

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26708024

研究課題名(和文)有機無機ハイブリッド色素集積体の合成と光音響造影剤としての応用

研究課題名(英文) Dye-Containing Organic-Inorganic Hybrid Materials for Photoacoustic Imaging Probes

研究代表者

三木 康嗣 (MIKI, KOJI)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60422979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外光を吸収し、超音波(光音響信号)を発生するシアニン系色素をヒアルロン酸、ポリエチレングリコールに結合させ、有機-無機ハイブリッド材料を合成した。合成した材料は、水中でナノ粒子を形成した。このナノ粒子は、近赤外パルスレーザーを照射することで、効率良く光音響信号を発生することを明らかにした。このナノ粒子を担がんマウスに投与したところ、効率良く腫瘍に蓄積し、光音響撮像装置を用いることで腫瘍をコントラスト良く可視化できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Organic-inorganic hybrid materials consisting of hyaluronic acid, poly(ethylene glycol), and cyanine dyes, which absorb near-infrared light and generate ultrasound, so-called photoacoustic signal, were prepared. These materials formed nanoparticles in water, which generated photoacoustic signal efficiently under near-infrared pulse laser irradiation. When these nanoparticles injected to tumor-bearing mice, nanoparticles efficiently accumulated in tumor sites and visualized them in high contrast.

研究分野：有機合成化学

キーワード：近赤外色素 両親媒性 ヒアルロン酸 ナノ粒子 腫瘍 光音響

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 光音響撮像法について

光音響撮像法は、光照射により引き起こされる造影剤もしくはその周囲の媒体（水分子など）の瞬間的な膨張により発生する疎密波（光音響波と呼ばれる。妊婦健診にも利用される超音波の一種）を検出することで行われる（図1）。その膨張は、造影剤分子が吸収した励起光エネルギーが効率良く熱エネルギーへと変換され、放出されることで引き起こされる。この原理を踏まえると、生体透過性の高い近赤外光を高効率に吸収し、蛍光発光しない色素が、高効率に光音響波を発生する造影剤分子である可能性が高い（Wang, L. V. et al. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2756）。本研究では、モル吸光係数が高い近赤外色素インドシアニングリーン系色素（ICG と略す）、シリコンナフタロシアニン（SiNc と略す）、ボロンジピロメテン（BODIPY と略す）二量体がこの条件に即した分子として選定した（図2）。しかし、これらの色素は標的指向性を持たないため、造影剤には適さなかった。なお、光音響撮像法では、生体透過性の良い光音響波を検出するため、光イメージングよりコントラストが良いとされる（Ntziachristos, V. et al. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2783）。また、PET や MRI などが必要な大型装置も不要であり、将来的には妊婦健診で用いられるハンドヘルド型の装置で光励起と検出が可能であると考えられている。

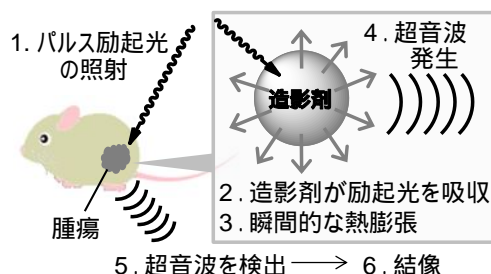


図1. 光音響撮像法の概要.

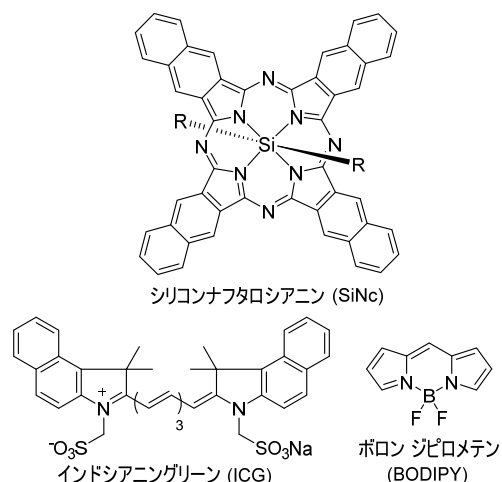


図2. 本課題で検討した近赤外色素群.

### (2) 腫瘍の可視化について

がんの早期発見と治療につながる造影剤の開発は喫緊の課題である。申請者はこれまで、腫瘍周辺の脆弱な血管壁に起因するEPR効果（腫瘍組織にはナノメートルサイズの粒子や集合体が選択的に蓄積しやすいという現象）を利用する高分子自己集合体の腫瘍への集積とそれを利用した高コントラスト光腫瘍イメージングに成功している（例えば *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6567）。しかし、蛍光イメージングより深部の腫瘍検出に適した光音響腫瘍イメージングに適用できる高コントラスト造影剤開発には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、親水性置換基で修飾されたSiNc、ICG、BODIPY二量体などを高分子、特に多糖類と複合化することにより、有機無機ハイブリッド材料を創製する。また、結合させる色素の割合、親水性基の種類、主鎖高分子の長さを調節し、ハイブリッド材料の形成する自己集合体のサイズや信号強度とともに体内動態、腫瘍集積性を精査する。また、腫瘍ターゲティング分子を導入することで、高い腫瘍特異性を持つ光音響腫瘍造影剤を開発する。

### 3. 研究の方法

本研究課題は、以下の4項目から成る。(1) ペントフラノース骨格を持つ多糖類縁高分子を母体とする光腫瘍造影剤の開発、(2) ICGを結合したヒアルロン酸誘導体を用いる光音響腫瘍イメージング、(3) SiNc および BODIPY 二量体と高分子との複合化による光音響造影剤の開発である。各々についてその方法を以下に示す。

#### (1) ペントフラノース骨格を持つ多糖類縁高分子を母体とする光腫瘍造影剤の開発

これまで研究代表者は、シクロペンタン環を母骨格に持つ多糖類縁高分子を用い造影剤を創製した。天然多糖はヘキソースもしくはフラノース骨格を主鎖に持つため、環内に酸素原子が含まれる影響を明らかにする必要がある。本項ではペントフラノース骨格を持つ多糖類縁高分子を新規に開発し、環内の酸素原子の影響を明らかにする（図3）。特に光イメージング装置を用いて腫瘍集積性や造影能に与える影響を精査する。

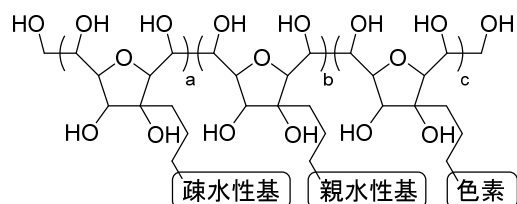


図3. ペントフラノース骨格を持つ多糖類縁高分子.

(2) ICG を結合したヒアルロン酸誘導体を用いる光音響腫瘍イメージング

前項(1)で得られた知見をもとに、ヒアルロン酸に近赤外色素 ICG 類縁体を結合させ、光音響腫瘍造影剤を創製する(図4)。前項では疎水性基を別途結合させることにより両親媒性高分子とし、自己集合体を形成させた。本項では、疎水性近赤外色素 ICG 類縁体を用い、ICG が集積化された自己集合体を光音響造影剤とする。集積化された ICG は蛍光発光が抑えられ、光音響信号強度が増幅すると考えたためである。得られる造影剤の体内動態、腫瘍集積性を精査する。

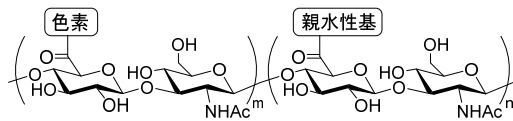


図4 .色素を結合したヒアルロン酸誘導体 .

(3) SiNc および BODIPY 二量体と高分子との複合化による光音響造影剤の開発

前項(2)で得られた知見をもとに、ヒアルロン酸や親水性高分子に近赤外色素 SiNc や BODIPY 二量体を結合させ、より光音響信号強度の強い光音響腫瘍造影剤を創製する。得られる造影剤の体内動態、腫瘍集積性を精査する。

4 . 研究成果

(1) ペントフラノース骨格を持つ多糖類縁高分子を母体とする光腫瘍造影剤の開発

疎水性ポリメタクリレート (PMA) を持つ 7-オキサノルボルネン( vic-ジオール部位はアセタール保護されている )の開環メタセシス重合と続く触媒的なジヒドロキシル化により多糖類縁高分子を合成した(図5)。なお、原料となるモノマー 7-オキサノルボルネンは、ピバロイルオキシ基を持つフランとケテン等価体との Diels-Alder 反応、触媒的ジヒドロキシル化反応、vic-ジオール部位のアセタール保護などを経て合成した。得られたテトラヒドロフラン環を主鎖に含む多糖類縁高分子に、銅触媒を用いる環化付加反応によりポリエチレングリコール (PEG) をグラフトし、水溶性高分子を得た。ここに、近赤外色素インドシアニングリーン (ICG) および表面インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  を認識する腫瘍ターゲティング分子である環状 RGD ペプチドを結合させ、光腫瘍造影剤 1 を得た。造影剤 1 は、水中で粒径 159 nm の球状自己集合体を形成した(透過型電子顕微鏡により確認)。造影剤 1 を担がんマウスに投与し、光腫瘍イメージングを行った結果、1 は効率良く腫瘍に集積し、高コントラストな像を与えた(図6)。腫瘍以外に最も発光量が強かった肝臓との蛍光強度比を算出したところ、投与後 12 時間以内に 1 を超えることがわかった。なお、

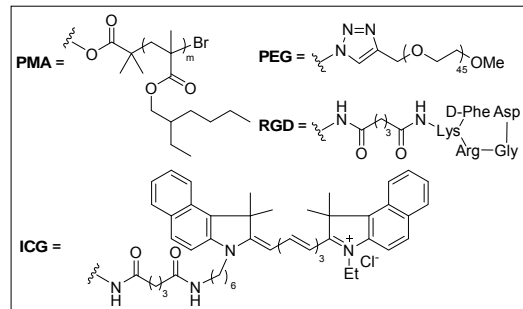
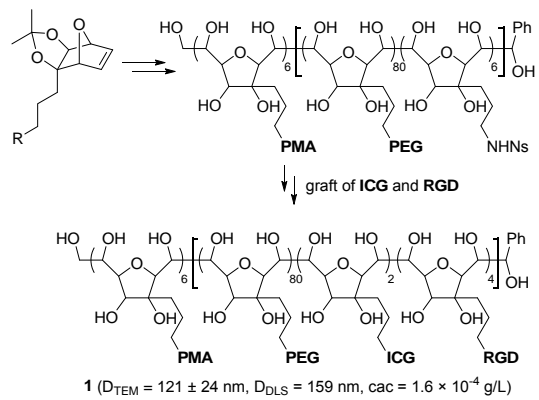


図5 . ペントフラノース骨格を持つ多糖類縁高分子を母体とする造影剤 .

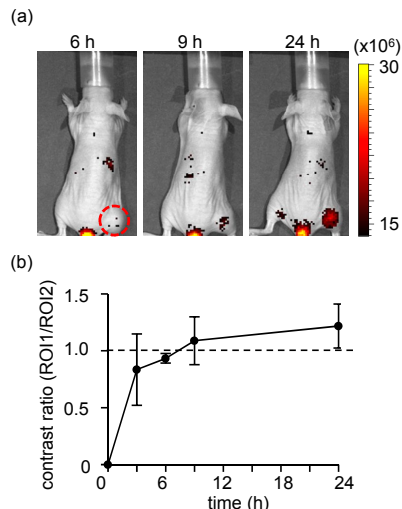


図6 . (a) 担がんマウスに造影剤 1 を投与した際の光イメージング像(photon/sec) . (b) 腫瘍と肝臓の蛍光強度比 .

多糖類縁高分子 1 は、研究代表者が以前報告したシクロペンタン環を母骨格に有し、オリゴペプチドを疎水性部位として持つ多糖類縁高分子と比較し、ほとんど細胞毒性を示さないことを明らかにした。

このように、ペントフラノース骨格を持つ多糖類縁高分子は、研究代表者が開発したシクロペンタン環を持つ多糖類縁高分子と遜色無い有望な材料であることを示した。なお、側鎖に近赤外色素や腫瘍ターゲティング分子 RBD を結合させることで、これらの機能を損ねることなく造影剤を開発できることを明らかにした。これら知見を活かし、次項以降の研究を推進した。





#### (4) 研究成果のまとめと展望

本課題では、以下の三つを明らかにした。まず、ペントフラノース骨格を持つ人工多糖類縁高分子に近赤外色素と腫瘍ターゲティング分子をハイブリッド化し、高性能な光腫瘍造影剤を創製した。これにより、近赤外色素と腫瘍ターゲティング分子の機能を損なうことなく多糖類を化学修飾する手法を開発した。次に、これら技術を活かし、天然多糖ヒアルロン酸に近赤外色素 ICG および TBD を複合化させ、腫瘍集積性の高い有機無機ハイブリッド材料 光音響腫瘍造影剤を開発した。腫瘍ターゲティング分子を結合させ、さらに腫瘍集積性を高めることが、実用化に資する造影剤開発につながると考えられる。最後に、近赤外色素の中でも Nc 系および BODIPY 系色素の光退色性が低いことから、ICG にとって代わる有望な光増感剤として期待されることを明らかにした。このことは、今後新しい造影剤の開発につながる成果であるといえる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) “pH-Responsive Near-Infrared Fluorescent Cyanine Dyes for Molecular Imaging Based on pH Sensing”  
Miki, K.; Ohe, K. et al. (6 人中 1 番目)  
*Chem. Commun.* **2017**, accepted. DOI: 10.1039/C7CC03035E. (査読有)
- (2) “Polymeric Self-Assemblies with Boron-Containing Near-Infrared Dye Dimers for Photoacoustic Imaging Probes”  
Miki, K.; Ohe, K. et al. (7 人中 1 番目)  
*Biomacromolecules* **2017**, *18*, 249-256. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01568. (査読有)
- (3) “シアニン系色素 - ヒアルロン酸複合造影剤を用いる光音響腫瘍イメージング”  
三木康嗣, 大江浩一  
*ケミカルエンジニアリング誌* **2016**, *61*, 18-22. (総合論文, 査読無)
- (4) “Synthesis of Biocompatible Polysaccharide Analogues and Their Application to In Vivo Optical Tumor Imaging”  
Miki, K.; Ohe, K. et al. (7 人中 1 番目)  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2015**, *88*, 792-803. DOI:10.1246/bcsj.20150038. (査読有)
- (5) “Near-Infrared Dye-Conjugated Amphiphilic Hyaluronic Acid Derivatives as a Dual Contrast Agent for Optical and Photoacoustic Tumor Imaging In Vivo”  
Miki, K.; Ohe, K. et al. (8 人中 1 番目)  
*Biomacromolecules* **2015**, *16*, 219-227. DOI:10.1021/bm501438e. (査読有)
- (6) “多糖類縁体の合成・機能化に基づく高性能光腫瘍造影剤の開発”  
三木康嗣  
*有機合成化学協会誌* **2015**, *73*, 580-594. (総合論文, 査読有)

- (7) “Sonication-Induced Formation of Size-Controlled Self-Assemblies of Amphiphilic Janus-Type Polymers as Optical Tumor-Imaging Agents”  
Miki, K.; Ohe, K. et al. (7 人中 1 番目)  
*Small* **2014**, *10*, 3119-3130. DOI:10.1002/sml.201400358. (査読有)

〔学会発表〕(計 24 件)

- (1) “Near-infrared dye-grafted nanoparticles for tumor imaging and therapy”, Koji Miki, 2016 Annual Meeting of The Japan Scripps Society -Scripps Asia-, Tokyo, 2016 年 12 月 3 日. [招待講演]
- (2) “パイ共役分子 - 生体高分子ハイブリッド材料を用いる腫瘍の可視化と治療”, 三木康嗣, 小島健太郎, 垣内 唯, 大江浩一, 第 65 回高分子討論会, 横浜, 2016 年 9 月 14-16 日. [依頼講演]
- (3) “多糖類縁体の機能化に基づく腫瘍造影剤の創出”, 三木康嗣, 第 35 回有機合成若手セミナー 明日の有機合成を担う人のために, 京都, 2015 年 8 月 1 日. [依頼講演]
- (4) “多糖類とパイ共役分子の融合に基づく医用材料の創出”, 三木康嗣, 第 64 回高分子討論会, 宮城, 2015 年 9 月 15-17 日. [依頼講演]
- (5) “多糖類縁体の合成・機能化に基づく高性能腫瘍造影剤の開発”, 三木康嗣, 第 7 回 ChemBio ハイブリッドレクチャー, 東京, 2014 年 10 月 4 日. [依頼講演]
- (6) “多糖類縁体の合成・機能化に基づく高性能腫瘍造影剤の開発”, 三木康嗣, 第 31 回有機合成化学セミナー, 福岡, 2014 年 9 月 17-19 日. [受賞講演]
- (7) “Synthesis of Near-Infrared Dye-Conjugated Polysaccharide Analogues and Their Application to Tumor Imaging”, Koji Miki, International Symposium on Polymeric Materials Based on Element-Blocks, 京都, 2014 年 5 月 31 日. [招待講演]

〔図書〕(計 1 件)

- (1) “元素ブロック高分子材料を用いる光腫瘍イメージング”  
三木康嗣, 大江浩一  
「元素ブロック材料の創出と応用展開」  
中條善樹監修, シーエムシー出版, **2016**, pp248-258. (書籍, 分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: Near-Infrared Dye-Conjugated Hyaluronic Acid Derivative and Contrast Agent for Optical Imaging Including Them  
発明者: Miki, K.; Yamauchi, F.; Yano, T.; Minami, M.; Inoue, T.; Kobayashi, Y.; Nakano,

K.; Ohe, K.  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：EP14709763.8  
申請年月日：25/Aug/2015  
国内外の別： 国外

取得状況（計 4 件）

名称：pH 応答性シアニン系近赤外色素の開発  
発明者：三木康嗣，小島健太郎，折出一明、  
原田 浩、大江浩一  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特開 2016-160194  
取得年月日：2016 年 9 月 5 日  
国内外の別： 国内

名称：近赤外色素結合ヒアルロン酸誘導体お  
よびそれを有する光イメージング用造影剤  
発明者：三木康嗣，井上達広，小林靖人，中  
野克哉，大江浩一，山内文生，矢野哲哉，南  
昌人  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特開 2014-185333  
取得年月日：2014 年 10 月 2 日  
国内外の別： 国内

名称：Near-Infrared Dye-Conjugated Hyaluronic  
Acid Derivative and Contrast Agent for Optical  
Imaging Including Them  
発明者：Miki, K.; Yamauchi, F.; Yano, T.;  
Minami, M.; Inoue, T.; Kobayashi, Y.; Nakano,  
K.; Ohe, K.  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：WO2014/129674 A1  
取得年月日：28/Aug/2014  
国内外の別： 国外

名称：Near-Infrared Dye-Conjugated Hyaluronic  
Acid Derivative and Contrast Agent for Optical  
Imaging Including Them  
発明者：Miki, K.; Yamauchi, F.; Yano, T.;  
Minami, M.; Inoue, T.; Kobayashi, Y.; Nakano,  
K.; Ohe, K.  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：US14/767362  
取得年月日：取得内諾（2017 年 6 月 12 日）.  
国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.ehcc.kyoto-u.ac.jp/eh31/home/index-j.html>

(1)研究代表者  
三木 康嗣（MIKI Koji）  
京都大学・工学研究科・准教授  
研究者番号： 60422979