

## 研究成果報告（概要）

## 1. 研究課題

和文	超音響波を発生する腫瘍特異的な可視化剤の開拓
英文	Development of Tumor-Specific Contrast Agents Generating Photoacoustic Signal

## 2. 申請者名(代表研究者)

氏名 三木 康嗣	ローマ字表記 Koji Miki
所属大学・機関名 京都大学	英訳表記 Kyoto University
研究科専攻名・部課名等 工学研究科 物質エネルギー化学専攻	英訳表記 Department of Energy and Hydrocarbon Chemistry, Graduate School of Engineering
役職名 准教授	英訳表記 Associate Professor

## 3. 共同研究者（下段 英訳表記）

氏名	所属機関名・研究科等名・役職
(氏名) 小島 健太郎	京都大学大学院工学研究科・修士課程2回生
(英訳表記) Kentaro Kojima	(英訳表記) Kyoto University, M2
(氏名) 大江 浩一	京都大学大学院工学研究科・教授
(英訳表記) Kouichi Ohe	(英訳表記) Kyoto University, Professor
(氏名) 原田 浩	京都大学放射線生物研究センター・教授
(英訳表記) Hiroshi Harada	(英訳表記) Kyoto University, Professor

4.研究について

**研究目的**

腫瘍イメージングは、がんの早期発見を可能にする技術として注目される。特に、色素分子の光励起を利用した可視化に関する装置や材料開発に多くの研究者が取り組んでいる。しかし、光照射により常に蛍光を発する色素を生体イメージング用の造影剤として用いると、代謝にかかわる臓器や血液中に造影剤が滞留した場合、バックグラウンドノイズが強くなり、コントラストの悪い像を与える。一方、目的患部に到達した造影剤のみがシグナルを出せば、コントラストのよい像を与えたと考えられているものの(図1)、生体透過性の良い近赤外色素を用いてこれを達成した例はほとんど無い。本研究では、pHの変化にตอบสนองし、腫瘍でのみ発光する近赤外色素を創製することを目的とした。

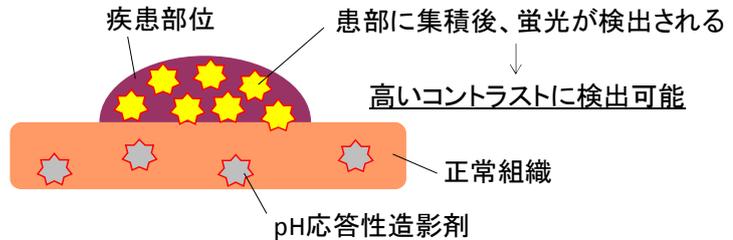


図1. pH 応答性造影剤を用いる分子イメージング。

**成果**

近赤外光を吸収し蛍光を発する血管造影剤 インドシアニングリーン (ICG、図2) は、分子内に求電子的なイミニウムカチオン部位を有している。分子内の適当な位置に求核剤を配することで、この求核剤がイミニウムカチオン部位に環化付加した閉環構造を有する色素が得られると想定した。ICG 色素骨格中のベンゾインドールの窒素原子上に 3-aminopropyl 基、3-hydroxypropyl 基、3-mercaptopropyl 基を結合させることで、pH 応答性シアニン系色素 **1a-c** を開発した(図3)。

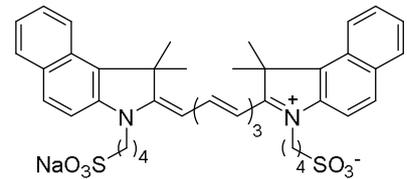


図2. 市販の血管造影剤インドシアニンググリーン (ICG)。

(なお、3-hydroxypropyl 基を持つ類似の色素は市販されており、DNA のラベル化などにも利用されているが、pH 応答性を考慮せず用いられている。本成果において pH 応答性を明らかにしたことは大変有意義であると考えられる。)

この色素は、中性および塩基性条件では非発光性の閉環体 **1'**へと平衡が偏り、シアニン系色素特有の吸発光挙動を示さない。一方、酸性条件下では求核部位がプロトン化され、発光性の開環体 **1**へと平衡が偏る。色素 **1a-c** の pH 応答領域は異なっており(図4a)、おのの求核部位が形成する二級アミン、エーテル、チオエーテルの塩基性度に依存することがわかった。特に、**1b** および **1c** は、pH 5-7 および pH 4-6 で応答することから、腫瘍組織の弱酸性環境を認識できると考えられる。蛍光発光の pH 依存性は、吸光度の pH 応答領域と比較し、やや塩基性側にシフトすることがわかった(図4b)。一方、色素 **1c** について、酸および塩基の添加により pH 応答性の可逆性を確認したところ、色素の吸光度、発光強度が大きく損なわれることはなかった(図4c)。

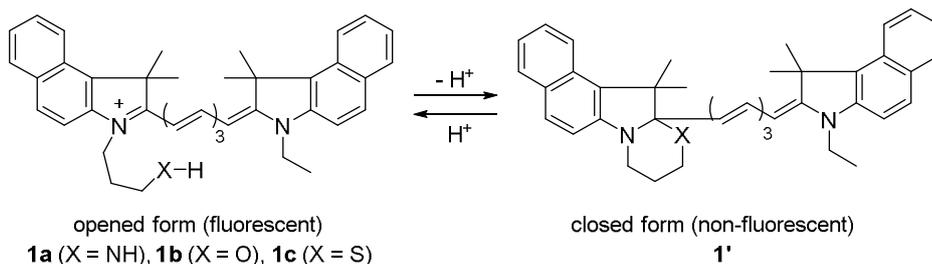


図3. pH 応答性近赤外色素. 低 pH において非発光性の **1'**から発光性の **1**へと平衡が偏る。

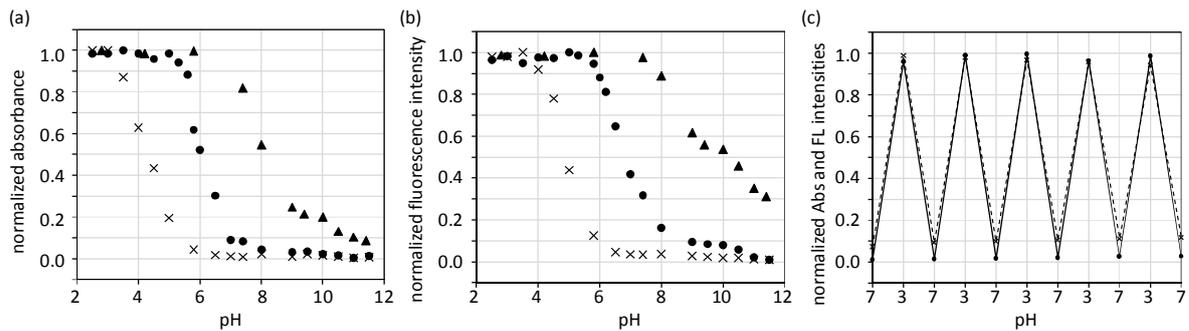


図 4. **1a** (▲)、**1b** (●) および **1c** (×) の緩衝溶液中での (a) 吸光度変化 (780 nm) および (b) 蛍光強度変化 (780 nm 励起、820 nm 検出). (c) **1c** の pH 応答性の可逆性.

酸性条件で応答する **1b'** と **1c'** を HeLa 細胞に投与し、エンドサイトーシスによる細胞内への取り込みとエンドソーム内の低 pH 環境に対する応答性を調査した。エンドサイトーシスによる取り込みが起こりにくい 4 °C において細胞を培養したところ、市販の ICG、**1b'**、**1c'** ともに蛍光発光量に大きな変化はなかった (図 5a)。色素はいずれも細胞に取り込まれず、**1b'** や **1c'** においては開環反応が起こらなかったことを意味している。一方、37 °C で培養したところ、ICG では 4 °C と同様に蛍光量にほとんど変化は観測されなかったが、**1b'** と **1c'** では、顕著な蛍光量の増大が確認された (図 5b)。エンドサイトーシスにより **1b'** および **1c'** は細胞内に取り込まれ、酸性環境のエンドソーム内で発光性 **1'** へと変化したことを意味する。細胞をリン酸緩衝液で洗浄したあと、細胞の蛍光発光量を定量したところ、いずれも 37 °C で培養した場合、蛍光量が増大した (図 5c,d)。このように開発した色素が細胞存在下でも pH の変化に応答して機能することを明らかにした。

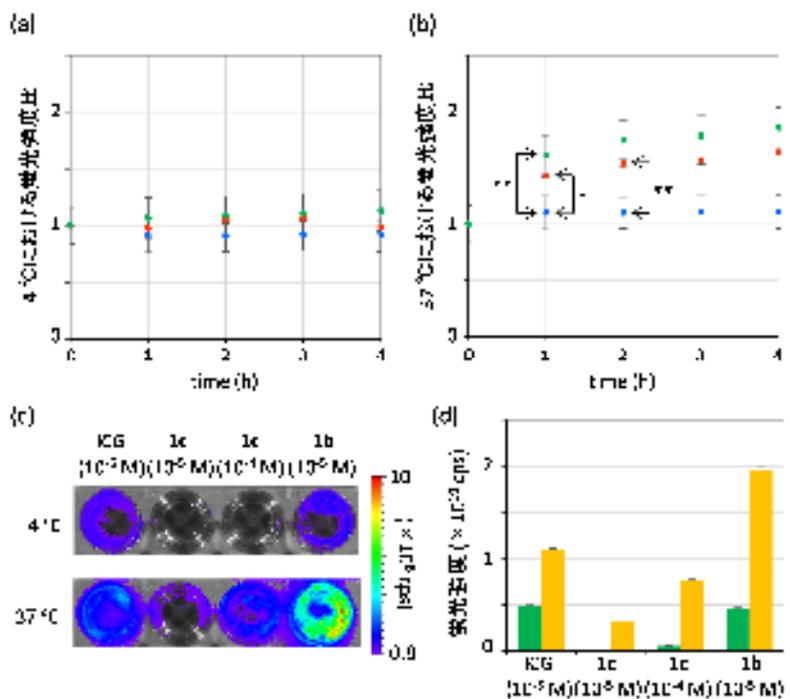


図 5. **1a** (a) 4 °C および (b) 37 °C において市販の ICG (青)、**1b** (緑)、**1c** (赤) を含む培地中 HeLa 細胞を培養した際の、培地を含む細胞の蛍光発光強度の時間変化. 洗浄後の細胞の (c) 蛍光発光像および (d) 蛍光発光強度 (緑 : 4 °C, 黄色 : 37 °C).

### 今後の展望

本課題では、細胞共存下でも機能する pH 応答性近赤外色素を開発した。高分子との複合化により腫瘍特異的な蓄積を達成することで、腫瘍のみ可視化できる造影剤の開発が可能であると考えられる。