

平成21年 6月3日現在

研究種目：基盤研究（C）一般  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19590014  
 研究課題名（和文） 光線力学的療法の治療効率向上を目指した新規複素環系鉄除去剤の開発  
 研究課題名（英文） Evaluation of novel heterocycle-containing iron(III) removal agents as promoting agents for photodynamic therapy efficiency  
 研究代表者  
 加藤 明良（KATOH AKIRA）  
 成蹊大学・理工学部・教授  
 研究者番号： 00167339

## 研究成果の概要：

光線力学的療法は、臓器の切除や抗ガン剤による副作用のない治療法である。この治療効率向上には、光増感剤である生体成分プロトポルフィン IX（PpIX）の局所濃度を上げる必要がある。本研究では、様々な複素環系2座及び6座配位子を合成し、鉄錯体形成能及び活性評価実験から、配位子の添加によりガン細胞内 PpIX 濃度を増加できることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,400,000	420,000	1,820,000
20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：複素環・6座配位子・鉄除去剤プロトポルフィリン・光線力学的療法・PDT

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ガンは日本における死亡原因の第1位である。現在のガン治療法としては、放射線療法、抗ガン剤による治療、外科治療、レーザー治療などが行われているが、これらの治療法は痛みや副作用などの欠点があり、より治療効果の高い新たな治療法が望まれている。この要請に応える治療法として、**光線力学的療法=PhotoDynamicTherapy (PDT)**が注目されている。光線力学的療法は、ポルフィリン関連化合物が有する腫瘍組織・新生血管への特異的な集積性と光励起により発生する一重項酸素の強い殺細胞効果を利用してガン細胞を壊死させるユニークな治療法である。

(2) ホトフリンとレーザーによる光線力学的療法の有効性と安全性が確認され、厚生省の認可を受けたのが1994年とかなり新しい治療法である。しかし、ホトフリンも第2世代のレザフィリンも生体残留時間が長いため日光過敏症となり、投与後1～3週間直射日光を避けた生活を強いられることから、QOL (Quality of Life)の点で改善が望まれる。

(3) もう一つの研究の流れは、5-アミノレブリン酸=5-aminolevulinic acid (ALA) とそのエステル誘導体の局所投与とヘム生合成を利用して、生体成分でしかも光増感剤になり得る PpIX のガン細胞への集積を目指すものであるが、殆ど研究がなされていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、生体成分でしかも光増感剤となり得るプロトポルフィリン IX (注:プロトポルフィリン IX に鉄が配位したヘムは、光増感剤として働かない) のガン細胞への集積性を高めるために必要な鉄除去を新規な複素環配位子を用いて行い、結果的に光線力学療法の治療効果を飛躍的に高めることである。

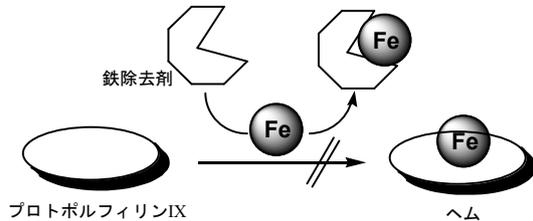


図 1. 本研究の概念図

(2) この2年間で、種々のpKa値をもつヒドロキシアジン系複素環 2 座および 6 座配位子を新規に合成し、鉄錯体形成能、錯体の安定度定数の算出、人の鉄イオン輸送タンパク質であるトランスフェリンからの鉄除去能等を評価する。さらに、ヒト組織球性腫瘍細胞 (U-937) やヒト肝ガン細胞 (Chang Liver) を用いた *in vitro* 活性試験 (ここで、光照射の光源として、ハロゲンランプを用いる) により、新規に合成した配位子の殺細胞効果を評価し、光線力学的療法剤への応用の道を開きたい。

## 3. 研究の方法

平成 19 年度は、ヒドロキシアジン系複素環 2 座配位及び 6 座配位子の合成を中心に研究を進める。

(1) 市販の 3-メトキシ-2(1H)-ピリジノンを出発原料に用い、N-アルキル化、カルボニル基のチオカルボニル基への変換、脱メチル化反応により、1 位に様々な置換基をもつ 3-ヒドロキシ-2(1H)-ピリジンチオン類を合成する。

(2) 市販のマルトールを出発原料に用い、0-ベンジル化反応、アミン類との反応、脱ベンジル化、カルボニル基のチオカルボニル基への変換により、1 位に光学活性基を含む様々な置換基をもつ 3-ヒドロキシ-4(1H)-ピリジンチオン類を合成する。

(3) 市販の 1,3-ジケトン類と N-ベンジルオキシ尿素との縮合反応、カルボニル基のチオカルボニル基への変換、接触還元による脱ベンジル化により、4 位と 6 位に様々な置換基をもつ 1-ヒドロキシ-2(1H)-ピリジンチオン類を合成する。

(4) グリオキサールや 2,3-ブタンジオンと各種アミノ酸 N-ベンジルオキシアミドの縮合反応、カルボニル基のチオカルボニル基への変換、接触還元による脱ベンジル化によ

り、3 位に様々な置換基をもつ 1-ヒドロキシ-2(1H)-ピリジンチオン類 (D) を合成する。

(5) 4 位にトリアゾリル基が置換したピリミジノンを出発原料に用い、アミノカルボン酸の連結、ケン化、活性エステル化の後、環状トリセリントリラクトンとのカップリング、最後に接触還元により脱ベンジル化反応を行い新規な 6 座配位子を合成する。

(6) 3 位にメトキシカルボニルエチル基が置換したピラジノンを出発原料に用い、ケン化、アミンカルボン酸の連結、ケン化、活性エステル化後、環状トリセリントリラクトンとのカップリング、最後に接触還元により脱ベンジル化を行い新規な 6 座配位子を合成する。

平成 20 年度は、19 年度に合成した配位子の鉄除去能の評価とガン細胞を用いた殺細胞効果の評価を中心に行う。

(1) 合成 6 座配位子の水酸基の pKa 値を測定する。

(2) 合成 6 座配位子と Fe(III) との結合比の測定、鉄錯体形成能の評価、EDTA との鉄交換反応を利用し鉄錯体の安定度定数を算出する。

(3) アポトランスフェリンから、人の鉄輸送タンパク質であるトランスフェリンを調製する。

(4) 合成 6 座配位子によるトランスフェリンからの鉄除去能を評価する。

(5) ガン細胞 (U-937, Chang Liver) に 5-ALA を加え、暗所で 1.5 時間培養する。合成した 6 座配位子を添加し暗所で更に 1.5 時間培養する。メタルハライドランプ (光源: 550-750 nm) を数時間照射する。培地にトリパンプルーを加え、細胞の生死を確認し生存率を調べる。

(6) 5-ALA と合成 6 座配位子の添加量とガン細胞の生存率 (照射後の生存細胞数 ÷ 無照射の生存細胞数 × 100) との関係性を調べる。

(7) 照射エネルギーとガン細胞の生存率との関係を調べる。

(8) プロトポルフィリン IX 由来の 635 nm の蛍光強度の測定から、6 座配位子の添加によるプロトポルフィリン IX の細胞内蓄積量の増加について調べる。

以上の実験から、本研究で合成した複素環系 2 座および 6 座配位子が光線力学的療法に於ける新しい鉄除去剤になり得るか、換言すれば、新しい光線力学的療法の治療効率促進剤になり得るかを総合的に評価する。

## 4. 研究成果

(1) 複素環系 2 座配位子として、図 2 に示す 5 種類を合成した; 3-ヒドロキシ-2(1H)ピリジンチオン類 (A)、3-ヒドロキシ

-4(1H)-ピリジンチオン類(B), 4,5-ジヒドロキシ-6-メトキシカルボニル-2-フェニルピリジン(C), 1-ヒドロキシ-2(1H)-ピリミジノン類(D), 5-N,N-ジアルキルスルファモイル-8-ヒドロキシキノリン類(E)。

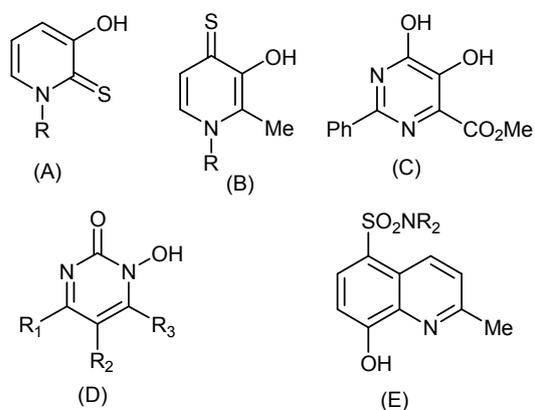


図2. 合成したヒドロキシアジン系2座配位子

(2) 複素環系6座配位子として、図3に示す5種類を合成した。

①市販の2,3-ジヒドロピリジンから7段階の反応を経て、3-ヒドロキシ-2(1H)-ピリジノンとスペーサーとトリス(2-アミノエチル)アミンから成る6座配位子(3HOPO<sub>n</sub>)を合成した。

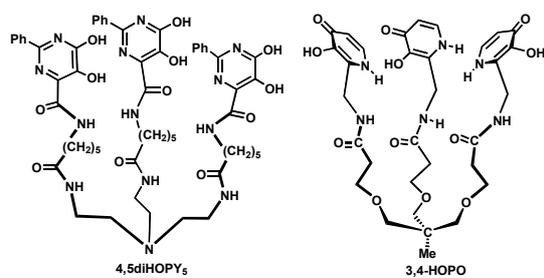
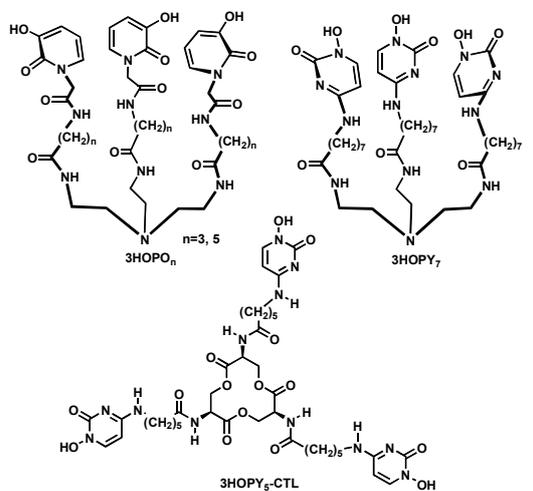


図3. 合成したヒドロキシアジン系6座配位子

②1-ベンジルオキシ-4-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)-2(1H)-ピリミジノンから6段階

の反応を経て、1-ヒドロキシ-2(1H)-ピリミジノンとスペーサーとトリス(2-アミノエチル)アミンから成る6座配位子(3HOPY<sub>7</sub>)を合成した。

③1-ベンジルオキシ-4-(1,2,4-トリアゾール-1-イル)-2(1H)-ピリミジノンから3段階の反応で得た活性エステルと、L-セリンから3段階の反応で得た環状トリラクトンカップリングし、脱ベンジル保護することにより6座配位子(3HOPY<sub>5</sub>-CTL)を合成した。

④ベンゾニトリルから8段階の反応を経て4,5-ジヒドロキシ-2-フェニルピリミジンとスペーサーとトリス(2-アミノエチル)アミンから成る6座配位子(4,5diHOPY<sub>5</sub>)を合成した。

⑤市販のマルトールから3段階の反応で得た3,4-ビス(ベンジルオキシ)-2-アミノメチルピリジンと、1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンから4段階の反応で得た活性エステルをカップリングし、脱ベンジル保護することにより6座配位子(3,4-HOPO)を合成した。

(3) 合成した複素環系配位子の鉄錯体形成能を評価した。

①配位子(3HOPO<sub>5</sub>)とFe<sup>3+</sup>を1:1で混合し50%DMF水溶液で紫外-可視吸収スペクトルを測定したところ、420-515nmにLMCTに基づく吸収が観測された。しかも幅広いpH領域で吸光度がほぼ一定であったことから、3HOPO<sub>5</sub>は安定な1:1錯体を形成することがわかった。(図4)

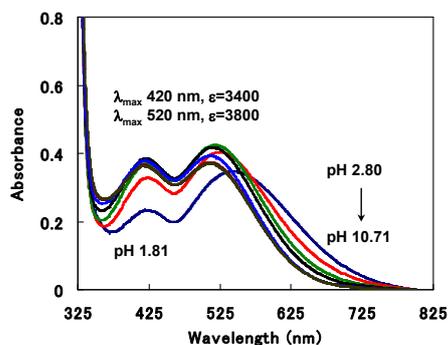


図4. 様々なpH条件におけるUV-VISスペクトル

②配位子(3HOPY<sub>7</sub>)とFe<sup>3+</sup>を1:1で混合した水溶液の紫外-可視吸収スペクトルを測定したところ、pH 5.6で465nm付近にLMCTに基づく吸収(ε4550)が観測され、しかも酸性から中性の幅広いpH領域で吸光度がほぼ一定であったことから、3HOPY<sub>7</sub>は安定な1:1錯体を形成することがわかった。

③配位子(3HOPY<sub>5</sub>-CTL)とFe<sup>3+</sup>を1:1で混合し50%MeOH水溶液で紫外-可視吸収スペクトルを測定したところ、pH8.5におい

て456 nmにLMCTに基づく吸収帯が観測され、モル吸光係数が4150となった。これらの値及びpH4から9でモル吸光係数が約4000でほぼ一定であったことから、**3HOPY<sub>5</sub>-CTL**は溶液中で安定な1:1錯体を形成することがわかった。(図5)

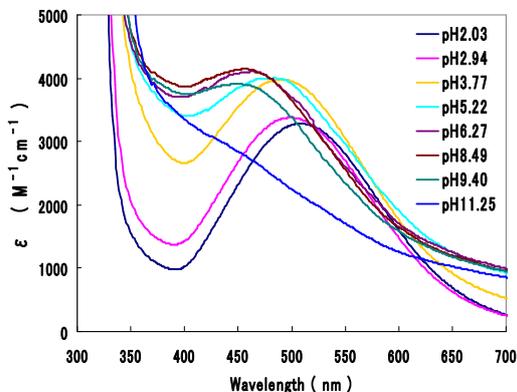


図5. 様々なpH条件におけるUV-VISスペクトル

④配位子(3,4-HOPO)とFe<sup>3+</sup>を1:1で混合した水溶液の紫外-可視吸収スペクトルを測定したところ、450 nm付近にLMCTに基づく吸収(ε 5020)が観測され、しかも幅広いpH領域(1-13.5)で吸光度がほぼ一定であったことから、**3,4-HOPO**かなり安定な1:1錯体を形成することが示唆された。(図6)

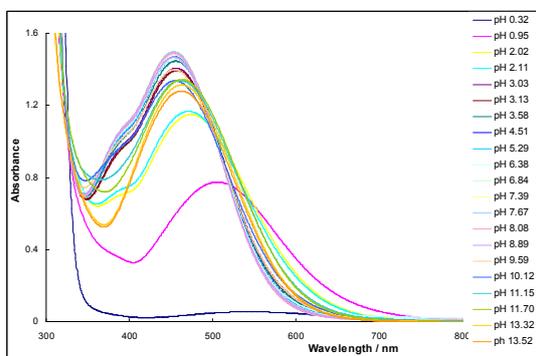


図6. 様々なpH条件におけるUV-VISスペクトル

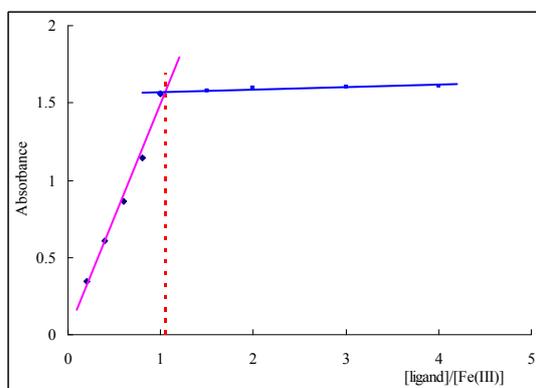


図7. pH 7.6におけるモル比プロット

また、配位子とFe<sup>3+</sup>の結合比を調べるためにモル比法を行った。鉄イオンの濃度を一定にし、配位子の濃度を順次変化させたところ、[Ligand]/[Fe(III)]=1.05に折れ点を与えたことから、1:1の錯生成を確認した。(図7) ⑤さらに、配位子(3,4-HOPO)とエチレンジアミン四酢酸(EDTA)との間の鉄交換反応から、鉄錯体の安定度定数を算出した結果、log K=28.4となり、天然の代表的な鉄イオン除去剤デスフェリオキサミンB(DFB)の30.5には及ばないものの、高い第二鉄イオンへの親和力を持つことが明らかとなった。

#### (4) 評価

まず、光増感剤である**PpIX**の蓄積量を検討した。5 x 10<sup>5</sup> cells/mLのヒト組織球性腫瘍細胞U937懸濁液5 mLを直径5 cmのシャーレに入れ、10wt%5-アミノレブリン酸(ALA)を10 μL添加して37 °Cで3時間インキュベーションし、同時に7 mM **3HOPY<sub>7</sub>**を10 μL添加して所定の時間インキュベーションした。その後、遠心分離によって培地を除去し、Hanks溶液で洗浄後、Hanks溶液を3 mL入れ、細胞内**PpIX**の蛍光スペクトルを測定した。(励起波長: 410 nm, 蛍光波長: 620-660 nm) 図8に**3HOPY<sub>7</sub>**を添加後のインキュベーション時間に対する細胞内**PpIX**の633 nmにおける蛍光強度を示した。但し、縦軸はALA単独投与の際の蛍光強度を100とした時の相対値で、それが大きいほど細胞内**PpIX**量が多いことを示している。

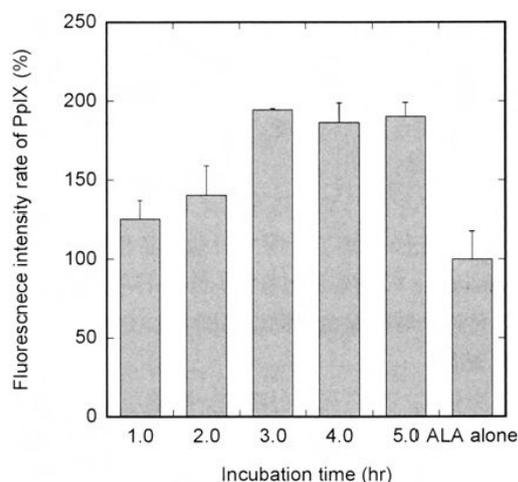


図8. 3HOPY7のインキュベーション時間とPpIXの蛍光強度との関係

**3HOPY<sub>7</sub>**を添加することによって細胞内**PpIX**量の増加が認められた。さらに、その傾向はインキュベーション時間3時間以上で顕著であった。また、**3HOPY<sub>7</sub>**無添加系と**3HOPY<sub>7</sub>**を添加して3時間以上インキュベーションした系に、それぞれ200J/cm<sup>2</sup>以上の光

照射 (550-700 nm) を行ったところ、**3HOPY<sub>7</sub>** 添加系の方が高い殺細胞効果 (U937 の生存率 : 57±8.7% for ALA only vs. 33±4.5% for **3HOPY<sub>7</sub>**-ALA) を示した。複素環系 6 座配位子 (**3HOPO<sub>n</sub>**, n=3,5) についても同様な実験を行ったが、細胞内 PpIX 量の増加は殆ど認められなかった。

以上の結果から、**3HOPY<sub>7</sub>** は ALA による細胞内 PpIX の集積性向上に有効であることが明らかとなった。今後、他の合成複素環系 2 座及び 6 座配位子についても評価を行っていく予定である。

この 2 年間の研究を通し手、光線力学的療法の治療効率向上の可能性を示唆することができたと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Akira Katoh, Yuriko Matsumura, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui, Hiromu Sakurai, Evaluation of insulin-mimetic activities of vanadyl and zinc(II) complexes from the viewpoint of heterocyclic bidentate ligands, Journal of Inorganic Biochemistry, Vol 103, p.567-574, 2009, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 加藤明良・山口美香・徳岡由一、ピリミジン含有三方向性 6 座配位子の合成と光線力学的療法(PDT)効率促進剤としての評価、第 37 回複素環化学討論会、2007 年 10 月 18 日、長野市若里市民文化ホール
- ② 加藤明良・玉之内泰明・松村有里子、PDT 促進剤を指向した新規六座配位子の合成と鉄錯体形成能、第 55 回有機合成化学関東支部シンポジウム (野田シンポジウム)、2008 年 5 月 10 日、東京理科大野田キャンパス薬学校舎
- ③ 徳岡由一・山口美香・松村有里子・加藤明良、ALA-PpIX におけるピリミジン含有三方向性六座配位子の添加効果、第 18 回日本光線力学学会、2008 年 6 月 14 日、テレピアホール (名古屋市)
- ④ 加藤明良・盧 公昊・松村有里子、光線力学的療法剤を指向した 3-ヒドロキシ-4-ピリドン含有三方向性六座配位子の合成、第 56 回有機合成化学関東支部シンポジウム (新潟シンポジウム)、2008 年 11 月 30 日、新潟大学工学部

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 明良 (KATOH AKIRA)

成蹊大学・理工学部・教授

研究者番号： 00167339