

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer: Collaborative Research Based on Industrial Demand

研究開発課題名： (日本語) 5-アミノレブリン酸(5-ALA)とランタニドナノ粒子(LNP)併用による深部微小癌局在診断技術の構築
(英語) Development of a diagnostic skill for deep-seated micro cancers by combined use of 5-aminolevulinic acid and lanthanide nanoparticles

研究開発担当者 (日本語) 京都府立医科大学 大学院医学研究科 教授 大辻英吾
所属 役職 氏名： (英語) Division of Digestive Surgery, Department of Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine, Professor Eigo Otsuji

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 5-アミノレブリン酸(5-ALA)とランタニドナノ粒子(LNP)併用による深部微小癌局在診断技術の構築
開発課題名： (英語) Development of a diagnostic skill for deep-seated micro cancers by combined use of 5-aminolevulinic acid and lanthanide nanoparticles

研究開発担当者 (日本語) 京都府立医科大学 大学院医学研究科 教授 大辻英吾
所属 役職 氏名： (英語) Division of Digestive Surgery, Department of Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine, Professor Eigo Otsuji

分担研究 (日本語) 5-アミノレブリン酸(5-ALA)とランタニドナノ粒子(LNP)併用による深部微小癌局在診断技術の構築
開発課題名： (英語) Development of a diagnostic skill for deep-seated micro cancers by combined use of 5-aminolevulinic acid and lanthanide nanoparticles

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京工業大学 大学院生命理工学院 教授 湯浅英哉
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Institute of Technology, Graduate School of Life Science and Technology, Professor Hideya Yuasa

II. 成果の概要（総括研究報告）

癌患者が、ポルフィリンの生合成原料である 5-アミノレブリン酸（ALA）を内服すると、癌細胞の代謝異常により、光感受性物質であるプロトポルフィリン IX（PpIX）が癌細胞特異的に集積する。PpIX は青色光で照射すると赤色蛍光を発するので、光線力学診断（PDD）に応用可能である。しかし、青色光は組織浸透性が低く、一層被っただけでも PDD が困難になる。一方、近赤外線は組織浸透性が大きい。ランタニドナノ粒子（LNP）は、近赤外線で励起され、アップコンバージョン機構（複数段階電子が励起される）により可視光を発光する。可視光が PpIX を励起できる波長であれば、LNP を癌細胞の近傍にデリバリーし、近赤外線を照射することで、PpIX の発光が可能である。本研究は、外科手術の現場で、ALA と LNP を投与することで深部の胃癌を診断するシステムの構築を目標とした。

本研究プロジェクトでは、この LNP と ALA を併用した PDD の開発を目指しているが、いくつかの問題点が見つかった。まず一つ目は LNP の赤色の発光が PpIX の蛍光の波長が近接しているという点である。次に、LNP 発光の量子収率が低いことが新たな問題となった。これらを改善するためには、まず LNP の発光と PpIX の蛍光を分離するためにバンドパスフィルターを用いることとした。このことにより、蛍光強度は低くなるものの観察側の感度を向上させることにより、PpIX の蛍光を分離し観察することが可能となった。

LNP の発光が弱いことに対しては、従来は LNP の EPR 効果により腫瘍に集積させていたが、LNP の発光量子収率をなるべく向上させ、かつ LNP と PpIX がなるべく近距離に配置するように LNP を選択的に癌細胞付近にデリバリーすることが肝心である。癌細胞近傍への集積のために、CEA 抗体結合 LNP を用いると、癌細胞周囲に LNP が集積した。また、胃癌細胞への選択的デリバリーについては、上皮成長因子（EGF）タンパク質をリガンド分子として用いることで達成できた。子宮頸癌 HeLa や癌細胞に集積しやすいマクロファージ RAW264.7 に対しては、グルコースやシアル酸などの安価な単糖が顕著なデリバリー効果を持つことが判明している。本年度は、グルコースと LNP を結ぶスペーサーを長くするなどの検討を行ったが、デリバリー効果の改善にはいたっていない。LNP をなるべく多く癌細胞にデリバリーするために、粒子径を小さくすることによる効果についてはまだ十分検討できていない。次に、投与方法の工夫を行うこととした。従来、LNP の投与は単回のみであったが、予備実験で、癌細胞への LNP 集積時間が長いことも判明しているため、複数回投与することとした。また、NIR の照射を多方向照射で行うことで、温度の上昇を防ぎ、パルス照射することでさらなる改善を試みた。その結果、マウス 6 匹を用いて体外からの腹膜播種診断を検討した。10 結節認めたが、405nm 励起による PpIX の径宇高診断では感度 0%、陽性反応的中率 0%と診断できていないのに対して、5-ALA、LNP 併用による近赤外励起による診断では感度 70%(7/10)、陽性反応的中率 100%(7/7)であり、偽陽性は認めなかった。

今回の検討では、640nm の PpIX の蛍光をほとんど抑えたものであり、LNP の赤色の発光を抑えるまたは無くすことにより、今回の検討以上の結果が期待できる。LNP の赤色の発光を下げることは理論上可能であり、現在検討中である。また、毒性試験についての評価は不十分であり、今後検討を加える。

以上、LNP の癌集積性と画像処理技術の向上の相乗効果により、実用的なレベルまで PDD 効率を向上させることも可能と考えられる。

Recently, photodynamic diagnosis (PDD) is being increasingly used. PDD can discriminate between normal organization and malignant lesion without surgical removal. 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) is an endogenous amino acid and a natural precursor of the heme pathway. In cancer cells, increased activity of porphobilinogen deaminase and decreased activity of ferrochelatase cause the intracellular accumulation of protoporphyrin IX (PpIX). When PpIX, which is a fluorescent agent, is excited by 405-nm light, a fluorescence spectrum with 635-nm peak is emitted. Various cancer diagnostic methods using the properties of 5-ALA have been reported. Because the visible light has low light permeability of the light, the cancer diagnosis of the deep part is difficult.

Lanthanide nanoparticles (LNPs) are nanoparticles synthesized from rare earth ions. LNPs can exhibit upconversion luminescent property. In a typical upconversion process of LNPs, LNPs emit red light (655nm), green light (545nm), blue light (520nm) by 980nm near-infrared (NIR) light excitation. Comparing to organic fluorophores, LNPs have many advantages, such as high penetrativity of NIR excitation light, non-photobleaching and non-photoblinking properties. Additionally LNPs have no toxicity itself.

LNPs by NIR irradiation emits the light that can excite PpIX. We investigated whether the deeply-placed cancer can be observed by using 5-ALA and LNPs combination.

These methods include two problems. The first problem is that the wavelengths of red luminescence of LNP and the fluorescence of PpIX are very close. We used a band pass filter to separate luminescence of LNP and the fluorescence of PpIX. By this method, the intensity of fluorescence lowered, but, by using the high sensitive camera, EMCCD, we separated the fluorescence of PpIX and were able to observe it.

Then, it became the new problem that a quantum yield of the LNP luminescence was low. Conventionally, tumor tissues accumulate LNP by the enhanced permeability and retention (EPR) effect. LNP accumulated around a cancer cell when we used CEA antibody-binding LNP. In addition, a selective delivery to gastric cancer cells, was accomplished by using epidermal growth factor (EGF) protein a ligand molecule. For macrophage RAW264.7, which easily-accumulates near cancer cells, and HeLa cells, it is recognized that the cheap monosaccharides such as glucose or the sialic acid have a remarkable delivery effect. The attempts to improve the LNP delivery effect by lengthening the spacer between LNP and glucose, etc., ended in failure this year. Improvement of the delivery by making the size of LNP smaller has not been well examined yet.

Then, we devised the dosage method. Conventionally, the administration of LNP was only a single time, but decided to give it twice. In addition, we prevented burn injury and improve diagnostic ability by performing irradiation of NIR by multidirectional irradiation and using pulse laser. As a result, the observation of the deep part cancer tissues was enabled.

This study was the result of observation of a part of the PpIX fluorescence at 640nm. We can expect a better result than that of this examination by suppressing the red luminescence of LNP or extinguishing it. It is possible to lower the red luminescence of LNP theoretically and thus it is examined now. In addition, the evaluation about the toxicity test was insufficient and will add examination in future.

It is thought that we can improve PDD efficiency to a practical level by cancer accumulation

characteristics of LNP and synergy of the improvement of the image processing technology as things mentioned above.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 2件）

1. KANAMORI T, SAWAMURA T, TANAKA T, SOTOKAWA I, MORI R, INADA K, OHKUBO A, OGURA S-I, MURAYAMA Y, OTSUJI E, YUASA H. Coating lanthanide nanoparticles with carbohydrate ligands elicits affinity for HeLa and RAW264.7 cells, enhancing their photodamaging effect. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017, 25, 743–749.
2. Nishimura M, Murayama Y, Harada K, Kamada Y, Morimura R, Ikoma H, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Photodynamic Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma Using 5-Aminolevulinic Acid. *Anticancer Res*. 2016 Sep;36(9):4569-74.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 進行胆嚢癌に対する5アミノレブリン酸を用いた術中蛍光診断. 口演 村山康利、森村玲、鎌田陽介、中島慎吾、有田智洋、小菅敏幸、小松周平、塩崎敦、栗生宜明、生駒久視、落合登志哉、大辻英吾. 第28回日本肝胆膵外科学会学術集会 2016年6月2-4日 国内
2. 胃癌のリンパ節転移診断に対する5-アミノレブリン酸を用いた光線力学的診断の検討. 口演 原田恭一、村山康利、小菅敏幸、小西博貴、小松周平、塩崎敦、市川大輔、藤原斉、岡本和真、大辻英吾. 徳島市 第71回日本消化器外科学会総会 2016年7月14-16日 国内
3. 消化器癌に対する光イメージング・治療の現状と近赤外プローブを用いたイメージング・治療の展望. 口演 村山康利、有田智洋、塩崎敦、栗生宜明、生駒久視、中西正芳、市川大輔、藤原斉、岡本和真、大辻英吾. 徳島市 第71回日本消化器外科学会総会 2016年7月14-16日国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし