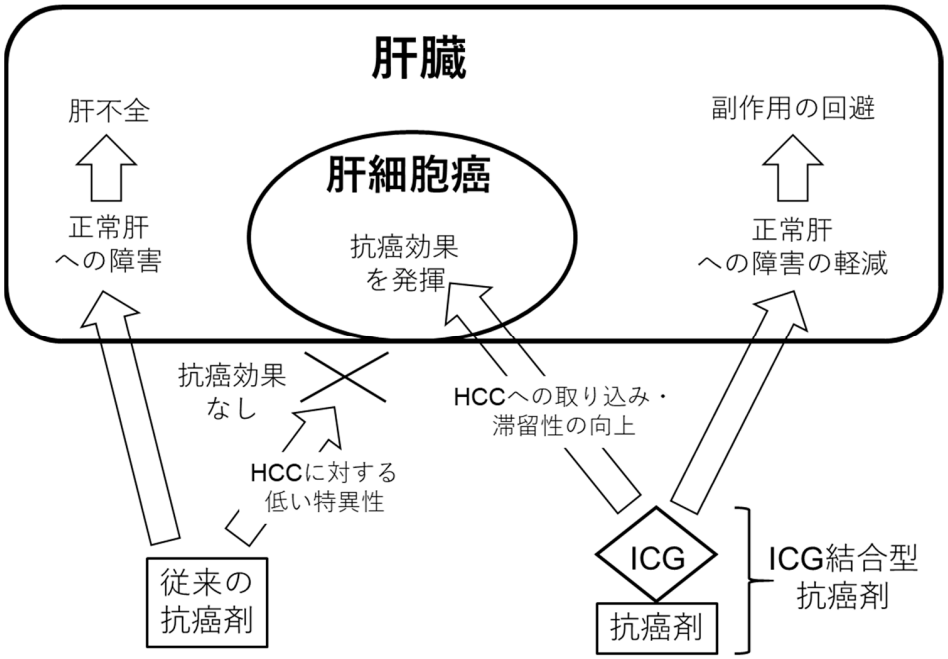
163　肝細胞癌の物質滞留性機構の解明と治療への応用	稲垣　善則

【目的】Indocyanine green（ICG）は、肝細胞癌組織に滞留する性質を有する。しかし、その滞留性を導くメカニズムは明らかではない。本研究では、肝細胞癌細胞における ICG の滞留性を導く因子を検討するとともに、ICG を結合させた抗癌剤を合成し、肝細胞癌細胞への滞留性を活かした特異性の高い抗癌剤の創出を試みた。

【方法】ICG と既存の抗癌剤 A を結合させた ICG 結合型化合物 A を各種肝癌細胞に作用させ、細胞内における蛍光発光、*in vitro* での殺細胞効果を検討した。皮下移植腫瘍モデルマウスを作製し、ICG 結合型化合物 A を静脈投与あるいは腫瘍へ直接投与し、生体内での ICG 結合型化合物 A の分布や抗腫瘍効果を評価した。肝細胞癌細胞における ICG の取り込みに関与するとされる organic anion-transporting polypeptide 1B3（OATP1B3）の発現を低下させた細胞を作製し、ICG 及び ICG 結合型化合物 A の取り込みへの効果を評価した。

【結果】ICG と既存の抗癌剤 A を結合させた ICG 結合型化合物 A は、抗癌剤 A と比較して *in vivo* において高い抗癌効果を示した。ICG 結合型化合物 A は、皮下移植腫瘍組織において 8 日以上滞留していた。また、ICG 結合型化合物 A の *in vitro* での正常細胞に対する毒性は、抗癌剤 A より軽減した。以上の結果から、本研究で作製した ICG 結合型化合物 A は肝細胞癌に対する新規化学療法剤として有用であると示唆される。さらに、OATP1B3 の発現を低下させた細胞では、ICG を作用させた細胞の細胞内の蛍光強度は未処理の細胞に比べて低下したが、ICG 結合型化合物 A を作用させた細胞の蛍光強度は低下しなかった。この結果は、OATP1B3 の発現が、肝細胞癌細胞における ICG の滞留性に寄与することを示唆している。一方で、肝細胞癌細胞における ICG 結合型化合物 A の滞留性には、ICG の滞留性とは異なる機構が存在すると考えられる。

ICG 結合型抗癌剤の開発意義に関する概略



163. 肝細胞癌の物質滞留性機構の解明と治療への応用

稲垣　善則

東京大学 医学部附属病院 肝胆膵・人工臓器移植外科

Key words：肝細胞癌，化学療法，drug delivery system，indocyanine green，蛍光

緒　言

肝細胞癌は、癌の死因の中で世界的に 2 番目に多い癌種である［1］。肝細胞癌患者の多くは、診断時にすでに進行癌の病態となっているため、有効な化学療法の適用が重要な意味をもつ。しかし、多くの肝細胞癌患者は背景肝にウイルス性肝炎や肝硬変といった疾患を併発しているため、毒性の強い抗癌剤による化学療法は十分な効果を得られない［2］。そこで、肝細胞癌に対して特異性高く抗癌効果を誘導するために、肝動脈注入療法といった化学療法が開発されてきたが、その有効性に関するエビデンスは限定的である［3］。一方、進行肝細胞癌に対する有効性が証明されている薬剤は、現時点でマルチキナーゼ阻害剤である sorafenib、regorafenib、lenvatinib のみであり、進行肝細胞癌患者を対象として日本国内においても承認され臨床医療で使用されている［4］。しかしながら、当該薬剤も日本人に対しては皮膚症状などの副作用が強く、長期継続が困難であることが多い。また、平均余命の延長効果が 3 ヶ月程度しかなく、より副作用の少ない有効な抗癌剤の開発は急務の課題である。

蛍光物質 indocyanine green（ICG）は、肝機能検査を目的として臨床的に広く使用されている薬剤である［5］。我々の研究グループでは、肝細胞癌患者に対して ICG を静脈投与すると、肝細胞癌組織に ICG が滞留して強く蛍光を発することを明らかにした［6］。さらに、最近の研究では、肝細胞癌組織に ICG が滞留する性質に着目し、ICG が滞留した肝細胞癌組織をもつ担癌モデルマウスに対して近赤外光を照射した［7］。その結果、ICG を滞留させた状態での近赤外光照射は肝細胞癌組織の生育を有意に阻害した。以上より、ICG は肝細胞癌細胞内に取り込まれて滞留する性質を有し、正常細胞には影響を及ぼさない特異性の高い治療法の開発に応用可能であることが示唆された。そこで本研究では、化学療法剤の肝細胞癌細胞への特異性を改善させるために、ICG と各種抗癌剤を化学的に結合させることにより、ICG をキャリアーとして抗癌剤を肝細胞癌細胞へ輸送させる新しい drug delivery system（DDS）の創出を試みた。そして、ICG と同様に肝細胞癌細胞内での滞留性を有し、抗腫瘍効果を有する ICG 結合型抗癌剤の候補化合物を見出した。

方　法

1. 細胞及び動物

肝細胞癌細胞株 HuH-7 は、the Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank（JCRB 細胞バンク）から供与されたものを使用した。肝癌細胞株 HepG2 は、the European Collection of Animal Cell Cultures（ECACC）から供与されたものを使用した。大腸癌細胞株 HCT116 は、the American Type Culture Collection（ATCC）から供与されたものを使用した。細胞は、10%ウシ胎児血清（Invitrogen）を含有させた Dulbecco's modified Eagle's Medium（Invitrogen）を培地として 37℃、5%CO_2 存在下で培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）は、各種成長因子を含有させた EGM-2 培地（Lonza Japan）で培養した。

In vivo 試験で用いたオスの BALB/c ヌードマウスは Charles River Laboratories Japan, Inc.から購入し、5～6 週齢のものを使用した。動物は specific pathogen-free の環境下で飼育し、飼育及び実験におけるすべての行程は東京大学動物実験倫理委員会の承認を得た方法で実施した。

2. *In vitro* での細胞内蛍光発光の評価

継代培養した各種癌細胞を 1×10^5 個/mL の密度で 4-well chamber slide に播種し、24 時間培養して細胞を接着させた。各種 ICG 結合型化合物を添加し、24 時間培養した。そして、ICG 結合型化合物を除去し、さらに 24 時間培養した。最終的に、接着した細胞内からの蛍光発光を蛍光顕微鏡（Hamamatsu Photonics）にて検出した。

3. *In vitro* での細胞毒性分析

継代培養した HuH-7 細胞、HepG2 細胞、及び HUVEC を 5×10^3 個/200 μL の密度で 96-well plate に播種し、24 時間培養して細胞を接着させた。各種濃度の ICG 結合型化合物を添加し、37℃で 48 時間培養した。化合物添加後 48 時間での生存細胞の存在を methylthiazole tetrazolium（MTT）法に基づいて検出した。

4. 皮下移植腫瘍モデルを用いた *in vivo* 抗腫瘍効果の評価

継代培養した HuH-7 細胞を回収し、無血清 DMEM に懸濁した。50 %マトリゲル（Becton-Dickinson）を含有させた無血清 DMEM を用いて 5×10^6 個/200 μL の密度で細胞懸濁液を作製し、BALB/c ヌードマウスの側腹部の皮下に移植した。腫瘍が 500 mm^3 程度まで生育した時点（移植後約 10 日）で、0.4 mg/kg の ICG 結合型化合物をマウスの尾静脈に投与し、24 時間後にマウスの蛍光発光を蛍光イメージングシステム（Hamamatsu Photonics）を用いて観察した。また、現在臨床で実施されている肝動脈注入療法を模擬した動物実験モデルとして、皮下移植腫瘍に対して直接 ICG 結合型化合物を投与する方法も試みた。静脈投与時と同様に腫瘍が 500 mm^3 程度まで生育した時点（移植後約 10 日）で、0.2 mg/kg の ICG 結合型化合物をマウスの側腹部の皮下腫瘍に対して直接注入し、これを 3 日おきに実施した。ICG 結合型化合物投与開始時から皮下腫瘍の体積を 1 日ごとに計測した。

5. トランスポータータンパク質の発現量が ICG の滞留性に及ぼす効果の検討

継代培養した HuH-7 細胞を 1×10^5 個/mL の密度で 4-well chamber slide に播種し、24 時間培養して細胞を接着させた。ICG の取り込みに関与するタンパク質として示唆されている organic anion-transporting polypeptide 1B3（OATP1B3）に対する 3 種類の siRNA をそれぞれ添加し、48 時間培養した。そして、ICG あるいは ICG 結合型化合物を添加し、24 時間培養した。最終的に、接着した細胞内からの蛍光発光を蛍光顕微鏡（Hamamatsu Photonics）にて検出した。

6. 統計解析

各種実験における統計解析は、統計解析ソフト SPSS 11.5 を用いた student t 検定を実施し、P 値 0.05 未満を有意差の基準とした。

結果および考察

1. ICG 結合型抗癌剤の作製と細胞内局在

現在臨床医療において使用されている種々の抗癌剤と ICG を化学反応を利用して共有結合させ、複数種の ICG 結合型化合物の合成を達成した。その中から、合成計画が複雑ではなく、DMEM 培地中で安定に存在できることを確認した ICG 結合型化合物 A に関して以下の実験を進めることとした。

各種細胞における ICG 結合型化合物 A の細胞内局在を評価した。化合物を添加して 24 時間培養を実施した細胞の蛍光発光の分布を観察したところ、肝癌細胞 HuH-7 細胞及び HepG2 細胞においては細胞質での蛍光発光を検出した（図 1）。一方、大腸癌細胞 HCT116 においては、蛍光発光は検出されなかった。なお、この HuH-7 細胞及び HepG2 細胞における蛍光発光は、細胞質ほど強くはないものの核内でも検出された。この蛍光発光の分布は ICG でも同様の挙動を示すことから、ICG 結合型化合物 A は肝癌細胞において ICG と同様の挙動を示すと示唆される。従って、ICG 結合型化合物 A は ICG の特性を利用して抗癌剤を肝癌細胞内に輸送し、そこで滞留する性質を有すると考えられる。

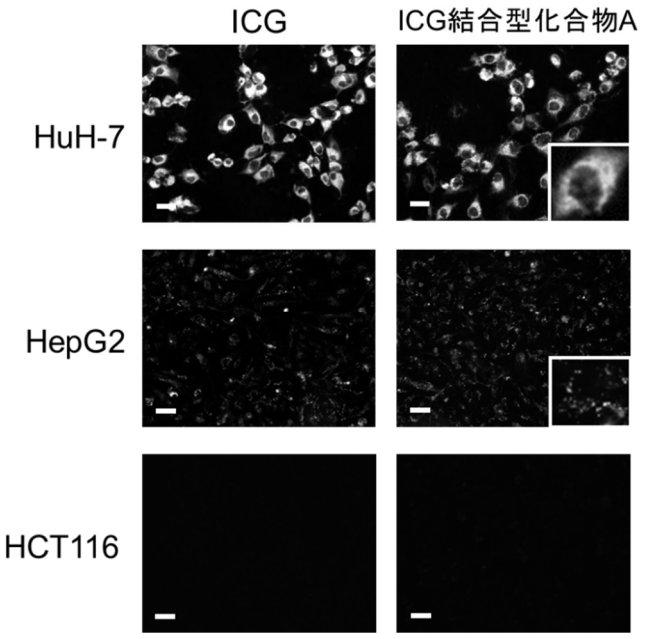


図 1. ICG あるいは ICG 結合型化合物 A 添加培養後の各種細胞の蛍光発光像
肝癌細胞 HuH-7 細胞及び HepG2 細胞、大腸癌細胞 HCT116 細胞における ICG（左図）あるいは ICG 結合型化合物 A（右図）添加培養後の蛍光発光を検出。スケールバーは 50 μm。

2. *In vitro* での ICG 結合型化合物 A の殺細胞効果

各種細胞における ICG 結合型化合物 A の殺細胞効果を MTT 法に基づいて評価した。その結果、HuH-7 細胞及び HepG2 細胞に対する ICG 結合型化合物 A の殺細胞効果は ICG を結合する前の抗癌剤 A と同程度であった（図 2A）。一方、HUVEC に対する ICG 結合型化合物 A の殺細胞効果は、抗癌剤 A と比較して軽減された（図 2B）。以上の結果から、ICG 結合型化合物 A は ICG の滞留性を有さない正常細胞に対する毒性を軽減しながら、ICG の滞留性を有する肝癌細胞に対して毒性を誘導することが示唆される。

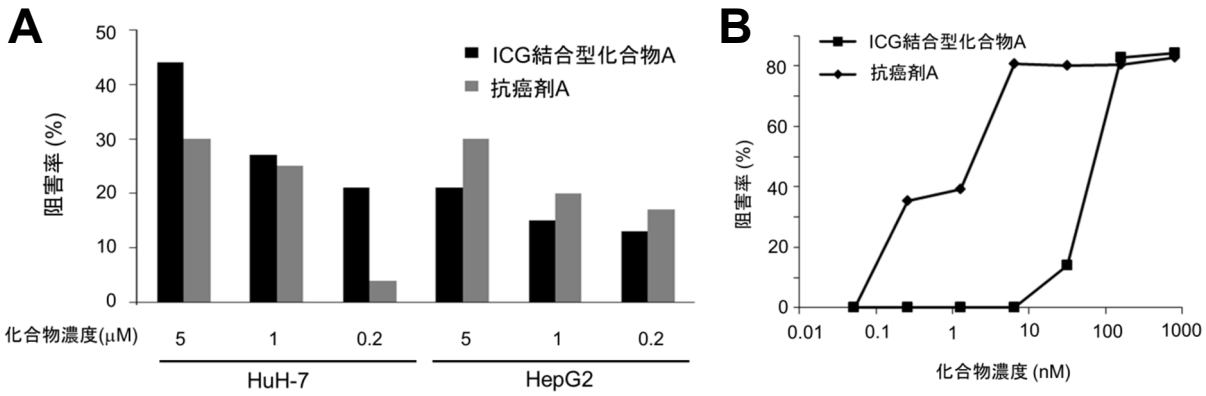


図 2. 各種肝癌細胞及び HUVEC に対する ICG 結合型化合物 A 及び抗癌剤 A の増殖阻害効果
肝癌細胞 HuH-7 及び HepG2（A）、HUVEC（B）に対して ICG 結合型化合物 A 及び抗癌剤 A を作用させ、48 時間後の生細胞の割合を化合物無添加条件と比較して阻害率を算出。

3. *In vivo* での ICG 結合型化合物 A の抗腫瘍効果

肝細胞癌細胞をヌードマウスの皮下に移植した腫瘍モデルマウスを作出し、ICG 結合型化合物 A を静脈投与し、24 時間後に体表からの蛍光発光を観察した。その結果、HuH-7 細胞由来の腫瘍組織は顕著な蛍光発光を呈した（図 3A）。一方で、大腸癌細胞 HCT116 細胞由来の腫瘍は、蛍光発光を呈さなかった（図 3A）。従って、*in vivo* における ICG 結合型化合物 A に由来する蛍光発光の分布は、上述した *in vitro* で癌細胞に直接投与した実験における結果と同様であったことを示している。一方、この ICG 結合型化合物 A に由来する蛍光発光は、正常肝においても検出された（図 3A）。この特性は、ICG 単独の静脈投与時には見られなかったものである。また、ICG 結合型化合物 A は ICG と同様に胆汁を介して排出され、尿中での排泄ではないとされるため、静脈投与による全身性の化学療法には不向きであると考えられた。そこで、化学療法への応用においては選択的投与が求められることから、肝動脈注入療法を想定した腫瘍への直接注入という方法での *in vivo* 抗腫瘍効果の検討を実施した。その結果、皮下腫瘍における蛍光発光は化合物投与後 1 週間以上持続していた（図 3B）。そして、ICG 結合型化合物 A 投与群の腫瘍は、ICG 結合前の抗癌剤 A 投与群よりも小さかった（図 3C）。この結果は、肝細胞癌組織における ICG 結合型化合物 A の滞留が、抗癌剤 A よりも強い抗腫瘍効果を示しており、ICG 結合型化合物 A が肝細胞癌に対する化学療法剤として利用可能であることを示唆している。我々の研究では、当科で ICG を静脈投与された症例における約 90%の肝細胞癌組織において ICG の滞留がみとめられた［6］。故に、ICG の滞留性が活かされた ICG 結合型化合物は、広範の肝細胞癌患者への化学療法剤として適用できると考えられる。

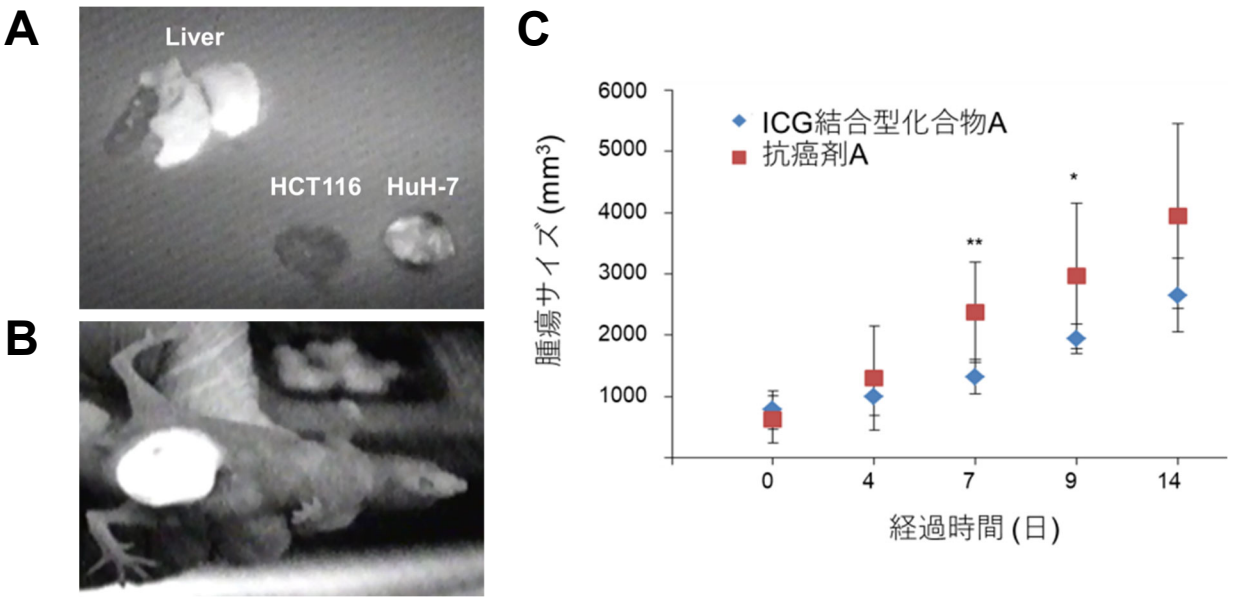


図 3. 皮下腫瘍モデルマウスを用いた ICG 結合型化合物 A の評価

（A）HuH-7 細胞あるいは HCT116 細胞の皮下移植腫瘍モデルマウスに ICG 結合型化合物 A を静脈投与し、24 時間後の腫瘍組織及び正常肝の蛍光発光。（B）HuH-7 細胞の皮下移植腫瘍モデルマウスの腫瘍組織に ICG 結合型化合物 A を直接投与し、8 日後の蛍光発光を体外から観察。（C）HuH-7 細胞の皮下移植腫瘍モデルマウスの腫瘍組織に ICG 結合型化合物 A を直接投与し、腫瘍の体積を計測。$*P < 0.05$、$**P < 0.01$。

4. ICG 及び ICG 結合型化合物 A の滞留性における OATP1B3 の効果

過去の研究において、ICG が滞留して蛍光発光を呈する肝細胞癌組織では、OATP1B3 の発現が蛍光発光を呈さない組織に比較して高いという結果が示された [6]。そこで、siRNA を用いて OATP1B3 の発現を低下させ、ICG 及び ICG 結合型化合物 A の滞留性における OATP1B3 の効果を評価した。その結果、OATP1B3 の発現低下がみられた細胞において、ICG 由来の蛍光発光の強度がノックダウン未処理の細胞に比較して低下した（図 4）。なお、この細胞においても ICG 由来の蛍光発光がすべて消失することはなかった。一方、ICG 結合型化合物 A においては、OATP1B3 の発現低下がみられた細胞でも蛍光発光の強度が低下することはなかった（図 4）。以上の結果から、ICG 結合型化合物 A の滞留性は、OATP1B3 による取り込みの変化のみによって誘導されているのではなく、複数の因子によって複合的に制御されていると考えられる。

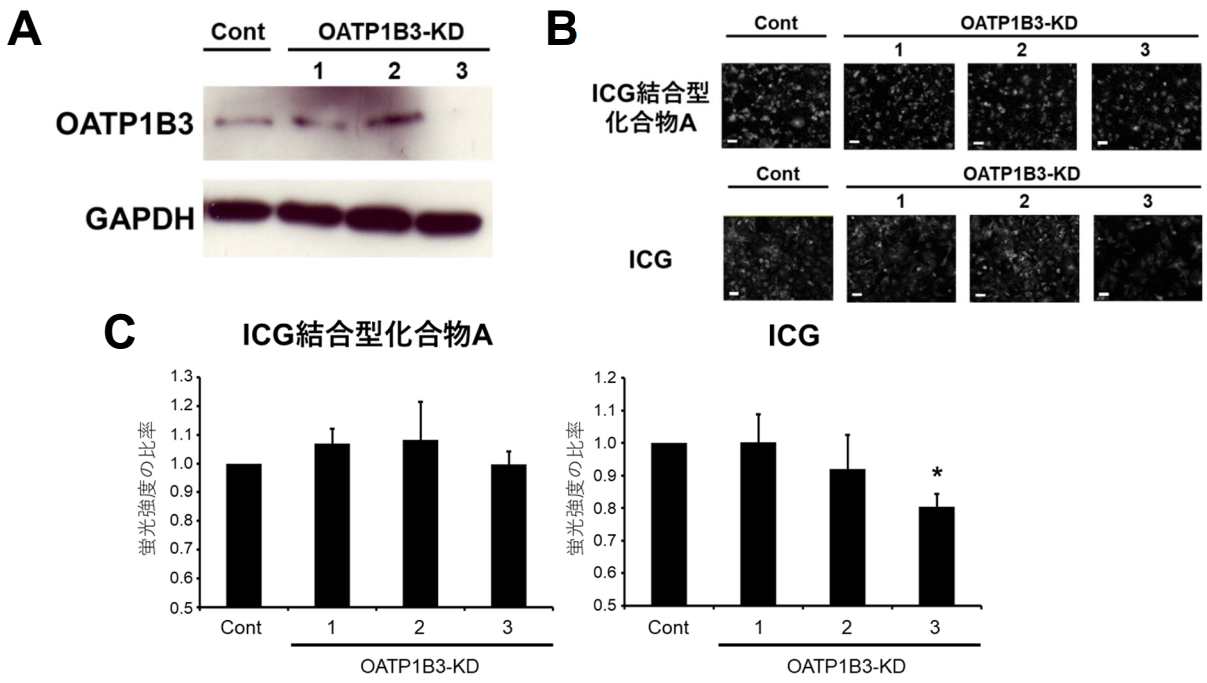


図 4. OATP1B3 の発現量を低下させた HuH-7 細胞における ICG 及び ICG 結合型化合物 A の滞留性
（A）各種 siRNA で処理した HuH-7 細胞の OATP1B3 の発現。（B）ICG 及び ICG 結合型化合物 A を作用させた各種 siRNA 処理 HuH-7 細胞の蛍光発光。スケールバーは 50 μm。（C）ICG 及び ICG 結合型化合物 A を作用させた各種 siRNA 処理 HuH-7 細胞の蛍光強度の比較。$*P < 0.05$。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室の浦野泰照教授である。

文　献

1） Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma. CA Cancer J Clin. 2012;62(6):394-9. doi: 10.3322/caac.21161. PMID: 23070690.

2） Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet 2012;379:1245-1255. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61347-0. PMID: 22353262.

3） Ikeda M, Shimizu S, Sato T, Morimoto M, Kojima Y, Inaba Y, Hagihara A, Kudo M, Nakamori S, Kaneko S, Sugimoto R, Tahara T, Ohmura T, Yasui K, Sato K, Ishii H, Furuse J, Okusaka T. Sorafenib plus hepatic

arterial infusion chemotherapy with cisplatin versus sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma: randomized phase II trial. Ann Oncol 2016;27:2090-2096. PMID: 27573564.

4) Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet. 2018 Mar 31;391(10127):1301-1314. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30010-2. Epub 2018 Jan 5. PMID: 29307467.

5) Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. N Engl J Med 2007;356:1545-1559. PMID: 17429086.

6) Ishizawa T, Masuda K, Urano Y, Kawaguchi Y, Satou S, Kaneko J, Hasegawa K, Shibahara J, Fukayama M, Tsuji S, Midorikawa Y, Aburatani H, Kokudo N. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. Ann Surg Oncol 2014;21:440-448. doi: 10.1245/s10434-013-3360-4. PMID: 24254203.

7) Kaneko J, Inagaki Y, Ishizawa T, Gao J, Tang W, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N. Photodynamic therapy for human hepatoma-cell-line tumors utilizing biliary excretion properties of indocyanine green. J Gastroenterol. 2014;49(1):110-116. doi: 10.1007/s00535-013-0775-4. PMID: 23595610.