

デンドリックフタロシアニンの合成と ガン光線力学療法用光増感剤の効果

日大生産工 ○坂本恵一 日大生産工(院) 金澤誠子 化技教研 奥村映子

1. 緒言

レーザー光線と機能性色素としての光増感剤とを組み合わせるガン光線力学療法(Photodynamic therapy of cancer; PDT)が実用化されるようになってきた。そのため安全性の高い高性能の PDT 用光増感剤の開発が急務となっている。

実用化されている PDT 用光増感剤は天然色素のヘマトポルフィリン誘導体であるため、その吸収極大はポルフィリン誘導体に特有な HOMO-LUMO 間の π - π^* 遷移である Soret 帯に基づいて 450nm 付近に現れる。PDT 用増感剤は皮膚透過性の高い 600 から 800 nm の範囲に吸収極大の存在が要求されるが、ヘマトポルフィリン誘導体は吸収極大の位置から、体内深部のガンへの有効性が低いこと、細胞に対する蓄積性を有すること、細胞毒性を示すこと、いわゆるポルフィリン症をおこすために数日間暗所での生活が必要などの短所が報告されている。これらの短所を解決法として、ポルフィリン類縁体であるフタロシアニン(PC)が次世代の PDT 用増感剤として注目されている。

PC は、その吸収極大が PC に特有な HOMO-LUMO 間の π - π^* 遷移である Q 帯に基づいて 650 nm 付近に現れ、置換基の導入で長波長側への移動が可能であること、酸素で容易に分解されるため蓄積性が無く代謝されやすい上に、細胞毒性を示さないばかりでなく、ポルフィリン症も引き起こさないなどの長所を有している。また、PC は DNA ベクターとしての利用も注目されている¹⁻³⁾。

本研究では PDT 用 PC 誘導体の光捕集能力または生体親和性の増加を考え、PC の機能発現を担っている中心金属部分を遮蔽しない、比較的長さの短いポリ(アミドアミン)デンドロンをデンドロン部位としたデンドリック PC を分子設計した。この新規のデンドリック PC のデンドロン部位の効果を検討するために、分子中のデンドロン数とその世代を変えたものを合成した。なお、デンドロン数を変えるために、核部位の PC は混合原料を用いて合成した非対称型亜鉛 PC ポリ(カルボン酸)とした。

2. 実験

2.1 合成

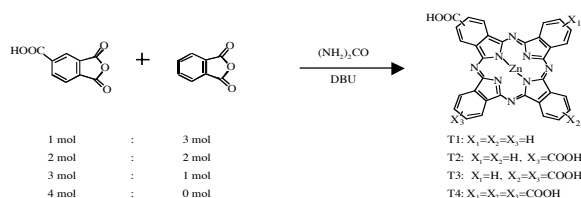
デンドリック PC は、ポリアミドアミンのデンドロン部位と亜鉛 PC ポリ(カルボン酸)の核部位をそれぞれ個別に合成し、それらを結合することによった。

デンドロン部位は、3,3'-イミノジプロピオニトリルから 3,3'-イミノジプロピオン酸を経て、*N*-(*t*-Boc)イミノジプロピオン酸とし、これにエチレンジアミンあるいはアクリル酸メチルとを交互に反応させることにより、1.0 世代 (G-1.0)、1.5 世代 (G-1.5)、2.0 世代 (G-2.0)および 2.5 世代デンドロン(G-2.5)とした。

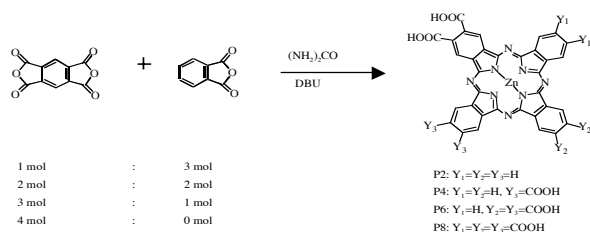
核部位はそのタイプによって、無水トリメリット酸と無水フタル酸の混合原料から得る Type 1 と、ピロメリット酸二無水物と無水フタル酸の混合原料から得る Type 2 とを合成した。なお、合成した PC は Type 1、Type 2 とともに、分子中に有するカルボン酸の数によって T1、

T2、T3、T4 あるいは P2、P4、P6、P8 と略記した (Scheme 1 & 2)。

デンドリック PC は、Type 1 あるいは Type 2 の核部位と G-1.0 から G-2.5 のデンドロン部位とをそれぞれ結合することで合成した⁹⁾。



Scheme 1



Scheme 2

2.2 PDT 特性の測定

PDT 特性は、アフリカミドリザル腎臓由来のウシ胎児血清を 5%含む培地にて 37℃で 5% CO₂ 条件の下、80%コンフルエント状態になるまで培養した後に培地を取り除いた Vero 細胞を用い、これにデンドリック PC を注入して 3 時間培養し光を照射することで検討した。照射後の Vero 細胞は、生細胞、死細胞および核を細胞染色色素である Casesin AM、Propidium Iodide、Hoechst staining を用いてそれぞれ染色した後、生細胞、死細胞および核数を Array scan Cy5 を用いて計測した。

3. 結果および考察

3.1 デンドリック PC の合成

デンドロン部位は、G-1.0 では収率 71%の淡黄色透明粘性液体、G-1.5 では 83%の無色透明粘性液体、G-2.0 では 98%の無色透明粘性液体、G-2.5 では 99%の無色透明粘性液体として得た。

それぞれのデンドロン部位は、赤外吸収 (IR) およびプロトン核磁気共鳴 (¹H-NMR) スペクトルにより目的構造であることが確認できた。

核部位は、Type 1 および Type 2 とともに暗青色固体として得た。なお、無水トリメリット酸あるいはピロメリット酸二無水物と無水フタル酸との混合原料による非対称型亜鉛 PC ポリ(カルボン酸)であり、これらは混合原料の化学量論比に応じた構造をとることが、IR および質量 (MS) スペクトルと元素分析により確認できた。

Type 1 および Type 2 は、Q 帯の吸収が 675 から 700 nm 付近に現れていた。この Q 帯の吸収波長は Type 1 と Type 2 とを比較すると、Type 2 の方がより長波長側に移動していた。観察された Q 帯の吸収は、分子中のカルボキシル基数の増加に伴って長波長側に移動すると考えられる。

合成した核部位において、無水トリメリット酸あるいはピロメリット酸二無水物と無水フタル酸から合成した Type 1 および Type 2 は前述のように化学量論比に応じた構造ではあるが、カルボキシル基による位置異性体の存在が考えられる。

合成したデンドリック PC は、これらの位置異性体を含んでいる可能性が考えられるが、本研究においてはそのままガン細胞との相互作用を検討した。

デンドリック PC は、デンドロの世代および核のタイプの略号を組み合わせで表記した。合成したデンドリック PC は、Type 1 核では T1G1.0、T1G1.5、T1G2.0、T1G2.5、T4G1.0、T4G1.5、T4G2.0 および T4G2.5、Type 2 核では P8G1.0、P8G1.5、P8G2.0 および P8G2.5 である。

得られたデンドリック PC は、IR および MS スペクトルと元素分析により合成が確認できた。なお、デンドリック PC は、UV-Vis、蛍光および電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを用いてキャラクタリゼーションした (Table 1)。

Table 1 Characterization data of dendritic Zn-Pcs.

Compound	yield / %	$\log \varepsilon_{max}$	$\lambda_{max} / \text{nm}$	F_{max} / nm	g value
T1G1.0	2	4.594	679.5	690.0	2.00262
T1G1.5	13	4.480	687.0	690.0	2.00260
T1G2.0	12	4.579	678.5	690.0	2.00243
T1G2.5	7	4.521	678.5	690.0	2.00260
T4G1.0	17	5.339	686.5	705.0	2.00276
T4G1.5	12	5.512	680.5	700.0	2.00278
T4G2.0	13	5.745	687.5	700.0	2.00283
T4G2.5	10	5.965	687.0	700.0	2.00278
P8G1.0	6	4.207	696.0	710.0	2.00275
P8G1.5	5	4.664	694.0	710.0	2.00302
P8G2.0	3				2.00364
P8G2.5	0.4	4.630	699.0	710.0	2.00287

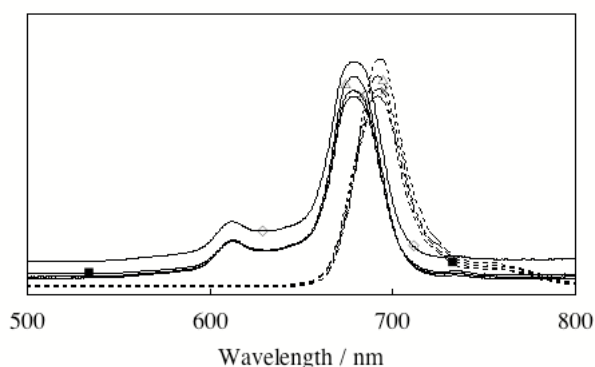


Fig. 1 UV-Vis and fluorescence spectra of Type1 T1 dendritic Pcs in DMSO. Solid lines show UV-Vis spectra. Broken lines show fluorescence spectra. ◇:T1G1.0 ■:T1G1.5 △:T1G2.0 ×:T1G2.5

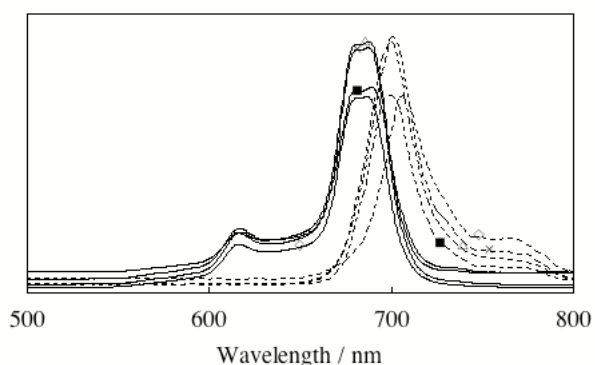


Fig. 2 UV-Vis and fluorescence spectra of Type1 T1 dendritic Pcs in DMSO. Solid lines show UV-Vis spectra. Broken lines show fluorescence spectra. ◇:T4G1.0 ■:T4G1.5 △:T4G2.0 ×:T4G2.5

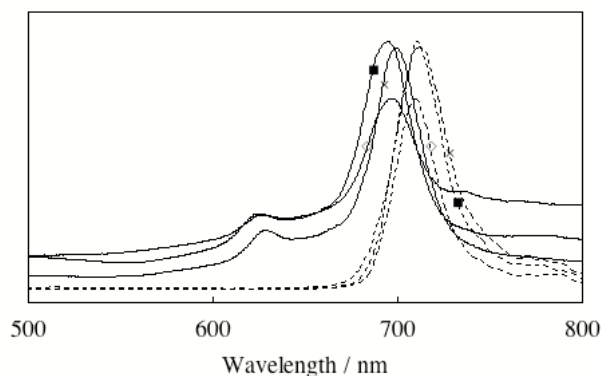


Fig. 3 UV-Vis and fluorescence spectra of Type1 T1 dendritic Pcs in DMSO. Solid lines show UV-Vis spectra. Broken lines show fluorescence spectra. ◇:P8G1.0 ■:P8G1.5 ×:P8G2.5

合成したデンドリック PC は、DMSO 溶媒中において、Q 帯の吸収が 680nm から 695nm 付近に現れ、デンドロン部位を結合させたことにより、無置換の亜鉛 PC よりも長波長側に移動していた (Fig. 1-3)。

デンドリック PC の Q 帯の吸収は、デンドリック PC 1 分子中のデンドロン部位数が増加するほど、長波長側に移動する傾向があった。しかし、同一タイプの核に世代の異なるデンドロン部位を核部位に結合させても、吸収波長の差はほとんど無いことがわかった。デンドリック PC の蛍光は 690 から 710 nm に現れており、Storks シフトが小さいことがわかった。UV-Vis および蛍光スペクトルからデンドリック PC は励起状態においても剛直な分子構造であると考えられる。

ESR スペクトルにおいて、デンドリック PC は $g = 2.00240$ から 2.00365 に現れており、デンドロン部位の数が増えるほど g 値が大きくなる傾向があった。また、デンドリック PC は、無置換の亜鉛 PC および核部位の PC よりも自由電子の g 値との差が大きいため、不対電子に対する拘束力が大きいことがわかった。

3.2 PDT 特性

デンドリック PC を光増感剤として使用するためには、ガン細胞中のデンドリック PC の濃度が低いときに、高い死滅したガン細胞の割合を示すことが望ましい。そこで、合成したデンドリック PC のうち、T1G1.0、T4G1.0、P8G1.0 および P8G1.5 について、Vero 細胞を用いて PDT 特性の測定を行った(Fig. 4)。

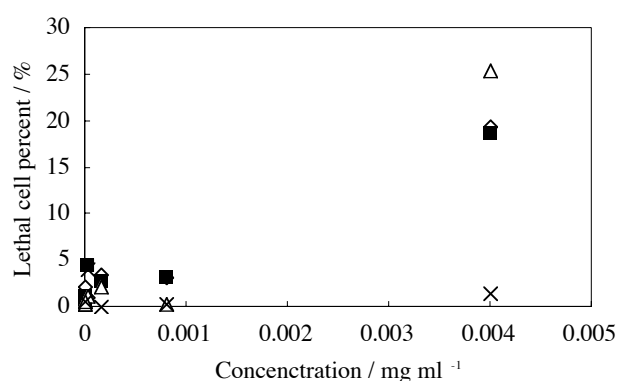


Fig. 4 Photocytotoxicity of dendritic PCs. ◇:T1G1.0 ■:T4G1.0 △:P8G1.0 ×:P8G1.5

低濃度域において、光照射後の死細胞率は2%から4%で差はほとんど見られなかった。一方、高濃度域においてはデンドリック PC の末端基が G-1.0 のようにイミノ基の場合、光照射後の死細胞率は20%から25%であるのに対し、末端基が G-1.5 のようにカルボキシル基の場合1.4%であった。

この結果より、よりガン細胞との相互作用の強いデンドリック PC の検討が必要ではあるが、デンドリック PC は、ガン細胞に対して光線力学的ダメージを与えることがわかった。

4. 結論

デンドリック PC は、Zn-PC および既存の PDT 用光増感剤よりも長波長側の吸収を有する。さらに、デンドリック PC とガン細胞との相互作用の結果から、PDT 用光増感剤としての有用性が示唆された。

参考文献

- 1) D. Rboston, J. C. Bailar. Jr., *Inorganic Chemistry*, **11**, (1972) 1578-1583.
- 2) K. Sakamoto, E. Ohno-Okumura, *Current Topics Electrochem.*, **9**, (2003) 117-156.
- 3) 廣橋亮, 坂本恵一, 奥村映子, “機能性色素としてのフタロシアニン”, アイピーシー, 東京 (2004).
- 4) K. E.Uhrich, J. M. J. Frechet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1992**, 1623-1630.
- 5) D. K. P. Ng, *C. R. Chimie*, **6**, (2003) 903.
- 6) K. Sakamoto, E. Ohno-Okumura, T. Kato, *Recent Res. Devel. Inorganic Chem.*, **5**, (2006) 1- 28.
- 7) K. Sakamoto, E. Ohno-Okumura, T. Kato, M. Watanabe, M. J. Cook, *Metal-Based Drugs*, in press.
- 8) K. Sakamoto, E. Ohno-Okumura, T. Kato, M. Watanabe, M. J. Cook, *Dyes Pigments*, in press.
- 9) 金澤誠子, 坂本恵一, 特願 2006-302304 (2006), 米国特許 PCT-JP2007-00100 (2007).