

新しいリンパ系イメージング剤としての インドシアニンググリーン標識ヒアルロン酸誘導体の開発

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

インドシアニンググリーン (ICG) は人体への投与が認められている暗緑青色の化合物であり、血漿中の蛋白質と結合して近赤外領域での蛍光を発することが知られている。人体の皮膚は近赤外光を通しやすい性質を有しており、臨床では近年この性質を応用した特殊な赤外観察カメラ (PhotoDynamic Eye : PDE 浜松ホトニクス, 日本) によるリンパ管造影法やセンチネルリンパ節生検などで多くの臨床応用例が報告されている。しかし、ICG 自体は少なからず毒性をもつこと、体内では ICG はタンパク質と非特異的に相互作用してしまうこと、その結果としての蛍光強度が比較的低いことなどの問題点がある。本研究ではこれらの問題を解決するために、ICG をドラッグデリバリーシステム (DDS) 修飾することを考え、ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体を作製した。用いる高分子材料として、リンパ系に効率良く分布する可能性の高いヒアルロン酸を取り上げた。また、ICG はタンパク質と相互作用する性質があるため、臨床応用が可能なタンパク質としてゼラチンを取り上げ、ゼラチンをヒアルロン酸に導入することを考えた。得られた複合体の物性とマウス足底部皮下に注射した場合の下肢におけるリンパ移行性について、ICG 単体と比較検討した。

【材料と方法】

1. ヒアルロン酸の熱加水分解：ヒアルロン酸を熱加水分解する際に、加熱時間を変化させることで平均分子量が 18,000 と 9,000 のヒアルロン酸を得た。
2. ゼラチングラフト化ヒアルロン酸の合成：ゼラチンは、分子量 3,100 (PI=8) のものを使用し、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES), 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC), N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を用いたカルボキシル基活性化法により、ゼラチンをヒアルロン酸に導入し、得られた生成物 (gelatin-HA(9)および gelatin-HA(18)) について、タンパク質定量キットをもちいてゼラチンの導入率を検討した。
3. ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体の調整：各ゼラチングラフト化ヒアルロン酸 (gelatin-HA(9)および gelatin-HA(18)) とインドシアニンググリーン (ICG) 混合し、ヒアルロン酸の分子量が異なる 2 種類の ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体溶液を得た (ICG-gelatin-HA(9)および ICG-gelatin-HA(18))。
4. ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体の粒子径および表面電位の測定：3. で得られた各複合体について、動的光散乱光度計による粒子の大きさの測定と、電気泳動光散乱光度計による表面電位 (ζ -potential) の測定を行った。
5. 水晶共振子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance) 法による分子間相互作用の測定と解離定数の解析：ゼラチンおよびアルブミンと、ICG との分子間相互作用を、分子間相互作用測定 QCM 装置を用いて測定した。また、アルブミンに対する ICG, ヒアルロン酸, および当複合体 (ICG-gelatin-HA(9)) との分子間相互作用の測定も行った。
6. 吸光スペクトルの測定：3. で得られた各複合体溶液について、分光光度計を用いて、500 ~ 900 nm の範囲で吸光スペクトルを測定した。なお、比較対象として ICG 溶液の吸光スペク

トルを測定した。同様に、ウシ血清アルブミン存在下で測定を行った。

7. マウス：8週齢のマウス（ddY, 雄）を用いた。

8. 近赤外観察カメラによる、マウス下肢における本複合体の動態の観察：3. で得られた本複合体溶液を、全身麻酔下にマウス右後肢足底皮下に注射し、右膝窩リンパ節における蛍光強度の経時的な変化を、近赤外観察カメラを用いて観察した。対照群には、ICG 溶液を注射した。

9. マウス膝窩リンパ節における病理組織学的検討：8. と同様に調整した ICG, ICG-gelatin-HA(9)および ICG-gelatin-HA(18)の各溶液をマウス右後肢足底に注射し、30 分後に安楽死させ、右膝窩リンパ節を摘出し、切片標本を作製して蛍光顕微鏡で観察した。

10. 免疫組織化学染色：8. で得た膝窩リンパ節の一部を、同様に切片標本を作製して、免疫組織化学染色を施行した。

【結果および考察】

ICG とゼラチングラフト化ヒアルロン酸による複合体は、水溶液中では ICG とゼラチンとの相互作用により、ICG を含むゼラチングラフト化ヒアルロン酸分子が複数本集まり、ある大きさをもった粒子を形成していると考えられる。本実験では、ICG に比べて、ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体のアルブミンに対する相互作用力が減少している。しかしながら、ヒアルロン酸とアルブミンとの場合に比べて Kd 値は小さい。これらのことから、複合体粒子表面には少なからずヒアルロン酸が存在していると考えられる。複合体の表面電位が同じであることも、複合体表面にヒアルロン酸が存在することを示唆している。以上のことから、ゼラチングラフト化ヒアルロン酸は ICG とゼラチン部分を介して相互作用し、ICG を内部に含み、表面にヒアルロン酸鎖の存在するナノ DDS を得ることができる。これにより、ICG の体内でのタンパク質との非特異的相互作用が抑制され、かつ表面にヒアルロン酸が存在することで、前述したヒアルロン酸の特徴を活かせる投与形態となると考えられる。

ICG 水溶液における吸光スペクトル曲線は、その濃度にもよるが一般に、ICG 分子の二量体による吸収に対応する 700 nm 付近のピークと、ICG 分子の単量体による吸収に対応する 800 nm 付近の 2 つピークをもつことが知られている。本実験では、ICG のゼラチングラフト化ヒアルロン酸による複合体化により、700 nm 付近のピークがなくなり平坦化しつつ、900 nm までの長波長域にまたがる吸収帯が現れた。このことは、ICG が複合体化することで ICG 分子が単量体の状態で存在している割合が増えたことを示していると考えられる。また、ICG が血漿タンパク等と結合することにより 800 nm 付近の励起光による蛍光強度が上昇するのは、ICG が血漿タンパク等と結合すると ICG 分子が単量体の状態で存在する割合が増え、励起される ICG 単量体の量が増加することによるものと考えられる。これらのことから、本研究ではゼラチングラフト化ヒアルロン酸により複合体化することで ICG のもつ蛍光強度を増大させることができたと考えられた。

体内動態の実験では、複合体投与群において、蛍光強度のピーク値を示す時間とリンパ節から消退するまでの時間は ICG 単体投与群と変わらないものの、ピーク時から注射後 2 時間程度まで最大で 2 倍程度の蛍光強度の増加が得られた。全ての実験結果を考慮すると、本複合体の場合には、血漿タンパクと相互作用せず、複合体に取り込まれた状態でリンパ節に移動する ICG 分子の量が、ICG 単体投与群よりも多いことが理由であると考えられる。なお、蛍光強度が最大となる時間変化パターンは変わらないものの、注射後 2 時間までは ICG 単体投与群の 2 倍近くの蛍光強度が持続している。この結果はセンチネルリンパ節生検において臨床的には充分な持続時間である。また、蛍光強度の増加により、将来的には ICG としての投与量を減らすことも可能になり、DDS 化による利点は得られていると考えられる。

リンパ管内皮細胞は、LYVE-1 をはじめとする数種類のヒアルロン酸レセプターを発現していることが明らかにされてきており、ヒアルロン酸との親和性が高いと考えられている。分子内にアミノ基を持ち、ICG と同じく近赤外領域での蛍光を発する、ICG 類似物質にヒアルロン酸をアミド結合により修飾したリンパ系を標的とした DDS の報告では、ヒアルロン酸のリンパ系への親和性を示しており、本複合体が効率よくリンパ系に分布する可能性が高いと考える。

【結語】

本研究では、インドシアニングリーン (ICG) を、ゼラチンを化学導入したヒアルロン酸誘導体と、ゼラチンを介して結合させることで ICG を複合体化した。得られた複合体に関して、

その物性とマウス足底部皮下に注射した場合の下肢におけるリンパ移行性を, ICG 単体と比較検討した. その結果, 得られた複合体は ICG 単体よりも高い蛍光強度をもち, 効率よくリンパ系に分布する可能性が高いことが示唆された.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 有 平
副 査 教 授 久 下 裕 司
副 査 教 授 松 居 喜 郎

学 位 論 文 題 名

新しいリンパ系イメージング剤としての インドシアニンググリーン標識ヒアルロン酸誘導体の開発

インドシアニンググリーン (ICG) は人体への投与が認められている暗緑青色の化合物であり、血漿中の蛋白質と結合して近赤外領域での蛍光を発することが知られている。人体の皮膚は近赤外光を通しやすい性質を有しており、臨床では近年この性質を応用した特殊な赤外観察カメラによるリンパ管造影法やセンチネルリンパ節生検などで多くの臨床応用例が報告されている。しかし、ICG 自体は少なからず毒性をもつこと、体内では ICG はタンパク質と非特異的に相互作用してしまうこと、その結果としての蛍光強度が比較的低いことなどの問題点があげられる。本研究ではこれらの問題を解決するために、ICG をドラッグデリバリーシステム (DDS) 修飾することを考え、ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体を作製した。用いる高分子材料として、リンパ系に効率良く分布する可能性の高いヒアルロン酸を取り上げた。また、ICG はタンパク質と相互作用する性質があるため、臨床応用が可能なタンパク質としてゼラチンを取り上げ、ゼラチンをヒアルロン酸に導入することを考えた。得られた複合体の物性と、マウス足底部皮下に注射した場合の下肢におけるリンパ移行性について、ICG 単体と比較検討した。

ICG とゼラチングラフト化ヒアルロン酸による複合体は、水溶液中では ICG とゼラチンとの相互作用により、ICG を含むゼラチングラフト化ヒアルロン酸分子が複数本集まり、ある大きさをもった粒子を形成していると考えられる。そこで、得られた複合体粒子の物性について検討を行ったところ、複合体粒子の大きさと表面電位に、ヒアルロン酸の分子量による差は認めなかった。また、分子間相互作用に関する実験では、ICG に比べて、ICG-ゼラチン-ヒアルロン酸複合体のアルブミンに対する相互作用力が減少していたが、その現象の程度は、ヒアルロン酸とアルブミンとの場合までは低下していなかった。これらのことから、複合体粒子表面には少なくともある程度のヒアルロン酸が存在していると考えられた。すなわち、ICG の体内でのタンパク質との非特異的相互作用が抑制され、かつ表面にヒアルロン酸が存在することで、前述したヒアルロン酸の特徴を活かせる投与形態となると考えられた。また、複合体の吸光スペクトル分析では、ICG が複合体化により ICG 分子が単量体の状態で存在している割合が増えたことを示唆する結果が得られた。ここで、ICG が血漿タンパク等と結合することにより 800 nm 付近の励起光による蛍光強度が上昇するのは、ICG が血漿タンパク等と結合すると ICG 分子が単量体の状態で存在する割合が増え、励起される ICG 単量体の量が増加することによるものと考えられることから、本研究ではゼラチングラフト化ヒアルロン酸により複合体化することで ICG のもつ蛍光強度を増大させることができたと考えられた。

マウス下肢におけるリンパ移行性に関する実験では、複合体投与群において、蛍光強度のピーク値を示す時間とリンパ節から消退するまでの時間は ICG 単体投与群と変わらないも

の、ピーク時から注射後 2 時間程度まで最大で 2 倍程度の蛍光強度の増加が得られた。この結果はセンチネルリンパ節生検において臨床的には十分な持続時間であると考えられる。

リンパ管内皮細胞は、LYVE-1 をはじめとする数種類のヒアルロン酸レセプターを発現していることが明らかにされてきており、ヒアルロン酸との親和性が高いと考えられている。分子内にアミノ基を持ち、ICG と同じく近赤外領域での蛍光を発する、ICG 類似物質にヒアルロン酸をアミド結合により修飾したリンパ系を標的とした DDS の報告では、ヒアルロン酸のリンパ系への親和性を示しており、本複合体が効率よくリンパ系に分布する可能性が高いと考える。

公開発表にあたり、副査久下裕司教授から、1) 粒子径とリンパ移行性に関する検討について、2) 対照群としてのゼラチン-ICG 複合体との比較実験の有無についての質問があった。次いで、副査松居喜郎教授から、1) 近赤外蛍光観察装置の改良に対する、ICG の修飾による蛍光強度の増大の必要性、2) 他のヒアルロン酸を材料とした DDS の報告と本研究との相違点と優位性、3) リンパ系イメージング以外の分野への応用の可能性について質問とコメントがあった。最後に、主査山本有平教授より、1) 抗癌剤など他の薬剤への応用の可能性について、2) 臨床応用への今後の展望についての質問とコメントがあった。いずれの質問に対しても申請者は自らの研究内容と文献を引用し、妥当な回答をした。

この論文は、ICG の持つタンパク質への非特異的相互作用を利用して、ICG をヒアルロン酸で DDS 修飾することで複合体を形成し、ICG のタンパク質への非特異的相互作用を減少させつつ、蛍光強度を増加させることに成功しており、また、生体内での蛍光強度の増加と、持続時間の延長を可能にした点で高く評価できる。今後、リンパ系イメージング剤だけではなく、リンパ系を標的とした新たな DDS の開発へつながることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽と取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。