

# 医療分野研究成果展開事業/産学共創基礎基盤研究プログラム（産学共創）

平成 27 年度成果報告書（公開）

研究代表者 (所属機関・氏名)	北海道大学 大学院薬学研究院 小川 美香子
参加機関	浜松医科大学 静岡県立大学
研究開発課題	蛍光トモグラフィイメージングへの利用を目的とした、機能性 ナノ粒子を用いた新規近赤外蛍光分子イメージングプローブの 創製

## 1. 研究開発の目的

本研究では、臨床応用を目指し、蛍光トモグラフィイメージングへの利用が可能な機能性ナノ粒子を用いた新規近赤外蛍光分子イメージングプローブを創製する。この際、細胞標的性と酵素反応特異性を兼ね備えることで、特異性の向上を図る。これにより、動脈硬化不安定プラークの簡便なスクリーニング法を開発し、また、蛍光トモグラフィイメージングへの応用の可能性について検討することを目的とする。

## 2. 研究開発の概要

近赤外蛍光物質であるインドシアニングリーン（ICG）を結合したペプチドを、細胞標的化リポソームに内包した分子イメージングプローブを作成する（図 1）。なお、標的として不安定プラークに多く浸潤し、プラークの不安定化に直接かかわることが報告されているマクロファージを選択する。また、ICG 標識ペプチドに、標的細胞内の酵素反応によって蛍光が ON になる「アクチベータブルプローブ」の性質を持たせることにより、さらなる特異性の向上を目指す。すなわち、蛍光分子は、それぞれが近接している場合、セルフクエンチにより消光することが知られている。そこで、標的細胞内酵素により特異的に切断される短いペプチド配列を選択し、このペプチド配列の両端に ICG を配置するように結合させ、セルフクエンチによって消光させたプローブを作成する。このプローブは、ペプチドが酵素により切断されると、ICG 分子間距離が長くなるため蛍光が ON となる。すなわち、このペプチドを細胞標的化リポソームに封入すれば、標的細胞にてリポソームが取り込まれた後崩壊し、ペプチドが酵素反応にて切断を受けることで蛍光を発することとなる。これにより、細胞標的性を持ち、さらに標的細胞内での酵素反応に特異的な分子イメージングプローブが作成できる。

具体的には、動脈硬化病変に浸潤するマクロファージは、アポトーシスした細胞表面に発現するホスファチジルセリン（PS）を認識し貪食する性質があることから、PS 修飾リポソームによる標的化を試みた。また、カテプシン B により蛍光が ON となるアクチベータブルプローブと組み合わせ検討を行った。

## 3. 研究開発の成果（平成 27 年度）

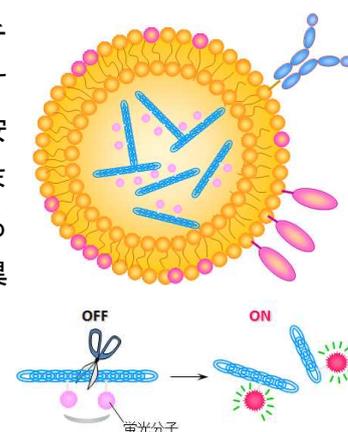


図1 開発する蛍光分子イメージングプローブの概念図  
内包ペプチドが酵素により切断されることにより、蛍光がONとなる。

(1) アクチベータブル近赤外蛍光分子イメージングプローブの作成とその評価【北海道大学】

平成 27 年度は、浜松医科大学にて行ったサルを用いた検討をおよびヒト標本を用いた評価の結果を基に、臨床応用に向けた最適化を図った。すなわち、より早い時間経過にて（概ね 10 分以内）蛍光を発することができるようなアクチベーションシステムを利用するための ICG の化学構造改変を行い、新規化合物である Carboxy-ICG を開発した。さらに、臨床応用を視野に検出感度に関する検討を行った。この結果、最低でも 5  $\mu$ M、小さなプラークの検出を考えると 20  $\mu$ M 以上の ICG が必要であることがわかった。

(2) アクチベータブル近赤外蛍光分子イメージングプローブの作成とその評価【浜松医科大学】

平成 26 年度から、臨床応用を目指し、浜松医科大学にて大型動物であるサルを用いた検討、および、ヒト動脈硬化標本を用いた検討を開始した。平成 27 年度は、ひきつづき高脂肪食を給餌したカニクイザルにて動脈硬化病変のインビボイメージングを一ヶ月ごとに行い、病変の進展にともなって遅くとも 24 時間以内、出来れば 2 時間以内に画像化がなされるか、ハンディタイプ近赤外蛍光カメラを用いて検討した。この結果、頸部を切開することで 3 時間以内に画像化することに成功したが、非侵襲的なイメージングのためにはカメラの感度を上げる・よりバックグラウンド蛍光を少なくする必要があることが判った。また、ヒト標本を用いた検討を行い、マクロファージへ時間とともにイメージングプローブが取り込まれることが確認された。

(3) アクチベータブル近赤外蛍光分子イメージングプローブの作成とその評価【静岡県立大学】

平成 27 年度は、プローブの動脈硬化病巣部へのデリバリー効率を上げるため、キャリアであるリポソームのマクロファージ標的性の最適化を行うとともに、体外からの検出を可能とするため、アクチベータブル蛍光標識ペプチドのリポソーム内への封入効率の向上を目指した。結果として、マクロファージ標的化プローブであるホスファチジルセリン (PS) を全リン脂質の内 50%含む組成において、最もマクロファージに取り込まれるデータを得ることができ、そしてこの組成のリポソームにアクチベータブル蛍光標識ペプチドを内封したリポソームは、マクロファージ内において効率的に ICG の蛍光発光が起こることを確認した。またアクチベータブル蛍光標識ペプチドのリポソーム内への高濃度内封化については、当初の目標であった、サルに投与する際に必要となるアクチベータブル蛍光標識ペプチド濃度 0.3 mg/mL のリポソーム溶液を調製することができることを確認した。