

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03369

研究課題名(和文)ポルフィリン関連分子の医薬科学への多様な応用に関する研究

研究課題名(英文)Study on Application of Porphyrin-related molecules to Medicinal Sciences

研究代表者

樋口 恒彦(Higuchi, Tsunehiko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・名誉教授

研究者番号：50173159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学療法で適用外の深部がんへ適用可能にするための色素の開発を行った。ポルフィリン類似のバクテリオクロリン(BC)は、生体深部に到達できる近赤外光の照射により酸素を活性化する能力を有する。3タイプの異なるBCを合成し、ヒトがん細胞への光毒性を評価した結果、BC-1のみが極めて高い光毒性を有することを見出した。

次に、シトクロムP450と同じ配位構造を持つSR錯体が、プロスタグランジン(PG)生合成の共通中間体であるPGH2を皮膚創傷治癒促進効果を有する12-HHTに触媒的に高速変換した。SRやその類縁体をヒト細胞に投与したところ、SR錯体の投与は細胞の12-HHT量を高め医薬機能が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体透過性の高い近赤外光を利用可能なBCで光毒性の極めて高いものが得られたことは、これまでの光線力学療法(PDT)では適用外であった深部がんやサイズの大きいがんへの適用に道を拓く成果となる。PDTは患者への負担の少ない治療法であるため、その社会的意義は大きいと言える。また合成した3種のBCのうち1種のみ光毒性が高かったことは、BCの光毒性の本質解明の手がかりとなり得、学術的意義がある。SR錯体の細胞への投与により、12-HHTが増産されたことは、実際に細胞内でPGH2から12-HHTへの変換をSR錯体が行ったことを示唆する結果であり、細胞内での錯体の触媒機能が医薬へつながる学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We have developed a dye that can be applied to deep cancers that are not covered by conventional photodynamic therapy. Bacteriochlorin (BC), which is similar to porphyrin, has the ability to activate oxygen by irradiation with near-infrared light that can reach deep into the body. As a result of synthesizing three different types of BCs and evaluating their phototoxicity to human cancer cells, it was found that only BC-3 has extremely high phototoxicity. Next, an SR complex with the same coordination structure as cytochrome P450 catalyzed high-speed conversion of PGH2, a common intermediate in prostaglandin (PG) biosynthesis, to 12-HHT, which has a skin wound healing promoting effect. When SR and its analogues were administered to human cells, administration of SR complexes increased the amount of 12-HHT in the cells, suggesting in-cell catalyst and a medicinal function.

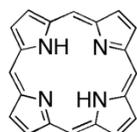
研究分野：医薬化学 生物無機化学

キーワード：bacteriochlorin near-infrared light photodynamic therapy phototoxicity heme thiolate prostaglandin 12-HHT in-cell catalyst

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

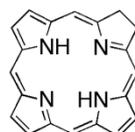
### 1. 研究開始当初の背景

光線力学療法(PDT)は、光増感作用を有する色素を癌などの患部に蓄積させ、必要な部位のみに光照射することで、細胞内で基底状態の酸素を一重項酸素に励起するなど細胞障害を起こし細胞死に至らしめる療法である。主に使用されるポルフィリン類縁体は、投与されると一旦全身に分布するが、2日ほどで大部分は排出され、一方、癌のような未熟な組織には残存するため、そこに光照射を行うことで選択的にガン組織を壊死させることができる。PDTは、副作用が少なく患者への負担が少ないため、優れた治療法と言えるが、照射する光が充分到達する部位でないと、癌を排除できず再増殖が起きることになる。研究開始当初に臨床現場で主に用いられていた色素は、代表的なレザフィリンを含めクロリン(Ch)類であり、660-670nm付近を励起光とするもので、ポルフィリンよりは長波長ではあるが生体透過性は十分ではなく、表面に現れた癌が対象であり、深部ガンやサイズの大きい癌は適用外であった。ここで我々が着目した色素がバクテリオクロリン(BC)であった。BCの励起波長は730-750nmとさらに長波長であり、Ch類のそれと比較して約2倍の生体透過性があると見積もられ、適用範囲を大幅に広げる可能性を持っていた。それまでもPDTを意識したBCに関する研究報告はいくつかあったが、めざましい生物活性を示すものまではなかった。BCにさらに癌選択性までを付与すれば優れた研究になると予想された。



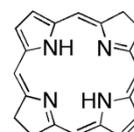
ポルフィリン  
(Por)

$\lambda_{\max}$  635 nm



クロリン  
(Ch)

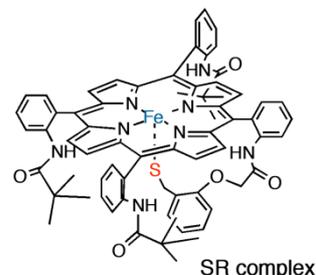
$\lambda_{\max}$  670 nm



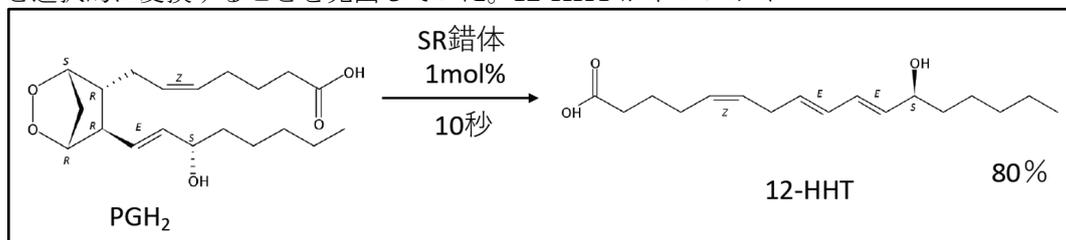
バクテリオクロリン  
(BC)

$\lambda_{\max}$  740 nm

もう一つの研究課題の背景としては、まず我々がその時既に薬物代謝酵素シトクロム P450 と同様の配位構造(チオラート軸配位ヘム)を有する錯体(SR錯体)の開発<sup>1</sup>に既に成功していたことがある。プロスタグランジン(PG)は、共通の中間体であり環状ペルオキシド構造を持つPGH<sub>2</sub>から各種酵素によってそれぞれのPGが生成されるが、そのうちの2つがシトクロム P450 型の酵素であることがわかっていた。このため、PGH<sub>2</sub>とSR錯体との反応を試みたところ、SR錯体が高速で触媒的にPGH<sub>2</sub>を不飽和脂肪酸12-HHTへと選択的に変換することを見出していた。12-HHTがトロンボキ



SR complex



サン B2 合成酵素によっても 50%生成するが、これが単なる副産物ではなく、12-HHTはBLT2受容体の内在性リガンドであり、皮膚創傷治癒に促進的に作用することが明らかになっていたこと<sup>2</sup>に気がついた(奥野ら、生化学 2015, 87 (1), 125)。また一方、SR錯体の類縁体として、硫黄をセレンに置き換えたセレンラート配位ヘム錯体の開発にも成功していた(Se-SR錯体)。Se-SR錯体は、アルキルヒドロペルオキシドを酸化剤とした触媒的酸化では、SR錯体の10倍以上活性が高いことも明らかにしていた。

### 2. 研究の目的

2つの課題のうち、PDTに関する研究の目的は以下の通りである。

ポルフィリン(Por)のメソ位を、芳香環ではないコンパクトで他の分子と結合容易な置換基のPorを合成し、それに対し、還元や環化付加によって数種のBCを合成し、その近赤外光励起による光増感能の評価を行う。それと同時にヒト細胞に投与し、730nm近赤外光を照射してその光毒性を評価し、構造と活性の相関を明らかにすることにより、優れた活性を持つBCを見出していくことを目的とする。また、開発したBCに、癌に高発現するxCTに親和性のある分子や癌抗原に対する抗体を結合させ、BCに癌選択性を持たせることにより、より優れたPDT剤の開発を目指す。

もう一つの課題については、SR錯体とその類縁体におけるPGH<sub>2</sub>→12-HHT変換機能の比較を行い、さらにヒト細胞に投与してもPGH<sub>2</sub>から12-HHTへの変換を促進するかどうかを検討し、SR錯体類が、皮膚創傷治癒を促進させる治療薬としての可能性を探ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

## I. BC 関連研究

ethyl glyoxylate とピロールから酸触媒を用いて *meso*-tetrakis(ethoxycarbonyl)porphyrin (TECP) を合成した。また、同様に *tert*-butyl glyoxylate を用いて *meso*-tetrakis(*tert*-butoxycarbonyl)porphyrin (TBCP) を得た。次に、TECP を基質として、以下の3つの反応に処することによりそれぞれ異なるタイプの BC を合成した。

(1) 1,3-双極子付加；(2) Diels-Alder 環化付加；(3) ジイミド還元

近赤外光 (730 nm) を、LED 型照射装置 (朝日分光製 CL-1501) を用いて照射し、一重項酸素生成能を、検出試薬 (2,5-diphenylfuran, SOSG 等) を用いて計測した。

ヒト細胞に BC をそれぞれ投与し、そこに近赤外光 (730 nm) を照射し、MTT アッセイにより IC<sub>50</sub> を求めた。

## II. チオラート配位ヘム及び類縁体に関する研究

チオラート配位ヘム 2 種及びセレノラート配位ヘム 2 種を合成した。セレノラート配位ヘムは、これまでの SR 錯体の合成法に準じて合成することができた。PGH<sub>2</sub> から 12-HHT への変換反応は、触媒を 0.2 mol% 用い重クロロホルム中 0°C で行い、反応開始後 5, 10, 15 秒後の NMR スペクトル観測により速度を求めた。また、研究協力者の順天堂大学大学院医学研究科の横溝岳彦教授にご協力いただき、P450 ミックスの細胞への投与によるエイコサノイド類の量的変化を網羅的に解析した。

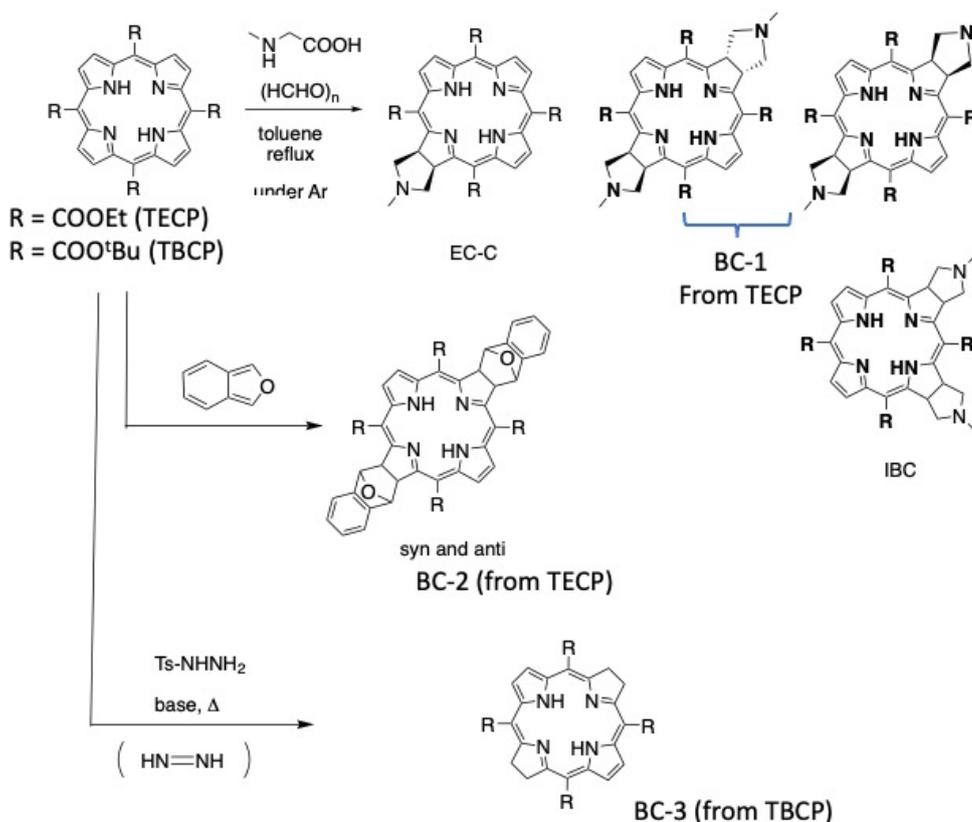
## 4. 研究成果

### I. BC 関連研究

TECP と、*N*-メチルグリシンとホルムアルデヒドとの反応で発生するアゾメチンイリドを反応させることにより、低収率ながら TECP の β 位二重結合に 2ヶ所環化付加が起きた BC (BC-1) が得られた。主生成物は 1ヶ所環化付加が起きた Ch 体であった。

次に、TECP と isobenzofuran とを加熱することで 2ヶ所の Diels-Alder 環化付加を行い、BC-2 を得た。

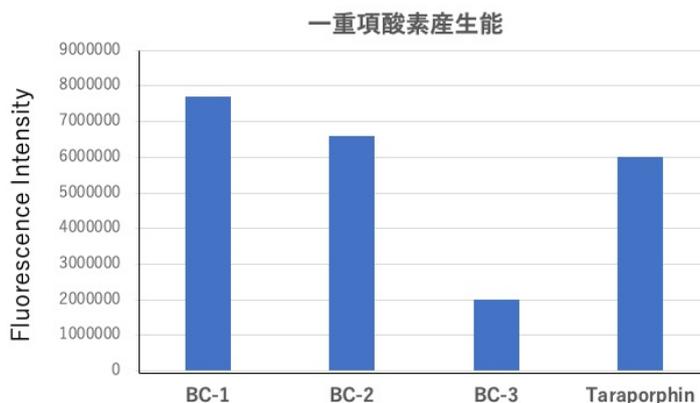
さらに、TBCP に対して塩基と tosylhydrazine から発生するジイミドで TBCP の β 位を還元することで BC-3 を得た。



それぞれの BC の紫外可視吸光スペクトルを測定したところ、最長極大吸収波長は以下の通り近赤外領域にあることが示された。

Bacteriochlorin	BC-1	BC-2	BC-3
最長極大吸収波長 in H <sub>2</sub> O	734 nm	728 nm	745 nm
最長極大吸収波長 in DMSO	742 nm	732 nm	750 nm

次に、BC 類の近赤外光 (730 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>) 照射時における一重項酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 生成能を、重水緩衝液中で <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 蛍光プローブの Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) を用いて評価した。また、対象化合物として既に用いられている Ch 型のタラポルフィン (レザフィリン) を用い (こちらは 660 nm 光照射) 比較した。次ページグラ



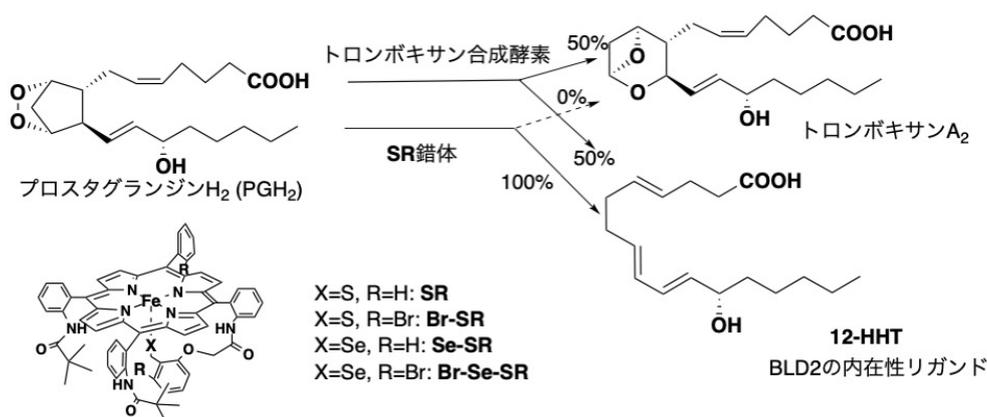
フに示すように、156 nM においていずれも <sup>1</sup>O<sub>2</sub> は生成したが、BC-3 の産生量は相対的に少なかった。BC-1, BC-2 とタラポルフィンと同レベルの <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 産生能を有すると考えられた。BC-3 は他に比べて疎水性の高い分子であるため、水中では凝集が起きてそのために <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 産生能が低くなっているのではないかと推測している。

次に、BC 類の近赤外光 (730 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>) 照射・非照射時における細胞への光毒性を評価した。用いた細胞は CFPAC-1 (ヒト膵臓腺癌)、JIMT-1 (ヒト乳癌)、BxPC-3 (ヒト膵臓癌)、NCI-H1299 (ヒト肺癌) である。光非照射下では、いずれも 1 μM では毒性を示さなかった。一方、光照射下では、BC-1 にのみ IC<sub>50</sub> が 18 nM 前後のかなり高い光毒性が認められた。これは BC としては最高レベルの近赤外光照射時の活性と言える。

細胞種	光非照射 (IC <sub>50</sub> nM)			730nm 光照射 (10 J/cm <sup>2</sup> ) (IC <sub>50</sub> nM)		
	BC-1	BC-2	BC-3	BC-1	BC-2	BC-3
CFPAC-1	>1000	>1000	>1000	18.2	>1000	>1000
JIMT-1	>1000	>1000	>1000	17.9	>1000	>1000
BxPC-3	>1000	>1000	>1000	18.3	>1000	>1000
NCI-H1299	>1000	>1000	>1000	18.8	>1000	>1000

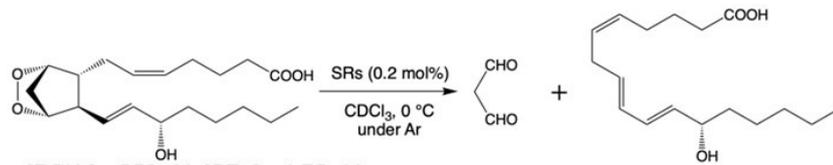
BC-1 と BC-2 では、近赤外光照射時の <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 産生能は同レベルであったのに対し、光毒性は BC-1 が圧倒的に高かった。このように <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 産生能のみで光毒性が説明できない理由は現時点ではわかっていない。ただ、BC-1 のみアミノ基を有していることから、それにより例えば細胞内の局在性に違いが出て、それにより光毒性に違いが出たことなどは考えられる。

## II. チオラート配位ヘム及び類縁体に関する研究

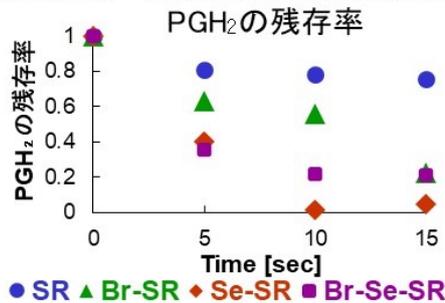


PGH<sub>2</sub> の環状ペルオキシド部分のみの SR 錯体による異性化・分解反応は既に報告していた。本研究では PGH<sub>2</sub> そのものを用いて実験を行った。PGH<sub>2</sub> から 12-HHT への変換反応は、触媒を 0.2mol% 用い重クロロホルム中 0°C で行い、反応開始後 5, 10, 15 秒後の NMR スペクトル観測により速度を求めた。SR の 1 秒間当たりの触媒回転数が 4 であったのに対し、セレンラート配位ヘムである Se-SR は 53 で 10 倍以上触媒活性が高く転換率も高かった。一方、Br-SR は SR の 2 倍程度の活性であった。反応が高速であるため、反応をより綿密に追跡する目

的で、PGH<sub>2</sub>の環状ペルオキシド部分であるEP1を合成し、それを基質としてストップフロー法により反応を観測した。その結果、SRを用いた場合にはトリ-tert-ブチルフェノールによるラジカル中間体の捕捉が明確に観測されたのに対し、Se-SRではほ



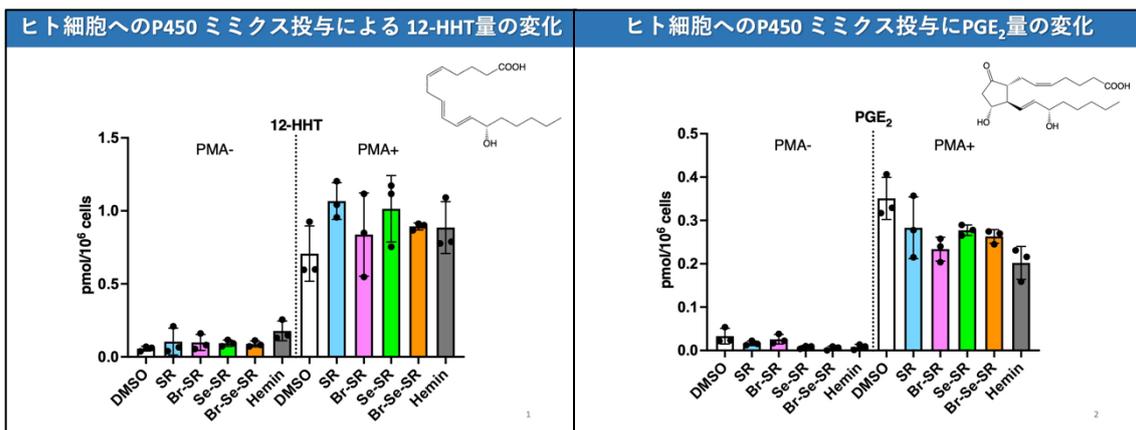
[PGH<sub>2</sub>] = 350 μM, [SRs] = 1.75 μM,  
[1,2,4,5-tetrachlorobenzene] = 150 μM (as an internal standard),  
[pyridine-d<sub>5</sub>] = 100 mM (as a reaction terminator)



PGH<sub>2</sub>変換反応における  
TOF (触媒回転速度)

Catalyst	TOF [s <sup>-1</sup> ]
SR	4.0
Br-SR	9.3
Se-SR	53
Br-Se-SR	24

とんど観測されなかったことから、反応機構がSRと異なることが示唆された。次に、SR及び類縁体のヒト細胞 (MEG-01S) への投与による12-HHTやプロスタグランジン類、11-HETEなどアラキドン酸由来酸化脂質の変動を網羅的に解析した。その結果、P450ミックスの投与により、どの化合物もそれらの変動を引き起こし、化合物間でも差異が観測された。SR 1 μM投与によって、ヒト細胞の12-HHTを1.5倍増加させ、一方、同様にPGH<sub>2</sub>から生合成されるPGE<sub>2</sub>は20%減少させることがわかった。PGE<sub>2</sub>の減少は鎮痛にもつながる。今のところ顕著な変化とまでは言えないものの、期待した方向への変化を細胞にもたすことが明らかとなった。今後P450ミックスの構造を、基質取込部位などを導入することによって種々改良して、より優れた機能を示す分子の開発を目指す。SRを始めとするP450ミックスは、細胞内で薬効につながる触媒機能を発揮した可能性が高く、生体内人工触媒の稀有の例となるため、今後この点を明確に実証していく。



#### 【文献】

1. T. Higuchi, S. Uzu, M. Hirobe *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7051
2. T. Okuno, Y. Iizuka, H. Okazaki, T. Yokomizo, R. Taguchi, T. Shimizu, *J. Exp. Med.*, **2008**, *205*, 759–766; 奥野ら、*生化学* **2015**, *87* (1), 125.
3. T. Yamane, K. Makino, N. Umezawa, N. Kato, T. Higuchi *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6438.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Amano Taisei, Inagaki Hideki, Shirakawa Yoshinori, Yano Yuuki, Hisamatsu Yosuke, Umezawa Naoki, Kato Nobuki, Higuchi Tsunehiko	4. 巻 94
2. 論文標題 New Strategy for Synthesis of Bis-Pocket Metalloporphyrins Enabling Regioselective Catalytic Oxidation of Alkanes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 2563 ~ 2568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20210236	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tsunehiko Higuchi
2. 発表標題 Heme chalcogenates: their distinct differences and similarities in spectroscopic and catalytic properties
3. 学会等名 23rd International Conference on Cytochrome P450 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樋口恒彦
2. 発表標題 酵素の活性発現戦略を組み入れた触媒分子の開発
3. 学会等名 生物無機化学シンポジウム2024 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Tsunehiko Higuchi
2. 発表標題 Synthetic heme chalcogenates: their marked differences and similarities in chemical and physicochemical property
3. 学会等名 12th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuuki Yano, Yoshinori Shirakawa, Yuto Tsuzuki, Naoki Umezawa, Yosuke Hisamatsu, Tsunehiko Higuchi
2. 発表標題 Synthetic Heme Alcoholate, Heme Thiolate and Heme Selenolate: Comprehensive Study on Their Difference in Chemical Properties and Reactivity
3. 学会等名 AsBIC 10 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋口恒彦
2. 発表標題 精密設計ヘム関連錯体による 生物無機化学研究
3. 学会等名 第30回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口恒彦、都築優斗、久松洋介、梅澤直樹、劉珉、佐伯和子、横溝岳彦
2. 発表標題 ヘム-チオラート錯体及び類縁体による環状ペルオキシドの試験管内及び細胞内変換反応
3. 学会等名 第56回酸化反応討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野雄輝、都築優斗、白川慶典、山根健浩、梅澤直樹、久松洋介、樋口恒彦
2. 発表標題 カルコゲナート軸配位ヘム：錯体間の化学特性の相違性と類似性
3. 学会等名 第2回 生命金属科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 都築優斗、矢野雄紀、山根健浩、久松洋介、梅澤直樹、樋口 恒彦
2. 発表標題 チオラート配位ヘム錯体類が触媒するプロスタグランジン H2 類の高速変換反応
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梅澤 直樹 (Umezawa Naoki)  (40347422)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授  (23903)	
研究分担者	久松 洋介 (Hisamatsu Yosuke)  (80587270)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師  (23903)	
研究分担者	池田 慎一 (Ikeda Shin-ichi)  (90254309)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授  (23903)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	横溝 岳彦 (Yokomizo Takehiko)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授  (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------