

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 5 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659052

研究課題名（和文） 超高エネルギー物質を利用する細胞破壊型殺癌剤の開発

研究課題名（英文） High Energy Materials for Cancer Drugs: A Novel Mechanism of Action

研究代表者 柴田哲男 (SHIBATA NORIO)

名古屋工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：40293302

研究成果の概要（和文）：テトラゾールとトリフルオロエトキシ化フタロシアニンから構成される全く新しい作用機序を持つと想定される超高エネルギー性細胞破壊型殺癌剤の設計を行い、目的通りにその合成を完成させた。さらに得られた合成化合物を用い細胞試験を行ったところ光照射時においてのみ高い活性を持つことがわかった。

研究成果の概要（英文）：Designed and synthesis of a novel anti-cancer agent, trifluoroethoxyphthalocyanine-aminotetrazole conjugate (TFEO-Pc-AT) is described. The target compound was synthesized nicely by the use of copper-catalyzed Click-reaction of 1-(2-azidoethyl)-5-aminotetrazole and phthalocyanine containing terminal alkyne as a key step. TFEO-Pc-AT showed excellent photodynamic activities against B16-F10 murine melanoma upon illumination with a 660 nm laser, while no cytotoxicity of TFEO-Pc-AT was observed without illumination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学

1. 研究開始当初の背景

日本人の主要な死因が感染症から生活習慣病へと移行する中で、特に癌は 1981 年以来死亡原因の第一位となり、疾病対策上の最重要課題として対策が進められてきた。外科的治療を初め、抗癌剤による化学的治療、放射線治療、免疫細胞療法が行われており、近年では抗体治療や光線力学的治療 (PDT) などの治療法の模索も行われている。特に抗癌剤は創薬化学や有機化学などの発展と共に、様々な作用機序を持つ薬剤が開発されている。しかし、様々な癌を標的とした医薬品が存在するにもかかわらず、化学療法による癌治療が難しい点はその重篤な副作用にある。抗癌剤は癌細胞を攻撃すると同時に正常細胞も攻撃して、脱毛や神経麻痺などの副作用を起こす。また、近年では薬剤耐性腫瘍細胞の出現も大きな問題となっている。病原菌と同じように、癌細胞は医薬品の化学的抗癌プロセスに対して、その相互作用をブロックすることで薬剤を無力化する。耐性を持った癌の出現は、化学療法を中止せざるを得なくなり、患者の行く手を阻む深刻な問題である。

胞も攻撃して、脱毛や神経麻痺などの副作用を起こす。また、近年では薬剤耐性腫瘍細胞の出現も大きな問題となっている。病原菌と同じように、癌細胞は医薬品の化学的抗癌プロセスに対して、その相互作用をブロックすることで薬剤を無力化する。耐性を持った癌の出現は、化学療法を中止せざるを得なくなり、患者の行く手を阻む深刻な問題である。

2. 研究の目的

これらの点に鑑みて、当該研究では癌細胞以外の正常細胞への副作用が少なく、さらに薬剤耐性腫瘍に対する効力を持った新たな抗癌剤として、テトラゾール骨格を有し、腫瘍細胞に到達した後に光やレーザーによ

て活性化して腫瘍のみを爆撃する「腫瘍爆撃型殺癌剤」の開発を開始する。テトラゾールが分解する際に爆発的に発生する窒素ガスによって物理的に癌細胞を攻撃するため、薬剤耐性の影響を受けず、殺癌作用を発揮する。爆発トリガーとしてレーザーを患部にのみ照射することで、癌細胞のみにその殺傷効果を発揮させ、正常細胞への影響を最小限に食い止める。弾頭としてテトラゾール環を、トリガーとしてフタロシアニン有し、癌細胞中で爆発するナノ爆弾を考案した。電子吸引力の高いトリフルオロエトキシ基で置換させたフタロシアニンにテトラゾール環を導入することで、テトラゾール環内の電子密度を減らし、熱や衝撃に対する安定性を高め、フタロシアニンが持つ癌集積性を利用して標的腫瘍へ輸送する。そこへ PDT と同じ要領で光照射し、フタロシアニンからテトラゾールへエネルギーが流れ込み、活性化されたテトラゾール環が分解、爆発的に発生する窒素によって癌細胞を破壊・死滅させる。本来、抗癌剤は、癌細胞一つに対して抗癌剤が1分子必要となるものが多かったが、本手法では、液状テトラゾール1分子(分子量1000, 比重1の場合)が分解することで2分子のガス状窒素に加え、1分子の二酸化炭素(あるいは一酸化炭素)が発生する可能性もあり、体積は約40から60倍に膨張する。効果は絶大で、ほんの数個の分子で数百から数千におよぶ癌細胞を一掃できる。物理的な作用であることから薬剤耐性の不安はなく、幹部への光照射で誘発するため副作用も少ない。また、PDT用光増感剤として使用されるフタロシアニン部を持つことにより光線力学的治療も行うことができ、二重の包囲網で癌を一網打尽にする。

3. 研究の方法

フタロシアニンはポルフィンと同じく癌細胞に集積しやすいうえ、深部にまで浸透する7-800nm付近の長波長側に吸収を持つため光線力学的癌治療への期待が高いが、異常なまでの凝集効果のため、その構造をナノレベルで制御することは難しく、実用化の目処は立たない。そこでフッ素の撥水撥油性を利用することにより分子凝集を制御することを考え、分子周辺にトリフルオロエトキシ基を組み込んだ分子を開発した。特筆すべきは、通常のフタロシアニンとは異なり、いかなる条件下でも全く凝集しないという点である。この性質を利用して、レーザー照射による癌治療(PDT)への応用を図った。非凝集性のフルオロエトキシフタロシアニンと核酸とのハイブリッドを合成したところ、凝集に由来する失活を起こさず、強い蛍光を発することを見出した。広い π 電子共役系平面構造を有するフタロシアニンが凝集しないという

我々の報告は、非常に稀である。さらに、十分に発光する光増感剤は、光線力学的治療への有望株であるばかりでなく、癌の診断薬としても期待が持て、高い活性を有する新規薬剤開発へとつながる。本研究は、*Angew. Chem. Int. Ed.* 誌の内表紙(2006, 45 8163)として掲載された。また、より多くのフッ素を導入した分子も合わせて開発し、その抗癌活性を確認し有望性を示した(*Eur. J. Org. Chem.* 2010, 15, 2878)(図1)。

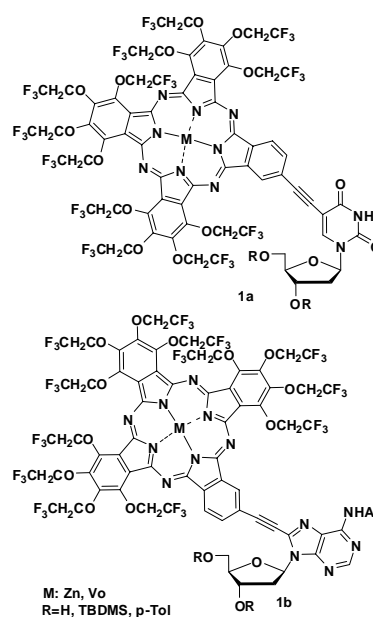


図1. トリフルオロエトキシフタロシアニン核酸

一方、テトラゾールは五員環構造にN原子を4つ持つ複素環化合物であり、医薬化学においてカルボン酸の等価体と見なされ、アンギオテンシンII受容体拮抗薬であるロサルタンなどに見られる。一方、熱や衝撃に不安定であることから、5位にアミノ基を持つものは車のエアバッグの火薬として使われる。近年では、低毒性で有用な新たな高エネルギーとして5-アミノテトラゾール誘導体に注目が集まっている。ShreeveやKlapötkeらによって研究されているニトロイミノテトラゾール誘導体は、共役系の広がりにより熱に対して安定性が高い。また、前述のようにカルボン酸等価体であることから、1位のプロトンの酸性度が高く、様々な塩基と塩を形成することで安定性を上げることもできる(Shreeve, J. M. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 7320.; Klapötke et al. *Helv. Chim. Acta* 2007, 90, 2132.)。このようにテトラゾールは構造変換、塩形成によって性質を変化させることが可能なことから、特にアメリカ政府はロケット燃料などへの応用をShreeveらと共に模索している(図2)。

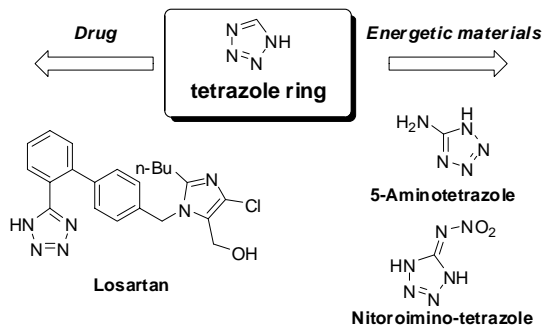


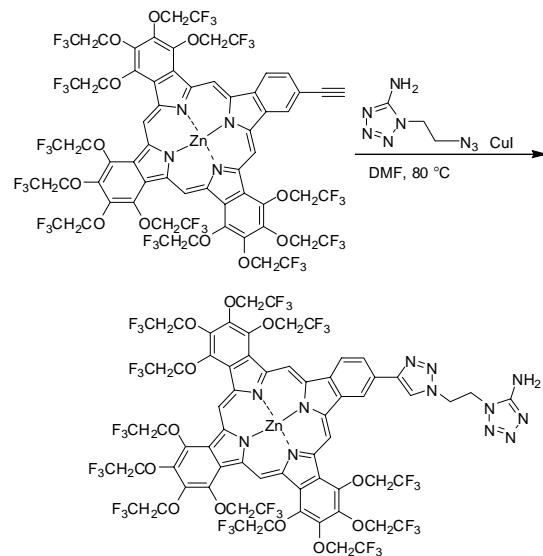
図2. テトラゾールの応用例

そこで弾頭としてテトラゾール環を、トリガーとしてフタロシアニンを有し、癌細胞中で爆発するナノ爆弾を考案した。電子吸引性の高いトリフルオロエトキシ基で置換させたフタロシアニンにテトラゾール環を導入することで、テトラゾール環内の電子密度を減らし、熱や衝撃に対する安定性を高め、フタロシアニンが持つ癌集積性を利用して標的腫瘍へ輸送する。そこへ PDT と同じ要領で光照射し、フタロシアニンからテトラゾールへエネルギーが流れ込み、活性化されたテトラゾール環が分解、爆発的に発生する窒素によって癌細胞を破壊・死滅させる。本来、抗癌剤は、癌細胞一つに対して抗癌剤が1分子必要となるものが多かったが、本手法では、液状テトラゾール1分子(分子量1000, 比重1の場合)が分解することで2分子のガス状窒素に加え、1分子の二酸化炭素(あるいは一酸化炭素)が発生する可能性もあり、体積は約40から60倍に膨張する。効果は絶大で、ほんの数個の分子で数百から数千におよぶ癌細胞を一掃できる。物理的な作用であることから薬剤耐性の不安はなく、幹部への光照射で誘発するため副作用も少ない。また、PDT用光増感剤として使用されるフタロシアニン部を持つことにより光線力学的治療も行うことができ、二重の包囲網で癌を一網打尽にする。

4. 研究成果

研究計画に従い、まずテトラゾール縮合型フタロシアニンの開発研究を行った。アジド基を有するテトラゾールとエチニル基を有するトリフルオロエトキシ化フタロシアニンをクリック反応にて結合させ、目的とする化合物を得ることに成功した(式1)。本化合物は一般的な極性溶媒に容易に溶解、溶液中では700nmの極大吸収波長をもつ。また本化合物は固体状態では安定であるが、溶液中では光を当てることにより分解することが確認された。更に本来フタロシアニンは強い凝集特性をもち、溶液状態ではスタッキングしてしまうが、本化合物ではその様子は見られなかった。これはトリフルオロエトキシ基

のもつ撥水撥油効果に起因していると考えられる。



式1. テトラゾール型フタロシアニンの合成

続いて合成した化合物を用いた *in vitro* の細胞試験を行った。 2.0×10^4 個のメラノーマ癌細胞 B16F10 に対し、本化合物の DMSO 溶液を4時間曝露させ、続いて一定の波長の光を40分間照射することにより、癌細胞が死滅するかどうかを調べた。MTT アッセイによって細胞の生存率を調べたところ、660 nm の光を当てた時に細胞数が大きく減少しており、強い細胞毒性を示すことが判明した。光照射時と非照射時の細胞生存率を比べたところ、光を当てた際、約8割の細胞が死滅する結果となったが、非照射時において細胞死滅数は0であり、高い選択性を示した。また本化合物の阻害率50は $2.00 \mu\text{M}$ となり高い活性を持つことが判明した(図3)。

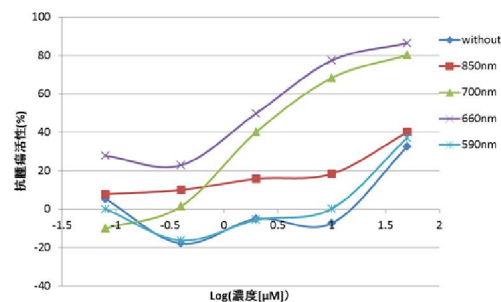


図3. 活性試験の結果

更なる知見を得るため、光照射によるテトラゾール分解実験を行った。本化合物を酢酸エチルに溶解し、四面平方石英セルにいれ、キセノンランプを用いて光を照射した。光照射30分で、緑色を呈していた溶液が退色し、

完全に分解している様子が確認された。この実験から細胞内で光を当てることにより、窒素ガスが発生していることが示唆される。また本化合物の溶液中での物性を調べるため可視紫外吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定した。ジメチルスルホキシド溶媒中においてQ帯と呼ばれるシャープな吸収帯を示した。この吸収帯は配位性溶媒であるピリジンを添加しても、形状に変化がなかったことから。溶液中で会合状態を作っていないことが示唆される。650nmの光を当てて蛍光を測定したところ、720nmの光を發し、その蛍光量子収率は0.15となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計7件)

○森 悟, 徳永恵津子, 柴田哲男, テトラゾール類縁体の合成と生理活性, 日本化学会第92 春季年会(2012), 2012 年 3 月 25~28 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス

○森 悟, 徳永恵津子, 柴田哲男, テトラゾール類縁体の合成と光線力学的治療法への展開, 第 58 回 日本薬学会東海支部 総会・大会, 2012 年 7 月 7 日, 静岡県立大学

○ Satoru Mori, Etsuko Tokunaga, Norio Shibata, Synthesis and Bioactivity of Trifluoroethoxy-coated Phthalocyanine Linked with 5-Aminotetrazole, 20th International Symposium on Fluorine Chemistry, 2012 July 22-27, Kyoto

○ Satoru Mori, Etsuko Tokunaga, Norio Shibata, Synthesis and Biological Activity of 5-Aminotetrazole derivative, the 6th Takeda Science Foundation symposium on pharmascience, 2012 September 13-14, Osaka

○森 悟, 徳永恵津子, 柴田哲男, テトラゾール基を有するフタロシアニンの合成と光線力学的治療法への展開, 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2012 年 11 月 5~6 日, タワーホール船堀

○森 悟, 徳永恵津子, 柴田哲男, テトラゾール縮合型フタロシアニンの合成と癌治療への展開, 第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2012 年 11 月 28 日~30 日, タワーホール船堀

○森 悟, 徳永恵津子, 柴田哲男, 高エネルギー

物質を用いた癌治療薬: 新しい作用機序による医薬設計, 日本ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会, 2013 年 6 月 19~21 日, 東京医科歯科大学 M&D タワー, 申込受理

〔図書〕(計0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

<http://www.ach.nitech.ac.jp/~organic/shibata/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者 柴田哲男 (SHIBATA NORIO)
名古屋工業大学・工学研究科・教授
研究者番号: 40293302

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし