

機関番号：34517

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710229

研究課題名（和文） 光線力学活性を利用したドラッグデリバリーシステムの開発

研究課題名（英文） The development of a new photodynamic therapy-based photo-sensitive drug delivery system

研究代表者

秋山 元英（AKIYAMA MOTOFUSA）

武庫川女子大学・生活環境学部・食物栄養学科・助手

研究者番号：90467697

研究成果の概要（和文）：光線力学療法は、光増感剤を光照射により励起し、細胞殺傷能の高い一重項酸素を産生させることで、標的細胞を死滅させるガン治療法の1つである。本研究課題では、薬剤の放出制御や安定化、病巣への選択的輸送などにより薬の副作用を押さえ薬効を高めるドラッグデリバリーシステムに、光線力学療法の原理を応用し、光増感剤が産生する一重項酸素を薬剤キャリアに作用させ、その構造を変化させることで薬剤の放出制御するシステムの構築を目指した。

研究成果の概要（英文）：Photodynamic therapy is a next-generation cancer treatment based on cytotoxic singlet oxygen molecules producing photochemical reactions between photoexcited photosensitizers and molecular oxygen. In this study, photodynamic therapy-based drug delivery systems were developed to achieve the photo-inducible controlled release of pharmaceutical compounds from carriers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：ドラッグデリバリー、光線力学療法、光増感剤、一重項酸素、フラールン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、薬剤の放出制御、体内での安定化、病巣への選択的輸送などにより薬の副作用を押さえ薬効を高めるドラッグデリバリーシステム（DDS）が注目を浴びている。一般的に、抗癌剤のDDSキャリアには、正常組織での副作用を抑えるために、血流中では内包した薬剤の流出を防ぐために構造的な安定性が求められるが、病巣では薬剤を放出するという二つの相反した性質が求められる。この様な要求に対し、標的細胞に高発現している酵素や受容体タンパク質を利用し、標的

細胞外付近で分解されることや、細胞内に取り込まれ、細胞内環境（例えば低 pH）にさらされることで薬剤を放出する DDS キャリアが開発されている。しかし、癌細胞で高発現している酵素や受容体タンパク質（例えばマトリックスメタロプロテアーゼや葉酸受容体など）は、他の正常な組織の細胞にも発現していること、癌細胞により高発現しているタンパク質が一樣でないことなどの問題点があった。また、この他にも、光によりキャリアからの薬剤放出制御を目指した研究も行なわれているが、それらは光がキャリア

に直接作用し構造変化を引き起こすため、強い光エネルギーが必要であり、照射する光が、組織透過性の低い、細胞にとって有害な紫外線であるなど、実用化には大きな障害があった。

一方、これに対し、光増感剤に光を照射することで一重項酸素などの活性酸素を産生し、標的細胞を死滅させる光線力学治療法 (PDT) において用いられる光は、組織透過性の高い長波長で、低出力のレーザー光である。また、光増感剤より産生される一重項酸素は、高い反応性を有しており、反応基質となる化学構造が明らかにされている。

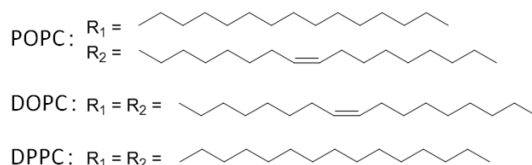
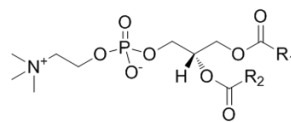
## 2. 研究の目的

以上の様な背景より、PDT の原理を基盤とし、光をキャリアに作用させるのでは無く、一重項酸素によりキャリアの構造を制御すれば、光照射により薬剤の放出を制御可能な DDS の確立が可能ではないかと考えた。そこで本研究課題では、フラーレンなどの光増感剤が、光励起することで一重項酸素を発生する性質を利用し、ドラッグデリバリーシステムに用いられている薬剤キャリアを一重項酸素により構造変化を受ける様に改良を加え、薬剤キャリア内に、光増感剤と抗癌剤などの薬剤を同時に内包させることで、光照射により薬剤キャリアの構造を変化させ、内包する薬剤の放出制御が可能なドラッグデリバリーシステムの開発を行なうことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ドラッグキャリアとして用いるリポソームは、薄膜法 (パンガム法) および、エクストルーダーによるサイジングにより調製を行った。擬似薬剤として用いた蛍光色素カルセインのリポソームへの封入は、リポソームの調製を、カルセインが濃度消光を起こす高濃度 (50 mM) の溶液で行い、その後、リポソーム内へ未封入のカルセインを SpharoseCL-4B を担体として用いたゲルろ過クロマトグラフィにより分離精製することで行った。なお、ゲルろ過クロマトグラフィにより精製したリポソームは、リン定量法によりその脂質濃度の算出を行った。本研究では、不飽和脂質として 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) および 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) を、飽和脂質として 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) を用いている (参考図 1)。なお、細胞実験に際しては、主成分の脂質に加え、カチオン性脂質を 10 mol% を混合し、リポソ

ームが細胞に取り込まれ易い条件下で実験を行った。



参考図 1 本研究で用いた脂質の構造

(2) リポソームへの光増感剤の導入は、光増感剤として用いるフラーレンの  $\gamma$ -シクロデキストリン錯体からの交換反応法により行った。まず、フラーレンの  $\gamma$ -シクロデキストリン錯体を高速振動粉碎法 (30 Hz, 20 min) により調製し、これを加温したリポソーム溶液に攪拌しながら滴下し混合することでフラーレンをリポソームへ導入した。なお、反応温度と時間は、[60]フラーレンを用いた場合は 80°C で 1 時間、[70]フラーレンを用いた場合は脂質の相転移温度以上で 1 分間反応を行った。

(3) リポソームからのカルセインの放出は、濃度消光しているカルセインが、溶液中に放出されることによる蛍光の回復を、蛍光スペクトルを測定することにより評価した。リポソーム溶液を酸素でバブリングし、溶液中の溶存酸素量を高めた後、光照射を行った。光照射は 500 W キセノンランプ (SX-UID500X, ウシオ電機) を光源とし、300 nm 以下の波長をカットするフィルターおよび水フィルターを用いて、室温下で 1 時間行った。光照射後、経時的に蛍光スペクトルの変化を測定し、測定後に界面活性剤である TritonX-100 を添加し、リポソームを全て破壊することで、カルセインが完全にリポソームから放出された時の蛍光強度を測定した。なお、リポソームからのカルセインの放出率は、リポソーム調製直後もしくは光照射直後の蛍光強度を  $F_0$ 、各時間経過後の蛍光強度を  $F$ 、TritonX-100 添加後の蛍光強度を  $F_m$  とした時、放出率 (%) =  $(F - F_0) / (F_m - F_0) \times 100$  の式により算出した。

(4) コレステロールや L-ヒスチジンが、リポソームに導入した光増感剤の細胞殺傷能に与える影響を評価する実験は、ヒト子宮頸ガン由来の HeLa 細胞を用いて行った。細胞を、培養プレートに播種し一晩培養した。その後、光増感剤を含有したリポソーム溶液を

目的の濃度となるように添加し、24 時間細胞に取り込ませた。24 時間後、リン酸緩衝生理食塩水で細胞を洗浄することで取り込まれなかった光増感剤を除去し、培地を再添加後に照射を行なった。照射は 300 W キセノンランプ (MAX-301, 朝日分光) を光源とし、ミラーモジュールおよび短波長カットフィルターを用いることで 600–740 nm の波長の光を、室温下で 30 分間照射した。なお、細胞の生存率は、照射の 24 時間後、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いることで算出した。

#### 4. 研究成果

(1) 一重項酸素が脂質のアルキル鎖における不飽和部位と反応する性質を利用し、不飽和脂質からなるリポソーム内に光増感剤を導入し、照射依存的な薬剤放出制御が可能かの検討を行った。不飽和脂質として、アルキル鎖において不飽和結合を 1 つ有する POPC を、光増感剤としてフラブレン、擬似薬剤として蛍光色素カルセインを用い実験を行った。その結果、フラブレンを導入したリポソームにおいて照射依存的にカルセインが放出されることが確認された。この照射依存的なカルセインの放出率は、フラブレンを導入していないリポソームに比べ明らかに高いことより、不飽和脂質が一重項酸素により酸化され、それに伴い内包したカルセインが放出された可能性が示唆された (図 1)。

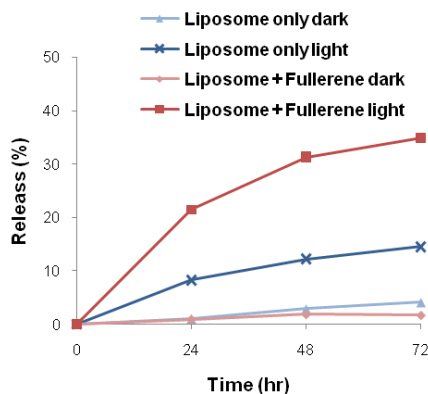


図 1 光依存的なリポソームからのカルセインの放出

(2) 次に、リポソームを構成する脂質における一重項酸素との反応部位の数、すなわち脂質の不飽和度が与える影響に関して、検討を行った。(1) で用いた POPC に加え、アルキル鎖において不飽和結合を 2 つ有する DOPC を用い、(1) と同様に光依存的な擬似薬剤の放出の増大を調べた。その結果、POPC または DOPC からなるリポソーム間において、光依存的な擬似薬剤の放出能に差はなく、脂質のア

ルキル鎖において、不飽和結合が 1 つ存在すればそれ以上存在する場合と同等に薬剤が放出されることが明らかとなった。

(3) 一方、POPC からなるリポソームは、飽和脂質 DPPC からなるリポソームとの比較実験において、光を照射していない定常状態において、擬似薬剤の若干の放出が観察されることより、定常状態における安定性の向上が必要であることが示唆された (図 2)。

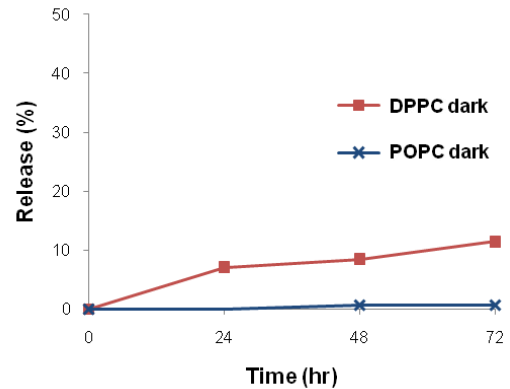


図 2 暗所におけるリポソームからのカルセインの放出

(4) 飽和脂質 DPPC からなるリポソームに、光増感剤であるフラブレンに加え、一重項酸素との反応部位としてコレステロールを導入し、リポソームからの一重項酸素の産生に与える影響を、光増感剤の細胞殺傷能を比較することで評価した。その結果、HeLa 細胞を用いた実験において、コレステロールを導入したフラブレン含有リポソームの細胞殺傷能が、コレステロールを導入していないフラブレン含有リポソームの細胞殺傷能より低下する傾向が観察された。このことは、リポソーム内のコレステロールが光増感剤より産生された一重項酸素と反応している可能性を示唆するものであり、酸化コレステロールが生成されることによりリポソームの脂質膜が乱されていることが予想された (図 3)。

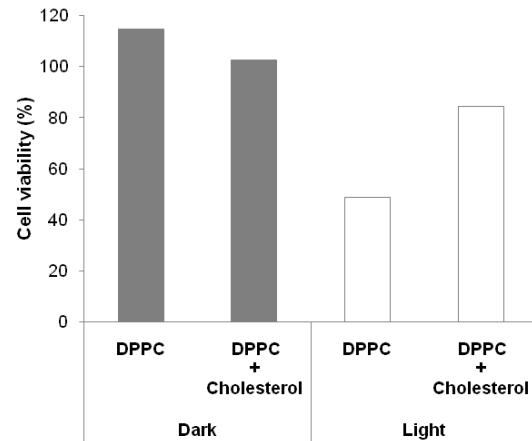


図 3 コレステロール添加による細胞殺傷能の低下

(5) また、コレステロール以外にも一重項酸素と反応するものとして、一重項酸素と高い反応性を有していることが報告されているアミノ酸 L-ヒスチジンをを用い、光増感剤の細胞殺傷能に与える影響の検討も行った。(3)と同様に HeLa 細胞を用い解析を行った結果、フラレン含有リポソームの光依存的な一重項酸素を介した細胞殺傷能が、L-ヒスチジン存在下で著しく阻害されることより、フラレンを光増感剤として導入したリポソームより産生された一重項酸素が L-ヒスチジンと反応することが確認された (図 4)。

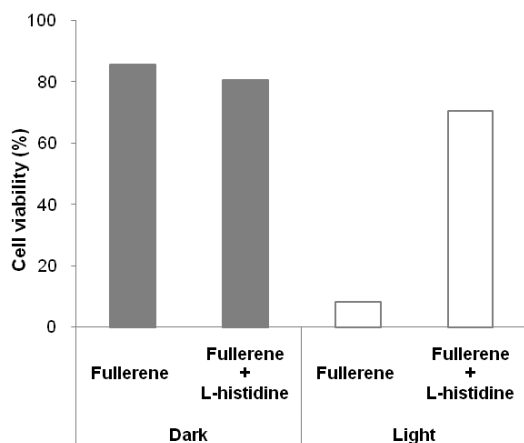


図 4 L-ヒスチジン添加による細胞殺傷能の低下

(6) 今後は、コレステロールを導入した飽和脂質 DPPC からなるリポソームを用い、光照射時における擬似薬剤の放出能を検討するとともに、コレステロール以外にも今回確認された L-ヒスチジンの様な一重項酸素との高い反応性を有する分子をリポソーム内に導入することで、薬剤放出制御システムの向上を目指す予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Atsushi Ikeda, Yoshihiko Kawai, Jun-ichi Kikuchi, Motofusa Akiyama, Eiji Nakata, Yoshihiro Uto, Hitoshi Hori. Formation and regulation of fullerene-incorporation in liposomes under the phase transition temperature. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有 Vol.9, 2011, in press (DOI: 10.1039/c0ob01030h).
- ② Atsushi Ikeda, Tomoya Genmoto, Naotake Maekubo, Jun-ichi Kikuchi, Motofusa Akiyama, Takayuki Mochizuki, Shuhei Kotani, Toshifumi Konishi. Water-soluble Inclusion Complexes of [60]Fullerene Derivatives Using

$\gamma$ -Cyclodextrin. *Chemistry Letters* 査読有 Vol.39, 2010, 1256-1257.

- ③ Atsushi Ikeda, Motofusa Akiyama, Takuya Ogawa, Tatsuo Takeya. Photodynamic Activity of Liposomal Photosensitizers via Energy Transfer from Antenna Molecules to [60]Fullerene. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 査読有 Vol.1, 2010, 115-119.
- ④ Atsushi Ikeda, Yoshihiko Kawai, Jun-ichi Kikuchi, Motofusa Akiyama. Effect of phase transition temperature of liposomes on preparation of fullerene-encapsulated liposomes by the fullerene-exchange reaction. *Chemical Communications*, 査読有 Vol.46, 2010, 2847-2849.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 前久保尚武、秋山元英、池田篤志、菊池純一、小西利史  $\gamma$ -シクロデキストリンによるフラレン誘導体の水溶化 日本化学会第 91 春季年会 平成 23 年 3 月 29 日 神奈川県横浜市
- ② 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 25 回生体機能関連化学シンポジウム 平成 22 年 9 月 25 日 大阪府豊中市
- ③ 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 平成 22 年 9 月 17 日 北海道札幌市
- ④ 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 平成 22 年 3 月 28 日 大阪府東大阪市
- ⑤ 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 平成 21 年 9 月 16 日 熊本県熊本市
- ⑥ 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> 内包リポ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 平成 21 年 9 月 14 日 福岡県福岡市

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 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：平成 23 年 3 月 7 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://mswebs.naist.jp/LABs/kikuchi/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 元英 (AKIYAMA MOTOFUSA)

武庫川女子大学・生活環境学部・

食物栄養学科・助手

研究者番号：90467697