

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21750133

研究課題名（和文）光癌治療を目指した新規ケイ素型光増感ナノ粒子の創製

研究課題名（英文）Creation of novel silyl photosensitizer absorbed on nanoparticle for photodynamic therapy

研究代表者

堀内 宏明（HORIUCHI HIROAKI）

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：00334136

研究成果の概要（和文）：

光癌治療に用いる光増感色素の高効率化を目指した研究を行った。従来化合物よりも一重項酸素の光増感効率と癌細胞による取り込み効率の向上に成功した。ケイ素により選択的な腫瘍集積効率も増加し、治療効果が著しく向上することを明らかにした。腫瘍集積性をさらに向上させるためにナノシリカとの複合化を行った。有機溶媒中ではナノシリカ表面に光増感色素を修飾しても高い一重項酸素の光増感効率を維持できることを確認できた。

研究成果の概要（英文）：

Developments of photosensitizer for photodynamic therapy were carried out. New silyl-photosensitizer shows higher sensitization efficiency of singlet oxygen and higher cellular uptake efficiency than previous one. The silylation also improved the selectively accumulating efficiency to tumor. Photodynamic activity for tumor-bearing mice was significantly enhanced by the silylation. Hybridization of a silyl-photosensitizer with silica nanoparticle was carried out to improve the selectively accumulating efficiency to tumor. It was confirmed that the hybrid material shows high sensitization efficiency of singlet oxygen in organic solvent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：光線力学療法、一重項酸素、ケイ素、光増感剤、ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

癌は、現在、日本の死亡要因の第1位を占めており、死因全体の約30%にも達する。癌の主な治療法には外科手術や放射線・化学療法が挙げられるが、どちらも患者の生活の質（Quality of life）が著しく低下するため、より負担の小さい治療法が求められている。

光線力学療法は癌の新しい治療法の一つで、光増感色素溶液の注射と、光照射のみによる治療であるため患者への負担が非常に小さい治療法として注目されている。この治

療法の概要は光増感色素を人体に投与した後、数時間後には色素が癌に集積し、ここに可視光を照射することにより一重項酸素を発生させ、癌細胞を死滅させる治療法である。この治療法では、光増感色素が最も重要な役割を果し、これに求められている主な性質は、1. 癌部位への高い選択的集積性、2. 癌細胞への高い取り込み効率、3. 赤色～近赤外領域における高い光吸収能力、4. 高い一重項酸素の発生効率、である。我々は新規光機能性材料の開発を目的として有機ケイ素化

化合物の光化学を研究してきた。その成果の一部として、光線力学療法に用いられてきているポルフィリン誘導体にケイ素を導入することにより、一重項酸素の増感効率が著しく向上することを見出した。また水溶性を付与した色素では、ケイ素の導入により一重項酸素の発生効率が向上するだけでなく、細胞への取り込み効率も2倍以上に向上し、最終的な癌細胞の光殺傷能力は3倍に向上することを見出した。一方、従来技術ではあるが、ポルフィリン環の一部還元により、赤色領域における分子吸光係数の向上にも成功している。

この様に光線力学療法の光増感色素に求められる4つの性質の内、既に3つの性質を改善することに成功し、残る主な課題として癌への集積性を向上させることが重要となっている。

薬剤を癌部位に選択的に集積させるための戦略の一つとして、ドラッグデリバリーシステムの利用が注目されており、中でも特に EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果を狙ったナノ粒子の利用が注目されている。EPR 効果の原理は以下の通りである。癌組織の急増殖により血管新生が速く、整然とした血管壁の構築が不可能であるため正常組織には無い数百ナノメートルの隙間が開いてしまう。そのため、数百ナノメートル以下の粒子を投与した際にこの隙間にだけ入ることができ、癌部位での濃度が向上することから、癌への選択的集積性を向上できることになる。

2. 研究の目的

光線力学療法に用いる薬剤(光増感剤)の腫瘍への選択的集積性を向上させるため、まず、これまでに開発してきたケイ素型光増感剤のさらに高効率化させることを目的とした。また、DDS (Drug Delivery System) としてシリカナノ粒子を用い、ケイ素型光増感剤と複合化させることによる効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

光増感剤の高効率化：

親水性置換基としてスルホン酸ナトリウム基(従来化合物)あるいはカルボン酸ナトリウム(新規化合物)とトリメチルシリル基を有するポルフィリン誘導体を合成した。

一重項酸素の光増感効率(Φ_{Δ})はナノ秒近赤外発光測定装置を使用し、対象化合物としてペリナフテノン($\Phi_{\Delta}=0.98$)を用いて決定した。培養癌細胞には人由来のグリオマ細胞である U251 細胞を用いた。培養癌細胞による光増感剤の取り込み効率(UE)は、光増感剤を含む培地で U251 細胞を培養した後、細胞内に取り込まれた光増感剤を抽出し、抽出液の

蛍光強度を測定することにより評価した。U251 細胞に対する光線力学活性は光増感剤を取り込ませた細胞に可視光を照射し、その後 MTT assay により細胞の生存率を調べることで評価した。動物実験には腫瘍(SCC7 細胞)を担持させたヌードマウスを用いた。光増感剤の体内分布は、光増感剤を静脈注射後、小動物蛍光イメージング装置を用いて評価した。また、組織内の光増感剤の濃度は、光増感剤を投与した担癌ヌードマウスの組織を摘出して組織中の光増感剤を抽出し、抽出液の蛍光強度を測定することにより評価した。腫瘍の光線力学治療では、光増感剤を静脈注射した担癌ヌードマウスの腫瘍部位に可視光を照射し、その後の腫瘍サイズや外観の経過を観測した。

光増感剤とシリカナノ粒子との複合化：

光増感剤とシリカナノ粒子との複合化には2種類の方法を検討した。一つ目の方法では、光増感剤であるシリルポルフィリンにトリエトキシシリル基を導入し、シランカップリング反応によりシリカ表面に化学吸着させた。二つ目の方法ではシリカ表面にあらかじめアミノ基を有するシランカップリング剤を修飾しておき、後からカルボキシル基を有する光増感剤を脱水縮合により化学吸着させた。

光増感剤/ナノシリカ複合体の光物性は紫外可視吸収スペクトル測定、蛍光スペクトル測定、光増感により発生した一重項酸素のリン光スペクトル測定により評価した。

4. 研究成果

まず始めに光増感剤の高効率化を目指した研究を行った。用いた光増感剤の分子構造を図1に示す。 S_4 と SiS_4 はこれまでに開発してきた化合物で、シリル基を導入することにより、一重項酸素の光増感効率 Φ_{Δ} と癌細胞に対する取り込み効率 UE が向上し、培養癌細胞に対する光線力学活性が向上することがわかってきた。シリル基を導入することにより培養癌細胞に対する活性が向上したことから、今回、次のステップとして担癌ヌードマウスを用いた評価を行った。しかしながら

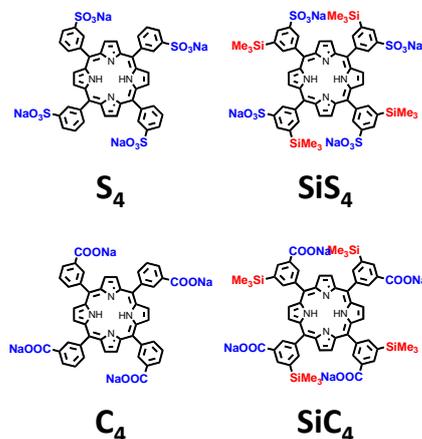


図1. 光増感剤の分子構造

SiS₄を静脈注射したヌードマウスは数時間後に死亡してしまっ。SiS₄は培養癌細胞に対しては毒性がなかったが、ヌードマウスに対しては毒性を示すことがわかった。

そこで、この問題を解決するために親水性置換基をスルホン酸ナトリウムから、実用化されている光増感剤で良く用いられているカルボン酸ナトリウムに変更した SiC₄を新たに合成した。まず、親水性置換基を変更しても、SiS₄の時と同様に、シリル化によりΦ_AとUEが向上するかどうかを確認した。まずは溶液中においてΦ_Aを決定した(図2)。カルボキシ誘導体においてもシリル基を導入することにより、Φ_Aが向上することがわかった。また、新たに合成したSiC₄の方が従来化合物のSiS₄よりも高い効率を示すことがわかった。

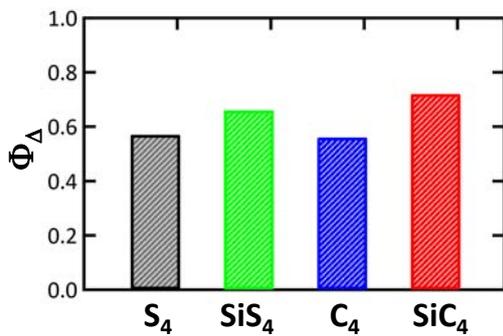


図2. 光増感剤の一項酸素の光増感効率Φ_A

次にU251細胞を用いてUEを評価した。15 μMの光増感剤を含む培地で12 h培養後、細胞内に取り込まれた光増感剤の相対濃度を調べた(図3)。やはりカルボキシ誘導体においてもシリル基を導入することにより、UEが向上することがわかった。また、新たに合成したSiC₄の方が従来化合物のSiS₄よりも高いUEを示すことがわかった。

従来化合物と同様に新規化合物であるカルボキシ誘導体においてもシリル化によりΦ_AとUEが共に向上し、さらに従来化合物のSiS₄よりも高い効率を示したことから高い光線力学活性が期待される。そこで、光線力学活性を調べた。15 μMの光増感剤を含む培地で12 h培養後、可視光照射を行い、細胞の生存率を決定した(図4)。スルホ誘導体と同様に、カルボキシ誘導体においてもシリル

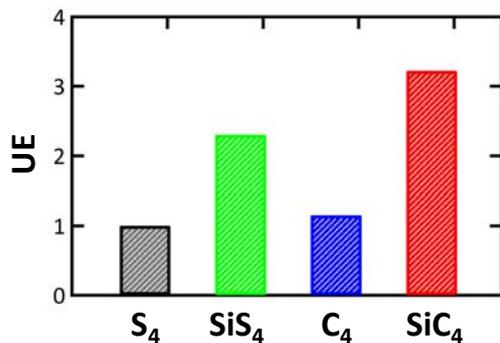


図3. 癌細胞による光増感剤の取り込み効率UE

基の導入により、活性が向上することがわかった。さらにSiS₄に比べてSiC₄の方が著しく高い活性を示すこともわかった。今回の親水性置換基の変更は、動物に対する毒性を低下させることを目的としていたが、結果としては活性を向上させることにも成功した。

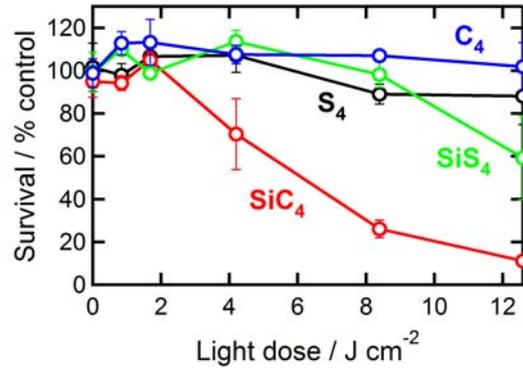


図4. U251細胞に対する光細胞毒性

次に担癌ヌードマウスを用いた評価を実施した。SiS₄を静脈注射したヌードマウスは数時間後に死亡したが、SiC₄を注射したヌードマウスは一週間経過しても生存したことから、親水性置換基をスルホン酸ナトリウムからカルボン酸ナトリウムへ変更させることにより光増感剤の毒性を低下させることに成功した。毒性の問題を解決出来たため、次に腫瘍集積性に及ぼすシリル化の効果を研究した。図5は100 nmolの光増感剤を尾から静脈注射し、4時間後に観測した蛍光イメージを示している。C₄では弱い光増感剤の蛍光が体全体から観測され、腫瘍部分とそれ以外の部分の蛍光強度に差は見られなかった。このことからC₄は腫瘍への選択的集積性は低いことがわかる。一方、SiC₄では腫瘍周辺における蛍光強度に比べ、腫瘍部位から強い蛍光が観測された。さらに腫瘍部位に蛍光強度はC₄よりもSiC₄の方が強い。以上のことから、光増感剤にシリル基を導入することにより、Φ_AとUEだけでなく腫瘍への選択的集積効率も向上することが明らかになった。SiC₄の組織内濃度を調べたところ、腫瘍中では筋肉中の9倍の濃度になっていることがわかった。一方、光増感剤が体外に排出される

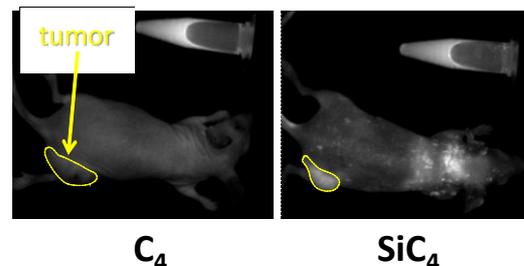


図5. 担癌ヌードマウスに投与した光増感剤の体内分布

過程を調べた結果、注射後二日経過すると光増感剤は正常組織から排出されることがわかった。

次に、担癌ヌードマウスに対して実際に光線力学治療を施した。100 nmol の光増感剤を尾から静脈注射し、4 時間後に白色光を照射した。治療後の腫瘍サイズの変化を図 6 に示す。C₄を用いた場合には、何も処置しなかった場合 (control) とほぼ同じ速度で腫瘍が成長していることから、治療効果は殆ど無かったと言える。一方、SiC₄では治療から 6 日後には腫瘍はかさぶたとなって消失し、治癒したことがわかった。以上のことから光増感剤にシリル基を導入すると、一重項酸素の光増感効率Φ_Δ、癌細胞による取り込み効率UE、腫瘍への選択的集積性が向上し、治療効果が著しく向上することが明らかになった。このことからシリル化は光線力学療法に用いる光増感剤の高効率化に有用であると言える。

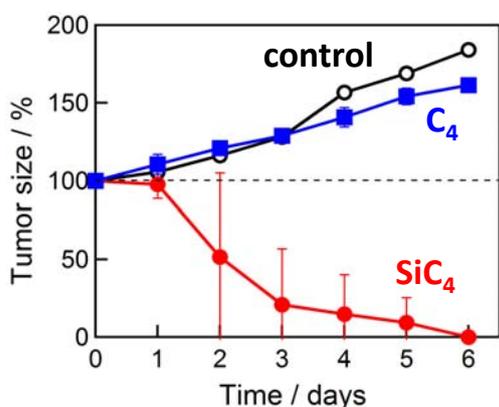


図6. 光線力学治療した担癌ヌードマウスの腫瘍サイズ変化

次に、DDS (Drug Delivery System) であるナノシリカと光増感剤の複合化の研究を行った。複合化方法としては図 7 に示した 2 種類の方法を実施した。まず初めに光増感剤の効率を向上させるシリル基の先にシランカップリング反応を起こすトリエトキシシリル基を導入した化合物 (SiTTPP-Si(OEt)₃) を合成した。この化合物の一重項酸素の光増感効率Φ_Δを THF 中で決定したところ、Φ_Δは 0.78

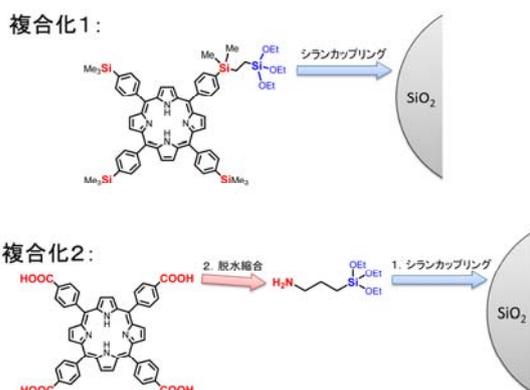


図7. 光増感剤とナノシリカの複合化

であり、無置換のポルフィリン (tetraphenylporphyrin; Φ_Δ = 0.58) よりも高いことから、シリル化によるΦ_Δの向上と、シランカップリング反応性の付与の両立に成功した。次に SiTTPP-Si(OEt)₃ をシランカップリング反応によりナノシリカ表面に化学吸着させた。ナノシリカとの複合体 (SiTTPP-SiO-Silica) を THF 中に分散させ吸収スペクトル測定を行った (図 8)。ナノシリ

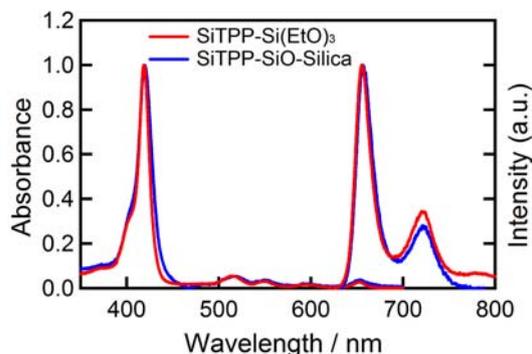


図8. THF中におけるSiTTPP-Si(OEt)₃と、ナノシリカとの複合体(SiTTPP-SiO-Silica)の吸収スペクトル

カに吸着した光増感剤の吸収スペクトルの形は未吸着のものと同様であることから、吸着によって分子吸光係数は変化しないと仮定できる。この仮定を用いて、ナノシリカ表面における光増感剤の吸着密度を評価したところ、5×10¹⁵ 個 m⁻²であり、ナノシリカ 1 粒子当たりの吸着した光増感剤の分子数は、約 7 個であった。

次にナノシリカに吸着した光増感剤の一重項酸素の光増感効率Φ_Δを評価したところ、Φ_Δは 0.71 であり、ナノシリカに吸着する前と同等の光増感効率を示すことがわかった。また、ナノシリカへの吸着前後の光増感剤の蛍光量子収率を決定したところ、吸着前後でそれぞれ 0.077、0.070 であり、ほぼ同等であった。以上の結果から、光増感剤をナノシリカ表面に吸着させても光増感剤の光物性は殆ど変化せず、高い一重項酸素の光増感効率を維持していることが明らかになった。この光増感剤とナノシリカの複合体を光線力学療法に应用するためには、水中で作用させる必要がある。吸着した光増感剤自身は非水溶性化合物であるが、ナノシリカは表面に多数のシラノール基を有するため、複合体は水に溶かすことが可能であった。そこで、複合体の光物性を水中で評価した。水中において一重項酸素の光増感を調べた結果、一重項酸素のリン光は検出限界以下であった。水中では一重項酸素のリン光量子収率が低いため、検出限界自体が低い、それを考慮してもΦ_Δが大幅に低下してしまったと言える。そこで、改めて THF 中と水中での SiTTPP-SiO-Silica の吸収・蛍光スペクトルを測定した (図 9)。水中では吸収スペクトル、

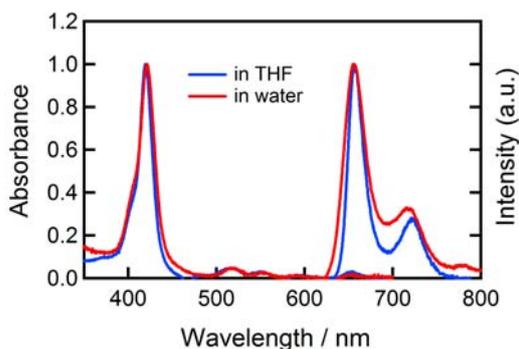


図9. THF中と水中における光増感剤/ナノシリカ複合体 (SiTTPP-SiO-Silica)の吸収スペクトル

蛍光スペクトル共にブロードになっていることがわかった。また、蛍光量子収率は THF 中では 0.070 であったのに対し、0.012 と 1/5 以下に低下した。この結果から、THF は光増感剤にとって良溶媒であるため、THF 中ではナノシリカ表面に吸着していても光増感剤は比較的自由にあり、未吸着の状態と同様の光物性を維持していると考えられる。しかしながら水は光増感剤にとって貧溶媒であるため、複合体自体は水中に溶けているものの、光増感剤はシリカ表面に張り付くか、あるいは光増感剤間で凝集を起こし、励起一重項状態の消光が起こってしまい、一重項酸素の光増感効率 Φ_A が低下してしまったと考えられる。

この様に水中で Φ_A が低下してしまった原因が、溶媒である水が光増感剤にとって貧溶媒であるためであるとの仮説を立て、これを解決する手段として、光増感剤として水溶性の化合物を用いることにした。まずは仮説を証明することが重要であるため、シリル基を持たない市販の水溶性光増感剤 (TPPC) を用いて図 7 に示した複合化 2 による複合体を合成した。水中の TPPC と TPPC を吸着させたナノシリカ (TPPC-Silica) の吸収スペクトルを測定した (図 10)。光増感剤を水溶性の化合物に変更したにも関わらず、水中ではナノシリカに吸着した TPPC の吸収スペクトルは未吸着のものとは異なり、ブロードになり長波長側にシフトしていた。また、シリカに吸着することにより、蛍光も観測されなくなった。以上の結果から、光増感剤が水溶性であってもシリカに吸着させて水に溶かした場合に

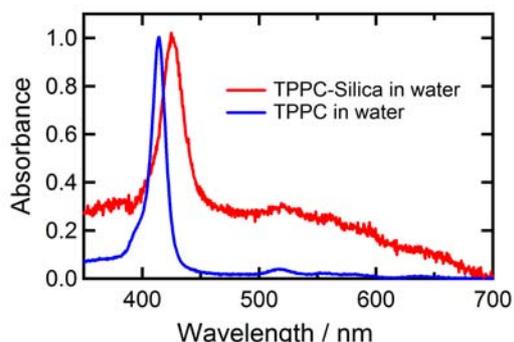


図10. 水中における光増感剤(TPPC)と光増感剤/ナノシリカ複合体(TPPC-Silica)の吸収スペクトル

は励起一重項状態の消光が起こってしまうことがわかった。今後はこの消光を抑制するために、光増感剤に嵩高い置換基を導入しシリカ表面への張り付き、あるいは光増感剤間の凝集を抑制する必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Silylation Enhancement of Photodynamic Activity of Tetraphenylporphyrin Derivative, Horiuchi, H.; Kameya, T.; Hosaka, M.; Yoshimura, K.; Kyushin, S.; Matsumoto, H.; Okutsu, T.; Takeuchi, T.; Hiratsuka, H., J. Photochem. Photobiol. A, in press. [査読有]

(2) Suppression mechanism of the photodegradation of J-aggregate thin films of cyanine dyes by coating with polysilanes, Horiuchi, H.; Ishida, S.; Matsuzaki, K.; Tani, K.; Hashimoto, T.; Hotta, H.; Tsunoda, K.; Kodaira, T.; Okutsu, T.; Hiratsuka, H., J. Phys. Chem. C (2011), 115(14), 6902-6909. [査読有]

(3) Singlet molecular oxygen generation by water-soluble phthalocyanine dendrimers with different aggregation behavior, Nishida, M.; Horiuchi, H.; Momotake, A.; Nishimura, Y.; Hiratsuka, H.; Arai, T., J. Porphyr. Phthalocyanines (2011), 15(1), 47-53. [査読有]

[学会発表] (計 39 件)

1. 堀内宏明・真塩広之・石田真太郎・久新 荘一郎・穂坂正博・竹内利行・奥津哲夫・平塚浩士; ケイ素ポルフィリンによる担癌マウスの光線力学治療; 日本化学会第91春季年会; 2011年3月27日; 神奈川大学

2. Horiuchi, H.; Kameya, T.; Yoshimura, K.; Kyushin, S.; Matsumoto, H.; Hosaka, M.; Takeuchi, T.; Okutsu, T.; Hiratsuka, H.; Development of Silicon-containing Photosensitizer for Photodynamic Therapy; PacificChem 2010; 2010年12月19日; Haw

aii (USA)

3. H. Horiuchi, H. Mashio, M. Hosaka, S. Ishida, S. Kyushin, T. Okutsu, T. Takeuchi, H. Hiratsuka; Development of Silicon-containing Photosensitizer for Photodynamic Therapy -in vivo study-; International Symposium on Silicon Science 2010; 2010年12月9日; Gunma
4. 眞塩 広之、堀内 宏明、穂坂 正博、竹内 利行、石田 真太郎、久新 莊一郎、奥津 哲夫、平塚 浩士; 含ケイ素光増感色素による担がんマウスの光線力学治療; 第14回ケイ素化学協会シンポジウム; 2010年11月19日; ニューウェルシテイ湯河原
5. 堀内宏明・眞塩広之・穂坂正博・竹内利行・石田真太郎・久新莊一郎・奥津哲夫・平塚浩士; ケイ素含有光増感色素の開発: 光物性とin vivo評価; 2010年光化学討論会; 2010年9月10日; 千葉大学
6. 堀内宏明・眞塩広之・石田真太郎・久新莊一郎・松本英之・穂坂正博・竹内利之・平塚浩士; ポルフィリン類縁体の一重項酸素光増感過程に及ぼす第14族元素の効果; 日本化学会第90春季年会; 2010.3.26; 東大阪
7. 堀内宏明・亀谷剛大・斉藤裕太・吉村公男・久新莊一郎・松本英之・平塚浩士; 光線力学療法に用いるケイ素型光増感色素の開発-シリルクロリンの光物性; 日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会 2009.12.5; 前橋
8. 堀内宏明・眞塩広之・斉藤裕太・石田真太郎・久新莊一郎・松本英之・穂坂正博・竹内利行・平塚浩士; 光線力学療法への応用を目指したケイ素を含む光増感色素の開発; 第13回ケイ素化学協会シンポジウム; 2009.10.30; 唐津
9. 眞塩 広之、堀内 宏明、亀谷 剛大、石田 真太郎、吉村 公男、久新 莊一郎・穂坂 正博、竹内 利行、松本 英之、平塚 浩士; In vitro と in vivo でのカルボキシル基を有する光線力学療法用の含ケイ素光増感色素の研究; 第13回ケイ素化学協会シンポジウム; 2009.10.30; 唐津
10. Hiroaki Horiuchi, Hiroyuki Mashio, Yuta Saito, Shintaro Ishida, Soichiro

Kyushin, Hideyuki Matsumoto Masahiro Hosaka, Toshiyuki Takeuchi, Hiroshi Hiratsuka; Development of Silicon-containing Photosensitizer for Photodynamic Therapy; The 4th International Symposium for Young Elements Chemists 2009 Workshop on Organometallic Chemistry; 2009.10.28; Kasuga

11. 堀内 宏明・眞塩 広之・亀谷 剛大・吉村 公男・斉藤 裕太・石田真太郎・久新 莊一郎・松本 英之・穂坂正博・竹内 利之・平塚 浩士; 光線力学療法への応用を目指したケイ素型光増感色素の開発; 第20回基礎有機化学討論会; 2009.9.26 桐生
12. 堀内宏明・亀谷剛大・眞塩広之・穂坂正博・竹内利之・斉藤裕太・久新莊一郎・平塚浩士; 光線力学療法への応用を目指したケイ素型光増感色素の開発; 2009年光化学討論会; 2009.9.18; 桐生
13. 眞塩広之、堀内宏明、亀谷剛大、穂坂正博、竹内利行、石田真太郎、吉村公男、久新莊一郎、松本英之、平塚浩士; カルボキシル基を有する光線力学療法用癌ケイ素光増感色素の生体内での研究; 2009年光化学討論会; 2009.9.18; 桐生

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

1. 名称: 含ケイ素置換基を導入した化合物、並びにそれを含む一重項酸素発生剤及び癌治療薬

発明者: 堀内宏明、穂坂正博、平塚浩士、竹内利行、久新莊一郎、石田真太郎

権利者: 国立大学法人群馬大学

種類: 特願

番号: 2010-196568

出願年月日: 2010年9月2日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 宏明 (HORIUCHI HIROAKI)

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 00334136