

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288028

研究課題名(和文) 癌診断と治療の両機能を有する先端医療用バイファンクショナル糖連結光機能分子の創出

研究課題名(英文) Development of dual functional glycoconjugated photosensitive supra molecules for advanced photodynamic therapy and photodynamic diagnosis.

研究代表者

矢野 重信 (YANO, Shigenobu)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・客員教授

研究者番号：60011186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：低侵襲性治療として注目されている癌の治療法「光線力学的治療法(PDT)」ならびに「光線力学的診断(PDD)」用の癌選択的に作用する第三世代先端光医療用超分子の創出と機能評価を推進した。その結果、癌細胞選択的にPDT効果を発揮するグルコース連結フラレーン、腫瘍会合性マクロファージをターゲットするマンノース連結クロリン、さらには水溶性のTEG連結フラレーンならびにオリゴ糖連結クロリンの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) has attracted much attention as a less invasive method for treating cancer. We have carried out in isolation and characterization of the third generation glycoconjugated chlorins and fullerenes for the advanced photodynamic therapy and photodynamic diagnosis (PDD) as described follows, 1) antitumor effects in gastrointestinal stromal tumors using photodynamic therapy with a novel glucose-conjugated chlorin, 2) a novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages, 3) efficient singlet oxygen generation from sugar pendant C60 derivatives for photodynamic therapy, 4) maltotriose-conjugation to a fluorinated chlorin derivative generating a PDT photosensitizer with improved water-solubility etc.

研究分野：生体機能関連化学・錯体化学

キーワード：光医療 光線力学療法 癌 クロリン フラレーン 糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎える我が国において癌患者数は今後も増加し、QOLの高い、より優れた低侵襲性の癌の治療法および診断技術の開発が切望されている。本研究課題は、その究極として注目を集めている「光線力学的治療法 (Photodynamic Therapy: PDT)」ならびに「光線力学的診断 (Photodynamic Diagnosis: PDD)」に関するものである。光線力学療法の分野では、第二世代と呼ばれる光感受性物質を中心に、副作用がより少ない光感受性物質の開発および適用範囲を広げるための臨床開発研究が行われている。

近年、生理機能素子 (抗体、リポソーム、アミノ酸、ステロイドなど) を利用した細胞選択的光感受性物質 (第三世代と呼ばれる) の開発が試みられている。当研究室では、この第三世代と呼ばれる最先端の化合物群に位置する糖鎖結合光感受性物質 (クロリン、フラワーレン誘導体) の開発研究を世界に先駆けて行ってきた (Fig. 1)。これらは究極の生体適合性分子である「糖 (グルコース)」を光感受性物質に連結させ、Warburg効果により腫瘍細胞への高

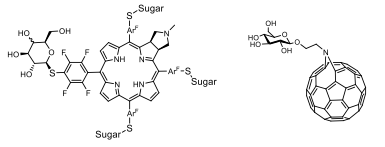


Fig. 1. Previously prepared glycoconjugated chlorin and fullerene.

選択的な取り込みを可能にした癌細胞標的医薬で、感光医薬では世界初である。ヒト大腸癌細胞のヌードマウス皮下移植モデルにおける *in vivo* 実験では、皮膚を介しての単回照射にもかかわらず周囲組織へのダメージをほとんど伴わずに強力な腫瘍縮小効果を認めている。開発に成功した糖鎖結合光感受性物質は、現在臨床で用いられているレザフィリン® (明治製菓ファルマKK) よりも極めて優れた効果を発揮する事が判明している。すなわち、①レザフィリン®と比較して、G-クロリン (H<sub>2</sub>-TFPC-SGlc) は50~60倍のPDT効果で、また糖鎖結合フラワーレン誘導体は15~16倍のPDT効果を有する、②正常細胞にはほとんどPDT効果を発揮せず、癌細胞選択的に作用する。最近、466 nmあるいは536 nmの光線を照射し、糖鎖結合クロリンから特異的に励起される620 nmあるいは600 nmの励起光量を計測することにより、粘膜下腫瘍細胞 (4T1-td-Tomato, 4T1-GFP) への糖鎖結合クロリンの集積量の測定が可能であり、分子イメージングプローブ (PDD) として有効であること、すなわち診断と治療が可能であることを、予備的試験で確かめている。

## 2. 研究の目的

本研究は、化学者 (矢野、鳴海、野元、中井、赤司) が臨床医学研究者 (片岡) との連携により、究極の低侵襲性治療として注目されている癌の治療法「光線力学的治療法 (PDT)」ならびに「光線力学的診断 (PDD)」用の応募者が開発した糖鎖結合感光医薬を進化させ、癌細胞選択的に作用する画期的なPDD・PDTの両機能を有する先端光医療用超高性能糖鎖結合超分子 (クロリン、フラワーレン) の創出と機能評価を目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) GIST細胞に対するG-クロリンPDT効果

癌細胞のみでなく、消化管間質の細胞から発生するGastrointestinal stromal tumor (GIST)は癌と同様に、PET検査で、<sup>18</sup>F-fluorodeoxy glucoseが集積することが知られている。粘膜上皮から発生する早期の食道癌、胃癌に対しては内視鏡的な切除術が主流であるが、粘膜上皮の下層から発生するGISTに対しては通常、内視鏡的切除は困難である。本研究では、GISTに対する新しい治療法としてPDTの応用の可能性の基礎研究としてGIST細胞に対するG-クロリンPDTを検討する。

(2) 光医療用糖鎖結合フラワーレンの合成とPDT効果

①グルコース結合フラワーレン: 一重項酸素の生成量子収率の高いフラワーレンを基本骨格に選び、窒素を介した糖鎖結合フラワーレンと炭素を介した糖鎖結合フラワーレンを合成し、これらについて、*in vivo*でのPDT効果を検討するとともに、レーザーフラッシュフォトリシス過渡吸収測定などを用いて一重項酸素生成ダイナミクスについて検討する。

②光医療用糖鎖結合フラワーレンの分子機能化: テトラエチレングリコール (TEG) を導入した、すなわちGlc-TEGユニットを有するC<sub>60</sub>誘導体であるGlc-TEG-C<sub>60</sub>の合成を行う。さらに、Glc-TEGを2ユニット複合化した(Glc-TEG)<sub>2</sub>-C<sub>60</sub>、および蛍光標識として7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD) を導入したGlc-C<sub>60</sub>-NBDの合成を行う。これらの高機能化糖鎖修飾C<sub>60</sub>誘導体の特性を検討する。

(3) 光線力学療法用可溶性オリゴ糖結合フッ化クロリンの合成とPDT効果

静脈投与および代謝向上に必要な水溶性の付与を目指して、水溶性の糖鎖修飾フッ化クロリン誘導体の開発を行う。具体的には、マルトトリオースを4分子修飾したフッ素化クロリン誘導体 (Mal3-chlorin) を合成し、その光化学的性質および光細胞毒性について明らかにする。

(4) マンノース結合フッ化クロリンのPDT効果

腫瘍間質にはマクロファージが多く存在し腫瘍関連マクロファージ (Tumor Associated Macrophage: TAM) と呼ばれている。TAMは、①癌細胞の増殖、浸潤の促進②腫瘍血管新生の促進③腫瘍免疫抑制④転移を促進する作用がある。TAMが多いほど予後が悪いという報告が多くなされている。⑤TAMはマンノースレセプターを発現している (Fig. 2)。本研究では、TAMのマンノースレセプターに着目し、新たに合成したマンノース結合フッ化クロリン (M-クロリン)

PDTの癌細胞およびTAMに対する *in vitro*, *in vivo* の検討を行う。

## 4. 研究成果

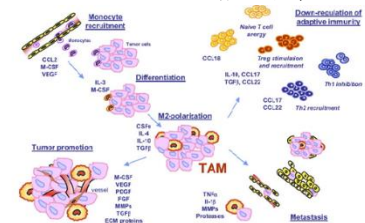


Fig. 2. Tumor-Associated Macrophages (TAM).

(1) GIST細胞に対するG-クロリンのPDT効果: G-クロリンの、GIST細胞内への取り込みを検討した。GIST細胞 (GIST-T1) および繊維芽細胞 (W138) を各 1 μM の 2-NBDG、クロリンおよびG-クロリンと所定の時間 (0, 15, 30, 60, 120, 240 min) インキュベートし、そ

これらの取り込み量を FACS を用いて、単一細胞の特徴的な赤色蛍光強度をモニターすることにより解析した。2-NBDG および G-クロリンはフッ化クロリン ( $H_2TFPC$ ) より、GIST-T1 および W138 へ多く取り込まれていることが明らかとなった。なお、 $H_2TFPC$  の GIST-T1 および W138 への取り込み量の差は見られなかった。次いで、GIST 細胞(GIST-T1)および繊維芽細胞(W138)にクロリンあるいは G-クロリンを加え、24 時間培養した。PBS による洗浄を一回行い、PBS 溶液で満たし照射 (650 nm,  $16 J cm^{-2}(30.8 mW cm^{-2})$ ) を行い、所定時間後 (0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h) BD 製 FACS Calibur フローサイトメーター解析によりアポトーシスラベルを実施した。なお、解析は Welch's *t*-test (ウェルチの *t* 検定) により行った。G-クロリンは GIST-T1 に対し、W138 に対するより大きな光殺細胞効果を示した。G-クロリンはクロリンに比べはるかに効果的な光殺細胞効果を示した。また、培地のグルコース濃度の高低には PDT 効果の差は認められなかった。GIST 細胞株、繊維芽細胞株 (W138) に G-クロリンをそれぞれ投与し、650nm の赤色 LED (半導体レーザー) を照射し、活性酸素の産生、アポトーシス誘導能、殺細胞効果などを比較検討した。G-クロリンはレザフィリンに比べ有意に高い細胞内への取り込み能を認め、また、高い活性酸素の産生とアポトーシスの誘導を示した。殺細胞効果の検討では、レザフィリンに比べて 1/20 から 1/50 の有意に低い濃度で強力な殺細胞効果を示した。GIST 細胞と繊維芽細胞の比較では GIST 細胞に有意に高い細胞内取り込み、および有意に強力な殺細胞効果を示した。抗 GLUT1、抗 GLUT3、抗 GLUT3 抗体を用いて GIST-T1 細胞と WI-38 細胞におけるグルコーストランスポーターの発現を検討したところ、GIST-T1 細胞は、WI-38 細胞に比べて、有意に高い GLUT1、GLUT3、GLUT4 の発現を呈した。ヌードマウス移植 GIST モデルにおける G-クロリンの抗腫瘍効果を検討した。顕著な抗腫瘍効果が認められた (Fig. 3)。G-クロリンは GIST 細胞に対して優れた癌細胞集積性を示し、光線照射により優れた殺細胞効果ならびに抗腫瘍効果を発揮した。また紫色光線照射による PDT への応用の可能性も示唆された。

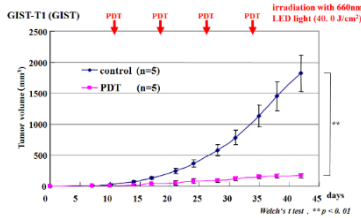


Fig. 3. Accumulation in tumors and inhibition of tumor growth by G-chlorin PDT.

細胞効果を示した。殺細胞効果の検討では、レザフィリンに比べて 1/20 から 1/50 の有意に低い濃度で強力な殺細胞効果を示した。GIST 細胞と繊維芽細胞の比較では GIST 細胞に有意に高い細胞内取り込み、および有意に強力な殺細胞効果を示した。抗 GLUT1、抗 GLUT3、抗 GLUT3 抗体を用いて GIST-T1 細胞と WI-38 細胞におけるグルコーストランスポーターの発現を検討したところ、GIST-T1 細胞は、WI-38 細胞に比べて、有意に高い GLUT1、GLUT3、GLUT4 の発現を呈した。ヌードマウス移植 GIST モデルにおける G-クロリンの抗腫瘍効果を検討した。顕著な抗腫瘍効果が認められた (Fig. 3)。G-クロリンは GIST 細胞に対して優れた癌細胞集積性を示し、光線照射により優れた殺細胞効果ならびに抗腫瘍効果を発揮した。また紫色光線照射による PDT への応用の可能性も示唆された。

## (2) 光医療用糖鎖連結フラーレンの合成と PDT 効果:

①グルコース連結フラーレン: 窒素を介した糖鎖連結フラーレンの合成は、まず単糖をアジド誘導体に変換し、フラーレンへの 1,3-双極子付加反応により、化合物 **1'** および **1** を合成した一方、炭素を介した糖鎖

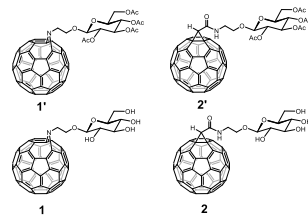


Fig. 4. Structures of Glc-pendant  $C_{60}$  azafulleroids **1**, **1'** and methanofulleroids **2**, **2'**.

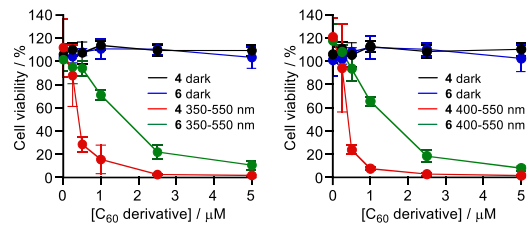


Fig. 5. Cell viability with **1** (square) and **2** (circle) at various concentrations under dark and photoirradiation [350–550 nm (left panel) and 400–550 nm (right panel)].

連結フラーレンの合成は、一方、炭素を介してグルコースを連結したメタノフラーレンは、フラーレンスクシンイミドエステルと糖のアミン誘導体との反応により、炭素を介した新しい糖鎖連結フラーレン **2'** および **2** を合成した (Fig. 4)。次いで、化合物 **1** および **2** の PDT 効果を検討した (Fig. 5)。ヒト子宮頸癌細胞を 10%FBS を含む培地で培養し、炭素を介した単糖連結フラーレン、窒素を介した単糖連結フラーレンをそれぞれ  $5 \mu M$  ずつ投与し、さらに 24 時間インキュベートした後、350~550 nm、400~550 nm の光を用いて照射を行った。細胞生存率は WST-8 アッセイにより求めた。窒素を介した **1**、炭素を介した **2** のいずれも細胞生存率がほぼ 100% を示し、暗所毒性がない。炭素を介した **2** は窒素を介した **1** と同様に高い光毒性を示すことが明らかとなった。さらに、 $IC_{50}$  を比較すると、炭素を介した **2** は、窒素を介した **1** に比べ 4 倍低い値を示し、強い光毒性があることが判明した。この結果は、炭素を介した **2'** の一重項酸素の生成量子収率が窒素を介した **1a'** に比べ約 3 倍高くなったことに起因すると考えられる。この現象を理解するために、窒素および炭素を介した単糖連結フラーレンの一重項酸素の生成ダイナミクスについて詳細検討した。一重項酸素が基底状態に遷移する過程で発光する近赤外発光 ( $\lambda_{em} = 1280$  nm) を用い、一重項酸素発生量を測定した。 **2'** は **1'** の約 3 倍、無置換フラーレンとほぼ同等の一重項酸素生成量子収率を示した。ナノ秒およびフェムト秒の過渡吸収測定の結果から、糖鎖連結フラーレン誘導体の

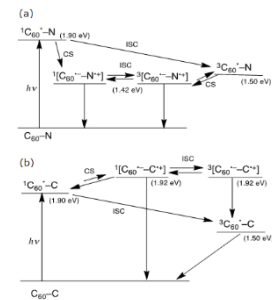


Fig. 6. Energy diagrams of (a) **1'** and (b) **2'**.

可能な光反応機構を図 6 に示した。窒素を介した糖鎖連結フラーレン **1'** ( $C_{60}-N$ ) が、光励起されることによって、一重項励起状態フラーレン ( $C_{60}^*-N$ ) が生成する。電子供与性の大きい窒素原子が、電子受容体であるフラーレン部位に結合しているため、分子内電子移動が可能となり、電荷分離状態 ( $C_{60}^{\cdot-}-N^+$ ) が 50 ps 以内で生成する。この電荷分離状態のエネルギーは  ${}^3C_{60}^*-N$  の励起エネルギーとほぼ同じであり、逆電子移動は平衡状態にあるために、 $C_{60}^{\cdot-}-N^+$  と  ${}^3C_{60}^*-N$  が同時に観測される。この電荷分離状態のラジカルイオン対は非常に近接した位置に存在するために、ラジカルイオン間相互作用によりスピン状態が一重項および三重項の 2 つの状態が存在するが、一重項電荷分離状態 [ ${}^1(C_{60}^{\cdot-}-N^+)$ ] はスピン反転を伴わない分、三重項電荷分離状態 [ ${}^3(C_{60}^{\cdot-}-N^+)$ ] よりも速く逆電子移動が起こると考えられる。



一重項酸素の発生には、 $^3C_{60}^*-N$  の生成が必要だが、酸素とのエネルギー移動と、 $^1(C_{60}^{--}N^+)$  の逆電子移動過程が競争反応となるために、一重項酸素の生成効率が低くなったと考えられる。一方、炭素を介した糖鎖連結フラレン $2'$  ( $C_{60}-C$ ) では、その電子供与性が  $C_{60}-N$  よりも弱いために、電荷分離のドライビングフォースは小さくなる。従って、電荷分離のエネルギーは  $^3C_{60}^*-C$  よりも高くなるために、マーカスの電子移動に基づけば、電荷分離状態から基底状態への逆電子移動反応は  $C_{60}^{--}N^+$  よりも遅くなる。これにより、 $C_{60}-C$  では効率よく  $^3C_{60}^*-C$  が生成したと考えられる。

以上、新しい光線力学療法剤として糖鎖連結メタノフラレンおよびアザフレロイドを設計、合成、評価した。レーザーフラッシュフォトリシス法により励起種の存在および一重項酸素の生成量を観測することに成功し、窒素を介した糖鎖連結フラレンと比べ、炭素を介した糖鎖連結フラレンの光線力学療法剤としての可能性を示した。さらに、エネルギー移動過程についても詳細な考察を行った。

②光医療用糖鎖連結フラレンの分子機能化：末端にアミノ基を有する Glc-TEG 誘導体と  $C_{60}$  カルボン酸と  $N$ -ヒドロキシスクシイミドから誘導した活性エステル基を一つ有する  $C_{60}$  誘導体あるいはマロン酸を有する  $C_{60}$  誘導体と塩化チオニルとの反応により誘導された酸クロリドを二つ有する  $C_{60}$  誘導体との反応により、Glc-TEG- $C_{60}$  および Glc-TEG を 2 ユニット複合した (Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$  を合成した (Fig. 7)。

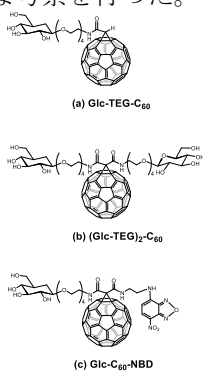


Fig. 7. Structures of Glc-TEG- $C_{60}$ , (Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$ , and Glc- $C_{60}$ -NBD.

Glc-TEG- $C_{60}$  および (Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$  は、いずれも水溶性であり、水中で  $C_{60}$  に由る UV-vis 吸収を示した。それぞれの 326nm におけるモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) は、 $15100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  および  $25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  であり、(Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$  が大きな値を示した。これは Glc-TEG ユニットの増加によりサンプルの親水性が増加し、 $C_{60}$  部位の会合が減少したためと考えられる。

Glc-TEG- $C_{60}$  および (Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$  について、ヒト子宮頸部類上皮癌由来の HeLa 細胞を用いた *in vitro* 細胞実験を行った。結果を Fig. 8 に示す。両サンプルはともに、 $50 \mu\text{M}$  の低濃度においても、暗所下では毒性を示さなかった。したがって、Glc-TEG ユニットの付与に効果的であることが示された。また、 $450 \text{ nm}$  の照射下では多くの細胞を死滅させることが示唆された。したがって、両化合物は PDT 活性を示すことが明らかとなった。

Glc-TEG- $C_{60}$  および (Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$  の 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) の値は、それぞれ  $8.5 \mu\text{M}$  および  $3.0 \mu\text{M}$  であり、(Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$  が特に高い PDT 活性を示した。一方で、Glc-TEG- $C_{60}$  および (Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$  の、光照射下での活性酸素 (ROS) の発生能を、水溶性アントラセン誘導体 (ADMD) を用いて調べたところ、両サンプルの間で大きな差は認められなかった。したがって、Glc-TEG ユニットの 2 つ導入した (Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$  の PDT 活性における優位性は、がん細胞への標的指向性、あるいはがん細胞への取り込み能が向上した結果であると考えている。治療だけではなく、診断への応用も可能なセラノティクス光増感剤の開発を目的に、

蛍光素子修飾糖鎖複合  $C_{60}$  である Glc- $C_{60}$ -NBD の合成について検討した。Glc およびカルボキシ基を有する  $C_{60}$  誘導体である Glc- $C_{60}$ -COOH を新規に合成した。Glc- $C_{60}$ -COOH の水溶液にエチレンジアミンおよびトリアジンス縮合剤である

DMT-MM を加え、室温で遮光攪拌した。粗生成物を精製し、Glc およびアミノ基を有する  $C_{60}$  誘導体である Glc- $C_{60}$ -NH $_2$  を得た。Glc- $C_{60}$ -NH $_2$  および NBD-Cl の DMF 溶液にトリエチルアミンを加え、窒素雰囲気下  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  で遮光攪拌した。粗生成物を分取 GPC で精製し、最終目的物である Glc- $C_{60}$ -NBD (Fig. 7-(c)) を得た。

以上、Glc-TEG ユニットの 1 つおよび 2 つ有する複合  $C_{60}$  誘導体を新規に合成した。これらのサンプルは優れた生体適合性と PDT 活性を示し、次世代の水溶性光増感剤として高い潜在性があることを示した。また、蛍光ユニットを有する糖鎖修飾セラノティクス  $C_{60}$  光増感剤の開発に繋がる合成経路を見いだした。

③光線力学療法用水溶性オリゴ糖連結クロリンの合成と PDT 効果

フッ化クロリン誘導体である H $_2$ TFPC およびオリゴ糖鎖糖鎖誘導体 (AcMal $_3$ -SAC) を乾燥 DMF に溶解した。これにジエチルアミン (Et $_2$ NH) を加え、室温で 2 時間攪拌した ([TFPC]:[AcMal $_3$ -SAC] = 1.0/4.2)。反応混合物を濃縮し、残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、前駆体である AcMal $_3$ -chlorin を得た。AcMal $_3$ -chlorin に NaOMe の乾燥 THF 溶液を滴下し、室温で 2 時間攪拌した。反応混合物を精製した後、水への透析および凍結乾燥を行い、最終目的物であるマルトリオース複合クロリン (Mal $_3$ -chlorin) を得た (Fig. 9)。

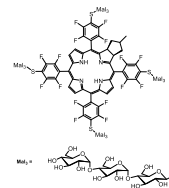


Fig. 9. Structure of Mal $_3$ -chlorin.

生体透過性に優れた長波長の可視光領域 ( $630\sim 651 \text{ nm}$ ) に Q 帯由来の吸収が観測され、そのモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) は  $35900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  であった。以上は、TFPC の DMSO 中での特性と同等であった。したがって、Mal $_3$ -chlorin は、生理条件下において PDT 光増感剤に適した光吸収特性を示すことが明らかとなった。Fig. 10 に、HeLa 細胞を用いた *in vitro* 細胞実験の結果を示す ([Mal $_3$ -chlorin] =  $0.15\sim 10.0 \mu\text{M}$ )。なお、本実験では、Mal $_3$ -chlorin が水溶性であるため DMSO などの有機溶媒を一切使用していない。Mal $_3$ -chlorin は暗所毒性を示さなかった。一方、 $610\sim 740 \text{ nm}$  の光照射下では顕著な光毒性を示した。したがって、Mal $_3$ -chlorin は PDT 活性を示した。また、この実験系における  $IC_{50}$  は  $1.3 \mu\text{M}$  であった。続いて活

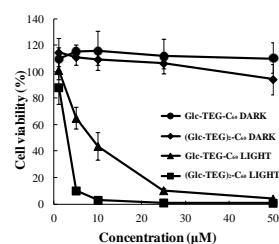


Fig. 8. Dose dependent photodynamic activities of Glc-TEG- $C_{60}$  and (Glc-TEG) $_2$ - $C_{60}$ .

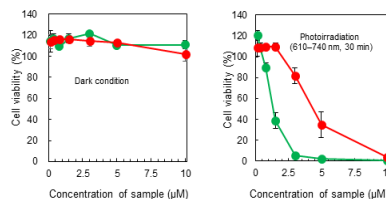


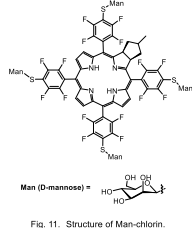
Fig. 10. Plot of cell-viability vs. concentration of Mal $_3$ -chlorin (green circle) and Mal $_3$ -porphyrin (red circle) for the photo-unirradiated system (left panel) and irradiated system ( $610\sim 740 \text{ nm}$ , 30 min) (right panel).

性酸素の生成効率を 9,10-anthracenediyl-bis(methyl)dimalonic acid (ABDA) を用いた系で調べた。Mal<sub>3</sub>-chlorin の活性酸素の生成効率は、G-chlorin と同等に優れたものであることが示された。上記の *in vitro* 細胞実験を、ヒドロキシラジカルおよび一重項酸素の阻害剤である D-マンニトールおよび L-ヒスチジンを加えて行った。L-ヒスチジンを加えた系で阻害効果がみられたことから、この系における活性種が一重項酸素であることが示された。また、Mal<sub>3</sub>-chlorin の酸素飽和重水溶液中でのりん光測定を行い、一重項酸素発生量子収率を求めた。Mal<sub>3</sub>-chlorin の量子収率は 0.28 であり、レザフィリンよりも高い値であった。さらに水溶性付与の評価を目的として、1-オクタノールと PBS 緩衝液への溶解性の比を表す数値である分配係数  $\text{Log } P = \text{Log}\{C_{\text{octanol}}/C_{\text{PBS}}\}$  を求めた。Mal<sub>3</sub>-chlorin の  $\text{Log } P$  の値は -1.78 であった。この結果より Mal<sub>3</sub>-chlorin は、以前に報告のあるグルコース複合クロリン (G-chlorin) に比べ 45 倍の水溶性を示すことが明らかとなった。また、臨床で使用されている光増感剤であるレザフィリン<sup>®</sup>の  $\text{Log } P$  の値にも非常に近いことがわかった。

以上、フッ化クロリン誘導体とマルトトリオースを連結させた Mal<sub>3</sub> 複合クロリン (Mal<sub>3</sub>-chlorin) を得た。Mal<sub>3</sub>-chlorin は、高い水溶性を示し、有機溶媒を一切使わない生理条件下において PDT 光増感剤に適した光吸収特性を示した。さらに種々の実験により、Mal<sub>3</sub>-chlorin は G-chlorin に匹敵する高い一重項酸素生成効率と光細胞毒性を示すことを明らかにした。

(4) マンノース連結フッ化クロリンの PDT 効果

フッ化クロリン誘導体 (H<sub>2</sub>TFPC) とチオアセチルマンノース (AcManSAc) との反応より、H<sub>2</sub>TFPC-SAcMan を合成した。ついで H<sub>2</sub>TFPC-SAcMan を、CH<sub>3</sub>ONa を用いて脱保護することにより、最終目的物である 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-( $\alpha$ -D-mannopyranosylthio)-2, 3, 5, 6-tetrafluorophenyl)-2, 3-(methano (N-methyl)iminomethano)chlorin (H<sub>2</sub>TFPC-SMan = M-クロリン) の黒色粉末を得た (Fig. 11)。



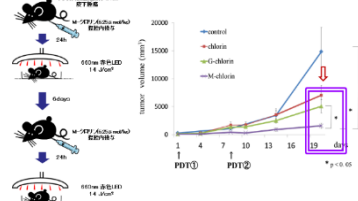
**Cell line** (ヒト胃癌細胞株 MKN28、MKN45、ヒト大腸癌細胞株 HT29、HCT116、マウス大腸癌細胞株 CT26) に、クロリン、G-クロリン、M-クロリンを投与 24 時間後に 660nm の赤色 LED 光線を 13.9 J/cm<sup>2</sup> 照射し WST-8 アッセイを施行した (Table 1)。M-クロリンは予想外にも G-クロリンと同等、クロリンよりも 10<sup>-4</sup> 0 倍の殺細胞効果を示した。また、右側のアポトーシスは 4 時間後からクロリンに比べ M-クロリン、G-クロリンは強力にアポトーシスを誘導した。さらに、クロリンが赤色に自家発光することを利用して、コンフォーカル顕微鏡を用いて細胞内局在を調べた。M-クロリンはリソソーム、小胞体には集積が多い傾向にあり、一方、G-クロリンはミトコンドリアに多く集積する傾向にあった。M-クロリンは、マンノースレセプターを介してエンドサイトーシスで癌細胞内に取り込ま

Table 1. The IC<sub>50</sub> for gastric and colon cancer cells by chlorin, G-chlorin and M-chlorin.

| IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | Gastric cancer |       | Colon cancer |        |      |
|-----------------------------|----------------|-------|--------------|--------|------|
|                             | MKN28          | MKN45 | HT29         | HCT116 | CT26 |
| chlorin                     | 2.94           | 3.77  | 3.46         | 4.00   | 0.80 |
| G-chlorin                   | 0.20           | 0.16  | 0.26         | 0.09   | 0.05 |
| M-Chlorin                   | 0.15           | 0.27  | 0.29         | 0.10   | 0.04 |

れていると考えられる。次に、TAM に対する *in vitro* の検討を行った。マクロファージのセルラインがないため、単球である THP1 を用いて、刺激を与えてマクロファージに分化させて検討を行い、分化できたかを確認するために PCR を用いて、マクロファージのマーカーである CD68 とマンノースレセプターの CD206 の発現を調べた。マクロファージは単球から M1 と M2 に分化する。M1 は腫瘍抑制作用があり、逆に M2 には腫瘍促進作用を有している。TAM は M2 の性質を持っている。マクロファージのマーカーである CD68 の発現を調べると刺激を与えると発現が増えていることが分かった。また、M2 のマーカーでマンノースレセプターの CD206 の発現は、M2 マクロファージで有意に上昇していた。M1 マクロファージに対する殺細胞効果は、クロリン、G-クロリン、M-クロリンと有意差を認めなかったが、M2 マクロファージにおいては M-クロリン PDT が有意に殺細胞効果を示した。

さらに、BALB/c マウスにマウス大腸癌細胞株 CT26 の皮下腫瘍モデルを作成し、クロリン、G-クロリン、M-クロリン PDT による抗腫瘍効果を比較検討した (Fig. 12)。左のマウスの図のように、CT26 の皮下腫瘍を作成し、M-クロリンを腹腔内投与した。24 時間後に赤色レーザー照射し、1 週間後に同様のことを繰り返した。結果は、M-クロリンが、コントロール、クロリン、G-クロリンと比べて有意な抗腫瘍効果を示した。G-クロリンと M-クロリンの差は、*in vitro* 実験での癌細胞においては同等だったことを考えると TAM に対する差が出たと考えられる。そこで、免疫染色を行った。コントロール、クロリンは腫瘍内が茶色く染まっているが、M-クロリンでは腫瘍内が茶色に染まりが弱くなっている。数を数えると、CD206 は M-クロリン PDT で有意に減っていることが明らかである。また、マクロファージと TAM との比をみると、コントロール、クロリン、G-クロリンが約 8 割なのに対し、M-クロリンは 6 割と TAM を選択的に抑制している。



以上から、M-クロリンは、癌細胞および癌間質の TAM の両者に特異的に集積し、PDT により強力な殺細胞効果を示した。すなわち、M-クロリン PDT は QOL に配慮した超低侵襲癌治療の候補の一つと考えられ、今後の展開が期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano, T. Sawada, H. Akashi, et al., Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin), *Oncotarget*, in press. (査読あり)
- ② A. Narumi, A. Nomoto, S. Yano et al., Maltotriose-Conjugation to Fluorinated Chlorin Derivative Generating PDT Photosensitizer with Improved Water-

- Solubility, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, 14, 3608–3613. (査読あり)
- ③ S. Yano, A. Narumi, K. Ohkubo, S. Fukuzum et al., Efficient singlet oxygen generation from sugar pendant C60 derivatives for photodynamic therapy, *Chem. Commun.*, 51, 16581-16720, 2015. (査読あり)
- ④ A. Nomoto, S. Yano, A. Ogawa et al., Synthesis Novel Cysteine-Incorporated Anthraquinone Derivative and Its Structural Properties, *Molecules*, 06/2015; 20(6):10192-10204. (査読あり)
- ⑤ N. Hayashi, H. Kataoka, S. Yano et al., Tu1969 A Novel Photodynamic Therapy Targeting Tumor-Associated Macrophages, *Gastroenterology* 04/2015 148(4) S-949. (査読あり)
- ⑥ H. Kurokawa, S. Yano, T. Kamachi et al., High resolution imaging of intracellular oxygen concentration by phosphorescence lifetime, *Scientific Reports* | 5:10657 | (査読あり)
- ⑦ N. Hayashi, H. Kataoka, S. Yano, H. Akashi et al., A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated Macrophages, *Mol Cancer Ther.*, 2015; 14(2) 452-460. (査読あり)
- ⑧ J. A. Czaplewska, S. Yano, U. S. Schubert, M. Gottschaldt et al., Glycoconjugated Rhenium(I) and 99m-Techneium(I) Carbonyl Complexes from Pyridyltriazole Ligands Obtained by “Click Chemistry”, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, 6290–6297. (査読あり)
- ⑨ A. Nomoto, S. Yano, A. Ogawa et al., Vanadium-catalyzed green oxidation of benzylic alcohols in water under air atmosphere, *Tetrahedron*, 70 (2014) 2431-2438. (査読あり)
- ⑩ M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano, H. Akashi et al., Antitumor effects in, gastrointestinal stromal tumors using photodynamic therapy with a novel glucose-conjugated chlorin, *Mol Cancer Ther.*, 2014;13, 767-775. (査読あり)
- ⑪ M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano et al., Anti-cancer effects of newly developed chemotherapeutic agents of glycoconjugated platinum (II) complex and glycoconjugated palladium (II) complex against cisplatin-resistant gastric cancer cells, *BMC. Cancer*, 13, 237-246 (2013). (査読あり)
- ⑫ M. Nakai, S. Yano, et al, Syntheses and photodynamic properties of glucopyranoside-conjugated indium(III) porphyrins as a bifunctional agent. *J. Porphyr. Phthalocyan.*, 17,1173-1182. 2013. (査読あり)
- ⑬ M. Nakai, S. Yano et al., Syntheses, Structures, and Photochemical Properties of ( $\mu_3$ -O)Tris{bis( $\mu$ -carboxylato)} trimanganese Complexes with Naphthylacetate Ligands in Relevance to Artificial Solar Energy Harvesting System, *Inorg. Chim. Acta.*, 406, 1, 2013, 130-137. (査読あり)
- ⑭ S. Sakuma, H. Akashi, H. Ohi, S. Yano, A. Morita et al., Photodynamic Therapy with Glycoconjugated Chlorin Photosensitizer, *J. Porphyr. Phthalocyan.*, 17, 331-342, 2013. (査読あり)
- ⑮ N. Xiao, S. Yano et al., Synthesis of miktoarm star copolymer Ru(II) complexes by click-to-chelate approach, *Polymer Journal* (Tokyo, Japan) (2013), 45(2), 216-225. (査読あり)

[学会発表] (計 4 7 件)

- ① 矢野重信：医工連携による先端光医療用糖鎖連結光感受性物質の開発を目指して、第 36 回レーザー医学会総会（栃木県総合文化センター、宇都宮、2015 年 10 月 24 日）招待講演
- ② 矢野重信：医工連携による先端光医療用薬剤の開発を目指して、日本化学会第 95 春季年会（日本大学理工学部船橋キャンパス、船橋、2015 年 3 月 29 日）招待講演

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称：糖鎖連結クロリン誘導体  
 発明者：福本圭介、仲野靖浩、矢野重信  
 権利者：同上  
 種類：特許  
 番号：特願 2015-096400  
 出願年月日：2015 年 5 月 11 日  
 国内外の別： 国内

名称：糖鎖連結クロリン誘導体  
 発明者：山下正彦、仲野靖浩、井上陽統、矢野重信  
 権利者：同上  
 種類：特許  
 番号：特願 2014-00587  
 出願年月日：2014 年 1 月 10 日  
 国内外の別： 国内

名称：光線力学療法のための新規糖鎖連結光感受性物質  
 発明者：片岡洋望、林 則之、城 卓志、矢野重信  
 権利者：同上  
 種類：特許  
 番号：特願 2013-161518  
 出願年月日：2013 年 8 月 2 日  
 国内外の別： 国内

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢野 重信 (YANO Shigenobu)  
 奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・客員教授  
 研究者番号：60011186

### (2) 研究分担者

片岡 洋望 (KATAOKA Hiromi)  
 名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  
 研究者番号：40381785

鳴海 敦 (NARUMI Atsushi)  
 山形大学・理工学研究科・准教授  
 研究者番号：60443975

野元 昭宏 (NOMOTO Akihiro)  
 大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授  
 研究者番号：60405347

中井 美早紀 (NAKAI Misaki)  
 関西大学・工学部・准教授  
 研究者番号：40527115

赤司 治夫 (AKASHI Haruo)  
 岡山理科大学・自然科学研究所・教授  
 研究者番号：30221708