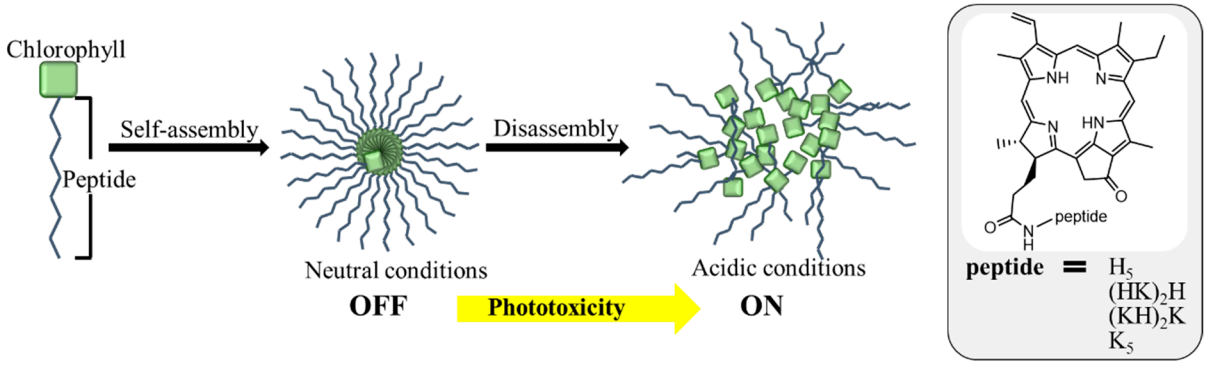
| 176　がん組織に選択的に機能する光増感剤の創製 | 松原　翔吾 |
|---|---|

【目的】光線力学療法（PDT：Photodynamic therapy）は光増感剤と呼ばれる化学物質を生体内に取り込み、患部に対してレーザー光を照射する治療法であり、抗腫瘍効果が高く、毒性（副作用）が少ない非侵襲的治療法であることから、近年注目されているガン治療法の 1 つである。しかし、PDT には光過敏症のリスクがあり、光増感剤が体外に排出されるまでは、遮光環境下で生活が必要となる。そこで本研究では、ガン特有の性質である「腫瘍血管の欠陥」と「腫瘍組織の pH 特性」に着目し、腫瘍組織でのみ高い光毒性を示す新規光増感剤として酸応答性ペプチド-クロロフィル複合体の開発を行った。

【方法】本研究では、ヒスチジン（His、H）とリジン（Lys、K）を含むペプチドとクロロフィルを複合させた化合物を光増感剤として用いた。クロロフィルおよびその誘導体は光増感剤としての機能を有している一方で、凝集すると自己消光によって光毒性が著しく低下するという性質を持っているため、クロロフィル誘導体の凝集・解離を制御することが可能となれば、光増感剤としての光毒性の制御（OFF・ON）が可能となる。また、凝集体を形成することで 10～200 nm 程度のナノ粒子を形成することが可能であれば、腫瘍組織選択的な蓄積も可能となる。凝集・解離を制御するトリガーとしては、酸応答性ペプチドを用いた。ヒスチジンは酸解離定数（pKa）が 6.04 であるため、中性条件下ではイミダゾリル基が疎水基として機能し、水溶液中においては疎水性相互作用による凝集性が高くなる。そのため、正常組織のような中性条件下では複合体が凝集し、自己消光による光毒性を軽減する（OFF 状態）。一方で、弱酸性条件下ではイミダゾリル基がプロトネーションすることで静電反発が起こり、凝集に伴う自己消光が緩和され、光毒性を示すようになる（ON 状態）。このナノ粒子化による腫瘍組織選択的な蓄積と pH 変化による光毒性変化を利用することによって、ガン選択的な光増感剤の開発を行った。

【結果】ペプチド-クロロフィル複合体として **Chl-$(HK)_2$H**、**Chl-$(KH)_2$K**、**Chl-$K_5$**、**Chl-$H_5$**を合成し、それぞれの集積体について物性測定を行った。電子顕微鏡を用いて構造観察を行ったところ、**Chl-$(HK)_2$H** の集積体は腫瘍組織選択的な蓄積が可能なナノ粒子であることが明らかとなった。pH 変化に伴う光毒性評価を、活性酸素蛍光プローブを用いて行ったところ、すべての複合体において酸性条件下の方が、活性酸素量が高くなるという結果となった。腫瘍組織選択的な蓄積と pH 変化による光毒性変化の両方の結果から、最もガン選択的な光増感剤に近い化合物は **Chl-$(HK)_2$H** であると予想し、HeLa 細胞を用いて暗毒性と光毒性の評価を行った。HeLa 細胞に **Chl-$(HK)_2$H** をインキュベートし、中性条件下で光照射を行った場合、細胞死はほとんど観察されず、高い細胞生存率を示すという結果となった。一方で、酸性条件下において光照射を行った場合では、細胞死が確認され、中性条件下に比べて細胞生存率の著しい低下が見られた。このことからも、**Chl-$(HK)_2$H** は酸性条件下においてのみ光毒性を示すことが明らかとなり、ガン選択的な光増感剤として機能することが期待できる。

ペプチド-クロロフィル複合体を用いた酸応答性光増感剤



# 176. がん組織に選択的に機能する光増感剤の創製

松原　翔吾

名古屋工業大学 大学院工学研究科 生命・応用化学系プログラム ソフトマテリアル分野

Key words：光線力学療法，クロロフィル，ペプチド，腫瘍選択性，分子集積

## 緒　言

日本では 2〜3 人に一人はガンになる時代となっており、死因の約 1／4 もの割合を占めている。このような背景もあり、ガンの治療法は数多く研究されており、古くから利用されている手術療法・化学療法・放射線療法に加え、免疫療法や光線力学療法（PDT：Photodynamic therapy）などの新しい治療法も発展してきている。中でも、PDT は抗腫瘍効果が高い、毒性（副作用）が少ない、非侵襲的であるといった理由から、近年特に注目されているガン治療法の 1 つである。PDT は光増感剤と呼ばれる化学物質を生体内に取り込み、患部に対してレーザー光を照射する治療法である。PDT のメカニズムは以下の通りである（図 1）。まず、生体内に取り込まれた光増感剤が患部に蓄積し、そこへ光照射を行うことによって光増感剤が励起され、一重項励起状態になる。その後、一定の確率で項間交差が生じ、スピン反転することによる励起三重項状態が生まれることがある。この三重項状態の光増感剤から酸素分子（基底三重項酸素）へのエネルギー移動により励起一重項酸素を主とした活性酸素（ROS：reactive oxygen species）が発生し、この ROS が腫瘍組織にダメージを与えることで、ガンを死滅させる。

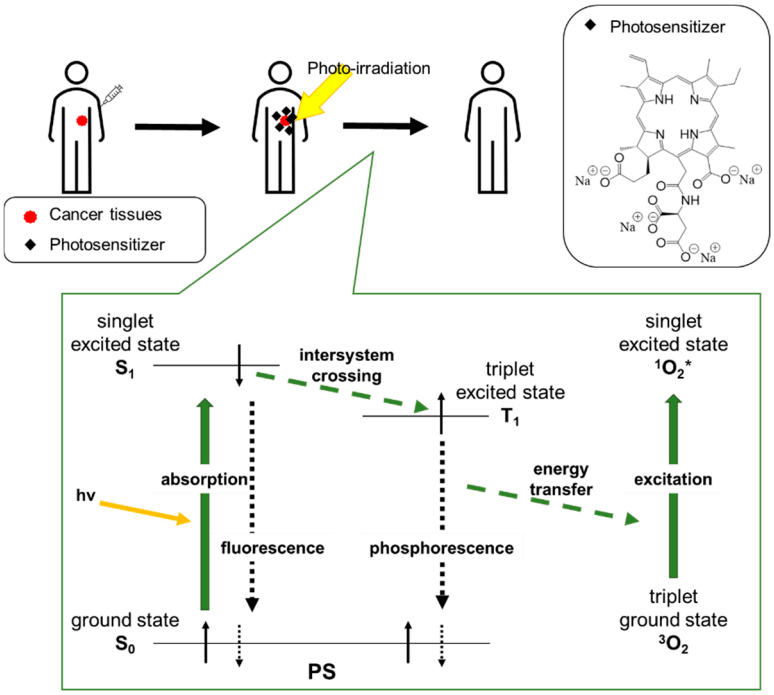



図 1. PDT の概要図と増感剤（フォトフィリン）の化学構造
光増感剤に光照射した際の光励起から活性酸素が生成されるまでの光化学過程を示している。

しかし、PDT にもデメリットは存在し、それは光過敏症のリスクがあることである。これは、光増感剤が体内に一定期間たまるため、太陽光などの強い光を浴びることで正常組織内に存在している光増感剤が活性酸素を発生し、傷付けてしまうからである。そのため、光増感剤が体外に排出されるまで、日常生活が制限されることや遮光環境下で生活する必要が生まれる。光増感剤の機能は表裏一体であり、ガンに対して高い毒性を示す光増感剤は、正常組織に対しても高い毒性を示してしまう。したがって、ガン選択的に機能する光増感剤の開発が患者の QOL（Quality of life）向上のためには必要不可欠である。

ここでは、ガン選択性を持たせるためのトリガーとして「腫瘍血管の欠陥」と「腫瘍組織の pH 特性」に着目した。腫瘍組織周辺の血管内皮細胞には欠陥が多く存在しており、数百 nm 程度の隙間が生成している。そのため、10～200 nm 程度のナノ粒子は正常組織に蓄積することなく、腫瘍組織選択的に蓄積する（EPR 効果と呼ばれる）[1]。また、腫瘍組織は代謝異常によって弱酸性環境下（pH 5～6.5）になっていることが多い [2]。そこで、この 2 つの特性を活用し、正常組織においては毒性を示さず、腫瘍組織でのみ高い光毒性を示す新規光増感剤の開発を目指し、酸応答性ペプチド-クロロフィル複合体の合成とその物性測定を行った。

## 方　法

### 1. ペプチド-クロロフィル複合体の設計と合成

本研究では、ヒスチジン（His、H）とリジン（Lys、K）を含むペプチドとクロロフィルを複合させた化合物を光増感剤として設計した (図 2)。クロロフィルおよびその誘導体は光増感剤としての機能を有している一方で、凝集すると自己消光によって光毒性が著しく低下するという性質を持っている。そのため、クロロフィル誘導体の凝集・解離を制御することが可能となれば、光増感剤としての光毒性の制御（OFF・ON）が可能となる。また、凝集体を形成することで 10～200 nm 程度のナノ粒子を形成することが可能であれば、EPR 効果による腫瘍組織選択的な蓄積も可能となる。凝集・解離を制御するトリガーとしては、酸応答性ペプチドを用いた。ヒスチジンは酸解離定数（pKa）が 6.04 であるため、中性条件下（pH7.4、正常組織）ではイミダゾリル基が疎水基として機能し、水溶液中においては疎水性相互作用による凝集性が高くなる。一方、弱酸性条件下（pH 5.8、腫瘍組織）ではイミダゾリル基がプロトネーションすることで静電反発が起こり、水溶性が向上する。そのため、pH による凝集性の制御のために導入した。リジンは pKa が 10.54 であり、pH7.4、5.8 の両方の条件下でアミノ基がプロトネーションした状態をとり、高い親水性を示す。そのため、巨大な凝集体の生成を抑え、水への分散性を高めるための役割をとして導入した。

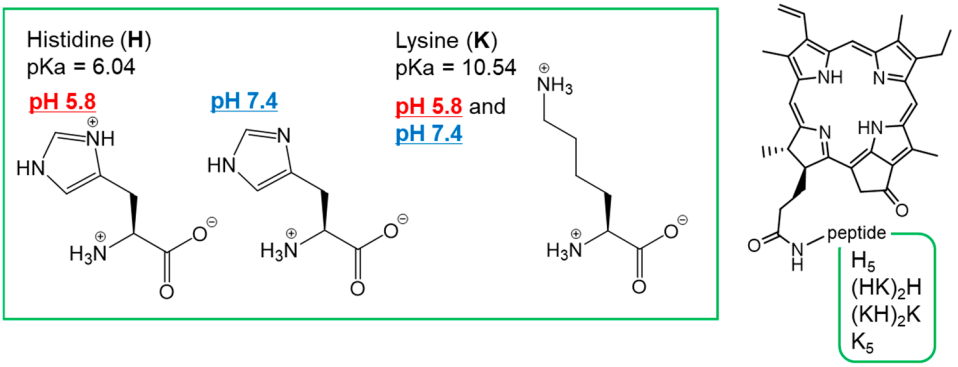



図 2. ペプチド-クロロフィル複合体（右）およびペプチドを構成するアミノ酸（左）の化学構造
pH5.8 と 7.4 条件下におけるヒスチジンとリシンの化学構造（電荷状態）を示している。

クロロフィル部位としては、天然のクロロフィル *a* 由来の pyropheophorbide-*a* を用いた。シアノバクテリアから天然のクロロフィル *a* を抽出し、それらを化学修飾することによってカルボン酸を有する pyropheophorbide-*a* を合成した。ペプチド部位に関しては、固相合成法を用いて合成し、目的のシークエンスに

なるようにアミノ酸を結合させた後に、N 末端を pyropheophorbide-*a* でキャッピングし、固相合成樹脂から切り離すことによって、ペプチド-クロロフィル複合体を合成した。

### 2. ペプチド-クロロフィル複合体の自己集積体の調製

ペプチド-クロロフィル複合体を少量のエタノールに溶解させ、そこへリン酸緩衝液（PSB）を加えることによって、自己集積体の PBS 分散液を調製し、このサンプルを用いて各種物性測定を行った。

### 3. ペプチド-クロロフィル複合体の物性測定

ペプチド-クロロフィル複合体の集積体に関しては、エラスチックカーボン銅グリッドを使用し、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて観察を行った。光増感剤への光照射による活性酸素量の評価は、活性酸素蛍光プローブ（SOSG：Singlet oxygen sensor green）を用いた蛍光スペクトル測定によって評価を行った。細胞毒性試験には、HeLa 細胞を用い、pH の異なる培地を使用することによって、pH 変化に応じたペプチド-クロロフィル複合体の光毒性および暗毒性の評価を行った。

## 結果および考察

### 1. ペプチド-クロロフィル複合体の集積体の評価

pH7.4 の中性条件下で調製した各ペプチド-クロロフィル複合体の集積体の TEM 観察から、**Chl-(HK)$_2$H**、**Chl-(KH)$_2$K**、**Chl-H$_5$** の集積体は粒子形状であることが明らかとなった。一方で、**Chl-K$_5$** の集積体からは粒子状のナノ構造体は観察されず、不定形の構造体が観測された（図 3）。中でも、**Chl-(HK)$_2$H** の集積体に関しては、平均粒子径 73 nm であり、EPR 効果による腫瘍選択的な蓄積が期待できるサイズであった。また、pH5.8 の弱酸性条件下で調製した各ペプチド-クロロフィル複合体の集積体の TEM 観察からは、平均粒子径の増大または粒子構造の崩壊がみられた。これは、ヒスチジン残基のプロトネーションに伴う静電反発が増大することによって、凝集体構造が膨張したことが原因であると予想される。

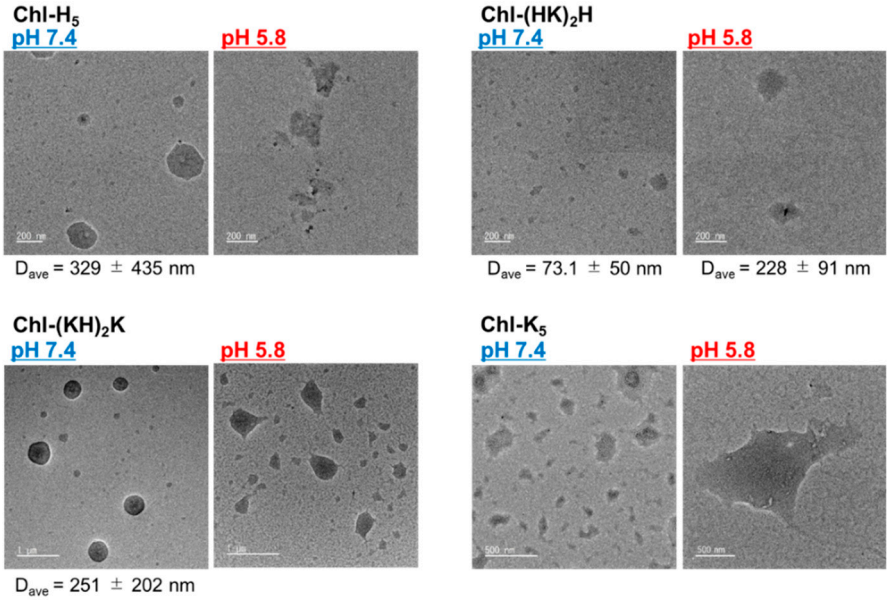



図 3. 各ペプチド-クロロフィル複合体の集積体 TEM 画像
pH7.4（各画像の左）および pH5.8（各画像の右）の PBS で調製したペプチド-クロロフィルの集積体を示し、各画像の下に平均粒子径を記載している。ただし、粒子形状でないものに関しては、記載していない。

## 2. pH 応答性光増感剤としての評価

ペプチド-クロロフィル複合体を光増感剤として用いた際の活性酸素量評価は SOSG を用いて行った。増感剤への光照射によって系内に活性酸素が生じた場合、無蛍光性の SOSG と化学反応を起こし、蛍光発光を示す構造へと変化する。そのため、蛍光性 SOSG に由来する 530 nm の発光増大は活性酸素の発生を意味している。pH5.4 と 7.4 の PBS 中で測定した蛍光発光スペクトルより、光照射に伴う蛍光発光増大量（活性酸素生成量）は中性条件下よりも酸性条件下の方が大きいことが明らかとなった（図 4）。中でも、**Chl-(HK)$_2$H**、**Chl-(KH)$_2$K**、**Chl-H$_5$**の集積体に関しては、光照射に伴う蛍光発光増大はほとんど観察されず、光毒性をほとんど示さないことが予想された。**Chl-K$_5$**の集積体は酸性条件下における蛍光発光増大量が多い一方で、中性条件下においても蛍光発光の増大がみられた。これらの結果より、**Chl-(HK)$_2$H**、**Chl-(KH)$_2$K**、**Chl-H$_5$**は酸応答性の光増感剤として機能することが期待される。

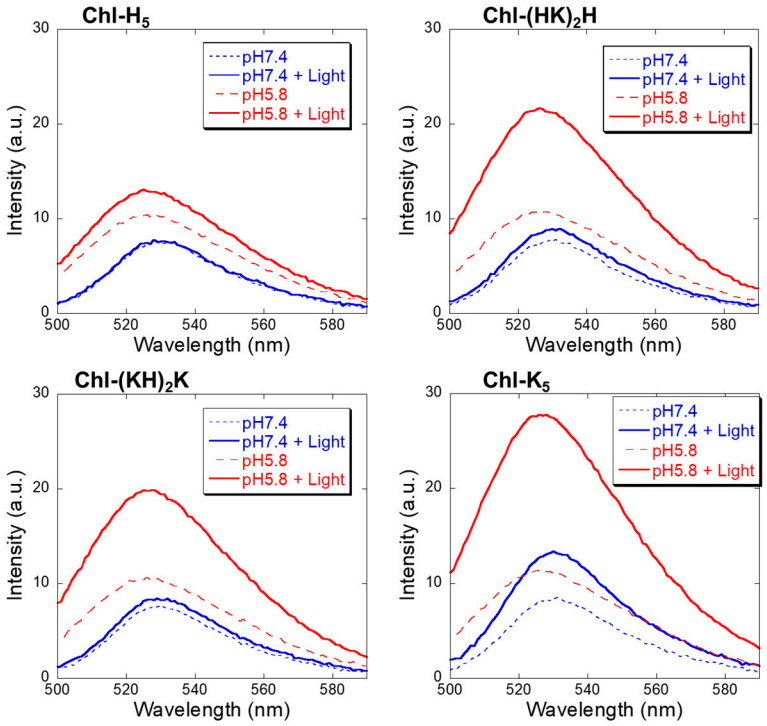



図 4.　各ペプチド-クロロフィル複合体への光照射を行った際の活性酸素量評価
各ペプチド-クロロフィル複合体と SOSG を混合した溶液に光照射を行った際の蛍光発光スペクトルを示しており、発光量の増大は活性酸素の発生を示している（点線：光照射前のスペクトル→実線：光照射後のスペクトル）。

上記の実験結果より、**Chl-(HK)$_2$H** は酸応答性の光増感剤として機能することに加え、EPR 効果による腫瘍選択的な蓄積も期待できる。そこで、HeLa 細胞を用いて **Chl-(HK)$_2$H** の暗毒性（化合物そのものの毒性）および光毒性の評価を行った。0、0.1、1 μM の **Chl-(HK)$_2$H** を HeLa 細胞に添加し、0～60 分間インキュベートしたところ、サンプル濃度に関わらず細胞生存率は 95%以上であり、**Chl-(HK)$_2$H** の暗毒性は低いことが示された（図 5 左）。**Chl-(HK)$_2$H** をインキュベーションした後に 10～30 分間の光照射を行った後の細胞生存率に関して、サンプル濃度が 0.1 μM の場合では 30 分の光照射を行った場合でも細胞生存率が 90%以上であり、サンプル濃度が 1 μM の高濃度条件においては、光を 30 分間照射したところ多くの細胞死が確認された（図 5 右）。

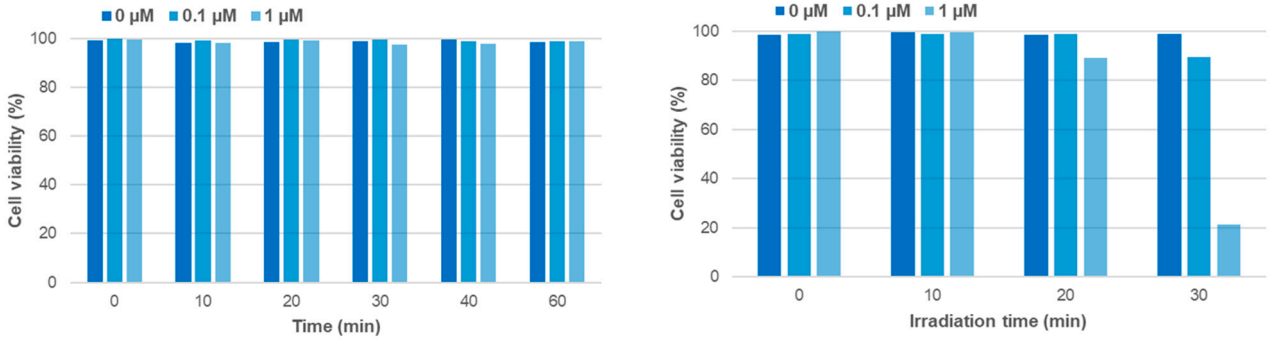



図 5. 中性条件下における HeLa 細胞を用いた **Chl-(HK)$_2$H** の細胞毒性
各濃度での Chl-(HK) 2 H を添加した際の HeLa 細胞の生存率を示しており、左図は光照射を行っていない場合で、右図は 10～30 分間光照射（λ＝420 nm）を行った場合の細部生存率を示している。

酸性条件下にて同様の細胞毒性試験を行ったところ、pH5.8 の場合においても暗毒性は確認されず、光照射を行わなかった場合においては 95%以上の細胞生存率を示した（図 6 左）。一方で、光照射を行った場合では、光照射 20 分から細胞死が確認された。中性条件下でサンプル濃度が 0.1 μM の **Chl-(HK)$_2$H** に光照射を行った時には、細胞生存率は 90%以上であったが、酸性条件下では同濃度で光照射を 30 分行った場合は細胞生存率が 40%にまで減少し、pH の変化によって光毒性に大きな差が見られた（図 6 右）。つまり、**Chl-(HK)$_2$H** は中性条件下においては光毒性が低く、酸性条件下では光毒性を示す酸応答性の光増感剤として機能することが示された。

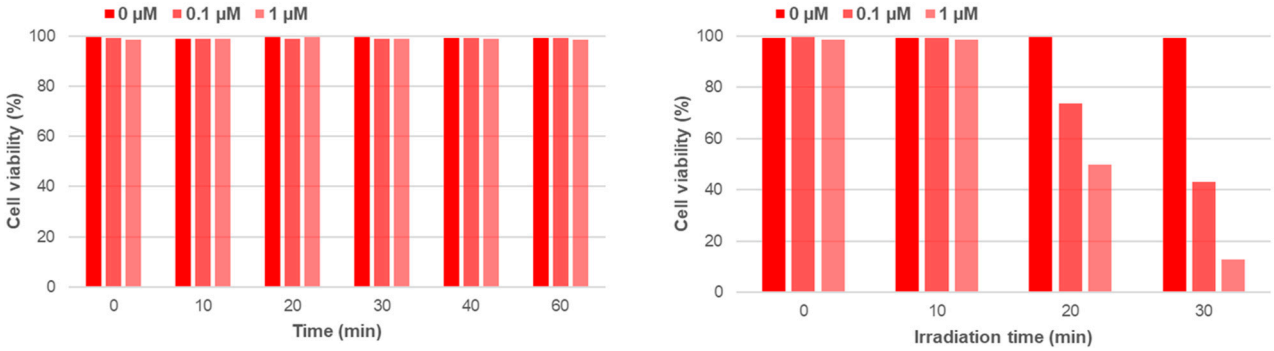



図 6. 酸性条件下における HeLa 細胞を用いた **Chl-(HK)$_2$H** の細胞毒性
各濃度での **Chl-(HK)$_2$H** を添加した際の HeLa 細胞の生存率を示しており、左図は光照射を行っていない場合で、右図は 10～30 分間光照射（λ＝420 nm）を行った場合の細部生存率を示している。

## 文　献


1） Matsumura Y, Maeda H, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. 1986 Dec 46;12(1):6387-92 [PMID: 2946403].

2） Tannock I F, Rotin D, Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. Cancer Res. 1989 Aug 15;49(16):4373-84 [PMID: 2545340].