

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860034

研究課題名(和文) 癌深部治療を標的とした近赤外光応答性ナノC60光増感剤の構築

研究課題名(英文) Design and Evaluation of Fullerene-fluorescence dye hybrid Nanoparticles for the Photosensitizer in Photodynamic Therapy

研究代表者

庵原 大輔 (IOHARA, Daisuke)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：40454954

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)：C60は既存の光増感剤と比較して、非常に高い量子収率を持つことから、一重項酸素などの活性酸素種を効率よく生成する光増感物質として注目を集めている。本研究では、親水性で生体適合性に優れる2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HP-β-CyD)を用いてC60をナノ粒子化し、その物理化学的性質・光吸収特性・生物活性を検討し、PDTにおける光増感剤としての有用性を明らかにした。さらに、蛍光色素を用いてC60ナノ粒子の光吸収特性を制御し、蛍光色素の励起波長の光で活性酸素種を生成可能な光増感剤を構築した。

研究成果の概要(英文)：The fullerene family especially C60, is generally regarded as an efficient photosensitizer for PDT due to light absorption at relatively long wavelengths and the high quantum yield of photoexcitation reactions. In this study, we evaluated the photosensitizing ability of C60/HP-β-CyD nanoparticles under visible light irradiation as a new photosensitizer in PDT. The photodynamic activity of C60/HP-β-CyD nanoparticles was studied in detail by in vitro and in vivo experiments. In addition, we revealed that C60-fluorescence dye hybrid nanoparticle is able to produce reactive oxygen species by the light irradiation at the wavelength that belongs to the fluorescence dye.

研究分野：製剤学

キーワード：フラーレン がん光線力学療法 ナノ粒子 活性酸素種 光増感剤 蛍光色素

1. 研究開始当初の背景

がん光線力学療法(Photodynamic Therapy, PDT)は腫瘍集積性のある光増感剤を投与した後、腫瘍組織に可視光を照射することで活性酸素種(Reactive Oxygen Species, ROS)を発生させ、腫瘍組織を選択的に変性・壊死させる次世代型のがん治療法である。PDTにおける理想的な光増感剤は、高い腫瘍選択性を持つこと、組織透過性の良い長波長側(700~900 nm)の光吸収を持つこと、高い量子収率で ROS を生成することが求められる。現在使用されている光増感剤の多くはポルフィリン誘導体であり、日本ではフォトフリン® やレザフィリン® が早期の肺がん、胃がん、食道がん、子宮頸がんの治療に対し、保険適用されている。しかしながら、これら光増感剤の腫瘍集積性、光吸収性はまだ不十分であり、光線過敏症の問題も残ることから、より効果的な光増感剤の開発が望まれている。

フラーレン C₆₀ は炭素原子が球状のネットワーク構造をしている化合物であり、ユニークな物理学的、生物学的特徴を持つことから金属材料やエネルギー輸送、化粧品など様々な分野に利用されている。医薬分野においては、C₆₀ は既存の光増感剤と比較して非常に高い量子収率や長波長の吸収スペクトル(S-S absorption: 530 nm, 620 nm, T-T absorption: 400 nm, 740 nm)を持つことから、一重項酸素(¹O₂)、スーパーオキシドアニオンラジカル(O₂^{•-})などの ROS を効率よく生成する光増感物質としても注目を集めている。しかし、C₆₀ の著しく低い水への溶解性は、医薬分野への応用を困難なものにしている。本研究では、親水性で生体適合性に優れた 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HP-β-CyD)を用いて C₆₀ をナノ粒子化し、PDTにおける光増感剤としての有用性を明らかにし、長波長の光吸収特性をもつ蛍光色素で被覆することで、近赤外領域でも効果的に励起可能な光増感剤を構築する。

2. 研究の目的

本研究では親水性 C₆₀ ナノ粒子を調製し、その光増感特性の詳細を明らかにすると

ともに、蛍光色素を用いて、その光吸収特性を制御し、蛍光色素の励起波長で選択的に ROS を生成可能な光増感剤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 可視光照射下における C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の光増感能の評価

C₆₀ ナノ粒子は C₆₀ と HP-β-CyD を自動マグネット乳鉢粉碎機を用いて減圧下、4°C で 3 時間混合粉碎後、水中へ超音波により分散させることで調製した。

可視光照射下における C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の O₂^{•-} および ¹O₂ 生成は ESR スピントラップ法を用いて検討した。ESR スピントラップ剤には DMPO(O₂^{•-}) および TEMP-OH(¹O₂) を用いた。また光増感剤であるプロトポルフィリン IX(PpIX)の ROS 生成能と比較することで C₆₀ ナノ粒子の有用性を検討した。可視光(400~700 nm)の光源にはこの波長範囲において均一な光を照射するキセノン光源を用いた。

(2) 各種がん細胞に対する C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の光線力学活性

可視光照射条件下における C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の細胞障害活性はヒト肺癌細胞由来 A549 細胞およびヒト子宮頸がん細胞由来 HeLa 細胞を用いて WST-1 法により評価した。さらに、光増感剤として臨床使用されている 5-アミノレブリン酸(ALA)と細胞障害活性を比較することで C₆₀ ナノ粒子の有用性を評価した。

(3) C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の *in vivo* 抗腫瘍効果

in vivo 抗腫瘍効果は、担癌マウスに C₆₀ ナノ粒子を腫瘍内に投与し、可視光(光源: キセノンライト(波長 400~700 nm))を照射した時の腫瘍体積の変化をコントロール群(生理食塩液、光照射のみ)および C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子と比較し、評価した。担癌マウスはマウス肉腫 S-180 細胞を ddy マウスの後肢付け根に皮下注射することで作製した。さらに、可視光の照射量および投与量を制御することで C₆₀ ナノ粒子による最適

な PDT の条件を検討した。

(4) C₆₀-蛍光色素ハイブリッドナノ粒子の調製と相互作用

C₆₀-蛍光色素ハイブリッドナノ粒子は C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子と蛍光色素（フルオレセイン、ローズベンガル、ローダミン B）を混合後、超音波を照射することで調製した。C₆₀ ナノ粒子と蛍光色素の相互作用は蛍光スペクトル測定により評価した。

(5) C₆₀-蛍光色素ハイブリッドナノ粒子の波長選択的な活性酸素生成能

C₆₀-蛍光色素ハイブリッドナノ粒子の活性酸素生成能はキセノン光源を用いて、520 nm の波長を照射後の O₂^{·-} および ¹O₂ 生成を ESR スペクトル測定により評価した。C₆₀ ナノ粒子のみの場合および C₆₀/γ-CyD 複合体と比較することで蛍光色素との相互作用による光増感能の増大効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 可視光照射下における親水性 C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の光増感能の評価

これまで、HP-β-CyD を用いて C₆₀ を親水性ナノ粒子として高濃度に調製可能なことを明らかとしてきた。そこで、C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の ROS 生成能を光増感剤である PpIX と比較し、その有用性を明らかにした。以下に得られた知見を要約する。

スピントラップ剤に TEMP-OH を用いて C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子に可視光を照射すると TEMP-OH に特徴的な ESR シグナルが得られ、¹O₂ の生成が確認された。¹O₂ の生成は C₆₀ 濃度および可視光の放射照度依存的に増大した。また、C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子は可視光照射下において PpIX よりも 1.5 倍高い ¹O₂ 生成能を示した。

スピントラップ剤に DMPO を用いて C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子に可視光を照射すると DMPO-OH に特徴的な ESR シグナルが得られ、O₂^{·-} の生成が確認された。¹O₂ の場合と同様に O₂^{·-} の生成は C₆₀ 濃度および可視光の放射照度依存的に増大

した。一方、PpIX に可視光を照射しても O₂^{·-} の生成はみられなかった。

UV-VIS スペクトル測定により、C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子と PpIX の可視光領域の吸収スペクトルを比較すると、C₆₀/HP-β-CyD は 420 ~ 540 nm の領域で PpIX よりも高い吸収を示し、600 ~ 700 nm の領域では、ほぼ同等の吸収スペクトルを示した。このことから、C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の高い ROS 生成能には C₆₀ 分子の高い量子収率だけでなく、可視光領域での吸収も影響していることが示唆された。

以上の知見より、C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子は可視光照射下において、PpIX よりも高い ROS 生成能を有していることが明らかとなった。

(2) 各種がん細胞に対する C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の光線力学活性

ALA は PpIX の前駆物質であり、光線力学療法における光増感剤として現在臨床で使用されている。そこで、C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の HeLa 細胞および A549 細胞に対する光線力学活性を ALA の場合と比較した。以下に得られた知見を要約する。

可視光照射下において C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子と ALA は HeLa 細胞および A549 細胞に対し、濃度依存的な細胞障害活性を示した (Fig.1)。ALA の IC₅₀ 値は HeLa 細胞で 100 μM、A549 細胞で 150 μM であった。一方、C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子はより低濃度で細胞障害活性を示し、IC₅₀ 値は HeLa 細胞では 10 μM、A549 細胞では 60 μM であった。可視光を照射しない場合、これら光増感剤の細胞障害性はみられなかった。

HeLa 細胞の生存率は O₂^{·-} 捕捉剤であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) および ¹O₂ 捕捉剤である L-ヒスチジン、2,5-ジメチルフランおよび 1,4-ジアザビシクロオクタン (DABCO) の添加により抑制された。このことから、可視光照射下における C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子の

細胞障害活性は細胞内に取り込まれた C_{60} から生成した $O_2^{\cdot -}$ や 1O_2 などの ROS が関与するものと推察された。

以上の知見より、可視光照射下においてのみ、 $C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は細胞内で ROS を生成し、細胞障害活性を示すことが明らかとなった。また、その効果は現在臨床で使用されている光増感剤 ALA よりも高いことが示唆された。

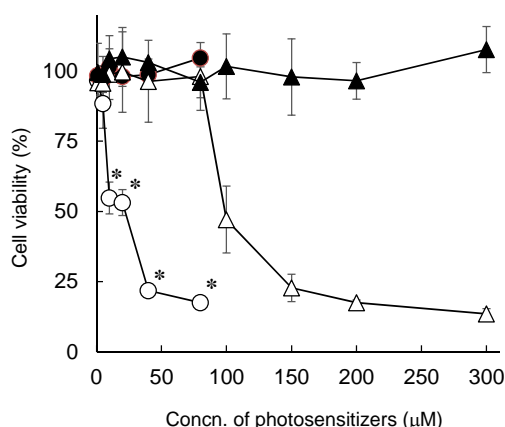


図 1. 可視光照射下 ($35mW/cm^2$) における $C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の HeLa 細胞に対する光線力学活性 : $C_{60}/HP-\beta-CyD$ 光照射なし; \circ : ALA 光照射なし; \blacktriangle : $C_{60}/HP-\beta-CyD$ 光照射あり; \triangle : ALA 光照射あり. $*P < 0.05$ versus ALA 光照射あり.

(3) 可視光照射下における $C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の *in vivo* 抗腫瘍効果

これまでの検討で $C_{60}/HP-\beta-CyD$ は *in vitro* において優れた光線力学活性を有することが示唆された。PDT は腫瘍における光増感剤の量、酸素分圧、光照射量などの影響を受ける。そこで、 $C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子による PDT において最適な条件を検討した。以下に得られた知見を要約する。

$C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子 ($C_{60} = 2.0$ mg/kg) を腫瘍内に投与後、 $100mW/cm^2$ の照度で 300 秒 ($30J/cm^2$) および 200 mW/cm² の照度で 60 秒 × 5 回 ($60J/cm^2$) 可視光を照射した場合、腫瘍体積の増加率はコントロール群と同等であり抗腫瘍効果は得られなかった。一方、 350 mW/cm² の照度で 15 秒 × 12 回 ($63J/cm^2$) 可視光を照射した場合、腫瘍成長の著し

い抑制がみられた。また、 $C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の投与量を 0.4 mg/kg にすると、抗腫瘍効果は減弱した。

$63J/cm^2$ の可視光のみを腫瘍に照射した場合あるいは $C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子 ($C_{60} = 2.0$ mg/kg) を投与し可視光を照射しない場合では抗腫瘍効果はみられなかった。このことから、本光照射条件では光温熱効果はなく、 $C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子自身にも抗腫瘍効果がないことが示唆された。

可視光の照度が $60J/cm^2$ の場合と $63J/cm^2$ の場合でほぼ変わらないにもかかわらず、抗腫瘍効果に違いがみられたことから、 C_{60} による PDT には光照射時間の間隔が影響することが示唆された。すなわち、繰り返し光を照射することで腫瘍組織における酸素濃度が光照射のインターバル中に回復し、十分な PDT 効果が発揮されたものと推察される。

以上の知見より、 $C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は PDT における新規光増感剤として有用であることが示唆された。また C_{60} ナノ粒子を用いて十分な抗腫瘍効果を得るためには 350 mW/cm² の照度で短時間、繰り返し照射することが最適であることが明らかとなった。

(4) C_{60} -蛍光色素ハイブリッドナノ粒子の調製と波長選択的な活性酸素生成能

$C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の光増感能の向上を企図して、各種蛍光色素(フルオレセイン、ローダミン B、ローズベンガル)で C_{60} ナノ粒子を被覆したハイブリッドナノ粒子を調製し、波長選択的な光増感効果を検討した。以下に得られた知見を要約する。

$C_{60}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子存在下で各種蛍光色素の蛍光スペクトルを測定すると、 C_{60} ナノ粒子の濃度依存的に各種色素に特徴的な蛍光ピークの減少がみられ、 C_{60} ナノ粒子と蛍光色素が相互作用していることが示唆された。蛍光スペクトル変化から Modified Stern-Volmer 式を用いて算出した安定度定数の値はフルオレセインでは $2.8 \times 10^4 M^{-1}$ 、ローダミン B では

$3.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、ローズベンガルでは $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であった。一方、 $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CyD}$ 複合体の場合では、蛍光スペクトルの変化はわずかであり、安定度定数の値はそれぞれフルオレセイン $7.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、ローダミン B $4.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、ローズベンガル $6.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ であった。以上の結果より、 C_{60} ナノ粒子表面への蛍光色素の吸着が示唆された。

520 nm の照射下における C_{60} -蛍光色素ハイブリッドナノ粒子 ($\text{C}_{60} = 200 \mu\text{M}$) の $^1\text{O}_2$ 生成能を ESR スペクトルにより検討すると、ローズベンガル濃度依存的に生成能が増大し、 $1 \mu\text{M}$ のローズベンガル存在下で約 4 倍に増大した。ローダミン B でも同様に蛍光色素の濃度依存的に $^1\text{O}_2$ の生成能が増大した。一方、 $\text{C}_{60}/\gamma\text{-CyD}$ 複合体を用いた場合では、 $^1\text{O}_2$ 生成能の増大はみられなかった。

520 nm の照射下における C_{60} -蛍光色素ハイブリッドナノ粒子の $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成能を ESR スペクトル測定により検討すると、各種蛍光色素存在下でも $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成能に変化はみられず C_{60} ナノ粒子のみの場合と同等であった。

以上の結果より、 C_{60} ナノ粒子は蛍光色素と強く相互作用し、蛍光色素の吸収波長の光照射下で ROS を生成可能なことが示唆された。また、 $^1\text{O}_2$ 生成能のみ増大することから、光励起した蛍光色素から C_{60} ナノ粒子へのエネルギー移動が生じ、波長選択的な光増感能の増大が生じたものと推察される。

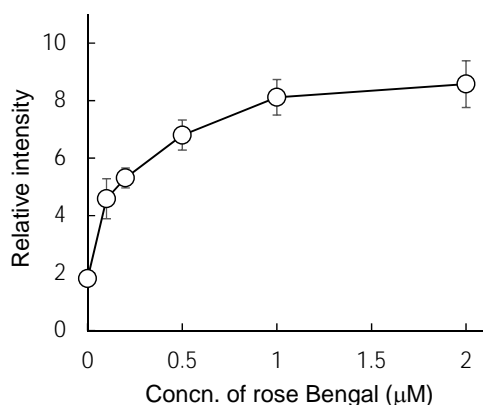


図 2. C_{60} ナノ粒子 ($\text{C}_{60} = 200 \mu\text{M}$) からの $^1\text{O}_2$ 生成に及ぼすおよぼすローズベンガルの影

響 (520 nm、 $1 \text{ mW}/\text{cm}^2$ の光照射時)

相対強度は外部標準 (Mn^{2+}) に対する TEMPO-OH の相対強度

現在のポルフィリン誘導体を用いた PDT 治療ではエキシマダイレーザー (630nm) や半導体レーザー (664 nm) が用いられている。しかしながら、可視光域 (400 ~ 700nm) はヘモグロビンやそのほかの生体構成物質の吸収が大きく、また、近赤外光域 (700 ~ 900nm) よりも長い波長では水の吸収が大きくなるため、現在の光増感剤を用いた PDT 治療は表在型のがんに限定される。蛍光色素被覆により、組織透過性の良い近赤外光で励起可能な光増感剤の開発が可能となれば、より深部のがんに対しても、十分な抗腫瘍効果を発揮することが予想される。本研究は優れた光増感作用を有し、ナノマテリアルとして注目を集めている C_{60} をナノ粒子化し、蛍光色素を用いてその光吸収特性を制御するものであり、 C_{60} -蛍光色素ハイブリッドナノ粒子は次世代型の光増感剤として有力な候補物質になるものと考えられる。

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)

Y. Umezaki, D. Iohara, M. Anraku, Y. Ishitsuka, T. Irie, K. Uekama and F. Hirayama, Preparation of Hydrophilic $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}/2$ -Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Nanoparticles for the Treatment of a Liver Injury Induced by an Overdose of Acetaminophen, *Biomaterials*, 査読有, Vol. 45, 2015, pp.115-123.

DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.12.032.

A. Altaf, H. Aldawsari, Z. M. Banjar, D. Iohara, M. Anraku, K. Uekama, F. Hirayama, Potential Use of $\text{C}_{60}/2$ -Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Nanoparticles as a New Photosensitizer in the Treatment of Cancer, *Int. J. Photoenergy*, 査読有, Article ID 570506, 8 pages, 2014.

DOI:10.1155/2014/570506

A. Altaf, H. Aldawsari, Z. M. Banjar, M. Anraku, D. Iohara, M. Otagiri, K. Uekama, F. Hirayama, Preparation of

soluble stable C₆₀/human serum albumin nanoparticles via cyclodextrin complexation and their reactive oxygen production characteristics, *Life Sci.*, 査読有, Vol. 93, 2013, pp.277-282.
DOI:10.1016/j.lfs.2013.06.021

〔学会発表〕(計 15 件)

庵原大輔、梅崎至高、安楽 誠、上釜兼人、平山文俊、シクロデキストリンを利用した親水性フラレンナノ粒子の調製と抗腫瘍・抗酸化効果の評価、第36回日本バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀(東京都、江戸川区)、11/17-18 (2014)。

Daisuke Iohara, Makoto Anraku, Kaneto Uekama and Fumitoshi Hirayama, Highly Dispersible C₆₀ Nanoparticles by Sugammadex under Physiological Conditions, 17th International Cyclodextrin Symposium, Saarbrücken (Germany), 5/29-31 (2014)。

庵原大輔、林田修平、安楽 誠、上釜兼人、平山文俊、アニオン性-シクロデキストリン誘導体 Sugammadex を用いた生理的条件下でも安定なフラレン C₆₀ ナノ粒子の調製、日本薬学会第134年会、熊本大学(熊本県、熊本市)、3/27-30 (2014)。

Daisuke Iohara, Abdulmalik Altaf, Hibah Aldawsari, Zainy Banjar, Makoto Anrakua, Fumitoshi Hirayama and Kaneto Uekama, In Vitro and In Vivo Photodynamic Activity of C₆₀/HP-β-CyD Nanoparticles in Cancer Therapy, The 3rd European Conference on Cyclodextrins, Antalya(Turkey) 10/2-4, (2013)。

〔図書〕(計 1 件)

上釜兼人、平山文俊、安楽 誠、庵原大輔、シーエムシー出版、シクロデキストリンの科学と技術、2013, pp.124-133。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.sojo-u.ac.jp/~dio/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庵原 大輔 (IOHARA Daisuke)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：40454954