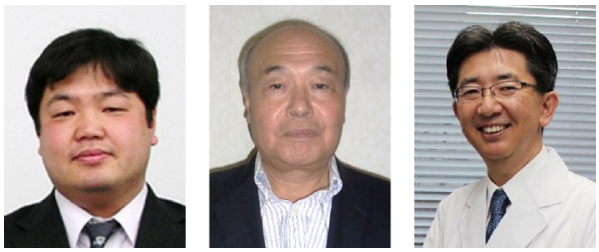
NanotechJapan Bulletin

本記事は，文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業 秀でた利用成果について紹介するものです．

文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム 令和 3 年度秀でた利用成果

ヘテロ原子を含有する光感受性化合物の構造決定と抗がん光線力学療法への応用

大阪府立大学大学院工学研究科　野元 昭宏，奈良女子大学共生科学研究センター　矢野 重信，
名古屋市立大大学院医学研究科　片岡 洋望
名古屋大学　鳥居 実恵，林 育生，伊藤 始，坂口 佳充



（左から）大阪府立大学　野元 昭宏，
奈良女子大学　矢野 重信，名古屋市立大学　片岡 洋望

（左から）名古屋大学　林 育生，鳥居 実恵，伊藤 始，坂口 佳充

展示会場にて賞状とともに
（左から）林 育生，野元 昭宏，坂口 佳充

1．はじめに

近年，がんは早期に発見すれば高い確率で治る病気となりつつあるが，今もって深刻な病である．その治療法は，光線力学療法，外科治療，放射線療法，温熱療法，化学療法など様々であり，継続的に研究が進められているが，未だその死亡率は高い．体組織に生じるがんは場所や種類によって癌や腫瘍などいくつかの表記はあるが，これらは主に腫瘍に大別され，厚生労働省の「令和 2 年（2020）人口動態統計月報年計（概数）の概況）」（https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai20/）によると，死亡数における死因の約 3 割を腫瘍が占めている（表 1）．また，年齢別の死因の構成割合を見ると，男性で 65 － 75 歳，女性で 55 － 64 歳の 4 割以上が腫瘍が原因で死亡している．

本研究では，このような現状において，さまざまな治

表 1　主な死因の構成割合（2020）

死因	割合（%）
腫瘍（悪性新生物）	27.6
心疾患（除 高血圧性）	15.0
老衰	9.6
脳血管疾患	7.5
肺炎	5.7
誤嚥性肺炎	3.1
不慮の事故	2.8
腎不全	2.0
アルツハイマー病	1.5
血管性及び詳細不明の認知症	1.5
その他	23.7

療法の中でも次世代の医療に向け，子どもや高齢者などの身体にとって手術の負荷が少ない光線力学療法に着目し，新薬剤開発を中心に研究を進めることとした．

2．光線力学療法について

光線力学療法（photodynamic therapy：PDT）の概略を**図 1** に示す．まず，①光感受性物質をがん患者に投与し，②主に内視鏡レーザーを患部近くに導入する．③一定時間後に患部に対し光感受性物質に対応する波長の光線（レーザー光）を照射することで光化学反応により一重項酸素を発生させ，患部のがん細胞を破壊する，という治療法である．よく知られているレーザー治療は，例えばレーザーによって表皮組織自体を焼いたり，部分的な切除を行ったりするのだが，PDT では照射するレーザー光の波長を考慮し，先にこの波長に吸収領域を有する光感受性色素を投与（注射）し，患部に色素が行き渡った後でレーザー光を照射する．レーザーは低侵襲かつレーザー照射局所での根治が可能であるため，身体への負荷が少なく，高齢化社会を迎える諸国においてはその開発が切望されている．現在，我が国では Porfimer sodium が食道癌，胃癌，肺癌，子宮頚癌に，第 2 世代の Talaporfin sodium が肺癌，脳腫瘍に用いられているが，がん細胞特異性，選択性が十分とは言えず，より抗腫瘍効果の高い PDT 用薬剤色素の開発が望まれている．腫瘍集積性を向上させるために生体の免疫機能を利用し，色素を抗体に結合させた光免疫療法（Photoimmunotherapy：PIT）や，腫瘍に集積して生体内反応によって色素を形成する 5-アミノレブリン酸（5-ALA）などが研究対象となって，さまざまな腫瘍への集積性や治療効果の向上に向けた努力が今も続けられている [1]．ここでは，我々が行ったクロリン e6 を骨格とした薬剤の合成開発を中心に述べる [2]．

がん治療のためには，生体内を透過しやすい波長領域のレーザー光が望ましく，これには装置面で，そのようなレーザーが提供されるかにもよる．もちろんがんの部位にもよるが，できるだけ小型のレーザー装置で生体透過性が高い光を利用し，かつ治療効果を高めるために，生体において光学的窓と呼ばれる 600 − 900nm 付近に吸収領域を有する色素が PDT 用光感受性色素に適しているといえる（**図 2**）．せっかく光を照射しても，これよりも短い波長ならば，血液に含まれるヘモグロビンなどに，長い波長ならば水分に吸収されてしまい，患部の色素に光が届かないことになる．

照射された光によって色素は一重項の励起状態となり，部分的に項間交差によって生成した三重項状態から一重項酸素が発生し，これが直接または間接的に反応し，患部を減退させることになる（**図 3**）．

3．PDT 用光感受性色素について

このようにさまざまな光学的条件から，有力な薬剤として近年研究が盛んに行われている化合物の一つにクロリンと呼ばれる物質がある．これは，よく耳にするポルフィリンに近い構造で，違うのは二重結合の一か所だけが単結合になっているものである（**図 4**）．この部分的な結合の違いが 650nm 付近の光吸収を大きくする．ポル

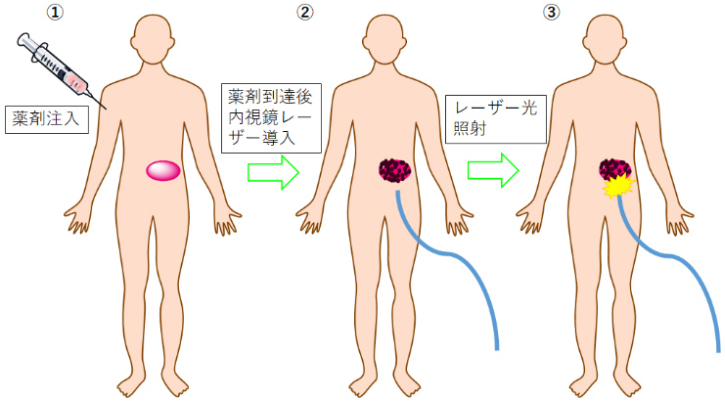


図 1　PDT の概略

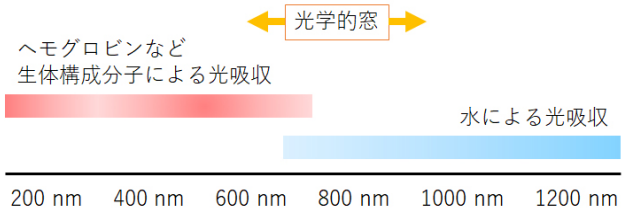


図 2　生体での透過光

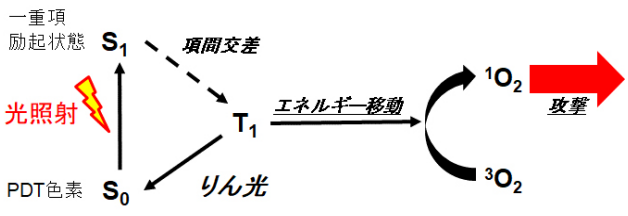


図 3　光による反応

フィリンとクロリンの光吸収スペクトルの概略を図 5 に示す．要点だけ述べると，先ほど示した 650nm 付近の光吸収が大きく増加する点である．ポルフィリンタイプの PDT 薬剤もあり，その場合，吸収としては小さいものであるが 550nm 付近の吸収帯を利用してレーザーを照射するのが一般的である．これらの照射波長はいずれの吸収に合わせても良いのだが，装置や治療効果の点から長波長の領域が使われることが多い．本研究ではこのクロリンに着目し，合成方針を立てることとした．

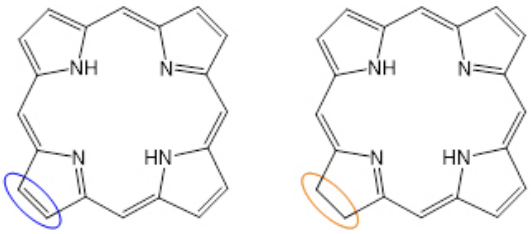


図 4　ポルフィリン（左）とクロリン（右）

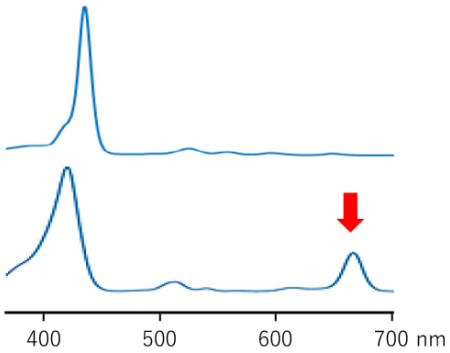


図 5　吸収スペクトルの概略：ポルフィリン（上），クロリン（下）

4．合成計画

近年の薬剤に必要な特質の一つに体外排出性が挙げられる．病態の深刻度にもよるが重金属のように体内に残留することなく速やかに排出されることが望ましい．これは実際に合成してマウス試験をしてみなければわからないのであるが，本研究の計画段階では，天然物をベースに組み合わせればある程度の無害性・排出性は担保されるのではないか，という期待のような推測に基づき計画を進めた．この点，クロリン e6 と呼ばれる物質は天然物を由来としており，既存薬であるタラポルフィンなどにも使われていることから安全であることが期待された（図 6）．

合成化学の経験者ならば，このクロリン e6 の下部のカルボン酸は容易に変換可能であることが予想される．事実，既に多くの報告例があったため，新規物質の合成としては不適当であろうという結論に至った．そこで，上部にあたる二重結合のアルケン部位について調べたところ，合成例は非常に限定的であったことから，ここに糖鎖を導入することとした．がん細胞はその旺盛な増殖傾向からアミノ酸や糖を取り込みやすく，特にエネルギー源としてのグルコースを吸収しやすいワールブルグ効果（Warburg effect）と呼ばれる性質がある [3]．我々はこれまでにアミノ酸や糖鎖を有する化合物の合成の経験があり [4][5][6]，さらに不飽和結合に対するヘテロ原子の導入反応を長く続けてきたことから [7]，グルコース誘導体の導入が可能であると結論付け，合成をスタートした．

予備的な in vitro 検討から，カルボン酸部位はアルキルキャップしておく方が良い細胞毒性を示したことから，有機溶媒中で反応させるため，アセチル保護化チオグルコースでの導入を進めた（図 7）．

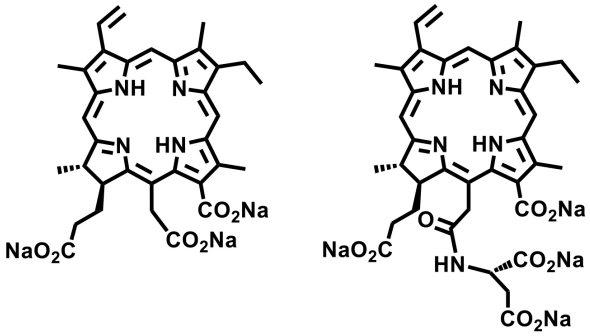


図 6　クロリン e6（左）とタラポルフィン（右）の分子構造

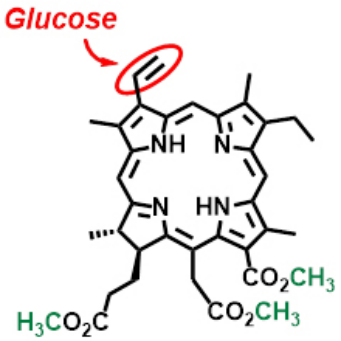


図 7　出発物質とグルコース導入部位

5．新規薬剤の合成とナノテクノロジープラットフォーム（名古屋大学）による精密分析

合成にあたり，いくつかの予備検討を行ったところ，①特殊な試薬ではなく一般的な製造会社で汎用の試薬を用いる，②直接のグルコース導入は立体障害のため反応が進行せず，アルキルスペーサーの導入が必要である，③グルコースを立体保持で導入するためにイオウを反応求核部として用いる，④ヨウ素は脱離しやすく反応剤としては多用されるが，本反応では逆反応を生じて出発物質が回収された，などが重要な点となった．このような予備的な合成検討の結果，次のような反応経路で合成を

進めると微量ながら最終生成物と思われる反応混合物が得られた（**図 8**）.

そこで，名古屋大学分子・物質合成プラットフォームでの質量分析を行った結果，目的物質の生成が確認された．分析は未精製の反応混合物であったが，詳細な質量分析の結果，未反応の出発物質や中間体臭素化物なども確認され，反応が十分に進行していないと判明すると同時に，間違いなく本反応経路で合成が可能であることを，この時強く確信した.

反応経路，最終生成物に関する知見が得られたことから，各反応段階の合成収率の向上化に入った [8]．最も重要なのは臭化アルキル導入体（**1**）から糖誘導体（**2**）を導入し，糖保護体（**3**）を得る段階で，大幅なスケールアップ実験も同時に行った（**表 2**）．この段階は有機合成化学において求核置換反応と呼ばれるもので，イオウの反応性を利用する．副反応として，下部アルキルキャップがイオウに交換することがあるため，反応温度は室温で，あまりにも長い反応時間は好ましくない．反応剤となる **2** を多く用いるほど反応収率は向上するが，単離精製で未反応の 2 を除去しにくい(entry 7)．**1** の量, 溶媒量, **2** の量などを種々検討した結果，**1** に対し約 4.5 当量の **2** の量を加えて反応させると，カラムクロマトグラフィーでの精製後，単離収率 82% で目的の化合物 **3** が得られた（entry 5）．本反応経路は外部委託機関でも良好に再現し，ラジオアイソトープ誘導体も合成された．また大量合成が可能で，マウスを用いた安全性試験も遂行した.

改めて各反応段階における生成物を単離し，名古屋大学分子・物質合成プラットフォームでの高性能 FT-IR 測定からカルボン酸部アルキルキャッピングは反応において脱離することなく保持されており，これに加えて質量分析からも，各段階の生成物を確認した．特に最終生成物に至る脱保護の段階は，部分的な保護基の残余が懸念された．新規化合物であることから HPLC 測定や NMR 測定からも十分な情報が得られない状況であったが，元素分析，高分解能質量分析から，最終の目的薬剤が確実に精製・単離されていることが示され，論文にても報告した.

このように合成した薬剤について抗がん特性について調べた．各種ヒトがん細胞やイヌ乳腺がん細胞に対して PDT 特性を調べたところ，本新規薬剤は蛍光顕微鏡からがん細胞内に取り込まれることが観測され，既存薬と IC_{50} について比較すると高い抗がん活性を有することが明らかとなった（**表 3**）[9].

第三者機関での毒性試験の結果から，本薬剤の毒性は既存薬よりも低く十分に使用可能であることも示された．さらに，ラジオアイソトープイメージングの結果，当初期待していた以上に薬剤の対外排出は速く，マウスにおいては 24 時間でほぼ体外に排出される結果が得られた．これは今後「日帰りがん治療」に大きく前進可能と考えられ，研究を進めている.

これに加えて，小型犬を中心とした動物に対する腫瘍治療に対しても検討を進めている．現在，この治療は主に通院光照射で行っており，高い治癒効果が認められている.

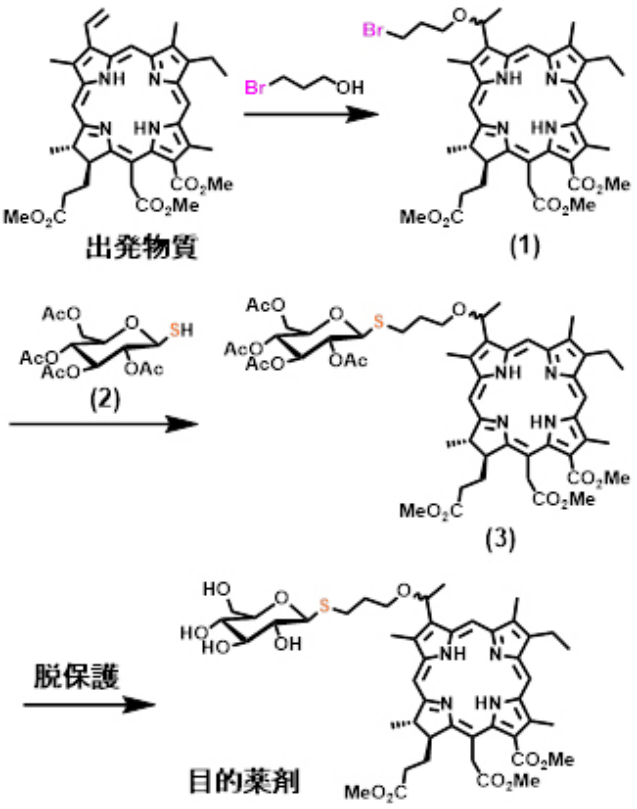


図 8　新規薬剤合成のための合成経路

表 2　糖部位導入段階の反応条件検討

entry	**1** (mmol)	**2** (equiv.)	time (h)	yield (**3**, %)
1[a]	0.132	3.3	3.5	40
2[a]	0.422	3.3	3.5	7
3[a]	3.00	4.5	5.0[c]	56
4[a]			22[d]	46
5[b]	1.30	4.5	3.5	82
6[b]	4.61	3.5	4.0	68
7[b]	5.16	4.5	4.0	96[e]

[a]added 6 equiv. of Et_3N. [b]added 12 equiv. of Et_3N. [c]distributed 18 mL. [d]distributed 34 mL. [e]Much thio-sugar are probably included.

表 3　糖部位導入段階の反応条件検討（IC_{50}，μM）

細胞種	Talaporfin	G-Chlorin-e6
胃癌 MKN45	10.9	0.00059
大腸癌 HT29	14.7	0.0016
食道癌 OE21	15.8	0.00046
食道癌 KYSE30	4.56	0.00028

6．まとめ

以上のように新規化合物の同定は薬剤研究を進める上では非常に重要であり，それによってその後の薬剤効果，体内動態試験，安全性試験，動物実験に進むことができる．これらの同定作業は合成化学者ならば日々行っていることであるが，化合物が複雑になるほど困難を極める．同時に，薬剤の場合，第三者機関での製造の可能性を示すことも重要であり，以前にも増して工業的な展開は重要となっている．

そのような中で，今回の名古屋大学分子・物質合成プラットフォームでの結果は，熟練した技術員，技官から生まれる確実性の高いデータであり，我が国の真のモノづくりに対する寄与は今後測り知れないといえる．このような技術が継続されていくことを強く願うものである．

7．謝辞

本研究は名古屋大学の坂口 佳充特任教授，鳥居 実恵技術職員，林 育生技術職員，伊藤 始技術支援者の御協力により推進されました．深く御礼申し上げます．

動物試験を行っていただいた鳥取大学農学部 共同獣医学科 大崎 智弘准教授，岡本 芳晴教授，誘導体効果を調べていただいた東京薬科大学薬学部 篠田 陽准教授，藤原 泰之教授，高分子融合体を調べていただいた，山形大学有機材料システム研究科 鳴海 敦教授に深く感謝いたします．

また，当研究室 小川 昭弥教授，小玉 晋太朗助教，大阪歯科大学 牧田 佳真講師には合成面での助言に深く感謝し，多くの条件検討に挑んでくださった学生諸君に深く感謝いたします．

参考文献

[1] D. E. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, “Photodynamic therapy for cancer”, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 380 (2003).

[2] 田中 守・西江 裕忠・片岡 洋望・野元 昭宏・矢野 重信 , “ 糖連結光感受性物質による癌細胞超選択的光線力学療法の開発 ”, 光アライアンス，2020 年 8 月号 .

[3] O. Warburg, “On the Origin of Cancer Cells”, *Science*, **123**, 309 (1956).

[4] T. Moriuchi, A. Nomoto, K. Yoshida, A. Ogawa, T. Hirao, “Chirality Organization of Ferrocenes Bearing Podand Dipeptide Chains: Synthesis and Structural Characterization”, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 68 (2001).

[5] H. Nishie, H. Kataoka, S. Yano, J.-i. Kikuchi, N. Hayashi, A. Narumi, A. Nomoto, E. Kubota, T. Joh, “A Next-Generation Bifunctional Photosensitizer with Improved Water-Solubility for Photodynamic Therapy and Diagnosis”, *Oncotarget*, **7**, 74259 (2016).

[6] A. Nomoto, N. Sakamoto, Y. Sakai, K. Fukumoto, S. Ogura, S. Katao, K. Kakiuchi, J. Kikuchi, S. Yano, A. Ogawa, “Synthesis and crystal structures of phenylalanine ester-introduced palladium(II) and platinum(II) complexes and their cytotoxicities”, *Res. Chem. Intermed.*, **45**, 3 (2019).

[7] A. Nomoto, Y. Higuchi, Y. Kobiki, A. Ogawa, “Synthesis of Selenium Compounds by Free Radical Addition Based on Visible- Light-Activated Se-Se Bond Cleavage”, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **13**, 814 (2013).

[8] A. Nomoto, H. Yamaguchi, M. Masuda, K. Hyakumura, S. Kodama, T. Osaki, Y. Okamoto, M. Tanaka, H. Kataoka, A. Narumi, T. Yoshimura, S. Yano, A. Ogawa, “Large-Scale Synthesis of Thio-Glucose-Conjugated Chlorin E6 for Photodynamic Therapy”, *Heterocycles*, 103, 1108 (2021).

[9] H. Nishie, H. Kataoka, S. Yano, H. Yamaguchi, A. Nomoto, M. Tanaka, A. Kato, T. Shimura, T. Mizoshita, E. Kubota, S. Tanida, T. Joh, “Excellent antitumor effects for gastrointestinal cancers using photodynamic therapy with a novel glucose conjugated chlorin e6”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 1204 (2018).

（大阪府立大学　野元 昭宏）

Molecule & Material Synthesis Platform, Nagoya University

【お問い合わせ】
分子・物質合成プラットフォーム
名古屋大学
☎ 052-789-4609
E-mail　nano-platform@chembio.nagoya-u.ac.jp

ホームページ
http://nano-platform.apchem.nagoya-u.ac.jp/