

令和 6 年 4 月 4 日現在

機関番号：53401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12741

研究課題名（和文）がんQOL向上を達成するレーザートリガー連鎖、新PDTシステムの開発

研究課題名（英文）Development of new PDT system, laser trigger chain to improve cancer QOL

研究代表者

松井 栄樹 (Matsui, Eiki)

福井工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号：90369976

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がんPDTシステムに適用可能な、生体内での相互作用によるがん細胞への色素集積化を目的とした修飾水溶性Pcを合成し、生成を確認した。合成した修飾水溶性Pcは、極性部分としてアミノ基、チオエーテル基、エステル基、ピリジル基をそれぞれ有する化合物であり、Pc骨格の形成、弱酸性や弱塩基性の状態での水への溶解性を確認した。これらのPcを実際にヒト乳ガン由来MCF-7細胞に適用し、光照射によって細胞破壊が生じるか検証を行った。その結果、Pc投与と光照射の組み合わせによって、ガン細胞に対する破壊効果が得られ、連鎖PDTシステムの基盤を構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在日本人の2人に1人が、がんに罹患する。がんは手術、化学療法、放射線療法により治療されるが、強い副作用が問題となっている。本研究では、がんの治療に適用可能な光線力学療法（PDT）の新システム、レーザーをトリガーとして発動する新規糖鎖脱離細胞毒性連鎖システムの基盤的な事項について実験的に確認した。本システムは色素を高選択的に腫瘍細胞へと取り込み、長波長レーザーにより組織深部へと光を照射する。非常に高い光細胞毒性を実現し、光感受性をコントロールすることで、PDTの副作用である光過敏症を抑制する。以上の特徴からQOL向上に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We synthesized and confirmed the production of modified water-soluble Pc, which can be applied to cancer PDT systems and aims to accumulate pigments in cancer cells through in-vivo interactions. The synthesized modified water-soluble Pc have an amino group, a thioether group, an ester group, or a pyridyl group as polar moieties. We confirmed the formation of Pc and its solubility in water under weakly acidic and slightly basic conditions. These Pcs were actually applied to human breast cancer-derived MCF-7 cells to verify whether cell destruction would occur due to light irradiation. As a result, the combination of Pc administration and light irradiation produced a destructive effect on cancer cells, and we were able to construct the basis of a desired PDT system.

研究分野：生物有機化学

キーワード：がんPDTシステム 修飾水溶性フタロシアニン ヒト乳ガン由来MCF-7細胞 ラマン散乱測定

1. 研究開始当初の背景

世界保健機関 (WHO) により、がん死亡数が 2030 年に 1200 万人に増加すると予測され、治療指数の改善には、薬物を特異的に腫瘍へ送達する等、分子レベルの技術開発が求められている。光線力学療法は腫瘍組織に選択的に集積する性質を持つ「光感受性物質」と呼ぶ薬と、レーザー光等との光化学反応により、標的とする細胞を破壊する癌治療法である。PDT は癌治療において化学療法、放射線療法に代わる手法として、最も開発が期待されている。

日本では、ポルフィリン骨格を有する第二世代のレザフィリンが保険で認可され、現在腫瘍細胞選択性と抗腫瘍効果が向上する第三世代の光感受性物質の開発が進んでいる。

現在研究される第三世代の光感受性物質は、腫瘍と相互作用しやすい部位を直接光感受性物質に結合したものが大多数で、相互作用する部位として糖、ペプチドなどを結合させた例が報告されている。直接結合させた場合には、腫瘍細胞選択性が高まる一方、光感受性、抗腫瘍性に関する光感受性部位の機能と構造に大きな制限が加わる。

そこで本研究では、がん細胞との相互作用が期待できる極性基を周辺に有する Pc を新規に合成して用い、腫瘍細胞選択性に効果のある糖鎖、ペプチドなどの極性基を有する有機分子との水素結合により、がん細胞への集積と光照射による抗腫瘍活性を発現させるため、研究を行った。

2. 研究の目的

現在研究される第三世代の光感受性物質は、腫瘍と相互作用しやすい部位を直接光感受性物質に結合したものが大多数で、相互作用する部位として糖、ペプチドなどを結合させた例が報告されている。直接結合させた場合には、腫瘍細胞選択性が高まる一方、光感受性、抗腫瘍性に関する光感受性部位の機能と構造に大きな制限が加わる。

申請者は、これまでに「光感受性物質」として環外部に相互作用可能なヘテロ原子を導入したフタロシアニン新規設計し合成を行い、本 Pc と金属との配位結合による「金属—Pc 複合体」形成について既の実現した。引用文献①

そこで本研究では、この相互作用を拡張すること、また PDT への適用を検討することを目的として、この Pc 部分を連結した「二量体 Pc」やがん細胞との相互作用が期待できる「極性基を有する Pc」を用い、腫瘍細胞選択性に効果のある糖鎖、ペプチドなどの極性基を有する有機分子との水素結合により「糖鎖—Pc 複合体」形成を実現する。さらに、この複合体の特徴を活かした、高い腫瘍細胞選択性と抗腫瘍効果を両立する、レーザーにより連鎖駆動する新世代 PDT システムを提案する。

また、合成した新規 Pc を実際にヒト乳ガン由来 MCF-7 細胞に適用し、光照射によって細胞破壊が生じるか検証を行う。Pc の細胞投与効果の検証を行うためには、細胞を培養し取り扱える実験室環境を構築することが必要不可欠であり、通常の細胞培養で必須となる CO₂ インキュベーターの整備と MCF-7 細胞を培養する方法の確立を行い、Pc を用いた光照射による MCF-7 細胞への PDT 効果評価を行った。

3. 研究の方法

(1) まず、二量体 Pc および極性基を有する Pc について、いくつかの新規化合物の合成を行った。二量体 Pc は構造的に架橋部位と相互作用部位から成っており、合成した Pc は MALDI-MS の結果から生成を確認した。この二量体 Pc とグルコース等の糖鎖との複合体形成について、UV-vis スペクトル、ESI-MS 測定から実証を行い、他の糖類との複合体形成、腫瘍細胞集積の基盤となる相互作用の状態について検討を行った。また、同様に極性基を有する Pc についても、合成、相互作用の検討を行った。

(2) 続いて、PDT の効果測定に適用できる、レーザー照射—スペクトル検出システムの構築を行った。レーザーとして Pc や Pc 複合体の極大吸収波長にあわせたダイオードレーザーを選択し、3 ポートセルまたは散乱測定システム、分光器を SMA—ファイバーにより接続した。これにより、可視吸収、蛍光、ラマン散乱の検出を研究の必要に応じ切り換え可能な機器を構築可能と考えられる。

(3) また、合成した新規 Pc を実際にヒト乳ガン由来 MCF-7 細胞に適用し、光照射によって細胞破壊が生じるか検証を行った。光照射に用いる波長は、Pc の吸収帯である Q 帯に適合する、640 nm の光源を用いた。生細胞数を血球計算盤によるセルカウント法により見積もり、Pc を添加せずに暗所で培養したものの生細胞数を 100 %とした時の生存率を評価した。

以上の実験と生細胞数の解析を通じ、本 PDT システムの効果および問題点、改善点を洗い出し、以後の研究への指標とした。

4. 研究成果

(1) がん PDT システムに適用可能な、架橋部位と相互作用部位から成る二量体 Pc を合成し、MALDI-MS を測定したところ、二量体 Pc および二量体 PcZn の質量、理論的マスパターンと一致し、生成が確認できた (図 1)。

また生体内での相互作用による、がん細胞への色素集積化を目的とした修飾水溶性 Pc を合成し、MALDI-MS、ESI-MS の結果から生成を確認した。合成した修飾水溶性 Pc は、極性部分としてアミノ基、チオエーテル基、エステル基、ピリジル基をそれぞれ有する化合物であり、得られた修飾水溶性 Pc はソーレ帯および Q 帯が UV-vis 測定により観測され、Pc 骨格の形成が確認された。また、弱酸性や弱塩基性の状態での水への溶解性を確認し、Pc 骨格の分解が起こらないことを確認した。

さらに、「生体分子—Pc 複合体」の形成を確認するため、ESI-MS による複合体検出実験を行った。一例を示すと、ピリジル基を含む Pc はアミノ酸である Cys, His 等と相互作用し、その相互作用した種の質量、理論マスパターンと一致したシグナルを同定した (図 2)。引用文献②

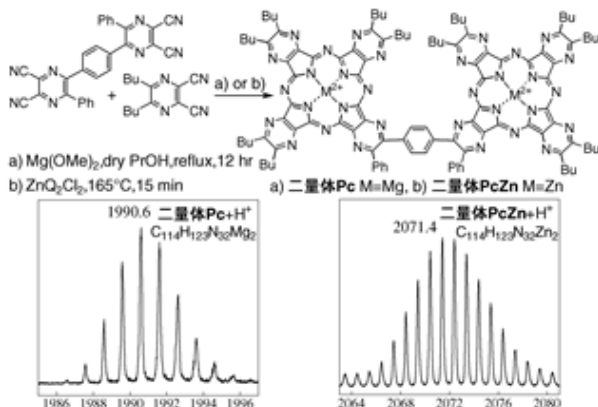


図 1 二量体 Pc の合成と MALDI-MS 測定結果

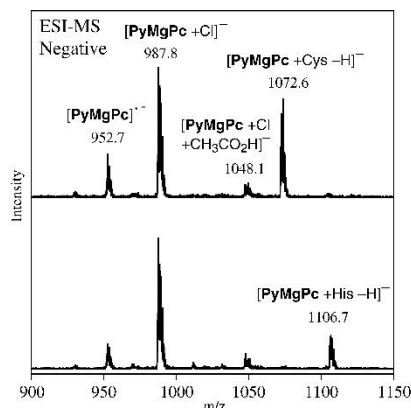


図 2 ピリジル基を有する Pc の合成と ESI-MS 測定結果

(2) 続いて、レーザー照射による糖鎖脱着の確認を目的とした、レーザー照射—スペクトル検出システムを市販の分光装置を組み合わせて構築した。ダイオードレーザーに (532, 660 nm) の 2 種類を選択し、20X 対物レンズ、レーザー光と散乱光を分離可能なフィルターをそれぞれ備えた散乱測定システムを SMA—ファイバーにより小型 CCD 検出器に接続して構築し、PC 上から測定、データ取り込みが出来るようにした。この装置により今後、連鎖 PDT システムの基本機能の測定をし、研究データを蓄積可能となった (図 3)。本装置を用いて、糖類やアミノ酸等の生体分子、また各種 Pc のラマンスペクトルを測定したところ、目的通りラマンスペクトルが観測された (図 4)。

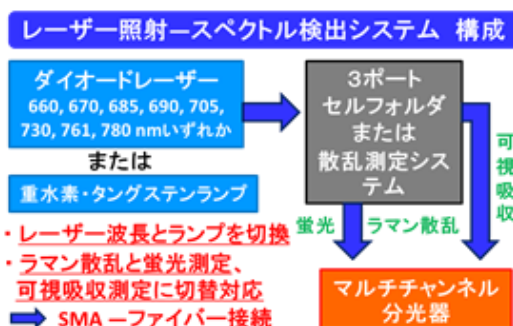


図 3 本研究にて構築したシステム構成

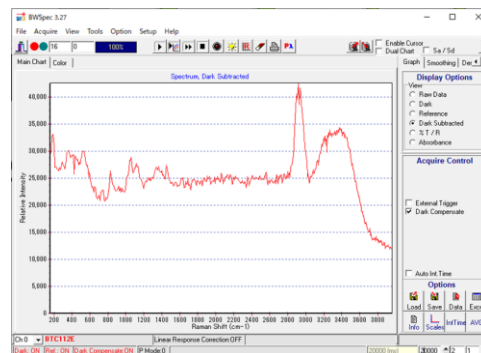


図 4 マルトースのラマンスペクトル測定結果

(3) これらの Pc を実際にヒト乳ガン由来 MCF-7 細胞に適用し、光照射によって細胞破壊が生じるか検証を行った。細胞投与効果の検証を行うため、CO₂ インキュベーターを使用し、細胞を培養し取り扱える実験室環境を構築した。また、光照射に用いる波長は、Pc の吸収帯である Q 帯に適合する、640 nm の光源を用いた (図 5)。

続いて Pc を MCF-7 細胞へ投与したものと同投与しないものを用意し、それぞれ 640 nm の LED 光

を1時間照射したものと暗所で1時間静置したものを作製した。さらに、それらを暗所にてD-MEM培地で2日間培養し、その生細胞数を血球計算盤によるセルカウント法により見積もり、Pcを添加せずに暗所で培養したものの生細胞数を100%とした時の生存率を評価した(図6)。図の左側よりa: Pcなし(暗所), b: Pc含有(暗所), c: Pcなし(光照射), d: Pc含有(光照射)であり、aとdを比較すると生存率が約30%減少しており、Pcのがん細胞に対する光細胞毒性効果が示された。なお項目の比較により、Pc化合物自体のがん細胞破壊効果は殆どなく、光照射のみの細胞破壊効果もなく、Pc投与と光照射の組み合わせによって、選択的ながん細胞破壊効果が得られたと考えられる。

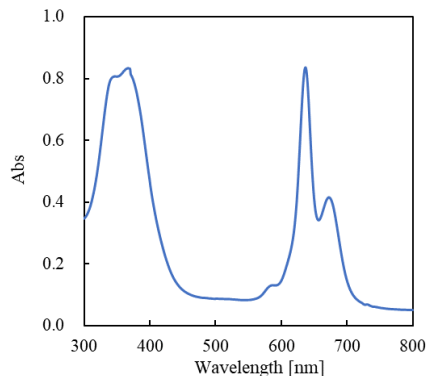


図5 PcのUV-Vis測定結果

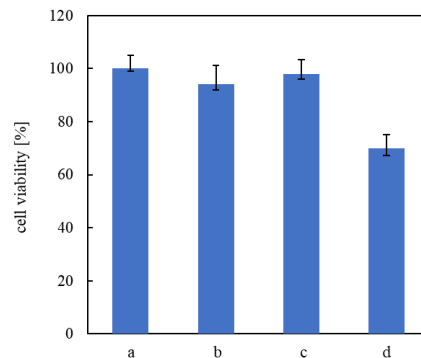


図6 PcのMCF-7へのPDT効果評価

<引用文献>

- ① E. Matsui, I. Hirazawa and M. Kobayashi, Pyrazine and Diazepine Substituted Phthalocyanines: Synthesis and Optical Properties by Metal Ion Coordinating, *Journal of Ecotechnology Research*, **15**, 1-4 (2009).
- ② E. Matsui, R. Uchida, R. Matsumura, Synthesis of phthalocyanines using precursors via oxidative coupling reactions, *Journal of Technology and Education*, **30**, 1-4 (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 松井 栄樹、内田 璃樹、松村 梨奈	4. 巻 30
2. 論文標題 酸化的カップリング反応による前駆体を用いたフタロシアニンの合成	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Technology and Education	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 松井 栄樹、富原 颯太、栗原 廉	4. 巻 31
2. 論文標題 ヘテロ環が置換したフタロシアニン化合物の合成と同定	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Technology and Education	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 渡辺 絢晴、松井 栄樹	4. 巻 29
2. 論文標題 硫黄原子を含む極性基側鎖を導入したフタロシアニンの合成	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Technology and Education	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 松井 栄樹、神崎 裕哉、山田 岳	4. 巻 29
2. 論文標題 極性色素分子と相互作用するフタロシアニンの合成と配位特性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Technology and Education	6. 最初と最後の頁 47-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 松井栄樹、加藤岳流、渡辺絢晴、柳田琉偉	4. 巻 28
2. 論文標題 アミノ酸と相互作用するフタロシアニンの合成と配位特性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Technology and Education	6. 最初と最後の頁 59-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 松井栄樹、渡辺絢晴、谷中佑規	4. 巻 29
2. 論文標題 極性有機分子と相互作用するポルフィリンの合成と配位特性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Technology and Education	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 富原 颯太、栗原 廉、松井 栄樹
2. 発表標題 複数の硫黄原子を含むフタロシアニン合成法の開発
3. 学会等名 2023年度北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松井栄樹、神崎裕哉、山田岳
2. 発表標題 極性色素分子と相互作用するフタロシアニンの合成と配位特性
3. 学会等名 2022年度北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺 絢晴, 加藤 岳流, 柳田 琉偉, 松井 栄樹
2. 発表標題 極性分子と相互作用するフタロシアニンの合成と配位特性
3. 学会等名 2021年度北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究テーマ概要 http://www.ce.fukui-nct.ac.jp/staff/eiki/company.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高山 勝己 (Takayama Katsumi) (70226934)	福井工業高等専門学校・物質工学科・教授 (53401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮里 朗夫 (Miyazato Akio)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------