

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460032

研究課題名(和文)デュアルスイッチ型caged化合物の開発

研究課題名(英文)Development of novel caged compound bearing off/on switch of light sensitivity

研究代表者

鈴木 紀行 (Suzuki, Noriyuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：10376379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「酵素反応による光感受性の変化」と「光反応による生理活性物質の放出」という2つのスイッチを分子内に有するcaged化合物を開発し、生体内で起こる様々なイベントを操作し解析するためのツールとして、さらには臨床薬剤としての応用に関する検討を行った。その結果、がんの虚血部位で活性化されるもの、酸化ストレスが負荷された組織中でのみ活性化されるもの、特異的な酵素反応や化学反応で活性化されるものなど、様々なスイッチを組み込んだcaged化合物の開発に成功した。また本研究において開発したcaged化合物について、細胞内で特定の条件によって活性化され、かつ光照射によって適切に機能することを示した。

研究成果の概要(英文)：Caged compounds are bioactive molecules inactivated by modification with photolabile protecting groups, and just irradiation with light to the caged compounds leads to generating corresponding bioactive molecules with highly spatial and temporal resolutions. However, spatial resolution of light is not enough for the subcellular applications of caged compounds. Therefore we developed novel photolabile groups with higher spatial resolution. We considered that spatial resolution up to subcellular level could be achieved by switching its photosensitivity by enzymatic reactions. If a caged compound is masked its photosensitivity by enzymatically cleavable groups, specific uncaging in the targeted organelle in which the reporter enzyme is localized could be achieved. We designed and synthesized novel photolabile groups, and demonstrated that photosensitivity of these compounds could be controlled by enzymatic reactions.

研究分野：医歯薬学

キーワード：光化学反応 caged化合物 がん 虚血

1. 研究開始当初の背景

Caged 化合物とは、光分解性保護基によって生理活性化合物を保護することでその生理活性を失わせた化合物をさす。この caged 化合物は、目的の組織や細胞に導入したのち光照射を行うことによって、任意の時間・空間内に元の生理活性物質を遊離させる (uncage する) ことができるため、ダイナミックな生体内シグナル伝達の解析に汎用され、また薬剤としての応用も期待されている。この caged 化合物を用いる際には、ターゲットとなる組織に対しいかにして特異的に uncage を行うかが鍵となる。しかしながら、従来の caged 化合物では、その特異性は光照射部位をどこまで絞れるかにのみ依存しており、応用が制限されてきた。そこで本研究では、保護基に光感受性のスイッチ機能を組み込むことで、より高機能な caged 化合物の開発を行うことを目的とする。

Caged 化合物の光による脱保護は、光化学反応の一つであり、クロモフォアが光を吸収し一重項励起状態に遷移することで反応が進行する。一方、同じく一重項励起状態からの緩和過程である蛍光発光の過程について近年詳細な研究が行われ、その蛍光発光の強度や波長を分子デザインに基づき自在に操ることが可能であることが示され、生体に適用可能な蛍光センサーとして多大な成果をあげている。申請者は、それらの蛍光センサーに関する研究と同様に、励起分子の緩和過程に含まれる様々な要素を利用することで、蛍光分子と同様に光感受性の ON/OFF スwitching が光分解性保護基においても可能であると考えた。

2. 研究の目的

Caged 化合物は研究のツールとしても臨床薬剤としても有用性が高い。本研究は、「酵素反応による光感受性の変化」と「光反応による生理活性物質の放出」という、2つのスイッチを分子内に有するデュアルスイッチ型 caged 化合物を開発し、様々な細胞内シグナルを解析するためのツールとして、さらには臨床薬剤としての応用を目指すことを目的とした。

申請者の構想の一つを Figure 1 に示した。活性物質の前駆体である caged 化合物 (で示す) は、生理活性・光感受性ともに抑制されており、生理作用を示すことなく細胞全体に分布する。そしてターゲットとなる特定の組織やオルガネラにのみ発現している酵素によってスイッチが ON となり光感受性が回復する (で示す。この図ではミトコンドリアにのみ存在している)。この状態で細胞全体に光照射を行うと、で示された caged 化合物(OFF state)は光反応を起こすことなく、で示された caged 化合物(ON state)のみが光反応を起こし、生理活性物質

(で示す)を遊離する。近年、細胞内のシグナル伝達はその多くがシグナル分子の細胞内の局在の変化によって調節されていることが明らかとなってきており、その解明のために、あるシグナル分子や阻害剤を細胞内に均一に処理するのではなく、ある部分に限定して負荷する必要が生じている。従来型の caged 化合物はそのような実験系を構築するための有用なツールであったが、解除光の照射範囲を細胞内小器官のみに絞り込むのは不可能であった。Figure 1 に示すような光感受性の ON/OFF スwitching が可能な caged 化合物を開発することで、これまで不可能であった高度に制御された時空間的シグナルの解析が可能となると考えられた。

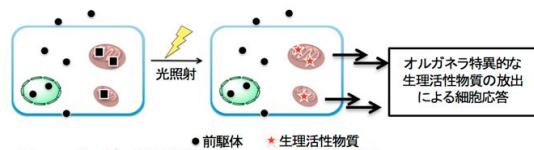


Figure 1. デュアルスイッチ型 caged 化合物の概念図

そのためにまず、光緩和過程の研究において蓄積されている様々な知見をもとに、caged 化合物の核となるクロモフォアを選択し、それに対してどのような化学的修飾を施せばその光感受性が調節出来るのかを検討することとした。一重項励起状態の寿命が長いほど光反応の量子収率は向上すると考えられるため、一重項励起状態のエネルギーレベルや三重項への遷移確率、光誘起電子移動による緩和など、その寿命に影響を与える様々な過程を検討した。そして有望なクロモフォアとスイッチの組み合わせを見だし、caged 化合物のモデル化合物を合成してそれが実際に機能するのかを検討した。そして最終的には、薬剤を保護した caged 化合物を合成し、実際に生体組織や培養細胞を用いて Figure 1 に示す限定的な薬剤の負荷が可能であるかを検証した。

本研究は、いわゆるプロドラッグの概念の応用である。一般的なプロドラッグは生体内の酵素反応などにより薬剤が活性化されるものであり、また従来型の caged 化合物は人工的な光照射を用いて活性な薬剤の遊離を起こす。申請者が開発する新たな caged 化合物は、その両方を利用してより高い時空間的分解能を持たせることにより、全く新しい応用を可能とするものである。このような caged 化合物は合成小分子としては今までに報告が無く、きわめて独創性が高いといえる。

また、このような caged 化合物は、実験室レベルで用いられるツールとして有用であるのみならず、実際に臨床に適用可能な薬剤、例えば抗がん剤としての応用も期待されている。がん組織に取り込まれ、何らかの化学変化が起こることで活性化される抗がん剤のプロドラッグは既に報告されている。しかしながら、それらの薬剤の選択性は十分とはいえない。これは、がん細胞はあくまで正常細胞が変異したものであり、様々な面で性質

が似ていることによる本質的な問題である。一方、がん組織に増感剤を負荷し照射することによって一重項酸素を生成し癌細胞を死滅させる光線力学療法は、いわば caged 一重項酸素ともいえるが、その特異性はレーザー照射部位をどこまで絞れるかによって決まるため、がん組織との境界があいまいな正常組織を正確に識別したり、目視できないような小さながんをすべて死滅させることはやはり難しい。しかし、本申請で開発する caged 基にがん組織に特徴的な生化学的・物理的条件下でのみ特異的に活性化されるスイッチを組み込んでおけば、がん組織に到達した際に光感受性が ON になり、さらに照射を受けて初めて抗がん活性を發揮するプロドラッグを開発することが可能となる。この場合、薬剤は光感受性スイッチによるがん組織の認識と照射という2つの条件が重なった部位でのみ抗がん活性を發揮することとなり、非特異的な副作用が劇的に軽減されることが期待される。むしろこのような応用は抗がん剤に限ったものではなく、アルツハイマー病や感染症など、様々な疾病に適用可能である。

3. 研究の方法

本研究においては、まず第一段階として目的とするデュアルスイッチ型 caged 基のためのクロモフォアとスイッチ部位の検討を主に行った。Caged 基としてはすでに数多くの化合物が報告されており、その一つとして xanthene 類が良好なクロモフォアとして機能しうることが知られていた。申請者は、予備的な検討により、Figure 2 に示す硫黄原子を含む thioxanthene が xanthene よりもさらに高効率で光分解反応を起こすこと、またその反応機構は、C-O 結合のヘテロリシスを経て thioxanthene 部分がカチオンとして遊離することで水酸基を遊離するというものであることを明らかにしていた。またこの反応機構に基づき、Figure 2 の官能基 X として電子吸引性基(EWG)を導入すると thioxanthene カチオン中間体を不安定化することでこの光反応は抑制され、逆に電子供与性基(EDG)はカチオン中間体の安定化を介して光反応を促進することを示していた。これはクロモフォアの化学修飾によりその光分解反応の制御が可能であることを示す具体例の一つであり、研究目的で述べた申請者の構想が実現可能なものであることの証明となっていた。この例以外にも様々なクロモフォアが有用な候補として考えられるし、また反応性を制御する機構についても様々なものが考えられる。申請者は、これらの組み合わせの検討にあたって計算化学的手法を用い、効率的に候補化合物を絞り込むことを計画した。そして有望なものについてはモデル化合物を実際に合成し、光化学反応を検討し、その機能を検証した。

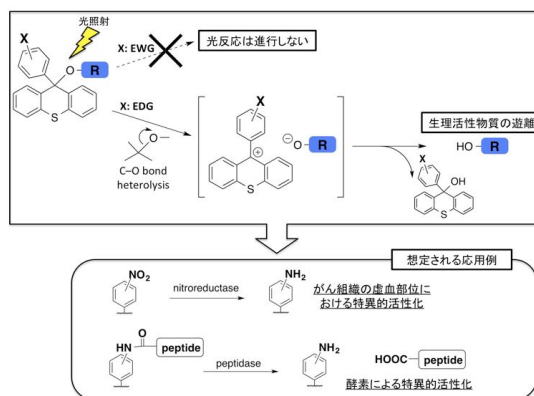


Figure 2. 光反応機構とその反応性の調節*

次に第二段階として、第一段階の研究成果に基づき、具体的なターゲットを念頭においてスイッチ部位をデザインし、薬剤を保護することで実際に生体組織に適用可能なデュアルスイッチ型 caged 化合物の合成・応用を行った。光感受性 ON/OFF のスイッチとしては、具体的なターゲットを考慮し、例えば Figure 2 に示すように、

- i) がん組織を標的とする場合：がん組織は多くが虚血状態となっており、その低酸素環境下で活性化している nitroreductase による還元反応
- ii) 特定の細胞内小器官を標的とする場合：その小器官で特異的に発現している（もしくは、人工的に発現させた）プロテアーゼ、ペプチダーゼなどの酵素

などが考えられる。ここで示す反応では、i)、ii)いずれの場合においても反応後に生じる官能基 X は強い電子供与性基であるアミノ基であり、光反応を強く促進することが期待される。また、保護すべき具体的な薬剤については、ターゲットを定めることである程度候補が絞られ、がん組織をターゲットとする場合はその薬剤は抗がん剤である。Figure 2 に示す xanthene 誘導体を保護基として用いる場合は、水酸基を保護することとなるため、抗がん剤としては代謝拮抗薬として働く核酸誘導体、例えばシタラピンなどが有望であると考えられた。細胞内小器官をターゲットとする場合には、その小器官へ移行すること、またそこから他の部位へさらに移行することが細胞応答として重要であると考えられるシグナル分子（小分子、ペプチド、タンパク質を含む）が保護すべき対象として想定された。

以上のような要素を加味したデュアルスイッチ型 caged 化合物を実際に合成し、まずは *in vitro* の酵素系でその機能を検証し、その後、培養細胞を用い、生きた細胞内でこの caged 化合物が機能しうるか、検討を行った。

4. 研究成果

目的とするデュアルスイッチ型 caged 基に導入するクロモフォアとスイッチ部位の検

討を行った結果、thioxanthene を光反応のクロモフォアとし、その誘導体を多数合成してそれぞれの uncage 効率を評価することで、クロモフォアに電子吸引性基を導入するとその光反応は抑制され、逆に電子供与性基を導入すると促進されることを示した。また、計算科学的な手法を用い、反応中間体の電子状態を計算することで、デザインした caged 化合物の光反応性の予測が可能であることを示した。さらに、がん細胞特異的に活性化される caged 抗がん剤の開発を目指し、虚血状態となっているがん組織において活性化されているニトロレダクターゼをターゲットとした基質のデザイン、合成を行った。すなわち、光反応のスイッチ部位にニトロフェニル基を、光反応によって放出される薬剤として抗がん剤であるシタラビンを導入した基質を合成し、その評価を行った (Figure 3)。

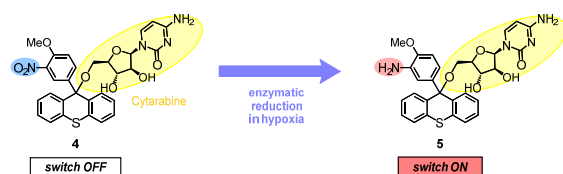


Figure 3. Design of caged anticancer drug targeting for hypoxic condition.

その結果、スイッチであるニトロフェニル基は低酸素状態のラット肝ミクロソームによって還元酵素依存的にアミノフェニル基へと還元され、光照射によってシタラビンを選択的に放出することが示された (Figure 4)。

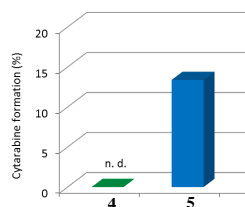


Figure 4. Photolysis of caged cytarabine under irradiation for 5 min.

デザイン・合成および光反応性の評価を行った各化合物について細胞毒性の評価を行った。培養細胞には、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 を用いた。その結果、抗がん剤であるシタラビンの薬効を、開発した光分解性保護基でマスクした化合物である caged シタラビンは、遊離型のシタラビンに比べ細胞毒性が低いことが明らかとなった (Figure 5)。

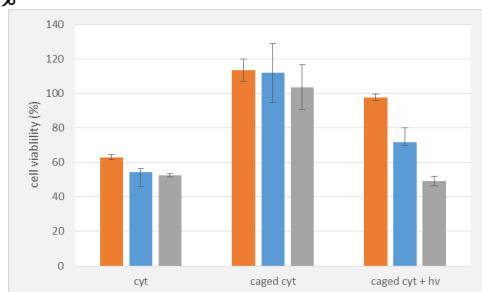


Figure 5. Cell viability of HepG2. cyt: cytarabine, caged cyt: caged cytarabine, caged cyt + hv : caged cytarabine under irradiation for 10 min. Drug concentrations: 100 nM: red bar, 1 μM: blue bar, 10 μM: gray bar.

また、この保護基によってマスクされた細胞毒性は、10 分間の光照射によってアンマスクされ、光照射によって細胞毒性を回復させることに成功した (Figure 5)。このことから、本研究により開発された光分解性保護基が、生体に適用可能であることが示された。

また、この光分解性保護基の有用性をさらに高めるため、スイッチ部分についてもさらなる検討を重ねることで、ニトロレダクターゼをターゲットとしたスイッチに加え、がん細胞特異的に発現しているペプチド分解酵素をターゲットとしたもの (Figure 6, Target 1)、細胞内の非特異的エステラーゼをターゲットとすることで細胞内と細胞外を区別した薬剤の放出を可能としたもの (Figure 6, Target 2) 細胞内で発生する過酸化水素をターゲットとしたもの (Figure 6, Target 3) 組織特異的な薬剤送達に汎用される Staudinger ligation をターゲットとしたもの (Figure 6, Target 4) など、様々なスイッチ部位の導入にも成功した。以上の成果に基づき、本研究によって構築された光分解性保護基の caged 化合物としての応用性、薬剤への適用の可能性など、プラットフォームとしての有用性を示すことに成功した。

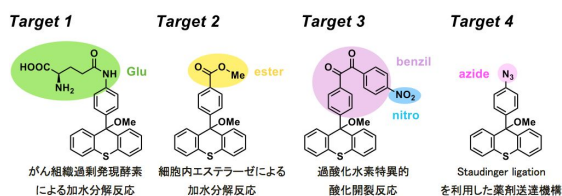


Figure 6. Developed caged compounds in this work.

以上のように、虚血部位で活性化されるもの、活性酸素や特異的な酵素反応で活性化されるものなど、様々なスイッチをこの caged 化合物に組み込むことが可能であることを示してきたが、同時に本研究を通じて採用してきた光分解性保護基に関する唯一の要改善点として、クロモフォアの吸収波長が比較的短波長であるという点が浮かび上がってきた。短波長の紫外光は、エネルギーが高く光反応には有利であるが、生体内の様々な分子により吸収されるため生体透過性が低いこと、細胞や生体組織に対しそれ自身が光毒性を示すことなど、問題が多い。そこでこの光分解性保護基のクロモフォア部分の構造を見直し、より長波長の光によって脱保護されるよう構造修飾を行うこととした。この点については現在も研究を継続中であるが、本 caged 化合物の長波長化が達成されれば、紫外光の照射による望ましくない副反応や光による直接的な細胞毒性が大幅に抑制されると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

K. Takahashi, N. Suzuki, Y. Ogra. Bioavailability comparison of nine bioselenocompounds in vitro and in vivo. *Int. J. Mol. Sci.*, 査読あり, 18:506, 1-11 (2017).

DOI: 10.3390/ijms18030506

T. Doura, K. Takahashi, Y. Ogra and N. Suzuki: Combretastatin A4-galactosyl conjugates for ovarian cancer prodrug monotherapy. *ACS Med. Chem. Lett.*, 査読あり, 8, 211-214 (2017).

DOI: 10.1021/acsmchemlett.6b00427

Y. Ogra, A. Tejima, N. Hatakeyama, M. Shiraiwa, S. Wu, T. Ishikawa, A. Yawata, Y. Anan, N. Suzuki. Changes in intracellular copper concentration and copper-regulating gene expression after PC12 differentiation into neurons. *Sci. Rep.*, 査読あり, 6:33007, 1-9 (2016).

DOI: 10.1038/srep33007

M. Hamano, M. Akimoto, K. Funada, N. Kagawa, N. Suzuki, T. Ishikawa. Construction of Bicyclo[3.2.1]octane System Carrying (R)-Carvone Core under Oxidative Radical Conditions: Synthetic Access to (+)-Miroestrols. *Synlett*, 査読あり, 26, 547-551 (2015).

DOI: 10.1055/s-0034-1379700

M. Takahashi, N. Suzuki, T. Ishikawa, H.-Y. Huang, H.-S. Chang, I.-S. Chen. Unprecedented 8,9'-Neolignans: Enantioselective Synthesis of Possible Stereoisomers for Structural Determination. *J. Nat. Prod.*, 査読あり, 77, 2585-2589 (2014).

DOI: 10.1021/np500641a

S.-S. Tang, C. Guillermier, M. Wang, J. C. Poczatek, N. Suzuki, J. Loscalzo, C. Lechene. Quantitative imaging of selenoprotein with multi-isotope imaging mass spectrometry. *Surf. Interface Anal.*, 査読あり, 46, 154-157 (2014).

DOI: 10.1002/sia.5625

S. Mkhize, N. Suzuki, A. Kurosawa, M. Fujinami, C. Chaicharoenpong, T. Ishikawa. New Synthetic Procedure for 2-Aryl-1,4-naphthoquinone-1-oxime Methyl Ethers with Potent Antitumor Activity. *Synlett*, 査読あり, 25, 2059-2063 (2014).

DOI: 10.1055/s-0034-1378342

T. Miyayama, Y. Arai, N. Suzuki, S. Hirano. Cellular distribution and behavior of metallothionein in mammalian cells following exposure to

silver nanoparticles and silver ions. *Yakugaku Zasshi*, 査読あり, 134, 723-729 (2014).

DOI: 10.1248/yakushi.14-00035-1

〔学会発表〕(計 7 件)

鈴木 紀行, 渡邊 弘樹, 堂浦 智裕, 小椋 康光: セレンの酸化還元反応に基づく新規 ROS 蛍光プローブの開発: 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017 年 3 月 27 日.

鈴木紀行: 化学形態別分析を基盤とした バイオセレンウム研究: 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016 年 9 月 17 日. N. Suzuki, Y. Ogra: Recent advances in analytical techniques for selenium compounds: 2016 Japan/Korea Joint Symposium on Pharmaceutical Health Science and Environmental Toxicology, Tokyo, Sept 10, 2016.

鈴木紀行, 久保田翔子, 青木孝憲, 堂浦 智裕, 石川 勉, 小椋康光: 特異的環境下で活性化される新規ケージド化合物の開発と応用: 日本ケミカルバイオロジック学会 第 11 回年会, 京都, 2016 年 6 月 15 日.

鈴木紀行, Shioh-Shih Tang, 小椋康光: 高空間分解能イメージング質量分析法によるセレノプロテインの可視化: フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー, 神戸, 2015 年 9 月 18 日.

鈴木紀行, Shioh-Shih Tang, Claude Lechene, 小椋康光: 高空間分解能イメージング質量分析法によるセレノプロテインの可視化: 日本ケミカルバイオロジック学会第 10 回年, 仙台, 2015 年 6 月 11 日.

鈴木紀行: 生体微量金属に関連したバイオプローブの開発: 日本薬学会第 135 年会 (一般シンポジウム S39), 神戸, 2015 年 3 月 27 日.

〔図書〕(計 2 件)

N. Suzuki, Y. Ogra. ⁷⁷Se NMR Spectroscopy for Speciation Analysis of Selenium Compounds. *Metallomics*, Springer, Berlin (2017).

鈴木紀行: スタンダード薬学シリーズ II 2 物理系薬学 II. 化学物質の分析, 日本薬学会編, 東京化学同人, 東京 (2016).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 紀行 (SUZUKI, Noriyuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 10376379