

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655128

研究課題名(和文)水溶性シクロデキストリン・フラレーン誘導体錯体を用いる新規光材料の開発

研究課題名(英文) Novel photo-materials using water-soluble cyclodextrin/fullerene derivative complexes

研究代表者

池田 篤志 (Ikeda, Atsushi)

広島大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90274505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：最近、水溶性フラレーンは、活性酸素種を発生できる優れた光増感剤としての利用について報告がなされている。シクロデキストリン(CDx)と錯化したフラレーンはCDxに包接されることによって水中で孤立分散している。その光活性を向上させるためには、フラレーンの機能化が重要であるが、我々は機能化したフラレーン誘導体がCDxと安定な錯体を形成することを報告した。

本申請課題で、我々はCDxと錯化したフラレーン誘導体の光線力学活性を比較した。我々は、フラレーン誘導体のCDx錯体がこの長波長(610nm以上)での光照射でがん細胞HeLa細胞に対して非常に高い光線力学活性を示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Water-solubilized fullerenes have recently been reported for their use as potential photosensitizers because fullerenes are efficient visible-light triplet-sensitizers with the generation of reactive oxygen species. Cyclodextrin (CDx)-complexed fullerenes can be isolated as independent units through CDx inclusion in water. To improve the photoactivity, it is important that the fullerenes are functionalized. Recently, we reported that several functionalized fullerene derivatives could form stable complexes with CDx.

Herein, we investigated a comparison of the photodynamic activities of CDx-complexed fullerene derivatives. We have succeeded that the CDx complexes of fullerene derivatives showed significantly high levels of photodynamic activity toward cancer HeLa cells under photoirradiation at long wavelengths (>610 nm).

研究分野：超分子化学

キーワード：フラレーン シクロデキストリン ホスト-ゲスト化学 光線力学治療 がん治療

1. 研究開始当初の背景

γ -シクロデキストリン (γ -CDx) は C_{60} と 2:1 の錯体を形成し、 C_{60} を水溶化できる。そのため、水中において高い光活性を持つ C_{60} の種々の応用が考えられるが、錯体の発見から既に約 20 年が経過するにも関わらず、錯体の応用研究はほとんど報告されていなかった。この最も大きな理由は (i) γ -CDx の位置選択的な化学修飾が困難であること、および (ii) 化学修飾した γ -CDx 誘導体は C_{60} を包接できなくなるためである。しかし、 $C_{60} \cdot \gamma$ -CDx 錯体は C_{60} を孤立化した状態で水溶化できることから材料としては非常に魅力的であった。

そのような中、我々は特定の置換基を導入した C_{60} 誘導体が γ -CDx と 2:1 型の錯体を形成でき、しかも未修飾 C_{60} とほぼ同じ 1~1.5 mM の濃度で水溶化されることを見出した (図 1)。このとき、 C_{60} の置換基が、2 個の重なった CDx の間から出た構造、または一方の γ -CDx の空孔から出た構造の 2 種類が考えられるが、単結晶 X 線構造解析の結果、後者の擬ロタキサン構造を有していることが明らかとなった。さらに、置換基の R 部位として、様々な置換基を導入できることが明らかとなった。そこで、R 部位に“金属表面への結合部位”、“がん細胞表面の認識部位”などを導入することによって、本来 C_{60} が持つ光機能を十分に発揮できる、従来にはない機能材料分野への応用を目指すという着想に至った。

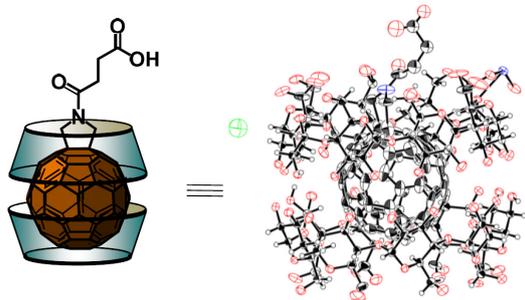


図 1. フラーレン誘導体・ γ -CDx 錯体の模式図と X 線構造解析

2. 研究の目的

我々は初めてフラーレン誘導体がシクロデキストリンと錯体を形成して、高濃度で水溶化できることを発見した。この結果、機能性官能基をフラーレンに導入すれば、従来不可能であった、種々の界面との相互作用が可能となり、新規物性の探索への道が開け、極めて広い分野への応用が期待される。そこで我々は、①エネルギー分野への応用：金属ナノ粒子や電極基板への修飾による光電変換素子への応用、②環境分野への応用：光によって活性酸素を発生する性質を利用した有害物質の光分解への応用、③医療分野への応用：水溶性を利用したがん治療や目の病気である加齢黄斑変性に対する光線力学治療薬への応用、を目指し、

新機能材料への道を開くことを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的に合った新規なフラーレン誘導体を合成し、シクロデキストリンによる水溶化を行った。錯体の確認を $^1\text{H NMR}$ 、可視紫外吸収、マススペクトルで確認した。これらの錯体を用いて、主に目的③の細胞実験を行った。がん細胞である HeLa 細胞の培地にフラーレン誘導体・シクロデキストリン錯体を添加し、細胞に取り込ませた。その後、培地を入れ替え、長波長 (> 610 nm) の光照射を行い、細胞の生存率を測定した。

4. 研究成果

(1) フラーレン誘導体・シクロデキストリン錯体の水溶化に及ぼす置換基の影響

まず、どのような置換基のフラーレン誘導体の場合にシクロデキストリンと錯形成ができ、水溶化できるのかについて検討を行った。用いた化合物を図 2 および 3 に示す。

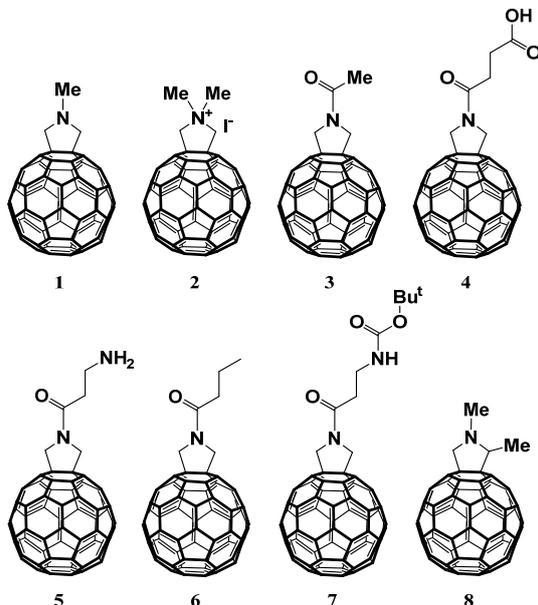


図 2. フラーレン誘導体の構造 (1)

まず、ピロリジンを有する誘導体について検討した。その結果、シクロデキストリンによる可溶化能は、 $2 > 1 > 4 > 3$ の順であった。カルボニル基を持たない **1** と **2** のほうがカルボニル基を持つ **3** と **4** よりもよく溶けるため、カルボニル基の立体障害の影響が考えられた。そこで、**5** を合成したところ最も高い溶解度を示した。これらの結果から末端の親水性が重要なのではないかと考えられた。そこで、末端が疎水性である **6** と **7** を合成したところ、ほとんど溶けないことがわかり、末端の親疎水性が重要であることが確認された。これらの結果より、 $1 > 3$ の順であるのは末端のメチル基が **3** のほうがよりシクロデキストリンの外に出ているためであると考えら

れる。また、ピロリジンの2位の影響を調べるために **8** を合成した。化合物 **5** は **1** に比べ約半分ほどの溶解度になるが、可溶化できることが示された。

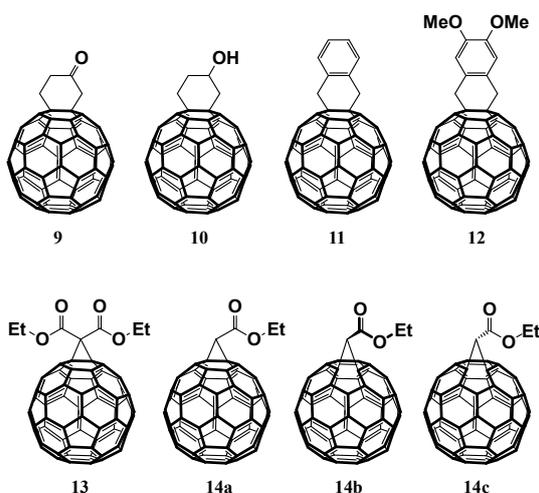


図3. フラレーン誘導体の構造 (2)

さらに、六員環を置換基に持つ **9** ~ **12** について検討した。親水性の置換基が末端にない **11** 以外は可溶化できた。このため、ピロリジンの様な五員環のみではなく、六員環についても水溶化できることが示された。

一方、**13** の様に立体障害の大きな置換基では水溶化できないことがわかっていたが、**14** のように置換基を一つにすると可溶化できた。

以上の結果より、六員環の置換基でもシクロデキストリンの上端の空孔を貫通することができ、その可溶可化能は末端の親水性が大きく寄与することがわかった。フラレーン誘導体間での安定性の違いはそれほど大きくなく、溶解性とは相関がないことがわかった。このとき、カルボニル基のような極性基が水と相互作用することで、シクロデキストリンが外れにくくなっていることがシミュレーション結果から明らかになった。

(2) フラレーン誘導体・シクロデキストリン錯体の安定性

水溶化できたフラレーン誘導体について、そのシクロデキストリンとの安定性を評価した。DMSO を水溶液に加えていくことで、錯体が崩壊を見た。その結果、**C₇₀** が最も不安定で、次に **C₆₀**、そしてフラレーン誘導体の順であることがわかった。

(3) 電極基板への修飾

電極基板にフラレーン誘導体・シクロデキストリン錯体を修飾できれば、フラレーン誘導体が孤立分散した状態で積層することができる。このことは、光励起子の自己失活を抑えられ、光電変換素子などでの

量子収率の向上が期待される。そこで、基板との相互作用が可能な置換基をもつフラレーン誘導体 **1, 2** の合成を行った。その結果、**1** の合成に成功した。

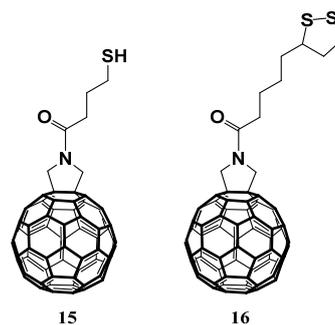


図4. フラレーン誘導体の構造 (3)

合成に成功した **1** についてシクロデキストリンとの錯体形成を試みた。その結果、溶解性が非常に悪いことがわかった。末端が SH 基であれば、水溶化できるものと考えたが、より水溶性が必要なことがわかった。現在は、他の置換基で、基板への積層を試みており、最終的にはシクロデキストリンの有無による光電流の違いを検討する。

(4) 光線力学活性の評価

フラレーン誘導体 **1**~**3**・シクロデキストリン錯体のがん細胞である HeLa 細胞に対する光線力学活性、つまり可視光照射によってがん細胞がどれほど殺傷できるかについて検討した。

用いた波長は 610 nm 以上の光で、光線力学治療に最も適した波長領域で検討を行った。その結果、**2** が最も高い光線力学活性を示した。この理由は、(i) **2** と **3** が **1** に対して高い一重項酸素発生能を持つため、および (ii) **2** が最も高い細胞取り込み能を持つための二点である。(i) の原因は、**1** はアミンを持つためアミンのローンペアによる失活が起こり、活性低下が見られることが実験的に確かめられた。(ii) の原因は、アニオン性の細胞表面を有するため、カチオン性の **2**・シクロデキストリン錯体が細胞表面に接着し、細胞内に取り込まれたものと考えられた。これらの要因はかけ算で効いてくるため、**2** が最も高い光線力学活性を示したことになる。この **2**・シクロデキストリン錯体の光線力学活性は、未修飾の **C₆₀** および **C₇₀**・シクロデキストリン錯体に比べ、圧倒的に高いものであった。また、現在光線力学治療において最もよく使用されているフォトリンに比べても、より高い活性を有することが示された。

今後、がん細胞を特異的に認識できる置換基を導入することで、細胞導入量を上げるとともに、正常細胞への導入が起こらないようにすることで光線力学治療薬への実用を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 18 件)

- (1) A. Ikeda, S. Hino, K. Ashizawa, K. Sugikawa, J. Kikuchi, M. Tsukamoto, K. Yasuhara, Lipid-Membrane-Incorporated Hydrophobic Photochromic Molecules Prepared by the Exchange Method Using Cyclodextrins, *Org. Biomol. Chem.*, **13** (22), 6175–6182 (2015). 査読有
- (2) J. Li, Y. Aizawa, K. Hiramoto, E. Kasahara, D. Tsuruta, T. Suzuki, A. Ikeda, H. Azuma, T. Nagasaki, Anti-Inflammatory Effect of Water-Soluble Complex of 1'-Acetoxychavicol Acetate with Highly Branched β -1,3-Glucan on Contact Dermatitis, *Biomed. Pharmacother.*, **69**, 201–207 (2015). 査読有
- (3) A. Ikeda, K. Kiguchi, T. Hida, K. Yasuhara, K. Nobusawa, M. Akiyama, W. Shinoda, [70]Fullerenes Assists the Formation of Phospholipid Bicelles at Low Lipid Concentrations. *Langmuir*, **30** (41), 12315–12320 (2014). 査読有
- (4) A. Ikeda, T. Hida, T. Nakano, S. Hino, K. Nobusawa, M. Akiyama, K. Sugikawa, Stability of Lipid-Membrane-Incorporated Azobenzene and Pyrenes in Water, *Chem. Lett.*, **43** (10), 1551–1553 (2014). 査読有
- (5) S. Mieda, A. Ikeda, Y. Shigeri, W. Shinoda, Thermodynamic Stability of [60]Fullerene and γ -Cyclodextrin Complex in Aqueous Solution: Free Energy Simulation. *J. Phys. Chem. C*, **118** (23), 12555–12561 (2014). 査読有
- (6) A. Ikeda, T. Hida, T. Iizuka, M. Tsukamoto, J. Kikuchi, K. Yasuhara, Dynamic Behaviour in Giant Unilamellar Vesicles Induced by the Uptake of [70]Fullerene, *Chem. Commun.*, **50** (11), 1288–1291 (2014). 査読有
- (7) A. Ikeda, T. Hida, J. Kikuchi, K. Nobusawa, T. Matsuo, NMR Spectroscopic Study of the Complexation Behaviors of Deuterated Cyclodextrins and [60]Fullerene, *Org. Lett.*, **15** (24), 6194–6197 (2013). 査読有
- (8) A. Ikeda, A. Hirata, M. Ishikawa, J. Kikuchi, S. Mieda, W. Shinoda, Effect of Different Substituents on the Water-Solubility and Stability Properties of [60]Fullerene Derivative•Gamma-Cyclodextrin Complexes, *Org. Biomol. Chem.*, **11** (45), 7843–7851 (2013). 査読有
- (9) A. Ikeda, M. Ishikawa, J. Kikuchi, K. Nobusawa, Enantioselective Recognition of [60]Fullerene-Bisadducts by Cyclodextrin: Kinetic Control of a Mechanochemical High-Speed Vibration Milling Process, *Chem. Lett.*, **42** (10), 1137–1139 (2013). 査読有
- (10) A. Ikeda, Water-soluble fullerenes using solubilizing agents, and their applications, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **77** (1-4), 49–65 (2013). 査読有
- (11) S. Koeda, K. Umezaki, A. Sumino, T. Noji, A. Ikeda, Y. Yamamoto, T. Dewa, K. Taga, M. Nango, T. Tanaka, T. Mizuno, Creation of Cross-linked Bilayer Membranes That Can Incorporate Membrane Proteins from Oligo-Asp-Based PG-Surfactants, *Langmuir*, **29** (37), 11695–11704 (2013). 査読有
- (12) S. Koeda, K. Umezaki, T. Noji, A. Ikeda, K. Kawakami, M. Kondo, Y. Yamamoto, J.-R. Shen, K. Taga, T. Dewa, S. Itoh, M. Nango, T. Tanaka, T. Mizuno, Application of Peptide Gemini Surfactants as Novel Solubilization Surfactants for Photosystems I and II of Cyanobacteria, *Langmuir*, **29** (37), 11667–11680 (2013). 査読有
- (13) J. Fujii, K. Nobusawa, A. Ikeda, H. Yanagi, A. Yamamoto, T. Yoshida, Field Electron Emission from Carbon Nanotube/ZnO Composite Films Prepared by Electrodeposition, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **52** 091801 (2013). 査読有
- (14) A. Ikeda, T. Iizuka, N. Maekubo, R. Aono, J. Kikuchi, M. Akiyama, T. Konishi, T. Ogawa, N. Ishida-Kitagawa, H. Tatebe, K. Shiozaki, Cyclodextrin Complexed [60]Fullerene Derivatives with High Levels of Photodynamic Activity by Long Wavelength Excitation, *ACS Med. Chem. Lett.*, **4** (8), 752–756 (2013). 査読有
- (15) A. Ikeda, M. Ishikawa, R. Aono, J. Kikuchi, M. Akiyama, W. Shinoda, Regioselective Recognition of a [60]Fullerene-Bisadduct by Cyclodextrin, *J. Org. Chem.*, **78** (6), 2534–2541 (2013). 査読有
- (16) C. Komeda, A. Ikeda, J. Kikuchi, N. Ishida-Kitagawa, H. Tatebe, K. Shiozaki, M. Akiyama, A Photo-Triggerable Drug

Carrier Based on Cleavage of PEG Lipids by Photosensitizer-Generated Reactive Singlet Oxygen, *Org. Biomol. Chem.*, **11** (16), 2567-2570 (2013). 査読有

- (17) K. Nobusawa, M. Akiyama, A. Ikeda, M. Naito, pH Responsive Smart Carrier of [60] Fullerene with 6-Amino-Cyclodextrin Inclusion Complex for Photodynamic Therapy, *J. Mater. Chem.*, **22** (42), 22610-22613 (2012). 査読有
- (18) K. Umezaki, S. Sakai, S. Koeda, Y. Yamamoto, M. Kondo, A. Ikeda, T. Dewa, K. Taga, T. Tanaka, T. Mizuno, Formation of Planar Bilayer Membranes on Solid Supports Using Peptide Gemini Surfactants, *Chem. Lett.*, **41** (11), 1430-1432 (2012). 査読有

〔学会発表〕(計 32 件)

- (1) 杉川幸太・久保厚喜・池田篤志、交換反応法を用いたフラレーン含有ナノゲルの合成、日本化学会第 95 春季年会(2015)、平成 27 年 3 月 26 日～29 日、千葉県船橋市
- (2) 芦澤健吾・日野彰大・杉川幸太・池田篤志、疎水性平面芳香族分子含有リポソームの調製と安定性の評価、日本化学会第 95 春季年会(2015)、平成 27 年 3 月 26 日～29 日、千葉県船橋市
- (3) 日野彰大・池田篤志・芦澤健吾・杉川幸太・菊池純一・塚本真未・安原主馬、交換反応法を用いたフォトクロミック分子含有リポソームの調製、日本化学会第 95 春季年会(2015)、平成 27 年 3 月 26 日～29 日、千葉県船橋市
- (4) 池田篤志・日野彰大・杉川幸太・菊池純一・塚本真未・安原主馬、交換反応法を用いたポルフィリン含有リポソームの調製、日本化学会第 95 春季年会(2015)、平成 27 年 3 月 26 日～29 日、千葉県船橋市
- (5) 久保厚喜・杉川幸太・池田篤志、フラレーン含有 pH 応答性ナノゲルの合成とその機能、日本化学会第 95 春季年会(2015)、平成 27 年 3 月 26 日～29 日、千葉県船橋市
- (6) 岩田昂・日野彰大・菊池純一・平尾岳大・灰野岳晴・杉川幸太・池田篤志、DMe- β -シクロデキストリンが引き起こすリポソームの崩壊とそのメカニズムの解明、日本化学会第 95 春季年会(2015)、平成 27 年 3 月 26 日～29 日、千葉県船橋市
- (7) 前智也・平尾岳大・灰野岳晴・杉川幸太・池田篤志、NMR によるフラレーン誘導体-シクロデキストリン錯体の分子内一分子間交換の検討、日本化学会第 95 春季年会(2015)、平成 27 年 3 月

26日～29日、千葉県船橋市

- (8) 清水勇夫・石田兼基・池田篤志・富田恒之・片桐清文・犬丸啓、近赤外光による光線力学治療のためのアップコンバージョン蛍光粒子含有ナノハイブリッドの作製と評価、第 53 回セラミックス基礎科学討論会 平成 27 年 1 月 8 日～9 日、京都府京都市
- (9) 池田篤志、フラレーン誘導体の水溶化とその光線力学活性、第 8 回有機 π 系シンポジウム、平成 26 年 11 月 21 日～22 日、佐賀県佐賀市、**招待講演**
- (10) 池田篤志、フラレーンおよびフラレーン誘導体を用いる光線力学治療薬を目指して、第 2 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム(第 29 回生体機能関連化学部会若手フォーラム)、平成 26 年 9 月 10 日、岡山県岡山市、**招待講演**
- (11) 池田篤志・肥田知浩・松尾貴史、重水素化シクロデキストリンの合成と錯形成、第 12 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム(HGCS2014)、平成 26 年 5 月 31 日～6 月 1 日、東京都目黒区大岡山
- (12) A. Ikeda, N. Maekubo, R. Aono, T. Iizuka, M. Ishikawa, J. Kikuchi, M. Akiyama, T. Konishi, Formation of cyclodextrin・fullerene derivative complexes and their photoactivities, International Symposium of New Trends of Nano- or Bio-materials Design in Supramolecular (2013NNBS), September 20-21, 2013, Fukuoka, **Invited**

外 20 件

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 池田篤志、交互積層法を利用した光電変換素子の開発、『*光の制御技術とその応用 事例集*』株式会社技術情報協会編、592-595 (2014).
- (2) 池田篤志、光合成を模倣したリポソーム光増感剤の構築とそのがん治療への応用、『*生物模倣技術と新材料・新製品開発への応用*』株式会社技術情報協会編、286-290 (2014).

〔その他〕

ホームページ:

<http://ikedalab.p2.weblife.me/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 篤志 (IKEDA ATSUSHI)

広島大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号: 90274505