

学位論文

「リポタンパク質と多環芳香族材料からなる
治療用ナノ複合体に関する基礎および応用研究」

**Fundamental and Applied Research on
Therapeutic Nanocomposites of Lipoproteins and
Polycyclic Aromatic Materials**

福田 亮介

**Fundamental and Applied Research on
Therapeutic Nanocomposites of Lipoproteins and
Polycyclic Aromatic Materials**

Ryosuke Fukuda

2020

CONTENTS

INTRODUCTION	-----	1
CHAPTER 1	-----	4
The novel reconstitution method of high-density lipoprotein		
CHAPTER 2	-----	50
Application of lipoprotein for photothermal therapy		
CHAPTER 3	-----	94
Application of lipoprotein for photodynamic therapy		
CONCLUSION	-----	132
LIST OF PUBLICATIONS	-----	134
ACKNOWLEDGEMENTS	-----	136

General Introduction

高齢化社会において、医療の重要性は年々高まっている。近年、薬物療法の進歩に伴い、高い治療効果はあるものの、その強い作用のために深刻な副作用を引き起こす薬物が多く開発されている。[1]そうした背景から、薬の有効性や安全性を保証するために、最適な薬物投与形態を設計することが、強く意識されている。対照的に、従来の薬物投与経路および剤形は必ずしも十分な機能を有していないため、薬物動態の精密制御を目的とした新しい薬物投与経路および剤形が開発されてきた。[2, 3]この概念に基づいて開発された薬物の新しい投与形態は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) と呼ばれる。

DDS では、薬物を内封し、疾患部位に送達するためのドラッグナノキャリアが使用される。その一例がリポソームである。[4-6]リポソーム製剤として最も有名なものの一つに、AmBisome[®]がある。AmBisome[®]は、Amphotericin B のリポソーム製剤であり、抗真菌薬として用いられる。Amphotericin B 単独では、望まない箇所で行く、強すぎる作用のために、副作用が現れる。そこで、リポソーム化することにより、治療効果を損なうことなく、毒性の低減および動態の改善を達成できることが知られている。[1]またドラッグナノキャリアは、疾患部位へのターゲティングのみならず、吸収改善や、薬物の安定性の向上、水溶性の改善にも利用される。[7-9]

さらに有効性、安全性を高めるために、ドラッグナノキャリアを、光や磁場などの外部刺激と組み合わせる手法が開発されてきた。[10]ドラッグナノキャリアによって目的の箇所に到達した薬物は、任意のタイミングで外部刺激を加えることで反応促進され、局所的に治療効果を発揮する。こうして副作用を抑えつつ、最大の治療効果を得ることが可能となる。このように、薬効を時間的・空間的に制御する手法が確立されつつあるが、その実現のためには、外部刺激に応答して機能を発現する材料が必要不可欠である。外部刺激の中でも、光に応答して機能を発現する材料として、多環芳香族材料(PAM)が知られている。PAM は有機太陽電池や光生物学に欠かせない材料である。[11, 12]本研究では、PAM の光応答、特に生物医学的に重要な「熱」、「活性酸素種(ROS)」の2つに分けて紹介する。Chapter 1 の DDS の章では、ドラッグナノキャリアとしてのアポリポタンパク質・高比重リポタンパク質(HDL)について示す。HDL はリポソームよりも

サイズが小さく、高い組織浸透性が期待できるため、後述するがん治療に適していると考えられる。Chapter 2 では、光応答的に熱生成するヘキサフィリンの光線温熱療法、Chapter 3 では、光応答的に ROS を生成する単層カーボンナノチューブの光線力学療法応用研究について述べ、その中でリポタンパク質ドラッグナノキャリアが担う役割を明らかにする。

References

- [1] Adler-Moore, J. (1994) AmBisome targeting to fungal infections *Bone Marrow Transplant.* 14, S3.
- [2] Tibbitt, M. W., Dahlman, J. E., Langer, R. (2016) Emerging Frontiers in Drug Delivery *J. Am. Soc. Chem.* 3, 704–717.
- [3] Allen, T. M., Cullis, P. R. (2004) Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream *Science* 303, 1818–1822.
- [4] Vemuri, S., Rhodes, C. T. (1995) Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review *Pharm. Acta Helv.* 70, 95–111.
- [5] Samad, A., Sultana, Y., Aqil, M. (2007) Liposomal drug delivery systems: An update review *Curr. Drug Delivery* 4, 297–305.
- [6] Maher, S., Mrsny, R. J., Brayden, D. J. (2016) Intestinal permeation enhancers for oral peptide delivery *Adv. Drug Delivery Rev.* 106, 277–319.
- [7] Allen, T. M., Cullis, P. R. (2013) Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications *Adv. Drug Delivery Rev.* 65, 36–48.
- [8] Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., Kim, J. T., Kim, H., Cho, J. M., Yun, G., Lee, J. (2014) Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability *Asian J. Pharm. Sci.* 9, 304–316.
- [9] Göke, K., Lorenz, T., Repanas, A., Schneider, F., Steiner, D., Baumann, K., Bunjes, H., Dietzel, A., Finke, J. H., Glasmacher, B., Kwade, A. (2018) Novel strategies for the formulation and processing of poorly water-soluble drugs *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 126, 40–56.
- [10] Karimi, M., Ghasemi, A., Sahandi Zangabad, P., Rahighi, R., Moosavi Basri, S. M., Mirshekari, H., Amiri, M., Shafaei Pishabad, Z., Aslani, A., Bozorgomid, M., Ghosh, D., Beyzavi, A., Vaseghi, A., Aref, A. R., Haghani, L., Bahrami, S., Hamblin, M. R. (2016) *Chem. Soc. Rev.* 45, 1457–1501.
- [11] Wang, Y., Liu, B., Koh, C. W., Zhou, X., Sun, H., Yu, J., Yang, K., Wang, H., Liao, Q., Woo, H. Y., Guo, X (2019) Facile synthesis of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-based acceptors with fine-tuned optoelectronic properties: toward efficient additive-free nonfullerene organic solar cells *Adv. Energy Mater.* 9, 1803976.
- [12] Takano, Y., Numata, T., Fujishima, K., Miyake, K., Nakao, K., Grove, W. D., Inoue, R., Kengaku, M., Sakaki, S., Mori, Y., Murakami, T., Imahori, H. (2016) *Chem. Sci.* 7, 3331–3337.

CHAPTER 1

The novel reconstitution method of high-density lipoprotein

1. Introduction

高密度リポタンパク質 (HDL) は、過剰なコレステロールを末梢組織から肝臓に輸送する。比較的最近まで HDL コレステロール値が増えると、心血管疾患のリスクが低下すると考えられてきた。[1]しかし、最近の多くの臨床研究では、HDL を標的とすることの利点は示されておらず、代わりに HDL の質、つまりコレステロール引き抜き能がより重要だということが示されている。[2]このパラダイムシフトは、HDL 構造/機能の変更が次世代の抗アテローム発生療法を開発するための有望な戦略であることを示唆する。

HDL およびその変異体は、生体適合性が高く、ドラッグナノキャリアとしては最小の部類に属する。[3]加えて、HDL をポリエチレングリコールで修飾する必要がない。これは、ドラッグナノキャリアに生体適合性を付与するために最も広く使用されている薬剤であるが、免疫原性を引き起こす可能性がある。[4]HDL のサイズが小さい (約 10 nm) ことは、100 nm のリポソームや 30 nm のポリマーミセルと比較して、投与後の組織浸透に有利である。新生 HDL は、試験管内でディスク状 HDL (dHDL) としてリン脂質と組換え apoA-I で再構成できる。本研究では、以前に癌[5]および加齢黄斑変性治療用材料として、dHDL 変異体を開発した。[6]dHDL を利用する治療法には大きな可能性があるにもかかわらず、この製剤については広く調べられていない。

dHDL は、ディスク状リン脂質二重層と 2 分子の脂質結合性タンパク質 apoA-I で構成される。このリン脂質-タンパク質の二元複合体 dHDL は、リン脂質と apoA-I の水溶性に大きな違いがあるため、リポソームやポリマーミセルの調製に比べて、再構成を比較的困難である。したがって、最も一般的な dHDL 再構成手順であるコール酸透析法では、比較的容易に除去できる界面活性剤 (25°C、0.15 M NaCl (pH 8) の存在下での臨界ミセル濃度: 11 mM[7]) を使用して、リン脂質を溶解させる。[8]この方法は、リン脂質のエタノール (またはクロロホルム) 溶液の真空乾燥 (≥2 時間)、リン脂質/コール酸ミセルの形成 (≥2 時間)、ミセルと apoA-I の反応 (≥4 時間)、およびコール酸ナトリウムを除去する透析 (≥1d) からなる。最近では、マイクロ流体技術を含むはるかに単純な方法が考案されている。[9]この方法では、リン脂質のエタノール溶液と apoA-I の水溶液が迅速かつ緻密に設計された方法で混合される。この方法では、迅速かつ連続的に dHDL

作製ができるため、dHDLの大規模生産に役立つが、専用のマイクロ流体チップの設計と製造が必要である。ここでは、特殊なデバイスなしで、天然-変性状態転移における遷移中点 urea 濃度の apoA-I と同じ濃度の urea を使用することにより、dHDL だけでなく、薬物搭載 dHDL も許容可能な収率で調製する簡単な手法を示す。

2. Materials and methods

2.1. 材料

特に記載のない限り、すべての試薬は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) から購入した。エタノール、塩酸 (HCl)、phospholipids C、*all-trans*-retinoic acid (ATRA)、およびドキシソルビシン塩酸塩 (DXR•HCl) は、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp. (Osaka, Japan) から購入した。ヒト血漿 HDL は、Lee BioSolutions, Inc. (Maryland Heights, MO) から購入した。Escherichia coli BL21 (DE3) コンピテントセルは Novagen (Madison, WI, USA) から購入した。

1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)、1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC)、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)、および 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) は、NOF America Corporation (White Plains, NY, USA) から購入した。DC Protein Assay Kit は、Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA) から購入した。分子量 6,500-66,000 Da のゲルろ過分子量マーカーキットは、Merck KGaA (Darmstadt, Germany) から購入した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) には、137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.1 mM Na₂HPO₄ および 1.47 mM KH₂PO₄ が含まれる。Tris-based gel filtration buffer には、150 mM NaCl、50 mM Tris•HCl (pH 7.4)、0.5 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride、2 mM disodium dihydrogen ethylenediaminetetraacetate dihydrate が含まれる。特に明記されていない限り、すべての反応中の温度制御は、プテクール MiniT-C ブロックヒーター (WakenBtech Co., Ltd., Kyoto, Japan) で行った。

2.2. apoA-I とその変異体の調製

以前の報告に記載されているように、ヒト apoA-I 変異体を発現する cDNA を調製した。[5,6] 全長ヒト apoA-I cDNA は、テンプレートとして pBluescript コンストラクト[5]とプライマー 5'-ggaattccatgatggatgaaccgccgcagagcccgtgggat-3' (sense 鎖) および 5'-aattaaccctcactaaaggg-3' (アンチセンス鎖)、次いで pCOLD I ベクターの NdeI および PstI 部位にクローニングされた。ApoA-I とその変異体は、製造元のプロトコルに従って BL21 細胞で発現させた。溶解バッファーは、20 mM Tris•HCl (pH 8)、137 mM NaCl、10 wt%グリセロール、1 wt%Nonidet P-40、および 10 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride または 20 mM リン酸バッファー (pH 7)、6 M 塩酸グアニジン、0.5 M NaCl、1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride、および 1 mM ジチオトレイトールを含む。前者のバッファーは apoA-I (44-243) と全長 apoA-I に使用され、後者は apoA-I (45-243) PEN に使用された。これらのタンパク質は、グアニジン変性条件下で Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.) 樹脂を充填した Tricorn 10/100 ガラス管 (GE Healthcare) を用いて AKTA start クロマトグラフィーシステム (GE Healthcare) で精製した。精製された apoA-I とその変異体を、molecular weight cutoff 10 kDa の Spectra/Por 6 pre-wetted RC dialysis membrane (Spectrum Chemical Mfg. Corp., New Brunswick, NJ) を使用して、4 mM の 3 L の 0.4 mM HCl に対して透析した。この透析の工程では、10 mM (NH₄)₂CO₃ がよく使用される[10]が、本研究の apoA-I 変異体はこの溶液で沈殿する。したがって、揮発性の 0.4 mM HCl を用いた。透析したサンプルを-80°Cで一晩保存し、FDS-1000 または FDU-1200 (EYELA, Tokyo, Japan) を使用して凍結乾燥しました。

2.3. コール酸透析法による dHDL 再構成

タンパク質成分として N 末端 43 アミノ酸が欠損した apoA-I (apoA-I (44-243)) を含む dHDL は、コール酸透析法の改法を利用して調製した。まず DMPC をエタノールに 4 mg / mL の濃度で溶解し、丸底フラスコに移した。続いてエバポレーター Rotavapor R-300 (BUCHI, Tokyo, Japan) でエタノールを除去し、FDS-1000 または FDU-1200 凍結乾燥機 (EYELA) を使用して真空で 2 時間以上完全に乾燥させ、脂質膜を形成した。次に、PBS (pH 7.4) に溶解させた 30 mg / mL の

コール酸ナトリウムを脂質とコール酸ナトリウムのモル比が 1:4 になるように脂質膜に加えた。得られた分散液を、FMU-1331 インキュベーター (Fukushima Galilei Co. Ltd., Osaka, Japan) を使用して 37°C で 4 時間以上インキュベートした。タンパク質を、1.5 mg / mL の濃度で 4 M urea を含む PBS に可溶化し、脂質分散液に添加しました (混合物中の urea 濃度は約 2 M)。脂質とタンパク質のモル比は 100 に設定した。反応は、DMPC のゲル相から液晶相への相転移温度 (T_m) である 24°C で一晩行った。次に、反応混合物を、molecular weight cutoff 50 kDa の Spectra/Por 6 pre-wetted RC dialysis membrane (Spectrum Chemical Mfg. Corp.) を使用して、室温で 3 L PBS に対して透析するか、Bio-Beads™ SM-2 Resin (Bio-Rad Laboratories, Inc.) の添加後に、製造元のプロトコルに従って 2 時間穏やかに回転させて、urea および/またはコール酸ナトリウムを除去した。透析液は 4 時間以上ごとに 3 回交換した。得られたサンプルを 20,000 g, 24°C で 30 分間遠心分離し、上澄み液を回収して、HiLoad 16/60 Superdex 200 prepgrade column を取り付けた AKTAprime Plus (GE Healthcare) で分取サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に供した。上記の Tris-based gel filtration buffer を用いて、室温で 1 mL/min の流速で dHDL を溶出した。検出は 280 nm の吸光度を測定することにより行った。dHDL 画分 (53-63 分) を収集し、molecular weight cutoff 50 kDa の Spectra/Por 6 pre-wetted RC dialysis membrane を使用して、室温で 3 L PBS に対して透析した。dHDL を 24°C, 3,000 g で 10 分間遠心分離し、Amicon Ultra-15 centrifugal filter (Ultracel-50K, Merck KGaA) を使用して 3,000 g, 24°C で 8 分間濃縮した。このコール酸透析法で再構成された dHDL を以後 cHDL と記す。

2.4. 分析 SEC

HDL サンプルは、Superdex 200 Increase 5/150 GL column (GE Healthcare) を備えた Prominence HPLC システム (Shimadzu, Kyoto, Japan) で分析した。dHDL は、上記の Tris-based gel filtration buffer または 0-4 M urea を含む PBS を使用して、室温で 0.15 mL/min の流速で溶出した。サンプルの吸光度を 280 nm で測定した。

2.5. Urea 存在下での dHDL 再構成の初期検討

DMPC を 10 mg/mL の濃度でエタノールに溶解した。凍結乾燥させた apoA-I(44-243) を、0.166 mg/mL の濃度で 2.17 M urea を含む PBS に溶解した。可溶化を促進するために、溶液を室温で 10 分間超音波処理した。マイクロピペットを使用して、10.5 μ L の DMPC 溶液を 120.7 μ L の apoA-I (44-243) 溶液に、脂質とタンパク質のモル比が 200 : 1 となるようにマイクロチューブ内で混合した。Urea とエタノールの終濃度は、それぞれ 2 M と 4% とした。混合物を、10 回ピペッティングした後、2 回転倒混和させることにより穏やかに混合した。混合物を 20,000 g, 24°C で 10 分間遠心分離し、上澄み液を分析用 SEC で分析した。Urea の存在下で再構成された dHDL を uHDL と記す。

2.6. 混合手順の最適化

DMPC は 6.7 mg/mL の濃度でエタノールに溶解した。ApoA-I (44-243) を 4 M urea を含む PBS に 2.0 mg/mL の濃度で溶かした後、室温で 10 分間超音波処理した。ApoA-I (44-243) 溶液を 1.98 M urea を含む PBS で 18.9 倍希釈して、2.09 M urea を含む 0.106 mg/mL apoA-I (44-243) 溶液を得た。DMPC 溶液を apoA-I (44-243) 溶液に対してモル比 100 : 1 でマイクロチューブに添加した。Urea とエタノールの濃度はそれぞれ 2 M と 4% とした。混合手順を最適化するために、エタノール中の 6.7 μ g/mL DMPC 7.9 μ L を、モル比 100 : 1 の 2.09 M urea を含む PBS 中の 189 μ L の 0.106 mg/mL apoA-I (44-243) に加えた。溶液をピペッティング (10 回)、転倒混和 (2 回)、および VORTEX-GENIE 2 mixer (M&S Instruments, Inc., Osaka, Japan) を用いて、3,220 rpm でボルテックス (0, 10, または 60 sec) 混合した後、反応混合物を分析 SEC に供した。

2.7. 脂質とタンパク質の混合モル比 (L/P) の最適化

L/P を最適化するために、エタノール中でさまざまな濃度に希釈した DMPC を用意した : 3.3 mg/mL (L/P = 50)、5.0 mg/mL (L/P = 75)、6.7 mg/mL (L/P = 100)、13.4 mg/mL (L/P = 200)、20 mg/mL (L/P = 300)、および 26.7 mg/mL (L/P = 400)。マイクロチューブに 2.09 M urea を含む PBS 溶液中の 0.106 mg/mL apoA-I (44-243) にさまざまな濃度の DMPC 溶液を加え、ピペッテ

イング（10回）と転倒混和（2回）で混合しました。24°Cで15時間インキュベートした後、溶液を20,000 g, 24°Cで10分間遠心分離し、上澄み液を収集した。続いて、混合溶液を分取SECにより精製した。分取SECで保持時間53-63分で溶出したHDLを収集した。精製後、uHDL分散液を3,000 g, 24°Cで10分間遠心分離し、Ultracel-50Kを使用して濃縮した（3,000 g, 24°C, 8 min）。溶液を、molecular weight cutoff 50 kDaのSpectra/Por 6 pre-wetted RC dialysis membraneを使用して、室温で3 L PBSに対して一晚透析して、バッファーをPBSに変更した。得られたサンプルをタンパク質およびリン脂質アッセイで評価しました（下記参照）。

2.8. インキュベーション温度と期間の最適化

以前に述べたように、エタノール中の6.7 mg/mL DMPCは、マイクロチューブ内のL/Pが100の2.09 M ureaを含むPBS中の0.106 mg/mL apoA-I (44-243)に添加した。濃度はそれぞれ2 Mと4%とした。その後、DMPC-apoA-I (44-243)分散液をピペッティング（10回）と転倒混和（2回）により混合した。溶液を4°C、24°C、37°Cで15時間インキュベートした後、3,000 g, 24°Cで8分間遠心分離した。上清を回収し、分取用SECカラムを使用してuHDLピーク強度を分析した。インキュベーションの影響を分析するために、DMPCとapoA-I (44-243)の反応混合物をSECで24時間、1時間間隔で12時間分析した。各分析の前に、混合物を20,000 g, 24°Cで10分間遠心分離した。HDLピーク面積は、LabSolutions分析ソフトウェア（Shimadzu）で計算した。

2.9. Urea 濃度の影響

上記のDMPC/apoA-I (44-243)混合物に0.88、1.98、3.08、または4.18 M ureaを含むPBS溶液を添加し、得られた混合物のurea終濃度を1、2、3、および4に調節した。具体的には、2.0 mg/mL apoA-I(44-243)を含むPBSと4 M ureaを含むPBS、1-4 M ureaを含むPBS、および6.7 mg/mL DMPCを含むエタノールの混合比は、240 : 4296 : 189.2 (v/v/v)とした。uHDLも同様に精製し、タンパク質および脂質ベースの収量を後述の通りに決定した。

ApoA-I (44-243)のオリゴマー化を分析するために、分子量と保持時間の関係を、ゲルろ過分子重量マーカーキットを使用して調査した。Cytochrome c (12.4 kDa)、carbonic anhydrase (29 kDa)、

albumin (66 kDa)、および alcohol dehydrogenase (150 kDa) を製造元のプロトコルに示されている濃度で PBS に溶解し、上記の分取 SEC で分析しました。保持時間は 87 (cytochrome c)、79 (carbonic anhydrase)、67 (albumin)、および 60 分 (alcohol dehydrogenase) であった。検量線を **Figure S1** に示す。

2.10. uHDL と cHDL の収量の比較

uHDL および cHDL のタンパク質量は、標準物質としてウシ血清アルブミンを用いて、Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instrument, Inc., Winooski, VT, USA) で調べた。これらのサンプル中の DMPC を定量するために、凍結乾燥したサンプルからエタノールで DMPC を抽出し、Phospholipid C assay kit (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) で分析した。

2.11. サイズ分析

HDL サンプルの流体力学的直径は、Nanotracs UPA-EX250 particle analyzer (MicrotracBEL Corp., Tokyo, Japan) を用いて測定した。使用した溶液の屈折率および粘度値を、ZETASIZER NANO ZSP software (Malvern, Worcestershire, U.K.) で計算した。

2.12. トリプトファン (Trp) 蛍光スペクトル測定

サンプル中の Trp 蛍光スペクトルを測定するために、0 または 2.09 M urea を含む PBS 中の 0.106 mg/mL apoA-I (44-243) を 189 μ L、最適化条件で、エタノール中の 6.7 mg/mL DMPC 7.9 μ L と混合した (Urea-assisted method)。インキュベーションの前または後に、0 または 2 M urea を含む DMPC-apoA-I (44-243) 混合物を、それぞれ 0 または 2 M urea、および 4% エタノール存在下で 10 倍希釈し、蛍光スペクトル測定 (Ex. 280 nm, Em. 300-450 nm) を行った。測定は FluoroMax-4 (HORIBA, Kyoto, Japan) を使用して、室温で、1 時間間隔で合計 12 時間行った。

2.13. 薬物搭載

エタノール中の ATRA (203 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を薬物：脂質のモル比 7.2：100 で cHDL または uHDL と混合し、混合物を 24°C で 9 時間インキュベートした。インキュベーション後、分取 SEC により精製を行った後、molecular weight cutoff 50 kDa の Spectra/Por 6 pre-wetted RC dialysis membrane を用いて 3 L PBS に対して 2 時間透析した。得られた分散液を 3,000g, 24°C で 10 分間遠心分離し、その後 Ultracel-50K (3,000g, 24°C, 8 min) を用いて濃縮した。濃縮した分散液は -80°C で予備凍結した後、FDS-1000 を使用して凍結乾燥した。等容量のアセトニトリルを凍結乾燥サンプルに加え、20,000 g, 24°C で 10 分間遠心分離した。上澄み液の吸収スペクトル (250-500 nm) を UV-3600 Plus (Shimadzu) で分析した。ATRA 濃度は吸収ピーク面積から計算した。

ジメチルスルホキシド中の DXR•HCl (627 $\mu\text{g}/\text{mL}$) またはアムホテリシン B (AmB, 392 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、薬物と脂質のモル比 7.2：100 で cHDL または uHDL と混合し、24 °C で 1 時間反応させた。精製は PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) で行った。次に、AmB または DXR•HCl を搭載したサンプルに 4% または 10% のドデシル硫酸ナトリウムを添加して、各 薬物-HDL 複合体を崩壊させた (ドデシル硫酸ナトリウムの終濃度はそれぞれ 2% または 3.8%)。AmB の吸収スペクトル (405-420 nm) または DXR•HCl の蛍光スペクトル (Ex. 470 nm, Em. 530-565 nm) を、UV-3600 Plus または FluoroMax-4 で分析した。AmB と DXR•HCl の濃度は、吸収または蛍光ピーク面積から計算した。

2.14. Urea-assisted method による ATRA 搭載 uHDL の調製

DMPC と ATRA のエタノール溶液と apoA-I (44-243) の urea 含有 PBS を脂質：薬物：タンパク質のモル比 100：7.2：1 で混合し、最適化された uHDL 調製条件に従ってインキュベートした。複合体の精製および ATRA の定量は、上記と同じ方法で行った。

2.15. 遠紫外円二色性スペクトル測定

200-260 nm の円偏光二色性 (CD) スペクトルは、Chirascan V100 (TEGA Science, Inc., Chiba, Japan) を使用して、窒素雰囲気下、室温で測定した。Lipid-free の apoA-I 変異体の CD スペクト

ルは、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の apoA-I 濃度で測定した。スペクトル測定の前に、タンパク質溶液を 24°C で 1 時間インキュベートした。すべての CD スペクトルデータは、PBS ベースラインを差し引いて得たものを解析に用いた。

2.16. Chemical cross-linking 分析

uHDL と cHDL、市販のヒト血漿 HDL は urea の存在下または非存在下で分取 SEC によって精製し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の apoA-I (44-243) タンパク質濃度で化学架橋した。具体的には、1 M トリエタノールアミン・HCl (pH 9.7) 中の 20 mg/mL dimethyl suberimidate duhydrochloride (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を各タンパク質サンプルと体積比 1:10 で混合し、次に、室温で 2 時間反応させた。50 mM グリシンを加えて反応を停止させた後、SuperSep™ Ace 5-20% ポリアクリルアミドゲル (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) による SDS-PAGE を行った。ゲルを CBB Stain One Super Coomassie Brilliant Blue 溶液 (Nacalai Tesque, Inc.) で染色した。ゲル画像は、DigiPrint Doc Tablet DP-T130z ゲルイメージャー (BioTools Inc., Gumma, Japan) で取得した。

2.17. AFM 観察

HDL 分散液 (PBS 中で 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、マイカ表面に滴下し 2 分間静置した。次に浮遊サンプルを純水ですすいだ。マイカ表面に固定された HDL サンプルを維持するために、純水中で画像を取得しました。HDL は PBS 中の基質上で急速に拡散し、したがって、それらの実際の形状は最初は捕捉できなかった。次に、実験室で構築された高速 AFM[12]とカンチレバー-BL-AC10DS instrument (Olympus Corp., Tokyo, Japan) と EBD チップを使用した。[13]スキャン速度は 1 frame/s とした。

3. Results and discussion

本研究では、His-tag 付きの N 末端 43 アミノ酸欠損型の apoA-I (apoA-I (44-243)) と DMPC を使用した。ヒト apoA-I 遺伝子には 2 つのエクソンがあり、2 番目のエクソンはこの欠損型の apoA-I をコードしています。この欠損変異体は、天然を模倣した環境における単一の膜タンパク質の特性評価のために利用されている「ナノディスク」のタンパク質成分である。[14]さらに、この欠損型 apoA-I で調製されたディスク状 HDL は、全長 apoA-I で調製された野生型 HDL に匹敵するコレステロール引き抜き能を示すと報告されている。[15]今回、エタノール中の DMPC を、urea を含む PBS 中で溶かした apoA-I (44-243) に加え単純混合した。初期条件下では、エタノールと urea の終濃度はそれぞれ 4% と 2 M、L/P は 200 とした。混合物を精製せずに SEC で直接分析したところ、ピークが dHDL とほぼ同じ 9 分の保持時間で検出された (**Figure S2**)。4°C で 2 日間保管した後、混合物を再分析すると、ピーク強度が大幅に増加した。この結果から、この反応を詳細に調査して、新しい dHDL 再構成法を開発することを目指した。本手法で作製される dHDL ナノ粒子は uHDL と略記する。

3.1. 混合手順の最適化

Microfluidics法では、マイクロチップ内で2つの溶液の迅速な混合が達成されている。これは Microvorticesとして知られる重要なプロセスである。**Figure 1a**に示すように、ボルテックス混合により、uHDLのピーク強度が時間依存的に減少した。したがって、ボルテックス混合は我々の方法では有害であり、作用のメカニズムが我々の方法とMicrofluidics法とで異なることを示している。

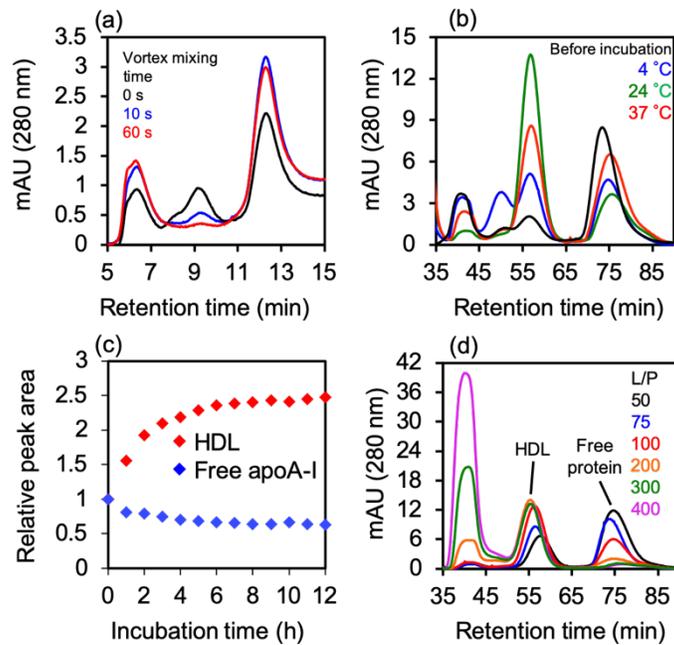


Figure 1. uHDL 形成条件の最適化

実験条件の最適化のために、分析 (a、c) または分取 (b、d) SEC 分析を行った。(a) uHDL 生成のためのボルテックス混合の必要性。ボルテックス混合により、混合時間の増加に伴い uHDL ピーク強度が減少した。ボルテックス混合の前に、すべてのサンプルをピペッティングと転倒混合によって混合した。(b) 4°C (青)、24°C (緑)、37°C (赤) での 23 時間のインキュベーション後と、インキュベーション前 (黒) の反応混合物 (L/P = 100) のクロマトグラム。2 M urea と 4% エタノールを含む PBS 溶液で 24°C でインキュベートすると、uHDL ピーク強度が他の温度よりも増加した。(c) uHDL 生成効率のインキュベーション中の apoA-I (44-243) と DMPC の形成反応の持続時間。uHDL と遊離 apoA-I (44-243) の相対ピーク面積は、0 時間のピーク面積を 1 として表した。uHDL のピーク強度は 9 時間のインキュベーションで飽和した。24°C での反応混合物 (L/P = 100) のインキュベーションにより、uHDL 画分のピーク強度が時間とともに増加した。(d) uHDL ピーク (約 58 分) は、L/P 比 200 で最大に達した。L/P 値が 100 を超えると、大きな脂質複合体 (約 40 分) を生成する副反応が顕著であった。

3.1. インキュベーション温度・時間の最適化

次に、SEC ピーク強度に対するインキュベーション温度の影響を調べた (**Figure 1b**)。我々の分取 SEC での dHDL の保持時間は約 58 分であった。調査した温度 (4°C、24°C、37°C) の中で、24°C が最も効率的に uHDL 形成を促進した (**Figure 1b**)。分取 SEC による精製後、早く溶出されたピーク脂質/タンパク質モル比は 179 と決定され、これは 10 nm のディスク状 HDL の~100 の比よりもはるかに大きかった。したがって、このピーク成分は uHDL ではないと判断した。4°C、24°C、または 37°C で約 58 分のピークから分画された uHDL の平均流体力学的直径は、動的光散乱によってそれぞれ 10.0 ± 1.1 、 8.8 ± 0.2 、および 8.6 ± 0.7 nm と見積もられた。これらの結果に基づいて、最適なインキュベーション温度は、DMPC の T_m である 24°C と決定された。リン脂質の T_m において、apoA-I とリポソーム[16]、あるいはリン脂質のコール酸ミセル[17]からの dHDL 形成に最適な反応速度が得られることが知られている。水溶液へのリン脂質のエタノール溶液の急速な希釈がリポソームを生成する可能性があることを考えると、同様の反応メカニズムの関与、たとえば反応プロセスで DMPC ナノ粒子への apoA-I (44-243) の挿入が起こることが想定される。

24°C でのインキュベーション後、uHDL 吸収ピーク面積は 12 時間後に 2.4 倍に増加し、反応は 6 時間後に 95%完了した (**Figure 1c**)。未反応の apoA-I (44-243) は、uHDL 形成に従って減少した。対照的に、一定の L/P で 2 つの成分の濃度が増加すると 3-4 時間まで 6 時間の期間は減少した (**Figure S3**)。

3.2. L/P の最適化

SEC ピーク強度が L/P の影響を受けるかどうかを調べるために、上記のように最初は 200 に設定されたさまざまな L/P 値 (50-400) で同様の反応を行った。0.106 mg/mL の apoA-I (44-243) 溶液にさまざまな濃度の DMPC 溶液を加え、10 回ピペッティングして 2 回転倒混和させることにより、一定の方法で混合を行った。**Figure 1d** の分取 SEC クロマトグラムに示すように、すべての条件下で uHDL ピーク (保持時間~58 分) が検出された。L/P が増加すると、uHDL 吸収ピークの強度も増加した。L/P が 200 の場合、ピーク強度は最大に達した。**Table S1** に示すように、

タンパク質ベースの収量は L/P = 200 で最高であったが、脂質収量は L/P 200 で 100 と比較して著しく低くなった。これらの結果から、本手法における最適条件は次のとおりである。つまり、L/P = 100 の DMPC とタンパク質を用いて、ピペッティングと転倒混和からなる穏やかな混合を行った後、24°C で 6 時間のインキュベーションを行うことである。

3.3. Urea 濃度の影響

上記の最適化された反応を、さまざまな urea 濃度で実行した。試験した urea 濃度 0、1、2、3、および 4 M のうち、2 M で最も高い uHDL 吸収強度を示した (**Figure 2**)。さまざまな濃度の urea の存在下でのインキュベーション後、分取 SEC (**Materials and methods** を参照) によって精製された uHDL についてタンパク質収率を決定した。urea 濃度 0、1、2、3、および 4 M で調製した uHDL の収率は、それぞれ 22%、49%、73%、65%、および 46% であり、特定の urea 濃度が作製に適していることを示している。以上の結果に基づき、今回検討した urea 濃度の中では 2 M が最適であった。

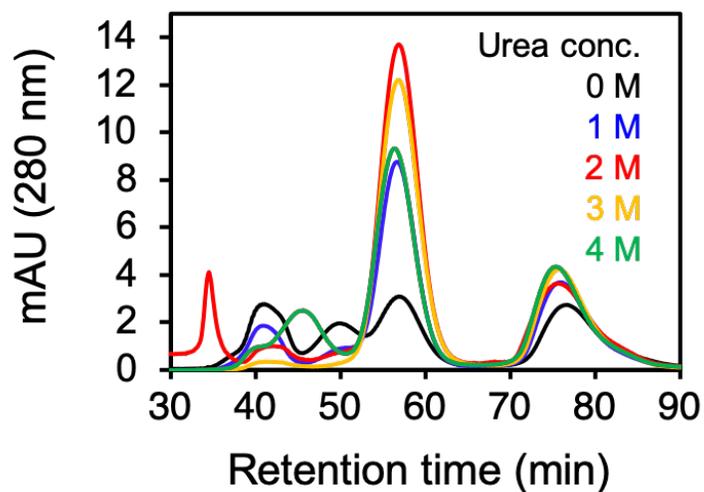


Figure 2. さまざまな濃度の urea の存在下でインキュベーションした後の uHDL のサイズ排除クロマトグラム

0、1、2、3、および 4 M urea と 4%エタノール溶液中で Urea-assisted method によって調製された反応混合物を、24°C で 15 時間インキュベートした後、分取 SEC で分析した。uHDL 画分のピーク強度が最大となるのは、2 M urea を含む場合であった。

3.3. コール酸透析法による直径、形状、収量の比較

脂質/タンパク質を同じ L/P (= 100) で調製し、同条件で精製した uHDL および cHDL の流体力学的直径は、それぞれ 9.4 ± 0.1 および 10.4 ± 1.0 nm であった (Table 1)。AFM 分析は、uHDL の形状が cHDL の形状と同様にディスク状であることを明確に示した (Figure 3)。uHDL の直径と高さはそれぞれ 8.8 nm と 3.7 nm であり、cHDL (7.9 nm と 4.4 nm) に匹敵することがわかった。脂質とタンパク質の含有量も、uHDL と cHDL の間で同等であった (Table 1)。これらのデータに基づくと、uHDL は cHDL と構造的にほぼ等価であることが示唆された。さらに、uHDL 粒子あたりのタンパク質数を決定するために、確立された cross-linking 分析[11]を行った。uHDL と cHDL の両方が同様のバンドパターンを示し、メインバンドは約 50 kDa、マイナーバンドは約 70 kDa に確認された。一方、3つの apoA-I タンパク質を含むことが知られているネイティブ HDL では、約 70 kDa にメインバンドが確認された (Figure S4)。これらの結果は、uHDL と cHDL の粒子あたりのタンパク質数が 2 であり、等しいことを示している。

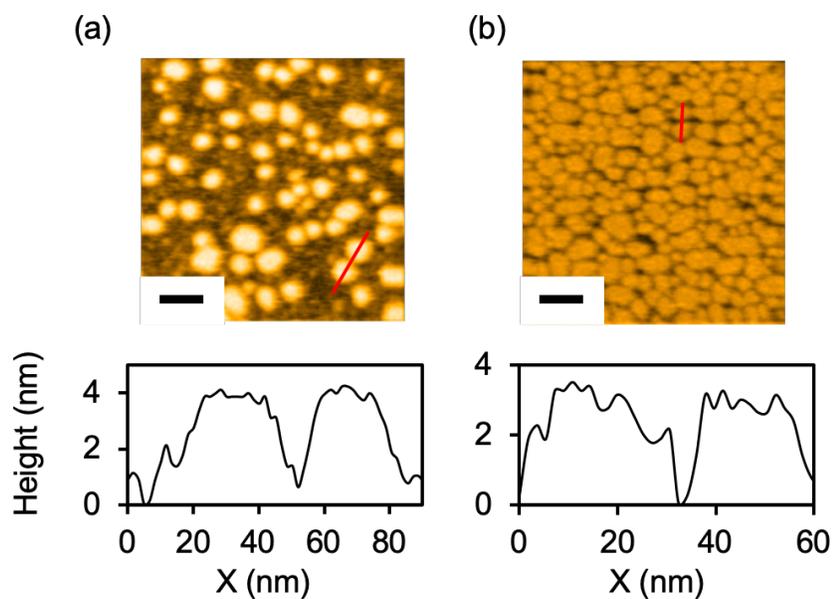


Figure 3. cHDL および uHDL の AFM 画像

cHDL (a) と uHDL (b) の AFM 画像と断面高さを示した。cHDL の直径と高さは 18 ± 4 および 4.0 ± 0.5 nm ($n = 14$) と計算され、uHDL は 19 ± 3 および 3.1 ± 0.3 nm ($n = 12$) であった。Black bar, 50 nm。

Table 1. 2つの方法で調製された dHDL の収量と粒子の特性評価

	Cholate dialysis ^a	Urea-assisted
Yield (protein basis, %)	68 ± 9	73 ± 3
Yield (lipid basis, %)	71 ± 12	70 ± 1
Mean hydrodynamic diameter (nm)	10.4 ± 1.0	9.4 ± 0.1
Lipid/protein molar ratio (in HDL)	104 ± 4	96 ± 3

^a本研究における我々のデータ。

上記のように (Table S1)、最適化された条件下で得られた uHDL の脂質およびタンパク質収率は、それぞれ $73 \pm 3\%$ および $71 \pm 3\%$ 、cHDL では $68 \pm 9\%$ および $71 \pm 12\%$ (Table 1) であった。また精製前の反応混合物の SEC クロマトグラムのプロファイルは同様であった (Figure S5)。これまでに得られた結果に基づいて、この dHDL 再構成法を Urea-assisted method と名付けた。

3.4. 他のリン脂質への適用性

本方法の DMPC 以外のリン脂質への適用性を評価するために、2 M urea の存在下で DLPC ($T_m = -2^\circ\text{C}$)、DPPC ($T_m = 41^\circ\text{C}$)、および DSPC ($T_m = 55^\circ\text{C}$) をそれぞれ 4°C 、 41°C 、 55°C で反応させた。コール酸透析法では、 T_m が 0°C 以下のリン脂質に対して 4°C のインキュベーション温度が使用されているため、DLPC のインキュベーション温度を 4°C とした。Figure S6a-c に示すように、DLPC を使用する場合にのみ、分析 SEC で uHDL に分類可能な 9-11 分の範囲にピークが現れた。分取 SEC に対応するピークを分取した後、平均流体力学的直径と脂質とタンパク質のモル比は 8.2 nm および 88 であることがわかった。DPPC および DSPC の場合、インキュベーション後に新しいピークは確認されなかった。リポソーム水和法では、リン脂質の T_m であっても、より高いインキュベーション温度での再構成は好ましくなくなり [17]、主に apoA-I のらせん形成に起因するエンタルピーの大幅な減少により、cHDL 形成は熱力学的に有利になる。[19]したがって、我々の方法は、これら 2 つの方法よりも反応温度に敏感であり、反応温度は、目的のリン脂質の T_m に調整しながら、可能な限り低くする必要がある可能性がある。これが事実である場合、室温付近で T_m を制御するためのいくつかの戦略は、DMPC 以外のリン脂質で uHDL を効率的に再構成するために必要である。

3.5. uHDL 形成における urea の役割

これまでの検討で特定濃度の urea の存在が、我々の方法で最も重要な要因であることがわかった。作用機序を理解するために、apoA-I (44-243) の構造に対する urea の影響を調べ、脂質膜への apoA-I の挿入に対する影響も調べた。この挿入過程はリポソーム水和法の律速段階として認識されている。[20] Figure 4a は、0-4 M urea を含む PBS に可溶化されたタンパク質のサイズ排

除クロマトグラムを示している。約 75 分でのピークは、SEC 検量線 (**Figure S1**) および chemical cross-linking 分析 (**Figure S4**, lane 6) を使用して、apoA-I (44-243) 単量体であると判断された。分取 SEC クロマトグラムにおける apoA-I 単量体以外のピークは、0 M urea でのみ検出された。これは、SEC 検量線から 5 個を超える apoA-I (44-243) タンパク質を含むマルチマーに相当する (**Figure S1**)。モノマーのピーク強度は、1 M urea を含めることでわずかに増加した。この増加幅は、1 M を超える urea 濃度ではわずかであった。Chemical cross-linking 分析では、2 M urea の存在下では、urea の非存在下よりもモノマーバンドの強度が強くなった (**Figure S4**)。これらの結果は、わずかな apoA-I (44-243) が 0 M urea で多量体として存在することを明確に示している。さらに、urea の添加により反応混合物の pH はわずかに塩基性になるため (**Table S2**)、酸性の pH によって誘発される dHDL 形成の可能性を明らかに除外される。[21]

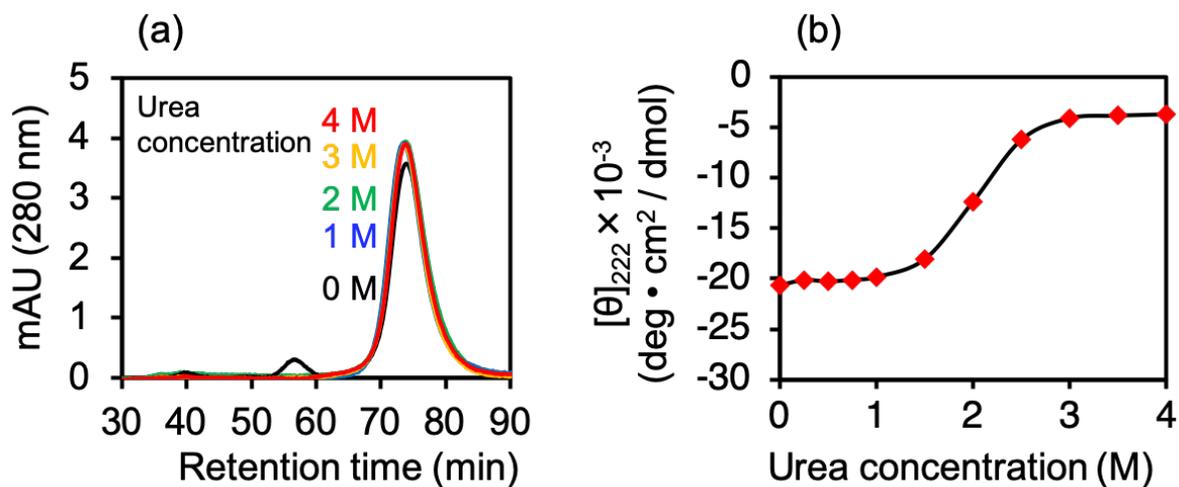


Figure 4. リン脂質の非存在下における urea による apoA-I (44-243) の可溶化と変性

ApoA-I (44-243) は、タンパク質濃度 0.101 mg/mL の 0-4 M urea と 4%エタノールの存在下で分取 SEC 分析に供した (a)。Urea が存在しない場合 (透析により urea を除去した場合)、保持時間が短い (約 57 分) オリゴマーが溶出された。apoA-I (44-243) (b) の円偏光二色性スペクトルは、折りたたまれた状態と展開された状態の遷移中点 urea 濃度が 2 M であることを示している。すべての測定は、リン脂質の非存在下で行った。

次に、apoA-I (44-243) の urea 変性曲線は、モル楕円率に基づいて作成した (Figure 4b)。タンパク質は、それぞれ 1 M urea と 3 M urea でほぼ折りたたまれた状態と展開された状態であり、変性曲線における転移中点は 2 M で、これは以前に報告された 1.9 M とほぼ同じであった。[22] 興味深いことに、この濃度は Urea-assisted method における urea 濃度 (2 M) の最適値とほとんど同じ値であった。これは、タンパク質と DMPC との反応性がその構造によって制御されていることを示唆している。これを確認するために、転移中点 urea 濃度を、全長 apoA-I および N 末端 44 アミノ酸欠損 C 末端 Penetratin 融合 apoA-I (apoA-I (45-243) PEN) で同様の試験を行った。後者は、以前、当研究室においてマウスの後眼部に低分子化合物を運ぶことができる dHDL 変異体を調製するために使用してきた。[6]2 種類の cHDL を、DMPC と各タンパク質で調製した。Figure S7a、b に示すように、転移中間点 urea 濃度はそれぞれ 2.7 M (全長 apoA-I) および 3.1 M (apoA-I (45-243) PEN) で、前者は以前に報告された 2.6 M に相当した。[22]2 種類の apoA-I および apoA-I 変異体からなる uHDL の SEC ピーク強度は、調査した濃度の中で転移中間点 urea 濃度において最も高かった (Figure S8)。これらの結果は、特定の量の変性タンパク質の存在が Urea-assisted method による再構成に有利であることを明確に示している。同様の構造崩壊によって誘発されるリポタンパク質形成が apoE について報告されており、ヘリックス間の tertiary contact の緩みはその脂質結合活性を増加させると予想されている。[21]この場合、dHDL 形成中に起こる apoA-I の二次構造の大幅な変化が想定される。コール酸透析法では、cHDL 形成はエンタルピー駆動型のプロセスであり、エンタルピーの低下は主に apoA-I[19]の α -ヘリックス形成によるものであると報告されているが、uHDL 形成能は 2 M urea (50%タンパク質変性) 環境よりも 4 M urea (タンパク質 100%変性) 環境において有意に低かった。この明らかな矛盾を理解するために、cHDL 構造に対する urea の影響を調べた。Figure S9 に示すように、4 M urea の存在は cHDL の分解を誘発することがわかり、urea に対する uHDL の安定性が別の決定因子であることを示唆している。したがって、この変性における転移中点 urea 濃度の重要性は、反応混合物におけるエンタルピーの減少と uHDL の不安定化という 2つの要因に対して上手くバランスをとっている可能性がある。

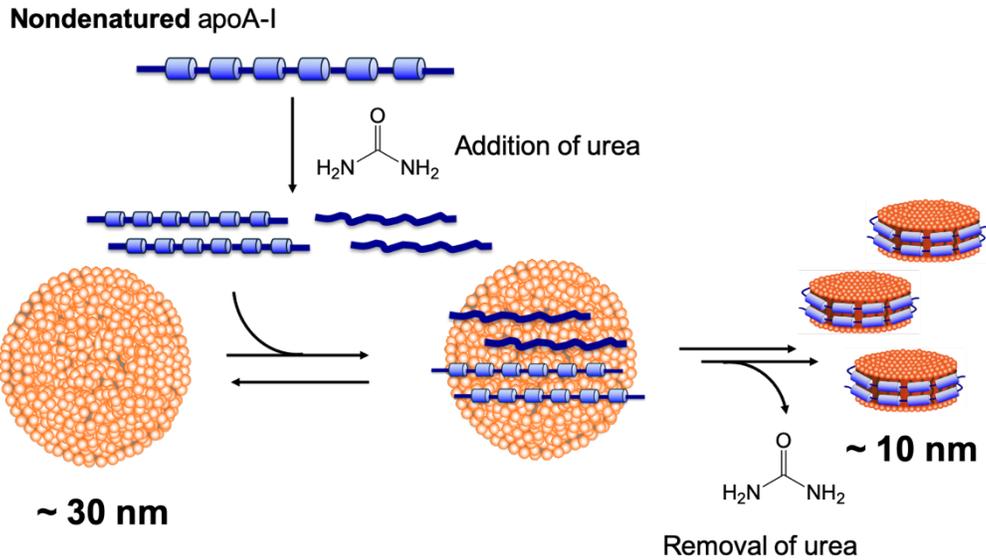
uHDL と cHDL のタンパク質収率は、我々の実験条件下では、それぞれ apoA-I (44-243) (73 ± 3 と 68 ± 9) の方が、全長 apoA-I (55 ± 4 と 50 ± 6) (**Table S3**) よりも高かった。透析ではなく、BioBeads を使用してコール酸を除去するコール酸透析法改法では、DMPC と apoA-I (44-243) で調製した dHDL のタンパク質収率は、~51%であり、コール酸透析法における収率よりも大幅に低かった。以上より、ここで観察された urea 効果に対する感受性は、apoA-I (44-243) の方が全長 apoA-I よりも大きいようである (**Figure 2** および **S8a**)。これらの結果は、我々の方法の有効性が apoA-I (44-243) タンパク質特異的であることを示唆している。一方、Urea-assisted method と (従来の) コール酸透析法の 2 種類の手法で同等の収率が得られたことにより、dHDL 形成速度を調節する共通因子の存在を推測することが可能となるだろう。

3.6. Urea-assisted method の作用メカニズム

uHDL 形成の作用メカニズムを理解するために、混合直後の反応混合物を用いて DLS でサイズ分布を調べた。**Figure S10** に示すように、平均直径は約 30 nm であり、uHDL の約 10 nm の 3 倍であった。同様の測定を脂質のみに対して行ったところ、サイズは同じく約 30 nm であった (**Figure S11**, black line)。これらの結果は、いくつかの脂質ナノ粒子が最初に形成され、その後の反応で脂質ナノ粒子が uHDL へ変換されたことを示唆する。またタンパク質の非存在下で DMPC の濃度が増加すると、脂質ナノ粒子のサイズが増加した (**Figure S11**)。当初、~30 nm ナノ粒子の高い膜曲率が apoA-I (44-243) の膜挿入に適していると予想していたが、この結果は膜曲率が重要な要素ではないことを示唆している。

次に、uHDL 形成プロセスを脂質-タンパク質相互作用の観点からさらに調査した。タンパク質の Trp 残基の蛍光ピーク波長は、周囲の疎水性に依存することが知られており、波長が短いほど疎水性が高いことを示す。[23]ApoA-I(44-243) には 3 つの Trp 残基 (Trp50、Trp72、および Trp108) があり、両親媒性 α ヘリックスの非極性 (脂質に面した) 側または極性面と非極性面の間の境界面に存在する。[24-26]**Figure S12** に示すように、Trp 発光ピーク波長は、最初 (0-1 時間) に急速に減少し、その後混合すると徐々に (1-6 時間) 減少した。**Figure S10** および **S11** のデータと合わせて、このプロファイルは、2 段階反応が 30 nm の脂質ナノ粒子へのタンパク質の急速な結

合と、10 nm uHDL のゆっくりとした放出からなり、半変性タンパク質が折りたたまれた状態に変化することを示唆している。二段階反応は、ナノディスク形成の作用メカニズムを報告する以前の研究によって示されている。[20]遊離型 apoA-I と脂質結合型の apoA-I の間の平衡がリポソーム水和法で提案されたことを考えると[27,28]この高速プロセスには、同様の平衡の形成が含まれる可能性がある (Scheme 1)。



Scheme 1. 想定される uHDL 形成のメカニズム

水溶液による脂質/エタノール溶液の強い希釈により、大きな脂質ナノ粒子（約 30 nm）が形成された。脂質溶液に半変性 apoA-I（44-243）を追加すると、タンパク質が脂質ナノ粒子に吸着し、結合した urea 分子が除去された。脂質膜上の apoA-I（44-243）の折りたたみは、6 時間かけて起こり、ディスク状の構造を形成した。

3.7. Urea-assisted method による薬物搭載

薬物搭載効率を、uHDL と cHDL の間で、分配係数値 (LogP) 、 ATRA (logP 6.3) 、 29 AmB (logP 0.8) 、 および DXR・HCl (logP 1.4) が異なる 3 種類の薬物と比較した。薬物搭載は、uHDL または cHDL を薬物と一緒に 24°C で 9 時間 (ATRA) または 24°C で 1 時間 (AmB および DXR・HCl) インキュベートすることにより行った。Figure 5 に示すように、搭載された薬物量は 3 つの薬物すべてで同等であった。これらの結果は、uHDL と cHDL が構造的に等価であることを裏付けている。最後に、Urea-assisted method による 3 つの成分の混合中に、薬剤搭載 uHDL が形成されるか調べた。ApoA-I (44-243) を 1 : 100 : 7.2 のモル比で DMPC および ATRA と混合し、インキュベートすると、ATRA-cHDL と同様の直径のディスク状ナノ粒子が得られた (Figure S13) 。タンパク質あたりの ATRA の割合も同等であった (Figure 5a、Blue bar) 。これらの結果は、dHDL を再構成するためだけでなく、薬物を搭載した dHDL 製剤を作製するためにも、我々の方法が利用できることを示唆している。

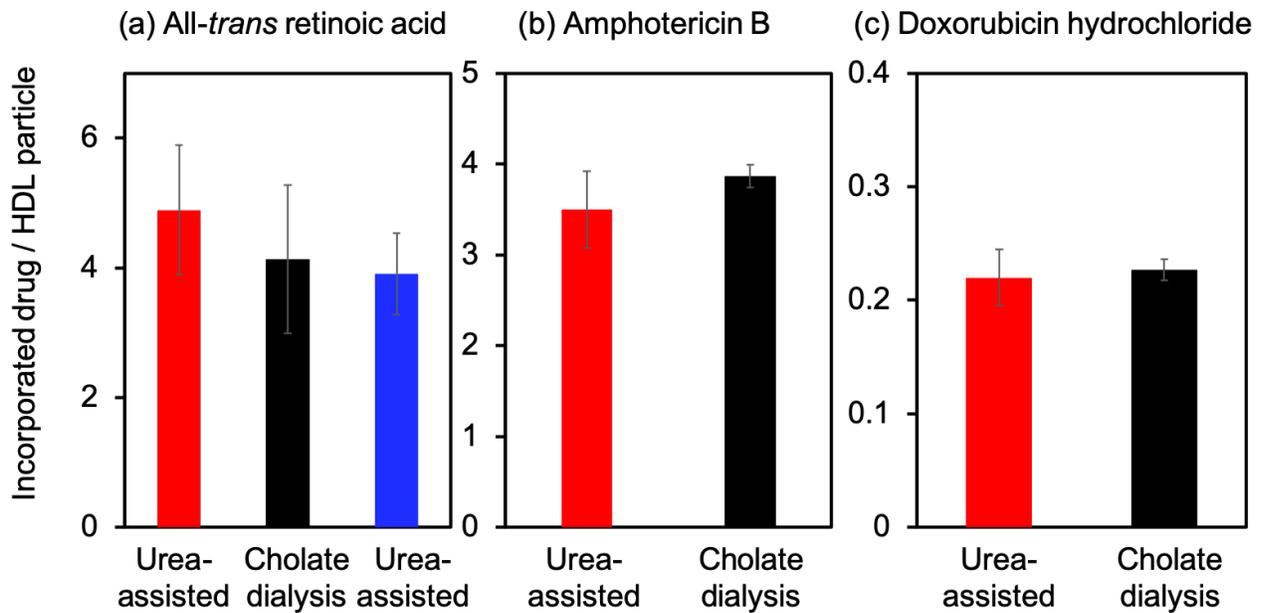


Figure 3. さまざまな dHDL 作製方法での薬物搭載効率の比較

uHDL (赤) または cHDL (黒) への薬物搭載効率を示す。モデル薬物として、疎水性 ATRA (a)、わずかに親水性の AmB (b)、または親水性の DXR•HCl (c) を使用した。(a) では、Urea-assisted method に従って 3 つの成分を混合することによる dHDL 再構成中の ATRA 搭載データを青色で示す。

3.8 制限事項

Urea-assisted method と呼ばれる dHDL の再構成法の開発に成功した。エタノール中の DMPC と 2 M urea を含む PBS 中の apoA-I (44-243) を穏やかに混合し、ゲル-液晶相転移温度で 6 時間インキュベートすると、dHDL 再構成に最も広く使用されているコール酸透析法と同等の収率で dHDL が得られた。特に、再構成に使用されるタンパク質の変性曲線における転移中点濃度の urea を含めることが重要な工程であった。この urea 効果は、全長タンパク質よりも N 末端欠失変異体の方でより重要であった。Urea-assisted method の作用機序として、混合直後に 30 nm の脂質ナノ粒子が形成される 2 段階反応を提案した。次に、最初のステップでこれらの粒子に apoA-I (44-243) を結合させ、次のステップで 10 nm dHDL を複合体からゆっくりと放出させた。タンパク質の半変性状態が後のステップで重要であると想定された。我々の手法は、脂質とタンパク質、薬物の 3 つの成分を混合することにより、薬物搭載 dHDL を 1 ステップで作製することもできた。この方法に適用できるリン脂質は、現在 DMPC に限定されている。したがって、この制限を克服するには、さらなる研究が必要であり、研究を継続することで、さまざまな分野における dHDL の有用性を大幅に高めることになると思う。

Supporting information

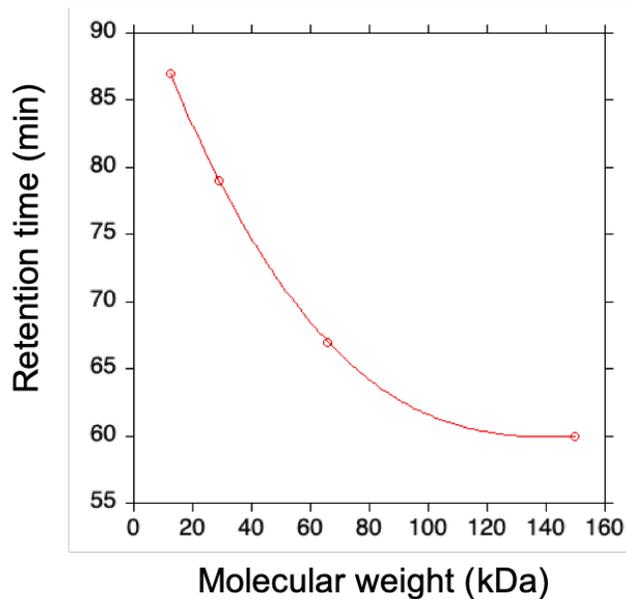


Figure S1. 分取 SEC におけるタンパク質分子量と保持時間の関係

Cytochrome *c* (12.4 kDa)、carbonic anhydrase (29 kDa)、albumin (66 kDa)、および alcohol dehydrogenase (150 kDa) を分取 SEC で分析した。タンパク質分子量と保持時間の関係式は次のように表される。

$$Y = M0 + M1 \cdot X + M2 \cdot X^2 + M3 \cdot X^3 \quad (1)$$

$$\begin{aligned} M0 &= 94.197 \\ M1 &= -0.62498 \\ M2 &= 0.0036808 \\ M3 &= -0.0000068946 \end{aligned}$$

式 (1) から、Figure 1b、1d、2、4a における 75 分のピークは、約 1.5 mer の apoA-I (44-243) に相当する。Figure 4a における 57 分のピークは検量線の範囲外だったため、Multimer 内の apoA-I (44-243) (26 kDa) の数は 5 を超えると計算された。

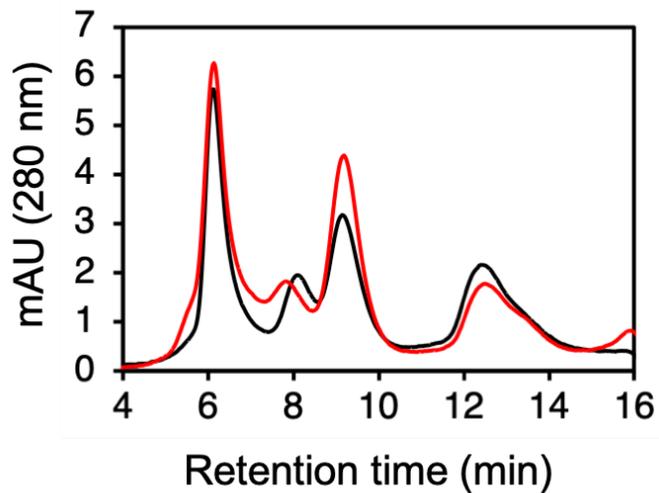


Figure S2. DMPC と apoA-I の単純混合物の分析 SEC クロマトグラム

DMPC と apoA-I (44-243) の単純混合物を、4°Cで2日間培養する前（黒）と後（赤）に分析用 SEC により分析した。溶液条件は、4%エタノールと 2 M urea を含む PBS とした。遊離 apoA-I (44-243) の吸収ピーク（約 12 分）の他に約 9 分の保持時間、つまり HDL 画分に吸収ピークが観察された。約 6 分の別の強いピークも観察された。これは生成物の脂質対タンパク質のモル比と平均流体力学的直径がそれぞれ>800 および~41 nm であったため、protein-poor な大きな脂質複合体であると推定される。

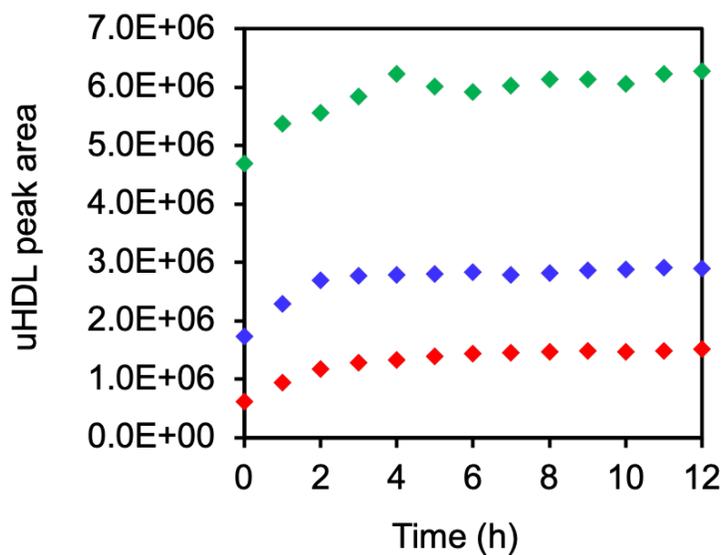


Figure S3. 反応時間の濃度依存性変化

Urea-assisted method により調製された uHDL の、SEC クロマトグラムにおける uHDL ピーク面積値の時間変化を示す。各脂質 / タンパク質濃度は、それぞれ $6.7 \text{ mg mL}^{-1} / 0.106 \text{ mg mL}^{-1}$ (赤)、 $13.4 \text{ mg mL}^{-1} / 0.212 \text{ mg mL}^{-1}$ (青)、または $26.7 \text{ mg mL}^{-1} / 0.424 \text{ mg mL}^{-1}$ (緑) とした。各反応は 6、3、または 4 時間で停止した。

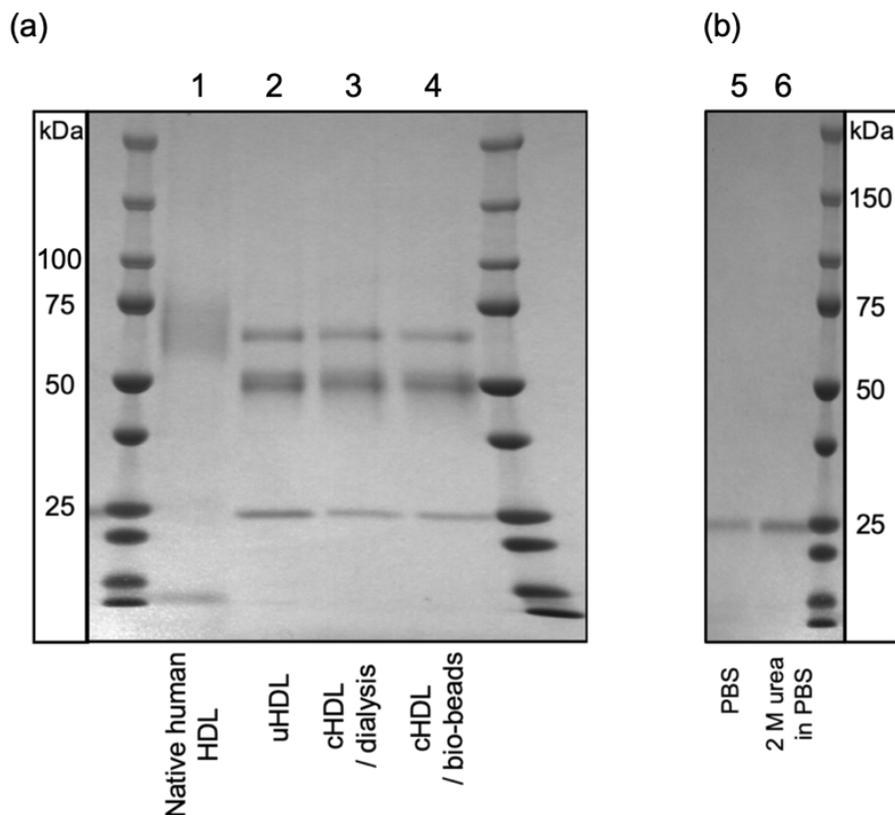


Figure S4. 化学架橋分析

化学架橋反応後の4種類のHDL (a) および apoA-I (44-243) (b) のCBB染色 SDS-PAGEゲルの画像を示す。市販のヒト血漿 HDL (レーン1) の平均流体力学的直径は、実験的に10 nmであることがわかっている。レーン1のスミアバンドの分子量は50-100 kDaの範囲であった。透析によりコール酸ナトリウムを除去した uHDL (レーン2) と cHDL (レーン3)、またはバイオビーズでコール酸ナトリウムを除去した cHDL (レーン4) は、SDS-PAGE分析で50 kDa程度のバンドを示した。対照的に、urea非存在下 (レーン5) または存在下 (レーン6) での apoA-I の反応生成物のバンドは、約25 kDaにのみ現れた。ただし、ureaが存在しない場合、レーン5のバンドはレーン6のバンドよりもわずかに薄くなった。すべてのサンプルの濃度は、タンパク質換算で100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、レーン2-4の脂質対タンパク質の重量比はすべて ~ 2.6 であった。

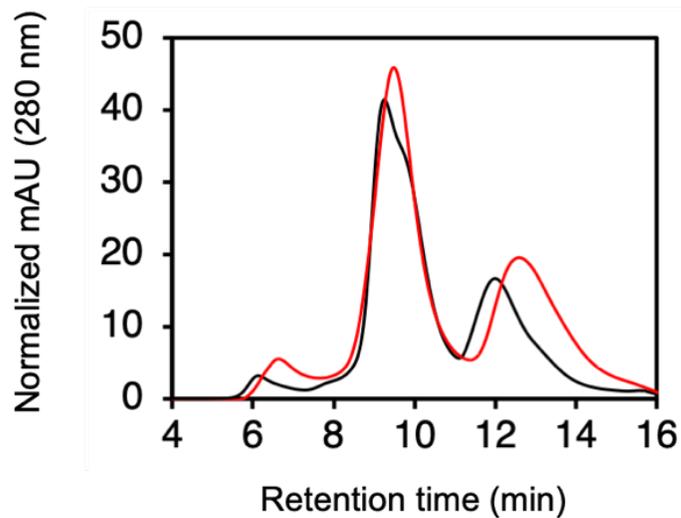


Figure S5. cHDL または uHDL を含む反応混合物の分析 SEC クロマトグラム

反応混合物中の cHDL (黒) または uHDL (赤) は、それぞれ透析後にコール酸ナトリウムを除去した後 (Materials and methods を参照)、または urea 存在下で 24°C で 12 時間インキュベートした後、分析した。これらのクロマトグラムは類似しており、dHDL の収量が同等であることを示唆している。

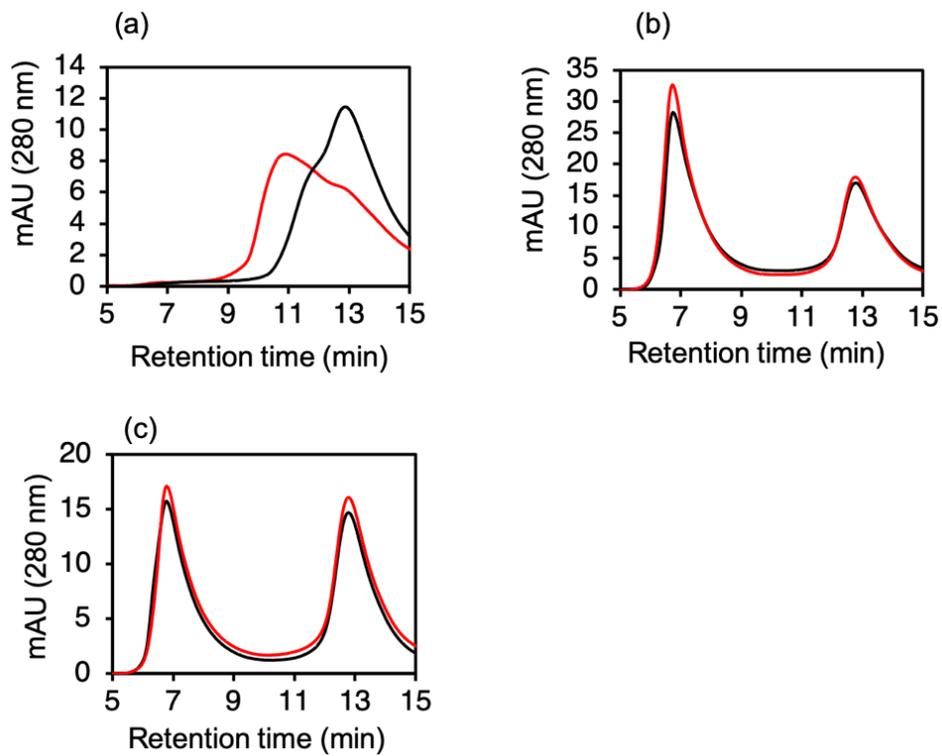


Figure S6. 脂質タイプ依存的な uHDL 形成

ApoA-I (44-243) と DLPC (a)、DPPC (b)、または DSPC (c) とを L/P モル比 100 で、2 M urea を含む PBS 溶液中で混合した。反応混合物を SEC で分析した。混合直後 (黒) または混合後 30 分 (赤) のクロマトグラムを示す。

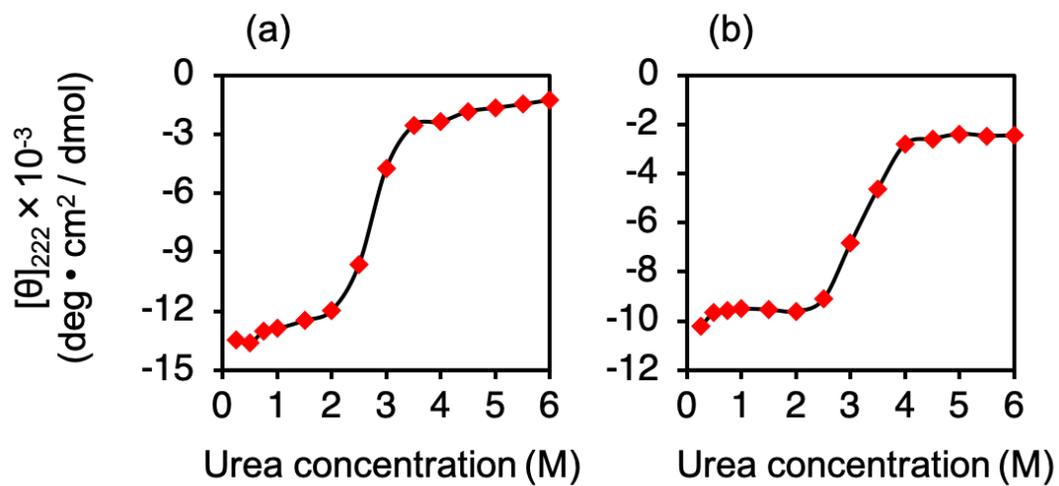


Figure S7. 円偏光二色性

全長 apoA-I (a) および apoA-I (45-243) PEN (b) の円偏光二色性スペクトルを示す。Urea 変性における転移中点濃度は、それぞれ 2.7 M と 3.1 M と計算された。

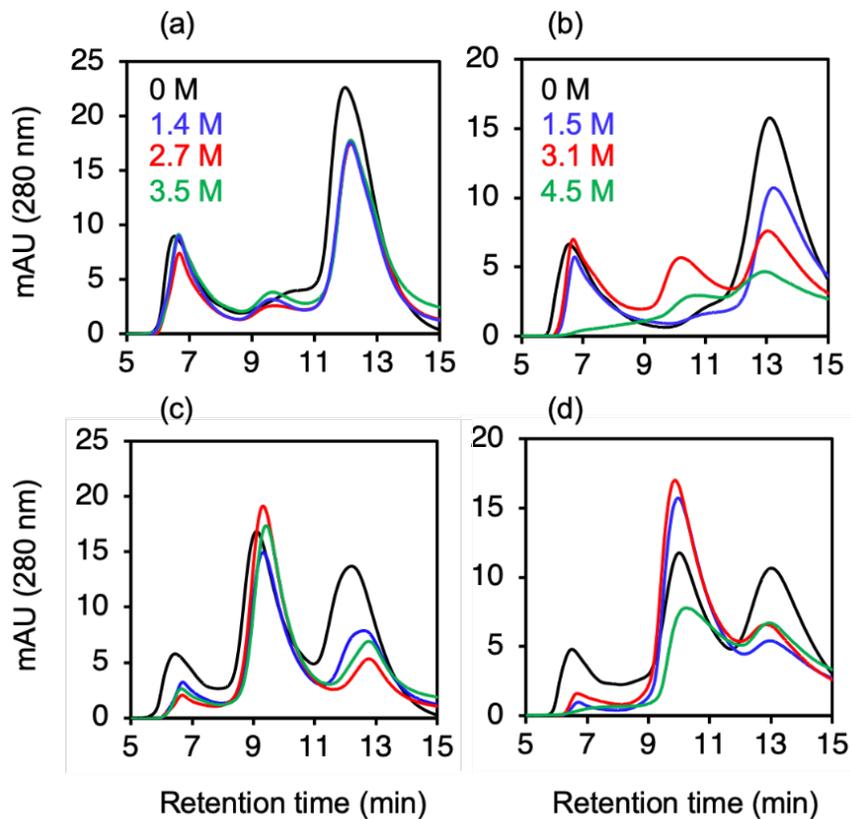


Figure S8. uHDL 形成のための最適な urea 濃度

さまざまな濃度の Urea 溶液中における、全長 apoA-I (a, c) または apoA-I (45-243) PEN (b, d) を含む uHDL の SEC 分析結果 (静置反応前: (a, b)、静置反応後: (b, d)) を示す。最も効率良く uHDL 形成する urea 濃度は 2.7 (全長 apoA-I) または 3.1 M (apoA-I (45-243) PEN) であり、apoA-I (44-243) (図 2 および 4 (b)) の場合と同様に、urea 変性における転移中点濃度 (Figure S6) と等しかった。対照的に、これら 2 つのタンパク質による uHDL 形成に対する urea の影響は、apoA-I (44-243) の場合よりも小さかった (Figure 2)。

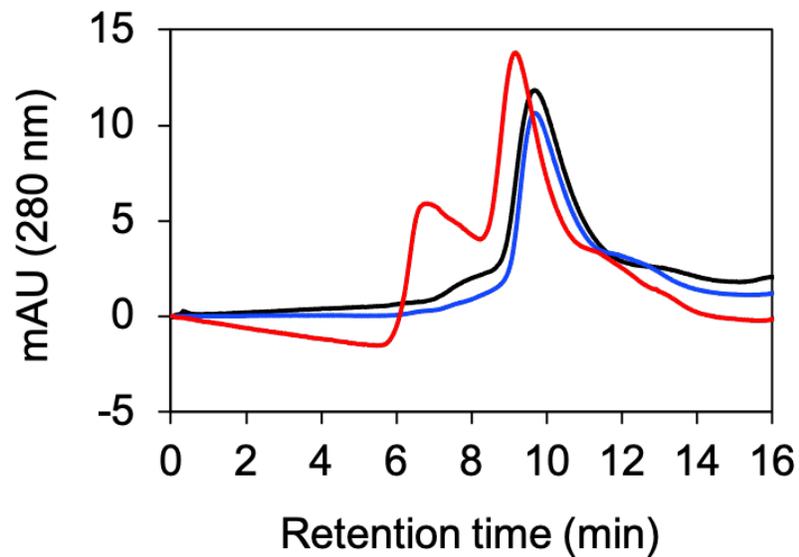


Figure S9. Urea による cHDL 変形

2 M (青) または 4 M urea (赤) 存在下、あるいは非存在下 (黒) で cHDL の分析 SEC を行った。cHDL を 0、2、または 4 M urea で処理した後、溶出液としてそれぞれ 0、2、または 4 M urea を含む PBS で分析した。4 M の存在下でのみ HDL 画分以外のピークが約 7 分に検出され、cHDL から大きな粒子が生成されていることを示す。

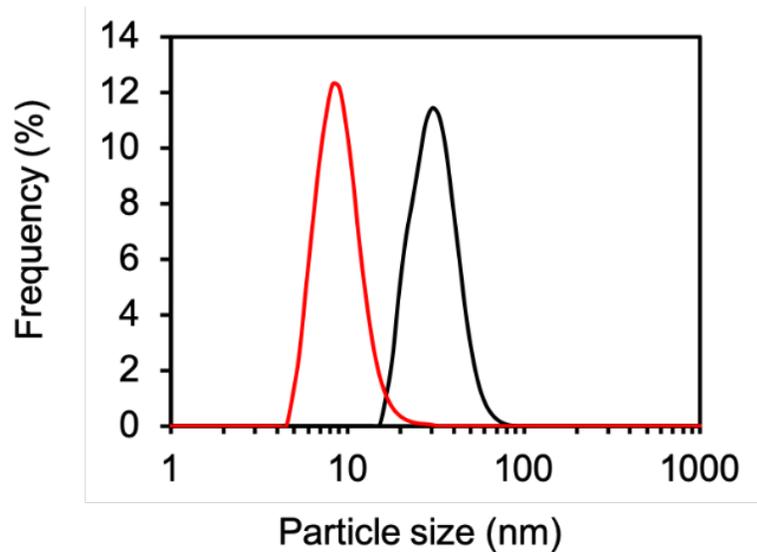


Figure S10. uHDL 形成反応中の粒子サイズの変化

エタノール中の 6.7 mg/mL DMPC と 2.09 M urea を含む PBS 中の 0.106 mg/mL apoA-I (44-243) を体積比 7.9 μ L : 189 μ L で混合した直後、粒子サイズは約 30 nm であった (黒)。インキュベーションおよび分取 SEC による精製後、平均流体力学的直径は約 10 nm (赤) となった。Urea/エタノール溶液の屈折率と粘度は、ZETASIZER NANO Z (Malvern Panalytical, Ltd, Worcestershire, UK) ソフトウェアの計算値を用いた。

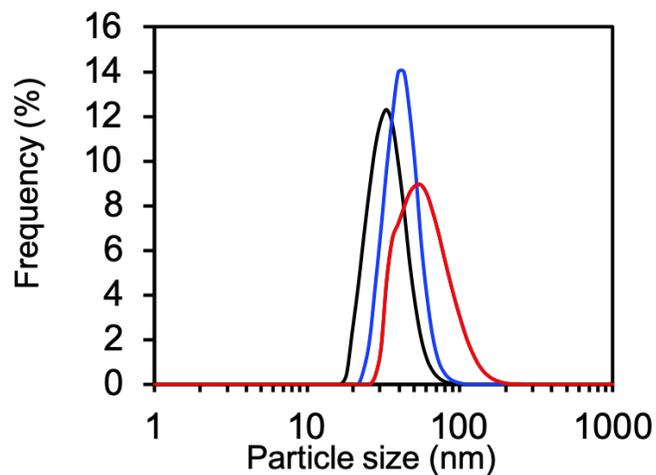


Figure S11. ApoA-I 非存在下における DMPC ナノ粒子のサイズ分布

DMPC ナノ粒子のみのサイズ分布を、2 M urea と 4%エタノール存在下で DLS により測定した。6.7 mg/mL (黒)、13.4 mg/mL (青)、および 26.7 mg/mL (赤) の濃度の DMPC のエタノール溶液 (7.9 μ L) に 2.09 M urea を含む PBS 溶液 (189 μ L) を添加した。それぞれ 33、41、および 59 nm の平均流体力学的直径を持つナノ粒子が生成した。Urea/エタノール溶液の屈折率と粘度は、ZETASIZER NANO Z ソフトウェアによる計算値を用いた。

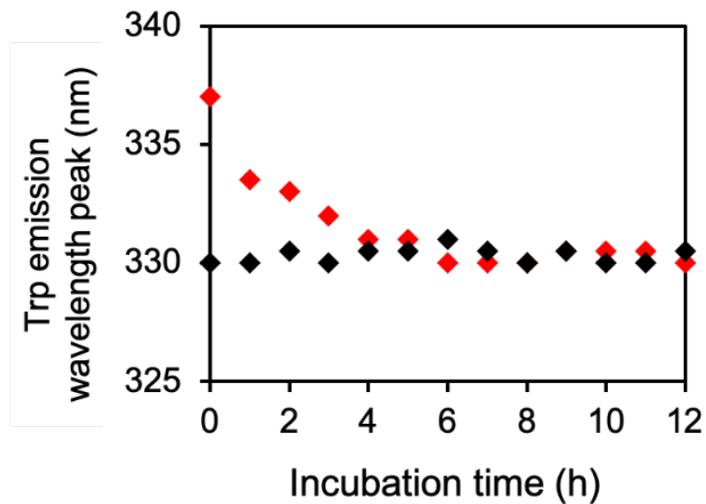


Figure S12. Trp 最大蛍光波長の時間変化

Trp 最大蛍光波長の時間変化を、DMPC/apoA-I 反応混合物のインキュベーションの開始から 12 時間測定した。最大蛍光波長は 6 時間でブルーシフトした。このブルーシフトは、2 M urea (赤) の存在下でのみ観察されたが、urea (黒) の非存在下では検出されなかった。励起波長は 280 nm とし、スペクトル測定は 25°C で行った。

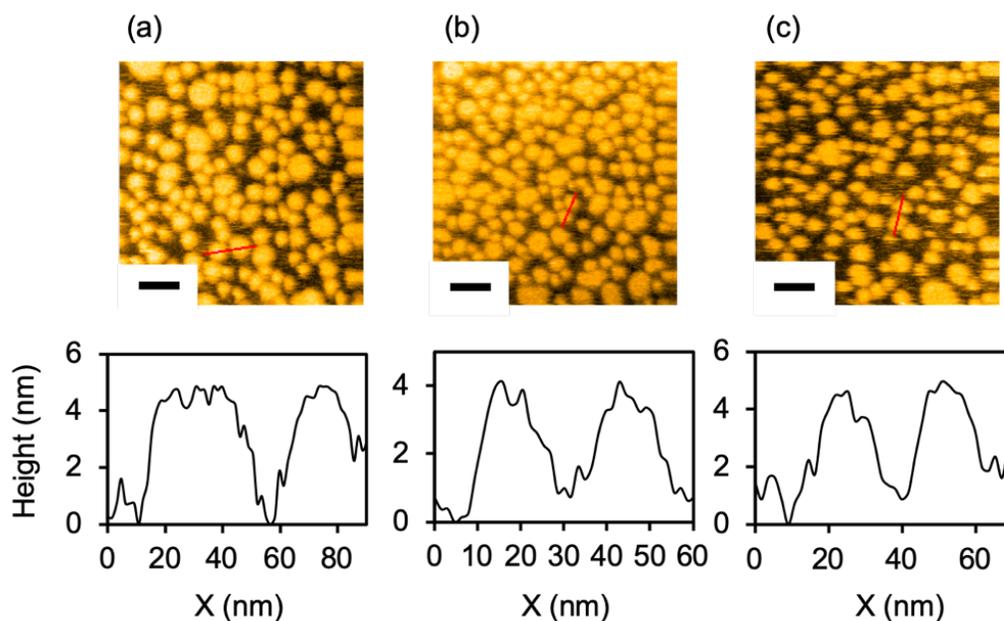


Figure S13. ATRA ロード cHDL および uHDL の AFM 画像

ATRA 搭載 cHDL (a)、ATRA 搭載 uHDL (b)、およびシングルステップの薬物搭載によって再構成した ATRA 搭載 uHDL (c) の AFM 画像と断面高さを示す。ATRA 搭載 cHDL、ATRA 搭載 uHDL、およびシングルステップの薬物搭載によって再構成した ATRA 搭載 uHDL の直径は、 18 ± 3 (n=18)、 16 ± 2 (n=20)、および 16 ± 3 nm (n=20) であった。これらの HDL の高さは、 4.7 ± 0.3 、 3.9 ± 0.3 、 4.6 ± 0.3 nm であった。スケールバーは 50 nm を示す。

Table S1. 脂質とタンパク質の混合比が異なる uHDL の平均体積サイズと収率

L/P	Mean hydrodynamic diameter (nm)	Yield (protein basis, %)	Yield (lipid basis, %)
50	8.4 ± 0.5	26 ± 8	56 ± 11
75	8.8 ± 0.5	43 ± 4	62 ± 12
100	8.8 ± 0.2	66 ± 8	66 ± 9
200	9.0 ± 0.4	74 ± 7	38 ± 7
300	9.8 ± 0.5	58 ± 9	25 ± 6
400	11.5 ± 2.2	65 ± 18	20 ± 7

Table S2. 0–1 M urea を含む PBS の pH 値

Urea concentration (M)	pH
0	7.4
1	7.5
2	7.6
3	7.7
4	7.7

Table S3. 3つの方法で調製された全長 apoA-I を含む dHDL の収率と粒子特性

	Urea-assisted	Cholate dialysis	Microfluidics ⁹
Yield (protein basis, %)	55 ± 4	50 ± 6	57 ± 11
Yield (lipid basis, %)	73 ± 5	67 ± 8	53 ± 4
Mean hydrodynamic diameter (nm)	9.5 ± 0.1	9.1 ± 0.3	8.0–9.0
Lipid/protein molar ratio in HDL	133 ± 6	130 ± 3	~97

4. References

- [1] Toth, P. P., Barter, P. J., Rosenson, R. S., Boden, W. E., Chapman, M. J., Cuchel, M., D'Agostino, R. B., Davidson, M. H., Davidson, W. S., Heinecke, J. W., Karas, R. H., Kontush, A., Krauss, R. M., Miller, M., and Rader, D. J. (2013) High-density lipoproteins: A consensus statement from the National Lipid Association. *J. Clin. Lipidol.* 7, 484–525.
- [2] Rohatgi, A., Khera, A., Berry, J. D., Givens, E. G., Ayers, C. R., Wedin, K. E., Neeland, I. J., Yuhanna, I. S., Rader, D. R., De Lemos, J. A., and Shaul, P. W. (2014) HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 371, 2383–2393.
- [3] Mo, Z. C., Ren, K., Liu, X., Tang, Z. L., and Yi, G. H. (2016) A high-density lipoprotein-mediated drug delivery system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 106, 132–147.
- [4] Abu Lila, A. S., Kiwada, H., and Ishida, T. (2013) The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. *J. Control. Release* 172, 38–47.
- [5] Murakami, T., Wijagkanalan, W., Hashida, M., and Tsuchida, K. (2010) Intracellular drug delivery by genetically engineered high-density lipoprotein nanoparticles. *Nanomedicine* 5, 867–879.
- [6] Suda, K., Murakami, T., Gotoh, N., Fukuda, R., Hashida, Y., Hashida, M., Tsujikawa, A., and Yoshimura, N. (2017) High-density lipoprotein mutant eye drops for the treatment of posterior eye diseases. *J. Control. Release* 266, 301–309.

- [7] Roda, A., Hofmann, A. F., and Mysels, K. J. (1983) The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. *J. Biol. Chem.* 258, 6362–6370.
- [8] Matz, C. E., and Jonas, A. (1982) Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J. Biol. Chem.* 257, 4535–4540.
- [9] Kim, Y., Fay, F., Cormode, D. P., Sanchez-Gaytan, B. L., Tang, J., Hennessy, E. J., Ma, M., Moore, K., Farokhzad, O. C., Fisher, E. A., Mulder, W. J. M., Langer, R., and Fayad, Z. A. (2013) Single step reconstitution of multifunctional high-density lipoprotein-derived nanomaterials using microfluidics. *ACS Nano* 7, 9975–9983.
- [10] Bhat, S., Sorci-Thomas, M. G., Alexander, E. T., Samuel, M. P., and Thomas, M. J. (2005) Intermolecular contact between globular N-terminal fold and C-terminal domain of ApoA-I stabilizes its lipid-bound conformation: Studies employing chemical cross-linking and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 280, 33015–33025.
- [11] Swaney, J. B. (1980) Properties of lipid•apolipoprotein association products. Complexes of dimyristoyl phosphatidylcholine and human apo A-1. *J. Biol. Chem.* 255, 877–881.
- [12] Ando, T., Kodera, N., Naito, Y., Kinoshita, T., Furuta, K., and Toyoshima, Y. Y. (2003) A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *ChemPhysChem* 4, 1196–1202.

- [13] Uchihashi, T., Kodera, N., and Ando, T. (2012) Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy. *Nat. Protoc.* 7, 1193–1206.
- [14] Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V., and Sligar, S. G. (2002) Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett.* 2, 853–856.
- [15] Scott, B. R., McManus, D. C., Franklin, V., McKenzie, A. G., Neville, T., Sparks, D. L., and Marcel, Y. L. (2001) The N-terminal Globular Domain and the First Class A Amphipathic Helix of Apolipoprotein A-I Are Important for Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Activation and the Maturation of High Density Lipoprotein in Vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 48716–48724.
- [16] Wan, C.-P. L., Chiu, M. H., Wu, X., Lee, S. K., Prenner, E. J., and Weers, P. M. M. (2011) Apolipoprotein-induced conversion of phosphatidylcholine bilayer vesicles into nanodisks. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 606–613.
- [17] Jonas, A., and Mason, W. R. (1981) Interactions of dipalmitoyl- and dimyristoylphosphatidylcholines and their mixtures with apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 20, 3801–3805.
- [18] Jeffs, L. B., Palmer, L. R., Ambegia, E. G., Giesbrecht, C., Ewanick, S., and MacLachlan, I. (2005) A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharm. Res.* 22, 362–372.

- [19] Fukuda, M., Nakano, M., Miyazaki, M., and Handa, T. (2010) Thermodynamic and kinetic stability of discoidal high-density lipoprotein formation from phosphatidylcholine / apolipoprotein A-I mixture. *J. Phys. Chem. B* 114, 8228–8234.
- [20] Segall, M. L., Dhanasekaran, P., Baldwin, F., Anantharamaiah, G. M., Weisgraber, K. H., Phillips, M. C., and Lund-Katz, S. (2002) Influence of apoE domain structure and polymorphism on the kinetics of phospholipid vesicle solubilization. *J. Lipid Res.* 43, 1688–1700.
- [21] Weers, P. M. M., Narayanaswami, V., Choy, N., Luty, R., Hicks, L., Kay, C. M., and Ryan, R. O. (2002) Lipid binding ability of human apolipoprotein E N-terminal domain isoforms: Correlation with protein stability? *Biophys. Chem.* 100, 481–492.
- [22] Rogers, D. P., Brouillette, C. G., Engler, J. A., Tendian, S. W., Roberts, L., Mishra, V. K., Anantharamaiah, G. M., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Ray, M. J. (1997) Truncation of the amine terminus of human apolipoprotein A-I substantially alters only the lipid-free conformation. *Biochemistry* 36, 288–300.
- [23] Mishra, V. K., Palgunachari, M. N., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Segrest, J. P., and Anantharamaiah, G. M. (1995) Effect of the arrangement of tandem repeating units of class A amphipathic α -helixes on lipid interaction. *J. Biol. Chem.* 270, 1602–1611.
- [24] Bibow, S., Polyhach, Y., Eichmann, C., Chi, C. N., Kowal, J., Albiez, S., McLeod, R. A., Stahlberg, H., Jeschke, G., Güntert, P., and Riek, R. (2017) Solution structure of discoidal high-density lipoprotein particles with a shortened apolipoprotein A-I. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 187–193.

- [25] Lagerstedt, J. O., Budamagunta, M. S., Oda, M. N., and Voss, J. C. (2007) Electron paramagnetic resonance spectroscopy of site-directed spin labels reveals the structural heterogeneity in the N-terminal domain of ApoA-I in solution. *J. Biol. Chem.* 282, 9143–9149.
- [26] Jayaraman, S., Abe-Dohmae, S., Yokoyama, S., and Cavigliolo, G. (2011) Impact of self-association on function of apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 286, 35610–35623.
- [27] Saito, H., Dhanasekaran, P., Nguyen, D., Holvoet, P., Lund-Katz, S., and Phillips, M. C. (2003) Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model. *J. Biol. Chem.* 278, 23227–23232.
- [28] Phillips, M. C. (2013) New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins. *J. Lipid Res.* 54, 2034–2048.
- [29] Murakami, T., Tsuchida, K., Hashida, M., and Imahori, H. (2010) Size control of lipid-based drug carrier by drug loading. *Mol. Biosyst.* 6, 789–791.

CHAPTER 2

Application of lipoprotein for photothermal therapy

1. Introduction

癌は、その治療法の大幅な進歩にもかかわらず、世界の公衆衛生の大きな課題であり、社会への多大な経済的負担であり続けている。イメージング機能と治療機能を単一の薬剤、つまりセラノスティックに統合することで、疾患の正確な診断、薬物送達のリアルタイムモニタリング、および治療結果の評価が可能になる。[1]この点で、さまざまな無機材料および有機材料が検討されてきたが、それらの実用的な臨床応用はまだ始まったばかりである。[2]これらの中で、ポルフィリンは光線力学療法（PDT）で最も一般的に使用される光増感剤であり、磁気共鳴画像（MRI）で造影剤として頻繁に使用される。[3]ポルフィリンに可視光を照射すると、励起されたポルフィリンから O_2 へのエネルギー移動（EN）が起こり、一重項酸素（ 1O_2 ）、癌細胞に対して非常に細胞毒性の高い活性酸素種（ROS）が生成する（**Figure 1**）。[4]しかし、PDT は、皮膚や目に光増感剤が不必要に蓄積するため、光過敏症の副作用が生じてしまう。

5つ以上のピロールユニットを含む環拡張ポルフィリンは、その独特の光学特性と配位能力のため、ポルフィリンとして光線療法やMRIにとって魅力的な有機色素でもある。[5]特に、ピロール単位が4つしかない従来のポルフィリンよりも π 共役系が大きいため、近赤外線（NIR）領域に達する吸収帯を持つ。'Therapeutic window'（750-900 nm）と呼ばれる NIR 領域での優れた吸収は、組織深部の治療に不可欠である。[6]拡張ポルフィリンによるこの低エネルギーでの光吸収は、環拡張ポルフィリン励起状態から O_2 への EN の駆動力が小さいため、 1O_2 の生成も低減することが想像される（**Figure 1**）。この状況において、環拡張されたポルフィリンによって吸収されたレーザー光子エネルギーは、nonradiative relaxation プロセスを通じて熱に変換され、発熱、つまり光熱療法（PTT）につながると予想される。PTT の中で、hyperthermia（42-49°C）は、癌に対して最も侵襲性の低い治療法である。その理論的根拠は、正常組織のそれよりも高いがん組織の熱感受性にに基づいている。環拡張ポルフィリン固有の低エネルギーでの励起状態は、有害な光力学効果（PDE）、つまり ROS の全身毒性と色素の光退色を最小限に抑えることにより、低侵襲 NIR 照射下で光熱効果（PTE）を最大化するのに有益である。

ただし、環拡張ポルフィリンの応用は、その合成上の制限のため、実現性が乏しい。メソ-アリアル置換環拡張ポルフィリンは、ピロールとアリアルアルデヒドの単純な酸触媒縮合によって合成されるが、アルデヒドは電子不足なもの、たとえばペンタフルオロまたは3,5-ビス(トリフルオロメチル)ベンズアルデヒドに限定される。[8]これらの電子欠乏メソアリアル置換基は、周囲の酸化に対する環拡張ポルフィリンの凝縮と安定性に不可欠である。[8c]したがって、アリアル置換基が必要であることは、分子設計とあらゆる分野での応用のための誘導体の合成を制限する。しかし、さまざまな観点から、この欠点には利点があるとも考えられる。

MRIは、人間の病理や病状を特定するために最も広く使用されている手法の1つである。MRIには、非侵襲性、軟部組織を区別する能力、高い側方解像度と深度解像度など、多くのメリットがある。[9]具体的には、フッ素の同位体存在比は100%であり、 ^{19}F のNMR感度は ^1H に匹敵する。さらに、体には固有の ^{19}F がないため、外部の ^{19}F MRI信号をバックグラウンド信号からの干渉なしに監視できる。したがって、複数のフッ素原子を持つ複数のアリアル基を本質的に所有する環拡張ポルフィリンは、十分な ^{19}F MRI信号を生成する。さらに、構造的に等価な位置に複数のフッ素原子を導入できるため、 ^{19}F MRI信号を増強できる。Pandeyらは、*in vivo* MRIプロローブとしてフッ素化ポルフィリンの潜在的な有用性を主張した(データは示されていない)[11]。我々の知る限りでは、PTTと ^{19}F MRIの両方における治療剤の有用性についての証拠はない。

要するに、メソアリアル置換環拡張ポルフィリンは、セラノスティック材料としての2つの潜在的な有利な特性、低侵襲PTTのNIR領域での優れた吸収、および ^{19}F MRIのメソアリアルグループでの複数のフッ素原子を持っている。本研究では、生化学的用途のために新規ヘキサフィリン(hexa)を設計および合成した(**Figure 2**)。環拡張ポルフィリンは、MRIによるPTTと ^{19}F の両方の検出が可能な有望なセラノスティック色素であることを初めて示した。

2. Materials and methods

2.1. 材料

特に記載がない限り、市販の溶媒および試薬をさらに精製せずに使用した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィー (TLC) は、それぞれ UltraPure シリカゲル (230-400 mesh; SiliCycle, Quebec City, Canada) およびシリカゲル 60 F₂₅₄ (Merck Millipore) を使用して行った。アルミナカラムクロマトグラフィーは、activated alumina (~300 mesh; Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) で行った。UV/Vis/NIR 吸収スペクトルは、Perkin-Elmer Lambda 900 UV/vis/NIR 分光計または JASCO V-630 UV/vis/NIR 分光計で測定した。定常状態の蛍光スペクトルは、Shimadzu NIR-PL システム分光計で測定した。¹H および ¹³C NMR スペクトルは、JEOL ECX-400P 分光計 (¹H の場合は 395.88 MHz、¹³C の場合は 99.54 MHz で動作) で、¹H の内部参照として残留溶媒を使用して記録した (CDCl₃: δ= 7.26 ppm、DMSO-d₆: δ= 2.50 ppm) および ¹³C (CDCl₃: δ= 77.16 ppm)。¹⁹F NMR スペクトルは、Bruker AVANCE-600 分光計 (600 MHz で動作) または JEOL ECX-400P 分光計 (372.50 MHz で動作) で記録した。高解像度質量スペクトル (HRMS) は、ESI-TOF メソッドを使用して、Thermo Fischer Scientific EXACTIVE 分光計で測定した。減衰された全反射-フーリエ変換赤外 (ATR-FTIR) スペクトルは、Golden Gate Diamond Anvil ATR accessory (NICOLET 6700, Thermo Fisher Scientific) を使用して、通常 2 cm⁻¹ の解像度、64 スキャンで取得した。すべてのサンプルは、同じ機械的な力を使用して diamond window に接触させた。2,6-ビス (トリフルオロメチル) 安息香酸 (**1**) [12]、4-ブロモ-2,6-ビス (トリフルオロメチル) 安息香酸 (**2**) [12] およびメチル 4-ブロモ-2,6-ビス (トリフルオロメチル) 安息香酸塩 (**3**) [13] は文献に従って調製した。

2.2. 4-ホルミル-2,6-ビス (トリフルオロメチル) 安息香酸メチルの合成 (**4**)

n-ヘキサン (6.9 mL、11 mmol) 中の *n*-BuLi の 1.60 M 溶液を、安息香酸 **3** (3.51 g、10 mmol) の無水 THF (125 mL) 溶液に -116°C (エタノール/液体 N₂) Ar 雰囲気中に 30 分以上晒した。溶液を 30 分間攪拌した後、DMF (1.6 mL、20 mmol) を滴下した。混合物を 5 分間攪拌し、次に室温

に温めた。混合物を5時間攪拌した後、反応を水(100 mL)および0.1 N HCl aq. (20 mL)でクエンチした。生成物を酢酸エチル(100 mL×3)で抽出した。合わせた有機層を水およびbrineで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた。溶媒を除去した後、粗生成物を酢酸エチルと*n*-ヘキサンの1:9混合物を使用するシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、**4**を無色の固体として得た(2.05 g, 6.8 mmol, 68%)。¹H NMR (395.88 MHz, CDCl₃, 25°C) : δ= 10.14 (s, 1H, CHO)、8.40 (s, 2H, **2**, 5-H) および 4.00 (s, 3H, COOMe) ppm。 ¹³C NMR (99.54 MHz, CDCl₃, 25°C) : δ= 188.5, 164.5, 137.1, 135.1, 130.6 (m)、130.5 (q, *J*=13 Hz)、122.4 (q, *J*=275 Hz) および 53.9 ppm。 FT-IR (ATR) : ν= 3070, 2960, 1743, 1710, 1621, 1589, 1436, 1360, 1287, 1269, 1207, 1174, 1133, 1061, 952, 903, 824, および 679 cm⁻¹。 HRMS (ESI-TOF, negative) *m/z* : calcd. C₁₁H₄F₆O₃; 299.0148, [M-H]⁻; 299.0147。

2.3. 5,10,15,20,25,30-ヘキサキス[4-メトキシカルボニル-3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル][26]ヘキサフィリン (1.1.1.1.1.1) の合成 (5)

トリフルオロ酢酸(40 μL, 0.53 mmol)をCH₂Cl₂(9 mL)中のピロール(40 μL, 0.57 mmol)とアルデヒド**4**(160 mg, 0.53 mmol)の混合物に加え、混合物をAr雰囲気下、室温、暗所で8時間攪拌した。*o*-クロラニル(130 mg, 0.53 mmol)を加えた後、得られた混合物を3時間攪拌した。反応混合物を、溶離液としてCH₂Cl₂を使用して短いアルミナカラムに直接通し、続いて溶媒を蒸発させた。次に、CH₂Cl₂と*n*-ヘキサンの5:2混合物を使用したシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、青緑色のフラクションとして**5**が、オレンジ色のフラクションとして対応するポルフィリンが得られた。溶媒を除去した後、残留固形物を*n*-ヘキサンの洗浄した。CH₂Cl₂と*n*-ヘキサンからの再結晶により、5本の紫色の針状結晶が得られた(19.2 mg, 9.2 μmol, 10%)。 ¹H NMR (395.88 MHz, CDCl₃, 25°C) : δ= 8.58 (brs, 4H, ortho-H)、8.21 (brs, 4H, ortho-H)、8.09 (d, *J*=4.8 Hz, 4H, bH)、7.92 (s, 2H, NH)、7.69 (d, *J*=2.4 Hz, 4H, bH)、7.39 (d, *J*=4.2 Hz, 4H, bH)、5.97 (s, 4H, ortho-H)、4.12 (s, 12H, COOMe) および 3.47 (s, 6H, COOMe) ppm; ¹³C NMR (99.54 MHz, CDCl₃, 25°C) : δ= 165.4, 164.3, 164.1, 160.5, 142.5, 140.4, 136.9, 133.5 (m)、133.3, 132.7, 132.6 (m)、132.2, 130.5, 129.5 (q, *J*=33 Hz)、128.3,

127.6、124.8、124.7 (q, $J=32$ Hz)、122.8 (q, $J=275$ Hz)、121.4 (q, $J=275$ Hz)、54.0 および 53.0 ppm; ^{19}F NMR (600 MHz, CDCl_3 , 25°C) : $\delta = -59.68$ (brs, 24F) および -61.51 (s, 12F) ppm。UV/vis (DMSO) : λ (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) = 332 (49000)、436 (31000)、615 (130000)、794 (9900)、882 (13000) および 983 (5500) nm。FT-IR (ATR) : $\nu = 3289$ 、3115、2957、1750、1557、1435、1355、1281、1198、1135、1062、987、955、910、825、684 cm^{-1} 。HRMS (ESI-TOF, negative) m/z : calcd. $\text{C}_{90}\text{H}_{43}\text{F}_{36}\text{N}_6\text{O}_{12}$; 2083.2370 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 2083.2302。

2.4. 5,10,15,20-テトラキス[4-メトキシカルボニル-3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]ポルフィリンの合成

^1H NMR (395.88 MHz, CDCl_3 , 25°C) : $\delta = 8.83$ (s, 8H, ortho-H)、8.80 (s, 8H, bH)、4.19 (s, COOMe) および -2.91 (s, 2H, NH)) ppm。

2.5. 5,10,15,20,25,30-ヘキサキス[4-カルボキシ-3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル][28]ヘキサフィリン (1.1.1.1.1.1) (hexa) の合成

AlBr_3 (1 g) とテトラヒドロチオフェン (0.7 mL) の混合物を **5** (23 mg, 11 μmol) の乾燥 CH_2Cl_2 (5 mL) 溶液に加え、混合物を暗闇の Ar 雰囲気下、室温で 12 時間攪拌した。反応混合物をメタノール (5 mL) で希釈し、1 N HCl 水溶液 (25 mL) および水 (25 mL) でクエンチした。生成物を酢酸エチル (50 mL \times 1、25 mL \times 3) で抽出し、合わせた有機層を Na_2SO_4 で乾燥させた。溶媒を除去した後、粗生成物を酢酸エチル/*n*-ヘキサンで沈殿させた。次に、メタノール (HPLC グレード) を使用して GPC (SephadexTM LH-20) で精製すると、青色の画分が得られた。溶媒を除去した後、hexa が紫色の粉末として得られた (18.6 mg, 9.3 μmol , 84%)。純度は HPLC 分析で確認しました (**Figure S5**)。 ^1H NMR (395.88 MHz, DMSO- d_6 , 25°C) : $\delta = 14.1$ (br)、10.6 (br)、9.3 (br)、8.6 (br)、8.2–7.5 (br, m)、7.2 (m)、6.8 (m)、5.5 (m)、1.0 (m)、0.85 (m)、0.63 (m)、 -1.9 (br) ppm; ^{19}F NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 37°C) : $\delta = -57.9$ – -59.2 (br, m) および -60.6 (s) ppm。UV/vis (DMSO) : λ (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) = 337 (34000)、427 (36000)、678 (110000)、805 (6300)、916 (10000)、990 (9400) および 1060 (sh) (5500) nm。蛍光 (DMSO、

$\lambda_{\text{ex}} = 656 \text{ nm}$) : $\lambda_{\text{max}} = 1094 \text{ nm}$ 。 FT-IR (ATR) : $\nu = 3450\text{--}3120 \text{ (br)}$ 、1731、1612、1575、1347、1293、1191、1133、915、795、683 cm^{-1} 。 HRMS (ESI-TOF、負) m/z : calcd. $\text{C}_{84}\text{H}_{32}\text{F}_{36}\text{N}_6\text{O}_{12}$; 1000.0757 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$; 1000.0793。

2.6. Pump-probe TA 測定

サブピコ秒からナノ秒の時間分解 TA スペクトルは、ポンププローブ技術を使用して測定した。Ti:サファイアジェネレーターのパルスは、Nd:YAG Q スイッチレーザー (Solar TII, model LF114) の第 2 高調波によってポンピングされるマルチパスアンプ (CDP-Avesta) を使用して増幅させた。増幅パルスを使用して、サンプル励起 (ポンプ光) の 2 次高調波 (400 nm) と、時間分解 TA スペクトル検出 (プローブ光) の白い連続体を生成した。TA スペクトルは、可視および近赤外範囲のモノクロメーターと結合した電荷結合素子 (CCD) 検出器 (Andor, Newton DU920) によって記録した。1 回の測定の波長範囲は 480-760 nm とした。機器の標準的な応答時間は 150 fs (半値全幅 (FWHM)) であった。データを処理するために、グローバルな多重指数フィッティング手順を適用した。この手順では、機器の時間応答関数と白い連続体の群速度分散が考慮され、減衰時定数と分散補償 TA スペクトルを計算できる。励起エネルギーは、サンプルの光分解とエネルギー依存の減衰プロセスを回避するのに十分なほど低密度に調整した。すべての測定は室温で行った。

2.7. cpHDL の製剤化

細胞透過性ペプチド (YGRKKRRQRRR) 融合 apoA-I 変異体 (N 末端 43 アミノ酸欠損) は、大腸菌発現システムで His-tag 付きタンパク質として生成した。[17a] Ni Sepharose (GE Healthcare UK Ltd.) で精製した。凍結乾燥された apoA-I 変異体を 4 M urea-PBS に可溶化し、リン脂質とタンパク質のモル比が 300 : 1 の 30 mg/mL コール酸ナトリウムを含む PBS のリン脂質 (DOPC) と混合した。混合物を室温で一晩インキュベートした後、Spectra/Por 透析膜 (MWCO 50,000) を使用して、4°C または室温で PBS に対して透析した。再構成した cpHDL 分散液を 16500 g, 4°C で 10 分間遠心分離して、破片を取り除いた。

2.8. hexa@cpHDL および ICG@cpHDL の作製

所定のプロトコルを使用して、[24]色素の DMSO 溶液 (10 mg/mL, 16 μ L) を cpHDL の PBS 溶液 (400 μ L, 200 μ g mL⁻¹, タンパク質濃度) に加え、混合物を 37°C で 1 時間インキュベートした。作製した hexa@cpHDL を、生理食塩水またはフェノールレッドを含まない RPMI1640 で平衡化した NAP-5 カラム (GE Healthcare UK Ltd.) で精製した。788 nm における hexa@cpHDL の吸光度により、色素の取り込み効率は 17% と算出された。比較実験で用いた ICG@cpHDL は、hexa@cpHDL 溶液の OD₇₈₈ と一致させるために、希釈前に同様の方法で調製した。色素を搭載した HDL の直径は、Nanotracs UPA-EX250 particle analyzer で測定した。50mM Tris•HCl (pH 7) 中の hexa@cpHDL のゼータ電位は、Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments, Malvern, UK) で測定した。

2.9. 光線温熱実験

すべての実験に対して三重試験を行った。光線温熱試験のために、300 μ L の溶液をマイクロチューブにセットし、37°C に設定されたインキュベーターに入れた。温度は、平衡に達成するまで、Reflex fiber-optic temperature sensor (Neoptics, Quebec, Canada) でモニタリングした。ファイバーの先端をレーザースポットの外側に配置した。溶液にフェムト秒パルス Chameleon-RF NIR レーザー (beam diameter 5 mm, 100-1000 mW, 788 nm; Coherent, Santa Clara, CA) を照射した。T24 細胞 (human bladder carcinoma; ATCC, Manassas, VA) は、照射 (788 nm, 1000 mW, 10 分) の前に 37°C で細胞培養プレートに播種した。

2.10. SOSGR を使用した一重項酸素検出

hexa@cpHDL および ICG@cpHDL (OD₇₈₈ = 0.3) の分散液は、測定前に 1 分間 O₂ でバブリングした。hexa@cpHDL と ICG@cpHDL の分散液を SOSGR (Invitrogen, 25 μ M in Methanol) と混合し、混合物にレーザー光 (788 nm, 1000 mW, 10 分) を照射した。475 nm で励起された SOSGR と 525 nm での蛍光の反応生成物を測定した。

2.11. hexa@cpHDL 複合体からの hexa の *in vitro* 放出

Spectra/Por 透析膜 (MWCO 50,000) の Hexa@cpHDL (OD₇₈₈ = 0.3, 1 mL) を、0.1% ウシ血清アルブミンを含む 0.9% NaCl 50 mL に浸し、37°C で穏やかに揺り動かした。膜の内側に残っている hexa の量を JASCO V-630 UV/vis/NIR 分光計で分析した。試験は 3 回行った。

2.12. 細胞培養

T24 細胞 (ヒト膀胱癌細胞株) は ATCC から購入したものであり、10% FBS を添加した Maccoy 5A 培地で維持した。細胞は、10% FBS を添加したフェノールレッドを含まない RPMI 1640 培地中の hexa@cpHDL で処理した。すべての細胞培養培地には、100 U/mL ペニシリンと 100 µg/mL ストレプトマイシンが含まれていた。細胞は、5% CO₂ と 95% 空気の加湿雰囲気下で 37°C でインキュベートした。細胞は 3-4 日ごとに継代した。

2.13. がん細胞の光線温熱死

hexa@cpHDL の濃縮溶液は、Amicon Ultra 限外濾過フィルター (100 kDa MWCO) を使用して調製した。濃縮した hexa@cpHDL を完全培地 (OD₇₈₈ = 0.3) で希釈し、T24 細胞 (ウェルあたり 1×10^4 細胞、96 ウェルプレート) に加えてから 4 時間インキュベートした。その後、37°C のインキュベーター上で直接レーザー光を照射した (788 nm, 1000 mW, 10 分)。場合によっては、100 mM アジ化ナトリウムの存在下で照射を行った。細胞生存率は、Cell Counting Kit-8 および SpectraMax M2&M2e マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を使用して、製造元プロトコルに従って評価した。細胞の生存率は、450 nm と 620 nm での OD の差を使用して推定されました。すべての測定は三重試験で行った。

2.14. アポトーシス/ネクローシスの検出

T24 細胞 (ガラスベースディッシュの 1 ウェルあたり 1×10^4 細胞 (100 µL)) を hexa@cpHDL (OD₇₈₈ = 0.3) で同様に処理し、37°C でレーザー光照射 (788 nm, 1000 mW, 10 分) した。37°C

で1時間インキュベートした後、Annexin V-FITC アポトーシス検出キット (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) と LSM 780 レーザー走査型共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss, Jena, Germany) を使用して、細胞生存率を評価した。アポトーシスおよびネクローシス経路を介した細胞死はヨウ化プロピジウム (PI) 蛍光で検出され、アポトーシス細胞死は細胞膜上の Annexin V-FITC 蛍光の有無により判断した。Annexin V-FITC で細胞内染色された細胞は、ネクローシス細胞死を受けたと判断した。生存している (染色されていない) 細胞、アポトーシス細胞、およびネクローシス細胞の割合は、20 枚の独立した蛍光画像で 100 以上の細胞をカウントすることによって決定した。

2.15. 生体内光線温熱療法

雌の無胸腺ヌードマウス (5 週齢、BALB/c *nu/nu*) は静岡県農業協同組合実験動物協会 (静岡県) から購入し、無菌動物の食物と水に自由にアクセスできる状態で飼育した。以前の報告に従って、RPMI 1640 と Matrigel™ 基底膜マトリックス (BD Bioscience, Carlsbad, CA, USA) の 1 : 1 混合液に懸濁した NCI-H460 細胞を注射し、皮下腫瘍を持つマウスを作出した。hexa@cpHDL (約 0.1 mL, 788 nm で OD > 3, 660 μM) または培地を使用し、NIR レーザー (788 nm, 1000 mW, 10 分) を照射した。翌日、腫瘍組織を切除し、4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した。その後、腫瘍組織をパラフィン包埋処理した。組織からの複数の厚さ 3 μm のマイクローム切片を脱ロウ、水和し、ヘマトキシリンとエオシン (HE) を用いる標準的な方法で染色した。動物実験はすべて京都大学動物実験委員会の規定に従って行った。

2.16. MRI 測定による ¹⁹F 信号の検出

MRI の研究は、内径 40 mm の ¹H/¹⁹F 無線周波数 (RF) コイルを搭載した 7T Bruker MR システム (BioSpec 70/20 USR) で行った。1T と ¹⁹F の共振周波数は、7 T でそれぞれ 300 MHz と 282 MHz であった。皮下腫瘍を持つヌードマウスは、主要な HDL 受容体であるスカベンジャー受容体クラス B タイプ I を過剰発現する Chinese hamster ovary (CHO) 細胞で準備した。これらの細胞への HDL の受容体依存性結合はすでに確認されている。この HDL 受容体の発現により、hexa@cpHDL の腫瘍内滞留が長期化すると予想された。MRI 測定中、室内空気で 1-2% イソフル

ランを吸入してマウスに麻酔をかけ、呼吸数と直腸温を継続的にモニターした。直腸温は、暖かい空気によって 30-31°C に維持した。マウスの ^1H 参照画像は、高速スピンエコー (FSE) シーケンスと次の取得パラメーターを使用して取得した。繰り返し時間/エコー時間 (TR/TE) = 2500/48 ms。エコートレイン長 (ETL) = 8; 視野 (FOV) = 8×4 cm; 2mm の厚さの冠状スライス; 行列のサイズ = 256×128; 累積数 (NA) = 1 (スキャン時間、40 秒)。同じマウスの ^{19}F 画像は、TR/TE = 1000/5.5 ms の FSE シーケンスによって取得した。ETL = 32; FOV = 32×8 cm; スライスを選択しないコロナ方向。行列サイズ = 128×32; NA = 7200 (スキャン時間、120 分)。正弦二乗ウィンドウ関数が取得データに適用され、続いて 2 倍のゼロフィリングを行った。その後、 ^{19}F 画像は 2D 高速フーリエ変換によって再構成した。

2.17. 腫瘍からの抽出物の ^{19}F NMR 測定

^{19}F MRI の測定後、マウスの腫瘍を摘出した。腫瘍を緩衝液に加え (腫瘍 1 g あたり 5 mL の緩衝液)、ホモジナイズした。混合物を遠心分離し (1200 g, 10 分)、沈殿物を除去した。得られた溶液を凍結乾燥した。残留物にメタノール (10 mL) を加え、混合物を 15 分間超音波処理した。遠心分離 (2380 g, 10 分) 後、沈殿物を除去し、溶液を蒸発させた。残留物を CD_3OD に溶解し、 ^{19}F NMR スペクトルを 25°C で Bruker AVANCE-600 分光計 (600 MHz で動作) または JEOL ECX-400P 分光計 (372.50 MHz で動作) で記録した。

3. Results and discussion

3.1. ヘキサフィリンの合成と性質

我々はメソ-ヘキサキス[3,5-ビス(トリフルオロメチル)-フェニル]-置換ヘキサフィリンに焦点を当てた。これには、合計36個のフッ素原子を含む12個のトリフルオロメチル基が含まれる。[8b]36個のフッ素原子は、磁氣的に同等に近く、 ^{19}F MRI 信号の増強が期待される。水溶液への溶解性を高めるために、メソアリーール置換基のパラ位に6つのカルボキシル基をさらにつなぎ、hexa を生成した (Figure 2)。この分子設計に基づいて、4-ホルミル-2,6-(トリフルオロメチル)安息香酸メチル **4** の重要な中間体を、4段階で市販の1,3-(トリフルオロメチル)ベンゼンから合成した (Scheme 1)。1,3-(トリフルオロメチル)ベンゼンをカリウム *tert*-ブトキシドの存在下で *n*-ブチルリチウムで処理した後、固体二酸化炭素を添加すると、2,6-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸 (**1**) が生成した[12]次に、酸 **1** を1,3-ジブromo-5,5-ジメチルヒダントインで臭素化して、位置選択的に **2** を得た[12]。酸 **2** をメチルエステル **3** にエステル化した後[13]、アルデヒド **4** の合成を試みた。 -78°C で **3** と *n*-ブチルリチウムとの臭素リチウム交換後、DMF を追加すると、低収率で **4** が得られた。ただし、条件を最適化した後、 -116°C で **3** を *n*-ブチルリチウムで処理し、続いて DMF トラッピングを行うと、**4** が許容可能な収率 (68%) で得られることがわかった。次のステップで、**4** とピロールの酸触媒縮合を使用して、メトキシカルボニル基 **5** を有するヘキサフィリンを調製した。[8b]**5** のメチルエステル部分を AlBr_3 とテトラヒドロチオフェンで処理することによりカルボン酸に変換し、hexa を高収率で得た (84%)。[14]特性評価の詳細は、Supporting information (Figure S1-S7) に記載した。

DMSO- d_6 中のヘキサの ^1H と ^{19}F NMR スペクトルは、溶液中でのそのコンホメーションの柔軟性のため、非常にブロードなシグナルを示した (Figure S5)。[5b, c]DMSO 中の hexa の UV/vis/NIR 吸収スペクトルは、800-1100 nm の範囲においてモル吸収係数 $\sim 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ で Q 帯に似たバンドを示した。これにより、Therapeutic window 内での NIR 光の利用が可能となる (Figure S6)。重要なことに、DMSO で hexa の蛍光スペクトルを測定したところ、1094 nm に明確な発光ピークが検出されたことである (Figure S7)。正規化された吸収スペクトルと蛍光スペクトル

の交点から、zero-zero 励起エネルギー (E_{0-0}) は 1.15 eV と決定された。S1 エネルギーレベルが低いことを考慮すると、hexa の T1 エネルギーレベルは 1O_2 (0.98 eV) に近いが、それに匹敵するはずであり、hexa からの EN による 1O_2 生成の抑制を示唆している (**Figure 1**)。また、DMSO での hexa のポンププローブ過渡吸収 (TA) 測定を使用して、ヘキサの光線力学を調べた (**Figure S8**)。S1 状態から生じる主な減衰成分 ($\tau = 110$ ps) は、他のヘキサフィリンの S1 状態と同様に、Soret 帯のブリーチングを示す。[8b]この短命の S1 状態は、高速の内部変換 (S1→S0) およびシステム間交差 (S1→T1) を受けるため、レーザー照射による効率的な発熱の妥当性をサポートする。これらの結果は、NIR 光線温熱療法用の有望な色素としての hexa の応用可能性を示唆する。

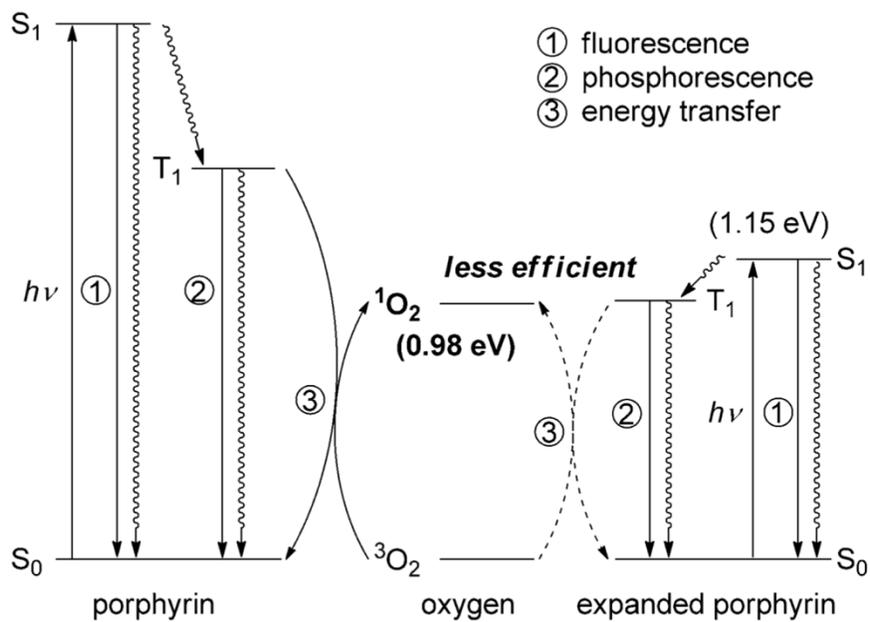
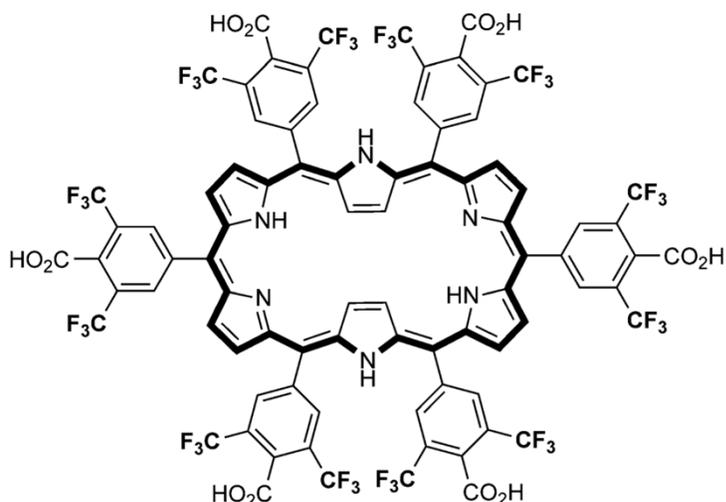
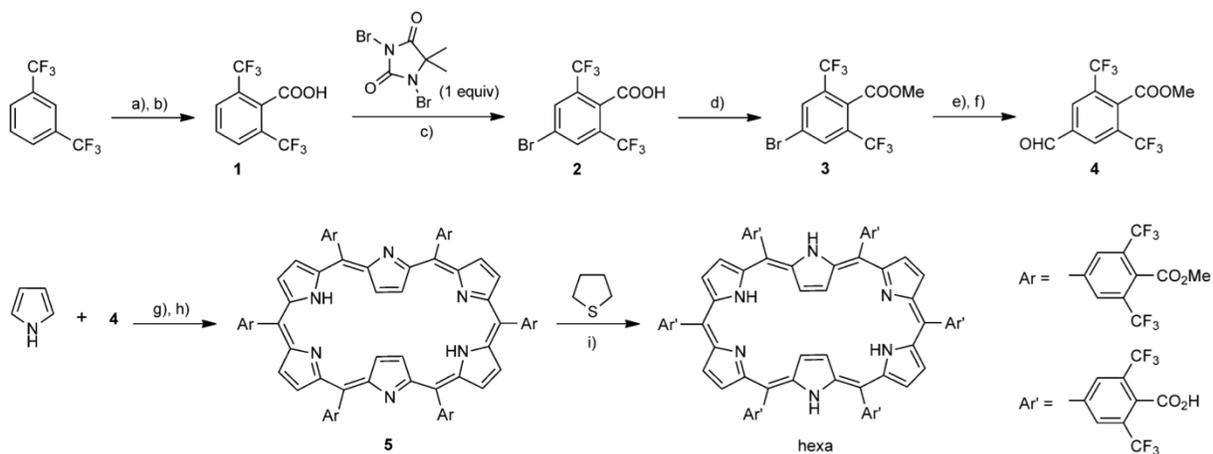


Figure 1. ポルフィリンおよび環拡張ポルフィリンの一重項酸素生成メカニズム



Photothermal therapy by NIR light & ^{19}F detection by MRI

Figure 2. 光線温熱療法および MRI による ^{19}F 検出可能なセラノスティック材料としてのヘキサフィリン (hexa)



Scheme 1. ヘキサフィリン(hexa)の合成

a) nBuLi (1.1 当量)、KOtBu (1.3 当量); b) CO₂ (ドライアイス)、THF、-95°C、7 時間; c) H₂SO₄、RT、12 時間; d) CH₃I (5 当量)、K₂CO₃ (2.5 当量)、CH₃CN、RT、12 時間; e) nBuLi (1.1 当量); f) DMF (2 当量)、THF、-116°C→RT、5 時間; g) TFA (1 当量)、CH₂Cl₂、RT、8 時間; h) chloranil (1 当量)、3 時間; i) AlBr₃ (過剰量)、CH₂Cl₂、RT、12 時間。

3.2. hexa のリポタンパク質製剤

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) では、6つのカルボキシル基があるにもかかわらず、hexa は直径 200 nm を超える比較的大きな凝集体を形成することがわかり (**Figure S9**)、これは長期循環治療システムにとって不利な可能性がある。[15]そのため、hexa にはナノキャリアを使用することにした。高密度リポタンパク質 (HDL) は、直径~10 nm で、血液循環中に投与されたポルフィリノイドを隔離することが知られている。本研究では、hexa を可溶化し、その細胞内送達を促進するために、カチオン性細胞透過性ペプチドを有する変異型の再構成 HDL (cpHDL) [17] を使用した。比較的流動性のある膜形成リン脂質である 1,2-ジオレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリンを用いて調製すると、cpHDL は hexa を効率的にカプセル化し、hexa@cpHDL を生成した (**Figure 3A**)。動的光散乱 (DLS) 測定を使用した hexa@cpHDL および cpHDL の特性評価により、同じ平均直径 76 nm が得られ (**Figure 3B** および **S10**)。hexa@cpHDL のゼータ電位は -8.0 ± 2.9 mV で、cpHDL の -2.0 ± 1.3 mV よりもわずかに低かった。この低い値は、hexa の6つのカルボキシル基の存在によるものである。さらに、hexa を cpHDL にカプセル化すると、細胞培養培地 (RPMI) における hexa の化学的安定性が大幅に向上し (**Figure S11**)、カプセル化された hexa が徐々に放出された (**Figure S12**)。Hexa 単独での bleaching が還元剤による求核攻撃によるものであると仮定して、RPMI の還元成分 (1 mg/L) であるグルタチオンを含む生理食塩水でのヘキサの吸収をモニタリングし、グルタチオンが hexa の安定性にほとんど影響しないことを発見した (**Figure S13**)。したがって、この bleaching のメカニズムは還元剤による単純な求核攻撃ではない可能性があり、将来の研究ではその化学的安定性を改善するための化学修飾を施す必要がある。一方、hexa の cpHDL からの徐放性は、hexa の ^{19}F NMR 信号の検出に適している。これは、溶液中の移動度の低下により、信号強度が cpHDL で低下したためである (下記参照)。一方、これらの結果は、hexa に関する問題、つまり、低溶解性と安定性の低さは将来的にはより洗練された分子設計で克服する必要がある。

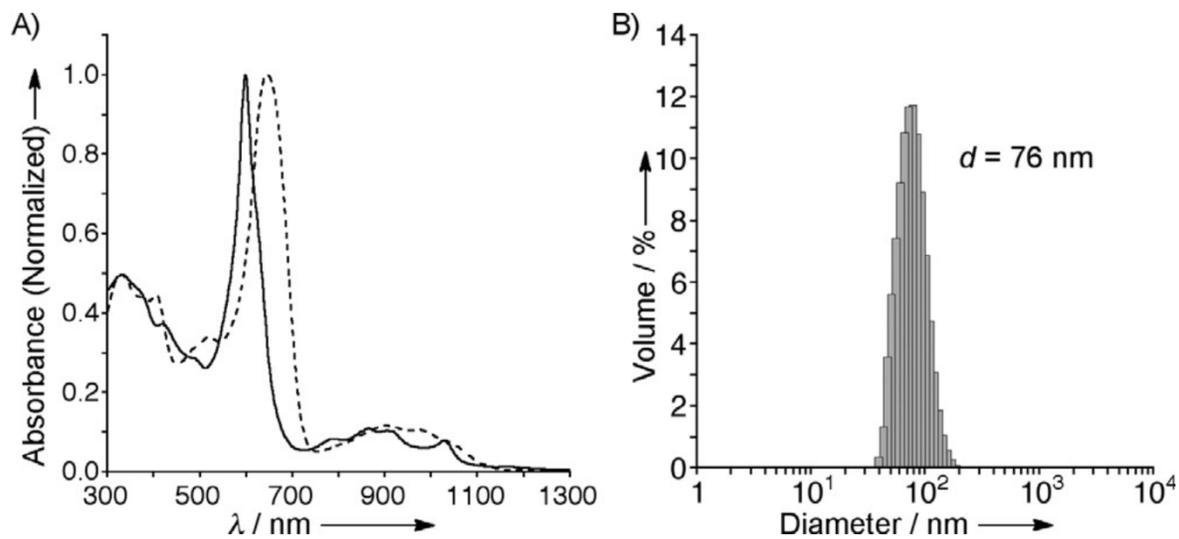


Figure 3. A) 生理食塩水中の hexa@cpHDL (c) および hexa (a) の UV/Vis/NIR 吸収スペクトル。
 B) 生理食塩水中の hexa@cpHDL のサイズ分布

3.3. ヘキサフィリンの光線温熱および光線力学効果

最初に、37°C で予め温めた水溶液 (300 μ L, OD₇₈₈ = 0.3, 28 μ M hexa) を使用して、hexa@cpHDL の光線温熱効果を評価した。**Figure 4A** は、788 nm のレーザー照射下での hexa@cpHDL 溶液の温度変化を示している。すべての溶液は、10 分間の照射時間にわたって、レーザー出力の関数として一定の光熱応答を示した。さらに、10 分での温度上昇をプロットすると、入射レーザーパワーに対する線形応答が認められた (**Figure S14**)。レーザー照射下では、hexa@cpHDL は 50°C の一定温度で持続的に熱を発生するが[18]、代表的な NIR 臨床イメージング剤であるインドシアニングリーン (ICG) を搭載した cpHDL (ICG@cpHDL) の光線温熱効果は [19]一時的であり (**Figure 4B**)、hexa は ICG よりも高い光安定性を有することを示している。

次に、PDE を評価した (**Figure 4C**)。hexa@cpHDL は、ICG@cpHDL よりもはるかに低い ¹O₂ 生成の増強効果を示した。光安定性の違いは、照射後の hexa@cpHDL と ICG@cpHDL の UV/vis/NIR 吸収スペクトルで明らかである (**Figure 4D**)。両方の色素モル濃度 (28 μ M) を揃えて試験した場合、それらの bleaching の程度は溶液の OD 値を揃えた場合と本質的に同等であった (**Figure S15**)。これらの結果は、cpHDL での hexa の安定化 (**Figure S11a**) に加えて、この低い PDE、つまり高い光安定性が、持続的な PTE の原因であることを示唆している。

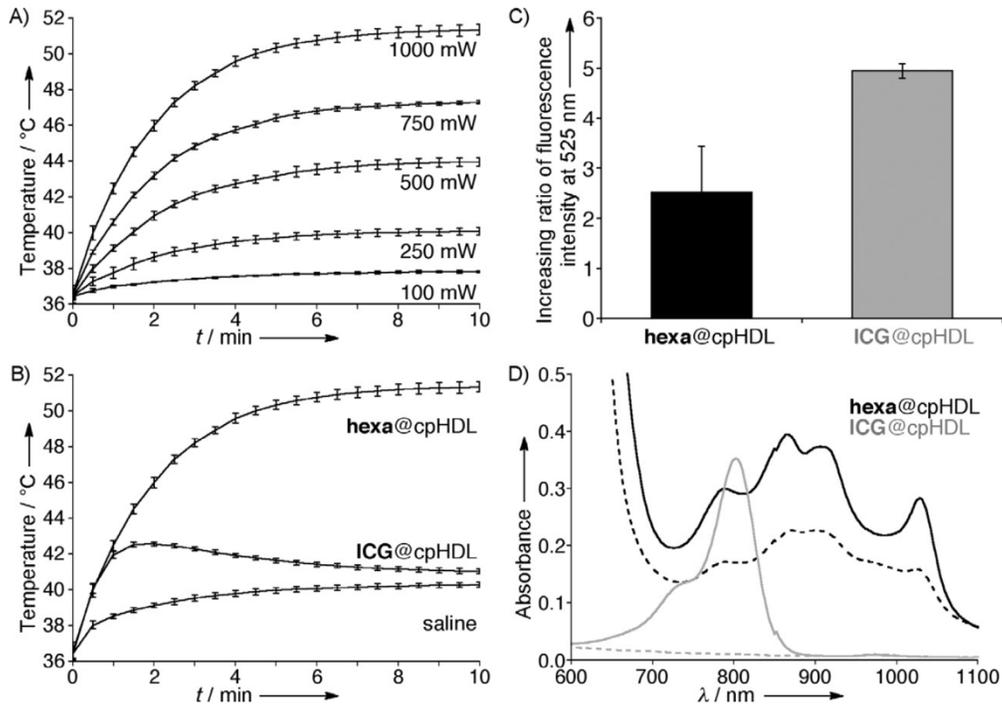


Figure 4. A) レーザー照射時間依存的な hexa@cpHDL の PTE ($OD_{788} = 0.30$ ($28 \mu\text{M}$ hexa)、 $\lambda_{\text{ex}} = 788 \text{ nm}$ 、10 分)、 $n = 3$ 。B) hexa@cpHDL と ICG@cpHDL ($OD_{788} = 0.30$)、生理食塩水の PTE ($\lambda_{\text{ex}} = 788 \text{ nm}$ 、1000 mW、10 分)、 $n = 3$ 。C) hexa@cpHDL と ICG@cpHDL の PDE。一重項酸素を蛍光検出試薬で検出した。ベースライン (一重項酸素生成なし) の値を 1 とした。D) 上記の照射前 (dashed line) および照射後 (solid line) の hexa@cpHDL (black) および ICG@cpHDL (gray) の UV/Vis/NIR 吸収スペクトル。

3.4. ヘキサフィリンの光毒性

T24 ヒト癌細胞を使用して hexa@cpHDL の光毒性を調べた。レーザー光照射を行わなかった場合、調査した条件下では明らかな細胞毒性は観察されなかった (9.3-66 μM hexa、1-4 時間のインキュベーション) (**Figure 5A**)。次に、hexa@cpHDL と ICG@cpHDL の光毒性を比較した。hexa@cpHDL または ICG@cpHDL で 4 時間細胞を処理した後 ($\text{OD}_{788} = 0.3$ 、それぞれ 28 または 2.4 μM の色素)、細胞に 788 nm レーザー光を 10 分間照射した。これらの条件下では、2 つのサンプルによって吸収される光子エネルギーは、色素のモル濃度が約 10 倍の違いがあるにも関わらず、等しくなる。ICG@cpHDL が光毒性を示さなかったのに対し、hexa@cpHDL では細胞生存率の顕著な低下 (約 50%) が観察された (**Figure 5B**)。これらの結果は、hexa@cpHDL が 2 つの色素によって吸収される光エネルギーを一定に保つ ICG@cpHDL よりも高い光殺細胞活性を持っていることを示す。

PTE は PDE と相乗効果があると報告されている。hexa@cpHDL の PDE は弱いため (**Figure 4C**)、それが hexa@cpHDL の光毒性に寄与するかどうかを調べた。一重項酸素の消光剤であるアジ化ナトリウムの存在下でレーザー光照射すると、細胞生存率はわずかに増加した (**Figure S16**)。アジ化ナトリウム単独での治療は生存率にまったく影響を与えなかった。さらに、照射後 1 時間でアポトーシス細胞が優勢であることがわかった (**Figure S17**)。これらの結果は、PTE による軽度の hyperthermia が実験条件下での hexa@cpHDL の主な作用機序であることを明確に裏付けている。[21] **Figure 5** のデータと合わせると、これらの結果は、持続的な PTE が一時的な PDE と PTE の組み合わせよりも細胞毒性が高いことを示している。PDT は低酸素腫瘍組織における O_2 枯渇環境で活性を十分に発揮できないという欠陥を持っているため、この洞察は光線療法色素の将来の分子設計に関する重要な考慮事項を提起する。

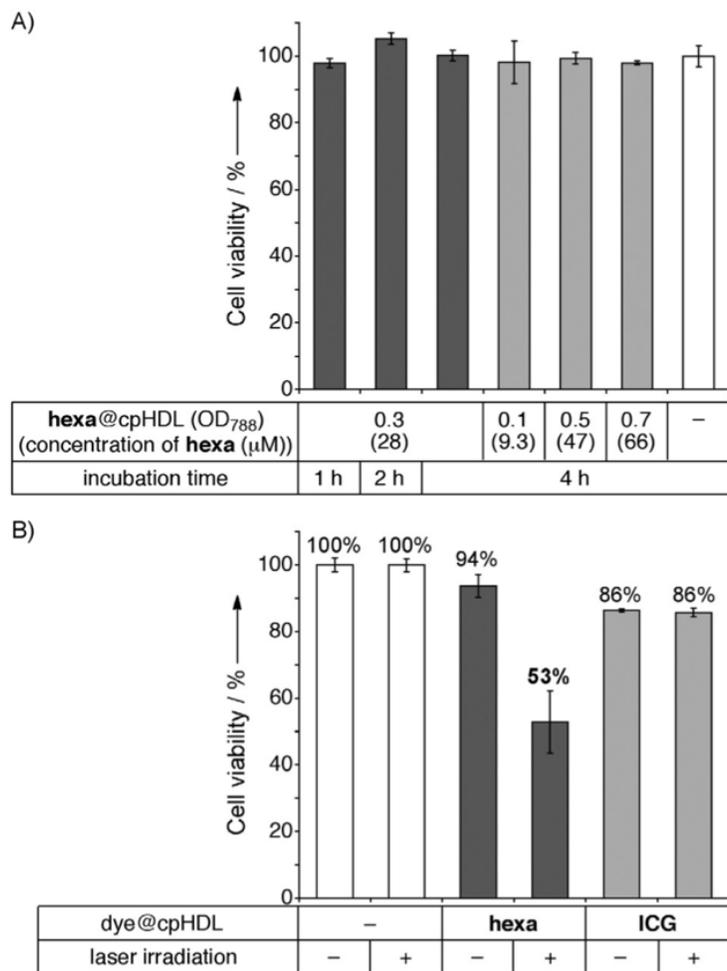


Figure 5. A) さまざまな条件下での T24 細胞に対する hexa@cpHDL の暗毒性 (n = 3)。B) レーザー照射後の hexa@cpHDL による T24 細胞の光殺細胞活性 (OD₇₈₈ = 0.30 (28 μM hexa)、λ_{ex} = 788 nm、1000 mW、10 分)、n = 3。

3.5. NMR および MRI 測定による ^{19}F 検出

また、 ^{19}F MRI に対する hexa@cpHDL の可能性を評価した。典型的な NMR 測定条件では、生理食塩水中の hexa@cpHDL のトリフルオロメチル基に起因するピークが約 5°C で観察された。 -60 ppm (**Figure 6A**)。hexa の ^{19}F NMR スペクトル (**Figure S5**) で観察されるように、その高い立体配座の柔軟性のため、信号はかなり広く複雑であった。重要なことに、生理食塩水中の遊離 hexa の NMR スペクトルは、hexa@cpHDL と比較してより強い信号を示す (**Figure S18**)。遊離 hexa は水溶液中で大きな凝集体を形成するが (**Figure S9**)、この結果は、cpHDL から放出されたヘキサが ^{19}F NMR および MRI 測定によってより簡単に検出できることを示している。実際、カプセル化された hexa が徐々に放出されるため、 37°C でのインキュベーション中に hexa@cpHDL の信号強度は徐々に増加した (**Figure S12** および **S19**)。これらの ^{19}F NMR スペクトルに動機づけられて、ファントムでの hexa@cpHDL ($\text{OD}_{788} = 0.7, 66 \mu\text{M}$) の実験を行い、明確な ^{19}F MRI 画像を観察した (**Figure 6B**)。hexa は 4 時間もほとんど分解せずに残っているため (**Figure S11**)、信号は cpHDL にカプセル化された hexa から現れている。この結果は、hexa@cpHDL が ^{19}F MRI の有望な材料であることを示唆している。

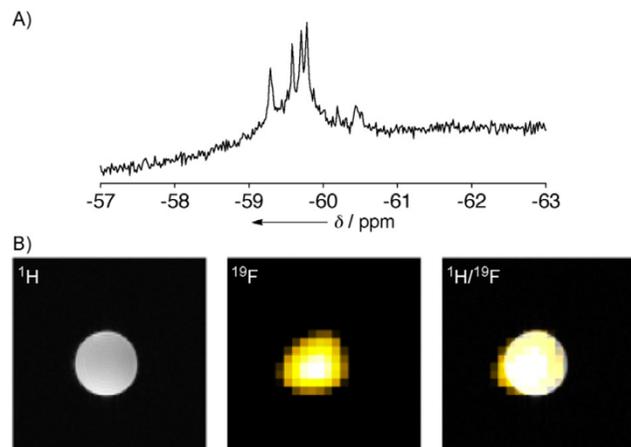


Figure 6. A) 27°Cの生理食塩水中の hexa@cpHDL の ^{19}F NMR スペクトル。B) hexa@cpHDL の ^1H 、 ^{19}F 、および $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ 統合 NMR 画像。 ^1H と ^{19}F の画像は、それぞれグレースケールと黄色で表示した。 ^{19}F NMR 画像の平均 S/N 比は 11 であった。

3.6. *In vivo* 光線温熱療法と ^{19}F MRI

最後に、新しいセラノスティック材料としてのヘキサフィリンの可能性を評価するために、予備的な生体内実験を行った。まず *in vivo* 光線温熱療法を行った (**Figure S20**)。hexa@cpHDL の~0.1 mL 溶液 (788 nm で OD > 3、660 μM) または細胞培養液を腫瘍内皮下腫瘍マウスに注入し、レーザー光照射 ($\lambda_{\text{ex}}=788$ nm、1000 mW、10 min) を行った。組織学的分析により、深部の腫瘍組織が hexa@cpHDL の注入と照射を受けていることが明らかになった。レーザー光照射なしでは、hexa@cpHDL 注入は明らかな組織損傷は認められなかった。これらの *in vivo* 実験は、hexa@cpHDL の持続的な PTE の治療効果を示している。

また、*in vivo* ^{19}F MRI を行った (**Figure S21**)。hexa@cpHDL の~0.1 mL 溶液 (788 nm で OD > 3、660 μM) を腫瘍内皮下に注射した。2時間後、腫瘍の一部で ^{19}F 信号が観察された ^1H および ^{19}F 画像のオーバーレイを取得しました。担癌マウス (negative control) に PBS を腫瘍内注射した後、 ^{19}F NMR 画像ではシグナルは観察されなかった (**Figure S21b**)。これらの結果を裏付けるために、腫瘍からの抽出物で ^{19}F NMR を測定し、hexa@cpHDL 注入の場合、約-60 ppm のブロードな ^{19}F 信号が検出された (**Figure S21c**)。このピークは、分解生成物に由来するトリフルオロメチル基に起因する可能性がある (**Figure S21a**)。したがって、MRI 測定で観察された ^{19}F 信号は、hexa のトリフルオロメチル基および腫瘍内のその分解生成物に由来すると推定した。腫瘍組織の視覚化が不完全なのは、腫瘍内注射後の hexa@cpHDL の不均一な分布が原因である。

これらの *in vivo* 研究では、hexa のナノキャリアとしての cpHDL の利用は、hexa の安定化と腫瘍内保持を介して PTT に対してポジティブに貢献するが、信号強度の低下により ^{19}F MRI に対してはネガティブな影響を与える (**Figure 6a**)。さらに、hexa の NIR 吸収は ICG のそれと比較して比較的低い。それにもかかわらず、hexa は cpHDL 中で ICG よりも細胞毒性はるかに低かった。ICG は臨床的に使用される造影剤であり、マウス、[22a]ハムスター、[22b]、およびヒトに PTE 依存性の治療効果を提供している。より洗練された分子設計、すなわち、末端機能化およびポルフィリン環のさらなる環拡張を通じて、hexa ベースのセラノスティックシステムの開発を進める。

Supporting information

1. Compound Characterization

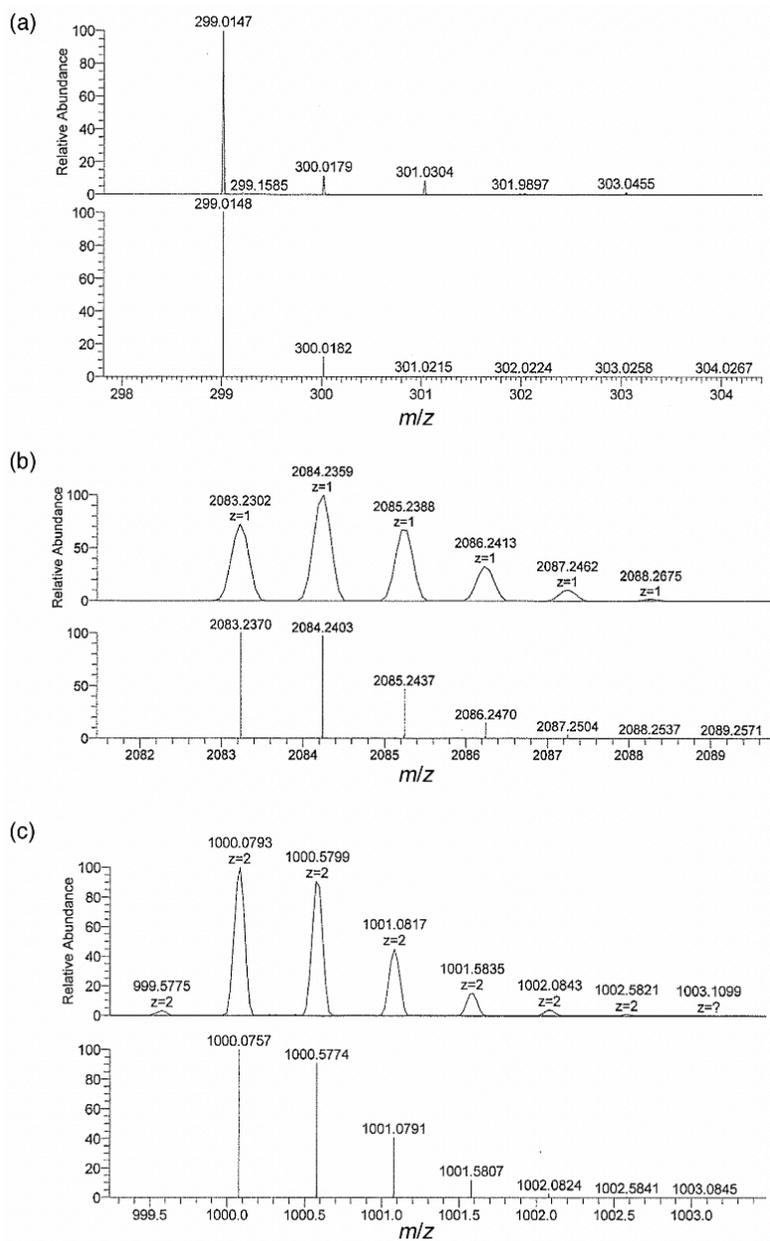


Figure S1. (a) 4、(b) 5、および(c) hexa の実験(上)および計算(下)により得られた高解像度 ESI-MS 分析結果。

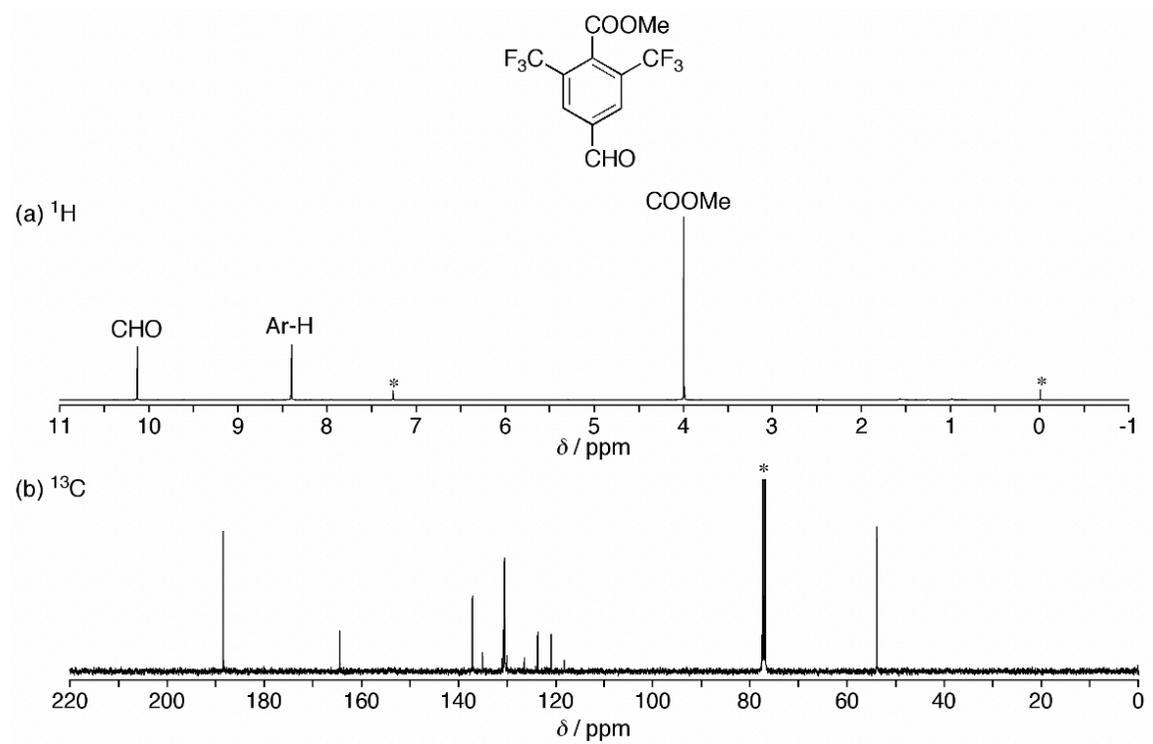


Figure S2. (a) ^1H および (b) CDCl_3 中 25°C での ^{13}C NMR スペクトル。*で示したピークは残留溶媒によるものである。

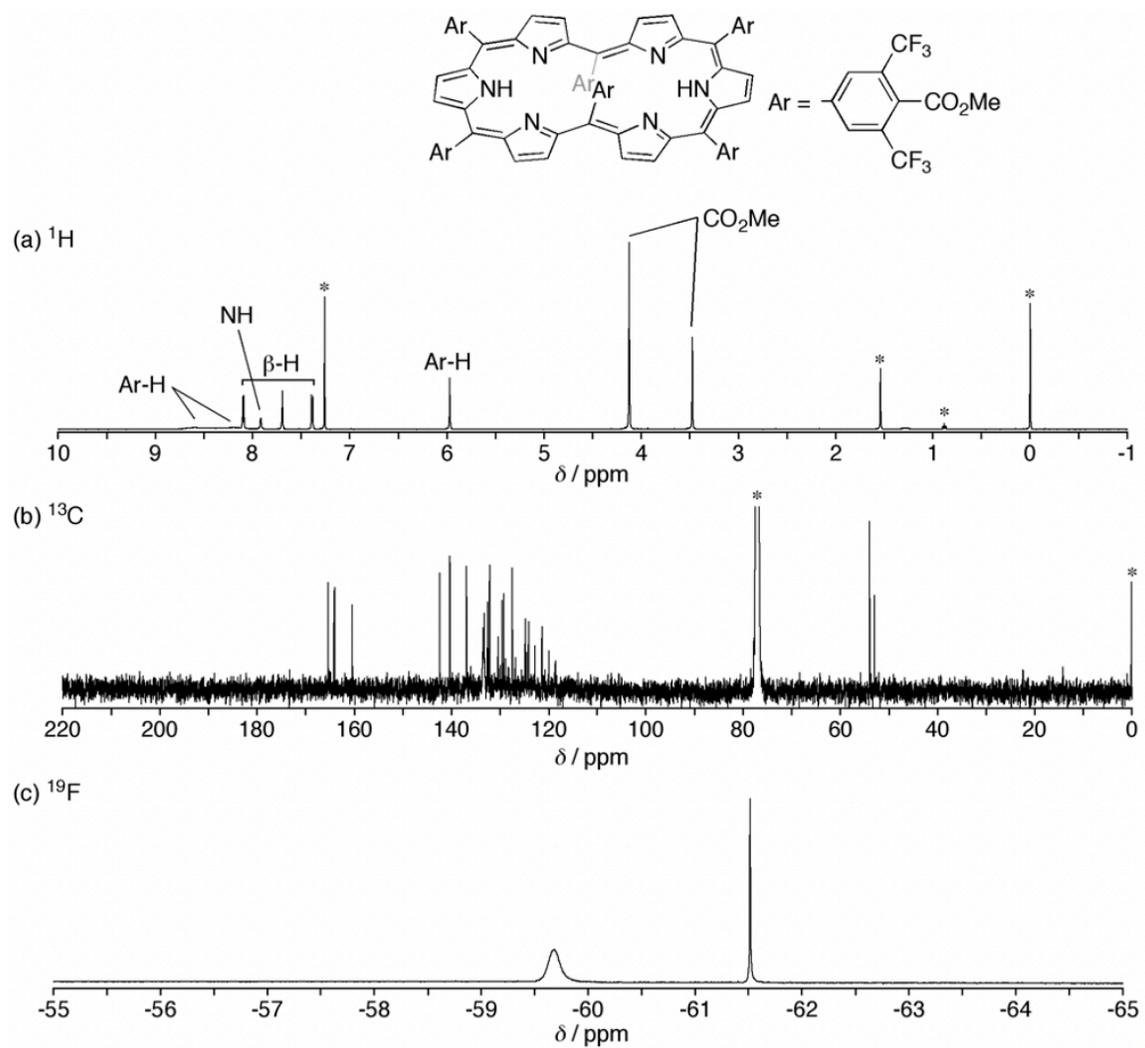


Figure S3. (a) ^1H 、(b) ^{13}C 、および (c) CDCl_3 中の 25°C における 5 の ^{19}F NMR スペクトル。
*で示したピークは残留溶媒によるものである。

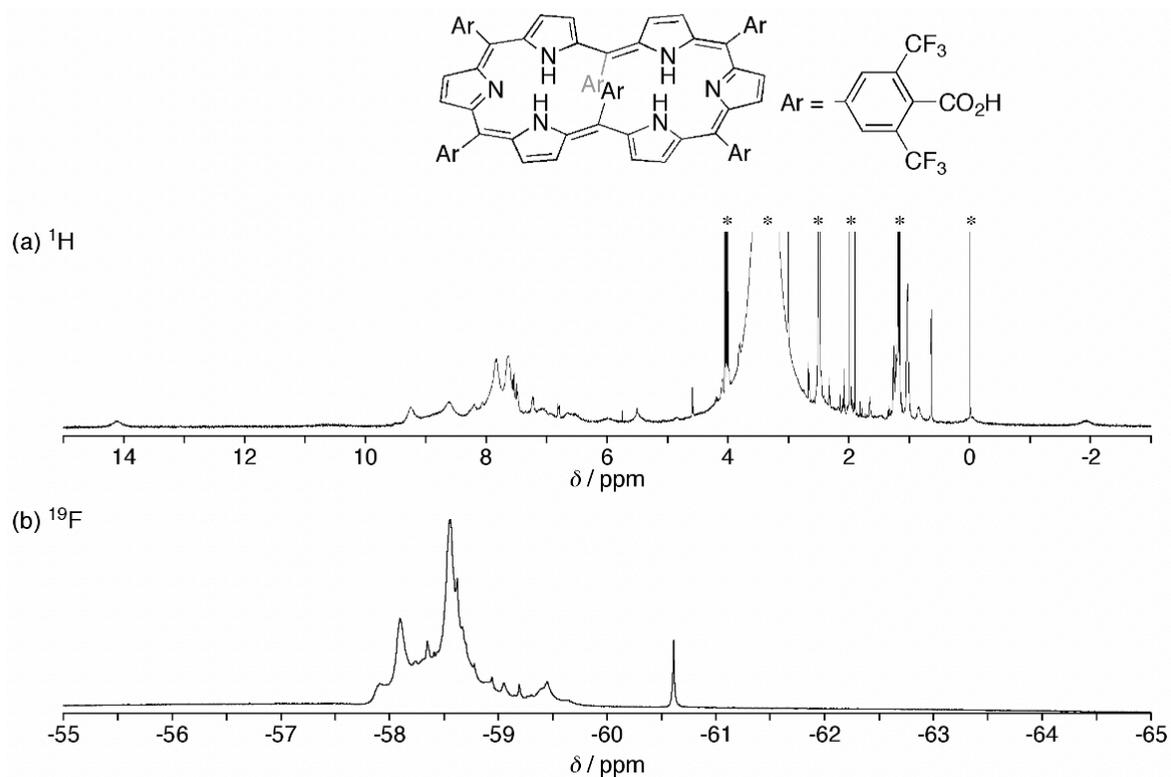


Figure S4. (a) ^1H および (b) $\text{DMSO-}d_6$ 中の hexa の ^{19}F NMR スペクトル。*で示したピークは残留溶媒によるものである。

hexa の NMR スペクトルは、その配座の柔軟性により非常に幅広い信号を示すため、信号の割り当ては困難である。高温での NMR 測定でも、シャープな信号は得られなかった（データは示していない）。溶液の立体配座を決定することはできなかったが、14 ppm と -2 ppm 前後の幅広い信号は、メビウスの芳香族性を示しており、hexa の吸収スペクトルの特徴と一致している

(**Figure S6**)。実際、[28]ヘキサフィリンと[32]ヘプタフィリンは、いくつかのねじれたメビウス配座をとり、極性溶媒中で動的配座平衡を示し、 ^1H NMR 信号の広がりにつながることを報告されている。[S1-3]

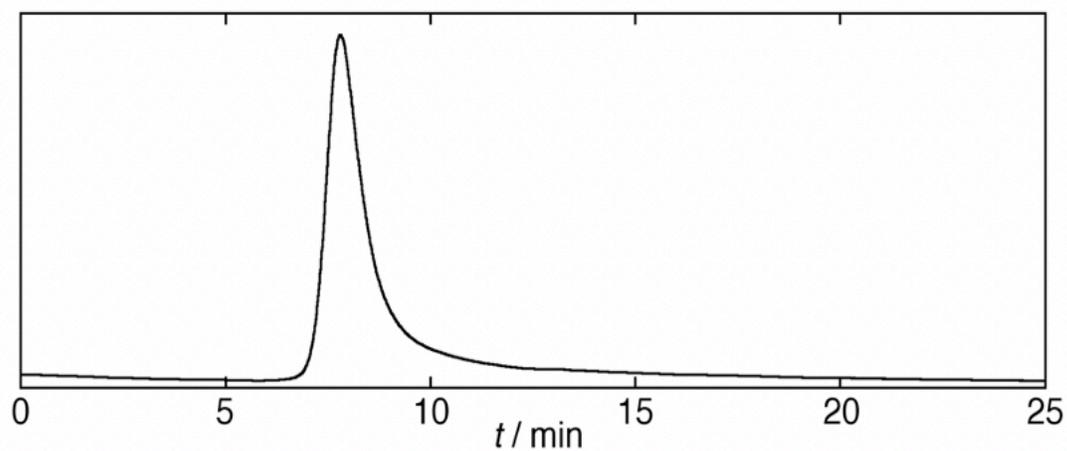


Figure S5. メタノールと H₂O の 1 : 1 混合物を使用した hexa の HPLC クロマトグラム。カラム : Agilent Eclipse Plus C18 3.5 μm (ID 4.6 mm×100 mm) ; 流量 : 0.15 mL min⁻¹。

2. Optical and Photophysical Properties

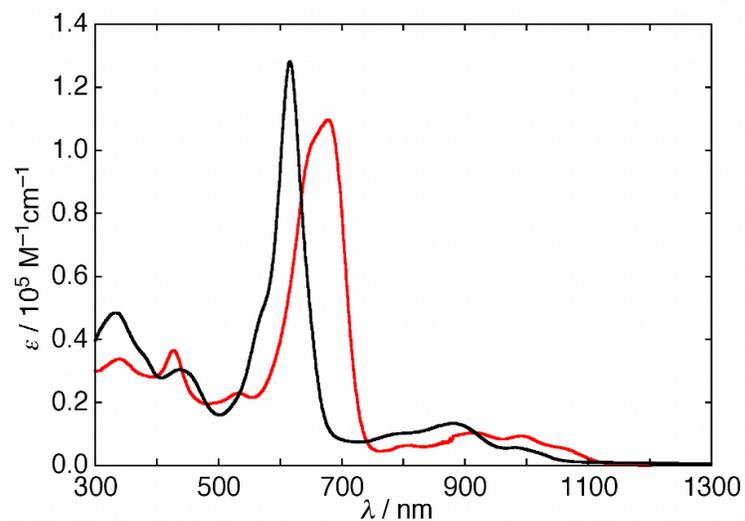


Figure S6. DMSO での 5 (黒) および 6 (赤) の UV/Vis/NIR 吸収スペクトル。

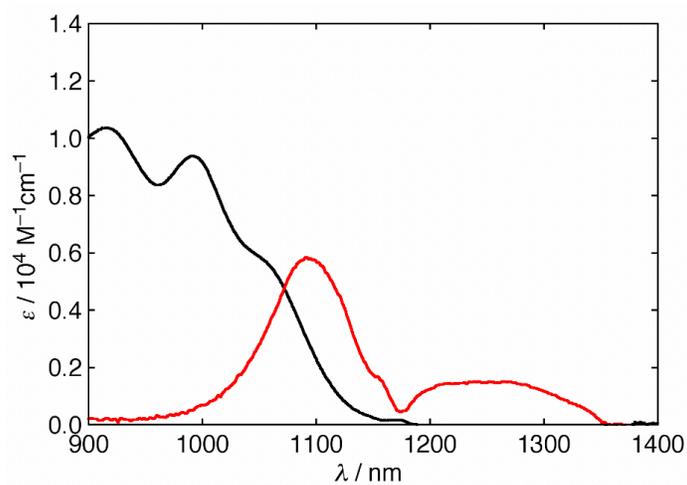


Figure S7. DMSO 中の hexa の NIR 吸収 (黒) および蛍光 (赤) スペクトル。蛍光スペクトルは、656 nm で励起することにより得た。

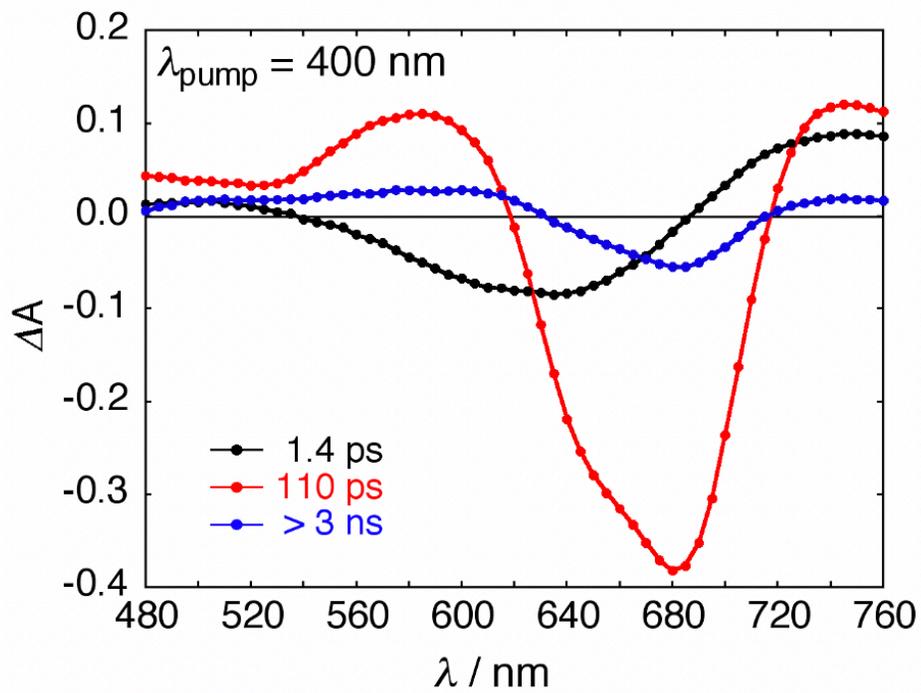


Figure S8. データの global three-exponential fit で得られた DMSO 中における hexa の時間分解 TA スペクトル。シグナル寿命は図中に示した。

3. DLS Measurements

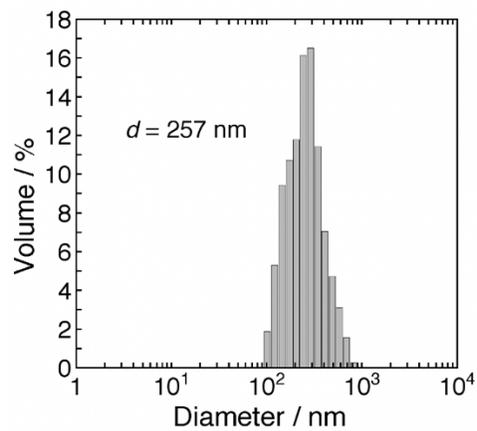


Figure S9. PBS での hexa (凝集体) のサイズ分布。

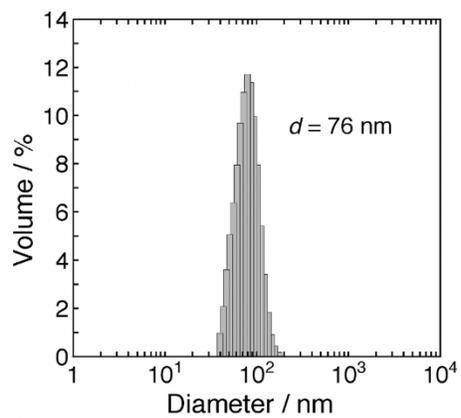


Figure S10. PBS における cpHDL のサイズ分布。

4. Properties of hexa@cpHDL

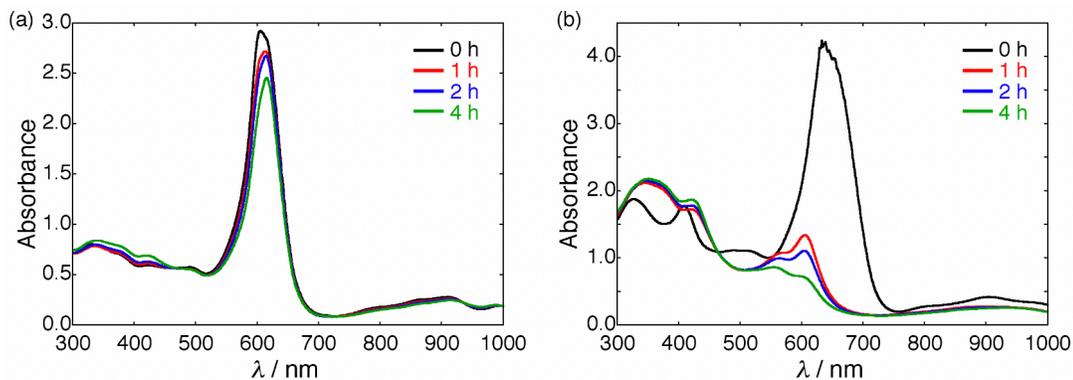


Figure S11. 暗所、37°Cで0-4時間インキュベートした後のRPMI1640培地中の(a) hexa@cpHDL および (b) hexaのUV/Vis/NIR吸収スペクトル。

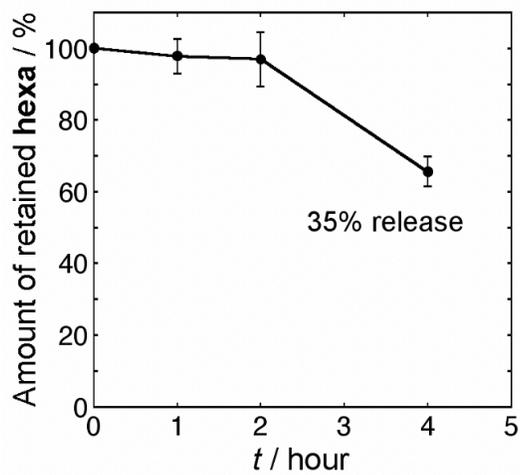


Figure S12. hexa@cpHDLからのhexaの徐放性。0.1 w/w% BSA in 0.9% NaClで行った。[S6]

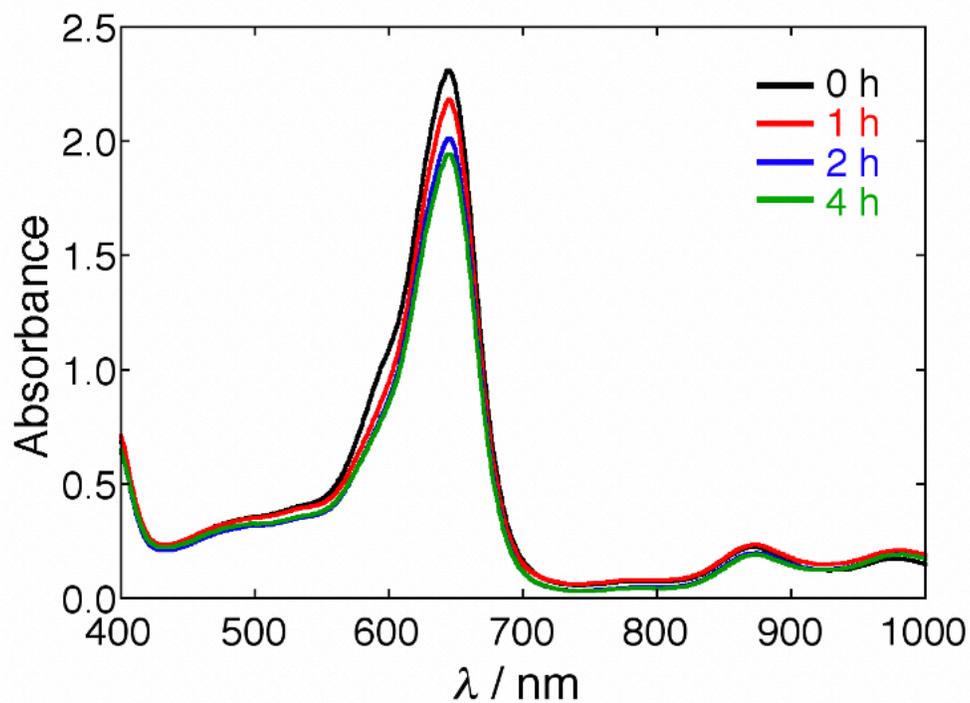


Figure S13. 暗所、37°Cで0-4時間インキュベートした後の、グルタチオン（1 mg/L）を含む生理食塩水中の hexa の UV/Vis/NIR 吸収スペクトル。

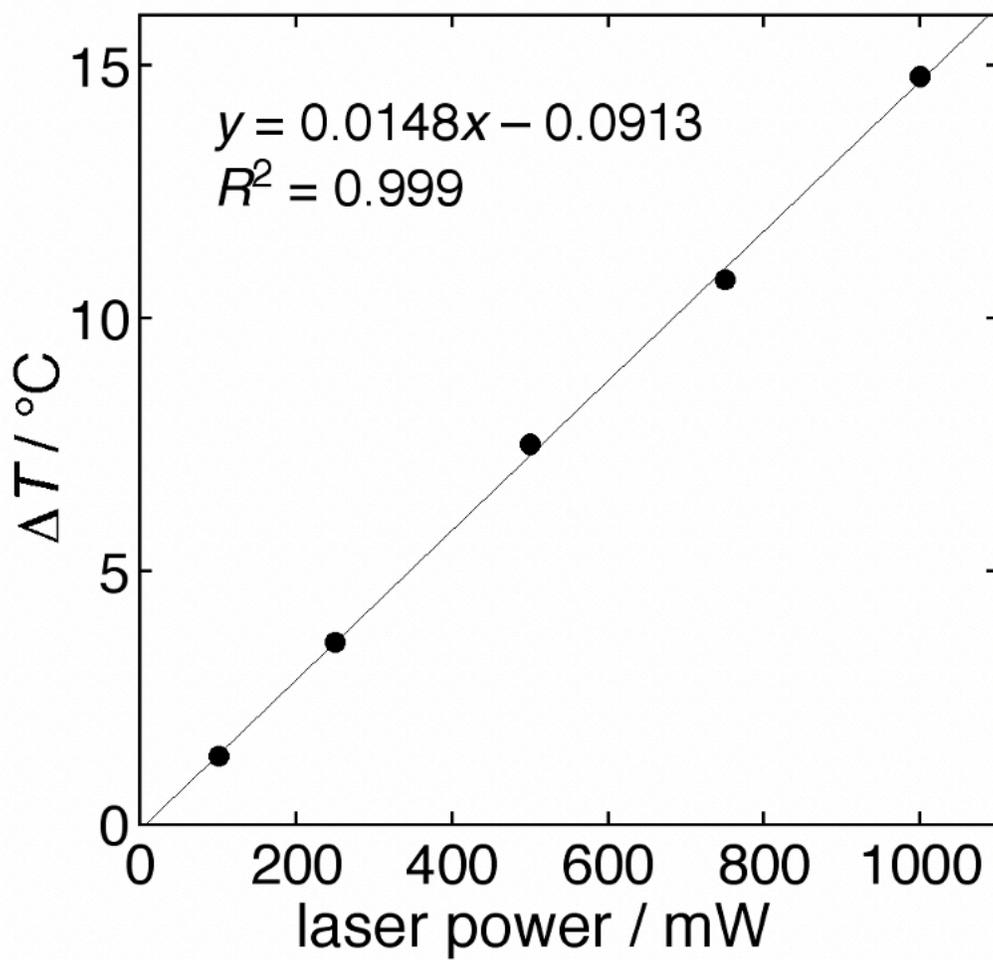


Figure S14. 照射レーザー光強度と温度上昇 (ΔT) のプロット。プロットは、Figure 3a のデータに基づいて行った。

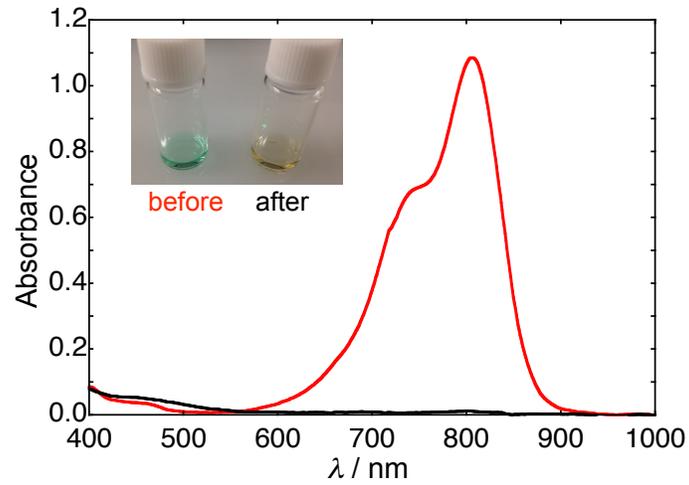


Figure S15. 788 nm (1000 mW)、10 分間のレーザー光照射前 (赤) 後 (黒) の ICG@cpHDL (28 μM) の UV/Vis/NIR 吸収スペクトル。スペクトルは溶液を 10 倍に希釈して測定した。

5. Cytotoxicity of hexaphyrin

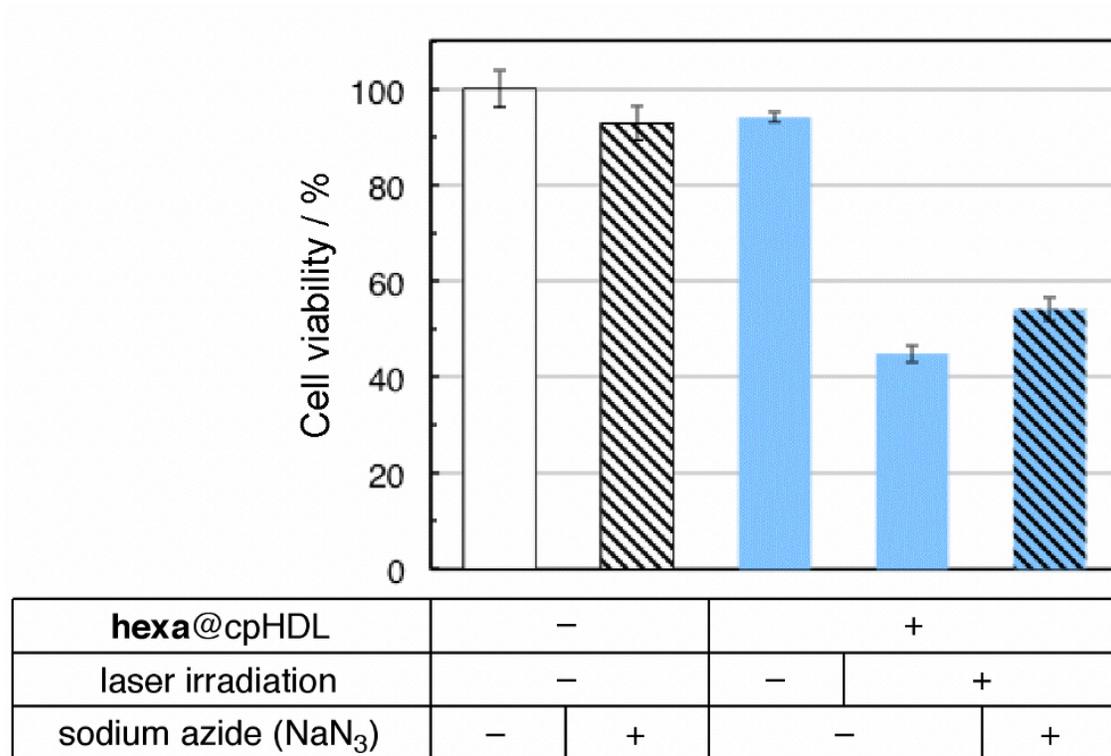


Figure S16. hexa@cpHDL へのレーザー照射により生成する一重項酸素の光殺細胞活性への寄与。実験条件は Figure 4 と同様である。場合によっては、一重項酸素クエンチャーであるアジ化ナトリウム (100 mM) を添加した。[S4, 5]アジ化ナトリウムは遺伝的毒性がある可能性があるが、T24 の処理サンプル処理 (4 時間) とレーザー照射 (10 分) の間、細胞生存率はごくわずかしこ低下しなかった。試験は 3 回繰り返して行った。

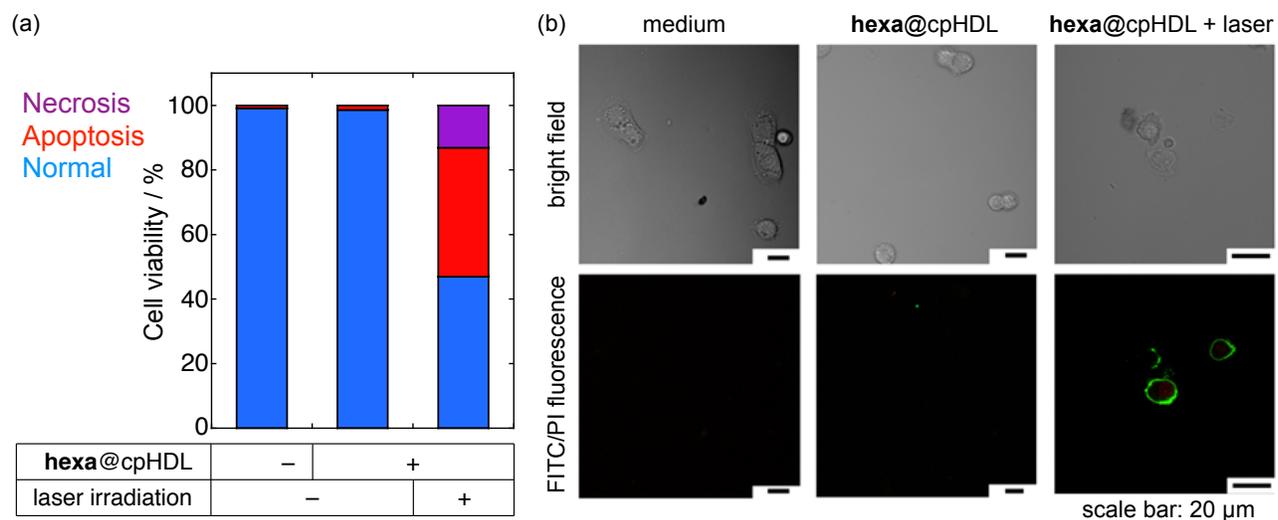


Figure S17. (a) 照射された hexa@cpHDL により誘導された細胞死に対するネクローシスおよびアポトーシスの寄与。死んだ細胞の中で、アポトーシス細胞死（40%）が優勢であった。(b) アポトーシス細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像。アポトーシス細胞死は、それぞれ細胞膜および核における Annexin V-FITC および PI 蛍光シグナル(下の画像では緑と赤)でそれぞれ決定した。

6. ^{19}F detection by NMR measurements

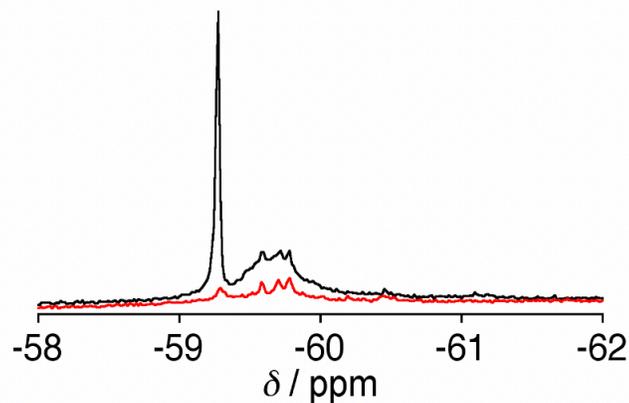


Figure S18. 25°C の生理食塩水 (96 μM hexa) 中の遊離 hexa (黒色) および hexa@cpHDL (赤色) の ^{19}F NMR スペクトル。

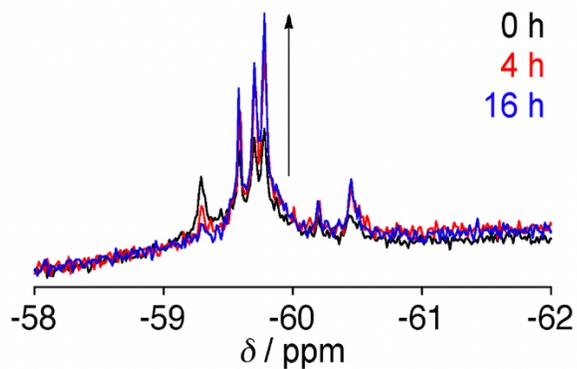


Figure S19. 37°C で 0–16 時間インキュベートした後、25°C の生理食塩水中における hexa@cpHDL の ^{19}F NMR スペクトル。

7. *In vivo* Experiments

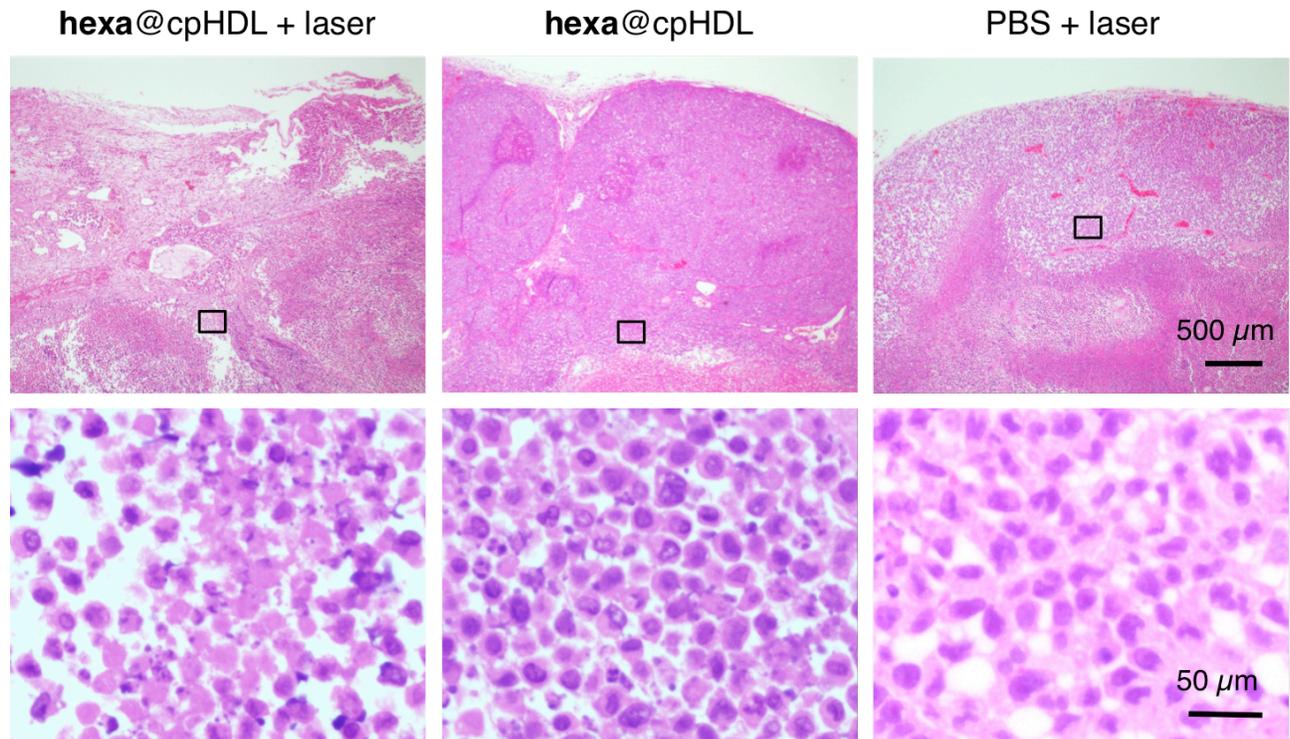


Figure S20. hexa@cpHDL +レーザー光 (左)、hexa@cpHDL 単独 (中央) または PBS +レーザー光 (右) で処理したマウスの腫瘍組織の HE 染色画像。下に、上の画像に示されている領域の拡大画像を示す。hexa@cpHDL +レーザーで治療すると、空胞変性と核の断片化がより深部の腫瘍組織の広い範囲で誘導された。

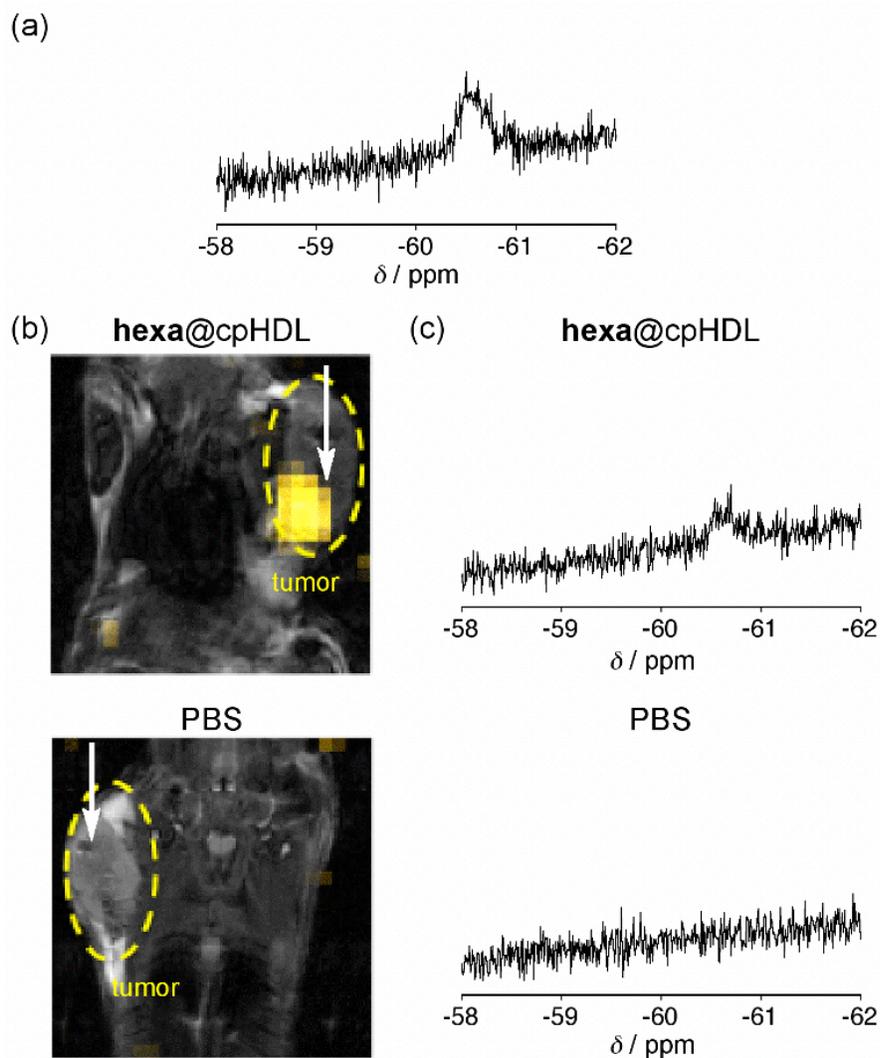


Figure S21. (a) 25°Cでの CD_3OD 中の hexa@cpHDL の分解生成物の ^{19}F NMR スペクトル。(b) hexa@cpHDL と PBS を腫瘍に注入した後のマウスの ^{19}F MRI 画像。MRI 画像では、 ^1H 画像をグレースケールで表示し、 ^{19}F 画像を重ねた。矢印は注射部位を示す。腫瘍外の ^{19}F 信号の出現は、4.9 の低い S/N 比に起因する可能性が最も高いと考えられる。イソフルランの ^{19}F シグナルは -81 ppm で観察されたため、MRI 画像ではイソフルランはおそらく可視化されない。腫瘍組織の一部のみからの ^{19}F 信号の検出は、腫瘍内に注入された hexa@cpHDL の不均一な分布によるものである。(c) 25°C の CD_3OD に対応する腫瘍抽出物の ^{19}F NMR スペクトル。

4. References

- [1] a) S. S. Kelkar, T. M. Reineke, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1879–1903; b) D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2656–2672; c) K. Y. Choi, G. Liu, S. Lee, X. Chen, *Nanoscale* **2012**, *4*, 330–342.
- [2] a) R. Kumar, W. S. Shin, K. Sunwoo, W. Y. Kim, S. Koo, S. Bhuniya, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6670–6683; b) E.-K. Lim, T. Kim, S. Paik, S. Haam, Y.-M. Huh, K. Lee, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 327–394.
- [3] a) R. K. Pandey, G. Zheng in *The Porphyrin Handbook, Vol. 6* (Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press: San Diego, **2000**; b) H. A. Collins, M. Khurana, E. H. Moriyama, A. Mariampillai, E. Dahlstedt, M. Balaz, M. K. Kuimova, M. Drobizhev, V. X. D. Yang, D. Phillips, et al., *Nature Photonics* **2008**, *2*, 420–424; c) M. K. Kuimova, S. W. Botchway, A. W. Parker, M. Balaz, H. A. Collins, H. L. Anderson, K. Suhling, P. R. Ogilby, *Nature Chem.* **2009**, *1*, 69–73; d) M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, R. K. Pandey, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 340–362; e) T. D. MacDonald, T. W. Liu, G. Zheng, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7076–7079; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6956–6959; f) M. Dommaschk, M. Peters, F. Gutzeit, C. Schütt, C. Näther, F. D. Sönnichsen, S. Tiwari, C. Riedel, S. Boretius, R. Herges, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7552–7555.
- [4] J. P. Celli, B. Q. Spring, I. Rizvi, C. L. Evans, K. S. Samkoe, S. Verma, B. W. Pogue, T. Hasan, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2795–2838.
- [5] a) J. L. Sessler, D. Seidel, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5292–5333; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5134–5175; b) M. Stępień, N. Sprutta, L. Latos-Grażyński, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4376–4430; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4288–4340; c) S. Saito, A. Osuka, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4432–4464; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4342–4373; d) C. Preihs, J. F. Arambula, D. Magda, H. Jeong, D. Yoo, J. Cheon, Z. H. Siddik, J. L. Sessler, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 12184–12192.
- [6] J. A. Parrish, *J. Invest. Dermatol.* **1981**, *77*, 45–50.
- [7] a) R. R. Anderson, J. A. Parrish, *Science* **1983**, *220*, 524–527; b) P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1578–1586.
- [8] a) J.-Y. Shin, H. Furuta, K. Yoza, S. Igarashi, A. Osuka, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7190–7191; b) S. Kang, H. Hayashi, T. Umeyama, Y. Matano, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyinen, H. Imahori, *Chem. An Asian J.* **2008**, *3*, 2065–2074; c) Y.-S. Xie, K. Yamaguchi, M. Toganoh, H. Uno, M. Suzuki, S. Mori, S. Saito, A. Osuka, H. Furuta, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5604–5607; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5496–5499.

- [9] a) F. Kiessling, B. Morgenstern, C. Zhang, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 77–91; b) A. J. L. Villaraza, A. Bumb, M. W. Brechbiel, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2921–2959.
- [10] a) J. Yu, V. D. Kodibagkar, W. Cui, R. P. Mason, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 819–848; b) Y. Takaoka, T. Sakamoto, S. Tsukiji, M. Narazaki, T. Matsuda, H. Tochio, M. Shirakawa, I. Hamachi, *Nature Chem.* **2009**, *1*, 557–561; c) K. J. Thurecht, I. Blakey, H. Peng, O. Squires, S. Hsu, C. Alexander, A. K. Whittaker, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5336–5337.
- [11] S. K. Pandey, A. L. Gryshuk, A. Graham, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, M. P. Dobhal, G. Zheng, Z. Ou, R. Zhan, K. M. Kadish, A. Oseroff, S. Ramaprasad, R. K. Pandey, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 10059–10073.
- [12] W. Dmowski, K. Piasecka-Maciejewska, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6781–6792.
- [13] Y. Nakamura, S. Inomata, M. Ebine, Y. Manabe, I. Iwakura, M. Ueda, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 83–85.
- [14] In this reaction, reduction of the hexaphyrin macrocycle coincidentally occurred. Under acidic conditions [26]hexaphyrin can be reduced to [28]hexaphyrin. See the following: S. Tokuji, J.-Y. Shin, K. S. Kim, J. M. Lim, K. Youfu, S. Saito, D. Kim, A. Osuka, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7240–7241.
- [15] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nature Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
- [16] a) A. Barel, G. Jori, A. Perin, P. Romandini, A. Pagnan, S. Biffanti, *Cancer Lett.* **1986**, *32*, 145–150; Y. N. Konan, R. Gurny, E. Allémann, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2002**, *66*, 89–106.
- [17] a) T. Murakami, W. Wijagkanalan, M. Hashida, K. Tsuchida, *Nanomedicine (Lond.)* **2010**, *5*, 867–879; b) T. Numata, T. Murakami, F. Kawashima, N. Morone, J. E. Heuser, Y. Takano, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, Y. Mori, H. Imahori, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6092–6095; c) S. Mathew, T. Murakami, H. Nakatsuji, H. Okamoto, N. Morone, J. E. Heuser, M. Hashida, H. Imahori, *ACS Nano*, **2013**, *7*, 8908–8916; d) T. Murakami, H. Nakatsuji, N. Monore, J. E. Heuser, F. Ishidate, M. Hashida, H. Imahori, *ACS Nano*, **2014**, *8*, 7370–7376; e) H. Nakatsuji, T. Numata, N. Monore, S. Kaneko, Y. Mori, H. Imahori, T. Murakami, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11725–11729.
- [18] L. E. Gerweck, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 3408–3414.
- [19] a) M. L. J. Landsman, G. Kwant, G. A. Mook, W. G. Zijlstra, *J. Appl. Physiol.* **1976**, *40*, 575–583; b) V. L. Dzurinko, A. S. Gurwood, J. R. Price, *Optometry* **2004**, *75*, 743–755; c) J. Yu, D. Javier, M. A. Yaseen, N. Nitin, R. Richards-Kortum, B. Anvari, M. S. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1929–1938.

- [20] a) B. Jang, J.-Y. Park, C.-H. Tung, I.-H. Kim, Y. Choi, *ACS Nano* **2011**, *5*, 1086–1094; b) Y. Li, T. Lin, Y. Luo, Q. Liu, W. Xiao, W. Guo, D. Lac, H. Zhang, C. Feng, S. Wachsmann-Hogiu, J. H. Walton, S. R. Cherry, D. J. Rowland, D. Kukis, C. Pan, K. S. Lam, *Nature Commun.* **2014**, *5*, 4712.
- [21] B. Hildebrandt, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *43*, 33–56.
- [22] a) G. Shafirstein, W. Bäuml, L. J. Hennings, E. R. Siegel, R. Friedman, M. A. Moreno, J. Webber, C. Jackson, R. J. Griffin, *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 1208–1215; b) P. Babilas, G. Shafirstein, J. Baler, V. Schacht, R.-M. Szeimies, M. Landthaler, W. Bäuml, C. Abels, *Lasers Surg. Med.* **2007**, *39*, 341–352; c) A. Klein, W. Bäuml, M. Koller, G. Shafirstein, E. A. Kohl, M. Landthaler, P. Babilas, *Lasers Surg. Med.* **2012**, *44*, 369–376.
- [23] N. V. Tkachenko, L. Rantala, A. Y. Tauber, J. Helaja, P. H. Hynninen, H. Lemmetyinen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9378–9387.
- [24] T. Murakami, K. Tsuchida, M. Hashida, H. Imahori, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 789–791.
- [25] M. Fukasawa, H. Adachi, K. Hirota, M. Tsujimoto, H. Arai, K. Inoue, *Exp. Cell Res.* **1996**, *222*, 246–250.
- [26] T. Murakami, H. Okamoto, H. Kim, *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 712–715.
- [S1] J. Sankar, S. Mori, S. Saito, H. Rath, M. Suzuki, Y. Inokuma, H. Shinokubo, K. S. Kim, Z. S. Yoon, J. Shin, J. M. Lim, Y. Matsuzaki, O. Matsushita, A. Muranaka, N. Kobayashi, D. Kim, A. Osuka, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13568–13579.
- [S2] S. Saito, J.-Y. Shin, J. M. Lim, K. S. Kim, D. Kim, A. Osuka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9657–9660.
- [S3] M.-C. Yoon, J.-Y. Shin, J. M. Lim, S. Saito, T. Yoneda, A. Osuka, D. Kim, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6707–6715.
- [S4] R. Vankayala, C.-C. Lin, P. Kalluru, C.-S. Chiang, K. C. Hwang, *Biomaterials* **2014**, *35*, 5527–5538.
- [S5] P. Kalluru, R. Vankayala, C.-S. Chiang, K. C. Hwang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12332–12336.
- [S6] J. A. Jones, J. R. Starkey, A. Kleinhofs, *Mutat. Res. Toxicol.* **1980**, *77*, 293–299.
- [S7] P. Arenaz, L. Hallberg, F. Mancillas, G. Gutierrez, S. Garcia, *Mutat. Res. Lett.* **1989**, *227*, 63–67.

CHAPTER 3

Application of lipoprotein for photodynamic therapy

1. Introduction

単層カーボンナノチューブ (SWNT) はグラファイトチューブ状ナノ材料であり、カイラリティ (chirality) に基づいて金属 (m-SWNT) と半導体 (s-SWNT) に分類される[1,2]。これら 2つの SWNT は本質的に sp^2 炭素原子で構成されているが、光応答の点で異なる。s-SWNT のみが強力な近赤外線 (NIR) 吸収を持ち、その光子エネルギーを O_2 の存在下で (光線力学効果、PDE) 蛍光発光、発熱 (光線温熱効果) および活性酸素種 (ROS) 生成に変換する。それらの NIR 吸収は、最初の van Hove 特異点に由来する。そのため、NIR 光は吸収と散乱が少ないため人体に比較的無害であるという事実に基づいて[3]、s-SWNT はイメージングや光線温熱療法、光線力学療法などの生物医学的応用に向けて広く研究されてきた[4-6]。この研究は、s-SWNT の単一カイラリティ成分の PDE に焦点を当て、その光安定性が高いため、その作用が信じられないほど持続可能であることを示している。

SWNT の PDE は、可視光での励起によって最初に観察された。Gandra らは、格子欠陥の少ない SWNT は、水性媒体中でより効率的に一重項酸素を光生成することを報告した[7]。次に、NIR 光の下で、ゲルクロマトグラフィーベースの方法を使用して HiPCO[®] SWNT から濃縮された s-SWNT [8]が ROS、すなわち一重項酸素 (1O_2) とスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) を生成できることを示した。一方、m-SWNT は s-SWNT よりも効率的に熱を生成する[9]。逆に、Lebedkin らは未濃縮の HiPCO[®] SWNT は 1O_2 のクエンチャーであり、その s-SWNT がこのクエンチの原因である可能性が高いと報告している[10]。これらの結果は、s-SWNT の PDE が大幅に過小評価されており、調査されていないことを示している。本研究は、単一の s-SWNT カイラリティ成分の PDE に焦点を当て、その光安定性が高いため、その作用が信じられないほど持続可能であることを示している。s-SWNT の NIR 応答は、NIR 吸収 s-SWNT の単一カイラリティ成分濃縮によって大幅に強化できる。最近の研究により、カイラリティ濃縮された(6,5)-SWNTs [11]、(12,1)-SWNTs および(11,3)-SWNTs [12]の高圧 CO 変換 (HiPCO[®]) SWNT、およびコバルト-モリブデン触媒 (CoMoCAT[®]) SWNT を濃縮した(6,4)-SWNT [13]が未濃縮 SWNT と比較して強い NIR 発光を示すことが明らかになった。HiPCO[®] (6,5)-SWNT [11]の高い光線温熱効果 (PTE) も注目されている。これらすべての s-SWNT カイラリティ成分は 808 nm でレーザー光照射されたが、

これは E22 共鳴吸収バンドと一致していない。3 種類の単一カイラル s-SWNT の PDE を評価するために、ピーク波長でのレーザー光照射を通して、NIR 領域の E22 バンドを励起した。さらに、それらの中で最も光線力学活性な成分 ((6,4)-SWNT) の光線力学療法の可能性は、2 種類の *in vitro* アッセイ、癌細胞アブレーションと A β ペプチド由来のアミロイド凝集体の光分解、で評価した。

2. Materials and methods

2.1. 一般的な手順

UV-vis-NIR吸収スペクトルは、SHIMADZU UV-3600 UV-vis-NIR吸収分光光度計で測定した。蛍光スペクトルは、HORIBA Jobin Yvon FluoroMax-4分光蛍光光度計とMolecular Devices SpectraMax M2 & M2eマイクロプレートリーダーで測定した。すべての測定は空気中で行った。

2.2. SWNTs分散の準備

泥のような状態の未処理のHiPCO® SWNTのサンプル（ロット番号R1901およびR1794、HP27-054）はUnidym Inc.から購入した。受け取ったサンプルには、メーカーによると7.8-9.9 wt%のSWNTが含まれていた。受け取ったサンプル（SWNTを78-156 mg含む）1-2 gを、冷却ジャケット付きの100 mLガラス容器内の2 wt%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の水溶液100 mLに加えた。次に、この分散液を、0.5インチのフラットチップを備えた超音波ホモジナイザー（Sonifier 250D、Branson）を使用して、 30 W cm^{-2} の出力密度で9時間連続的に超音波処理した。超音波処理中の分散剤の加熱を防ぐために、冷媒を16°Cの冷却ジャケットに流し込んだ。MLA-55アングルローター（Beckman Coulter）を備えたOptima MAX-XP超遠心機（Beckman Coulter）を使用して、超音波処理されたサンプル溶液を、残留触媒金属粒子、ナノチューブバンドル、その他の不純物を除去するために、210,000 gで120分間遠心分離した。上澄み（Initial SWNT分散液）の上位70%の容量を収集し、後続のゲルクロマトグラフィーに使用した。

2.3. SWNTからのs-SWNTの分離

Initial SWNT分散液（20 mL）を12 mLの10 wt% SDSで希釈し、次に75 mLの5 wt% SDSで平衡化した25 mL Sephacryl S-200 HRゲルカラムに通して、室温で炭素質不純物をさらに除去した。フロースルー画分を脱イオン水で1.5倍に希釈した。18ゲージの針が取り付けられた50 mLのシリンジで20 mLのSepharose 2Bゲルを使用して、希釈フロースルー画分の金属/半導体SWNT分離を行った。つまり、ゲルカラムを60 mLの1wt% SDS溶液で平衡化し、上記のSWNT分散液をカラム

の上部に滴下し、続いて1wt% SDS溶液 (60 mL) を使用して未結合SWNTを除去した。次に、1wt%デオキシコール酸ナトリウム(DOC)溶液を添加して、ゲルカラムからs-SWNTを溶出した。

2.4. 温度制御ゲルクロマトグラフィーを使用したカイラリティ濃縮

SWNTのカイラリティ濃縮は、既報の方法[14]に従ってわずかな変更を加えて実行した。XK 26/20カラム (GE Healthcare) に50 mLのSephacryl S-200 HR (GE Healthcare) を充填してゲルカラムを作製した。カラムを150 mLの2 wt% SDSで平衡化した。分離温度は、(6,4)-、(6,5)-、(12,1)-SWNTの濃縮の場合、10°C、13°C、または25°CのウォーターバスにカラムとSWNTs分散液を含むボトルを浸すことによって制御した。SWNTs分散液、洗浄液 (2 wt% SDS)、および溶離液 (5 wt% SDS) を、蠕動ポンプによる注入を介してカラムにロードした。流量は4.2 mL min⁻¹とした。各SWNTの分散を上記の温度でロードした。ゲルカラム内の未吸着SWNTを2 wt% SDS溶液150 mL (3カラムボリューム分) で洗い流した後、ゲルカラム内に吸着したSWNTを5 wt% SDS水溶液で溶出した。回収されたフラクション容量は3.5 mLだった。SWNTs分散剤は、保管のためにSDSからDOCに変更した。

2.5. カイラリティ濃縮SWNTの純度評価

Origin software ver. 8.6を使用して、S11吸収ピークを持つ個々の(n, m)の近赤外スペクトルをフイッティングした。各(n, m)フラクションの純度は、(6,4)-、(6,5)-、(12,1)-SWNTのS11ピークの面積、つまり800-1,350 nmの波長範囲の吸収ピーク面積から算出した。

2.6. SWNTsとapolipoproteinA-I (apoA-I) の混合物の分散

アポリポタンパク質A-I (apoA-I) との反応の前に、DOCで分散したSWNTを3 Lの脱イオンH₂Oに対して一晚透析して、遊離DOCを可能な限り除去した。Twin COMPACT METER (HORIBA) で測定した電気伝導度 (12 μS / cm) に基づいて推定された、~0.008 wt% DOCを含むSWNT分散液を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中 (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄)、ureaの終濃度が4 MになるようにしてapoA-Iと混合した。溶液をバスソニケーター (Elma,

Elmasonic S 30H) で30°C以下にて1時間超音波処理した。その後、分散液を3 LのPBS溶液に対して一晩透析し、HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep gradeゲルろ過カラム (GE Healthcare) を備えたFPLC AKTAprime plus (GE Healthcare) で精製した。流速は1.0 mL min⁻¹で、溶出液はトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンHCl溶液 (pH 7.4, 50 mM)、NaCl (150 mM)、EDTA溶液 (2 mM)、ジメチルスルホキシド中のフェニルメチルスルホニルフルオリド (0.5 mM) とした。SWNTとapoA-Iおよび遊離apoA-Iの複合体の保持時間は、それぞれ約40分と80分だったが、後者のピークは反応混合物ではほとんど検出されなかった。

2.7. 光線力学的効果 (PDE) の評価

活性酸素種 (ROS) は、蛍光ベースの試験で検出した。一重項酸素、スーパーオキシドアニオン、およびヒドロキシルラジカルは、Singlet Oxygen Sensor Green Reagent (SOSGR; Invitrogen Thermo Fisher Scientific Inc., USA)、ジヒドロエチジウム (DHE; Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)、およびヒドロキシフェニルフルオレセイン (HPF; Sekisui Medical Co., Ltd.)

簡潔にまとめると、マイクロチューブに10 μM SOSGを含む280 μLの(6,4)-、(6,5)-または(12,1)-SWNT濃縮または未濃縮s-SWNTs分散液 (1 wt% DOC) を調製し、混合物 (130 μL) をFluoromax-4分光蛍光光度計 (HORIBA JOBIN YVON) (励起波長475 nm) で蛍光分析した。残りの混合物は、800 nmおよび880 nm (Chameleon-RF, COHERENT)、または980 nm (Mai Tai, Spectra-Physics) で30分間20°Cでレーザー光照射し、蛍光分析を行った。各レーザー波長での光子数が880 nmで400 mWに対応する $8.9 \times 10^{20} \text{ s}^{-1}$ になるように、レーザー出力強度を調整した。

スーパーオキシドアニオンとヒドロキシルラジカルを検出するために、96ウェルプレートに100 μMのDHEまたは10 μMのHPFを含むSWNTの各分散液 (吸収ピークの最大値 = 0.2) を100 μL準備し、SpectraMax M2 & M2eマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で照明前後のサンプルの蛍光分析 (励起波長490 nm) を行った。

2.8. 過渡吸収測定

ナノ秒時間分解過渡吸収測定は株式会社ユニソクのレーザーシステムを用いて行った。ナノ秒過渡吸収スペクトルの測定は以下の手順で行った。各SWNT分散は、YAGレーザーによって570 nmによって励起した。Photodynamicsはプローブ光としてのキセノンランプ（150 W）と検出器としての光電子増倍管への継続的な露出によってモニタリングした。

2.9. ラマンスペクトル測定

(6,4)-および(6,5)-SWNTのラマンスペクトルは、2.33 eV（532 nm）および1.96 eV（633 nm）レーザーを搭載したHORIBA JOBIN YVON LabRAM ARAMISを用いて、Kyoto Integrated Science & Technology Bio-Analysis Center (KIST-BIC) で測定した。テトラヒドロフラン（100 μ L）を各SWNT分散液（100 μ L）に加え、20,000 gで10分間遠心分離した。得られた沈殿物をスライドグラス（SILANIZED SLIDES, DAKO）に貼り付けた。マイクロカバーガラス（22 \times 24mm, 厚さ0.12-0.17 mm, MATSUNAMI GLASS Ind., Ltd.）と50倍レンズも使用した。すべての測定は、室温の空気中で行った。(12,1)-SWNTのラマンスペクトルは、1.58 eV（785 nm）レーザーを搭載したJASCO NRS-3100で測定した。

2.10. 高解像度透過型電子顕微鏡（HR-TEM）測定

DOC-またはapoA-Iで分散されたSWNTは、穴あきアモルファスカーボンフィルムでコーティングされた銅製マイクログリッドに滴下されました。HR-TEM測定は、JEOL JEM-2200FS顕微鏡を使用して電子加速電圧200 kVで実行されました。HR-TEM画像は、これらの顕微鏡に1フレームs⁻¹の速度で取り付けられたCCDカメラ（Gatan、モデル894）を使用して記録されました。

2.11. 共焦点レーザー顕微鏡分析

Alexa546およびMitoTracker Greenからの蛍光信号は、LD C-Apochromat 40 \times / 1.1 W Corr対物レンズを備えたLSM 780レーザー走査共焦点顕微鏡（Zeiss）システムを使用して検出した。それら

の信号は、スペクトルイメージングモードで他の自己蛍光信号から厳密に区別した。両方の色素をAr-Ionレーザーで488 nmで励起し、蛍光発光を500-530 nm IRバンドパスフィルターで記録した。

2.12. 細胞培養

ヒト上皮癌細胞(HeLa)は理化学研究所の細胞株で、10%ウシ胎児血清(FBS, Japan Bioserum)、100 U mL⁻¹ペニシリン、100 µg mL⁻¹ストレプトマイシン(富士フィルム和光純薬)を添加したMinimum Essential Media(MEM, Thermo Fisher Scientific)で維持した。細胞は5% CO₂と95%空气中で培養され、3-4日ごとに継代した。

2.13. 暗毒性および光毒性実験

HeLa細胞を96ウェルプレート(Corning Inc.)に1×10⁵ cells mL⁻¹で播種し、24時間インキュベートしました。細胞は、s-SWNTまたは(6,4)-SWNTをapoA-I(それぞれOD₈₈₀ = 0.45、11または1.8 µg mL⁻¹)で修飾したもの、あるいはインドシアニンググリーン(ICG, OD₈₀₀ = 0.45)を37°Cで3時間処理した。インキュベーション後、SWNTの存在下で細胞を15分間光に曝した。レーザー出力は、880 nmで400 mW、800 nmで440 mWとした。細胞をPBSで2回洗浄した後、細胞培養液中で37°Cで18時間インキュベートした。¹O₂クエンチングのために、細胞を5 mM SOSGを含む細胞培養培地で30分間、照射前と照射中にインキュベートした。細胞生存率は、Cell Counting Kit-8(Dojindo)およびSpectraMax M2 & M2eマイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して、製造元のプロトコルに従って評価した。細胞生存率の計算には、450 nmと620 nm(参照)でのODの差を使用した。SOSGを用いた場合は、差分スペクトルを測定することでSOSG由来の吸収の影響を除去した。

2.14. アミロイドベータ由来ペプチド凝集体の光分解

アミロイドベータ由来ペプチドの原液は次のように調製した。5 mg アミロイドベータ 25-35 ペプチド(Peptide institute, Inc.)を1 mMの最終濃度で脱イオンH₂Oに溶解した。ストック溶液

を等量の 2×PBS で希釈し、37°Cで 1 時間ブレインキュベートした。その後、アミロイド溶液を PBS 溶液で、目的の濃度に希釈した。

s-または(6,4)-SWNTs/apo 分散液をアミロイドベータ 25-35 ペプチド凝集体 (A β 25-35/agg) と混合して、最終的な OD₈₈₀ を 0.2 (それぞれ 4.9 または 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) とした。その混合物を、600 mW の出力強度で 880 nm (Chameleon-RF, COHERENT) で 10 分間照射した。A β 25-35/agg の光分解の程度は、A β 25-35/agg の β -sheet 構造の蛍光プローブである 20 μM のチオフラビン T で評価した [15]。100mM NaN₃ (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) の存在下で ROS クエンチング実験を行った。

3. Results and discussion

3.1. カイラリティ濃縮SWNTの特性評価

最初の実験では、s-SWNTs混合物の(6,4)-、(6,5)-、および(12,1)-SWNTのNIR吸収スペクトルを測定した (**Figure S1**)。各カイラリティ成分の吸収スペクトルは、単一カイラリティ成分の濃縮がある程度成功したことを示している。NIRスペクトル (800-1350 nm) のピークフィッティングに基づいて、(6,4)-、(6,5)-、および(12,1)-SWNTの純度は73%、73%、それぞれ23%と計算された。(6,4)-、(6,5)-、および(12,1)-SWNTのNIR吸収極大は、それぞれ880 nm (S11)、983 nm (S11)、および800 nm (S22)であった。**Figure S2**は、各カイラリティ成分の原子間力顕微鏡 (AFM) および高解像度透過型電子顕微鏡 (HR-TEM) 分析を示している。

3.2. NIR照明下でのROS生成

次に、3つのカイラリティ濃縮したs-SWNTとICG [16]のROS生成効率を3種類の蛍光プローブで評価した。 $^1\text{O}_2$ は、光増感剤の励起三重項状態からのエネルギー移動 (Type IIメカニズム) によって生成する[17]が、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および $\cdot\text{OH}$ は、それらからの電子移動 (Type Iメカニズム) によって生成する[18]。**Figure 1**に示すように、(6,4)-SWNTは880 nmのNIR照明下で $^1\text{O}_2$ を光生成したが、他のカイラリティ成分はまったく生成しなかった。(6,4)-SWNTの $^1\text{O}_2$ 生成効率はICGよりも高かった (**Figure 1a**)。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 光生成は、3種類のs-SWNT間で同等であった (**Figure 1b**)。高度に濃縮された(6,4)-SWNTへのNIR照明は、大量の $\cdot\text{OH}$ を生成した (**Figure 1c**)。**Figure 1d**および**1e**は、HiPCO[®] (6,4)-SWNT (ロット番号HP27-054およびR1-832) とCoMoCAT[®] (6,4)-SWNT (ロット番号MKBG5771V) 間の $^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{OH}$ 生成効率の比較を示している。効率はロット番号と合成方法に応じてわずかに変動したが、すべてのタイプの(6,4)-SWNTには $^1\text{O}_2$ と $\cdot\text{OH}$ を光生成する活性があった。また、(6,4)-SWNTのPDEがそれらの金属不純物の量と関係していないこと (**Figure S3**)、およびNIRフォトルミネッセンスの不純物がないことも確認した (**Figure S4**)。これらの結果に基づいて、これらの光線力学的効果は(6,4)-SWNTの固有の光学機能によるものであると結論付けた。

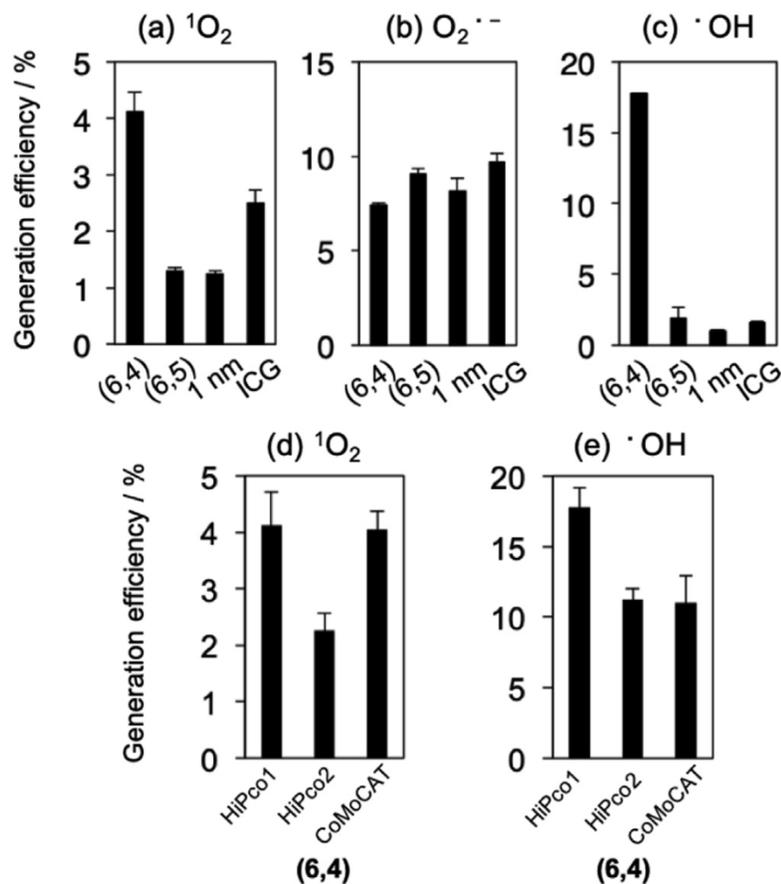


Figure 1. 水溶液中の近赤外(NIR)吸収極大で照明された単一成分濃縮単層カーボンナノチューブ (SWNT)の光線力学効果。

(a) 一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、(b) スーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、および (c) ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成を蛍光検出試薬で評価した。インドシアニンググリーン (ICG) も比較のために分析した。(d) $^1\text{O}_2$ および (e) $\cdot\text{OH}$ の生成に関して、3種類異なるロットのSWNTから精製した(6,4)-SWNTの比較も行った。吸収極大での各サンプルの吸光度は、(a)で0.45、(b、c)で0.2に調整した。データは平均 \pm 標準誤差 (n=3) として表示した。(a-c)の蛍光強度測定は、SpectraMax M2&M2e マイクロプレートリーダーで行い、(d)と(e)にはFluoromax-4 分光蛍光光度計を使用した。HiPco1および2 SWNTのバッチ番号はそれぞれHP27-054およびR1-832 (Nano Integris) であり、CoMoCAT SWNTのロット番号はMKBG5771V (Sigma-Aldrich) であった。先行研究[9]でも光線力学効果の同様のバッチ間変動が観察された。

3.3. カイラリティ濃縮したSWNTのphotodynamics

一般にType IまたはType IIのプロセスに関係なく、PDE生成の最も明確な決定因子は、励起状態の生成率とその寿命を定義するphotodynamicsである。最近の報告では、ポンププローブ過渡吸収分光法を使用して、(6,5)-SWNTの三重項励起状態 (T1) の存在が示されている[19]。(6,5)-SWNTsのT1→Tnシグナルは約1150 nmで観察され、その寿命と生成効率はそれぞれおよそ15 μ sおよび3-5%と計算された。ここでは、(6,4)-および(6,5)-SWNTのphotodynamicsを比較するために、ナノ秒過渡吸収スペクトル測定も実施した。**Figure S5a**に示すように、T1→Tn信号から得られた正の信号は、(6,4)-SWNTサンプルでは観察されなかった。これは、不純物、すなわち(6,5)-および(7,5)-SWNTによる(6,4)-SWNTの励起状態のクエンチングが原因であると考えられる。したがって、(6,4)-SWNTsを主要な不純物として含む(6,5)-SWNTsサンプルを使用することにした (**Figure S1**)。**Figure S5b**に示すように、2つの正の信号が約1150 nmと1050 nmで検出され、前者は以前の報告[19]に基づいて(6,5)-SWNTのT1→Tn信号に分類した。後者のシグナルは(6,5)-SWNTサンプルで検出されることがないため、(6,4)-SWNT不純物のT1→Tnシグナルだと予想された。これらの帰属に基づいて、(6,4)-SWNTおよび(6,5)-SWNTのT1寿命は、各減衰曲線からそれぞれ11.7および12.8 μ sと計算された (**Figure S5c, d**)。これらの値はParkらによって報告された15 μ sに相当する。これら2種類のs-SWNTの吸光係数が類似していると仮定すると、(6,4)-SWNTのT1生成効率は6-10%と計算され、(6,5)-SWNTの2倍であった (3-5%)。SWNTの直径が大きくなるとスピン軌道 (SO) 相互作用が減少し、S1-T1遷移のSO結合が減少することを考えると、S1-T1遷移時間は大幅に増加する[20]。分子動力学研究により、(6,4)-SWNTのS1-T1遷移は数十から数百psで発生することが明らかになったが、(6,4)-SWNTのS1-S0遷移時間は150 psであり、S1-T1遷移がS1-S0遷移と競合する[20]。これらは、(6,4)-SWNTが高いT1生成効率を示すことと一致している。**Table S1**に、いくつかの光増感剤のモル吸光係数 (ϵ)、項間交差量子収率 (Φ_{ISC})、および 1O_2 世代量子収率 (Φ_{Δ})をまとめた。ICGとローズベンガルは、(6,5)-SWNTと比較して、 ϵ と Φ_{ISC} の値が高くなっている。 Φ_{Δ} が三重項量子収率[21]に比例することを考えると、 Φ_{ISC} が低い(6,5)-SWNTは、これらの色素よりも Φ_{Δ} が小さいと予想される。対照的に、(6,4)-SWNTのより高い Φ_{ISC} はそれらのより高いPDEと矛盾しない。

3.4. $O_2^{\cdot-}$ および $\cdot OH$ 生成のメカニズム

PDE依存の $O_2^{\cdot-}$ および $\cdot OH$ 生成は、Type Iメカニズムに基づいている。照射された光増感剤から O_2 への電子移動により $O_2^{\cdot-}$ が生成し、次に H_2O_2 に変換され、次に $\cdot OH$ に変換される[22]。SWNTの場合、 $\cdot OH$ 光生成は、SWNT、 O_2 、および H_2O の間の光化学反応の次のサイクルを介して発生すると報告されている[23]。最初に、光励起されたSWNTからの O_2 による電子吸引が起こり、 $O_2^{\cdot-}$ が生成される。SWNTによるその後の $O_2^{\cdot-}$ の還元により H_2O_2 と $\cdot OH$ が生成され、その間に酸化されたSWNTが H_2O/OH^- によって還元される。(6,4)-、(6,5)-、および(12,1)-SWNTの酸化還元電位値は、 $-0.39/0.81$ V、 $-0.23/0.84$ V、 $-0.21/0.69$ V (vs. SCE)、それぞれ[24, 25]、 $O_2/O_2^{\cdot-}$ レドックスペアの半分の電位は -0.131 V (vs. SCE) である。これは、3つのSWNTのすべてが電気化学的に $O_2^{\cdot-}$ を生成できることを意味する。これは、同等の $O_2^{\cdot-}$ 生成を達成する3つのSWNTの結果によって実験的に実証された (**Figure 1b**)。対照的に、(6,4)-SWNTのみが検出可能なレベルの $\cdot OH$ を生成したため (**Figure 1c**)、次の $\cdot OH$ 生成の効率はレドックス電位によって説明できない。

3.5. カイラリティ濃縮SWNTの光安定性

光増感剤はROSの最も近いターゲットであるため、一般に光退色は避けられない。特に、 $\cdot OH$ はこの研究で検出された3つのROSの中で最も反応性が高く、その酸化反応はほぼ拡散律速である。したがって、PDE生成の別の決定因子は、光増感剤の光安定性である。**Figure 2a**は、(6,4)-SWNTのNIRピークで規格化された、NIR照明の前後のs-SWNT混合物の吸収スペクトルを示している。主に(6,5)-および(12,1)-SWNTにそれぞれ由来する ~ 980 および ~ 800 nmでのNIR吸光度は、NIR照射中に減少した。これは、これらのカイラリティ成分のうち、直径が大きいs-SWNTが $\cdot OH$ とより迅速に反応するという以前の報告と一致している[26]。(6,4)-SWNTは、本研究で検討した3つのSWNTの中で最小の直径を有するため、 $\cdot OH$ の高い光生成活性は、高い光安定性によっても説明される。

(6,4)-SWNTの光安定性は、ICGを比較対象としてさらに詳細に調べた (**Figure 2b, c**)。我々のNIRレーザー照射条件下では、(6,4)-SWNTのNIRピーク強度は完全に保持されたが、ICG吸収は完全に消失した。この結果によると、(6,4)-SWNTは、持続的かつ線形的に時間依存の 1O_2 の光生

成を示したのに対し、ICGについては横ばいであった（**Figure 2d**）。レーザー光照射された(6,4)-SWNTに対する酸化的損傷は、ラマン分光法によってさらに評価した（**Figure S6**）[27]。NIR照射前後の(6,4)-SWNTのGバンド（グラファイト構造に起因）とDバンド（欠陥に起因）の強度比（G/D比）は、わずかな変化のみを示しました。これらの結果は、(6,4)-SWNTが $\cdot\text{OH}$ にほとんど耐性があることを明確に示している。一方、 $\cdot\text{OH}$ による酸化的損傷への耐性のメカニズムは現在のところ不明である。

上記のROS光生成特性は、持続可能性と光退色が少ないという点で(6,4)-SWNTに固有である。UV/Visの照射時に、 TiO_2 ナノ粒子は $^1\text{O}_2$ 、 O_2^- および $\cdot\text{OH}$ [28]を生成できたが、わずかに光退色する[29]ことが報告されている。この光学特性は、廃水の消毒[30]と悪性細胞の切除[31]に利用されている。他の研究は、グラフェン量子ドットが可視光照明下でほとんど光退色せずに $^1\text{O}_2$ 、 O_2^- および $\cdot\text{OH}$ を生成することを報告した[32, 33]。これらの研究では、高い光安定性のメカニズムは明確に解明されていないが、ROSに対する耐性が、ROS生成効率に加えて、PDEの別の決定因子であることは明らかである。したがって、私たちの結果は、組織深部まで透過するNIR光を用いた場合に起こる持続的なPDEを最初に観察した例であり、(6,4)-SWNTはこれら2つの材料よりも実用的な光線力学剤であると予想される。

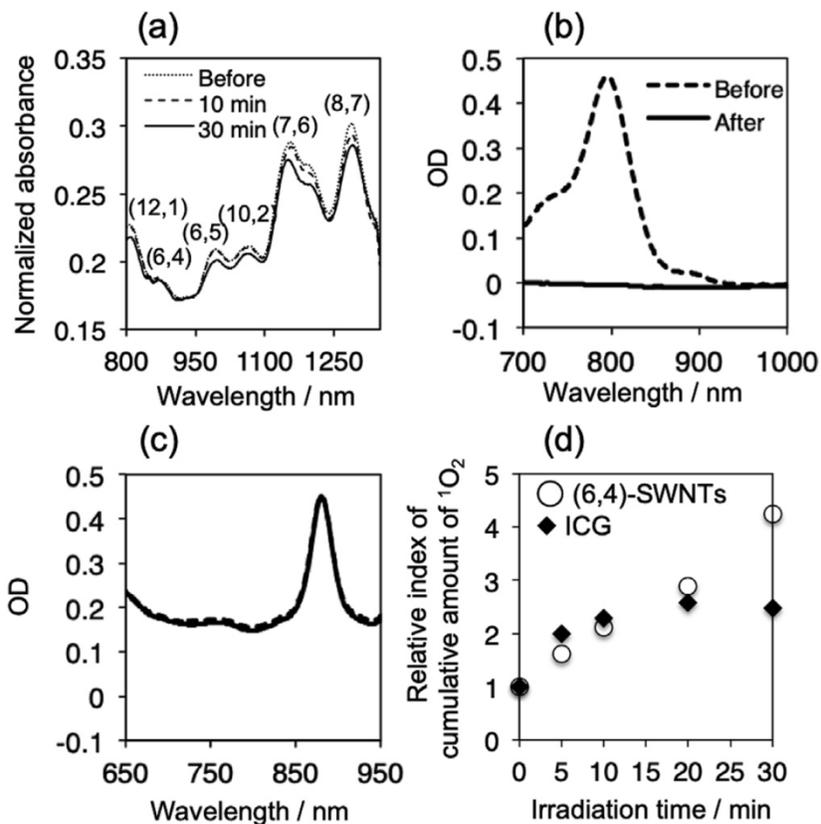


Figure 2. (6,4)-SWNT の光安定性

(a) 0分 (点線)、10分 (破線)、および30分 (実線) の NIR 照射 (880 nm/600 mW) 後の s-SWNT の吸収スペクトル。スペクトルは(6,4)-SWNT の NIR 吸収極大である 880 nm の吸光度で規格化した。s-SWNT に含まれるいくつかのカイラル s-SWNT 成分をパネル内に示した。(b) ICG と (c) (6,4)-SWNT の NIR 吸収スペクトル。それぞれ 800 および 880 nm (440 mW)、30 分間のレーザー照射前 (破線) および照射後 (実線) のスペクトルを示した。(d) レーザー照射時間依存的な(6,4)-SWNT (白い丸) および ICG (黒色のひし形) の $^1\text{O}_2$ 光生成活性。レーザー照射波長/強度は 880 nm/400 mW または 800 nm/440 mW とした。

3.6. (6,4)-SWNTの表面機能化

(6,4)-SWNTの持続的なPDEを生物医学応用するためには、乏しい水分散の問題を解決する必要があるため、表面化学の制御が不可欠である。本研究では、一本鎖DNA [34]に関する以前の報告を受けて、SWNTを包み込んで水分散させ、(6,4)-SWNTを安定化するために構造的柔軟性の高い天然タンパク質を利用した。ApolipoproteinA-I (apoA-I) は高密度リポタンパク質の脂質結合タンパク質であり、両親媒性 α ヘリックスが10個連なった構造をとると考えられている。したがって、apoA-IはDNAのようなSWNTに結合すると予想した。ここでは、N末端43アミノ酸残基を欠損させた変異体を使用した。(6,4)-SWNTをタンパク質とともに分散させる方法を**Figure 3a**に示す。タンパク質の処理の前後で、(6,4)-SWNTのNIR吸収スペクトルはほぼ同じであり、PBSでの(6,4)-SWNTのコロイド安定化がSWNTバンドル化を引き起こすことなく成功したことを示している。PBS中での37°C, 24時間のインキュベーションにより、スペクトルは大きく変化しなかった (**Figure 3c**)。HeLa細胞に対する有意な細胞毒性が確認されなかったため、デオキシコール酸ナトリウムの除去は成功したと判断した (下記参照)。さらに、TEM分析では、サンプル内に単分散したカーボンナノチューブが確認された (**Figure S7**)。全長のapoA-Iと他の欠損変異体も、効率の差はあったが、s-SWNTを安定化させることができた (**Figure S8**)。また、apoA-Iの2つの強力な脂質結合ドメイン (44-65, 220-241) [35]は安定化に必須ではないことも確認した。最初の欠損変異体で安定化された(6,4)-SWNTは(6,4)-SWNT/apoと表記し、続く研究に使用した。

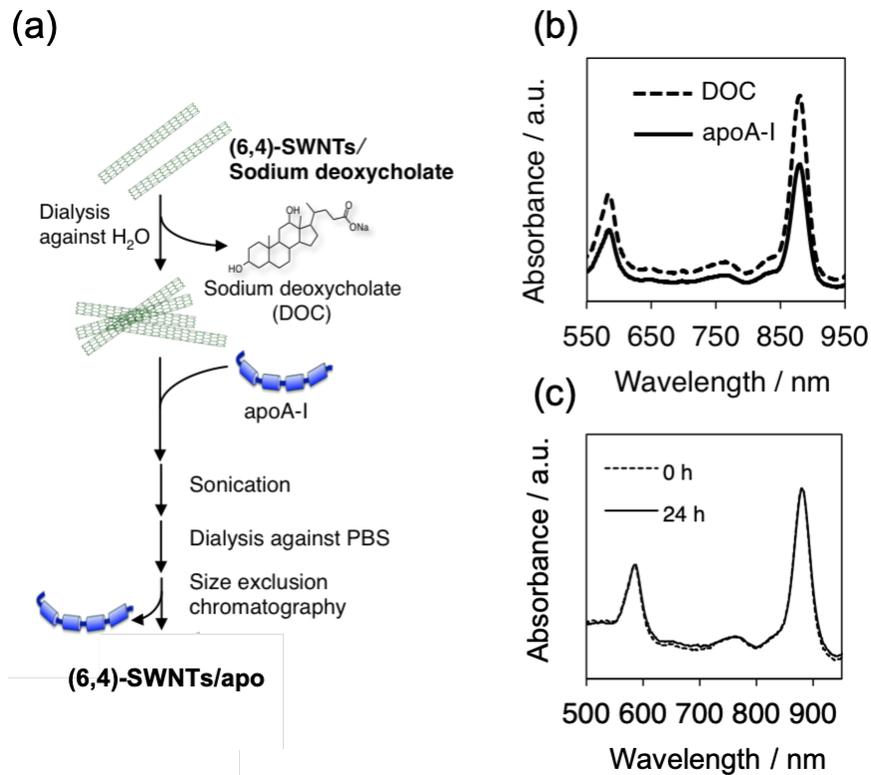


Figure 3. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) での(6,4)-SWNT のコロイド安定化

(a) デオキシコール酸ナトリウム (DOC) から両親媒性タンパク質 (apoA-I) への分散剤置換による、PBS での(6,4)-SWNT の分散手順の概略図。H₂O に対する透析後、分散色が薄くなり、スキームに示したように(6,4)-SWNT の凝集体形成が示唆された (データ非掲載)。(b) 1 wt% DOC 水溶液に分散された(6,4)-SWNT の NIR 吸収スペクトル (破線) は、apoA-I 分散した(6,4)-SWNT (実線) のスペクトルに比べてほとんど変化がなく、分散剤置換による影響が最小限であった。(c) PBS 溶液中の(6,4)-SWNTs/apo の吸収スペクトルは、調製直後 (点線) と 24 時間後 (実線) でほとんど変化がなかった。

3.7. がんの光線力学療法

ROSは、がん細胞のアブレーションに広く使用されている[21, 36]。ここでは、(6,4)-SWNT/apoのHeLa細胞に対する光毒性を、同様にapoA-I欠損変異体 (s-SWNTs/apo) で処理したs-SWNTsと比較した (それぞれの濃度は1.8および11 $\mu\text{g mL}^{-1}$)。 (6,4)-SWNT/apoの場合、細胞生存率は約40%減少し、s-SWNTs/apoの場合よりも高くなった (**Figure 4a**)。癌細胞をアブレーションするためのよく知られている光増感剤であるICGは、我々の実験条件下では光毒性を示すことができなかった。加えて $^1\text{O}_2$ クエンチャーである一重項酸素センサーグリーン (SOSG) は、(6,4)-SWNTの活性をある程度阻害した。さらに、(6,4)-SWNTの光線温熱効果は、細胞培養培地の温度上昇で確認したが、 $\Delta T = 15 \pm 1^\circ\text{C}$ とs-SWNTのそれ ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) よりもわずかに低かった。これらの結果は、(6,4)-SWNT/apoの光毒性が $^1\text{O}_2$ に由来することを示唆し、カイラリティ成分濃縮が投与量の削減の観点から非常に効果的であることを明確に示している。

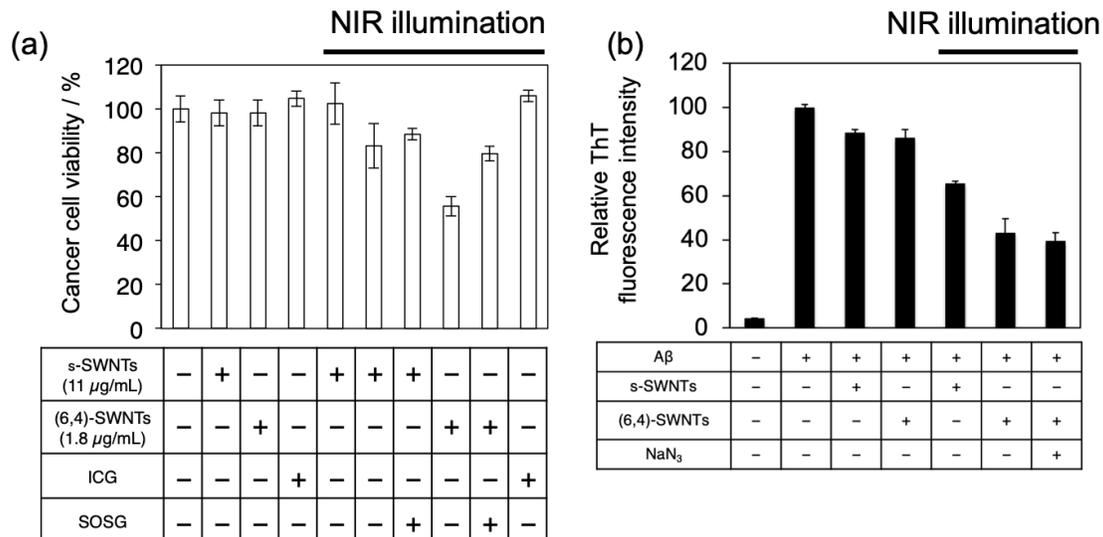


Figure 4. (6,4)-SWNTs/apo の光治療効果

(a) (6,4)-SWNTs/apo または s-SWNTs/apo ($\text{OD}_{880} = 0.45$) のいずれかで HeLa 細胞を 3 時間処理し、880 nm (400 mW) のレーザー光で 15 分間照射した場合の光毒性を示した。一重項酸素のクエンチャーとして SOSGR を同時処理した。各複合体は、遊離 apoA-I を除去せずに使用した。(b) (6,4)-SWNTs/apo への NIR 照射下での A β 25-35/agg 分解を実証した。A β 25-35/agg の量は、チオフラビン T (ThT) 蛍光強度によって推定した。事前に形成された凝集体を(6,4)-SWNTs/apo と混合し、880 nm (600 mW) のレーザー光で 10 分間照射した。一重項酸素のクエンチャーとして NaN₃ を使用した。各複合体は、遊離 apoA-I を除去せずに使用した。データは平均 \pm 標準誤差 (n = 3) として表示した。

3.8. (6,4)-SWNT/apoとHeLa細胞の相互作用

Alexa Fluor 546 (Alexa546) で蛍光標識された(6,4)-SWNT/apoを用いて、HeLa細胞における共焦点レーザー走査型顕微鏡法により細胞内局在を分析した (**Figure S9**)。細胞内オルガネラ、ミトコンドリアおよび初期エンドソームは、それぞれMitoTracker GreenおよびAlexa488-Transferrinで可視化した。Alexa546の蛍光信号と前者の蛍光信号の共局在比は、それぞれ約79%、約33%であると計算された。ミトコンドリア移行は、apoA-I単独では観察されなかった (**Figure S9**)。したがって、(6,4)-SWNTはapoA-Iと複合化されて初めてミトコンドリア移行すると結論付けることができる。ミトコンドリアは光線力学療法におけるROSの主な標的と見なされている。このミトコンドリア蓄積のメカニズムは現時点では不明であるが、(6,4)-SWNT/apoによる $^1\text{O}_2$ 依存性の癌細胞のアブレーションに有利であろう。

3.9. (6,4)-SWNTへのNIR照明条件下におけるA β ペプチド凝集体の光分解

ROSを使用したタンパク質の不活性化[23]と分解[37, 38]は、長年にわたって関心を集めてきた。前者は $\cdot\text{OH}$ を生成するSWNTのPDEで達成可能であったが、 $\cdot\text{OH}$ とそれに続く $\text{O}_2^{\cdot-}$ による協調的な酸化が後者を引き起こすことが知られている。SWNTには神経毒性のあるアミロイドベータ (A β) ペプチドの凝集体形成を阻害する効果があったため[39-41]、レーザー光照射された(6,4)-SWNTがA β ペプチド25-35凝集体 (A β 25-35/agg)を光分解できるか調べた。A β 25-35/aggと(6,4)-SWNT/apoの混合物に880 nm (600 mW) で10分間レーザー光を照射し、チオフラビンT (ThT) で処理して、蛍光測定で凝集体の量を推定した (ThT試験) [42]。(6,4)-SWNTを添加した後、レーザー光照射すると、ThT蛍光強度はコントロールサンプルのThT蛍光強度に対して~57%となった。それに対して、s-SWNTの場合は~35%であった (**Figure 4b**)。(6,4)-SWNT/apoまたはs-SWNTs/apoの添加がThT蛍光強度に影響を与えたが、その程度はおよそ~12%であった。そのため、カーボンナノチューブ表面へのThTの非特異的結合はこのアッセイシステムでは無視できることを示している。それらの重量濃度に6倍の差があることを考えると (s-SWNTs > (6,4)-SWNT)、A β 25-35/aggの光分解に対して(6,4)-SWNTがはるかに高い活性を有することは明白である。

3.10. A β 25–35/agg光分解の作用機序

この光分解のメカニズムを詳しく調べた。A β 25–35/aggの存在下でのThT蛍光強度は、熱処理の影響を受ける可能性がある。実際、A β 25–35/agg分散液を50°Cで熱処理することにより、強度の低下が顕著になった (**Figure S10a**)。我々のThT試験では、レーザー出力強度は600 mWで、s-SWNTs/apoおよび(6,4)-SWNT/apoの温度上昇はそれぞれ $26.6 \pm 0.6^\circ\text{C}$ および $23.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$ であった (**Figure S10b**)。さらに、 $^1\text{O}_2$ クエンチャー (NaN $_3$) の追加はThT蛍光強度にほとんど影響しなかったが、既知の $\text{O}_2^{\cdot-}$ および $\cdot\text{OH}$ クエンチャー (スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) およびテレフタル酸二ナトリウム) は、ThT蛍光に干渉するため、ThTアッセイシステムに適用できなかった。これらの結果は、レーザー光照射された(6,4)-SWNTによるA β 25–35/agg分解の主なメカニズムが、光照射により生じた熱ではなく、 $^1\text{O}_2$ 以外のROSの光力学的生成、つまり $\text{O}_2^{\cdot-}$ および $\cdot\text{OH}$ であることを示唆している。

先行研究でA β ペプチド凝集体の光分解が調査され、主な有効成分は $^1\text{O}_2$ であると推定されている [43, 44]。対照的に、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および $\cdot\text{OH}$ は協調してタンパク質を分解することが報告されており[37]、最近ではフラレーン誘導体のUV照射によるA β ペプチド凝集体の分解の原因となる活性種であることが報告されている[45]。これは、(6,4)-SWNTへのNIR照射条件下でA β ペプチド凝集体の光分解が起こるメカニズムが、光照射により生成する $\text{O}_2^{\cdot-}$ および $\cdot\text{OH}$ によるものであることを裏付ける。

持続的なPDEは、A β ペプチド凝集体を光分解するための有用な方法である。分子光増感剤は、可視光照射下での光生成ROSによる酸化により、A β ペプチドの凝集を強力に抑制することが報告されている[43, 46, 47]。別の報告では、ポルフィリン誘導体 (TPPS) は、モル吸光係数が低く、ROS光生成効率が低いにもかかわらず、そのZn $^{2+}$ 配位体 (ZnTPPS) に匹敵するA β ペプチド凝集阻害を示した[48]。可視光照射はTPPSをほとんどbleachingしなかったが、ZnTPPSは急速にbleachingした。これらの結果は、A β ペプチド凝集体の光分解の場合、光耐性が、低いPDEを補うことを示唆している。(6,4)-SWNTは、NIR光が組織深部まで浸透できるという事実と合わせて考えると、並外れた高い光安定性により、アルツハイマー病の治療のための光線力学療法剤として期待される。

Supporting information

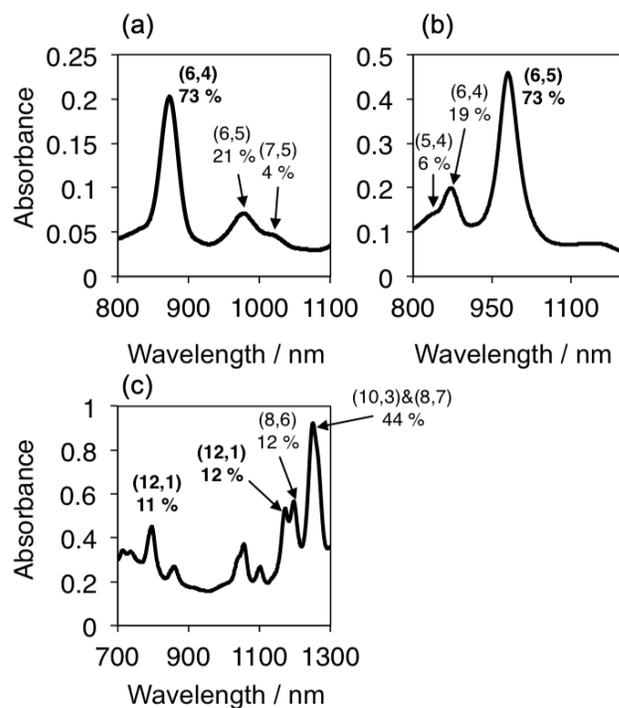


Figure S1. 温度制御ゲルクロマトグラフィーを使用して濃縮された SWNT の純度

(6,4)-SWNT (a)、(6,5)-SWNT (b)、および(12,1)-SWNT (c) の吸収スペクトル。各サンプルには、目的のカイラリティ成分の他に、さまざまなカイラル s-SWNT 成分が含まれており、各成分の相対含有率をパネル内に示した。特に、(12,1)-SWNT サンプルには、他のさまざまなカイラル s-SWNT 成分が含まれている。

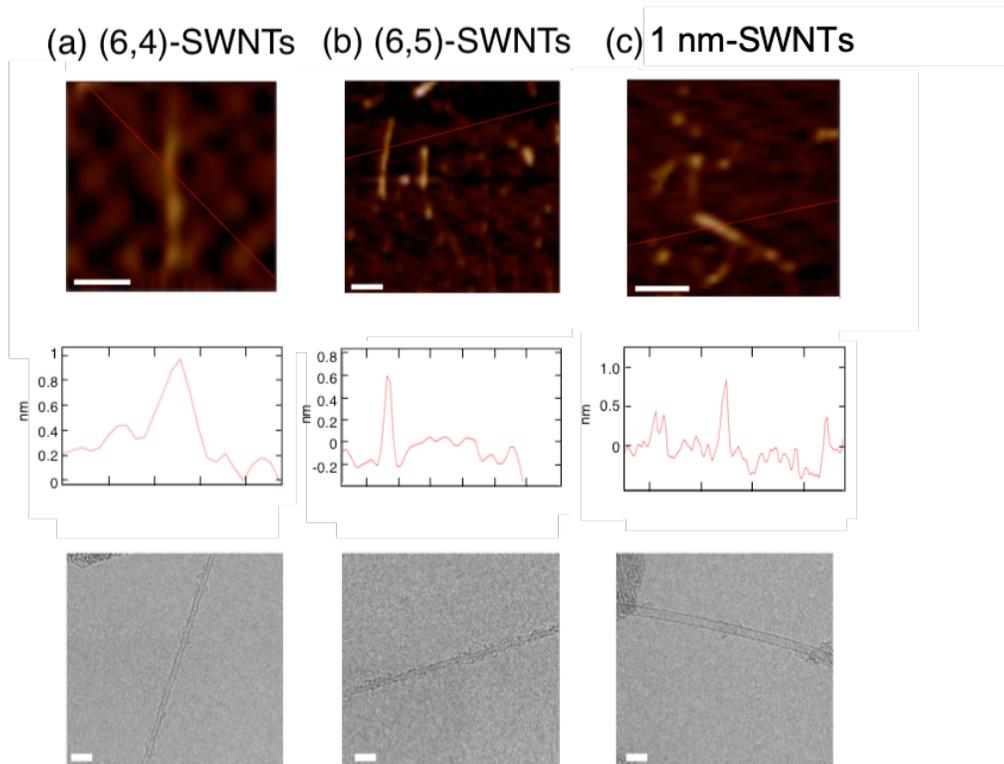


Figure S2. 単一成分濃縮 s-SWNT の原子間力顕微鏡および高解像度透過型電子顕微鏡分析

(a) (6,4)-SWNT、(b) (6,5)-SWNT、および (c) 1 nm-SWNT の代表的な原子間力顕微鏡 (AFM) 画像 (上段)、AFM 画像における断面高さデータ (中段)、および代表的な高解像度透過型電子顕微鏡 (HR-TEM) 画像 (下段) を示した。(6,4)-SWNT、(6,5)-SWNT、および 1 nm-SWNT の AFM および HR-TEM 画像から測定された直径は、以前に報告された直径値と一致している (それぞれ 0.692、0.757、および 0.995 nm)[S1]。スケールバーは 200 nm (AFM) および 2.5 nm (HR-TEM) を示す。

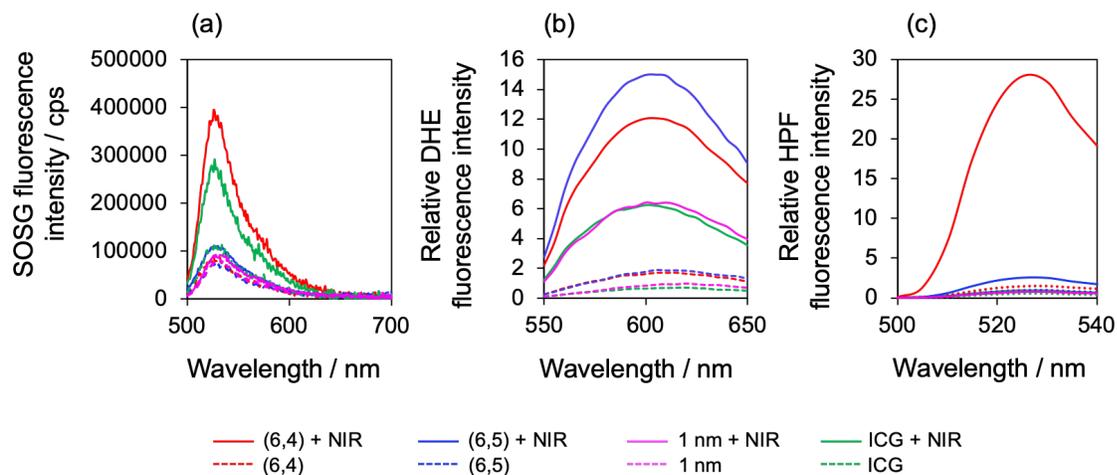


Figure S3.3 種類の s-SWNT 成分および ICG の ROS 生成効率

$^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および $\cdot\text{OH}$ の検出のために NIR 照射前 (破線) 後 (実線) の SOSG (a)、DHE (b)、および HPF (c) の蛍光スペクトルを測定した。(6,4)-、(6,5)-、1 nm-SWNT および ICG を、880、980、800、および 800 nm で 30 分間 (a) または 10 分間 (b、c) NIR 照射した。

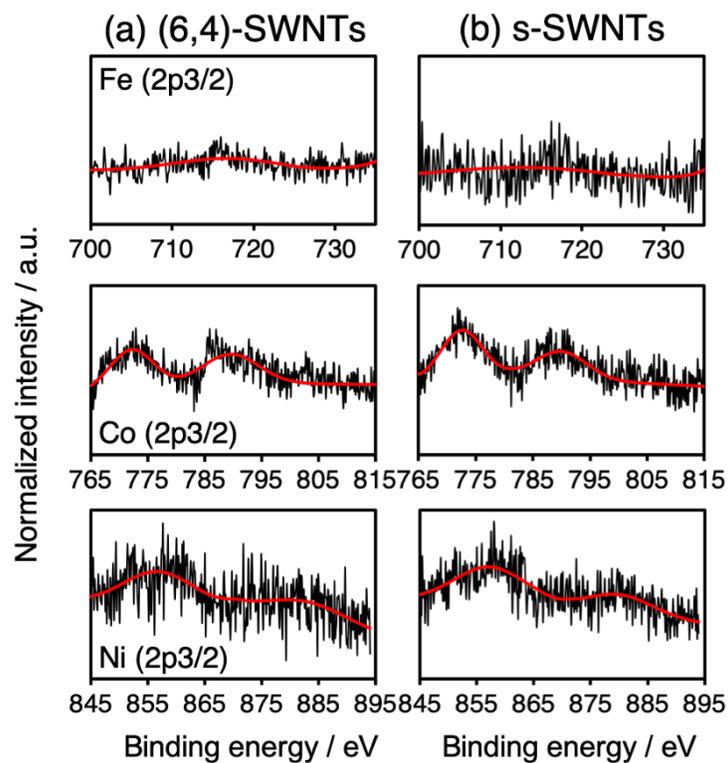


Figure S4. (6,4)-SWNT および s-SWNT の X 線光電子分光測定

(a) (6,4)-SWNT および (b) s-SWNT (HiPCO ロット番号: HP27-054) の残留金属不純物として、Fe (上)、Co (中央)、および Ni (下) を測定した。すべてのスペクトルは、SWNT の C 2s の強度によって規格化して示した。

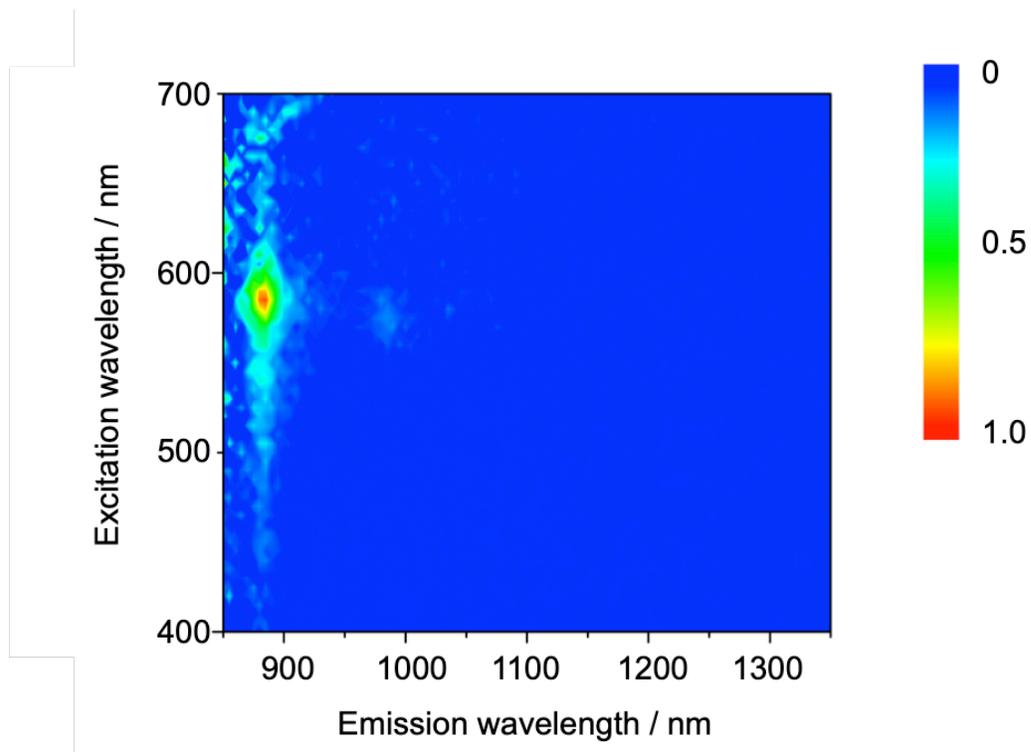
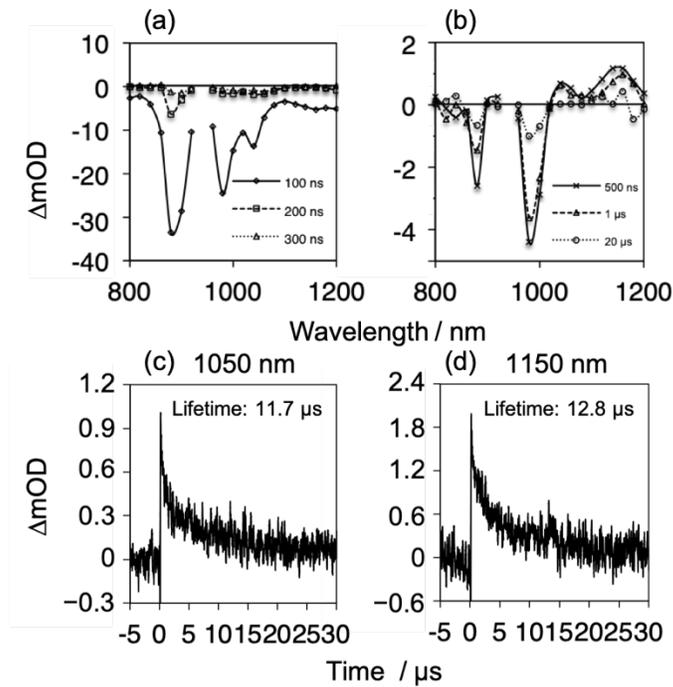


Figure S5. (6,4)-SWNTs からの近赤外フォトルミネセンス

(6,4)-SWNT の励起波長と発光波長は、それぞれ~580 nm と~875 nm であった。励起発光マッピングから、(6,4)-SWNT 以外のカイラル s-SWNT 成分はほとんど検出されなかった。



$$\Phi_{(6,4)ISC} = \Phi_{(6,5)ISC} \times \frac{\text{Purity of (6,5)}}{\text{Purity of (6,4)}} \times \frac{\Delta OD_{\max} \text{ of (6,4)}}{\Delta OD_{\max} \text{ of (6,5)}}$$

Figure S6. 過渡吸収分析

570 nm (13.4 mJ) での励起時の (a) (6,4)-SWNT および (b) (6,5)-SWNT の過渡吸収 (TA) スペクトル。(b) では、~1050 nm と ~1150 nm に 2 つの正のピークが観察され、後者は (6,5) -SWNT の三重項励起 (T1) 状態に割り当てられていると報告されている[S2]。(a) では正のピークが検出されないため、~1050 nm での TA は (6,4) -SWNT の推定 T1 状態に割り当てられ (本文を参照)、その崩壊速度は (c) で分析される。(6,5) -SWNTs の T1 状態について、(d) で ~1150 nm での TA 減衰速度も分析される。実験条件: $\lambda_{ex} = 570$ nm、 $\lambda_{probe} = 1050$ (左)、1150 nm (右)。パルスエネルギー = 13.4 mJ。プロットの下式は、(6,5) -SWNTs が豊富なサンプルにおける (6,4) -SWNT の系間交差の量子収量を示している。

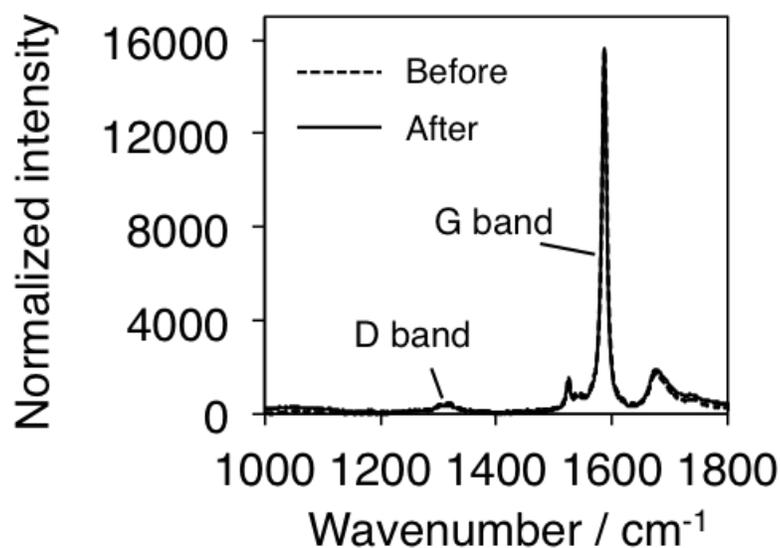


Figure S7. (6,4)-SWNT および ICG の光安定性

NIR 照射前（破線）と後（実線）の(6,4)-SWNT のラマンスペクトルを測定した。Gバンド（グラファイトに起因）とDバンド（欠陥に由来）の比率（G/D）は、 35 ± 5 （前）および 38 ± 3 （後）と計算された。測定は3回行った。

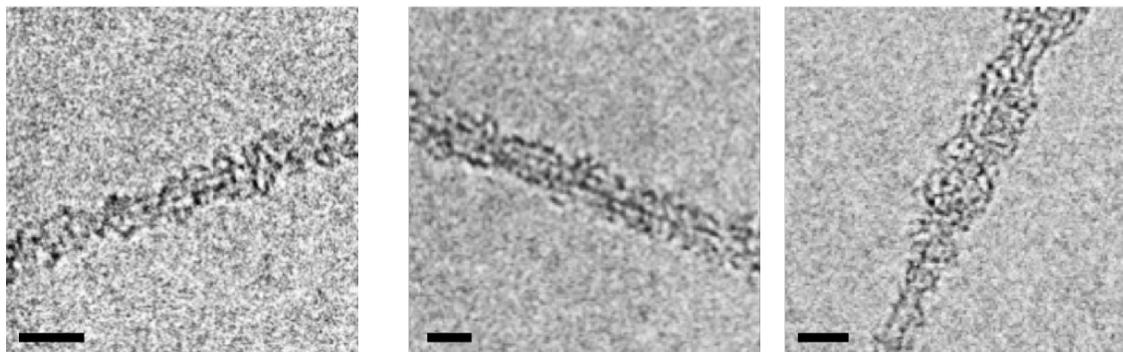


Figure S8. apoA-I によって安定化された(6,4)-SWNT の構造
(6,4)-SWNT の apoA-I によって安定化された HR-TEM 画像 ((6,4)-SWNTs/apo)。スケールバーは 2 nm を示す。

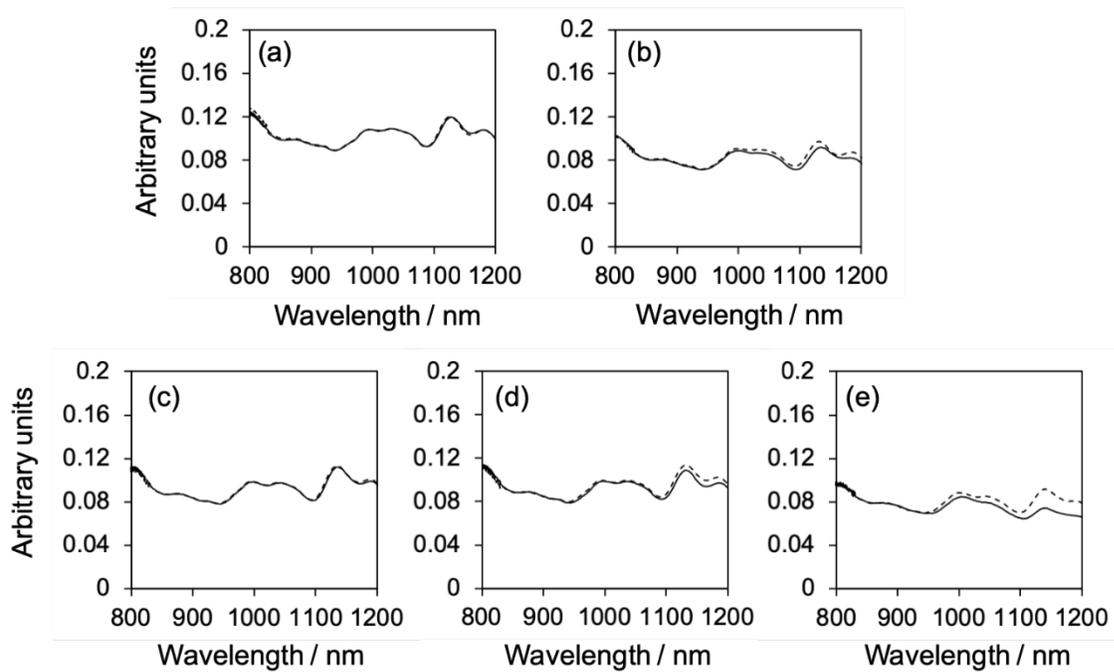


Figure S9. PBS 溶液中で様々な apoA-I 変異体で被覆された s-SWNT のコロイド安定性
 s-SWNT は、(a) 全長 apoA-I または (b) 44-243、(c) 44-142、(d) 60-184、および (e) 187-243 変異体で被覆した。吸収スペクトルは、37°C で 24 時間のインキュベーション前 (破線) およびインキュベーション後 (実線) に測定した。

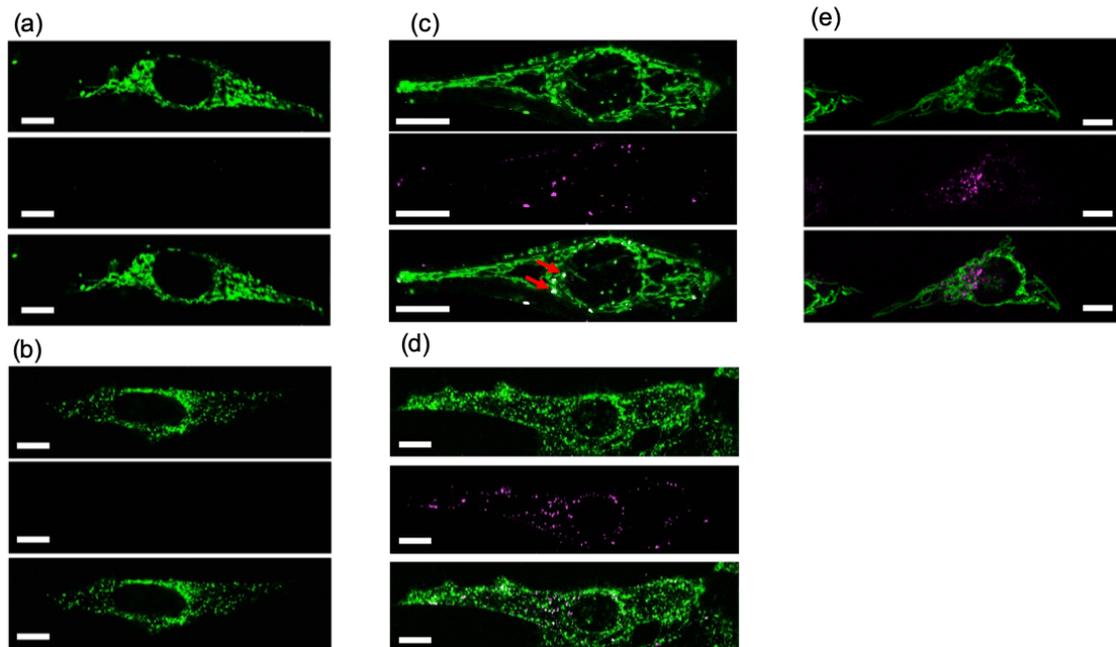


Figure S10. HeLa 細胞によって切り捨てられた apoA-I で処理された(6,4)-SWNT の内在化

(a, b) 培地のみ、(c, d) (6,4)-SWNTs と apoA-I 変異体の複合体 ((6,4)-SWNTs/apo)、または (e) apoA-I のみで処理した HeLa 細胞の共焦点画像。ここで使用した apoA-I 変異体は、Alexa546 で蛍光標識されており、その蛍光シグナルは、各パネルの中央と下部の画像にマゼンタで示した。ミトコンドリア (a, c, e) と初期エンドソーム (b, d) は、それぞれ MitoTracker Green と Transferrin-Alexa488 で染色した。上部と下部の画像で、両方の蛍光シグナルを緑色で示した。Alexa546 と Mito Tracker Green の蛍光シグナルの共局在は、(c) に赤の矢印で示した。スケールバーは 10 μm を示す。

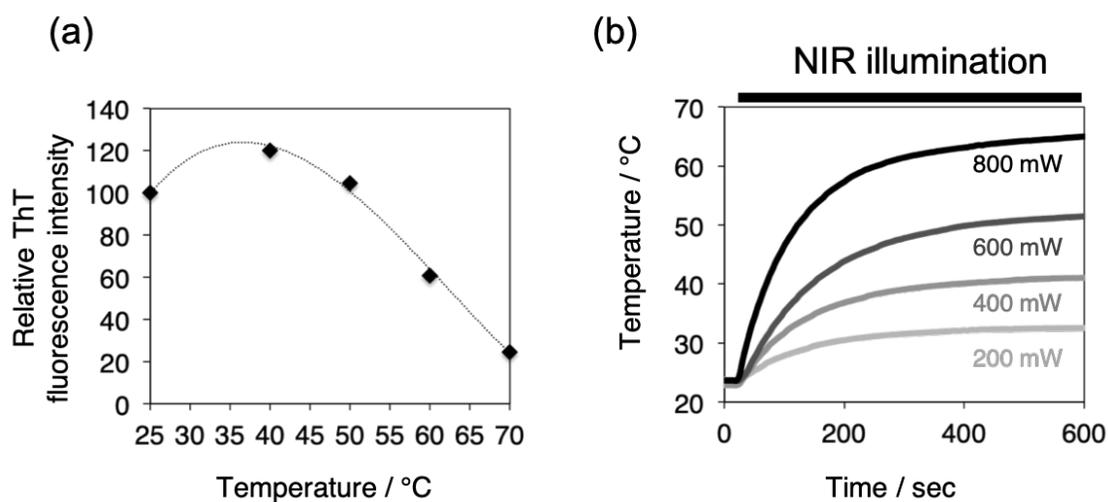


Figure S11. 加熱による A β 25-35 ペプチド凝集体の崩壊

(a) さまざまな温度における A β 25-35 ペプチド凝集体 (A β 25-35/agg) (100 μ L、50 μ M) の相対チオフラビン T (ThT) 蛍光強度。A β 25-35/agg 溶液を、記載された温度で 10 分間予熱し、溶液を室温まで冷却した後、蛍光強度を測定した。(b) 示されているレーザー光出力強度で 880 nm のレーザー光を照射した場合の、s-SWNT/apo (100 μ L、OD₈₈₀ = 0.2、約 5 μ g mL⁻¹) の光線温熱効果。

Table S1. 水溶液中のいくつかの光増感剤のモル吸光係数 (ϵ)、項間交差量子収率 (Φ_{ISC})、および ¹O₂ 生成量子収率 (Φ_{Δ})

	$\epsilon / M^{-1} cm^{-1}$	Φ_{ISC}	Φ_{Δ}
ICG	$(3.43-5.73) \times 10^5$ [S3]	0.14 ± 0.03 [S4]	0.002 [S5]
Rose bengal	9.5×10^4 [S6]	1.05 ± 0.06 [S7]	0.75 [S8]
(6,5)-SWNTs	4400 ± 1000 [S9]	0.03–0.05 [S2]	–
(6,4)-SWNTs	–	0.06–0.10	–

4. References

- [1] S.M. Bachilo, M.S. Strano, C. Kittrell, R.H. Hauge, R.E. Smalley, R.B. Weisman, Structure-assigned optical spectra of single-walled carbon nanotubes, *Science* 298 (2002) 2361–2366. <https://doi.org/10.1126/science.1078727>.
- [2] T.W. Odom, J.L. Huang, P. Kim, C.M. Lieber, Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes, *Nature* 391 (1998) 62–64. <https://doi.org/10.1038/34145>.
- [3] R.R. Anderson, J.A. Parrish, The optics of human skin, *J. Invest. Dermatol.* 77 (1981) 13–19. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12479191>.
- [4] A. De La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B.R. Smith, T.J. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Chen, H. Dai, B.T. Khuri-Yakub, S.S. Gambhir, Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 557–562. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.231>.
- [5] R. Singh, S.V. Torti, Carbon nanotubes in hyperthermia therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 2045–2060. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.001>.
- [6] T. Murakami, Photodynamic action of single-walled carbon nanotubes, *Chem. Pharm. Bull.* 65 (2017) 629–636. <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00120>.
- [7] N. Gandra, P.L. Chiu, W. Li, Y.R. Anderson, S. Mitra, H. He, R. Gao, Photosensitized singlet oxygen production upon two-photon excitation of single-walled carbon nanotubes and their functionalized analogues, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 5182–5185. <https://doi.org/10.1021/jp809268q>.
- [8] T. Tanaka, Y. Urabe, D. Nishide, H. Kataura, Continuous separation of metallic and semiconducting carbon nanotubes using agarose gel, *Appl. Phys. Express* 2 (2009). <https://doi.org/10.1143/APEX.2.125002>.
- [9] T. Murakami, H. Nakatsuji, M. Inada, Y. Matoba, T. Umeyama, M. Tsujimoto, S. Isoda, M. Hashida, H. Imahori, Photodynamic and photothermal effects of semiconducting and metallic-enriched single-walled carbon nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 17862–17865. <https://doi.org/10.1021/ja3079972>.
- [10] S. Lebedkin, I. Kareev, F. Hennrich, M.M. Kappes, Efficient quenching of singlet oxygen via energy transfer to semiconducting single-walled carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 16236–16239. <https://doi.org/10.1021/jp802754d>.

- [11] A.L. Antaris, J.T. Robinson, O.K. Yaghi, G. Hong, S. Diao, R. Luong, H. Dai, Ultra-low doses of chirality sorted (6,5) carbon nanotubes for simultaneous tumor imaging and photothermal therapy, *ACS Nano* 7 (2013) 3644–3652. <https://doi.org/10.1021/nm4006472>.
- [12] S. Diao, G. Hong, J.T. Robinson, L. Jiao, A.L. Antaris, J.Z. Wu, C.L. Choi, H. Dai, Chirality enriched (12,1) and (11,3) single-walled carbon nanotubes for biological imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 16971–16974. <https://doi.org/10.1021/ja307966u>.
- [13] A.L. Antaris, O.K. Yaghi, G. Hong, S. Diao, B. Zhang, J. Yang, L. Chew, H. Dai, Single chirality (6,4) single-walled carbon nanotubes for fluorescence imaging with silicon detectors, *Small* 11 (2015) 6325–6330. <https://doi.org/10.1002/smll.201501530>.
- [14] H. Liu, T. Tanaka, Y. Urabe, H. Kataura, High-efficiency single-chirality separation of carbon nanotubes using temperature-controlled gel chromatography, *Nano Lett.* 13 (2013) 1996–2003. <https://doi.org/10.1021/nl400128m>.
- [15] N. Reixach, E. Crooks, J.M. Ostresh, R.A. Houghten, S.E. Blondelle, Inhibition of β -amyloid-induced neurotoxicity by imidazopyridoindoles derived from a synthetic combinatorial library, *J. Struct. Biol.* 130 (2000) 247–258. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4245>.
- [16] E.P. Porcu, A. Salis, E. Gavini, G. Rassu, M. Maestri, P. Giunchedi, Indocyanine green delivery systems for tumour detection and treatments, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 768–789. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.04.001>.
- [17] R.W. Redmond, I.E. Kochevar, Symposium-in-print: Singlet oxygen invited review spatially resolved cellular responses to singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 1178–1186. <https://doi.org/10.1562/2006-04-14-1R-874>.
- [18] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1 (2004) 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
- [19] J. Park, P. Deria, M.J. Therien, Dynamics and transient absorption spectral signatures of the single-wall carbon nanotube electronically excited triplet state, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 17156–17159. <https://doi.org/10.1021/ja2079477>.
- [20] B.F. Habenicht, O. V. Prezhdo, Ab initio time-domain study of the triplet state in a semiconducting carbon nanotube: Intersystem crossing, phosphorescence time, and line width, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 15648–15651. <https://doi.org/10.1021/ja305685v>.
- [21] M.C. DeRosa, R.J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coord. Chem. Rev.* 233–234 (2002) 351–371. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).

- [22] R.C. Gilson, K.C.L. Black, D.D. Lane, S. Achilefua, Hybrid TiO₂-ruthenium nano-photosensitizer synergistically produces reactive oxygen species in both hypoxic and normoxic conditions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (2017) 10717–10720. <https://doi.org/10.1002/anie.201704458>.
- [23] A. Joshi, S. Punyani, S.S. Bale, H. Yang, T. Borca-Tasciuc, R.S. Kane, Nanotube-assisted protein deactivation, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 41–45. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.386>.
- [24] Y. Hirana, G. Juhasz, Y. Miyauchi, S. Mouri, K. Matsuda, N. Nakashima, Empirical prediction of electronic potentials of single-walled carbon nanotubes with a specific chirality (n,m), *Sci. Rep.* 3 (2013). <https://doi.org/10.1038/srep02959>.
- [25] Y. Tanaka, Y. Hirana, Y. Niidome, K. Kato, S. Saito, N. Nakashima, Experimentally determined redox potentials of individual (n,m) single-walled carbon nanotubes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 7655–7659. <https://doi.org/10.1002/anie.200902468>.
- [26] W.C. Hou, S. Beigzadehmilani, C.T. Jafvert, R.G. Zepp, Photoreactivity of unfunctionalized single-wall carbon nanotubes involving hydroxyl radical: Chiral dependency and surface coating effect, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 3875–3882. <https://doi.org/10.1021/es500013j>.
- [27] M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, A. Jorio, Raman spectroscopy of carbon nanotubes, *Phys. Rep.* 409 (2005) 47–99. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2004.10.006>.
- [28] Y. Li, W. Zhang, J. Niu, Y. Chen, Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles, *ACS Nano* 6 (2012) 5164–5173. <https://doi.org/10.1021/nn300934k>.
- [29] V.N. Kuznetsov, N. Serpone, Photoinduced coloration and photobleaching of titanium dioxide in TiO₂/polymer compositions upon UV- and visible-light excitation of color centers' absorption bands: Direct experimental evidence negating band-gap narrowing in anion-/cation-doped TiO₂, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 15277–15288. <https://doi.org/10.1021/jp073511h>.
- [30] C.H. Lin, R.F. Yu, W.P. Cheng, C.R. Liu, Monitoring and control of UV and UV-TiO₂ disinfections for municipal wastewater reclamation using artificial neural networks, *J. Hazard. Mater.* 209–210 (2012) 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.029>.
- [31] A. Fujishima, T. Shuin, K. Hashimoto, A. Fujishima, Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO₂ particles, *Cancer Res.* 52 (1992) 2346–2348.
- [32] J. Ge, M. Lan, B. Zhou, W. Liu, L. Guo, H. Wang, Q. Jia, G. Niu, X. Huang, H. Zhou, X. Meng, P. Wang, C.S. Lee, W. Zhang, X. Han, A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms5596>.

- [33] T.A. Tabish, C.J. Scotton, D.C.J. Ferguson, L. Lin, A. Van Der Veen, S. Lowry, M. Ali, F. Jabeen, P.G. Winyard, S. Zhang, Biocompatibility and toxicity of graphene quantum dots for potential application in photodynamic therapy, *Nanomedicine* 13 (2018) 1923–1937.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0018>.
- [34] X. Tu, S. Manohar, A. Jagota, M. Zheng, DNA sequence motifs for structure-specific recognition and separation of carbon nanotubes, *Nature* 460 (2009) 250–253.
<https://doi.org/10.1038/nature08116>.
- [35] M.N. Palgunachari, V.K. Mishra, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, S.O. Adeyeye, S. Alluri, G.M. Anantharamaiah, J.P. Segrest, Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity implications for HDL assembly, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (1996) 328–338. <https://doi.org/10.1161/01.atv.16.2.328>.
- [36] G.Y. Liou, P. Storz, Reactive oxygen species in cancer, *Free Radic. Res.* 44 (2010) 479–496.
<https://doi.org/10.3109/10715761003667554>.
- [37] K.J. Davies, M.E. Delsignore, Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9908–9913.
- [38] M.J. Davies, Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 761–770. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00817-9).
- [39] Z. Fu, Y. Luo, P. Derreumaux, G. Wei, Induced β -barrel formation of the Alzheimer's A β 25-35 oligomers on carbon nanotube surfaces: Implication for amyloid fibril inhibition, *Biophys. J.* 97 (2009) 1795–1803. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.07.014>.
- [40] H. Li, Y. Luo, P. Derreumaux, G. Wei, Carbon nanotube inhibits the formation of β -sheet-rich oligomers of the Alzheimer's amyloid- β (16-22) peptide, *Biophys. J.* 101 (2011) 2267–2276.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.046>.
- [41] D. Lin, R. Qi, S. Li, R. He, P. Li, G. Wei, X. Yang, Interaction dynamics in inhibiting the aggregation of A β peptides by SWCNTs: A combined experimental and coarse-grained molecular dynamic simulation study, *ACS Chem. Neurosci.* 7 (2016) 1232–1240.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.6b00101>.
- [42] H. Levine, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci.* 2 (1993) 404–410.
<https://doi.org/10.1002/pro.5560020312>.

- [43] J.S. Lee, B. Il Lee, C.B. Park, Photo-induced inhibition of Alzheimer's β -amyloid aggregation invitro by rose bengal, *Biomaterials* 38 (2015) 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.058>.
- [44] G. Son, B. Il Lee, Y.J. Chung, C.B. Park, Light-triggered dissociation of self-assembled β -amyloid aggregates into small, nontoxic fragments by ruthenium (II) complex, *Acta Biomater.* 67 (2018) 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.048>.
- [45] Y. Ishida, S. Tanimoto, D. Takahashi, K. Toshima, Photo-degradation of amyloid β by a designed fullerene-sugar hybrid, *MedChemComm.* 1 (2010) 212–215. <https://doi.org/10.1039/c0md00075b>.
- [46] A. Taniguchi, D. Sasaki, A. Shiohara, T. Iwatsubo, T. Tomita, Y. Sohma, M. Kanai, Attenuation of the aggregation and neurotoxicity of amyloid- β peptides by catalytic photooxygenation, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 1382–1385. <https://doi.org/10.1002/anie.201308001>.
- [47] A. Hirabayashi, Y. Shindo, K. Oka, D. Takahashi, K. Toshima, Photodegradation of amyloid β and reduction of its cytotoxicity to PC12 cells using porphyrin derivatives, *Chem. Commun.* 50 (2014) 9543–9546. <https://doi.org/10.1039/c4cc03791j>.
- [48] B. Il Lee, S. Lee, Y.S. Suh, J.S. Lee, A.K. Kim, O.Y. Kwon, K. Yu, C.B. Park, Photoexcited porphyrins as a strong suppressor of β -amyloid aggregation and synaptic toxicity, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2015) 11472–11476. <https://doi.org/10.1002/anie.201504310>.
- [S1] Y. Hirana, G. Juhasz, Y. Miyauchi, S. Mouri, K. Matsuda, N. Nakashima, Empirical prediction of electronic potentials of single-walled carbon nanotubes with a specific chirality (n,m), *Sci. Rep.* 3 (2013). <https://doi.org/10.1038/srep02959>.
- [S2] J. Park, P. Deria, M.J. Therien, Dynamics and transient absorption spectral signatures of the single-wall carbon nanotube electronically excited triplet state, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 17156–17159. <https://doi.org/10.1021/ja2079477>.
- [S3] B. Yuan, N. Chen, Q. Zhu, Emission and absorption properties of indocyanine green in Intralipid solution, *J. Biomed. Opt.* 9 (2004) 497. <https://doi.org/10.1117/1.1695411>.
- [S4] S. Reindl, A. Penzkofer, S.H. Gong, M. Landthaler, R.M. Szeimies, C. Abels, et al., Quantum yield of triplet formation for indocyanine green, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 105 (1997) 65–68. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(96\)04584-4](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(96)04584-4).
- [S5] R. Philip, A. Penzkofer, W. Bäuml, R.M. Szeimies, C. Abels, Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 96 (1996) 137–148. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(95\)04292-X](https://doi.org/10.1016/1010-6030(95)04292-X).

- [S6] L. Brand, J.R. Gohlke, D.S. Rao, Evidence for binding of rose bengal and anilinonaphthalenesulfonates at the active site regions of liver alcohol dehydrogenase, *Biochemistry* 6 (1967) 3510–3518. <https://doi.org/10.1021/bi00863a024>.
- [S7] P. Murasecco Suardi, E. Gassmann, A.M. Braun, E. Oliveros, Determination of the quantum yield of intersystem crossing of rose bengal, *Helv. Chim. Acta* 70 (1987) 1760–1773. <https://doi.org/10.1002/hlca.19870700712>.
- [S8] E. Gandin, Y. Lion, A. Van de Vorst, Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives, *Photochem. Photobiol.* 37 (1983) 271–278. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x>.
- [S9] F. Schöppler, C. Mann, T.C. Hain, F.M. Neubauer, G. Privitera, F. Bonaccorso, et al., Molar extinction coefficient of single-wall carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011) 14682–14686. <https://doi.org/10.1021/jp205289h>.

General Conclusion

Chapter 1 では我々は、Urea-assisted method と呼ばれる dHDL の再構成法の開発に成功した。エタノール中の DMPC と 2 M urea を含む PBS 中の apoA-I (44-243) を穏やかに混合し、ゲル-液晶相転移温度で 6 時間インキュベートすると、dHDL 再構成に最も広く使用されているコール酸透析法と同等の効率で dHDL が得られた。特に、再構成に使用されるタンパク質の変性曲線における転移中点濃度の urea を含むことが重要であった。Urea-assisted method の作用機序として、混合直後に~30 nm の脂質ナノ粒子が形成し、次に apoA-I (44-243) がこの粒子に結合して、10 nm サイズの dHDL 複合体を形成する、という 3 段階反応を提案した。本手法ではタンパク質の単量体および半変性状態が後のステップで重要であると想定された。我々の手法は、タンパク質、脂質、薬物の 3 つの成分を同時に混合することにより、薬物搭載 dHDL のワンステップ作製にも活用できた。ただし、この方法に適用できるリン脂質は、現在 DMPC に限定されている。したがって、この制限を克服するには、追加の研究が必要である。

Chapter 2 では、36 個のフッ素原子を持つヘキサフィリン、hexa が持続的な光線温熱効果と ^{19}F MRI の両方で使用できる有望なセラノスティック色素であることを初めて示した。hexa のユニークな化学構造から予想されるように、この持続的な熱生成は、低い PDE 活性に起因する可能性が高い。重要なことに、hexa は臨床的に使用される色素である ICG よりも PDE 活性が低いが、PTE 活性は高く、がん細胞を効率的にレーザーアブレーションすることができた。さらに、hexa@cpHDL は、hexa に導入された複数のフッ素原子により、 ^{19}F MRI による腫瘍の可視化に使用できる可能性を示した。hexa のセラノスティック材料としての使用は、現段階では現実的ではないかもしれないが、合理的な分子設計を使用することでその潜在能力を引き出し、セラノスティック材料として環拡張ポルフィリンを使用するための新しい研究領域を切り開くと信じている。

Chapter 3 では我々は、(6,4)-SWNT が NIR 照射条件下で持続的な ROS 生成が可能であること、およびこの光学特性ががん細胞の光治療に適しており、A β ペプチド凝集体を光分解するのに十分であることを示した。この性質は、おそらく光安定性と(6,4)-SWNT の系間交差量子収率によ

るものだと考えられた。また、両親媒性タンパク質 (apoA-I) は、(6,4)-SWNT を含む s-SWNT を安定的に生理的条件下で単分散化させるための生体適合性分散剤であることがわかった。apoA-I で安定化した(6,4)-SWNT は、生体透過性が高い NIR が利用可能であり、持続的に[•]OH 生成できるという特異な性質を有することから、生物医学応用に適したナノ材料だと言える。

ドラッグナノキャリアと PAM を用いる光線療法についてまとめた本研究の応用先の一例として、加齢黄斑変性 (AMD) 治療が想定される。既存の AMD 治療法には、まず抗体医薬品を眼球に直接注射する方法がある。他には PAM の一種であるベルテポルフィンを含むリポソーム製剤を血管内投与し、新生血管に対して光照射を行い、血管閉塞を起こす光線力学療法がある。この治療法における治療メカニズムは、リポソームに対する血漿リポタンパク質の吸着、およびリポタンパク質受容体を介する後眼部移行であるとされている。前者は侵襲性、後者は薬物送達の標的特異性が課題となっている。低侵襲で副作用が少ない治療法の確立のために、第一に HDL を点眼投与により後眼部網膜に送達し、AMD 治療できる可能性がある。その他に、HDL を用いれば、現在の光線力学療法の欠点である標的特異性の問題を克服することができると考える。既存の光線力学療法剤であるリポソーム製剤において眼内移行メカニズムを担っているのは血漿リポタンパク質であるため、リポタンパク質を含むドラッグナノキャリア、すなわち本研究で述べてきたような再構成 HDL を使用することはターゲティングの観点から合理的である。そこにさらに新生血管へのアクティブターゲティングモチーフを融合することで、後眼部新生血管への PAM 送達効率が向上することが予想される。このように薬物送達の標的特異性の向上を通じて、光線力学療法における副作用を低減できる可能性がある。本研究は、リポタンパク質ドラッグナノキャリアの開発、PAM との複合化、およびその生物医学応用について検討したものであり、PAM をドラッグナノキャリアと複合化することで初めて発現する機能を見出すことができた。本研究を通じて、生理的条件下での安定性が低い PAM の、治療応用に向けた戦略を提示できた。

LIST OF PUBLICATIONS (Chapter 1–3)

Chapter 1

Fukuda R., Saito M, Shibukawa S, Sumino A, Nakano M, Murakami T.
Urea-Assisted Reconstitution of Discoidal High-Density Lipoprotein. *Biochemistry* **2020**,
59, 1455–1464.

Chapter 2

Higashino T, Nakatsuji H, Fukuda R., Okamoto H, Imai H, Matsuda T, Tochio H,
Shirakawa M, Tkachenko, N. V., Hashida, M, Murakami T, Imahori H. Hexaphyrin as a
Potential Theranostic Dye for Photothermal Therapy and ¹⁹F Magnetic Resonance
Imaging. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 951–959.

Chapter 3

Fukuda R., Umeyama T, Tsujimoto M, Ishidate F, Tanaka T, Kataura H, Imahori H,
Murakami T. Sustained Photodynamic Effect of Single Chirality-Enriched Single-Walled
Carbon Nanotubes. *Carbon* **2020**, *161*, 718–725.

LIST OF OTHER PUBLICATIONS

1. Suda K, Murakami T, Gotoh N, Fukuda R, Hashida Y, Hashida M, Tsujikawa A, Yoshimura N. High-Density Lipoprotein Mutant Eye Drops for the Treatment of Posterior Eye Diseases *J. Controlled Release* **2017**, *266*, 301–309.
2. Omomo S, Fukuda R, Miura T, Murakami T, Ikoma T, Matano Y, Effects of the Peripheral Substituents, Central Metal, and Solvent on the Photochemical and Photophysical Properties of 5, 15-Diazaporphyrins *ChemPlusChem* **2019**, *84*, 1-7.
3. Fukuda R, Murakami T. Potential of Lipoprotein-Based Nanoparticulate Formulations for the Treatment of Eye Diseases. *Biol. Pharm. Bull.* **2020**, *43*, 596.

Acknowledgements

本研究を行うにあたり、村上 達也 教授に貴重なご提案を賜り、厚く御礼申し上げます。

また角野 歩美 博士、中野 実 教授、東野 智洋 博士、中辻 博貴 博士、岡本 陽己 様、今井 宏彦 博士、松田 哲也 教授、栃尾 豪人 教授、白川 昌宏 教授、Nikolai V. Tkachenko 教授、橋田 充 名誉教授、梅山 有和 博士、辻本 将彦 博士、石館 文善 特任教授、田中 方士 博士、片浦 弘道 博士、今堀 博 教授にも論文執筆にあたり、ご指導いただいたことを感謝申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり、サントリー生命科学財団（SUNBOR SCHOLARSHIP）の奨学金を得たことに感謝申し上げます。