

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月28日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05741

研究課題名(和文)超音波によって活性が変化する光がん治療薬の創出

研究課題名(英文) Development of sono-activatable photosensitizer for photodynamic therapy of cancer

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学療法は、非侵襲的ながん治療法である。しかし正常組織への光増感剤の分布をゼロにすることは難しく、正常組織でも蛍光灯などの光により副作用が生じる問題がある。本課題ではこれを解決するために、薬剤である光増感剤にON/OFFスイッチング機構を導入し、正常組織では機能せず、がん組織でのみ機能する薬剤の開発を目指す。また、ON/OFFスイッチングは超音波によって引き起こすことを目的とする。具体的には光増感剤の会合体を作製し、分子内自己消光によってOFF状態とする。これに超音波照射を行うことで、会合体から単量体に変換することにより、ON状態にスイッチングする系の創生を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の主力のガン治療法は強力である反面、副作用も大きく、患者の生活の質の改善は重要である。光と薬剤を組み合わせた光線力学療法は非侵襲的なガン治療法として期待されているものの、明所においては副作用が生じ、患者は治療後に暗所で長期間過ごす必要があるなどの問題を抱えている。本課題では光線力学療法の非侵襲性を飛躍的に向上させることを目指しており、将来的に本課題のメカニズムを導入できれば、日帰り治療が可能な、手軽なガン治療法として普及できる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy is one of a non-invasive cancer treatment using photosensitization of singlet oxygen. However, it is difficult to reduce the distribution of photosensitizer to normal tissue to zero, and singlet oxygen is also produced even in normal tissue to induce side effects.

In order to solve this problem, we will introduce an ON / OFF switching mechanism to photosensitizers, and aim to develop drugs that do not function in normal tissues and function only in cancer tissues. Moreover, we tried to induce the ON / OFF switching by sonication, which is one of a low invasive trigger. Specifically, aggregates of photosensitizers will be prepared to produce the OFF state by intramolecular self-quenching. The OFF to ON switching will be induced by the disaggregation by sonication.

研究分野：機能物性化学

キーワード：光線力学療法 一重項酸素 光増感剤 超音波 活性制御 ON/OFFスイッチング 会合体 自己消光

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

現在の主ながん治療法は外科手術、化学療法、放射線療法であるが、これらの治療法は強力である反面、強い副作用が問題となっている。光線力学的療法は副作用の弱い次世代治療法の一つとして期待されている。光線力学的療法では薬剤(光増感剤)ががん部位に選択的に集積することにより、活性化酸素種である一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )をがん特異的に生成させ、がん細胞のみを選択的に死滅させる治療法である(図1, 上部)。光線力学療法は高いポテンシャルを有しながらも、まだ非主流の治療法であり、光増感剤の改良が不可欠である。

光増感剤の開発における重要課題の一つが光副作用の低減である。光増感剤には選択的にがん組織に集積する化合物を用いるが、正常組織への分布をゼロにすることは事実上不可能である。そのため、患者が明るい場所に出ると、正常組織中에서도  $^1\text{O}_2$  が発生し、光副作用を生じてしまう(図1, 上部)。この副作用を避けるため、従来法では術後に光増感剤が完全に排出されるまでの長期間、患者は暗室に閉じこもっている必要がある。この光副作用が光線力学療法の普及を妨げる一因となっており、高い光治療効果と弱い光副作用の両立が急務である。

## 2. 研究の目的

光増感剤の高い光治療効果と弱い光副作用を両立させるためのアプローチの一つとして、光増感機能の ON/OFF スwitchングが注目されつつある。

この ON/OFF スwitchング型光増感剤では、光増感剤が正常組織中に存在する時には、光照射しても  $^1\text{O}_2$  を発生しない OFF 状態とし、正常組織における光副作用を抑制する。一方、光増感剤ががん組織に移行したときに何らかの生体内あるいは生体外刺激によって分子の性質が変化し、光照射により  $^1\text{O}_2$  を発生する ON 状態にスitchングする。申請者らが見出した超音波を利用した ON/OFF スwitchング系として「超音波応答型の光増感剤」を提案し、その基本コンセプトを実現することに成功した(図1, 下部)。ON/OFF スwitchングに超音波を利用するメリットは以下のとおりである。

1. 焦点式超音波を利用し、がん部位にのみ ON/OFF スwitchングの刺激を与えることが可能。
2. 超音波は非日常的な刺激であるため、意図せぬ ON/OFF スwitchングが起こりにくい。
3. 超音波は生体組織の透過性が高いため、体外からでも照射が可能(手術が簡便)。
4. 副作用が小さい。

申請者らが開発した「超音波応答型の光増感剤」の以下2点に基づいている(図1, 下部)。

- 分子会合による自己消光を利用した OFF 状態の創出
- 超音波照射による会合体の解離による ON 状態へのスitchング

しかしながら、この研究はまだ初期段階にあり、現時点では超音波による  $^1\text{O}_2$  光増感効率の変化量が小さいことが問題となっている。そのため実用化に向けて、光増感剤の会合体作製方法の最適化、および会合体内の分子間相互作用の最適化を行い、高い超音波応答性を実現することが不可欠である。

そこで本課題では、申請者らが提案した超音波応答型の光増感剤を、実用化に向けて発展させることを目的としている。

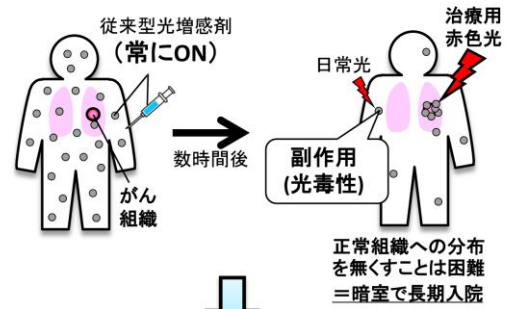
## 3. 研究の方法

本課題では、ポルフィリンをベースにした光増感剤の会合体(OFF 状態)の作製を行った。会合体の作製には、以下の2種類のアプローチを採用した。

### 計画 A. 超音波照射によって可逆的に単量体(ON 状態)へ変換できる会合体の創製

これまでに開発したプロトタイプ分子の問題点は、超音波照射による活性の変化量が小さいことであった。この原因としては、初期会合体の会合数が大きすぎ、超音波照射によって会合数は減少するが、十分に単量体に変換できなかったことが示唆された。

### 従来の光線力学療法



### 本課題の狙い

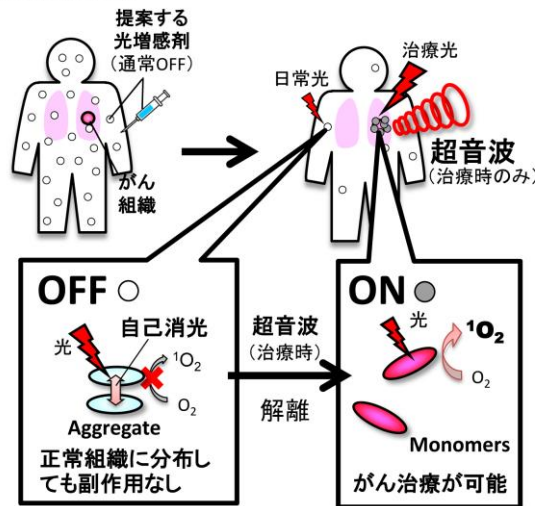


図1. 光線力学療法の問題点と本課題の狙い

そこで計画では、この問題を解決するために、分子間相互作用を弱めることにより初期会合体の会合数を低下させることを目指した。そのために図2に示す両親媒性の単量体を設計した。光増感剤ユニットには疎水性のポルフィリン誘導體

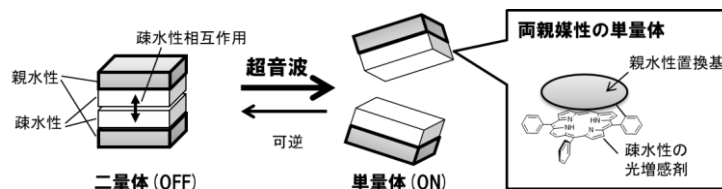


図2. 計画A: 超音波照射により可逆的に活性が変化する系

(平面型)を用いた。そして片面に親水性置換基を導入することにより、両親媒性の単量体とした(図2)。この様な分子は水中でサンドイッチ型の二量体を形成できると期待された。これらの作製した会合体に対して、会合状態の解明、 $^1O_2$ の光増感等の光化学過程の解明、超音波照射による光化学過程の変化の評価を行った。

#### 計画B. 超音波照射による不可逆反応で、単量体(ON状態)へ変換できる会合体の作製

ON状態への変換効率を重視した不可逆系の開発を目指した研究を行った。Xuanらは超音波照射によって図3(左)に示す化学反応が進行し、疎水性ユニットを親水性に変換できることを報告している。

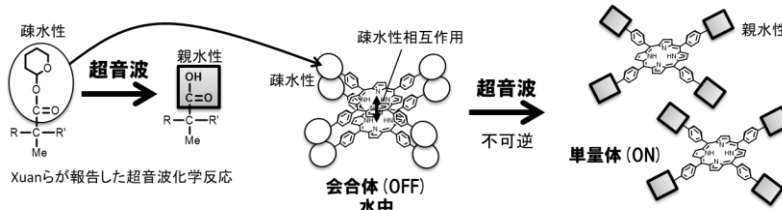
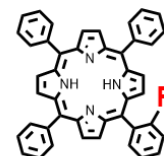


図3. 計画B: 超音波照射により不可逆的に活性が変化する系

本計画ではこの不可逆的な超音波化学反応を利用して、光増感剤同士の間相互作用を変化させて会合体(OFF状態)を単量体(ON状態)に変換することを目指した。具体的には光増感剤ユニットには疎水性のポルフィリン誘導體をベースにし、これに超音波反応性部位(疎水性)を連結させた(図3,中央)。この化合物は全て疎水性部位からなり、水中では溶解性が低いため会合体を形成し、OFF状態となると予想される。この会合体に超音波照射を行い、超音波反応性部位が親水性ユニットに変換することにより、光増感剤の水溶性が増加し、単量体(ON状態)にスイッチングさせることを目指した。この様な不可逆系では、仮に超音波に対する感受性が多少低くても、超音波照射時間を長くすることにより、ON状態の分子への変換効率を十分に高めることが可能と期待できる。これらの作製した会合体に対して、会合状態の解明、 $^1O_2$ の光増感等の光化学過程の解明、超音波照射による光化学過程の変化の評価を行った。

#### 4. 研究成果

まずは計画Aである両親媒性ポルフィリン誘導體の研究を行った。両親媒性ポルフィリンの親水性を制御するために、親水性の強さや親水性基の数の異なる図4に示す化合物群を合成した。分子の片面のみに親水性基を導入するために、テトラフェニルポルフィリンのフェニル部位の2位に親水性基を導入した。2位に親水性基を導入した場合、立体障害によりフェニル基の回転が抑制され、疎水性のポルフィリン部位の片面にのみ親水性基が位置すると期待される。これらの化合物の両親媒性を逆相HPLCの保持時間を用いて評価した。その結果、保持時間は予想通り、 $TPP(17.1 \text{ min}) < TPPH(15.2 \text{ min}) < TPPC1(14.7 \text{ min}) < TPPC2(13.6 \text{ min})$ の順であった。



略称	R
TPP	H
TPPH	OH
TPPC1	$OCH_2CH_2COOH$
TPPC2	$OCH_2CH_2CONHCOOH$ $CH_2COOH$

図4. 計画Aのために合成した化合物群の分子構造.

次に光増感剤の親水性の向上によって分子間相互作用の大きさが低下するため、会合定数が小さくなると期待した。会合定数が小さくなるほど $S_1$ 状態からの自己消光効率が低下し、超音波応答性が改善できると期待した。期待通り会合定数が小さくなった場合、超音波照射前の自己消光効率が低下すると予測された。そこで5%のテトラヒドロフランを含む水中において各化合物の蛍光強度を調べた(図5,時刻0)。いずれの化合物でも、テトラヒドロフラン中における単量体の蛍光強度に比べて著しく弱かったことから、会合体を形成し、 $S_1$ 状態からの自己消光が起きていることを確認できた。また、各化合物の蛍光強度を比較した結果、逆相HPLCの保持時間と同じで、 $TPP < TPPH < TPPC1 < TPPC2$ の順に蛍光強度が強くなったこと

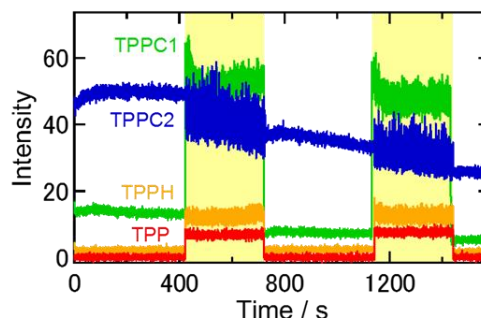


図5. 蛍光強度の経時変化(黄色部分:超音波照射した時間領域).

とから、期待通り親水性の向上により分子間相互作用が弱くなり、会合定数が小さくなったことが確認できた。

次に超音波照射による OFF から ON へのスイッチング効率を蛍光強度の変化により研究した (図 5, 400 s, 1100 s 付近)。TPP、TPPH、TPPC1 の会合体溶液へ超音波照射を開始すると蛍光強度が瞬時に増大した。超音波照射中の蛍光スペクトルを測定した結果、発光種が単量体であると帰属できた。よって、これらの光増感剤でも超音波照射により会合体の一部が単量体に変換でき、ON/OFF スwitching が可能であることがわかった。一方、TPPC2 では超音波照射により蛍光強度がわずかに減少したため、ON/OFF スwitching を行えていなかった。この原因として、超音波の繰り返し照射により蛍光強度が大きく減少し続けたことから、超音波照射による TPPC2 分子の分解が影響したと予想される。

次に親水性の指標の逆相 HPLC の保持時間と単量体のモル分率の関係を調べた。単量体へのモル分子率は、超音波照射中の会合体溶液の蛍光強度を単量体の溶液の蛍光強度で割ることにより算出した (図 6)。超音波照射前において、親水性が大きい光増感剤ほど単量体のモル分率が大きいことから、分子間相互作用が小さいと判断できる。また TPP、TPPH、TPPC1 では超音波照射前と照射中の単量体のモル分率の差はそれぞれ、1.4%、1.9%、7.3%であり、分子間相互作用の小さい分子ほど、超音波照射による会合体から単量体へ変化量が大きかった。したがって TPP、TPPH、TPPC1 間では、分子間相互作用の小さいものほど、超音波照射による ON/OFF スwitching の効率が向上することがわかった。

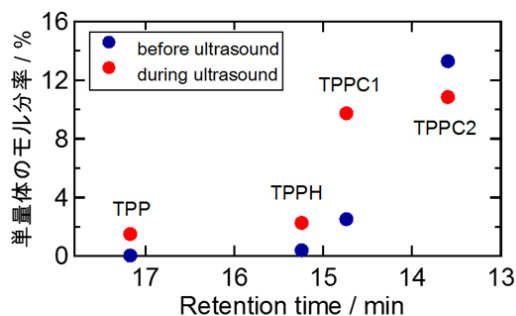


図6. 逆相HPLCの保持時間に対する単量体のモル分率。

以上の結果から、スイッチング効率を高めるには、分子の親水性を向上させて会合体の分子間相互作用を弱めることが重要であることがわかった。この知見は、高い超音波応答性を実現するために重要であると言える。

次に計画 B である不可逆的な超音波化学反応により、親水性を制御可能なポルフィリンの研究を行った。化合物としては、親水性ポルフィリンである PC のカルボキシ基に、超音波反応性を有するテトラヒドロピラニルカルボン酸エステル基 (Py 基) を導入した PCPy4 を合成した (図 7)。

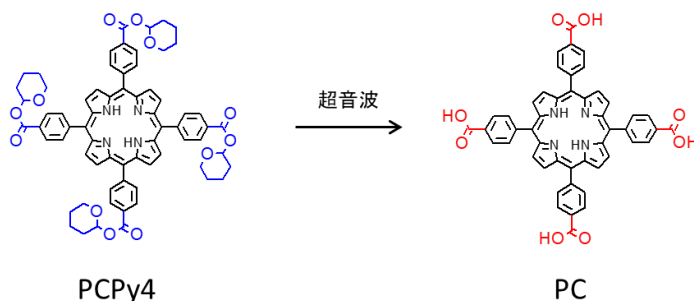


図7. 超音波化学反応によって親水性が変化するポルフィリン。

まず、PCPy4 の Py 基が超音波で反応し、カルボキシル基となった PC が生成するかを確認するために、PCPy4 をメタノール : 水 = 95 : 5 に溶解させ、これに超音波を照射して逆相 HPLC で追跡した (図 8)。超音波を照射すると、PCPy4 のモル分率が急激に低下し、60 分でほぼ全ての PCPy4 が消失した。このことから、PCPy4 は超音波反応性があると考えられる。また、この超音波反応生成物を HPLC 分析した結果、Py 基がカルボキシル基に変化した PC が生成することが分かった。この経時変化から反応速度定数は  $0.24 \text{ s}^{-1}$  と決定できた。超音波反応性を裏付けるために、超音波を照射せずに室温で放置した PCPy4 の経時変化を観察した (Fig. 1)。その結果、反応速度定数は  $1.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  と決定でき、超音波を照射したときの約 1/17 倍であった。よって、PCPy4 の反応は主に超音波によって引き起こされたと考えられる。

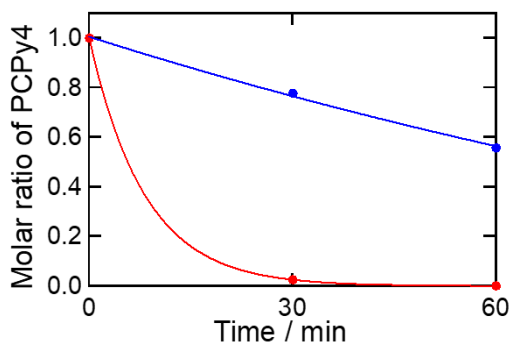


図8. 超音波照射(赤)と超音波未照射(青)における PCPy4 のモル分率変化。

次に、PCPy4 が水中で会合体を形成することを吸収スペクトルにより調べた (図9)。メタノール中の PCPy4 の吸収スペクトルは、メタノール中で単量体として存在する PC の吸収スペクトルと一致した。よって、PCPy4 はメタノール中で単量体として存在していた。溶媒を水に変更すると、PC の吸収スペクトルに変化はなかったが、PCPy4 の吸収スペクトルがレッドシフトを起こした。光増感剤は会合体を形成すると吸収スペクトルがレッドシフトを起こすことが知られているため、PCPy4 は水中で会合体を形成したと考えられる。

PCPy4 が会合体を形成したことで、 $^1\text{O}_2$  の生成量子収率 $\Phi_{\Delta}$ が低い OFF 状態になっているかを確かめた (図10)。 $^1\text{O}_2$  は 1270 nm にりん光を発することが知られている。 $^1\text{O}_2$  のりん光強度から、PCPy4 会合体の $\Phi_{\Delta}$ は 0.036 と決定できた。水中での PC 単量体の $\Phi_{\Delta}$ は 0.53 であることから、PCPy4 会合体は $\Phi_{\Delta}$ が低下した OFF 状態にあると言える。

次に PCPy4 会合体に超音波を照射すると、PC 単量体が生成し、 $\Phi_{\Delta}$ が増加すると期待した。これを確かめるために、PCPy4 会合体の超音波照射による  $^1\text{O}_2$  のりん光強度の変化を追跡した (図10)。PCPy4 会合体に超音波を照射すると、 $^1\text{O}_2$  のりん光強度が増加したことから、超音波照射により PCPy4 の会合数が減少し、自己消光過程が抑制され、 $\Phi_{\Delta}$ が高い ON 状態になったと言える。また、超音波照射 60 分の $\Phi_{\Delta}$  (0.41) と PC 単量体の $\Phi_{\Delta}$  (0.53) の比から、単量体の変換率が 77%であったことが分かった。この変換率は先行研究の変換率 (5%) の約 15 倍であった。よって、PCPy4 会合体の不可逆的な単量体への変化を利用することにより、会合体から単量体への変換率を向上させることが可能であると言える。

以上の成果から、高い光治療効果と弱い光副作用の両立を目指した ON/OFF スwitching系光増感剤の開拓において、ON/OFF スwitchingのトリガーとして超音波照射を利用する系を高効率化するための要素を明らかにした。今後はこの知見に基づき、より効率の高い超音波応答型光増感剤の発展に貢献したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

〔学会発表〕 (計 4 1 件)

〔図書〕 (計 1 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：奥津 哲夫

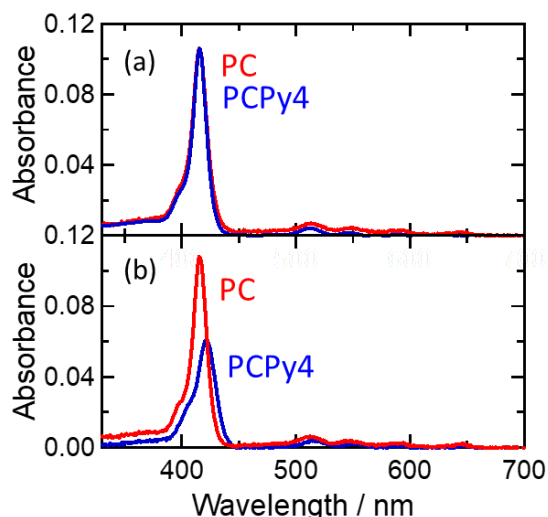


図9. メタノール中(a)と水中(b)でのPCPy4とPCの吸収スペクトル。

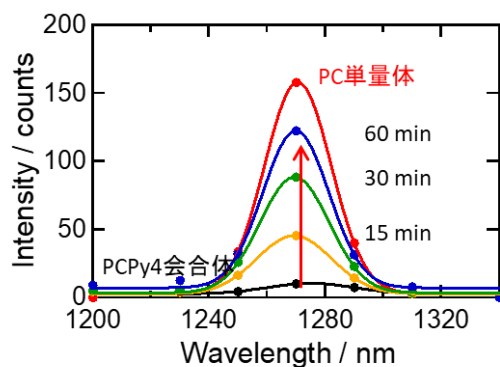


図10. PCPy4会合体への超音波照射による $^1\text{O}_2$ のりん光スペクトルの変化およびPC単量体による $^1\text{O}_2$ のりん光スペクトル(赤)。

ローマ字氏名：Tetsuo Okutsu

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院理工学府

職名：教授

研究者番号（8桁）：20261860

## (2)研究協力者

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。