78　近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブの創製	近藤　輝幸

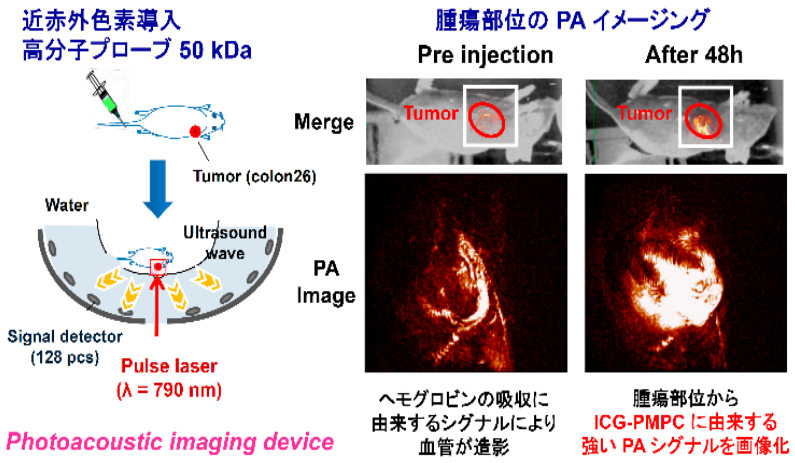
【目的】新しい生体イメージング法として、光イメージング法と超音波イメージング法とを融合した新しい“光音響イメージング法”（Photoacoustic Imaging：PAI）が、臨床現場から期待されている。光音響現象は、1880 年に Bell が通信手段の応用研究の中で発見した現象であり、その原理は、励起光を照射した光吸収体が熱膨張する際に発生する光音響波（粗密波）を超音波として観測する技術である。近年のレーザー光源の小型化と超音波検出素子の高性能化により、生体への応用が現実味を帯びている（Nature 2010 Feb 17;463(7283):977–80）。

多くの腫瘍において、著しい速度で増大する新生血管を PAI で 3D 画像化できれば、乳癌、甲状腺癌、前立腺癌等の比較的体表に近い癌の早期診断が可能になると考えられた。しかしながら、腫瘍内の新生血管は極めて細く、PAI に必要なヘモグロビン量が圧倒的に不足していることが分かってきた。従って、PET や MRI と同様、PAI に適した新しい分子プローブの創製が急務である。本研究では、我々のこれまでの研究成果に基づき（J. Am. Chem. Soc. 2015 Jan 21;137(2):799–806）、PAI に有効な新しい「近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブ」を開発する独創的、学術的、および臨床的意義の高い研究を行った。

【方法】2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine（MPC）の原子移動ラジカル重合（ATRP）により、末端にアミノ基を有する H_2N–PMPC を合成した。臨床応用されているインドシアニングリーン（ICG）、およびシアニン骨格を有し、親水性に優れた近赤外蛍光色素（Cy7、IRDye®800RS、IRDye®800CW）のスクシンイミジル誘導体と H_2N–PMPC との縮合反応により、4 種類の新しい近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブ（ICG–PMPC、Cy7–PMPC、800RS–PMPC、800CW–PMPC）を合成した。新規ポリマープローブの粒径と表面電位は、動的光散乱法（DLS）により測定するとともに、透過型電子顕微鏡（TEM）画像と比較した。また、水晶発振子マイクロバランス（QCM）法により、4 種類の NIR–PMPC と BSA との相互作用について評価した。さらに、マウス由来の大腸癌細胞（colon26）を右肩皮下に移植した表層担癌モデルマウスに、4 種類の NIR–PMPC をそれぞれ尾静脈投与（20 nmol/mouse）し、48 時間後まで経時的に *in vivo* 蛍光／光音響イメージングを行い、体内動態を明らかにした。

【結果】本研究では、腫瘍の *in vivo* 光音響イメージングに有効な概念的に新しい近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブ（NIR–PMPC）の開発に成功した。PMPC の末端に導入した近赤外蛍光色素の疎水性／親水性が、NIR–PMPC プローブの粒径、生体適合性、および腫瘍集積性に顕著な影響を与えることを見出した。合成した 4 種類の NIR–PMPC の内、特に、800RS–PMPC を、微小癌を担癌したモデルマウスに尾静脈投与し、*in vivo* PAI を行った結果、800RS-PMPC プローブが微小癌に高集積した明瞭な PAI 画像が得られた（下図）。以上の結果から、本研究では、近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブ（NIR–PMPC）を用いる光音響イメージング法が、生体深部の微小癌の早期診断に極めて有効であることを明らかにした。

800RS–PMPC プローブを用いた担癌マウスの腫瘍部位選択的 PAI 画像



78. 近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブの創製

近藤　輝幸

京都大学 大学院工学研究科 基礎物質化学講座 先端医工学分野

Key words：光音響イメージング，ナノ粒子プローブ，近赤外蛍光色素，ホスホリルコリン，ベタインポリマー

緒　言

近赤外蛍光色素（Near−Infrared dyes：NIR−dyes）をレポーターとして導入した生体適合性ポリマーナノ粒子は、腫瘍の *in vivo* 蛍光／光音響（Photoacoustic：PA）イメージングに有効なプローブと考えられ、粒径を適切に制御（*ca.* 10〜100 nm）できれば、EPR 効果（Enhanced Permeability and Retention Effect）により、効率的に腫瘍部位に集積することが期待される。一方、レポーターとして導入した近赤外蛍光色素の疎水性／親水性によるポリマーナノ粒子の物性変化は、生体内での動態に大きな影響を与えることが予想されるが、色素を導入していないポリマーナノ粒子の生体内での動態をリアルタイムで追跡する方法は確立されておらず、極めて困難な課題である。

一方、我々は、細胞膜脂質の構成要素であるホスホリルコリン基を側鎖に持つホスホリルコリンポリマーPMPC（poly(2-methacryloyloxyethyl-phosphorylcholine)）を、安定同位元素である^{13}C（および^{15}N）で標識した新規^{13}C ／^{15}N−PMPC プローブを開発し、分子標的 MRI（Magnetic Resonance Imaging）法により PMPC プローブの生体内での動態をリアルタイムで直接観測可能であることを明らかにし、報告している［1，2］（図 1）。

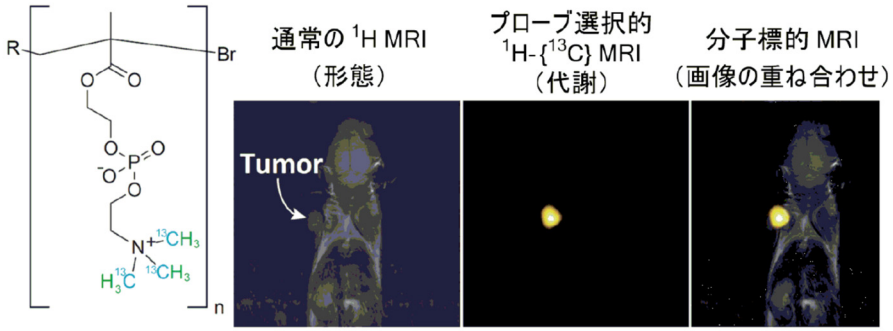
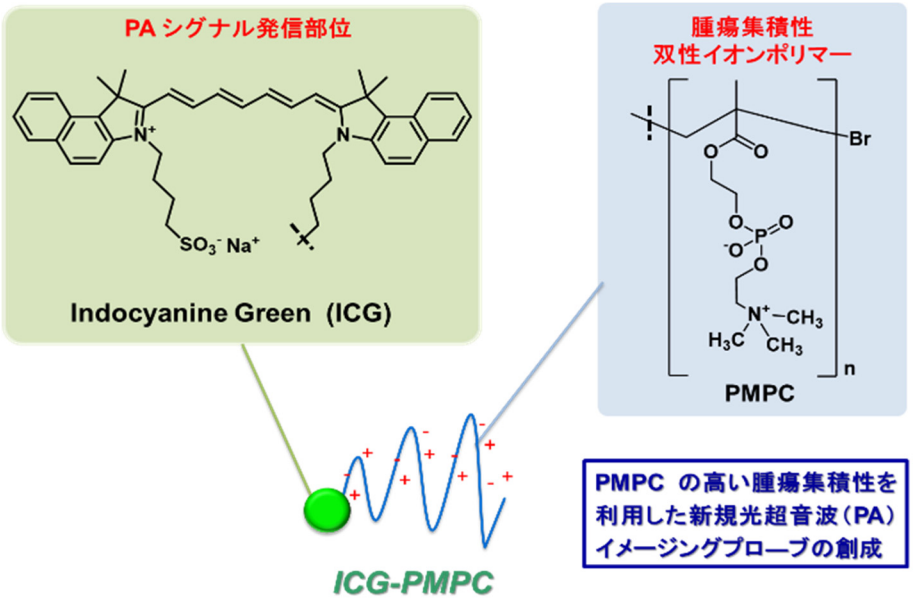


図 1. ^{13}C-PMPC プローブを用いる担癌マウスの分子標的 MRI 画像

そこで本研究では、PMPC を基盤とする新しい蛍光／光音響イメージングプローブの開発に取り組み、疎水性／親水性が異なる 4 種類のシアニン系近赤外蛍光色素（NIR−dyes）をそれぞれ PMPC の末端に導入した NIR−PMPC プローブの合成に成功した。NIR−PMPC プローブの粒径、およびタンパク質への吸着能を *in vitro* で評価した（Scheme 1）。さらに、担癌モデルマウスに NIR−PMPC プローブを尾静脈投与し、蛍光イメージングにより、腫瘍集積性と臓器滞留性を *in vivo* で評価した。最適化した 800RS−PMPC プローブを用いることにより、マウス生体深部の微小癌の *in vivo* 光音響イメージング（PAI）に成功し、NIR−PMPC プローブの PAI プローブとしての有効性を明らかにした。



Scheme 1. ICG–PMPC の概念図

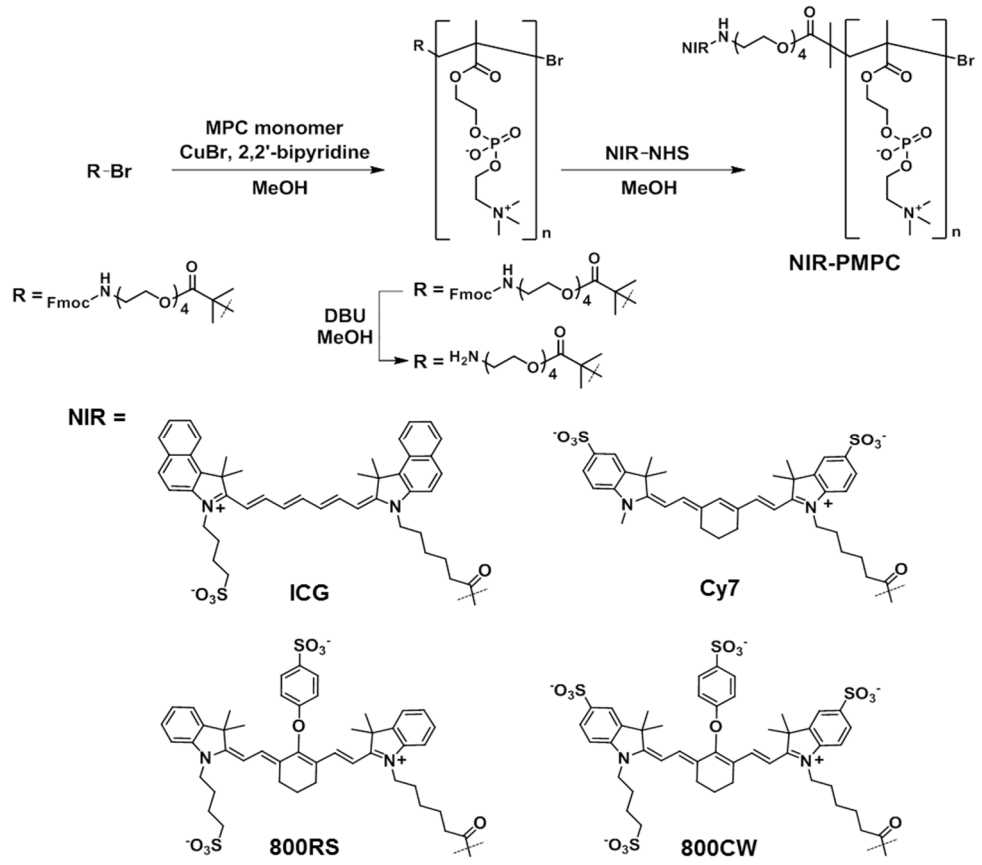
方　法

2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine （MPC） の原子移動ラジカル重合 （Atom Transfer Radical Polymerization : ATRP）により、ポリマー末端にアミノ基を有する H_2N–PMPC を合成した。次に、臨床応用されているインドシアニングリーン（ICG）、およびシアニン骨格を有する 3 種類の親水性に優れた近赤外蛍光色素（Cy7、IRDye® 800RS、IRDye® 800CW）のスクシンイミジル誘導体と H_2N–PMPC との縮合反応により、4 種類の新しい「近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマーナノ粒子プローブ（ICG–PMPC、Cy7–PMPC、800RS–PMPC、800CW–PMPC）」を合成した。ナノ粒子プローブの粒径と表面電位は、動的光散乱法（Dynamic Light Scattering : DLS）により測定し、粒径については、透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope : TEM）撮影による画像と比較した。また、水晶発振子マイクロバランス（Quartz Crystal Microbalance : QCM）法により、NIR–PMPC のウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin : BSA）への吸着能について評価した。さらに、マウス由来の大腸癌細胞 （colon 26） を右肩皮下に移植した表層担癌モデルマウスに、NIR–PMPC をそれぞれ尾静脈投与し（20 nmol/mouse）、48 時間後まで経時的にマウス全身の *in vivo* 蛍光イメージングを行い、腫瘍集積性と臓器滞留性を明らかにした。

結　果

1. NIR–PMPC の合成

CuBr/2,2'-bipyridine 触媒存在下、2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine（MPC）モノマーの原子移動ラジカル重合（ATRP）を行い、続く、塩基性条件下での Fmoc 基の脱保護により、ポリマー末端にアミノ基を有する H_2N–PMPC を得た。近赤外蛍光色素としては、臨床応用されている疎水性のインドシアニングリーン（ICG）、およびシアニン骨格を有する 3 種類の親水性の高い近赤外蛍光色素（Cy7、IRDye®800RS、IRDye®800CW）を選択した。各色素のスクシンイミジル誘導体と H_2N–PMPC との縮合反応により、4 種類の新規 NIR–PMPC プローブの合成に成功した（Scheme 2、表 1）。



Scheme 2. NIR-PMPC プローブの合成

2. NIR–PMPC の粒径評価

合成した 4 種類の NIR–PMPC および H_2N–PMPC について、動的光散乱法（DLS）により粒径を測定した結果、疎水性の ICG を導入した ICG–PMPC は、会合体（d_{DLS} = 148±0.6 nm）を形成しているのに対し、水溶性のシアニン色素を導入した Cy7–PMPC、800RS–PMPC、800CW–PMPC は、いずれも H_2N–PMPC と同程度の粒径（d_{DLS} = 12～16 nm）を示し、コンパクトな単量体として存在していることが明らかとなった。これらの DLS 測定による結果は、透過型電子顕微鏡（TEM）撮影による画像とも良く一致していた。以上の結果より、PMPC 末端に水溶性の近赤外蛍光色素を導入することにより、NIR–PMPC の親水性が向上し、会合体の形成が完全に抑制されることが明らかとなった（図 2）。

表 1. NIR–PMPC プローブの物性

NIR-PMPC	Overall yield (%)	M_n (kDa) [a]	Log *D* of fluorophore at pH 7.4	Formal charge of fluorophore
ICG-PMPC	53	55	3.73	0
Cy7-PMPC	54	55	-2.19	-1
800RS-PMPC	47	56	-1.02	-1
800CW-PMPC	46	56	-8.98	-3

[a] Measured by ^{1}H NMR. [b] Calculated with Pallas 3.0.

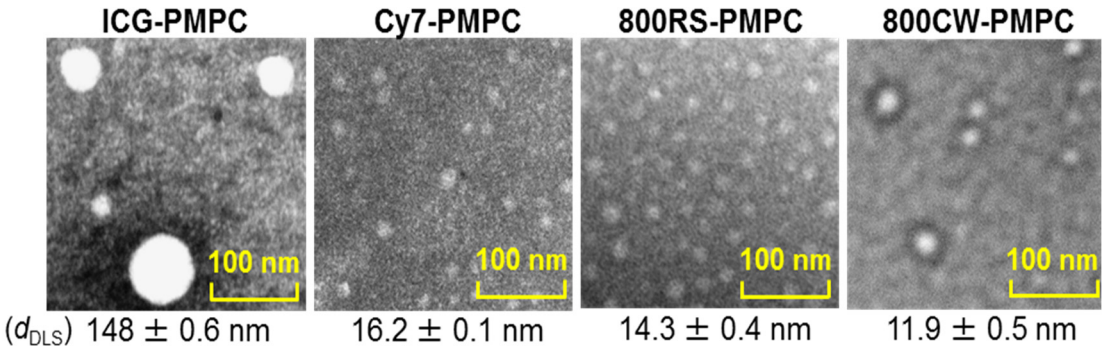


図 2. 疎水性／親水性が異なる近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブの TEM 画像
DLS での測定結果との比較（注）2.0 mg/ml の濃度でプローブを水に分散させ、タングステン酸によるネガティブ染色行った後、TEM 観察。

3. NIR–PMPC のウシ血清アルブミン（BSA）への吸着能の評価

水晶発振子マイクロバランス（QCM）法により、4 種類の NIR–PMPC の BSA との結合能を評価した（図 3）。その結果、ICG–PMPC は BSA に強く結合（吸着）するのに対し（BSA 1.0 mol 当たり 129±9.0 mmol）、親水性の近赤外蛍光色素を導入した 3 種類の NIR–PMPC の BSA への吸着量は、いずれも検出限界以下であった。従って、水溶性の近赤外蛍光色素を導入した NIR–PMPC では、色素部位での親水性の向上により、疎水性を駆動力とするタンパク質への吸着が著しく抑制され、高い生体適合性を有することが明らかとなった。

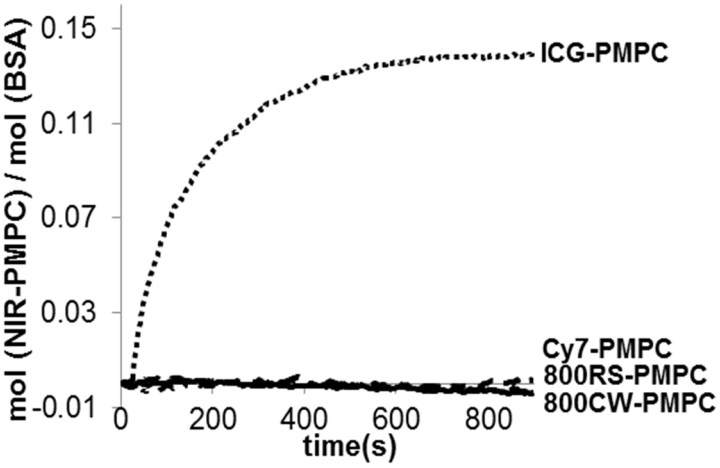


図 3. QCM 法による NIR–PMPC プローブの BSA に対する非特異的吸着能の評価

4. 担癌モデルマウスでの *in vivo* および *ex vivo* 蛍光イメージングによる NIR–PMPC の体内動態評価

PMPC の末端に導入した近赤外蛍光色素の疎水性／親水性が NIR–PMPC プローブの腫瘍集積性に与える影響を明らかにするため、マウス由来の大腸癌細胞（colon 26）を右肩皮下に移植した表層担癌モデルマウスに、NIR–PMPC を尾静脈投与（20 nmol/mouse）し、48 時間後まで経時的にマウス全身の *in vivo* 蛍光イメージングを行った。その結果、NIR–PMPC プローブを投与したマウス腫瘍部位から強い蛍光発光が観測された（図 4）。

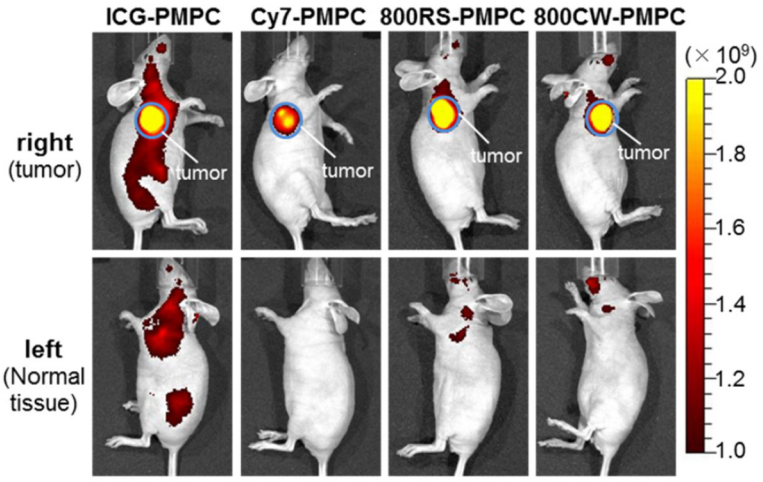


図 4. マウス由来の大腸癌細胞（colon 26）を右肩皮下に移植した表層担癌モデルマウスに、NIR–PMPC プローブを尾静脈投与（20 nmol/mouse）し、24 時間後の蛍光イメージング画像（励起光波長／観測波長 = 745／850 nm）

さらに、NIR–PMPC の投与から 48 時間後にマウスを犠牲死させ、摘出した臓器の *ex vivo* 蛍光イメージングを行った（図 5）。その結果、ICG–PMPC は肝臓をはじめとして腫瘍以外の臓器にも広く集積していることが明らかとなった。一方、親水性の近赤外色素を導入した Cy7–PMPC、800RS–PMPC、800CW–PMPC では、肝臓への集積が著しく低減された。

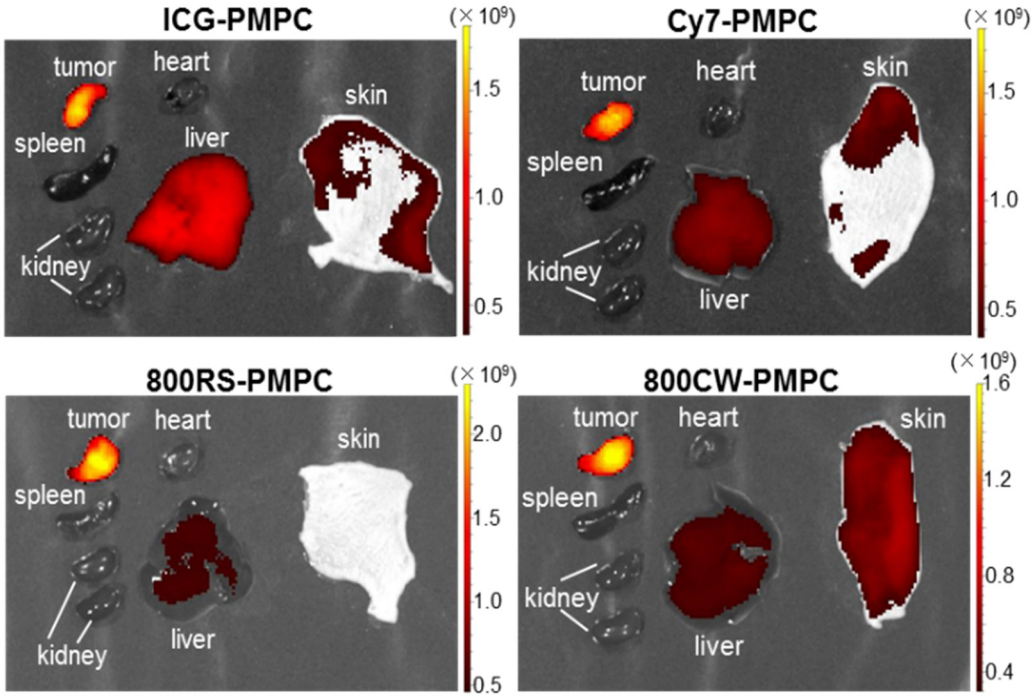


図 5. NIR–PMPC プローブ（20 nmol/mouse）の投与 48 時間後に犠牲死させた担癌マウスの腫瘍および臓器の蛍光イメージング画像（励起光波長／観測波長 = 745／850 nm）

以上の結果により、疎水性の ICG を導入した NIR– PMPC プローブでは、PMPC に特徴的な利点（コンパクトな粒径、高い生体適合性、および高い腫瘍集積性）が著しく阻害されるが、親水性のアニオン性近赤外蛍光色素を導入した NIR–PMPC プローブでは、これらの問題は全く起こらないことが明らかとなった。

5. NIR–PMPC の *in vivo* PA イメージングへの応用

一般に、蛍光イメージングは、広範囲を高感度で撮像する有効なイメージング法であるが、生体内では蛍光シグナルが散乱等により著しく減衰することから、生体深部の情報は得られない。一方、PA イメージングでは、生体深部（～2 cm）の高精細な画像化、および微小癌の検出が可能であることから、腫瘍の早期画像診断法として期待される。

そこで、NIR-PMPC プローブの中で、最も高い腫瘍選択性を有することが明らかになった 800RS–PMPC プローブを用い、生体深部の微小癌の PAI について検討した。マウス右足の筋肉中にマウス由来の大腸癌細胞（colon 26）を担癌することにより、体表から約 5 mm の右足深部に 2～5 mm 程度の微小癌の生成を MRI 撮像により確認した。そこで、800RS–PMPC プローブをこの担癌マウスに尾静脈投与（40 nmol/mouse）し、48 時間後に蛍光イメージングを行った結果、皮膚などの表層部位からの非特異的な蛍光シグナルのみが観測され、右足深部の微小癌に集積したプローブ由来の蛍光シグナルの検出は困難であった（図 6a 左）。一方、皮膚を切除した同一マウスの蛍光イメージングでは、微小癌に集積したプローブ由来の蛍光シグナルが選択的に確認された（図 6a 右）。

さらに、PAI について検討した結果、生理食塩水を投与したマウスに比べ、800RS–PMPC プローブを投与したマウスの深部微小癌から、プローブ由来の強い PA 信号が観測され、明瞭な PAI 画像を得ることに成功した（図 6b）。

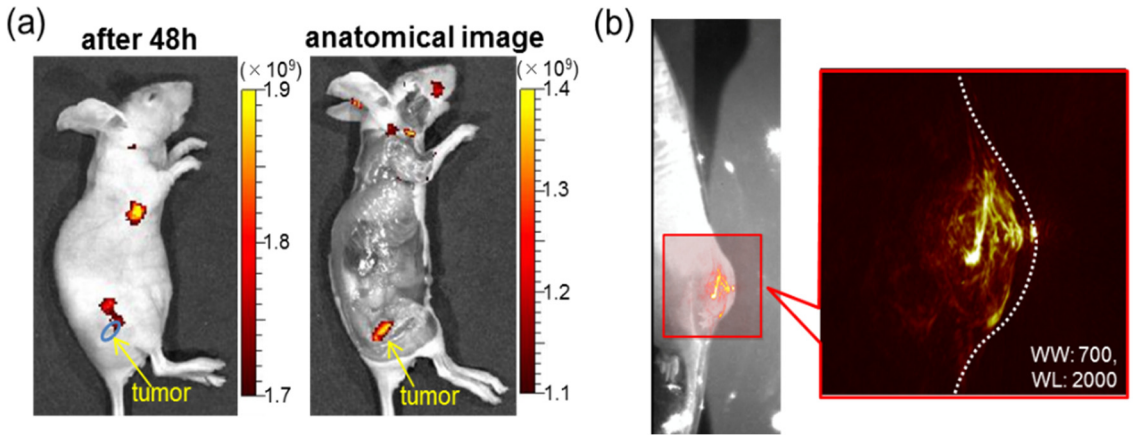


図 6. 右足深部に担癌したモデルマウスに 800RS-PMPC プローブを投与したマウスのイメージング画像

a) 800RS-PMPC プローブを尾静脈投与 48 時間後の蛍光イメージング画像（左）
皮膚を切除後の蛍光イメージング画像（右）

b) PAI 画像（励起光の波長は 771 nm）

考　察

これまでにも、PAI は、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの光吸収特性の違いを利用した血中酸素飽和度分布の画像化に用いられてきた。従って、PAI では血中ヘモグロビン由来の PA 信号が同時に観測されることから、生体深部の微小癌の PAI により、高精細な PAI 画像を得るためには、プローブの腫瘍集積性の著しい向上、血中ヘモグロビン由来の PA 信号の大幅な低減（PAI により得られた画像上でのサブトラクションを含む。）、および照射するパルスレーザー光の波長をプローブ毎に最適化する等のさらなる検討が必要である。

一方、本研究を推進する過程で、低酸素細胞に過剰発現しているニトロ基還元酵素によるニトロ基のアミノ基への還元により、低酸素細胞に蓄積する 2–ニトロイミダゾール誘導体とリファレンスとしての蛍光色素を同時に修飾した金ナノロッドの表面プラズモン効果を利用した新しい PAI プローブの開発にも成功した［3］。

文　献

1) Yamada H, Hasegawa Y, Imai H, Takayama Y, Sugihara F, Matsuda T, Tochio H, Shirakawa M, Sando S, Kimura Y, Toshimitsu A, Aoyama Y, Kondo T. Magnetic resonance imaging of tumor with a self-traceable phosphorylcholine polymer. J Am Chem Soc. 2015 Jan 21;137(2):799–806. Epub 2015 Jan 6. PMID: 25560796 DOI: 10.1021/ja510479v

2) For a review, see: Kondo T, Kimura Y, Yamada H, Aoyama Y. Polymeric ^{1}H MRI probes for visualizing tumor *in vivo*. Chem Rec. 2017 Jun;17(6):555–568. Epub 2017 Apr 7. PMID: 28387472 DOI: 10.1002/tcr.201600144

3) Umehara Y, Kageyama T, Son A, Kimura Y, Kondo T, Tanabe K. Biological reduction of nitroimidazole-functionalized gold nanorods for photoacoustic imaging of tumor hypoxia. RSC Adv. 2019 May 29;9(29):16863–68 DOI: 10.1039/c9ra00951e