

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750145

研究課題名（和文） 高効率ケイ素型光増感色素を用いた近赤外光応答トリプルターゲティング癌治療薬の創製

研究課題名（英文） Development of near-IR responsive triple-targeting anti-cancer drug using efficient silyl-photosensitizer

研究代表者

堀内 宏明（HORIUCHI HIROAKI）

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00334136

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では近赤外光によるがん治療法の発展を目指し、ナノサイズのドラッグキャリアと光増感剤をオレフィンユニットにより連結した近赤外光応答型のドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発および近赤外光応答型の光増感剤の開発を行った。

一重項酸素によるオレフィンユニットの解離効率を決定し、近赤外光による薬剤放出の可能性を議論した。また、近赤外光照射によって高効率で一重項酸素を発生させるために光増感剤の改良を行った。

研究成果の概要（英文）：

To develop the near-IR responsive anticancer drug, we have developed the near-IR responsive drug delivery system, which consists with nanosized drug carrier, olefin unit, and photosensitizer, and efficient near-IR responsive photosensitizer.

We have estimated the dissociation efficiency of olefin unit by singlet oxygen and have discussed the possibility to release the photosensitizer from the nanosized carrier. We have also improve the photosensitizer by tuning light absorption efficiency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：光機能物質

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：がん、光、治療、一重項酸素、近赤外光

## 1. 研究開始当初の背景

がんは世界的に見ても主要な死亡原因であり、その治療法の発展は非常に重要である。光線力学療法は光を利用したがん治療法であり、腫瘍に集積した光増感剤を赤色～近赤外光によって励起すると、一重項酸素を増感し、この一重項酸素ががん細胞を攻撃することによりがん細胞だけを壊死させる治療法である。この治療では薬剤を注射して可視光を照射するだけでがんが治癒するため、患者への負担が非常に少ない夢のような治療法である。この治療は一部では既に臨床応用さ

れているが、現実には光増感剤の性能は十分ではなく、この手法を広く普及させるために光増感剤の改良が強く求められている。申請者らはこれまでにケイ素を含む様々な光機能性物質の研究を行ってきた。ケイ素は地殻中で酸素に次いで最も多く存在する元素(ユビキタス元素)であり、ケイ素の元素特性を最大限に活用して様々な機能性物質を創出することは元素小資源国である日本において重要な課題である。我々の研究成果の一部として、光増感剤にシリル基を導入すると(ケイ素型にすると)、1. 一重項酸素の生成

効率、2. がん細胞による薬剤の取り込み効率、3. 腫瘍への集積効率、を同時に向上させ、このシリル基の一石三鳥の効果によって、がんの治療効果が著しく向上することを見出してきた(図1)。

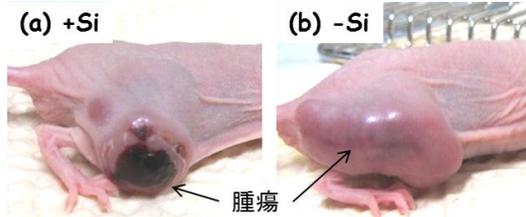


図1. ケイ素型光増感色素(a)と非ケイ素型光増感色素(b)を用いて治療した後の腫瘍の様子. ケイ素型においては腫瘍が壊死し、治癒した.

この様にシリル基の導入により、著しく治療効果を向上させることに成功したが、まだ腫瘍以外の正常組織にもわずかに光増感剤が分布しており、そのため今後は腫瘍集積効率をさらに向上させることが重要である。我々はナノ粒子のEPR (Enhanced Permeation and Retention) 効果を利用して腫瘍集積効率の向上を目指している。EPR 効果とは、腫瘍組織のみに血管細胞間に数百ナノメートルの隙間が存在し、直径 100 nm 程度のナノ粒子がこの隙間を通り腫瘍組織にのみ集積する効果である。ナノシリカの表面にケイ素型光増感剤を化学吸着させ、腫瘍集積効率の向上を目指してきた。さらに上記の研究を進展させるために紫外光照射によって崩壊するナノリポソームに光増感剤を担持させ(図2)、EPR 効果によって腫瘍に集積した段階で紫外光照射を行い、リポソームを崩壊させて光増感剤を放出(光投下)し、さらに近赤外光によって光線力学治療(光起爆)を行うトリプル・ターゲティングがん治療薬の開発を進行させている。我々が提案しているトリプルターゲティング型薬剤は腫瘍選択的な効果の良いがん治療につながることを期待できる。

しかしながら、トリプルターゲティングがん治療薬の鍵を握る光投下過程は、解離ユニットが励起状態において結合解離することに基いていた。この場合、結合を切るために高い励起エネルギーを必要とし、紫外光照射が不可欠であった。紫外光は生体透過性が著しく低いため、治療には適さず、効率良く生体を透過する近赤外光へのシフトが求められていた。

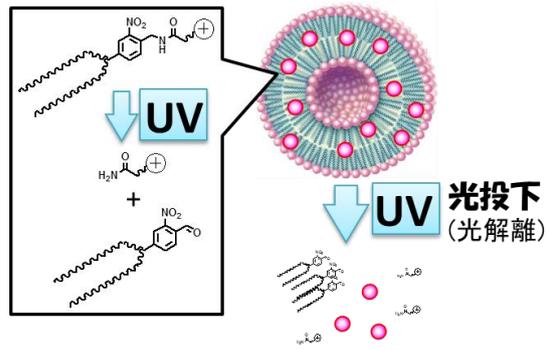


図2. 当時、開発中の光崩壊性リポソームの概略図

## 2. 研究の目的

本課題では、申請者がこれまでに開発してきた高効率な光がん治療(光線力学療法)用のケイ素型光増感剤と、近赤外光応答型 Drug Delivery System (DDS) を組み合わせることにより、三重の選択性を持って腫瘍のみを壊死させる近赤外光応答型のトリプル・ターゲティングがん治療薬を創製し、光線力学療法をベースとした新たな光がん治療法を開拓することを目的としている。(図3) ここで三重の選択性とは以下の三つの選択性を意味する。1. ナノキャリアーのEPR (Enhanced Permeation and Retention) 効果による腫瘍にのみ薬剤を集積させる、2. 腫瘍への近赤外光照射により腫瘍でのみ光増感剤の放出(光投下)させる、3. 腫瘍への近赤外光照射により光増感剤を励起し、一重項酸素を増感してがん細胞のみを死滅(光起爆)させる。具体的な目的は、1. 近赤外光によって高効率で一重項酸素を生成する光増感剤の開発、および2. 一重項酸素による薬剤放出システムの構築、することである。

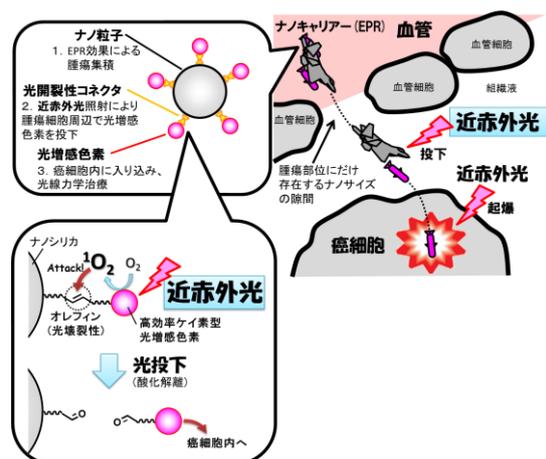


図3. 近赤外光応答型トリプル・ターゲティング(EPR・光投下・光起爆)型の薬剤を用いた癌治療法

## 3. 研究の方法

光増感剤の改良においては、ベンゾポルフ

イリン誘導体やクロリン誘導体を合成した。これらの光増感剤の励起状態緩和過程は分光光度計、蛍光分光光度計、ナノ秒蛍光寿命計、絶対蛍光量子収率計、ナノ秒過渡吸収測定装置、超音響測定装置などを用いて評価した。一重項酸素の生成効率を近赤外リン光測定によって決定した。培養がん細胞を用いた光増感剤の評価においては、がん細胞としてHeLa細胞を用いた。細胞内局在は蛍光顕微鏡を用いて評価した。細胞生存率はMTTアッセイにより決定した。

一重項酸素による薬剤放出システムの構築においては、一重項酸素によって解離するオレフィンユニットを合成した。このオレフィンユニットと一重項酸素の反応効率は一重項酸素の寿命測定によって評価した。

#### 4. 研究成果

近赤外光照射によって発生する一重項酸素を利用した薬剤放出システムを構築するために、まずは一重項酸素の光増感剤の開発を行った。これまでの研究によってテトラフェニルポルフィリン誘導体にシリル基を導入することによって一重項酸素の生成量子収率が向上することを見出してきた。さらに光線力学活性（光抗がん作用）もシリル化によって著しく向上した。しかしながらポルフィリン誘導体は赤色領域の吸収帯が弱い。シリルポルフィリンをベースに吸収効率を向上させるために、図4に示すクロリン誘導体およびベンゾポルフィリン誘導体を合成した。

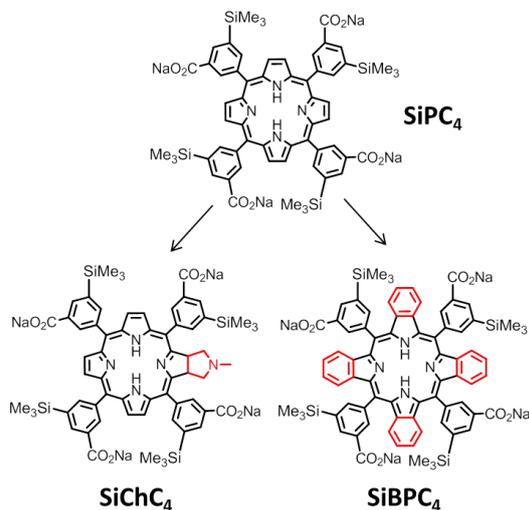


図4. シリル光増感剤の分子構造

クロリンはポルフィリン環の二重結合を一つ還元した構造を有し、分子の対称性がポルフィリンよりも低いため、対称禁制が部分的に解除され、高い分子吸光係数 $\epsilon$ を有することが知られている。シリルクロリンSiChC<sub>4</sub>の第一吸収帯の $\epsilon$ はシリルポルフィリンSiPC<sub>4</sub>に比

べて約7倍であった(図5)。クロリンにすることによる $\epsilon$ の増大により、蛍光放射速度定数が約5倍に増加した。これによって項間交差の量子収率が低下し、一重項酸素の光増感量子収率 $\Phi_{\Delta}$ は0.89倍とわずかに低下してしまった。しかしながら $\Phi_{\Delta}$ の減少よりも $\epsilon$ の増大のほうが大きいため全体的には高効率化できたと考えられる。そこで、次に培養がん細胞を用いた評価を行った。SiChC<sub>4</sub>を用いて培養したHeLa細胞の蛍光イメージはSiPC<sub>4</sub>と類似しており、Lysosomeに局在していることがわかった。また光増感剤を取り込んだHeLa細胞に光照射を行い光線力学活性の評価を行った。図6はHeLa細胞に光増感剤を投与し12時間後に光照射を行った際の細胞生存率の変化を示している。SiPC<sub>4</sub>に比べてSiChC<sub>4</sub>は約3倍の光線力学活性を示すことがわかった。

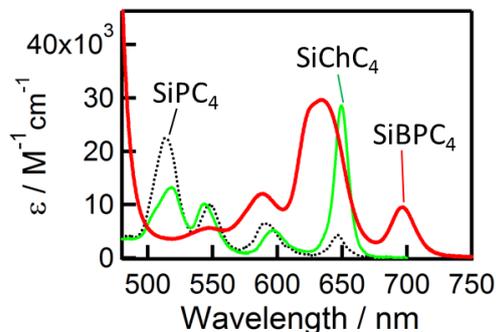


図5. SiPC<sub>4</sub>, SiChC<sub>4</sub>, SiBPC<sub>4</sub>の吸収スペクトル

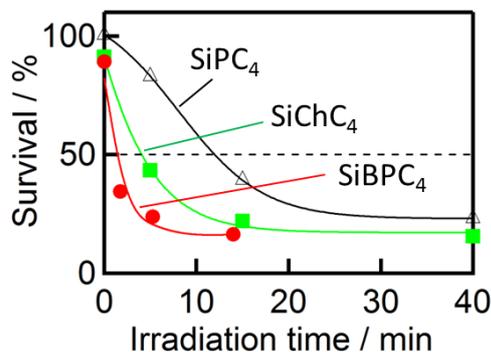


図6. 光照射によるSiPC<sub>4</sub>, SiChC<sub>4</sub>, SiBPC<sub>4</sub>を取り込んだHeLa細胞の生存率の変化

次にポルフィリン環の $\cdot$ 共役系を拡張したベンゾポルフィリンでは吸収帯の長波長シフトが見込める。そこで、SiPC<sub>4</sub>をベースとしたベンゾポルフィリン誘導体であるSiBPC<sub>4</sub>の合成を行った。SiBPC<sub>4</sub>の第一吸収帯はSiPC<sub>4</sub>よりも51 nm長波長シフトした700 nmに現

れ、 $\epsilon$ も約3倍に向上することがわかった(図5)。生体組織において最も光の透過率が高い波長は710 nmと報告されており、ほぼ理想的な吸収波長であったと言える。

シリルベンゾポルフィリンの励起状態緩和過程を研究した結果、吸収帯の長波長シフトによってエネルギーギャップ則に従い内部変換過程が増大し、項間交差の量子収率は約0.7倍に低下してしまった。この項間交差の量子収率の低下に伴い、 $\Phi_A$ も約0.7倍の0.48となってしまった。しかしながらクロリンと同様、吸収効率の改善の寄与のほうが大きいため、全体的には高効率化したと考えられる。そこで培養がん細胞を用いた評価を行った。まず細胞内局在はSiPC<sub>4</sub>やSiChC<sub>4</sub>と同様にLysosomeに局在することがわかった。両親媒性を表す1-オクタノール/水分配係数log PはSiPC<sub>4</sub>が2.3であるのに対して、SiBPC<sub>4</sub>では2.7以上と増大したが、HeLa細胞による取り込み効率はSiPC<sub>4</sub>の約0.9倍とわずかに減少してしまった。次にHeLa細胞に対する光線力学活性を評価した。 $\pi$ 共役系の拡張により、 $\Phi_A$ や細胞による取り込み効率はわずかに低下してしまったが、光吸収効率の増大により、光線力学活性は約10倍に向上することがわかった。

以上の結果から、従来のシリルポルフィリン誘導体の弱点であった光吸収効率を、クロリンやベンゾポルフィリンに変更することにより大幅な改善に成功した。そのため、キャリアから光増感剤を放出するために必要な一重項酸素を近赤外光照射によって効率よく発生できるように改善できたといえる。またこれらの化合物はキャリアから放出された後、効率良くがん細胞に取り込まれ、その後高い光線力学活性を示すことが明らかになった。

次に、一重項酸素による光増感剤の放出過程について研究を行った。薬剤放出の戦略はキャリアと光増感剤をオレフィンユニットで連結し、オレフィンユニットが一重項酸素と反応して開裂することを利用する。この一重項酸素とオレフィンユニットの反応効率が薬剤放出を行うのに十分であるかどうかを検討した。

オレフィンユニットには図7に示す化合物を用いた。この化合物は図7に示す反応により開裂することがMurthyらにより報告されている(*Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1041.)。一重項酸素とオレフィンの反応効率を調べるために、テトラフェニルポルフィリン(TPP)の光増感によって生成する一重項酸素の寿命を近赤外光測定によって調べた。一重項酸素とオレフィンの反応効率を上げるために、溶媒には一重項酸素の寿命が長いクロロホルムを用いた。TPP/クロロホルム

溶液にオレフィンを加え、オレフィンによる一重項酸素のクエンチングを調べた。(図8)

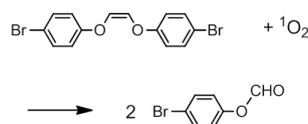


図7. 一重項酸素によるオレフィンユニットの開裂反応

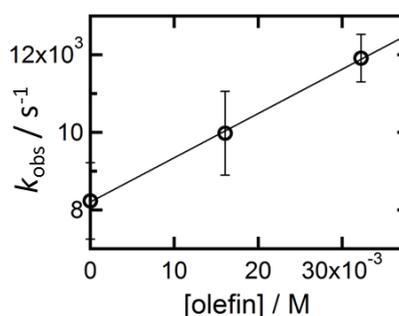


図8. 一重項酸素の玄瑞速度定数に及ぼすオレフィンの効果

これよりオレフィンによる一重項酸素のクエンチング速度定数 $k_q$ を調べた結果、 $1.1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ と求められた。この結果から、クロロホルム中(一重項酸素の減衰速度定数 $k_A = 8.2 \times 10^3 s^{-1}$ )、30 mMのオレフィンを用いた場合には式1よりオレフィンの解離量子収率 $\Phi_d$ は0.17と見積もられる。

$$\Phi_d = \Phi_A k_q [\text{olefin}] / (k_A + k_q [\text{olefin}]) \quad \text{式1}$$

図3に示すシステムでは、媒体は水であるため $k_A$ は $2.3 \times 10^5 s^{-1}$ となり、生体中でのオレフィン濃度[olefin]を1  $\mu M$ 程度と仮定すると $\Phi_d$ は $10^{-7}$ オーダーまで低下してしまう。図3に示す戦略では発生した一重項酸素が拡散してしまい、反応機構が二次反応になってしまう。そのためオレフィン濃度が不十分である場合、低い反応効率が予測されてしまう。従って、一重項酸素が拡散してしまうより前にオレフィンと反応できるような高密度な場を系に導入する必要があると言える。現在はそのような新しい反応系の再デザインを継続している。

## 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5件)

1, H. Hiratsuka, H. Horiuchi, T. Kudo, T. Minegishi, A. Yonemoto, N. Kusakari, T. Okutsu, N. Kamiyama, S. Murakami, Evidence

for the Specific Species of Benzyltriethoxysilane Derivatives with a High-coordination Silicon Atom, J. Phys. Chem. A, 査読有, in press.

2. H. Horiuchi, T. Kameya, M. Hosaka, K. Yoshimura, S. Kyushin, H. Matsumoto, T. Okutsu, T. Takeuchi, H. Hiratsuka, Silylation Enhancement of Photodynamic Activity of Tetraphenylporphyrin Derivative, J. Photochem. Photobiol. A, 査読有, 221, 2011, 98-104, DOI: 10.1016/j.jphotochem.2011.04.032

3. H. Horiuchi, S. Ishida, K. Matsuzaki, K. Tani, T. Hashimoto, H. Hotta, K. Tsunoda, T. Kodaira, T. Okutsu, H. Hiratsuka, Suppression mechanism of the photodegradation of J-aggregate thin films of cyanine dyes by coating with polysilanes, J. Phys. Chem. C, 査読有, 115, 2011, 6902-6909. DOI: 10.1021/jp109510x

4. M. Nishida, H. Horiuchi, A. Momotake, Y. Nishimura, H. Hiratsuka, T. Arai, Singlet molecular oxygen generation by water-soluble phthalocyanine dendrimers with different aggregation behavior, J. Porphyr. Phthalocyanines, 査読有, 15, 2011, 47-53. DOI: 10.1142/S1088424611003008

5. S. Haruta, H. Misawa, K. Ueno, Y. Yokota, H. Uehara, H. Hiratsuka, H. Horiuchi, T. Okutsu, Protein crystallization induced by strong photons-molecules coupling fields photochemical reaction, J. Photochem. Photobiol. A, 査読有, 221, 2011, 268-272. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2011.03.012

[学会発表] (計 23 件)

1. H. Horiuchi, Development of Silyl-photosensitizing Drug for Photodynamic Therapy, 日本化学会第 93 春季年会 Asia International Symposium: Photochemistry Division (招待講演), 2013 年 03 月 24 日, 草津.

2. H. Horiuchi, R. Ikeda, S. Akiyama, S. Ito, Y. Gomibuchi, Y. Saito, M. Hosaka, T. Okutsu, Improvements of Light Absorption Efficiency of Silyl-photosensitizing Drug for Photodynamic Therapy, 4th Asian Silicon Symposium, 2012 年 10 月 21 日~2012 年 10 月 24 日, Tsukuba.

3. H. Horiuchi, S. Akiyama, S. Ito, Y. Saito, M. Hosaka, T. Okutsu, Improvements of Silyl-photosensitizing Drug for Photodynamic Therapy, 2nd International

Symposium on Element Innovation, 2012 年 10 月 19 日~2012 年 10 月 20 日, Kiryu.

4. 堀内 宏明・秋山 真吾・池田 玲美・伊藤 智志・五味 潤 雄太・久新 莊一郎・奥津 哲夫, 光線力学療法に用いるシリル光増感剤の吸収特性の改良, 2012 年光化学討論会, 2012 年 09 月 12 日~2012 年 09 月 14 日, 東京.

5. 堀内宏明・寺嶋慶介・奥津哲夫・平塚浩士, シリルポルフィリンの光線力学作用に及ぼす中心金属の効果, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 26 日, 神奈川.

6. H. Horiuchi, K. Terashima, T. Okutsu, H. Hiratsuka, The effect of metal ion on the photodynamic activity of silylporphyrin, The First International Symposium on Element Innovation, 2011. 年 12 月 9 日, Kiryu.

7. 堀内宏明・眞塩広之・福田香奈・穂坂正博・石田真太郎・久新莊一郎・竹内利行・奥津哲夫・平塚浩士, 光線力学療法に用いるケイ素光増感剤の研究, 2011 年光化学討論会, 2011 年 9 月 6 日, 宮崎.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 含ケイ素置換基を導入した一重項酸素発生剤

発明者: 堀内宏明, 平塚浩士, 久新莊一郎, 松本英之, 田中統, 谷克彦, 佐藤健太, 吉村公男

権利者: 国立大学法人群馬大学

種類:

番号: 特許第 4899065 号

取得年月日: 平成 24 年 1 月 13 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 宏明 (HORIUCHI HIROAKI)

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 00334136

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し