の FITC でラベル化し、培養液 pH の異なる HeLa 細胞をイメージングした結果、pH 6.4 において取り込み量が pH 7.4 と比較し顕著に増加することが確認された (図 1)。がん細胞への選択的な光増感剤の送達技術への応用が期待される。

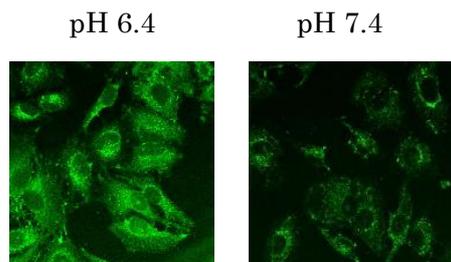


図 1 pH 7.4 と pH 6.4 で FITC ラベル化 pH 応答性混合電荷ポリマーミセルをインキュベーションした HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像

(2) pH 応答性近赤外蛍光プローブ

置換基を変えた数種類の pH 応答性近赤外蛍光プローブを合成した。置換基変えることで、応答する pH を任意に調節することが可能であった。また、正常組織周辺の pH 7.4 とがん組織周辺の pH 6.4-6.8 程度を認識して、吸光度が OFF/ON 制御できる誘導体も開発することができた。蛍光応答に関しても吸光度変化と同様の pH 応答を示した。

pH 7.4 と pH 6.4 で HeLa 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した画像を図 2 に示す。pH 7.4 と比較して、pH 6.4 では強い蛍光を示した。すなわち、pH 応答性近赤外蛍光プローブががん細胞周辺の弱酸性環境を認識して、蛍光イメージングできることが示された。PTT への応用を見据えて、pH 応答性近赤外蛍光プローブを細胞にインキュベーションし、レーザー照射した後に Live-Dead 染色液で生細胞 (緑色) と死細胞 (赤色) を蛍光染色した画像を図 3 に示す。pH 7.4 では死細胞はほとんど観察されないのに対して、pH 6.4 ではほとんどが死細胞となっていた。これらの結果より pH 選択的な光熱療法への応用可能性が示唆された。

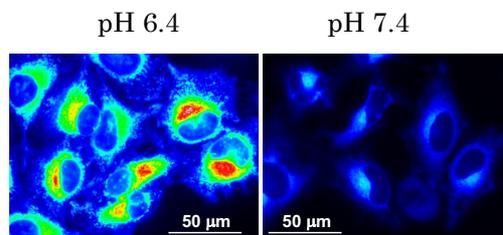


図 2 pH 応答性近赤外蛍光プローブによる HeLa 細胞の蛍光イメージング

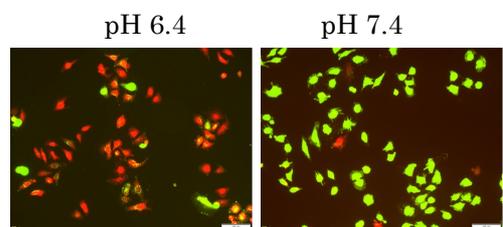


図 3 pH 応答性近赤外蛍光プローブとレーザー照射による PTT 効果
(生細胞を緑、死細胞を赤に染色)

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 Atanas Kurutos Yutaka Shindo, Yuki Hiruta, Kotaro Oka, Daniel Citterio	4. 巻 -
2. 論文標題 Organelle-selective near-infrared fluorescent probes for intracellular microenvironment labeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dyes and Pigments	6. 最初と最後の頁 110424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dyepig.2022.110424	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 KUMADA Rei, ORIOKA Mariko, CITTERIO Daniel, HIRUTA Yuki	4. 巻 70
2. 論文標題 Fluorescent and Bioluminescent Probes based on Precise Molecular Design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 601～616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/bunsekikagaku.70.601	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 Atanas Kurutos, Yutaka Shindo, Yuki Hiruta, Kotaro Oka, Daniel Citterio	4. 巻 181
2. 論文標題 Near-infrared pH responsive heptamethine cyanine platforms: Modulating the proton acceptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dyes and Pigments	6. 最初と最後の頁 108611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dyepig.2020.108611	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 Hiruta Yuki, Sawada Kazuki, Mizui Yuki, Citterio Daniel	4. 巻 93
2. 論文標題 pH-Responsive Tunable Mixed-Charge Polymers for pH-Selective Interaction with Anionic Biological Constituents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 547～552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20190374	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yuki Hiruta
2. 発表標題 Development of stimuli-responsive polymers for diagnostic and therapeutic applications
3. 学会等名 2021 MRS-T International Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Hiruta, Kazuki Sawada, Daniel Citterio
2. 発表標題 pH-Responsive mixed-charge polymer for weak acidic tumorous environment selective cellular uptake
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Hiruta, Kazuki Sawada, Kento Kannaka, Haruka Miura, Kohei Sano, Takahiro Mukai, Daniel Citterio
2. 発表標題 Development of temperature-responsive polymer materials for cancer therapy and imaging
3. 学会等名 The 2019 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Hiruta, Kazuki Sawada, Taisei Kaku, Yuki Tokura, Seimei Shiratori, Daniel Citterio
2. 発表標題 pH-response tunable mixed-charged polymers for reversible adsorption and desorption of proteins
3. 学会等名 ACS Fall 2019 National Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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