

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462039

研究課題名(和文) 肝がんのインドシアニン・グリーン蛍光機序解明と近赤外光線力学的療法の開発

研究課題名(英文) Development of a photodynamic therapy using Indocyanine green dye and near-infrared laser for hepatocellular carcinoma

研究代表者

金子 順一 (Kaneko, Junichi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50328118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌(HCC)は、種々の治療技術の進歩により患者の生存率が大きく改善したが、依然治療後の早期かつ高頻度なHCCの再発が課題となっている。その課題を克服するため、HCCに対する有効な新規治療法として、HCC細胞に蓄積する性質をもつ蛍光物質indocyanine greenと近赤外光を利用しHCCに対する特異性の高い光線力学的治療(PDT)を開発した。本方法は抗腫瘍効果を持つことを証明し、PDTとして肝細胞癌細胞からなる固形腫瘍に対し始めて抗腫瘍効果を持つことを発見し、さらに抗腫瘍効果は活性酸素と腫瘍自体の温度上昇であることが今回の研究で証明された。今後の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed, a new anti-cancer treatment, the photodynamic therapy (PDT) using Indocyanine green (ICG) and near-infrared (NIR) laser for hepatocellular carcinoma (HCC). However, a molecular mechanism underlying this effect needs to be elucidated. HuH-7 cells, a well-differentiated human HCC cell line, were transplanted subcutaneously into BALB/c-nu/nu mice. ICG was administered 24h before NIR irradiation. The irradiation was performed by 823-nm NIR laser. The temperature of HuH-7 xenografts rose to 49C. The cell toxicity of ICG-NIR was inhibited by cooling sheet. Reactive oxygen species (ROS) production was detected in vitro and in vivo, and the ROS production was inhibited under with a cooling sheet. Repeat NIR irradiation increased the cell toxicity. The mean tumor volume growth on day 9 was significantly suppressed ($p<0.01$). Apoptosis of HCC cells after ICG-NIR PDT is caused by heat production mediated ROS production. Repeated ICG-NIR irradiation improves the anti-tumor effect.

研究分野：肝細胞癌治療

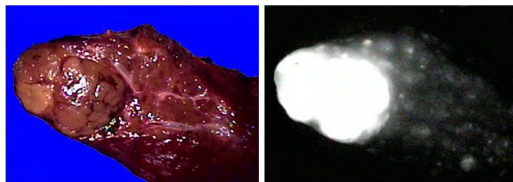
キーワード：肝細胞癌 indocyanine green 光線力学的治療

1. 研究開始当初の背景

肝がん(肝細胞癌)に対する治療法として、肝切除、ラジオ波焼灼療法、肝動脈化学塞栓療法、抗がん化学療法が確立している。この治療法の発展にもかかわらず、がん研究振興財団が発行するがんの統計(<http://ganjoho.jp/public/index.html>)によると肝がんは癌死亡原因の第4位に位置する。現状における肝腫瘍に対する治療における問題点は、腫瘍のみを選択的に治療することが困難なことである。例えば、肝切除を行おうとすると切除範囲が大きくなり、正常肝部分も摘出される。ラジオ波焼灼療法などの局所治療でも腫瘍を含んだ正常肝部分も焼却される。一方、径血管内治療、抗癌化学療法においては治療効果がまだ満足できるものではない。本研究では、従来とは違う全く新たな発想のもとに、より選択的に肝がんを根絶する治療法を開発する。

2. 研究の目的

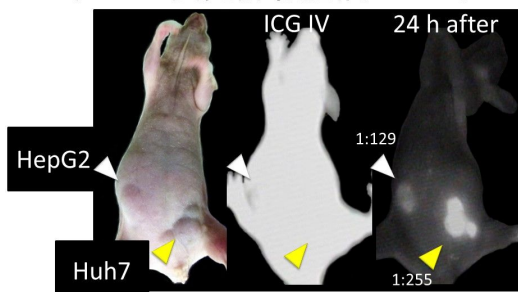
- 近赤外光感受性物質の一つである indocyanine green (ICG)は肝細胞癌に特異的に強く集積する。



Ishizawa T, Kokudo N et al Cancer 2009

Indocyanine green (ICG)は肝機能検査で頻用されてきたが、近赤外光を照射することで蛍光を発光することを利用して蛍光眼底造影検査や、近年、乳癌のセンチネルリンパ節の同定、脳神経外科手術時における脳血管の造影に用いられるなど、古くて新しい薬剤である。さらに最近、静注することにより、肝細胞癌に集積することが発見された。同肝離断断面を後述の赤外観察カメラシステムで観

マウスICG蛍光肝細胞癌PDTモデル

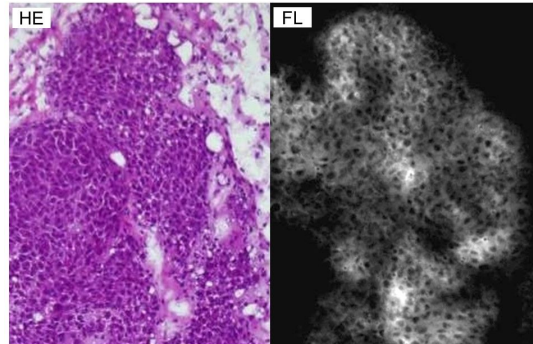


- Fluorescence intensity of Huh7 was 2-fold increase compared to HepG2.

察すると、肝細胞癌に強い蛍光発光を認める。この新たに ICG をがん蛍光プローブとして利用し、高感度に肝細胞癌を検出しながら系統的切除術を実施する一連の治療技術を構

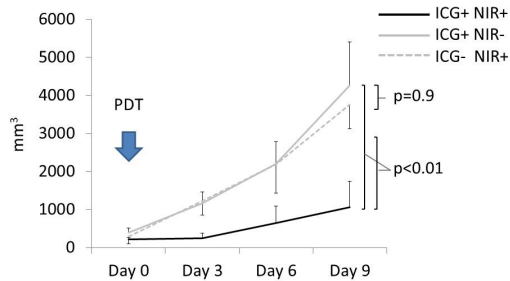
築するなど、蛍光ナビゲーションサージャリーとして術中ナビゲーションや肝細胞癌に高い感度と特異度が得られ、腹腔鏡下手術においても有用性が報告されている。一方、ICGは光感受性物質として、近赤外光を吸光することも知られていたが、この肝細胞癌に特異

Fluorescence histological patterns (Huh7)



的に集積する性質を利用し、光を増幅して近赤外光レーザーとして照射することで肝細胞癌において光線力学的療法が成立する可能性が期待された。本研究ではマウスモデル

Huh7 tumor growth after NIR exposure



Kaneko J, Kokudo N et al. J Gastroenterol. 2014

を作成し光線力学的療法のヒト肝細胞癌腫瘍に対する効果を探る。

3. 研究の方法

マウスモデルで、光感受性物質 ICG が特異的に高分化肝細胞癌株 HuH-7 腫瘍に集積することを発見し、近赤外光レーザー照射により本固形腫瘍において抗腫瘍効果を認め新規光線力学療法が確立されたが(Kaneko J et al. 2014)、

マウス ICG 蛍光肝細胞癌光線力学療法モデルに対する投与 ICG 量の決定、近赤外光レーザー照射による抗腫瘍効果の解析としてマウスの皮下に移植したヒト肝細胞癌に対してレーザー照射中の腫瘍温度の測定、ヒト肝細胞がんマウス肝転移モデルの開発、臨床では大腸がん肝転移で ICG が腫瘍周囲に集積することからヒト大腸がんマウス肝転移モデルの開発を行った。詳細は、ヒト肝細胞癌細胞 HuH-7 や大腸癌細胞 HCT-116 を BALB/c ノードマウスの脾臓へ移植して肝転移巣を形成させたマウスに対して ICG を静注し、肝転移巣の ICG 蛍光像を観察した。マ

ウス ICG 蛍光肝細胞癌光線力学療法モデルで腫瘍増大が抑制されるしくみを探るために、肝細胞癌細胞 HuH-7 細胞を用いた in vitro 解析系の構築を実施した。ICG 含有培地で培養し、近赤外光レーザーを照射し観察した。また、マウス肝細胞がん皮下モデルでも近赤外光レーザー照射を行いサーモグラフィで観察および記録した。

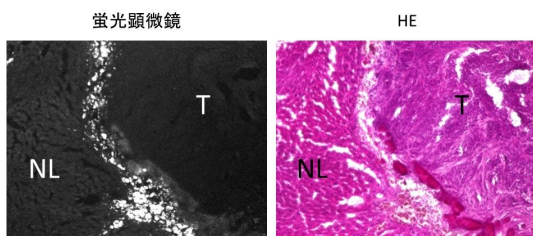
4. 研究成果

ヒト肝細胞癌細胞 HuH-7 や大腸癌細胞 HCT-116 を BALB/c ノードマウスの脾臓へ移植して肝転移巣を形成させたマウスに対

HCC肝転移モデルの構築

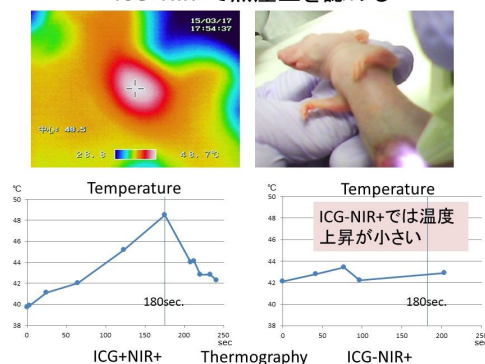
CRLMモデルの構築

- ・ ヒト大腸癌細胞 (HCT-116, 5×10^6 個)をBALB/cノードマウスの脾臓に注入
- ・ 3週間後にICGを静注(経尾静脈)
- ・ 肝臓を採取し、腫瘍組織と周辺非癌部組織を観察



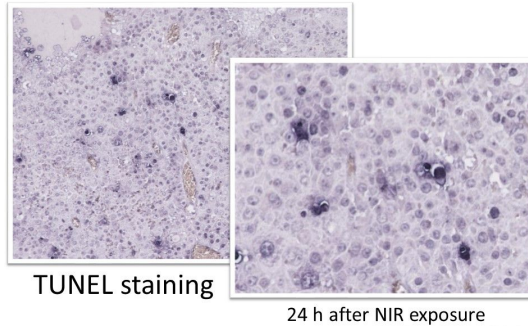
して ICG を静注し、肝転移巣の ICG 蛍光像を観察し、HuH-7 由来の転移巣では腫瘍組織に強い蛍光がみられた。HCT-116 由来の転移巣は、蛍光カメラで腫瘍組織の蛍光が確認された。蛍光顕微鏡では、腫瘍組織周囲の非癌部組織がリング状に蛍光がみられた。マウス ICG 蛍光肝細胞癌光線力学療法モデルで腫瘍増大が抑制されるしくみを探るために、肝細胞癌細胞 HuH-7 細胞を用いた in vitro 解

ICG+NIR+で熱産生を認める



析系を構築した。高分化肝細胞癌株 HuH-7 細胞死の誘導のメカニズムの解明で酸化ストレスの誘導が見られること、免染による DNA 酸化損傷の検出、ICG 濃度依存的な近赤外光による細胞死の証明、熱抑圧の効果から見た細胞死の誘導のメカニズムの解明、近赤外光照射回数による抗腫瘍効果の増強の証明、TUNEL 染色により近赤外光照射によりアポトーシスが誘導されていることがわ

照射によりアポトーシスが誘導されている



TUNEL staining

24 h after NIR exposure

かった。HuH-7 細胞培養チューブ内の ICG 含有培地に対して近赤外光レーザーを照射したところ ICG 濃度依存的に熱が発生した。さらに、ICG 含有培地で培養し、近赤外光レーザーを照射した場合、非照射に比べて HuH-7 細胞増殖が抑制された。また、マウス肝細胞がん皮下モデルでも近赤外光レーザー照射を行ったところ、腫瘍全体の温度が上昇することが確認された。また、近赤外光レーザー照射装置の開発も行い、より ICG の最大光吸収波長により近い波長 805nm、出力 200mW でより強化された抗腫瘍効果を確認した。

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3件)

1. Masuda K, Kaneko J, Kawaguchi Y, Togashi J, Arita J, Akamatsu N, Sakamoto Y, Hasegawa K, Sumihito T, Kokudo N. Diagnostic accuracy of indocyanine green fluorescence imaging and multidetector row computed tomography for identifying hepatocellular carcinoma with liver explant correlation., *Hepatol Res.* 2017 Feb 8. doi: 10.1111/hepr.12870.
2. Shirata C, Kaneko J, Inagaki Y, Kokudo T, Sato M, Kiritani S, Akamatsu N, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Photodynamic therapy with indocyanine green induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through heat-mediated oxidative stress, *Scientific reports* 2017 in press

3. Inagaki Y, Kokudo T, Kamiya M, Uno S, Sato M, Kaneko J, Kokudo N, Urano Y, Hasegawa K, A novel liver specific fluorescent anti-cancer drug delivery system using indocyanine green, Scientific reports 2017 in press

〔学会発表〕(計7件)

1. Kaneko J, Inagaki Y, Kokudo T, Shirata C, Kiritani S, Sato M, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Photodynamic therapy for human hepatoma-cell line tumors utilizing biliary-excretion properties of indocyanine. 16th International Photodynamic Association World Congress. Jun, 8th - 13th, 2017, Coimbra (Portugal)
2. 白田力, 金子順一, 稲垣善則, 國土貴嗣, 有田淳一, 赤松延久, 阪本良弘, 長谷川潔, 國土典宏. Indocyanine green 蛍光肝細胞癌に対する近赤外光照射による光線力学療法. 第26回日本光線力学学会, 2016年6月26日, はまぎんホール ヴィアマール (横浜市・横浜)
3. 金子順一, 長谷川潔, 國土典宏. Indocyanine green 蛍光肝細胞がんに対する近赤外レーザー光照射による光線力学療法. 第52回日本肝臓学会総会, 2016年5月19日-20日, ホテルニューオータニ幕張 (千葉県・千葉市)
4. 白田力, 金子順一, 稲垣善則, 國土貴嗣, 有田淳一, 赤松延久, 阪本良弘, 長谷川潔, 國土典宏. Indocyanine green 蛍光肝細胞癌に対する近赤外光照射による光線力学療法. 東京大学医学部附属病院先端医療シーズ開発フォーラム2016, 2016年2月2日, 東京大学伊藤国際学術研究センター (東京都・文京区)
5. Shirata C, Kaneko J, Inagaki Y, Kokudo T, Yamamoto S, Akamatsu N,

Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Near infrared photodynamic therapy using Indocyanine green inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma. International Liver Cancer Association 2015. Sep., 4th - 6th, 2015, Paris (France)

6. Inagaki Y, Kaneko J, Shirata C, Kokudo T, Yamamoto S, Akamatsu N, Arita J, Tang W, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. 第15回東京大学生命科学シンポジウム, 2015年6月27日, 武田先端知ビル (東京都・文京区)
7. 金子順一, 稲垣善則, 白田力, 國土貴嗣, 山本訓史, 赤松延久, 有田淳一, 阪本良弘, 唐子堯, 長谷川潔, 國土典宏. Indocyanine green 蛍光肝細胞癌に対する腹腔鏡下ないし開腹下近赤外光レーザー照射による光線力学療法, 第69回手術手技研究会, 2015年5月16日, 高崎ビューホテル (群馬県・高崎市)

〔図書〕(計1件)

1. Kaneko J, Inagaki Y, Ishizawa T, Kokudo N. Concepts and Applications of Fluorescence Imaging for Surgeons, Near-infrared laser photodynamic therapy for human hepatocellular carcinoma cell line tumor with indocyanine green fluorescence, Springer, 2015, p185-193

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)
取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.u-tokyo-hbp-transplant-surgery.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子順一 (KANEKO, Junichi)

東京大学・医学系研究科・講師

研究者番号：50328118

(2)研究分担者

國土典宏 (KOKUDO, Norihiro)

東京大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00205361

(3)連携研究者

稲垣善則 (INAGAKI, Yoshinori)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40733390

(4)研究協力者

浦野泰照 (URANO, Yasuteru)

國土貴嗣 (KOKUDO, Takashi)

白田力 (SHIRATA, Chikara)

桐谷翔 (KIRITANI, Sho)

佐藤祐充 (SATO, Masamitsu)