

近赤外光によるがん治療と診断を可能にするヒドロゲル微粒子の創製と

その悪性脳腫瘍治療への応用

Development of hydrogel nanoparticles which enable to treat cancer and diagnosis with near-infrared light and their application for glioblastoma

広島大学大学院先進理工系科学研究科応用化学プログラム 助教 河崎 陸

Program of Applied Chemistry, Graduate School of Advanced Science and Engineering,
Hiroshima University, Riku Kawasaki

要旨

1985 年にがんが我が国における一番主要な死因となって以降、その死亡者数は増加の一途を辿っている。医療技術や科学技術の進展に伴って、根治可能ながん種も増加してきた。その一方で、悪性脳腫瘍や悪性黒色腫など、悪性度の高いがんに対する治療法は依然として発展途上にある。特に、悪性脳腫瘍は脳への薬剤送達の困難さ、正常組織への損傷が全身への機能障害を誘発してしまうことから、その治療は困難を極めている。ここで光の時空間制御など操作性の高さから、低侵襲な光治療として、光線力学療法（PDT）の悪性脳腫瘍への応用が期待されている。本研究課題では、生体透過性に優れた近赤外光を利用することでがん治療と診断を実現するヒドロゲル微粒子の創製とその悪性脳腫瘍への応用を目指した。

1. はじめに

1985 年以降、がんは我が国における死因の第一位として君臨し続けている。そのため、これらがんに対する治療法の開発は健康長寿社会の実現において、喫緊の課題である。一方で、医療技術や科学技術の進展に伴って、根治可能ながん種も増加傾向にある。しかしながら、悪性黒色腫や悪性脳腫瘍のように進行性や転移能の高いがんに対する治療法は依然として発展途上にある。特に悪性脳腫瘍は脳内への薬剤送達の困難さから従来の化学療法が困難であることや正常組織への損傷が誘導する全身の機能障害を誘導することから外科手術による摘出が困難であるため、有効な治療法は確立されていないといっても過言ではない。

ここで、光の時空間制御など操作性の高さから、低侵襲な光がん治療法として、光線力学療

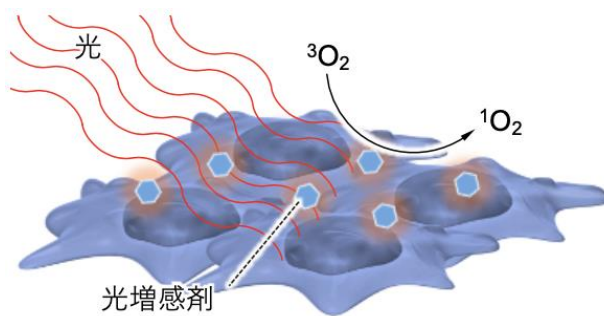


図 1. 光線力学療法（PDT）の悪性脳腫瘍への応用が期待されている[1]。この PDT では光増感剤[2]と呼ばれる光感受性物質へ特定の波長の光を照射することにより発生する活性酸素により、がん細胞を殺傷する（図 1）。また、この活性酸素の半減期が極めて短いことから、光増感剤のがん細胞への選択的かつ効率的な送達により、がん細胞選択的な殺傷を実現することができる。すなわち、本治療法の成否を分ける最大の鍵は光増感剤

法（PDT）の悪性脳腫瘍への応用が期待されている[1]。この PDT では光増感剤[2]と呼ばれる光感受性物質へ特定の波長の光を照射することにより発生する活性酸素により、がん細胞を殺傷する（図 1）。また、この活性酸素の半減期が極めて短いことから、光増感剤のがん細胞への選択的かつ効率的な送達により、がん細胞選択的な殺傷を実現することができる。すなわち、本治療法の成否を分ける最大の鍵は光増感剤

のがん細胞への選択的な送達基盤技術の開発にある。しかしながら、一般に光増感剤には、腫瘍選択性に乏しいことや水溶性に乏しいことなどの送達上の課題が指摘されている[3]。

そこで我々は光増感剤の水溶性の改善及びその動態制御を可能にするため、光増感剤と多糖からなる両親媒性高分子を合成し、この両親媒性高分子が自己組織化により形成するヒドロゲル微粒子を用いた光がん治療に関して検討した(図2)。

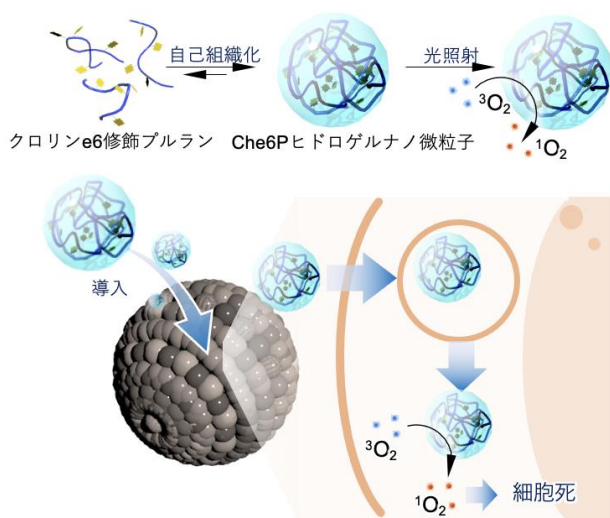


図2. 本システムの概略図

ここで微粒子化することにより、光増感剤の水溶性の課題を解決できるだけでなく、細胞内動態の制御、腫瘍への集積性の向上を同時に実現しえる。さらには光増感剤の蛍光特性により、診断と治療双方の機能を併せもつ革新的な基盤材料を創製できると考えた。

2. 実験方法

2.1 クロリン e6 修飾プルラン (Che6P) の合成

生体適合性に優れた多糖のうち、分散性に優れ、比較的柔らかい多糖であるプルランを基盤材料として用い、光増感剤として、クロリン e6 を用いることで両親媒性高分子 (Che6P) を合成した(図3)。化合物の同定は核磁気共鳴分光高

度法 (H-NMR) や紫外-可視吸収スペクトル測定 (UV-Vis) により行なった。ここでクロリン e6 の修飾率が得られるヒドロゲル微粒子の基礎物性や生物活性に及ぼす影響について検討するため、クロリン e6 の修飾率が異なる Che6P を系統的に合成した。

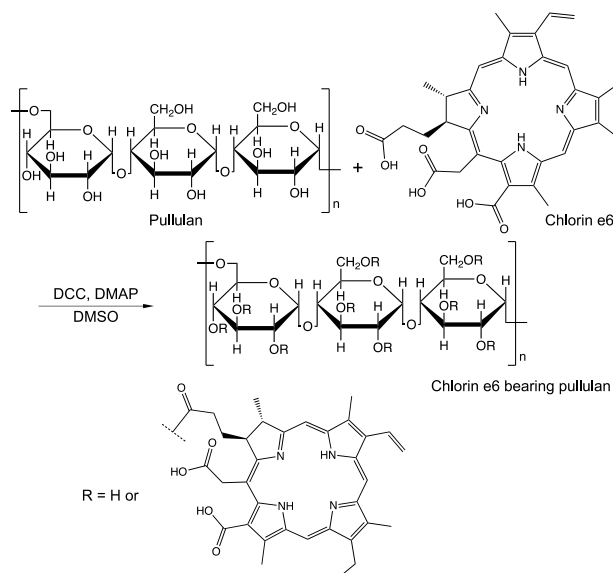


図3. Che6P の合成スキーム

2.2 Che6P の微粒子形成能と物性評価

合成により得られた Che6P の微粒子形成能について動的光散乱測定 (DLS) や透過型電子顕微鏡観察 (TEM) により明らかとした。また、ナノ粒子一つ当たりに含まれるポリマーの数を流動場分画多角度散乱測定 (FFF-MALS) により算出した。次に得られたヒドロゲル微粒子の活性酸素発生能について、アントラセン誘導体のクエンチにより定量評価した。

2.3 Che6P の光線力学活性評価

Che6P が形成するナノ微粒子をヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞)、マウス結腸がん細胞 (colon26 細胞)、マウスメラノーマ細胞 (B16BL6 細胞) へと添加し、照射を行うことで殺細胞効果について検討した。さらに細胞内における取り込み量をフローサイトメトリーにより定量し、その細胞内動態について、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

本システムの固形がん治療への有用性を明らかとするため、同様の評価をスフェロイドにおいて、行なった。

3. 実験結果

3.1 クロリン e6 修飾プルラン (Che6P) の合成

図 3 に示すスキームに従って、プルランに対して、クロリン e6 を結合させた。H-NMR、UV-Vis 吸収スペクトルの結果から、100 単糖あたり 0.22、0.42、0.72 個のクロリン e6 が導入されたことが分かった (それぞれ、Che6P-0.22、Che6P-0.42、Che6P-0.72 とする)。また、それぞれ生体透過性に優れる 600 nm 以上の光の照射により、蛍光特性を示したことから、蛍光によるがん診断の可能性をもつことが明らかとなった。

3.2 Che6P の微粒子形成能と物性評価

合成によって得られた Che6P を水中に分散させ、超音波処理を行うことでナノ粒子形成能について検討した。DLS 測定の結果、いずれの Che6P も直径 150 nm 程度のナノ粒子を形成していることが明らかとなった。この粒子径は腫瘍組織への受動的な選択性 (EPR 効果) を示すのに十分な大きさであった。そのため、本システムは EPR 効果による腫瘍組織への効率的な送達が可能であると示唆された。ここで、修飾率が多くなればなるほど粒子径の小さな粒子を形成することを明らかとした。これはポリマーの疎水性の上昇に伴って、より密にパッキングした粒子を形成しているためであると考えている。また、この修飾率と粒子径の間に見られた相関は TEM 観察によっても確認された。ここで、この粒子は 1 週間程度その粒子径に変化が見られなかったことから、コロイド的に安定であることが明らかとなった。さらには、クロリン e6 に由来する吸光度の減少がフリーで水中に分散させたクロリン e6 と比較して緩やかであったことから、本システムはクロリン e6

の水中における安定性を向上したといえる (図 4)。

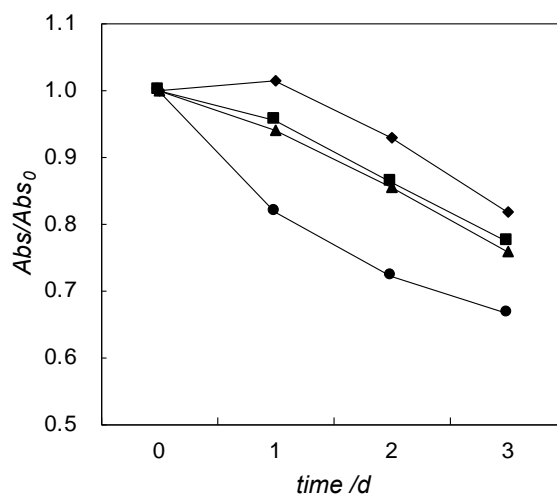


図 4. 水中におけるクロリン e6 の吸光度変化 (●, Che6P; ▲, Che6P-0.22; ■, Che6P-0.42; ◆, Che6P-0.72)

またナノ粒子形成後にクロリン e6 に由来する UV-Vis 吸収スペクトルのブロード化や蛍光スペクトルの消光が確認された。すなわち、本システムがクロリン e6 の疎水的な性質により会合し、ナノ粒子を形成していることが明らかとなった。さらに場の極性を測定できる蛍光プローブ (ピレン) により、粒子内に疎水的な領域が存在していることも確認された。

次に FFF-MALS により、ナノ粒子内におけるポリマーの会合数を定量した。その結果、今回作製したナノ粒子はそれぞれ、300~600 本のポリマーから構成されることが明らかとなった。

また、その会合数はクロリン e6 の修飾率依存的に増大していたことから、ポリマーの疎水性の増大により粒子内のポリマーのパッキングが密になり、粒子径を減少させるといった我々の予測を裏付けるものとなった。実際に粒子のポリマー密度を計算すると Che6P-0.22 で 0.013、Che6P-0.42 で 0.016、Che6P-0.72 で 0.023 と増大していることが分かった。

最後にこれらのナノ粒子へと光照射を行い、図 5 に示す、アントラセン誘導体のクエンチによって活性酸素発生能を評価した[4]。その結果、光照射の時間依存的にアントラセン誘導体由来する吸光度の減少が確認され、確かに活性酸素を生成していることが明らかとなった。

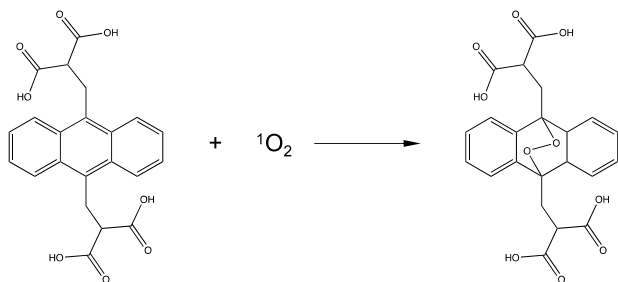


図 6. アントラセン誘導体による活性酸素発生能評価

また、活性酸素の生成能はいずれのヒドロゲル微粒子においても、フリーのクロリン e6 を凌駕すること、クロリン e6 の修飾率依存的に多くなることが示された。それだけでなく、この光照射前後において、このヒドロゲル微粒子は安定に存在していることが DLS 測定、UV-Vis 測定の結果から明らかとなった。

3.3 Che6P の光線力学活性評価

今回作製したヒドロゲル微粒子のがん細胞に対する光線力学活性について、種々のがん種に対して評価を行った。その結果、光を照射しなかった系については細胞毒性が見られなかったことから、本システムは安全に利用可能なキャリアであることが示された。ここで、本システムを作用させた細胞へと光照射を行うことで効率的にがん細胞を殺傷することができることが分かった。Che6P ヒドロゲル微粒子の殺細胞効果は驚くべきことにフリーで添加したクロリン e6 の 300 倍以上であること、臨床薬であるフォトフリンの 900 倍以上であることが明らかとなった (表 1)。

次にこの効率的な細胞死誘導について、検討するため、フローサイトメトリーにより取り込

表 1. Che6P の光線力学活性

Cell line	[Che6] /nM	[Che6P-0.22] /nM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[Che6P-0.42] /nM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[Che6P-0.72] /nM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[Photofrin] /nM
HeLa	8600	30 (4.0)	84 (3.8)	27 (0.7)	21000
Colon26	18000	52 (6.9)	35 (1.6)	54 (1.4)	49500
B16BL6	18900	35 (308)	616 (28)	540 (14)	151000

み量を定量した。その結果、いずれのヒドロゲル微粒子も効率的に取り込まれ、その効率は修飾率依存的であることが明らかとなった。

さらに、その細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、多くが細胞質へと抜け出している様子が観察された。これにより、酸化ストレスに弱いミトコンドリアや核へのダメージを効率的に誘導できたことが予想される。

最後に本システムのがん治療への有用性を明らかとするため、スフェロイドを用いた抗腫瘍活性について検討した。ここでスフェロイドとは三次元的に細胞が組織を形成することで得られる球状の細胞塊のことである。このスフェロイドは従来の二次元培養の系と異なり、細胞外マトリックス等の産生が促進されることから、本来の腫瘍環境を模倣することが可能である。そのため、動物実験の代替法として、期待されている[5]。

まず、スフェロイド内部への浸透について、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、スフェロイドの深部に至るまで到達している様子が観察された。さらには、Che6P ヒドロゲル微粒子を作用させたスフェロイドへの光照射によって、効率的に細胞死が誘導できることが明らかとなった。またその殺細胞効果は臨床薬であるフォトフリンを凌駕する結果であった。

4. まとめ

本研究により、クロリン e6 を生体適合性に優れた多糖プルランへと化学修飾することにより、直径 150 nm 程度のヒドロゲル微粒子を形成することが明らかとなった。ここで得られ

たヒドロゲル微粒子はクロリン e6 の水中における安定性を向上するだけでなく、活性酸素発生能を向上することを示した。また本システムの利用により、臨床薬であるフォトフリンを凌駕する治療効果を実現した。さらにはその効果は三次元培養系であるスフェロイドにおいても有効であることを実証した。現在、動物実験において、その光増感剤としての有用性、イメージング機能について検討を進めている。さらに、悪性脳腫瘍への応用についても検討を進めていく予定である。それだけでなく、これらの成果がまとめ次第、SCI 論文への投稿を進める予定である。

謝辞

本研究の推進に当たり、京都大学大学院高分子化学専攻秋吉一成教授、佐々木善浩准教授、澤田晋一助教、西村智貴特定助教（現信州大学助教）のご協力を賜りました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。また、本研究を援助していただいた公益財団法人京都技術科学センターに深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] I. Diamond, A. Mcdonagh, C. Wilson, S. Granelli, S. Nielsen and R. Jaenicke, *Lancet*, 1972, **300**, 1175-1177.
- [2] P. C. Lo, M. S. Rodriguez-Morgade, R. K. Pandey, D. K. P. Ng, T. Torres and F. Dumoulin, *Chem. Soc. Rev.*, 2020, **49**, 1041-1056.
- [3] M. R. Hamblin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2018, **17**, 1515-1533.
- [4] B. A. Lindig, M. A. J. Rodgers and A. P. Schaap, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 5590-5593.
- [5] M. Matsusaki, C. P. Case and M. Akashi, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2014, **74**, 95-103.

研究成果発表

- 1) 光線力学療法を志向した光増感剤修飾多糖ナノ粒子の開発、大嶽怜央・河崎陸・杉川幸太・池田篤志、P4-071、第 10 回 CSJ 化学フェスタ
- 2) 光増感剤修飾多糖ナノ粒子の創製と光線力学療法への応用、大嶽怜央・河崎陸・杉川幸太・池田篤志、P15、第 14 回有機 π 電子系シンポジウム（ポスター賞受賞）