

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：23701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14981

研究課題名(和文)腫瘍の検出と治療を同時に可能にする革新的光増感有機ビスマス分子の開発

研究課題名(英文)Development of novel organobismuth molecules as photosensitizers for theranostics of tumor

研究代表者

平山 祐(Hirayama, Tasuku)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10600207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、有機ビスマス分子の持つ潜在能力を引き出すことで、蛍光と光増感作用の両方を同時にスイッチングできる新しい光増感分子プラットフォームを開発し、遮光生活を必要としない画期的な光線力学診断・療法(Photodynamic Diagnosis and Therapy, PDDT)の確立を目指す。具体的には、申請者が最近独自に構築した新規含ビスマス蛍光団を基盤として、プロドラッグ機能を導入することで、腫瘍特異的に蛍光と光増感作用を発揮できる、活性化型光増感分子を創出すること、および開発した光増感分子を用い、革新的なイメージガイド光線力学療法を確立することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to develop a novel molecular platform for an activatable photosensitizer of which fluorescence and photosensitizing activity are enhanced as desired by exploiting a unique property of organobismuth compounds. The final goal of this project is to establish a novel photodynamic diagnosis and therapeutic method with the activatable photosensitizers. In detail, we aimed to develop bismuth-fused fluorophore with prodrug function targeting to tumor-specific enzymes and to establish an image-guided therapeutic method by the Bi-containing photosensitizers.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：有機ビスマス 光増感剤 イメージング

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法(PDT)は、光増感剤(光照射により一重項酸素等の活性酸素種を発生させる化合物)と弱いレーザー光を用い、腫瘍等の疾患部位の細胞を選択的に殺傷する手法であり、外科的処置を伴わないことから低侵襲な治療法として注目されている。その治療効果は使用する光増感剤に依存し、いかに選択的に腫瘍患部に集積させるかが鍵となっている。現在国内で承認されている光増感剤であるフォトフリン等はいずれも生体透過性が高い 630 nm 以上の近赤外光での励起が可能であり、強力な光増感能を有する。しかしながら、これら増感剤は患部への選択性・集積性が低く、標的部位以外でも光照射による細胞傷害が惹起されることから、治療の際には投与後一週間から一ヶ月程度の遮光生活が必要であり、このことが PDT の普及を妨げている。この光毒性の問題を回避するには患部のみで活性化されるようなプロドラッグ化機構を光増感剤に付与することが理想的であるが、従来の光増感剤は全てポルフィリン誘導體であり、その構造的制約のために分子設計の自由度が低く、機能の改変・付与が困難であった。

2. 研究の目的

申請者は最近、安価かつ低毒性な重元素であるビスマス元素の特性を活かした新素材を開発すべく、生体応用可能な新規含ビスマス蛍光団 BiR-M を独自に開発し、これを使った生細胞イメージングに成功した(論文未発表)。さらに、BiR-M で染色した細胞を一定時間以上励起光に暴露した場合、細胞死が惹起されること、その原因が光励起による一重項酸素の発生、すなわち BiR-M の光増感作用であることを見出した。BiR-M の高いモル吸光係数と近赤外領域の吸収極大波長(635 nm)は、上述のフォトフリンと同程度であった。申請者は、BiR-M の高い光増感能、近赤外領域の吸収帯、多様な修飾が可能な分子構造に着目し、これを基にした含ビスマス蛍光団が従来のポルフィリン系色素を凌駕する新しい光増感剤プラットフォームとなると考えた。本研究ではまず、BiR-M を基に、以下の検討を行なうことを目的とした。

(1) BiR-M の光増感剤としての詳細な機能評価。

(2) がん移植マウスを用いた腫瘍の検出と治療を同時に行なう PDDT(photodynamic diagnosis and therapy)の実施。

(3) 生体内安定性の向上と光増感作用のスイッチングが可能な光増感分子プラットフォームの構築

以上の検討から真に実用的な光増感分子の完成を目指す。

3. 研究の方法

(1) 含ビスマス蛍光団 BiR-M の光増感剤としての機能評価

BiR-M がビスマス元素導入による長波長化を

示した原因について、計算化学と電気化学的手法を使って検討した。BiR-M の持つ一重項酸素発生能について既存の光増感剤であるメチレンブルーと比較した。また、光照射下における細胞毒性とがん細胞選択性について、HepG2 細胞、A549 細胞、TIG3 細胞、および HEK293 細胞を使った細胞死試験により評価した。

(2) がん移植マウスを用いた腫瘍の検出と治療を同時に行なう PDDT の実施

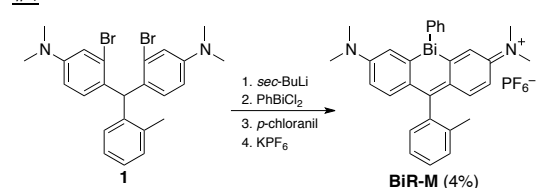
6 週齢の C57BL/6 マウスの両足にルシフェラーゼ導入 LLC 細胞(マウス肺がん由来細胞、 1×10^6 個)を移植し、腫瘍サイズが直径約 1 cm に達した移植後 17 日目に BiR-M を投与し、光照射(102 J/cm^2)を行った。腫瘍のサイズはルシフェリンを投与し、イメージングを用いた発光強度にて評価した。

(3) 生体内安定性の向上と光増感作用のスイッチングが可能な光増感分子プラットフォームの構築

上記(2)の実験にて明らかになった BiR-M の生体内での分解反応の問題を解決すべく、その構造を元に、より高い生体内安定性をもつ含ビスマス蛍光団の構築と、化学刺激に応じて光増感作用が活性化される新しい含ビスマス分子の合成に着手した。

4. 研究成果

(1) BiR-M の光増感剤としての詳細な機能評価



BiR-M については既知の化合物から約 4% の収率にて合成することができた。(図 1)

図 1. BiR-M の合成

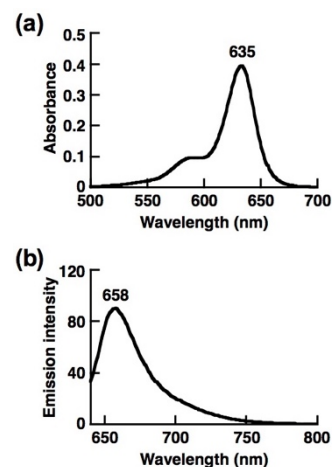


図 2. BiR-M の(a)吸収スペクトルと(b)蛍光スペクトル。

吸収・蛍光スペクトルを測定したところ、最大吸収波長が 635 nm、最大蛍光波長が 658 nm であることが分かった。また、蛍光量子収率

は 0.039 であり、モル吸光係数は約 $80,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。特に、吸収・蛍光波長については BiR-M の類似構造を有する汎用色素であるテトラメチルローダミン(TMR)に比較して約 80 nm 長波長シフトしており、ビスマスを導入することにより赤色光での励起が可能な色素となることが分かった。(図 2)

本化合物の長波長化の要因について検討するべく、電気化学測定を実施した。その結果、TMR に比較して酸化電位が 0.16 V 低電位シフトし、還元電位は 0.3 V 高電位側へシフトした。これは光励起に関与する軌道エネルギー差が小さくなっていることを示唆しており、長波長化を支持するものである。また、量子化学計算の結果からは、HOMO レベルが顕著に上昇したことから、BiR-M の長波長化には特に HOMO 準位の上昇が寄与していることが示唆された。

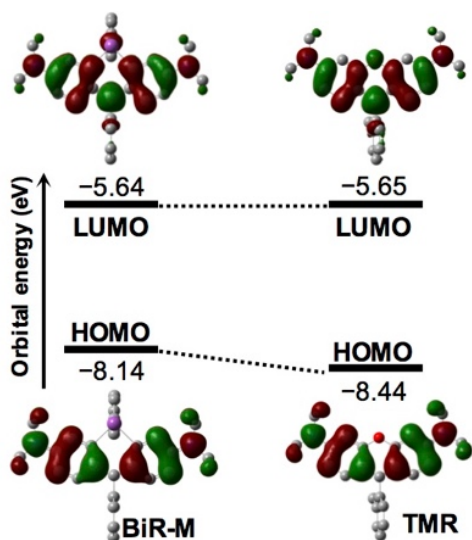


図 3. BiR-M およびテトラメチルローダミン (TMR) の分子軌道エネルギーの比較図。

ビスマス原子の持つ重原子効果による光増感作用、すなわち光照射による一重項酸素発生効率について、一重項酸素の検出剤である 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) を用いて測定を行なった。その結果、赤色光である 625 nm の光照射により DPBF の吸収波長である 410 nm の吸収が時間依存的に減少する様子が観察され、BiR-M の光照射により一重項酸素が発生する様子が観察された。また、光照射無しでは一重項酸素の発生は見られなかった。さらに、既存の光増感剤であるメチレンブルーと比較したところ、BiR-M に光照射を行なった際により迅速かつ効率的な一重項酸素の発生が確認され、非常に効率の良い光増感能を有することが分かった。

次に、光照射による細胞傷害作用について蛍光顕微鏡を使った検討を行なった。今回はがん系統の細胞種と正常細胞系統の細胞種をそれぞれ二種類ずつ使用した。まず、HepG2 細胞に対し、蛍光顕微鏡の励起光 ($630 \pm 20 \text{ nm}$)

を一分間照射し、直後、死細胞の核を染色するヨウ化プロピジウム (PI) および全ての核を染色する Hoechst33342 を同時に処理し、細胞死率について検討した。その結果、BiR-M の濃度依存的に PI 陽性細胞の比率が増大することが分かり、また、光照射のみ、あるいは BiR-M のみ (光照射無し) では細胞死は確認できなかった (図 4)。以上のことから、BiR-M は光依存的に細胞死を惹起する光増感剤として機能することが明らかになった。他の種の細胞においても同様の検討を行なった結果、全ての細胞において BiR-M と光照射に対する依存性がみられた。また、BiR-M の濃度依存性については今回使用した細胞間における有意な差はなかったことから、本化合物自体ががん選択性は無いことが分かった (表 1)。

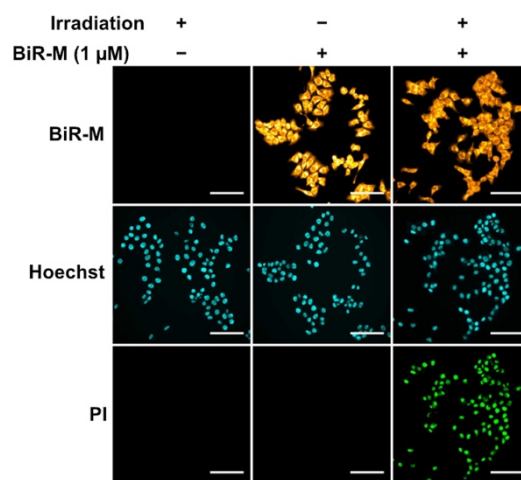


図 4. BiR-M を使った細胞光傷害実験の結果。PI の染色 (最下段、緑色で表示) が見られたものが死細胞を示す。

表 1. 各細胞に対する光傷害に対する BiR-M の効果濃度

細胞	EC ₅₀ (nM)
HepG2	375
A549	11
HEK293	40
TIG-3	20

(2) がん移植マウスを用いた腫瘍の検出と治療を同時に行なう PDDT (photodynamic diagnosis and therapy) への応用

上記の検討を踏まえ、今回はマウス体内において機能するか否かについて予備的な検討を行なった。左右両足にがんを移植したマウスを作成し、片側のみ BiR-M を局所投与した後、励起光である赤色光 (LED ランプ) を照射して腫瘍の縮小効果について調べた。結果、BiR-M の濃度および光照射の有無によらず腫瘍の縮小効果は確認できず (データ非公開)、BiR-M そのものを使った PDDT 実験は中止した。

(3) 生体内安定性の向上と光増感作用のスイ

ツチングが可能な光増感分子プラットフォームの構築

上記検討において光増感効果が得られなかった原因として、①励起波長が可視光領域であるため、皮下への励起効率が低い、②BiR-M が生体内で不安定である、③BiR-M の光安定性が低い、といった要因を考えた。そこで、生体透過性が高い近赤外光（700 nm 以上）にて励起可能、かつ分子構造において不安定化につながる要因となる窒素原子のパラ位周辺を立体的に保護した化合物を合成し、評価することとした。本化合物についてはまだ合成を達成できておらず、現在進行中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 祐 (HIRAYAMA, Tasuku)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：10600207

(2) 共同研究者

なし

(3) 連携研究者

近藤 科江 (KONDO, Shinae)
東京工業大学・生命理工学院・教授
研究者番号：40314182