

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20750131
 研究課題名 (和文) DNA 認識による光線力学的療法用光増感剤の活性制御
 研究課題名 (英文) Activity Control of Photosensitizers for Photodynamic Therapy through DNA Recognition
 研究代表者
 平川 和貴 (HIRAKAWA Kazutaka)
 静岡大学・工学部・准教授
 研究者番号： 60324513

研究成果の概要 (和文) : 本研究の目的は、光化学反応をがん治療に応用した光線力学的療法に用いる光増感剤の活性制御である。DNA を静電的相互作用で認識して、その鎖に結合し、光吸収によって一重項酸素を生成可能となる光増感剤のベルベリンとパルマチンを用い、相互作用する DNA の塩基配列の効果を明らかにした。ターゲットとなる DNA の塩基配列によって光増感剤の活性を制御できる可能性が示唆された。次に、これらの光増感剤による活性制御機構を応用し、臨床で用いられている光増感剤のポルフィリン類を用いた活性制御を検討した。電子ドナーを直結したポルフィリンが DNA との相互作用で分子内電子移動が抑制されることをスイッチとして、活性制御できることを明らかにした。本研究の成果は、テーラーメイド治療を指向したターゲット選択的光増感剤の設計・開発にも応用可能であると考えられる。

研究成果の概要 (英文) : The purpose of this study is the activity control of photosensitizers for photodynamic therapy, which is a promising treatment of cancer and some non-malignant conditions. Berberine and palmatine can photosensitize the generation of singlet oxygen only when these photosensitizers bind to DNA. This study revealed the sequence specificity on the activity control of these photosensitizers, suggesting the possibility of design of sequence-specific photosensitizer. To apply this control mechanism for clinical using porphyrinoid photosensitizer, the electron donor connecting porphyrins were synthesized. The photoexcited states of these porphyrins were quenched via intramolecular electron transfer. The interaction with DNA inhibited the electron transfer quenching of these photoexcited porphyrins, leading to the singlet oxygen generation via photoenergy transfer to molecular oxygen. These findings demonstrated that the DNA-selective photosensitizers can be developed using electron donor connecting porphyrins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：DNA、光増感剤、一重項酸素、光線力学的療法、電子移動

1. 研究開始当初の背景

光化学反応をがん治療に応用した光線力学的療法は、低侵襲的に極めて少ない副作用で実施できることから注目されており、臨床での実績もある。また、臓器の温存が可能な数少ない治療法でもある。しかし、治療効果の向上が課題となっている。現在、臨床で行われている一般的な光線力学的療法は、薬剤（光増感剤）を静脈注射により、投与し、目的の臓器の腫瘍に集まった時間帯に光ファイバー等を用いて照射が行われる。光励起状態になった光増感剤は、がん細胞内で酸素分子にエネルギー移動をすることで活性酸素の一種の一重項酸素を生成する。一重項酸素は、がん細胞内の生体高分子（タンパク質や DNA を含む）を酸化損傷する。生体高分子が傷つくことでがん細胞は、分裂できなくなり、壊死または細胞自殺によって消失する。この治療効果を向上するためには、光増感剤の開発が重要な手段となる。これまで、抗がん剤のようにテーラーメイド治療を指向し、特定の標的を選択的に狙う光増感剤の開発が非常に遅れていた。そこで、がん細胞内の特定のターゲットを選択的に攻撃する治療法が一つのブレイクスルーになると考えられる。近年、研究代表者は、光線力学的療法の原理である光化学反応による活性酸素生成を DNA と植物由来の光増感剤との相互作用により、制御できることを明らかにした。これまでに発見した原理に基づき、光線力学的療法に有効に用いることができるポルフィリン類等の光増感剤の活性制御が可能ではないかと予想された。

2. 研究の目的

DNA を特異的なターゲットにできる光増感剤の開発が本研究の目的である。がんの光線力学的療法は、副作用が少なく、臓器の温存ができることから非常に優れた原理の治療法であるが、効果の向上が課題である。光線力学的療法は、上記のようなメカニズムで生体高分子を光損傷することが原理となっている。今回は、DNA をターゲットに絞り、特異的に光損傷可能な光増感剤の開発を行った。はじめに、これまで明らかにした DNA 特異的光増感剤のベルベリンとパルマチンを用いて、ターゲットとなる DNA 塩基配列との相互作用の違いと活性制御への効果を定量的に明らかにすることを目的とした。これらの光増感剤は、治療に有効な長波長域の可視光線（波長：600~700 nm の赤色光）を吸収できない。そこで、臨床でも用いられているポルフィリン誘導體に同様の活性制御機

能をもたせることを次の目的とした。

3. 研究の方法

光増感剤と DNA との相互作用を吸収・蛍光スペクトル等の分光学的測定で明らかにした。DNA には、アデニン-チミン (AT) のみの配列のオリゴヌクレオチドとグアニン-シトシン (GC) を含む配列を用いた。DNA と光増感剤との相互作用の強さや活性制御に与える影響を吸収スペクトルのシフトおよび濃色・淡色効果などの変化、蛍光寿命（第一励起一重項状態の寿命）の変化から検討した。また、光増感剤に電子ドナーを直結したポルフィリンを分子軌道計算で設計して合成した。合成したポルフィリンの物性を分光学的に検討した。また、一重項酸素の発生効率を近赤外発光の測定で評価した。

4. 研究成果

(1) 光増感剤の活性制御における DNA 塩基配列特異性

はじめに、DNA に結合した状態で発現する光増感反応による一重項酸素生成活性を相互作用する DNA の塩基配列レベルで検討した。これまで、DNA のアニオン性ポリマーとしての効果がわかっていたが、塩基配列の異なるオリゴ DNA を用いた実験をアルカロイドのベルベリン、パルマチン（図 1）を用いて行うことで、DNA 微小環境の効果を検討した。AT のみの配列と GC を含む配列で、光増感剤との結合定数 (K) は異なった（表 1）。AT のみの配列のとき、蛍光量子収率 (Φ_f) の増大が大きく、さらに、最も長い蛍光寿命の延長 ($\tau_f = 70$ ps から 7 ns へ延長) がおきた。さらに、一重項酸素生成収率も最も増大（0 から 7%に増大）した。GC のみの配列の DNA は安定性の問題で検討できなかったが、AT 配列に GC が入ると蛍光寿命の延長および一重項酸素生成収率の増大は抑えられた。光増感剤と DNA との結合定数は、GC により小さくなった。結合定数の温度変化から結合のエンタルピー変化を求めるとその変化量も GC によっておよそ半分程度まで小さくなった。以上は、GC を含む配列では、光増感剤と DNA

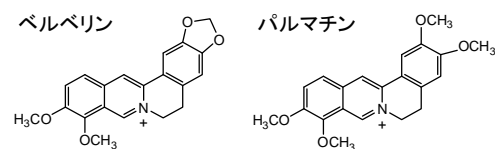


図 1 ベルベリンとパルマチン

表1 ベルベリン、パルマチンと DNA との結合定数および蛍光量子収率、蛍光寿命

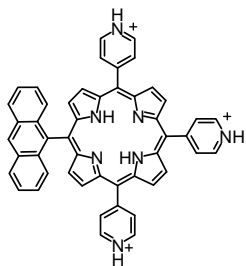
Sensitizer	DNA	K / M^{-1}	Φ_f	τ_f / ns (ratio)
Berberine			<0.001	0.05
	ON1	13100	0.093	0.30 (0.30)
				3.7 (0.42)
				11.9 (0.28)
	ON2	8200	0.043	0.12 (0.60)
			1.6 (0.32)	
			8.0 (0.08)	
Palmatine			<0.001	0.04
	ON1	9600	0.054	0.16 (0.39)
				2.3 (0.45)
				6.9 (0.16)
	ON2	6600	0.031	0.14 (0.54)
			1.4 (0.37)	
			5.9 (0.09)	

光増感剤濃度: 50 μM , DNA 濃度: 200 μM /base pair (bp) オリゴヌクレオチドの塩基配列は、ON1 (d(AAAATTTTAAATTTT)₂) および ON2 (d(AAGCTTTCGAAAGCTT)₂) を用いた。

の相互作用が弱められることを示している。DNA に結合した一重項酸素からの近赤外発光を時間分解で測定したところ発光の立ち上がりに 10 μs 以上を要することが観測された。コントロールに用いた水溶性ポルフィリンからの一重項酸素生成は励起直後に観測されたため、DNA に結合した光増感剤から溶存酸素へのエネルギー移動は、DNA の立体効果によって抑制されることが明らかとなった。この結果は、これらのアルカロイドが励起三重項状態から酸素にエネルギー移動している証拠であるとともに 10 μs の十分に長い励起三重項状態の寿命が光増感剤には求められること示している。これらは、光増感剤の活性制御のために重要な知見である。

(2) ターゲット選択的ポルフィリン光増感剤の設計・合成

分子軌道計算によるシミュレーションを行い、DNA との相互作用で活性制御可能なポ



AnTPyP

図2 DNA 選択性をもつ光増感剤の例

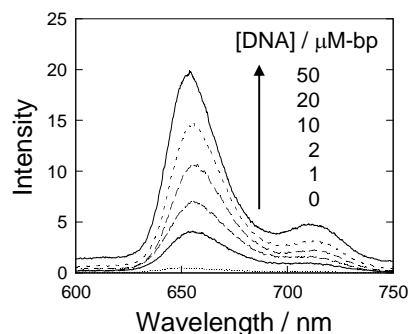


図3 電子ドナー直結型ポルフィリン光増感剤 (AnTPyP) の DNA 認識による蛍光増強

ルフィリン光増感剤を検討し、設計した。候補となる分子は、電子ドナーをポルフィリン環に直結させ、光励起状態からの分子内電子移動を DNA との相互作用で制御する分子である。電子ドナーには、ピレンおよびアントラセンを用いた (図2)。合成は、ピロールと芳香族アルデヒドを原料とする定法に従い、カラム精製の後、NMR および質量分析で確認した。電子ドナーとしてアントラセンを結合した光増感剤 (AnTPyP、図2) では、酸性条件でポルフィリンが水溶性となる条件を確認し、水溶液中での活性制御を検討した。ポルフィリン環の蛍光が完全に消光され、励起状態が速やかに (ピコ秒のオーダー) で失活されることを確認した。さらに、DNA を添加すると自発的に相互作用し、励起状態の寿命の延長と蛍光強度の増大を確認した (図3)。一重項酸素の生成活性も DNA との相互作用で発現することを明らかにした。DNA には、AT のみのオリゴヌクレオチド、GC 配列を含むもの、仔牛胸腺由来サンプルを用いたが、配列によらず、一重項酸素の生成活性が発現した。その活性制御機構は、ポルフィリンと DNA との疎水的および静電的相互作用により電荷移動状態のエネルギー準位が上昇し、分子内電子移動が抑制された結果、酸素へのエネルギー移動が可能となるものである。以上のように、設計通り、DNA による光増感剤の活性制御が可能であり、光増感剤の設計・合成法の指針にもなる成果が得られた。ピレン結合ポルフィリンでは、アントラセンのようなはっきりした活性制御は認められなかったが、類似の現象が観測された。また、基礎研究として、ピレンからポルフィリンへ高速の電子移動が起こることを分光学的に確認した。

(3) 光線力学的療法の副作用の対策

光線力学的療法の副作用に対する防護法も併せて検討した。光化学反応で生成した活

性酸素を安全に除去する防護剤が望まれている。有機物質では、活性酸素除去で自らが酸化され、二次的な毒性物質を発生させる恐れがある。そこで、人体無害な無機物質について検討し、白金などの貴金属ナノ微粒粒子による活性酸素除去作用を明らかにした。

(4) 結論および今後の可能性

DNA をターゲットにして活性を制御できる光増感剤を明らかにした。この原理は、光線力学的療法の臨床で用いられているポルフィリンにも応用することに成功した。また、相互作用する塩基配列に応じて活性をコントロールできる可能性も示された。今後、光増感剤のテーラーメイド化を指向した研究に発展させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- ① Kazutaka Hirakawa, Hiroshi Segawa, Acid Dissociation of Axial Hydroxyl Group of Hydroxy(1-pyrenebutoxy)-phosphorus(V) Porphyrin Controls the Intramolecular Excitation Energy Transfer, Photochemical and Photobiological Sciences, 査読有, Vol.9, 2010, pp.704-709.
- ② Kazutaka Hirakawa, Keiko Saito, Hiroshi Segawa, Anomalously Selective Quenching of S₂ Fluorescence from Upper Excited State of Zinc 5-(1'-pyrenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin Derivatives through Intramolecular Charge Transfer State, The Journal of Physical Chemistry A, 査読有, Vol.113, 2009, pp. 8852-8856.
- ③ Kazutaka Hirakawa, Shoichiro Sano, Platinum Nanoparticle Catalyst Scavenges Hydrogen Peroxide Generated from Hydroquinone, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 査読有, Vol.82, 2009, pp. 1299-1303.
- ④ Kazutaka Hirakawa, Fluorometry of Singlet Oxygen Generated via a Photosensitized Reaction Using Folic Acid and Methotrexate, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 査読有, Vol.393, 2009, 999-1005.
- ⑤ 平川和貴, 江原由美子, 平野達, 瀬川浩司, ポルフィリン P(V)錯体による光誘起電子移動および一重項酸素生成を介するヒト血清アルブミンの光損傷, 日本レーザー医学会誌, 査読有, Vo.29, No.4, 2009, pp. 376-382.
- ⑥ Saeko Tada-Oikawa, Shinji Oikawa, Junya Hirayama, Kazutaka Hirakawa, Shosuke Kawanishi, DNA Damage and Apoptosis Induced by Photosensitization of 5,10,15,20-Tetrakis (N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin via Singlet Oxygen Generation, Photochemistry and Photobiology, 査読有, Vol.85, 2009, pp. 1391-1399.
- ⑦ Kazutaka Hirakawa, Yoshio Nosaka, Toru Hirano, Yoshinobu Nishimura, Tatsuo Arai, Singlet Oxygen Generation from the Photosensitized Reaction in DNA Microenvironment, Photomedicine and Photobiology, 査読無, Vol.31, 2009, pp. 7-8.
- ⑧ Kazutaka Hirakawa, Evaluation and Chemoprevention of Phototoxic Effect by the Novel Materials, Photomedicine and Photobiology, Vol.31, 査読無, 2009, pp. 33-34.
- ⑨ Kazutaka Hirakawa, Toru Hirano, The Microenvironment of DNA Switches the Activity of Singlet Oxygen Generation Photosensitized by Berberine and Palmatine, Photochemistry and Photobiology, 査読有, Vol.84, 2008, pp. 202-208.
- ⑩ Kazutaka Hirakawa, Kohei Shiota,, Shoichiro Sano, Preventive Action of Metal Nanoparticles on UVA-sensitized Oxidation through Hydrogen Peroxide Formation, Photomedicine and Photobiology, 査読無, Vol.30, 2008, pp. 27-28.

〔学会発表〕(計 19 件)

- ① 平川和貴, DNA 認識による電子ドナー直結型ポルフィリンの電子遷移制御、日本化学会第 90 春季年会、2010.
- ② 安海恵都, 平川和貴, フッ素含有ポルフィリン P(V)錯体による水溶性タンパク質の光損傷、日本化学会第 90 春季年会、2010.
- ③ 大田和洋, 平川和貴, カチオン性青色光増感剤と DNA との相互作用、日本化学会第 90 春季年会、2010.
- ④ 原田万理, 平川和貴, ドナー直結ポルフィリンのアニオン性ポリマーによる電子移動制御、日本化学会第 90 春季年会、2010.
- ⑤ 東野寿樹, 花岡淳, 平川和貴, ポルフィリン P(V)および Zn 錯体の水/エタノール混合溶媒における自己会合体形成、日本化学会第 90 春季年会、2010.
- ⑥ Kazutaka Hirakawa, Yoshinobu Nishimura, Tatsuo Arai, Toru Hirano, Yoshio Nosaka, The Relaxation Process of Photoexcited State of DNA-binding Photosensitizers and the Sequence-dependent Generation of Singlet Oxygen, The 6th Korea-Japan Joint Symposium on Frontier Photoscience, 2009.
- ⑦ 平川和貴, 西村賢宣, 新井達郎, 平野達, 野坂芳雄, DNA 鎖内における光励起状態ベルベリン類の緩和過程、2009 年光化学

- 討論会、2009.
- ⑧ 平川和貴、山本将太、ビタミン B 類を用いた光毒性防護物質の評価、2009 年光化学討論会、2009.
- ⑨ 佐野昇一郎、平川和貴、貴金属ナノ粒子による活性酸素除去に基づく光毒性防護、2009 年光化学討論会、2009.
- ⑩ 平川和貴、光毒性の評価および化学防護における新規材料の応用、第 31 回日本光医学・光生物学会、2009.
- ⑪ 平川和貴、野坂芳雄、平野達、西村賢宣、新井達郎、DNA 鎖内に結合した光増感剤による一重項酸素生成、第 31 回日本光医学・光生物学会、2009.
- ⑫ 平川和貴、野坂芳雄、平野達、ヒト血清アルブミンとの相互作用下におけるペルベリン類の光増感反応と一重項酸素生成、第 19 回日本光線力学学会学術集会、2009.
- ⑬ 平川和貴、平野達、西村賢宣、新井達郎、DNA 認識による光増感剤の一重項酸素生成活性の制御：塩基配列の効果、日本化学会第 89 春季年会、2009.
- ⑭ 菊地諒、平川和貴、ジプロピレングリコキシ P (V) テトラフェニルポルフィリンによるヒト血清アルブミンの光酸化損傷、日本化学会第 89 春季年会、2009.
- ⑮ 平川和貴、平野達、大門利博、野坂芳雄、DNA 認識による光化学的一重項酸素生成反応の制御、第 41 回酸化反応討論会、2008.
- ⑯ Kazutaka Hirakawa, Shosuke Kawanish, Photochemistry of Folic Acid Analogues: Photosensitized DNA Damage and Application for Fluorometry of Reactive Oxygen Species, 2008 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, 2008.
- ⑰ Kazutaka Hirakawa, Kohei Shiota, Shoichiro Sano, Preventive Action of Metal Nanoparticles on UVA-Sensitized Oxidation through Hydrogen Peroxide Formation, 2008 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, 2008.
- ⑱ 平川和貴、葉酸誘導体の光酸化反応と一重項酸素検出への応用、2008 年光化学討論会、2008.
- ⑲ 平川和貴、中島淑、カチオン性ポルフィリンのベンゾキノロン類との複合体形成と S₂ および S₁ 励起状態からの電子遷移、2008 年光化学討論会、2008.

[図書] (計 2 件)

- ① Kazutaka Hirakawa, Chemopreventive Action of Organic and Inorganic Materials on Phototoxic Effect, in Photobiology: Principles, Applications and Effects, Chapter 6, Nova Science Publishers, 2010.
- ② Kazutaka Hirakawa, DNA Damage through

Photo-induced Electron Transfer and Photosensitized Generation of Reactive Oxygen Species, in New Research on DNA Damage, Chapter 9, Nova Science Publishers, New York, 2008.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：活性酸素の定量法

発明者：平川和貴

権利者：静岡大学

種類：特許

番号：第 4247393 号

取得年月日：2009 年 1 月 23 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~tkhirak/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平川 和貴 (HIRAKAWA KAZUTAKA)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：60324513

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者