

令和元年6月15日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04128

研究課題名(和文) 色素ラジカル - 光励起多重項の自在制御に基づいた光機能分子の創製

研究課題名(英文) Development of Photofunctional Molecules Based on Flexible Controls of the Excited Multiplet States of Chromophore-Radical Systems

研究代表者

石井 和之 (ISHII, Kazuyuki)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：20282022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビタミンC検出用蛍光プローブを新規に開発し、静脈から投与された、マウス中のビタミンCをイメージングすることに初めて成功した。二つのニトロキシドラジカルが結合したフタロシアニンR2cを血清アルブミン二量体で包むことにより、“ビタミンCとの効率良い反応(従来比100倍以上)”と“他の様々な生体内酸化還元物質からの保護”を両立させている。蛍光プローブをマウスに注射した後、ビタミンCを注射すると、数分以内に肝臓、心臓、肺および胆嚢周囲の蛍光が増大した。これより、静脈から投与したビタミンCが、活性な状態で、これらの臓器に輸送されたことをリアルタイムで観測することに初めて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、投与されたビタミンCが活性な状態でどの臓器に輸送されるかを知ることができるようになるため、高濃度ビタミンC療法への有用な知見が期待できるとともに、アルブミン二量体との複合化法は、蛍光プローブ開発における新たな分子設計指針として有用と考えられる。

本研究は、Scientific Reports誌に論文が掲載(2018, 8, 1560)され、日本経済新聞、日経産業新聞、海外web記事等に紹介された。社会的Impact FactorであるAltmetricは93となり、本誌Top 10 in Biochemistry and Molecular Biologyにも選出された。

研究成果の概要(英文)：After a groundbreaking study demonstrated that a high dose of ascorbic acid selectively kills cancer cells, the compound has been tested in the clinic against various forms of cancers, with some success. However, in vivo tracing of intravenously injected ascorbic acid has not been achieved. In this study, we successfully imaged ascorbic acid intravenously injected into mice based on the discovery of a novel, highly sensitive, and appropriately selective fluorescent probe consisting of silicon phthalocyanine and two nitroxide radicals, i.e., R2c. The radicals in this R2c were encapsulated in dimeric bovine serum albumin, and the sensitivity was >100-fold higher than those of other R2c-based probes. Ascorbic acid intravenously injected into mice was efficiently transported to the liver, heart, lung, and cholecyst. The present results provide opportunities to advance the use of ascorbic acid as cancer therapy.

研究分野：光化学・スピン化学・錯体化学

キーワード：色素 ラジカル 光励起多重項 光機能

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

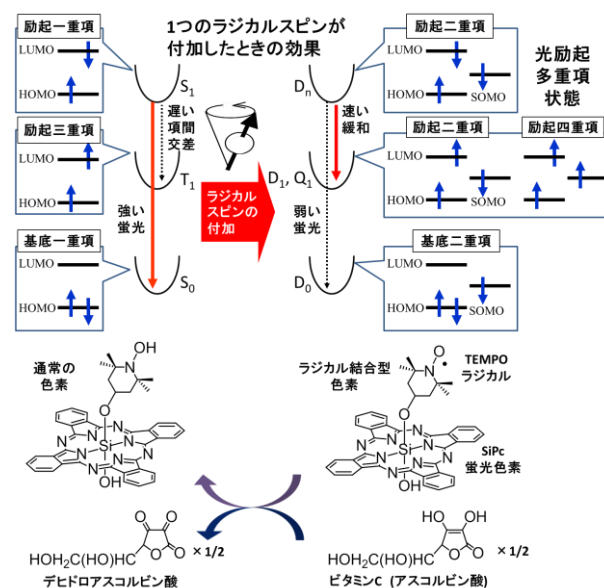
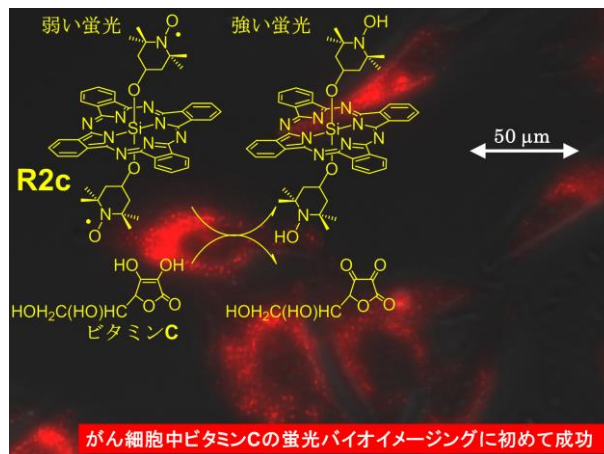
1. 研究開始当初の背景

(1) **励起状態における分子磁性化学** 新しい光技術・光機能を実現する切り口として、光と分子磁性のカップリングは近年注目されている。例えば、励起三重項からの燐光を利用した有機 EL 材料 (Baldo et al., *Nature*, **403**, 750 (2000).)、様々な光誘起磁性研究 (Sato et al., *Science*, **272**, 704 (1996).) などが成果を挙げており、その発展が期待されている。これまでに研究代表者石井らは、安定ニトロキシドラジカル TEMPO と励起三重項色素から構成される励起二重項や励起四重項といった“**光励起多重項状態**”を、**世界に先駆けて時間分解電子スピン共鳴 (ESR) により見出し** (*J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 13079 (1996).)、そのスピンの科学について精力的に研究を展開してきた (磁氣的性質の光制御・光反応の制御・光線力学的がん治療の制御)。

(2) **光励起多重項状態を利用したビタミン C 検出用蛍光プローブの開発** Chen らが、“薬理的濃度のアスコルビン酸 (ビタミン C) はがん細胞を選択的に殺す” という論文 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13604 (2005).) を

報告して以降、ビタミン C 高濃度投与によるがん治療が注目されている。そのため、蛍光バイオイメージング等によるビタミン C の機能解明が望まれている。近年研究代表者石井らは、2 つの TEMPO ラジカルと結合したケイ素フタロシアニン (SiPc) 蛍光分子 R2c を用いて、HeLa 細胞中のビタミン C をバイオイメージングすることに成功している (右図、*Chem. Commun.*, **47**, 4932 (2011))。本蛍光プローブの特長は、以下の 3 つが挙げられる。

① 対電子スピンの磁氣的性質の利用：通常の色素では遅い $S_1 \rightarrow T_1$ 項間交差が、ラジカルスピンの付加により、励起二重項間の速い緩和 ($D_n \rightarrow D_1$) へと変換されるため、その蛍光量子収率は非常に小さい。一方、ビタミン C と酸化還元反応後には、ラジカルスピンを失うため、SiPc は強い蛍光を発する。② リポソームによる TEMPO ラジカルの保護：疎水性 R2c を両親媒性リン脂質二重膜であるリポソームに取り込ませることで、様々な細胞内酸化還元物質との非選択的反応を阻害し、ビタミン C との選択的反応を達成している。③ 赤色光の利用：SiPc 蛍光色素の励起光と蛍光の波長は、700nm 付近 (赤色光) であり、生体組織透過性が高い。そのため、マウス等の *In Vivo* バイオイメージングに適している。



2. 研究の目的

本研究では、ラジカルの分子軌道 SOMO を制御することで、その励起多重項状態の学理を明らかにし、その学理に基づいて、①植物・果物におけるビタミン C バイオイメージングを可能とする近赤外光用蛍光プローブの開発、②強く発色するラジカル色素を用いた発色変化によるビタミン C 検出法の開発、③ラジカルスピン環境の制御により、高感度化・応答高速化されたビタミン C 検出用蛍光プローブの開発、及び *In Vivo* ビタミン C バイオイメージング等の様々な検出法の開発を目的とする。

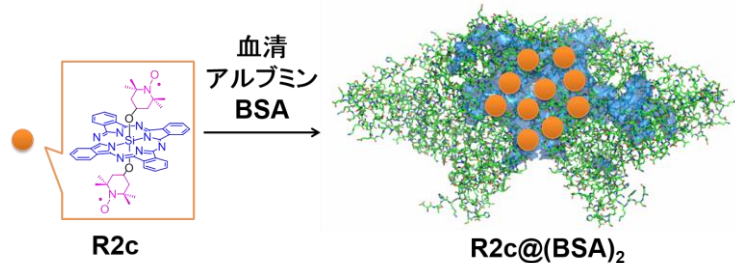
3. 研究の方法

安定ラジカルとしては、フタロシアニンに結合した TEMPO ラジカル、ポルフィリン二量体、ニトロニルニトロキシドを用いた。実験の詳細は、発表論文を参照されたい。

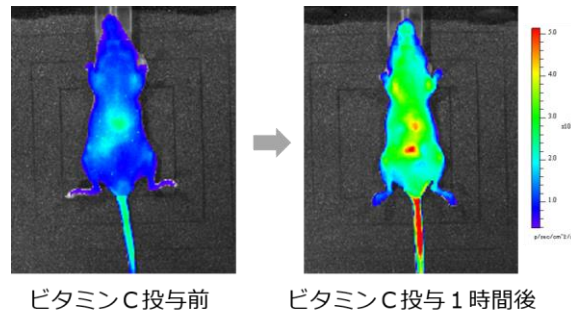
4. 研究成果

① ラジカルスピンの環境制御

リポソームに疎水性蛍光プローブ R2c を取り込んだ場合、R2c はリポソーム内側の疎水性領域に分布するため、水溶性物質との反応からラジカルを保護する一方、疎水性領域まで入り込んだビタミン C とのみ反応するため、反応性も低下してしまう。そこで、血液中のタンパク質 BSA 二量体と R2c を選択的に複合させた新規ビタミン C 検出用蛍光プローブ (R2c@(BSA)₂) を開発し、①BSA 二量体は R2c ラジカルを保護すること、②R2c@(BSA)₂ は 1 μ M のビタミン C でも検出可能であること (リポソーマル R2c に比べて 100 倍以上低濃度) 等を見出した。ビタミン C と R2c@(BSA)₂ の反応性は、pH 依存性や温度依存性の観点から調べ、BSA の構造変化と比較された。さらに、生体内レドックス分子である過酸化水素やグルタチオンなどと比較することで、ビタミン C と R2c@(BSA)₂ の反応物質選択性が高いこともわかった。



R2c@(BSA)₂ を用いて、マウス中におけるビタミン C の蛍光バイオイメージングを行い、マウス中における活性なビタミン C のイメージングに初めて成功した。この結果は、マウス内のビタミン C 濃度を測定して比較した。高濃度ビタミン C 療法の発展や新規蛍光プローブの設計において有用な知見になり得る。本成果は、Scientific Reports に論文が掲載されるとともに、高濃度ビタミン C 療法との関連から重要な成果であるため、日本経済新聞電子版や海外の Web メディアなどで紹介された。



② 近赤外吸収・発光性分子の設計指針

(1) π 共役系の拡張：アントラセン環を有するケイ素アンソラコサイアニン (SiAc) を新規に合成した。金属 Pc 類縁体と同様に、SiAc では、近赤外領域の 870nm 付近にシャープな Q 吸収帯、880nm 付近にシャープな発光が観測された。以上のように、近赤外領域にシャープかつ強い Q 吸収帯を示し、発光を示す分子の合成に成功した。さらに、テトラセン環を有するケイ素テトラコサイアニン (SiTc) の合成を試みた。SiTc は、空気中では不安定な化合物であったが、SiTc 骨格形成を示す Mass スペクトル、吸収スペクトルを得ることができた。

(2) 1060 nm 付近に発光を有するネオジムイオン Nd³⁺ イオンの利用：Nd³⁺ の 1060 nm 付近の発光が、励起状態 (⁴F_{7/2}) から励起状態 (⁴I_{11/2}) の遷移に相当するため、S₁-T₁ 分裂が小さい積層型ポルフィリン錯体においても、近赤外光励起による Nd³⁺ 発光の利用は困難であることを実験的に明らかとした。

③ SOMO 由来の強い発色を示すラジカル色素

SOMO 由来の強い発色を示すラジカル色素 (ニトロニルニトロキシド誘導体、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジルラジカルなど) をシリカゲルに担持すると、ビタミン C などの抗酸化物質の水溶液と速やかに反応し、退色することが明らかとなった。この際、シリカゲル担持ラジカルは、窒素下、冷凍保存により、数ヶ月間安定性が保たれることが明らかとなった。本系は、簡便に抗酸化物質を検出・分析するために有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① M. Karasawa and K. Ishii “Magnetic Hysteresis of Molecular Faraday Effects of Phthalocyanine-Based Thin Films on Bi, Al-Substituted DyIG Substrates at Room Temperature and Demagnetization of the Ferrimagnetic Substrates by Photothermal Effects of

- Phthalocyanines" *J. Phys. Chem. C*, **120**, 21811-21817 (2016).
- ② S. Hattori, K. Akagawa, K. Kudo and K. Ishii "Determination of the Absolute Configuration of Side Chains of Basic Amino Acid Residues Using the Water-Soluble Porphyrin-Based Exciton Chirality Method" *J. Phys. Chem. B*, **120**, 10280-10287 (2016).
 - ③ S. Hattori, Y. Yamamoto, T. Miyatake and K. Ishii "Magneto-chiral dichroism measurements using a pulsed electromagnet" *Chem. Phys. Lett.*, **674**, 38-41 (2017).
 - ④ S. Hattori, S. Vandendriessche, G. Koeckelberghs, T. Verbiest and K. Ishii "Evaporation Rate-Based Selection of Supramolecular Chirality" *Chem. Commun.*, **53**, 3066-3069 (2017).
 - ⑤ K. Murata and K. Ishii "Near infra-red $S_0 \leftrightarrow T_1$ transitions of iridium(III) phthalocyanine: Degeneracy of the T_1 state evidenced by magnetic circular dichroism" *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2017**, 5103-5107 (2017).
 - ⑥ N. T. Hong Trang and K. Ishii "Photoelectrochemical oxygen reduction reactions using phthalocyanine-based thin films on an ITO electrode" *J. Phys. Chem. C*, **122**, 3539-3547 (2017).
 - ⑦ T. Yokoi, T. Otani and K. Ishii "*In vivo* fluorescence bioimaging of ascorbic acid in mice: Development of an efficient probe consisting of phthalocyanine, TEMPO, and albumin" *Scientific Reports*, **8**, 1560 (2018).
 - ⑧ M. Karasawa and K. Ishii "Pulsed laser induced heat transfer from phthalocyanine-based thin film to a Bi, Al-substituted DyIG substrate: photothermal demagnetization observed by magnetic circular dichroism and numerical analysis" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 12241-12247 (2018).
 - ⑨ M. Karasawa and K. Ishii "Transient absorption studies on photothermal energy transfer and heat dissipation: Phthalocyanine-based thin films on Bi, Al-substituted DyIG substrates" *Chem. Phys. Lett.*, **704**, 1-4 (2018).
 - ⑩ T. Yokoi and K. Ishii "Dependence of phthalocyanine-based fluorescence on albumin structure: A fluorescent probe for ascorbic acid" *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **364**, 1-5 (2018).
 - ⑪ T. Yokoi, S. Hattori and K. Ishii "Encapsulation of zinc phthalocyanine into bovine serum albumin aggregates" *J. Coord. Chem.*, **72**, 707-715 (2019).
 - ⑫ S. Hattori, S. Vandendriessche, T. Hirano, F. Sato, G. Koeckelberghs, T. Verbiest and K. Ishii "Molecular Power Spring: Circular Dichroism Inversion of Polythiophene Aggregates from Right-handed Helix to Left-Handed Helix" *J. Phys. Chem. B*, **123**, 2925-2929 (2019).
 - ⑬ K. Murata, H. Tanaka and K. Ishii "Electrochemical Reduction of CO_2 by a GasDiffusion Electrode Composed of *fac*-Re(diimine)(CO) $_3$ Cl and Carbon Nanotubes" *J. Phys. Chem. C*, **123**, 12073-12080 (2019).

[学会発表] (計 80 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：榎本恭子

ローマ字氏名：ENOMOTO, Kyoko

所属研究機関名：東京大学

部局名：生産技術研究所

職名：技術専門職員

研究者番号 (8桁)：50772711

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横井孝紀

ローマ字氏名：YOKOI, Takanori

研究協力者氏名：唐澤 正信

ローマ字氏名：KARASAWA, Masanobu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。