

酸素に依存しない光線力学的療法用光増感剤の開発

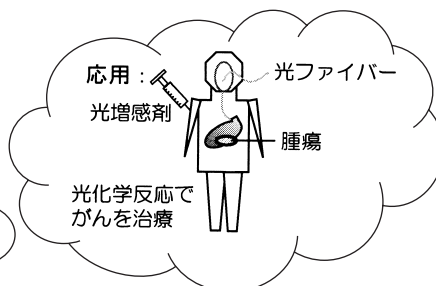
静岡大学工学部共通講座 (化学)

平川 和貴

tkhirak@ipc.shizuoka.ac.jp

課題

光線力学的療法は、非常に侵襲の少ないがん治療法である。投与された薬と光が、がん細胞内の酸素を武器(活性酸素)に変えて戦うが、がん細胞内には酸素が少ない! 酸素に頼らない武器の開発は可能か?



1. はじめに

がんの光線力学的療法 (Photodynamic therapy : PDT) は、非常に侵襲性が低く、臓器機能の温存が可能な先端の治療法である。体力等の問題で安全に麻酔がかけられない等、手術が困難な場合や臓器温存が必要な場合には、重要な治療法となる。PDTの手順の概略は、次の通りである。まず、可視光線を吸収して作用する薬剤 (光増感剤) を静脈注射などで投与する。光増感剤には、ポルフィリン類が用いられている。数時間後に光増感剤が特定の臓器に集積し、正常組織に比べて、腫瘍内の光増感剤濃度が高くなった状態となる。その時間帯に光ファイバーを使用し、腫瘍にピンポイントでレーザー光を照射する。励起状態となった光増感剤が引き起こす光化学反応により、がん細胞にダメージを与える。現在、臨床で行われている治療では、励起状態の光増感剤から細胞内の酸素へのエネルギー移動で発生する活性酸素 (一重項酸素、 $^1\text{O}_2$) が、がん細胞内のタンパク質などの生体分子を酸化損傷し、その結果、細胞の壊死または細胞自殺が引き起こされる。しかし、がん細胞内の酸素濃度は、正常細胞に比べて低い。PDTの重要な課題である治療効果向上のためには、低酸素濃度で生体分子損傷の活性を維持することが必要であると考えられている。一般的な生体分子の光酸化損傷には、 $^1\text{O}_2$ に依存しない電子移動反応 (生体分子からの電子引き抜き) による機構も知られている。しかし、PDTでは、人体組織をよく透過する赤色光の利用が重要であり、赤色光では、 $^1\text{O}_2$ 以外のメカニズムはエネルギー的に困難と考えられている。生体分子からの電子引き抜きには、励起状態の光増感剤に強い酸化力が必要で、紫外線~青色光のエネルギーを要する場合が多いためである。そこで、本研究では、赤色光を吸収する光増感剤の中でも光励起状態の酸化力が高いポルフィリンP(V) 錯体に着目し、タンパク質の光損傷作用を検討した。

2. ポルフィリンP(V)錯体の光化学的および電気化学的物性

ポルフィリンP(V)錯体は、既報に従い、テトラフェニルポルフィリンへのリンの導入で合成した。はじめに合成したP(V)テトラフェニルポルフィリンジクロロ体のエチレングリコールによる処理で、ジエチレングリコキシP(V)テトラフェニルポルフィリン (DEP(V)TPP) を得た。図1にDEP(V)TPPの化学構造を示す。DEP(V)TPPの吸収および蛍光スペクトルを図2に示す。550~600 nm付近に第一励起状態 (S_1) への電子遷移に対応するQ帯が観測され、420 nm付近には第二励起状態 (S_2) への遷移によるSoret帯が見られる。蛍光スペクトルでは、600~700 nm付近に第一励起状態から基底状

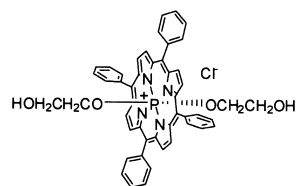


図1 DEP(V)TPPの化学構造

態への遷移によるS₁蛍光が観測された。ポルフィリンは、第二励起状態から基底状態への直接的な遷移による蛍光 (S₂蛍光) を発することが知られているが、440 nm 付近にDEP(V)TPPのS₂蛍光が観測された。DEP(V)TPPの基底状態での還元電位 (E_{red}) は、飽和カロメル電極 (saturated calomel electrode; SCE) に対して測定したとき、約-0.5 Vであり、励起状態における還元電位 (Red*) を次の式で見積もることができる。

$$Red^* = E_{red} + E^* \quad (1)$$

ここで、E*は、DEP(V)TPPの励起状態 (S₁またはS₂) のエネルギーであり、一電子励起するために必要な電位差とその値が等しくなる。その値は、蛍光極大波長から計算でき、DEP(V)TPPのS₁およびS₂では、それぞれ、2.0 Vおよび2.8 Vである。従って、式 (1) を用い、Red*は、S₁およびS₂において、それぞれ、+1.5 Vおよび+2.3 Vと計算された。一方、アミノ酸の一電子酸化における酸化還元電位は、周囲の環境によって影響されるが、比較的酸化されやすいトリプトファンとチロシンで、それぞれ、+1.0 Vおよび+1.6 V程度である。DEP(V)TPP励起状態において、電子移動反応でタンパク質のトリプトファン残基であれば十分酸化可能であることが示された。S₂励起状態からは、チロシンをはじめ、さらに酸化されにくいアミノ酸の酸化もエネルギー的に可能である。また、DEP(V)TPPの光増感反応による¹O₂生成を近赤外線スペクトルの測定で検討した。¹O₂は、1270 nm付近に極大をもつ近赤外線を放出するが、その強度から、DEP(V)TPPが吸収した光子1つあたり、¹O₂が0.41個発生 (エタノール中) すると見積もられた。以上から、DEP(V)TPPは、光励起状態において電子移動反応と¹O₂生成の2通りの機構で生体分子損傷を引き起こせる可能性が示された。

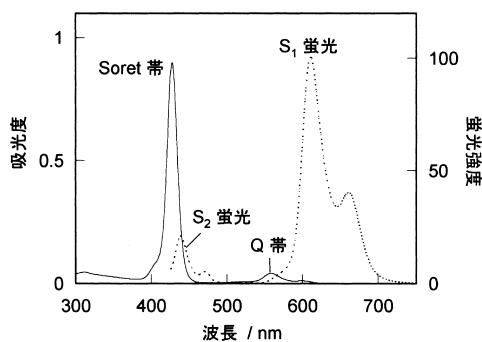


図2 DEP(V)TPPの吸収および蛍光スペクトル

3. ポルフィリンP(V)錯体と水溶性タンパク質ヒト血清アルブミンとの相互作用

光増感反応のターゲットとなる生体分子として水溶性タンパク質のヒト血清アルブミン (HSA) を用いた。図3にHSAとの相互作用によるDEP(V)TPPの吸収スペクトル変化を示す。HSAを添加するとDEP(V)TPPの吸収スペクトルの長波長シフトと濃色効果が観測された。図3に示しているDEP(V)TPPの吸収帯の領域には、HSAの吸収がないため、HSAとの相互作用により生じたDEP(V)TPPの吸収スペクトル変化である。HSAには、有機分子を結合できる部分があくつか存在するが、吸光度の変化から、HSA1つ当たり、DEP(V)TPPが2分子結合できることが示された。そのとき結合定数は、 $4.0 \times 10^5 M^{-1}$ (25°C) であり、比較的強く結合していることが示唆された。結合定数は、温度上昇とともに小さくなったことから、HSAへの結合により、DEP(V)TPPのエネルギー的な安定化が明らかとなった。また、円偏光二色性スペクトルの測定で正のピークが観測された。正のピークは、左円偏光に対する吸光度が右円偏光に対する吸光度よりも大きいことを示しており、物質にキラリティーがある場合の指標となる。この結果は、DEP(V)TPPがHSAの特定のサイトに結合することでキラリティーが生じたことを示している。観測された正のピークは、さほど大きくないことから、大部分のDEP(V)TPPはランダムにHSAに結合していることが考えられる。

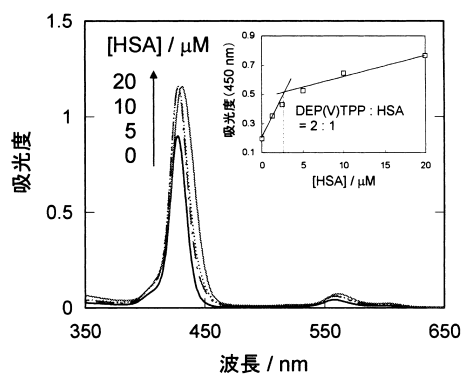


図3 HSAとの相互作用によるDEP(V)TPPの吸収スペクトル変化

4. ポルフィリンP(V)錯体によるヒト血清アルブミンの光酸化

HSAの吸収および蛍光スペクトルを図4に示す。280 nm付近の吸収帯は、トリプトファン、チロシン残基に由来する。波長298 nmの励起では、トリプトファン残基を選択的に励起できる。298 nm励起で観測される波長350 nm付近の蛍光は、トリプトファン残基に由来する。トリプトファンは、アミノ酸残基の中でも特に酸化されやすく、光増感反応によるタンパク質酸化分解のターゲットとして利用できる。この波長350 nm付近の蛍光強度からトリプトワンの光損傷（酸化分解）を評価した。2.5 %エタノールを含むリン酸緩衝液（pH 7.6）にDEP(V)TPPとHSAを混合し、DEP(V)TPPの光増感反応を行ったところ光照射時間に依存し、HSAのトリプトファン残基に由来する蛍光強度が減少し、トリプトワンの酸化分解が示された。また、フリーのトリプトファンとDEP(V)TPPを同様の溶液中で混合し、光照射を行った場合にもトリプトワンの蛍光強度の減少が観測され、確かに、光増感反応でトリプトファンが酸化分解されることが示された。

トリプトファン残基の酸化分解機構を溶媒効果と $^1\text{O}_2$ 消去剤の効果から検討した。 $^1\text{O}_2$ の寿命が延長する重水中で、顕著な酸化促進効果は認められなかった。 $^1\text{O}_2$ 生成以外に主要なメカニズムがある場合には、重水の効果が見られない場合もある。一方、 $^1\text{O}_2$ 消去剤のアジ化ナトリウム添加により、HSAの蛍光強度の減少がある程度抑制された（図5）。アジ化ナトリウムは、 $^1\text{O}_2$ に対する強力な物理消去剤であり、 $^1\text{O}_2$ をすみやかに基底状態の $^3\text{O}_2$ へ失活させる。このことから、HSAの酸化分解に $^1\text{O}_2$ の関与が示唆された。しかし、比較的少量にアジ化ナトリウムを使用した場合にもその抑制効果は部分的であった。この結果は、 $^1\text{O}_2$ 以外の機構も酸化分解に関与していることを示している。

また、5 μM HSAにより5 μM DEP(V)TPPの S_2 蛍光の強度が38%減少したが、HSAから励起状態DEP(V)TPPへの電子移動による消光で説明できる。 S_2 蛍光は、寿命数ピコ秒程度で起こる高速の過程であり、 S_2 蛍光の消光には、DEP(V)TPPとHSAとの強い相互作用が必要である。この結果は、電子移動機構もHSAの光酸化に関与していることを支持している。

5. おわりに

ポルフィリンP(V)錯体的一种であるDEP(V)TPPは、図6に示すように光増感反応による $^1\text{O}_2$ 生成の他、酸素に依存しない電子移動反応の2つの機構でタンパク質を光損傷できることが示された。このことから、酸素濃度の低いがん細胞内でも、ポルフィリンP(V)錯体を光増感剤に用いると活性を維持できる可能性が考えられる。

謝辞

本研究は、財団法人浜松科学技術研究振興会村田基金研究助成金の採択を受けて行われました。ここに謝意を表します。

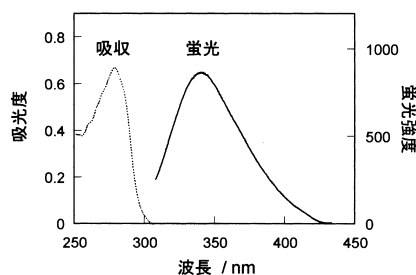


図4 HSAの吸収、蛍光スペクトル

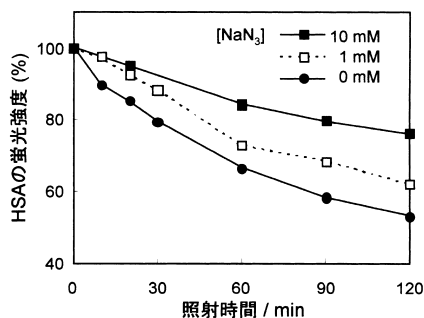


図5 光酸化によるHSAの蛍光強度減少と $^1\text{O}_2$ 消去剤の効果

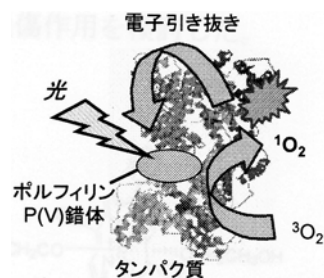


図6 ポルフィリンP(V)錯体の光増感反応によるタンパク質損傷機構