

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15523

研究課題名（和文）光アンテナ含有フラーレンナノ粒子の光線力学治療薬としての応用

研究課題名（英文）Application of fullerene nanoparticles containing antenna molecules as photodynamic therapeutic agents

研究代表者

杉川 幸太（Sugikawa, Kouta）

広島大学・先進理工系科学研究科（工）・助教

研究者番号：60745503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では光捕集効果を持つアンテナ分子としてポルフィリン誘導体およびフタロシアニン誘導体を含有したフラーレンナノ粒子を合成した。結果、3種類のポルフィリン誘導体および1種類のフタロシアニン誘導体を含有したフラーレンナノ粒子を世界で初めて合成することに成功した。これらのアンテナ分子含有フラーレンナノ粒子はアンテナ分子を含まないフラーレンナノ粒子に比べて、光照射時の一重項酸素発生量が10から31%増大することが明らかになった。さらに、種々のフラーレン誘導体を用いたナノ粒子の合成および金ナノ粒子/フラーレン複合材料の合成にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにフラーレンナノ粒子を合成する研究は世界各地で行われているが、実用化に向けての道筋は示されていない。本研究において、シクロデキストリンと複合化したフラーレンが水中で不安定化しナノ粒子を形成する際に、さまざまな分子を含有することを世界で初めて明らかにした。また、ポルフィリン誘導体はフタロシアニン誘導体を含有したフラーレンナノ粒子は、光照射による一重項酸素発生量が増大することも明らかになった。これらの成果は水中での取り扱いが難しいフラーレンをナノ粒子の形で応用する上で学術的にも産業的にも重要な技術になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, fullerene nanoparticles containing a porphyrin derivative and a phthalocyanine derivative were synthesized as antenna molecules having a light-harvesting effect. As a result, we succeeded in synthesizing fullerene nanoparticles containing three types of porphyrin derivatives and one type of phthalocyanine derivative for the first time in the world. It was clarified that these fullerene nanoparticles containing antenna molecules increased the amount of single-term oxygen generated during light irradiation by 10 to 31% as compared with the fullerene nanoparticles containing no antenna molecules. Furthermore, we have succeeded in synthesizing nanoparticles using various fullerene derivatives and synthesizing gold nanoparticles / fullerene composite materials.

研究分野：超分子化学

キーワード：フラーレン ナノ粒子 光アンテナ分子 光線力学療法 シクロデキストリン ホストゲスト化学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新しいがん治療法として光線力学治療法 (PDT) が注目されている。光線力学治療法とは、光増感剤 (PDT 薬剤) が可視光によって励起され溶存酸素を一重項酸素にすることによってがん細胞を破壊しようとするものである。このため、光が当たらない限りは PDT 薬剤の毒性が低いと副作用が少ないこと、さらに組織 (臓器) を温存できるという利点がある。実際、大腸がん、胃がん、肺がん、子宮頸部がん、脳腫瘍などに対して、非常によい治療効果を上げている。現在、日本国内ではいくつかのポルフィリン誘導体が PDT 薬剤として認可され実用化されており、リウマチや加齢黄斑変性への応用研究も進められている。しかし、その普及には問題が残されている。例えば、(1) 治療効果をより向上させるためには、皮膚透過性のより高い長波長領域の光照射に対して、PDT 薬剤の活性をさらに高める必要があること、(2) 術後に光線過敏症の問題があるために薬物が代謝されるまで患者は暗所に 1 週間程度隔離されなければならないこと、が挙げられる。そこで、ポルフィリン誘導体に代わる、より有効な PDT 薬剤として、高い一重項酸素発生効率を持つフラーレンが多く研究者によって注目されている。しかし、フラーレンは水溶化が困難であること、さらに PDT に最適とされる波長領域 (600~800 nm) の吸収が非常に小さいことなどから、実用化に至るフラーレン PDT 薬剤の開発には至っていない。

2. 研究の目的

フラーレン材料の中でも、ナノサイズのフラーレン結晶 (フラーレンナノ粒子) は分散剤なしで水に安定分散し、光照射に対する一重項酸素発生能も維持していることから、PDT 薬剤として高いポテンシャルを有している。申請者は、シクロデキストリンで水溶化されたフラーレンをポリエチレングリコール (PEG) などの高分子化合物で追い出すことでフラーレンナノ粒子を形成させる手法を開発し、有機溶媒を使わずに形状とサイズが均一なフラーレンナノ粒子を合成することに成功した [RSC Adv., 6, 74696-74699 (2016)]。しかし、本手法で合成したフラーレンナノ粒子において、(i) 近紫外光から可視光領域 (350 - 500 nm) の光照射に対して効率よく一重項酸素を生成するが、長波長 (600 - 800 nm) の光照射では一重項酸素をほとんど生成しないこと、(ii) フラーレンナノ粒子の表面は負電荷を帯びており細胞導入効率が悪く、細胞選択性も低い (光線過敏症の原因のひとつになる) ことが問題として残った。

そこで、本申請課題ではこれらの問題を次の方法で解決することを考えた。問題 (i) は、600-800 nm の領域に吸収帯を持ちフラーレンに対して効率よくエネルギー移動を起こす光アンテナ分子 (有機色素分子) をフラーレンナノ粒子に導入することで解決する。問題 (ii) は、様々な官能基を持つフラーレン誘導体を利用したフラーレンナノ粒子の合成および高分子化合物との複合化によるフラーレンナノ粒子の表面改質により解決を目指す。また、がん細胞が認識する官能基を導入すること、EPR効果が期待される 200 nm 前後にサイズ調整することで、フラーレンナノ粒子のがん細胞への選択的導入も試み、光線過敏症への対策も講じる。

3. 研究の方法

(1) アンテナ分子含有フラーレンナノ粒子の合成

図1および図2に示す6種類のポルフィリン誘導体およびフタロシアニン誘導体を用いて、アンテナ分子含有フラーレンナノ粒子 (nC60-有機色素) を合成した。合成手段としてシクロデキストリンを介した交換反応法を用いた。

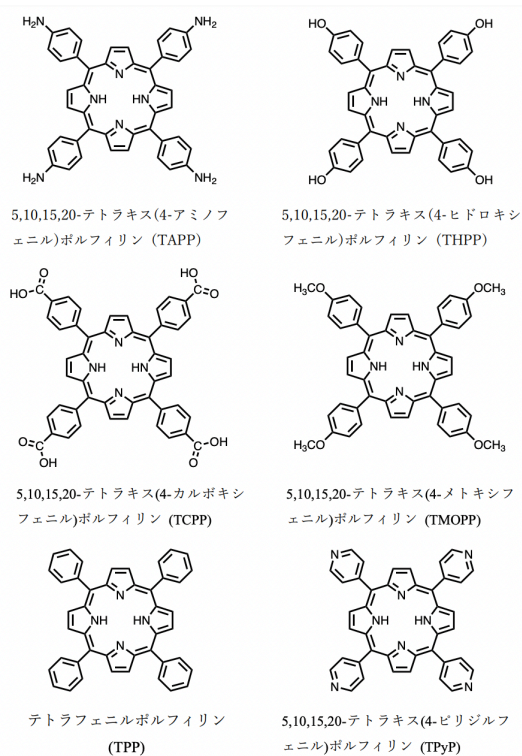


図1. 実験に用いたフラーレン誘導体とその名称

(2) フラーレン誘導体を用いたフラーレンナノ粒子の合成

図3に示す6種類のフラーレン誘導体を用いてフラーレンナノ粒子の合成を試みた。

(3) フラーレン誘導体を用いたアンテナ分子含有フラーレンナノ粒子の合成

(4) 金ナノ粒子/フラーレン複合ナノ粒子の合成

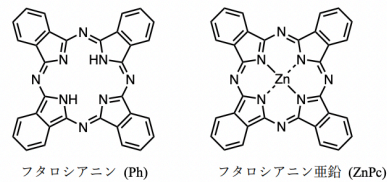


図2. 実験に用いたフタロシアニン誘導体とその名称

4. 研究成果

(1) アンテナ分子含有フラーレンナノ粒子の合成

$^1\text{H-NMR}$ 測定、UV-vis 吸収スペクトル測定、DLS 測定、ゼータ電位測定および TEM 観察により、合成した nC60-有機色素の評価を行なった。

$^1\text{H-NMR}$ 測定および UV-vis 吸収スペクトル測定から、nC60-TAPP、nC60-THPP および nC60-TCPP は複合体が形成されていないと示唆された。

nC60-TPyP は、C60 と TPyP と一部複合化していることが示唆されたが、十分ではなく溶液には沈殿も生じていた。

$^1\text{H-NMR}$ 測定および UV-vis 吸収スペクトル測定から、nC60-TMOPP および nC60-TPP では複合体の形成が示唆された。DLS 測定では、nC60 に比べ、nC60-TMOPP および nC60-TPP の粒径が大きくなっており負電荷を帯びているため安定して水中で分散していることが考えられる。TEM 画像からは nC60 に比べ、nC60-TMOPP および nC60-TPP 粒子はでこぼこしていることが確認できた。この結果は、nC60 と TMOPP および TPP が複合化していることをより明確に示唆することになった。

nC60-ZnPc および nC60-Pc は、 $^1\text{H-NMR}$ 測定では ZnPc および Pc/HP- β -CDx 錯体が検出できなかったため錯体崩壊は確認できなかったが、UV-vis 吸収スペクトル測定にて複合化が示唆された。DLS 測定では、負電荷を帯びていることが確認でき、これより水中で安定して分散していると考えられる。TEM 画像から nC60 に比べ、nC60-ZnPc および nC60-Pc が会合していることが確認できた。ZnPc および Pc は会合しやすい性質を持っているため、その性質が引き継がれたと考えられ、このこともまた、複合体形成をより示唆した。

(2) nC60-有機色素の一重項酸素発生能評価

合成した複合体の活性酸素種発生能の評価を行なった。一重項酸素発生能評価では、nC60のみよりも複合体の方が高い一重項酸素発生能を有していることが示唆された。これは、有機色素から電子移動が起こった結果と考えられる。スーパーオキシドアニオン発生能評価では、NADH 存在下ではすべての複合体が nC60 よりもスーパーオキシドアニオンが発生していた。一方で、NADH 非存在下では、nC60 および複合体はスーパーオキシドアニオンをほとんど発生していなかった。これより、細胞内のミトコンドリア内などの NADH 存在で選択的に PDT 活性を示す可能性が示唆された。

(3) フラーレン誘導体を用いたフラーレンナノ粒子の合成

図3に示すフラーレン誘導体 (C60-D) を用いて、フラーレンナノ粒子の合成を試みた。C60-2 は、PEG の有無にかかわらず、80 °Cに錯体溶液を加熱することで溶液中のすべての錯体が崩壊し、nC60-2 が形成することが分かった。C60-4 については、PEG の有無にかかわらず、錯体溶液を 90°Cで加熱することで溶液中のすべての錯体が崩壊した。しかし、PEG なしの場合、C60-4 は水に分散する粒子を形成せず、会合体となり沈殿した。一方、PEG を添加した場合、C60-4 は水に分散する会合体を形成した。この会合体の TEM 観察を行ったところ、球状では

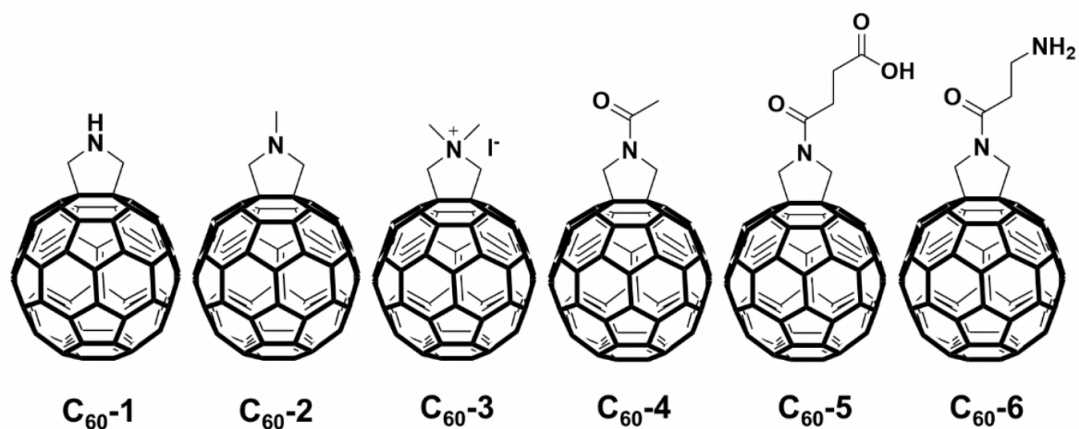


図3. 実験に用いたフラーレン誘導体とその名称

なく、ロッド状の構造体が確認された。C₆₀-4 がこのような構造体を形成した理由は明確には分からないが、これは合成条件ではなく、C₆₀-4 の分子構造によるところが大きいとみられる。続いて、C₆₀-1 については、PEG を 50 g/L の高濃度にし、さらに加熱温度を 100°C まで上昇させることで、溶液中のすべての錯体を崩壊させ、nC₆₀-1 を合成することに成功した。C₆₀-5 や C₆₀-6 については、錯体の非常に安定性が高く、さらに錯体を不安定化する必要があった。PEG の分子量を 2000 から 10000 に変更し、さらに、モル比 1:2 で調製した錯体を用いることで、ほぼすべての錯体を崩壊させ、水に分散する nC_x を合成することに成功した。この結果から、フラーレンに対する γ -CD_x 濃度が低いほど、錯体は不安定になることが明らかとなった。最後に、C₆₀-3 については、ほかの C₆₀-D で試みた最も錯体を不安定化できる条件 (PEG20000 添加, 100°C 加熱, モル比 1:2 調製した錯体を用いる) でも、反応進行度は 55% 程度であった。それでも、一部崩壊した錯体の C₆₀-3 は、10~20 nm のサイズの小さな粒子を形成していることを TEM 観察から確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taiki Nishiyama, Kento Sugiura, Kouta Sugikawa, Atsushi Ikeda, Toshihisa Mizuno	4. 巻 40
2. 論文標題 Construction of protein-loadable protein cages using the hybrid proteins of the olefin hydrophobic domain and hydrophilic dimeric coiled-coil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloid and Interface Science Communications	6. 最初と最後の頁 100352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colcom.2020.100352	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 Kouta Sugikawa, Kosuke Masuda, Kentaro Kozawa, Riku Kawasaki, Atsushi Ikeda	4. 巻 11
2. 論文標題 Fullerene porphyrin hybrid nanoparticles that generate activated oxygen by photoirradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 1564-1568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ra09387d	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 Shodai Hino Rikushi Funada Dr. Kouta Sugikawa Dr. Riku Kawasaki Prof. Kazuya Koumoto Dr. Toshio Suzuki Prof. Takeshi Nagasaki Prof. Atsushi Ikeda	4. 巻 16
2. 論文標題 Mechanism toward Turn on of Polysaccharide Porphyrin Complexes for Fluorescence Probes and Photosensitizers in Photodynamic Therapy in Living Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 793-803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.202000656	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 Shodai Hino Dr. Kouta Sugikawa Dr. Riku Kawasaki Dr. Hisakage Funabashi Prof. Akio Kuroda Prof. Atsushi Ikeda	4. 巻 4
2. 論文標題 Aggregation Induced Emission and Retention of Crystal Chiral Information of Tetraphenylethylene Incorporated by Polysaccharides in Water	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemPhotoChem	6. 最初と最後の頁 577-581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ptc.202000022	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 D. Antoku, K. Sugikawa, A. Ikeda	4. 巻 28
2. 論文標題 Photodynamic Activity of Fullerene Derivatives Water-Solubilized by Natural Product-Based Solubilizing Agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Eur. J.	6. 最初と最後の頁 1854 - 1865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201803657	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 T. Nakaya, B. Horiguchi, S. Hino, K. Sugikawa, H. Funabashi, A. Kuroda A. Ikeda	4. 巻 18
2. 論文標題 Stabilisation of Lipid Membrane-Incorporated Porphyrin Derivative Aqueous Solutions and Their Photodynamic Activities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photochem. Photobiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 459 - 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8PP00350E	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 S. Hino, R. Funada, K. Sugikawa, K. Koumoto, T. Suzuki, T. Nagasaki, A. Ikeda	4. 巻 18
2. 論文標題 Turn-on Fluorescence and Photodynamic Activity of (1,3-1,6)-D-Glucan-Complexed Porphyrin Derivative Inside HeLa Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photochem. Photobiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2854-2858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9PP00208A	査読の有無 無
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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 杉川 幸太・井上 裕也・河崎 陸・池田 篤志
2. 発表標題 ゲスト交換反応を利用したハイドロゲルへのフラーレンの導入
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日野 彰大・杉川 幸太・河崎 陸・甲元 一也・鈴木 利雄・長崎 健・池田 篤志
2. 発表標題 Turn-on型光線力学治療薬および診断薬の機能を有するポルフィリン誘導体-多糖複合体の調製
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安徳 大輝・河崎 陸・杉川 幸太・池田 篤志
2. 発表標題 活性部位-光捕集部位二元系を用いることによる光線力学活性の向上
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 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

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