

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19614009
 研究課題名（和文） 癌治療のためのシグナルペプチドを連結したQOL対応型光線力学療法用光増感剤の開発
 研究課題名（英文） Development of Novel Photosensitizers having Biofunctional Moieties for QOL-oriented Photodynamic Therapy
 研究代表者
 小幡 誠（OBATA MAKOTO）
 奈良女子大学・大学院人間文化研究科・助教
 研究者番号：70343267

研究成果の概要：

メソ位にペンタフルオロフェニル基を有するポルフィリン(フッ素ポルフィリン)の高い反応性を利用して生理活性分子を連結した光線力学療法用 PDT 光増感剤の開発を行った。特にチオレートアニオンによる求核置換反応およびアゾメチンイリドによる 1,3-双極子付加反応を利用して生理活性分子を連結可能な光増感剤の合成法を検討した。また 1,3-双極子付加反応により構造明確なフッ素クロリン金属錯体を合成し、細胞内環境における重原子効果の観測に初めて成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：高分子化学

科研費の分科・細目：光生命科学（時限付き細目）

キーワード：光生命科学、光医療、光線力学療法、光増感剤

1. 研究開始当初の背景

近代医学は最大の死亡原因であった感染症を抑えこむことに成功し、平均寿命を大幅に延ばすことに成功した。そのような現状の中で癌治療が最も重要な課題の一つと考えられている。癌治療には大きく分けて、外科治療、放射線療法、化学療法、生物療法、光化学療法、温熱療法などがある。この中でも光化学療法の一つである光線力学療法(Photodynamic Therapy, PDT)は最低限の外科治療で行えるため、患者の機能温存、すなわち Quality of Life の高い治療法として注目を

集めている。日本でも光増感剤としてフォトプリンやレザフィリンを用いた臨床例が拡大しており、また重粒子線療法に代表される放射線療法と異なり大規模な設備を必要としないため、PDT が実施できる施設も拡大している。PDT はあらかじめ投与した光増感剤に光照射することにより腫瘍組織選択的に活性酸素を発生させ、腫瘍組織を死滅させる治療法である。この PDT の成否は用いる光増感剤の光化学的特性に強く依存するため、新たな光増感剤の開発が精力的に行われている。特に組織透過性の高い長波長の光で励起

可能な光増感剤の合成が重要課題とされている。このような研究は主に有機合成化学や光物理化学の側面から研究が進められている。

一方、光増感剤の細胞内取り込み活性制御や細胞内局在の制御といった生物学的アプローチも大変重要な課題である。しかしながら光化学的特性とは異なり、生物学的特性はその分子設計が非常に難しく、あまり進展していないのが現状である。我々はこれまでに生理活性分子である糖分子を連結した光増感剤の合成を行ってきた。糖分子の連結は光増感剤の光化学的特性にはほとんど影響を与えないが、細胞内取り込みなどの生物学的特性には大きな影響を与えることを明らかにした。すなわち、糖やペプチドなどの生理活性分子を連結することにより光増感剤の生物学的特性を改善し、PDT用光増感剤としての性能を飛躍的に向上させることができると考えられる。しかしながら光増感剤と生理活性分子の複合体の合成はその例が限られているのが現状である。これは光増感剤と生理活性分子を結合させる合成および精製手法の不足によるところが大きい。

2. 研究の目的

本研究では、近年その重要性が提唱されている光生命科学分野において光化学医療への積極的な貢献のため、生理活性分子による光細胞毒性の増幅作用機序を解明することを最終的な目的としている。この最終目的を達成させるためには同一の光増感部位に様々な生理活性分子を系統的に連結する方法論が必要である。これまで用いられてきた糖連結ポルフィリンおよびクロリン誘導体の合成法は生理活性分子を合成初期段階で導入するため、シグナルペプチドのような比較的反応性の高い官能基を多数持つ分子には適用困難である。そこで我々はペンタフルオロフェニル基の高い反応性に着目した。ペンタフルオロフェニル基をメソ位に有するポルフィリン(フッ素ポルフィリン)はチオレートアニオンによって極めて穏やかな条件下で求核置換反応を起こすことが知られている。またフッ素ポルフィリンは1,3-双極子付加反応を容易に受けるなど、通常のポルフィリンには見られない反応性を示す。本研究課題ではこのフッ素ポルフィリンの高い反応性を利用して、糖やシグナルペプチドといった生理活性分子を連結した光増感剤の開発を行った。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために以下の3つの方法で研究を進めた。

(1)フッ素ポルフィリンおよびクロリン誘導体の合成 メソ位にペンタフルオロフェニル

ル基を有するポルフィリン(フッ素ポルフィリン)およびクロリン(フッ素クロリン)は、ペンタフルオロフェニル基のフッ素原子が極めて穏やかな条件下でチオレートアニオンによる置換反応を受けるため、糖やペプチドといった生理活性分子を連結した光増感剤合成に有用な分子である。しかしながら、これまでにフッ素ポルフィリンおよびクロリン誘導体を PDT 用光増感剤に適用した例は限られている。そこで、生理活性分子を連結した PDT 用光増感剤の光増感部位としてフッ素ポルフィリンおよびその金属錯体の1,3-双極子付加によるフッ素クロリンおよびその金属錯体の合成を行った。

(2)ペンタフルオロフェニル基へのチオレートアニオンの求核置換反応を利用した生理活性分子連結光増感剤の合成 糖やペプチドなどの生理活性分子を連結した光増感剤の合成には、生理活性分子の機能を損なわずに光増感剤と結合させる穏やかで幅広い官能基に対応可能な合成経路が必要不可欠である。その一つとしてチオレートアニオンなどの求核種によるペンタフルオロフェニル基のパラ位へ置換反応が考えられる。この方法の可能性と適用限界を調査することを目的として糖およびペプチドを連結した光増感剤の合成を試みた。

(3) C_s 対称面上に官能基を導入したクロリン誘導体の合成 クロリンはポルフィリンのベータ位の一つを還元した分子である。特に1,3-双極子付加反応で生じるクロリンでは、ポルフィリンが有する D_{4h} 対称性が C_s 対称性に低下し、メソ位はエナンチオトピックになる。従って、メソ位へのキラルな生理活性分子の導入は分離困難な立体異性体を生じてしまうという問題点があった。この立体異性体の生成を避けるためには、クロリン環の C_s 対称面上に官能基を導入し、これを介して生理活性分子を連結する必要がある。しかし、これまでにクロリン環の C_s 対称面上に官能基を導入する試みは無い。そこでアゾメチンイリドの1,3-双極子付加反応によりクロリン環の対称面上に窒素原子を導入することができることに着目し、 C_s 対称面上に官能基を導入したクロリン誘導体の合成を試みた。

4. 研究成果

(1)フッ素ポルフィリンおよびクロリン誘導体の合成 はじめに文献に従いフッ素ポルフィリンの亜鉛錯体、パラジウム錯体および白金錯体を合成した。これに *N*-メチルグリシンとパラホルムアルデヒドより反応系中でアゾメチンイリドを生成させ、これにより1,3-双極子付加反応を行った。反応の進行とともに電子吸収スペクトルにクロリン環に特徴的な吸収帯が現れたことからベータ位への1,3-双極子付加反応を確認した。しかし、

亜鉛錯体に関しては、生成したフッ素クロリン亜鉛錯体の溶解性が極めて悪く、単離・精製することができなかった。一方、フッ素クロリンパラジウム錯体および白金錯体は溶液中で室内光によってゆっくりと分解することが分かった。これを回避するために暗所でシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲル浸透クロマトグラフィー、さらに再結晶を行うことにより目的とするフッ素クロリンパラジウム錯体およびフッ素クロリン白金錯体を単離した(図1)。得られた化合物は元

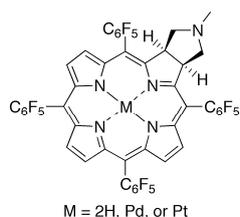


図1 フッ素クロリン金属錯体

素分析、HPLCにより純度が95%以上であることを確認し、¹H、¹³Cおよび¹⁹F NMRで構造を確認し、さらに単結晶X線回折によりそ

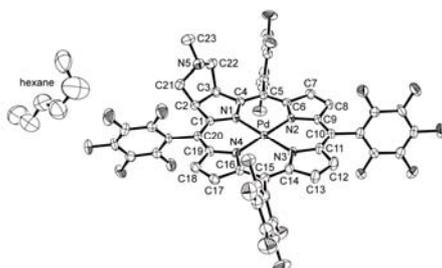


図2 フッ素クロリンパラジウム錯体の結晶構造

の結晶構造を明らかにした(図2)。これは構造明確なフッ素クロリン金属錯体の初めての合成例である。このフッ素クロリンおよびその金属錯体の光増感能、すなわち一重項酸素量子収率を1270 nmにおける一重項酸素の発光の直接観測により評価した。その結果、重ベンゼン中でのフッ素クロリンの一重項酸素量子収率は0.28であったが、そのパラジウム錯体は0.89、白金錯体は0.92と一重項酸素量子収率が向上した。このことから有機溶媒中でのフッ素クロリンにおけるパラジウム原子および白金原子の重原子効果を確認した。このフッ素クロリンおよびその金属錯体について、子宮頸部癌の培養細胞株であるHeLa細胞に対する光細胞毒性を評価した。方法は所定濃度のフッ素クロリンおよびその金属錯体をHeLa細胞に24時間接触させ、その後、所定光量の光を照射し、24時間後の細胞生存率を求めることにより、光細胞毒性

を評価した。その結果、光増感剤濃度0.5 μMのとき、フッ素クロリンの細胞生存率が92%であったのに対し、パラジウム錯体では38%、白金錯体では19%と細胞生存率が低下した。この光細胞毒性の低下は一重項酸素量子収率の増加と符合した。さらに光細胞毒性をもたらす活性種を同定するために、活性酸素阻害剤の存在下での光細胞毒性を調べた。阻害剤として、一重項酸素にはアジ化ナトリウムをヒドロキシルラジカルにはD-マンニトールを用いた。フッ素クロリンの場合、アジ化ナトリウムおよびD-マンニトールの添加により細胞生存率の向上が確認されたことから、光細胞毒性には一重項酸素ばかりでなくヒドロキシルラジカルも関与していることが示唆された。一方、パラジウム錯体と白金錯体の場合ではアジ化ナトリウムの添加により大幅に細胞生存率が向上するものの、D-マンニトールではほとんど細胞生存率が向上しなかった。このことはパラジウム錯体および白金錯体がほぼ排他的に一重項酸素を生成していることを示している。以上の結果からフッ素クロリンにおいては有機溶媒だけでなく細胞内においても重金属効果による一重項酸素の効果的な生成が行われることが示された。これはポルフィリン系光増感剤の細胞内における重原子効果の発現の確実な証拠を与えた初めての例である。

(2)ペンタフルオロフェニル基へのチオレートアニオンの求核置換反応を利用した生理活性分子連結光増感剤の合成 まずはじめにフッ素ポルフィリンへの反応例が報告されているチオグリコシドとフッ素ポルフィリンおよびその金属錯体との反応を試みた。チオグリコシドとフッ素ポルフィリンおよびその金属錯体との反応は溶媒にジメチルホルムアミド、塩基としてジエチルアミンを使用することにより室温で進行し、収率74

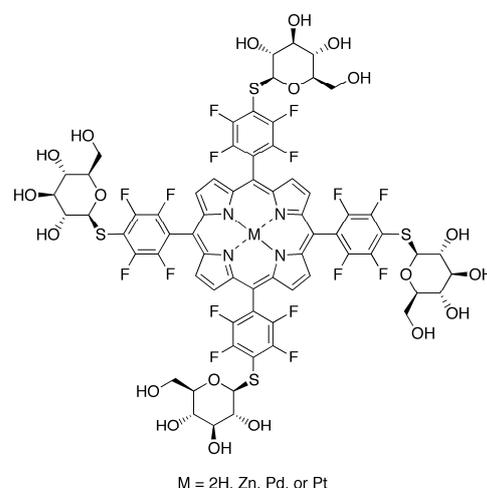


図3 糖連結フッ素ポルフィリン

～85 %で目的とする糖連結ポルフィリン誘導体(図3)を得ることができた。文献では過剰量のチオグリコシドを用いることが必要であると報告されていたが、十分に純度の高いチオグリコシドを用いると、過剰なチオグリコシドの使用は予期せぬ置換体を生じることが分かった。最終的にはポルフィリンに対して等量のチオグリコシドを使用することが最適であることを明らかにした。

次に本反応の汎用性を確かめるために、システアミンとフッ素ポルフィリンの反応を試みた。まずシステアミンとフッ素ポルフィリンをジメチルホルムアミド中、室温で攪拌したが全く反応が進行しなかった。またこれに塩基性触媒としてジエチルアミンを添加したがやはり反応は進行しなかった。次に2-メルカプトエタノールとフッ素ポルフィリンをジメチルホルムアミド中、室温で攪拌したが、全く反応が進行せず、ジメチルアミンを加えても同様の結果となった。一つの可能性としてはシステアミンや2-メルカプトエタノールでは分子内水素結合を介して安定な五員環構造を形成できるため、求核性が著しく低下している可能性が考えられた。

一方、チオグリコシドとの反応ではフッ素ポルフィリンよりもその金属錯体、特に白金錯体を用いたときに最も収率が高いことが示されていた。そこで2-メルカプトエタノールとフッ素ポルフィリン白金錯体をジメチルホルムアミド中、室温で24時間、攪拌した。反応混合物のTLCには2-メルカプトエタノールの付加物と考えられるスポットが現れた。反応混合物をクロロホルムで希釈し、水洗後、有機相をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより目的物(以下、PtTFPP-SCH₂CH₂OHと略記)を単離した。得られた化合物の¹⁹F NMR スペクトルからペンタフルオロフェニル基のパラ位に置換基が導入されたことが分かった。次に、これに膜透過性が期待できるオリゴアルギニンペプチドの連結を計画した。まずはじめにモデル反応としてFmoc基とPmc基で保護されたアルギニン(以下、Fmoc-Arg(Pmc)と略記)の連結を試みた。反応はPtTFPP-SCH₂CH₂OHとFmoc-Arg(Pmc)を乾燥ジメチルホルムアミドに溶解し、縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミドとヒドロキシベンゾトリアゾールを用いて行った。反応溶液は複雑な混合物となったが、クロロホルム可溶部を集め、ゲル浸透クロマトグラフィーにより各成分を分画した。得られた成分のうち溶出時間の早い分画に目的物(図4)の存在を¹H NMRにより確認した。しかしながら現状では極めて収率が低く、実用に耐えないことが分かった。このため合成経路の再検討が必要であることが分かった。

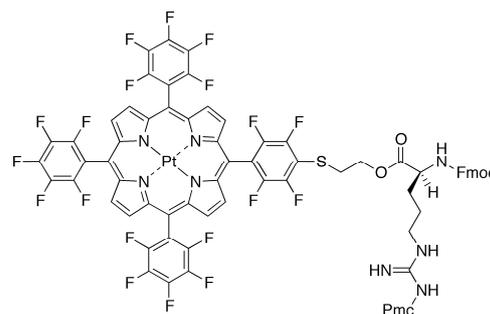


図4 アミノ酸連結フッ素ポルフィリン

(3)C₅対称面上に官能基を導入したクロリン誘導体の合成 *N*-メチルグリシンとパラホルムアルデヒドから生成するアジメチンイリドはフッ素ポルフィリンのベータ位に1,3-双極子付加によりピロリジン環を生成する。このピロリジン環の窒素原子はクロリン環のC₅対称面上に位置している。このためこの窒素原子に官能基を導入することができればキラルな生理活性分子を連結しても立体異性体が生じる恐れが無い。この窒素原子上に置換基を導入する一つの方法は*N*-メチルグリシンのメチル基上に官能基を導入するものである。そこでグリシンの*N*-アルキル化を試みた。グリシンメチルエステルとトリチル基で水酸基を保護した3-ブromo-1-プロパノールを、溶媒に乾燥ジメチルホルムアミドを用い、様々な塩基触媒を用いて反応を試みたが、目的物は得られなかった。そこでアルキル化剤に4-(ブromoメチル)安息香酸メチルを用い、塩基として水酸化カリウムを用いて反応を行った。反応混合物からモノアルキル化物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより単離した。

次に得られた*N*-(4-メトキシカルボニルベンジル)グリシンメチルエステルとパラホルムアルデヒドを用い、フッ素ポルフィリンへの1,3-双極子付加反応を試みた。反応は溶媒にトルエンを用い130 °Cで加熱還流することにより行った。反応の進行と共に溶液の色が緑色に変化し、またTLC上で新たなスポ

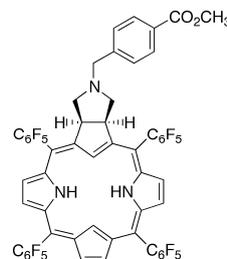


図5 C₅対称面上に官能基を導入したフッ素クロリン誘導体

ットが現れた。また反応混合物の電子吸収スペクトルにはクロリン環に特徴的な 650 nm 付近の吸収帯が現れていることから、N-(4-メトキシカルボニルベンジル)ピロリジン環の生成が確認された(図 5)。しかしながらこの反応は収率が極めて低く、これ以降の誘導体合成にはより反応性の高い 1,3-双極子の合成が必要不可欠であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Makoto Obata, Shiho Hirohara, Rika Tanaka, Isamu Kinoshita, Kei Ohkubo, Shunichi Fukuzumi, Masao Tanihara, Shigenobu Yano, In Vitro Heavy-Atom Effect of Palladium(II) and Platinum(II) Complexes of Pyrrolidine-Fused Chlorin in Photodynamic Therapy, *J. Med. Chem.*, in press (2009). 査読有
2. Shiho Hirohara, Makoto Obata, Hiroki Alitomo, Kohei Sharyo, Tsuyoshi Ando, Shigenobu Yano, Masao Tanihara, Synthesis and Photocytotoxicity of S-Glycosylated 5,10,15,20-Tetrakis(tetrafluorophenyl)porphyrin Metal Complexes as Efficient $^1\text{O}_2$ -Generating Glycoconjugates, *Bioconjugate Chem.*, in press (2009). 査読有
3. Shiho Hirohara, Makoto Obata, Hiroki Alitomo, Kohei Sharyo, Shin-ichi Ogata, Chikara Ohtsuki, Shigenobu Yano, Tsuyoshi Ando, Masao Tanihara, Structure-Photodynamic Effect Relationships of 24 Glycoconjugated Photosensitizers in HeLa Cells, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2265-2272 (2008). 査読有
4. Makoto Obata, Shiho Hirohara, Kohei Sharyo, Hiroki Alitomo, Kazumi Kajiwara, Shin-ichi Ogata, Masao Tanihara, Chikara Ohtsuki, Shigenobu Yano, Sugar-dependent photodynamic effect of glycoconjugated porphyrins: A study on photocytotoxicity, photophysical properties and binding behavior to bovine serum albumin (BSA), *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 1204-1211 (2007). 査読有
5. Makoto Obata, Mako Morita, Kayoko Nakase, Kazunori Mitsuo, Keisuke Asai, Shiho Hirohara, Shigenobu Yano, Synthesis and Photophysical Properties of Rhodamine B Dye-bearing Poly(isobutyl methacrylate-co-2,2,2-trifluoroethyl methacrylate) as a Temperature-Sensing Polymer Film", *J. Polym. Sci. A Chem.*, **45**, 2876-2885 (2007). 査読有
6. Naoko Araki, Yutaka Amao, Takuzo Funabiki, Masanobu Kamitakahara, Chikara Ohtsuki, Kazunori Mitsuo, Keisuke Asai, Makoto

Obata, Shigenobu Yano, Optical oxygen-sensing properties of porphyrin derivatives anchored on ordered porous aluminium oxide plates, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **6**, 794-803 (2007). 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Makoto Obata, Syntheses and Applications of Polymeric Materials having Photosensitizing Functionality, The 12th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Advanced Nanomaterials New Concepts and Technologies - Invited Session I, 2008年6月30日, Rosen Centre Hotel (Orland, Florida, USA)
2. 小幡誠, 大竹絵依子, 廣原志保, 谷原正夫, 矢野重信, クロリン環を光増感部位として有する糖質高分子の合成と光線力学療法への応用, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム(第23回生体機能関連化学シンポジウム), 2008年9月18日, 東京工業大学
3. 佐久間志帆, 廣原志保, 谷原正夫, 小幡誠, 三方裕司, 船引卓三, 矢野重信, 光線力学療法用糖連結フッ素ポルフィリン誘導体の合成とその光毒性, 日本化学会第88春季年会, 2008年3月26日, 立教大学
4. 大竹絵依子, 廣原志保, 谷原正夫, 小幡誠, 三方裕司, 船引卓三, 矢野重信, フッ素ポルフィリンのリビングラジカル重合による糖質高分子の合成と光線力学療法への応用, 日本化学会第88春季年会, 2008年3月26日, 立教大学
5. Shiho Sakuma, Makoto Obata, Yuji Mikata, Takuzo Funabiki, Shigenobu Yano, Synthesis of Glycoconjugated Fluorochlorin Derivatives and Their Application for Photodynamic Therapy (PDT), 14th International SPACC-CSJ Symposium, 2007年12月20日, National Taiwan University (Taipei, Taiwan)
6. Eiko Otake, Makoto Obata, Yuji Mikata, Takuzo Funabiki, Shigenobu Yano, Novel Approach for the Synthesis of Fluorochlorin Derivatives by Radical Addition and Their Application for Photodynamic Therapy (PDT), 14th International SPACC-CSJ Symposium, 2007年12月20日, National Taiwan University (Taipei, Taiwan)
7. Makoto Obata, Shiho Hirohara, Masao Tanihara, Rika Tanaka, Isamu Kinoshita, Kei Ohkubo, Shunichi Fukuzumi, Shigenobu Yano, Synthesis, Characterization and In Vitro Photocytotoxicity of Novel Fluorinated Metallochlorins for Photodynamic Therapy Photosensitizers, 14th International SPACC-CSJ Symposium, 2007年12月20日, National Taiwan University (Taipei, Taiwan)
8. Makoto Obata, Kazunori Mitsuo, Hiroki Nagai, Keisuke Asai, Kazue Wakashi, Shiho

Hirohara, Masao Tanihara, Atsushi Narumi, Toyoji Kakuchi, Shigenobu Yano, Synthesis of Polymers having Photosensitizing Moieties for Pressure/Temperature-Sensitive Paint and Photodynamic Therapy, International Symposium on Advanced Macromolecules and Nano-materials with Precisely Designed Architectures, 2007 年 10 月 4 日, Hokkaido University

9. 小幡誠, 廣原志保, 谷原正夫, 田中里佳, 木下勇, 大久保敬, 福住俊一, 矢野重信, 糖分子を機能素子とするフッ素クロリン誘導体の合成と光細胞毒性, 第 22 回生体機能関連化学シンポジウム, 2007 年 9 月 28 日, 東北大学

10. 小幡誠, 廣原志保, 谷原正夫, 田中里佳, 木下勇, 大久保敬, 福住俊一, 矢野重信, フッ素クロリン金属錯体の光化学的性質と光線力学療法への応用, 第 20 回配位化合物の光化学討論会, 2007 年 8 月 7 日, シーサイドホテル舞子ビラ神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小幡 誠 (OBATA MAKOTO)

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・助教
研究者番号：70343267

(2) 研究分担者

矢野 重信 (YANO SHIGENOBU)

京都大学・産学官連携センター・寄付研究部門教員

研究者番号：60011186