

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670060

研究課題名(和文)光化学とリポソーム技術を融合した抗癌剤ドキシフルリジン放出剤の構築と能力評価

研究課題名(英文) Development and efficiency of a photoactivated doxifluridine donor encapsulated in liposome

研究代表者

犬井 洋 (INUI, Hiroshi)

北里大学・理学部・講師

研究者番号：20348600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌の化学療法は有効であるが、多くの場合正常組織への攻撃に伴う副作用を生じる。この問題を最小化するために、ドキシフルリジン(DF)を光化学的に放出する分子の構築を行った。光反応は照射条件を制御することで、望む時間と位置で反応を誘起することができる。またDFは癌細胞内で高発現される酵素によって抗癌剤へと変換される薬剤である。従って、このような光反応とDFの性質を融合することで劇的な副作用の軽減化が期待される。本研究では、ニトロキノリル基を有する新規光DF放出剤を合成し、それらの光反応性を定評のあるニトロベンジル保護基を有する放出剤と比較した。更に細胞への導入実験を行い光照射に伴う致死効果を調べた。

研究成果の概要(英文)：In cancer therapy, the ability to destroy tumor tissue rather than normal tissue is important for reducing side effect. To achieve this goal, I developed photoactivated anticancer prodrugs to release doxifluridine (DF). Photoreactions allow a reaction to be induced the desired time and space through the control of irradiation conditions. DF is known to undergo conversion to cytotoxic 5-fluorouracil catalyzed by an enzyme, which is more highly expressed in cancer cells than in normal ones. Therefore, the combination of this high-priority DF conversion in cancer cells with the target selectivity of photoreaction should lead to a further decrease of the side effects. In this work, photochemical DF donors having a newly developed nitroquinolyl protecting group were synthesized, and the photoreactivity were compared to that of other DF donors possessing the widely used 2-nitrobenzyl groups. Furthermore, the behavior of the DF donors in living cells and their cytotoxicity were investigated.

研究分野：有機光化学

キーワード：光反応 ドキシフルリジン 抗癌剤 プロドラッグ 光分解性保護基

1. 研究開始当初の背景

光反応を利用する癌治療は、光照射の場所・時間条件を制御することで、癌組織を狙い撃ちすることが可能となり、副作用の軽減化に大きく寄与するものと期待される。現在の光線力学療法の主流は、癌組織集積性を有するポルフィリンを利用し、その光増感反応によって生成する活性酸素で癌細胞を破壊するものである。生体組織透過性の高い 630 nm 付近の可視光を利用できる点で優れているが、酸素分子がなければ反応は起こらず、実際、生体内の酸素濃度が低いことは問題点として指摘されている。また、放射線の電離作用を利用して癌を破壊する最新の光化学的な治療は、体外から照射可能であるため身体への負担が少ないことが利点であるが、照射部位周辺での局所的副作用の問題はある。これらの状況を踏まえ、本研究では、酸素分子に頼らず抗癌剤を直接的に効率良く放出できる分子の創製を目指す。また抗癌剤としてドキシフルリジン(DF)を用いるが、DFは癌細胞内で活性化酵素により5-フルオロウラシル(5-FU)へと変換されてはじめて制癌作用を示す。すなわちDFは正常組織にとって有害性の低いプロドラッグであり、このプロドラッグの性質と光反応の特徴を組み合わせて二重の有利性を獲得し、更にリポソームに封入することで血管透過性が亢進している腫瘍組織に集積し易くなれば、大幅な副作用の軽減化に繋がるものと考えられる。これが、本研究を着想するに至った背景である。

2. 研究の目的

(1) 1に記述した研究背景を踏まえ、光分解性保護基を用いて抗癌剤ドキシフルリジン(DF)を保護した種々の分子を合成し、それらの光吸収量や量子収率を測定することで光DF放出剤としての能力を評価すること

を目的とする。

(2) 合成した光DF放出剤について細胞内導入実験を行い、細胞内での構造変化、光化学的挙動、および細胞致死率を明らかにすることを目的とする。

(3) 光DF放出剤のリポソームへの担持を検討する。(これについてはレシチンを用いて検討したが、現段階では良好な結果が得られていない。)

3. 研究の方法

(1) 新規光分解性保護基としてニトロキノリル基を合成し、そこにDFを連結させることで光DF放出剤を創製した。また、そこに細胞内滞留性の向上を目的としてアセトキシメチル基を導入した分子も合成した。それらの溶液中での光反応をNMR、HPLC、積算光量計を用いて詳細に調べることでDF放出能力を求め、定評のある他の光分解性保護基を用いた場合のDF放出剤と比較した。

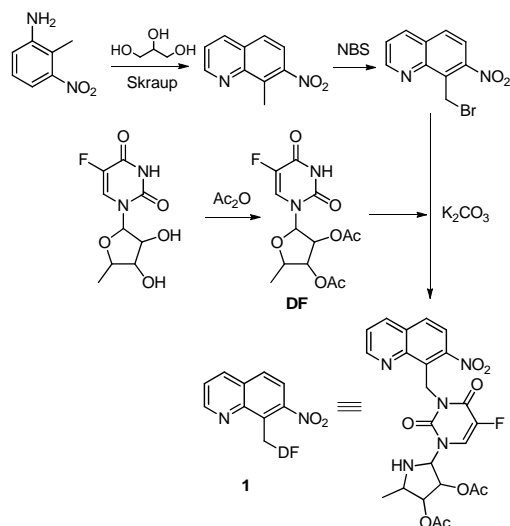
(2) ニトロキノリル基を有するDF放出剤について、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUBEC)に対する導入実験を行った。具体的には、まず培養液中にDF放出剤を添加し、その後細胞成分のHPLCやMS測定を行うことで導入の可否を判断した。その後、細胞への光照射を行い、細胞内でのDF放出を確認すると共に、トリパンブルー染色法による細胞致死率の算出を行った。

4. 研究成果

(1) 分子設計と合成

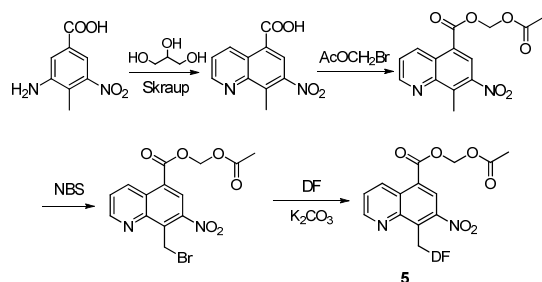
ニトロキノリル基を有する新規光ドキシフルリジン(DF)放出剤1および1にアセトキシメチル基を導入した5を合成した。1は2-メチル-3-ニトロアニリンからスクラウブ反応によりキノリン環を形成し、*N*-プロモスクシンイミド(NBS)を用いたメチル基のプロモ化、それに続くDFとのカップリングを

経て合成することができた。この際、DF は反応性の高い2つのヒドロキシ基をアセチル保護したものを使用し、細胞膜透過性を考慮し敢えて脱保護は行っていない (Scheme 1)。



Scheme 1. 分子 1 の合成経路

分子 5 の合成では、まず 3,5-ジニトロ-*p*-トルイル酸の片側のニトロ基のみをアミノ基へと還元した後、スクラウプ反応を施すことでカルボキシ基を有するキノリン環を合成した。この分子に対して酢酸プロモメチルをトリエチルアミン存在下で反応させることでアセトキシメチル基を導入し、その後 1 の合成と同様にプロモ化と DF とのカップリングを経て 5 を合成することができた。



Scheme 1. 分子 5 の合成経路

また、キノリル系放出剤 1 と 5 の光反応性や DF 放出能と比較するために、一般的によく知られた光分解性保護基を持つ 2-4 も合成した。それらの合成方法は相当するプロモメ

チル体に DF を作用させることにより行うことができた。

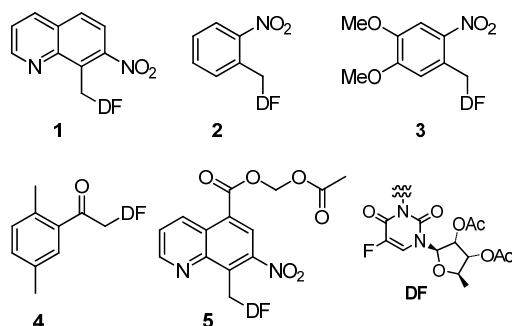


Figure 1. 光化学的 DF 放出剤 1 - 5

(2) $^1\text{H-NMR}$ による光反応の追跡

合成した分子の溶液中での光反応を行い、実際に DF が放出されているかを $^1\text{H-NMR}$ により調べた。分子 1-5 のアセトニトリル溶液に光照射 (365 nm) したのち、 $^1\text{H-NMR}$ により生成物解析を行った。またフタリドを内部標準として加え、ピーク積分比を利用して基質の分解率と消費された基質に対する DF 収率を求めた。Figure 2 は分子 1 の場合の 4.7-6.1 ppm 領域における $^1\text{H-NMR}$ スペクトル変化であり、最下段が照射前、中断が照射後である。光照射により 1 由来のシグナルが減少すると共に赤丸で示した新たなピークが出現してきた。これは生成物として期待される DF のピークと完全に一致したことから、光化学的に DF が放出されたことが確認された。

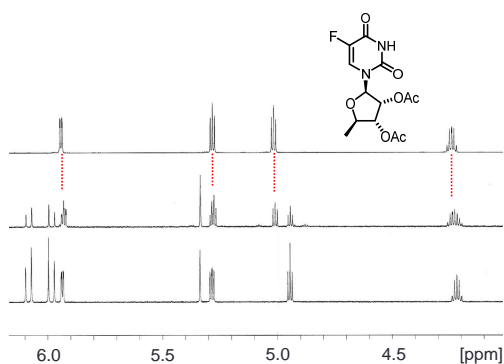


Figure 2. 分子 1 のアセトニトリル溶液中での光反応に伴う $^1\text{H-NMR}$ スペクトル変化 (上: DF、中央: 照射後、下: 照射前)

また Table 1 に示したように、照射時間 1 分での分解率を比較すると、キノリン骨格を持つ 1 および 5 でそれぞれ 67% と 45% であり、ベンゼン系の 2、3 および 4 では殆ど分解しないことが分かった。また、1 における DF 収率は 94% と極めて高く、分解した基質の大部分が DF を放出していることが分かった。2 と 3 については照射時間を 10 分にすることで基質の分解と DF の放出を確認することができたが、それでも分解率は 11-13% 程度と低いものであった。4 については、照射時間を 10 分にしてもほとんど分解せず、DF を確認することはできなかった。

Table 1. 分子 1-5 の光反応(365 nm)における基質分解率と DF 収率

分子	照射時間(min)	分解率(%)	DF収率(%)
1	1	60	93
	10	100	82
2	1	0	0
	10	11	92
3	1	2.0	0
	10	13	78
4	1	1	0
	10	3	0
5	1	45	84
	10	100	70

(3) 光反応の量子収率と DF 放出能力

上述した光反応を詳細に議論するために、積算光量計と HPLC を用いて基質分解の量子収率 ϕ_d および DF 放出の量子収率 ϕ_{DF} の測定を行った。それぞれの分子のアセトニトリル溶液 (1×10^{-4} M) を調製し、石英セルに 1 ml 入れ、硫酸銅水溶液とバンドパスフィルターを通した Deep UV ランプからの光(365 nm)を 30 秒間照射した。その際セルを透過してくる光量を測定することで吸収光量 I を求め、同時に HPLC で基質の分解量と DF の生成量を求めることで量子収率を算出した(Table 2)。その結果、ニトロキノリル基を有する 1 の量子収率 ($\phi_d = 0.290$, $\phi_{DF} = 0.273$) は、2 ($\phi_d = 0.052$, $\phi_{DF} = 0.047$)、3 ($\phi_d = 0.0059$, $\phi_{DF} = 0.0046$)

に比べて極めて高い値を示すことがわかった。また、吸収光量 I と量子収率 ϕ_{DF} をかけた値 ($I\phi_{DF}$) は DF 放出能力とみなすことができるが、1 が示すこの値は、一般的な光分解性保護基を持つ分子 2 に比べ 20 倍以上高く、優れた DF 放出剤であることが判明した。アセトキシメチル基を有する 5 ($\phi_d = 0.210$, $\phi_{DF} = 0.199$) の放出能力は 1 に比べると低下するが、2 に比べれば十分に高いことが示された。

(4) 量子収率に影響を与える因子

続いて量子収率に差が生じた要因を考察した。反応機構を推測すると、この光反応は励起一重項および励起三重項状態におけるニトロ基酸素へのメチレン水素の移動によって開始され、その後はヒドロキシ基のメチン炭素への攻撃に続く結合の組み換えによって DF が放出するものと考えられる。一般的にニトロ化合物の項間交差の量子収率が高いことを考慮すると、量子収率は両励起状態における水素移動の効率に依存すると考えられる。分子 1 と 2 についての構造的差異は、¹H-NMR スペクトルにおけるメチレン部位のシグナルに現れていた。すなわち 2 がシングレットピークであるのに対し、1 では分裂シ等価になっていた。このことから、キノリン窒素と DF のカルボニル酸素との静電反発によりメチレン部位の回転が抑制され、水素移動しやすい配座にいる確率が高くなったために分解率の向上を招いたと推測される。このことを確かめるべく、ベンジル位に対してオルト位またはパラ位にクロロ基を導入した分子 *o*-6 と *p*-6 を合成 (Figure 3) し光反応を調べたところ、*o*-6 でのみメチレ

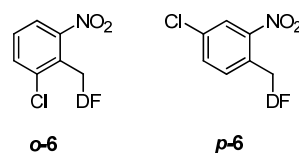


Figure 3. クロロ基を導入した DF 放出剤の構造

ンプロトンがシングレットピークを与え、量子収率が大幅に向上 (Φ_{is} : o-6: 0.292、p-6: 0.098) することが判明した。

(5) 細胞内導入と細胞内光反応

薬剤の取り込み等、薬理学的研究で一般的に使用されるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、分子 1 および 6 の細胞内導入実験を行った。100 μ M の 1 または 6 を含む培地を用いて、5%CO₂ インキュベーター (37) 内で 1 時間細胞培養し、細胞表面の洗浄、トリプシン処理による細胞剥離、超音波ホモジナイザーによる細胞破壊、遠心分離をしたのち、HPLC 分析により 1 および 6 の導入率を算出した。その結果、1 では細胞内への導入が全く観測されなかったが、6 では仕込み量に対して 6.5% が導入され、HPLC および MS 測定から、アセトキシメチル基が加水分解されたカルボン酸の状態で見出された。

導入に伴う細胞生存率をトリパンブルー染色法により求めたところ、コントロールに対して 92% であり、細胞毒性は低いことが判った。また、細胞に対して光照射を行い、細胞生存率を測定したところ、照射直後に 48% まで低下し、24 時間培養した後は 13% にまで低下することが判明した。この細胞致死効果が、放出された DF によるものか否かを調べるために、毒性のないウラシル放出剤 7 (Figure 4) を合成し光反応を行った。その結

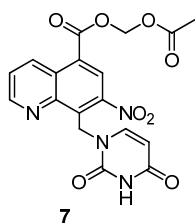


Figure 4. 光化学的ウラシル放出剤 7 の構造

果、光照射後には 60% まで細胞生存率が低下するものの、24 時間培養後でも 53% であり、

生存率がほぼ維持されることが判った。この結果から、分子 5 では放出された DF が 24 時間培養に伴い 5-FU へと代謝され細胞毒性を示したものと推測される。

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 1 件)

Hiroshi Inui, Kazuhiro Sawada, Shigero Oishi, Kiminori Ushida, Robert J. McMahon, Aryl Nitrene Rearrangements: Spectroscopic Observation of a Benzazirine and Its Ring Expansion to a Ketenimine by Heavy-Atom Tunneling, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 10246-10249. 査読有

[学会発表](計 4 件)

1. 遠峰美希佳、犬井 洋、丑田公規、光化学的ドキシフルリジンおよびテガフルール放出剤の合成と光反応、2014 年光化学討論会(2014)、札幌市、北海道大学。
2. 藤田英臣、犬井 洋、丑田公規、極低温マトリックス中に単離した[4-(1-ピロリジル)フェニル]カルベンと小分子の分子間反応、2014 年光化学討論会(2014)、札幌市、北海道大学。
3. 遠峰美希佳、犬井 洋、丑田公規、光化学的ドキシフルリジン放出剤の合成と光化学、2013 年光化学討論会(2013)、松山市、愛媛大学。
4. 藤田英臣、犬井 洋、丑田公規、極低温マトリックス中の 4-(1-ピロリジル)フェニルカルベンと硫化カルボニルの反応、2013 年光化学討論会(2013)、松山市、愛媛大学。

[その他]

ホームページ等

http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/kagaku/HP_kikou/indexA.html

6. 研究組織

(1)研究代表者
犬井 洋 (INUI, Hiroshi)
北里大学・理学部・講師
研究者番号：20348600