

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410083

研究課題名(和文) pH応答性に基づいた腫瘍内でのみ光化学活性を示す光増感型がん治療薬の創製

研究課題名(英文) Development of pH-activatable photosensitizers for photodynamic therapy

研究代表者

堀内 宏明(Horiuchi, Hiroaki)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：00334136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：患者への負担の小さいがん治療法である光線力学療法をさらに発展させるために、薬剤である光増感剤の副作用(光毒性)を低減することを目的とした。光毒性を低減するために、pH変化によってポルフィリン系光増感剤による一重項酸素の生成効率をON/OFFスイッチングする機構の導入を行った。テトラフェニルポルフィリン誘導体のフェニル部位をアニリン誘導体に置換することによって、中性条件下では一重項酸素を生成効率の低いOFF状態、酸性条件下では一重項酸素の生成効率が高いON状態にスイッチングさせることに成功した。またpH応答性の最適化にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed the photosensitizers for photodynamic therapy. pH-activatable function has been introduced to tetraphenylporphyrin derivative by using aniline units to suppress photo-induced side effects of photodynamic therapy. The photosensitization efficiency of the porphyrin with aniline unit was very low in the neutral condition (OFF state), but the photosensitization efficiency was recovered in the acidic condition (ON state). Furthermore, the pH-response could be optimized by changing the number of aniline units. A sharp pH-response and high ON/OFF switching ratio were obtained.

研究分野：光化学・物理化学

キーワード：光線力学療法 光増感剤 一重項酸素 pH応答性 ポルフィリン

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法は生活の質を改善できる新しいがん治療法として期待されている(図1)。光線力学療法の手順は次のとおりである。1. がん患者に光増感剤を静脈注射する。2. 数時間待つことによって、光増感剤が腫瘍部位に選択的に集積する。3. 内視鏡などを用いて、腫瘍部位に光を照射する。4. 光増感剤が光励起されることにより、一重項酸素( $^1O_2$ )などの活性酸素種が腫瘍部位において発生する。5. 活性酸素種によりがん細胞が死滅する。光増感剤には光照射によって活性酸素種を発生させる性質だけでなく、腫瘍部位に選択的に集積する性質を持つ化合物が用いられるため、正常細胞へのダメージを最低限にすることが可能であり、生活の質の改善につながると期待されている。

光線力学療法に用いる光増感剤には、レザフィリンなど、実用化された薬剤が数種類あるが、光線力学療法の発展のためにはさらなる改良が不可欠である。光増感剤の改良には、光活性の向上および副作用の低減が重要である。光線力学療法における主な副作用は光毒性であり、正常組織にわずかに分布した光増感剤が蛍光灯などの光を吸収すると、正常組織中でも一重項酸素を発生してしまい、細胞死を引き起こすことによって生じる。そのため、患者は体内の光増感剤が完全に分解・排出されるまで、長期間にわたって暗所での生活を余儀なくされる。この光毒性の問題が光線力学療法の普及を妨げている要因の一つとなっている。光毒性を抑制するためには、正常組織への薬剤分布を低減させるための研究が主になされているが、精力的な研究がなされている半面、伸び代が少なくなっている。これに対して、光活性の ON/OFF スwitching は光毒性を抑制するための新しい戦略として注目されてきており、今後の発展が期待されている(図1)。

2. 研究の目的

本課題では pH 変化にตอบสนองして光活性が ON/OFF スwitching する、pH 応答性光増感剤の開発を目的とした。pH 応答性光増感剤では中性では光を吸収しても一重項酸素を生成せず光活性を示さない OFF 状態を取るのに対し、酸性条件では光照射によって一重項酸素を生成する ON 状態にスitching する(図1)。腫瘍組織や細胞中のリソソームが酸性であることが知られており、光増感剤がこれらの環境に分布した時にだけ光活性を示す ON 状態にスitching できる pH 応答性光増感剤を用いることによって、光毒性の低減に繋がる。本課題では、最も基本的な光増感剤の一つであるテトラフェニルポルフィリンをベースにして、この分子に pH 応答性を付与すること、そしてその pH 応答性を最適化することを目的とした。

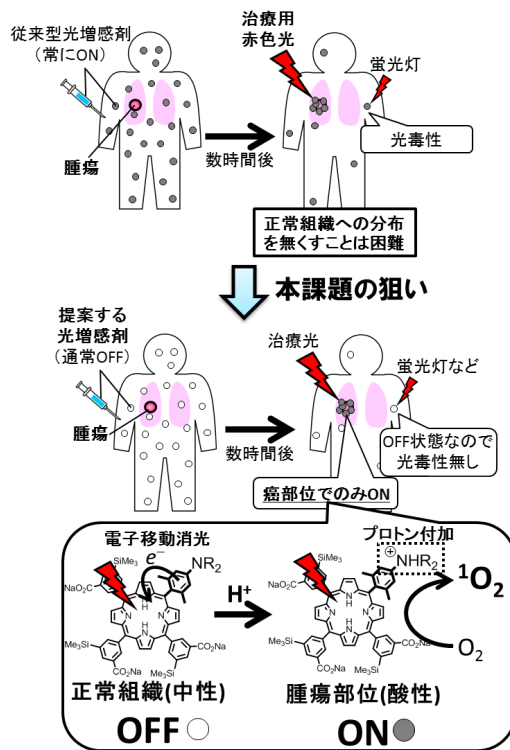


図1. 従来型の光増感剤を用いた光線力学療法と pH 応答性光増感剤を用いた光毒性の低減。

3. 研究の方法

pH 応答性光増感剤の分子設計は量子化学計算(DFT, B3LYP 6-31G(d))を用いて行った。pH 応答性光増感剤にはテトラフェニルポルフィリン(TPP)誘導体を元に、フェニル部位をアニリンユニットに置換した化合物を検討した(図2)。また分子設計により pH 応答性光増感剤として期待された N1, N3, N4 を合成した。また pH に応答しない対象物質としてアニリン部位を持たない N0 も合成した。

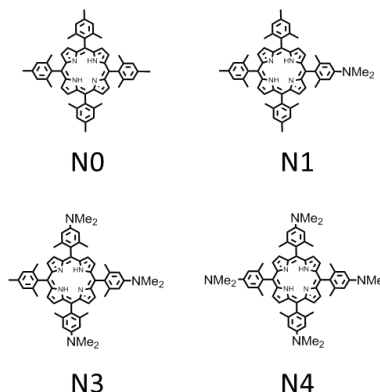


図2. 本課題で研究した pH 応答性光増感剤 N1, N3, N4 および対象物質 N0 の分子構造。

合成した化合物の光化学的な評価として、紫外・可視吸収スペクトル測定、蛍光スペクトル測定、ナノ秒蛍光寿命測定、一重項酸素のリン光スペクトル測定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) DFT 計算による分子設計

DFT 計算により分子設計を行った。中性条件では光を吸収しても一重項酸素を生成しない OFF 状態である必要がある。このために TPP 誘導体のフェニル部位をアニリンユニットで置換した。この分子では光増感剤であるポルフィリン部位が光を吸収して励起後、アニリン部位からポルフィリン部位への電子移動消光が起こることによって三重項( $T_1$ )状態の生成を抑制し、一重項酸素の生成も抑制することを狙っている(図3)。また、酸性条件ではアニリンユニットがプロトン化することによって電子状態が大きく変化し、アニリン部位からポルフィリン部位への電子移動消光が起こらなくなる。これにより、通常通り  $T_1$  状態が生成し、一重項酸素も生成する ON 状態にスイッチングすることを狙っている。このような作用機構で pH 応答性を示すためには、アニリン部位の HOMO のエネルギー準位がポルフィリン部位の HOMO と LUMO の間に位置する必要がある。また、アニリン部位がプロトン化されると、アニリン部位の HOMO がポルフィリン部位の HOMO よりも低くなる必要がある(図3)。

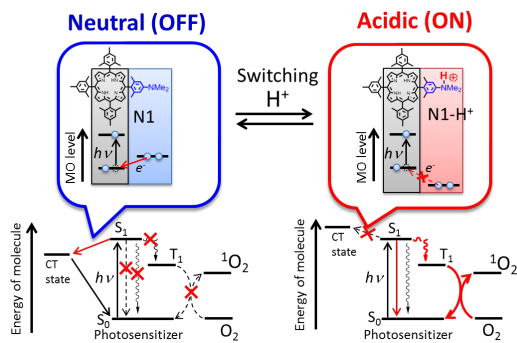


図3. pH 応答性光増感剤の作用機構。

様々なポルフィリン誘導体について DFT 計算を行った結果、N1 は上記の条件を満たすと予想され、pH 応答性光増感剤として期待できることがわかった。

##### (2) pH 変化による N1 の光増感効率のスイッチング

DFT 計算により設計された N1 を合成し、その光化学特性を研究した。N1 は水に不溶であったため、溶媒には溶解性と高極性を両立出来た水とジメチルスルホキシドの混合溶媒(1:9 v/v)を用いた。まずは対象物質である N0 と比較し、中性条件下での特性を評価した。図4a, 4b に N0 と N1 の吸収スペクトルと蛍光スペクトルを示す。N0 と N1 の吸収スペクトルはほぼ一致しており、アニリン部位はポルフィリンの電子遷移に影響を及ぼしていないことがわかる。しかし、N1 は N0 に比べて蛍光強度が非常に弱いことがわかった。また、N0 の蛍光寿命は 12.4 ns であるの

に対し、N1 では 0.5 ns 以下であった。さらに N1 と N0 の蛍光スペクトルの形はほぼ同じことから、N1 ではアニリン部位が消光剤として作用することにより蛍光量子収率が低下していると考えられ、期待通り N1 が中性条件下で OFF 状態となっていると言える。この蛍光消光は溶媒の誘電率が高い程、効率が良くなったことから、蛍光消光のメカニズムは図3に示すアニリン部位からポルフィリン部位への電子移動であると結論づけた。

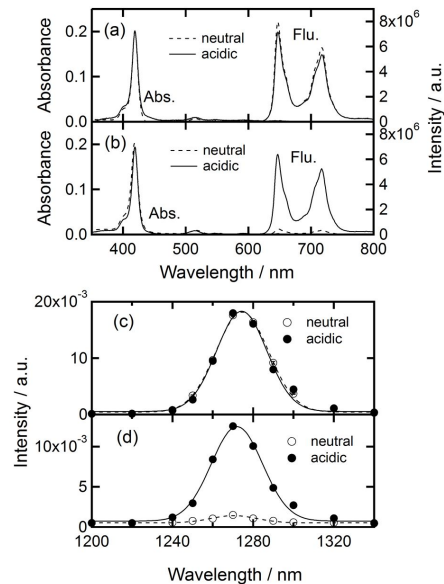


図4. 中性・酸性条件下における N0 (a)と N1 (b)の吸収・蛍光スペクトル、および N0 (c)と N1 (d)によって光増感された一重項酸素のリン光スペクトル。

N1 の  $S_1$  状態が消光されることが確認出来たため、N1 では  $T_1$  状態の生成が抑制され、一重項酸素の生成も抑制できると期待される。そこで、N0 と N1 に対して一重項酸素の生成量子収率を調べた(図4c, 4d)。N0 では通常のパルフィリン誘導体と同様の効率で一重項酸素を光増感したが、N1 では一重項酸素の生成量子収率は著しく低いことが確認できた。以上の結果から、図3に示す作用機構によって、N1 は中性条件下では蛍光や一重項酸素の光増感が抑制された OFF 状態であることが明らかとなった。

次に N1 の光増感過程などに及ぼす酸の効果の研究した。図4a, 4b に酸として 0.06 M の HCl を加えた際の吸収・蛍光スペクトルを示す。N0 の場合、酸を加えても吸収、蛍光のどちらも変化がなかった。これに対して N1 では、酸を加えても吸収スペクトルの変化は観測されなかったが、蛍光強度は N0 と同レベルまで回復した。これはアニリン部位がプロトン化することによって、 $S_1$  状態からの電子移動消光が抑制されたためであると考えられる(図3)。また酸性条件下における N1 の蛍光寿命は 12.5 ns であり、N0 の値(12.4 ns)とほぼ同等であった。この結果も、アニリン部位のプロトン化により電子移動消光が抑

制されたことを支持している。また一重項酸素の生成に及ぼす酸の効果も調べた(図 4c, 4d)。蛍光と同様に、N0 では酸の効果があったのに対し、N1 では酸の添加によって一重項酸素の生成量子収率が N0 と同レベルまで回復した。以上の結果から、N1 は pH 応答性光増感剤として機能していることが明らかになった。

### (3) N1 の ON/OFF スwitching の酸濃度依存性

N1 の光増感機能が酸の添加によって ON/OFF スwitching することが判明したので、次に酸濃度依存性を研究した(図 5a)。 $-\log[\text{HCl}]$  が 5~1 の領域において酸濃度の増加に従い、蛍光量子収率の増加が観測された。この酸濃度領域は、アニリンユニットである 3,5-ジメチル-N,N-ジメチルアニリンのプロトン化が起こる酸濃度領域とよく対応していた。この結果は N1 の ON/OFF スwitching がアニリン部位のプロトン化に起因していることを支持している。N1 の一重項酸素の光増感に及ぼす酸濃度依存性を調べた結果、蛍光の酸濃度依存性とほぼ一致していた。この結果は N1 の ON/OFF スwitching が  $S_1$  からの消光であることを支持している。この酸濃度依存性を理論式により解析したところ、実験結果と良く対応した。この解析結果を用いて、ON/OFF スwitching 比は 16 と求められ、高いスwitching 比が得られた。また、ON/OFF スwitching に必要な酸濃度変化を評価した。光増感量子収率が最大になる  $-\log[\text{HCl}]$  と、光増感量子収率が最大値の 10% になる  $-\log[\text{HCl}]$  の差を、10 倍のスwitching 比を得るのに必要な酸濃度変化 ( $-\log[\text{HCl}]_{10}$ ) とした。N1 の  $-\log[\text{HCl}]_{10}$  は 2.99 であり、N1 では ON/OFF スwitching のために大きな酸濃度変化が必要であることがわかった。

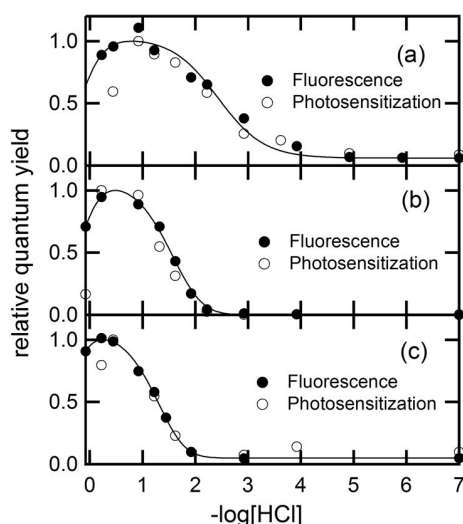


図 5. N1 (a), N3 (b), N4 (c) の蛍光量子収率および一重項酸素の生成量子収率の酸濃度依存性。

### (4) pH 応答特性の最適化

N1 では ON/OFF スwitching を行うために大きな酸濃度変化が必要であった。これは生体系における微小な pH 変化では十分なスwitching が困難であることを意味する。そこで、より少ない pH 変化でもスwitching が可能な分子の開発を行った。より小さな pH 変化でもスwitching が可能と期待される分子として、複数のアニリン部位を有する N3 および N4 (図 2) を合成した。N3 および N4 の蛍光量子収率の酸濃度依存性をそれぞれ図 5b および 5c に示す。また、一重項酸素の生成量子収率の酸濃度依存性も調べた。N3 および N4 でも N1 と同様に酸濃度の増加に伴い、蛍光量子収率や一重項酸素の生成量子収率が増加した。これより、N3 と N4 も pH 応答特性光増感剤として機能していることが確認できた。また、蛍光と一重項酸素生成の酸濃度依存性は対応していることから、N1 と同様に ON/OFF スwitching 機構が  $S_1$  状態からの電子移動消光によるものであることがわかる。

次に、N3, N4 の光増感効に及ぼす酸濃度依存性を解析した結果、どちらの化合物でも実験結果とよく対応した。この解析結果から  $-\log[\text{HCl}]_{10}$  を算出したところ、N3 と N4 のどちらも 1.64 となった。この結果からアニリン部位の数を増やすことによって少ない pH 変化でも ON/OFF スwitching が可能になることがわかった。また、ON/OFF スwitching 比を求めた結果、N3 と N4 でそれぞれ 100 と 20 と決定された。これより N3 は少ない pH 変化でスwitching が可能であるだけでなく、大きなスwitching 比を有することがわかった。

以上の結果から、テトラフェニルポルフィリン誘導体のフェニル部位をアニリン誘導体に置き換えることによって、pH 応答性を付与できることが明らかになった。またアニリン部位の数を増やすことによって、より優れた pH 応答性を付与できることがわかった。よってアニリン部位を持つポルフィリン誘導体は pH 応答性光増感剤として期待できる。

## 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 9 件)

H. Horiuchi, K. Terashima, A. Sakai, D. Suda, T. Yoshihara, A. Kobayashi, S. Tobita, T. Okutsu, The effect of central metal on the photodynamic properties of silylated tetraphenylporphyrin derivative, J. Photochem. Photobiol. A (2016), 321, 72-78. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2016.01.004 査読有

T. Okutsu, T. Taguchi, J. Korenaga, T. Kuroiwa, Y. Ishikawa, S. Iizuka, K.

Sugiyama, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, Investigation of the mechanism of photochemically-induced lysozyme crystallization, *J. Photochem. Photobiol. A* (2016), 321, 180-186. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2016.01.026 査読有

N. Hasebe, Y. Deguchi, S. Murayama, T. Yoshihara, H. Horiuchi, T. Okutsu, S. Tobita, Phosphorescence quenching of neutral and cationic iridium(III) complexes by molecular oxygen and aromatic electron acceptors, *J. Photochem. Photobiol. A* (2016), 324, 134-144. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2016.03.008 査読有

N. Hasebe, K. Suzuki, H. Horiuchi, H. Suzuki, T. Yoshihara, T. Okutsu, S. Tobita, Absolute Phosphorescence Quantum Yields of Singlet Molecular Oxygen in Solution Determined Using an Integrating Sphere Instrument, *Ana. Chem.* (2015), 87(4), 2360-2366. DOI: 10.1021/ac5042268 査読有

H. Horiuchi, M. Hosaka, H. Mashio, M. Terata, S. Ishida, S. Kyushin, T. Okutsu, T. Takeuchi, H. Hiratsuka, Silylation improves photodynamic activity of tetraphenylporphyrin derivative in vitro and in vivo, *Chem. Eur. J.*, (2014), 20, 6054-6060. DOI: 10.1002/chem.201303120 査読有

H. Horiuchi, T. Kano, H. Uehara, T. Okutsu, Sono-activatable Photosensitizer for Photodynamic Therapy, *Chem. Lett.*, (2014), 43, 1423-1425. DOI: 10.1246/cl.140403 査読有

S. Kyushin, Y. Saito, K. Yoshimura, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, Synthesis and Properties of 5,10,15,20-Tetrakis(4-trimethylsilylphenyl)chlorin, *Heteroat. Chem.* (2014), 25, 514-517. DOI: 10.1002/hc.21232 査読有

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*, (2013), 117, 4817-4827. DOI: 10.1021/jp308642z 査読有

T. Kuroiwa, H. Horiuchi, H. Hiratsuka, T. Okutsu, Verification of photochemically induced crystallization mechanism of proteins by dimer addition, *Key Eng. Mater.* (2013) 245, 247-250. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.534.2

#### 47 査読有

〔学会発表〕(計28件)

H. Horiuchi, R. Kuribara, A. Hirabara, T. Okutsu, Development of pH-activatable Tetraphenylporphyrin Derivatives as Photosensitizers for PDT, *PacificChem2015*, 2015/12/15, Hawaii, USA

H. Horiuchi, A. Hirabara, R. Kuribara, S. Torii, T. Okutsu, Development of pH-activatable Photosensitizer for Photodynamic Therapy, 2nd International Symposium of Gunma University Medical Innovation, 2015/12/8, Gunma University (Maebashi, Gunma)

H. Horiuchi, Developments of Porphyrin Derivatives as Photosensitizers for Photodynamic Therapy, 227th ESC Meeting, 2015/5/28, Chicago, USA (招待講演)

樋口みなみ・堀内宏明・奥津哲夫, 超音波による光増感剤の活性制御メカニズムの研究, 2015年光化学討論会, 2015/9/9, 大阪市立大学(大阪府・大阪市)

平原阿槻・堀内宏明・栗原亮太・奥津哲夫, 一重項酸素光増感効率の酸応答性に及ぼすアミノ置換数の効果, 2015年光化学討論会, 2015/9/9, 大阪市立大学(大阪府・大阪市)

堀内宏明・平原阿槻・栗原亮太・奥津哲夫, 光線力学療法に用いる pH 応答性光増感剤の研究, 第37回日本光医学・光生物学会, 2015/7/17, シーガイアコンベンションセンター(宮崎県・宮崎市)

H. Horiuchi, T. Kano, H. Uehara, T. Okutsu, Sono-activatable Photosensitizer for PDT, 4th International Symposium on Element Innovation, 2014/10/24, Kiryuu city performing arts center (Kiryuu, Gunma)

堀内宏明・狩野貴行・上原宏樹・奥津哲夫, 光増感剤への超音波応答性の付与, 2014年光化学討論会, 2014/10/13, 北海道大学(北海道・札幌市)

堀内宏明・栗原亮太・狩野貴行・奥津哲夫, 光増感剤への活性制御機構の導入, 第24回日本光線力学学会学術講演会, 2014/6/28, アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県・浜松市)

堀内宏明・栗原亮太・狩野貴行・奥津哲夫, 光線力学療法への応用を目指した活性制御型光増感剤の開発, 日本化学会第94春季年会, 2014/3/27-30, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計2件)

堀内宏明, 朝倉書店, 光化学の事典(2014年)(分担, p.260-261).

堀内宏明, エレメントイノベーションプロジェクト, 群馬大学, 炭素とケイ素の元素科学(2014年), (分担, p.66-78).

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://okutsu-lab.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

堀内 宏明 (HORIUCHI, Hiroaki)  
群馬大学・大学院理工学府・准教授  
研究者番号：00334136

### (2)研究分担者

奥津 哲夫 (Okutsu, Tetsuo)  
群馬大学・大学院理工学府・教授  
研究者番号：20261860