

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790063

研究課題名（和文）がんの診断及びフォトダイナミック治療同時遂行を目指した次世代型光感受性薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of next generation of photosensitizer for fluorescent imaging and photodynamic therapy of cancer

研究代表者

神野 伸一郎 (KAMINO SHINICHIRO)

独立行政法人理化学研究所・複数分子イメージング研究チーム・研究員

研究者番号：20537237

研究成果の概要（和文）：

ABPX をフォトダイナミック治療の光感受性薬剤として応用する上で、化学種の構造同定と光物性との関連性を、詳細に精査した結果、キサントン環がプロトン化されたジカチオン型構造が高い光感受性と赤色の蛍光発光することを明らかにした。加えて、ジカチオン型構造は、アニオン種とイオン性の会合体を形成することで、凝集状態で高い光機能性を維持することを明らかにした。また、70%以上の高い発光効率を有する誘導体の創出に成功し、いずれの誘導体も高い光感受性を有し、高い水溶性と光安定性を示した。上記より、ABPX は有用な光感受性薬剤として有用な候補化合物であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We have designed and synthesized a new class of rhodamine dyes with an extended π -conjugated system, named 3',3''-bis(oxospiroisobenzofuran)-3,7-bis(diethylamino)benzopyrano-xanthene (ABPX01) dye. In this study, the investigations were carried out to reveal the relationships among the chemical species of ABPX01, the color, and the fluorescence emission in various solutions. ABPX01 had various forms: the spirolactone form (ABPX01⁰), which is colorless; and the monocationic form (ABPX01H⁺) and the dicationic form (ABPX01H₂²⁺), which are colored. ABPX01H₂²⁺ was identified to be a red fluorescent species. Detailed spectroscopic and electron microscopic investigations led to the assumption that the ABPX01H₂²⁺ formed ion associates with Cl⁻ as counter anions in HCl aqueous solution, and the nano- and submicrometer-sized colloidal aggregates of ABPX01 hydrochloride exhibit fluorescence emission. Good performance in fluorescent imaging demands large fluorescence quantum yields, and solubility in hydrosoluble media of the markers. We design and synthesize new ABPX derivatives in which the amino groups are incorporated into rigid six-membered rings. The relative fluorescence quantum yields of ABPX101H₂²⁺, ABPX102H₂²⁺, and ABPX103H₂²⁺ were drastically increased relative to that of ABPX01H₂²⁺. All ABPX derivatives commonly exhibited the well-developed bimodal fluorescence emission spectra over a wide range including red and NIR region. The intrinsic solubility of the ABPX dyes is favorable for the photosensitizers of fluorescent imaging and photodynamic therapy.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード： アミノベンゾピラノキサントニン系(ABPX)色素，蛍光イメージング，フォトダイナミック治療

1. 研究開始当初の背景

がんのフォトダイナミック治療法(PDT)は、光感受性薬剤(Photosensitizer; PS)とレーザー光によって引き起こされる光化学反応を利用し、がん組織中に活性酸素を発生させ、その力によってがん組織を死滅させるもので、患者の QOL を配慮した治療法として近年注目されている。PDT は外科的治療や化学的治療に比べ低侵襲性で、PS はがん病巣に集積するため正常組織への障害を最小限に抑え、選択的に治療することができる。しかしながら臨床現場で用いられる PS は、フォトフィリンなどのポルフィリン誘導体のみで、これら PS は、(1) がんを集積すると、PS 同士が凝集することで光感受性が急激に低下し、治療に必要な活性酸素を発生しにくくなるため、がんの大きさや進行状態に応じて送達薬物濃度を制御できない (2) がんを発現する標的分子への選択性が小さい (3) 光線過敏症やアレルギーなどの毒性を有する などの問題点を有しているため、PDT の実用化の事例は極端に少ない。一方、PDT 時のがん部位の特定や治療効果を解析する試みは全くなされていない。このように PDT の治療効果は PS の光物性や送達濃度に依存しているため、これら問題点を打破し、かつ、診断や治療効果を評価できる新たな PS の開発が切望されている。

2. 研究の目的

本研究は、報告者が発見、創製した凝集誘起発光増強性色素であるアミノベンゾピラノキサントニン系色素(ABPX)をがんの蛍光イメージングとフォトダイナミック治療が同時に可能な次世代型光感受性薬剤の開発に向け、[1] ABPX の化学構造と光物性の解明、[2] 凝集誘起発光増強特性の機構解明、[3] 新 ABPX 誘導体の合成と光物性の解明、に関する基礎研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

吸収スペクトルの測定：有機溶媒中での測定は、単独の有機溶媒に溶解させた 50 μM ABPX01 溶液を、0-15% TFA/有機溶媒混合でそれぞれ 10 倍に希釈し 5 μM としたものを用いた。また対照として、単独の有機溶媒を 0-15% TFA/有機溶媒混合溶液で 10 倍に希釈したものをブランクとして用いた。

蛍光量子収率測定：標準物質を RB としエタノール中での $\phi_{\text{fl}} = 0.73$ を基準として相対法にて測定した。サンプルは 2.5% TFA を含むクロロホルム混合溶媒溶解し、適当に希釈して 1 μM としたものを用いた。

4. 研究成果

[1] ABPX の化学構造と光物性の解明

ABPX の発光分子種の同定にあたり、まず発色分子種の吸収スペクトルの帰属を行った。スピロラクトン型分子種の ABPX01⁰ を溶解した各種有機溶媒にトリフルオロ酢酸 (TFA) を濃度依存的に加え、吸収スペクトルを測定・解析することで、ABPX の分子種とそれに相当する吸収スペクトル帰属を行った。まず TFA/テトラヒドロフラン (THF) 混合溶液中での ABPX01 の吸収スペクトルを測定したところ、THF のみに溶解した場合は 316 nm 付近に 1 つの吸収帯 (λ_{max}) を示して無色透明の溶液を示したが、0.5% の TFA を加えると新たに可視域に光吸収を持つ双峰性の吸収帯 ($\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}, 532 \text{ nm}$) があらわれ桃色の溶液を示した。続いて TFA 濃度を増加すると TFA 濃度依存的に $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}, 532 \text{ nm}$ の吸収帯の吸光度が増加し、328 nm に 1 つの等吸収点を示した。次に TFA/アセトン混合溶液中での実験では、ABPX01 を溶解した 0.1% TFA/アセトン混合溶液が $\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}, 531 \text{ nm}$ に双峰性の吸収帯を示して桃色の溶液を示し、TFA 濃度が増加すると $\lambda_{\text{max}} = 547 \text{ nm}, 593 \text{ nm}$ の双峰性の吸収帯が現れて紫色の溶液を呈した。このとき 445 nm に 1 つの等吸収点を示した。上記の実験結果から吸収スペクトルと分子種の帰属を以下のとおり考察した。まず TFA/THF 混合溶液中での実験結果から、THF 単独のとき示された 316 nm の吸収帯は無色透明の溶液であることから非共役型のスピロラクトン型分子種の ABPX01⁰ と帰属した。従って続いて現れた $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}, 532 \text{ nm}$ の双峰性の吸収帯はスピロラクトン型分子種の吸収帯 (316 nm) と 328 nm に等吸収点を示して平衡状態であったことからモノカチオン種 ABPX01H⁺ であると帰属した。即ち 0.1% TFA/アセトン混合溶液中で示された $\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}, 531 \text{ nm}$ の双峰性吸収帯は ABPX01H⁺ であることから、高濃度 TFA/アセトン混合溶液中で現れた $\lambda_{\text{max}} = 547 \text{ nm}, 593 \text{ nm}$ の双峰性の吸収帯はジカチオン種 ABPX01H₂²⁺ であると帰属した。一方、スペクトルの形状に着目すると ABPX01H⁺ および ABPX01H₂²⁺ はいずれも双峰性の吸収スペクトルを示したが、これは分子が基底一重項状態 (S_0) から最低振動準位 (S_1) に遷移する 0-0 遷移のときの光吸収と、更に高い振動準位 (S_2) に遷移する 0-1 遷移のときの光吸収に由来する振電スペクトルと考察した。これらの吸収スペクトルは密度汎関数 (DFT) 法による計算値と一致していた (Fig. 1)。

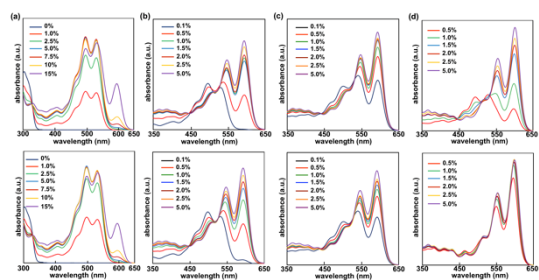


Fig. 1 Absorption spectra of 5 μM ABPX01 in various combinations of trifluoroacetic acid (TFA) and (a) THF, (b) acetone, (c) methanol, or (d) chloroform. Top panels: *trans*-ABPX01 and bottom panels: *cis*-ABPX01.

続いて、ABPX01の発光分子種を明らかにするために蛍光スペクトル測定を行った。ABPX01が発光性を示す条件として1% TFA/クロロホルム混合溶液中の5 μM ABPX01溶液を調製し吸収スペクトル並びに蛍光スペクトル測定を行った。その結果、ABPX01H₂²⁺を示す吸収スペクトルと蛍光スペクトルの形状が鏡像関係にあったことから、発光分子種はABPX01 H₂²⁺であることが分かった (Fig.2).

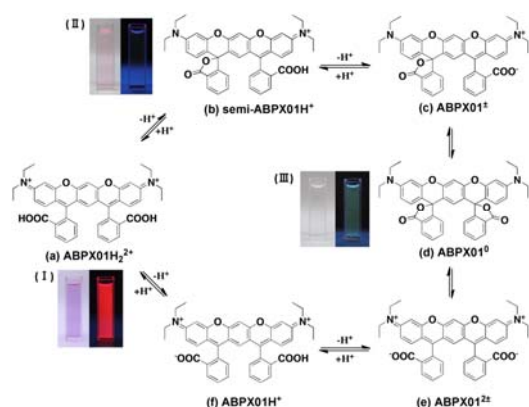


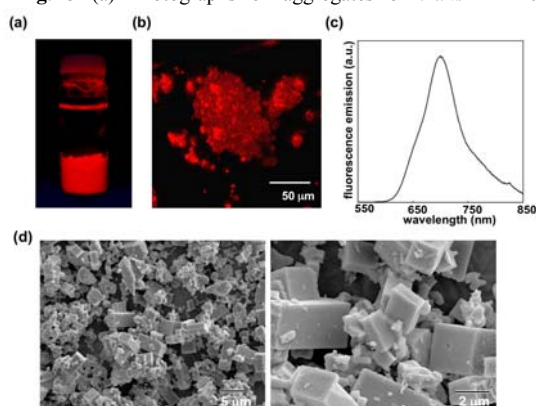
Fig. 2 Proposed protolytic reactions of ABPX01. ABPX01 is expected to exist in solution in an ionic form: (a) the dicationic form ABPX01H₂²⁺; (b) the semispirolactone-opening monocationic form semi-ABPX01H⁺; (c) the zwitterionic form ABPX01[±]; (d) the spirolactone form ABPX01⁰; (e) the zwitterionic form ABPX01^{2±}; and (f) the spirolactone-opening monocationic form ABPX01H⁺. Photographs of the respective chemical species under (left) room light and (right) 365 nm irradiation in (I) 1% TFA/chloroform mixture (ABPX01H₂²⁺), (II) 1% TFA/THF mixture (semi-ABPX01H⁺), and (III) THF solution (ABPX01⁰).

[2] 凝集誘起発光増強特性の機構解明

ABPX01⁰をTHF中へ溶解させた後、1Mの塩酸水溶液を加えたところ、ABPX01H₂²⁺のピークに帰属される発光凝集体の生成を確認した。その形態を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察したところ、500 nm以上の粒径を有するナノ粒子が観察された。またエネルギー分散型X線分光法(EDS)で組成分析を行なったところ、C, N, O, Clのピークがみられ、ABPX01H₂²⁺は水中で共存する塩化物イオン

(Cl⁻)とイオン対を形成することで、蛍光を有することが推定された。これらの結果を踏まえ、有機溶媒中でABPX01塩酸塩を合成し、その蛍光を測定したところ、同様の波長を有する固体蛍光が確認され、得られた発光粉末を粉末X線回折法により結晶性を有することを確認した。またABPX01塩酸塩を水溶液中へ溶解させ、濃度を変化させた際の蛍光並びに吸収スペクトルを測定したところ、ABPX01H₂²⁺は従来のローダミン系蛍光色素と比べて高濃度域でも消光しにくいことが分かった。色素濃度を上昇させた場合でも吸収波長は同一であり、色素間会合体に由来するピークは確認できなかったことから、ABPX01H₂²⁺は、ジベンゼンカルボン酸を有することで、蛍光団同士が会合しにくい構造であることが示唆された (Fig. 3).

Fig. 3 (a) Photographs of aggregates of *trans*-ABPX01



hydrochloride in 1 M HCl in diethyl ether/dichloromethane under 365 nm irradiation. (b) Confocal laser scanning microscopic images of the aggregates in powder form, (c) Solid-fluorescence emission spectra of the aggregates in powder form, obtained by excitation at 365 nm, and (d) SEM images of the aggregates in powder form.

[3] 新 ABPX 誘導体の合成と光物性の検討

新規 ABPX 誘導体の合成にあたって、まず ABPX01 の低い蛍光量子収率(ϕ_f)の原因が確かに分子内運動などの無放射失活に起因するかを確かめるために、分子内運動を抑制した溶媒(低温溶媒および粘性溶媒)における蛍光強度の測定を行った。低温溶媒として凝固点の低い(-98°C)メタノールを用い、1% TFA/メタノール混合溶液中で室温から-78°Cにわたる蛍光スペクトルを測定したところ、ABPX01は溶媒温度が低下するに従って蛍光強度が増大した。更に粘性溶媒としてグリセロールを濃度依存的に加えた1% TFA/メタノール混合溶液中での蛍光スペクトルを測定したところ、溶媒の粘度の増加に従って蛍光強度が増大した。これらの結果から ABPX01 は、確かに分子内運動が発光効率の低下に影響していることが明らかとなり、ABPX の高発光効率化において分子構造の剛直化が有効であることが確認された。従って ABPX01

の低い ϕ_f は、キサンテン環窒素部位のアルキル鎖構造の分子内回転運動により、熱放射などの無放射失活が蛍光放射に比べ優位になっていることに起因していると予想した。そこで窒素部位の構造的な剛直性を高めることで発光効率が向上できると考え、本作業仮説に基づいて、窒素部位を環状化した新規誘導体の ABPX101, 102 および 103 を合成した (Chart 1)。

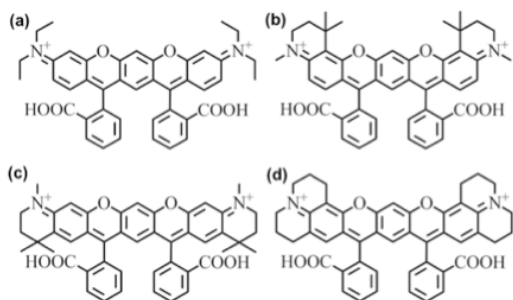


Chart 1. Chemical structures of (a) ABPX01, (b) ABPX101, (c) ABPX102 and (d) ABPX103.

続いて、新規 ABPX 誘導体の光物性を 2.5% の TFA を混合したクロロホルム中で評価したところ、いずれの誘導体においても ABPX01 に比べ、 ϕ_f が飛躍的に増大する結果となった (Table 1)。続いて各新規誘導体の蛍光寿命 (τ_f) を測定することで、放射速度定数 (k_f) 並びに無放射失活速度定数 (k_{nr}) をそれぞれ算出し、ABPX01 と比較することで、作業仮説の検証を行った。その結果まず k_f が *cis*-ABPX01 と *cis*-ABPX101, 102, 103 と比較していずれも $0.23 - 0.29 \text{ s}^{-1}$ でほとんど違いがないが、一方 k_{nr} は *cis*-ABPX01 の 1.17 s^{-1} 対し *cis*-ABPX101 が 0.23 、*cis*-ABPX102 が 0.12 s^{-1} 、*cis*-ABPX103 が 0.21 s^{-1} を示し大幅に減少したことが明らかとなった。これらの結果は *trans*-ABPX01, 101, 102, 103 においても同様であった。従って ABPX101, 102, 103 の ϕ_f の増大は k_{nr} の減少によることが明らかとなり、作業仮説「無放射失活が抑制されて蛍光量子収率 (ϕ_f) が増大する」が立証された。またいずれの誘導体も高い光感受性と水溶性、光安定性を示した。上記より、ABPX は有用な光感受性薬剤として有用な候補化合物であることが明らかとなった。

Dye	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{1}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}^{\text{1}}$ [nm]	$\epsilon_{\text{0-1}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$\phi_f^{\text{*1}}$	τ_f [ns]	k_f	k_{nr}
<i>cis</i> -ABPX01	598	622	128650	0.17	0.73	0.23	1.11
<i>trans</i> -ABPX01	601	625	98880	0.16	0.72	0.22	1.17
<i>cis</i> -ABPX101	617	640	108167	0.50	2.17	0.23	0.23
<i>trans</i> -ABPX101	617	644	113112	0.49	1.96	0.25	0.26
<i>cis</i> -ABPX102	590	612	130298	0.70	2.43	0.29	0.12
<i>trans</i> -ABPX102	592	617	131231	0.69	1.74	0.40	0.19
<i>cis</i> -ABPX103	611	635	116960	0.55	2.17	0.25	0.21
<i>trans</i> -ABPX103	612	637	109375	0.54	2.36	0.23	0.19

Table 1. Photophysical properties of ABPX derivatives in 2.5% TFA/chloroform mixtures solution.

^{*1} ϕ_f are determined by using the reference standard dye of rhodamine B ($\phi_f = 0.73$ in ethanol).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- ① New aminobenzopyranoxanthene-based colorimetric sensor for Cu²⁺ with dual-color signal detection system, *Chem. Asian J.*, S. Shirasaki, S. Kamino, Watanabe, K, Y. Takeuchi, S. Komeda, S, Enomoto, in press (2013). 査読有
- ② Basicity of N-terminal amine in ATCUN peptide regulates stability constant of albumin-like Cu²⁺ complex, *Chem. Lett.*, T. Miyamoto, S. Kamino, A. Odani, M. Hiromura, S. Enomoto, in press (2013). 査読有
- ③ Development of new zinc dithiosemicarbazone complex for use as oral antidiabetic agent, *Biol. Trace. Elem. Res.*, S. Kadowaki, M. Munekane, Y. Kitamura, M. Hiromura, S. Kamino, Y. Yoshikawa, H. Saji, S. Enomoto, in press (2013). 査読有
- ④ A Red-Emissive Aminobenzopyrano-xanthene Dye: Elucidation of Fluorescence Emission Mechanism in Solution and Aggregate State. S. Kamino, A. Muranaka, M. Murakami, A. Tatsumi, N. Nagaoka, Y. Shirasaki, K. Watanabe, K. Yoshida, J. Horigome, S. Komeda, M. Uchiyama, S, Enomoto, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 2131 (2013). 査読有
- ⑤ Spectrophotometric determination of titanium with *o*-carboxyphenylfluorone in cationic micellar media, and its equilibrium and kinetic studies, M. Hoshino, S. Kamino, S. Mitani, M. Asano, T. Yamaguchi, Y. Fujita, *Talanta*, **15**, 2339 (2011). 査読有
- ⑥ Exploration of target molecules for molecular imaging of inflammatory bowel disease. K. Higashikawa, N. Akada, K. Yagi, K. Watanabe, S. Kamino, Y. Knayama, M. Hiromura, S. Enomoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **410**, 416 (2011). 査読有
- ⑦ Determination of Trace Aluminum by Fluorescence Quenching with *m*-Carboxyphenylfluorone as Analytical Reagent. M. Hoshino, S. Kamino, S. Takada, M. Ijyuin, M. Nakanishi, M. Naito, M. Asano, T. Yamaguchi, Y. Fujita, *Anal. Sci.*, **27**, 659 (2011). 査読有

〔学会発表〕 (計 10 件)

〔口頭発表〕

- ① 「 π 電子系拡張型構造を有する新規アミノベンゾピラノキサンテン系 (ABPX) 色素の合成と蛍光特性」 神野伸一郎, 堀込純, 榎本秀一, 第 13 回分子分光研究会 (岡山), 5 月 18 日 (2013).
- ② 「 π 電子系拡張型構造を有する新規アミノ

ベンゾピラノキサントレン系(ABPX)色素の合成と光化学的性質」神野伸一郎，堀込純，村中厚哉，内山真伸，榎本秀一，第 72 回分析化学討論会(鹿児島)，5 月 19 日(2012)。

③ 「 π 電子系拡張型構造を有する新規アミノベンゾピラノキサントレン系(ABPX)色素の合成と光化学的性質」神野伸一郎，村中厚哉，米田誠治，堀込純，廣村 信，内山真伸，榎本秀一，日本化学会第 92 春季年会(神奈川)，3 月 27 日(2012)。

④ 「Design and Syntheses of Rhodamine Dyes with Aggregation-Induced Emission」Shinichiro Kamino，Seiji Komeda，Jun Horigome，Kei Higashikawa，Keiko Watanabe，Yoshikazu Fujita，Makoto Hiromura，Shuichi Enomoto，IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011(Kyoto)，23，May (2011)。

[依頼・招待講演]

⑤ 「新規ローダミン系色素化合物」Nano tech 2012 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議(東京)，2 月 16 日(2012)。

⑥ 「生体内光イメージングを指向した次世代型蛍光性色素分子の開発研究」第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(岡山)，11 月 25 日(2011)。

⑦ 「イノベーション創出を目指した次世代型蛍光色素分子の開発と展望」第 41 回メディカルテクノかやま(岡山)，7 月 6 日(2011)。

C. ポスター発表

⑧ 「A red emissive aminobenzopyrano-xanthene dye (ABPX): elucidation of fluorescence emission mechanism in solution and aggregate states」S. Kamino，A. Muranaka，J. Hirogome，M. Uchiyama，S. Enomoto，ISACS2013 (Kyoto)，19，Jun (2013)。

⑨ 「 π 電子系拡張型構造を有する新規アミノベンゾピラノキサントレン系(ABPX)蛍光色素の合成と光化学的性質」神野伸一郎，村中厚哉，堀込純，内山真伸，榎本秀一，2012 年光化学討論会(東京)，9 月 12 日(2012)。

⑩ 「アミノベンゾピラノキサントレン系色素(ABPX)蛍光色素の立体構造に対する凝集誘起発光特性(AIEE)変化」神野伸一郎，村上美穂，堀込純，廣村 信，榎本秀一，第 24 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2011) (大山)，8 月 31 日(2011)。

[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：COMPOUND AND USE THEREOF

発明者：S. Kamino，S. Enomoto

権利者：S. Kamino，S. Enomoto

種類：production

番号：US8,134,017 B1

取得年月日：Mar.13, 2012

国内外の別：国内外

6. 研究組織

(1)研究代表者

神野 伸一郎 (KAMINO SHINICHIRO)

独立行政法人理化学研究所・複数分子イメージング研究チーム・研究員

研究者番号：20537237

(2)研究分担者

特になし

(3)連携研究者

特になし