

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：55501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750192

研究課題名(和文)ポルフィリン金属錯体を用いたX線増感型ガン治療法の開発

研究課題名(英文)Development of glycoconjugated porphyrin metal complexes for X-ray dynamic therapy

研究代表者

廣原 志保(Hirohara, Shiho)

宇部工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：70413804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低線量X線とX線増感剤を組み合わせたX線増感型ガン治療法の開発を行った。候補X線増感剤としてグルコース連結ポルフィリン金属錯体の合成を行った。合成した化合物についてラット正常胃粘膜細胞株及び胃癌様変異株(RGK-1)を用いたX線照射試験を行い、中心金属、糖鎖の置換数及び連結部位に対するX線増感効果を調べた。その結果、ほとんどの化合物がRGK細胞に対して高いX線増感効果を示した。また、 α -トコフェロールを共存させることでポルフィリンの副作用である光細胞毒性効果を抑制することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Radiotherapy is an excellent treatment for deep-seated cancer. However, repeated irradiation with nearly lethal dose is generally required to kill the tumor, which gives serious strains on patients. In this study, we propose a new radiotherapy which combines X-ray sensitizer with low-dose X-ray irradiation. We synthesized S-, O- and triazol-glucoconjugated porphyrin metal complexes (H₂, Zn, Pd, Pt) with all five patterns of glucoconjugation as sensitizers. In addition, the cytotoxicity of porphyrins was evaluated without X-ray irradiation and under X-ray irradiation in normal rat gastric mucosal cells (RGM) and a rat murine RGM gastric carcinoma mucosal cells (RGK). Almost all of porphyrins afforded significantly higher cytotoxicity to RGK cells rather than to RGM cells upon X-ray irradiation. Furthermore, we succeeded in inhibiting the side effects of porphyrin ring, namely photocytotoxicity, by means of the incubation of α -tocopherol with porphyrins.

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：X線増感剤 グルコース連結ポルフィリン金属錯体 ガン細胞 細胞取り込み 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

体透過性が高い放射線を用いる放射線治療は深在性ガンの有効な治療法である。しかし致死線量相当の放射線照射が必要なため、患者への負担が大きい。申請者らは新たな放射線治療として、一般に普及している X 線間接撮影程度、すなわち人体に影響のない 1 ミリグレイ程度の線量でガン細胞のみを死滅させることを目標として、低線量 X 線を効率良く吸収し、殺細胞効果の高い化学種(活性酸素など)をガン部位のみに発生させる X 線増感剤を用いた治療法『X 線増感型ガン治療法』を提唱している。

2. 研究の目的

本研究では『X 線増感型ガン治療法』に用いる X 線増感剤の開発として、申請者の *trans*-2 置換グルコース連結ポルフィリンがガン組織高集積性薬剤を示すという発見に基づき、高い X 線吸収効率を持つ重金属と組み合わせ、一般に普及している X 線間接撮影程度、すなわち人体に影響のない 1 ミリグレイ程度の線量でガン細胞のみを死滅させる薬剤の合成と X 線照射試験を検討した。

本実験では、X 線増感剤としてさまざまなグルコース連結ポルフィリン金属錯体(図 1)を合成した。合成した化合物に対し、ラット正常胃粘膜上皮細胞株(RGM)および MNNG 添加により得られた胃癌様変異株(RGK)を用いた X 線照射試験を行い、中心金属(H₂, Zn, Pd, Pt)、置換基(S 連結、O 連結、triazol 環体)、置換数と位置(1, *cis*-2, *trans*-2, 3, 4)に対する X 線増感能を調べた。

またグルコース連結フッ素ポルフィリンを X 線増感剤として用いるためには、光過敏症となるポルフィリンの副作用を低減する必要がある。そこで本実験では、光過敏症の原因となる化合物の光細胞毒性能を除去するための光細胞毒性除去剤の検討を行った。

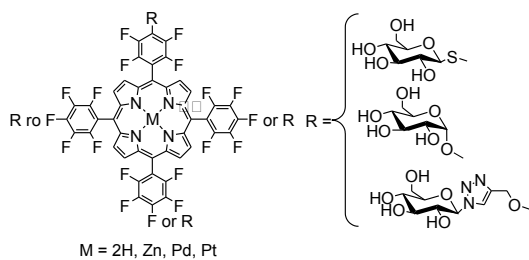


図 1 グルコース連結ポルフィリン金属錯体

3. 研究の方法

3-1. グルコース連結ポルフィリンの合成

3-1-1. S 連結体 (MSx) の合成

ジエチルアミン存在下、フッ素ポルフィリン(TFPP)およびその金属錯体(Zn, Pd, Pt)に 1~4 当量のアセチルグルコース配糖体 1(AcGlcSAc)を DMSO 中、室温で終夜反応させた。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及びゲル浸透クロマト

グラフィーで分離精製後、それぞれの置換体をナトリウムメトキシド(NaOMe)で脱保護し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(逆相)で精製することで 1~4 置換 S 連結体を得た。

3-1-2. O 連結体 (PtO1) の合成

炭酸カリウム(K₂CO₃)存在下、TFPP または PtTFPP に 2 当量のアセチルグルコース配糖体 2(AcGlcOH)を DMF 中 50°C で終夜反応させた。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及びゲル浸透クロマトグラフィーで分離精製後、それぞれの置換体を NaOMe で脱保護し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(逆相)で精製することで 1 置換 O 連結体を得た。

3-1-3. triazol 環体 (PdTAx) の合成

K₂CO₃存在下、PdTFPP に 1~8 当量のプロパギルアルコールを DMF 中 50°C で終夜反応させた。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及びゲル浸透クロマトグラフィーで分離精製することで 1~4 置換プロパギル連結 PdTFPP を得た。プロパギル連結 PdTFPP にそれぞれ対応する置換数の当量のアセチルグルコース配糖体 3(AcGlcN₃)、臭化銅、N,N,N',N'',N'''-ペンタメチルジエチントリアミン(PMDETA)を DMF 中、室温で 1 時間反応させた。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及びゲル浸透クロマトグラフィーで精製後、それぞれの置換体を NaOMe で脱保護し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(逆相)で精製することで 1~4 置換 triazol 環を得た。

3-2. ヒドロキシラジカル(•OH)測定

暗所下で、合成した化合物(5 μM)とヒドロキシフェニルフルオロセイン(HPF, c=2 mM)の混合溶液(3% DMSO/ PBS)入りの 96 穴プレートに X 線 15 Gy (Al, t 0.3 mAl filter, 8.3 mA, 75 kV)を 25°C 下で照射した。その後、照射プレートの各穴の発光強度(λ_{ex}=485 nm, λ_{em}=535 nm)をプレートリーダーで求めた。比較物質として抗がん剤として市販されている白金錯体(シスプラチン)を用い、同様の実験を行った。

3-3. X 線増感試験

RGM-1 細胞株及び RGK-1 細胞株(1×10⁴ cells/well)に合成した化合物(10 μM)の 2%DMSO/10%FCS 培地溶液を 24 時間薬剤接触させた(薬剤の終濃度: 5 μM, 1%DMSO/10%FCS 培地溶液)。その後、余剰分の薬剤を取り除き、PBS で 2 回洗浄した後、新しい培地交換したプレートを暗所下で X 線 15 Gy (Al, t0.5 mAl, t0.5 mm filter, 5 mA, 130 kV)を照射した。照射 24 時間後 WST-8 アッセイにより細胞の生存率を求めた。

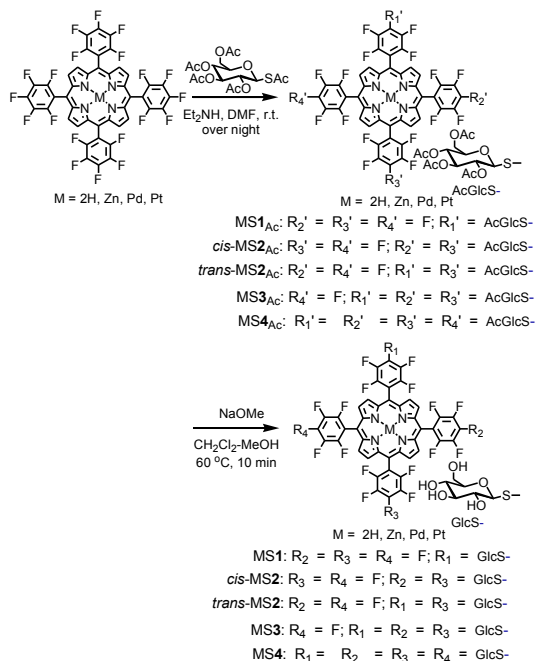
またα-トコフェロール(100 mM, 500 mM)

を共存させた X 線増感試験も同様に行った。

4. 研究成果

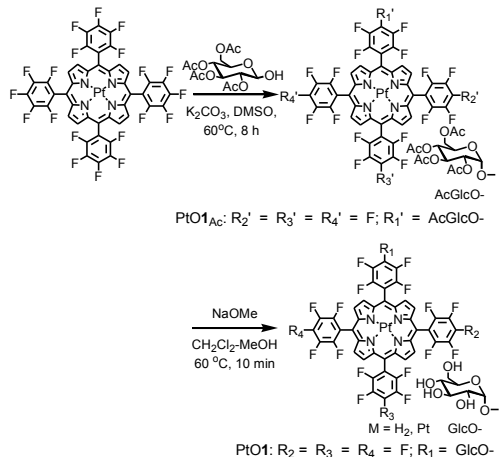
4-1. グルコース連結ポルフィリン金属錯体の合成

ジエチルアミン存在下、TFPP および金属錯体 (Zn, Pd, Pt) に 1~4 当量の AcGlcSAC を求核置換反応させることで保護体を 14~86% で得た。その後ナトリウムメトキドを用いて脱保護を行い MSx を 42~82% で得た (反応式 1)。



反応式 1 S 連結体の合成

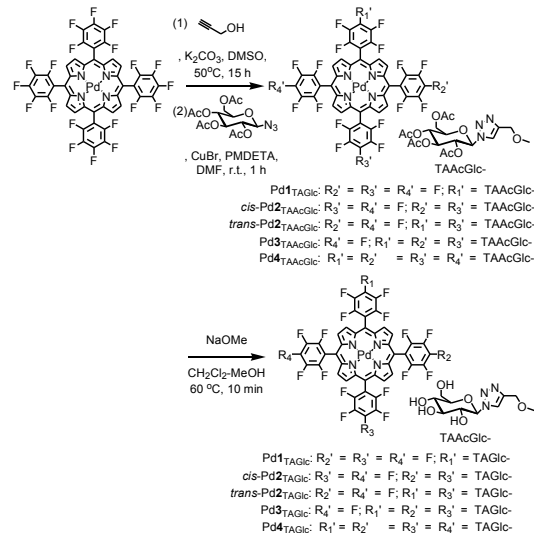
O 連結体は、 K_2CO_3 存在下、PtTFPP に 2 当量の AcGlcOH を反応させることで 18% で保護体を得た後、脱保護することで PtO1 を収率 52% で得た (反応式 2)。



反応式 2 O 連結体の合成

triazol 環体は、PdTFPP に塩基性 (K_2CO_3) 条件下、1~8 当量のプロパギルアルコールを反応させ 1~4 置換プロパギルポルフィリンを 6~50% で得た。このプロパギルポルフィリン

に対応する当量の AcGlcN₃ を銅(I)触媒下反応させ、Click 反応により保護体を 58~78% で得た。その後、グルコースのアセチル基を脱保護することで目的の 1~4 置換 PdTA を 37~88% で得た (反応式 3)。



反応式 3 triazol 環体連結体の合成

すべての化合物は、1D NMR (¹H, ¹⁹F, ¹³C) および 2D (COSY, HMQC) と UV-Vis スペクトルにより構造を決定し、元素分析、HPLC により純度が 96% 以上であることを確認した。

4-2. ヒドロキシラジカル(•OH)測定

HPF を用いて、グルコース連結ポルフィリン金属錯体 ($c = 5 \mu M$) 3% DMSO/ PBS 溶液中に X 線を 10 Gy 照射した。照射したプレートについて蛍光強度を求め相対•OH 発生量を中心金属、グルコース鎖の置換数および連結部位についてそれぞれ比較した (図 2)。比較物質としてシスプラチンを用いた。PBS において、シスプラチンを含めすべてのグルコース連結ポルフィリンで•OH の発生量の違いはほとんど見られなかった。

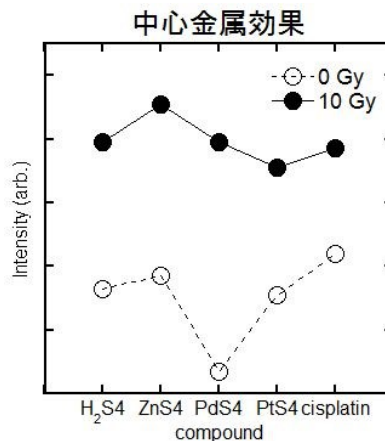


図 2-1 ヒドロキシラジカル発生試験

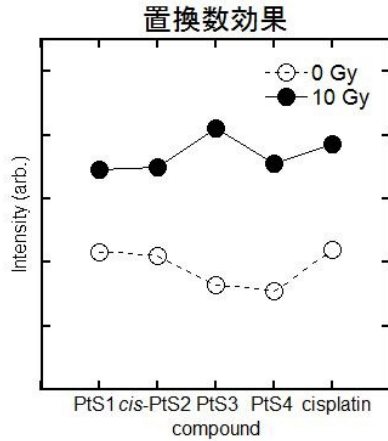


図 2-2 ヒドロキシラジカル発生試験

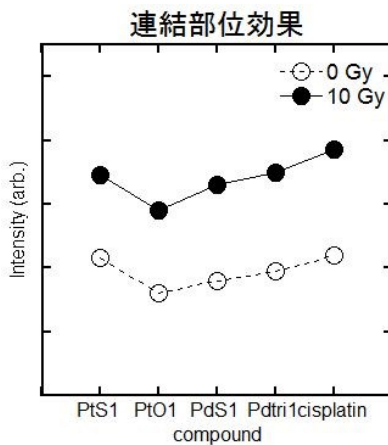


図 2-3 ヒドロキシラジカル発生試験

4-3. X線増感試験

RGM細胞及びRGK細胞 (1×10^4 cells/well) にグルコース連結ポルフィリン金属錯体 ($c = 5 \mu\text{M}$) を24時間接触後、X線15 Gyを照射した。24時間時間後、WST-8アッセイにより細胞の生存率を求めた(図3)。比較物質としてヘマトポルフィリン(HP)も同様の試験を行った。また α -トコフェロール(100 mM, 500 mM)を共存させたX線増感試験も同様に行った。

図3に示すように、ほとんどのグルコース連結ポルフィリン金属錯体はRGK細胞に対して高い殺傷効果すなわちX線増感効果を示した。これはグルコース連結ポルフィリン金属錯体がRGM細胞よりRGK細胞に高い取り込み量を示すことに起因すると考えられる(雑誌論文2)。またRGK細胞において、中心金属で比較したところ、Zn体とPt体において高いX線増感効果が観測された。特に白金体は、すべての置換体において高いX線増感効果を示した(図3-2)。また、糖鎖置換数の中で最もガン細胞へ高い取り込み量を示すtrans-2置換体は、図3-2を示す、一重項酸素の消去剤である α -トコフェロールを100 mMを共存させることで、trans-2置換体の副

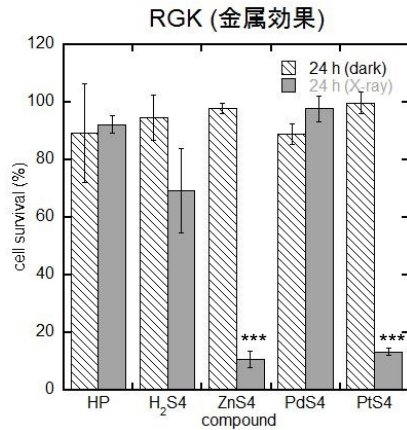
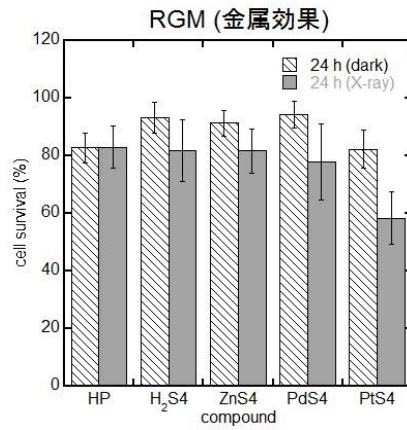


図 3-1 X線増感試験(中心金属) n=6.

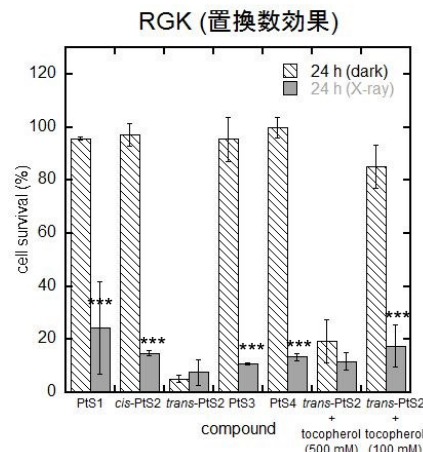
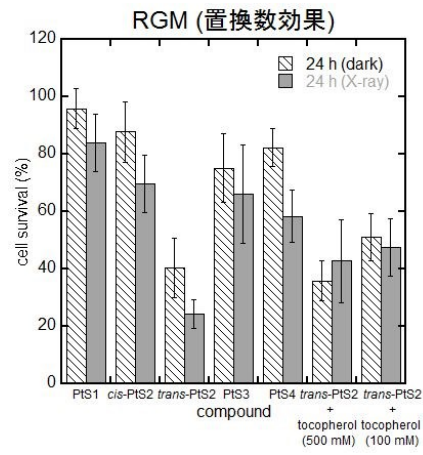


図 3-2 X線増感試験(糖鎖置換数) n=6.

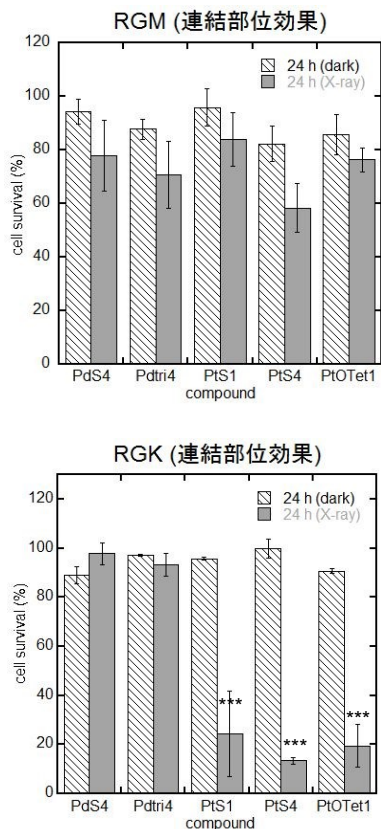


図 3-3 X線増感試験(連結部位) n=6.

作用(光過敏症)の原因となる化合物の光細胞毒性能を押さえることに成功した。今後、ガン細胞への高い取り込み量を示す *trans*-2置換体について様々なガン細胞についてのX線増感試験を検討していく予定である。

本研究は 2013~2015 年度 科学研究費助成事業(若手 B)の援助を賜り、研究成果を上げることができました。ここに心より深く感謝いたします。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① M. Tamura, H. Matsui, S. Hirohara, K. Kakiuchi, M. Tanihara, N. Takahashi, K. Nakai, Y. Kanai, H. Watabe, J. Hatazawa, "Rapid synthesis of ⁶²Zn-labeled S-glycosylated porphyrin as positron emission tomography tracers for in vivo PET imaging", *Chem. Lett.*, in press. DOI: 10.1246/cl.140056 (査読有)
- ② M. Tamura, H. Matsui, S. Hirohara, K. Kakiuchi, M. Tanihara, N. Takahashi, K. Nakai, Y. Kanai, H. Watabe, J. Hatazawa, "Selective accumulation of [⁶²Zn]-labeled glycoconjugated porphyrins as multi-functional positron emission tomography tracers in cancer cells", *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 22, pp. 2563-2570 (2014). DOI: 10.1016/j.bmc.2014.02.021 (査読有)
- ③ M.Obata, R.Asato, K. Mitsuo, S. Hirohara, "Radical Polymerization of Trifluoromethyl-substituted Methyl Methacrylates and Their Application for Use in Pressure-Sensitive Paint", *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*,

Vol.52, pp.963-972 (2014). DOI: 10.1002/pola.27076 (査読有)

- ④ K. Fujitake, T. Tomiyama, S. Fujiyama, M. Obata, M. Tamura, H. Matsui, S. Hirohara, "Synthesis of Hydroxyethoxy-conjugated Porphyrin Derivatives and Evaluation of Their Photodynamic Effect", *ALA-Porphyrin Science*, Vol.2(1), pp.47-56 (2013). HP: <http://porphyrin-ala.com/> (査読有)
 - ⑤ S. Hirohara, K. Sharyo, Y. Kawasaki, M. Totani, A. Tomotsuka, R. Funasako, N. Yasui, Y. Hasegawa, J. Yuasa, T. Nakashima, T. Kawai, C. Oka, M. Kawaichi, M. Obata, M. Tanihara, "Trans-Bisglycoconjugation is an Efficient and Robust Architecture for PDT Photosensitizers based on 5,10,15,20-Tetrakis (pentafluorophenyl)porphyrin Derivatives", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Vol.86, pp.1295-1308 (2013). DOI: 10.1246/bcsj.20130131 (査読有)
 - ⑥ A. Kusumaatmaja, T. Ando, K. Terada, S. Hirohara, T. Nakashima, T. Kawai, T. Terashima, M. Tanihara, "Synthesis and photoproperties of Eu(III)-bearing star polymers as luminescent materials", *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, Vol.51, pp.2527-2535 (2013). DOI: 10.1002/pola.26652 (査読有)
 - ⑦ S. Hirohara, Y. Kawasaki, R. Funasako, N. Yasui, M. Totani, H. Alitomo, J. Yuasa, T. Kawai, C. Oka, M. Kawaichi, M. Obata, M. Tanihara, "Sugar and Heavy Atom Effects of Glycoconjugated Chlorin Palladium Complex on Photocytotoxicity", *Bioconjugate Chem.*, Vol.23, pp.1881-1890 (2012). DOI: 10.1021/bc300223j (査読有)
 - ⑧ M. Obata, T. Kobari, S. Hirohara, M. Tanihara, "Synthesis of poly[2-(α -D-mannopyranosyloxy)ethyl-co-2-dimethylaminoethylmethacrylates] and its lectin-binding and DNA-condensing properties", *Polymer.*, Vol.53, pp.4672-4677 (2012). DOI: 10.1016/j.polymer.2012.08.031 (査読有)
 - ⑨ M. Obata, E. Ohtake, S. Hirohara, M. Tanihara, S. Yano, "Porphyrin Derivatives act as Vinylene Monomers in TEMPO-mediated Radical Copolymerization with Styrene", *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, Vol.50, pp.3592-3597 (2012). DOI: 10.1002/pola.26147 (査読有)
 - ⑩ M. Obata, M. Shimizu, T. Ohta, A. Matsushige, K. Iwai, S. Hirohara, M. Tanihara, "Synthesis, Characterization and Cellular Internalization of Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) bearing α -D-Mannopyranose", *Polym. Chem.*, Vol.2, pp.651-658 (2011). DOI: 10.1039/C0PY00326C (査読有)
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 廣原志保, 田村磨聖, 松井裕史, 小幡誠, "ポルフィリン金属錯体の X線感受性試験",

- 第4回ポルフィリン ALA 学会, 神戸, 平成 25 年 4 月 26 日
- ②白石昌大, 藤竹香澄, 富山泰至, 藤山真治, 小幡誠, 松井裕史, 田村磨聖, 廣原志保, “異なる置換基を有するポルフィリンの合成と光細胞毒性”, 第 93 回日本化学会春季年会, 広島, 平成 26 年 11 月 27 日~30 日
- ③赤星迅人, 藤竹香澄, 小幡誠, 松井裕史, 田村磨聖, 廣原志保, “2 種類の置換基を導入したクロリンパラジウム錯体の開発”, 第 93 回日本化学会春季年会, 広島, 平成 26 年 11 月 27 日~30 日
- ④藤津恭介, 赤星迅人, 白石昌大, 藤竹香澄, 小幡誠, 松井裕史, 田村磨聖, 伊藤紘, 廣原志保, “SOD 製剤のための糖連結ポルフィリンマンガン錯体の合成と物性評価”, 第 93 回日本化学会春季年会, 広島, 平成 26 年 11 月 27 日~30 日
- ⑤伊藤由美子, 藤竹香澄, 廣原志保, “2 置換クロリンの合成と PDT 評価”, 2013 年日本化学会中国四国支部大会, 広島, 平成 25 年 11 月 16 日~17 日
- ⑥佐伯茉耶, 藤山真治, 廣原志保, “エチレングリコール連結ポルフィリンを用いた PET 診断薬の合成法の開発”, 2013 年日本化学会中国四国支部大会, 広島, 平成 25 年 11 月 16 日~17 日
- ⑦富山泰至, 藤竹香澄, 廣原志保, “水溶性置換基を有するフッ素ポルフィリンの合成と in vitro 評価”, 2013 年日本化学会中国四国支部大会, 広島, 平成 25 年 11 月 16 日~17 日
- ⑧藤山真治, 藤竹香澄, 田村磨聖, 松井裕史, 廣原志保, “水溶性を変化させた PEG 連結ポルフィリンの合成と光細胞毒性”, 2013 年日本化学会中国四国支部大会, 広島, 平成 25 年 11 月 16 日~17 日
- ⑨藤竹香澄, 田村磨聖, 松井裕史, 廣原志保, “様々な癌細胞株を用いた糖連結ポルフィリンの PDT 試験”, 2013 年日本化学会中国四国支部大会, 広島, 平成 25 年 11 月 16 日~17 日
- ⑩藤竹香澄, 井上葵, 伊藤由美子, 佐伯茉耶, 田村磨聖, 松井裕史, 小幡誠, 廣原志保, “グルコース連結 Mn ポルフィリンの合成と機能評価”, 第 3 回ポルフィリン ALA 学会, 茨城, 平成 25 年 4 月 27 日
- ⑪富山泰至, 西谷雄矢, 藤山真治, 藤竹香澄, 船迫亮太, 廣原志保, 田村磨聖, 松井裕史, 小幡誠, 谷原正夫, “エチレングリコール連結ポルフィリンの合成と光細胞毒性”, 第 3 回ポルフィリン ALA 学会, 茨城, 平成 25 年 4 月 27 日
- ⑫藤山真治, 富山泰至, 藤竹香澄, 田村磨聖, 松井裕史, 廣原志保, “亜鉛ポルフィリンの合成と細胞評価”, 第 3 回ポルフィリン ALA 学会, 茨城, 平成 25 年 4 月 27 日
- ⑬井上葵, 廣原志保, 田村磨聖, 松井裕史, “グルコース連結マンガンポルフィリンの合成と光細胞毒性評価”, 第 27 回中国四国

- 地区高分子若手研究会, 山口, 平成 24 年 11 月 8~9 日
- ⑭西谷雄矢, 船迫亮太, 田村磨聖, 廣原志保, 小幡誠, 松井裕史, 谷原正夫, “エチレングリコール連結フッ素ポルフィリンの合成と光細胞毒性評価”, 第 27 回中国四国地区高分子若手研究会, 山口, 平成 24 年 11 月 8~9 日
- ⑮廣原志保, 戸谷匡康, 湯浅順平, 中島琢也, 河合壯, 岡千緒, 川市正史, 小幡誠, 谷原正夫, “位置選択的糖修飾により発現するポルフィリンの特異な体内動態と高効率光線力学効果”, 2012 年光化学討論会, 東京, 平成 24 年 9 月 12~15 日
- ⑯廣原志保, 宇田圭吾, 谷原正夫, 小幡誠, 高橋成人, 篠原厚, 金井泰和, 畑澤順, 垣内喜代三, “PET 診断のための IDG 連結ポルフィリン誘導体の合成”, 第 15 回ヨウ素学会シンポジウム, 千葉, 平成 24 年 9 月 11 日
- ⑰廣原志保, 田村磨聖, 高橋成人, 中井浩二, 金井泰和, 渡部浩司, 谷原正夫, 垣内喜代三, 松井裕史, 篠原厚, 畑澤順, “光線力学療法のための新規物質の開発”, 第 22 回日本光線力学学会, 茨城, 平成 24 年 7 月 6~7 日
- ⑱廣原志保, 戸谷匡康, 湯浅順平, 河合壯, 岡千緒, 川市正史, 小幡誠, 谷原正夫, “位置選択的グルコース修飾により発現するポルフィリンの特異な体内動態と高効率光線力学効果”, 第 92 回日本化学会春季年会, 神奈川県, 平成 24 年 3 月 25~28 日
- ⑲廣原志保, 戸谷匡康, 湯浅順平, 河合壯, 岡千緒, 川市正史, 小幡誠, 谷原正夫, “糖連結フッ素ポルフィリン類の光細胞毒性に対する構造活性相関”, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 茨城県, 平成 23 年 9 月 12~14 日

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 悪性腫瘍の PET 診断用トレーサー
 発明者: 松井裕史, 田村磨聖, 廣原志保, 谷原正夫, 垣内喜代三
 権利者: 国立大学法人筑波大学, 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学, 国立高等専門学校機構
 種類: 特許
 番号: 特願 2013-159132 号、PCT/JP2013/1257
 出願年月日: 2013 年 7 月 31 日、2014 年 2 月 3 日
 国内外の別: 国内、国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣原 志保 (HIROHARA, Shiho)

宇部工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号: 70413804