

【要約】

Photodynamic therapy using liposomal gold nanorods
for squamous cell carcinoma

(金ナノロッドリポソームを用いた扁平上皮癌に対する
光線力学的温熱療法)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：松原久裕教授)

水藤 広

【背景】

温熱療法は、癌組織の温度を上昇させることで癌を縮小、消滅させる治療法である。光線力学的療法（**photodynamic therapy ; PDT**）は、光感受性物質を投与し光線照射によって局所の加温効果を生じさせる治療法である。

腫瘍組織は多数の血管を増生するため、特定のタンパク質や高分子は、血管やリンパ管を透過して、**EPR (enhanced permeability and retention)** 効果と呼ばれる強力な腫瘍特異的集積を示す。

リポソームは直径 100nm 程度の球状の脂質二重膜である。また、インドシアニングリーン（**ICG**）は近赤外光照射で発熱することが知られており、**ICG-Liposome (ICG-L)** は、脂質二重膜に **ICG** 誘導体を埋め込んだリポソームである。われわれはこれまでの研究で、この **ICG-L** を投与し **EPR** 効果によって試薬を集積させた担癌マウスに対して **PDT** を行い、その抗腫瘍効果を検討してきた。

一方、近年、ナノ科学の分野で注目を集めている金ナノロッド（**Gold Nanorod ; GNR**）という物質がある。金は汎用性があり、組織毒性が低い。長径 40nm の **GNR** は、温熱療法に用いる組織透過性の高い近赤外光（波長 800-900nm 付近）に強い吸収を持つことが知られている。金粒子は、吸収した光エネルギーを効率よく熱に変換することができる（**photothermal** 効果）。

また、放射線治療の領域において、局所放射線照射が未照射部位に治療効果をもたらす作用が考えられている。この作用は **abscopal effect**（未照射部位効果）と呼ばれ、T 細胞由来の免疫反応が関与していると考えられている。われわれは、放射線照射同様、温熱療法による腫瘍の加温ストレスが、局所のみでなく全身の免疫反応を惹起し、抗腫瘍効果を発揮することを報告した。

今回われわれは、**ICG-L** に **GNR** を付着させた物質（**ICG-GNR-L**）を開発し、経静脈投与での **EPR** 効果によるデリバリーの効率化を目的とし、また温熱療法の **enhancer** としての抗腫瘍効果、および免疫賦活効果を検証した。

【方法】

まず作成した **ICG-GNR-L** 溶液を電子顕微鏡で観察し、**GNR** が **ICG-L** に付着しているかどうかを確認した。濃度を変化させた **GNR** に対して、近赤外光による照射を行い、**photothermal** 効果による温度の変化を測定した。また、**GNR** をマウス扁平上皮癌細胞株 **SCCVII** の培養液に混ぜ、培養細胞に対して **PDT** を行い、腫瘍細胞の増殖抑制効果を検討した。

さらに、**SCCVII** を左大腿に移植したマウスに対し **PDT** を行い、その治療効果を検討した。また、後半の実験では、同様に **SCCVII** を左大腿および前胸部に同時に皮下移植したマウスを使用し、**abscopal effect** に関する実験を行った。担癌マウスは、投与する試薬によって **Liposome (L)**、**ICG-Liposome (ICG-L)**、**GNR-Liposome (GNR-L)**、**ICG-GNR-Liposome (ICG-GNR-L)**、の 4 群に分けた。試薬はすべて尾静脈より注射し、近赤外光の照射中は、

腹腔麻酔で麻酔を行った。

それぞれの試薬を尾静注投与してから 24 時間後にマウスの腫瘍に対して、近赤外光を照射した。温度の測定は、サーモメーターを使用した。続く実験では、担癌マウスに対して、試薬を尾静注投与した 24 時間後、48 時間後、72 時間後の計 3 回、腫瘍部に対して 20 分間の近赤外光照射を行い、腫瘍径を照射日から 3~4 日ごとに、2 週間まで測定した。試薬投与から 2 週間後に、マウスをサクリファイスし、腫瘍組織、および腫瘍近傍のリンパ節を摘出した。腫瘍組織はホルマリンに漬けて保存し、パラフィン切片を作成し、TUNEL 染色により治療を行った組織のアポトーシスを評価した。腫瘍近傍リンパ節に対しては、FACS を行い、CD3 陽性細胞と CD8 陽性細胞の細胞数をカウントした。左大腿と前胸部に腫瘍を皮下移植した別の担癌マウスグループでは、上記と同様の方法で、試薬の投与を行い、計 3 回の近赤外光照射を左大腿の腫瘍のみに行ったのち、前胸部の腫瘍径を照射日から 3~4 日ごとに、2 週間まで測定した。

【結果】

ICG-GNR-L の試薬を電子顕微鏡で観察すると、GNR が Liposome に付着している様子がみられた。観察の結果、ICG の有り無しで、Liposome の形態や GNR の付着の多寡などには特に差はなかった。GNR は、Liposome の中心部ではなく、膜に沿った場所や、リポソーム同士の隙間にあたる場所に見られた。金ナノロッドはリポソームの内部に封入されているというよりは、膜に吸着されているような状態と考えられた。

金ナノロッドの試薬に近赤外光を 20 分間照射することで、約 20°C の温度上昇がみられた。温度上昇は約 10 分までは急速にみられ、その後ほぼプラトーに達した。濃度を薄めると、温度上昇は緩やかになった。照射を中止すると、温度は速やかに降下した。

培養液中に GNR を混入し、PDT を行った実験では、72 時間後の吸光度測定で、非治療群と比較して、治療群で細胞増殖抑制がみられた。

マウスの実験では、コントロールのマウスでは、ほとんど腫瘍の温度上昇はみられなかったが、ICG、GNR を含む試薬を投与した群では、照射後約 1 分までに速やかに温度上昇がみられ、最大で照射開始前と比べて 12°C 程度までの温度上昇がみられた。特に ICG-GNR-L を投与したマウスでは強い温度上昇がみられた。

GNR、ICG とともに含まない Liposome のみを投与し PDT を行ったグループ (control) では、腫瘍の増殖抑制はみられなかった。一方、ICG-L、GNR-L、ICG-GNR-L を投与し、PDT を行ったグループでは、コントロールと比較して平均腫瘍径は有意に小さくなった。

PDT を行った後にサクリファイスしたマウスの腫瘍組織を用いた TUNEL 染色では、Liposome を投与したグループ、ICG-L を投与し PDT を行ったグループでは、viable な細胞が多数みられ、アポトーシスを呈する細胞はあまりみられなかった。一方、GNR-L、ICG-GNR-L を投与し、PDT を行ったグループでは、アポトーシスを起こしている細胞が多数みられた。

PDT を行った後にサクリファイスしたマウスの腫瘍近傍のリンパ節を摘出し、行った

FACS では、Liposome を投与し PDT を行ったグループと比較して、ICG-L、GNR-L、ICG-GNR-L を投与し、PDT を行ったグループで、CD3 陽性細胞、CD8 陽性細胞の割合が、多いという結果が得られた。

GNR、ICG ともに含まない Liposome のみを投与し PDT を行ったグループ (control) では、前胸部の腫瘍の増殖抑制はみられなかった。一方、ICG-L、GNR-L、ICG-GNR-L を投与し、PDT を行ったグループでは、腫瘍の増殖はみられたものの、コントロールと比較して平均腫瘍径は有意に小さかった。

【考察】

われわれの研究の目的は、ICG-L に GNR を付着させた物質を開発し温熱療法の効率を上げ、強力な抗腫瘍効果を達成することである。さらに温熱療法がもたらす免疫賦活効果についても検討することも目的としていた。まず初めに、ICG-GNR-L の動態の検討を *in vitro* で行った。電子顕微鏡による観察では、Liposome の膜の周囲に GNR が付着するということがわかった。ICG-GNR-L と近赤外光照射装置の組み合わせによる photothermal 効果は、濃度依存性に溶液の温度上昇がみられることで確認できた。次に、*in vitro* のレベルで、PDT が有効であるか検討するために、培養細胞に対して GNR を用いた近赤外光による PDT を行い、細胞増殖抑制がみられ、GNR による PDT に抗腫瘍効果があることが確認された。

これらの結果をもとに ICG-GNR-L を用いた PDT の抗腫瘍効果の検証を *in vivo* で行った。EPR 効果により腫瘍に ICG-GNR-L を集積させたマウスに対して、PDT を行った。マウスの体外からの近赤外光照射で、PDT 中の腫瘍温度が上昇していることを確認するため、サーモメーターを用いた。実際、PDT 中にかなり強力な腫瘍組織の温度上昇がみられ、腫瘍局所での GNR による photothermal 効果が発揮されていると考えた。コントロールグループではほぼ温度の上昇がなく、ICG-L と GNR-L を投与したグループでは、ある程度の温度上昇がみられ、ICG-GNR-L を投与したグループでは、最も強力な温度上昇がみられた。この結果は、ICG と GNR が双方とも近赤外光の照射で発熱し、その組み合わせにより、さらに一段階上の発熱が生じたことを示していると思われる。さらに、このようにして PDT を行ったマウスの腫瘍体積を測定した。治療開始から 15 日後の時点で、ICG-GNR-L を投与して PDT を行ったグループでは、マウスの腫瘍体積が、コントロールグループと比べて、有意に小さかった。ICG-L と GNR-L を投与したグループでは、有意差はなかったが、15 日時点での腫瘍体積はコントロールと比べて小さい傾向であった。PDT による殺細胞効果により、ICG-GNR-L を投与したマウスでは腫瘍の増殖抑制が起こっていたのだと考えられる。3 週間以上経過すると、腫瘍体積は急速に大きくなり、グループ間での差はみられなくなった。次に、腫瘍内部で起こっている PDT の効果をさらに詳細に検証するため、PDT を行った腫瘍組織を摘出し TUNEL 染色を行っている。GNR-L と ICG-GNR-L を投与したマウスの腫瘍組織では、コントロールグループと比べて明らかに TUNEL 陽性細胞の数が多という結果が得られた。この結果は、GNR と近赤外光を組み合わせた PDT は何らかの機序で、腫瘍のアポトーシス誘導に関与している可能性が示唆している。また、PDT を行

ったマウスの腫瘍から最も近くにあるリンパ節を摘出し、フローサイトメトリーを行い、腫瘍免疫および細胞性免疫の活性化の指標となる CD3 陽性細胞と CD8 陽性細胞の相対数を計測し、コントロールと比べて、ICG-L と GNR-L と ICG-GNR-L を投与して PDT を行ったグループの CD3 陽性細胞と CD8 陽性細胞の相対数が多いことが確認された。この結果は PDT によってマウス体内の免疫機構が活性化されていた可能性を示唆している。さらに、局所の温熱治療が全身に及ぼす抗腫瘍効果を検証するため 2 か所に腫瘍を作成したマウスモデルを作成し、1 か所のみで PDT を行った。ICG-GNR-L を投与して PDT を行ったグループでは、コントロールと比べて治療局所ではない腫瘍組織のサイズが縮小していた。局所の PDT は全身の免疫賦活効果をもたらし、治療部以外の腫瘍にも影響を及ぼしていることが考えられた。今回用いたマウス扁平上皮癌細胞株 SCCVII は、非常に扱いやすく、培養や腫瘍生着も容易であるが、腫瘍の増殖スピードが速く、治療後早期での効果がみられても、数週間経過するとサイズがかなり大きくなり、グループごとの差がほとんどみられなくなってしまった。

これまでの研究で GNR は生体への副作用が少ないことが確認されているが、今後薬剤として用いる際には、代謝経路の検証などが必要になるとと思われる。一回の治療にどれくらいの時間をかけるのか、何回の治療を施すのか、ということに関して、今後検討が必要であると思われる。

【結語】

ICG-GNR-L は近赤外光照射による PDT の効果を強力に高め、さらに免疫賦活効果を有する。この治療法には、今後の癌治療の選択肢を広げる可能性があると思われる。