

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19103

研究課題名(和文)効果的な放射線治療に向けた制動放射光子に反応する発光ナノ材料の探索と応用

研究課題名(英文)Exploration of luminescent nanomaterials responsive to bremsstrahlung photons for effective radiotherapy

研究代表者

小阪田 泰子(Osakada, Yasuko)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：00579245

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)：放射線治療の効率化は、さらに豊かな社会の発展にとって欠かせない研究課題であり、その新しい作用原理の開発が効率化の一つの解決方法と言える。特に、他療法との組み合わせは、がん選択的な治療も原理的に可能なため、大きな注目を集めている。本研究では、申請者が見いだしたナノ材料でのX線励起発光を発展させ、新しい原理の発見として、高エネルギーのLINAC照射への反応を調べるための実験系の立ち上げを行った。また、硬X線励起による発光機構を明らかにするために、Au20を新たに合成し、その光化学特性と硬X線励起発光の関係を詳細に調べ論文にまとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特に、放射線治療と他療法との組み合わせは、がん選択的な治療も原理的に可能なため、大きな注目を集めている。特に、選択性という点では、光化学反応を用いた光線力学療法や化学療法との組み合わせが重要になる。このために、「制動放射光子励起により発光するナノ材料」で、光化学反応を引き起こすことに着目した。しかし、そのような材料の報告例は少ない。それゆえ、今後、上記の観点を含めた、本研究の発光自体の学術的知見の探索をさらに発展させることで、新たな放射線化学の領域開拓にもつながり、学問的にも意義深い研究である。

研究成果の概要(英文)：Improving the efficiency of radiation therapy is a research topic that is essential for the society and the development of its new action principle can be one of the solution for improving efficiency. In particular, the combination with other therapies has been receiving a great attention because it is possible, in principal to treat cancer selectively. In this study, we investigated X-ray excited luminescence nano-materials that can be excited by electron beam from LINIAC as well as hard X-ray. In order to set up an experimental system to investigate the response to high-energy bremsstrahlung photons, we developed the measurement system using LINAC at ISIR Osaka university. Moreover, in order to clarify the mechanisms of emission by hard X-ray excitation, Au20 was newly synthesized and the relationship between its photochemical properties and hard X-ray excitation was investigated in detail.

研究分野：放射線化学

キーワード：ナノ材料 シンチレーション 発光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線治療の効率化は、さらに豊かな社会の発展にとって欠かせない研究課題であり、その新しい作用原理の開発が効率化の一つの解決方法と言える。特に、他療法との組み合わせは、がん選択的な治療も原理的に可能なため、大きな注目を集めている。特に、選択性という点では、光化学反応を用いた光線力学療法や化学療法との組み合わせが重要になる。このために、申請者は、「制動放射光子励起により発光するナノ材料」で、光化学反応を引き起こすことに着目した。しかし、そのような材料の報告例は少ない。それゆえ、発光自体の学術的知見の探索が出来れば、新たな放射線化学の領域開拓にもつながり、学問的にも意義深い研究テーマになる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が見いだしたナノ材料での X 線励起発光を進展させ、新しい原理の発見として、高エネルギーの制動放射光子への応答を明らかにすることである。また、効果的な放射線治療の開発へ展開するための基盤を確立する。放射線治療は、外科的な手術や化学療法と共にがんに対する主要な治療法の一つと言える。治療効果の高い放射線治療法が開発が望まれ、その方法の一つに、治療効果を高める「複合的治療法」が挙げられる。特に、光化学反応を用いた手法が目玉され、その光励起エネルギー源の可視光発光材料が必要になる。「光化学反応を用いた効果的な複合的治療法の開発」には、まず、放射線治療に用いる数 MeV 程度の制動放射光子に応答する発光ナノ材料自体の開拓調査が必要と考えた。

申請者は、これまでに診断用 50 keV の X-ray を励起光源として使用し、ナノ材料を用いた X 線励起発光イメージングを実施した。結果、Au₂₅ クラスタやイリジウム錯体含有ポリマーナノ粒子で発光が見られることを明らかにした。一方、診断目的に加え、放射線は治療にも重要な役割を果たす。X-ray 撮影に用いる診断用 X 線のエネルギーは 50 keV 程度であるのに対し、放射線治療に使われる小型リニアック (LINAC) は、数 MeV の制動放射光子を照射する。しかしながら、硬 X 線を含め、制動放射光子を用いた場合、生体親和性の高いナノ材料からの発光がどのような材料を用いれば起こるか現時点で知見はない。この発光の知見が得られれば、発光を化学反応の励起エネルギーとした、部位選択的なガス・治療薬の放出が可能になると考えた。

そこで、1. 大阪大学産業科学研究所量子ビーム施設内の LINAC の L-バンドからの 20 MeV 程度の電子線ビームでアルミ金属ターゲット存在下発生する制動放射光子を利用し、発光観察を試みた。また、2. 硬 X 線励起による発光機構を明らかにするために、Au₂₀ を新たに合成し、その光化学特性と硬 X 線励起発光の関係を詳細に調べた。

3. 研究の方法 4. 研究成果

1. LINAC 照射下での発光観察の試み

大阪大学産業科学研究所 LINAC を用いた発光観察に向けた予備実験を行った。阪大産研 LINAC の L バンド (24 MeV) 由来の電子線を、ターゲット金属のアルミ板 (5 cm) に照射し、目的とする X 線・電子線を発生させた。電子線照射下、デジタルカメラにて、黒色アクリル板に塗布したシンチレーター蛍光粉末 (ニコラ社製 #727) の発光を観察した。電子線のターゲット金属のアルミ板 (厚さ 5 cm) を用いた場合の、測定系写真 (図 1 右) と、デジタルカメラにて、黒色アクリル板に塗布したシンチレーター蛍光粉末 (ニコラ社製 #727) の発光を観察した結果を示した (図 2)。図からも明らかなように、シンチレーターの蛍光体 ZnS 由来の青色可視発光を確認した。これらの萌芽的実験結果をもとに、生体に利用可能なシンチレータの開発に今後取り組む。

2. Au₂₀ クラスタでの光化学特性と硬 X 線励起発光

発光プローブは、イメージングや診断に広く用いられている。将来的な生体深部での利用を可能にするために、発光プローブのための励起源として硬 X 線の利用が注目されている。しかし、硬 X 線励起光学ルミネセンス (hXEOL) を示す生体適合性の高いプローブの開発は限られており、さらなる研究が必要である。これまでに、我々は、タンパク質で保護された Au₂₅ クラスタを用いた hXEOL を報告した。ウシ血清アルブミン (BSA) 内包 Au₂₅ クラスタを用いて硬 X 線 (50 kVp) 照射時の発光を観測したが、Au₈ クラスタでは特徴的なコントラストは観測されなかった。本研究では、さらなる一般性と光化学特性との相関を調べるために、タンパク質

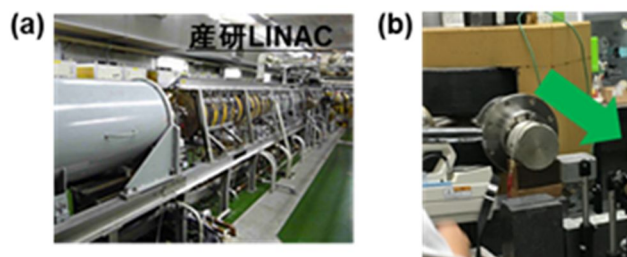


図 1. 用いた装置写真。

(a) 産研 LINAC と、(b) 電子線ポートの写真。

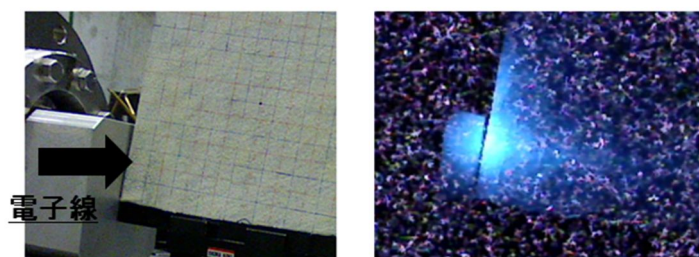


図 2. LINAC 由来制動放射光子照射による可視発光。

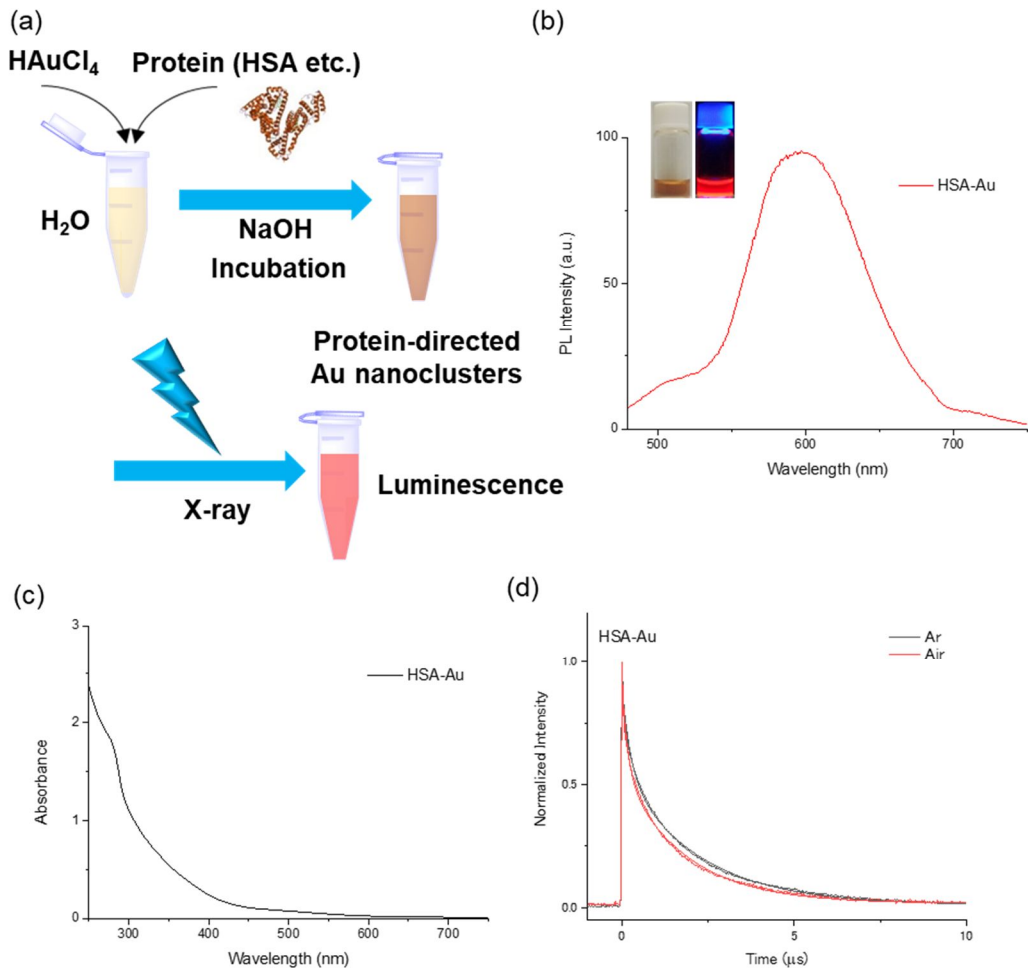


図 3. HAS 含有 Au₂₀ クラスターの光化学特性。(a) HAS 含有 Au₂₀ クラスターの合成方法。(b) 470 nm 励起での PL スペクトル。挿入図は自然光 (左) あるいは UV 光 (365 nm、右) 照射下でのサンプル写真。(c) HSA-Au の吸収スペクトル、(d) 355 nm ナノ秒レーザー照射による、空気 (赤)、アルゴン (黒) 下での 640 nm における PL 減衰カーブ。

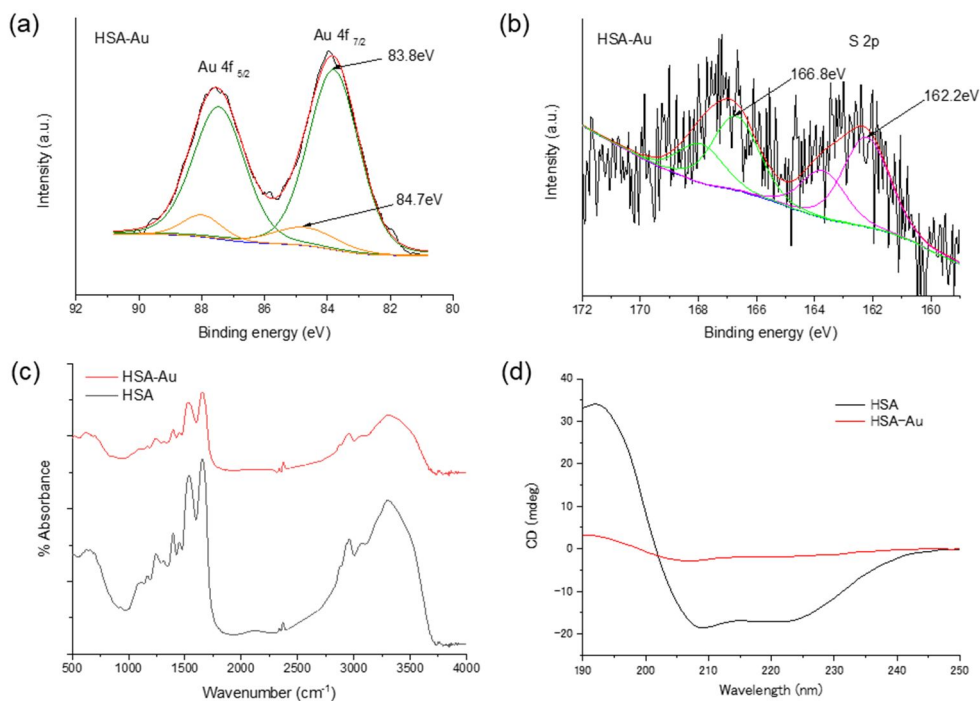


図 4. HSA-Au クラスターの構造評価。(a and b) XPS スペクトル。(c) FT-IR スペクトル。(d) CD スペクトル。

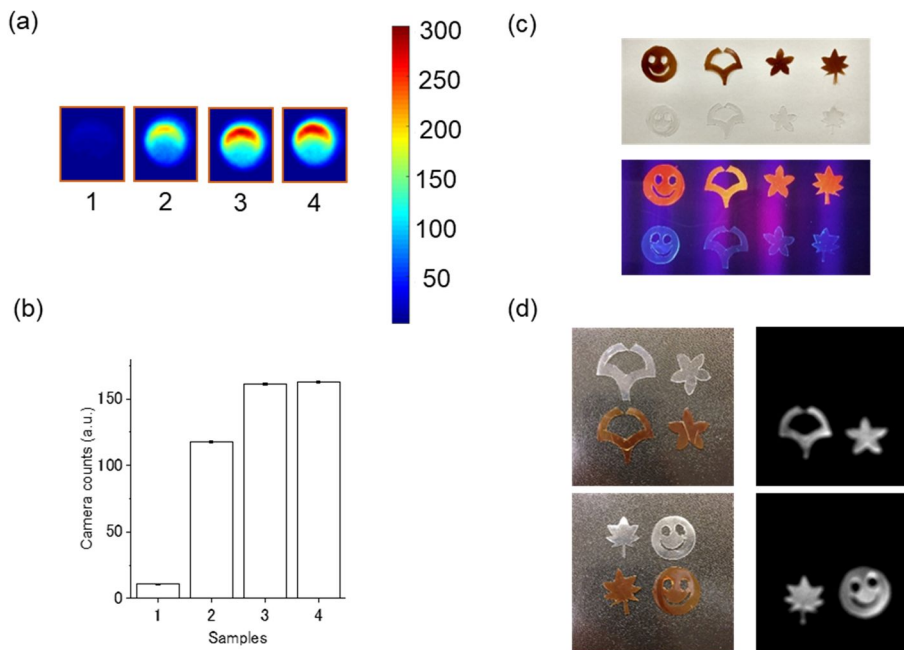


図 5. hXEOL イメージング。(a,b) イメージ像とそのコントラストの定量。(1) 水、(2) lactoferrin-Au (3) BSA-Au and (4) HSA-Au。(c,d) PVA フィルムでのコントラスト像。(c) 上：自然光、下：UV 光 (365 nm)照射下での写真。(d) 硬 X 線照射下でのイメージ。左：自然光、右：硬 X 線(60 kVp)照射下でのイメージ。

Au_{~20} クラスターの紫外-可視および硬 X 線照射下での発光特性を調べ、これらの物質の包括的な構造特性を明らかにした。

本研究では、タンパク質に内包された Au_{~20} クラスターを合成するために、human serum albumin (HSA), BSA, および lactoferrin を用いた (Fig. 1a)。これらの Au_{~20} clusters を合成するために、詳細は割愛するが pH11 条件下で既報に基づき合成した。合成したクラスターの PL と吸収スペクトルを示した (HAS の結果、Fig. 1b and c)。なお、本報告書では主に HSA の結果を以下に示している。すべてのタンパク質クラスターにおいて、tail 状の可視領域 (300-600 nm)における吸収バンドを確認した。一方、UV 光照射下 (365 nm)においては、特徴的な赤色発光を示した (Fig.1b 挿入図)。470 nm 励起での発光の絶対量子収率は、数%程度で、3.3% (BSA-Au_{~20}) to 6.7% (lactoferrin-Au_{~20}) (透析後)。なお、透析後には、発光ピークの 10 nm 程度の Blue シフトを認めた。370 nm の励起では、420 nm と 610 nm にピークを有する発光を観察し、それぞれ、チロシンダイマー酸化体と Au クラスターの発光に帰属した。クラスター自体の合成化学収率を測定するために、inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)測定を行ったところ、すべての場合において、金の収量は 6%で、化学収量は 80%–88%と見積もった。

次に、今回合成したクラスターの構造を決定した。まず、その分子量サイズを知るために matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) 質量スペクトルを測定した。その結果、金原子は 20 程度であることが分かった。Jellium model によると、今回の発光スペクトルから推定される金原子が、15–25 であったことから一致している。続いて、X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)測定により、Au 4f や S 2p の酸化状態を調べた (Figs. 2a, 2b)。その結果、~83.8 と 84.7 eV に、Au(0) and Au(I)の結合エネルギーに帰属されるピークを認めた。また、Au(I)を定量したところ、アルブミンタンパク質クラスターでは 11%、ラクトフェリンでは 15%であった。S2p に関しては、162.2 と 166.8 eV にピークを観察し、それぞれ、S-Au と S の酸化状態と帰属した。FT-IR スペクトルでは、アミド結合に特徴的なピークを観察し、合成反応前後での顕著な差はみられなかったことから、タンパク質の主鎖そのものには反応前後で大きな差がないことが分かった。(Fig. 2c)。CD スペクトルでは、タンパク質では、208 and 222 nm に負のピークが観察され、 α -helical 構造に帰属したが、反応後のクラスターサンプルでは、まったく観察されず、タンパク質の 2 次構造そのものは形成されていないことが分かった (Figs. 2d)。

次に、発光スペクトルの光化学的特性をさらに理解するために、PL 寿命を測定し、特に、その酸素の影響を調べた (Figs. 1d)。その減衰曲線から、酸素との反応はわずかであることが分かり、反応速度を見積もったところ、拡散律速 ($7.4 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)よりも 13 倍遅いことが分かった。なお、速度は以下の式から見積もった。 $(k_{\text{air}} = k_{\text{Ar}} + k_{\text{q}}[\text{O}_2])$ 。このことは、今回合成した金クラスターは、タンパク質の Shell に覆われており、酸素との反応が阻害されていることを示唆している。

最後に、硬 X 線発光イメージングを行った。凍結乾燥体を水で溶解し、96-穴プレートにサンプルを入れ、EM-CCD カメラを用いて、硬 X 線照射下での発光イメージングを行った (Fig. 3)。その結果、3 つのタンパク質全てで明瞭なシグナルを観察し、特にアルブミン類でシグナルがやや増加していることが分かった。We (Fig. 3a, b)。このことは、上述の実験から推測すると、PL 発光寿命が長いことや Au(0)の含有比率が多いことがその発光増加の要因と考察したが、更なる詳細については現在検討を行っている。加えて、合成したクラスターをフィルム状にしたものでも硬 X 線イメージング実験を行い、その発光を観察した (Fig. 3c,d)。

その他、光応答性ナノ材料に関する研究も行い、今後の放射応答性ナノ材料の開発に関する基礎的知見も得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Liu Zuoyue, Jung Kyung Oh, Takahata Ryo, Sakamoto Masanori, Teranishi Toshiharu, Fujitsuka Mamoru, Pratz Guillem, Osakada Yasuko | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Hard X-ray excited optical luminescence from protein-directed Au ₂₀ clusters | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 RSC Advances | 6. 最初と最後の頁 13824 ~ 13829 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ra01935f | 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 |
| 1. 著者名 Fan Zeyu, Nomura Kota, Zhu Mingshan, Li Xinxu, Xue Jiawei, Majima Tetsuro, Osakada Yasuko | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Synthesis and photocatalytic activity of ultrathin two-dimensional porphyrin nanodisks via covalent organic framework exfoliation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Communications Chemistry | 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) 10.1038/s42004-019-0158-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tanaka Atsushi, Liu Zuoyue, Osakada Yasuko | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Synthesis of unsymmetric perylenediimide dye molecule and its photochemical properties on lipid membrane | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 1899 ~ 1903 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.05.053 | 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 - |
| 1. 著者名 Li Xinxu, Goto Tomoyo, Nomura Kota, Zhu Mingshan, Sekino Tohru, Osakada Yasuko | 4. 巻 513 |
| 2. 論文標題 Synthesis of porphyrin nanodisks from COFs through mechanical stirring and their photocatalytic activity | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Applied Surface Science | 6. 最初と最後の頁 145720 ~ 145720 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apsusc.2020.145720 | 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Osakada Yasuko, Fukaminato Tuyoshi, Ichinose Yuma, Fujitsuka Mamoru, Harada Yoshie, Majima Tetsuro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Live Cell Imaging Using Photoswitchable Diarylethene-Doped Fluorescent Polymer Dots | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry - An Asian Journal | 6. 最初と最後の頁 2660 ~ 2665 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201701038 | 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 - |

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yasuko Osakada |
| 2. 発表標題 Development of photo-functional nanomaterials with new properties and their application to bioscience |
| 3. 学会等名 日本化学会第100回春年会2020 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 LIU, Zuoyue; OSAKADA, Yasuko |
| 2. 発表標題 Synthesis and application of photo-luminescent polymer dots doped with iridium complex |
| 3. 学会等名 日本化学会第100回春年会2020 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Zuoyue Liu, Yasuko Osakada |
| 2. 発表標題 Photoluminescence and X-ray imaging of protein-directed gold clusters |
| 3. 学会等名 放射線化学討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 LIU, Zuoyue · OSAKADA, Yasuko |
| 2. 発表標題 Synthesis and photoluminescence of gold nanoclusters directed by various proteins |
| 3. 学会等名 光化学討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 LIU, Zuoyue; OSAKADA, Yasuko |
| 2. 発表標題 Synthesis and photo-luminescent properties of iridium complexes doped polymer dots |
| 3. 学会等名 日本化学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yasuko Osakada |
| 2. 発表標題 Radiation and photochemistry based bioscience |
| 3. 学会等名 2019 The 4th Osaka Univ KAERI Joint Workshop on Radiation Research |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小阪田 泰子 |
| 2. 発表標題 光・放射線機能性分子・ナノ材料の光化学・放射線化学反応による生物イメージングと生体機能操作 |
| 3. 学会等名 高等共創研究院キックオフシンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 小阪田泰子 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 2 |
| 3. 書名 74. ダウンコンバージョンプローブ『実験医学』増刊号イメージングの選び方・使い方100+ | |

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|