

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20310133

研究課題名（和文） 光捕集部位—フラレン 2 元系を用いる光線力学治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of Photosensitizers by using Antenna Molecules-Fullerene Dyad Systems

研究代表者

池田 篤志（IKEDA ATSUSHI）

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：90274505

研究成果の概要（和文）：光線力学治療法（PDT）はここ数十年で非常に注目される新しいがん治療法である。本研究では、リポソームの脂質膜中に光捕集部位と C<sub>60</sub> を共存させることにより光合成模倣のリポソーム光増感剤を構築した。この光増感剤は、光捕集部位から C<sub>60</sub> へのエネルギー移動により、人がん細胞に対して光線力学活性を示した。この結果は、PDT に適した波長領域（600~700 nm）の光を照射したことにより C<sub>60</sub> が光線力学活性を示した初めての例となる。

研究成果の概要（英文）：Photodynamic therapy (PDT) is an emerging approach for the treatment of tumour diseases that has received growing interest in the last few years. In this study, we constructed photosynthesis mimetic liposomal photosensitizers (PS) of PDT by shoehorning light-harvesting “antenna” molecules and dense C<sub>60</sub> into lipid membrane bilayers. The developed liposomal PS showed improved photodynamic activity toward human cancer cells via the photoenergy transfer from photoactivated antenna molecules to C<sub>60</sub>. This is the first demonstration of photodynamic activity of C<sub>60</sub> by the irradiation of light matched with the optimal wavelength for PDT (600–700 nm).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：フラレン，リポソーム，光線力学治療法，がん細胞，2 元系，エネルギー移動，一重項酸素，活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

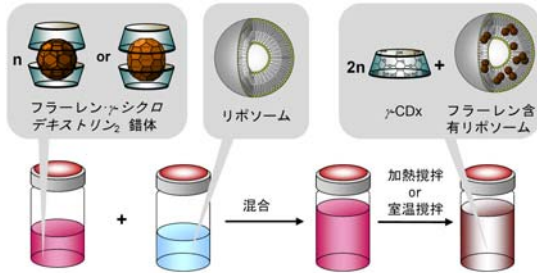
最近、新しいがん治療法として光線力学治療法（PDT）が大変注目されている。PDT は光増感剤（PDT 薬剤）をがん腫瘍に集積させ、その部位に可視光を照射することでガン組織を死滅させるもので、組織（臓器）を残せることや外科的手術が必要ないことが大き

な特徴となる。実際、国内外のいくつかの大病院では本格的に導入され、よい成果が得られている。現在、日本国内ではフォトブリンというポルフィリン誘導体が唯一光増感薬剤として認可され実用化されているが、高性能な薬剤の更なる開発が望まれている。その有力候補としてシリカ粒子より安全である

と報告されているものの今後さらに安全性試験が必要ではあるが“毒性が低いとされるフラレン”が挙げられる。このフラレン(C<sub>60</sub>)は可視光で光励起されると高い電子受容能を有することから、光増感薬剤として早くから注目されてきた。しかし、生体内に導入するためにはC<sub>60</sub>の水溶化が大きな課題となる。そのため、フラレンに水溶性の置換基を導入する方法、シクロデキストリンなどの可溶化剤による包接錯体を用いる方法により水溶化されてきた。しかし、いずれの方法も、水溶化と機能化を両立させることが難しいという新たな課題が発生した。さらに、C<sub>60</sub>やC<sub>70</sub>では、皮膚透過性の高い600~700 nmの波長領域の光をほとんど吸収できないため、この領域の波長の光ではほとんど光線力学活性を持たないという問題があった。

## 2. 研究の目的

我々はフラレン交換法という新たな手法を用いることで簡便に、そして短時間でリ



スキーム 1. フラレン交換法によるフラレン含有リポソームの調製方法

ポソーム内にフラレンを含有させ水溶化することに成功した(スキーム 1)。このC<sub>60</sub>含有リポソームは、(i) 脂質を選択することで表面の性質を様々に変えられ、機能化できること、(ii) リポソームが高分子量の会合体であるため“Enhanced Permeability and Retention Effect”(EPR 効果)によりがん指向性の向上が図れること、など多くの利点を有する。スキーム 1の方法で作製したC<sub>60</sub>含有リポソームを用いて細胞実験を行なった結果、近紫外領域(350~400 nm)の光を照射することで高い細胞致死率を達成できた。しかし、近紫外領域の光は皮膚や生体組織透過性が低く、深部にあるがん組織を死滅させることが難しい。そこで、現在 PDT で最もよく使われている600~700 nmの長波長の光を吸収できる光捕集部位を導入すれば、光を吸収し励起された光捕集部位からエネルギー移動、もしくは電子移動により“活性酸素発生効率の高い”C<sub>60</sub>が励起され、効率よく細胞死を引き起こせるものと考えた(図 1)。さらに、リポソームが崩壊した時点で光捕集部位からC<sub>60</sub>へのエネルギー移動、もしくは電子移動

が起こらなくなり、光毒性が消滅するものと考えられる。このことは、患者が早期退院できる可能性があり、光線力学治療法の普及に繋がるものと期待される。以上のように、光捕集部位と活性部位をリポソーム内に共存させた、緑色植物で行われる“光合成を模倣”した光増感剤の開発を目指した。

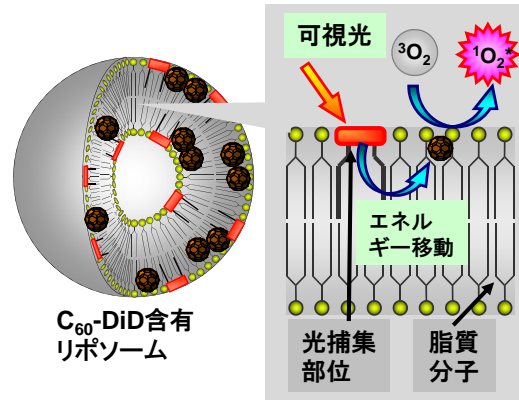
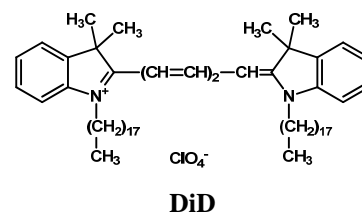


図 1. C<sub>60</sub>-光捕集部位 (DiD) 含有リポソームの模式図とエネルギー移動の流れ

## 3. 研究の方法

光捕集部位として吸収極大を約650 nmに有するカルボシアニン系蛍光色素であるDiDを用いた。DiDを混合したリポソーム中にさらにC<sub>60</sub>を取り込ませることで、2元系の作製を行った。この2元系を用いてがん細胞であるHeLa細胞に対する光活性(毒性)を評価した。細胞生存率はWST-8アッセイにより評価した。また、比較として、DiDまたはC<sub>60</sub>のみを含有するリポソームを作製し、上記と同様の条件で細胞実験を行った。



## 4. 研究成果

DiD、またはC<sub>60</sub>のみをそれぞれ含有するリポソームではほとんど光毒性がないのに対して、DiD-C<sub>60</sub> 2元系を含有したリポソームは圧倒的に高い光毒性を有することが明らかとなった(図 2)。この光活性は、従来の光線力学治療薬であるフォトフリンと、ポルフィリンおよびDiDのユニット換算で比較すると、ほぼ同等の活性を持つことが確認された。さらに、DiDおよびC<sub>60</sub>それぞれ単独では光毒性を持たないことから、リポソームが崩壊することにより、代謝される前に光毒性

が消失することが示された。つまり、光線力学治療法において従来から問題となっていた光線過敏症の問題が解決できる可能性が

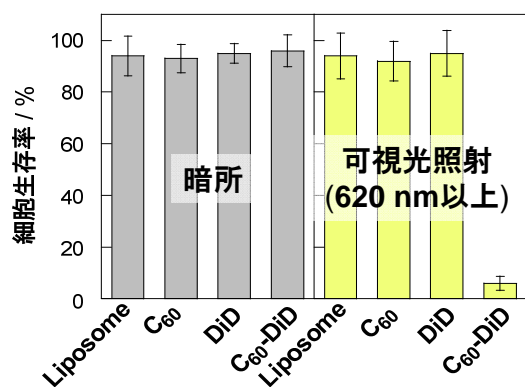


図 2. C<sub>60</sub>-DiD 含有リポソームの 620 nm 以上の照射による光線力学活性の評価

ある。このことは、DiD、または C<sub>60</sub> のみをそれぞれ含有するリポソームを 1 : 1 の比で混合した系は、DiD-C<sub>60</sub> 2 元系を含有したリポソームに比べ光毒性が圧倒的に低いことから確認された。一方、活性部位として C<sub>60</sub> にかわり C<sub>70</sub> を用いた DiD-C<sub>70</sub> 2 元系の活性は DiD-C<sub>60</sub> 2 元系よりも高く、その結果フォトプリンと比べてより活性が高いことが示された。この原因はまだ完全には明らかとなっていないが、エネルギーポテンシャルを考えると DiD からのエネルギー移動が C<sub>60</sub> よりも C<sub>70</sub> のほうが効率よく起こり、結果的に溶存酸素へのエネルギー移動がより高効率で起こることによって活性酸素が発生しているためであると考えられる。さらに、C<sub>70</sub> と DiD のリポソーム膜中濃度には最適値が存在することが明らかとなった。

今後は、さらに活性の高い光捕集部位の検討や、膜中での光捕集部位と活性部位であるフラレンの存在位置を精密に制御することによる光活性の向上を目指す。また、外部刺激によりリポソームを崩壊させることによる、光線過敏症の問題を解決することを目標とする。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① A. Ikeda, (他 9 名、1 番目), Advantages and Potential of Lipid- Membrane-Incorporating Fullerenes Prepared by the Fullerene-Exchange Method, *Chem.-Asian J.*, **7** (3), 605-613 (2012). 査読有
- ② 池田篤志, フラレン光増感剤による光線力学治療法, 月刊「バイオインダストリー」フラレン特集, シーエムシー出版, **29** (3), 13-19 (2012). 査読無

- ③ A. Ikeda, (他 5 名、1 番目), R. Aono, N. Maekubo, S. Katao, J. Kikuchi, M. Akiyama, Pseudorotaxane Structure of a Fullerene Derivative-Cyclodextrin 1:2 Complex, *Chem. Commun.*, **47** (48), 12795-12797 (2011). 査読有
- ④ A. Ikeda, (他 5 名、1 番目), Location of [60]fullerene incorporation in lipid membranes, *Chem. Commun.*, **47** (44), 12095-12097 (2011). 査読有
- ⑤ A. Ikeda, (他 8 名、5 番目), Fabrication of Carbon Nanotube/Zinc Oxide Composite Films by Electrodeposition, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **50**, 085504 (2011). 査読有
- ⑥ A. Ikeda, (他 6 名、1 番目), Formation and regulation of fullerene-incorporation in liposomes under the phase transition temperature, *Org. Biomol. Chem.*, **9** (8), 2622-2627 (2011). 査読有
- ⑦ K. Nobusawa, A. Ikeda, J. Kikuchi, Self-Assembly Control of Water-Solubilised Single-Walled Carbon Nanotubes by Combination of Reduction and Ligand Exchange Reactions of Transition Metal Complexes, *Supramolecular Chem.*, **23** (1-2), 102-105 (2011). 査読有
- ⑧ A. Ikeda, (他 8 名、6 番目), Current states and future views in photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol., C*, **12** (1), 46-67 (2011). 査読有
- ⑨ A. Ikeda, (他 7 名、1 番目), Water-soluble Inclusion Complexes of [60]Fullerene Derivatives using  $\gamma$ -Cyclodextrin, *Chem. Lett.*, **39** (12), 1256-1257 (2010). 査読有
- ⑩ A. Ikeda, (他 3 名、1 番目), Photodynamic Activity of Liposomal Photosensitizers via Energy Transfer from Antenna Molecules to [60]Fullerene, *ACS Med. Chem. Lett.*, **1** (3), 115-119 (2010). 査読有
- ⑪ A. Ikeda, (他 3 名、1 番目), Effect of Phase Transition Temperature of Liposomes on Preparation of Fullerene-Encapsulated Liposomes by the Fullerene-Exchange Reaction, *Chem. Commun.*, **46** (16), 2847-2849 (2010). 査読有
- ⑫ A. Ikeda, (他 3 名、1 番目), Reversible Solubilisation and Precipitation of Carbon Nanotubes by Temperature and pH Control in Water, *J. Mater. Chem.*, **19** (32), 5785-5789 (2009). 査読有
- ⑬ A. Ikeda, (他 5 名、1 番目), Photoelectrochemical Sensor with Porphyrin-Deposited Electrodes for Determination of Nucleotides in Water, *Org. Lett.*, **11** (5), 1163-1166 (2009). 査読有
- ⑭ A. Ikeda, (他 5 名、1 番目), Direct and Short-Time Uptake of [70]Fullerene into The

Cell Membrane Using an Exchange Reaction from [70]Fullerene• $\gamma$ -Cyclodextrin Complex and The Resulting Photodynamic Activity, *Chem. Commun.*, (12), 1547-1549 (2009). 査読有

⑮ A. Ikeda, (他 10 名、1 番目), Photodynamic Activity of C<sub>70</sub> Caged within Surface-Crosslinked Liposome, *Chem.-Asian J.*, **4** (1), 199-205 (2009). 査読有

⑯ A. Ikeda, (他 6 名、6 番目), Stiffness- and Conformation-Dependent Polymer Wrapping onto Single-Walled Carbon Nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.*, **130** (49), 16697-16703 (2008). 査読有

⑰ A. Ikeda, (他 7 名、2 番目), Intracellular Uptake and Photodynamic Activity of Water-soluble [60] and [70]Fullerenes Incorporated in Liposomes, *Chem.-Eur. J.*, **14** (29), 8892-8897 (2008). 査読有

⑱ A. Ikeda, (他 8 名、1 番目), Preparation of Highly Photosensitizing Liposomes with Fullerene Doped Lipid Bilayer using Dispersion-Controllable Molecular Exchange Reactions, *Org. Lett.*, **10** (18), 4077-4080 (2008). 査読有

⑲ A. Ikeda, (他 5 名、2 番目), Reversible Solubilization and Precipitation of Carbon Nanotubes through Oxidation-Reduction Reactions of a Solubilizing Agent, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47** (24), 4577-4580 (2008). 査読有

[学会発表] (計 63 件)

① 木ロー也, 池田篤志, 秋山元英, 菊池純一, 小川拓哉, 竹家達夫, 脂質二分子膜中におけるフラーレンの存在位置の検討, 日本化学会第 92 春季年会, 2012.3.27, 神奈川

② 飯塚達也, 池田篤志, 秋山元英, 菊池純一, 小川拓哉, 竹家達夫, 可溶化剤により水溶化したフラーレン誘導体の PDT 活性の評価, 日本化学会第 92 春季年会, 2012.3.25, 神奈川

③ 秋山元英, 池田篤志, 菊池純一, 小川拓哉, 竹家達夫, 中田栄司, 光捕集分子-フラーレン 2 元系を用いた pH 応答性光増感剤の開発, 日本化学会第 92 春季年会, 2012.3.25, 神奈川

④ 石橋怜菜, 片桐清文, 河本邦仁, 秋山元英, 河井芳彦, 池田篤志, 光線力学療法を目的としたフラーレン含有脂質膜コート酸化鉄ナノ粒子の合成と評価, 第 30 回無機高分子研究討論会, 2011.11.11, 京都

⑤ 池田篤志, 秋山元英, 前久保尚武, 木ロー也, 菊池純一, 小川拓哉, 竹家達夫, リポソーム中におけるフラーレンの存在位置を制御することによる光線力学活性の向上, 第 60 回高分子討論会, 2011.9.30, 岡山

⑥ 池田篤志, 前久保尚武, 青野綾太, 秋山元英, 菊池純一, 小西利史, 小川拓哉, 竹家

達夫, フラーレン誘導体・シクロデキストリン錯体の構造と機能, 第 7 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 2011.5.28, 広島

⑦ 木ロー也, 池田篤志, 秋山元英・菊池純一, フラーレン含有リポソームの脂質二分子膜中におけるフラーレンの存在位置の検討, 日本化学会第 91 春季年会, 2011.3.29, 神奈川

⑧ 河井芳彦, 池田篤志, 秋山元英, 菊池純一, 中田栄司, 宇都義浩, 堀均, リポソームへのフラーレン交換反応の  $\pi$  分子による制御, 日本化学会第 91 春季年会, 2011.3.29, 神奈川

⑨ 前久保尚武, 池田篤志, 秋山元英, 菊池純一, 小西利史, 小川拓哉, 竹家達夫, フラーレン誘導体含有リポソームを用いることによる光線力学活性の向上, 日本化学会第 91 春季年会, 2011.3.29, 神奈川

⑩ 前久保尚武, 池田篤志, 秋山元英, 菊池純一, シクロデキストリンによるフラーレン誘導体の水溶化, 第 4 回有機  $\pi$  電子系シンポジウム, 2010.11.19, 兵庫

⑪ 秋山元英, 池田篤志, 菊池純一, 小川拓哉, 竹家達夫, 光アンテナ分子-フラーレンを内包したリポソーム型光増感剤の C<sub>70</sub> による効率化, 第 4 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2010.9.25, 大阪

⑫ 池田篤志, 秋山元英・河井芳彦, 森美由貴, 菊池純一, 小川拓哉, 竹家達夫, 安定なフラーレン含有リポソーム製剤の新規調製法とその光活性評価, 第 59 回高分子討論会, 2010.9.17, 北海道

⑬ 池田篤志, 光アンテナ-フラーレン二元系を用いる光がん治療薬, JST 新技術説明会, 2010.7.26, 東京

⑭ 秋山元英, 池田篤志, 小川拓哉, 竹家達夫, 蛍光色素を光捕集アンテナ部位として導入した C<sub>60</sub> 含有リポソームの PDT 活性, 第 20 回日本光線力学学会学術講演会, 2010.6.11, 福井

⑮ 秋山元英, 池田篤志, 菊池純一, 小川拓哉, 竹家達夫, カルボシアニン色素を光捕集部位として導入した C<sub>60</sub> 含有リポソームの光線力学活性の解析, 日本化学会第 90 春季年会, 2010.3.28, 大阪

⑯ 池田篤志, フラーレンでがんを治す ~ 水溶化と光線力学治療薬としての応用~, 第 45 回けいはんな光医療産業バレー研究会, 2010.2.24, 京都

⑰ A. Ikeda, Intracellular uptake and photodynamic activity of water-soluble [60] and [70]fullerenes incorporated in liposomes, The 9th GIST/NAIST Joint Symposium on Advanced Materials, 2009.11.18, 韓国・光州

⑱ 池田篤志, 秋山元英, 菊池純一, 小川拓哉, 竹家達夫, 光捕集部位-フラーレンの 2 元系システムによる光線力学治療薬の開発, 第

58 回高分子討論会, 2009.9.16, 熊本

⑱ 秋山元英, 池田篤志, 菊池純一, 小川拓哉, 竹家達夫, カルボシアニン色素を光捕集部位として導入した C<sub>60</sub> 内包リボソームの光線力学活性の解析, 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 2009.9.16, 福岡

⑳ A. Ikeda, Intracellular uptake and photodynamic activity of water-soluble [60] and [70]fullerenes incorporated in liposomes”, the 215th Meeting of the Electrochemical Society, 2009.5.27, アメリカ・カリフォルニア州  
他 43 件

[図書] (計 9 件)

① 池田篤志, 高速振動粉碎法による表面処理について, 工業用炭素材料, ナノカーボン材料の表面処理 ノウハウ, 株式会社技術情報協会編, 324-326 (2011).

② A. Ikeda, Solubilization of Fullerenes and Carbon Nanotubes, in *ENCYCLOPEDIA OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, 2nd Edition*, H. S. Nalwa (Ed.), American Scientific Publishers, Los Angeles, vol. 23, 329-347 (2011).

③ 池田篤志, 医療分野における光ナノサイエンス, 光ナノ科学への招待, 長谷川靖哉, 細川陽一郎, 中嶋琢也 編著, ㈱化学同人, 98-100 (2010).

④ A. Ikeda, Fullerene Encapsulation, in *Handbook of Nanophysics: Clusters and Fullerenes*, K. D. Sattler (Ed.), CRC Press, 41-1-41-17 (2010).

⑤ 池田篤志, カリックスアレーンによる分子認識, 超分子サイエンス&テクノロジー ~基礎からイノベーションまで~, 国武豊喜 監修, 株式会社エヌ・ティー・エス, 95-104, (2009).

⑥ 池田篤志, 高速振動粉碎法による可溶化技術, カーボンナノチューブの精製・前処理と分散・可溶化技術, 株式会社技術情報協会編, 199-207 (2009).

⑦ 池田篤志, 共役ポリマー/カーボンナノチューブ複合体の構造特性, 次世代共役ポリマーの超階層制御と革新機能, 赤木 和夫 監修, 株式会社シーエムシー出版, 322-327 (2009).

⑧ 池田正澄、太田俊作、池田篤志、和田俊一、有機化学入門 第 2 版, 廣川書店, 2009 年 1 月.

⑨ A. Ikeda, Supramolecular design of photocurrent generators toward modeling of photosynthesis systems, in *BOTTOM-UP NANOFABRICATION: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films*, K. Ariga and H. S. Nalwa, (Eds.), American Scientific Publishers, Los Angeles, Vol. 2, 437-450 (2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称: フラーレン誘導体を用いた水溶性光増感性材料

発明者: 池田篤志, 秋山元英

権利者: 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-048658

出願年月日: 2011 年 3 月 7 日

国内外の別: 国内

名称: 疎水性クラスター化合物の水溶化方法

発明者: 長崎 健, 切畑光統, 沼田宗典, 池田篤志, 鈴木利雄, 植田秀昭

権利者: 公立大学法人大阪市立大学, 公立大学法人大阪府立大学, 公立大学法人京都府立大学, 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学, ダイソー株式会社

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/71128

出願年月日: 2010 年 11 月 26 日

国内外の別: 国外

名称: 疎水性クラスター化合物の水溶化方法

発明者: 長崎 健, 切畑光統, 沼田宗典, 池田篤志, 鈴木利雄, 植田秀昭

権利者: 公立大学法人大阪市立大学, 公立大学法人大阪府立大学, 公立大学法人京都府立大学, 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学, ダイソー株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2009-270801

出願年月日: 2009 年 11 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: 光線力学治療に利用可能な脂質膜およびその利用

発明者: 池田篤志, 秋山元英

権利者: 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-141667

出願年月日: 2008 年 5 月 29 日

国内外の別: 国内

[その他]

① 新聞報道: 日経産業新聞 2010 年 4 月 15 日、日刊工業新聞 2010 年 4 月 27 日

② 雑誌表紙採用: 雑誌論文①、⑥、⑮

③ ホームページアドレス: [http://mswebs.naist.jp/LABs/kikuchi/07gaiyou3\\_PDT.pdf](http://mswebs.naist.jp/LABs/kikuchi/07gaiyou3_PDT.pdf)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 篤志 (IKEDA ATSUSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学

研究科・准教授

研究者番号：90274505