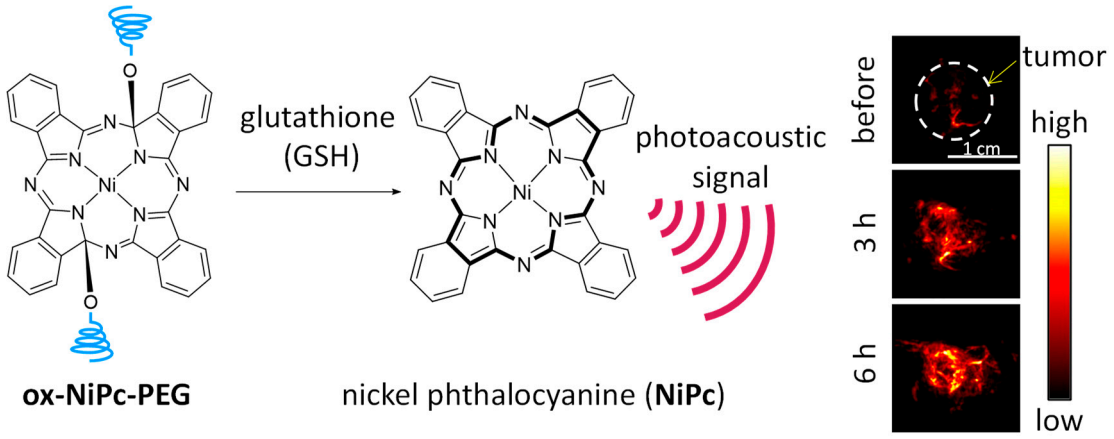
71　酸化型フタロシアニンを用いる低侵襲セラノスティクス	三木　康嗣

【目的】高い空間分解能をもつ低侵襲な撮像法である光音響イメージングに利用できる造影剤として、近赤外パルスレーザー光を高効率に吸収し、無輻射失活過程を経て励起エネルギーを消費する光増感分子が適する。造影剤に適した光増感分子としてメタロフタロシアニン（MPc）が近年活発に研究されているが、腫瘍部位で信号を発するようになる turn-on 型造影剤は未開拓であった。そこで、本研究では MPc の 18 パイ電子系を酸化的に化学修飾した酸化型メタロフタロシアニン（ox-MPc）に注目し、血中や正常組織において光音響信号を全く発さないが、目的とする腫瘍組織において信号を発するようになる turn-on 型造影剤の開発を目指した。

【方法】**ox-NiPc-PEG** はフタロニトリル、酢酸ニッケルなどから 2 段階で合成した。リン酸緩衝液中で **ox-NiPc-PEG** にがん細胞内で過剰発現することが知られるグルタチオン（GSH）を作用させ、対応する NiPc の生成を追跡した。NiPc は質量分析、赤外吸収分光法、元素分析により同定した。反応とともに生成する NiPc に由来する光音響信号強度は光音響イメージング装置を用いて測定した。ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞の内因性 GSH との反応についても同様に調査した。A549 を移植したマウスの腫瘍部位に **ox-NiPc-PEG** を直接投与し、光音響信号強度の経時変化を調査した。

【結果】**ox-NiPc-PEG** と GSH を反応させたところ、NiPc がほぼ定量的に得られた。**ox-NiPc-PEG** と NiPc の紫外－可視吸収スペクトルから、**ox-NiPc-PEG** は生体透過性の高い近赤外領域に吸収を持たないが、NiPc は強い吸収を示すことがわかった。**ox-NiPc-PEG** を GSH が過剰発現する A549 細胞に作用させたところ強い光音響信号が観測された。一方、GSH の発現量が低いヒト胎児腎細胞 HEK293 では光音響信号強度はあまり変化しなかった。右脚に A549 を移植した担癌マウスに対して **ox-NiPc-PEG** を腫瘍に直接投与し、腫瘍における光音響信号強度の変化を測定した。投与前の像では、マウスの血液に含まれるヘモグロビンに由来すると考えられる光音響信号が血管様にバックグラウンドシグナルとして観測された。**ox-NiPc-PEG** を注射する前の光音響信号強度と比較すると、注射後 6 時間まで有意に光音響信号強度が増大した。これらを踏まえ、**ox-NiPc-PEG** は生体内で GSH が過剰発現するがん細胞を可視化する光音響イメージング用造影剤として利用できることが示された。

turn-on 型光音響造影剤 **ox-NiPc-PEG** およびこれを用いる光音響イメージング



71. 酸化型フタロシアニンを用いる低侵襲セラノスティクス

三木　康嗣

京都大学 大学院工学研究科 物質エネルギー化学専攻 基礎炭化水素化学分野

Keywords：光音響イメージング，フタロシアニン，がん，グルタチオン

緒　言

光音響イメージングは、高い空間分解能をもつ低侵襲な撮像法である［1］。近赤外パルスレーザー光を高効率に吸収し、無輻射失活過程を経て励起エネルギーを消費する光増感分子が造影剤として適する。また、パルスレーザー光を繰り返し照射するため、光褪色性を示さないことも重視される。メタロフタロシアニン（MPc）は光褪色性を示さない近赤外色素として知られており、その高いモル吸光係数や高効率な光熱変換効率は光音響イメージング用光増感分子の性能として適する［2］。これまで、MPc を含有するナノ粒子状造影剤や水溶性官能基を化学修飾した MPc が開発されたが［3］、これらの造影剤は血中を滞留する間や正常組織に蓄積した際にも光音響信号を発するため、高いバックグラウンドシグナルによるコントラストの悪化や正常組織からの偽陽性が問題となっている。これらを背景に、目的とする組織や疾病部位において光音響信号強度が増大する activatable 型の造影剤がいくつか開発された［4］。しかし、これらの activatable 型造影剤もコントラストの向上には寄与するものの、バックグラウンドシグナルが低減するわけではないため根本的な解決とはならない。そこで、本研究では血中や正常組織において光音響信号を全く発さないが、目的とする腫瘍組織において信号を発するようになる turn-on 型造影剤の開発を目指した。

MPc の 18 パイ電子系を酸化的に化学修飾した酸化型メタロフタロシアニン（ox-MPc）は、18 パイ電子系が切断されているため近赤外光を吸収しない［5］。また、80℃以上の加熱により MPc へと変換されることも知られている［5］。もし、生体内の特定の疾患で過剰発現する生物活性分子に応答して MPc へと変換されれば、ox-MPc を turn-on 型造影剤に用いることができると考えた。本研究では、酸化型ニッケルフタロシアニン（ox-NiPc）が腫瘍組織で過剰発現する還元性トリペプチド グルタチオン（GSH）によって温和な条件で NiPc へと変換されることを見出した［6］。水溶性ポリエチレングリコールで修飾された ox-NiPc（**ox-NiPc-PEG**）が turn-on 型光音響造影剤として機能することを明らかにした（図 1）。

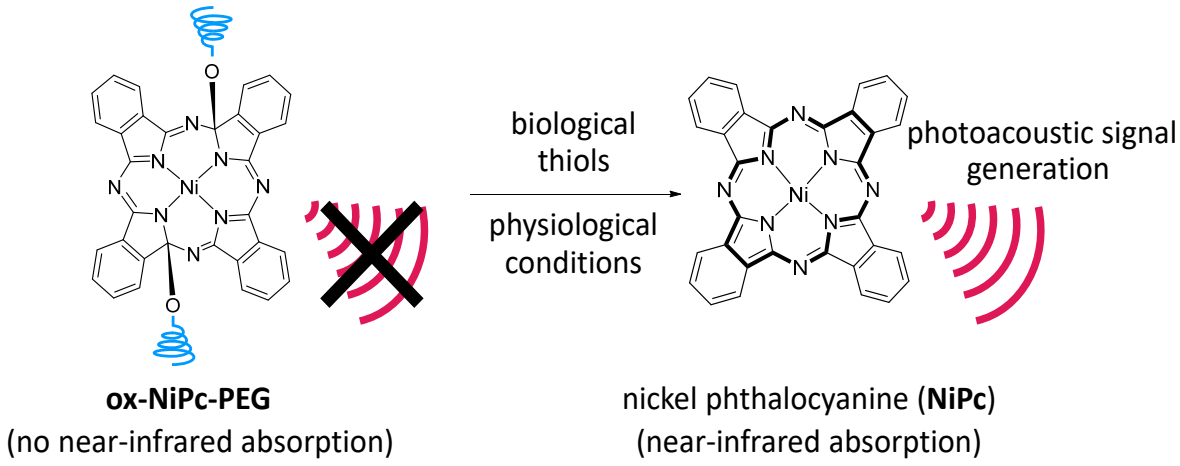


図 1. turn-on 型光音響造影剤 **ox-NiPc-PEG**
生体内チオールに応答し光音響信号を発するようになる turn-on 型光音響造影剤。

方　法

1. ox-NiPc-PEG の合成

ox-NiPc-PEG は図 2 に示す通りフタロニトリル、酢酸ニッケルなどから 2 段階で合成した。合成手法、精製手法、各種スペクトルデータは発表論文［6］を参照されたい。中間体である **ox-NiPc-OH** の構造は X 線結晶構造解析により同定した。

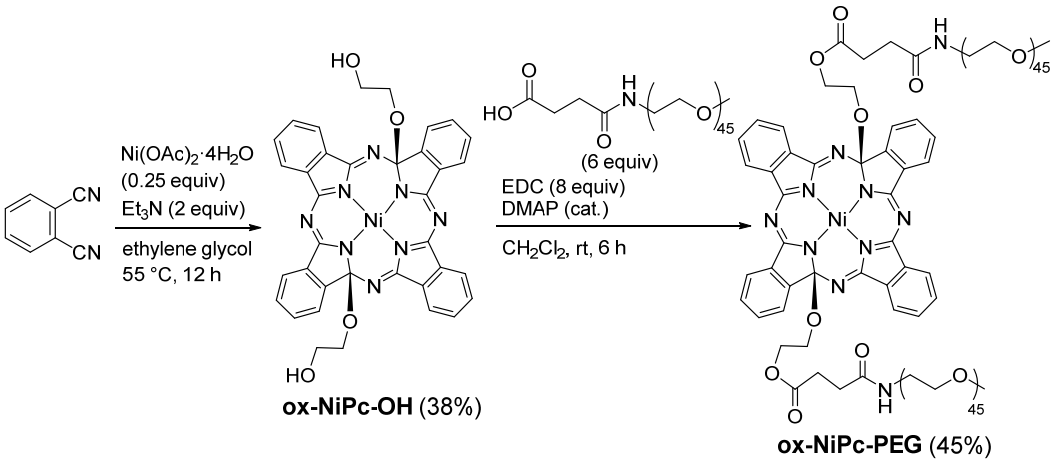


図 2. **ox-NiPc-PEG** の合成
フタロニトリルから **ox-NiPc-PEG** の合成方法。

2. ox-NiPc-PEG と外因性および内因性 GSH との反応

リン酸緩衝液中で **ox-NiPc-PEG** に GSH を作用させ、対応する NiPc の生成を調査した。NiPc は質量分析、赤外吸収分光法、元素分析により同定した。反応とともに生成する NiPc に由来する光音響信号強度は光音響イメージング装置を用いて測定した。ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞の内因性 GSH との反応についても同様に調査した。A549 を移植したマウスの腫瘍部位に **ox-NiPc-PEG** を直接投与し、光音響信号強度の経時変化を調査した。詳細な実験手法は発表論文［6］を参照されたい。

結果および考察

1. GSH による ox-NiPc-PEG の還元

GSH と **ox-NiPc-PEG** を室温、純水中で作用させたところ、NiPc の青色固体が得られた。**ox-NiPc-OH** を還元した場合、NiPc の収率は 98%であったことからほぼ定量的に進行する反応であることが確認された。**ox-NiPc-PEG** と NiPc の紫外－可視吸収スペクトルを図 3a に示す。**ox-NiPc-PEG** は生体透過性の高い近赤外領域に吸収を持たないが、NiPc は強い吸収を示すことがわかる。

pH5.8 のリン酸緩衝液中で、**ox-NiPc-PEG** に GSH を作用させ、反応溶液の光音響信号強度を測定した（図 3b）。光音響信号強度の変化量は、GSH の濃度に依存して増加した。**ox-NiPc-PEG** が GSH により還元され NiPc が生成し、その NiPc が近赤外パルス光を吸収することで、溶液の光音響信号が増大したと考えられる。**ox-NiPc-PEG** の GSH による還元反応の pH 依存性を調査した。pH の異なるリン酸緩衝液中で **ox-NiPc-PEG** に GSH を作用させ、溶液の光音響信号強度を経時測定した（図 3c）。溶液の pH が低下するにつれて光音響信号が増大し、GSH による **ox-NiPc-PEG** の還元反応は酸性条件下で促進されることがわかった。

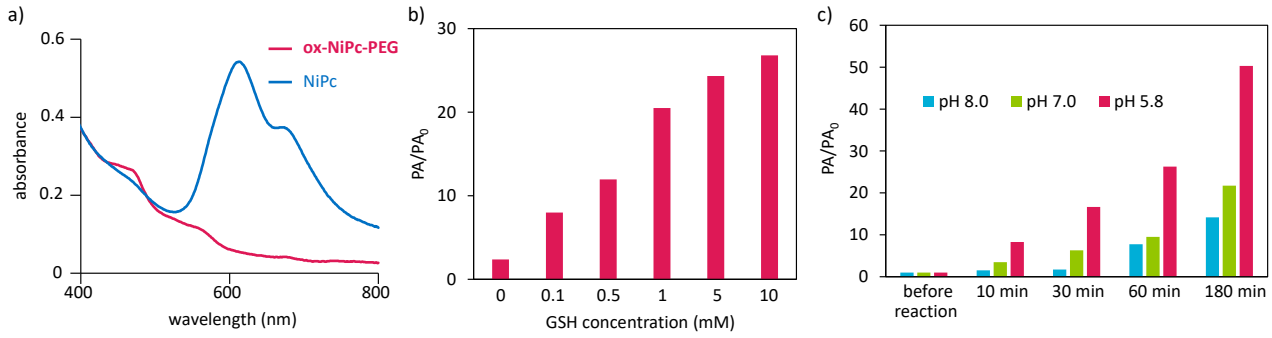


図 3. **ox-NiPc-PEG** の還元

a) **ox-NiPc-PEG** と NiPc の紫外－可視吸収スペクトル。

b) **ox-NiPc-PEG** に異なる濃度の GSH をリン酸緩衝液（pH 5.8）中で 37℃、30 分作用させた際の光音響信号強度 PA。GSH を作用させる前の光音響信号強度 PA_0 に対する強度比を示す。

c) **ox-NiPc-PEG** に 1 mM GSH を異なる pH のリン酸緩衝液中で作用させた際の光音響信号強度 PA の経時変化。

2. ox-NiPc-PEG による内因性生体内チオールの検出、光音響造影剤としての機能評価

pH 5.8 の PBS 中で、**ox-NiPc-PEG** に各種アミノ酸を作用させ、溶液の光音響信号の強度を測定した（図 4a）。還元性アミノ酸である cysteine（Cys）や homocysteine（Hcy）を作用させた場合にも僅かに光音響信号が増大した。Cys の細胞内濃度は 30～200 μM であるのに対し、GSH の細胞内濃度は 1～10 mM である。このことから Cys や Hcy がイメージングに与える影響は小さいと考えられる。

GSH が過剰発現することが知られているヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 と GSH の発現量が低いヒト胎児腎細胞 HEK293 に対して **ox-NiPc-PEG** を作用させ、光音響信号強度の変化を測定した（図 4b）。A549 に **ox-NiPc-PEG** を作用させた場合、HEK293 の場合と比較して光音響信号強度が 4.6 倍となり、高いがん選択性を示した。チオール阻害剤 *N*-ethylmaleimide（NEM）による阻害効果も確認した。

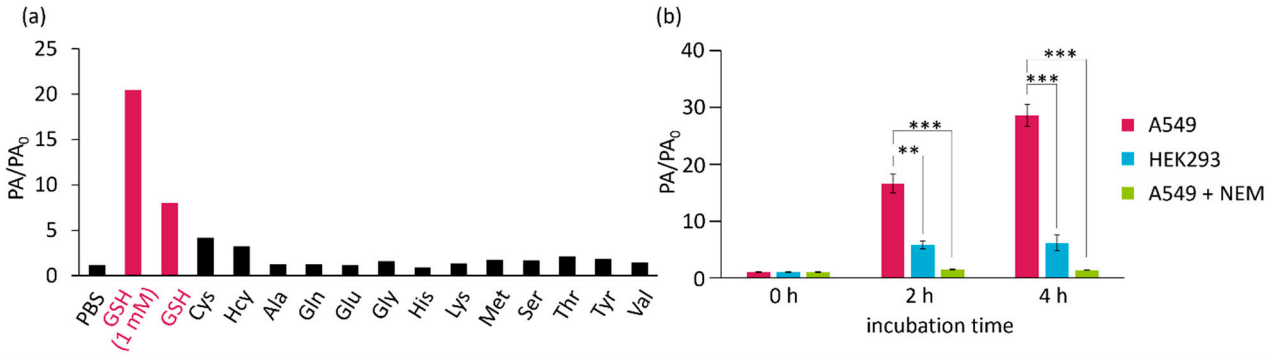


図 4. **ox-NiPc-PEG** の生体内チオールに対する応答性評価

a) **ox-NiPc-PEG** に GSH および各種アミノ酸を作用させた際の光音響信号強度 PA の変化。PA_0 は作用させた直後の信号強度。

b) **ox-NiPc-PEG** を A549 細胞もしくは HEK293 細胞に作用させた際の光音響信号強度の変化。NEM：*N*-ethylmaleimide。**p＜0.01、***p＜0.001（Two-tailed Student's t-test）。

3. ox-NiPc-PEG による内因性生体内チオールの検出、光音響造影剤としての機能評価

右脚に A549 を移植した担癌マウスに対して **ox-NiPc-PEG** を腫瘍に直接投与し、腫瘍における光音響信号強度の変化を測定した（図 5）。右脚の腫瘍に対して生理食塩水（30 μL）を注射し、その 30 分後に **ox-NiPc-PEG**（50 μM、60 μL）を腫瘍に注射した（NEM（−）、A549（＋）と表記）。同じマウスの左脚の筋肉に対して生理食塩水を注射し、その 30 分後に **ox-NiPc-PEG** を同所に注射した（NEM（−）、A549（−）と表記）。また、別のマウスの右脚の腫瘍に対して NEM（2.0 mM、30 μL）を注射し、その 30 分後に **ox-NiPc-PEG** を腫瘍に注射した（NEM（＋）、A549（＋）と表記）。それぞれの注射箇所の光音響信号強度の経時変化を測定した。

投与前の像では、マウスの血液に含まれるヘモグロビンに由来すると考えられる光音響信号が血管様にバックグラウンドシグナルとして観測された。**ox-NiPc-PEG** を注射する前の光音響信号強度と比較すると、注射後 6 時間まで NEM（−）、A549（＋）の場合に有意に光音響信号強度が増大した。また、NEM（−）、A549（−）や NEM（＋）、A549（＋）の場合には注射箇所の光音響信号強度には有意差が確認されず、腫瘍特異的に光音響信号が増大したと言える。これらを踏まえ、**ox-NiPc-PEG** は生体内で GSH が過剰発現するがん細胞を可視化する光音響イメージング用造影剤として利用できることが示された。

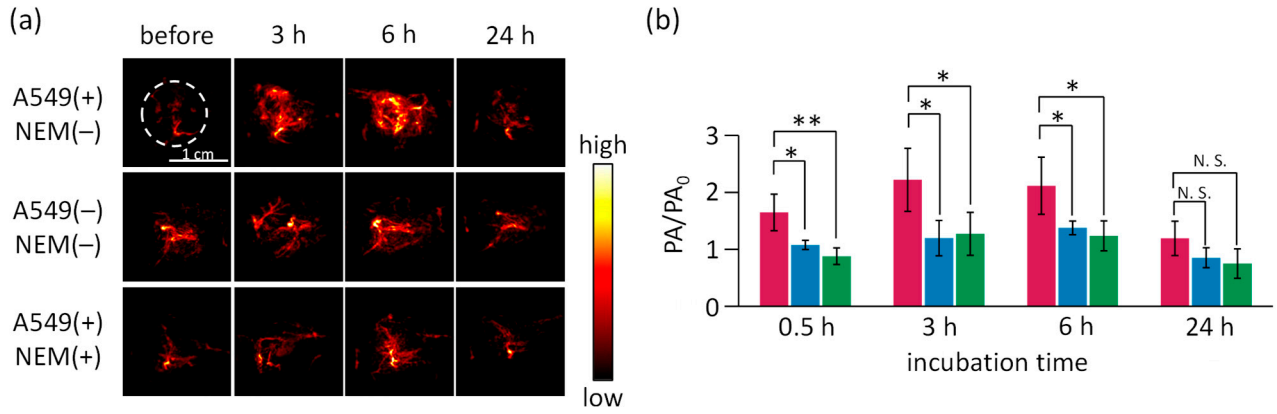


図 5. **ox-NiPc-PEG** を用いる光音響腫瘍イメージング

a）**ox-NiPc-PEG** を投与した腫瘍もしくは筋肉部位の光音響イメージング像。

b）**ox-NiPc-PEG** を投与した腫瘍もしくは筋肉部位の光音響信号強度の経時変化。赤：A549（＋）、NEM（−）、青：A549（−）、NEM（＋）、緑：A549（＋）、NEM（＋）。*p＜0.05、**p＜0.01（Two-tailed Student's t-test）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院工学研究科物質エネルギー化学専攻大江研究室の大江浩一教授、Huiying Mu 助教、野北康平氏、菅原嵩弥氏、京都大学大学院生命科学研究科高次生命科学専攻ゲノム生物学講座の原田浩教授、小林稔助教である。

文　献

1） Weber J. Beard P. C. Bohndiek S. E. Contrast agents for molecular photoacoustic imaging. Nat Methods. 2016 Jul 28;13(8):639-50. doi: 10.1038/nmeth.3929. PMID: 27467727 DOI: 10.1038/nmeth.3929.

2） Li D. Cai S. Wang P. Cheng H. Cheng B. Zhang Y. Innovative Design Strategies Advance Biomedical Applications of Phthalocyanines. Adv Healthc Mater. 2023 Sep;12(22):e2300263. doi: 10.1002/adhm.202300263. Epub 2023 May 16. PMID: 37039069 DOI: 10.1002/adhm.202300263.

3) Li X. Park E.-Y. Kang Y. Kwon N. Yang M. Lee S. Kim W. J. Kim C. Yoon J. Supramolecular Phthalocyanine Assemblies for Improved Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. Angew Chem Int Ed Engl. 2020 May 25;59(22):8630-8634. doi: 10.1002/anie.201916147. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32077201 DOI: 10.1002/anie.201916147.
4) Miki K. Imaizumi N. Nogita K. Oe M. Mu H. Huo W. Harada H. Ohe K. MMP-2-Activatable Photoacoustic Tumor Imaging Probes Based on Al- and Si-Naphthalocyanines. Bioconjug Chem. 2021 Aug 18;32(8):1773-1781. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00266. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34167292 DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00266.
5) Kikukawa Y. Fukuda T. Fuyuhiro A. Ishikawa N. Kobayashi N. Facile one-pot preparation of thermally and photochemically convertible soluble precursors of copper phthalocyanine and naphthalocyanine. Chem Commun. 2011 Aug 14;47(30):8518-20. doi: 10.1039/c1cc12970h. Epub 2011 Jul 1. PMID: 21725534 DOI: 10.1039/c1cc12970h.
6) Nogita K. Sugahara T. Miki K. Mu H. Kobayashi M. Harada H. Ohe K. A reductively convertible nickel phthalocyanine precursor as a biological thiol-responsive turn-on photoacoustic contrast agent. Chem Commun. 2024 Feb 1;60(11):1472-75. Epub 2006 Aug 10. PMID: 38224167 DOI: 10.1039/d3cc05628g