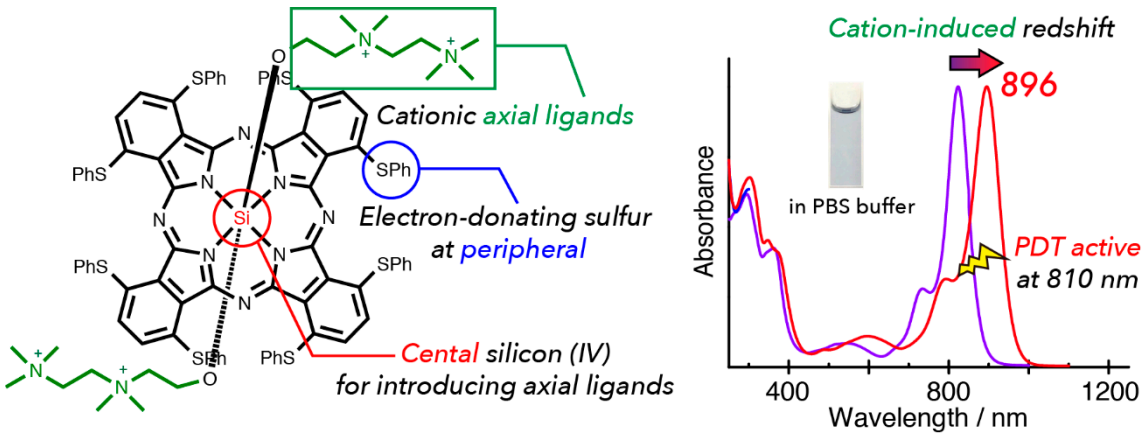
120　近赤外光を活用する光線力学療法増感剤の新設計指針	古山　渓行

【目的】可視～近赤外光を強く吸収するフタロシアニンを基に、「生体系へ適用可能な親水性」「『生体の窓』と呼ばれる近赤外光の選択的吸収」を同時に達成するための分子デザインとして、「元素特性の相乗効果を利用したフタロシアニンケイ素錯体」を新たに提案し、合成法の開発および光線力学療法への応用を行う。光線力学療法（PDT）は光感受性を示す色素をがんなどの病理組織に集積させ、レーザー光を照射することで病理組織のみを選択的に駆除する手法であり、既に国内でも加齢黄斑変性症に対する治療などにおいて認可された手法である。照射された光を色素（光増感剤）が吸収し、近傍で細胞毒性のある一重項酸素を発生させ、これが病理組織を駆除するとされる。よって、空間選択性に優れており、患者への負担も少ないことが利点として挙げられ、薬学・医学の分野で注目を集めている。一方で従来用いられている光増感剤が利用できる波長は 600 nm 程度が限界であり、生体深部に対する透過性に問題があった。一方、フタロシアニン類は可視～近赤外光を強く吸収し、光物理特性の制御も容易であるため、光増感剤としての応用研究も行われていたが、「生体の窓」と呼ばれる領域である 800 nm を超える光を活用した材料は知られていなかった。以上の背景から、生体応用を指向したフタロシアニン近赤外材料の開発が PDT における新たな展開に貢献できると考え、検討を行った。

【方法】フタロシアニンケイ素錯体は中心ケイ素上に様々な官能基を導入できることが知られている。例えば、カチオン性イオン官能基を導入すれば親水性が向上するため、生体材料への適用に有利となることが知られている。以前の知見から、フタロシアニン周辺部に硫黄置換基を導入し、中心に電子不足のリン原子を導入することが近赤外光の活用において重要であることがわかっていた。カチオン性イオンは電子不足と捉えることもできるため、先の結果を踏まえて周辺に硫黄置換基を導入し、ケイ素上にカチオン性イオン官能基を導入したフタロシアニンは生体適用可能な親水性と近赤外光の選択的吸収の両方を実現できるのではないかと仮説を立て、検討を行った。

【結果】既存のフタロシアニン合成法に則ることで、目的のケイ素錯体を良好な収率で得ることができた。親水性溶媒に対する溶解性を評価したところ、イオン官能基の導入により溶解性が向上していることを確認できた。また、親水性溶媒中においてしばしば問題となる色素の会合も観測されなかった。これらの化合物の溶液中における吸収スペクトルを測定したところ、Q 帯と呼ばれる強い吸収帯を 800 nm を超える近赤外領域に観測した。また、興味深いことに、イオン官能基の導入による Q 帯のさらなる長波長化が観測された。電気化学測定および理論計算による解析から、この効果が周辺の硫黄置換基との相乗効果によるものと明らかにした。開発したフタロシアニンを用いて、HEK293T 細胞に対する光毒性を評価した。照射光として 810 nm の近赤外光を用いたところ、明確な光毒性を観測することができ、本材料が近赤外光を用いた PDT へ適用できる可能性を示すことができた。

周辺置換基とケイ素上軸配位子効果に基づく近赤外光吸収フタロシアニンの設計



120. 近赤外光を活用する光線力学療法増感剤の新設計指針

古山　渓行

金沢大学 理工研究域 物質化学系 精密有機合成化学研究室

Key words：フタロシアニン，光線力学療法，近赤外光，光増感剤，ケイ素

緒　言

光線力学療法（PDT）は光感受性を示す色素をがんなどの病理組織に集積させ、レーザー光を照射することで病理組織のみを選択的に駆除する手法であり、既に国内でも加齢黄斑変性症など治療において認可された手法である。照射された光を色素（光増感剤）が吸収し、近傍で細胞毒性のある一重項酸素を発生させることで病理組織を駆除するため、空間選択性に優れており、患者への負担も少ないことが利点であることから、薬学・医学の分野で注目を集めている。

PDT において使用する照射光の波長は、光増感剤が吸収できる光の波長に依存する。現在認可されているレザフィリン®などは 600 nm 程度の可視光を強く吸収する。一方、生体組織内は赤血球をはじめ可視光を強く吸収する物質が多数存在し、これらが光増感色素の吸収と競合する問題がある。解決策として、より長い波長を持つ近赤外光の利用が考えられる。特に、700～1,000 nm の領域は「生体の窓」と呼ばれ、生体組織が光吸収を持たないため、光増感色素の選択的な活性化が実現できる。この点に注目した研究も行われており、例えば可視～近赤外光を強く吸収するフタロシアニンケイ素錯体を用いて 700 nm 程度の選択的光励起を実現した報告［1］はアメリカ大統領一般教書演説でも取り上げられるなど、社会において強く注目されている。一方、より選択性の高い 800～900 nm の光の活用については一般的分子設計指針がほとんど確立されていなかったということもあり、課題が残されていた。

さて、先に挙げたフタロシアニンケイ素錯体は、「650～700 nm 程度の可視～近赤外光と強く相互作用する」、「中心ケイ素上に様々な軸配位子を導入でき、設計性に優れる」という利点がある。一方、我々は過去に、フタロシアニン中心に電子不足な五価リンを導入したフタロシアニン五価リン錯体において、周辺に硫黄置換基を導入した時に、両者の相互作用により近赤外光との相互作用が大幅に上昇する、という現象を見出している［2］。しかし、この分子は設計性、親水性において課題を残しており、生体系への応用研究はほとんど進んでいなかった［3］。

以上を踏まえ、本研究では周辺に硫黄置換基を導入したフタロシアニンケイ素錯体において、カチオン性イオン官能基をケイ素上に導入した材料を新たに設計した。カチオン性イオン官能基は、材料の親水性を高めるためにしばしば導入される。また、電子的には電子不足の官能基とみなすこともできる。そこで、ケイ素錯体にカチオン性イオン官能基を導入した材料は、五価リン錯体に類似した近赤外光特性を獲得することができないだろうか、との仮説を立てた。本研究では実際の材料合成と近赤外光特性をはじめとした基礎物性評価をまず行った上で、開発した材料を実際に生細胞へ適用し近赤外光照射による光毒性が発現するかについて、検証を行った［4］。

方法および結果

1.　材料の合成

本研究で用いた材料の合成法を図 1 に示す。フタロシアニンケイ素錯体は 1,3-ジイミノイソインドリン誘導体を前駆体とし、四塩化ケイ素を鋳型とした環化四量化を行うことで合成できる。硫黄置換基を有する前駆体に対し環化を行った後、加水分解を行うことで、ケイ素上の軸がヒドロキシ基であるフタロシアニン **2** を得ることができた。これに対し、各種アルコール誘導体を脱水縮合することで目的の軸配位子を導入した。さらに、アミノアルキル基を持つ化合物 **4**、**5** に対して過剰量のヨウ化メチルを用いて窒素上の四級化を行い、カチオン性イオン官能基をケイ素上に持つ **4Q**、**5Q** を合成した。また、周辺硫黄置換基の効果を詳細に検証するため、比較化合物として周辺無置換の

ケイ素錯体 **6** および **6Q** も合成した。化合物の構造は ^{1}H、^{29}Si NMR および高分解能質量分析により決定した。

本研究の目的の一つであるカチオン性イオン官能基の導入により親水性が向上しているかについて、次の実験を行った。すなわち、後に行う光細胞毒性アッセイ条件を考慮して DMSO : PBS buffer = 1 : 1 の溶液を親水性溶媒のモデルとし、材料の溶解性を検討した。疎水性軸配位子を持つ **4**、**5** はこの条件において全く溶解が見られない一方で、カチオンとした **4Q**、**5Q** は良好な溶解性を示した（図 2）。つまり、カチオン性イオン官能基の効果により、明確に親水性が向上したこととなる。

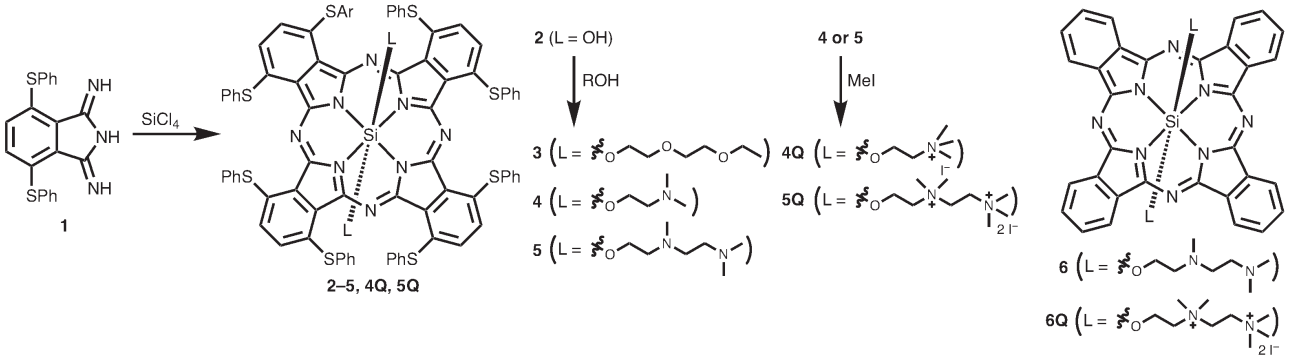


図 1. 本研究で用いたフタロシアニンケイ素錯体の合成

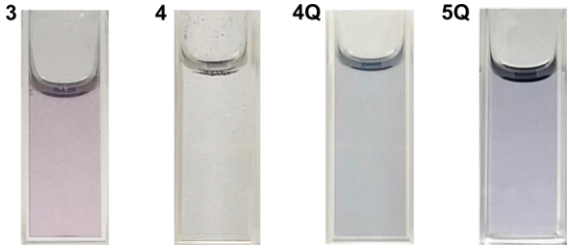


図 2. 親水性溶媒中における化合物 **3**、**4**、**4Q**、**5Q** 溶液の写真
親水性溶媒として DMSO : PBS buffer = 1 : 1（v/v）を使用。濃度は 1.0×10^{-5} M であり、1 cm 角の石英セルに入れて撮影を行った。化合物 **4** に関してはこの条件で溶解せず、不溶物が溶液表面に浮いていた。

2. 基礎物性評価

合成した材料の光特性を溶液中における紫外可視近赤外吸収スペクトルから評価した（図 3）。フタロシアニンは一般的に 650～700 nm の領域に Q 帯と呼ばれる強い光吸収帯を持ち、これはフタロシアニン骨格由来のπ-π*遷移に帰属されることが知られている。すなわち、ケイ素錯体における軸配位子のように、フタロシアニン骨格のπ軌道と直接相互作用しない位置への官能基の導入は、材料の光特性にあまり大きな影響を与えない。実際、周辺無置換の化合物ではカチオン化の前後で光特性はほとんど変わらず、これは過去のフタロシアニンケイ素錯体における報告[5]とも一致する結果であった。一方、周辺に硫黄置換基を導入したフタロシアニンにおいては、硫黄の効果により Q 帯が近赤外領域まで長波長化する［6］ことが知られており、これはケイ素錯体においても同様の結果を与えた。さらに興味深いことに、カチオン化した **4Q**、**5Q** においては元となる **4**、**5** と比べて明確な長波長シフトが観測された（**5Q** において DMSO 中、35 nm、490 cm^{-1}のシフト）。親水性を有する中性官能基であるオリゴエチレングリコール鎖をケイ素上に導入した **3** ではそのような現象は見られなかったことから、本現象は軸配位子のカチオン性と周辺の硫黄置換基の両方が関係すると考えることができる。また、同様の長波長化は測定に用いる溶媒の種類を変えても同様に観測された。ここから、この長波長化現象は単純な溶媒効果ではなく、材料が本質的に有する性質であることが言える。

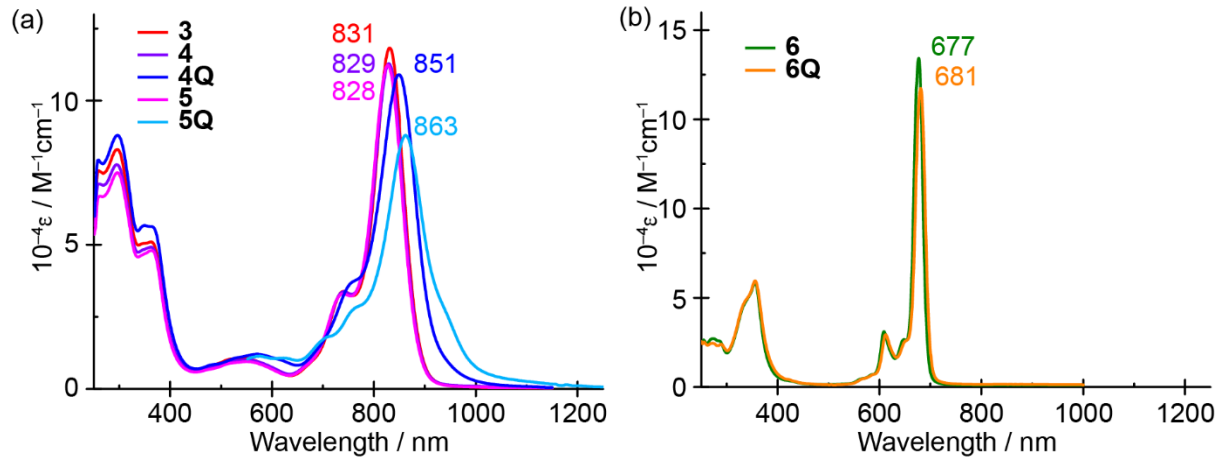


図 3. フタロシアニンケイ素錯体群の紫外可視近赤外吸収スペクトル
いずれも、DMSO を溶媒として用いた。(a) は周辺に硫黄置換基を持つもの、(b) は周辺無置換のフタロシアニンである。

3. 光細胞毒性の評価

合成した親水性材料 **3**、**4Q**、**5Q** を用いて、光照射による光細胞毒性を評価した。光源として、これらの材料と強く相互作用しうる 810 nm を中心波長とする LED を用いた。アッセイ条件の検討において、残念ながら **4Q** は細胞アッセイ条件において十分な溶解性を有しないことが明らかとなったので、実際の評価は **3** および **5Q** に対し行った。HEK293 細胞に対して 10 μM (0.1% DMSO) の化合物を作用させた後、15 分間光照射を行い、光照射直後および 2 日培養後の細胞数について WST-8 を用いた MTT アッセイにより評価した。

結果、図 4a に示すように、**5Q** において強い光細胞毒性が観測された。なお、光照射を行わない場合細胞数にほとんど変化が見られなかったことから、**5Q** 自体の細胞毒性は低く、光照射と組み合わせることではじめて細胞毒性が発現したと考えることができる。一方、**3** においてはほとんど光細胞毒性が現れなかった。想定する毒性発現機構は、PDT において一般的に提唱されている、材料の光増感による一重項酸素の発生であると考えている。この観点から各材料の一重項酸素増感能を評価した結果、**3** においても **5Q** に匹敵する十分な光増感能を持つことが分かっていた。つまり、光増感能の問題ではなく、細胞取り込みなどの何らかの過程において問題があることを意味しているが、はっきりした理由は分かっていない。

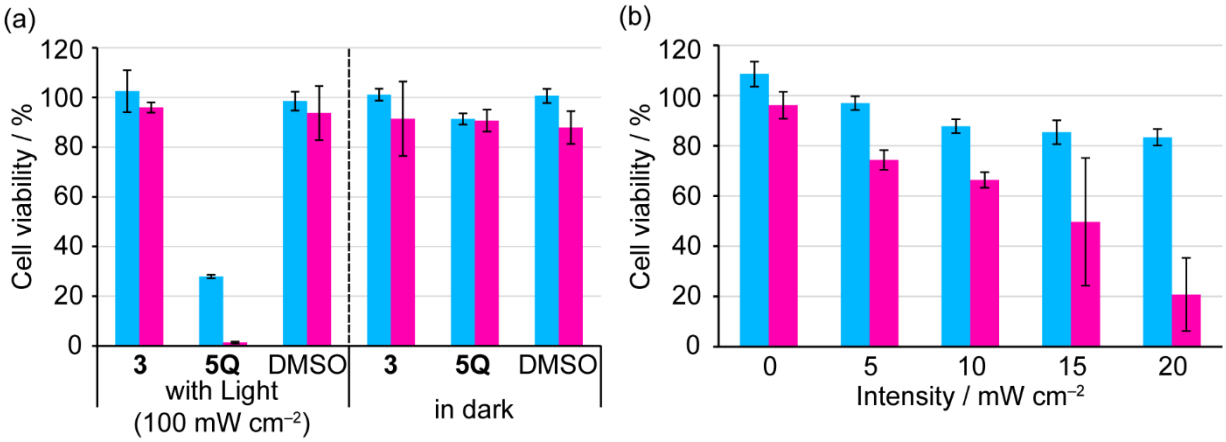


図 4. HEK293T 細胞に対するフタロシアニン類の近赤外光細胞毒性評価
化合物は 10 μM の 0.1% DMSO 溶液とし、細胞へ投与した。光源として 810 nm の LED 光を用い、強度 100 (a) または 5～20 (b) mW/cm^{-2}として 15 分照射後、暗所にて 2 日培養した。細胞数は MTT 法により見積もり、光照射前の細胞数を 100%とした時の細胞数を光照射直後（青）および 2 日培養後（赤）時点で評価した（n = 3）。

考　察

1. カチオン化に伴う光特性変化の帰属

今回はじめて見出した、「周辺硫黄置換基」と「カチオン性イオン軸配位子」の両方に基づく光吸収帯の近赤外領域における長波長化について、電気化学および理論化学の観点から、より詳細な議論を試みた。はじめにサイクリックボルタンメトリーにより、各材料の酸化還元電位を評価した（図 5）。ここで、第一酸化電位と第一還元電位の差と光吸収スペクトルにおける Q 帯の位置には相関があることが知られている。また、カチオン性イオン官能基を導入すると、化合物全体が電子不足となるため、各電位は全体的に正側シフトする。無置換錯体 **6**、**6Q** では以上の性質を反映する結果が得られ、**4**、**4Q** においても光特性を反映した電位の変化が観測された。ここで、カチオン化の前後における酸化・還元電位の変化量を比較したところ、還元電位の方がより大きな変化が起きた結果、全体的な電位差が低下していることが分かった。ここから、本現象は主に LUMO の安定化によるものと捉えることができる。以上の結果は、モデル材料の分子軌道計算からも支持された。なお、この時近赤外特性に関係すると考えられる分子軌道において、ケイ素上の官能基の電子密度はほとんど影響していないことも分かった。この結果は本現象が軌道相互作用によるものではなく、クーロン力由来のものであることを示している。同様の現象は、過去の五価リン錯体の例[2]でも観測されたものである。

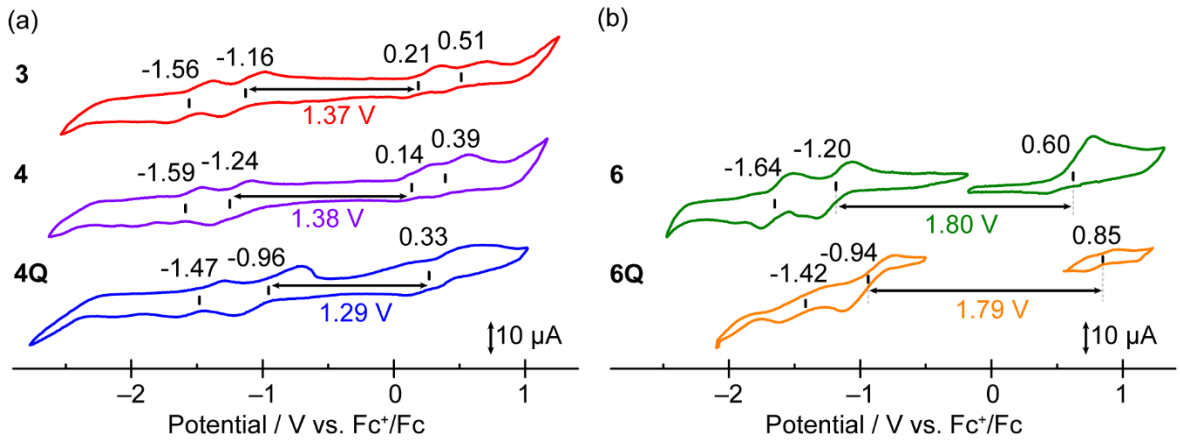


図 5.　フタロシアニンケイ素錯体群のサイクリックボルタモグラム
いずれも、o ジクロロベンゼンを溶媒とし、支持電解質として $^{n}Bu_4N^+ClO_4^-$ が 0.1 M となるように調製した。サンプルの濃度はいずれも 1.0 mM である。(a) は周辺に硫黄置換基を持つもの、(b) は周辺無置換のフタロシアニンである。

2. 光細胞毒性の検証

活性が見られた **5Q** に対してより詳細な検証を行うべく、光照射の際の光強度を変えて光細胞毒性の評価を行った（図 4b）。照射時間は同一とし、照射強度を 5～20 mW cm^{-2} の間で変化させて同様に細胞数の評価を行った。結果、照射直後の細胞数に大きな変化は見られなかったが、2 日後における細胞数と照射強度の間には明確な正の相関が見られ、光照射による細胞毒性発現が支持された。毒性発現機構に関するより詳細な検討は今回行っていないが、光増感剤により発生した一重項酸素が細胞に作用しアポトーシスが誘導された結果、少し時間をおいた毒性発現という現象として現れたのではないかと考えている。

以上、フタロシアニンケイ素錯体の周辺置換基とケイ素上軸配位子の精密設計を通し、近赤外光を利用した PDT への適用可能性を示すことができた。実際に PDT 材料として使用するためには細胞への移行性や臓器選択性など解決すべき問題は多い。一方で、今回の材料は主要な性質に関与していない部位、例えば硫黄に直結した官能基なども有しており、これらを使ったさらなる機能化も期待できる。今後、*in vivo* における評価も視野に入れて、検討を進めていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究は、主に分子の合成および基礎的物性の測定・解析については金沢大学にて石井孝知学士と協力して進めました。また細胞に対する光毒性評価は名古屋市立大学大学院薬学研究科の中川秀彦教授、家田直弥助教のご協力のもと進めました。最後に、ご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. Nat Med. 2011 Nov 6;17(12):1685-91. PMID: 22057348 DOI: 10.1038/nm.2554.

2) Furuyama T, Satoh K, Kushiya T, Kobayashi N. Design, synthesis, and properties of phthalocyanine complexes with main-group elements showing main absorption and fluorescence beyond 1000 nm. J Am Chem Soc. 2014 Jan 15;136(2):765-76. PMID: 24328229 DOI: 10.1021/ja411016f.

3) Zhou Y, Wang D, Zhang Y, Chitgupi U, Geng J, Wang Y, Zhang Y, Cook TR, Xia J, Lovell JF. A Phosphorus Phthalocyanine Formulation with Intense Absorbance at 1000 nm for Deep Optical Imaging. Theranostics. 2016 Mar 11;6(5):688-97. PMID: 27022416 DOI: 10.7150/thno.14555.

4) Furuyama T, Ishii T, Ieda N, Maeda H, Segi M, Uchiyama M, Nakagawa H. Cationic axial ligands on sulfur substituted silicon(iv) phthalocyanines: improved hydrophilicity and exceptionally red-shifted absorption into the NIR region. Chem Commun (Camb). 2019 Jun 20;55(51):7311-7314. PMID: 31144690 DOI: 10.1039/c9cc03022k.

5) Lo Pc, Huang JD, Cheng DY, Chan EY, Fong WP, Ko WH, Ng DK. New amphiphilic silicon(IV) phthalocyanines as efficient photosensitizers for photodynamic therapy: synthesis, photophysical properties, and in vitro photodynamic activities. Chemistry. 2004 Oct 4;10(19):4831-8. PMID: 15372681 DOI: 10.1002/chem.200400462.

6) Kobayashi N, Ogata H, Nonaka N, Luk'yanets EA. Effect of peripheral substitution on the electronic absorption and fluorescence spectra of metal-free and zinc phthalocyanines. Chemistry. 2003 Oct 17;9(20):5123-34. PMID: 14562330 DOI: 10.1002/chem.200304834.