

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25288037

研究課題名(和文)人工細胞膜中でのフラレーン誘導体の位置制御による光線力学活性の向上

研究課題名(英文) Improved photodynamic activity by control of position of fullerene derivatives in liposomes

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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：私は疎水性のフラレーンをリポソームドラッグキャリアー内に内包させる新しい方法として交換反応法を用いた。この交換反応法ではシクロデキストリンの空孔からリポソーム中にフラレーンを移動させるというものである。C60誘導体において交換反応を試みたが失敗した。しかし、これらの実験の中で、(i)C60誘導体がC60に比べ高い光線力学活性をもつこと、および(ii)  $\beta$ -1,3-グルカンに取り込んだアニオン性のC60誘導体が他のC60誘導体に比べRAW細胞に対し高い光線力学活性をもつことを見出した。なお、最近交換反応法によってリポソーム内包C60誘導体の作成に成功した。

研究成果の概要(英文)：An effective exchange method is described whereby liposomal drug carriers of hydrophobic fullerene are used to incorporate the guests into lipid membranes. The exchange method transfers the fullerene from a cyclodextrin cavity to a liposome in water. I attempted [60]Fullerene (C60) derivatives were incorporated into liposomes using a fullerene exchange method, but failed. However, in the experiments, we found that (i) C60 derivatives have much higher photodynamic activity than C60 under photoirradiation at long wavelengths (>610 nm) and (ii)  $\beta$ -1,3-glucan-complexed an anionic C60 derivative has higher photoactivity toward RAW cells than other C60 derivatives. Recently, I succeeded the preparation of lipid-membrane-incorporated C60 derivatives.

研究分野：超分子化学、有機合成化学

キーワード：フラレーン リポソーム ホスト-ゲスト錯体 光線力学治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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) が現在非常に注目されている。光線力学治療法は、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 薬剤の毒性が低いため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、非常によい治療効果を上げている。現在、日本国内では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いる。しかし、問題点がないわけではない。例えば、(1) より治療効果を向上させるために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 週間程度い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レーンは多くの研究者に注目されている。しかし、フラレーンの水溶化は困難であった。本申請者は、従来法に比べ  $C_{60}$  と  $C_{70}$  を 10~100 倍という高濃度で水溶化でき、さらに高い長期安定性を実現できる新規可溶化法として “フラレーン交換法” を開発した。本手法は、シクロデキストリンにより可溶化したフラレーンをリポソーム内へ移動させるという簡便な方法で、フラレーン誘導体にも適用可能である。フラレーン交換法によって高濃度でフラレーンを可溶化できたことから、既に以下の二つの事実を明らかにしている。すなわち、(i) 可視光 (350 nm 以上の光) を照射することによってがん細胞を死滅させることができること、ならびに (ii) フラレーンが二分子膜の膜間に存在していることである。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、未修飾  $C_{60}$  や  $C_{70}$  ではなく、フラレーン誘導体を含むリポソームを用いることによって、がんなどへの光増感剤 (光線力学治療薬) としての実用化を目指す。機能性置換基を導入したフラレーン誘導体の長波長領域での活性の高さ、およびリポソーム膜中におけるナノ構造の制御によって、(A) 膜中でフラレーンが本来有する光活性を発揮できるようにすること、ならびに (B) 皮膚透過性のより高い長波長領域の光照射に対する光線力学活性を向上させることを目指す。さらに、(C) 現在光線力学治療において唯一の副作用である光線過敏症の問題を光活性の “オン - オフ” を制御することによって解決する。

## 3. 研究の方法

高速振動粉碎法を用いてフラレーン誘導体とシクロデキストリン、もしくは多糖であるアクア  $\beta$  を固体の状態では混合した。次にこの混合物を水で抽出することで、錯体を形成させ水溶化した。これら錯体の可溶性は、可視-紫外吸収スペクトル、および  $^1\text{H}$  NMR スペクトルによって決定した。

作製したこれら錯体をがん細胞である HeLa 細胞や免疫細胞である RAW 細胞に取り込ませ、PDT 治療に最適な波長である 620 nm 以上の可視光を照射した。PDT 活性 (光細胞殺傷能) は細胞生存率を WST アッセイキットによって測定することで決定した。また、フラレーン誘導体間、および未修飾の  $C_{60}$  や  $C_{70}$  との PDT 活性の違いの原因を一重項酸素発生能の差や細胞導入量の差で判断した。

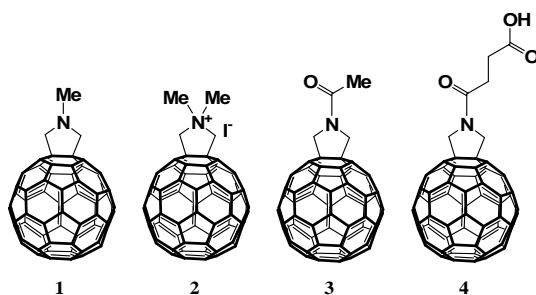


図 1. 用いたフラレーン誘導体のうち代表的なもの構造

2015 年 種々のフラレン誘導体をシクロデキストリン内からリポソーム膜内へ移動させる交換反応の進行は可視-紫外吸収スペクトル、および  $^1\text{H}$  NMR スペクトルによって判断した。

#### 4. 研究成果

まず、これまで詳しく調べられてこなかったフラレン誘導体の光線力学活性を評価した。種々のフラレン誘導体を用いてシクロデキストリン・フラレン誘導体錯体を作製した。シクロデキストリン・フラレン誘導体錯体の安定性を評価した。その結果、以下のことが明らかになった。(1) 予想に反し未修飾フラレンの錯体と比べ若干安定性が向上すること、(2) 置換基の疎水性が大きすぎると可溶化できず末端の親水性で可溶可能が決まること、(3) 置換基のシクロデキストリン近傍の置換基により安定性が決まること、である。

作製できたシクロデキストリン・フラレン誘導体錯体の PDT 活性を測定した。その結果、特にカチオン性の置換基を有するフラレン誘導体(化合物 2)が、PDT に適した波長領域である 600 nm 以上の光の照射で従来の PDT 薬剤であるフォトリンよりも高い活性を示した。この領域の光では、未修飾の  $\text{C}_{60}$  がほとんど PDT 活性を示さないことから、フラレン誘導体を用いる利点が明らかとなった。

次に、シクロデキストリンに変わる可溶化剤として、多糖であるアクア  $\beta$  を用いた。このとき、シクロデキストリンで高い PDT 活性を示したカチオン性のフラレン誘導体(化合物 2)は可溶化されなかった。しかし、中性とアニオン性のフラレン誘導体(化合物 1, 3, 4)は高濃度で可溶化できた。次に、これらのフラレン誘導体・アクア  $\beta$  錯体を用いて光線力学活性を評価した。マクロファージである RAW 細胞を用いて検討したところ、PDT に適した波長領域である 600 nm 以上の光の照射でアニオン性のフラレン

誘導体(化合物 4)が非常に高い活性を示した。この理由はアニオン置換基とアクア  $\beta$  の多糖が RAW 細胞表面を認識したためと考えられる。

最後に種々のフラレン誘導体をシクロデキストリン内からリポソーム膜内へ移動させる交換反応を行った。その結果、置換基により導入効率が大きく異なることが示された。フラレン誘導体の置換基の親水性が大きすぎる場合(化合物 4)に、うまくリポソーム内に導入されないことが、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルより明らかになった。一方、置換基が疎水性の場合(化合物 1) リポソーム内に導入できることが明らかとなった。しかし、疎水性の高い置換基の場合、リポソーム膜表面近傍にフラレン誘導体が存在しないため、シクロデキストリン・フラレン誘導体錯体(化合物 1~4)自身が持つ光線力学活性に比べ、その活性が十分に高いとは言えなかった。

そこで、交換反応の条件を種々変化させると、カチオン性フラレン誘導体(化合物 2)で、ほぼ 100% リポソーム内に移ることが確認された。そのフラレン誘導体(化合物 2)含有リポソームは高い PDT 活性を有することが確認でき、今後他のフラレン誘導体との比較実験を行い、その効果を確認する。

#### 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 2 2 件)

- (1) A. Ikeda, R. Funada, K. Sugikawa, Different stabilities of liposomes containing saturated and unsaturated lipids toward the addition of cyclodextrins, *Org. Biomol. Chem.*, **14** (22), 5065–5072 (2016). (DOI: 10.1039/C6OB00535G) 査読有
- (2) A. Narumi, T. Tsuji, K. Shinohara, H. Yamazaki, M. Kikuchi, S. Kawaguchi, T. Mae, A. Ikeda, Y. Sakai, H. Kataoka, A. Inoue, A.

- Nomoto, J. Kikuchi, S. Yano, Maltotriose-Conjugation to Fluorinated Chlorin Derivative Generating PDT Photosensitizer with Improved Water-Solubility, *Org. Biomol. Chem.*, **14** (14), 3608–3613 (2016). (DOI: 10.1039/C6OB00276E) 査読有
- (3) K. Sugikawa, T. Kadota, K. Yasuhara, A. Ikeda, Anisotropic Self-Assembly of Citrate-Coated Gold Nanoparticles on Fluidic Liposomes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55** (12), 4059–4063 (2016). (DOI: 10.1002/anie.201511785) 査読有
- (4) A. Ikeda, Photodynamic Activity of Fullerenes and Other Molecules Incorporated in Lipid Membranes by Exchange, *Chem. Rec.*, **16** (1), 249–260 (2016) (DOI: 10.1002/tcr.201500249). 査読有
- (5) K. Sugikawa, A. Kubo, A. Ikeda, pH-Responsive Nanogels Containing Fullerenes: Synthesis via a Fullerene Exchange Method and Photoactivity, *Chem. Lett.*, **45** (1), 60–62, (2016). (DOI:10.1246/cl.150924) 査読有
- (6) A. Ikeda, S. Hino, T. Mae, Y. Tsuchiya, K. Sugikawa, M. Tsukamoto, K. Yasuhara, H. Shigeto, H. Funabashi, A. Kuroda, M. Akiyama, Porphyrin-uptake in Liposomes and Living Cells Using an Exchange Method with Cyclodextrin, *RSC Advances*, **5** (127), 105279–105287 (2015). (DOI: 10.1039/C5RA24985F)
- (7) S. Yano, M. Naemura, A. Toshimitsu, M. Akiyama, A. Ikeda, J. Kikuchi, X. Shen, Q. Duan, A. Narumi, M. Inoue, K. Ohkubo, S. Fukuzum, Efficient Singlet Oxygen Generation from Sugar Pendant C<sub>60</sub> Derivatives for Photodynamic Therapy, *Chem. Commun.*, **51** (93), 16605–16608 (2015). (DOI: 10.1039/C5CC07353G) 査読有 (表紙採用)
- (8) A. Ikeda, N. Iwata, S. Hino, T. Mae, Y. Tsuchiya, K. Sugikawa, T. Hirao, T. Haino, K. Ohara, K. Yamaguchi, Liposome Collapse Resulting from an Allosteric Interaction between 2,6-Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrins and Lipids, *RSC Advances*, **5** (95), 77746–77754 (2015). (DOI: 10.1039/C5RA14970C) 査読有
- (9) 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  $\beta$ -1,3-Glucan on Contact Dermatitis, *Biomed. Pharmacother.*, **69**, 201–207 (2015). (DOI: 10.1016/j.biopha.2014.11.026) 査読有
- (10) 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). (DOI: 10.1039/C5OB00240K) 査読有 (表紙採用)
- (11) 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). (DOI: 10.1021/la503732q) 査読有
- (12) 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). (DOI: 10.1246/cl.14059) 査読有
- (13) S. Mieda, A. Ikeda, Y. Shigeri, W. Shinoda, Thermodynamic Stability of [60]Fullerene and  $\gamma$ -Cyclodextrin Complex in Aqueous Solution: Free Energy Simulation, *J. Phys. Chem. C*, **118** (23), 12555–12561 (2014). (DOI: 10.1021/jp5029905) 査読有
- (14) 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). (DOI:

10.1039/c3cc47711h) 査読有 (表紙採用)  
(15) [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). (DOI: 10.1021/ol4030343) 査読有  
(16) [A. Ikeda](#), Water-soluble fullerenes using solubilizing agents, and their applications, **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, **77** (1-4), 49–65 (2013). (DOI: 10.1007/s10847-013-0319-9) 査読有  
(17) [A. Ikeda](#), A. Hirata, M. Ishikawa, J. Kikuchi, S. Mieda, W. Shinoda, Effect of Different Substituents on the Water-Solubility and Stability Properties of 1:2 [60]Fullerene Derivative•Gamma-Cyclodextrin Complexes, **Org. Biomol. Chem.**, **11** (45), 7843–7851 (2013). (DOI: 10.1039/c3ob41513a) 査読有 (表紙採用)  
(18) [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). (DOI: 10.1246/cl.130515) 査読有  
(19) 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). (DOI: 10.1021/la401566h) 査読有  
(20) 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). (DOI:

10.1021/la402167v) 査読有  
(21) 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). (DOI: 10.7567/JJAP.52.091801) 査読有  
(22) [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). (DOI: 10.1021/ml4001535) 査読有

〔学会発表〕(計39件)

- (1) 井上裕也・杉川幸太・[池田篤志](#)、シクロデキストリン錯体から親水性ゲル基板へのフラレンの交換反応、日本化学会第96春季年会(2016) 2016年3月24日~27日、京都府京田辺市、他7件
- (2) 前智也・土屋祐輝・杉川幸太・重藤元・舟橋久景・黒田章夫・[池田篤志](#)、交換反応法によるポルフィリンのリポソームと細胞への導入、第9回有機 $\pi$ 電子系シンポジウム、2015年11月20日、愛知県犬山市
- (3) 杉川幸太・門田竜也・[池田篤志](#)、脂質二分子膜表面での金ナノ粒子の自己組織化制御、2015年日本化学会中四国支部大会、2015年11月15日、岡山県岡山市
- (4) 門田竜也・杉川幸太・[池田篤志](#)、人工細胞膜表面におけるナノ粒子の自己組織化挙動、「細胞を創る」研究会 8.0、2015年11月12日、大阪府吹田市、他1件
- (5) 杉川幸太・門田竜也・[池田篤志](#)、リポソーム膜の相転移を利用した金ナノ粒子の自己組織化制御、第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015年9月10日~12日、熊本県熊本市、他2件
- (6) 芦澤健吾・杉川幸太・[池田篤志](#)、リポソームを用いた疎水性芳香族分子の水溶化、第

31 回 若手化学者のための化学道場、2015 年 8 月 27 日、兵庫県淡路市、他 1 件

(7) 池田篤志、シクロデキストリンを用いた交換反応法による新規水溶性ホスト・ゲスト錯体の作製と機能評価、第 13 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム(HGCS2015)、2015 年 6 月 6 日、仙台市青葉区(招待講演)、他 2 件

(8) 池田篤志・日野彰大・杉川幸太・塚本真未・安原主馬、シクロデキストリンを用いる交換反応による疎水性分子含有リポソームの調製、第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 29 日~31 日、札幌市白石区、他 1 件

(9) 杉川幸太・久保厚喜・池田篤志、交換反応法を用いたフラレン含有ナノゲルの合成、日本化学会第 95 春季年会(2015) 2015 年 3 月 26 日~29 日、千葉県船橋市、他 6 件

(10) 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 2015 年 1 月 9 日、京都府京都市

(11) 池田篤志、フラレン誘導体の水溶化とその光線力学活性、第 8 回有機  $\pi$  系シンポジウム、2014 年 11 月 22 日、佐賀県佐賀市(招待講演)

(12) 池田篤志、フラレンおよびフラレ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) 2014 年 9 月 10 日、岡山市北区(招待講演)

(13) 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) 2014 年 5 月 31 日、東京都目黒区大岡山

(14) 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), 2013 年 9 月 21 日, Higashi-ku, Fukuoka. (招待講演)

(15) 池田篤志・肥田知浩・塚本真未・安原主馬・菊池純一、[70]フラレンの取り込みによるリポソームの動的挙動変化第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 11 日~13 日、石川県金沢市、他 1 件

(16) 池田篤志・石川路子・秋山元英・菊池純一・篠田 渉、シクロデキストリンによるフラレン二付加体の位置およびエナンチオ選択的認識、第 10 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム(HGCS2013) 2013 年 5 月 25 日~26 日、和歌山県和歌山市、他 2 件

〔図書〕(計 2 件)

(1) 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).

(2) 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 実例集、株式会社技術情報協会編、592-595 (2014).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 篤志 (ATSUSHI IKEDA)

広島大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：90274505