

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：55101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12813

研究課題名(和文) 光増感剤内包型アップコンバージョン粒子を活用した細胞深部がん治療の展開

研究課題名(英文) Development of Deep Cellular Cancer Therapy Using Photosensitizer-Encapsulated Upconversion Particles

研究代表者

梶間 由幸 (URUMA, YOSHIYUKI)

米子工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：70442457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：光増感剤含有アップコンバージョンナノ粒子は、粒子の核をなすY(イットリウム)、そしてアップコンバージョンを起こすYb(イッテルビウム)、Tm(ツリウム)を用いた。光増感剤として8-メトキシソラレン、フタロシアニンを用いた。ナノ粒子の調製法は、既存の方法によりNaYF₄核ナノ粒子を得た後、得られた粒子をエタノール、2M HCl溶液で処理した後、エタノールで余分な酸を洗浄した。さらに、粒子の水溶性及び生体適合性を高めるために粒子の表面をシリカでコーティングしTEMで測定した。得られた粒子を利用し細胞を用いた実験を行った。HeLa細胞、DLD-1において、顕著な細胞毒性を示すことが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の2人に1人は将来がんになると推測され、その内3人に1人は死亡すると言われる。本申請研究では、次世代のがん治療法として注目を集める光線力学療法の治療上の課題を解決し細胞深部でも適応できる技術にすることを目的とする。課題克服に向け鍵となるのは近赤外光線を可視光線に変換するアップコンバージョン技術とがん細胞である。我々は、ワールブルク効果に基づいた光増感剤の合成に成功しており、本申請研究ではUCN内部に、我々が開発した特異的にがん細胞への集積能をもつ光増感剤を内包させ、UCN表面には親水性、機能性を付与した細胞内動態特性を有する新規機能素子を調整した。

研究成果の概要(英文)：The photosensitizer-containing upconversion nanoparticles were made of Y (yttrium), which forms the nucleus of the particles, and Yb (ytterbium) and Tm (thulium), which cause upconversion. 8-methoxypsoralene and phthalocyanines were used as photosensitizers. The NaYF₄ nucleus nanoparticles were prepared by an existing method, and then the particles were treated with ethanol and 2M HCl solution, and the excess acid was washed out with ethanol. The surface of the particles was coated with silica to enhance their water solubility and biocompatibility, and TEM measured the results. Cell-based experiments were conducted using the obtained particles. The particles showed significant cytotoxicity in HeLa cells and DLD-1 cells.

研究分野：有機合成化学

キーワード：光増感剤 一重項活性酸素 低酸素 光線力学

1. 研究開始当初の背景

日本は高齢化社会を迎え、がんやアルツハイマー病といった難治性疾患の克服に対する社会的要請が強く新たな治療法の開発に対する期待は大きい。がん治療は外科的治療による腫瘍の切除、内科的治療による抗がん剤治療があった。前者の場合、患者への負担が大きいことから体力的な問題が存在し、後者の場合、重い副作用が課題であった。近年ではこれらの課題を解決すべく多くの研究が行われている。光線力学療法は光エネルギーを利用した次世代医療として注目されている。本治療は低侵襲的に極めて少ない副作用で実施できることから注目され臨床での実績もあり、且つ、臓器の温存が可能な数少ない治療法でもある。しかし、治療効果の向上が課題となっている。現在、臨床で行われている一般的な光線力学的療法は、薬剤（光増感剤）を静脈注射により投与し、がん細胞に集積したのを見計らって光を照射して行われる。光励起状態にある光増感剤はがん細胞内で酸素分子にエネルギーを移動することで一重項酸素を生成する。一般的にがん細胞内は低酸素状態のためエネルギーの授受効率が低くなり、治療効率が低いことが課題である。このため光増感剤の高機能化を目指した研究は活発に行われている。1960年 Lipson らによってヘマトポルフィリン(Hp)がヒトの腫瘍に集積することが明らかになり、臨床に用いられてきた。しかし、細胞透過性の高い赤色光の吸収強度が小さいことから、光増感剤の改良は重要な課題である。これらの課題を解決するため応募者は皮膚科において治療され技術的にも確立している PUVA 療法 (Psoralen Ultraviolet A) に着目した。本治療は、炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎や湿疹さらに皮膚リンパ腫である皮膚原発 T 細胞性リンパ腫の治療として実施される。その際に用いられる化学物質として光増感作用を示すソラレンが知られている。先行研究では、ソラレンを光増感剤とすることとした。がん細胞は正常細胞に比べて細胞分裂速度が早くエネルギー供給のため血管新生を行い増殖する。その際、グルコースが著しく消費する(ワールブルク効果)ことに注目し、光増感剤の分子内にグルコースを含有した分子設計を施し合成に成功している。光細胞毒性試験では、比較的がん増殖が速いマウス胎児繊維芽細胞由来 BALB 細胞を使用した。顕著な光細胞毒性の発現は $2.9\ \mu\text{M}$ において強い細胞毒性の発現を確認することができた。(Uruma, Y. et al., Bioorg. Med. Chem., 2017, 25, 2377-2372.) しかし、既存の光線力学療法の課題ともいえる細胞深部のがん細胞への光線力学療法の適用については未解決な課題である。

2. 研究の目的

日本人の2人に1人は将来がんになると推測され、その内3人に1人は死亡すると言われる。本申請研究では、次世代のがん治療法として注目を集める光線力学療法の治療上の課題を解決し細胞深部でも適応できる技術にすることを目的とする。課題克服に向け鍵となるのは近赤外線可視光線に変換するアップコンバージョン技術とがん細胞である。希土類元素を含んだアップコンバージョン粒子(UCN)は2012年 Zhang らによって論文発表されてきた。我々は、ワールブルク効果に基づいた光増感剤の合成に成功しており、本申請研究ではUCN内部に、我々が開発した特異的にがん細胞への集積能をもつ光増感剤を内包させ、UCN 表面には親水性、機能性を付与した細胞内動態特性を有する新規機能素子を調整する。また3次元培養技術により調整した大腸癌オルガノイド細胞を用いることでこれまで得られなかった詳細ながん細胞の情報を得ることが可能になる。必要な技術としては、有機合成化学、無機合成化学そして生化学などの学問領域が融合することで解決できなかった光線力学療法の課題解決を目指す。

3. 研究の方法

細胞深部に存在するがん細胞に対して光線力学療法を有用な手法にするためには、弱い光エネルギーを強い光エネルギーへ変換する技術(アップコンバージョン)である。本手法を利用するためにアップコンバージョン粒子作製を行った。光増感剤含有アップコンバージョンナノ粒子の調製の検討として、希土類には粒子の核をなす Y (イットリウム),そしてアップコンバージョンを起こす Yb(イッテルビウム),Tm(ツリウム)を用いた。光増感剤として 8-メトキシソラレン,フタロシアニンそして糖含有光増感剤を用いた。ナノ粒子の調製法は、オレイン酸と1-オクタデセンの入ったフラスコに YCl_3 , YbCl_3 , TmCl_3 を加え、 150°C で45分間加熱することで、希土類を含むオレイン酸のエマルジョンを形成した。その後、 NH_4F , NaOH 含有メタノール溶液、光増感剤を加え、 100°C で30分間加熱し、発生するガスを取り除いた後、さらに 290°C で1.5時間加熱することで NaYF_4 核ナノ粒子を得た。得られた粒子をエタノール、2 M HCl 溶液で処理した後、エタノールで余分な酸を洗浄した。粒子の水溶性及び生体適合性を高めるために粒子の表面をシリカでコーティングした。純水とポリビニルピロリドン(50 mg/mL)水溶液に UCNP を添加した後、超音波を30分間、攪拌1時間行い完全に UCNP を分散させた後、アンモニア水を加え pH を7に調整した。

さらに超音波を 30 分間照射後，TEOS(Tetraethyl Orthosilicate)を加え 12 時間攪拌することで UCNPs をシリカでコーティングした。

4 . 研究成果

これまでの知見に基づいた条件で光細胞毒性試験を行った。前日に 5×10^3 個/well に播種したがん細胞にアップコンバージョン粒子を添加した後，24 時間培養後 MEM 交換，さらに培養を継続した後，近赤外光 (980 nm) を照射した。48 時間後，クリスタルバイオレット処理にて細胞生存率の評価を行った。結果として，強い細胞毒性を示す結果を得ることが出来なかった。理由として，粒子に近赤外光を照射するが，粒子内でエネルギーの変換がうまく出来ておらず一重項活性酸素が発生出来ないことが理由であると推察した。実際にアップコンバージョンによる発光スペクトルを測定した結果，十分な発光を観測することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Venkatesan Parthiban, Priscilla Yoong Mei Yen, Yoshiyuki Uruma* and Ping-Shan Lai	4. 巻 -
2. 論文標題 Designing the Synthetic Glycosylated Photosensitizer for Photodynamic Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246./bcsj.20200079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yao, H.; Sakamoto, K.; Endo, S.; Okada, F. Uruma, Y.
2. 発表標題 Photocytotoxicity and cellular uptake of glycoconjugated photosensitizer
3. 学会等名 環太平洋化学会議2021（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Kodaki, S.; Uruma, Y.; Okada, F.
2. 発表標題 Research for the photodynamic therapy utilizing DDS containing phthalocyanine
3. 学会等名 環太平洋化学会議2021（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 小滝 咲、江田 明優、小村 勇人、Loghapriya Sivasamy、梶間 由幸、小沼 邦重
2. 発表標題 光線力学療法アップコンバージョン法による細胞毒性
3. 学会等名 第27回 高専シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 田中佐和子、遠藤聖也、江田明優、榎間由幸、Ping-Shan Lai、鈴木秋弘
2. 発表標題 拡張したハイブリット光増感剤の合成と物性評価
3. 学会等名 第27回 高専シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 八尾颯斗、遠藤聖也、坂本啓太、岡田太、鈴木秋弘、榎間由幸
2. 発表標題 拡張した光増感剤のナノ粒子化と物性評価
3. 学会等名 第27回 高専シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 片尾水羽子、原望実、江田明優、Ping-Shan Lai、鈴木秋弘、榎間由幸 1
2. 発表標題 近赤外対応光増感剤の合成と細胞毒性
3. 学会等名 第27回 高専シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 原望実、坂本啓太、加藤有紀、小沼邦重、岡田太、Ping-Shan Lai、榎間由幸
2. 発表標題 二世代型光増感剤の合成と物性評価
3. 学会等名 日本化学会第101回春季年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 遠藤 聖也、坂本 啓太、加藤 有紀、小沼 邦重、岡田 太、 Ping-Shan Lai , 櫻間 由幸
2. 発表標題 糖含有次世代型光増感剤の開発・研究
3. 学会等名 日本化学会第101回春季年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 江田 明優、坂本 啓太、加藤 有紀、小沼 邦重、岡田 太、 Ping-Shan Lai、櫻間 由幸
2. 発表標題 新規合成ルートを用いた光増感剤の合成と生物学的評価
3. 学会等名 日本化学会第101回春季年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 加藤有紀, 櫻間由幸
2. 発表標題 近赤外対応型光増感剤の開発研究
3. 学会等名 日本化学会第100回春季大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 坂本啓太, 櫻間由幸
2. 発表標題 糖含有光増感剤の合成と光細胞毒性
3. 学会等名 第35回 若手化学者のための化学道場in島根
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiyuki Uruma,
2. 発表標題 Synthesis of photocytotoxicity of glucose conjugated photosensitizer.
3. 学会等名 20th Tetrahedron Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshiyuki Uruma
2. 発表標題 Synthesis and Biological Evaluation of Glucose Conjugated Phthalocyanine as a Second-Generation Photosensitizer
3. 学会等名 2019 ACC (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	小沼 邦重 (Onuma Kunishige) (90597890)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------