

(論文要約)

がんのオーজে治療および光線力学療法併用の
可能にする二機能性薬剤の開発に関する研究

2023

尾上 遼太郎

第 1 章

オージェ治療を目的とした

放射性ヨウ素標識 BODIPY 結合ヘキストの開発

背景

^{125}I , ^{111}In , ^{67}Ga , および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等の放射性核種から放出されるオージェ電子は、約 25 keV 程度の低エネルギーの電子であるが、飛程がナノメートルオーダー (< 500 nm) と短いことから、 β 線より高い線エネルギー付与を示す¹。また、 α 線と同様に DNA 分子を電離・励起し、DNA 二重鎖切断の発生および細胞死の誘導を引き起こすため、核医学治療に応用することができる²⁻⁵。オージェ電子は飛程が短く、治療効果を得るためにはオージェ電子放出核種を核 DNA の近傍に集積させる必要がある一方で⁶、 α 線や β 線と比較して非標的組織以外への被ばくを抑えることが可能であり、従来の放射線治療で問題となる副作用を軽減することができる。現在までにオージェ電子を利用した核医学治療(オージェ治療)用の薬剤として、5-[^{125}I]Iodo-2'-deoxyuridine^{7,8}をはじめとする核酸誘導體や、[^{111}In]In-DOTATOC-NLS⁹ および [^{111}In]In-NLS-Trastuzumab^{10, 11} などの核局在化シグナル(Nuclear localization signal: NLS)を有するペプチドや抗体が開発されている。 α 線または β 線を放出する放射性医薬品については、臨床応用されている薬剤が存在する一方で^{12,13}、オージェ電子を放出する放射性医薬品については、オージェ電子放出核種を核 DNA へ選択的に集積させることが困難であるため、臨床応用されている薬剤はなく、有用なオージェ治療用薬剤の開発が期待されている。

ここで、DNA 標的分子として、生細胞の核染色に用いられる青色蛍光色素のヘキストの 1 つである Hoechst33258¹⁴ に着目した。ヘキストはアデニンやチミンに富む領域である DNA の副溝に結合するため、オージェ電子による DNA 損傷を最大化可能な核局在化タグとして機能することが予想される。これまでに代表的なオージェ電子放出核種である ^{125}I を導入したヘキスト誘導體が開発されており、その DNA 切断能については報告されているが^{6,15}、がん細胞を用いた *in vitro* での研究は限られており、治療効果は不明である。所属分野では以前、放射性ヨウ素標識剤として、N-ヒドロキシスクシンイ

ミド(*N*-Hydroxysuccinimide: NHS)エステルを用いた $^{123/125}\text{I}$ 標識 BODIPY ($^{123/125}\text{I}$ BODIPY-NHS)を報告している¹⁶。この BODIPY 誘導体は一般的に用いられるヨウ素標識剤とは異なり、トリブチルスズ前駆体を用いることなく容易に放射標識することができる。しかし、 ^{123}I BODIPY-NHS で標識した抗体を用いた予備的なイメージング研究を除いて、生物学的研究は行われていない。また、Hoechst33258 と BODIPY を結合させて合成した蛍光色素は、DNA への結合能を損なうことなく、核選択的なイメージングプローブとして使用できることが報告されている¹⁷。本研究では、核への選択的な集積を可能にする新規オージェ治療用薬剤の開発を目的として、Hoechst33258 と ^{125}I BODIPY-NHS を結合させた ^{125}I BODIPY-Hoechst (^{125}I BH)を新たに設計・合成した(Figure 1-1)。オージェ電子は直接的な DNA 損傷だけでなく、水分子の励起によって生じる活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS)による間接的な DNA 損傷によっても細胞死を引き起こすため、DNA を標的としない放射性医薬品であっても治療効果を示す可能性がある⁴。直接的な DNA 損傷が細胞毒性にどのように影響するかを検討するために、対照化合物としてヘキストを含まない ^{125}I BODIPY (^{125}I BD)を設計・合成し、生細胞における核内移行、細胞毒性、および DNA 損傷を評価した。

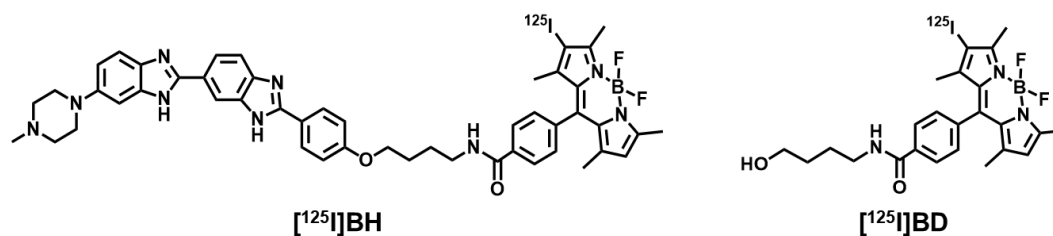


Figure 1-1. Chemical structures of ^{125}I BH and ^{125}I BD

1.1. 実験方法

試薬・機器

試薬は、ナカライテスク株式会社、東京化成工業、富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。中圧分取液体クロマトグラフィー装置には、山善株式会社製自動設定中圧分取液体クロマトグラフシステム(EPCLC-W-Prep 2XY; 送液ポンプ(ミキサー内蔵): No. 580D, 検出器(波長固定型): prep UV-254W, フラクションコレクター: FR-260)を使用し、HI-FLASH COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 μm, カラムサイズ: M/L/2L)および INJECT COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 μm, カラムサイズ: M/L)を装着した。核磁気共鳴分光(Nuclear magnetic resonance: NMR)には、日本電子株式会社製 JEOL JNM-ECS400 を用い、Tetramethylsilane を内部標準物質として測定した。エレクトロスプレーイオン化質量分析(Electrospray ionization mass spectrometry: ESI-MS)には、株式会社島津製作所製 LCMS-2020 EV を用いて測定した。^[125I]NaI はパーキンエルマー社より購入した。高速液体クロマトグラフィー(High performance liquid chromatography: HPLC)には、株式会社島津製作所製 LC-20AD を使用し、検出器として紫外スペクトル検出器 SPD-20A と日立アロカメディカル株式会社製シンチレーションサーベイメーターTCS172 あるいはユニバーサル技研株式会社製 HPLC 用放射線検出器 US-3000T を使用した。逆相 HPLC 用カラムには、ナカライテスク株式会社製 COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 4.6 I.D. × 150 mm を使用した。放射能の測定には、パーキンエルマー社製 Wallac WIZARD2470 および ALOKA 社製キュリーメーター(IGC-7)を用いて測定した。蛍光染色画像は、株式会社キーエンス製 BZ-9000 を用いて観察した。吸光度はバイオラッド社製のマイクロプレートリーダー(iMark™)を用いて測定した。有意差検定には、GraphPad Software 社製の GraphPad Prism version 6 ソフトウェアを使用した。

BODIPY-Hoechst 誘導体の合成

4-(6-(4-Methylpiperazin-1-yl)-1*H*,3'*H*-[2,5'-bibenzo[*d*]imidazol]-2'-yl)phenol (Hoechst33258)¹⁸, 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-(5,5-difluoro-2-iodo-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)benzoate (I-BODIPY-NHS)¹⁶, および 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)benzoate (BODIPY-NHS)¹⁹ は既報のスキームに従い合成した。

tert-Butyl (4-(4-(6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1*H*,3*H'*-[2,5'-bibenzo[*d*]imidazole)-2'-yl)phenoxy)butyl)carbamate (1, Boc-aminobutyl-Hoechst)

Hoechst33258 (48.8 mg, 115 μmol)および炭酸カリウム(43.5 mg, 315 μmol)を *N,N*-ジメチルホルムアミド (*N,N*-Dimethylformamide: DMF) (1 mL)に溶解し, *tert*-Butyl (4-bromobutyl)carbamate (86.2 mg, 342 μmol)を添加して 60 °C で一晩攪拌した. クロロホルム(15 mL \times 3)で分液抽出し, 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール = 4:1)で精製し, 化合物 **1** を収量 12.6 mg (18.4%)で得た. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.31-8.22 (m, 1H), 8.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.97-7.89 (m, 1H), 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.21-7.12 (m, 1H), 7.07 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.04-7.00 (m, 1H), 4.08-4.05 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.30-3.26 (m, 4H), 3.14-3.10 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.86-2.71 (m, 4H), 2.46 (s, 3H), 1.84-1.80 (m, 2H), 1.68-1.64 (m, 2H), 1.44 (s, 9H). HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_3^+$, 596.3344 $[\text{M} + \text{H}]^+$: found 596.3340.

4-(5,5-Difluoro-2-iodo-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)-*N*-(4-(4-(6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1*H*,3'*H*-[2,5'-bibenzo[*d*]imidazol]-2'-yl)phenoxy)butyl)benzamide (2, BH)

化合物 **1** (12.6 mg, 21.2 μmol)をジクロロメタン(1.5 mL)に溶解し, トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid: TFA) (1 mL)を添加して, 室温で1時間攪拌した. 反応溶媒を減圧留去した後, 残渣を DMF (1.5 mL)に溶解し, I-BODIPY-NHS (12.5 mg, 21.1 μmol)および *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (*N,N*-Diisopropylethylamine: DIPEA) (31 μL , 178 μmol)を加えて, 室温で7時間攪拌した. クロロホルム(15 mL \times 3)で分液抽出し, 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール = 4:1)で精製し, 化合物 **2** を収量 4.3 mg (20.9%)で得た. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.36-8.28 (m, 1H), 8.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.01-7.96 (m, 1H), 7.89 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.37-7.34 (m, 1H), 7.32-7.29 (m, 1H), 7.18 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.11 (s, 1H), 4.26-4.20 (m, 2H), 3.55-3.49 (m, 2H), 3.29-3.28 (m, 4H), 3.24-3.18 (m, 4H), 3.02 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 1.98-1.87 (m, 4H), 1.36 (s, 3H), 1.33 (s, 3H). HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{50}\text{BF}_2\text{IN}_9\text{O}_2^+$, 972.3118 $[\text{M} + \text{H}]^+$: found 972.3110.

4-(5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)-*N*-(4-(4-(6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1*H*,3'*H*)-[2,5'-bibenzo[*d*]imidazol]-2'-yl)phenoxy)butyl)benzamide (3, BH 標識前駆体)

化合物 **1** (26.6 mg, 44.7 μmol) をジクロロメタン(2 mL) に溶解し、TFA (1.5 mL) を添加して、室温で 1 時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去した後、残渣を DMF (2 mL) に溶解し、BODIPY-NHS (20 mg, 43 μmol) および DIPEA (63 μL, 362 μmol) を加えて、50 °C で 6 時間攪拌した。クロロホルム(15 mL × 3) で分液抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール = 4:1) で精製し、化合物 **3** を収量 7.6 mg (20.9%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.30-8.25 (m, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.99-7.96 (m, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.72-7.65 (m, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.19-7.15 (m, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 4.22-4.14 (m, 2H), 3.57-3.47 (m, 2H), 3.29-3.23 (m, 4H), 2.84-2.73 (m, 4H), 2.45 (s, 3H), 2.44 (s, 6H), 1.98-1.84 (m, 4H), 1.35 (s, 6H). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₄₉H₅₁BF₂N₉O₂⁺, 846.4221 [M + H]⁺: found 846.4229.

4-(5,5-Difluoro-2-iodo-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)-*N*-(4-hydroxybutyl)benzamide (4, BD)

I-BODIPY-NHS (38.7 mg, 65.4 μmol) をジクロロメタン(10 mL) に溶解し、4-Aminobutanol (6.1 μL, 65.7 μmol) および DIPEA (93.5 μL, 537 μmol) を添加し、室温で一晩攪拌した。クロロホルム(20 mL × 3) で分液抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン = 5:1) で精製し、化合物 **4** を収量 33 mg (89.2%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.65 (br s, 1H), 5.98 (s, 1H), 3.70 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.49 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 1.88-1.62 (m, 4H), 1.30 (s, 3H), 1.29 (s, 3H). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₄H₂₈BF₂IN₃O₂⁺, 566.1282 [M + H]⁺: found 566.1280.

4-(5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)-*N*-(4-hydroxybutyl)benzamide (5, BD 標識前駆体)

BODIPY-NHS (115.4 mg, 248 μmol)をジクロロメタン(10 mL)に溶解し、4-Aminobutanol (23 μL , 248 μmol)および DIPEA (353 μL , 2027 μmol)を添加し、室温で一晩攪拌した。クロロホルム(20 mL \times 3)で分液抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン = 5:1)で精製し、化合物 **5** を収量 89.6 mg (82.3%)で得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.54 (br s, 1H), 5.92 (s, 2H), 3.70 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.49 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 2.49 (s, 6H), 1.77-1.62 (m, 4H), 1.29 (s, 6H). HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2^+$, 440.2315 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: found 440.2317.

^{125}I]BH および ^{125}I]BD の合成

対応する前駆体を含む 1%酢酸含有メタノール溶液(1 mg/mL, 25 μL), *N*-Chlorosuccinimide のメタノール溶液(0.5 mg/mL, 20 μL), および ^{125}I]NaI 溶液(1.85–7.4 MBq, 比放射能 629 GBq/mg)を加えて、室温で 30 分攪拌した。反応溶液に 50 μL の超純水, 100 μL の飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液, 200 μL の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を順次添加し、酢酸エチル(400 μL \times 3)で分液抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、窒素ガスで溶媒を除去した。残渣を逆相 HPLC (0.1% TFA 含有 MeCN/ H_2O)を用いて精製し、目的とする ^{125}I 標識体を含む画分を窒素ガスで乾固した。放射性ヨウ素標識化合物の同定は、Cosmosil 5C₁₈-AR-IIカラムを使用し、1 mL/min の流速下、対応する非標識体との共溶出によって確認した。

細胞培養

ヒト子宮頸がん細胞株の HeLa 細胞(JCRB, 日本)を、1%非必須アミノ酸, 10%ウシ胎児血清, および 1%ペニシリン-ストレプトマイシン抗生物質溶液を添加した Eagle's Minimum Essential Media 中で、37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 加湿雰囲気下で培養した。

核取り込み評価

HeLa 細胞を 1 ウェルあたり 1.0×10^6 個の密度で 6 ウェルプレートに播種し、一晩接着させた。HeLa 細胞に 18.5 kBq の ^{125}I]BH または ^{125}I]BD を含むアッセイ培地(25 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸および 0.2%ウシ血清アルブミンを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM))を 2 mL 添加して 37 $^\circ\text{C}$ で 2–6 時間インキュベートした。その後、セルスクレーパーで細胞を剥がして 2 mL チューブに

回収し、2100 g, 4 °C で 3 分間遠心分離した。上清を回収し、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) を 2 mL 加えて同様の条件で再度遠心分離した。上清を回収した後、沈殿物の放射エネルギーを測定した(細胞画分)。沈殿物に 2 mL の細胞溶解バッファー(10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 1.5 mM 塩化マグネシウム, 140 mM 塩化ナトリウム, および 0.1% IGEPAL® CA-630)を加えて懸濁させ、10 分間氷上でインキュベートした。細胞溶解液を、1300 g, 4 °C で 2 分間遠心分離し、上清を回収した後、沈殿物の放射エネルギーを測定した(核画分)。有意差検定は、two-way ANOVA による分散分析および Sidak 法による多重比較により行った。

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)アッセイ

HeLa 細胞を 1 ウェルあたり 1.0×10^4 個の密度で 96 ウェルプレートに播種し、一晚接着させた。HeLa 細胞に 0–37 kBq の $[^{125}\text{I}]\text{BH}$ または $[^{125}\text{I}]\text{BD}$, 0–2280 nM の非標識 BH または BD を含むアッセイ培地(0.5%エタノールを含む DMEM 培地)を 100 μL 添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした。続いて MTT 溶液を各ウェルに加えて、さらに 4 時間インキュベートした。MTT を含む培地を回収し、PBS で洗浄後 0.04 M 塩酸を含むイソプロパノールで MTT ホルマザン完全に溶解させ、マイクロプレートリーダーで 570 nm の吸光度を測定した。有意差検定は、two-way ANOVA による分散分析および Sidak 法による多重比較により行った。

γ -H2AX アッセイ

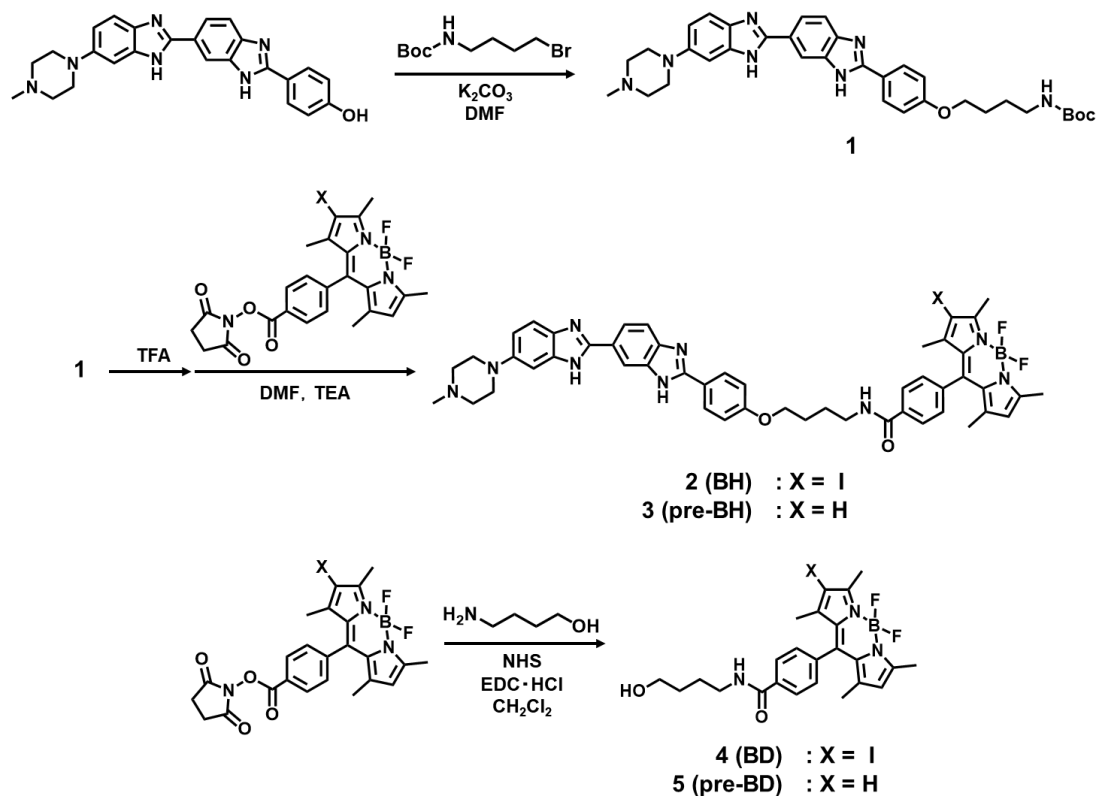
HeLa 細胞を 1 ウェルあたり 1.0×10^4 個の密度で 16 ウェルチェンバースライドに播種し、一晚接着させた。HeLa 細胞に 0–37 kBq の $[^{125}\text{I}]\text{BH}$ または $[^{125}\text{I}]\text{BD}$ を含むアッセイ培地(0.5%エタノールを含む DMEM 培地)を 100 μL 添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした。PBS で細胞を洗浄し、4%ホルムアルデヒドを加え 5 分間静置して細胞を固定した。PBS で細胞を洗浄し、1% Triton™ X-100 を含む PBS 溶液を加え 10 分静置して膜透過処理した。PBS で細胞を洗浄し、抗 γ -H2AX の一次抗体を含む溶液を加え 1 時間インキュベートした。PBS で細胞を洗浄し、フルオレセインイソチオシアネートで標識された二次抗体を含む溶液を加え 1 時間インキュベートした。PBS で細胞を洗浄し、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)溶液を加え 15 分インキュベートした。蛍光顕微鏡で細胞を観察し、およそ 200 個の核を捉えた画像を撮影した。 γ -H2AX 病巣は BZ-II 解析アプリケーションで分析し、核の単位面積あたりの病巣の蛍光輝度(病巣にお

ける蛍光の平均輝度 × 病巣面積を, 核面積で割った値)を測定することによって定量化した. 有意差検定は, two-way ANOVA による分散分析および Tukey 法による多重比較により行った.

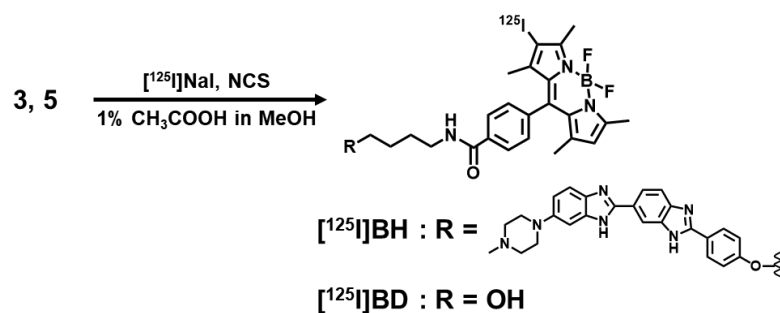
1.2. 結果と考察

非標識体 BH/BD および ^{125}I BH/ ^{125}I BD の合成

Hoechst33258¹⁸, I-BODIPY-NHS¹⁶, および BODIPY-NHS¹⁹ は既報の報告に従い合成した. アミノブチルリンカーを介した Hoechst33258 と I-BODIPY-NHS との縮合により BH を合成した. また, I-BODIPY-NHS とアミノブチルリンカーとの縮合により BD を合成した. pre-BH および pre-BD は, I-BODIPY-NHS の代わりに BODIPY-NHS を用いて BH および BD と同様のスキームで合成した(Scheme 1-1). ^{125}I BH および ^{125}I BD の合成は, 標識前駆体として pre-BH および pre-BD を用いた放射性ヨウ素化反応によって行い, 逆相 HPLC で精製することで, ^{125}I BH および ^{125}I BD をそれぞれ放射化学的収率 20 および 47%, 放射化学的純度 95%以上で得た(Scheme 1-2).



Scheme 1-1. Synthetic scheme of BH (2), pre-BH (3), BD (4), and pre-BD (5)



Scheme 1-2. Radiosynthesis of [^{125}I]BH and [^{125}I]BD

核取り込み評価

HeLa 細胞に [^{125}I]BH または [^{125}I]BD を添加し、2、4、および 6 時間インキュベート後の細胞内と核の取り込み率を評価した(Figure 1-2). [^{125}I]BH および [^{125}I]BD はいずれも経時的な細胞取り込み率の増加を示した. 6 時間のインキュベート後、 [^{125}I]BH および [^{125}I]BD の細胞内取り込み率はそれぞれ 17.3 および 14.5%であり、 [^{125}I]BH は [^{125}I]BD と比較して有意に高い取り込みを示した. [^{125}I]BH は [^{125}I]BD よりも脂溶性が高いため、 [^{125}I]BH は受動拡散によって HeLa 細胞により多く集積する可能性が考えられた. [^{125}I]BH および [^{125}I]BD の核取り込み率は、2 時間から 6 時間のインキュベートの間に、それぞれ 1.15 から 1.43% および 0.51 から 0.57% とわずかに増加した. [^{125}I]BD と比較して、 [^{125}I]BH は核内への迅速かつ高い集積を示し、放射能は 6 時間まで保持されていた. また、すべてのタイムポイントで、 [^{125}I]BH は [^{125}I]BD よりも核画分への有意に高い取り込みを示した. これらの結果は、 [^{125}I]BH のヘキスト部分が DNA への結合を促進したことを示している. 以前の研究で Nakamura らは、ヘキストタグ付きフルオレセインが、ヘキスト認識モチーフである AATT 配列を含む hpDNA に結合することを報告しており¹⁷, [^{125}I]BH も同様の様式で DNA に結合していると考えられた.

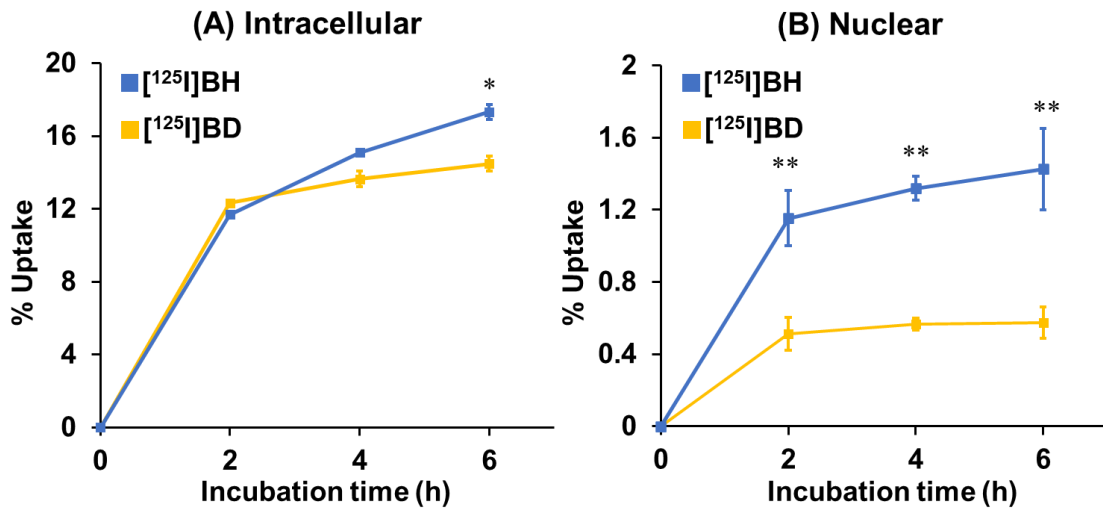


Figure 1-2. (A) Internalized and (B) nuclear fractions of [¹²⁵I]BH and [¹²⁵I]BD in HeLa cells. Data are presented as the mean ± SD (*n* = 3). * and ** indicate *P* < 0.05 and *P* < 0.001, respectively.

MTT アッセイ

0–37 kBq の [¹²⁵I]BH または [¹²⁵I]BD を HeLa 細胞に添加し、6 時間インキュベート後の細胞の生存率を MTT アッセイによって評価した(Figure 1-3A). [¹²⁵I]BH を添加した細胞では、放射エネルギー依存的な細胞生存率の低下が認められ、最大放射エネルギーの 37 kBq では生存率が 50%まで低下した。一方で、 [¹²⁵I]BD を添加した細胞の生存率は 90%までしか低下しなかった。18.5 および 37 kBq の放射エネルギーにおいて、 [¹²⁵I]BD と比較して、 [¹²⁵I]BH を添加した細胞で有意な生存率の低下が認められた。次いで、 [¹²⁵I]BH または [¹²⁵I]BD の放射エネルギーと同等の濃度の非放射性 BH または BD を用いた MTT アッセイを行うことで、化合物自体の細胞毒性を評価した(Figure 1-3B)。その結果、濃度の増加に関わらず、BH または BD を添加した細胞において顕著な毒性は認められなかった。これらの結果から、 [¹²⁵I]BH を添加した細胞で認められた細胞毒性は、オージェ電子の放出によって引き起こされる細胞死に起因することが示唆された。既報のオージェ治療用薬剤である ^{99m}Tc 標識ドキソルビシン複合体を用いた HeLa 細胞の生存率評価では、18.5 kBq の標識体を添加した細胞の生存率がわずか 80%までしか低下していない²⁰。したがって、放射性核種の違いはあるものの、 [¹²⁵I]BH は既存化合物と比べて低い放射エネルギーにおいても優れた細胞毒性を示すことが明らかとなった。

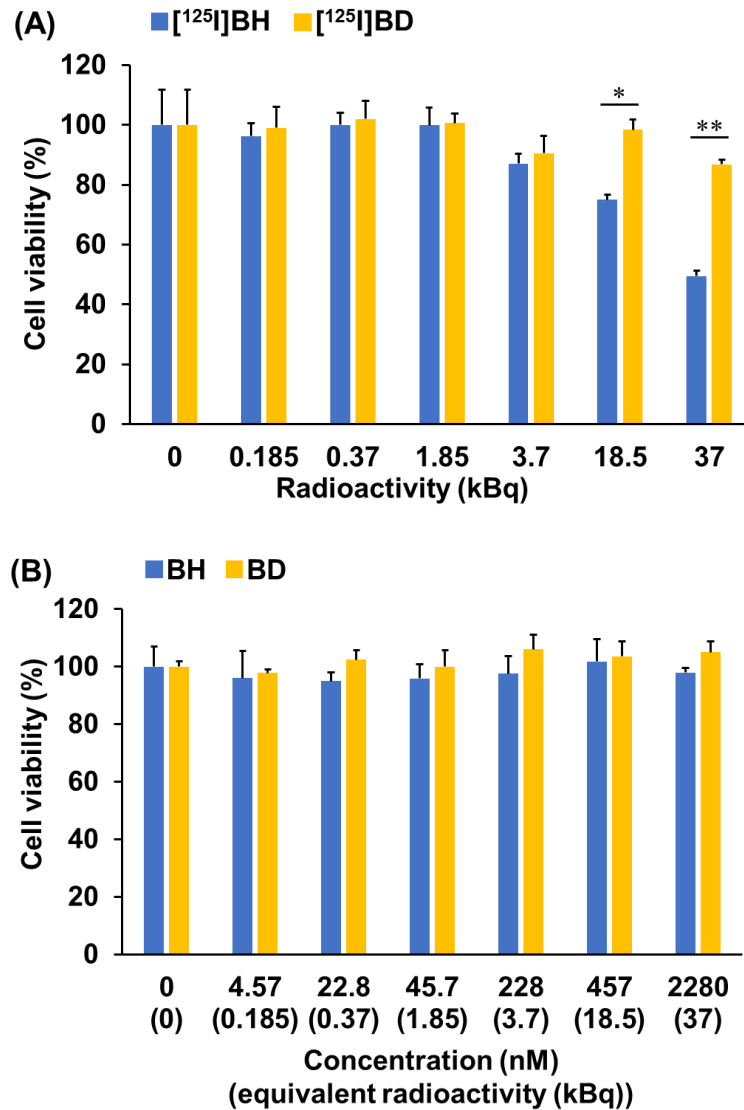


Figure 1-3. HeLa cell viability after treatment with (A) [¹²⁵I]BH or [¹²⁵I]BD, and with (B) non-radioactive BH or BD compared with untreated cells (set as 100%). Data are presented as the mean ± SD (*n* = 3). * and ** indicate *P* < 0.01 and *P* < 0.001, respectively.

γ-H2AX アッセイ

一般に、核内に移行した放射性化合物から放出されるオージェ電子による細胞生存率の低下は、DNA 損傷によって引き起こされる。DNA 損傷に伴い DNA 二重鎖切断が生じると、ヒストン H2A の 139 番目のセリン残基がホスホイノシチド 3-キナーゼによって急速にリン酸化され、γ-H2AX 病巣が形成される²¹。したがって、γ-H2AX 病巣の検出は DNA 損傷の評価における一般的な手法である。 [¹²⁵I]BH または [¹²⁵I]BD によって引き起こされる DNA 損傷を検出するために、0–37 kBq の [¹²⁵I]BH または [¹²⁵I]BD を HeLa 細胞に添加して 2 時間インキュベートした後、γ-H2AX 病巣の形成を蛍光免疫染色によって観察した(Figure 1-4A)。37 kBq の [¹²⁵I]BH または [¹²⁵I]BD を添加した細胞の核では、未処理の細胞と比較してより多くの γ-H2AX 病巣が観察されたことから、放射性化合物の添加によって DNA 二重鎖切断が生じることが示された。蛍光画像解析により γ-H2AX 発現を定量化した結果、 [¹²⁵I]BH または [¹²⁵I]BD を添加した細胞における γ-H2AX 発現は放射エネルギー依存的な増加を示した(Figure 1-4B)。3.7 kBq 以上の放射エネルギーの [¹²⁵I]BH を添加した細胞における γ-H2AX 発現は、未処理の細胞と比較して有意な増加を示した一方で、 [¹²⁵I]BD を添加した細胞では有意な γ-H2AX 発現の増加は認められなかった。また、3.7 kBq 以上の [¹²⁵I]BH を添加した細胞における γ-H2AX 発現は、同様の放射エネルギーの [¹²⁵I]BD を添加した場合と比較して有意に高い値を示した。この結果は、MTT アッセイにおいて [¹²⁵I]BH または [¹²⁵I]BD 間で有意な生存率の低下が認められた放射エネルギーと一致する。以上より、核内への高い集積を示した [¹²⁵I]BH は、 [¹²⁵I]BD と比較してより多くの DNA 二重鎖切断を引き起こすことが可能であり、DNA 二重鎖切断の頻度は MTT アッセイで認められた細胞毒性と相関することが示唆された。

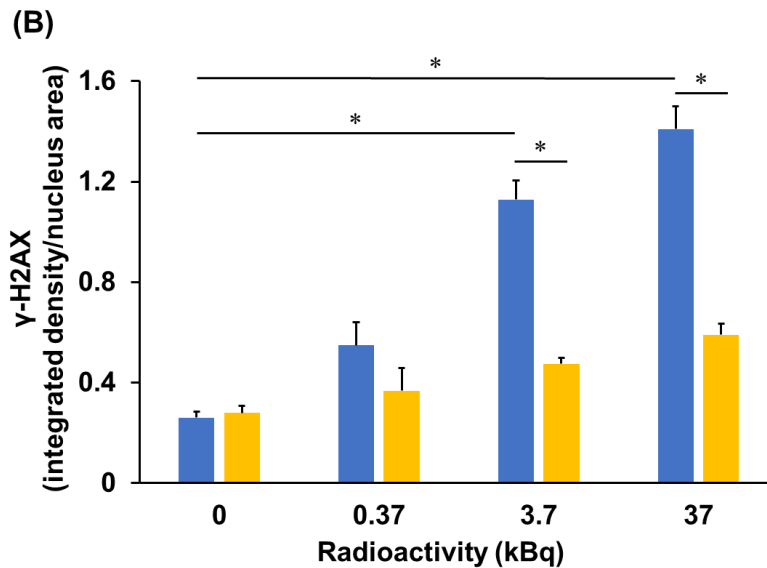
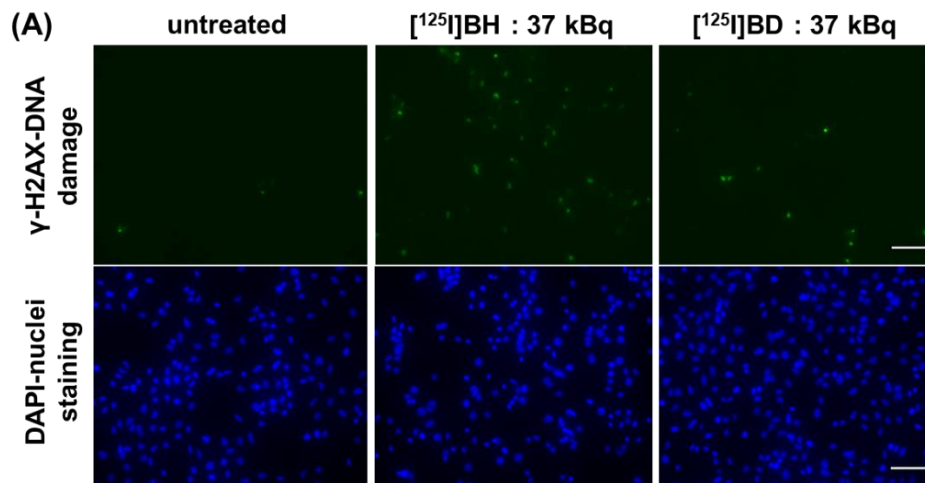


Figure 1-4. (A) Fluorescence images of untreated HeLa cells (control), cells exposed to 37 kBq of [¹²⁵I]BH, or [¹²⁵I]BD. γ-H2AX was stained with green fluorescence and the nucleus was stained with DAPI (blue). Insert scale bar: 100 μm. (B) Quantification of γ-H2AX foci (integrated density/nucleus area) in HeLa cells exposed to [¹²⁵I]BH and [¹²⁵I]BD. Data are presented as the mean ± SE (*n* = 3). * indicates *P* < 0.001.

1.3. 小括

本章では、核への選択的な集積を可能にする新規オージェ治療用薬剤を開発することを目的として、放射性ヨウ素標識 BODIPY 結合ヘキストの $[^{125}\text{I}]\text{BH}$ を新たに設計・合成し、HeLa 細胞に対する生物学的効果の観点から、オージェ治療用薬剤としての有用性を評価し、以下に述べる結果を得た。

- (1) Hoechst33258 および放射性ヨウ素標識 BODIPY で構成される $[^{125}\text{I}]\text{BH}$ 、および対照化合物としてヘキストを含まない $[^{125}\text{I}]\text{BD}$ を設計・合成した。
- (2) $[^{125}\text{I}]\text{BH}$ は $[^{125}\text{I}]\text{BD}$ と比較して核への高い取り込み率を示し、ヘキストが核局在化ターゲットとして機能することが示された。
- (3) $[^{125}\text{I}]\text{BH}$ はオージェ電子による DNA 損傷によって、 $[^{125}\text{I}]\text{BD}$ と比較して顕著な細胞毒性を引き起こした。

以上の結果より、Hoechst33258 の導入が DNA ターゲティングを達成するための有望なアプローチであり、 $[^{125}\text{I}]\text{BH}$ がオージェ治療用薬剤として機能する可能性が示唆された。

第 2 章

オージェ治療および光線力学療法を可能にする

BODIPY 結合ヘキストの開発

背景

光線力学療法(Photodynamic therapy: PDT)は非侵襲的かつ標的部特異的ながん治療モダリティとして注目を集めており、微小浸潤肺がん、閉塞性肺がんおよび閉塞性食道がんに加えて、光線角化症や加齢黄斑変性の治療のために、アメリカ食品医薬局に承認されている²²⁻²⁴。PDT は、光照射により活性化される光増感剤、基底状態の酸素分子、および可視光を含む 3 つの要素で構成される。PDT によって引き起こされる細胞傷害には 2 つの経路が存在する²⁵。1 つは、光照射によって励起した光増感剤が、細胞膜や細胞質内の機能性タンパクと直接反応し、プロトンまたは電子の移動によりラジカルカチオンまたはアニオンを生成させた後、これらのラジカルが酸素と反応することで、ROS が発生する経路である。もう 1 つは、光活性化した光増感剤がその励起状態のエネルギーを分子状酸素に移動させることで、ROS の一種である一重項酸素が生じる経路であり、これらの経路によってアポトーシスおよびネクローシスが誘導される。前者と後者の細胞傷害の寄与の割合は、光増感剤の濃度や細胞内に溶存する酸素の量により変化するが、一般的には後者による寄与が大きいことが報告されている²⁶。

現在臨床で使用されている光増感剤の多くは、ポルフィリンを母核とする誘導体である^{27,28}。これらは、低いモル吸光係数、複雑な分子構造、高い暗毒性などの欠点を有することから、他の蛍光団を母核とする光増感剤の開発が行われている²⁹。なかでも BODIPY 色素は、高いモル吸光係数、化学修飾の容易さ、および高い光安定性などの利点を有し、光増感剤として好ましい性質を示すことから、PDT への適用について検討されている³⁰⁻³³。一般に BODIPY は高い蛍光量子収率を示す一方で、一重項酸素量子収率は非常に低く、光増感剤としての利用は制限される。これは、励起された BODIPY が、励起一重項状態から基底状態へと遷移し、蛍光としてエネルギーを放出する一方で、分子状酸素へのエネルギー移動が可能な励起三重項状態へ遷移しないことに起因する。この問題に対処するため、BODIPY コアの近傍にヨウ素や臭素などのハロゲン原子を導入

し、重原子効果によって励起三重項状態への遷移を促進させる手法が広く用いられている。これにより BODIPY を光増感剤として利用することが可能となる³⁴。

第 1 章で合成した BH は BODIPY コアの 2 位にヨウ素原子を有することから光増感剤として機能し、PDT による光毒性を示す可能性がある。また近年、光増感剤が核に集積する場合、治療効果の向上が認められており³⁵、オージェ治療用薬剤としての性質が光増感剤の開発における利点となる可能性がある。本研究では、重原子効果による PDT における光毒性の増強を企図して³⁶、BH の BODIPY コアの 6 位にヨウ素を導入することで 2 つのヨウ素原子を有する BH-2、およびその ¹²⁵I 標識体である [¹²⁵I]BH-2 を新たに設計・合成した(Figure 2-1)。 [¹²⁵I]BH-2/BH-2 および [¹²⁵I]BH/BH について、核局在性、オージェ電子による細胞毒性、DNA 損傷、光化学的性質、および光増感作用により誘発される細胞毒性を検討することで、オージェ治療用薬剤および光増感剤としての有用性を評価した。

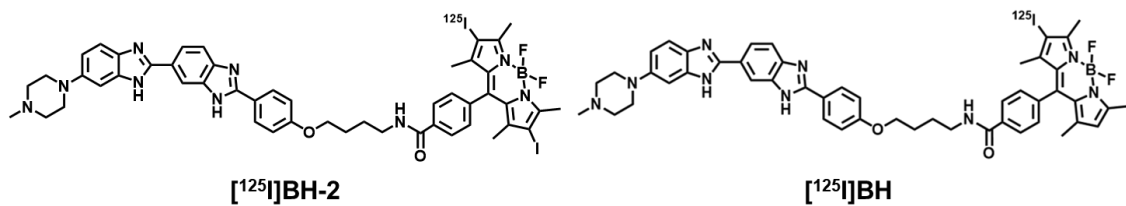


Figure 2-1. Chemical structures of [¹²⁵I]BH-2 and [¹²⁵I]BH.

2.1. 実験方法

試薬・機器

第1章と同じ試薬・機器を使用した。光化学的パラメーターは島津製作所製の UV-1800 および RF-6000 を用いて測定した。光源はウシオ電機株式会社製の 525 nm Green color illuminator を使用した。一重項酸素量子収率の測定および光照射後の MTT アッセイでは、Tecan 社製のマイクロプレートリーダー(Infinite® M200 PRO)を用いて吸光度を測定した。

BH-2 の合成

BODIPY-NHS¹⁹ は既報のスキームに従い合成した。Boc-aminobutyl-Hoechst および BH は Scheme 1-1 に従い合成した。

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-(5,5-difluoro-2,8-diiodo-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)benzoate (1)

BODIPY-NHS (56 mg, 0.12 mmol) および *N*-Iodosuccinimide (NIS) (54 mg, 0.24 mmol) を、12 mL および 5 mL のジクロロメタンにそれぞれ溶解し 0 °C で混合した。その後室温に戻し 30 分攪拌した。反応溶媒を減圧留去した後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン = 1:3)で精製し、化合物 **1** を収量 39.7 mg (46%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.31 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.97 (s, 4H), 2.66 (s, 6H), 1.40 (s, 6H). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₄H₂₁BF₂I₂N₃O₄⁺, 717.9682 [M + H]⁺: found 717.9676.

4-(5,5-Difluoro-2,8-diiodo-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)-*N*-(4-(4-(6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1*H*,3'*H*-[2,5'-bibenzo[*d*]imidazol]-2'-yl)phenoxy)butyl)benzamide (2, BH-2)

Boc-aminobutyl-Hoechst (22.3 mg, 37 μmol) をジクロロメタン(1.5 mL)に溶解し、TFA (1 mL)を加え 1 時間室温で攪拌した。反応溶媒を減圧留去した後、残渣を DMF に溶解し、化合物 **1** (39.7 mg 55 μmol) およびトリエチルアミン(30 μL, 215 μmol)を加えて、50 °C で一晩攪拌した。クロロホルム(15 mL × 3)で分液抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール = 4:1)で精製し、化合物 **2** を収量 3.1 mg (7.6%) で得

た. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.37-8.30 (m, 1H), 8.10 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 8.04-7.94 (m, 1H), 7.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.84-7.81 (m, 1H), 7.73 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.38-7.36 (m, 1H), 7.32-7.29 (m, 1H), 7.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.28-4.20 (m, 2H), 3.57-3.49 (m, 2H), 3.27-3.17 (m, 8H), 3.02 (s, 2H), 2.50 (s, 6H), 1.97-1.85 (m, 4H), 1.34 (s, 6H). HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{49}\text{BF}_2\text{I}_2\text{N}_9\text{O}_2^+$, 1098.2159 $[\text{M} + \text{H}]^+$: found 1098.2158.

^{125}I]BH-2 の合成

第 1 章と同様の方法で合成した.

^{125}I]C₅ の合成

既報の合成スキームに従い合成した³⁷.

細胞培養

第 1 章と同様の方法で培養した.

核取り込み評価

第 1 章と同様の方法で評価した.

MTT アッセイ(オージェ治療)

第 1 章と同様の方法で評価した. 有意差検定は, two-way ANOVA による分散分析および Tukey 法による多重比較により行った.

γ -H2AX アッセイ

第 1 章と同様の方法で評価した.

光化学的パラメーターの測定

吸光スペクトルおよび蛍光スペクトルを UV-1800 および RF-6000 を用いて測定した. 蛍光量子収率(Φ_f)は以下の式に従って算出した.

$$\Phi_f = (F^s / F^{\text{ref}}) \cdot (n_s^2 / n_{\text{ref}}^2) \cdot (A^{\text{ref}} / A^s) \cdot \Phi_f^{\text{ref}}$$

F , A , および n はそれぞれ, 蛍光ピーク下面積, 525 nm の吸光度, および溶媒の屈折率を表している. 参照化合物として I-BODIPY-NHS ($\Phi_f = 0.11$, トルエン)¹⁶ を用いた.

一重項酸素量子収率の測定

一重項酸素量子収率(Φ_{Δ})は、マイクロプレートリーダーを使用して 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF)の極大吸収波長の 410 nm の吸光度をモニタリングすることで測定した。溶媒はメタノールを使用し、96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり、800 μM の DPBF を 50 μL (終濃度: 200 μM)、10 μM の BH-2 または BH を 20 μL (終濃度: 1 μM)、およびメタノールを 130 μL それぞれ添加した。参照化合物として 20 μM のローズベンガルを 20 μL 、BH-2 または BH の代わりに添加した(終濃度: 2 μM)。光を照射するときを除き、プレートを常にアルミホイルで遮光した。最初に、410 および 525 nm の吸光度を測定した。その後 525 nm Green color illuminator を用いて 96 ウェルプレートに出力強度 105 mW/cm² の緑色光を 20 秒間当てた後 410 nm の吸光度を測定した。これを積算照射時間 140 秒まで繰り返した。得られた吸光度を以下の式に当てはめ一重項酸素量子収率を算出した。

$$\Phi_{\Delta} = (k^s / k^{\text{ref}}) \cdot (f^{\text{ref}} / f) \cdot \Phi_{\Delta}^{\text{ref}}$$

$$f = 1 - 10^{(-A_{525})}$$

k は DPBF の一次消費速度定数であり、各タイムポイントでの 410 nm の吸光度を最初に測定した吸光度で除し、その自然対数値を時間ごとにプロットし、得られた検量線の傾きから求めた。 f は吸収補正係数であり、525 nm の吸光度を上記の式に当てはめることで算出した。参照化合物としてローズベンガル($\Phi_{\Delta} = 0.76$, メタノール)³⁸ を用いた。

MTT アッセイ(PDT)

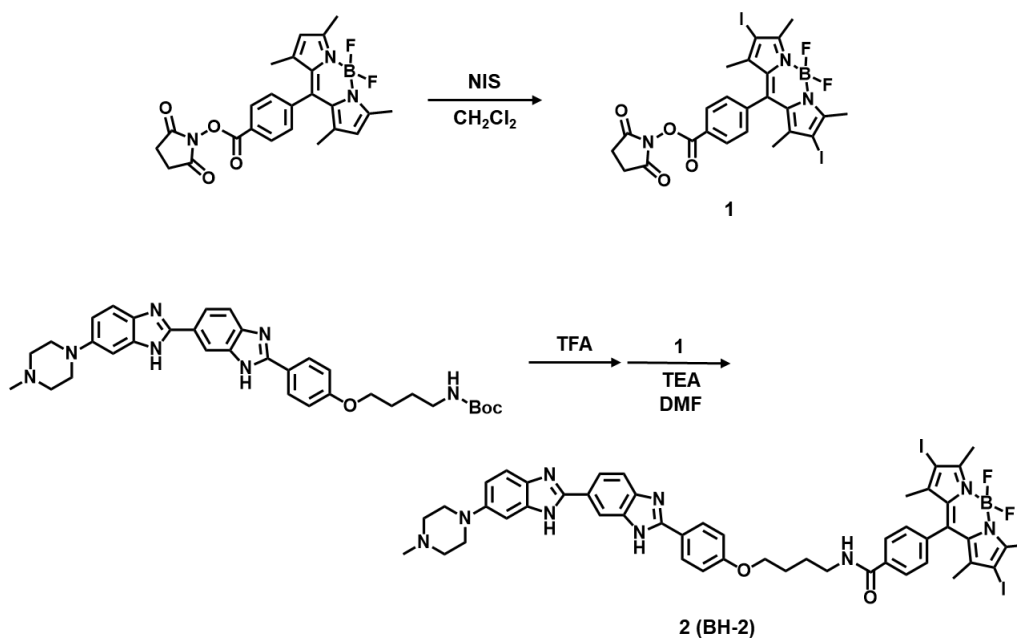
HeLa 細胞を 1 ウェルあたり 5.0×10^3 個の密度で 96 ウェルプレートに播種し、一晚接着させた。HeLa 細胞に 0–1600 nM の BH-2 または BH を含むアッセイ培地(0.5%エタノールを含む DMEM 培地)を 100 μL 添加し、37 °C で 24 時間インキュベートした。その後培地を除去し、100 μL の PBS で培地を置換し 525 nm Green color illuminator を用いて出力強度 105 mW/cm² の緑色光を 6 分間照射した。PBS を除去し、DMEM 培地を添加した後、37 °C で 24 時間インキュベートした。MTT 溶液を各ウェルに加え、4 時間インキュベートした。MTT を含む培地を除去し、PBS で洗浄後 0.04 M 塩酸を含むイソプロパノールで MTT ホルマザンを完全に溶解させ、マイクロプレートリーダーで 570 nm の吸光度を測定した。有意差検定は、two-way ANOVA による分散分析および Tukey 法に

よる多重比較により行った.

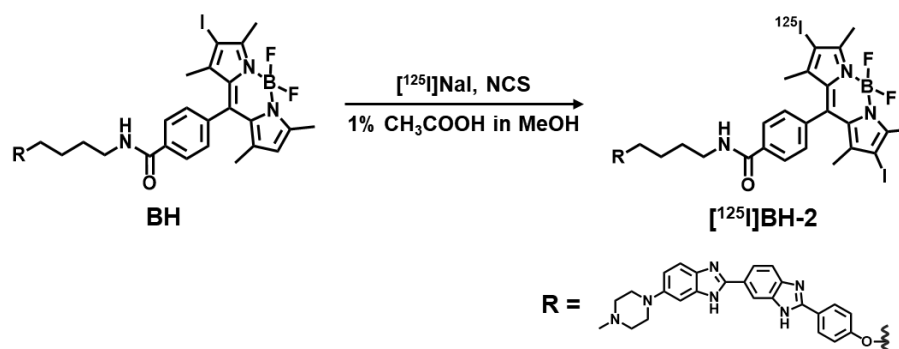
2.2. 結果と考察

非標識体 BH-2 および ^{125}I BH-2 の合成

Boc-aminobutyl-Hoechst および非標識 BH は第 1 章に記載した手順で合成した。BODIPY-NHS に対して 2 等量を超える NIS を用いてヨウ素化することで、化合物 **1** を合成した。アミノブチルリンカーを介した、Hoechst33258 と化合物 **1** との縮合により BH-2 を合成した(Scheme 2-1)。 ^{125}I BH-2 の合成は、標識前駆体として BH を用いた放射性ヨウ素化反応によって行い、逆相 HPLC で精製することで、 ^{125}I BH-2 を放射化学的収率 13%、放射化学的純度 95%以上で得た(Scheme 2-2)。



Scheme 2-1. Synthetic scheme of BH-2



Scheme 2-2. Radiosynthesis of [¹²⁵I]BH-2

核取り込み評価

[¹²⁵I]BH-2 のオージェ治療用薬剤としての可能性を検討するために、HeLa 細胞に [¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH を添加し、2, 4, および 6 時間インキュベート後の細胞内と核の取り込み率を評価した(Figure 2-2). [¹²⁵I]BH-2 および [¹²⁵I]BH はいずれも、添加後 6 時間まで経時的な細胞内取り込み率の増加を示した. 4 および 6 時間インキュベート後の細胞内取り込み率において、[¹²⁵I]BH は [¹²⁵I]BH-2 と比較して高値を示したが、有意差は認められなかった. また、核取り込みにおいても、細胞内取り込みと同様に [¹²⁵I]BH-2 および [¹²⁵I]BH はいずれも、経時的な取り込み率の増加を示した. 4 および 6 時間インキュベート後の核取り込み率において、[¹²⁵I]BH-2 は [¹²⁵I]BH と比較して高値を示したが、細胞内取り込みと同様に化合物間で有意差は認められなかった. すべてのタイムポイントで、[¹²⁵I]BH-2 は [¹²⁵I]BH と同等の細胞内取り込みおよび核取り込みを示したことから、[¹²⁵I]BH-2 のヘキスト部分が [¹²⁵I]BH と同様に、核 DNA においてヘキスト認識モチーフである AATT 配列に結合し、核局在化タグとして機能することが示唆された.

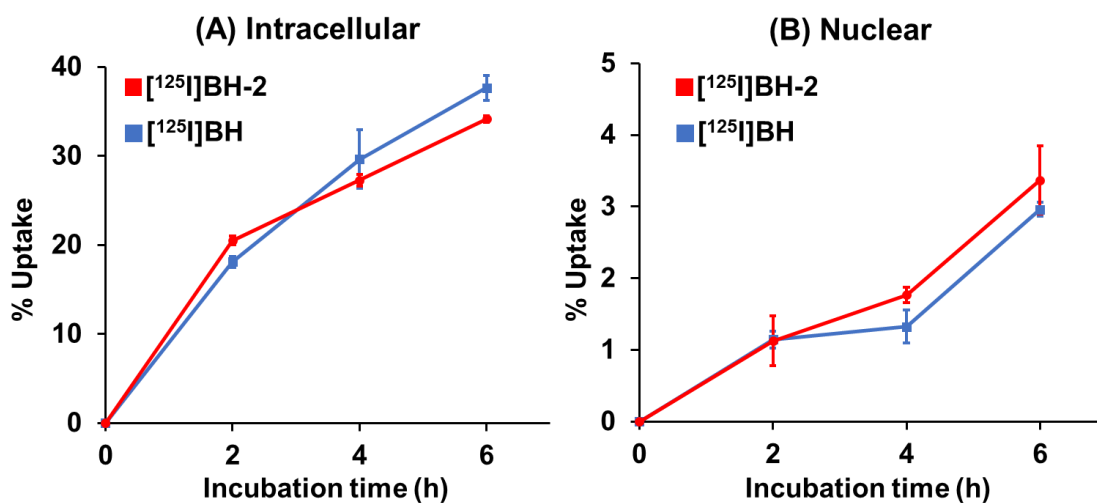


Figure 2-2. (A) Internalized and (B) nuclear fractions of [¹²⁵I]BH-2 and [¹²⁵I]BH in HeLa cells. Data are presented as the mean ± SD (*n* = 3).

MTT アッセイ(オージェ治療)

オージェ電子の放出により引き起こされる細胞毒性を検討するために、0–18.5 kBq の [¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH を HeLa 細胞に添加し、6 時間インキュベート後の細胞の生存率を MTT アッセイによって評価した(Figure 2-3A, B). [¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH を添加した細胞のいずれにおいても、放射エネルギー依存的な細胞生存率の低下が認められた。最大放射エネルギーの 18.5 kBq において、 [¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH を添加した細胞の生存率はそれぞれ 43 および 60%であった。また、1.85 から 18.5 kBq の放射エネルギーにおいて、 [¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH を添加した細胞の生存率はそれぞれ未処理の細胞と比較して有意に低い値を示した。この結果から、 [¹²⁵I]BH-2 は [¹²⁵I]BH と同等のオージェ電子による細胞毒性を引き起こすことが示された。 [¹²⁵I]BH-2 および [¹²⁵I]BH の細胞毒性について、既報のオージェ治療用薬剤と比較するために、アクリジンオレンジを母核とする [¹²⁵I]C₅³⁷ を合成した後、MTT アッセイにより [¹²⁵I]C₅ を添加後の HeLa 細胞の生存率を測定した(Figure 2-3C)。その結果、放射エネルギー依存的な細胞生存率の低下が認められ、最大放射エネルギーの 18.5 kBq における細胞生存率は 64%であった。また、1.85 から 18.5 kBq の放射エネルギーにおいて、 [¹²⁵I]C₅ を添加した細胞の生存率はそれぞれ未処理の細胞と比較して有意に低い値を示した。この結果から、 [¹²⁵I]BH-2 および [¹²⁵I]BH は、既報のオージェ治療用薬剤である [¹²⁵I]C₅ と同等もしくはそれ以上の細胞毒性を引き起こすことが明らかとなった。

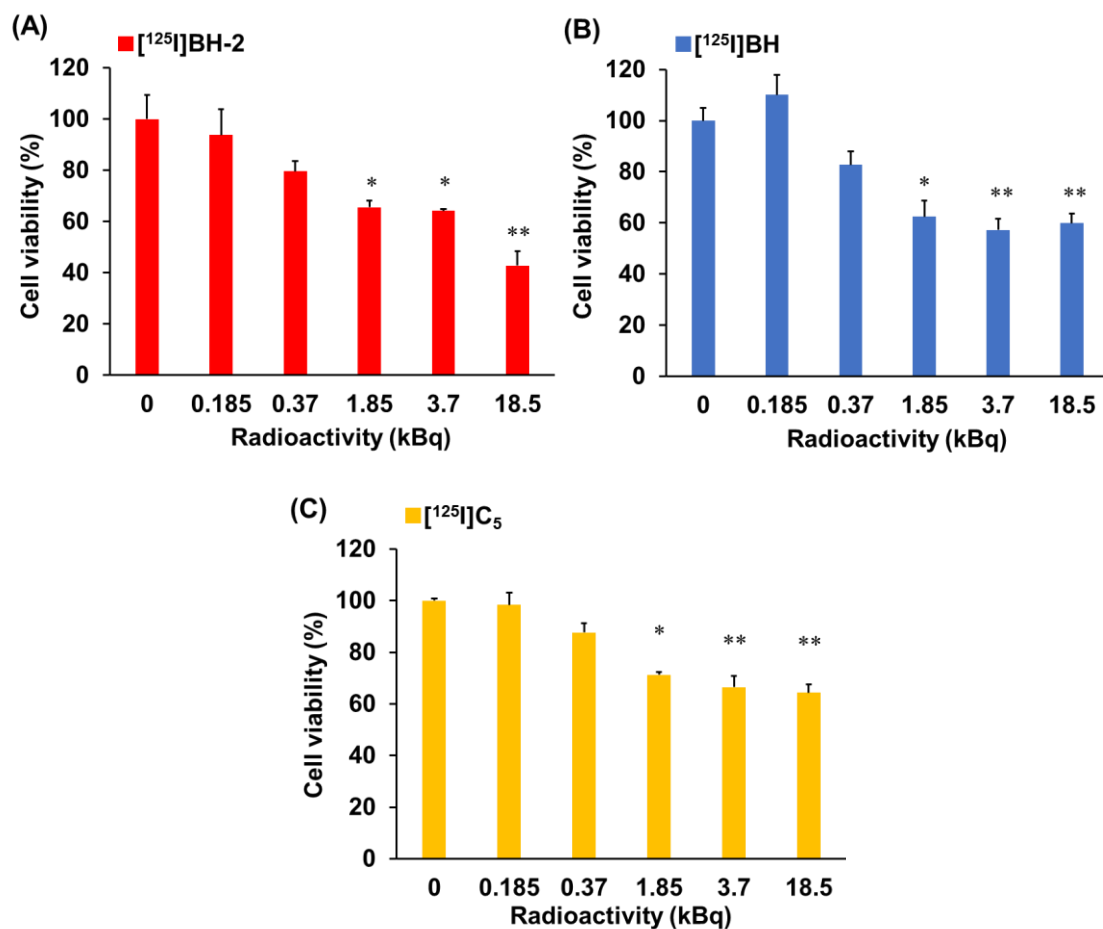


Figure 2-3. HeLa cell viability after treatment with (A) [¹²⁵I]BH-2, (B) [¹²⁵I]BH, or (C) [¹²⁵I]C₅ compared with untreated cells (set as 100%). Data are presented as the mean ± SD (*n* = 3). * and ** indicate *P* < 0.05 and *P* < 0.01, respectively, compared with untreated cells (0 kBq).

γ-H2AX アッセイ

[¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH によって引き起こされる DNA 損傷を検出するために、0–18.5 kBq の [¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH を HeLa 細胞に添加して 2 時間インキュベートした後、γ-H2AX 病巣の形成を蛍光免疫染色によって分析した。18.5 kBq の [¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH を添加した細胞の核では、未処理の細胞と比較してより多くの γ-H2AX 病巣が観察されたことから、放射性化合物の添加によって DNA 二重鎖切断が生じることが示された (Figure 2-4)。蛍光画像解析により γ-H2AX 発現を定量化した結果、[¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH を添加した細胞において、放射エネルギー依存的な γ-H2AX 発現の増加が認められた (Figure 2-5)。1.85 および 18.5 kBq の放射エネルギーにおいて、[¹²⁵I]BH-2 または [¹²⁵I]BH を添加した細胞における γ-H2AX 発現は、未処理の細胞と比較して有意な増加を示した。

また、MTT アッセイにおいても 1.85 kBq 以上の^[125I]BH-2 または^[125I]BH を添加した細胞において有意な細胞生存率の低下が認められたことから、DNA 二重鎖切断の頻度とオージェ電子による細胞毒性との間に相関があることが示された。以上の結果から、^[125I]BH-2 はオージェ治療用薬剤として、^[125I]BH と同等の性質を示すことが明らかとなった。

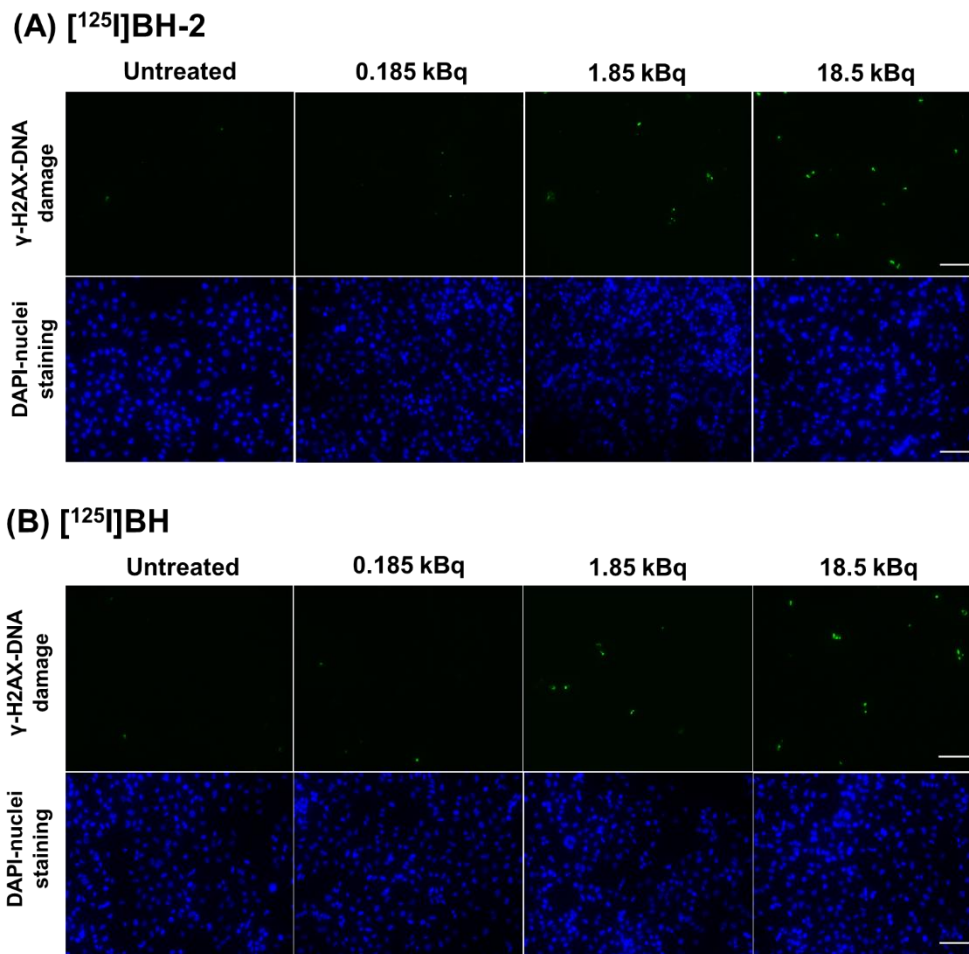


Figure 2-4. Fluorescence images of (A) cells exposed from 0 to 18.5 kBq of ^[125I]BH-2, or (B) cells exposed of ^[125I]BH. γ -H2AX was stained with green fluorescence and the nucleus was stained with DAPI (blue). Insert scale bar: 100 μ m.

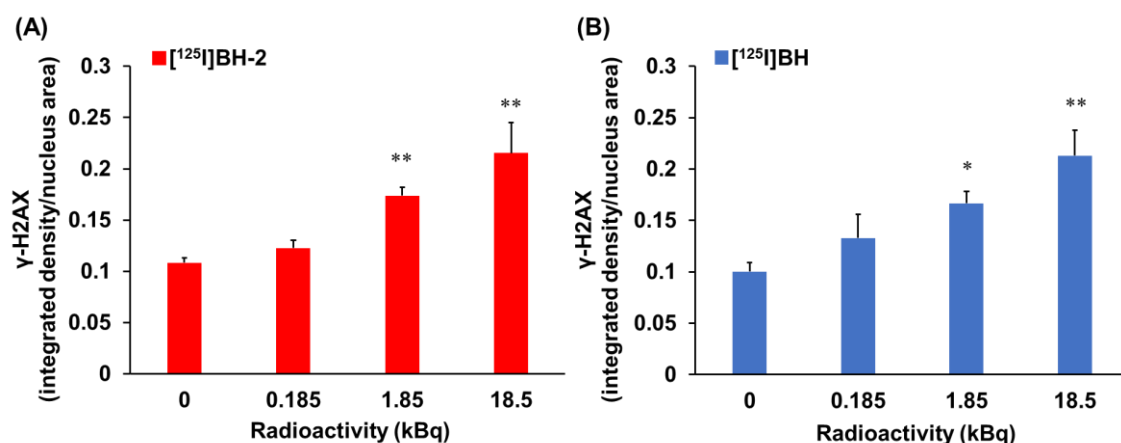


Figure 2-5. Quantification of γ -H2AX foci (integrated density/nucleus area) in HeLa cells exposed to (A) [125 I]BH-2 or (B) [125 I]BH. Data are presented as the mean \pm SE ($n = 3$). * and ** indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

光化学的パラメーターおよび一重項酸素量子収率の測定

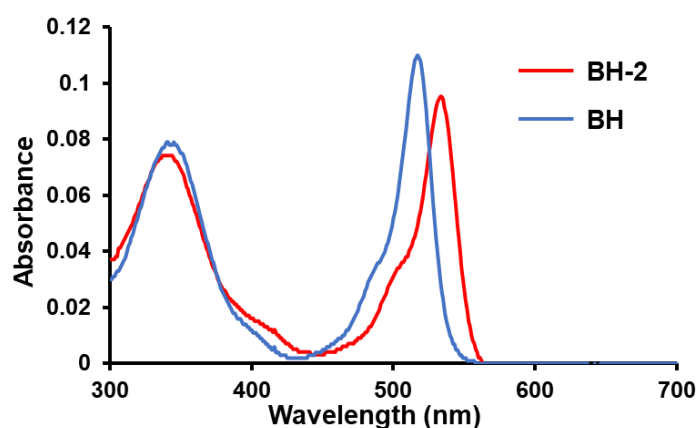
光増感剤としての性質を評価するために、BH-2 および BH をメタノールに溶解し、分光パラメーターを測定した(Table 2-1)。BH-2 と BH の吸収スペクトルはいずれもヘキスト由来の 350 nm 付近のピークおよび BODIPY 由来の 500 nm 付近のピークの 2 つの極大吸収を示した(Figure 2-6)。BH-2 および BH の極大吸収波長は 533 および 517 nm、蛍光波長は 552 および 532 nm であった。この結果から、ヨウ素原子の BODIPY コアへの導入により深色シフトが生じることが示された。この現象はハロゲンなどの助色団を蛍光色素に導入した場合に一般的に認められる³³。また、BH-2 および BH のモル吸光係数は約 20,000 であった。I-BODIPY-NHS¹⁶を参照化合物として、BH-2 および BH の蛍光量子収率を測定したところ、それぞれ 0.04 および 0.06 であった。一重項酸素生成能の比較のため参照化合物としてローズベンガル³⁸を使用して BH-2 および BH の一重項酸素量子収率を算出したところ、それぞれ 0.41 および 0.32 であった。分子内に 2 つのヨウ素原子を有する BH-2 は、1 つのヨウ素原子を有する BH と比較して低い蛍光量子収率および 1.3 倍高い一重項酸素量子収率を示したことから、さらなるヨウ素原子の導入によって項間交差が加速することが示された。

Table 2-1. Photophysical parameters of BH-2 and BH.

Compound ^a	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{a}}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{a}}$	ε ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) ^a	$\Phi_{\text{f}}^{\text{b}}$	Φ_{Δ}^{b}
BH-2	533	552	20600	0.04	0.41
BH	517	532	22000	0.06	0.32

^a In methanol.

^b Fluorescence quantum yields (Φ_{f}) and singlet oxygen quantum yields (Φ_{Δ}) were determined with reference to I-BODIPY-NHS ($\Phi_{\text{f}} = 0.11$) in toluene and Rose Bengal ($\Phi_{\Delta} = 0.76$) in methanol, respectively.

**Figure 2-6.** Absorption spectra of BH-2 and BH.

MTT アッセイ(PDT)

BH-2 および BH の光学的活性を評価するために、HeLa 細胞に 0–1600 nM の BH-2 および BH を添加し、525 nm の光を照射した後 MTT アッセイにて細胞生存率を測定した(Figure 2-7A)。BH-2 または BH を添加した細胞の生存率は濃度依存的な低下を示し、BH-2 および BH が光増感剤として機能することが示された。最大濃度の 1600 nM において、BH-2 および BH を添加した細胞の生存率はそれぞれ 29 および 50%であり、BH-2 は BH と比較して有意な生存率の低下を引き起こした。BH-2 は BH と比較して優れた光毒性を示したが、これは一重項酸素量子収率の違いに起因すると考えられる。BH-2 および BH の IC_{50} 値は、それぞれ 195 および 702 nM であった。Yu らが以前報告した aza-BODIPY を母核とした光増感剤において、最も高い光毒性を示した化合物の IC_{50} 値が 76 nM であったことを考慮すると³⁹、BH-2 は良好な光学的活性を有することが明らかとなった。次いで、BH-2 および BH の暗毒性を評価するために、BH-2 または BH を

添加し、光を照射せずに HeLa 細胞の生存率を測定した(Figure 2-7B). 一般に、重原子の導入により暗毒性が増加する傾向にあるため⁴⁰, 高濃度の BH-2 とインキュベートした細胞における生存率の低下が予想された. しかし, BH-2 および BH はいずれも最大濃度の 1600 nM まで顕著な暗毒性を示さなかった. この結果から, BH-2 および BH により引き起こされる細胞毒性は光を照射した場合にのみ引き起こされることが明らかとなった.

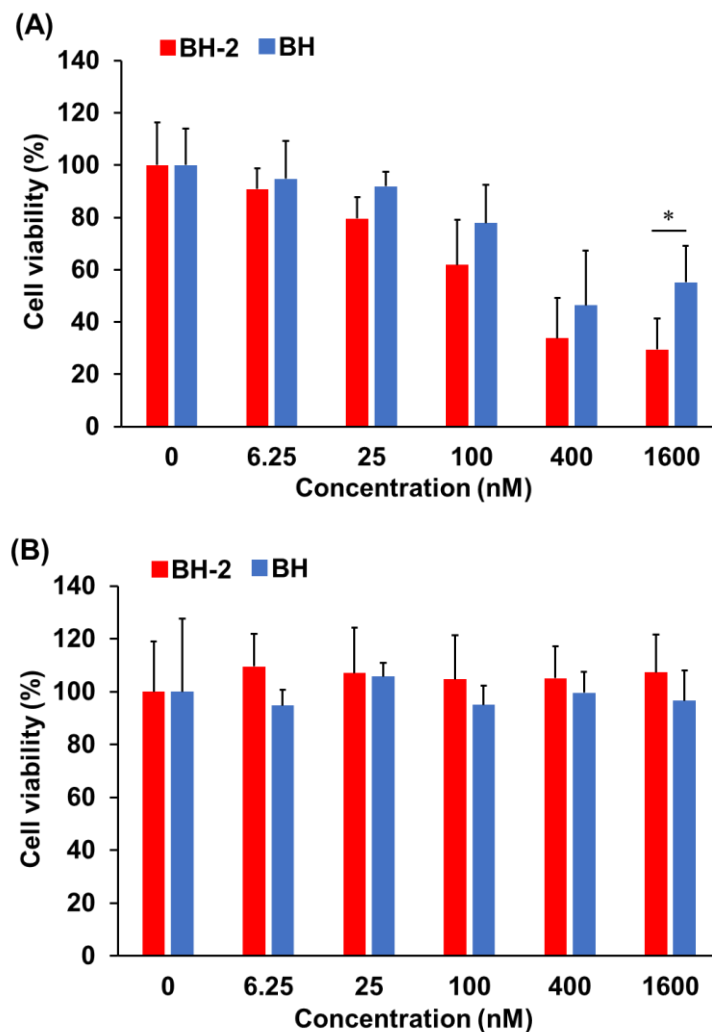


Figure 2-7. HeLa cell viability treated with BH-2 or BH (A) with light irradiation at 525 nm and (B) without light irradiation compared with untreated cells (set as 100%). The cells were incubated with compounds for 24 h. After light irradiation for 6 min, cells were incubated for 24 h in the dark. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 6$). * indicates $P < 0.01$.

2.3. 小括

本章では、オージェ治療および PDT の両治療法へ適用可能な薬剤を開発することを目的として、分子内に2つのヨウ素原子を有する BODIPY 結合ヘキストの $[^{125}\text{I}]\text{BH-2/BH-2}$ を新たに設計・合成した。第1章で合成した $[^{125}\text{I}]\text{BH/BH}$ を含めて、光化学的性質および HeLa 細胞に対する生物学的効果の観点から、オージェ治療用薬剤および光増感剤としての有用性を評価し、以下に述べる結果を得た。

- (1) 重原子効果による PDT 治療効果の増強に期待して、 $[^{125}\text{I}]\text{BH/BH}$ にさらに 1 原子ヨウ素を導入した $[^{125}\text{I}]\text{BH-2/BH-2}$ を新たに設計・合成した。
- (2) $[^{125}\text{I}]\text{BH-2}$ は $[^{125}\text{I}]\text{BH}$ と同程度の核への取り込みを示し、BH と同様に分子内のヘキスト部分が核局在化タグとして機能することが示された。
- (3) $[^{125}\text{I}]\text{BH-2}$ はオージェ電子による DNA 損傷によって、 $[^{125}\text{I}]\text{BH}$ と同等の細胞毒性を引き起こした。
- (4) BH-2 および BH は濃度依存的な光毒性を示し、光増感剤として機能することが示された。特に BH-2 は BH と比較して顕著な光毒性を示した。

以上の結果より、 $[^{125}\text{I}]\text{BH-2/BH-2}$ および $[^{125}\text{I}]\text{BH/BH}$ はオージェ治療および PDT のいずれにも応用可能であることが示唆された、特に、BH-2 は BH と比較して光増感剤としての優れた性質を示した。

第3章

近赤外光を利用した光線力学療法およびオージェ治療の

併用を可能にする NIR-BODIPY 結合ヘキストの開発

背景

臨床で実施される PDT において、光増感剤の低い腫瘍選択性および近赤外領域における弱い光吸収のために高用量の光増感剤の投与が必要となり、光線過敏症などの副作用が生じることが問題となっている⁴¹。この問題を解決するために他のがん治療との併用療法が検討されており、光増感剤の用量減少を可能にするだけでなく、それぞれの治療を個別に実施した場合と比べて、治療効果が増強することが報告されている⁴²⁻⁴⁵。しかし、これまでに PDT とオージェ治療を用いた併用療法に関する報告はない。

第1章および第2章にて開発した BH および BH-2 は、約 520 nm に吸収極大波長を持つが、この波長の光は生体透過性が低く、腫瘍の深部に到達することが困難であることから、光増感剤としての生体応用が制限される。そこで、¹²⁵I]BH/BH および¹²⁵I]BH-2/BH-2 の吸収波長を生体透過性が高い近赤外領域まで長波長化すべく、BODIPY の 3 位および 5 位に *p*-methoxystyryl 基を導入した¹²⁵I]NBH-1/NBH-1 および¹²⁵I]NBH-2/NBH-2 を設計・合成し、オージェ治療用薬剤および光増感剤としての有用性、および 2 つのがん治療の併用による治療効果を評価した。¹²⁵I 標識体を用いた検討において、¹²⁵I]NBH-2 と比較して¹²⁵I]NBH-1 はオージェ治療用薬剤として優れた性質を示し、また光力学的活性に関する検討において、NBH-1 は近赤外光で励起可能な光増感剤として機能することが明らかとなった。¹²⁵I]NBH-1/NBH-1 を用いたオージェ治療および PDT の併用により、細胞毒性および腫瘍増殖抑制効果の増強が認められた。以上の結果より、¹²⁵I]NBH-1/NBH-1 は近赤外光を利用した PDT およびオージェ治療へ応用可能な二機能性薬剤として有用であり、2 つ治療の併用によって治療効果が増強することが示唆された。

引用文献

1. Aghevlian, S.; Boyle, A. J.; Reilly, R. M. Radioimmunotherapy of cancer with high linear energy transfer (LET) radiation delivered by radionuclides emitting α -particles or Auger electrons. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2017**, 109, 102-118.
2. Cornelissen, B.; Katherine., V. Targeting the Nucleus: An Overview of Auger-Electron Radionuclide Therapy. *Current Drug Discovery Technologies* **2010**, 7, 263-279.
3. Filosofov, D.; Kurakina, E.; Radchenko, V. Potent candidates for Targeted Auger Therapy: Production and radiochemical considerations. *Nuclear Medicine and Biology* **2021**, 94-95, 1-19.
4. Ku, A.; Facca, V. J.; Cai, Z.; Reilly, R. M. Auger electrons for cancer therapy – a review. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* **2019**, 4, 27.
5. Bolcaen, J.; Gizawy, M. A.; Terry, S. Y. A.; Paulo, A.; Cornelissen, B.; Korde, A.; Engle, J.; Radchenko, V.; Howell, R. W. Marshalling the Potential of Auger Electron Radiopharmaceutical Therapy. *Journal of Nuclear Medicine* **2023**, 64, 1344-1351.
6. Balagurumorthy, P.; Xu, X.; Wang, K.; Adelstein, S. J.; Kassis, A. I. Effect of distance between decaying ^{125}I and DNA on Auger-electron induced double-strand break yield. *International Journal of Radiation Biology* **2012**, 88, 998-1008.
7. Kassis, A. I.; Fayad, F.; Kinsey, B. M.; Sastry, K. S. R.; Taube, R. A.; Adelstein, S. J. Radiotoxicity of ^{125}I in Mammalian Cells. *Radiation Research* **1987**, 111, 305-318.
8. Sahu, S. K.; Wen, P. Y.; Foulon, C. F.; Nagel, J. S.; Black, P. M.; Adelstein, S. J.; Kassis, A. I. Intrathecal 5- ^{125}I Iodo-2'-Deoxyuridine in a Rat Model of Leptomeningeal Metastases. *Journal of Nuclear Medicine* **1997**, 38, 386-390.
9. Ginja, M.; Hinni, K.; Tschumi, S.; Schulz, S.; Maecke, H. R. Trifunctional Somatostatin-Based Derivatives Designed for Targeted Radiotherapy Using Auger Electron Emitters. *Journal of Nuclear Medicine* **2005**, 46, 2097-2103.
10. Costantini, D. L.; Chan, C.; Cai, Z.; Vallis, K. A.; Reilly, R. M. ^{111}In -Labeled Trastuzumab (Herceptin) Modified with Nuclear Localization Sequences (NLS): An Auger Electron-Emitting Radiotherapeutic Agent for HER2/neu-Amplified Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* **2007**, 48, 1357-1368.
11. Costantini, D. L.; Mclarty, K.; Lee, H.; Done, S. J.; Vallis, K. A.; Reilly, R. M. Antitumor Effects and Normal-Tissue Toxicity of ^{111}In -Nuclear Localization Sequence-Trastuzumab in Athymic Mice Bearing HER-Positive Human Breast Cancer Xenografts. *Journal of Nuclear Medicine* **2010**, 51, 1084-1091.

12. Parker, C.; Lewington, V.; Shore, N.; Kratochwil, C.; Levy, M.; Lindén, O.; Noordzij, W.; Park, J.; Saad, F. Targeted Alpha Therapy, an Emerging Class of Cancer Agents. *JAMA Oncology* **2018**, *4*, 1765-1772.
13. Sgouros, G.; Bodei, L.; Mcdevitt, M. R.; Nedrow, J. R. Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* **2020**, *19*, 589-608.
14. Bucevičius, J.; Lukinavičius, G.; Gerasimaitė, R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and beyond. *Chemosensors* **2018**, *6*, 18.
15. Kassis, A. I.; Walicka, M. A. Double-Strand Break Yield Following ¹²⁵I Decay Effects of DNA Conformation. *Acta Oncologica* **2000**, *39*, 721-726.
16. Ono, M.; Watanabe, H.; Ikehata, Y.; Ding, N.; Yoshimura, M.; Sano, K.; Saji, H. Radioiodination of BODIPY and its application to a nuclear and optical dual functional labeling agent for proteins and peptides. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 3337.
17. Nakamura, A.; Takigawa, K.; Kurishita, Y.; Kuwata, K.; Ishida, M.; Shimoda, Y.; Hamachi, I.; Tsukiji, S. Hoechst tagging: a modular strategy to design synthetic fluorescent probes for live-cell nucleus imaging. *Chemical Communications* **2014**, *50*, 6149-6152.
18. Chandrika, N. T.; Shrestha, S. K.; Ngo, H. X.; Garneau-Tsodikova, S. Synthesis and investigation of novel benzimidazole derivatives as antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *24*, 3680-3686.
19. Nepomnyashchii, A. B.; Pistner, A. J.; Bard, A. J.; Rosenthal, J. Synthesis, Photophysics, Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence of PEG-Modified BODIPY Dyes in Organic and Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 5599-5609.
20. Imstepf, S.; Pierroz, V.; Raposinho, P.; Felber, M.; Fox, T.; Fernandes, C.; Gasser, G.; Santos, I. R.; Alberto, R. Towards ^{99m}Tc-based imaging agents with effective doxorubicin mimetics: a molecular and cellular study. *Dalton Transactions* **2016**, *45*, 13025-13033.
21. Kuo, L. J.; Yang, L. X. γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *in vivo* **2008**, *22*, 305-309.
22. Gunaydin, G.; Gedik, M. E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Frontiers in Chemistry* **2021**, *9*, 691697.
23. Yanovsky, R. L.; Bartenstein, D. W.; Rogers, G. S.; Isakoff, S. J.; Chen, S. T. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **2019**, *35*, 295-303.
24. Zhu, T. C.; Finlay, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics* **2008**, *35*, 3127-3136.
25. DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications.

- Coordination Chemistry Reviews* **2002**, 233-234, 351-371.
26. Allison, R. R.; Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2010**, 7, 61-75.
 27. Schweitzer, V. G. PHOTOFRIN-mediated photodynamic therapy for treatment of early stage oral cavity and laryngeal malignancies. *Lasers in Surgery and Medicine* **2001**, 29, 305-313.
 28. Yano, S.; Hirohara, S.; Obata, M.; Hagiya, Y.; Ogura, S.; Ikeda, A.; Kataoka, H.; Tanaka, M.; Joh, T. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2011**, 12, 46-67.
 29. Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, 3897-3915.
 30. Awuah, S. G.; You, Y. Boron dipyrromethene (BODIPY)-based photosensitizers for photodynamic therapy. *RSC Advances* **2012**, 2, 11169.
 31. Prieto - Montero, R.; Prieto - Castañeda, A.; Sola - Llano, R.; Agarrabeitia, A. R.; García - Fresnadillo, D.; López - Arbeloa, I.; Villanueva, A.; Ortiz, M. J.; De La Moya, S.; Martínez - Martínez, V. Exploring BODIPY Derivatives as Singlet Oxygen Photosensitizers for PDT. *Photochemistry and Photobiology* **2020**, 96, 458-477.
 32. Yogo, T. Highly Efficient and Photostable Photosensitizer Based on BODIPY Chromophore. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 12162-12163.
 33. Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 77-88.
 34. Chen, K.; Dong, Y.; Zhao, X.; Imran, M.; Tang, G.; Zhao, J.; Liu, Q. Bodipy Derivatives as Triplet Photosensitizers and the Related Intersystem Crossing Mechanisms. *Frontiers in Chemistry* **2019**, 7, 821.
 35. Kang, M.; Zhang, Z.; Xu, W.; Wen, H.; Zhu, W.; Wu, Q.; Wu, H.; Gong, J.; Wang, Z.; Wang, D.; et al. Good Steel Used in the Blade: Well - Tailored Type - I Photosensitizers with Aggregation - Induced Emission Characteristics for Precise Nuclear Targeting Photodynamic Therapy. *Advanced Science* **2021**, 8, 2100524.
 36. Gorbea, M.; Costero, A.M.; Sancenóna, F.; Martínez-Máñeza, R.; Ballesteros-Cillero, R.; Ochando, L.E.; Chulvi, K.; Gotorb, R.; Gilb, S. Halogen-containing BODIPY derivatives for photodynamic therapy. *Dyes and Pigments* **2019**, 160, 198-207.
 37. Pereira, E.; Do Quental, L.; Palma, E.; Oliveira, M. C.; Mendes, F.; Raposinho, P.; Correia, I.; Lavrado, J.; Di Maria, S.; Belchior, A.; et al. Evaluation of Acridine Orange Derivatives as DNA-Targeted Radiopharmaceuticals for Auger Therapy: Influence of the Radionuclide and Distance to DNA. *Scientific Reports* **2017**, 7, 42544.
 38. Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochemistry and Photobiology* **1999**, 70, 391-475.

39. Yu, Z.; Zhou, J.; Ji, X.; Lin, G.; Xu, S.; Dong, X.; Zhao, W. Discovery of a Monoiodo Aza-BODIPY Near-Infrared Photosensitizer: *in vitro* and *in vivo* Evaluation for Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 9950–9964.
40. Zou, J.; Yin, Z.; Ding, K.; Tang, Q.; Li, J.; Si, W.; Shao, J.; Zhang, Q.; Huang, W.; Dong, X. BODIPY Derivatives for Photodynamic Therapy: Influence of Configuration versus Heavy Atom Effect. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9*, 32475-32481.
41. Zhang, Q.; Li, L. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *office Journal of the Balkan Union of Oncology* **2018**, *23*, 561-567.
42. De Freitas, L. M.; Serafim, R. B.; De Sousa, J. F.; Moreira, T. F.; Dos Santos, C. T.; Baviera, A. M.; Valente, V.; Soares, C. P.; Fontana, C. R. Photodynamic therapy combined to cisplatin potentiates cell death responses of cervical cancer cells. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 123.
43. Hwang, H. S.; Shin, H.; Han, J.; Na, K. Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **2018**, *4*, 143-151.
44. Nsole Biteghe, F. A.; Davids, L. M. A combination of photodynamic therapy and chemotherapy displays a differential cytotoxic effect on human metastatic melanoma cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2017**, *166*, 18-27.
45. Wang, G. D.; Nguyen, H. T.; Chen, H.; Cox, P. B.; Wang, L.; Nagata, K.; Hao, Z.; Wang, A.; Li, Z.; Xie, J. X-Ray Induced Photodynamic Therapy: A Combination of Radiotherapy and Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2016**, *6*, 2295-2305.

謝辞

本研究の終わりに鑑み、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 小野 正博 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行および本論文の作成において、終始懇切なる御指導と御教示を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 渡邊 裕之 講師に厚く御礼申し上げます。

懇切なる御指導を戴きました、飯國 慎平 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり討論に参加していただきました、京都大学大学院薬学研究科 貝出 翔 博士、垂水 勇太 修士、中島 一磨 修士、赤坂 貴浩 修士、数多 伸紀 修士、齋藤 浩輔 学士、小原 崇貴 学士、土橋 昌平 学士、白木 香帆 さんをはじめ、病態機能分析学分野の方々に謹んで御礼申し上げます。

最後に研究に専念できるように支え、応援して戴いた家族、友人に心より感謝申し上げます。