

平成21年6月18日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790043
 研究課題名 (和文) 固形腫瘍に対する光線力学療法剤を志向した活性酸素発生物質の開発
 研究課題名 (英文) Development of ROS (Reactive Oxygen Species) Generating Agents for Photodynamic Therapy
 研究代表者
 中西 郁夫 (NAKANISHI IKUO)
 独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・主任研究員
 研究者番号：70356137

研究成果の概要：低酸素状態の固形腫瘍に有効な光線力学療法剤を開発する目的で、非酸素存在下、ピリジン *N*-オキシド構造を有する化合物を光電子移動還元し、その活性酸素種生成反応について検討した。その結果、ニトロ基などの電子求引性置換基を有するピリジン *N*-オキシドの一電子還元体は比較的安定であるのに対し、無置換のピリジン *N*-オキシドの場合には、N-O結合が開裂してヒドロキシルラジカルを生成することがわかった。以上の知見に基づき、新規化合物の設計を行った。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,200,000 | 0 | 2,200,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 330,000 | 3,630,000 |

研究分野：生命物理化学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：癌・薬学・有機化学・活性酸素種・放射線・ラジカル・光線力学療法・反応機構

1. 研究開始当初の背景

生体内で活性酸素種を発生して DNA 切断活性を示す化合物は、発がんや老化のメカニズムを解明する上で重要であるばかりでなく、がん細胞の DNA を選択的に損傷させることができれば、がんの治療薬として応用できる可能性があり、非常に興味深い。特に光非照射下では生体毒性をまったく示さず、光照射下でのみ活性酸素種を発生し、DNA 切断活性を発現する化合物は、がんの光線力学療法に応用できるため、近年、国内外で活発な研究が行われている (Armitage, B. *Chem. Rev.* **1998**,

98, 1171)。光は、その強度や波長の制御が容易で非常に扱いやすく、化合物固有の吸収波長の光を照射することで、選択的に活性の高い励起状態をつくりだすことができる。特に、400 nm 以上の可視光領域に吸収をもつ化合物は、照射光が生体組織に吸収されずに生体内深部まで到達できるため、光線力学療法剤として極めて有用であると考えられる。しかし、これまで可視光照射により高量子収率で活性酸素を発生し、効率良い DNA 切断活性を示す化合物の報告例は少ない。特に、進行がんの固形腫瘍は低酸素状態にあるため、酸

素非存在下でも活性酸素を生成できる化合物が望まれているが、その例は極めて少ない (Brown, J. M. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 5863)。一方、放射線も生体深部にまで到達できるため、放射線照射によって活性酸素種を生成する化合物もがんの治療薬となり得る。そこで本研究では、研究代表者がこれまで行ってきた活性酸素種生成と消去のスピントラップ法による検出に関する研究をさらに発展させ、酸素非存在下で可視光照射または放射線照射することによって高効率で活性酸素種を生成し、DNA 切断活性を示す化合物を開発し、低酸素状態にある固形腫瘍に対するがん光線力学療法剤への応用を目指す。

2. 研究の目的

低酸素状態にある固形腫瘍に対する光線力学療法剤を開発する目的で、酸素非存在下、可視光照射または放射線照射することによって高効率で活性酸素種を発生して DNA 切断活性を示す化合物を開発する。開発する化合物の基本骨格として、ピリジン N-オキシド化合物に着目する。ピリジン N-オキシド化合物は、一電子還元すると N-O 結合が開裂し、活性酸素の中でもっとも強力な酸化力をもつヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)を生成し、DNA 切断活性を示すと言われている。しかし、 $\cdot\text{OH}$ 生成の実験的な証拠はまだ報告されていない。そこで本研究では、ピリジン N-オキシド化合物による DNA 切断の活性種は何かを調べる目的で、まず、種々の置換基を有するピリジン N-オキシド (RPyO) の一電子還元体の反応挙動を分子論的に明らかにし、RPyO の一電子還元に対する構造-反応性相関のライブラリを構築する。次に、生体内における還元剤であるジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) のモデル化合物を用い、RPyO の光還元反応について検討する。さらに得られた知見に基づき、分子内に RPyO 部位および NADH モデル部位の両方を有する新規化合物を合成し、光反応挙動および光 DNA 切断活性について検討する。また、放射線照射により水から発生する水和電子によるピリジン N-オキシド化合物の還元反応および活性酸素生成反応についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 種々の置換基 R をもつピリジン N-オキシド (RPyO; R = MeO, Me, H, CN, NO₂, etc.) の一電子還元電位 (E_{red}^0) は、酸素非存在下、ALS 630A 電気化学アナライザーを用いてサイクリックボルタモグラム (CV) を測定することにより決定した。対応する一電子還元体ラジカルアニオン (RPyO $^{\cdot-}$) が不安定で、可逆な CV が得られなかった場合には、第二高調波交流ボルタンメトリー (SHACV) 法により E_{red}^0 値を決定した。

(2) RPyO の一電子還元体を得るための RPyO と NADH モデルとの光反応は、アジレント 8453 フォトダイオードアレー分光光度計および島津製作所 RF-5300PC 分光蛍光光度計を用い、紫外可視吸収スペクトル変化で追跡した。

(3) ラジカル中間体の検出およびキャラクタリゼーション、スピントラッピング法による活性酸素種の検出には、日本電子 JES-ME-LX 型 X バンド電子スピン共鳴 (ESR) 測定装置を用いた。

4. 研究成果

(1) 種々の置換基 R をもつピリジン N-オキシド (RPyO; R = MeO, Me, H, CN, NO₂, etc.) (図 1) の一電子還元電位 (E_{red}^0) を決定するため、酸素非存在下、サイクリックボルタモグラフィー法により RPyO のサイクリックボルタモグラム (CV) を測定した。その結果、R = NO₂ などの電子求引性置換基をもつ RPyO は、無置換の PyO (R = H) に比べて高い E_{red}^0 値をもつことがわかった。以上の結果から、ピリジン N-オキシドの置換基 R を変えることにより、その酸化還元特性を精密に制御できることがわかった。

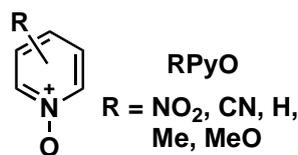


図 1. ピリジン N-オキシド

(2) RPyO の一電子還元体を得るために、酸素非存在下、25°C で、RPyO とジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) モデルである 1-ベンジル-1,4-ジヒドロニコチンアミド (BNAH) (図 2) との光反応を行った。その結果、RPyO は対応するラジカルアニオン RPyO $^{\cdot-}$ に還元されることがわかった。R = H の場合には、ラジカルアニオンが極めて不安定であるのに対し、R = NO₂ の場合には、NO₂PyO $^{\cdot-}$ を電子スピン共鳴 (ESR) 法で直接検出することができ、その ESR スペクトルの超微細構造から NO₂PyO $^{\cdot-}$ の詳細な電子構造を明らかにすることができた。

(3) RPyO と BNAH との光反応で生成した RPyO $^{\cdot-}$ による活性酸素種生成の反応性を DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) によるスピントラッピング法で検討した。その結果、R = H の場合には、DMPO-OH に特徴的な ESR シグナルが観測され、HPyO $^{\cdot-}$ から効率良くヒドロキシルラジカルが生成することがわかった。一方、NO₂PyO $^{\cdot-}$ は比較的安定なため、ヒドロキシルラジカルの生成は観測さ

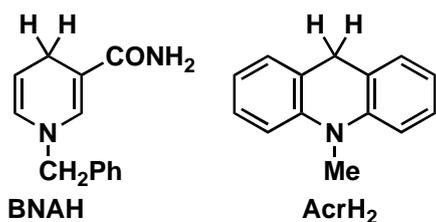


図2. NADHモデル

れなかった。

(4) RPy0の一電子還元剤として、ジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)のモデル化合物である10-メチル-9,10-ジヒドロアクリジン(AcrH₂) (図2)の光酸化反応挙動について検討し、AcrH₂が光照射により優れた還元剤として作用することを確認した。

(5) RPy0部分とAcrH₂部分を共有結合で連結した新規化合物Py0-AcrHを設計した(図3)。Py0-AcrHに光照射すると、AcrHの励起状態からPy0部分に分子内電子移動が起こり、Py0は一電子還元されると考えられる。生成したPy0の一電子還元体は上述のようにN-O結合の開裂を受け、活性酸素種の中でも最も酸化力が強いヒドロキシルラジカル(\cdot OH)を生成すると考えられる。

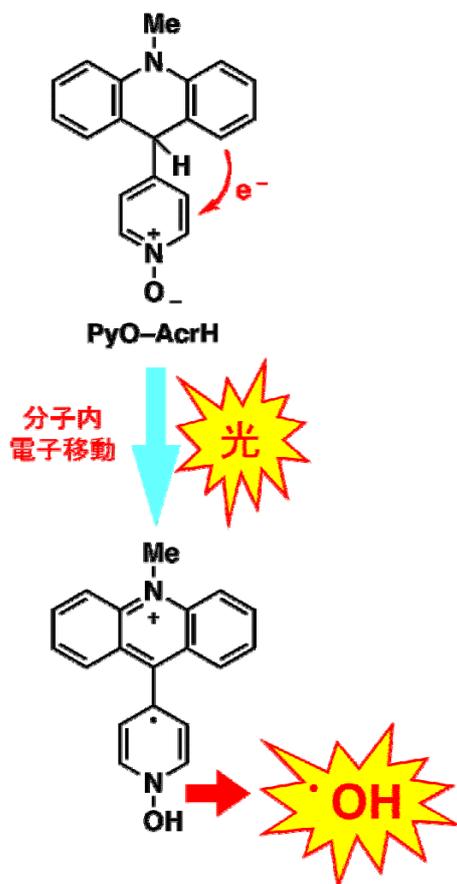


図3

Py0-AcrHの合成については、引き続き現在検討中であるが、Py0-AcrHが合成できれば、非酸素存在下でも光照射することにより高効率で活性酸素種を発生するがん光線力学療法剤の候補物質を開発できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 松本謙一郎、岡城 彩、永田 桂、William G. DeGraff、乳井美奈子、上野恵美、中西郁夫、小澤俊彦、James B. Mitchell、Murari C. Krishna、山本晴彦、遠藤和豊、安西和紀、Detection of Free Radical Reactions in an Aqueous Sample Induced by Low Linear-Energy-Transfer Irradiation, *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 542-547 (2009) 査読有
- ② 岡城 彩、宇井伊織、Sushma Manda、中西郁夫、松本謙一郎、安西和紀、遠藤和豊、Intracellular and Extracellular Redox Environment Surrounding Redox-Sensitive Contrast Agents under Oxidative Atmosphere, *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 535-541 (2009) 査読有
- ③ Sushma Manda、中西郁夫、大久保 敬、薬丸晴子、松本謙一郎、小澤俊彦、伊古田暢夫、福住俊一、安西和紀、Nitroxyl Radicals: Electrochemical Redox Behaviour and Structure-Activity Relationships, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 3951-3955 (2007) 査読有
- ④ Sushma Manda、中西郁夫、大久保 敬、川島知憲、松本謙一郎、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、安西和紀、Effect of Solvent Polarity on the One-Electron Oxidation of Cyclic Nitroxyl Radicals, *Chem. Lett.*, **36**, 914-915 (2007) 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 中西郁夫、抗酸化物質が関与するフリーラジカル反応のメカニズム解明に体する物理化学的アプローチ、第23回日本酸化ストレス学会関東支部会、2008年12月13日、横浜
- ② 松本謙一郎、中西郁夫、遠藤和豊、安西和紀、Free Radical Reactions in an Aqueous Sample Caused by Heavy-Ion (Carbon) Beam Irradiation, 15th Annual Meeting of the Society for Free Radical and Medicine, 2008年11月19-23日、米国インディアナポリス
- ③ 中西郁夫、電子スピン共鳴(ESR)法を用いた生体関連酸化還元反応機構の解明、第

47 回電子スピンサイエンス学会年会、
2008 年 10 月 1-3 日、福岡

- ④ 安西和紀、盛武 敬、松本謙一郎、中西郁夫、Kailash Manda、上野恵美、Detection of Heavy-Ion Particle Radiation-Generated Free Radicals and Modification of Their Biological Effects, A Joint Conference of 13th In Vivo EPR Spectroscopy & Imaging and 10th International EPR Spin Trapping/Spin Labeling、2008 年 9 月 28-30 日、福岡

[図書] (計 4 件)

- ① 中西郁夫、独立行政法人 放射線医学総合研究所、放射線科学、2009 年、3 ページ
② 中西郁夫、電子スピンサイエンス学会、電子スピンサイエンス、2009 年、6 ページ
③ 中西郁夫、宇都義浩、大久保 敬、川島知憲、Sushma Manda、松本謙一郎、堀 均、福原 潔、奥田晴宏、伊古田暢夫、福住俊一、小澤俊彦、安西和紀、International Proceedings, XIV Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International、2009 年、4 ページ
④ 福原 潔、中西郁夫、電子スピンサイエンス学会、電子スピンサイエンス、2007 年、6 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 郁夫 (NAKANISHI IKUO)
独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医科学センター・主任研究員
研究者番号：70356137