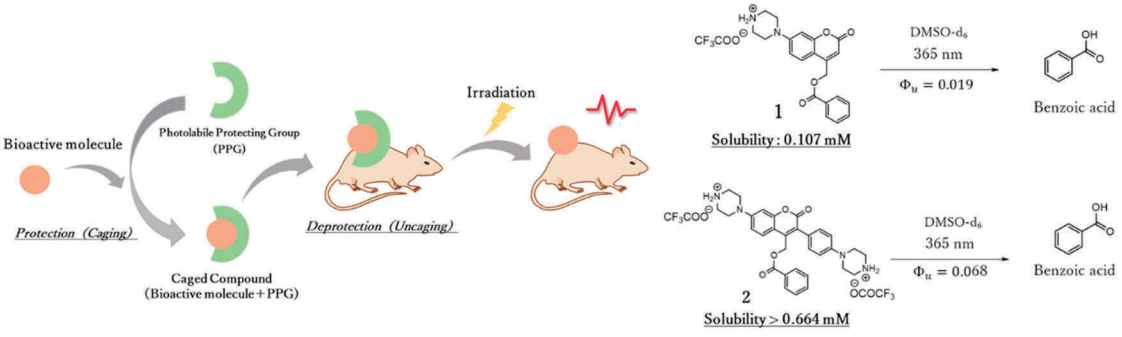
1　低侵襲「光」ドラッグデリバリー研究	安倍　学

【目的】生物活性物質の活性部位を光解離性保護基（PPG）で保護（ケージング）し、一時的に生物不活性となった化合物はケージド化合物と呼ばれる。ケージド化合物は中性・無試薬条件下で生物活性物質を時空間的に制御することができ、光照射による脱保護（アンケージング）によってその活性を再生できる。神経伝達物質などをケージングすることで、生物活性物質の機能発現のメカニズムの解明や、ドラッグデリバリー、神経科学、薬理学などの医療分野での応用が期待されている。本研究では新規ケージド化合物 **1** と **2** の合成、光反応性と水溶性の調査することにした。

【方法】7-hydroxy-4-methylcoumarin を出発物として、目的化合物となる **1** と **2** の合成に取り組んだ。目的化合物 **1** は 7 ステップ・全収率 20%で合成を達成した。また、目的化合物 **2** は 10 ステップ・全収率 1.7%で合成を達成した。合成した化合物 **1** および **2** が光照射により安息香酸を放出するか否かの光反応性を ^{1}H NMR スペクトルにより追跡した。その結果、化合物 **1** および **2** が CD_3OD および DMSO-d_6 中でケージド化合物として機能することを確認した。水溶液中において発色団 1 および 2 がプロトン化する際に、本研究で新たに導入したピペラジン部位の 2 つの窒素原子のうち、どちらの窒素に優先的にプロトン化するかを pH 効果の評価により決定した。まず、対照実験として窒素原子を一つしか保持していない DEACM で測定を行ったところ、1M HCl 溶液を加えた酸性条件下で溶液中のプロトン数が多くなるにつれ、吸収が明らかに減衰していき短波長シフトが確認された。その後、1 M NaOH 溶液を加え塩基性条件とすると吸光度が復元され、中性条件下の吸光度と同等の吸収が見られた。発色団 1 および 2 のサンプルで同様の実験を行ったところ、DEACM に比べ pH の影響をほとんど受けず吸収を保ったままであった。なお、DEACM、発色団 1 および 2 は pH の値により可逆的に変化したが、強酸性または強塩基性条件下では数時間で吸収が減衰し分解している様子が確認できた。各発色団の電子供与性置換基のアミノ基がプロトン化された状態の量子化学計算を行い、プロトン化されたピペラジンおよびジエチルアミノ基の電子供与性を調査した。DEACM はアミノ基がプロトン化されるとクマリン骨格に対してほぼ直角となる様子が算出された。また、プロトン化された発色団では HOMO-LUMO における電子遷移がほとんど見られなかった。これにより窒素原子のプロトン化による電子供与性の喪失が示唆された。一方で発色団 1 および 2 は末端のアミノ基がプロトン化された後もピペラジン基とクマリン骨格の傾きは大きく変化せず、電子供与性が保たれている様子が示唆され、HOMO-LUMO における電子遷移の様子も確認された。分子末端ではなくクマリン骨格側のアミノ基がプロトン化された場合、DEACM と同様にピペラジン基がクマリン骨格に対してほぼ垂直となるような構造となり、電子供与性の喪失が示唆された。

【結果】本研究ではクマリン型光解離性保護基に新たにピペラジン基を導入し光反応性と水溶性の両立を目指して、新規ケージド化合物 **1** および **2** の設計・合成・物性調査に取り組んだ。ケージド化合物 **1** および **2** は 365 nm の光照射により安息香酸の効率的かつ効果的なアンケージング反応を示した一方で、生理学実験に十分に応用可能な水溶性も有することが分かった。今後の展望として、ケージド化合物 1 および 2 の二光子アンケージング反応を行い、二光子吸収特性を評価する。

光解離性保護基を用いるケージングとアンケージングによる光ドラッグデリバリーの概念図と本研究の結果



1. 低侵襲「光」ドラッグデリバリー研究

安倍　学

広島大学 大学院先進理工系科学研究科 反応有機化学研究室

Key words：ケージド化合物，光解離性保護基，生物活性物質，ドラッグデリバリー

緒　言

生物活性物質の活性部位を光解離性保護基（PPG）で保護（ケージング）し、一時的に生物不活性となった化合物はケージド化合物と呼ばれる［1，2］。ケージド化合物は中性・無試薬条件下で生物活性物質を時空間的に制御することができ、光照射による脱保護（アンケージング）によってその活性を再生できる。神経伝達物質などをケージングすることで、生物活性物質の機能発現のメカニズムの解明や、ドラッグデリバリー、神経科学、薬理学などの医療分野での応用が期待されている（図 1）。

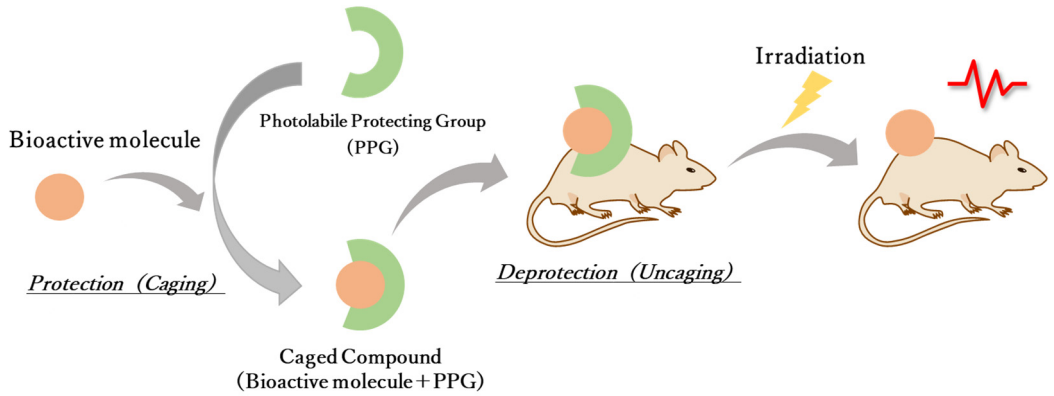


図 1. 光解離性保護基を用いるケージングとアンケージングによる光ドラッグデリバリーの概念図

ケージド化合物のアンケージングに必要な PPG は、これまで多く設計・開発されてきた。しかし、そのほとんどは生体内のヘモグロビンや水の存在による吸光のため細胞透過性が低く、細胞毒性がある紫外可視光領域内に励起波長を有することから生理学実験に不向きかつ生体内でのアンケージング効率が低いことが課題として挙げられている。そのため、より長波長で細胞毒性が低く、かつ細胞透過性の高い光学窓と呼ばれる 700～900 nm の 近赤外光領域でのアンケージングを狙って研究が行われてきた。近赤外光領域周辺のより長波長の光でのアンケージング、およびアンケージング効率の向上のためにπ共役系の拡張、電子求引性置換基・電子供与性置換基の導入など、様々な工夫がなされてきた。その一つに二光子吸収（2PA）の利用が挙げられる。ほとんどの場合、アンケージング反応などの光反応は分子が一つの光子を吸収し励起する一光子吸収（1PA）により進行する。しかし一光子での励起は大きなエネルギーが必要となるため短波長で生体毒性が高い紫外光が必要となる。さらに、一光子吸収励起確率が光強度に比例するため比較的光散乱が大きく光吸収効率も優れないため、高強度の光源でなければならない。二光子吸収は分子が二つの光子を同時に吸収し励起する現象であり、通常の一光子励起と比べ励起に必要な一光子あたりのエネルギーはおよそ 1/2 倍となる。そのため一光子励起のおよそ 2 倍の波長の光での励起が可能となり、紫外光で励起する分子を、二光子吸収を利用して近赤外光領域付近のより長波長での光により励起させることが可能となる。また、二光子励起では励起確率は光強度の二乗に比例するためレンズの焦点部分での局所的な励起が可能となる。そのため、生理学実験への応用を目指す場合、

二光子吸収の利用は非常に興味深いものとなっている。

当研究室では、π共役により分子サイズの割に比較的高い二光子断面積 (GM) を持つトランススチルベンに着目し、cis-trans 光異性化により二光子吸収能の減少が起こらないよう酸素原子やエステルで架橋した PPG についての調査を行ってきた（図 2）[3, 4]。クマリン型 PPG の 3 位にジメチルアミノ基、7 位にジエチルアミノ基を電子供与性置換基として導入した D-π-D 構造をもつクマリン型ケージド化合物は二光子吸収を利用した光反応性が優れている一方で、水溶液中においては 7 位のアミノ基がプロトン化し電子供与性が失われるため、二光子吸収能が低下しアンケージングが起こる励起波長が紫外領域寄りになるという問題点があった。そこで、本研究ではクマリンの 7 位と 3 位に新たな電子供与性置換基としてピペラジンを導入した PPG の設計、合成に取り組んだ。ピペラジンとは窒素原子を 2 つ保持する 6 員環構造の分子である。一方の窒素原子をクマリンの 7 位に導入することにより 3 級となったアミンに比べ、分子末端のアミンは 2 級のままとなり水溶液などのプロトン性溶媒中においては、末端側の窒素が優先的にプロトン化すると考えられる。これによりクマリン側の窒素原子が持つ電子供与性を失わないようにすることで、水溶性と光反応性の両立を狙いとしている。さらに、トリフルオロ酢酸を添加し末端のアミノ基をイオン化させ極性を高めることにより、さらなる水溶性の向上を目指した。本研究では目的分子として新規ケージド化合物 **1** と **2** の合成、光反応性と水溶性の調査について報告する（図 3）。

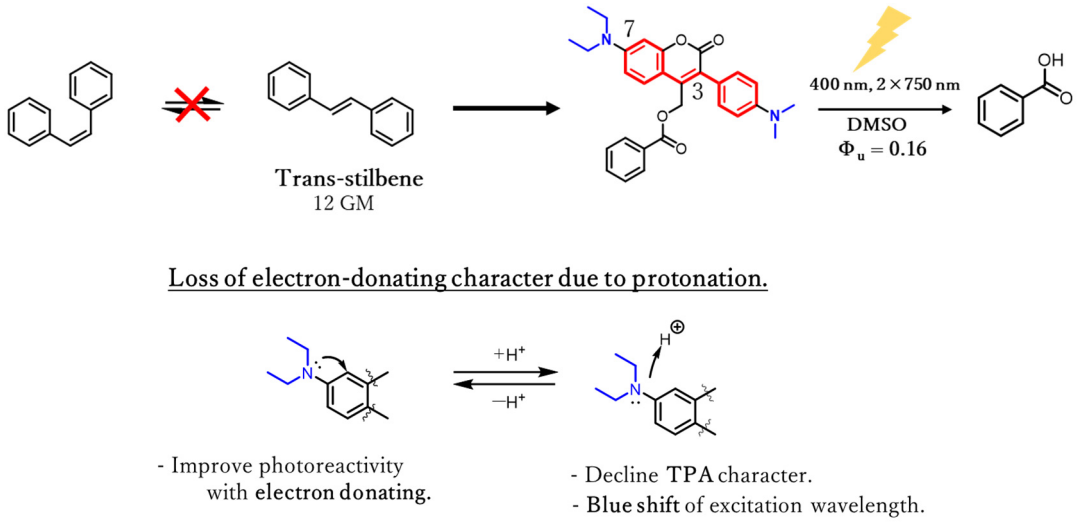


図2.　これまでの研究での問題点

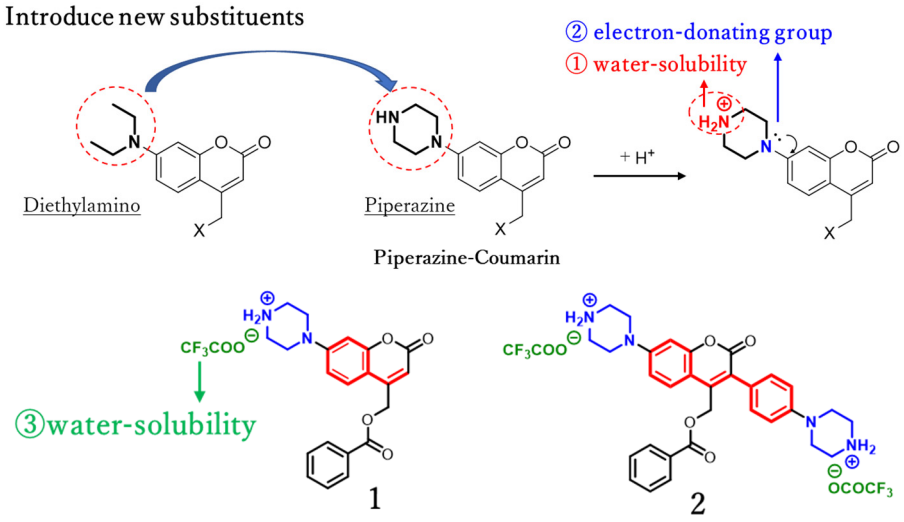


図3.　本研究：ピペラジン基の導入による水溶性の改善と電子供与性の補完

方法および考察

1. ケージド化合物 1、2 の合成

7-hydroxy-4-methylcoumarin を出発物として、目的化合物となる **1** と **2** の合成に取り組んだ。目的化合物 **1** は 7 ステップ・全収率 20%で合成を達成した。また、目的化合物 **2** は 10 ステップ・全収率 1.7%で合成を達成した。

2. 光反応生成物の調査

合成した化合物 **1** および **2** が光照射により安息香酸を放出するか否かの光反応性を ^{1}H NMR スペクトルにより追跡した。これにより化合物 **1** および **2** が CD_3OD および DMSO-d_6 中でケージド化合物として機能するかを確認した。

溶液調製および実験方法

1) 化合物 **1** および **2** をそれぞれ一定量測り取り、0.5 mL の CD_3OD または DMSO-d_6 溶媒に溶解させた。・・・①
2) NMR チューブに①を加えた。
3) 光照射前および一定時間光照射を行った後の ^{1}H NMR スペクトルを測定し、スペクトルの変化を比較した。
4) 化合物 **1** および **2** が完全に消費されるまで光照射を続けた。
5) 1,3,5-trimethoxybenzene の標準溶液を別途調製し、0.1 mL を光照射終了後のサンプルに加えた。・・・②
6) ②の ^{1}H NMR スペクトルにおいて、光反応生成物としての安息香酸、副生成物と標準サンプルのピークの積分値を比較し、収率を算出した。

化合物 **1** および **2** は両溶媒中において 90%以上の収率で安息香酸（benzoic acid）を放出していると算出された（表 1）。この実験結果より、**1** および **2** はケージド化合物として機能することが確認された。光反応副生成物においては、DMSO-d_6 中では両化合物のアンケージング反応において、10 ppm あたりにアルデヒド誘導体に特徴的なピークが確認された。発色団 1 および 2 のアルデヒド誘導体を別途合成し、反応溶液のスペクトルを比較したところ、良い一致を示した。これにより光反応副生成物としてアルデヒド誘導体が生成していることが示唆されが、アルデヒド誘導体の収率は化合物 **1** および **2** でそれぞれ 5%、4%と非常に低かった。またその他に目立ったピークも見られなかったため、副生成物は光照射に伴い分解された可能性が高いと考えられる。一方で CD_3OD 中では DMSO-d_6 中に比べて副生成物の収率はおよそ 20%と若干の向上が見られた。これについて、アルコール誘導体ではないかと考え、別途合成したアルコール誘導体の ^{1}H NMR スペクトルと比較したが、ブローディングやオーバーラッピング等によりアルコール誘導体と副生成物が一致していると判断することはできなかった。

表 1. 化合物 **1** と **2** の光反応

	Solvent	Concentration (mM)	Reaction time (min.)	Chemical yield (%)	
				Benzoic acid	Byproduct
1	DMSO-d_6	5.28	180	**94**	5 (Aldehyde 1)
	CD_3OD	6.53	180	**93**	17
2	DMSO-d_6	4.55	90	**92**	4 (Aldehyde 2)
	CD_3OD	28.7	1440	**90**	20

3. pH 評価

水溶液中において発色団 1 および 2 がプロトン化する際に、本研究で新たに導入したピペラジン部位の 2 つの窒素原子のうち、どちらの窒素に優先的にプロトン化するかを pH 効果の評価により決定した。まず対照実験として窒素原子を一つしか保持していない DEACM で測定を行ったところ、1M HCl 溶液を加えた酸性条件下で溶液中のプロトン数が多くなるにつれ、吸収が明らかに減衰していき短波長シフトが確認された。その後、1 M NaOH 溶液を加え塩基性条件とすると吸光度が復元され、中性条件下の吸光度と同等の吸収が見られた。

発色団 1 および 2 のサンプルで同様の実験を行ったところ、DEACM に比べ pH の影響をほとんど受けず吸収を保ったままであった。なお、DEACM、発色団 1 および 2 は pH の値により可逆的に変化したが、強酸性または強塩基条

件下では数時間で吸収が減衰し分解している様子が確認できた。各発色団の電子供与性置換基のアミノ基がプロトン化された状態の量子化学計算を行い、プロトン化されたピペラジンおよびジエチルアミノ基の電子供与性を調査した。DEACM はアミノ基がプロトン化されるとクマリン骨格に対してほぼ直角となる様子が算出された。また、プロトン化された発色団では HOMO-LUMO における電子遷移がほとんど見られなかった。これにより窒素原子のプロトン化による電子供与性の喪失が示唆された。

一方で発色団 1 および 2 は末端のアミノ基がプロトン化された後もピペラジン基とクマリン骨格の傾きは大きく変化せず、電子供与性が保たれている様子が示唆され、HOMO-LUMO における電子遷移の様子も確認された（図 4)。分子末端ではなくクマリン骨格側のアミノ基がプロトン化された場合、DEACM と同様にピペラジン基がクマリン骨格に対してほぼ垂直となるような構造となり、電子供与性の喪失が示唆された。

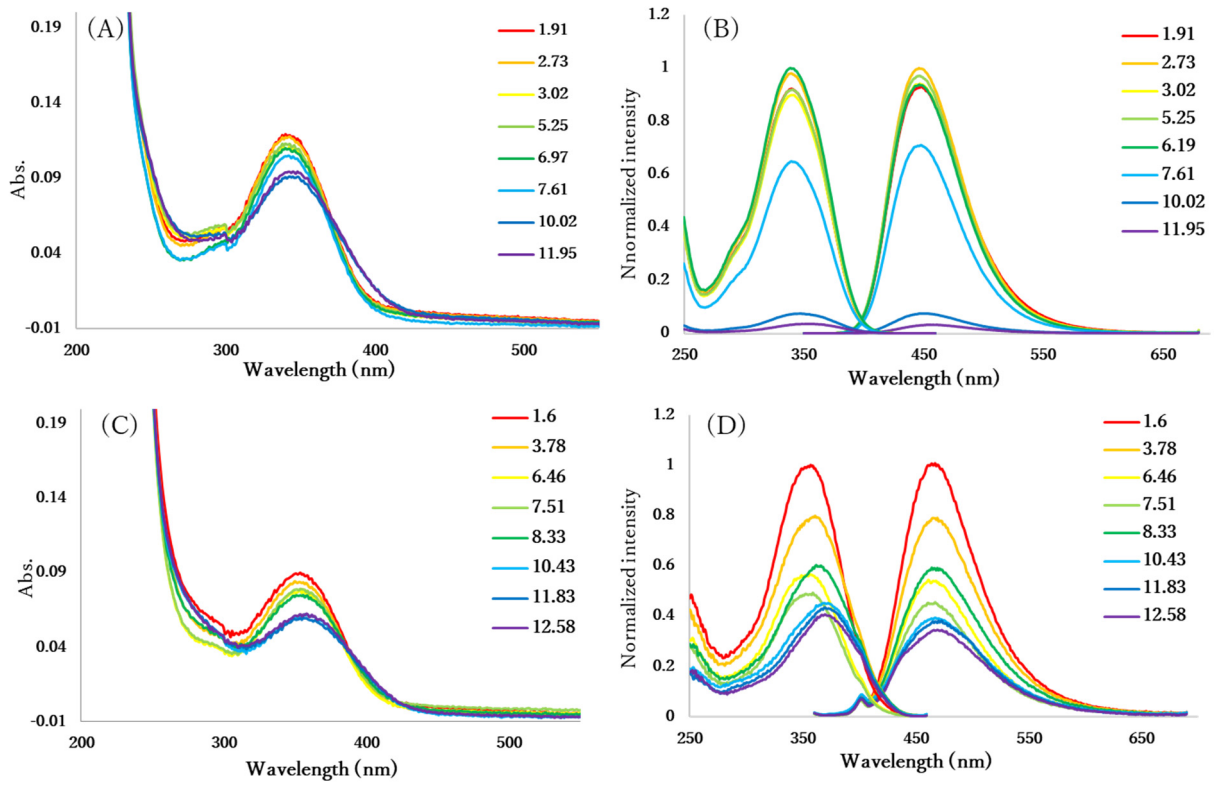


図4. 化合物**1**と**2**の吸収および発光スペクトルに及ぼすpH効果

A, B） 化合物**1**の吸収スペクトルと発光スペクトル。

C, D） 化合物**2**の吸収スペクトルと発光スペクトル。

4. 水溶性

化合物**1**および**2**が生物学実験に応用するのに十分な水溶性を有するかを確かめるために緩衝溶液pH7.4のHEPES buffer への溶解度を調査した。化合物 **1** の水溶性が 0.107 mM であったのに対し、化合物 **2** では比較的高濃度中でも飽和点の決定方法として考えた濃度間の吸収差の違いは見られなかった。さらに溶け残っている様子も確認できなかったため、今回の測定で開始した初めの濃度 0.664 mM よりも飽和点が高いと考えることができ、ケージド化合物 **1** に比べ大きく水溶性を向上させることに成功した。これにより DMSO などの有機溶媒を混和させることなく生理学実験に応用できることが示唆された。DEACM-BA の HEPES buffer への溶解度を調査した際、多量の母液を加えても DEACM-BA はほぼ溶けず沈殿している様子が見られた。紫外可視吸収スペクトルを確認すると吸光度が 0.02 以下と他の有機溶媒中で見られるような高い吸光度が見られず、吸光度に対してノイズも無視できない程であったため濃度に

対する吸光度の変化量に相関はほとんど見られなかった。これは DEACM-BA が溶媒に溶けていないことを示唆していると考えられる。

トリフルオロ酢酸を添加することにより分子末端のアミノ基をイオン化し塩を形成することによる水溶性の向上への寄与を評価するため、末端のアミノ基が遊離アミンとなったケージド化合物の水溶性も調査した。DEACM-BA に比べ吸光度はやや向上したが、依然として溶け残りが確認できた。0.019 mM 相当の母液を加えた時点で母液を使い果たしたため、その水溶性は 0.019 mM 以下であることが分かった。TFA 塩である **1** は 0.107 mM であったため、末端のアミノ基のイオン化は水溶性の向上に効果的であることがわかった。以上より、水溶性の向上にはピペラジン基の導入が効果的であり、末端のアミノ基をイオン化させることによりさらに大きく水溶性を向上させることが可能であることが明らかとなった。生理学実験においては試料の濃度が数十μM 程の実験が多いため、化合物 **1** は生理学実験に応用するのに十分な水溶性を有していると言える。

結　果

本研究ではクマリン型光解離性保護基に新たにピペラジン基を導入し光反応性と水溶性の両立を目指して、新規ケージド化合物 **1** および **2** の設計・合成・物性調査に取り組んだ。ケージド化合物 **1** および **2** は 365 nm の光照射により安息香酸の効率的かつ効果的なアンケージング反応を示した一方で、生理学実験に十分に応用可能な水溶性も有することが分かった（図 5）。今後の展望として、ケージド化合物 1 および 2 の二光子アンケージング反応を行い、二光子吸収特性を評価する。

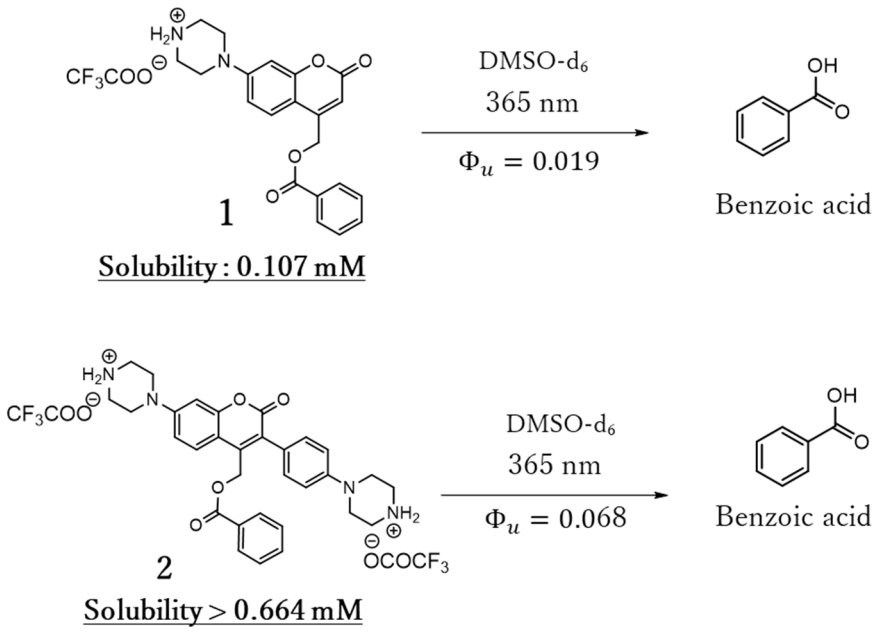


図5. 化合物**1**と**2**の光反応と水溶性のまとめ

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、広島大学大学院先進理工系科学研究科反応有機化学研究室の杉川賢太郎である。

文　献

1) Kaplan, J. H, Forbush, B, III, Hoffman J. F, Rapid Photolytic Release of Adenosine S'-Triphosphate from a Protected Analogue: Utilization by the Na:K Pump of Human Red Blood Cell Ghosts' Biochemistry, 1978, 17, 1929-1935. PMID: 148906 DOI: 10.1021/bi00578a027

2) Engels, J, Schlaeger, E.J, Synthesis, structure, and reactivity of adenosine cyclic 3',5'-phosphate benzyl triesters. J. Med. Chem, 1977, 20, 907-911. PMID: 195057 DOI: 10.1021/jm00217a008

3) Abe, M, Chitose, Y, Jakkampudi, S. Design and Synthesis of Two-Photon Responsive Chromophores for Near-Infrared Light-Induced Uncaging Reactions. Synthesis, 2017, 49 (5), 3337-3346. DOI: 10.1055/s-0036-1590813

4) Chitose, Y, Abe, M, Furukawa, K, Lin, J.-Y, Lin, T.-C, Katan, C, Design and Synthesis of a Caged Carboxylic Acid with a Donor–π–Donor Coumarin Structure: One-photon and Two-photon Uncaging Reactions Using Visible and Near-Infrared Lights, Org. Lett, 2017, 19 (10), 2622–2625. PMID: 28485152 DOI: 10.1021/acs.orglett.7b00957