

次世代型光線力学療法を指向した
刺激応答型光感受性分子の創製

2021 年度

北 村 貴 士

学位論文 博士（工学）

次世代型光線力学療法を指向した
刺激応答型光感受性分子の創製

2021 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

北村 貴士

目次

略語表.....	iii
序論.....	1
緒言.....	2
第1章 光線力学療法.....	5
1.1 光感受性分子.....	5
1.2 光線力学療法に使用されている光感受性分子.....	6
1.3 光線力学療法と光過敏症.....	8
1.4 刺激応答型光感受性分子.....	10
1.4.1 ポルフィリンを基本骨格とした刺激応答型光感受性分子.....	11
1.4.2 フタロシアニンを基本骨格とした刺激応答型光感受性分子.....	13
1.4.3 BODIPY を基本骨格とした刺激応答型光感受性分子.....	13
1.4.4 セレノローダミンを基本骨格とした刺激応答型光感受性分子.....	15
1.4.5 シアニン誘導体を基本骨格とした刺激応答型光感受性分子.....	17
1.4.6 メチレンブルーを基本骨格とした刺激応答型光感受性分子.....	18
1.4.7 その他の刺激応答型光感受性分子.....	19
第2章 1,3-ジカルボニルエノール構造を持つ天然物.....	23
2.1 ネオカルチノスタチン・クロモフォア.....	23
2.2 ヒポクレリン B.....	28
第3章 過酸化水素とがん.....	33
3.1 生体内での過酸化水素の役割.....	33
3.2 バイオマーカーとしての過酸化水素.....	33
第4章 タンパク質を光分解する光感受性分子.....	36
第5章 本論文の概要.....	40
本論.....	42
第1章 ネオカルチノスタチン・クロモフォアの2-ナフトール部位におけるタンパク質光分解 活性の発見と構造活性相関研究.....	43
1.1 研究目的.....	43
1.2 2-ナフトール誘導体 31 および 57-61 の合成.....	44
1.3 2-ナフトール部位 57 のタンパク質光分解活性評価.....	45
1.4 2-ナフトール誘導体 31 および 57-61 のタンパク質光分解活性評価.....	47
1.5 2-ナフトール誘導体 31 および 57-61 の UV-Vis スペクトル.....	49
1.6 2-ナフトール部位 57 の活性種の同定.....	51
1.6.1 スカベンジャー試験による活性種の推定.....	51
1.6.2 スピントラッピング EPR 法による活性種の同定.....	53
1.7 2-ナフトール誘導体 57 および 59 の一重項酸素生成量評価.....	55
1.8 結論.....	57

第 2 章	ネオカルチノスタチン・クロモフォアの 2-ナフトール部位を基本骨格とした H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子の創製.....	59
2.1	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 62 の分子デザイン	59
2.2	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 62 の合成.....	60
2.3	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 62 の UV-Vis スペクトル.....	61
2.4	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 62 のタンパク質光分解活性評価	61
2.5	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 62 の一重項酸素生成量評価	63
2.6	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 62 の H ₂ O ₂ 応答性評価.....	64
2.6.1	62 の H ₂ O ₂ 濃度依存的応答性評価.....	65
2.6.2	62 の時間依存的 H ₂ O ₂ 応答性評価.....	66
2.6.3	62 の各種 ROS に対する選択性評価	67
2.7	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 62 の光細胞毒性評価.....	68
2.8	結論.....	70
第 3 章	ヒポクレリン B を基本骨格とした H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子の創製.....	72
3.1	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 63 の分子デザイン	72
3.2	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 63 の合成.....	73
3.3	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 63 の UV-Vis スペクトル.....	74
3.4	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 63 のタンパク質光分解活性評価	75
3.5	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 63 の一重項酸素生成量評価	76
3.6	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 63 を用いた EPR 測定.....	78
3.7	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 63 の H ₂ O ₂ 応答性評価.....	79
3.7.1	63 の H ₂ O ₂ 応答性評価.....	80
3.7.2	63 の各種 ROS に対する選択性評価	81
3.8	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 63 の H ₂ O ₂ 存在下での一重項酸素生成量評価	82
3.9	H ₂ O ₂ 応答型光感受性分子 63 の光細胞毒性評価	84
3.10	結論.....	86
	結論.....	89
	実験の部.....	92
	参考文献.....	117
	謝辞.....	127

略語表

Abs	absorbance
Ac	acetyl
ALA	aminolevulinic acid
ALP	alkaline phosphatase
APS	ammonium peroxodisulfate
BHQ-3	black hole quencher 3
BODIPY	borondipyrromethene
BSA	bovine serum albumin
Bu	butyl
CD	circular dichroism
Con A	concanavalin A
DBB	bis(phenylethynyl)benzene
DETAPAC	diethylenetriaminepentaacetic acid
DFT	density functional theory
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNs	2,4-dinitrobenzenesulfonyl
DPBF	1,3-diphenylisobenzofuran
DPP	diketopyrrolopyrrole
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPR	electron paramagnetic resonance
ER- α	estrogen receptor α
ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
FAP	fibroblast activation protein
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GGT	γ -glutamyl transpeptidase
GSH	glutathione
HER	human epidermal growth factor receptor
HIV	human immunodeficiency virus
hNQO1	human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
HPLC	high performance liquid chromatography

HRMS	high-resolution mass spectrometry
ICT	intramolecular charge transfer
LAP	leucine aminopeptidase
LDA	lithium diisopropylamide
LED	light emitting diode
Lyso	hen egg lysozyme
MAL	methyl aminolevulinate
MB	methylene blue
Me	methyl
MEM	Eagle's minimum essential medium
MS	molecular sieve
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-3-yl)-2,5-diphenyl-2 <i>H</i> -tetrazolium bromide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCS	neocarzinostatin
NCS-chr	neocarzinostatin chromophore
NMR	nuclear magnetic resonance
NTR	nitroreductase
OPD	<i>o</i> -phenylenediamine
PBS	phosphate buffered saline
PDT	photodynamic therapy
PeT	photo-induced electron transfer
PIT	photoimmunotherapy
PP	pyropheophorbide a
ROS	reactive oxygen species
rt	room temperature
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SMA	poly(styrene-co-maleic acid)
TBHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
TD-DFT	time-dependent density functional theory
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography
TMS	trimethylsilyl
TO	thiazole orange
TOF	time of flight
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TsOH	toluenesulfonic acid
UV	ultraviolet

Vis	visible
WM	weight marker
4-Oxo-TEMP	2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone
4-Oxo-TEMPO	2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone-1-oxyl

序論

緒言

がんは、1981年以降、日本における死因順位第1位の疾病であり、高齢化を主な要因として、罹患数および死亡数ともに年々増加し続けている¹。2020年には、年間で37万人以上ががんで亡くなり、死亡総数に占めるその割合は27.6%にのぼる²。世界的にも、がんの罹患数および死亡数は増加し続けており³、世界保健機関（world health organization, WHO）の附属機関である国際がん研究機関（international agency for research on cancer, IRAC）の推計では、2020年に世界で約1930万人ががんに罹患し、約1000万人ががんで死亡したとみられる⁴。さらに、調査した183か国のうち112か国において、がんが70歳未満の死因順位の第1位または第2位を占めている。2040年には、世界で年間に約2840万人ががんに罹患すると推定され、特に現段階では高齢者の割合が低い国々において、今後の高齢化に伴い、がん患者が著しく増加すると予想されている。

このような背景から、がんに対する治療薬および治療法の開発は、近年特に盛んに行われている。現在のがんの治療法としては、主に外科手術、薬物療法および放射線療法が挙げられ、さらに薬物療法としては、古典的抗がん剤を用いる化学療法、分子標的薬、ホルモン療法、免疫療法などが挙げられる。加えて、最近では、薬剤の種類が多様化し、薬剤として用いられる物質の種類ごとに分類されている。従来の低分子医薬、抗体医薬のほか、抗体-薬物複合体⁵や中分子（ペプチド）医薬⁶、核酸医薬⁷、細胞治療⁸など、その種類は多岐にわたり、様々な創薬手法・治療手段（モダリティ）からの創薬研究がなされている。

一方で、光感受性分子は、特定波長の光照射により励起し、長寿命の三重項励起状態を経て、酸素など周囲の別の分子との間でのエネルギー移動や電子移動を引き起こす化合物である。本性質により光感受性分子は、光酸素化および光酸化反応などの有機合成反応⁹から、核酸、タンパク質、糖鎖など生体高分子の光分解および光修飾¹⁰⁻¹³、さらには光線力学療法（photodynamic therapy, PDT）¹⁴⁻¹⁷などに利用されている。中でも、PDTは、光感受性分子とレーザー光を用いた標的病理組織を選択的に治療可能な低侵襲性の治療手法である。日本においては、早期肺がん、表在型食道がん、表在型早期胃がん、子宮頸部初期がんおよび異形成¹⁸、加齢黄斑変性症¹⁹、および原発性悪性脳腫瘍、加えて、2015年には、化学放射線療法または放射線療法後の局所遺残・再発食道がんに対する治療において保険適用されており²⁰、とりわけ、がん治療の分野において、がんに対する従来の外科手術や薬物療法、放射線療法とは異なる新たなモダリティとして注目されている。しかし、PDTに使用される既存の光感受性分子は、腫瘍組織のみならず正常組織にも取り込まれるため、手術中、患者の眼や皮膚など正常組織が光に曝露されないようカバーで覆って保護する必要がある¹⁸⁻²⁰。加えて、PDT治療後も、太陽光や室内灯による正常組織への副作用（光過敏症）を引き起こすため、光曝露への対策が必要である¹⁸⁻²⁰。具体的には、患者は、光感受性分子が体外に排出されるまで2週間～数週間、遮光カーテン等を用いて照度を低く調整した室内で過ごす必要があり、かつ光過敏症が消失後も外出の際は太陽光を避けるため、帽子、手袋、長袖の衣類およびサングラスの着用が推奨されている。このように、PDTの低侵襲性や治療部位選択性は魅力的である一方、光過敏症の副作用は、患者の生活に多大な制約を与えるため、これら問題の解決が求められている。

この解決のため、様々な研究がなされているが、代表的な手法の一つとして、光免疫療法（photo

immunotherapy, PIT) が挙げられる²¹。本手法では、がん細胞に過剰発現する膜タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体に対し、光感受性分子を連結した抗体-光感受性分子複合体を用い、腫瘍組織への集積性を向上させることで、正常組織への副作用の低減を達成している。2011年、小林らは、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR または HER1) に特異的に結合するパニツムマブ、あるいはヒト上皮成長因子受容体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) に特異的に結合するトラスツズマブに対し、光感受性分子であるフタロシアニン誘導体 IRDye[®] 700DX (IR700) を連結した抗体-光感受性分子複合体を開発し、EGFR あるいは HER2 過剰発現細胞を担持したマウスを用いて、*in vivo* において本複合体が標的組織に高選択的に集積し、効果的な治療効果が得られることを実証した²²。さらに、2020年、抗体部分を変更した抗ヒト EGFR モノクローナル抗体セツキシマブ-IR700 複合体 (セツキシマブ サロタロカンナトリウム、商品名: アキシャルックス[®]) が日本において、切除不能な局所進行または局所再発の頭頸部がんに対して、条件付き早期承認され、販売が開始されている (Figure 1)²³。このように光免疫療法は、PDT の欠点を改善した新手法として広く使用され始めている。しかし、本手法は、抗体を用いてがん細胞を識別するため、標的可能な物質が細胞表面の膜タンパク質などに限られ、細胞内の過剰発現因子を標的とすることは困難である。

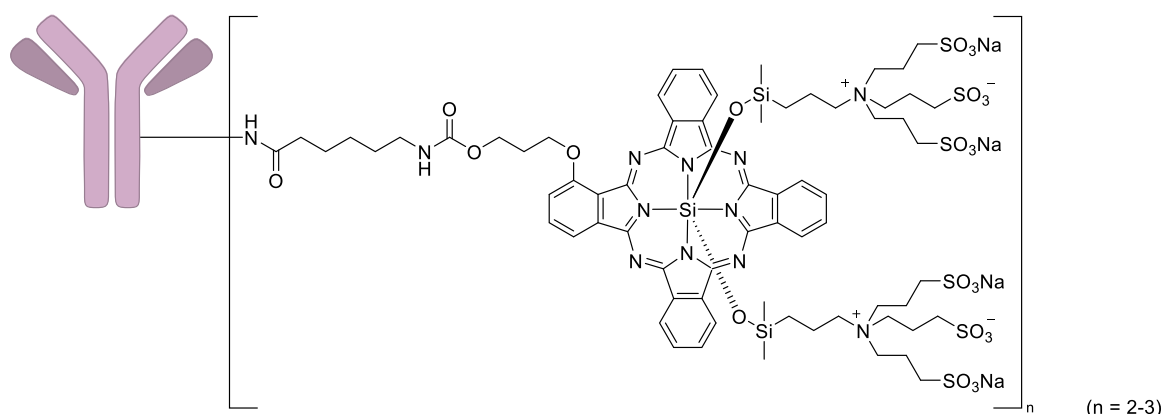


Figure 1 セツキシマブ サロタロカンナトリウム (商品名: アキシャルックス[®]) の化学構造

一方で、腫瘍組織への集積性の向上で PDT の副作用を低減しようとする光免疫療法とは別のアプローチとして最近、刺激応答型光感受性分子 (activatable photosensitizer) が注目されている²⁴。本分子は、光感受性分子をプロドラッグ化した化合物である。従来の光感受性分子は、光感受性が「常に ON」である一方 (Figure 2a)、刺激応答型光感受性分子は、それ自体の光感受性は OFF であり、腫瘍組織に特異的に過剰発現するバイオマーカーに応答して光感受性が ON である光感受性分子に変換、あるいは光感受性が ON である光感受性分子を放出する分子である。そのため、正常組織に取り込まれた場合においても光感受性は OFF のままであり、光過敏症の抑制が期待される。一方、腫瘍組織に取り込まれるとバイオマーカーと反応して光感受性が ON である光感受性分子に変換、あるいは光感受性分子を放出するため、腫瘍組織に対する高選択的な治療効果を望むことができる (Figure 2b)。そこで著者は、新たな刺激応答型光感受性分子をデザインし、その有用性を実証することで、本手法による医薬品開発に大きく貢献できると考え、光感受性の

OFF/ON を制御可能な新たな光感受性分子の探索と、光感受性分子にがん細胞に過剰発現するバイオマーカーとの応答部位を付与した刺激応答型光感受性分子の創製を行った。

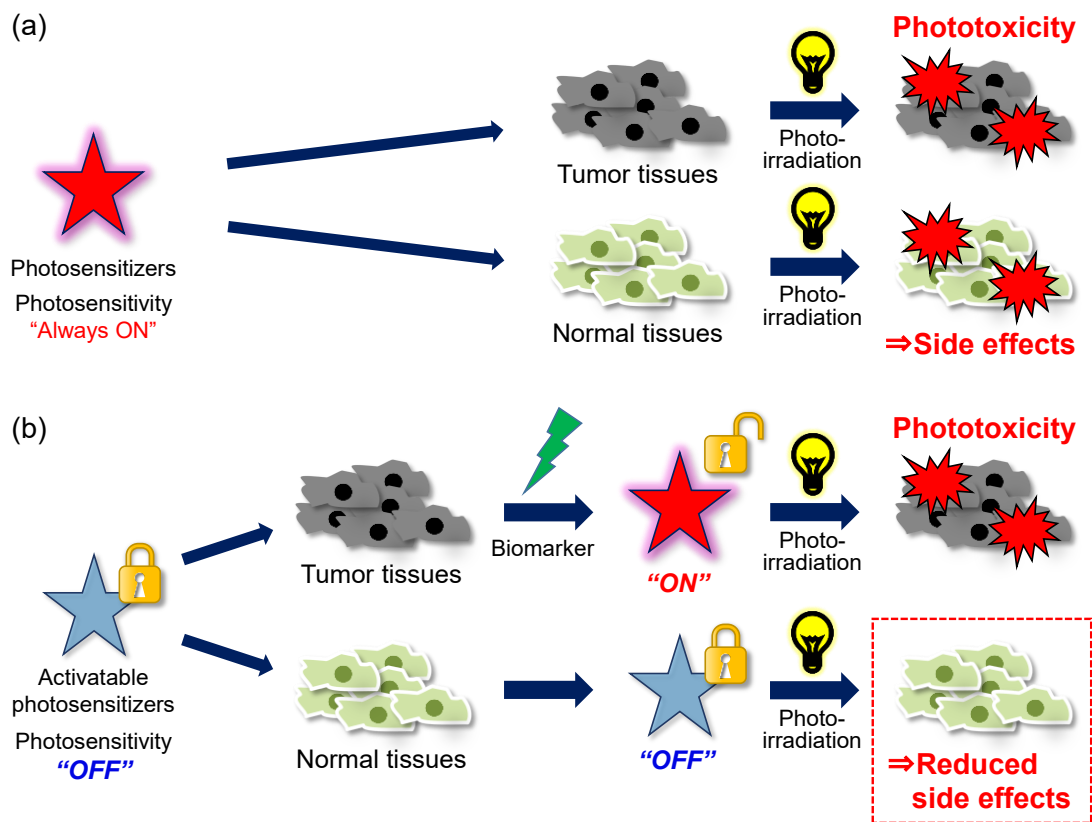


Figure 2 (a)従来の光感受性分子および(b)刺激応答型光感受性分子による光毒性発現

第 1 章 光線力学療法

1.1 光感受性分子

光感受性分子は、特定波長の光照射により励起し、近傍の酸素分子を活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) へと変換する。ROS とは、酸素分子から生成する反応性の高い化学種の総称であり、主に一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) やスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) が挙げられる。光感受性分子による ROS の生成機構を **Figure 1.1.1** に示す^{25,26}。基底状態にある光感受性分子が光照射により励起すると、一重項励起状態となる。その後、項間交差により比較的長寿命な三重項励起状態へと遷移する。この三重項励起状態にある光感受性分子が、基底状態にある他の光感受性分子や、溶媒、生体内の種々の構成成分などから、一電子を受け取る、あるいは水素原子を引き抜くことで、ラジカルやラジカルイオンを生成する。これらのラジカルやラジカルイオンは、容易に周囲の酸素分子と反応し、酸素化あるいは酸化された別の物質に変換されたり、酸素分子に一電子を与えることでスーパーオキシドアニオンの生成を引き起こす。生じたスーパーオキシドアニオンはさらに、不均化反応により過酸化水素を与え、過酸化水素は、生体内の鉄イオン (Fe^{2+}) やその他の金属イオンとの Fenton 反応で、ヒドロキシラジカルを与える。このようなラジカルやラジカルイオンを経由した光感受性分子による ROS 生成機構を type I 機構と呼ぶ。また、三重項励起状態の光感受性分子から三重項基底状態の酸素分子へのエネルギー移動が起こると、一重項酸素を生成する。このようなエネルギー移動を経由した光感受性分子による ROS 生成機構を type II 機構と呼ぶ。こうして生成した ROS は、核酸やタンパク質、糖鎖、脂質など生体内の様々な構成成分に酸化的ダメージを与え、細胞死を引き起こす。

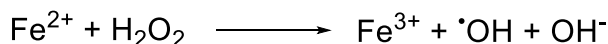
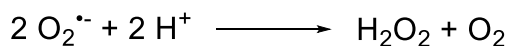
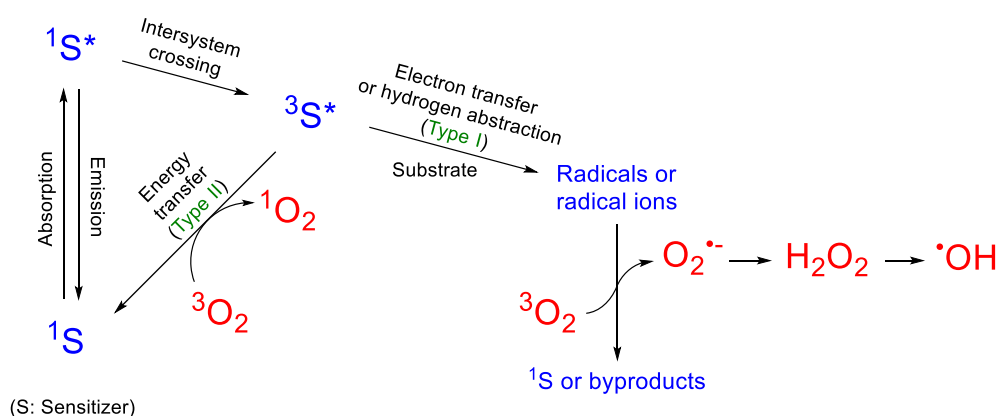


Figure 1.1.1 光感受性分子による活性酸素種の生成機構

1.2 光線力学療法に使用されている光感受性分子

現在、PDT用の光感受性分子として臨床承認されている光感受性分子は主にポルフィリン系化合物である（Table 1.1.1 および Figure 1.1.2）²⁷⁻²⁹。第一世代のPDT光感受性分子であるポルフィマーナトリウム（フォトフリン[®]）は、日本を含め世界各国で臨床承認されており、日本では、早期肺癌、表在型食道がん、表在型早期胃がん、子宮頸部初期がんおよび異形成に対するPDTにおいて保険適用されている¹⁸。しかし、1.3節で後述するように、ポルフィマーナトリウムは光過敏症の副作用が長期間継続するため、患者の生活への制約が非常に大きかった。この課題を解決するため、第二世代のPDT光感受性分子がこれまでに数多く開発され、その一部は臨床承認されて使用されている。日本においては、タラポルフィンナトリウム（レザフィリン[®]）が、早期肺癌、原発性悪性脳腫瘍、および化学放射線療法または放射線療法後の局所遺残・再発食道がんに対するPDTにおいて²⁰、ベルテポルフィン（ビスダイン[®]）が加齢黄斑変性症に対するPDTにおいて保険適用されている¹⁹。海外では、ヨーロッパにおいて、テモポルフィン（Foscan[®]）やパデリポルフィン（Tookad[®]）が特定のがんに対するPDTに臨床承認済みである。また、光感受性分子プロトポルフィリンIXの前駆体である5-アミノレブリン酸（5-ALA, Ameluz[®], Levulan[®]）やアミノレブリン酸メチル（MAL, Metvix[®]）は海外において、皮膚の日光角化症に対するPDTの塗布薬として臨床承認されている。なお、5-ALAは日本においては、膀胱がんや悪性神経膠腫の診断薬としてのみ臨床承認されている³⁰。以上の第二世代のPDT光感受性分子は、第一世代のポルフィマーナトリウムと比較すると、光過敏症の継続期間が短縮されたものの、一定期間は光過敏症の対策をした制約のある生活をする必要があり、依然として光過敏症の副作用は解決されていない³¹。Figure 1.1.3に示すように、現在臨床試験中のPDT光感受性分子がある一方、光過敏症を解決可能な新たなタイプの光感受性分子の開発が強く求められている。

Table 1.1.1 臨床承認済みのPDT用光感受性分子

Photosensitizer (Trade name)	Treatment wavelength	Indication	Route of administration	Year approved	Country
Porfimer sodium (Photofrin [®])	630 nm	Lung and esophageal cancer	Intravenous	1993	Worldwide (including Japan)
5-Aminolevulinic acid, 5-ALA (Ameluz [®] , Levulan [®])	635 nm	Actinic keratosis	Topical, oral or intravenous	1999	Worldwide (Only for diagnostic purpose in Japan)
Methyl aminolevulinate, MAL (Metvix [®])	635 nm	Actinic keratosis, basal cell carcinoma	Topical	2004	Worldwide (Not in Japan)
Verteporfin (Visudyne [®])	689 nm	Age-related macular degeneration	Intravenous	2000	Worldwide (including Japan)
Temoporfin (Foscan [®])	652 nm	Head and neck squamous cell carcinoma	Intravenous	2001	European union
Talaporfin sodium (Laserphyrin [®])	664 nm	Lung, brain and esophageal cancer	Intravenous	2004	Japan
Padeliporfin (Tookad [®])	753 nm	Prostate cancer	Intravenous	2017	European union

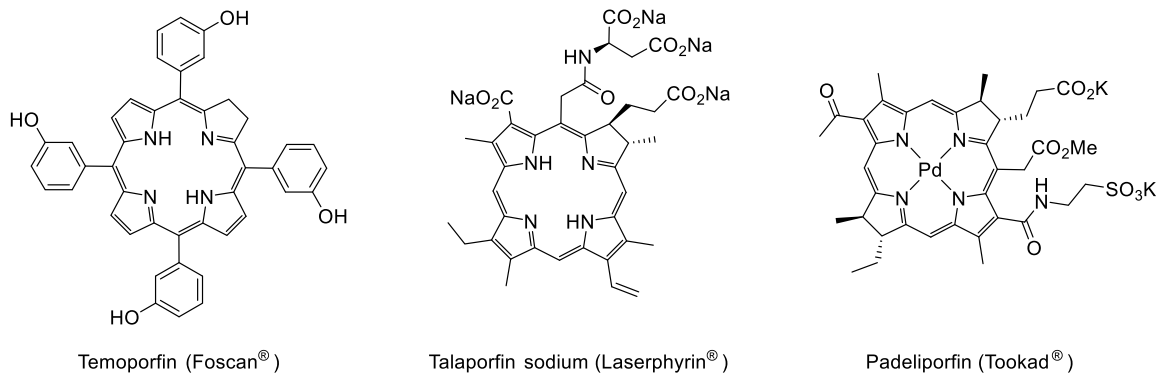
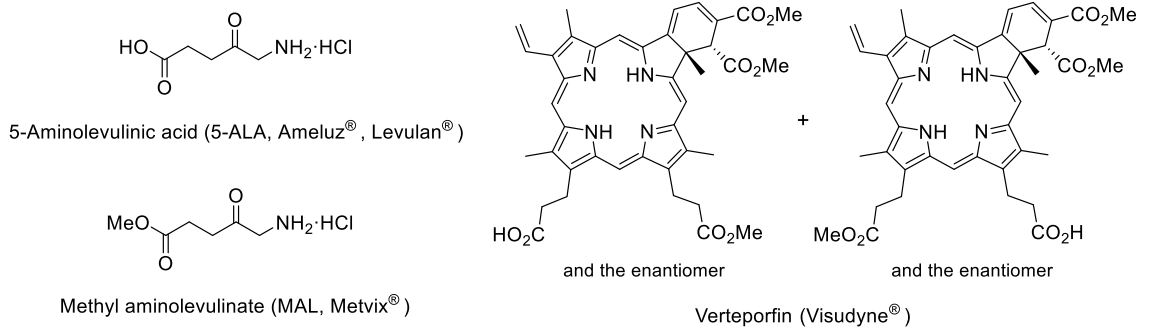
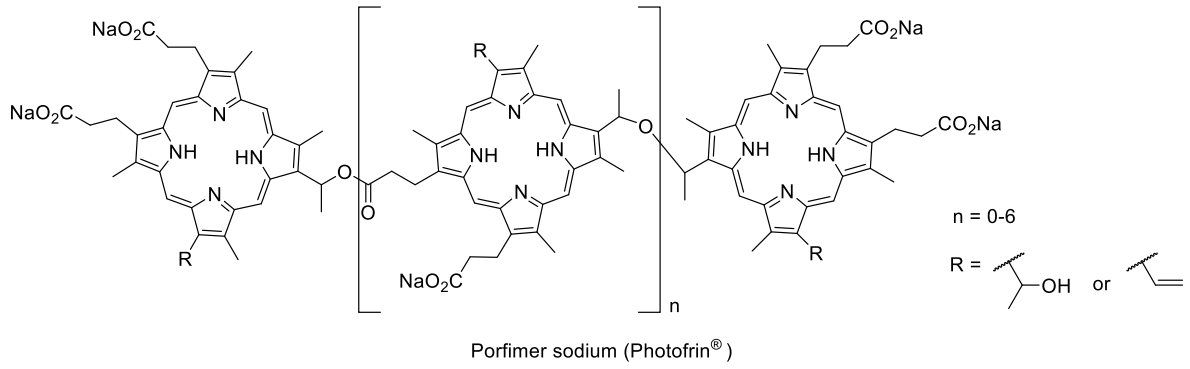


Figure 1.1.2 臨床承認済みの PDT 用光感受性分子の化学構造

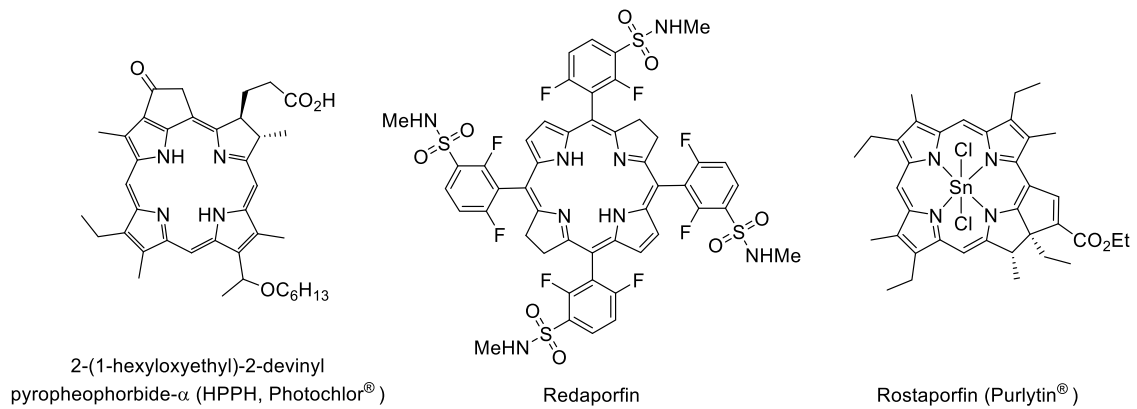


Figure 1.1.3 臨床試験段階の PDT 用光感受性分子の化学構造

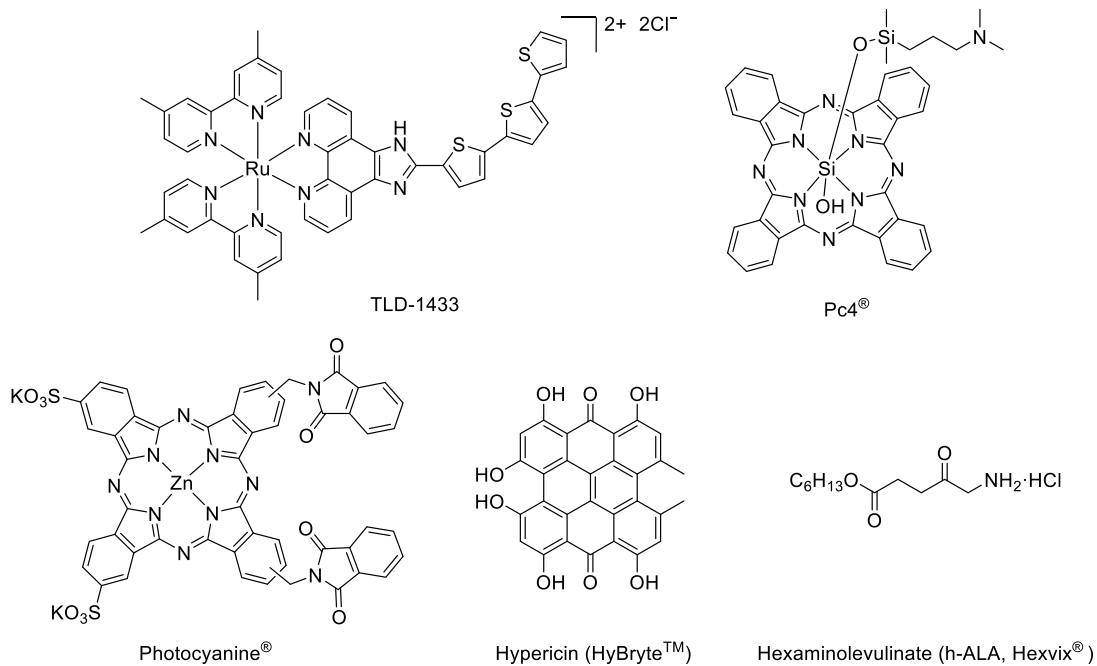


Figure 1.1.3 臨床試験段階の PDT 用光感受性分子の化学構造 (続き)

1.3 光線力学療法と光過敏症

PDT における治療手順および光過敏症に対する現在の対策に関して、日本で承認されているポルフィマーナトリウム¹⁸およびタラポルフィンナトリウム²⁰を例に以下に述べる。

治療手順に関して、まずは、光感受性分子を主に静脈内注射により投与する (Figure 1.1.4)。ポルフィリン系化合物はそれ自体に、ある程度の腫瘍組織集積性を有するため³²、腫瘍組織とその他の正常組織における光感受性分子の組織内濃度の差が大きくなったタイミングを見計らって病巣部位にレーザー光照射を行う。ポルフィマーナトリウムの場合、静脈内注射の 48~72 時間後、タラポルフィンナトリウムの場合、静脈内注射の 4~6 時間後 (原発性悪性脳腫瘍治療の場合は 22~26 時間後) に、内視鏡状あるいは気管支鏡状のレーザー照射装置を用いて、レーザー光照射を実施する。PDT に用いられるレーザー光の波長は主に、生体透過性が高いとされる 600-900 nm³³ (文献によっては、600-800 nm^{16,17}, 650-850 nm³⁴, 650-900 nm³⁵, 700-900 nm²⁹ など) である。本波長以下では、生体内のヘモグロビンなどによる光の吸収の影響が大きく、本波長以上では、生体

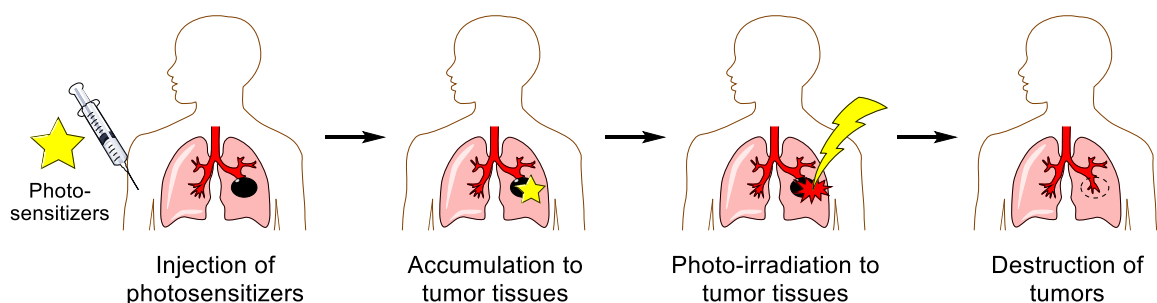


Figure 1.1.4 PDT の治療手順

内の水による光の吸収の影響が大きいため、本波長領域は“phototherapeutic window（生体の窓）”と呼ばれている。皮膚組織における本波長領域の光の透過距離は、633 nm において 1.7 mm および 660 nm において 1.8 mm とする報告例³⁶や、組織表面での光の強度の 37%に減衰する距離が 630 nm において約 1-3 mm とする報告例²⁸がある。ポルフィマーナトリウムの場合、630 nm のレーザー光を治療部位に応じて 100 J/cm² 前後照射し、タラポルフィリンナトリウムの場合は、664 nm, 150 mW/cm² のレーザー光を 100 J/cm²（照射時間: 11 分 7 秒）あるいは 27 J/cm²（照射時間: 3 分）照射する。以上のような治療により、がん細胞を直接死滅させたり、腫瘍組織内の微小血管に障害を与えて酸素や栄養分の供給を阻害するほか、このようにダメージを受けたがん細胞は特徴的な分子を細胞表面に提示したり、放出したりするため、炎症反応が誘導されて細胞死を引き起こす^{15,37}。

しかし、1.2 節で述べた通り、PDT においては光過敏症の副作用が解決すべき重要な課題として残されている。まず、レーザー光照射時における光過敏症の対策としては、

- ・患者の眼や皮膚が光に曝露されないようにカバーで覆うなどの保護手段を施すこと。
- ・无影灯等の手術用照明は必要最小限とすること。
- ・病巣の周辺部以外の正常組織への光照射は、極力抑えるように注意すること。

が挙げられている^{18,20}。次に、レーザー光照射後の光過敏症の対策としては、光感受性分子が体外に排出されるまでの一定期間、遮光カーテン等を用いて照度を低く調整した室内で過ごす必要がある。具体的には、

- ・ポルフィマーナトリウムの場合：投与後少なくとも 1 か月間は直射日光および電気スタンド等の集中光を避け、薄暗い室内（100～300 ルクス）で過ごすこと。
- ・タラポルフィリンナトリウムの場合：投与後 2 週間は直射日光を避け、遮光カーテン等を用いて照度 500 ルクス以下に調整した室内で過ごすこと。また、投与後 3 日間はサングラスをかけること。

とされている。加えて、上記期間経過後、光に曝露された際に光過敏症を発症するかどうかは、実際に指や手掌背部に直射日光を当てて試験する。具体的には、

- ・ポルフィマーナトリウムの場合：投与から 1 か月経過後に指や手掌背部を直射日光で 5 分間曝露させたとき、紅斑や水疱等の光過敏症を示した場合には、さらに 2 週間直射日光および集中光を避け、異常が見られなくなるまで同様の試験を繰り返すこと。
- ・タラポルフィリンナトリウムの場合：投与から 2 週間経過後に指や手掌背部を直射日光で 5 分間曝露させたとき、紅斑や水疱等の光過敏症を示した場合には、さらに 1 週間直射日光を避け、異常が見られなくなるまで同様の試験を繰り返すこと。

とされている。実際に上記試験を実施する際には、例えば、手の甲に 2 cm 四方の穴を開けた遮光性手袋を装着して最小限の照射範囲で試験する例が報告されているが³⁸、光過敏症の有無を実際に光照射を実施して試験する必要があるため、患者の体への負担を強いることとなる。また、光過敏症の症状が消失後も投与後一定期間（タラポルフィリンナトリウムの場合は 4 週間）以内の外出の際は、太陽光を避けるため、帽子、手袋、長袖の衣類およびサングラスの着用が推奨されている。このように、光過敏症の副作用は、患者の生活に多大な制約を与えるため、これら問題の解決が求められている。

1.4 刺激応答型光感受性分子

光過敏症の解決のため、とりわけ最近、刺激応答型光感受性分子の開発が精力的に行われている²⁴。刺激応答型光感受性分子のデザイン戦略としては主に、

- 1) 光感受性分子に、バイオマーカーで切断可能なリンカーを介して消光剤を連結し、バイオマーカーとの反応後は、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) が起こらなくなることで、光感受性を回復する手法。
- 2) バイオマーカーとの反応により、光誘起電子移動 (photo-induced electron transfer, PeT) が起こらなくなることで、光感受性を回復する手法。
- 3) バイオマーカーとの反応により、吸収波長が長波長シフトした、あるいは長波長領域に新たな吸収帯を有する光感受性分子を放出し、バイオマーカーとの反応前後での吸光度差を利用して、バイオマーカーと反応後の光感受性分子を選択励起する手法。
- 4) バイオマーカーとの反応により、光感受性分子を放出することで、項間交差の効率を向上させ、ROS を生成するのに必要な三重項励起状態への遷移比率を上昇させる手法。
- 5) DNA にインターカレートした際に光感受性を示す光感受性分子や、凝集誘起発光を利用した光感受性分子などに対して、物性を変化させるバイオマーカー応答部位を導入し、バイオマーカーとの反応により、元の物性を示す光感受性分子を放出する手法。

などが挙げられ (Figure 1.1.5)、いくつかの種類的光感受性分子を基本骨格として、刺激応答型光感受性分子の開発が達成されている。しかし、1)のような光感受性分子に消光剤を連結する戦略

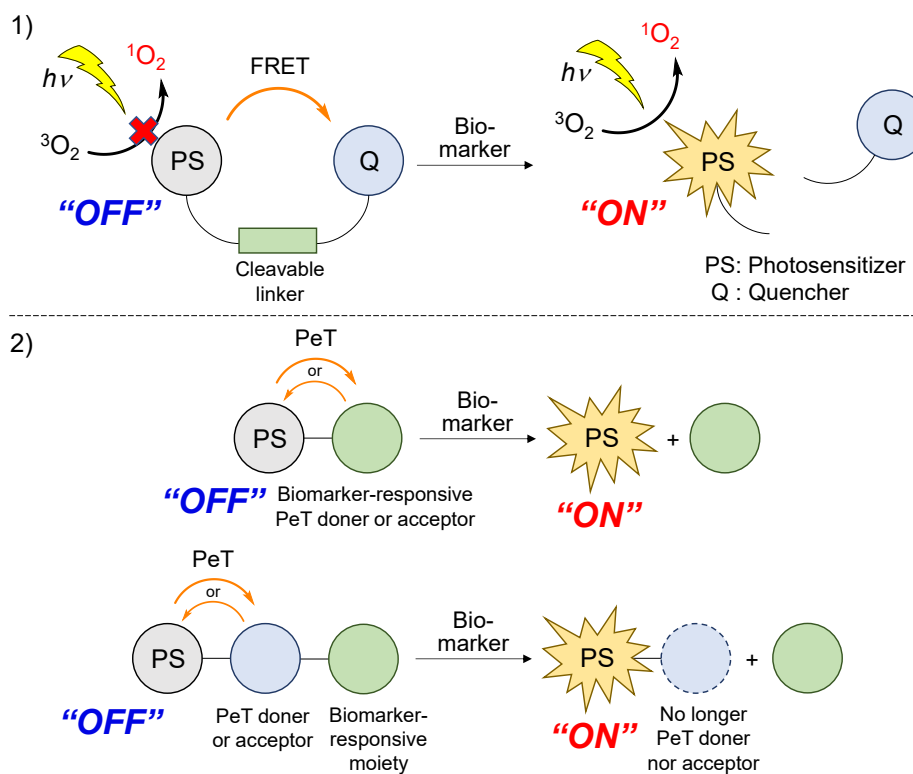


Figure 1.1.5 刺激応答型光感受性分子のデザイン戦略

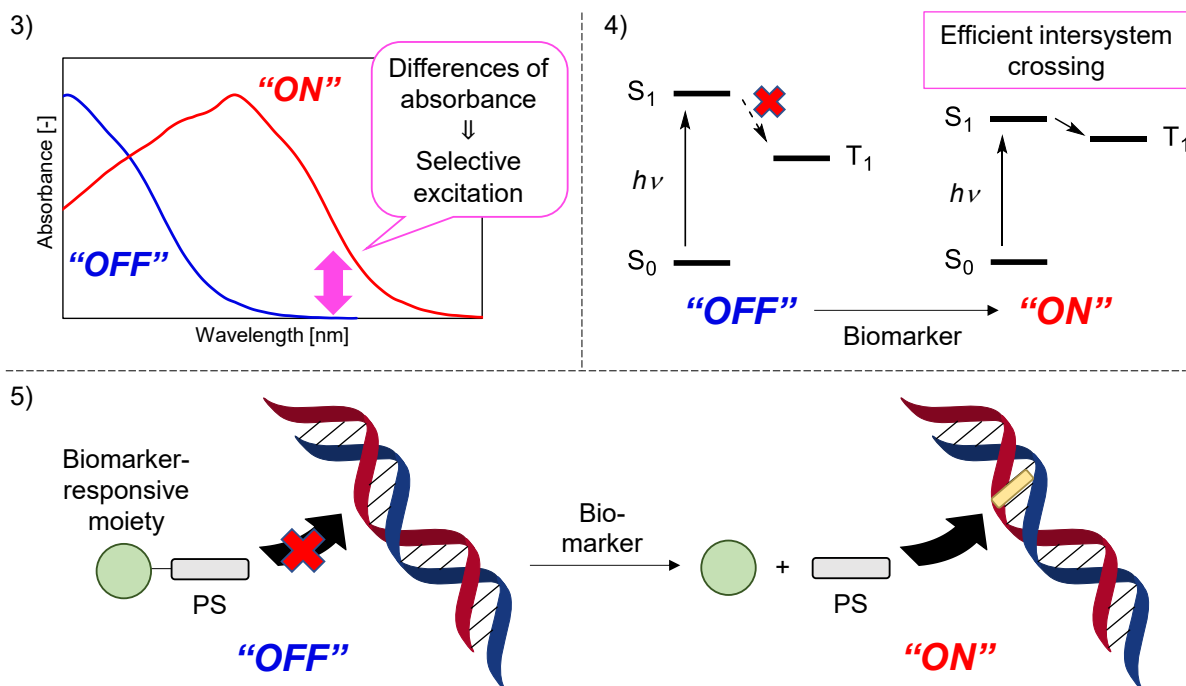


Figure 1.1.5 刺激応答型光感受性分子のデザイン戦略 (続き)

では、元の光感受性分子と比較して、分子構造が大きくなる上、光感受性分子およびバイオマーカー応答部位に加えて、消光剤を有することで、生体内でのオフターゲット効果が高まる恐れがある。また、2)-5)の中には、刺激応答型蛍光分子として報告されていた蛍光分子に対し、重原子を導入することで刺激応答型光感受性分子に変換した例が多く、光感受性の OFF/ON を制御可能な光感受性分子の開発は、蛍光の OFF/ON を制御可能な蛍光分子に依存しているのが現状である。そのため、光感受性の OFF/ON を制御可能な新たな種類の光感受性分子の開発と刺激応答型光感受性分子への応用は、学術的にも医薬品開発への応用の観点からも有用である。以下に、これまでに開発された刺激応答型光感受性分子の例を述べる。

1.4.1 ポルフィリンを基本骨格とした刺激応答型光感受性分子

2009年、Zhengらは、光感受性分子であるピロフェオホルビド a (PP) と消光剤 BHQ-3 とを、線維芽細胞活性化タンパク質 (fibroblast activation protein, FAP) により特異的に切断されるアミノ酸配列を含んだリンカーで連結した刺激応答型光感受性分子 **FAP-PPB** を報告している³⁹ (Figure 1.1.6)。FAPとは、細胞膜上に存在するセリンプロテアーゼであり、ヒト上皮性腫瘍におけるがん関連線維芽細胞において過剰発現している。**FAP-PPB**は、光照射により励起後、ピロフェオホルビド a から BHQ-3 への FRET により消光するため、光感受性は OFF である。これに対して、FAP によるリンカー切断後は、FRET が起こらなくなるため、光感受性が ON となる。670 nm の光照射下における光細胞毒性を評価した結果、**FAP-PPB** は、FAP 遺伝子をトランスフェクションしていない HEK293 細胞と比較して、トランスフェクションした HEK293 細胞に対して選択的な光細胞毒性を発現することを明らかにした。しかし、その選択性の程度には課題が残されていた。

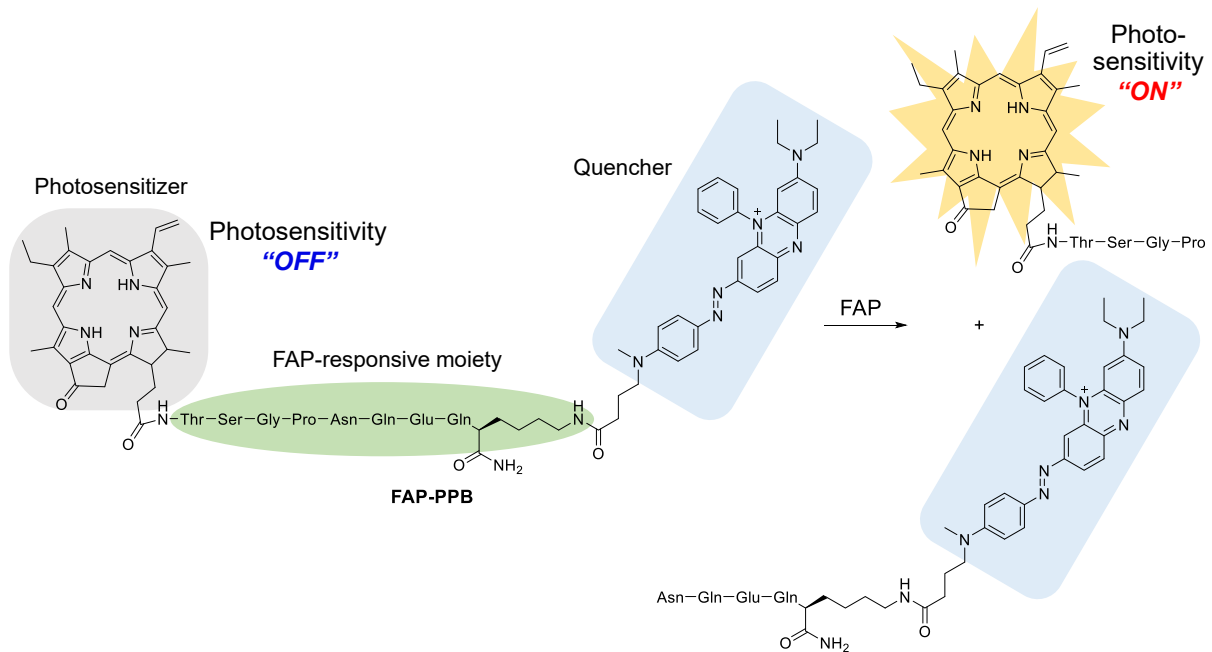


Figure 1.1.6 ポルフィリンを基本骨格とした FAP 応答型光感受性分子 FAP-PPB

2009 年、McCarthy らは、光感受性分子であるポルフィリン誘導体 **4-mPEG** に、がん細胞に過剰発現するグルタチオン (GSH) に応答する 2,4-ジニトロベンゼンスルホニル (DNs) 基を導入した刺激応答型光感受性分子 **4SAM-mPEG** を報告している⁴⁰ (Figure 1.1.7)。DNs 基は、GSH などのチオール応答部位であるとともに、PeT により様々な蛍光分子を消光することが見出されている⁴¹。**4SAM-mPEG** は、低い一重項酸素生成量子収率 ($\Phi_{\Delta} = 0.07$) を示す一方、チオールとの反応後に生成する **4-mPEG** は、高い一重項酸素生成量子収率 ($\Phi_{\Delta} = 0.61$) を示すことを明らかにしている。しかし、**4SAM-mPEG** の細胞内での効果は明らかにされていない。

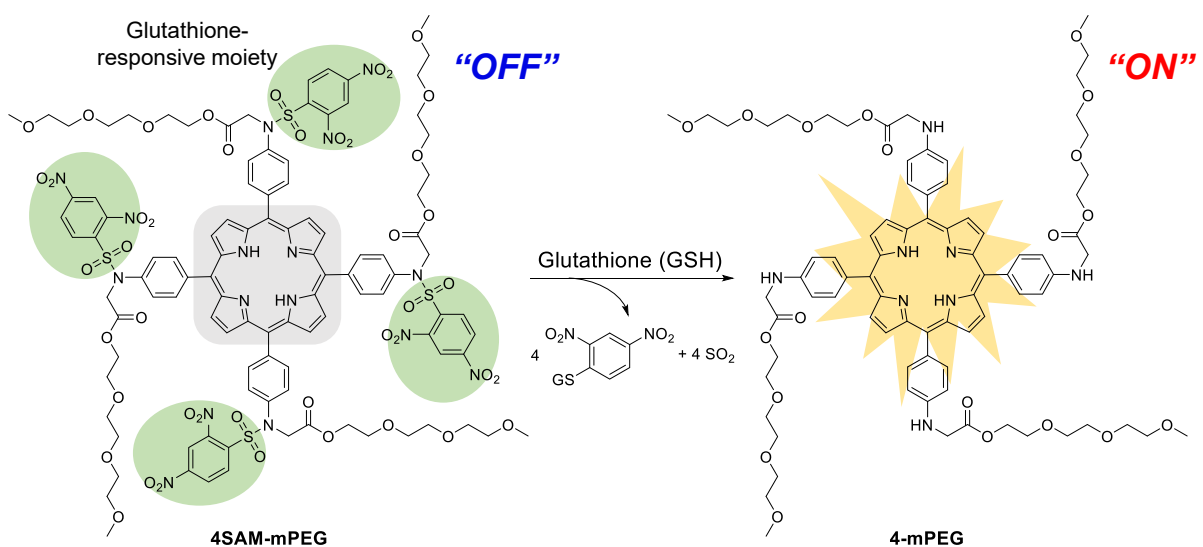


Figure 1.1.7 ポルフィリンを基本骨格としたグルタチオン応答型光感受性分子 4SAM-mPEG

1.4.2 フタロシアニンを基本骨格とした刺激応答型光感受性分子

2014年、Ngらは、光感受性分子であるフタロシアニン誘導体 **1** が有する水酸基に、グルタチオン (GSH) 応答部位として 2,4-ジニトロベンゼンスルホニル (DNs) 基を導入した刺激応答型光感受性分子 **2** を報告している⁴² (Figure 1.1.8)。 **2** の光感受性は、PeTにより OFF であるが、 **2** は GSH と反応して、高い一重項酸素生成能を示す **1** を放出することを明らかにしている。さらに、 **2** はヒト乳がん細胞 MCF-7 に対し、照射 ($\lambda > 610 \text{ nm}$) 下において **1** と同等の高い光細胞毒性を示すことを見出した。しかし、 **2** の正常細胞に対する細胞毒性評価は行っておらず、がん細胞に対して選択的に光細胞毒性を発現するかは明らかにされていない。

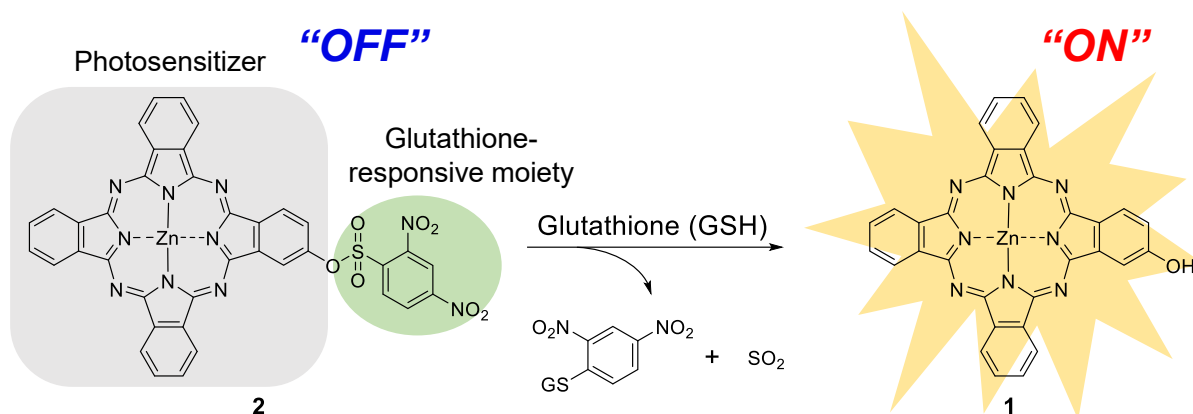


Figure 1.1.8 フタロシアニンを基本骨格としたグルタチオン応答型光感受性分子 **2**

1.4.3 BODIPY を基本骨格とした刺激応答型光感受性分子

2005年、O'Sheaらは、光感受性分子であるアザ-BODIPY誘導体を基本骨格とし、がん細胞の微小環境である低 pH に応答する部位としてジエチルアミノ基を連結した刺激応答型光感受性分子 **4** を報告している⁴³ (Figure 1.1.9)。 **4** は、中性条件では脱プロトン化された状態で、隣接する芳香環からアザ-BODIPY への PeT により消光しているが、がん細胞における低 pH 環境により、ジエチルアミノ基がプロトン化されると、PeT が起こらなくなり、光感受性が ON になる。しか

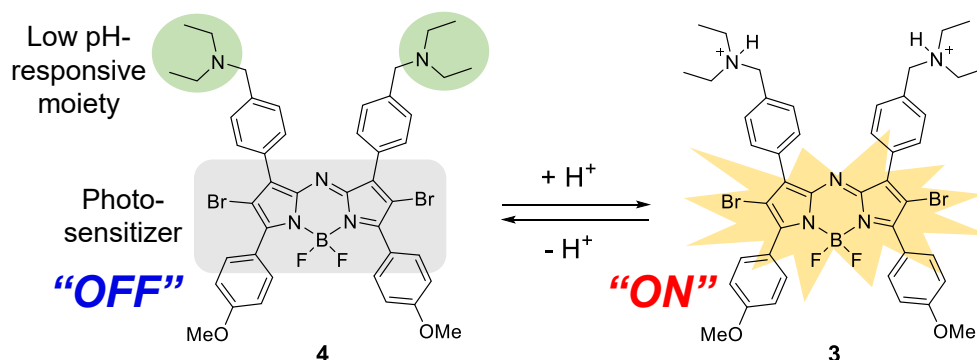


Figure 1.1.9 アザ-BODIPY を基本骨格とした低 pH 応答型光感受性分子 **4**

し、4 が 600-750 nm の光照射下、正常細胞に対して光細胞毒性を発現することが示された一方、がん細胞に対する細胞毒性は不明であり、細胞種選択性は明らかにされていない。

2014 年、Akkaya らは、刺激応答型蛍光分子として報告されていた BODIPY 誘導体⁴⁴を基に、ブロモ基を導入して光感受性分子に変換した BODIPY 誘導体 5 を開発し、5 に対し、グルタチオン (GSH) 応答部位である 2,4-ジニトロベンゼンスルホニル (DNs) 基を連結した刺激応答型光感受性分子 6 を報告している⁴⁵ (Figure 1.1.10)。6 の一重項酸素生成は、PeT により OFF である一方、6 は GSH と反応して、光感受性が ON である 5 を生成することを明らかにしている。加えて、6 のヒト大腸がん細胞 HCT116 および正常細胞 MRC-5 に対する光細胞毒性を 625 nm の光照射下において評価した結果、6 は HCT116 細胞選択的な光細胞毒性を発現することを見出している。

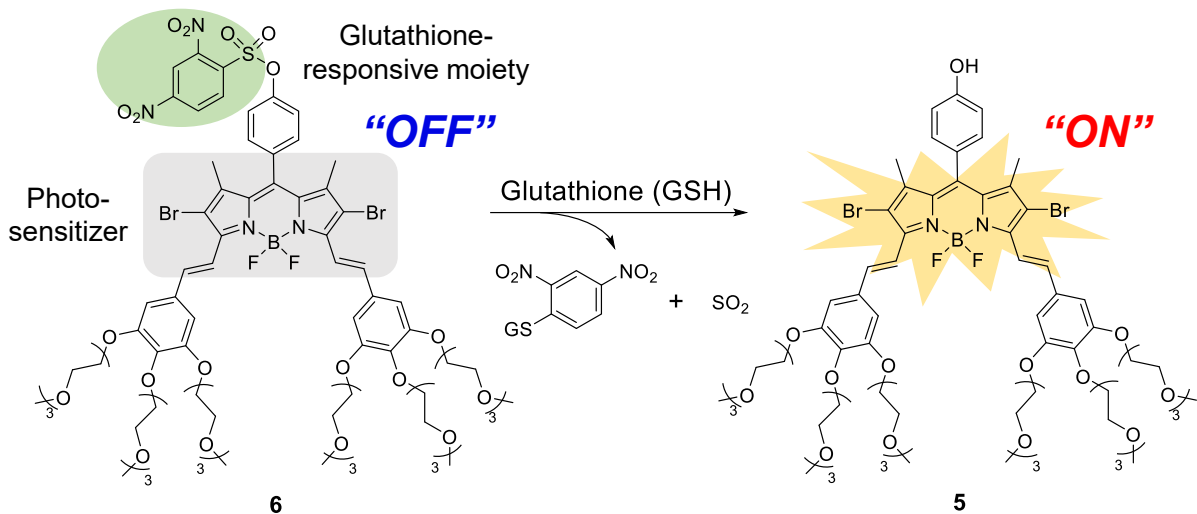


Figure 1.1.10 BODIPY を基本骨格としたグルタチオン応答型光感受性分子 6

2020 年、Zhang らは、刺激応答型蛍光分子として報告されていた BODIPY 誘導体⁴⁶に対し、ヨウ素原子を導入した光感受性分子である BODIPY 誘導体 7 に、がん細胞に過剰発現する H_2O_2 に対して応答する芳香族ボロン酸エステルを連結した刺激応答型光感受性分子 8 を報告している⁴⁷ (Figure 1.1.11)。8 の光感受性は、ピリジニウム塩部位による PeT 効果により抑制されている。

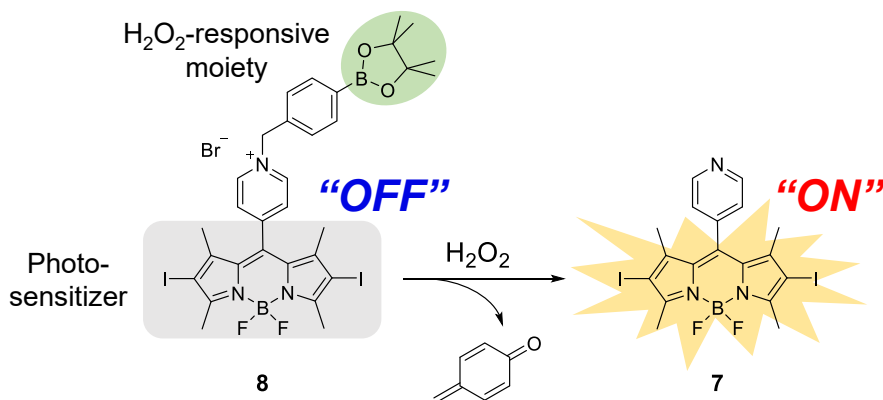


Figure 1.1.11 BODIPY を基本骨格とした H_2O_2 応答型光感受性分子 8

これに対し、**8** は H_2O_2 と反応することで、光感受性の向上した **7** を放出することを見出している。さらに **8** の 550 nm の光照射下におけるヒト大腸がん細胞 HCT116 および正常細胞 NCM460 に対する光細胞毒性を評価した結果、**8** は HCT116 細胞に対して選択的な光細胞毒性を発現することを明らかにしている。

1.4.4 セレノローダミンを基本骨格とした刺激応答型光感受性分子

2014 年、浦野らは、光感受性の OFF/ON を制御可能な光感受性分子として、刺激応答型蛍光分子として報告していたローダミン誘導体⁴⁸ の環内酸素原子を重原子であるセレン原子に置換した **HMDESeR** を開発し、卵巣がん細胞などに過剰発現する β -ガラクトシダーゼに応答する β -ガラクトースを **HMDESeR** に導入した刺激応答型光感受性分子 **HMDESeR- β Gal** を報告している⁴⁹ (Figure 1.1.12)。本分子は、 β -ガラクトシダーゼとの応答前後での、生理的 pH における分子内スピロ環化平衡状態の違いを利用して、光感受性の OFF/ON を制御可能な化合物である。**HMDESeR- β Gal** は生理的 pH において、分子内スピロ環化をした閉環状態で存在するため、セレノキサントン骨格の共役系が分断されている。一方で、 β -ガラクトシダーゼとの反応で生成する **HMDESeR** は生理的 pH において、開環状態で存在するため、セレノキサントン骨格の共役系の分断が解消され、可視光領域に新たな吸収帯が出現する。この吸収帯の波長で光照射を行うことで、**HMDESeR** を選択的に励起でき、 β -ガラクトシダーゼとの反応前後で光感受性を OFF から ON に制御することが可能である。実際、532 nm の光照射下、**HMDESeR- β Gal** の光感受性が OFF であること、および β -ガラクトシダーゼと反応して光感受性が ON である **HMDESeR** を放出することを明らかにしている。加えて、**HMDESeR- β Gal** の、 β -ガラクトシダーゼを発現させた HEK293 細胞 (HEK/*lacZ*) および非発現の HEK293 細胞に対する光細胞毒性を評価した結果、**HMDESeR- β Gal** が HEK/*lacZ* 細胞に対して選択的な光細胞毒性を発現することを見出している。さらに、**HMDESeR- β Gal** の β -ガラクトシダーゼ発現ショウジョウバエ蛹翅原基を用いた組織中での選択的な光細胞毒性を実証している。

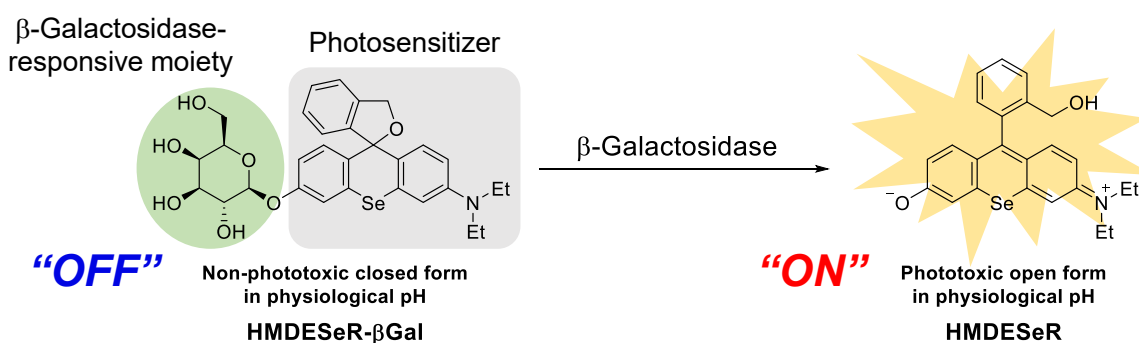


Figure 1.1.12 セレノローダミンを基本骨格とした β -ガラクトシダーゼ応答型光感受性分子 **HMDESeR- β Gal**

さらに、2017年、浦野らは、光感受性分子である **HMSeR** に、卵巣がんや肺がん細胞などに過剰発現する γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) に応答するグルタミン酸を連結した刺激応答型光感受性分子 **gGlu-HMSeR** を報告している⁵⁰ (Figure 1.1.13)。**HMDESeR- β Gal** と同様、532 nm の光照射下における **gGlu-HMSeR** の光感受性は OFF であるが、GGT と反応することで、534 nm を吸収極大とする新たな吸収帯を有し、光感受性を示す **HMSeR** を放出することを明らかにしている。加えて、GGT 高発現ヒト卵巣がん細胞 SHIN3 および GGT 低発現ヒト卵巣がん細胞 SKOV3 に対する光細胞毒性を評価した結果、**gGlu-HMSeR** が SHIN3 細胞選択的な光細胞毒性を示すことを見出し、さらに三次元腫瘍スフェロイドおよび鶏卵膀胱膜を用いた組織中での選択的光細胞毒性を実証している。

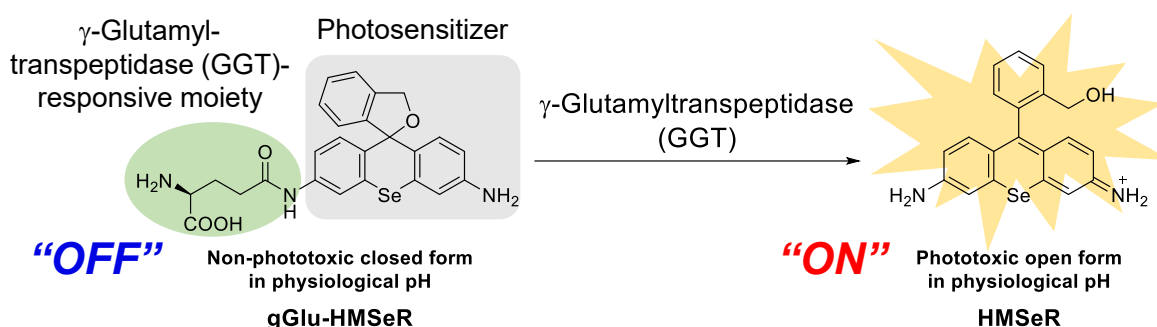


Figure 1.1.13 セレノローダミンを基本骨格とした GGT 応答型光感受性分子 **gGlu-HMSeR**

また、2017年、浦野らは、光感受性分子であるセレノローダミン誘導体 **SeR** に、腫瘍組織に特徴的な低酸素環境で還元酵素により還元されるジアゾ基を導入した刺激応答型光感受性分子 **azoSeR** を報告している⁵¹ (Figure 1.1.14)。**azoSeR** は上述した **HMDESeR- β Gal** や **gGlu-HMSeR** とは異なり、分子内スピロ環化平衡状態の違いを利用した分子ではなく、光励起後のジアゾ結合周辺の非常に素早いコンフォーメーション変化により項間交差を抑制した分子である。ラット肝ミクロソームを用いた **azoSeR** の応答性を評価した結果、正常酸素濃度下では応答せず、低酸素環境かつ NADPH 存在下でのみ光感受性分子 **SeR** を放出することを明らかにしている。さらに、ヒト肺がん細胞 A549 を用いて、535 nm の光照射下、**azoSeR** が低酸素環境選択的に光細胞毒性を発現することを明らかにしている。

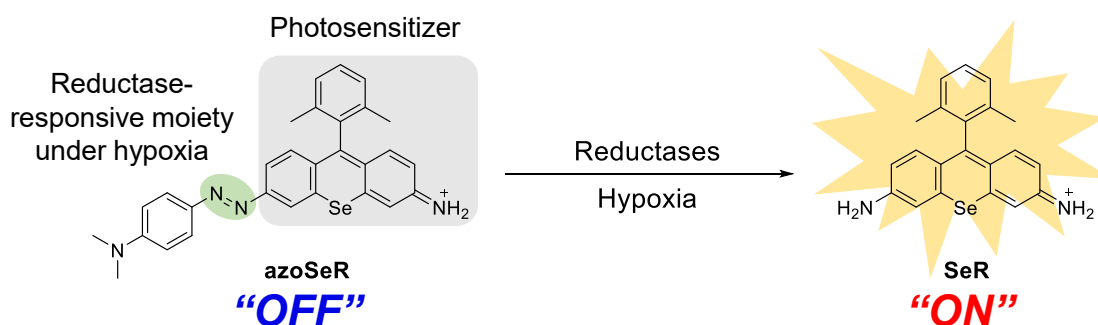


Figure 1.1.14 セレノローダミンを基本骨格とした低酸素環境下で選択的に還元酵素により還元される刺激応答型光感受性分子 **azoSeR**

1.4.5 シアニン誘導体を基本骨格とした刺激応答型光感受性分子

2019年、Pengらは、刺激応答型蛍光分子として報告されていたヘミシアニン誘導体⁵²に対し、ヨウ素原子を導入した光感受性分子であるヘミシアニン誘導体 **ICy-OH** を開発し、その水酸基に、低酸素環境において過剰発現し、かつ高い酵素活性を示すニトロ還元酵素（NTR）に応答する芳香族ニトロ基を連結した刺激応答型光感受性分子 **ICy-N** を報告している⁵³ (**Figure 1.1.15**)。 **ICy-OH** は、分子内電荷移動（intramolecular charge transfer, ICT）した励起状態を経由して効率的に一重項酸素を生成するのに対し、 **ICy-N** では、ICTが抑制されており、主に振動緩和により励起エネルギーを放出するため、項間交差が抑制され、一重項酸素生成能が低下している。加えて、ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて、660 nm の光照射下、 **ICy-N** が低酸素環境選択的に光細胞毒性を発現することを明らかにしている。さらに、マウス乳がん細胞 4T1 を担持した Balb/c マウスを用いて、 **ICy-N** が光照射下、抗がん活性を示すことを明らかにしている。

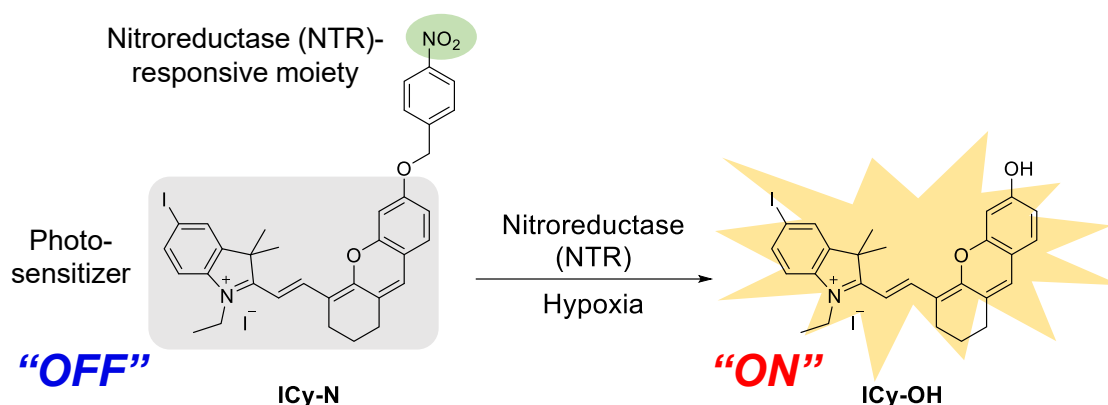


Figure 1.1.15 シアニン誘導体を基本骨格とした NTR 応答型光感受性分子 **ICy-N**

2021年、Kolemenらは、光感受性分子であるヘミシアニン誘導体 **HC-1** に、大腸がん細胞などで過剰発現するロイシンアミノペプチダーゼ（LAP）に応答するロイシンを連結した刺激応答型光感受性分子 **HCL** を報告している⁵⁴ (**Figure 1.1.16**)。LAPは、N末端のロイシンを加水分解す

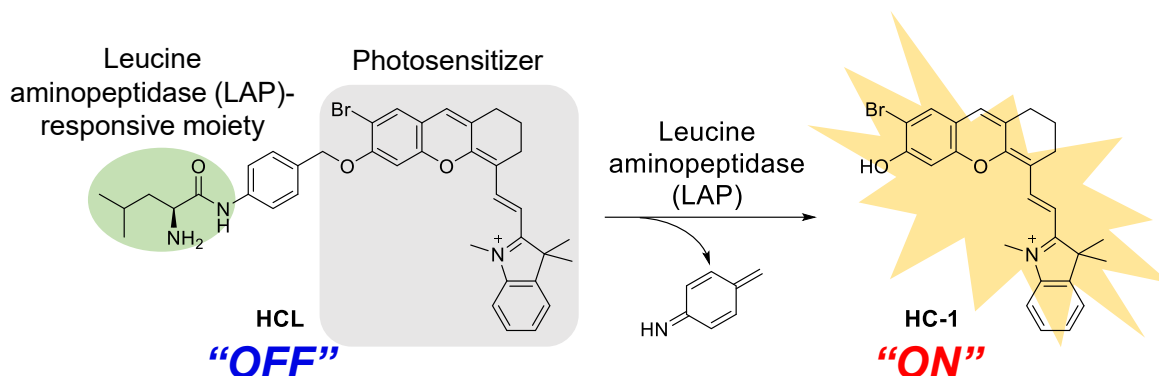


Figure 1.1.16 シアニン誘導体を基本骨格とした LAP 応答型光感受性分子 **HCL**

るペプチダーゼである。HCL は、ICy-N と同様、ICT の抑制により光感受性が OFF である一方、LAP との反応により光感受性が ON である HC-1 を放出することを見出している。さらに、HCL のヒト大腸がん細胞 HCT116、ヒト肺がん細胞 A549 および正常細胞であるマウス線維芽細胞 L929 に対する光細胞毒性を評価した結果、640 nm の光照射下、HCL が HCT116 および A549 細胞選択的に光細胞毒性を発現することを明らかにしている。

1.4.6 メチレンブルーを基本骨格とした刺激応答型光感受性分子

2019 年、Xing らは、刺激応答型蛍光分子としての報告例⁵⁵があった蛍光性光感受性分子であるメチレンブルー (MB) の環内窒素原子に、H₂O₂ 応答部位である芳香族ボロン酸エステルを連結した刺激応答型光感受性分子 MBPB を報告している⁵⁶ (Figure 1.1.17)。MBPB は可視光領域の吸収が顕著に抑制されているのに対し、H₂O₂ と反応することで、665 nm を吸収極大とする新たな吸収帯を有する MB を放出する。そのため、本吸収帯の波長の光照射を行うことで、MB を選択励起することが可能である。実際、633 nm の光照射下において、MBPB の光感受性が OFF であること、および H₂O₂ 存在下では光感受性分子 MB を放出することを明らかにしている。加えて、MBPB とウシ血清アルブミン (BSA) を疎水性相互作用によりナノ粒子化した BSA-MBPB が、ヒト正常肝細胞 LO2 と比較して、ヒト肝細胞がん細胞 HepG2 に対して選択的に光細胞毒性を発現することを見出している。さらに、BSA-MBPB が、HepG2 細胞を担持した Balb/c マウスに対して、光照射依存的な抗がん活性を示すことを実証している。

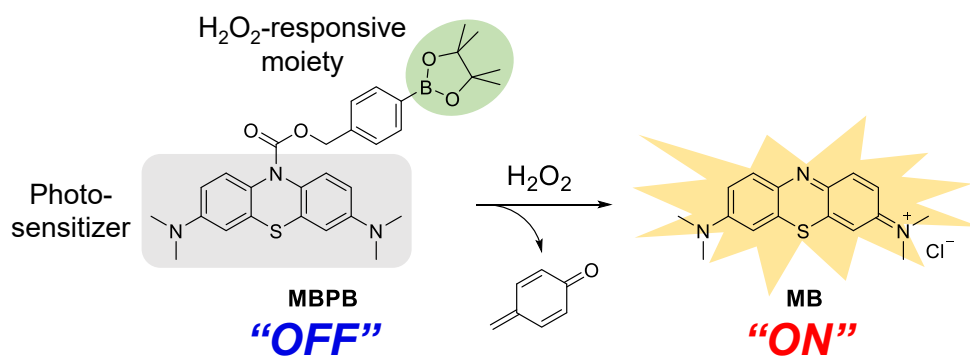


Figure 1.1.17 メチレンブルーを基本骨格とした H₂O₂ 応答型光感受性分子 MBPB

2020 年、Tung らは、光感受性分子であるメチレンブルー (MB) の環内窒素原子に、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) 応答部位であるグルタミン酸を連結した刺激応答型光感受性分子 gGluMB を報告している⁵⁷ (Figure 1.1.18)。gGluMB は、MBPB と同様、可視光領域に吸収を有さないため、665 nm の光照射下における光感受性は OFF である一方、GGT と反応することで光感受性を有する MB を放出する。さらに、gGluMB は、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC と比較して、GGT を過剰発現するヒト神経膠腫細胞 U251 およびラット神経膠腫細胞 C6 に対し選択的に光細胞毒性を発現することを明らかにしている。

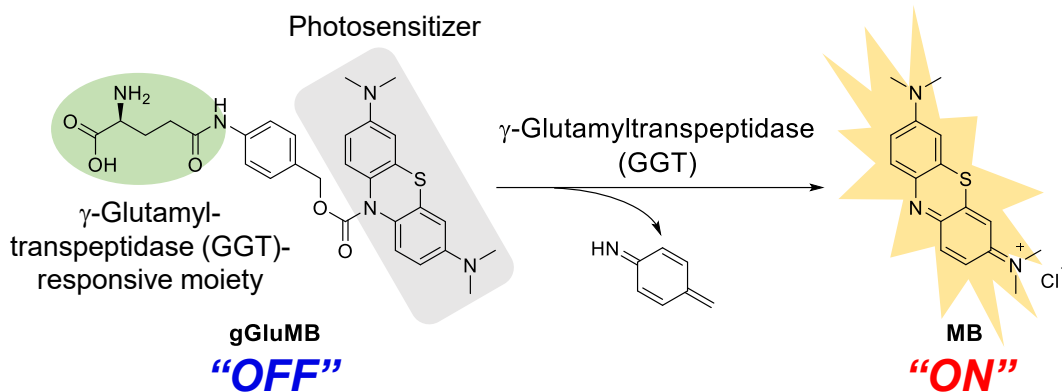


Figure 1.1.18 メチレンブルーを基本骨格とした GGT 応答型光感受性分子 **gGluMB**

1.4.7 その他の刺激応答型光感受性分子

2009 年、長野らは、DNA 結合性光感受性分子として、チアゾールオレンジ (TO) 誘導体 **PhoTO-OH** を開発し、その水酸基に β -ガラクトシダーゼに応答する β -ガラクトースを導入した刺激応答型光感受性分子 **PhoTO-Gal** を報告している⁵⁸ (Figure 1.1.19)。**PhoTO-OH** は、DNA にインターカレートし、平面構造が固定されることで、光感受性が ON となる化合物であることから、これに親水性のかさ高い β -ガラクトースを導入することで、DNA へのインターカレートが阻害され、光感受性を OFF に制御できると考えられた。実際、**PhoTO-Gal** が β -ガラクトシダーゼと反応して、**PhoTO-OH** を放出すること、および β -ガラクトシダーゼ非発現の HEK293 細胞と比較して、 β -ガラクトシダーゼを発現させた HEK293 細胞に対して選択的な光細胞毒性を示すことを明らかにしている。

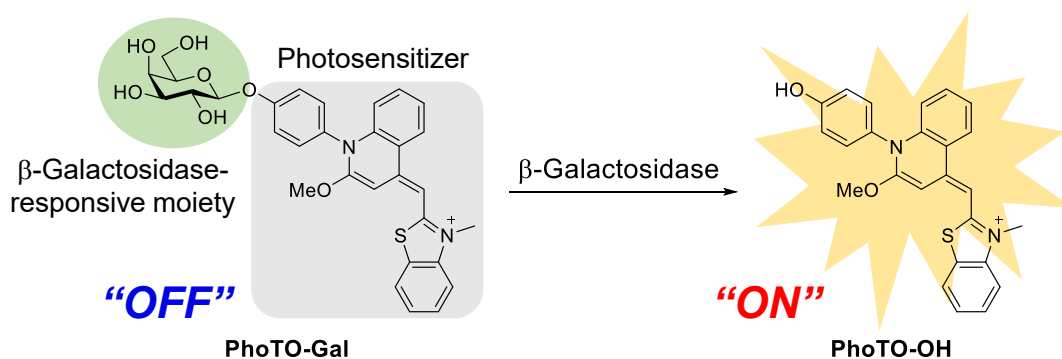


Figure 1.1.19 チアゾールオレンジ誘導体を基本骨格とした β -ガラクトシダーゼ応答型光感受性分子 **PhoTO-Gal**

2018 年、Fan らは、光感受性分子であるビス(フェニルエチニル)ベンゼン誘導体 (**DBB**) に、様々な炎症性疾患において発現量が上昇することが知られている一酸化窒素 (NO) に応答する *o*-フェニレンジアミン (OPD) を連結した刺激応答型光感受性分子 **DBB-NO** を報告している⁵⁹ (Figure 1.1.20)。**DBB-NO** の光感受性は、分子内の OPD 部位からの PeT により OFF であるが、

NO と反応することで光感受性が ON である DBB を放出する。さらに、750 nm における 2 光子励起により、DBB-NO が、活性化していないマウスマクロファージ細胞 RAW264.7 と比較して、活性化した RAW264.7 細胞選択的に光細胞毒性を発現することを明らかにしている。

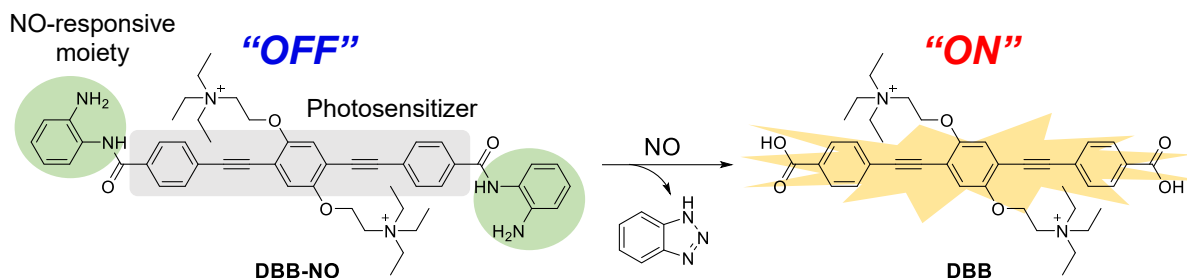


Figure 1.1.20 ビス(フェニルエチニル)ベンゼン誘導体を基本骨格とした NO 応答型光感受性分子 DBB-NO

2019 年、Li らは、光感受性の OFF/ON を制御可能な光感受性分子として、刺激応答型蛍光分子であるジシアノメチレン-4*H*-クロメン誘導体⁶⁰の環内酸素原子をセレン原子に置換した **9** を開発し、子宮頸がん細胞などで過剰発現するアルカリフォスファターゼ (ALP) に応答するリン酸基を導入した刺激応答型光感受性分子 **10** を報告している⁶¹ (Figure 1.1.21)。**9** は、ICT 励起状態のエネルギー準位に対応する長波長可視光領域 ($\lambda_{\max} = 616 \text{ nm}$) の吸収帯を有する一方、**10** では ICT の抑制により、**9** で見られた 616 nm を極大とする吸収帯が消失している。そのため、本吸収帯の波長で光照射を行うことで、**9** を選択的に励起でき、ALP との反応で光感受性を OFF から ON にすることが可能である。加えて、ヒト子宮頸がん細胞 HeLa に対して **10** が光細胞毒性を示すこと、および ALP 阻害剤であるオルトバナジン酸ナトリウム (Na_3VO_4) 存在下では、**10** の HeLa 細胞に対する光細胞毒性が顕著に抑制されることを明らかにしている。

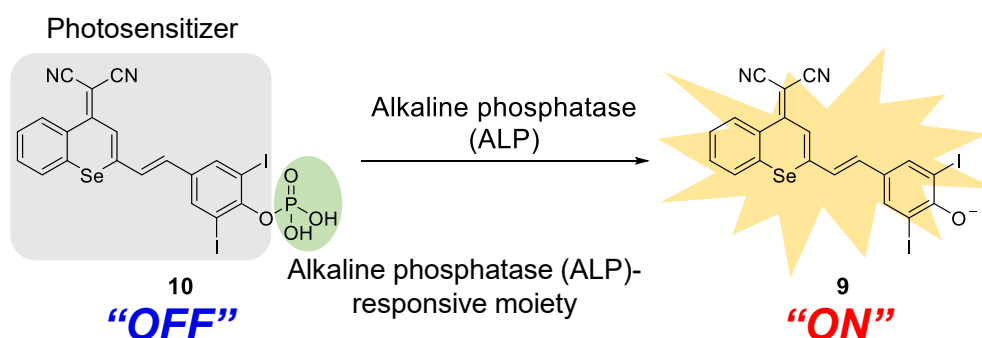


Figure 1.1.21 ジシアノメチレン-4*H*-クロメン誘導体を基本骨格とした ALP 応答型光感受性分子 **10**

2020 年、Beharry らは、光感受性分子であるフェナレノン誘導体 **11** に、がん細胞に過剰発現するヒト NAD(P)H:キノンオキシドレダクターゼ 1 (hNQO1) 応答部位であるベンゾキノン誘導体を連結した刺激応答型光感受性分子 **12** を報告している⁶² (Figure 1.1.22)。**12** の光感受性は、分子内

のベンズキノン部位への PeT により抑制されているが、hNQO1 に応答して高い光感受性を示す **11** を放出する。さらに、**12** が、415 nm の光照射下、ヒト正常細胞 MRC9 と比較して、hNQO1 を過剰発現するヒト肺癌細胞 A549 に対して選択的な光細胞毒性を発現することを明らかにしている。

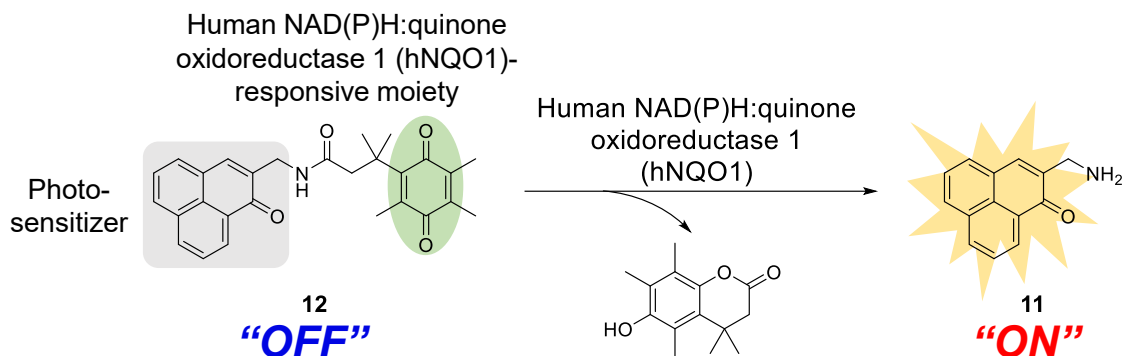


Figure 1.1.22 フェナレン誘導体を基本骨格とした hNQO1 応答型光感受性分子 **12**

2020 年、Wang らは、 H_2O_2 およびグルタチオン (GSH) の両方に応答して、光感受性分子であるベンゾチアジアゾール誘導体 **13** を生成する刺激応答型光感受性分子 **14** を報告している⁶³ (**Figure 1.1.23**)。光感受性が OFF である **14** は、 H_2O_2 と反応して遊離のチオール基を有する **15** を放出した後、 H_2O_2 および GSH の存在下で、**13** に変換される。TD-DFT 計算により、**13** の励起エネルギー準位を計算した結果、 S_1 および T_3 状態の間の一重項—三重項エネルギーギャップ (ΔE_{ST}) が小さい値 (-0.11 eV) であると推定されたことから、**13** は、効率的に項間交差を起こすため光感受性を示すと推測されている。さらに、細胞内においてミトコンドリアをターゲティングするトリフェニルホスフィン部位を **14** に連結した **16** が、405 nm の光照射下において HeLa 細胞に対し光細胞毒性を示すこと、および外部から H_2O_2 を加えることで **16** の光細胞毒性が向上することを明らかにしている。

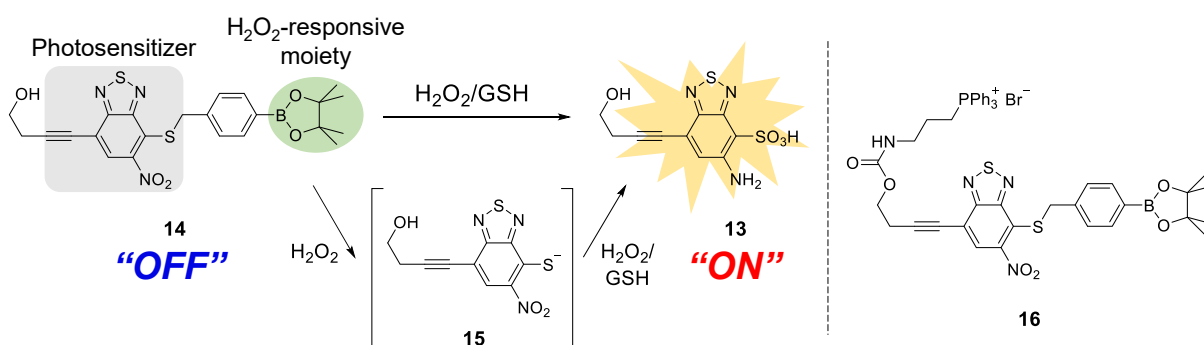


Figure 1.1.23 ベンゾチアジアゾール誘導体を基本骨格とした H_2O_2 /GSH 応答型光感受性分子 **14**

2020年、Huaらは、光感受性分子であるジケトピロロピロール（DPP）誘導体 **DPP-py** に、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GGT）応答部位であるグルタミン酸を連結した刺激応答型光感受性分子 **DPP-GGT** を報告している⁶⁴ (**Figure 1.1.24**)。 **DPP-GGT** のモデル化合物として合成された **DPP-pys** の光感受性は OFF であった。 DFT 計算の結果、 S_1 状態から最もエネルギー差の小さい三重項励起状態までの一重項-三重項エネルギーギャップ (ΔE_{ST}) は、 **DPP-py** では 0.0387 eV であったのに対し、 **DPP-pys** では 1.3521 eV であり、項間交差効率の低下により **DPP-pys** の光感受性が OFF になっていると推測されている。 **DPP-GGT** の光感受性も同様に OFF である一方、 GGT と反応することで光感受性が ON である **DPP-py** を放出することを見出している。 加えて、 **DPP-GGT** が、530 nm の照射下、 GGT 低発現のヒト乳がん細胞 MCF-7 およびヒト正常肝細胞 LO2 と比較して、 GGT 高発現のヒト肝細胞がん細胞 HepG2 に対して選択的に光細胞毒性を発現することを明らかにしている。

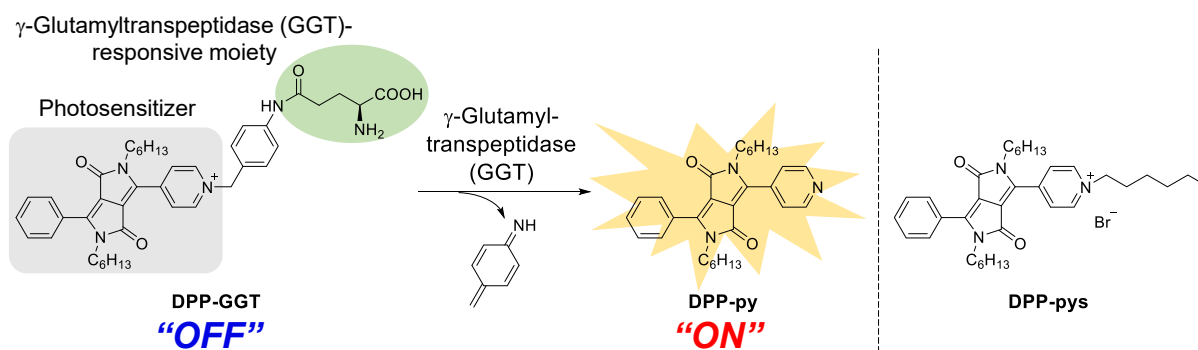


Figure 1.1.24 ジケトピロロピロール誘導体を基本骨格とした GGT 応答型光感受性分子 **DPP-GGT**

以上に示したように、とりわけ最近、刺激応答型光感受性分子の開発が盛んに行われているが、既存の刺激応答型蛍光分子に対し、重原子を導入することで刺激応答型光感受性分子に変換した例がその多くを占めている。そのため、既存の刺激応答型蛍光分子を基にしたデザイン戦略とは異なる、新たなデザイン戦略の刺激応答型光感受性分子の開発は、学術的に意義深いだけでなく、光感受性の OFF/ON を制御可能な光感受性分子骨格の多様性を創出するため、医薬品開発への応用の際に、標的疾患に応じて、最適な基本骨格を選択して刺激応答型光感受性分子を開発することが可能となる。このような背景の中、著者は、光感受性の OFF/ON を制御可能な新たな光感受性分子を開発するにあたり、そのデザイン戦略として天然物に着目した。

第2章 1,3-ジカルボニルエノール構造を持つ天然物

本章では、本論文において、新たな刺激応答型光感受性分子の基本骨格として着目した天然物について記述する。

2.1 ネオカルチノスタチン・クロモフォア

ネオカルチノスタチン・クロモフォア (NCS-chr) (17)は、アポタンパク質と非共有結合的に 1:1 の複合体を形成したネオカルチノスタチン (NCS) として、1965 年に石田らによって放線菌 *Streptomyces carzinostaticus* var. F-41 の培養ろ液から単離されたエンジイン系抗腫瘍性抗生物質である⁶⁵。当初は、NCS がアポタンパク質とクロモフォアの複合体であることは明らかにされていなかったが、NCS 自体も抗腫瘍性抗生物質として作用し、日本において 1971 年に臨床承認され、白血病、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、肝臓がんおよび脳腫瘍などの治療に使用されていた^{66,67}。さらに、NCS にスチレン・マレイン酸交互共重合体 (poly(styrene-co-maleic acid), SMA) を連結した SMANCS は、親油性高分子抗がん剤として、日本において 1993 年に臨床承認され、肝細胞がんなどの治療に使用されていた^{66,68,69}。その一方で、NCS の構造解析が進められた。1979 年に Goldberg らによって⁷⁰、また 1980 年に石田らによって⁷¹、NCS がアポタンパク質とクロモフォアに分離可能であることが明らかにされ、さらに NCS の活性本体はクロモフォアであり、11 kDa のアポタンパク質は非毒性であること、および熱、紫外光、および求核剤の攻撃などに不安定なクロモフォアはアポタンパク質と複合体を形成することで安定化されることを見出している。1985 年には江戸および石田らによって、NCS-chr の構造決定がなされ、その構造が前例のないビシクロ[7.3.0]ドデカジエンジイン構造、すなわち 9 員環エンジイン構造を核とし、2-ナフトール誘導体、*N*-メチルフコサミン、および炭酸エチレン部位が連結した構造であることを明らかにしている⁷² (Figure 1.2.1)。その後、9 員環あるいは 10 員環エンジイン構造を有するエンジイン系抗生物質として、カリケアマイシン (calicheamicin)⁷³、エスペラマイシン (esperamicin)⁷⁴、ダイネマイシン (dynemicin)⁷⁵、C-1027 クロモフォア⁷⁶、ケダルシジンクロモフォア (kedarcidin chromophore)⁷⁷ および N1999A2⁷⁸ などが単離・構造決定され、これらの全合成研究が盛んに行われてきた⁷⁹⁻⁸⁴。NCS-chr は、2-ナフトール部位の合成が、1984 年に渋谷らによって初めて達成され⁸⁵、のちに複数の合成例が報告されている⁸⁶⁻⁹⁰。また、NCS-chr の全合成は、1998 年に Myers らによって^{91,92}、形式全合成が 2006 年に平間らによって達成されている⁹³。

また、NCS が示す強力な細胞毒性に関して、その毒性発現機構の解明が、NCS の単離当初から行われた。1970 年に石田らは、NCS が HeLa-S3 細胞に対して、DNA 合成阻害および有糸分裂阻害を引き起こすことで細胞毒性を発現することを明らかにした⁹⁴。その後、1974 年に Goldberg らは、NCS を投与した HeLa-S3 細胞において、DNA 鎖の切断が起こること、および試験管内において、2-メルカプトエタノールの存在下で NCS とプラスミド DNA をインキュベートすることで、プラスミド DNA の 1 本鎖あるいは 2 本鎖切断が起こることを報告している⁹⁵。1975 年には石田らによっても、NCS を投与した HeLa-S3 細胞において、DNA 鎖の切断が起こることが報告されている⁹⁶。さらに、1978 年には Goldberg ら⁹⁷ および Haseltine ら⁹⁸ によって、2-メルカプトエタ

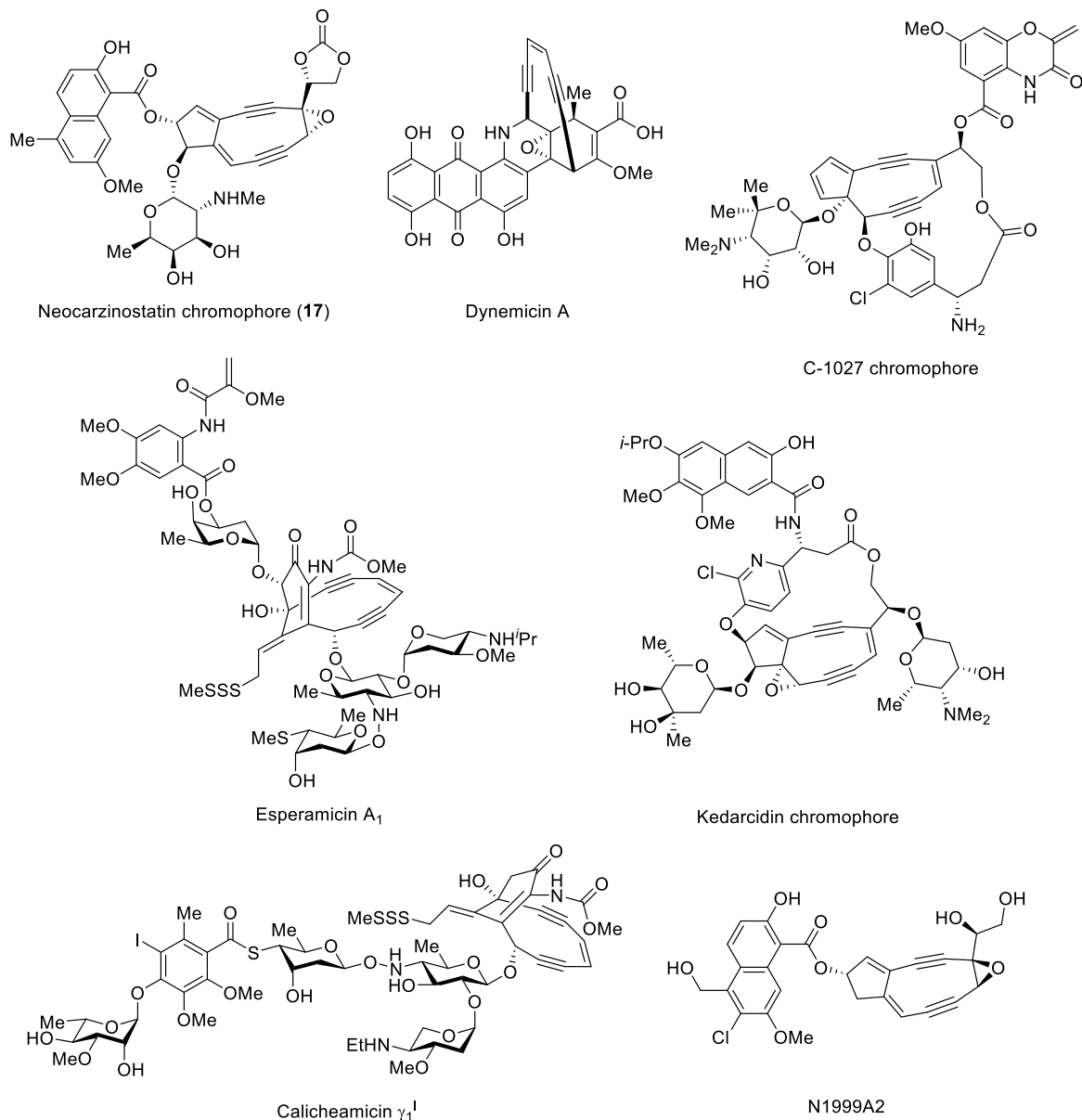


Figure 1.2.1 エンジン系抗生物質の化学構造

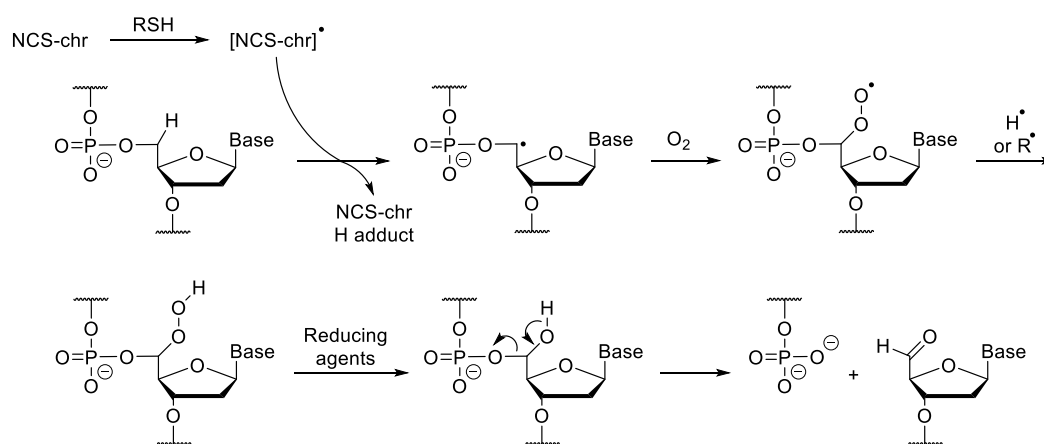
ノールの存在下での NCS による DNA 切断がチミンおよびアデニンにおいて起きることが明らかにされているほか、同年には Lown ら⁹⁹および Goldberg ら¹⁰⁰によって、2-メルカプトエタノールの存在下での NCS による DNA 切断が、ラジカルスカベンジャー存在下では阻害されることが報告されている。

1979 年および 1980 年に NCS-*chr* が単離されると、更なる毒性発現機構の解明が進められた。1980 年に江戸および石田らは、2-メルカプトエタノールの存在下での NCS-*chr* の EPR スペクトルを測定した。その結果、NCS-*chr* がラジカル種を生成していることを明らかとした¹⁰¹。翌年には Gupta らによって同様の現象が報告されたほか、NCS-*chr* が紫外光に不安定なことから、長波長紫外光の照射下において NCS-*chr* の EPR スペクトルを測定した結果、ラジカル種が生成することを見出している¹⁰²。1985 年に NCS-*chr* の構造決定がなされたのち、1987 年には Goldberg らが、こ

れまでの実験事実を基に、ラジカルを経由した NCS-chr の DNA 切断機構を提唱している¹⁰³。すなわち、実験事実である 2-メルカプトエタノールの存在下で NCS-chr がラジカル種を生成すること、および DNA のデオキシリボースの C-5'位の水素原子を NCS-chr が引き抜き、デオキシリボースの 5'-アルデヒド体が生成することなどから、以下の機構を提唱している (Scheme 1.2.1)。

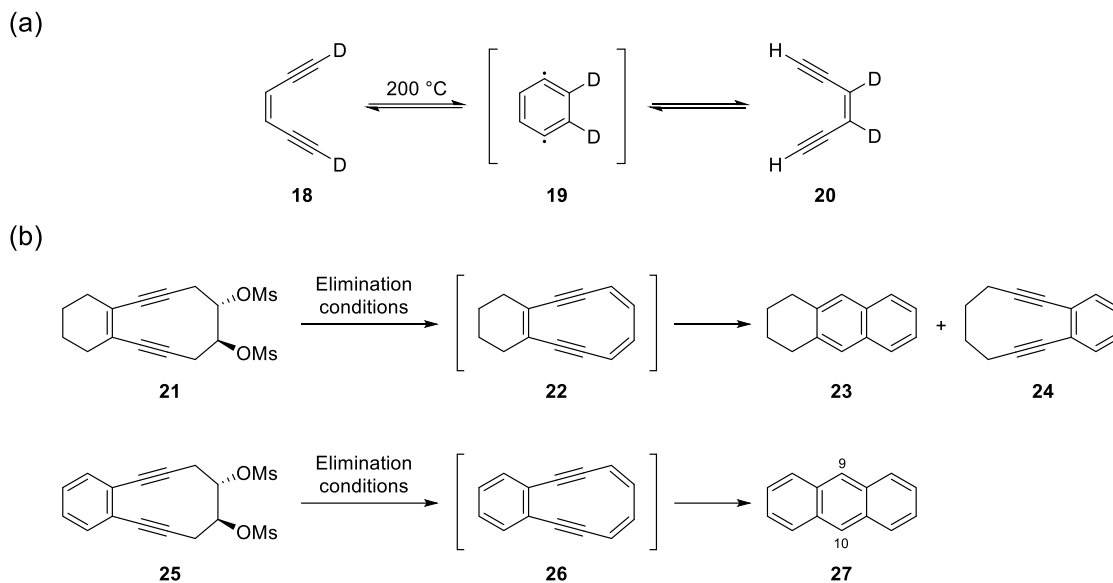
1 段階目として、NCS-chr の高度に不飽和な中心骨格へのチオール付加によりラジカル種を生成する。次に、発生した NCS-chr のラジカル種がデオキシリボースの C-5'位の水素原子を引き抜く。3 段階目に、C-5'位に生成したラジカルに酸素分子が付加し、その後、還元剤によりペルオキシドが還元され、水酸基となる。最後に、C-5'位のリン酸エステルの脱離により、DNA 鎖が切断され、5'末端にアルデヒドを有する DNA 断片を生成する。

また、NCS-chr の 2-ナフトール部位が DNA インターカレーターとして、*N*-メチルフコサミン部位が静電的相互作用によるマイナーグループバインダーとして作用し、エンジン骨格をデオキシリボースの C-5'位付近に位置させるため、C-5'位選択的な水素原子の引き抜きが起こると推測している。



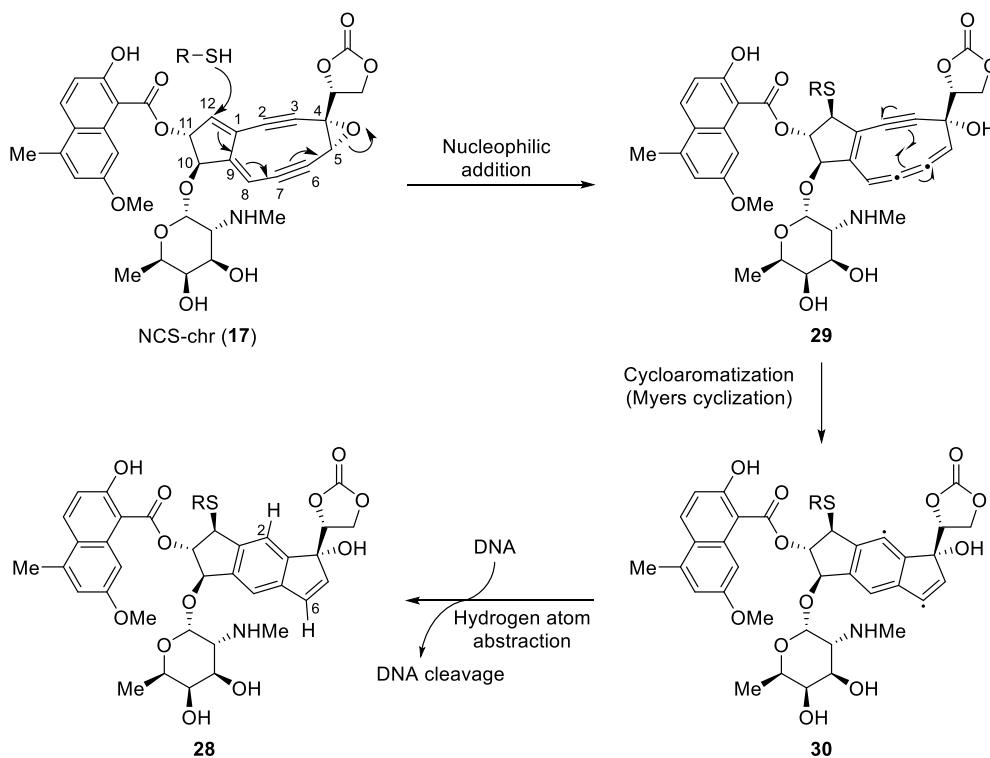
Scheme 1.2.1 NCS-chr による DNA 切断機構

その後、NCS-chr がチオール存在下でラジカル種を生成する反応機構に関する研究が行われた。この反応機構の研究に貢献したのが、正宗-Bergman 反応である (Scheme 1.2.2)。本反応は、*cis*-3-ヘキセン-1,5-ジエンが加熱下において、ラジカル機構で 1,4-ベンゼンビラジカルを生成する反応である。1972 年に Bergman らは、重水素で標識した *cis*-3-ヘキセン-1,5-ジエン **18** を 200 °C 以上に加熱すると、1,4-ベンゼンビラジカル **19** を經由して、**20** に異性化することを見出した¹⁰⁴ (Scheme 1.2.2a)。また、その前年には、正宗らが、脱離反応条件下において、1,5-ジデヒドロ[10]アヌレン前駆体 **21** から 1,2,3,4-テトラヒドロアントラセン(**23**)および **24** が、1,5-ジデヒドロ[10]アヌレン前駆体 **25** からアントラセン(**27**)が生成すること、および重溶媒中で **25** に対する同反応を行うことで、9 位および 10 位が重水素化された **27** が生成することを見出している¹⁰⁵ (Scheme 1.2.2b)。



Scheme 1.2.2 正宗-Bergman 反応

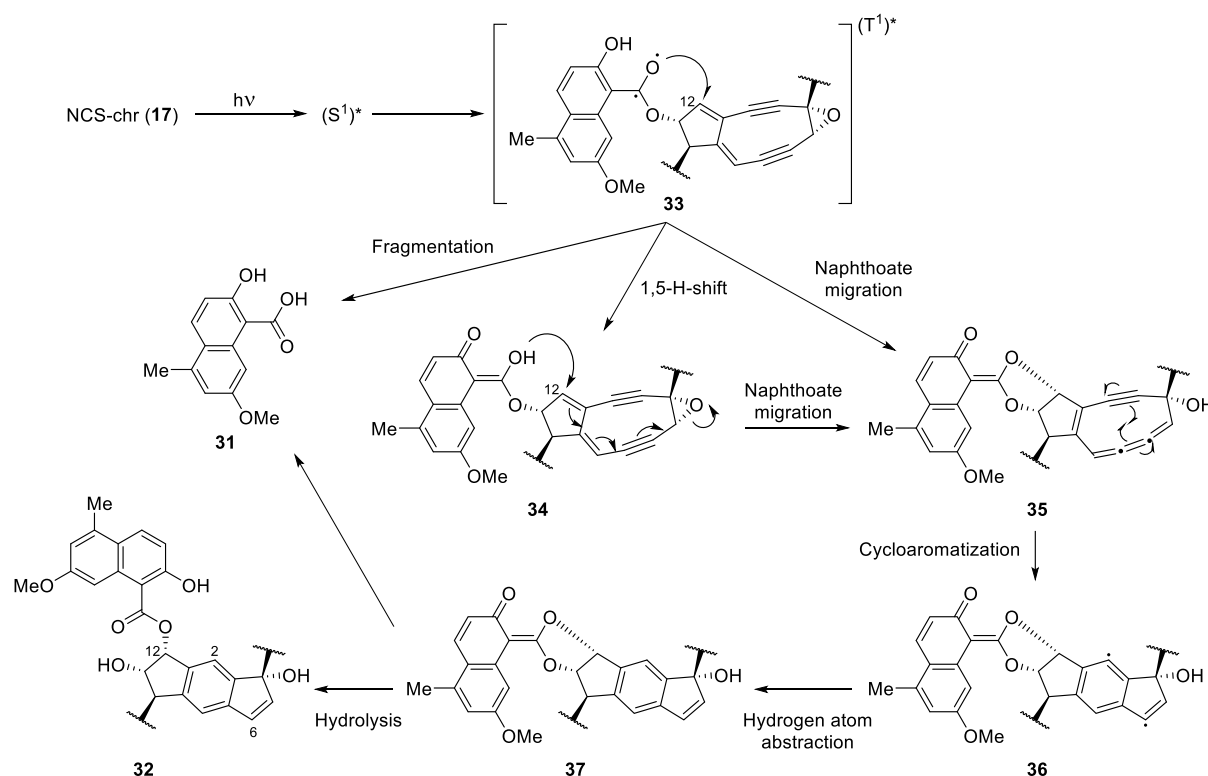
1987年、Myersらは、チオール存在下でのNCS-chrの分解生成物の構造をテトラヒドロインダセン **28** であると報告し、それまでの分解生成物の構造解析の結果と併せて、**28** の生成に関する推定反応機構を提唱している¹⁰⁶ (Scheme 1.2.3)。はじめに、チオールがNCS-chrのC-12位に求核攻撃し、エポキシ基の開環が起こる。その後、生成した高い環ひずみを有する不安定なエンインクムレン中間体 **29** が、正宗-Bergman 反応様の渡環反応 (Myers 型渡環反応) を起こして環化



Scheme 1.2.3 チオール存在下でのNCS-chrのDNA切断機構

し、ビラジカル **30** を生成する。最後に、**30** のラジカルが、**Scheme 1.2.1** に示したようにデオキシリボースの C-5' 位の水素原子を引き抜くことで、テトラヒドロインダセン **28** となり、DNA の切断反応が進行する。1989 年には Myers らによって、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ での低温 NMR 測定により、NCS-chr にチオールが付加したエンインクムレン中間体 **29** の生成が確認されている。さらに、測定温度を上昇させることで、重溶媒から重水素を引き抜き、C-2 および C-6 位における重水素化が確認されたことより、推定反応機構が裏付けられている¹⁰⁷。

一方、1989 年、杉浦らは、NCS が紫外光の照射下、DNA を切断することを報告している¹⁰⁸。興味深いことに、NCS による DNA 切断の塩基選択性は、チオール存在下ではチミンおよびアデニン選択的で、かつチミン>アデニンであったのに対し、紫外光照射下ではチミンおよびアデニンに加えて、グアニンにおいても DNA 切断が起きることを見出している。その後、1995 年に平間らは、NCS-chr が、長波長紫外光の照射下で、2-ナフトール誘導体 **31** およびテトラヒドロインダセン **32** を生成すること、および重溶媒中で同反応を行うことで、C-2 および C-6 位が重水素化されることを明らかにし、光照射下における NCS-chr の DNA 切断機構を以下のように提唱している¹⁰⁹ (**Scheme 1.2.4**)。NCS-chr が光照射により励起された後、三重項励起状態へと遷移する。この状態において、カルボニル酸素がラジカル様の性質を示し、C-12 位へ攻撃する。あるいは、2-ナフトール部位のフェノール性水酸基とカルボニル基の間で、水素の 1,5-シフトが起こった後、C-12 位への求核攻撃が起こる。これにより、ケテンアセタールを有するエンインクムレン中間体 **35** が生成し、チオール存在下の場合と同様に、Myers 型渡環反応を起こして、ビラジカル **36** となる。さらに、このラジカルが DNA から水素を引き抜いた後、ケテンアセタールの加水分解によ



Scheme 1.2.4 紫外光照射下での NCS-chr の DNA 切断機構

り、C-12 位に 2-ナフトール部位が転位した **32** が生成する。しかし、紫外光照射下における NCS-*chr* の DNA 切断が、チミンおよびアデニンに加えて、グアニンにおいても起きる理由は明らかにされなかった。

そこで当研究室では、2000 年に、NCS-*chr* の紫外光照射下における DNA 切断機構には、平間らが提唱した機構以外にも、エンジン骨格が関与しない別の機構が存在し、グアニンを切断しているのではないかと仮説を立て、NCS-*chr* の 9 員環エンジン構造を有さない 2-ナフトール部位一糖部位ハイブリッド **38 α** および **38 β** をデザイン・合成し、その DNA 切断活性を評価した¹¹⁰ (Figure 1.2.2)。その結果、**38 α** および **38 β** は、長波長紫外光の照射下において、DNA 光切断活性を示すことを明らかにしている。加えて、Sanger 法により DNA の切断位置を解析した結果、**38 α** および **38 β** は、グアニン選択的に DNA を光切断することを見出している。以上の結果より、NCS-*chr* は、紫外光照射下において、エンジン骨格から生じたビラジカルがチミンおよびアデニンを、光励起した 2-ナフトール部位がグアニンをそれぞれ切断することが示唆されている。しかし、NCS-*chr* の 2-ナフトール部位における光感受性の発現に重要な構造は明らかにされていなかった。

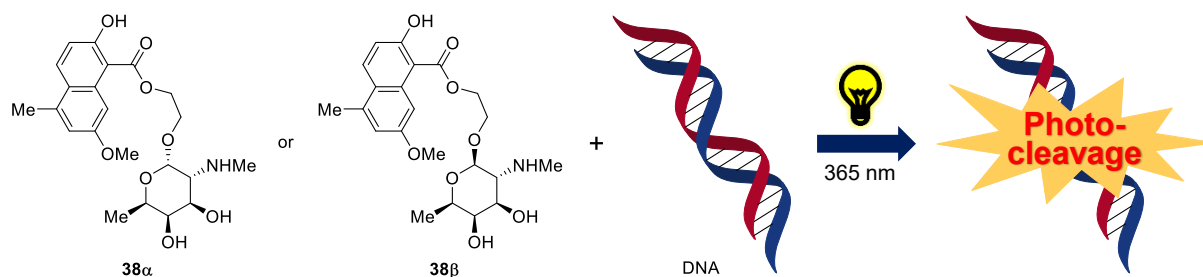


Figure 1.2.2 NCS-*chr* の 2-ナフトール部位一糖部位ハイブリッド **38 α** および **38 β** による DNA 光切断

2.2 ヒポクレリン B

ヒポクレリン B (**39**) は、1989 年に Wu らによって¹¹¹、また 1991 年に岸らによって¹¹²、真菌 *Shiraia bambusicola* P. Henn. より単離・構造決定されたペリレンキノン系色素である (Figure 1.2.3)。**39** の類縁体としては、**39** と同論文にて *Shiraia bambusicola* P. Henn. より単離・構造決定されたヒポクレリン A (**40**) およびシライアクロム A (**41**)^{111,112} や、1981 年に Breitmaier らによって真菌 *Hypocrella bambusae* (Berk. et Broome) Sacc. より単離・構造決定されたヒポクレリン (**42**, *ent-40*)¹¹³ が報告されているほか、セルコスポリン (**43**)¹¹⁴、カルフォスチン D (**44**)¹¹⁵、フレイクロム (**45**)¹¹⁶、エルシノクロム A (**46**)¹¹⁷ などが報告されている。

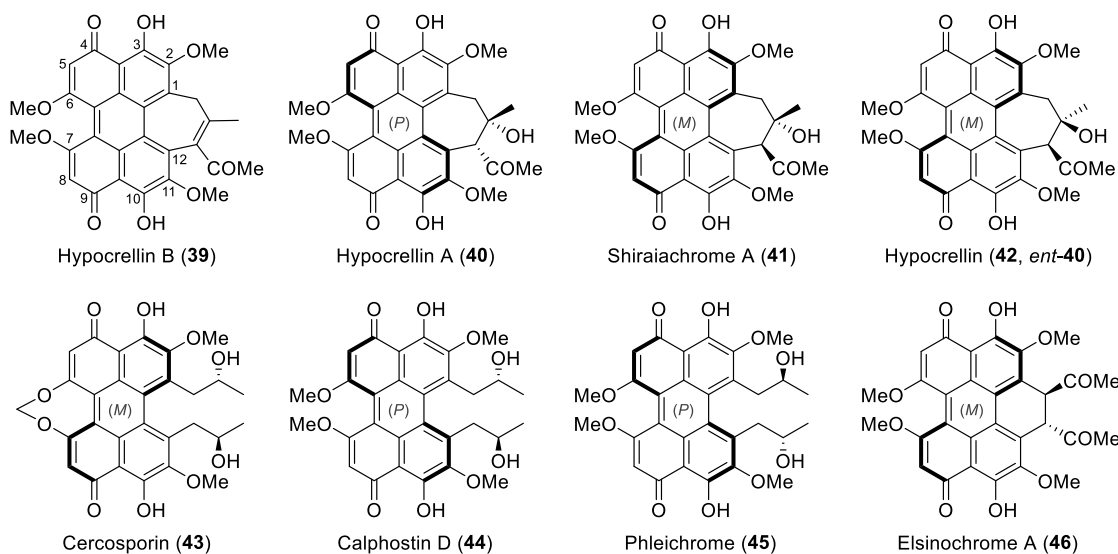


Figure 1.2.3 ペリレンキノン系色素の化学構造

ペリレンキノン系色素の構造的特徴として、i) C-3 位、C-4 位、C-9 位および C-10 位間でのケト-エノール互変異性と、ii) ヘリシティーを有するペリレンキノン骨格におけるアトロプ異性の 2 点が挙げられる¹¹⁸⁻¹²⁰。まず、ケト-エノール互変異性に関して記述する。Figure 1.2.4 に示すように、ペリレンキノン骨格には **I**~**IV** の 4 種類のケト-エノール互変異性体が存在する。この中で、**I** および **II** は、2 つの水酸基がともにペリレンキノン骨格の右側あるいは左側に位置する 3,10-ジヒドロキシ型および 4,9-ジヒドロキシ型であるのに対し、**III** および **IV** は、2 つの水酸基が対角の位置関係にある 3,9-ジヒドロキシ型および 4,10-ジヒドロキシ型である。Weiss らは、計算科学を用いて、4,9-dihydroxypyrene-3,10-dione (**II**) および 3,9-dihydroxypyrene-4,10-dione (**III**) の最安定構造のエネルギーを比較した¹²¹。その結果、**II** は、対角の位置に 2 つの水酸基を有する **III** と比較して、12.6 kJ/mol (= 3.0 kcal/mol) だけ安定であることを明らかにし、ペリレンキノン骨格の互変異性において、**I** および **II** が主な互変異性体であると推測している。

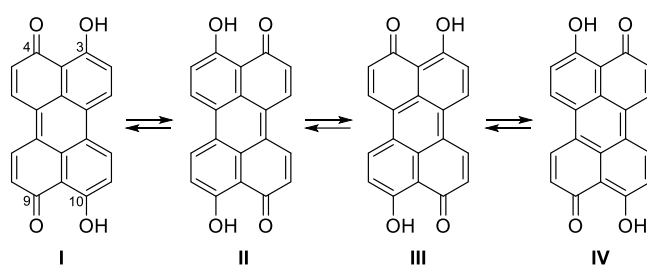


Figure 1.2.4 ペリレンキノン骨格の互変異性

また、Weiss らは、種々のペリレンキノン系色素を用いて、**I** に相当する 3,10-ジヒドロキシ型と **II** に相当する 4,9-ジヒドロキシ型の存在比率を推定している¹²¹。ペリレンキノン骨格の互変異性は非常に素早く、NMR 測定の時間スケールでは平均化された 1 種類の化合物としてのみ検出されるため、個々の互変異性体のシグナルを検出するのは困難であった。そこで、分子内水素結合を

形成しているフェノール性水酸基のプロトンと、その水酸基が結合している芳香族炭素との間の ${}^2J_{C,OH}$ が 4.5-5.0 Hz のカップリングを有することに着目し、推定した。すなわち、C-3 位および C-4 位それぞれにおいて、水酸基として結合している場合には ${}^2J_{C,OH}$ が観測され、カルボニル基として存在している場合には ${}^2J_{C,OH}$ が観測されないため、シグナルが平均化されると、互変異性体の存在比率に応じて C-3 位および C-4 位の ${}^2J_{C,OH}$ 値が 0 Hz から 5 Hz 程度まで変化する。これを利用し、得られた ${}^2J(C3,OH)$ と ${}^2J(C4,OH)$ の比を算出することで、互変異性体の存在比率を推定している。その結果、化合物によって、互変異性体の存在比率は大きく異なり、**42**、**45** および **46** では 2 つの互変異性体がともに中程度の割合で存在している一方、**43** では平衡が大きく偏り、大部分が 4,9-ジヒドロキシ型で存在していることが示唆された (Table 1.2.1)。存在比率に影響を与える要素として Weiss らは、置換基の電子的効果、フェノール性水酸基とカルボニル基との分子内水素結合の強さ、ペリレンキノン骨格のねじれの度合い、溶媒和効果および凝集効果を挙げている。また、C-5 位の水素の 1H -NMR の化学シフト (δ_{H-5}) は、C-5 位が芳香環として存在する割合とキノンとして存在する割合を反映しており、互変異性体の存在比率と関連していると述べている。実際、2 つの互変異性体がともに中程度の割合で存在すると示唆された **42**、**45** および **46** の δ_{H-5} は、6.5-6.6 ppm であるのに対し、大部分が 4,9-ジヒドロキシ型で存在することが示唆された **43** の δ_{H-5} は、7.03 ppm であり、C-5 位が芳香環として存在する割合が多いことと一致する。

なお、ヒポクレリン B (**39**) に関しても、互変異性は非常に素早く、NMR 測定的时间スケールでは平均化された 1 種類の化合物としてのみ検出されることが報告されているほか^{122,123}、**39** の δ_{H-5} は、6.42 ppm と報告されている^{111,112}。

Table 1.2.1 CDCl₃ 中での化合物 **42**、**43**、**45** および **46** の互変異性体の存在比率の推定値と H-5 位の化学シフト¹²¹

	${}^2J_{C,OH}$ (Hz)		Relative population of tautomers (%)		δ_{H-5} (ppm)
	C3, OH	C4, OH	3,10-Dihydroxy type	4,9-Dihydroxy type	
Hypocrellin (42)	2.7	3.1	47	53	6.50
Cercosporin (43)	≤0.3	5.2	5	95	7.03
Phleichrome (45)	2.0	3.8	34	66	6.58
Elsinochrome A (46)	3.0	3.0	50	50	6.61

次に、ペリレンキノン骨格のヘリシティーによるアトロプ異性について記述する。Figure 1.2.3 に示したように、ペリレンキノン系色素は、置換基の種類に応じて、*P*あるいは*M*のヘリシティーを有する。各化合物における 2 つのアトロプ異性体の安定性およびアトロプ異性化の起こりやすさは、化合物の種類により異なることが見出されている。例えば、**43** および **45** は、室温ではアトロプ異性化が非常に起こりにくく、安定である一方 (Table 1.2.2)、加熱条件下では、アトロプ異性化の活性化エネルギーを上回って、アトロプ異性化が進行し、**43** および **45** のアトロプ異性体が室温において単離可能であることが報告されている^{124,125}。これに対し、**40** および **42** は、室温でアトロプ異性化が容易に進行し、NMR スペクトルは、ジアステレオマーの関係にある 2 つのアトロプ異性体の平衡混合物として観測される。このことは、**40** および **42** の 1H -NMR 測定を -5 °C

にて実施した際に、アトロプ異性化が抑制されたことで観測された2組のシャープなシグナルが、それぞれ2つのアトロプ異性体であると帰属されたことで示された^{122,123}。**43**および**45**と比較して、**40**および**42**のアトロプ異性化が容易に起こる要因は、**43**および**45**のC-1位およびC-12位のアシル鎖が、**40**および**42**では7員環に置き換わったことで、立体障害が低下したためだと考察されている。なお、**40**および**42**は、Figure 1.2.3に示したヘリシティーのアトロプ異性体の方が安定であり、¹H-NMRのシグナル比から2つのアトロプ異性体の存在比が約3:1であることが示されている。

Table 1.2.2 化合物**40**、**42**、**43**および**45**のアトロプ異性化の活性化エネルギーとアトロプ異性化の半減期における温度依存性

	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	T (°C)	$t_{1/2}$
Hypocrellin A (40) ¹²²	15.3 ^a	-	-
Hypocrellin (42) ¹²³	15.7 ^b	-	-
Cercosporin (43) ¹²⁵	28.2 ^c	25	2 y
		60	4 d
		90	2.5 h
		180	3 s
Phleichrome (45) ¹²⁵	30.2 ^c	25	51 y
		60	75 d
		90	38 h
		180	27 s

^a A value given at 26.85 °C in acetone-*d*₆. ^b A value given at 22 °C in acetone-*d*₆. ^c A value given at 65 °C in DMSO-*d*₆.

一方、ヒポクレリン B (**39**)の場合は、存在する2つのアトロプ異性体がエナンチオマーの関係にあるため、NMRでは区別できない (Figure 1.2.5)。

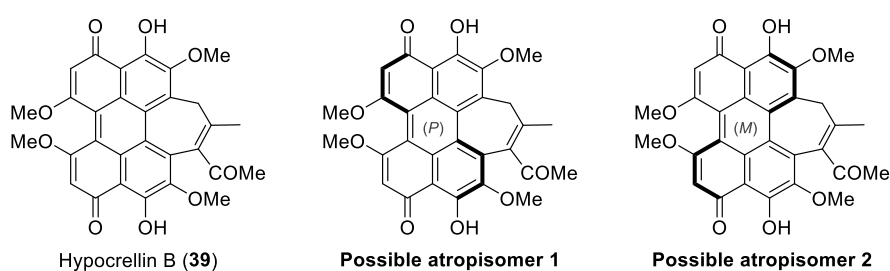


Figure 1.2.5 ヒポクレリン B (**39**)のアトロプ異性体の化学構造

39の単離・構造決定文献¹¹²において、**39**の円偏光二色性 (CD) スペクトルが測定されている。ヘリシティーを有するペリレンキノン系色素の場合は、そのヘリシティー (*P*あるいは*M*)に応じたCDスペクトルが観測される一方、**39**ではCDスペクトルが観測されなかった。さらに、異なるヘリシティーを有する**40**および**41**の脱水反応により、**39**を合成し、同様にCDスペクトルを測定した場合も、CDスペクトルが観測されなかった。このことより、**39**のエネルギー的に等価な2つのアトロプ異性体は、容易にアトロプ異性化してラセミ体となり、互いのCDスペクトルを打ち消し合っていると推測されており、**39**の2つのアトロプ異性体はほぼ1:1の存在比で存在していると考えられている^{112,119}。

以上の内容を化合物 **39** に関してまとめると、ケト-エノール互変異性およびアトロプ異性により、室温では、計 4 種類の化合物の平衡混合物として存在していると考えられている (Figure 1.2.6)。

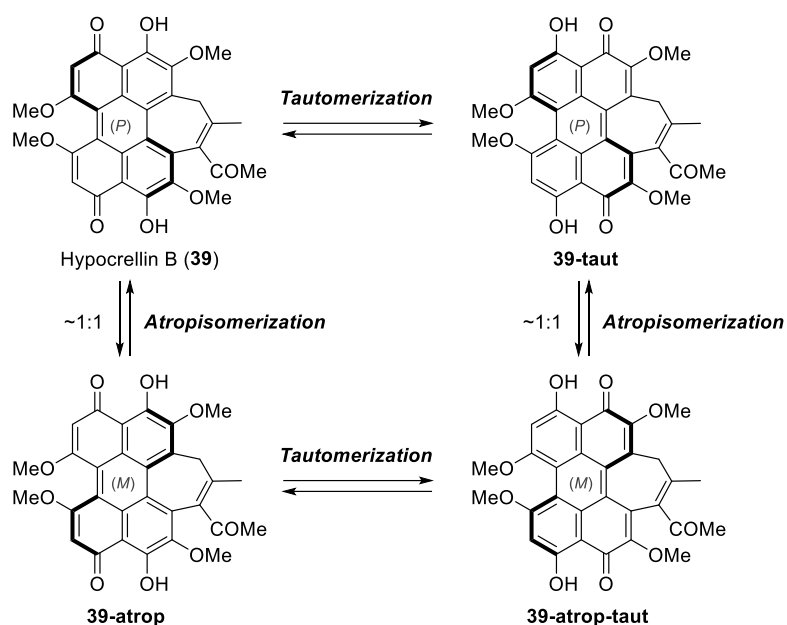


Figure 1.2.6 ヒポクレリン B (39)の互変異性およびアトロプ異性

39 の全合成は、1997 年に Lown らによって達成されている¹²⁶。また、**39** の生物活性として、光照射下における抗がん活性¹²⁷⁻¹²⁹ および抗ウイルス活性¹³⁰ が報告されていることから、単離当初より光感受性分子としての研究が盛んに行われてきた。

39 は、可視光領域にまたがる幅広い吸収スペクトルを示し、生体透過性の高い 600 nm 以上の波長域にまで吸収を有する化合物である¹³¹。加えて、**39** は、高い一重項酸素生成量子収率 ($\Phi_{\Delta} = 0.76$ in benzene) を示すことが報告されている^{131,132}。このような性質から、630 nm の光照射下において、種々の細胞に対し高い光細胞毒性を発現することが見出されている^{128,133}。さらに、**39** は担がんマウスに対し、光照射下において抗がん活性を示すことが明らかにされているほか¹²⁷⁻¹²⁹、第一世代の PDT 光感受性分子であるポルフィマーナトリウムと比較して、素早く体内から排出されるため、光過敏症の症状の継続期間を短縮できる可能性があるとして報告されている¹³⁴。以上のような優れた特徴から、**39** は、第二世代の PDT 光感受性分子の候補として注目されている^{16,129,135}。

第3章 過酸化水素とがん

本章では、本論文において、がん細胞に過剰発現するバイオマーカーとして着目した過酸化水素 (H_2O_2) の生体内での役割や疾病との関係について記述する。

3.1 生体内での過酸化水素の役割

H_2O_2 は、ROS の一種であり、ミトコンドリアにおける電子伝達系や細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼなどにより生成したスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) をスーパーオキシドディスムターゼが不均化すること等で生成する^{136,137} (Figure 1.3.1)。また、 H_2O_2 は、鉄イオン (Fe^{2+}) やその他の金属イオンとの Fenton 反応で、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) へと変換されるほか、グルタチオン (GSH) ペルオキシダーゼやカタラーゼなどにより水と酸素に分解される。このように H_2O_2 は生成と消費を繰り返している一方、その生成と消費の速度は制御され、バランスが保たれているため、状況に応じて適切な濃度の H_2O_2 が細胞内に存在している¹³⁶⁻¹³⁸。

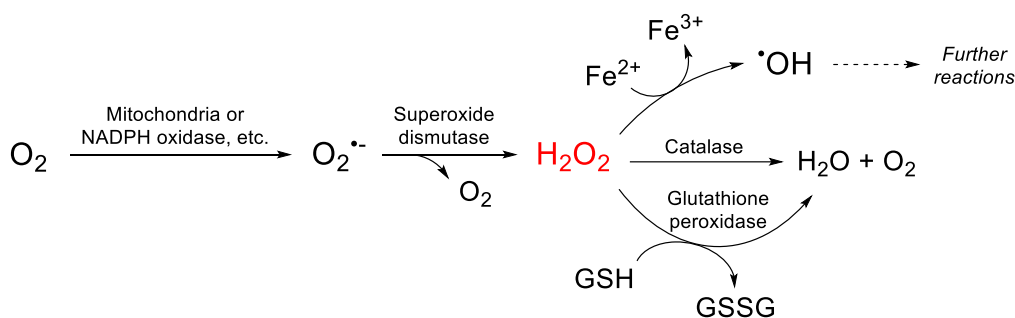


Figure 1.3.1 生体内での過酸化水素の生成と消費

近年、 H_2O_2 は、細胞に酸化ストレスを与える分子としてだけでなく、細胞内のレドックス状態を伝達するシグナル伝達分子として機能することが明らかとなってきている¹³⁷。例えば、成長因子などがその受容体に結合することで、細胞内 H_2O_2 濃度が制御されて増大し、必要な濃度に達すると、特定のタンパク質の高反応性のチオール基 ($-\text{SH}$) が可逆的に酸化されて、スルフェン酸型 ($-\text{SOH}$) となる。これに分子内のチオール基や別のタンパク質あるいはグルタチオンのチオール基が反応することでジスルフィド結合を形成したり、さらに酸化されてスルフィノ基 ($-\text{SO}_2\text{H}$) やスルホ基 ($-\text{SO}_3\text{H}$) となる。このような H_2O_2 濃度に依存したチオール基の変換により、特定のタンパク質の酵素活性が阻害され、シグナル伝達に影響を与えることが報告されている。

3.2 バイオマーカーとしての過酸化水素

通常は H_2O_2 を始めとする ROS の生成と消費のバランスが制御されている一方、ROS の過剰生成あるいは消費阻害により、細胞内の ROS の生成と消費のバランスが崩れると、細胞内の酸化ストレスが増大して、がんや神経変性疾患などの様々な疾病を引き起こす原因となることが報告さ

れている¹³⁹。また、様々な種類のがんにおいて、正常組織と比較して、 H_2O_2 を生成するスーパーオキシドディスムターゼの過剰発現および H_2O_2 を分解するカタラーゼの低発現により、 H_2O_2 の発現量が増大していることが明らかにされている¹⁴⁰。同様に、がん細胞においても H_2O_2 発現量の増大が見られ¹⁴¹、細胞内の H_2O_2 濃度は、正常細胞では $0.001\text{-}0.7\ \mu\text{M}$ である一方、がん細胞では $10\text{-}100\ \mu\text{M}$ に達するものもあると推定されている¹⁴²。加えて、 H_2O_2 の発現量とがんの転移や浸潤との関係が報告されており¹⁴³⁻¹⁴⁷、例えば、高転移性のヒト膀胱がん細胞 253J B-V は、非転移性のヒト膀胱がん細胞 253J と比較して、 H_2O_2 および転移に関連する成長因子を高発現していること、および 253J B-V 細胞において、 H_2O_2 の発現を抑制することで、転移に関連する成長因子の発現が抑制されることが明らかにされている¹⁴⁴。以上のことから、 H_2O_2 は、がんなどの疾病に対するバイオマーカーとして注目されており、 H_2O_2 と反応して物性や活性、機能が変化する H_2O_2 応答性分子が、1.4節で述べた H_2O_2 応答型光感受性分子を含め、これまでに数多く開発されている¹⁴⁸。

H_2O_2 応答性分子で使用される代表的な H_2O_2 応答部位として、ボロン酸およびボロン酸エステルが挙げられる。ボロン酸およびボロン酸エステルは H_2O_2 と高い選択性で反応し酸化され、加水分解を経て、対応する水酸基へと変換される¹⁴⁸ (Figure 1.3.2)。

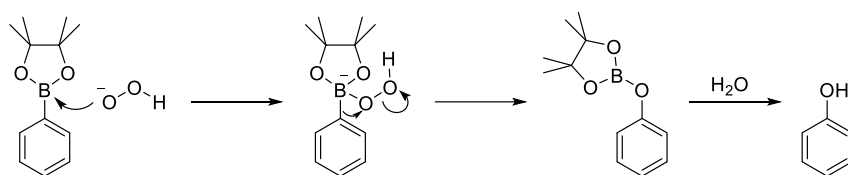


Figure 1.3.2 過酸化水素によるボロン酸エステルの酸化反応

2004年、Changらは、蛍光分子であるフルオレセインに、 H_2O_2 に反応するボロン酸エステルを導入した H_2O_2 応答性蛍光プローブ 47を報告している¹⁴⁹ (Figure 1.3.3)。47は、可視光領域に吸収を有さない無蛍光性の閉環型構造であるが、 H_2O_2 と反応することで、フルオレセインを放出し、蛍光強度が1000倍以上に増大することを見出している。

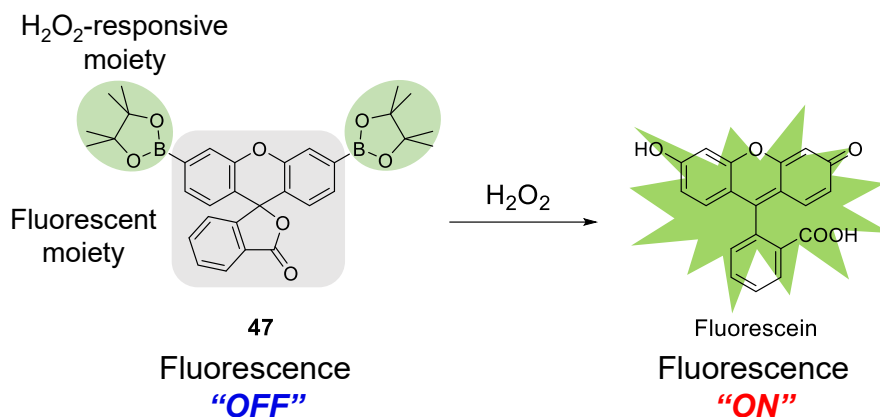


Figure 1.3.3 フルオレセインを基本骨格とした H_2O_2 応答性蛍光プローブ 47

また、2010年、Changらは、生物発光基質であるホタルルシフェリンの水酸基に、ベンジルエーテルリンカーを介してH₂O₂に応答するボロン酸を連結したH₂O₂応答性生物発光プローブ**48**を報告している¹⁵⁰ (Figure 1.3.4)。**48**は、ルシフェラーゼとの反応および生物発光が抑制されているのに対し、H₂O₂と反応してルシフェリンを放出した後は、生物発光が約7倍に増大することを見出している。さらに、ルシフェラーゼ発現細胞およびルシフェラーゼ発現マウスを用いて、**48**によるH₂O₂濃度依存的な生物発光イメージングを実証している。

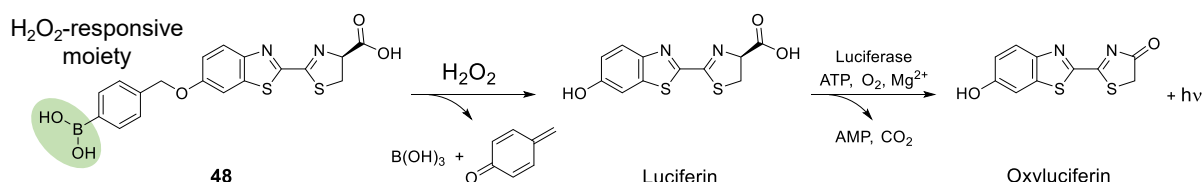


Figure 1.3.4 ホタルルシフェリンを基本骨格としたH₂O₂応答性生物発光プローブ**48**

当研究室では、2017年に、セラノスティクスを指向したH₂O₂応答型ハイブリッド分子**49**を報告している¹⁵¹ (Figure 1.3.5)。**49**は、H₂O₂応答部位としてボロン酸エステル、蛍光部位としてレゾルフィン、および治療を行う光感受性部位としてアントラセンを有する分子である。**49**は蛍光がOFFであるが、H₂O₂を過剰発現するがん細胞内に入ると、H₂O₂によりボロン酸エステルが酸化され、蛍光分子であるレゾルフィンを放出する。これにより、まず標的細胞のイメージングを行う。次に、イメージングされた細胞に対し、人体に無害な長波長紫外光を照射することで、アントラセンが励起し、H₂O₂を過剰発現するがん細胞選択的な光細胞毒性を発現することを見出している。

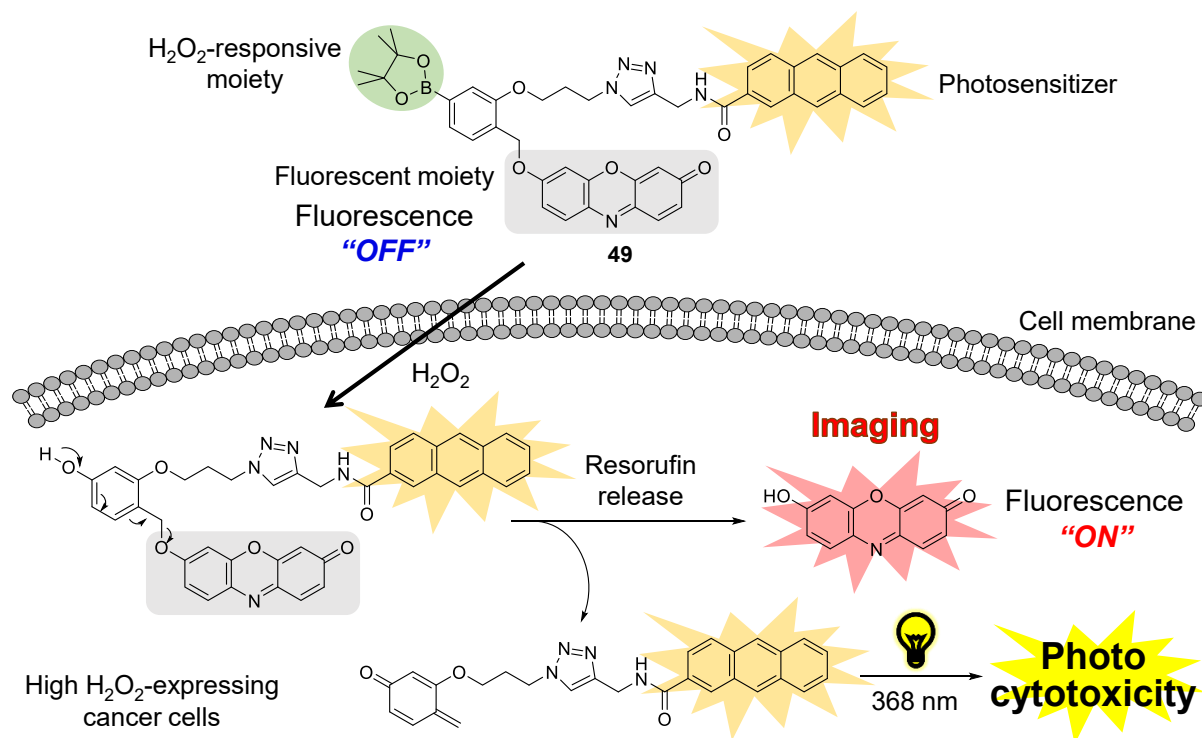


Figure 1.3.5 セラノスティクスを指向したH₂O₂応答型ハイブリッド分子**49**

第4章 タンパク質を光分解する光感受性分子

当研究室では、これまでに、**Figure 1.4.1** に示した低分子化合物を用いた DNA¹⁰、タンパク質¹¹ および糖鎖¹² の光分解研究が行われてきた。とりわけ、タンパク質を光分解する光感受性分子としては、アントラキノン¹⁵²⁻¹⁵⁶、アントラセン¹⁵⁷、2-フェニルキノリン¹⁵⁸⁻¹⁶⁰、ポルフィリン¹⁶¹⁻¹⁶³ およびフラレーン¹⁶⁴⁻¹⁶⁷ を見出している。さらに、適切にデザインしたアントラキノン誘導体、2-フェニルキノリン誘導体、ポルフィリン誘導体およびフラレーン誘導体が、標的としたインフルエンザ関連タンパク質ノイラミニダーゼ¹⁵³、乳がん関連タンパク質エストロゲンレセプター α ^{158,159}、アルツハイマー関連タンパク質アミロイド β ¹⁶³ およびエイズ関連タンパク質 HIV-1 プロテアーゼ¹⁶⁴ などの疾病関連タンパク質や生命現象に深く関与するタンパク質である α -グルコシダーゼ¹⁶⁰ を、人体に無害な長波長紫外光あるいは可視光照射下で効果的に光分解することを明らかにしている (**Figure 1.4.2**)。

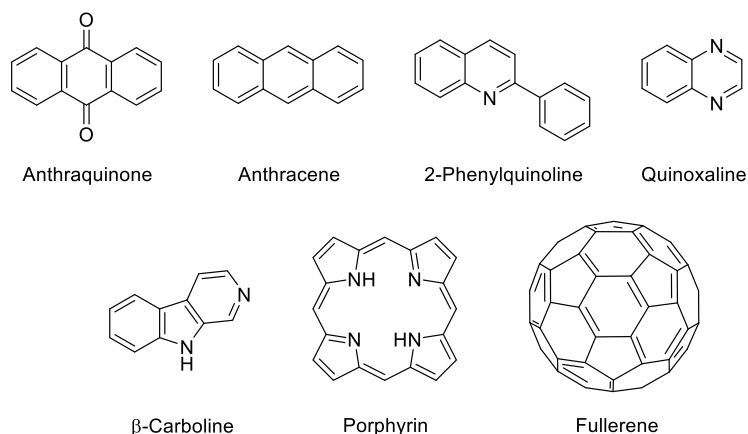


Figure 1.4.1 当研究室で生体高分子を光分解することを見出した光感受性分子

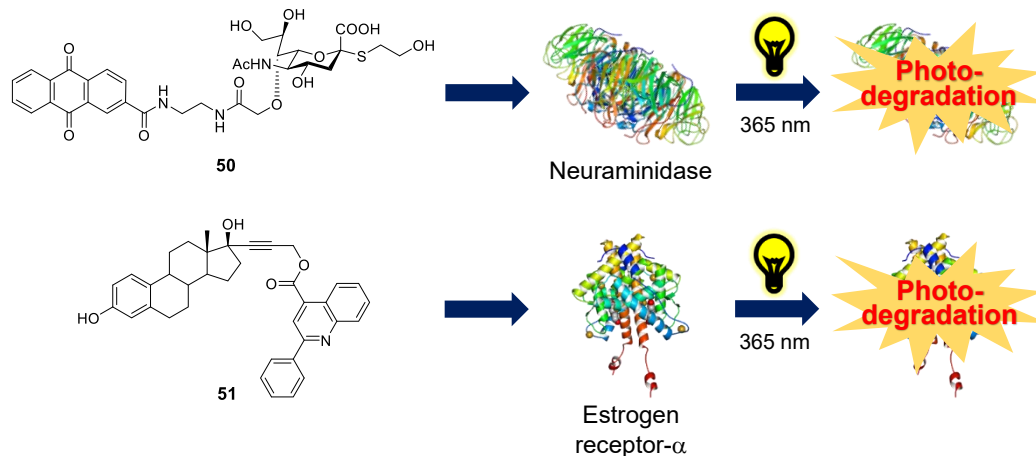


Figure 1.4.2 標的タンパク質の光分解

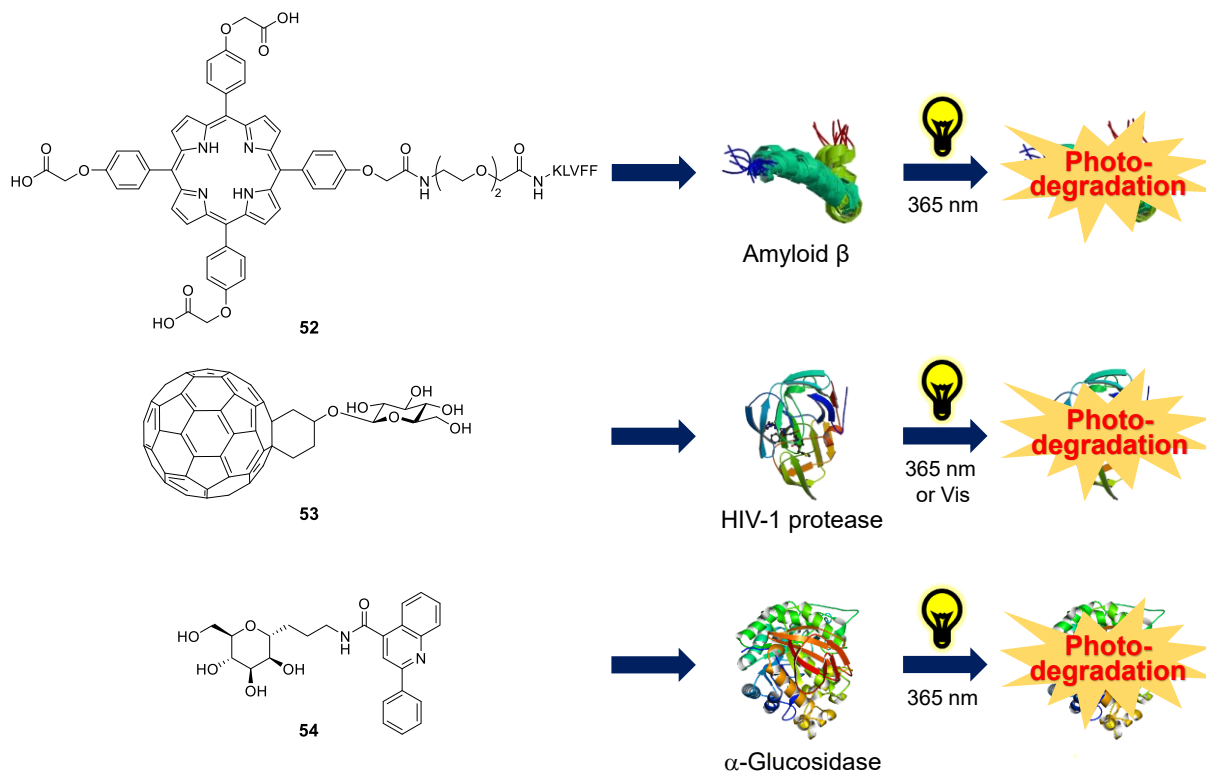


Figure 1.4.2 標的タンパク質の光分解 (続き)

また、Meares らは、2-ブロモ-4'-ニトロアセトフェノン(55)および5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(56)が、タンパク質のシステイン残基と反応して修飾し、紫外光の照射下、タンパク質を光分解することを見出している¹⁶⁸ (Figure 1.4.3)。

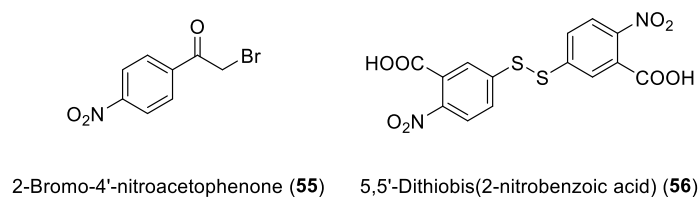


Figure 1.4.3 55 および 56 の化学構造

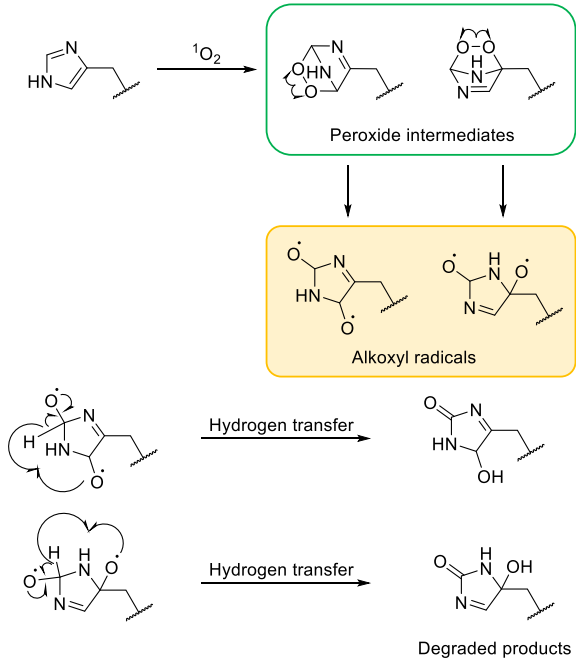
光感受性分子によるタンパク質の光分解は、特定波長の光照射下において、光感受性分子が生成する一重項酸素やヒドロキシラジカルなどの ROS により、以下に示す i) および ii) の 2 段階の機構で起こると提唱されている^{26,169,170}。

i) 一重項酸素による芳香族アミノ酸残基の酸化と生成したペルオキシド中間体からのヒドロキシラジカルおよびアルコキシラジカルの生成

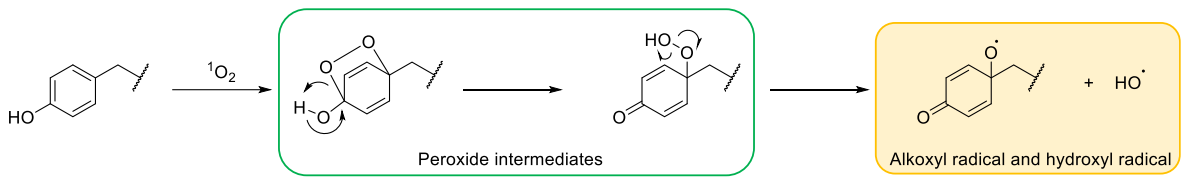
光感受性分子より生成した一重項酸素はまず、ヒスチジン、チロシンおよびトリプトファン残基と反応して、ペルオキシド中間体を生成する (Figure 1.4.4)。その後、ペルオキシドの開裂により、ヒドロキシラジカルおよびアルコキシラジカルを生成する。このヒドロキシラジ

カルおよびアルコキシラジカルが、ii)に示す機構でタンパク質の主鎖を切断する。

Histidine residue



Tyrosine residue



Tryptophan residue

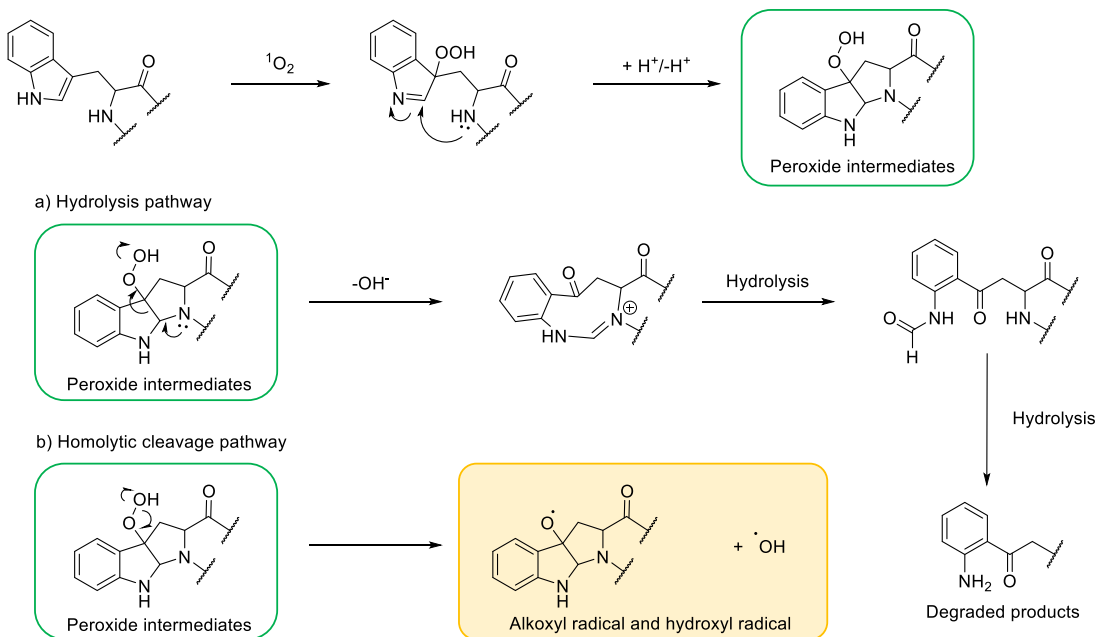


Figure 1.4.4 一重項酸素による芳香族アミノ酸残基からのラジカル生成の提唱機構

ii) ヒドロキシラジカルおよびアルコキシラジカルによるタンパク質主鎖の切断

i)により生じたヒドロキシラジカルおよびアルコキシラジカル、または光感受性分子が生成したヒドロキシラジカルは、タンパク質主鎖の α 炭素から水素をラジカル的に引き抜く。続いて、ラジカルを有する α 炭素に酸素分子が付加した後、二量化や加水分解を経て、主鎖が切断され、タンパク質が分解される (Figure 1.4.5)。

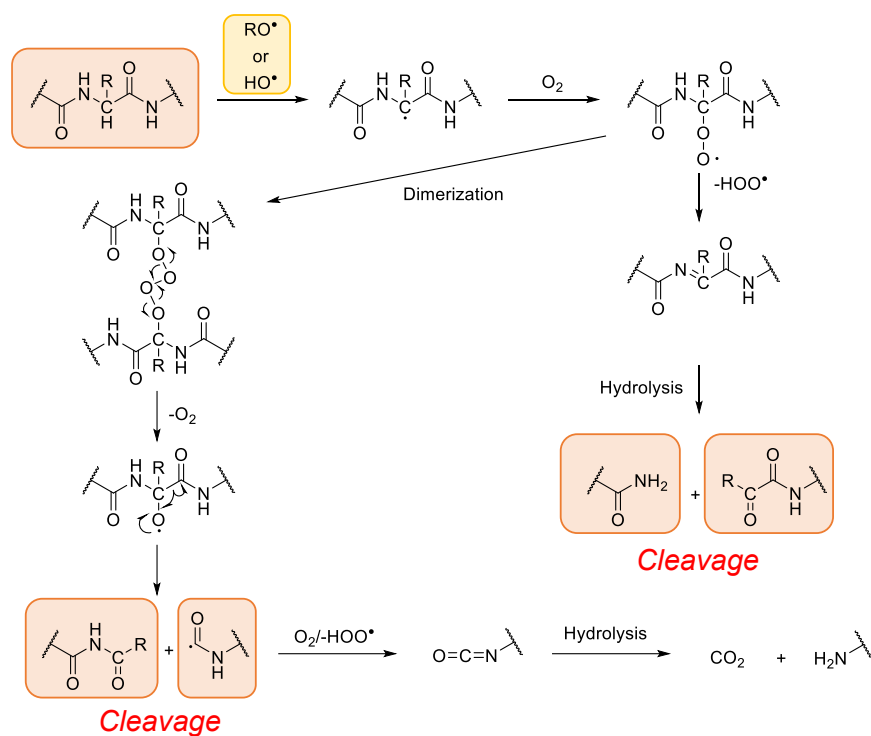


Figure 1.4.5 ラジカル種によるタンパク質主鎖の切断の提唱機構

第 5 章 本論文の概要

本論文では、光感受性の OFF/ON を制御可能な新たな光感受性分子の探索とがん細胞に過剰発現するバイオマーカーである H_2O_2 に応答する刺激応答型光感受性分子の創製について記述した。

本論第 1 章 ネオカルチノスタチン・クロモフォアの 2-ナフトール部位におけるタンパク質光分解活性の発見と構造活性相関研究¹⁷¹

本論第 1 章においては、ネオカルチノスタチン・クロモフォアの 2-ナフトール部位 **57** におけるタンパク質光分解活性の発見と光感受性に関する構造活性相関研究について記述した。すなわち、**57** が人体に無害な長波長紫外光の照射下、タンパク質を光分解することを初めて見出した。さらに、**57** における光感受性の発現に重要な構造を明らかにするため、本論文では **57** の C-1 位および C-2 位に着目し、これら 2 か所の置換基を変更した 5 種類の類縁体と **57** を用いた構造活性相関研究を行った。その結果、C-1 位にメチルエステルあるいはカルボキシ基、および C-2 位に水酸基を有する構造、すなわち 2-ナフトール部位における 1,3-ジカルボニルエノール構造が光感受性の発現に重要であり、その水酸基をメチル化することで光感受性を OFF に制御できることを見出した (Figure 1.5.1)。

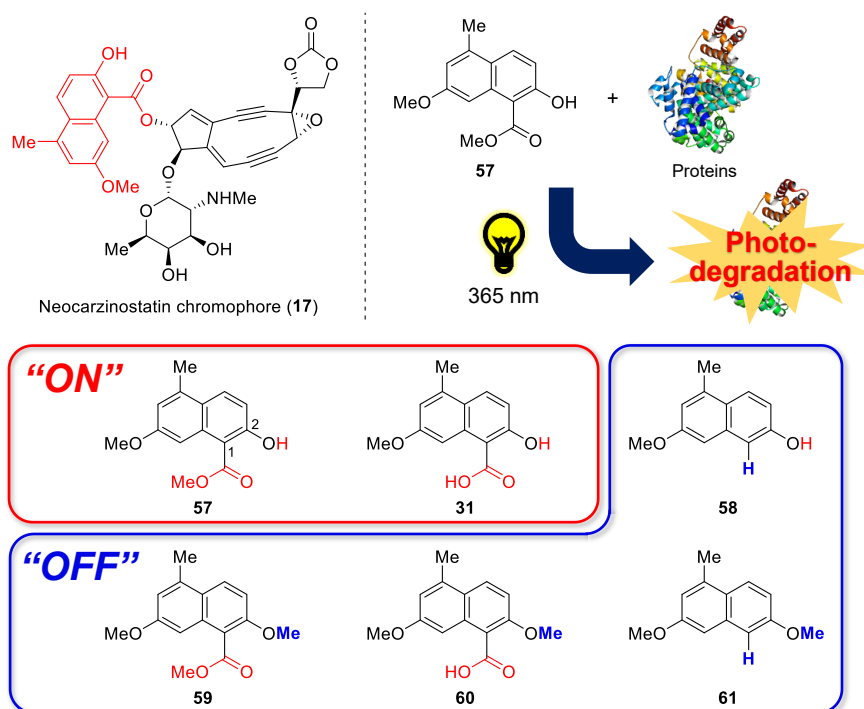


Figure 1.5.1 本論第 1 章の概要

本論第 2 章 ネオカルチノスタチン・クロモフォアの 2-ナフトール部位を基本骨格とした H_2O_2 応答型光感受性分子の創製¹⁷¹

本論第 2 章においては、本論第 1 章で光感受性を制御可能であることを見出したネオカルチノ

スタチン・クロモフォアの2-ナフトール部位 **57** を基本骨格とした H_2O_2 応答型光感受性分子の創製について記述した。すなわち、**57** が有する 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基に、 H_2O_2 応答性のボロン酸エステルをベンジルエーテルリンカーを介して連結した **62** をデザインおよび合成後、長波長紫外光 (365 nm) の照射下における光感受性を評価した。その結果、**62** の光感受性が OFF であること、および **62** が H_2O_2 と反応して、光感受性が ON である **57** を放出することを明らかにした。さらに、**62** の正常細胞 WI-38 および H_2O_2 を過剰発現するがん細胞 B16F10 に対する光細胞毒性を評価した。その結果、**62** が B16F10 細胞に対して選択的な光細胞毒性を発現する刺激応答型光感受性分子であることを明らかにした (Figure 1.5.2)。

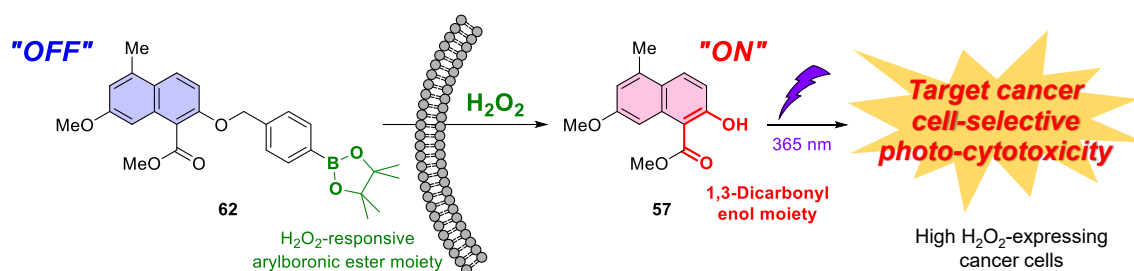


Figure 1.5.2 本論第2章の概要

本論第3章 ヒポクレリン B を基本骨格とした H_2O_2 応答型光感受性分子の創製¹⁷²

本論第3章においては、**57** と同様、1,3-ジカルボニルエノール構造を有し、かつ生体透過性の高い長波長の可視光で励起可能な光感受性分子であるヒポクレリン B (**39**) を基本骨格とした H_2O_2 応答型光感受性分子の創製について記述した。すなわち、**39** が有する 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基に、ボロン酸エステルを連結した **63** を合成後、660 nm の光照射下における光感受性を評価した。その結果、**63** の光感受性が OFF であること、および **63** が H_2O_2 と反応して、光感受性が ON である **39** を放出することを明らかにした。さらに、**63** が生体透過性の高い 660 nm の光照射下で B16F10 細胞に対して選択的な光細胞毒性を発現することを見出し、**63** が低侵襲性の刺激応答型光感受性分子であることを明らかにした (Figure 1.5.3)。

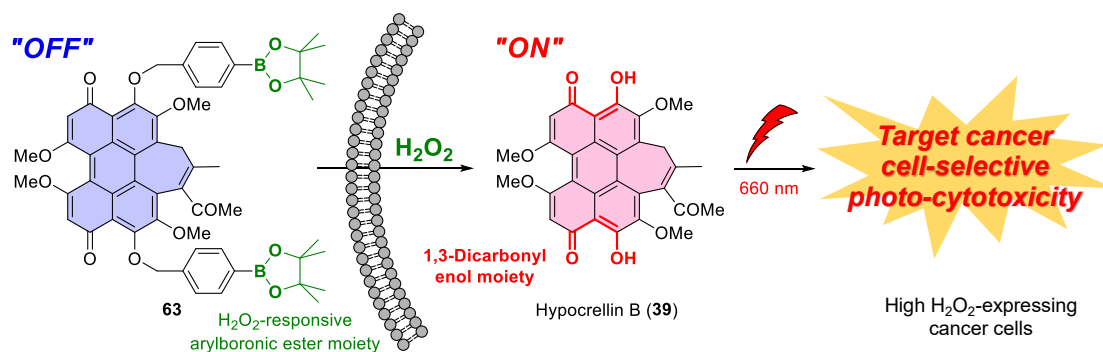


Figure 1.5.3 本論第3章の概要

本論

第 1 章 ネオカルチノスタチン・クロモフォアの 2-ナフトール部位におけるタンパク質光分解活性の発見と構造活性相関研究

1.1 研究目的

序論第 2 章 2.1 節で前述したように、ネオカルチノスタチン・クロモフォア (NCS-chr) (17) はチオール存在下あるいは長波長紫外光の照射下でピラジカルを生じ、DNA を切断することが明らかにされている。加えて、当研究室では、NCS-chr (17) の 9 員環エンジーン構造を有さない 2-ナフトール部位—糖部位ハイブリッド **38** が、長波長紫外光の照射下で、DNA を光切断することを見出している¹¹⁰。しかし、NCS-chr (17) の 2-ナフトール部位における光感受性の発現に重要な構造は明らかにされていなかった。そこで本研究では、まず初めに、**38** が光照射下、ROS を生成することで DNA を光切断しているならば、DNA 相互作用部位である *N*-メチルフコサミン部位を有さない 2-ナフトール部位 **57** のみで、長波長紫外光の照射下、タンパク質を光分解するのではないかと仮説を立て、検証した。次に、NCS-chr (17) の 2-ナフトール部位における光感受性の発現に重要な構造を明らかにするため、本研究では **57** の C-1 位および C-2 位に着目し、これら 2 か所の置換基を変更した 5 種類の類縁体、すなわち、**57** の C-1 位メチルエステルをそれぞれカルボキシ基および無置換に変更した **31** および **58** と、**57**、**31** および **58** の C-2 位水酸基をそれぞれメトキシ基に変更した **59-61** を用いた構造活性相関研究を行った (Figure 2.1.1)。

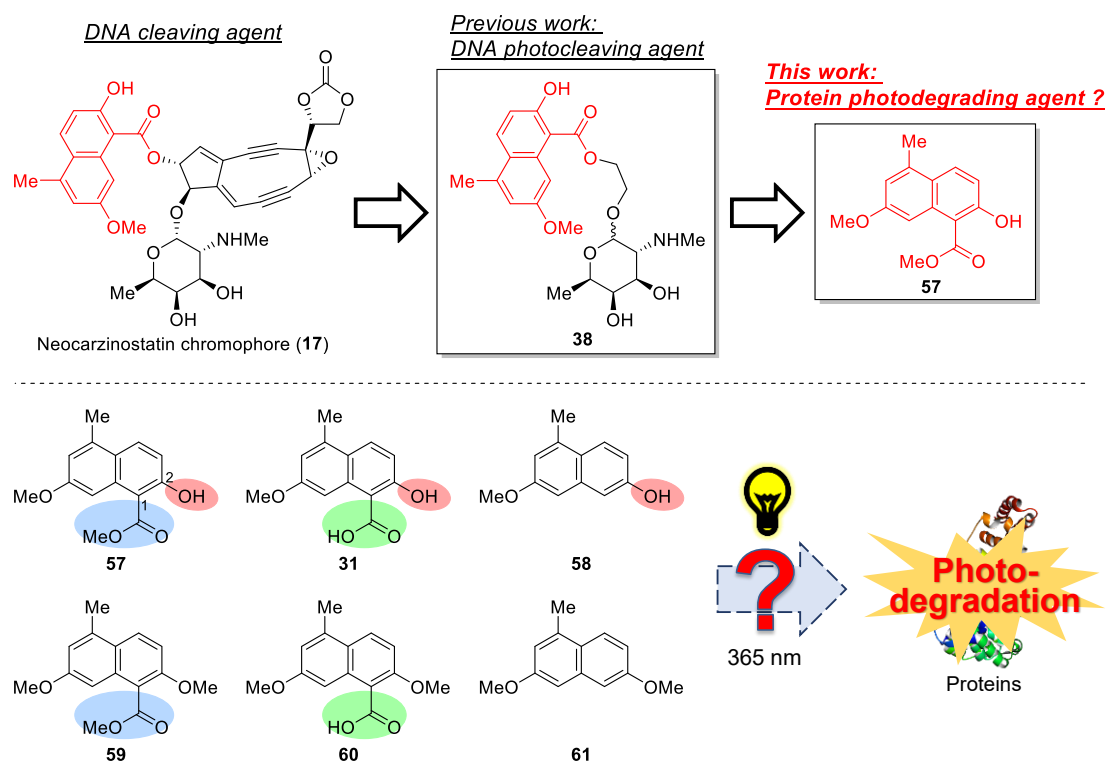
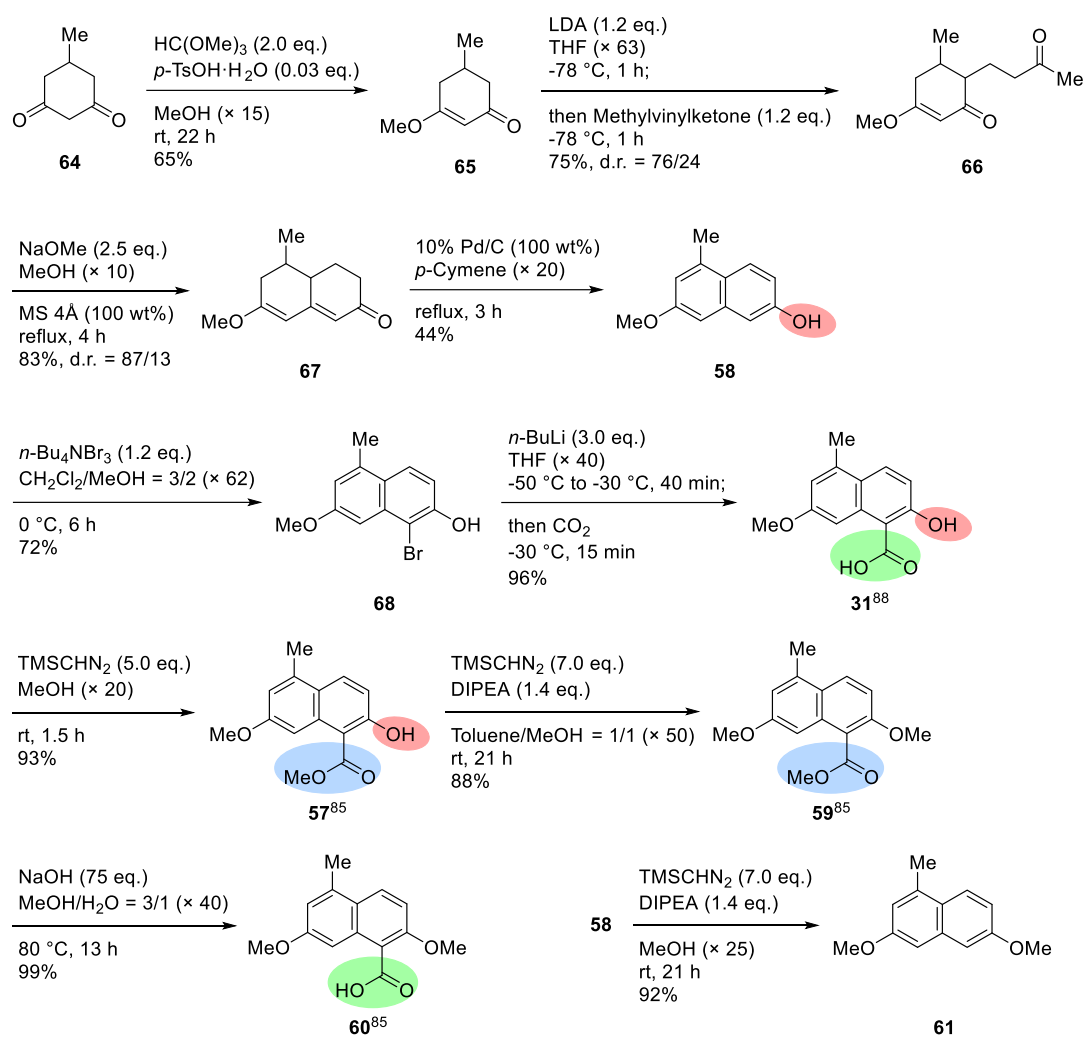


Figure 2.1.1 本論第 1 章の研究目的

1.2 2-ナフトール誘導体 31 および 57-61 の合成

2-ナフトール誘導体 **31** および **57-61** の合成スキームを以下に示す (Scheme 2.1.1)。本研究では平間らの合成例⁸⁸に従い、まず、市販原料である 5-メチル-1,3-シクロヘキサジオン(**64**)の一方のカルボニル基をメタノール溶媒中、酸触媒存在下でエノールエーテル化することで **65** を得た。次に、LDA を用いて **65** をリチウムエノラート化した後、メチルビニルケトンへの共役付加を行うことで **66** を得た。得られた **66** の分子内アルドール縮合、続く 10% Pd/C を用いた脱水素化によって芳香環化を行うことで、2-ナフトール誘導体 **58** を合成した。次に、**58** に対して、テトラブチルアンモニウムトリブロミドを用いた位置選択的ブロモ化を行った後、*n*-ブチルリチウムを用いたハロゲン-金属交換、続く炭酸ガスを用いたカルボキシル化により、**31**⁸⁸ を合成した。さらに、**31** に対し、TMS ジアゾメタンを用いたメチル化を 2 段階に分けて行うことで、**57**⁸⁵ および **59**⁸⁵ を合成した。最後に、得られた **59** のメチルエステルを加水分解することで、**60**⁸⁵ を合成した。また、**58** に対して、TMS ジアゾメタンを用いたメチル化を行うことで、**61** を合成した。



Scheme 2.1.1 2-ナフトール誘導体 **31** および **57-61** の合成

1.3 2-ナフトール部位 **57** のタンパク質光分解活性評価

合成した 2-ナフトール部位 **57** のタンパク質光分解活性を SDS-PAGE により評価した。タンパク質としては初めに、ウシ血清アルブミン (BSA) を選択して評価を行った (Figure 2.1.2)。

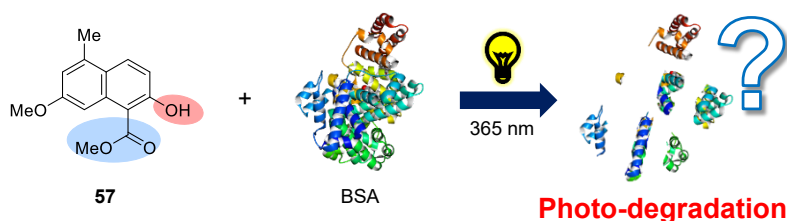


Figure 2.1.2 2-ナフトール部位 **57** の BSA に対するタンパク質光分解活性評価

57 の BSA に対するタンパク質光分解活性評価のプロトコルを以下に示す。

- ① 0.5 mL チューブに、BSA (1.5 μ M) および 2-ナフトール部位 **57** (0, 0.15, 1.5, 15 および 150 μ M) を含む 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 10 μ L を調製した。
- ② 調製したサンプルを、液面の 10 cm 上方からの UV 光照射下 (365 nm, 100 W) あるいは非 UV 光照射下において 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、サンプルに 2-メルカプトエタノールを含むローディングバッファー 2 μ L を加え、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱して、タンパク質の還元処理を行った。
- ④ 8% ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。

2-ナフトール部位 **57** の BSA に対するタンパク質光分解活性評価の結果を Figure 2.1.3 に示す。

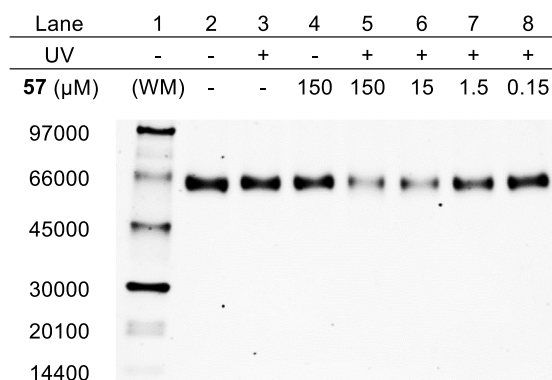


Figure 2.1.3 Photodegradation of BSA using **57** under UV light irradiation. BSA (1.5 μ M) was incubated with **57** in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 $^{\circ}$ C for 2 h under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 10 cm from the sample. The products were analyzed by tricine-SDS-PAGE. The gels were stained with Sypro Ruby protein gel stain. Lane 1: size marker; lane 2: BSA alone; lane 3: BSA upon photo-irradiation; lane 4: BSA + **57** (150 μ M) without photo-irradiation; lanes 5-8: BSA + **57** (concentrations 150, 15, 1.5 and 0.15 μ M, respectively) upon photo-irradiation.

レーン 1 は分子量マーカー、レーン 2 は BSA のみのコントロール、レーン 3 は BSA に UV 光を照射したサンプル、レーン 4 は BSA に **57** (150 μM)を加えて UV 光を照射しなかったサンプル、レーン 5-8 は BSA に **57** (150, 15, 1.5 および 0.15 μM)を加えて UV 光を照射したサンプルである。レーン 2 と比較して、レーン 3 および 4 では、BSA のバンドに変化が見られなかったことから、**57** の非存在下で BSA に UV 光を照射した場合および BSA に **57** を加えて UV 光を照射しなかった場合には、BSA は分解されないことを確認した。これに対して、レーン 5 および 6 では、BSA のバンドが顕著に薄くなったことから、**57** が 365 nm の光照射下、BSA を光分解することを初めて見出した。なお、レーン 5 および 6 において、BSA の分解に伴う特定の低分子量のバンド等は検出されなかった。この理由は、BSA の光分解が、タンパク質上のランダムな位置で起こるため、個々の分子量のフラグメントの量が少なく、検出限界を下回ったためであると考えられる¹⁷³。

次に、2-ナフトール部位 **57** の BSA 以外の各種タンパク質に対する光分解活性を検証するため、**57** の鶏卵リゾチーム (Lyso) およびコンカナバリン A (Con A) に対するタンパク質光分解活性評価を行った (Figure 2.1.4)。

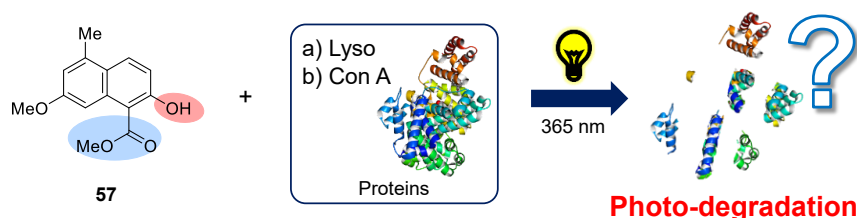


Figure 2.1.4 2-ナフトール部位 **57** の各種タンパク質に対する光分解活性評価

57 の各種タンパク質に対する光分解活性評価の protocols を以下に示す。

- ① 0.5 mL チューブに、Lyso あるいは Con A (1.5 μM) および 2-ナフトール部位 **57** (0, 0.15, 1.5, 15 および 150 μM) を含む 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 10 μL を調製した。
- ② 調製したサンプルを、液面の 10 cm 上方からの UV 光照射下 (365 nm, 100 W) あるいは非 UV 光照射下において 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、サンプルに 2-メルカプトエタノールを含むローディングバッファー 2 μL を加え、95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱して、タンパク質の還元処理を行った。
- ④ 8% ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。

2-ナフトール部位 **57** の Lyso および Con A に対するタンパク質光分解活性評価の結果をそれぞれ Figure 2.1.5a および b に示す。各図のレーン 1 は分子量マーカー、レーン 2 はタンパク質のみのコントロール、レーン 3 はタンパク質に UV 光を照射したサンプル、レーン 4 はタンパク質に **57** (150 μM)を加えて UV 光を照射しなかったサンプル、レーン 5-8 はタンパク質に **57** (150, 15, 1.5 および 0.15 μM)を加えて UV 光を照射したサンプルである。BSA の場合と同様、レーン 2 と比較して、レーン 3 および 4 では、Lyso および Con A のバンドに変化が見られなかったことから、**57** の非存在下で Lyso および Con A に UV 光を照射した場合と、Lyso および Con A に **57** を加えて UV 光を照射しなかった場合には、Lyso および Con A は分解しないことを確認した。一方で、レ

ーン5および6では、LysoおよびCon Aのバンドが顕著に薄くなったことから、**57**が365 nmの光照射下において、LysoおよびCon Aを光分解することを見出した。加えて、レーン5-8を比較することで、**57**によるタンパク質の光分解が、**57**の濃度依存的に起こることを明らかにした。以上の結果より、**57**は、365 nmの光照射下、タンパク質を光分解することを見出した。

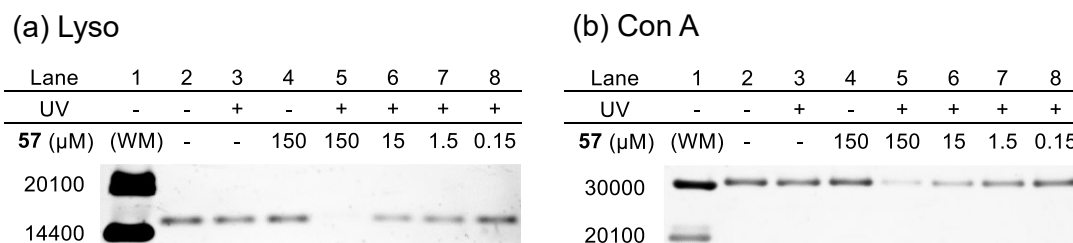


Figure 2.1.5 Photodegradation of (a) hen egg lysozyme (Lyso) and (b) concanavalin A (Con A) using **57** under UV light irradiation. Each protein (1.5 μM) was incubated with **57** in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 °C for 2 h under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 10 cm from the sample. The products were analyzed by tricine-SDS-PAGE. The gels were stained with Sypro Ruby protein gel stain. Lane 1: size marker; lane 2: protein alone; lane 3: protein upon photo-irradiation; lane 4: protein + **57** (150 μM) without photo-irradiation; lanes 5-8: protein + **57** (concentrations 150, 15, 1.5 and 0.15 μM, respectively) upon photo-irradiation.

1.4 2-ナフトール誘導体 **31** および **57-61** のタンパク質光分解活性評価

2-ナフトール部位 **57** がタンパク質光分解活性を発現することを見出したので、次に、**57** の光感受性の発現に重要な構造を明らかにするため、2-ナフトール誘導体 **31** および **57-61** の BSA に対するタンパク質光分解活性を比較した (**Figure 2.1.6**)。

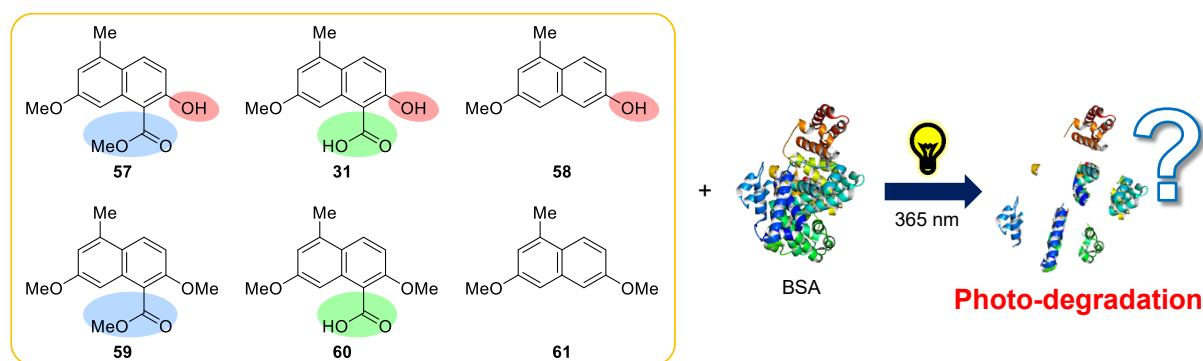


Figure 2.1.6 2-ナフトール誘導体 **31** および **57-61** の BSA に対する光分解活性評価

31 および **57-61** の BSA に対する光分解活性評価のプロトコルを以下に示す。

- ① 0.5 mL チューブに、BSA (1.5 μM) および 2-ナフトール誘導体 **31** あるいは **57-61** (0 または 150 μM) を含む 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 10 μL を調製した。

- ② 調製したサンプルを、液面の 10 cm 上方からの UV 光照射下(365 nm, 100 W)あるいは非 UV 光照射下において 37 °C で 2 時間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、サンプルに 2-メルカプトエタノールを含むローディングバッファー 2 μ L を加え、95 °C で 5 分間加熱して、タンパク質の還元処理を行った。
- ④ 8%ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。

2-ナフトール誘導体 **31** および **57-61** の BSA に対する光分解活性評価の結果を **Figure 2.1.7** に示す。各図のレーン 1 は分子量マーカー、レーン 2 は BSA のみのコントロール、レーン 3 は BSA に UV 光を照射したサンプル、レーン 4 は BSA に **57**、**31** あるいは **58** (150 μ M)を加えて UV 光を照射しなかったサンプル、レーン 5 は BSA に **57**、**31** あるいは **58** (150 μ M)を加えて UV 光を照射したサンプル、レーン 6 は BSA に **59**、**60** あるいは **61** (150 μ M)を加えて UV 光を照射しなかったサンプル、レーン 7 は BSA に **59**、**60** あるいは **61** (150 μ M)を加えて UV 光を照射したサンプルである。レーン 2 と比較して、レーン 4 および 6 では、BSA のバンドに変化が見られなかったことから、BSA に **31** あるいは **57-61** を加えて UV 光を照射しなかった場合には、BSA を分解しないことを確認した。加えて、**Figure 2.1.7c** のレーン 5 および **Figure 2.1.7a-c** のレーン 7 において、BSA のバンドに変化が見られなかったことから、**58-61** (150 μ M)は、365 nm の光照射下、BSA を光分解しないことを明らかにした。これに対して、**Figure 2.1.7b** のレーン 5 では、**Figure 2.1.7a** のレーン 5 と同様、BSA のバンドが顕著に薄くなったことから、**31** が **57** と同様に 365 nm の光照射下、BSA を光分解することを見出した。以上の結果から、NCS-*chr* の 2-ナフトール部位における光感受性の発現には、C-1 位にメチルエステルあるいはカルボキシ基、および C-2 位に水酸基を有する構造、すなわち 1,3-ジカルボニルエノール構造が重要であることを明らかにした。さらに、**57** および **31** の C-2 位水酸基、すなわち 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基をメチル化することで、タンパク質光分解活性が顕著に抑制され、その活性を OFF に制御可能なことを見出した。

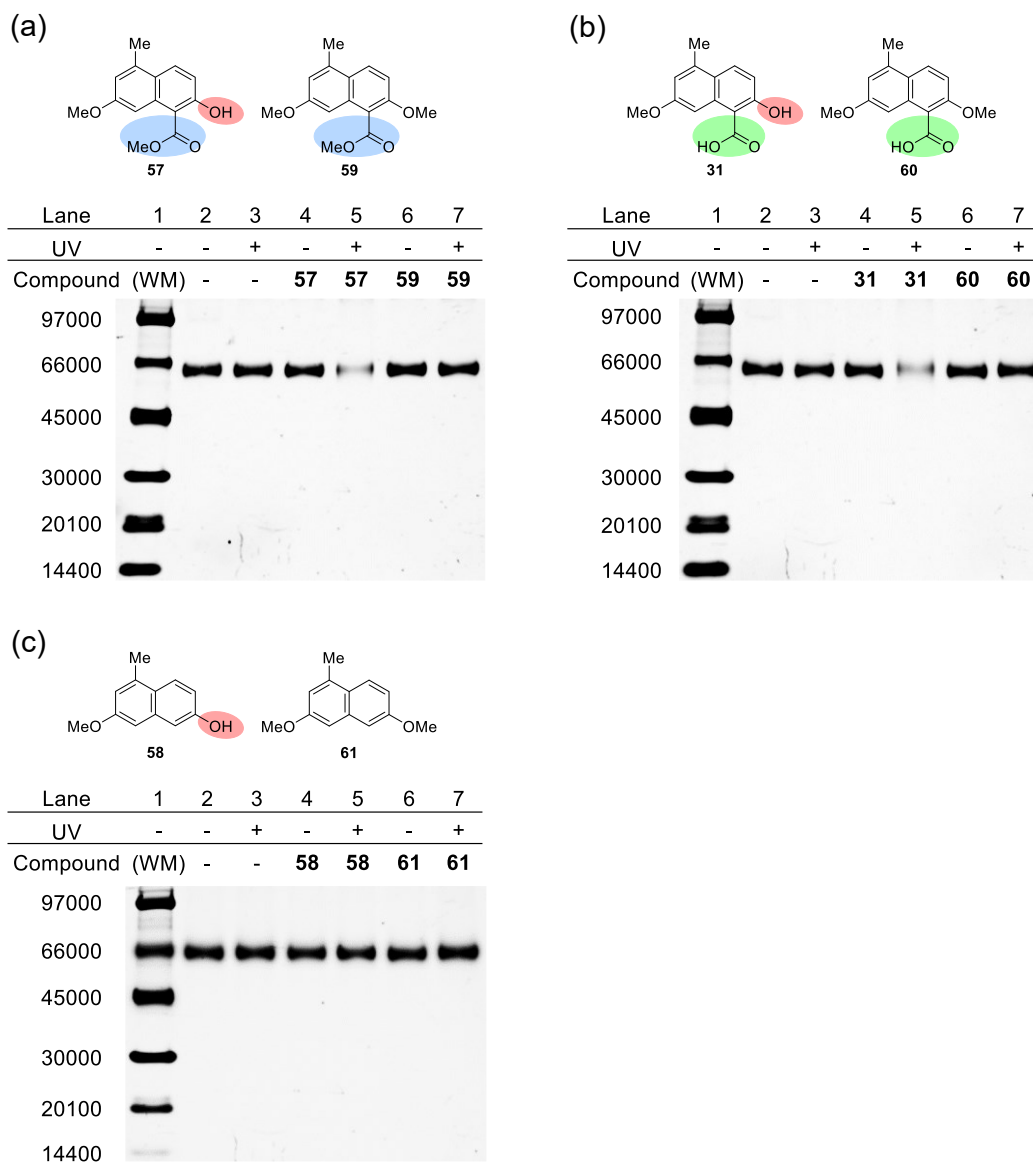


Figure 2.1.7 Photodegradation of BSA using **31** and **57-61** under UV light irradiation. BSA (1.5 μM) was incubated with the compound in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 10 cm from the sample. The products were analyzed by tricine-SDS-PAGE. The gels were stained with Sypro Ruby protein gel stain. Gels (a)-(c) represent (a) **57** and **59**, (b) **31** and **60**, and (c) **58** and **61**, respectively. Lane 1: size marker; lane 2: BSA alone; lane 3: BSA upon photo-irradiation; lanes 4 and 6: BSA + each compound (150 μM) without photo-irradiation; lanes 5 and 7: BSA + each compound (150 μM) upon photo-irradiation.

1.5 2-ナフトール誘導体 **31** および **57-61** の UV-Vis スペクトル

次に、タンパク質光分解活性の発現と UV 吸収の関係を検証するため、2-ナフトール誘導体 **31** および **57-61** の UV-Vis スペクトルを測定した。

31 および 57-61 の UV-Vis スペクトル測定のプロトコルを以下に示す。

- ① 2-ナフトール誘導体 31 および 57-61 (150 μ M)を含む 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM)溶液を調製した。
- ② 紫外可視分光光度計を用いて、300-400 nm の吸収スペクトルを測定した。

2-ナフトール誘導体 31 および 57-61 の吸収スペクトルを **Figure 2.1.8** に示す。各図の横軸は波長、縦軸は吸光度を表しており、**Figure 2.1.8a** は 57 および 59 のスペクトルを、**Figure 2.1.8b** は 31 および 60 のスペクトルを、**Figure 2.1.8c** は 58 および 61 のスペクトルを示している。1.4 節で 365 nm の光照射下、タンパク質光分解活性を示した 57 および 31 は、365 nm に UV 吸収を有することを見出した。一方で、タンパク質光分解活性を示さなかった 58-61 は、57 および 31 と比較して、吸収スペクトルが短波長シフトし、365 nm における吸光度が大幅に減少していることを明らかとした。以上の結果より、58-61 が 365 nm の光照射下において、タンパク質光分解活性を示さ

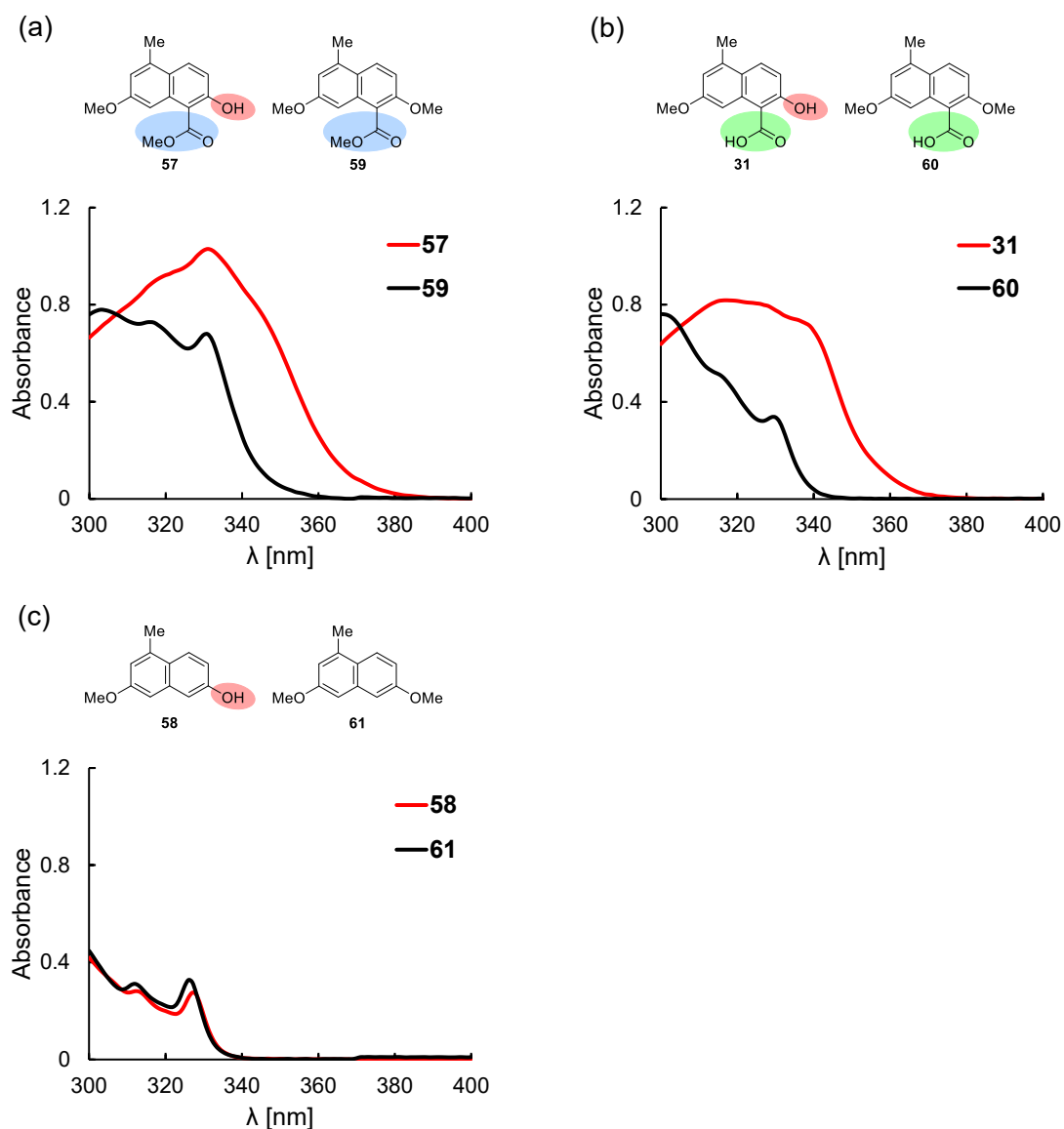


Figure 2.1.8 UV-Vis spectra of 31 and 57-61 (150 μ M) in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM).

なかった原因は、**58-61** の 365 nm における吸光度が著しく低く、 S_1 状態への光励起が起こりにくいためであることが示唆された。1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基をメチル化することで吸収スペクトルが短波長シフトすることは、サリチル酸(**69**)においても報告されている¹⁷⁴ (**Figure 2.1.9**)。実際に、**69** および **70** (150 μ M)の吸収スペクトルを、20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM)溶液中で測定した結果、**70** の吸収スペクトルが、**69** と比較して、短波長シフトすることを確認した (**Figure 2.1.10**)。



Figure 2.1.9 サリチル酸(**69**)のメチル化による短波長シフト

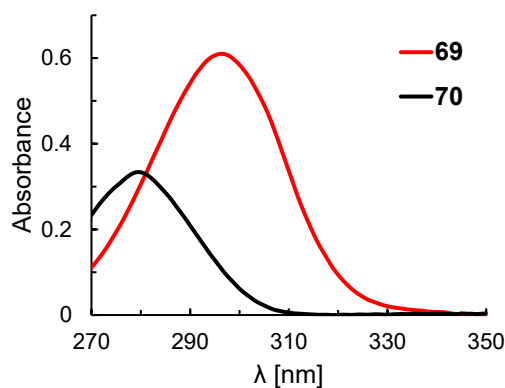


Figure 2.1.10 UV-Vis spectra of **69** and **70** (150 μ M) in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM).

1.6 2-ナフトール部位 57 の活性種の同定

1.6.1 スカベンジャー試験による活性種の推定

次に、2-ナフトール部位 **57** によるタンパク質光分解の活性種を推定するため、スカベンジャー試験を実施した。本試験では、活性種を捕捉するスカベンジャーを加えた状態でタンパク質光分解活性評価を行い、光分解の阻害の有無を検証することで、そのスカベンジャーが捕捉する活性種が光分解に関与しているかどうかを評価することができる (**Figure 2.1.11**)。本研究では、活性種として、代表的な ROS である一重項酸素 (1O_2)、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2) およびヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) に着目し、これらを捕捉することが知られているヒスチジン^{26,169}、タイロン¹⁷⁵、ヨウ化カリウム (KI)¹⁷⁶ およびエタノール (EtOH)¹⁷⁷ をそれぞれスカベンジャーとして用いた (**Figure 2.1.12**)。

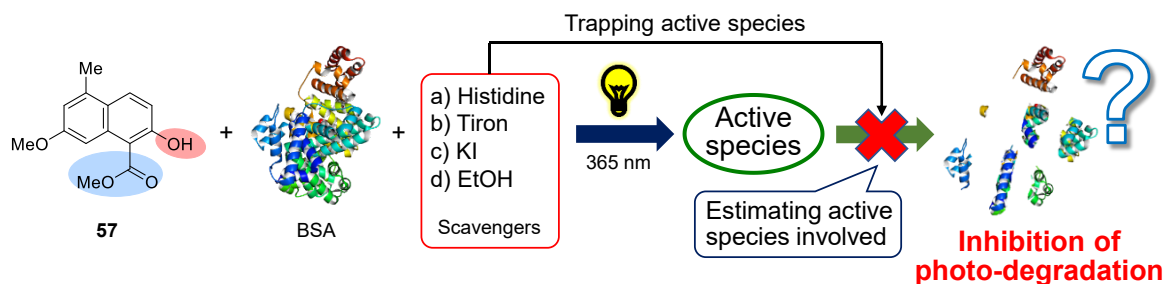


Figure 2.1.11 57 によるタンパク質光分解の活性種に関するスカベンジャー試験

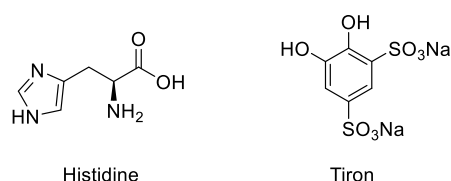


Figure 2.1.12 ヒスチジンおよびタイロンの化学構造

57 の活性種に関するスカベンジャー試験のプロトコルを以下に示す。

- ① 0.5 mL チューブに、BSA (1.5 μM)、2-ナフトール部位 57 (0 または 150 μM) およびスカベンジャー (0, 0.15, 1.5, 15 および 150 mM) を含む 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 10 μL を調製した。
- ② 調製したサンプルを、液面の 10 cm 上方からの UV 光照射下 (365 nm, 100 W) あるいは非 UV 光照射下において 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、サンプルに 2-メルカプトエタノールを含むローディングバッファー 2 μL を加え、95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱して、タンパク質の還元処理を行った。
- ④ 8% ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。

2-ナフトール部位 57 の活性種に関するスカベンジャー試験の結果を Figure 2.1.13 に示す。Figures 2.1.13a-d はそれぞれ、ヒスチジン、タイロン、ヨウ化カリウムおよびエタノールをスカベンジャーとして用いた場合の結果である。各図のレーン 1 は分子量マーカー、レーン 2 は BSA のみのコントロール、レーン 3 は BSA にスカベンジャー (150 mM) を加えて UV 光を照射したサンプル、レーン 4 は BSA に 57 (150 μM) を加えて UV 光を照射したサンプル、レーン 5-8 は BSA に 57 (150 μM) およびスカベンジャー (0.15, 1.5, 15 および 150 mM) を加えて UV 光を照射したサンプルである。Figure 2.1.13d に示すように、エタノールをスカベンジャーに用いた場合には BSA の光分解は阻害されなかった。一方で、Figures 2.1.13a-c に示すように、ヒスチジン、タイロンおよびヨウ化カリウムをスカベンジャーに用いた場合には、スカベンジャー濃度依存的に 57 の BSA に対する光分解活性が阻害されることを明らかにした。このことから、57 によるタンパク質光分解の推定される活性種として、一重項酸素、スーパーオキシドアニオンおよび過酸化水素が挙げられ、57 が光照射下でこれらの ROS を生成することが示唆された。

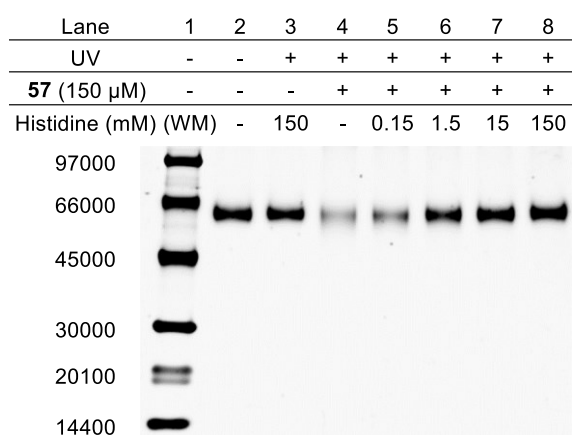
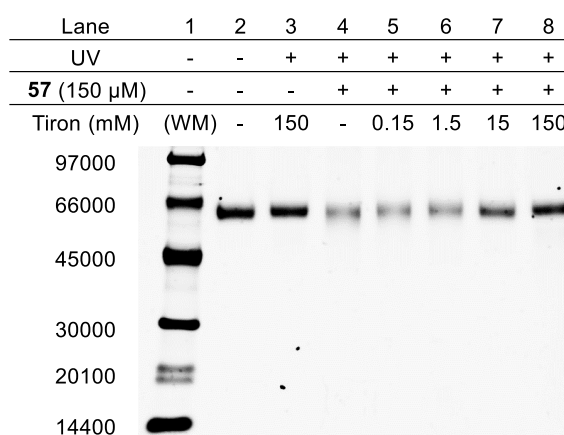
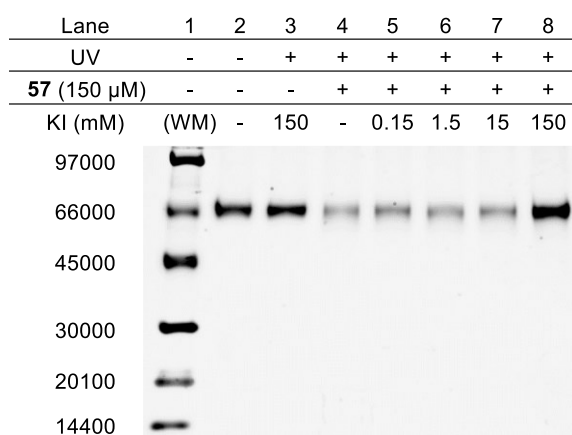
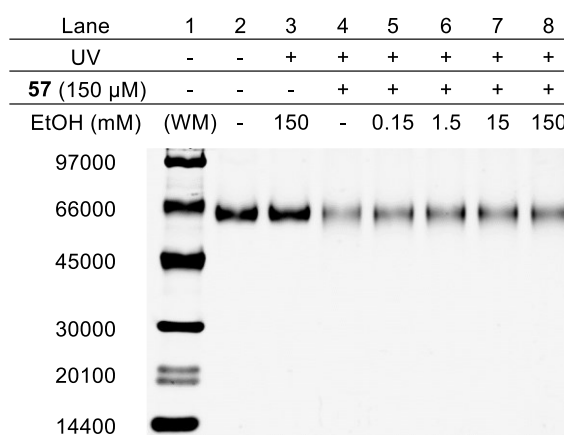
(a) Histidine ($^1\text{O}_2$ scavenger)(b) Tiron ($\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenger)(c) KI (H_2O_2 scavenger)(d) EtOH ($^{\cdot}\text{OH}$ scavenger)

Figure 2.1.13 Inhibition of photodegradation of BSA using **57** in the presence of several scavengers. BSA (1.5 μM) was incubated with **57** and scavenger, (a) histidine, (b) tiron, (c) potassium iodide (KI) and (d) ethanol (EtOH), in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h under irradiation of a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 10 cm from the sample. The products were analyzed by tricine-SDS-PAGE. The gels were stained with Sypro Ruby protein gel stain. Lane 1: size marker; lane 2: BSA alone; lane 3: BSA + scavenger (150 mM) upon photo-irradiation; lane 4: BSA + **57** (150 μM) upon photo-irradiation; lanes 5-8: BSA + **57** (150 μM) + scavenger (concentrations 0.15, 1.5, 15 and 150 mM, respectively) upon photo-irradiation.

1.6.2 スピントラッピング EPR 法による活性種の同定

1.6.1 節で **57** の BSA に対するタンパク質光分解活性を阻害した 3 種類のスカベンジャーのうち、スカベンジャーの濃度に基づくと、ヒスチジンが最も顕著なタンパク質光分解の阻害活性を示した。この結果より、一重項酸素が主な活性種の一つであることが示唆された。そのため、本研究では一重項酸素に着目し、365 nm の光照射下、実際に **57** が一重項酸素を生成することをスピントラッピング EPR 法を用いて検証した (**Figure 2.1.14**)。スピントラッピング EPR 法とは、直

接的な測定が困難な短寿命のラジカル種および活性種を、特定のラジカル種および活性種を捕捉して安定なラジカル種を生成するスピントラップ剤を用いて、EPR 測定可能な長寿命のラジカル種へと変換することで、検出および同定する手法である。一重項酸素のスピントラップ剤としては、4-oxo-TEMP を選択した。4-Oxo-TEMP は、一重項酸素を捕捉することで、安定化されたラジカルを有する 4-oxo-TEMPO を生成する (Figure 2.1.15a)。この 4-oxo-TEMPO は特徴的な 3 本線の EPR スペクトルを示すことから、一重項酸素の検出および同定が可能である¹⁷⁸ (Figure 2.1.15b)。

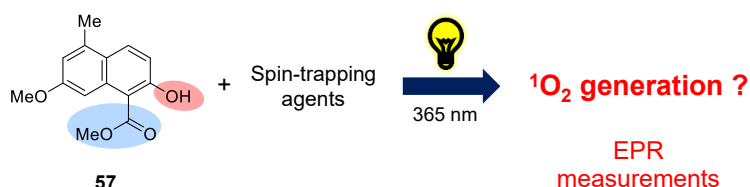


Figure 2.1.14 スピントラッピング EPR 法を用いた **57** による一重項酸素生成の検証

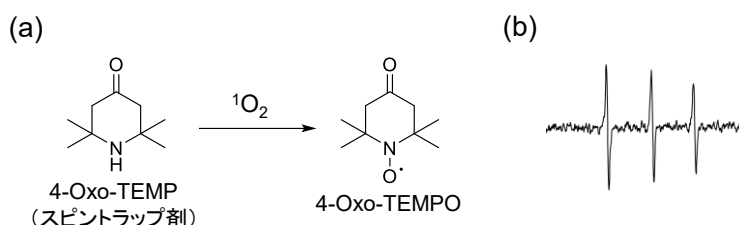


Figure 2.1.15 4-Oxo-TEMP による一重項酸素の捕捉および 4-oxo-TEMPO の EPR スペクトル

57 を用いた EPR スペクトル測定のプロトコルを以下に示す。

- ① 2-ナフトール部位 **57** (1.0 mM)、4-oxo-TEMP (200 mM) および DETAPAC (1.0 mM) を含む 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液を調製した。
- ② 調製したサンプルを EPR 分光器の石英セルに充填し、セルより 40 cm の距離からの UV 照射下 (365 nm, 100 W) あるいは非 UV 照射下において、EPR スペクトルを 20 分間測定した。

非 UV 照射下および UV 照射下における EPR スペクトルをそれぞれ Figures 2.1.16a および **b** に示す。**57** および 4-oxo-TEMP 存在下、非 UV 照射時には、シグナルが検出されなかったのに対し、UV 照射下では、4-oxo-TEMPO の 3 本線の EPR スペクトルが検出されたことから、**57** は 365 nm の照射下、一重項酸素を生成することを明らかにした。

以上のスカベンジャー試験および EPR 測定の結果より、2-ナフトール部位 **57** によるタンパク質の光分解は、**57** が照射下において生成する一重項酸素などの ROS により起こることが強く示唆された。

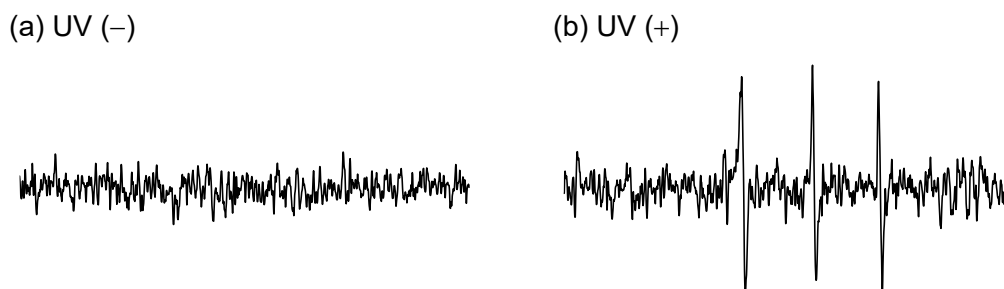


Figure 2.1.16 EPR spectra obtained during photo-irradiation of **57** in the presence of 4-oxo-TEMP. **57** (1 mM) and 4-oxo-TEMP (200 mM) were incubated in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) containing 1 mM DETAPAC under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 40 cm from a flat cell. (a) After 20 min without irradiation. (b) After 20 min irradiation.

1.7 2-ナフトール誘導体 **57** および **59** の一重項酸素生成量評価

1.6.2 節で2-ナフトール部位 **57** が光照射下、一重項酸素を生成することが明らかになったため、次に、1.4 節でタンパク質光分解活性を示した **57** およびその活性を示さなかった **59** の活性の違いと、一重項酸素生成量の関係を検証した。すなわち、一重項酸素捕捉剤として DPBF を使い、365 nm の光照射下における **57** および **59** の一重項酸素生成量を DPBF の吸光度変化を利用して評価した (**Figure 2.1.17**)。DPBF は、410 nm に特徴的な吸収極大を有する化合物であり、一重項酸素と反応した量に応じて、410 nm における吸光度が減少するため、その吸光度変化を測定することで、一重項酸素生成量を間接的に評価することが可能である¹⁷⁹ (**Figure 2.1.18**)。

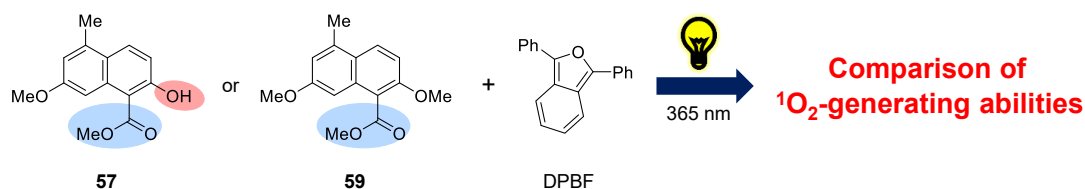


Figure 2.1.17 DPBF を用いた 2-ナフトール誘導体 **57** および **59** の一重項酸素生成量評価

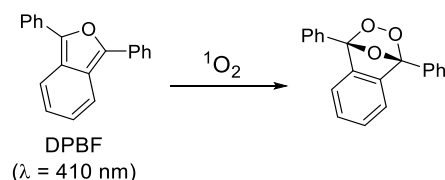


Figure 2.1.18 DPBF と一重項酸素との反応

57 および **59** の DPBF を用いた一重項酸素生成量評価のプロトコルを以下に示す。

- ① 1.5 mL チューブに、2-ナフトール誘導体 **57** あるいは **59** (1.5 mM) および DPBF (500 μM) を含む 60% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 120 μL を調製した。

- ② 調製したサンプルを、液面の 60 cm 上方からの UV 照射下(365 nm, 100 W)において室温で 0, 30, 60, 90, 120 および 150 秒間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、120 μ L の各サンプルから 100 μ L を 96 ウェルプレートに移し、プレートリーダーを用いて 320-500 nm の吸収スペクトルを測定した。

2-ナフトール誘導体 **57** および **59** の一重項酸素生成量を評価した結果を **Figure 2.1.19** に示す。**Figure 2.1.19a** は、2-ナフトール誘導体を含まず、DPBF のみのブランク試料の測定結果を、**Figure 2.1.19b** および **Figure 2.1.19c** はそれぞれ **57** および **59** の測定結果を示している。各図の横軸は波長を、縦軸は吸光度を表しており、赤、橙、黄緑、緑、青および紺色のグラフはそれぞれ 365 nm の照射を 0, 30, 60, 90, 120 および 150 秒間行ったサンプルの結果を示している。**57** を用いた場合には、DPBF の 410 nm の吸光度の著しい減少が観測されたことから、一重項酸素の生成を本アッセイにおいても確認した。これに対し、**59** を用いた場合には、DPBF の 410 nm の吸光度はほとんど減少せず、ブランクと同程度の減少率であることを見出した。以上の結果より、365 nm の光

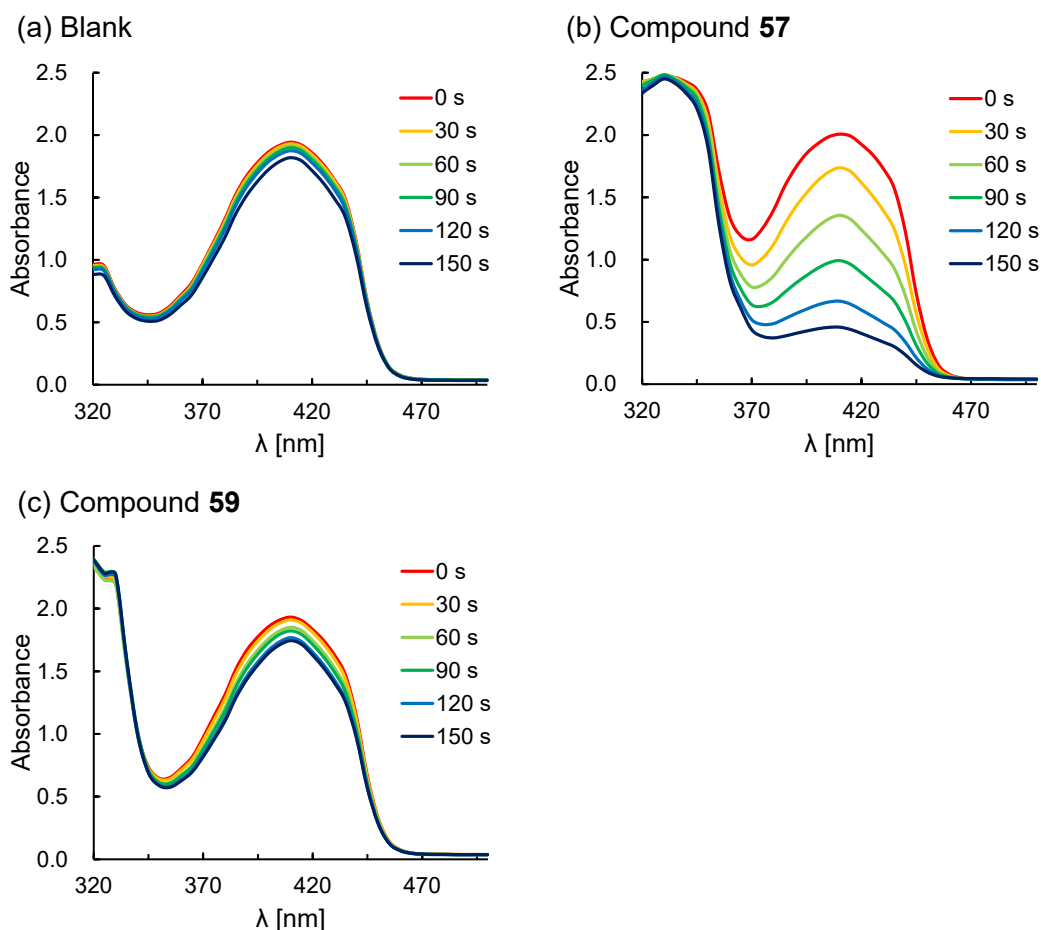


Figure 2.1.19 Time-dependent changes in UV-Vis spectra of 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) with **57** and **59** upon photo-irradiation. DPBF (500 μ M) was incubated (a) without and with (b) **57** or (c) **59** (1.5 mM) in 60% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) at rt for 0-150 s under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 60 cm from the sample.

照射下における **59** の一重項酸素生成量は、**57** と比較して顕著に低下することを明らかにした。この結果は、タンパク質光分解活性評価の結果と一致する。したがって、**57** および **59** のタンパク質光分解活性の違いは、一重項酸素などの活性種の生成量の違いに依存していることが示唆された。

1.4 節のタンパク質光分解活性評価および本節の一重項酸素生成量評価の結果より、2-ナフトール部位 **57** は効果的な光感受性を示し、光感受性が ON であるのに対し、**57** の C-2 位水酸基、すなわち 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基をメチル化することで、**57** の光感受性が顕著に低下し、光感受性を OFF に制御できることを明らかにした。

1.8 結論

第 1 章では、ネオカルチノスタチン・クロモフォアの 2-ナフトール部位におけるタンパク質光分解活性の発見と構造活性相関研究について述べた。まず、ネオカルチノスタチン・クロモフォア (NCS-chr) (**17**) の 9 員環エンジイン構造および DNA 相互作用部位である *N*-メチルフコサミン部位を有さない 2-ナフトール部位 **57** のタンパク質光分解活性を評価した。その結果、**57** が、人体に無害な 365 nm の光照射下において、タンパク質を光分解することを初めて見出した (Figure 2.1.20)。

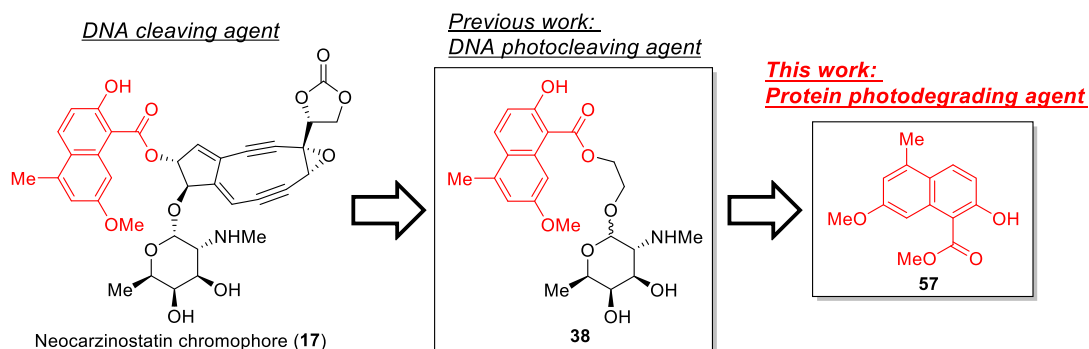


Figure 2.1.20 本論第 1 章の結論 (1)

次に、NCS-chr (**17**) の 2-ナフトール部位における光感受性の発現に重要な構造を明らかにするため、**57** および他の 5 種類の類縁体 **31** および **58-61** を用いた構造活性相関研究を行った。その結果、C-1 位にメチルエステルあるいはカルボキシ基、および C-2 位に水酸基を有する構造、すなわち 2-ナフトール部位における 1,3-ジカルボニルエノール構造がタンパク質光分解活性の発現に重要であり、その水酸基をメチル化することでタンパク質光分解活性を OFF に制御できることを見出した。さらに、これら 6 種類の類縁体の吸収スペクトルを測定した結果、365 nm におけるタンパク質光分解活性を示した **57** および **31** は、365 nm に吸収を有したのに対し、365 nm におけるタンパク質光分解活性を示さなかった **58-61** は、**57** および **31** と比較して、吸収スペクトルが短波長シフトし、365 nm における吸光度が顕著に減少していることを明らかにした。このことから、**58-61** がタンパク質光分解活性を示さなかった要因は、**58-61** の 365 nm における吸光度が著しく低

く、 S_1 状態への光励起が起こりにくいためであることが示唆された (Figure 2.1.21)。

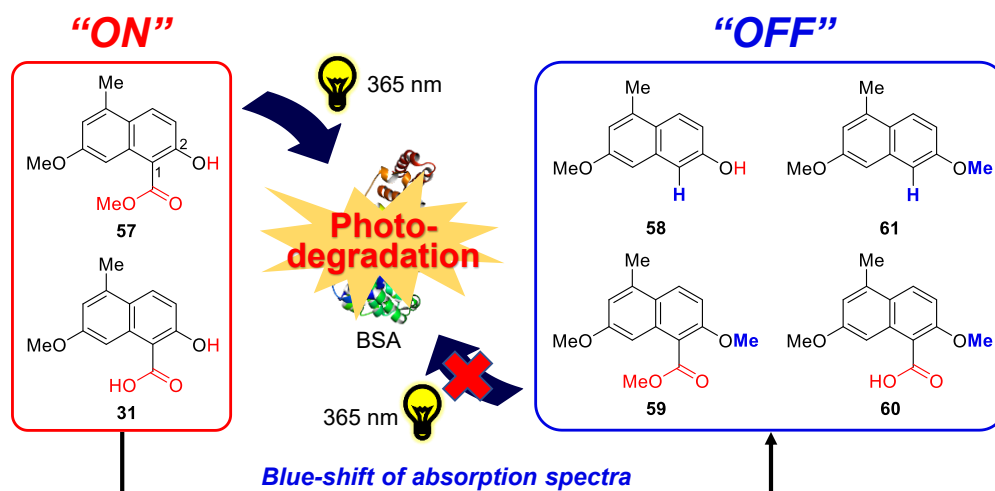


Figure 2.1.21 本論第 1 章の結論 (2)

さらに、2-ナフトール部位 **57** の活性種に関するスカベンジャー試験および EPR 測定の結果、**57** が光照射下で一重項酸素を生成することを明らかにし、**57** が光照射下で生成した一重項酸素などの ROS によりタンパク質の光分解を引き起こしていることが示唆された。そのため、365 nm におけるタンパク質光分解活性を示した **57** およびその活性を示さなかった **59** の、光照射下における一重項酸素生成量を評価した。その結果、**57** は光照射下で効果的に一重項酸素を生成した一方、365 nm の光照射下における **59** の一重項酸素生成量は、**57** と比較して顕著に低下することを明らかにした (Figure 2.1.22)。

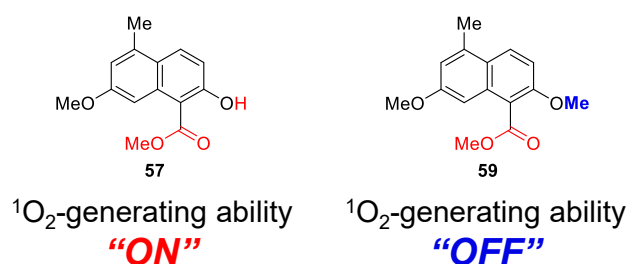


Figure 2.1.22 本論第 1 章の結論 (3)

以上の結果より、2-ナフトール部位 **57** は効果的な光感受性を示し、光感受性が ON であるのに対し、**57** の C-2 位水酸基、すなわち 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基をメチル化することで、**57** の光感受性が顕著に低下し、光感受性を OFF に制御できることを明らかにした。

第2章 ネオカルチノスタチン・クロモフォアの2-ナフトール部位を基本骨格としたH₂O₂応答型光感受性分子の創製

2.1 H₂O₂ 応答型光感受性分子 62 の分子デザイン

本論第1章で、ネオカルチノスタチン・クロモフォアの2-ナフトール部位 **57** が光感受性を示すこと、および **57** が有する 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基をメチル化することで、光感受性を OFF に制御可能なことを明らかにした (Figure 2.2.1a)。著者は、この実験結果から着想を得、**57** が有する 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基に、がん細胞に過剰発現するバイオマーカーとの応答部位を導入することで、**57** が刺激応答型光感受性分子になると考えた (Figure 2.2.1b)。すなわち、光感受性が「常に ON」である **57** は、がん細胞および正常細胞に対し、非選択的な光細胞毒性を発現すると考えられる。一方、**57** を刺激応答型光感受性分子に変換することで、正常細胞に対しては光細胞毒性を発現せず、がん細胞に対しては、がん細胞に過剰発現するバイオマーカーと反応して、**57** を放出することで、がん細胞選択的に光細胞毒性を発現できると考えた (Figure 2.2.1c)。

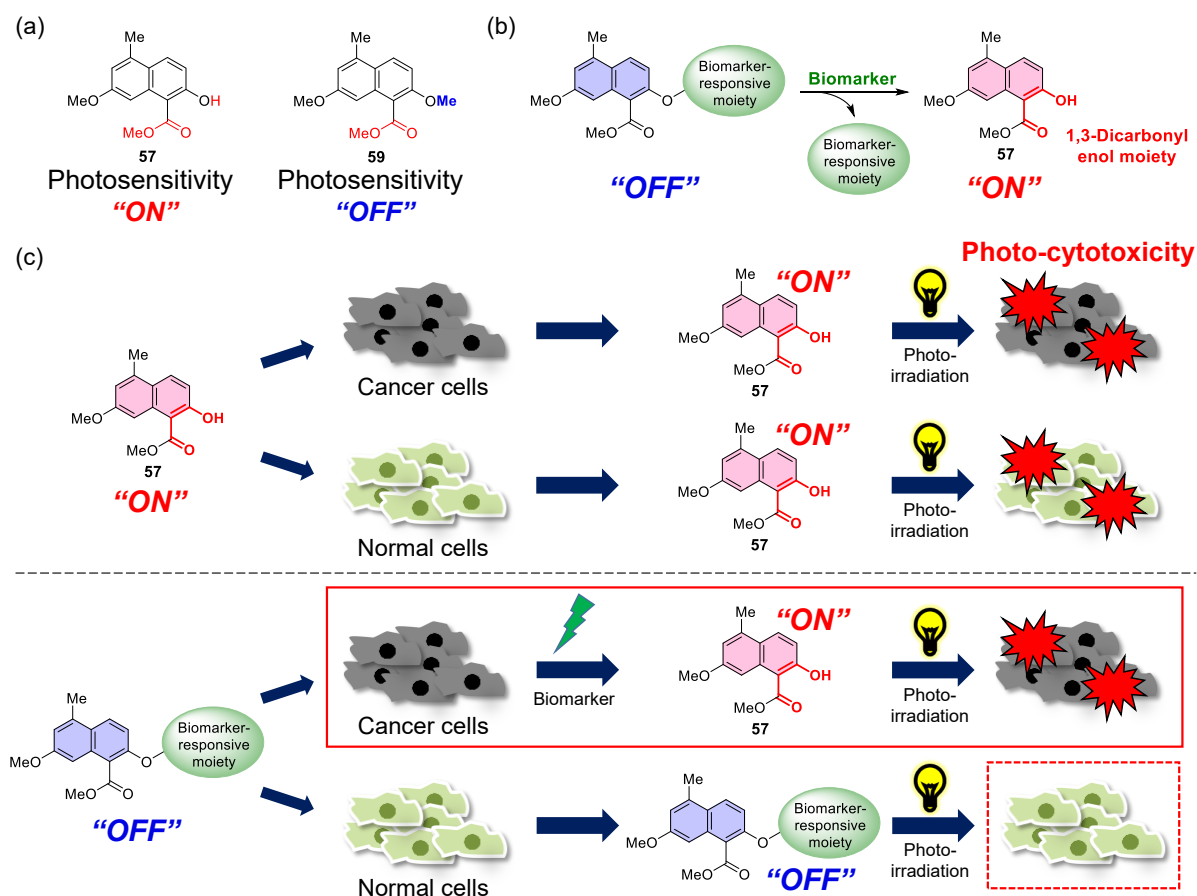


Figure 2.2.1 2-ナフトール部位 **57** を基本骨格とした刺激応答型光感受性分子のデザイン戦略

本研究では、がん細胞に過剰発現するバイオマーカーとして、 H_2O_2 を選択し、**57** が有する 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基に、 H_2O_2 応答部位としてボロン酸エステルをベンジルエーテルリンカーで連結した **62** をデザインした (Figure 2.2.2)。

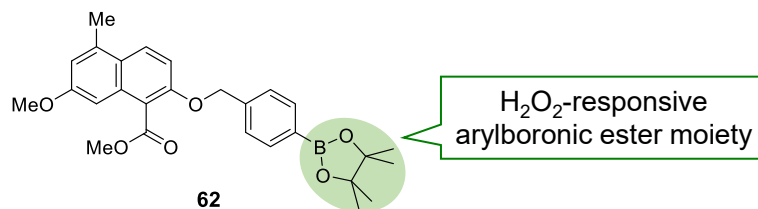


Figure 2.2.2 H_2O_2 応答型光感受性分子 **62** の分子デザイン

デザインした **62** の H_2O_2 過剰発現がん細胞に対する推定作用機序を Figure 2.2.3 に示す。まず、光感受性が OFF である **62** が細胞内に取り込まれると、 H_2O_2 によってボロン酸エステルが酸化され、水酸基に変換される。その後、生じた *p*-ヒドロキシベンジルエーテル部分の 1,6-脱離により、光感受性が ON である **57** が放出される。このように生成した **57** に対して、人体に無害な長波長紫外光を照射することで、 H_2O_2 過剰発現がん細胞に対して選択的に光細胞毒性を発現させることができると考えた。

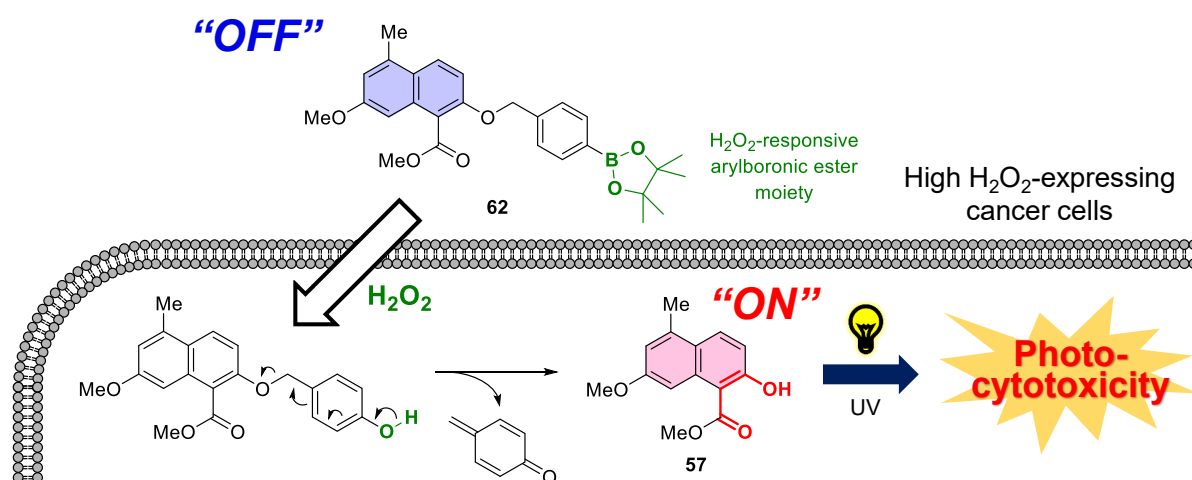
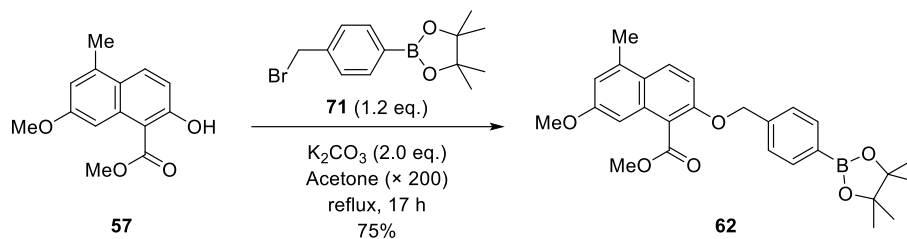


Figure 2.2.3 H_2O_2 応答型光感受性分子 **62** の推定作用機序

2.2 H_2O_2 応答型光感受性分子 **62** の合成

62 の合成を以下に示す (Scheme 2.2.1)。 **57** のフェノール性水酸基を、市販原料である 4-(プロモメチル)フェニルボロン酸ピナコールエステル(**71**)を用いてアルキル化することで、 H_2O_2 応答型光感受性分子 **62** を合成した。



Scheme 2.2.1 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の合成

2.3 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の UV-Vis スペクトル

次に、1.5 節で示した結果と同様、H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の吸収スペクトルが **57** と比較して短波長シフトしていることを検証するため、**62** の UV-Vis スペクトルを測定した。

57 および **62** の UV-Vis スペクトル測定のプロトコルを以下に示す。

- ① **57** および **62** (150 μM) を含む 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液を調製した。
- ② 紫外可視分光光度計を用いて、300-400 nm の吸収スペクトルを測定した。

57 および **62** の吸収スペクトルを **Figure 2.2.4** に示す。横軸は波長、縦軸は吸光度を表しており、赤色のグラフが **57** の吸収スペクトルを、黒色のグラフが **62** の吸収スペクトルを示している。その結果、**62** の吸収スペクトルは、**57** と比較して短波長シフトし、365 nm における吸光度が大幅に減少していることを明らかにした。

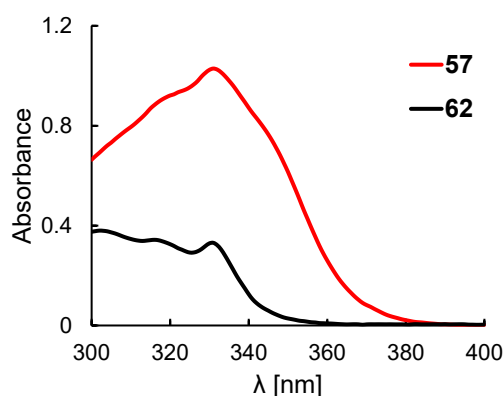


Figure 2.2.4 UV-Vis spectra of **57** and **62** (150 μM) in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM).

2.4 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** のタンパク質光分解活性評価

次に、H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の BSA に対するタンパク質光分解活性が OFF であるかを検証した (**Figure 2.2.5**)。

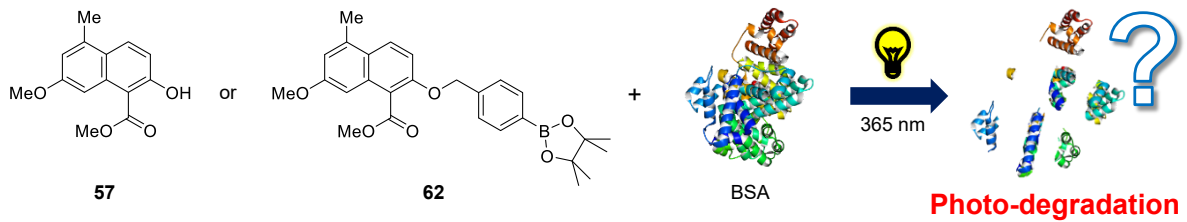


Figure 2.2.5 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の BSA に対する光分解活性評価

57 および **62** の BSA に対する光分解活性評価のプロトコルを以下に示す。

- ① 0.5 mL チューブに、BSA (1.5 μM) および **57** あるいは **62** (0 または 150 μM) を含む 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 10 μL を調製した。
- ② 調製したサンプルを、液面の 10 cm 上方からの UV 光照射下(365 nm, 100 W) あるいは非 UV 光照射下において 37 °C で 2 時間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、サンプルに 2-メルカプトエタノールを含むローディングバッファー 2 μL を加え、95 °C で 5 分間加熱して、タンパク質の還元処理を行った。
- ④ 8% ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。

H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の BSA に対する光分解活性評価の結果を **Figure 2.2.6** に示す。レーン 1 は分子量マーカー、レーン 2 は BSA のみのコントロール、レーン 3 は BSA に UV 光を照射したサンプル、レーン 4 は BSA に **57** (150 μM) を加えて UV 光を照射しなかったサンプル、レーン 5 は BSA に **57** (150 μM) を加えて UV 光を照射したサンプル、レーン 6 は BSA に **62** (150 μM) を加えて UV 光を照射しなかったサンプル、レーン 7 は BSA に **62** (150 μM) を加えて UV 光を照

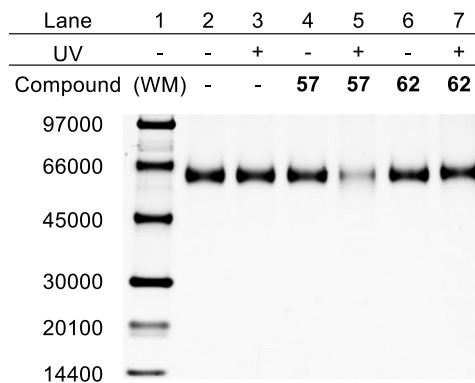


Figure 2.2.6 Photodegradation of BSA using **57** and **62** under UV light irradiation. BSA (1.5 μM) was incubated with the compound in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 °C for 2 h under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 10 cm from the sample. The products were analyzed by tricine-SDS-PAGE. The gels were stained with Sypro Ruby protein gel stain. Lane 1: size marker; lane 2: BSA alone; lane 3: BSA upon photo-irradiation; lanes 4 and 6: BSA + each compound (150 μM) without photo-irradiation; lanes 5 and 7: BSA + each compound (150 μM) upon photo-irradiation.

射したサンプルである。レーン 2 および 4 と比較して、レーン 5 では、1.4 節で示した結果と同様、効果的に BSA のバンドが薄くなっており、**57** は 365 nm の光照射下、BSA を光分解した。一方、レーン 2 と比較して、レーン 6 および 7 ではともに、BSA のバンドに変化が見られなかったことから、**62** (150 μ M) は、非 UV 光照射下および UV 光照射下のいずれの場合においても、BSA を分解しないことを明らかにした。したがって、365 nm の光照射下における **62** のタンパク質光分解活性は OFF であることを見出した。

2.5 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の一重項酸素生成量評価

さらに、365 nm の光照射下における H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の一重項酸素生成量が、**57** と比較して低下していることを検証するため、一重項酸素捕捉剤である DPBF を用いて **62** の光照射下における一重項酸素生成量を評価した (Figure 2.2.7)。

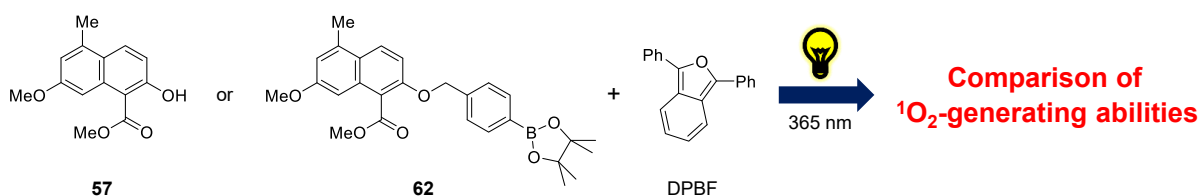


Figure 2.2.7 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の一重項酸素生成量評価

57 および **62** の DPBF を用いた一重項酸素生成量評価のプロトコルを以下に示す。

- ① 1.5 mL チューブに、**57** あるいは **62** (1.5 mM) および DPBF (500 μ M) を含む 60% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 120 μ L を調製した。
- ② 調製したサンプルを、液面の 60 cm 上方からの UV 光照射下 (365 nm, 100 W) において室温で 0, 30, 60, 90, 120 および 150 秒間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、120 μ L の各サンプルから 100 μ L を 96 ウェルプレートに移し、プレートリーダーを用いて 320-500 nm の吸収スペクトルを測定した。

57 および **62** の一重項酸素生成量評価の結果を Figure 2.2.8 に示す。Figure 2.2.8a は、2-ナフトール誘導体を含まず、DPBF のみのブランク試料の測定結果を、Figure 2.2.8b および Figure 2.2.8c はそれぞれ **57** および **62** の測定結果を示している。各図の横軸は波長を、縦軸は吸光度を表しており、赤、橙、黄緑、緑、青および紺色のグラフはそれぞれ 365 nm の光照射を 0, 30, 60, 90, 120 および 150 秒間行ったサンプルの結果を示している。**57** を用いた場合の DPBF の 410 nm における吸光度の顕著な減少と比較して、**62** を用いた場合には、DPBF の 410 nm の吸光度の減少はほとんどなく、ブランクと同程度の減少率であることを見出した。したがって、365 nm の光照射下における **62** の一重項酸素生成量は、**57** と比較して顕著に低下しており、**62** の光感受性が OFF であることを明らかにした。

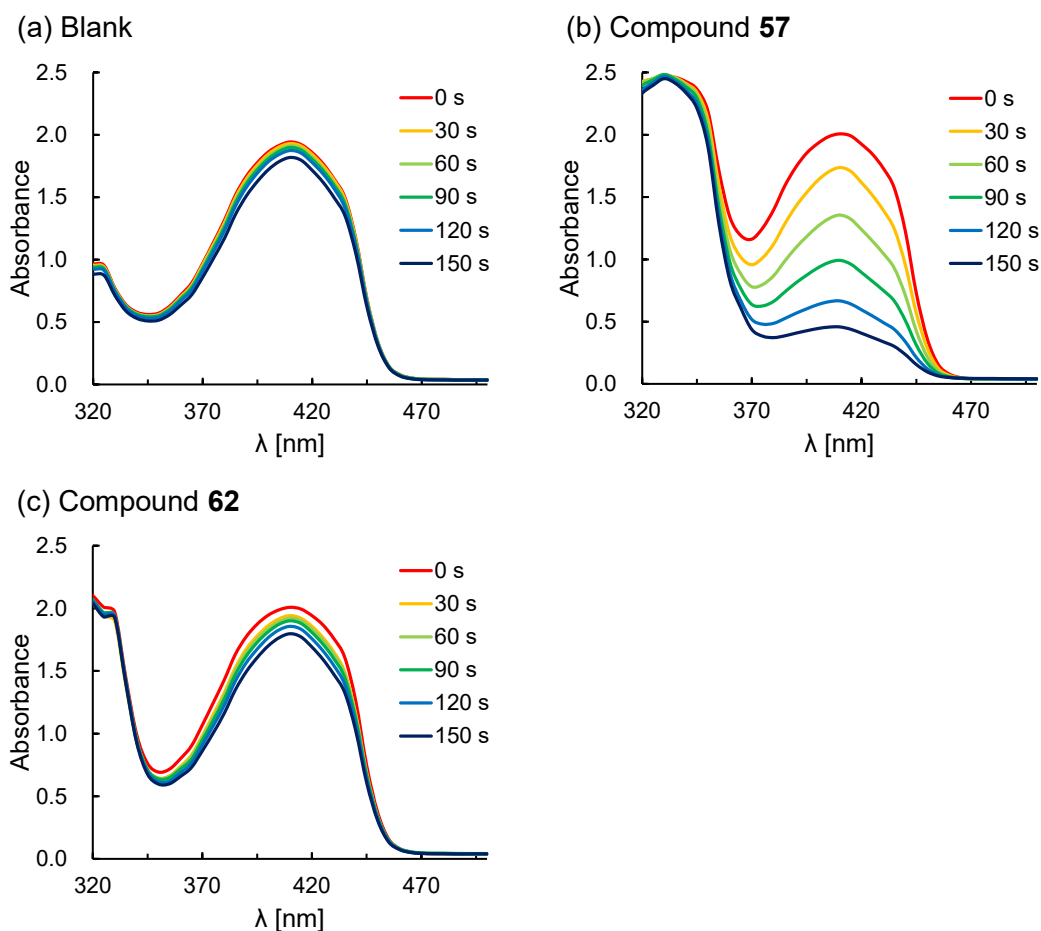


Figure 2.2.8 Time-dependent changes in UV-Vis spectra of 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) with **57** and **62** upon photo-irradiation. DPBF (500 μ M) was incubated (a) without and with (b) **57** or (c) **62** (1.5 mM) in 60% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) at rt for 0-150 s under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 60 cm from the sample.

2.6 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の H₂O₂ 応答性評価

前節までに **62** の光感受性が OFF であることを明らかにしたので次に、**62** が H₂O₂ と反応して、光感受性が ON である **57** を放出するかを HPLC を用いて検討した (Figure 2.2.9)。

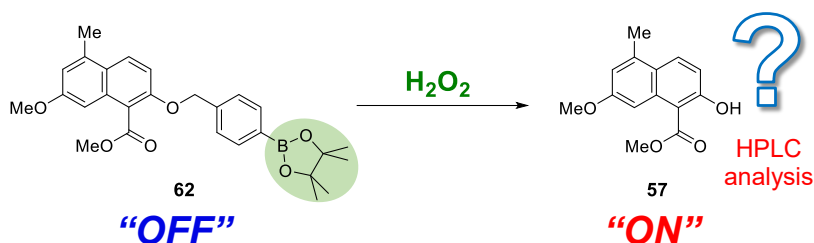


Figure 2.2.9 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の H₂O₂ 応答性評価

2.6.1 62 の H₂O₂ 濃度依存的応答性評価

はじめに、62 が H₂O₂ 濃度依存的に応答して、57 を放出するかを HPLC を用いて検討した。本アッセイのプロトコルを以下に示す (Figure 2.2.10)。

- ① 0.5 mL チューブに、62 (100 μM) および H₂O₂ (0, 1, 3, 10, 30, 100 および 300 μM) を含む 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 50 μL を調製した。
- ② 調製したサンプルを 37 °C で 60 分間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、反応液を HPLC/UV を用いて定量解析し、検量線により 57 の生成量を算出した。

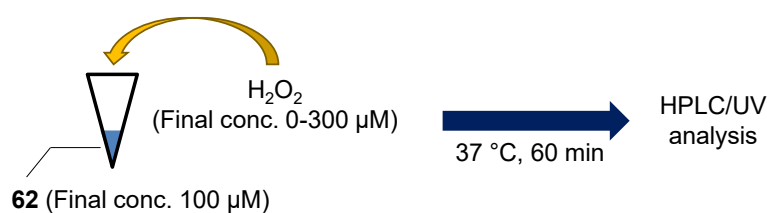


Figure 2.2.10 HPLC を用いた 62 の H₂O₂ 濃度依存的応答性評価

62 の H₂O₂ 濃度依存的応答性評価の結果を Figure 2.2.11 に示す。横軸は H₂O₂ 濃度、縦軸は放出された 57 の濃度を表している。Figure 2.2.11 より、62 は、H₂O₂ の濃度依存的に H₂O₂ と反応し、57 を放出することを明らかにした。

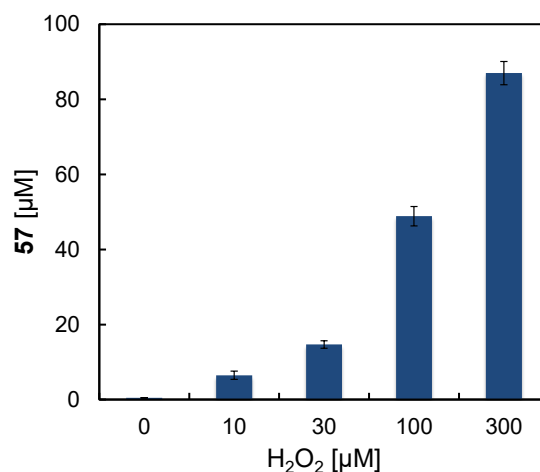


Figure 2.2.11 Responses of 62 to H₂O₂. 62 (100 μM) was incubated with H₂O₂ (0-300 μM) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 °C for 60 min. The products were analyzed by HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, 4.6×250 mm; 3:2 MeCN/H₂O; flow rate 1.0 mL min⁻¹; 30 °C; detection by UV (230 nm)).

2.6.2 62 の時間依存的 H₂O₂ 応答性評価

次に、62 が時間依存的に H₂O₂ に応答して、57 を放出するかを HPLC を用いて検討した。本アッセイのプロトコルを以下に示す (Figure 2.2.12)。

- ① 0.5 mL チューブに、62 (100 μM) および H₂O₂ (0 または 100 μM) を含む 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 50 μL を調製した。
- ② 調製したサンプルを 37 °C で 0, 20, 40, 60, 90, 120 および 180 分間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、反応液を HPLC/UV を用いて定量解析し、検量線により 57 の生成量を算出した。

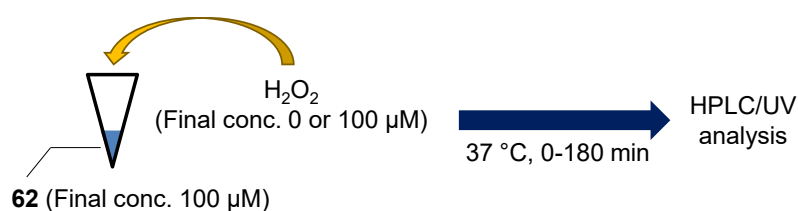


Figure 2.2.12 HPLC を用いた 62 の時間依存的 H₂O₂ 応答性評価

62 の時間依存的 H₂O₂ 応答性評価の結果を Figure 2.2.13 に示す。Figure 2.2.13a は、62 を H₂O₂ 存在下で 20, 60 および 180 分間インキュベートした後の HPLC クロマトグラムであり、横軸は保持時間、縦軸は 230 nm における吸光度を表している。青色のチャートは 62 の標品、淡緑色、緑色および濃緑色のチャートは 62 に H₂O₂ を加えてそれぞれ 20, 60 および 180 分間インキュベート

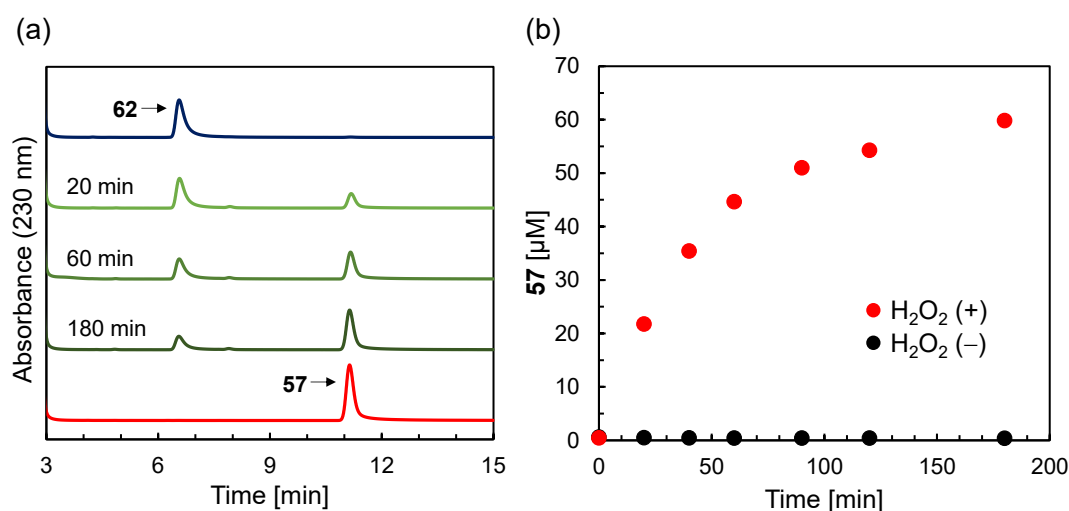


Figure 2.2.13 (a) HPLC chromatograms of 62 after reaction with H₂O₂. (b) Time-dependent responses of 62 to H₂O₂. 62 (100 μM) was incubated with or without H₂O₂ (100 μM) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 °C for 0-180 min. The products were analyzed by HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, 4.6×250 mm; 3:2 MeCN/H₂O; flow rate 1.0 mL min⁻¹; 30 °C; detection by UV (230 nm)).

後のサンプル、赤色のチャートは **57** の標品の結果を示している。**Figure 2.2.13b** は、インキュベート時間に対して **57** の生成量をプロットしたグラフであり、横軸はインキュベート時間、縦軸は放出された **57** の濃度を表している。赤色のプロットは H_2O_2 (100 μM) 存在下での結果を、黒色のプロットは H_2O_2 非存在下での結果を示している。**Figure 2.2.13a** より、**62** のピークは時間依存的に減少している一方、**57** のピークは時間依存的に増大していることから、**62** が時間依存的に H_2O_2 に応答して、**57** を放出することを明らかにした。さらに、**Figure 2.2.13b** より、 H_2O_2 存在下では、**57** が放出されるのに対し、 H_2O_2 非存在下では、**62** は安定であり、**57** を放出しないことを明らかにした。

2.6.3 62 の各種 ROS に対する選択性評価

序論第3章3.1節で前述したように、生体内には H_2O_2 だけでなく、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) やスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) など様々な種類の ROS が存在している。そのため、**62** が H_2O_2 以外の ROS に対しても応答する場合、標的組織および細胞選択性が低下することが懸念される。そこで次に、**62** の各種 ROS に対する選択性を HPLC を用いて検討した。

本検討では、 H_2O_2 以外の ROS として、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP)、*tert*-ブトキシラジカル ($\cdot\text{O}^t\text{Bu}$)、次亜塩素酸イオン (OCl^-) およびスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) を用いた。本アッセイのプロトコルを以下に示す (**Figure 2.2.14**)。

- ① 0.5 mL チューブに、**62** (100 μM) および各種 ROS (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, TBHP, $\cdot\text{O}^t\text{Bu}$, OCl^- および $\text{O}_2^{\cdot-}$, 100 μM) を含む 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 50 μL を調製した。
- ② 調製したサンプルを 37 $^\circ\text{C}$ で 20, 40 および 60 分間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、反応液を HPLC/UV を用いて定量解析し、検量線により **57** の生成量を算出した。

なお、スーパーオキシドアニオンは、**Scheme 2.2.2** に示す反応により H_2O_2 を生成するため、 H_2O_2 スカベンジャーとしてカタラーゼ(5 units)を添加した場合の評価も行った¹⁸⁰。

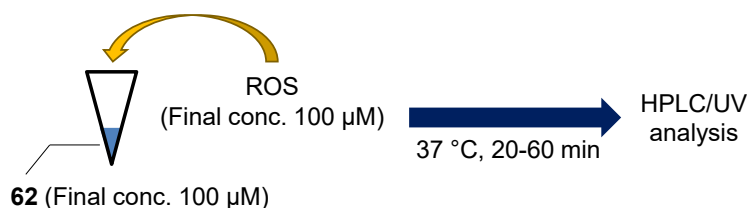
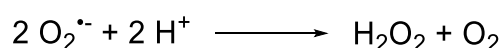


Figure 2.2.14 HPLC を用いた **62** の各種 ROS に対する応答性評価



Scheme 2.2.2 スーパーオキシドアニオンの不均化反応

62 の各種 ROS に対する応答性評価の結果を **Figure 2.2.15** に示す。横軸は ROS の種類を、縦軸は放出された **57** の濃度を表している。赤色、黄色および青色のグラフはそれぞれ 20, 40 および 60 分間インキュベートした結果を示している。その結果、**62** は、 $\cdot\text{OH}$, TBHP, $\cdot\text{O}^t\text{Bu}$ および $\cdot\text{OCl}$ に対して、ほとんど応答しないことを明らかにした。さらに、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ に対する応答は、カタラーゼの存在下では起こらないことから、**62** は $\text{O}_2^{\cdot-}$ に応答したのではなく、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ が不均化して生成した H_2O_2 に対して応答したと考えられる。したがって、**62** は、 $\cdot\text{OH}$, TBHP, $\cdot\text{O}^t\text{Bu}$, $\cdot\text{OCl}$ および $\text{O}_2^{\cdot-}$ に対してほとんど応答せず、 H_2O_2 選択的に応答し、**57** を放出することを見出した。

2.6 節で述べた以上の結果より、**62** は H_2O_2 に対して選択的かつ速やかに応答して、光感受性が ON である **57** を放出することを明らかにした。

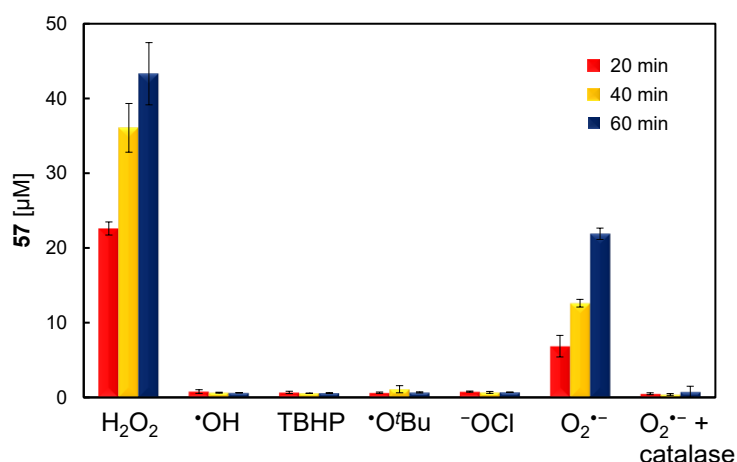


Figure 2.2.15 Responses of **62** to several reactive oxygen species (ROS). **62** (100 μM) was incubated with the indicated ROS (100 μM) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 °C for 20-60 min. The products were analyzed by HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, 4.6×250 mm; 3:2 MeCN/H₂O; flow rate 1.0 mL min⁻¹; 30 °C; detection by UV (230 nm)).

2.7 H_2O_2 応答型光感受性分子 **62** の光細胞毒性評価

2.6 節までに **62** の光感受性が OFF であること、および **62** が H_2O_2 に応答して光感受性が ON である **57** を放出することを明らかにした。そこで最後に、**62** が H_2O_2 過剰発現がん細胞に対して選択的な光細胞毒性を発現することを実証するため、 H_2O_2 を過剰発現するマウスメラノーマ細胞 B16F10¹⁴⁵ および正常細胞 WI-38 に対する **62** の光細胞毒性を評価した (**Figure 2.2.16**)。比較のため、光感受性が常に ON である **57** の光細胞毒性も同様に評価した。

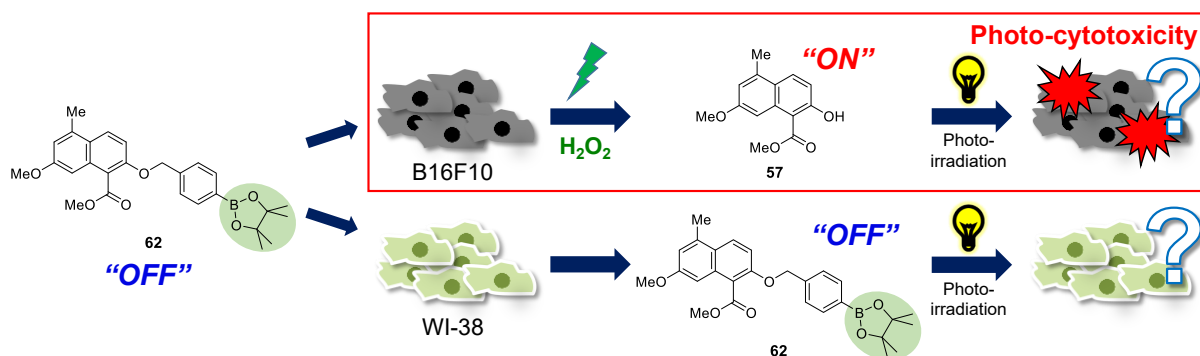


Figure 2.2.16 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **62** の光細胞毒性評価

57 および **62** の光細胞毒性評価のプロトコルを以下に示す (Figure 2.2.17)。

- ① マウスメラノーマ細胞 B16F10 あるいはヒト胎児肺線維芽細胞 WI-38 を 96 ウェルプレートに 4000 細胞/ウェルで播種した。
- ② 37 °C で 24 時間インキュベート後、**57** あるいは **62** を終濃度 0, 10, 20, 30, 40 および 50 μM かつ DMSO 終濃度 1% となるように添加した。
- ③ 37 °C で 3 時間インキュベート後、プレートの 20 cm 上方からの UV 光照射下 (368 nm, 30 W) あるいは非 UV 光照射下において 30 分間インキュベートした。
- ④ 37 °C で 24 時間インキュベート後、MTT アッセイにより細胞生存率を測定した。

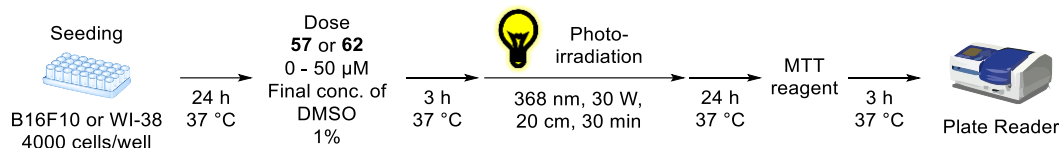


Figure 2.2.17 **57** および **62** の光細胞毒性評価のプロトコル

57 および **62** の光細胞毒性評価の結果を Figure 2.2.18 に示す。Figures 2.2.18a および b はそれぞれ、B16F10 および WI-38 に対して **57** を投与した結果を、Figures 2.2.18c および d はそれぞれ、B16F10 および WI-38 に対して **62** を投与した結果を示している。各図の横軸は **57** および **62** の濃度、縦軸は細胞生存率を表しており、青色および赤色のグラフがそれぞれ非 UV 光照射下および UV 光照射下の結果を表している。非 UV 光照射下では、**57** および **62** は試験した濃度範囲において、どちらの細胞に対しても細胞毒性を示さないことを明らかにした。これに対し、**57** は UV 光照射下で、B16F10 細胞および WI-38 細胞に対して非選択的に、**57** の濃度依存的な光細胞毒性を発現することを見出した。一方、**62** は WI-38 細胞に対して、UV 光照射下においても、光細胞毒性をほとんど発現しなかったのに対し、B16F10 細胞に対しては効果的な光細胞毒性を発現することを明らかにした。以上の結果より、**62** が UV 光照射下、H₂O₂ を過剰発現しているがん細胞である B16F10 細胞に対して選択的な光細胞毒性を発現することを見出した。

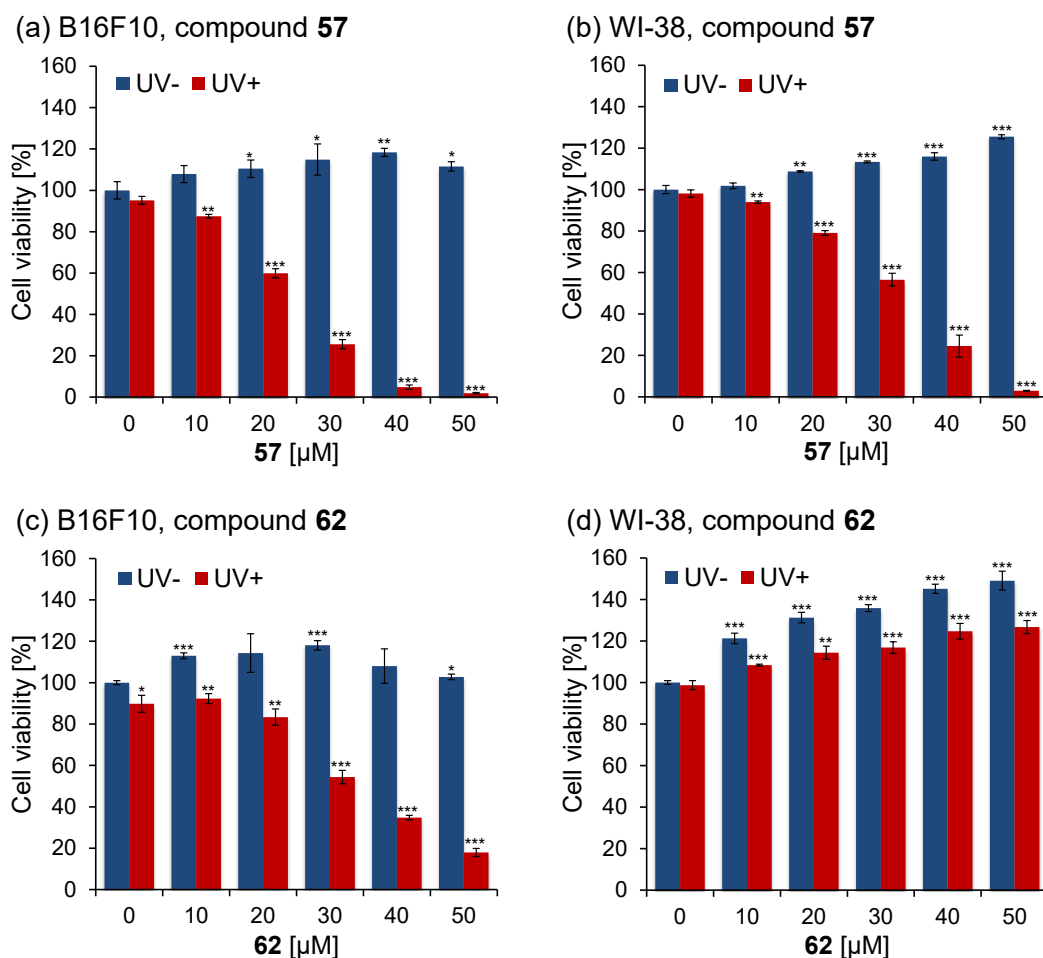


Figure 2.2.18 Photo-cytotoxic activity of **57** and **62** against B16F10 and WI-38 cells. (a, c) B16F10 and (b, d) WI-38 cells were seeded into 96-well plates (4.0×10^3 cells). After 24 h, the cells were treated with the indicated concentrations of (a, b) **57** and (c, d) **62**, and incubated for 3 h at 37 °C, followed by incubation for 30 min with or without photo-irradiation by a UV lamp (368 nm, 30 W) placed 20 cm from the sample. Samples were further incubated for 24 h at 37 °C, and then MTT reagent was added to each well and the cells were incubated for up to three additional hours. Absorbance at 540 nm was read using a plate reader. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.8 結論

第2章では、ネオカルチノスタチン・クロモフォアの2-ナフトール部位を基本骨格とした H_2O_2 応答型光感受性分子の創製について述べた。本論第1章で記述した実験結果を基に、ネオカルチノスタチン・クロモフォアの2-ナフトール部位 **57** が有する 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基に、がん細胞に過剰発現するバイオマーカーである H_2O_2 に応答するボロン酸エステルを連結した **62** をデザインおよび合成した。次に、**62** の吸収スペクトル測定、タンパク質光分解活性評価および一重項酸素生成量評価を行った結果、365 nm の照射下における **62** のタンパク質光分解活性および一重項酸素生成能は、**57** と比較して顕著に低下し、**62** の光感受性が OFF であることを

見出した。**62** の吸収スペクトルは、本論第 1 章 1.5 節に述べた他の 2-ナフトール誘導体の結果と同様、**57** と比較して短波長シフトし、365 nm における吸光度が大幅に減少していたことから、**62** の光感受性が OFF である要因は、365 nm の光照射下における光励起の起こりにくさのためであることが示唆された (Figure 2.2.19)。

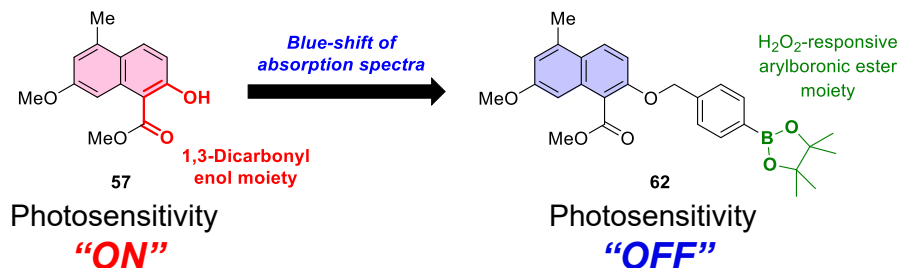


Figure 2.2.19 本論第 2 章の結論 (1)

次に、**62** の H₂O₂ に対する応答性を評価した結果、**62** は、H₂O₂ 濃度依存的かつ時間依存的に H₂O₂ と反応して、光感受性が ON である **57** を放出することを明らかにした。さらに、**62** は生体内に関連する他の種類の ROS には応答せず、H₂O₂ に対し選択的に応答して **57** を放出することを見出した (Figure 2.2.20)。

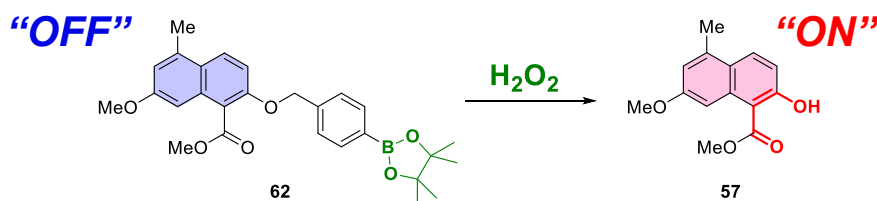


Figure 2.2.20 本論第 2 章の結論 (2)

最後に、H₂O₂ を過剰発現するマウスメラノーマ細胞 B16F10 および正常細胞 WI-38 に対する **57** および **62** の光細胞毒性を評価した。その結果、**57** は、368 nm の光照射下、B16F10 細胞および WI-38 細胞に対して非選択的な光細胞毒性を発現した一方、**62** は、368 nm の光照射下において、B16F10 細胞選択的な光細胞毒性を発現することを明らかにした (Figure 2.2.21)。

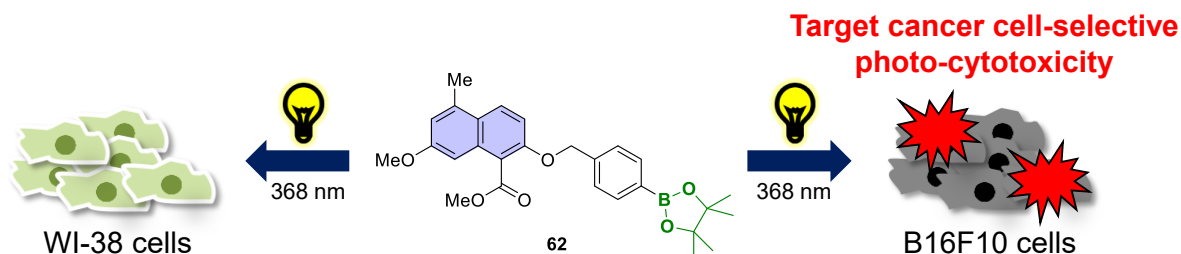


Figure 2.2.21 本論第 2 章の結論 (3)

第3章 ヒポクレリン B を基本骨格とした H₂O₂ 応答型光感受性分子の創製

3.1 H₂O₂ 応答型光感受性分子 63 の分子デザイン

本論第2章で、ネオカルチノスタチン・クロモフォアの2-ナフトール部位 **57** が有する 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基に、H₂O₂ に応答するボロン酸エステルを連結した **62** が、H₂O₂ 応答型光感受性分子であることを明らかにした (Figure 2.3.1a)。そこで本章では、1,3-ジカルボニルエノール構造に着目した本光感受性制御手法が、より生体透過性の高い長波長の光で励起可能な他の光感受性分子にも適用できるかを検証した。すなわち、新たな光感受性分子として、生体透過性の高い長波長の可視光 (660 nm など) で励起可能、かつ 1,3-ジカルボニルエノール構造を有する光感受性分子であり、光照射下において光細胞毒性を発現する天然物ヒポクレリン B (**39**) を選択し、**39** が有する 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基にボロン酸エステルを連結した H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** をデザインした (Figure 2.3.1b)。

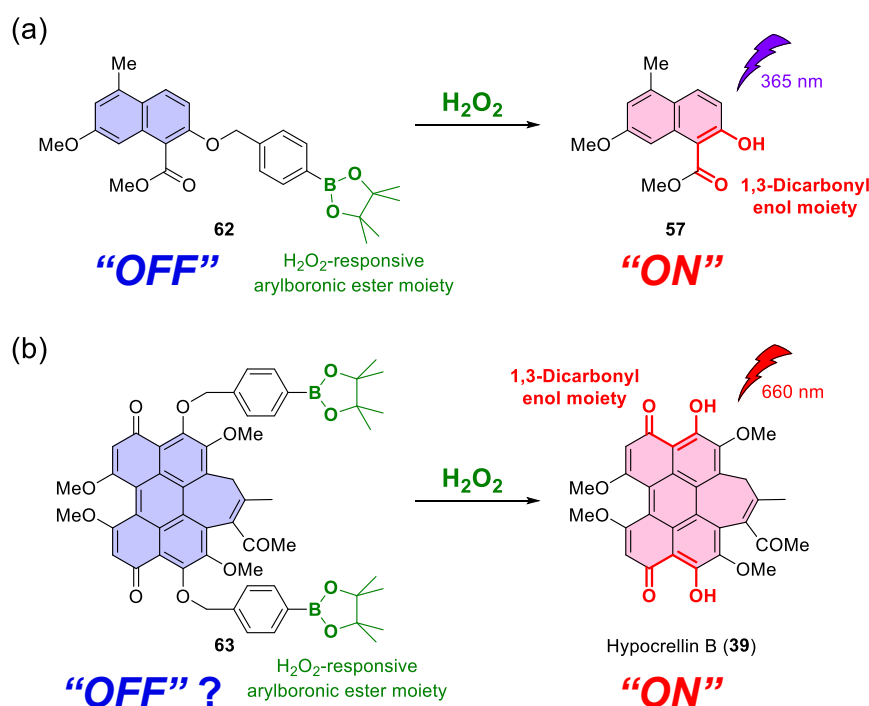


Figure 2.3.1 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の分子デザイン

デザインした **63** の H₂O₂ 過剰発現がん細胞に対する推定作用機序を Figure 2.3.2 に示す。まず、光感受性が OFF である **63** は細胞内で、H₂O₂ によりボロン酸エステル部分が酸化され、水酸基となる。その後、生じた *p*-ヒドロキシベンジルエーテルの 1,6-脱離により、光感受性が ON である **39** が放出される。このように生成した **39** に対して、生体透過性の高い 660 nm の光照射することで、H₂O₂ 過剰発現がん細胞に対して選択的に光細胞毒性を発現させることができると考えた。

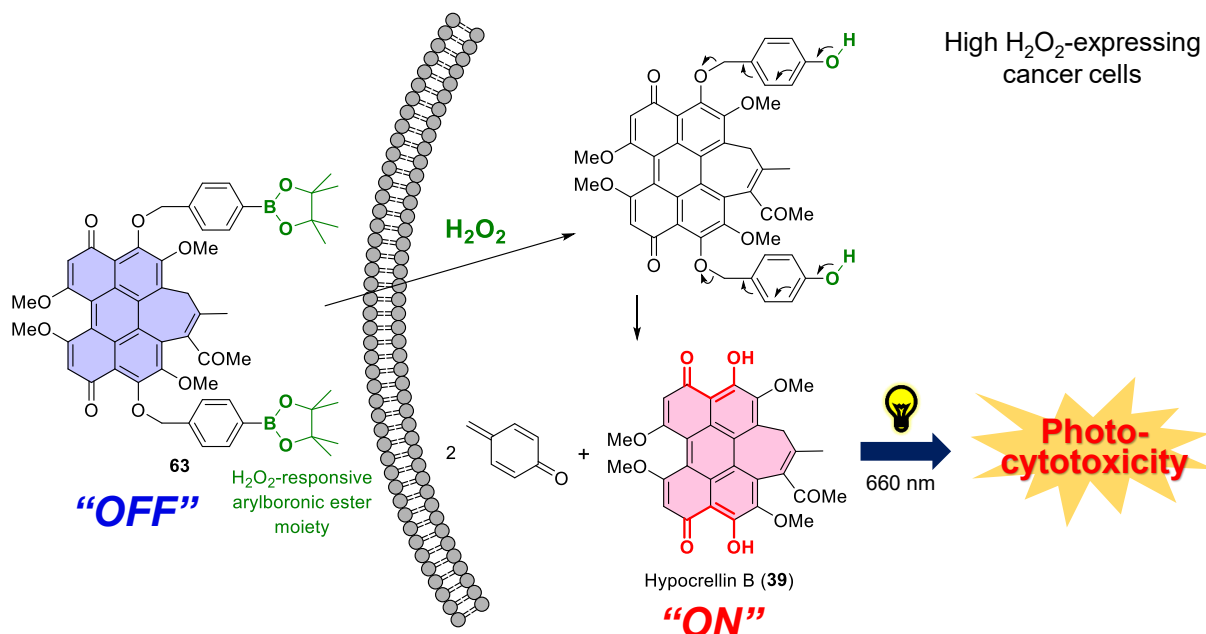
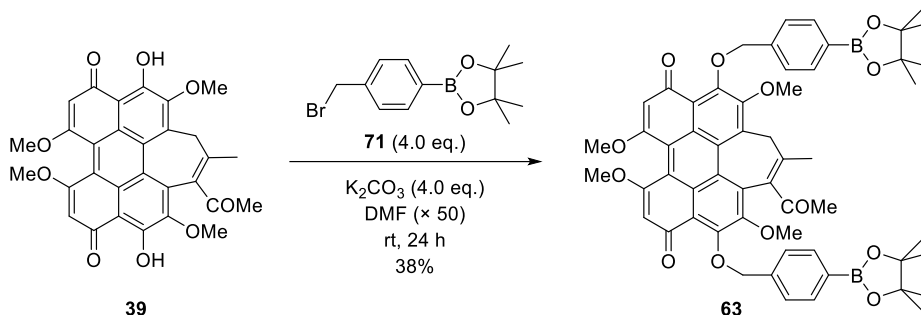


Figure 2.3.2 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の推定作用機序

3.2 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の合成

63 の合成を以下に示す (Scheme 2.3.1)。市販原料である **39** の 2 か所のフェノール性水酸基を 4-(ブロモメチル)フェニルボロン酸ピナコールエステル(**71**)を用いてアルキル化することで、H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** を合成した。



Scheme 2.3.1 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の合成

63 におけるアルキル化位置の決定は、**63** の C-5 位および C-8 位水素の ¹H-NMR 化学シフト ($\delta_{\text{H-5}}$ および $\delta_{\text{H-8}}$)、HMBC および nOe を基に行った (Figure 2.3.3)。先行研究において、C-3 位および C-10 位水酸基がメチル化されたヒポクレリン B 誘導体 **72** の $\delta_{\text{H-5}}$ および $\delta_{\text{H-8}}$ は、6.13 および 6.12 ppm であり、C-4 位および C-9 位水酸基がメチル化されたヒポクレリン B 誘導体 **73** の $\delta_{\text{H-5}}$ および $\delta_{\text{H-8}}$ は、6.83 および 6.82 ppm であると報告されている¹³²。これに対し、**63** の $\delta_{\text{H-5}}$ および $\delta_{\text{H-8}}$ は、6.16 および 6.16 ppm であったことから、C-3 位および C-10 位水酸基がメチル化された **72** の化学シフトと同様の傾向を示した。加えて、**63** の HMBC 測定の結果、C-5 位および C-8 位のプロトンとキノンのカルボニル炭素との HMBC 相関が観測されたことから、C-4 位および C-9 位にキ

の吸収スペクトルは、予測の通り、**39**と比較して短波長シフトし、660 nm付近における吸光度が大幅に低下することを明らかにした。

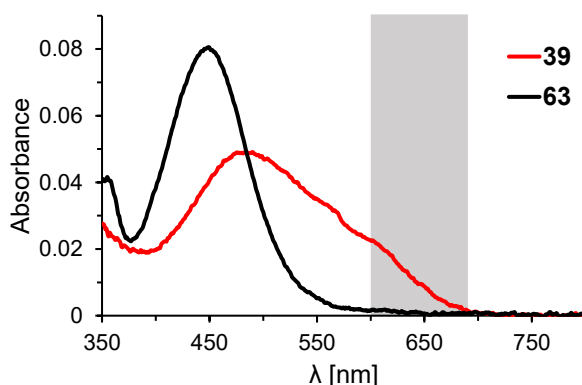


Figure 2.3.5 UV-Vis spectra of **39** and **63** (5 μ M) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM). The highlighted wavelength range is the emission wavelength of the LED (660 nm) used in this study.

3.4 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** のタンパク質光分解活性評価

次に、660 nm の光照射下における **39** および **63** の BSA に対するタンパク質光分解活性がそれぞれ ON および OFF であることを検証した (**Figure 2.3.6**)。

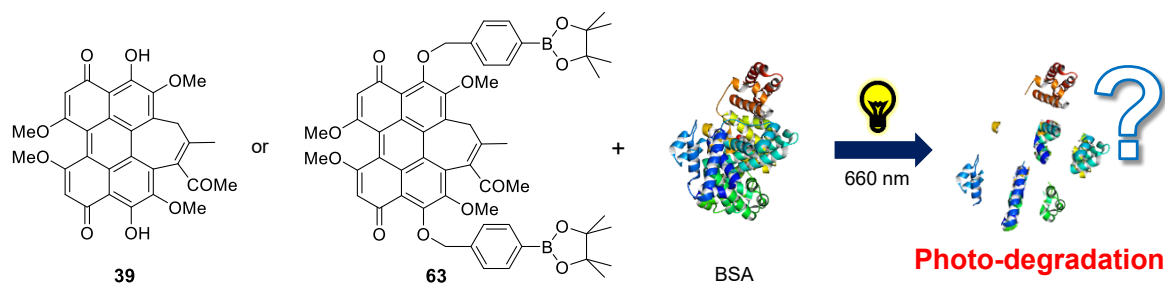


Figure 2.3.6 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の BSA に対する光分解活性評価

39 および **63** の BSA に対する光分解活性評価のプロトコルを以下に示す。

- ① 0.5 mL チューブに、BSA (1.5 μ M) および **39** あるいは **63** (0, 0.3, 1, 3 および 10 μ M) を含む 1% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 10 μ L を調製した。
- ② 調製したサンプルを、液面の 10 cm 上方からの LED 光照射下 (660 nm, 3 W, 33 mW/cm²) あるいは非 LED 光照射下において 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、サンプルに 2-メルカプトエタノールを含むローディングバッファー 2 μ L を加え、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱して、タンパク質の還元処理を行った。
- ④ 8% ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。

39 および **63** の BSA に対する光分解活性評価の結果をそれぞれ **Figures 2.3.7a** および **b** に示す。各図のレーン 1 は分子量マーカー、レーン 2 は BSA のみのコントロール、レーン 3 は BSA に LED 光を照射したサンプル、レーン 4 は BSA に **39** あるいは **63** (10 μM) を加えて LED 光を照射しなかったサンプル、レーン 5-8 は BSA に **39** あるいは **63** (10, 3, 1 および 0.3 μM) を加えて LED 光を照射したサンプルである。**Figures 2.3.7a** および **b** ともに、レーン 2 と比較して、レーン 3 および 4 では、BSA のバンドに変化が見られなかったことから、**39** あるいは **63** の非存在下で BSA に 660 nm の光照射をした場合、および BSA に **39** あるいは **63** を加えて LED 光を照射しなかった場合には、BSA が分解しないことを確認した。一方で、**Figure 2.3.7a** のレーン 5 および 6 では、BSA のバンドが顕著に薄くなったことから、**39** が 660 nm の光照射下、BSA を効果的に光分解することを見出した。これに対し、**Figure 2.3.7b** のレーン 5-8 では、レーン 2 と比較して、BSA のバンドに変化が見られなかったことから、**63** (0.3-10 μM) は、660 nm の光照射下において、BSA を光分解しないことを明らかにした。以上の結果より、660 nm の光照射下における **39** および **63** のタンパク質光分解活性はそれぞれ ON および OFF であることを見出した。

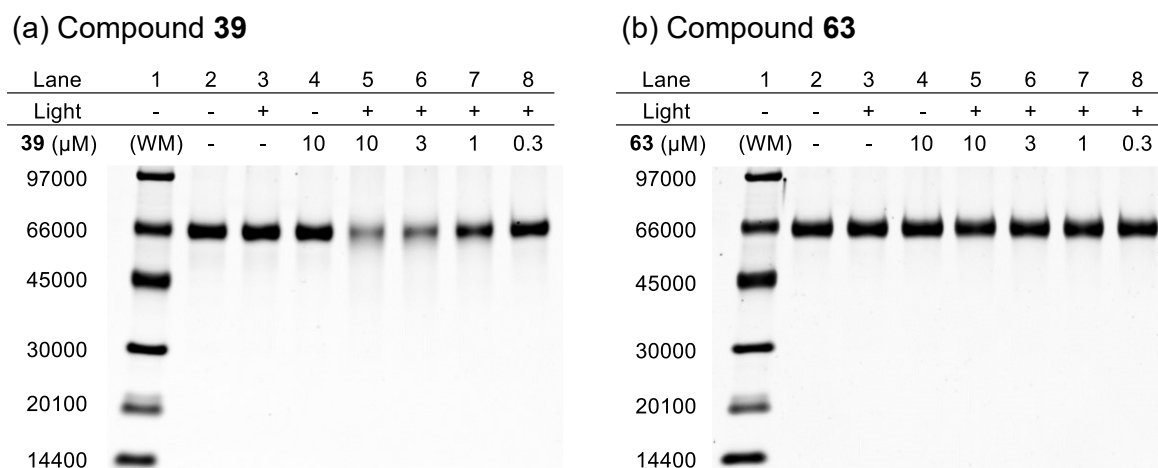


Figure 2.3.7 Photodegradation of BSA using **39** and **63** under 660 nm light irradiation. BSA (1.5 μM) was incubated with (a) **39** and (b) **63** in 1% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 °C for 2 h under irradiation with a LED (660 nm, 3 W, and 33 mW/cm²) placed 10 cm from the sample. The products were analyzed by tricine-SDS-PAGE. The gels were stained with Sypro Ruby protein gel stain. Lane 1: size marker; lane 2: BSA alone; lane 3: BSA upon photo-irradiation; lane 4: BSA + each compound (10 μM) without photo-irradiation; lanes 5-8: BSA + each compound (concentrations 10, 3, 1 and 0.3 μM , respectively) upon photo-irradiation.

3.5 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の一重項酸素生成量評価

さらに、660 nm の光照射下における H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の一重項酸素生成量が、**39** と比較して低下していることを検証するため、一重項酸素捕捉剤である DPBF を用いて **39** および **63** の光照射下における一重項酸素生成量を評価した (**Figure 2.3.8**)。

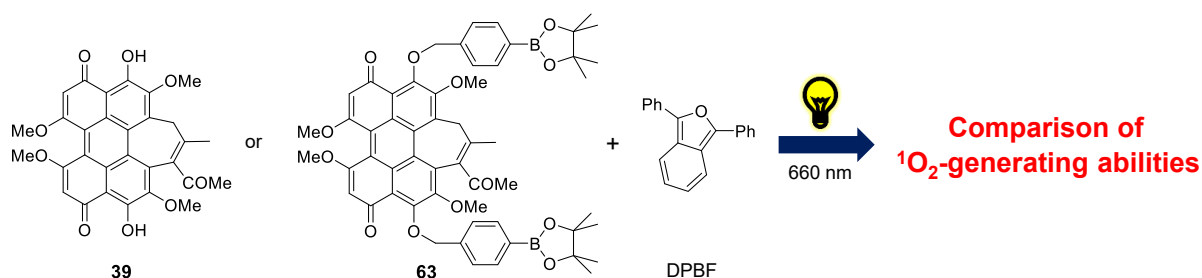


Figure 2.3.8 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の一重項酸素生成量評価

39 および **63** の DPBF を用いた一重項酸素生成量評価のプロトコルを以下に示す。

- ① 1.5 mL チューブに、**39** あるいは **63** (5 μM) および DPBF (500 μM) を含む 80% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 120 μL を調製した。
- ② 調製したサンプルを、液面の 20 cm 上方からの LED 光照射下 (660 nm, 3 W, 10 mW/cm²) において室温で 0, 10, 20, 40, 60 および 120 秒間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、120 μL の各サンプルから 100 μL を 96 ウェルプレートに移し、プレートリーダーを用いて 320-500 nm の吸収スペクトルを測定した。

39 および **63** の一重項酸素生成量評価の結果を Figure 2.3.9 に示す。Figure 2.3.9a は、ヒポクレリン B 誘導体を含まず、DPBF のみのブランク試料の測定結果を、Figure 2.3.9b および Figure 2.3.9c はそれぞれ **39** および **63** の測定結果を示している。各図の横軸は波長を、縦軸は吸光度を表しており、赤、橙、黄緑、緑、青および紺色のグラフはそれぞれ 660 nm の光照射を 0, 10, 20, 40, 60 および 120 秒間行ったサンプルの結果を示している。**39** を用いた場合には、DPBF の 410 nm の吸光度が著しく減少したことから、**39** が 660 nm の光照射下、一重項酸素を生成することを確認した。これに対し、**63** を用いた場合には、ブランクと同様、DPBF の 410 nm の吸光度が減少しないことを見出した。したがって、660 nm の光照射下における **63** の一重項酸素生成量は、**39** と比較して顕著に低下し、**63** の光感受性が OFF であることを明らかにした。この結果は、タンパク質光分解活性評価の結果と一致した。

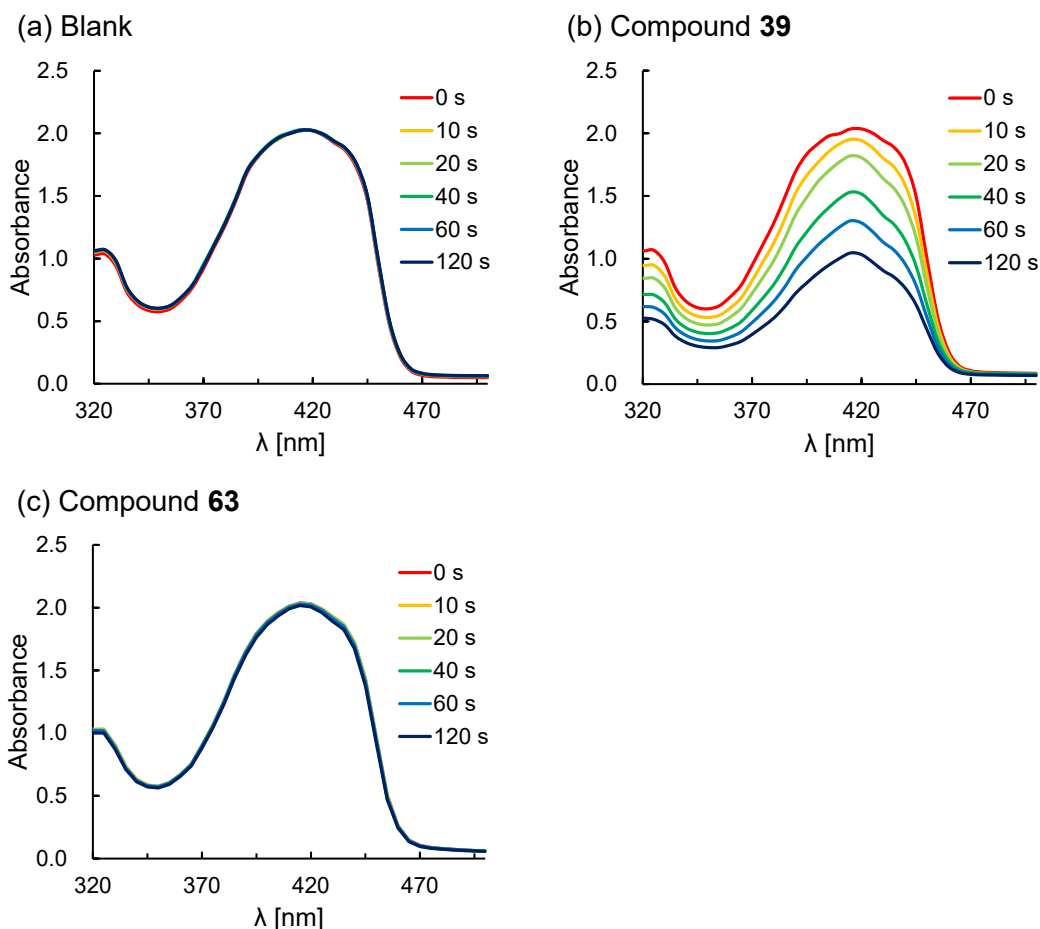


Figure 2.3.9 Time-dependent changes in UV-Vis spectra of 1,3-diphenyl isobenzofuran (DPBF) with **39** and **63** upon photo-irradiation. DPBF (500 μM) was incubated (a) without and with (b) **39** or (c) **63** (5 μM) in 80% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) at rt for 0-120 s under irradiation with a LED (660 nm, 3 W, and 10 mW/cm^2) placed 20 cm from the sample.

3.6 H_2O_2 応答型光感受性分子 **63** を用いた EPR 測定

39 および **63** の一重項酸素生成量の違いをさらに検証するため、スピントラッピング EPR 法を用いて、660 nm の照射下における **39** および **63** の一重項酸素生成量を比較した (**Figure 2.3.10**)。一重項酸素のスピントラップ剤としては、1.6.2 節と同様、4-oxo-TEMP を使用した。

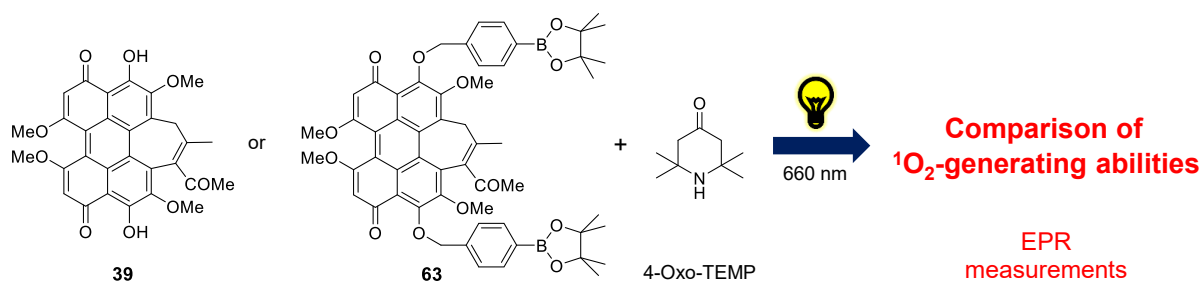


Figure 2.3.10 スピントラッピング EPR 法を用いた **39** および **63** による一重項酸素生成の検証

39 および **63** を用いた EPR スペクトル測定のプロトコルを以下に示す。

- ① **39** あるいは **63** (5 μ M)、4-oxo-TEMP (200 mM) および DETAPAC (1.0 mM) を含む 1% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液を調製した。
- ② 調製したサンプルを EPR 分光器の石英セルに充填し、セルより 20 cm の距離からの LED 光照射下 (660 nm, 3 W, 10 mW/cm²) において、EPR スペクトルを 3 分間測定した。

39 および **63** を用いた LED 光照射下における EPR スペクトルをそれぞれ **Figures 2.3.11a** および **b** に示す。**39** および 4-oxo-TEMP 存在下、LED 光照射時には、4-oxo-TEMPO の 3 本線の EPR スペクトルが検出されたことから、**39** が 660 nm の光照射下において一重項酸素を生成することを本評価においても確認した。これに対して、**63** および 4-oxo-TEMP 存在下、LED 光照射時には、シグナルの検出が顕著に抑制されたことから、3.5 節と同様、660 nm の光照射下における **63** の一重項酸素生成量が、**39** と比較して顕著に低下することを見出した。

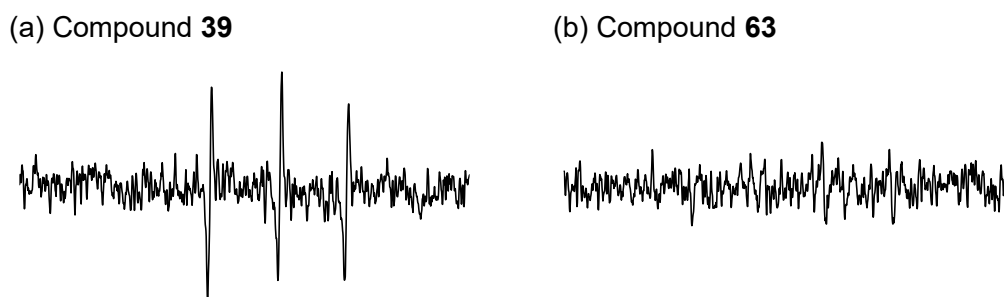


Figure 2.3.11 EPR spectra obtained during photo-irradiation of (a) **39** and (b) **63** in the presence of 4-oxo-TEMP. Each compound (5 μ M) and 4-oxo-TEMP (200 mM) were incubated in 1% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) containing 1 mM DETAPAC under irradiation with a LED (660 nm, 3 W, and 10 mW/cm²) placed 20 cm from a flat cell for 3 min.

以上の 3.4-3.6 節の結果より、660 nm の光照射下における **63** の光感受性が OFF であることを明らかにした。また、3.3 節の結果より、**63** の光感受性が OFF である要因は、**63** の 660 nm における吸光度が、**39** と比較して大幅に減少し、S₁ 状態への光励起が起こりにくいためであることが示唆された。

3.7 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の H₂O₂ 応答性評価

前節までに **63** の光感受性が OFF であることを明らかにした。次に、**63** が H₂O₂ と反応して、光感受性が ON である **39** を放出するかを HPLC を用いて検討した (**Figure 2.3.12**)。

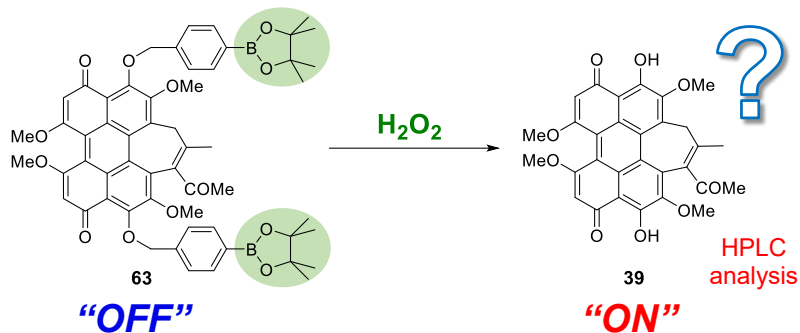


Figure 2.3.12 H₂O₂ 応答型光感受性分子 **63** の H₂O₂ 応答性評価

3.7.1 **63** の H₂O₂ 応答性評価

はじめに、**63** が H₂O₂ 濃度依存的および時間依存的に H₂O₂ に応答して、**39** を放出するかを HPLC を用いて検討した。本アッセイのプロトコルを以下に示す (Figure 2.3.13)。

- ① 0.5 mL チューブに、**63** (20 μM) および H₂O₂ (0, 100, 300 および 1000 μM) を含む 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 50 μL を調製した。
- ② 調製したサンプルを 37 °C で 0, 30, 60, 90, 120 および 180 分間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、反応液を HPLC/UV を用いて定量解析し、検量線により **39** の生成量を算出した。

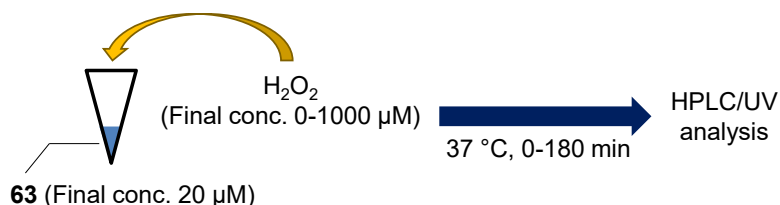


Figure 2.3.13 HPLC を用いた **63** の H₂O₂ 応答性評価

63 の H₂O₂ 応答性評価の結果を Figure 2.3.14 に示す。横軸はインキュベート時間、縦軸は **39** の放出率を表している。また、赤、橙、黄緑および黒色のプロットは、**63** をそれぞれ 1000 μM、300 μM、100 μM および 0 μM の H₂O₂ 存在下でインキュベートした結果を示している。その結果、**63** は H₂O₂ 非存在下では安定であり、**39** を放出しない一方、H₂O₂ 存在下では H₂O₂ 濃度依存的に **39** を放出することを明らかにした。さらに、**63** は時間依存的に H₂O₂ に応答して、**39** を放出することを見出した。以上の結果より、**63** が H₂O₂ 濃度依存的かつ時間依存的に H₂O₂ に応答して、**39** を放出することを明らかにした。

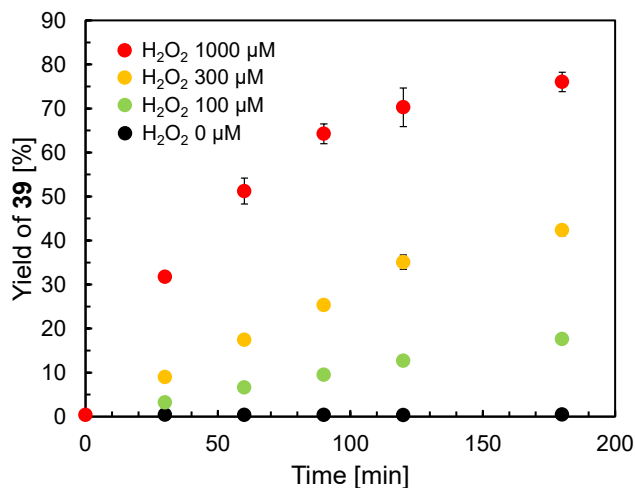


Figure 2.3.14 Responses of **63** to H₂O₂. **63** (20 μM) was incubated with H₂O₂ (0-1000 μM) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 °C for 0-180 min. The products were analyzed by HPLC/UV.

3.7.2 63 の各種 ROS に対する選択性評価

次に、**63** が H₂O₂ に選択的に応答して、**39** を放出することを明らかにするため、**63** の各種 ROS に対する応答性を HPLC を用いて評価した。2.6.3 節と同様、H₂O₂ 以外の ROS として、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP)、*tert*-ブトキシラジカル ($\cdot\text{O}^t\text{Bu}$)、次亜塩素酸イオン (OCl^-) およびスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) を用いた。本アッセイのプロトコルを以下に示す (**Figure 2.3.15**)。

- ① 0.5 mL チューブに、**63** (20 μM) および各種 ROS (H₂O₂, $\cdot\text{OH}$, TBHP, $\cdot\text{O}^t\text{Bu}$, OCl^- および $\text{O}_2^{\cdot-}$, 300 μM) を含む 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 50 μL を調製した。
- ② 調製したサンプルを 37 °C で 120 分間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、反応液を HPLC/UV を用いて定量解析し、検量線により **39** の生成量を算出した。

なお、スーパーオキシドアニオンに関しては、不均化により生成しうる H₂O₂ の影響を除くため、H₂O₂ スカベンジャーとしてカタラーゼ (5 units) を添加した場合の評価も行った。

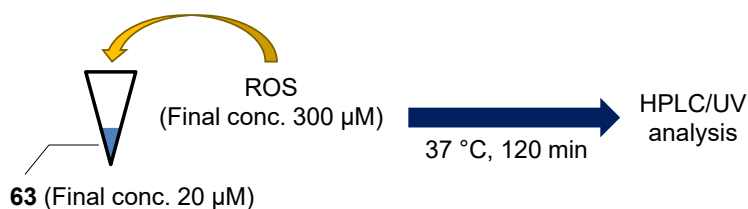


Figure 2.3.15 HPLC を用いた **63** の各種 ROS に対する応答性評価

63 の各種 ROS に対する応答性評価の結果を **Figure 2.3.16** に示す。横軸は ROS の種類を、縦軸は **39** の放出率を表している。その結果、2.6.3 節の結果と同様、**63** は、 $\cdot\text{OH}$, TBHP, $\cdot\text{O}^t\text{Bu}$ および

OCl^- に対して、ほとんど応答しないことを見出した。さらに、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ に対する応答は、カタラーゼを添加した場合には起こらないことから、**63** は $\text{O}_2^{\cdot-}$ に応答したのではなく、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ が不均化して生成した H_2O_2 に対して応答したと考えられる。したがって、**63** は、 $\cdot\text{OH}$, TBHP, $\cdot\text{O}^t\text{Bu}$, OCl^- および $\text{O}_2^{\cdot-}$ に対してほとんど応答せず、 H_2O_2 に対して選択的に応答し、**39** を放出することを明らかにした。

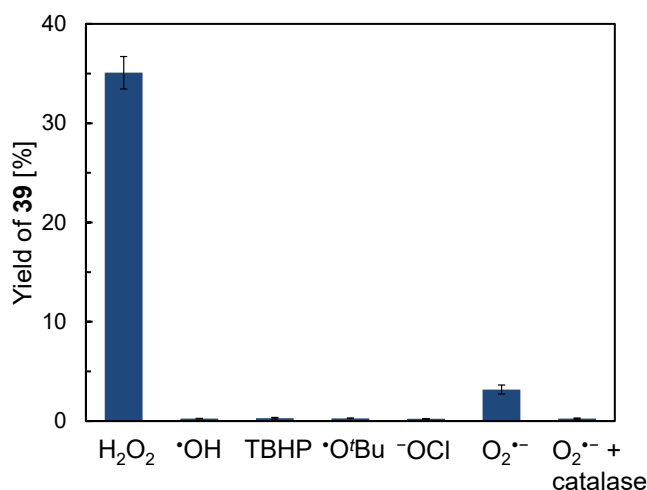


Figure 2.3.16 Responses of **63** to several reactive oxygen species (ROS). **63** (20 μM) was incubated with the indicated ROS (300 μM) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 $^\circ\text{C}$ for 120 min. The products were analyzed by HPLC/UV.

3.7 節で述べた以上の結果より、**63** は H_2O_2 に対して選択的かつ効果的に応答して、光感受性が ON である **39** を放出することを見出した。

3.8 H_2O_2 応答型光感受性分子 **63** の H_2O_2 存在下での一重項酸素生成量評価

H_2O_2 応答型光感受性分子 **63** が、 H_2O_2 と反応して **39** を放出することで、**39** の光感受性を回復するかを検証するため、**63** を H_2O_2 とインキュベートした後の 660 nm の光照射下における一重項酸素生成量を DPBF を用いて評価した (**Figure 2.3.17**)。

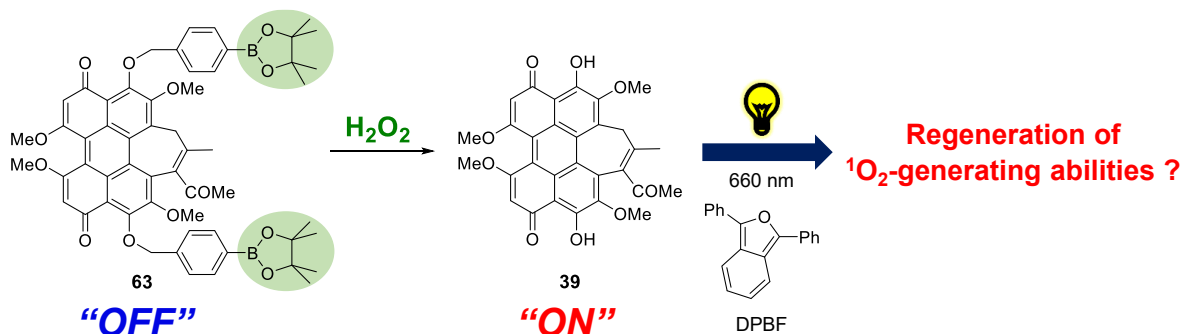


Figure 2.3.17 H_2O_2 応答型光感受性分子 **63** の H_2O_2 との反応後の一重項酸素生成量評価

H₂O₂ との反応後の **63** の DPBF を用いた一重項酸素生成量評価のプロトコルを以下に示す (Figure 2.3.18)。

- ① 0.5 mL チューブに、**63** (0 または 25 μM) および H₂O₂ (1 mM) を含む 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液を調製した。
- ② 調製したサンプルを 37 °C で 2 時間インキュベートした。
- ③ インキュベート後、1.5 mL チューブに、反応液 24 μL、および DPBF (625 μM) を含む 98.75% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 96 μL を加えることで、反応液が 5 倍に希釈され、かつ DPBF (500 μM) を含む 80% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) 溶液 120 μL を調製した。
- ④ 調製したサンプルを、液面の 20 cm 上方からの LED 光照射下 (660 nm, 3 W, 10 mW/cm²) において室温で 0, 10, 20, 40, 60 および 120 秒間インキュベートした。
- ⑤ インキュベート後、120 μL の各サンプルから 100 μL を 96 ウェルプレートに移し、プレートリーダーを用いて 320-500 nm の吸収スペクトルを測定した。

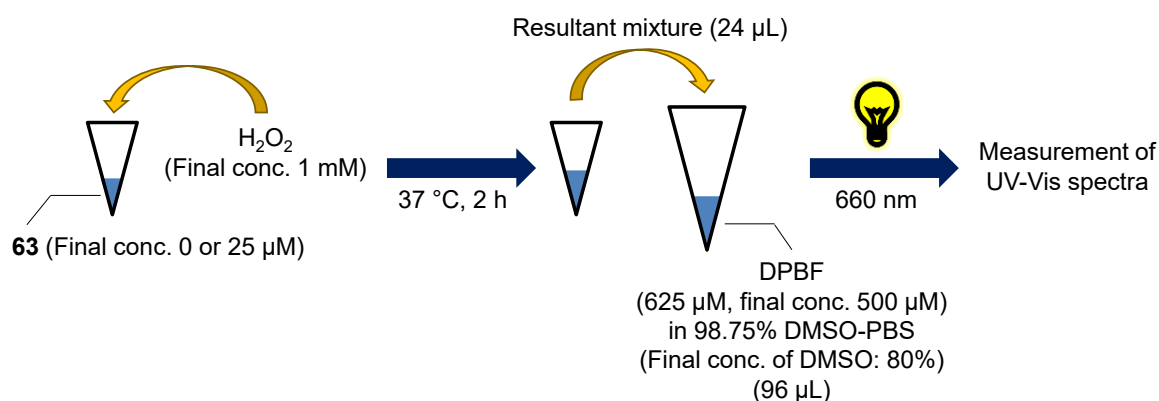


Figure 2.3.18 DPBF を用いた **63** の H₂O₂ との反応後の一重項酸素生成量評価

H₂O₂ との反応後の **63** の一重項酸素生成量評価の結果を Figure 2.3.19 に示す。Figure 2.3.19a は、**63** を含まず、H₂O₂ のみを 2 時間インキュベートしたサンプルを DPBF 溶液と混合して測定したブランク試料の結果を、Figure 2.3.19b は、**63** を H₂O₂ 存在下で 2 時間インキュベート後、DPBF 溶液と混合して測定した結果を示している。各図の横軸は波長を、縦軸は吸光度を表しており、赤、橙、黄緑、緑、青および紺色のグラフはそれぞれ 660 nm の光照射を 0, 10, 20, 40, 60 および 120 秒間行ったサンプルの結果を示している。**63** を含まず、H₂O₂ のみを 2 時間インキュベートしたブランク試料の場合には、DPBF の 410 nm の吸光度が減少しないことを確認した。これに対し、**63** を H₂O₂ 存在下で 2 時間インキュベートしたサンプルを用いた場合には、DPBF の 410 nm における吸光度が顕著に減少したことから、**63** は H₂O₂ と反応することで、**39** の光感受性を回復し、光感受性が ON になることを明らかにした。

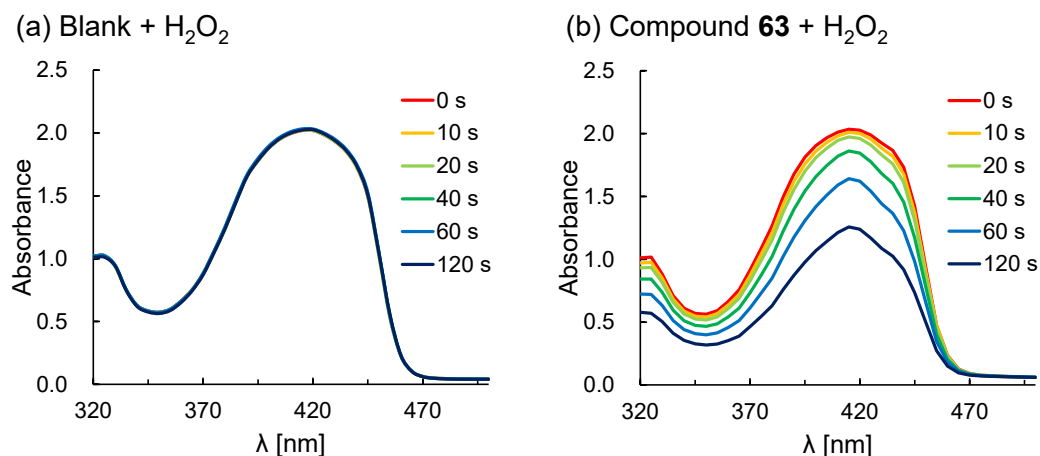


Figure 2.3.19 Time-dependent changes in UV-Vis spectra of DPBF (a) without and (b) with **63** in the presence of H_2O_2 upon photo-irradiation. **63** (25 μM) was incubated with H_2O_2 (1 mM) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) at 37 °C for 2 h. The product was then incubated with DPBF (500 μM) in 80% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) at rt for 0-120 s under irradiation with a LED (660 nm, 3 W, and 10 mW/cm^2) placed 20 cm from the sample.

3.9 H_2O_2 応答型光感受性分子 **63** の光細胞毒性評価

3.8 節までに **63** の光感受性が OFF であること、および **63** が H_2O_2 に応答して光感受性が ON である **39** を放出し、光感受性を回復することを明らかにした。そこで最後に、**63** が生体透過性の高い 660 nm の光照射下において、 H_2O_2 過剰発現がん細胞に対して選択的な光細胞毒性を発現することを実証するため、WI-38 細胞および H_2O_2 を過剰発現する B16F10 細胞に対する **63** の光細胞毒性を評価した (Figure 2.3.20)。比較のため、光感受性が常に ON である **39** の光細胞毒性も同様に評価した。

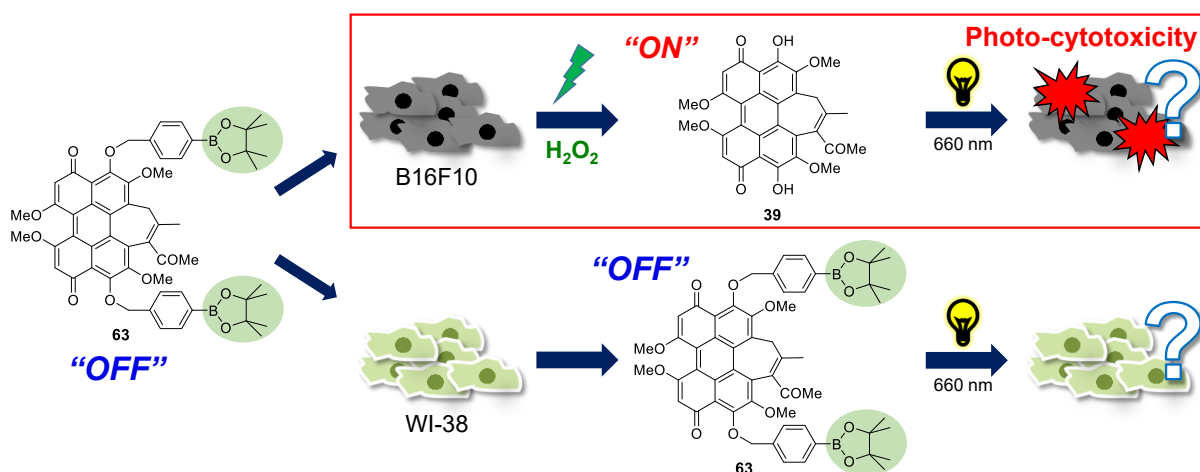


Figure 2.3.20 H_2O_2 応答型光感受性分子 **63** の光細胞毒性評価

39 および 63 の光細胞毒性評価のプロトコルを以下に示す (Figure 2.3.21)。

- ① マウスメラノーマ細胞 B16F10 あるいはヒト胎児肺線維芽細胞 WI-38 を 96 ウェルプレートに 4000 細胞/ウェルで播種した。
- ② 37 °C で 24 時間インキュベート後、39 あるいは 63 を終濃度 0, 0.1, 0.3, 1 および 3 μM かつ DMSO 終濃度 1% となるように添加した。
- ③ 37 °C で 3 時間インキュベート後、プレートの 15 cm 上方からの LED 光照射下 (660 nm, 3 W, 17 mW/cm^2) あるいは非 LED 光照射下において 30 分間インキュベートした。
- ④ 37 °C で 24 時間インキュベート後、MTT アッセイにより細胞生存率を測定した。

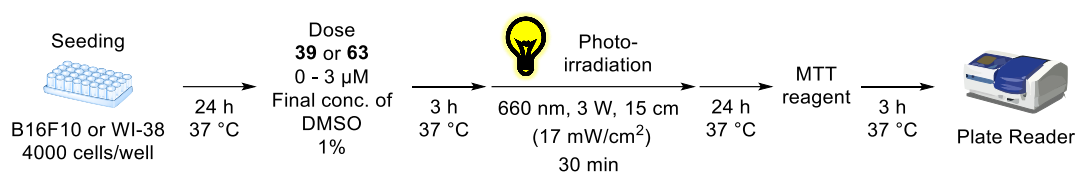


Figure 2.3.21 39 および 63 の光細胞毒性評価のプロトコル

39 および 63 の光細胞毒性評価の結果を Figure 2.3.22 に示す。Figures 2.3.22a および b はそれぞれ、B16F10 および WI-38 に対して 39 を投与した結果を、Figures 2.3.22c および d はそれぞれ、B16F10 および WI-38 に対して 63 を投与した結果を示している。各図の横軸は 39 および 63 の濃度、縦軸は細胞生存率を表しており、青色および赤色のグラフがそれぞれ非 LED 光照射下および LED 光照射下の結果を表している。非 LED 光照射下では、39 および 63 は試験した濃度範囲において、いずれの細胞に対しても細胞毒性を示さないことを見出した。これに対し、39 は 660 nm の光照射下において、B16F10 細胞および WI-38 細胞に対して非選択的に、39 の濃度依存的な光細胞毒性を発現することを明らかにした。一方、63 は WI-38 細胞に対して、660 nm の光照射下においても、光細胞毒性をほとんど発現しなかったのに対し、B16F10 細胞に対しては顕著な光細胞毒性を発現することを見出した。これらの結果より、63 が 660 nm の光照射下、 H_2O_2 を過剰発現するがん細胞 B16F10 に対して選択的かつ効果的な光細胞毒性を発現する低侵襲性の H_2O_2 応答型光感受性分子であることを明らかにした。

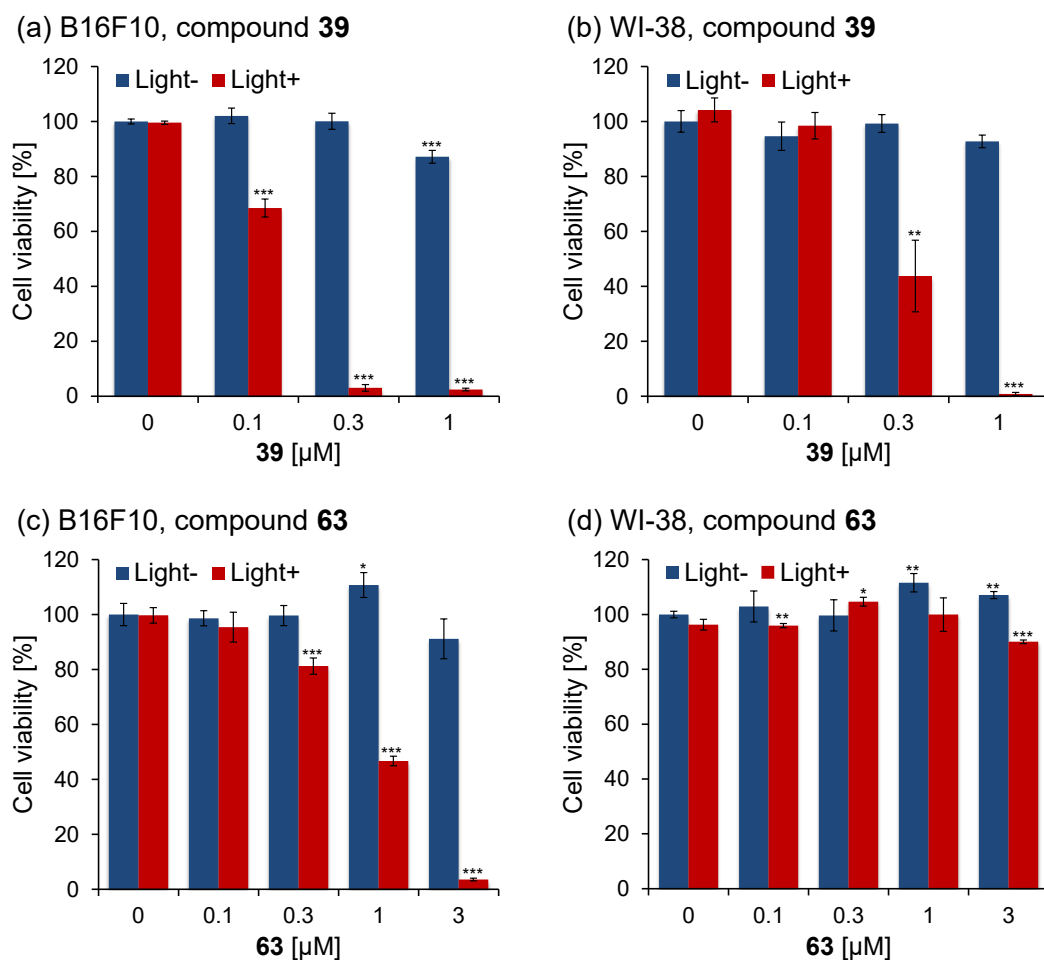


Figure 2.3.22 Photo-cytotoxic activity of **39** and **63** against B16F10 and WI-38 cells. (a, c) B16F10 and (b, d) WI-38 cells were seeded into 96-well plates (4.0×10^3 cells). After 24 h, the cells were treated with the indicated concentrations of (a, b) **39** and (c, d) **63**, and incubated for 3 h at 37 °C, followed by incubation with or without photo-irradiation by a LED (660 nm, 3 W, and 17 mW/cm²) placed 15 cm from the sample for 30 min. Samples were further incubated for 24 h at 37 °C, and then MTT reagent was added to each well and the cells were incubated for up to three additional hours. Absorbance at 540 nm was read using a plate reader. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.10 結論

第3章では、ヒポクレリンBを基本骨格としたH₂O₂応答型光感受性分子の創製について述べた。本論第2章で、ネオカルチノスタチン・クロモフォアの2-ナフトール部位が有する1,3-ジカルボニルエノール構造に着目したH₂O₂応答型光感受性分子の創製を達成したことから、本章では、1,3-ジカルボニルエノール構造に着目した本光感受性制御手法を、生体透過性の高い可視光で励起可能なヒポクレリンB (**39**)に適用することを検討した。はじめに、**39**が有する1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基にボロン酸エステルを連結した**63**をデザインおよび合成した。次に、**39**および**63**の吸収スペクトルを測定した結果、**63**の吸収スペクトルは、**39**と比較して短波長シ

フトし、光照射に用いた波長 660 nm における吸光度が顕著に減少することを見出した。次に、**39** および **63** のタンパク質光分解活性および一重項酸素生成量を評価した。その結果、660 nm の光照射下における **63** のタンパク質光分解活性および一重項酸素生成能は、**39** と比較して顕著に低下し、**63** の光感受性が OFF であることを見出した。**63** の光感受性が OFF である要因は、**63** の 660 nm における吸光度が、**39** と比較して大幅に低く、660 nm の光照射下における光励起が起こりにくいからであることが示唆された (Figure 2.3.23)。

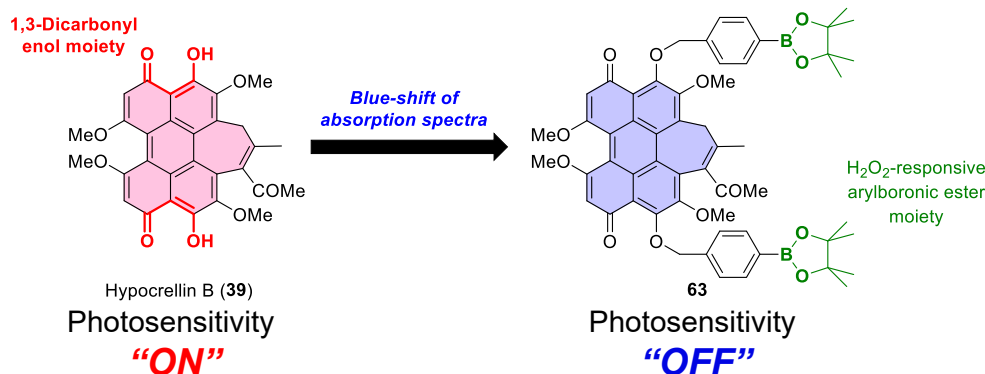


Figure 2.3.23 本論第 3 章の結論 (1)

次に、**63** の H₂O₂ に対する応答性および応答の選択性を評価した結果、**63** は H₂O₂ と選択的かつ効果的に反応して、光感受性が ON である **39** を放出することを見出した。さらに、**63** は H₂O₂ と反応することで、**39** の光感受性を回復することを明らかにした (Figure 2.3.24)。

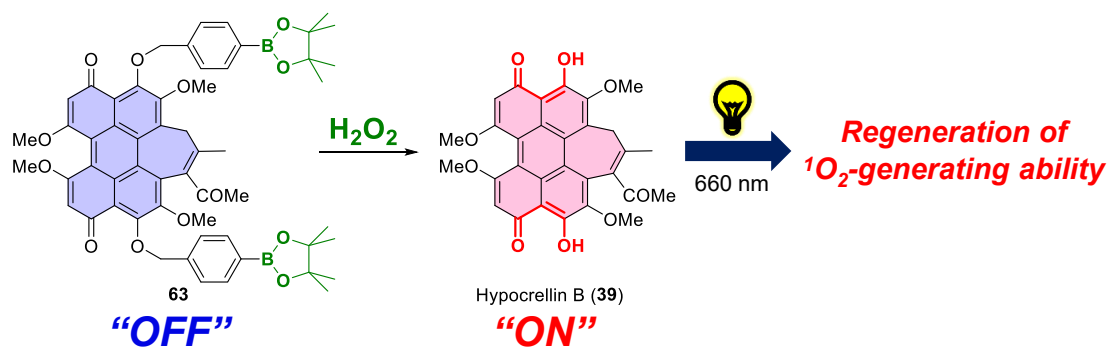


Figure 2.3.24 本論第 3 章の結論 (2)

最後に、H₂O₂ を過剰発現するマウスメラノーマ細胞 B16F10 および正常細胞 WI-38 に対する **39** および **63** の光細胞毒性を評価した。その結果、**39** は、660 nm の光照射下において、B16F10 細胞および WI-38 細胞に対して非選択的な光細胞毒性を示した。これに対して、**63** は、生体透過性の高い 660 nm の光照射下、B16F10 細胞に対し選択的かつ顕著な光細胞毒性を発現することを見出した。以上の結果より、**63** が生体透過性の高い可視光で励起可能な低侵襲性の H₂O₂ 応答型光感受性分子であることを明らかにした (Figure 2.3.25)。

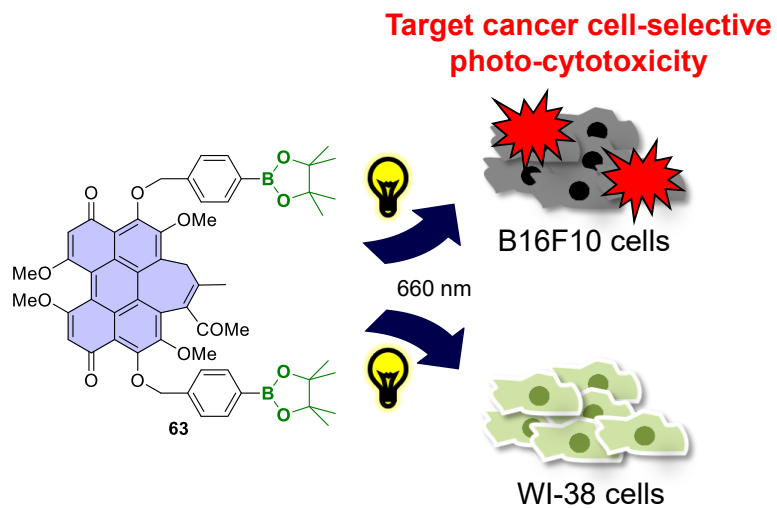


Figure 2.3.25 本論第 3 章の結論 (3)

結論

本研究では、次世代型光線力学療法を指向した刺激応答型光感受性分子の創製を行った。はじめに、ネオカルチノスタチン・クロモフォアの 2-ナフトール部位におけるタンパク質光分解活性の発見と構造活性相関研究により、光感受性の OFF/ON を制御可能な新たな光感受性分子を発見した。次に、本知見を基に、ネオカルチノスタチン・クロモフォアの 2-ナフトール部位を基本骨格とした H₂O₂ 応答型光感受性分子の創製を行った。最後に、本知見を他の光感受性分子に応用し、ヒポクレリン B を基本骨格とした H₂O₂ 応答型光感受性分子の創製を達成した。

ネオカルチノスタチン・クロモフォアの 2-ナフトール部位におけるタンパク質光分解活性の発見と構造活性相関研究

ネオカルチノスタチン・クロモフォア (NCS-chr) (17) の 2-ナフトール部位における光感受性の発現に重要な構造を明らかにするため、まず、NCS-chr (17) の 2-ナフトール部位 57 のタンパク質光分解活性を評価した。その結果、57 が人体に無害な 365 nm の光照射下、タンパク質を光分解することを初めて見出した。次に、57 の C-1 位および C-2 位の置換基が異なる 5 種類の類縁体を用いた光感受性に関する構造活性相関研究を行った。その結果、C-1 位にメチルエステルあるいはカルボキシ基、および C-2 位に水酸基を有する構造、すなわち 2-ナフトール部位における 1,3-ジカルボニルエノール構造が光感受性の発現に重要であり、その水酸基をメチル化することで光感受性を OFF に制御できることを見出した (Figure 2.4.1)。

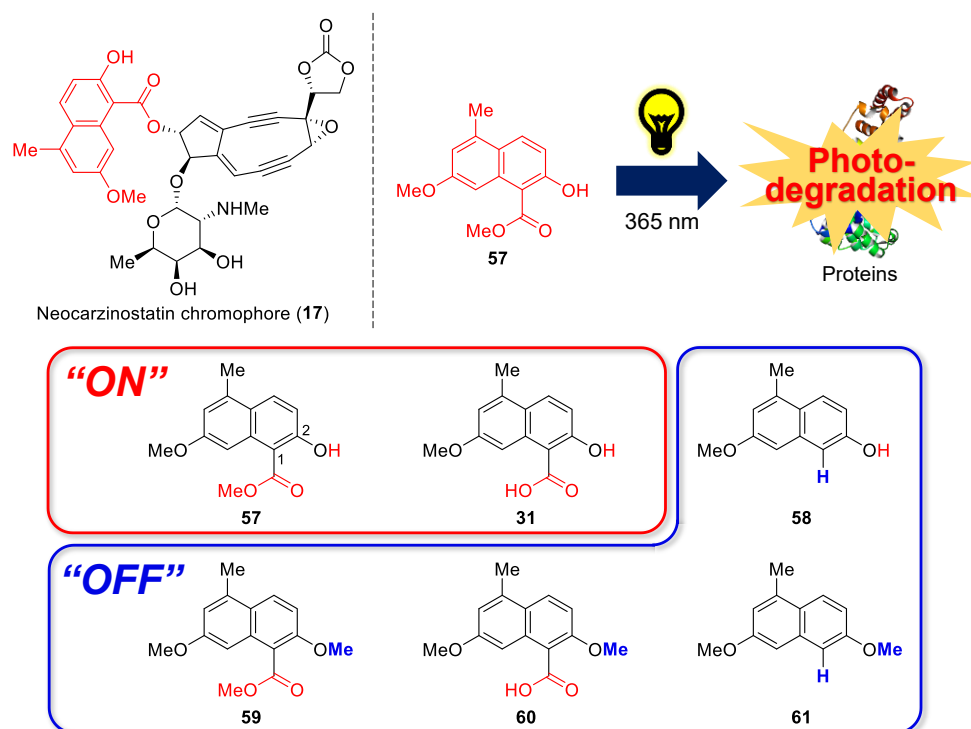


Figure 2.4.1 本論第 1 章の結論

ネオカルチノスタチン・クロモフォアの2-ナフトール部位を基本骨格とした H₂O₂ 応答型光感受性分子の創製

H₂O₂ 応答型光感受性分子への応用を指向し、光感受性を制御可能であることを見出した 57 の 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基に、H₂O₂ 応答性のボロン酸エステルを連結した 62 をデザインおよび合成した。次に、365 nm の照射下における 62 の光感受性を評価した結果、62 の光感受性が OFF であること、および 62 が H₂O₂ と反応して、光感受性が ON である 57 を放出することを明らかにした。さらに、62 の正常細胞 WI-38 および H₂O₂ を過剰発現するがん細胞 B16F10 に対する光細胞毒性を評価した。その結果、62 が B16F10 細胞に対して選択的な光細胞毒性を発現する H₂O₂ 応答型光感受性分子であることを明らかにした (Figure 2.4.2)。

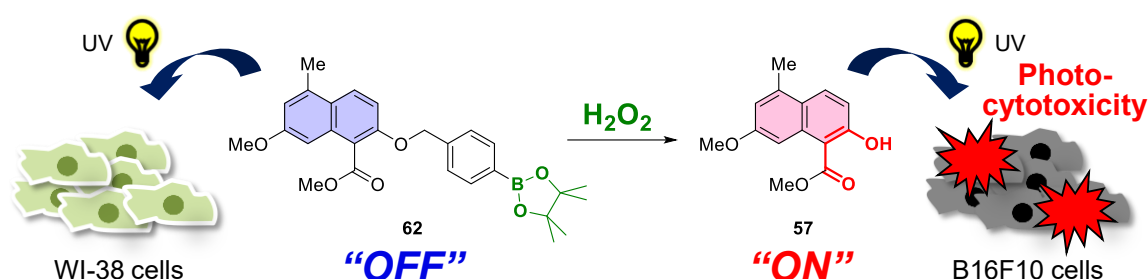


Figure 2.4.2 本論第2章の結論

ヒポクレリン B を基本骨格とした H₂O₂ 応答型光感受性分子の創製

1,3-ジカルボニルエノール構造に着目した本光感受性制御手法の一般性を検証するため、新たな光感受性分子として、生体透過性の高い長波長の可視光で励起可能であり、かつ 1,3-ジカルボニルエノール構造を有する光感受性分子である天然物ヒポクレリン B (39) に着目し、39 が有する 1,3-ジカルボニルエノール構造の水酸基にボロン酸エステルを連結した H₂O₂ 応答型光感受性分子 63 をデザインおよび合成した。次に、63 の 660 nm の光照射下における光感受性を評価した結果、63 の光感受性が OFF であること、および 63 が H₂O₂ と反応して、光感受性が ON である 39 を放出することを明らかにした。さらに、63 が生体透過性の高い 660 nm の光照射下で B16F10 細胞に対して選択的かつ顕著な光細胞毒性を発現することを見出し、63 が低侵襲性の H₂O₂ 応答型光感受性分子であることを明らかにした (Figure 2.4.3)。

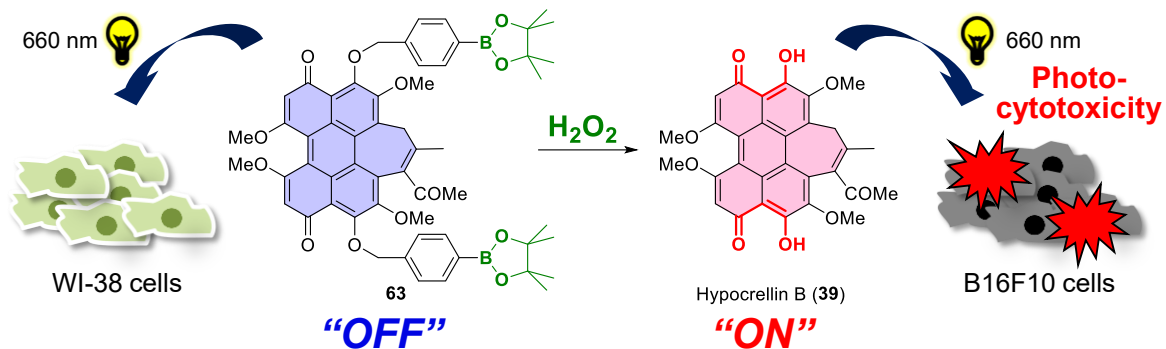


Figure 2.4.3 本論第3章の結論

以上、本研究で得られた知見は、刺激応答型光感受性分子のデザイン戦略や本手法による医薬品開発に大きく貢献することが期待される。

実験の部

Table of Contents

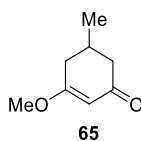
General methods for chemical synthesis	p. 94
Synthetic procedure and characterization data of 31 , 57-61 and 65-68 in chapter 1	p. 94
NMR spectral charts of 31 , 57-61 and 65-68 in chapter 1	p. 99
Synthetic procedure and characterization data of 62 in chapter 2	p. 106
NMR spectral charts of 62 in chapter 2	p. 107
Synthetic procedure and characterization data of 63 in chapter 3	p. 108
NMR spectral charts of 63 in chapter 3	p. 109
Materials for biological assay	p. 112
Experimental methods for biological assay in chapter 1	p. 112
Experimental methods for biological assay in chapter 2	p. 113
Experimental methods for biological assay in chapter 3	p. 114

General methods for chemical synthesis

NMR spectra were recorded on a JEOL ECA-500 (500 MHz for ^1H , 125 MHz for ^{13}C) spectrometer or a JEOL ECS-400 (400 MHz for ^1H) spectrometer. ^1H -NMR data are reported as follows; chemical shift in parts per million (ppm) downfield or upfield from tetramethylsilane (δ 0.00) or CDCl_3 (δ 7.26), integration, multiplicity (br = broad, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, and m = multiplet) and coupling constants (Hz). ^{13}C -NMR chemical shifts are reported in ppm downfield or upfield from CDCl_3 (δ 77.0). ESI-TOF Mass spectra were measured on a Waters LCT premier XE. Melting points were determined on a micro hot-stage (Yanako MP-S3) and were uncorrected. Silica gel TLC, preparative TLC and column chromatography separations were performed using Merck TLC 60F-254 (0.25 mm), Merck PLC 60F-254 (0.5 mm) and Silica Gel 60 N (spherical, neutral, 63-210 μm or 40-50 μm) (Kanto Chemical Co., Inc.), respectively. UV-Vis spectra were recorded on a JASCO V-550 spectrometer. Air- and/or moisture-sensitive reactions were carried out under an argon atmosphere using oven-dried glassware.

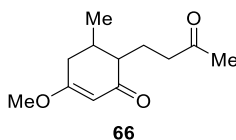
Synthetic procedure and characterization data of 31, 57-61 and 65-68 in chapter 1

Compound 65



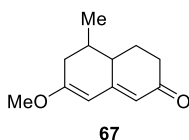
To a solution of **64** (4.75 g, 37.7 mmol) in MeOH (71.2 mL) were added trimethyl orthoformate (8.24 mL, 75.3 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (215 mg, 1.13 mmol) at room temperature, and the resultant solution was stirred for 22 h at room temperature. After concentrated to 20 mL in *vacuo*, the reaction mixture was diluted with water (40 mL) and then extracted with CH_2Cl_2 (40 mL \times 6). The extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to flash silica gel column chromatography (1/1 *n*-hexane/EtOAc) to give **65** (3.44 g, 24.5 mmol, 65% yield). Pale yellow solid; R_f 0.46 (25/25/1 *n*-hexane/EtOAc/AcOH); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.36 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-2), 3.69 (3H, s, OMe-3), 2.43 (1H, ddd, J = 16.4, 4.0 and 1.6 Hz, H-4 or 6), 2.42 (1H, ddd, J = 16.0, 4.0 and 1.6 Hz, H-4 or 6), 2.29-2.18 (1H, m), 2.15 (1H, ddd, J = 16.8, 10.0 and 1.2 Hz, H-4 or 6), 2.04 (1H, dd, J = 16.8 and 11.6 Hz, H-4 or 6), 1.08 (3H, d, J = 6.4 Hz, Me-5); HRMS (ESI-TOF) m/z 141.0920 (141.0916 calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_2$, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

Compound 66



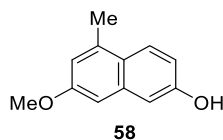
To a solution of LDA (1.0 M in THF/*n*-hexane, 30.7 mL, 30.7 mmol) in THF (180 mL) was added dropwise a solution of **65** (3.59 g, 25.6 mmol) in THF (16.5 mL) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. After being stirred for 1 h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, methylvinylketone (2.50 mL, 30.7 mmol) was added to the reaction mixture at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the resultant solution was stirred for 1 h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. After the reaction was quenched with water (200 mL) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, the resultant mixture was extracted with Et₂O (150 mL \times 2) and then with EtOAc (150 mL \times 2). The extracts were washed with sat. NaHCO₃ aq. (300 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to flash silica gel column chromatography (2/1 *n*-hexane/EtOAc) to give **66** (4.02 g, 19.1 mmol, 75% yield, d.r. = 76/24). Pale yellow syrup; *R*_f 0.42 (25/25/1 *n*-hexane/EtOAc/AcOH); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.30 (0.76H, s, H-2), 5.26 (0.24H, s, H-2), 3.68 (2.28H, s, OMe-3), 3.68 (0.72H, s, OMe-3), 2.66-2.30 (3H, m), 2.28-2.17 (1H, m), 2.15 (2.28H, s, COMe), 2.14 (0.72H, s, COMe), 2.11-1.97 (2H, m), 1.93-1.68 (2H, m), 1.09 (2.28H, d, *J* = 6.5 Hz, Me-5), 1.01 (0.72H, d, *J* = 7.0 Hz, Me-5); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 211.1335 (211.1334 calcd. for C₁₂H₁₉O₃, [M+H]⁺).

Compound **67**



To a solution of **66** (4.20 g, 20.0 mmol) in MeOH (30.0 mL) were added 28% NaOMe in MeOH (12.2 mL, 50.0 mmol) and MS 4Å (4.20 g, 100 wt%) at room temperature. After the reaction mixture was stirred under reflux conditions for 4 h, the precipitated solid was removed by suction filtration. The filtrate was diluted with water (50 mL), neutralized with AcOH (4 mL), extracted with CH₂Cl₂ (50 mL \times 4), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to flash silica gel column chromatography (2/1 *n*-hexane/EtOAc) to give **67** (3.19 g, 16.6 mmol, 83% yield, d.r. = 87/13). Orange solid; *R*_f 0.53 (25/25/1 *n*-hexane/EtOAc/AcOH); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.78 (0.13H, s), 5.74 (0.87H, s), 5.41 (1H, d, *J* = 0.8 Hz), 3.70 (0.39H, s, OMe-7), 3.70 (2.61H, s, OMe-7), 2.73-2.48 (1H, m), 2.43-2.26 (3H, m), 2.20-1.83 (2H, m), 1.74-1.67 (1H, m), 1.60-1.49 (1H, m), 1.09 (2.61H, d, *J* = 6.8 Hz, Me-5), 0.90 (0.39H, d, *J* = 6.8 Hz, Me-5); HRMS (ESI-TOF) *m/z* 193.1233 (193.1229 calcd. for C₁₂H₁₇O₂, [M+H]⁺).

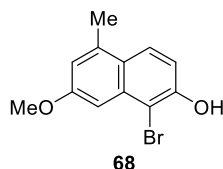
Compound **58**



To a solution of **67** (2.91 g, 15.1 mmol) in *p*-cymene (58.3 mL) was added 10% Pd/C (2.92 g, 100 wt%) at room temperature. After being stirred under reflux conditions for 3 h, the reaction mixture was filtered through Celite. The filtrate was diluted with Et₂O (40 mL), and extracted with 0.5 N NaOH (20 mL \times 6). After the aqueous layers were acidified to pH 1 with conc. HCl at 0 $^{\circ}\text{C}$, the resultant mixture was extracted with CH₂Cl₂ (40 mL \times 4), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to flash silica gel column chromatography (4/1 *n*-hexane/EtOAc) to give **58** (1.24 g,

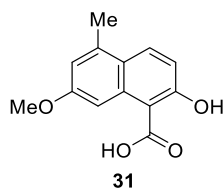
6.59 mmol, 44% yield). White solid; R_f 0.48 (2/1 *n*-hexane/EtOAc); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-4), 7.06 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-1), 6.96 (1H, dd, $J = 8.9$ and 2.5 Hz, H-3), 6.84 (2H, s, H-6, 8), 4.98 (1H, br-s, OH-2), 3.88 (3H, s, OMe-7), 2.60 (3H, s, Me-5); HRMS (ESI-TOF) m/z 189.0910 (189.0916 calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_2$, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

Compound 68



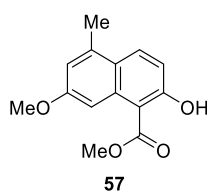
To a solution of **58** (345 mg, 1.83 mmol) in CH_2Cl_2 (10.3 mL) and MeOH (6.90 mL) was added a solution of Bu_4NBr_3 (1.11 g, 2.30 mmol) in CH_2Cl_2 (2.50 mL) and MeOH (1.70 mL) at 0°C . After the reaction mixture was stirred for 6 h at 0°C , the reaction was quenched with water (12 mL). The resultant mixture was extracted with CH_2Cl_2 (8 mL \times 3), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to flash silica gel column chromatography (100/1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) to give **68** (352 mg, 1.32 mmol, 72% yield). White solid; R_f 0.74 (100/1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4), 7.21 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 7.13 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3), 6.90 (1H, dd, $J = 2.4$ and 1.2 Hz, H-6), 5.86 (1H, s, OH-2), 3.95 (3H, s, OMe-7), 2.63 (3H, s, Me-5); HRMS (ESI-TOF) m/z 267.0024 (267.0021 calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{BrO}_2$, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

Compound 31



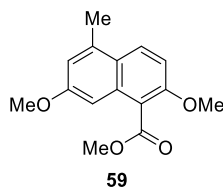
To a solution of **68** (327 mg, 1.22 mmol) in THF (13.1 mL) was slowly added *n*-BuLi (1.6 M in *n*-hexane, 2.29 mL, 3.66 mmol) at -50°C . After being stirred for 40 min at -30°C , CO_2 gas was bubbled through the reaction mixture for 15 min. The resultant mixture was diluted with CH_2Cl_2 (10 mL), and extracted with sat. NaHCO_3 aq. (10 mL \times 3). After the aqueous layers were acidified to pH 1 with conc. HCl at 0°C , the resultant mixture was extracted with CHCl_3 (50 mL \times 4), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to flash silica gel column chromatography (20/1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) to give **31** (273 mg, 1.18 mmol, 96% yield). White solid; R_f 0.40 (4/1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (1H, s, H-8), 8.10 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-4), 7.05 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3), 6.93 (1H, s, H-6), 3.95 (3H, s, OMe-7), 2.65 (3H, s, Me-5); HRMS (ESI-TOF) m/z 233.0819 (233.0814 calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4$, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

Compound 57



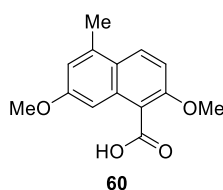
To a solution of **31** (231 mg, 0.995 mmol) in MeOH (4.63 mL) was added TMSCHN₂ (2.0 M in Et₂O, 2.49 mL, 4.98 mmol) at 0 °C. After being stirred for 1.5 h at room temperature, the reaction was quenched with AcOH (3 mL). The resultant mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to silica gel column chromatography (8/1 *n*-hexane/EtOAc) to give **57** (228 mg, 0.926 mmol, 93% yield). White solid; *R_f* 0.57 (4/1 *n*-hexane/EtOAc); m.p. 111-112 °C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 12.13 (1H, s, OH-2), 8.08 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-8), 8.03 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.04 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3), 6.90 (1H, dd, *J* = 2.5 and 1.0 Hz, H-6), 4.10 (3H, s, COOMe-1), 3.92 (3H, s, OMe-7), 2.63 (3H, s, Me-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.7, 164.2, 159.2, 136.7, 133.9, 132.2, 122.9, 115.8, 104.4, 104.0, 54.8, 52.2, 19.9; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 247.0973 (247.0970 calcd. for C₁₄H₁₅O₄, [M+H]⁺).

Compound 59



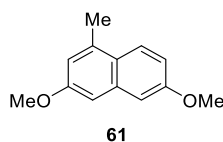
To a solution of **57** (40.5 mg, 0.164 mmol) in toluene (1.01 mL) and MeOH (1.01 mL) were added TMSCHN₂ (2.0 M in Et₂O, 0.576 mL, 1.15 mmol) and DIPEA (39.2 μL, 0.230 mmol) at 0 °C. After being stirred for 21 h at room temperature, the reaction was quenched with AcOH (0.5 mL). The resultant mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to silica gel column chromatography (8/1 *n*-hexane/EtOAc) to give **59** (37.6 mg, 0.144 mmol, 88% yield). White solid; *R_f* 0.43 (4/1 *n*-hexane/EtOAc); m.p. 151-152 °C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.13 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3), 6.88 (1H, dd, *J* = 2.5 and 1.0 Hz, H-6), 6.84 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-8), 4.03 (3H, s, COOMe-1), 3.95 (3H, s, OMe-2), 3.87 (3H, s, OMe-7), 2.62 (3H, s, Me-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 169.0, 158.6, 154.8, 136.4, 132.7, 127.5, 123.5, 117.7, 116.9, 109.6, 100.1, 56.4, 54.9, 52.3, 19.4; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 261.1126 (261.1127 calcd. for C₁₅H₁₇O₄, [M+H]⁺).

Compound 60



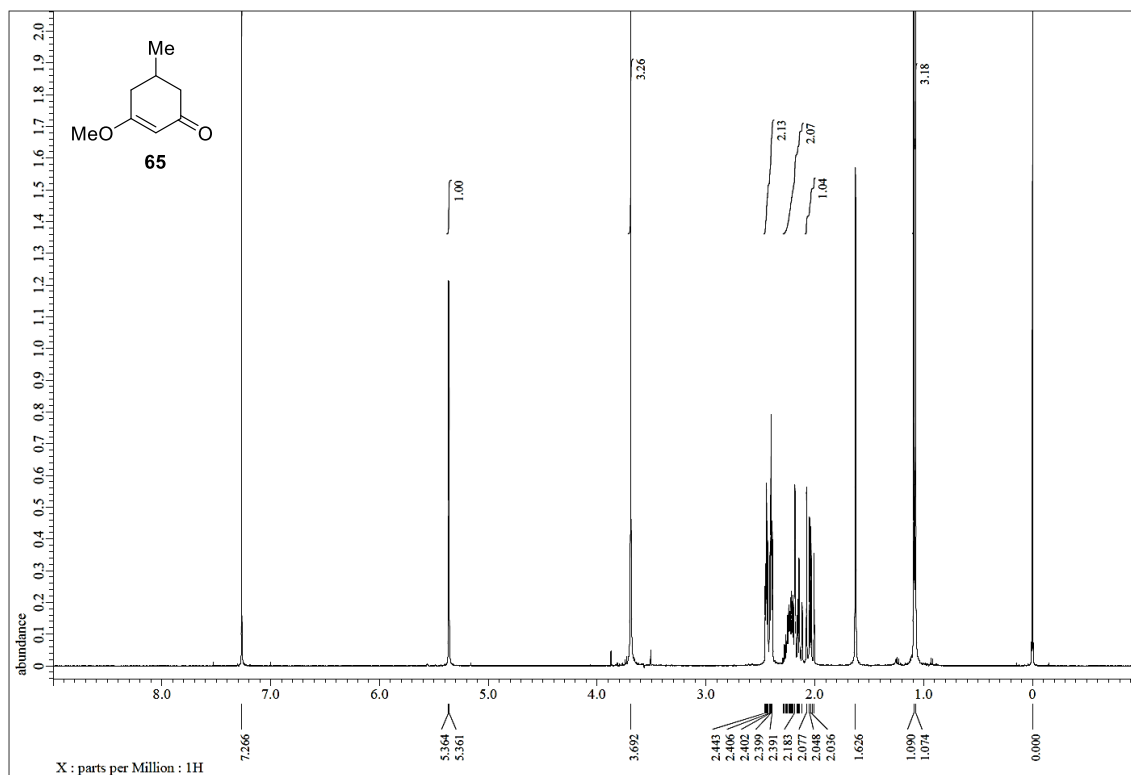
To a solution of **59** (31.3 mg, 0.120 mmol) in MeOH (0.939 mL) and H₂O (0.313 mL) was added portionwise NaOH (361 mg, 9.03 mmol) at 0 °C. After being stirred for 13 h at 80 °C, the reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ (3 mL), and extracted with sat. NaHCO₃ aq. (3 mL×3). After the aqueous layers were acidified to pH 1 with conc. HCl at 0 °C, the resultant mixture was extracted with CHCl₃ (10 mL×3), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated in *vacuo* to give **60** (29.2 mg, 0.119 mmol, 99% yield). White solid; *R_f* 0.31 (10/1 CHCl₃/MeOH); m.p. 144-145 °C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.80 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 7.16 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3), 6.93 (1H, dd, *J* = 2.5 and 1.0 Hz, H-6), 4.08 (3H, s, OMe-2), 3.91 (3H, s, OMe-7), 2.63 (3H, s, Me-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.1, 159.1, 156.2, 136.4, 133.7, 129.2, 123.9, 118.1, 114.2, 109.3, 101.2, 56.9, 55.1, 19.6; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 247.0958 (247.0970 calcd. for C₁₄H₁₅O₄, [M+H]⁺).

Compound **61**

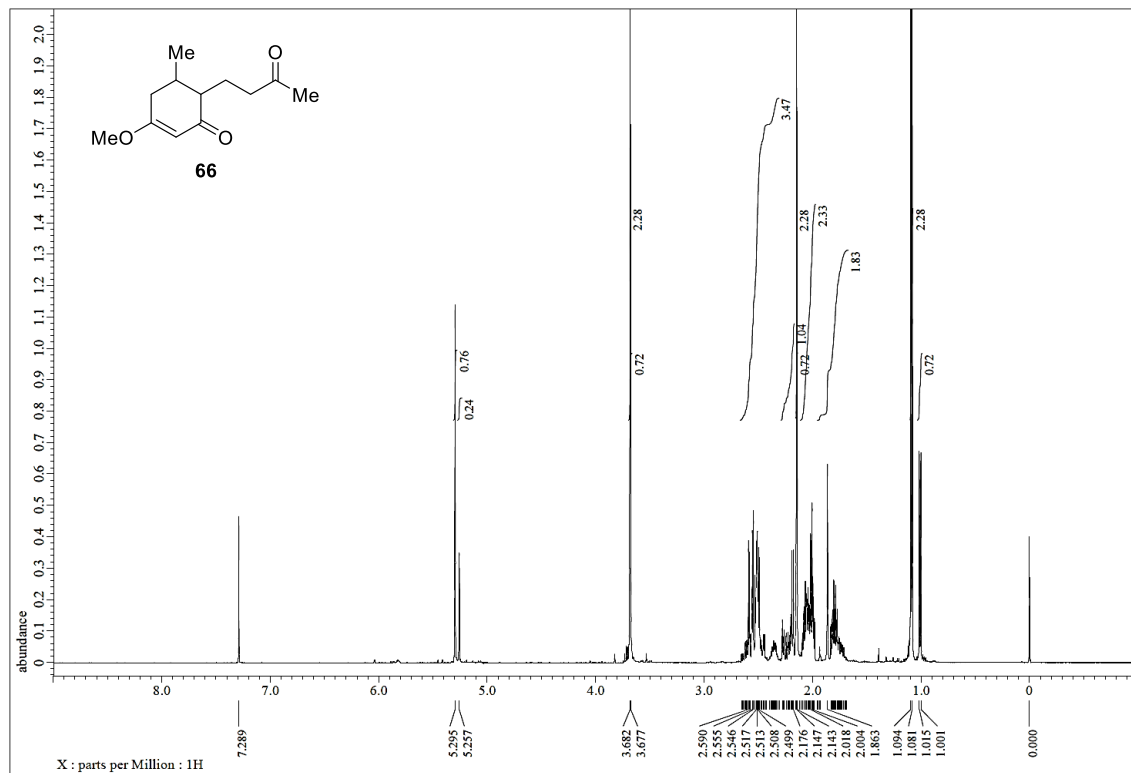


To a solution of **58** (39.1 mg, 0.208 mmol) in MeOH (1.00 mL) were added TMSCHN₂ (2.0 M in Et₂O, 0.727 mL, 1.45 mmol) and DIPEA (49.5 μL, 0.291 mmol) at 0 °C. After being stirred for 21 h at room temperature, the reaction was quenched with AcOH (1 mL). The resultant mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to silica gel column chromatography (8/1 *n*-hexane/EtOAc) to give **61** (38.6 mg, 0.191 mmol, 92% yield). White solid; *R_f* 0.66 (4/1 *n*-hexane/EtOAc); m.p. 107-108 °C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.07 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-1), 7.02 (1H, dd, *J* = 9.0 and 3.0 Hz, H-3), 6.92 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-8), 6.85 (1H, dd, *J* = 2.5 and 1.0 Hz, H-6), 3.91 (3H, s, OMe-2), 3.89 (3H, s, OMe-7), 2.61 (3H, s, Me-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 157.9, 157.8, 136.3, 136.1, 125.5, 123.6, 116.9, 115.4, 106.0, 103.5, 55.2, 55.1, 19.3; HRMS (ESI-TOF) *m/z* 203.1065 (203.1072 calcd. for C₁₃H₁₅O₂, [M+H]⁺).

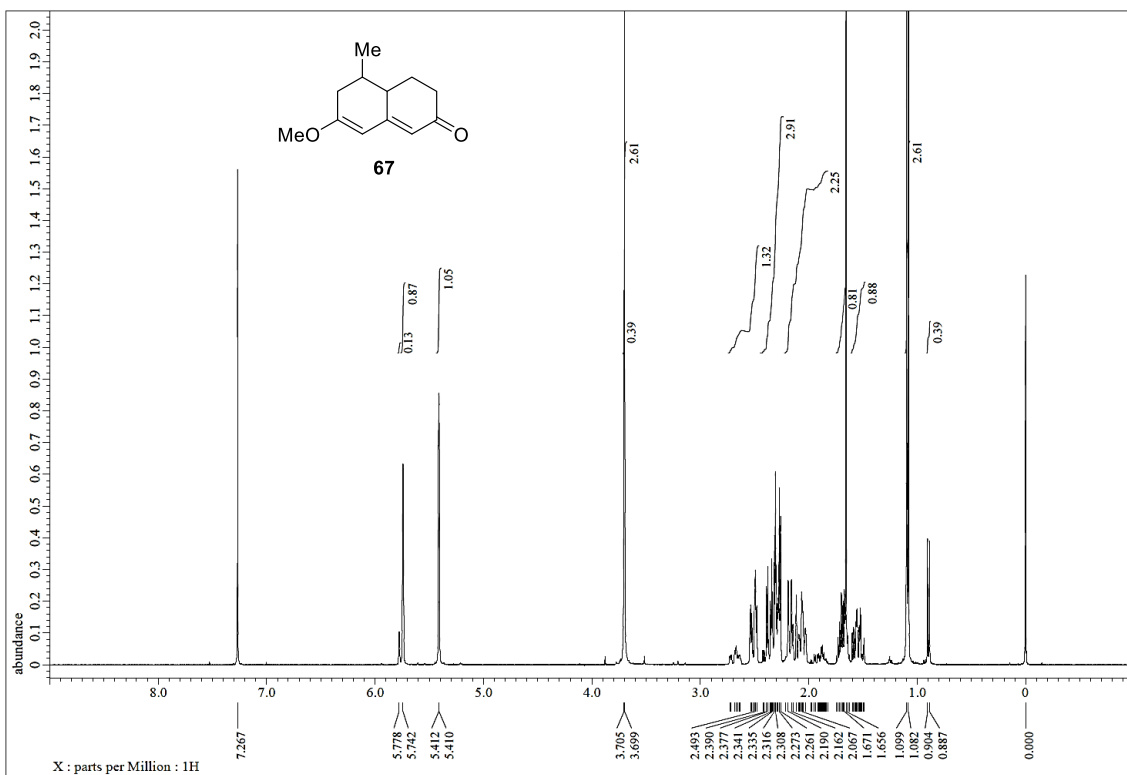
NMR spectral charts of 31, 57-61 and 65-68 in chapter 1



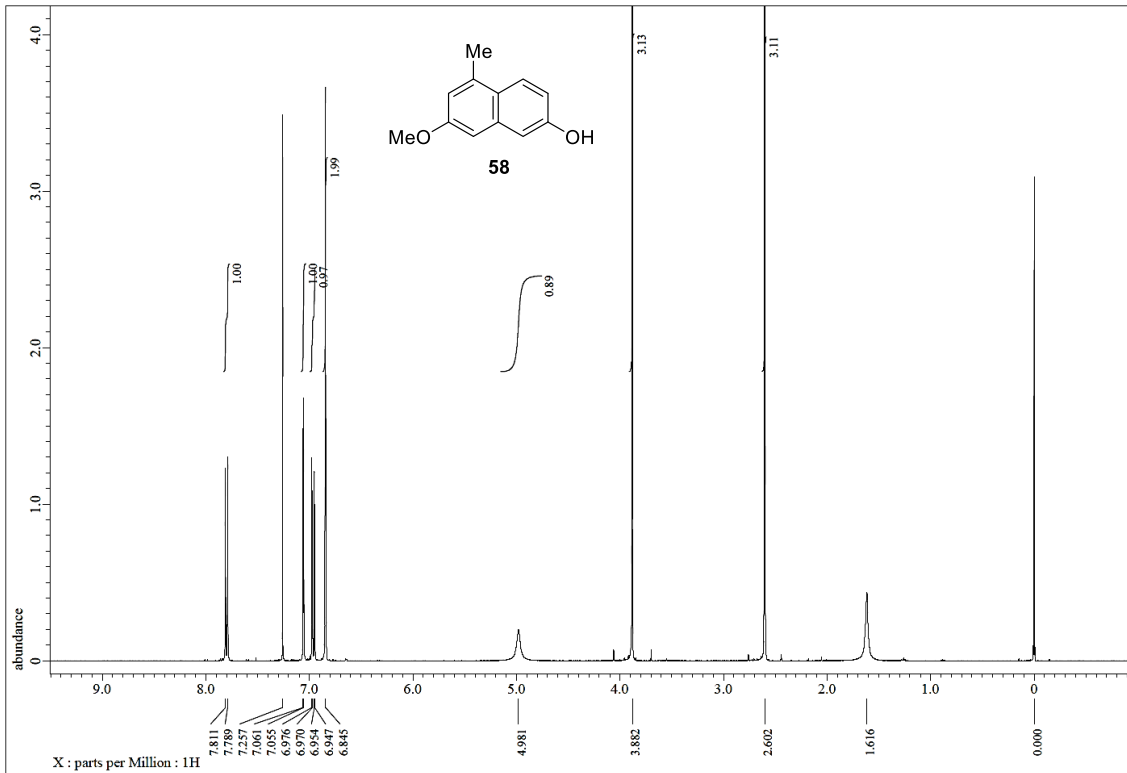
¹H-NMR spectrum of **65**



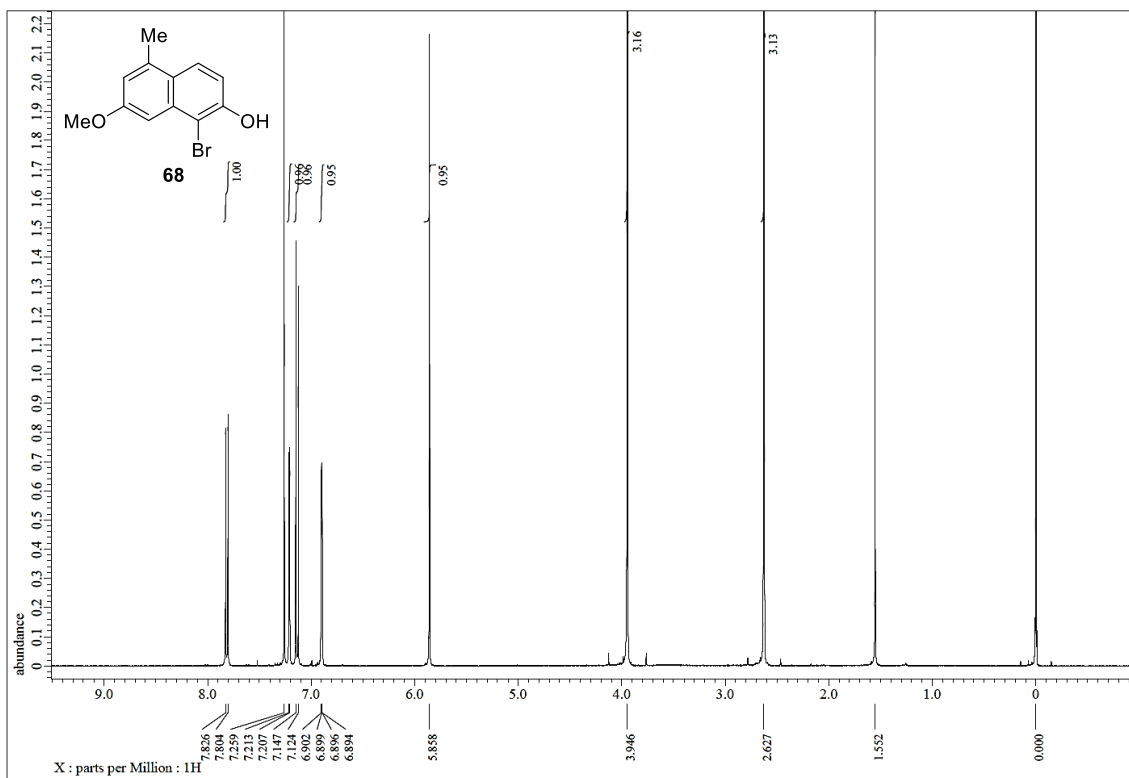
¹H-NMR spectrum of **66**



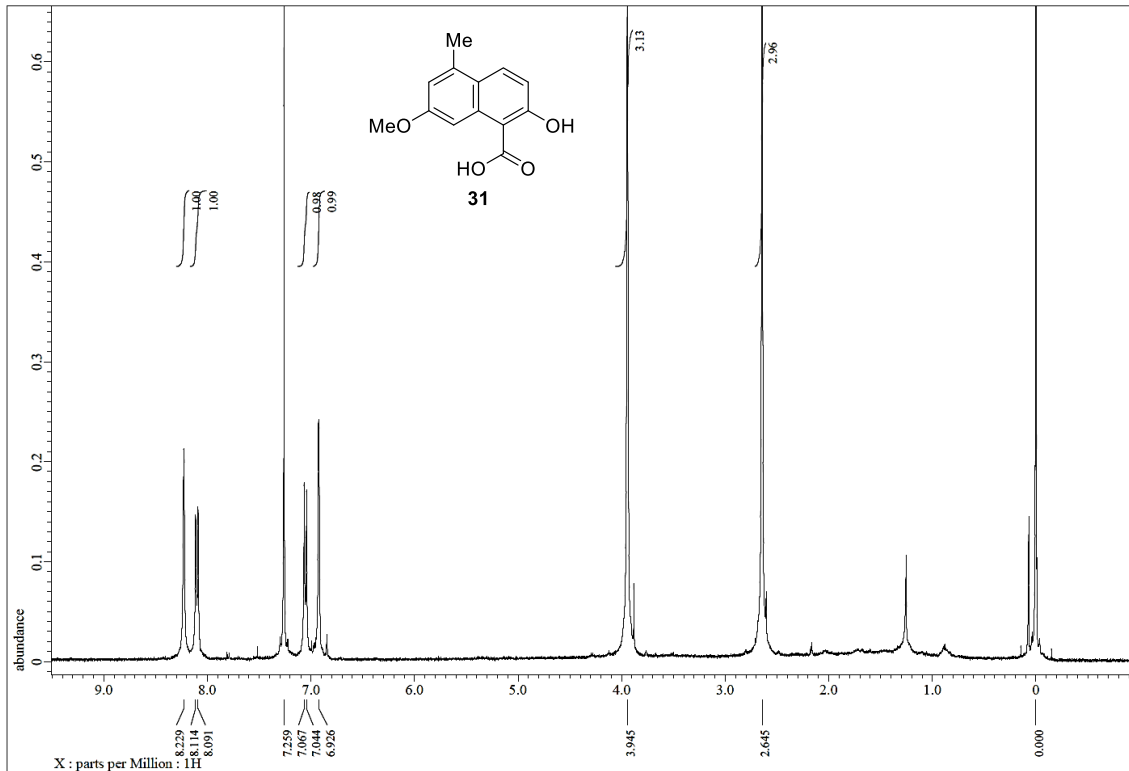
¹H-NMR spectrum of **67**



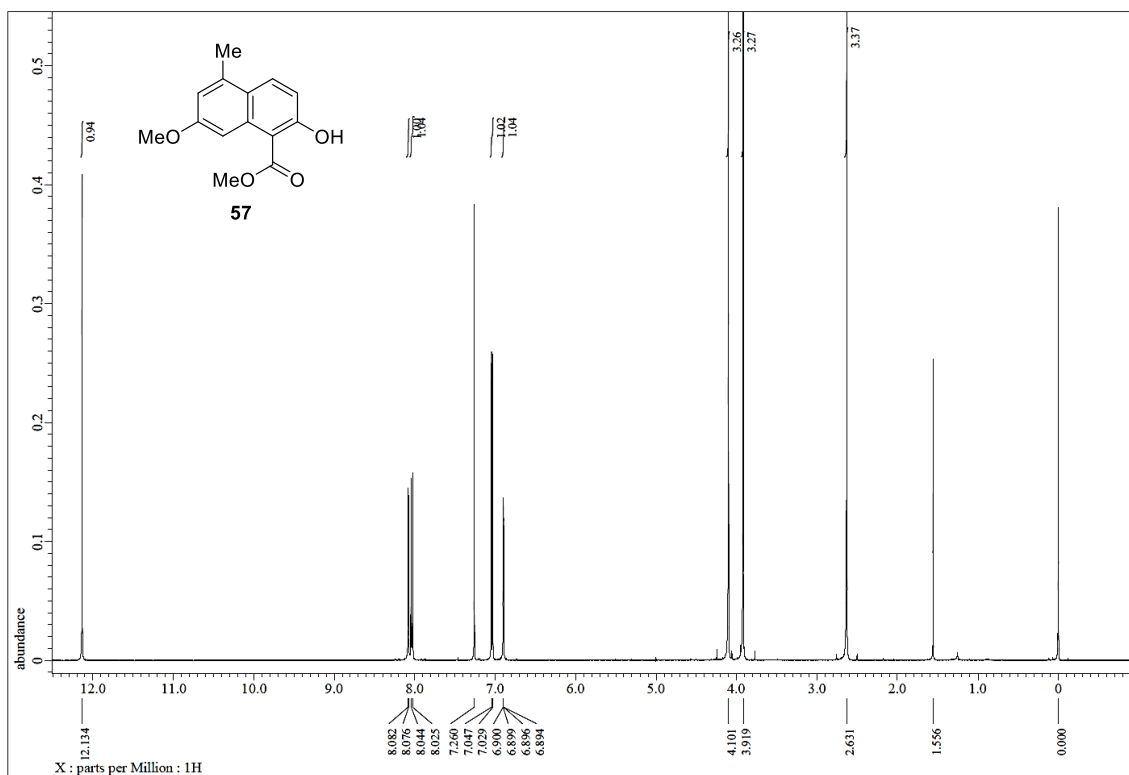
¹H-NMR spectrum of **58**



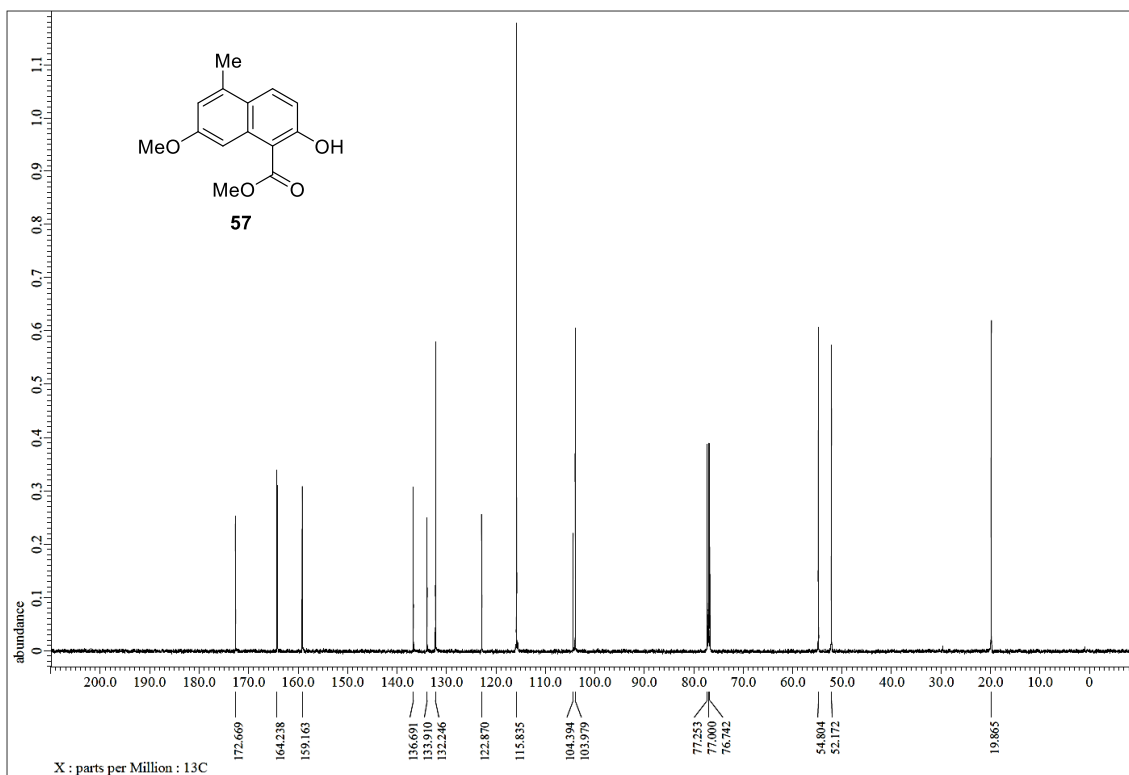
¹H-NMR spectrum of **68**



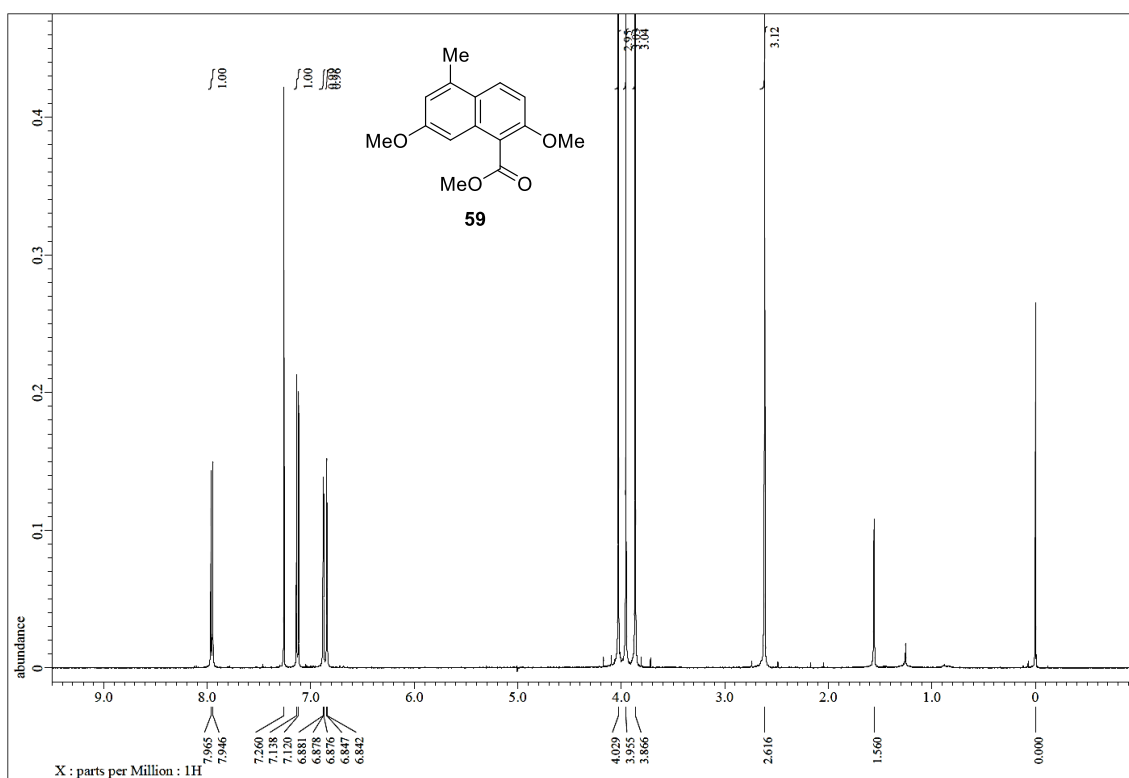
¹H-NMR spectrum of **31**



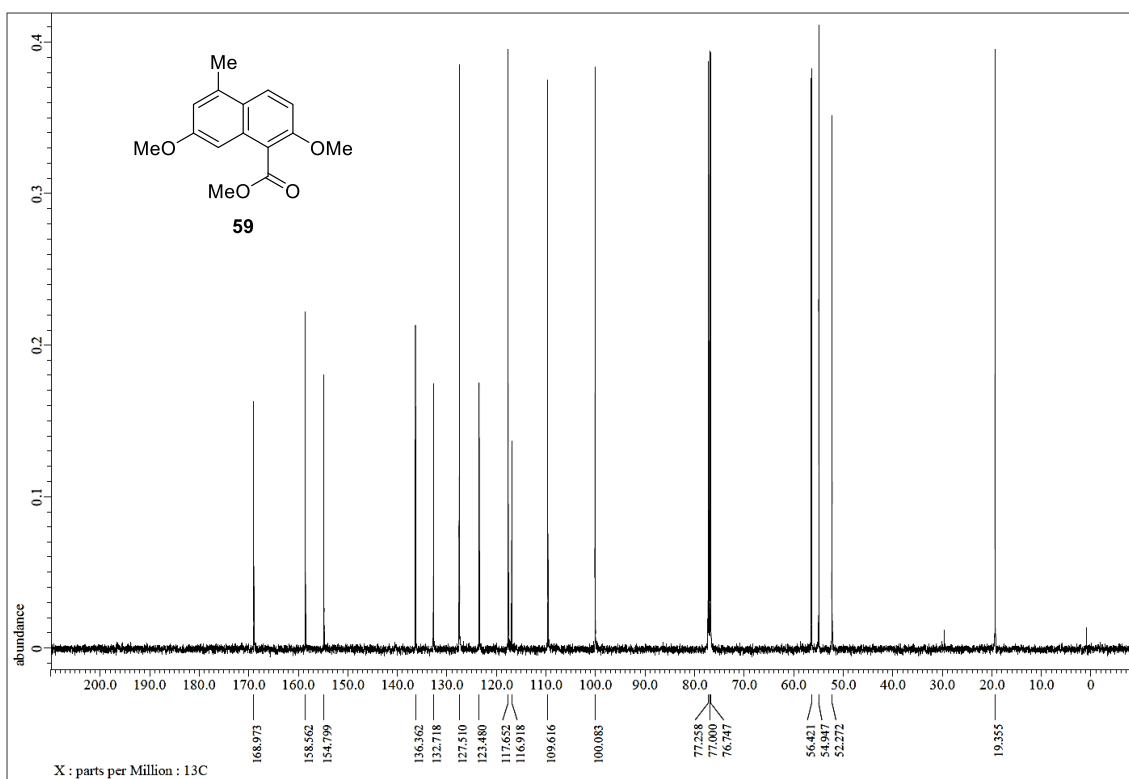
¹H-NMR spectrum of **57**



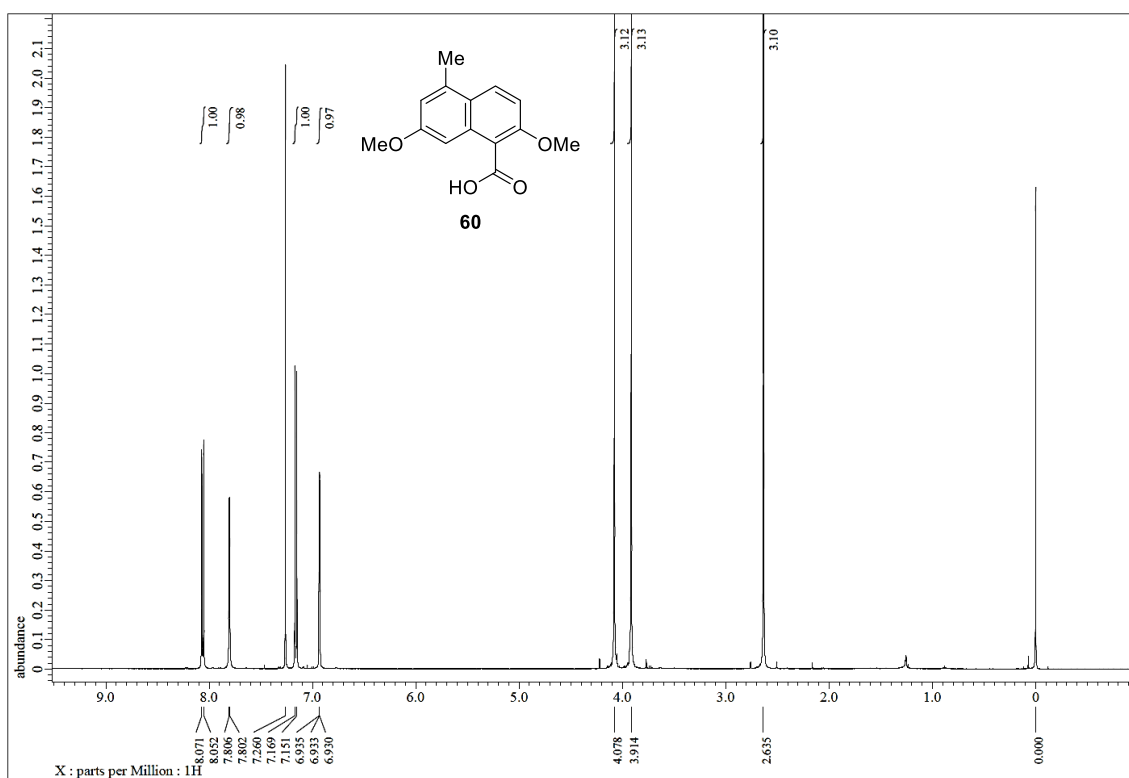
¹³C-NMR spectrum of **57**



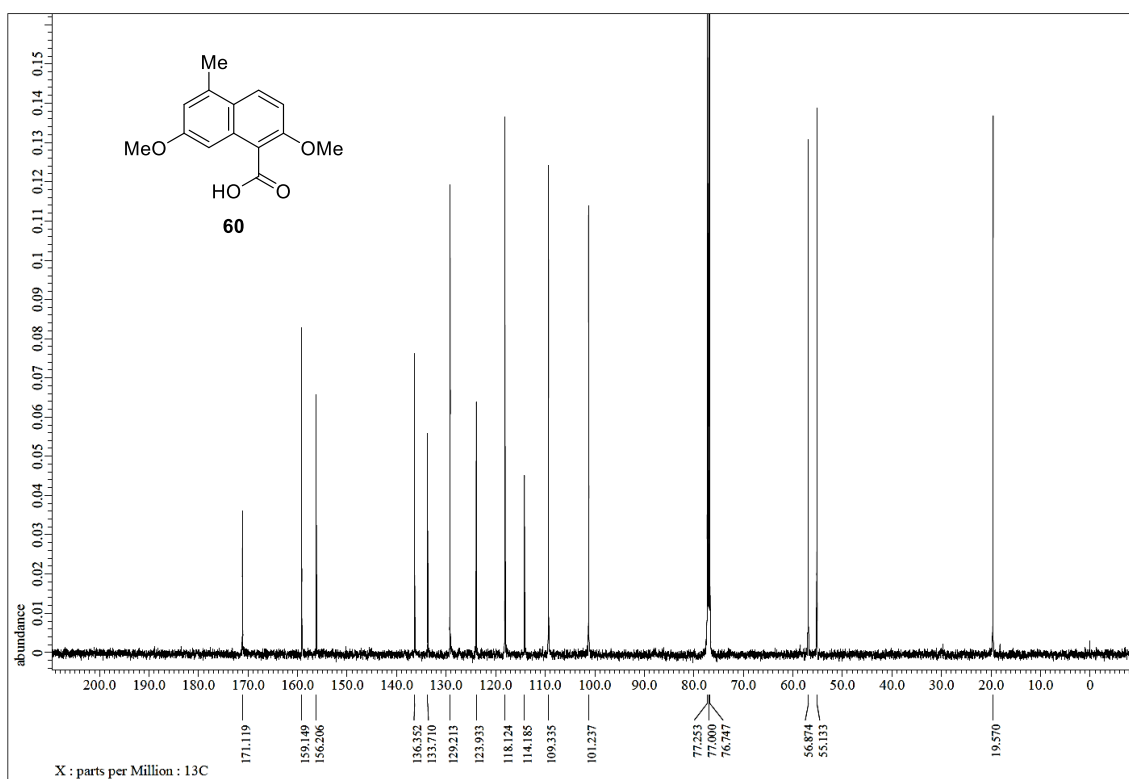
¹H-NMR spectrum of **59**



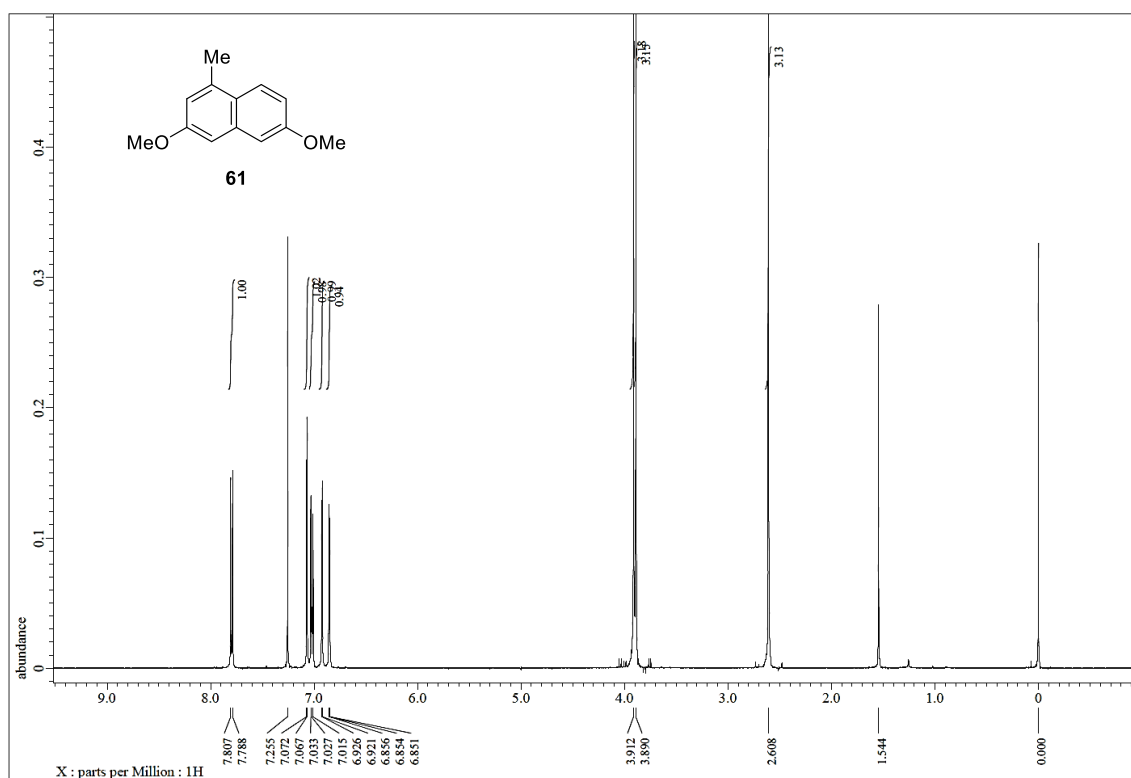
¹³C-NMR spectrum of **59**



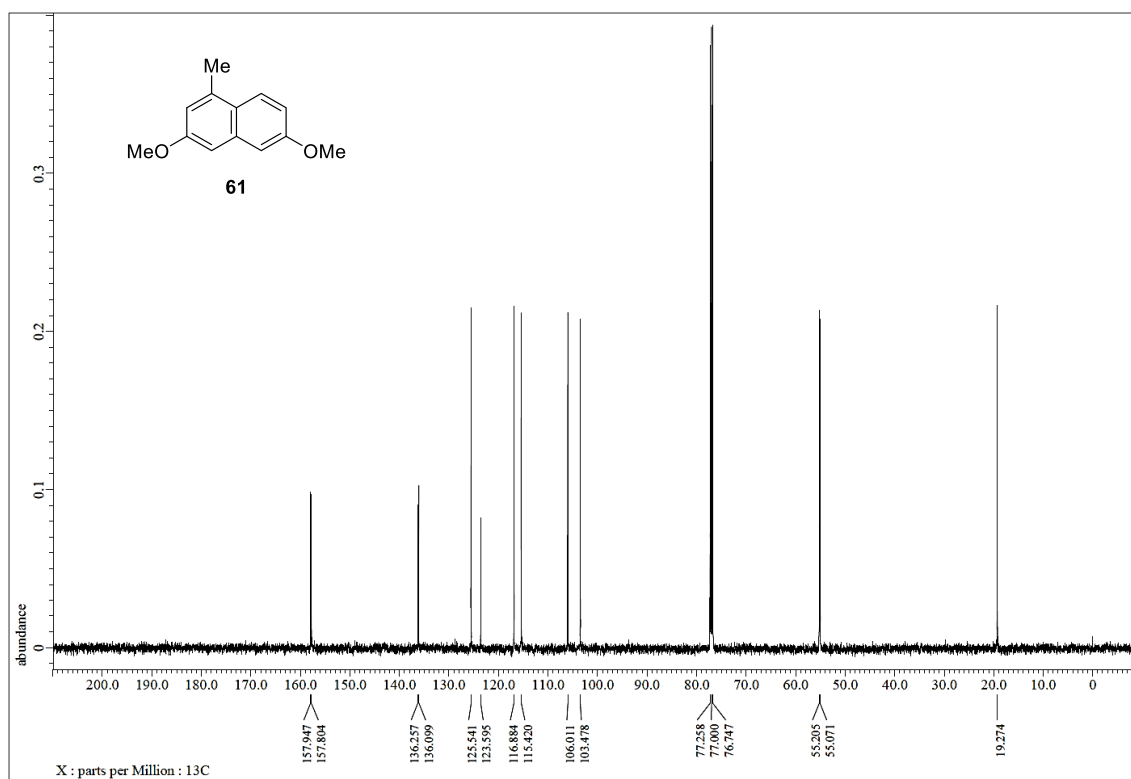
¹H-NMR spectrum of **60**



¹³C-NMR spectrum of **60**

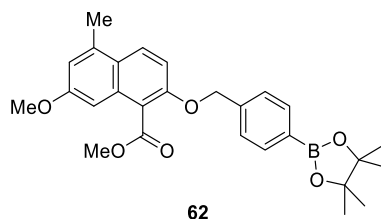


¹H-NMR spectrum of **61**



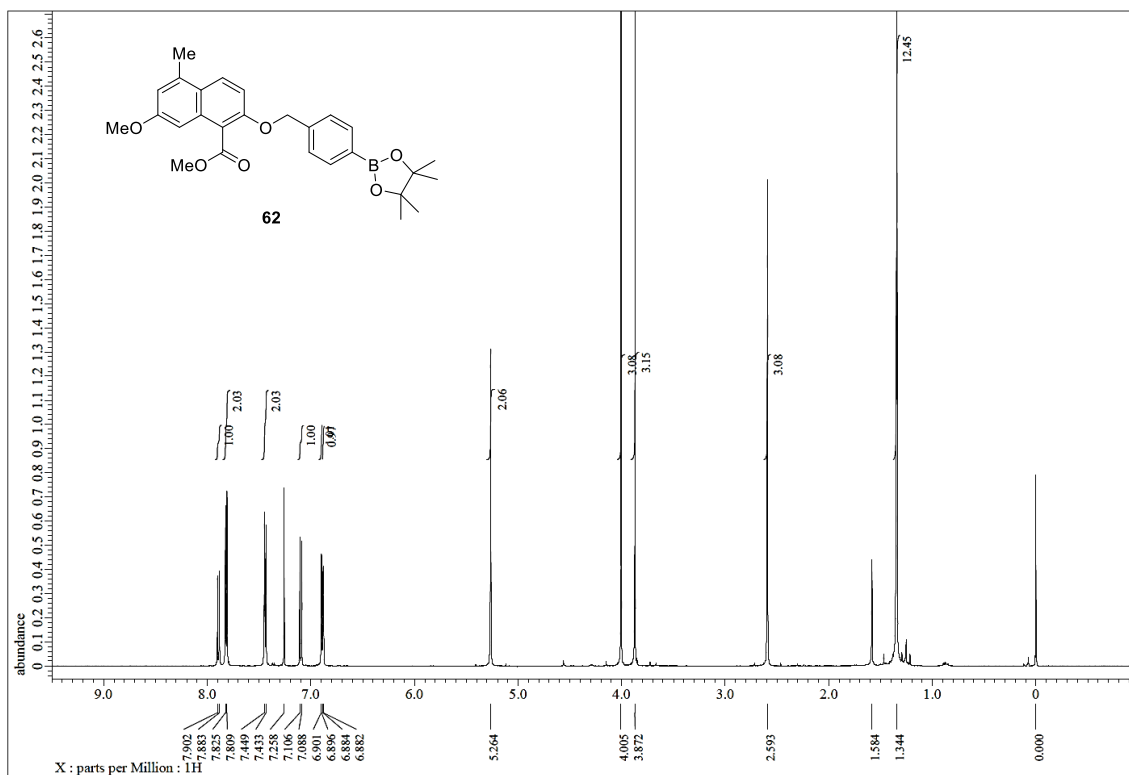
¹³C-NMR spectrum of **61**

Synthetic procedure and characterization data of **62** in chapter 2

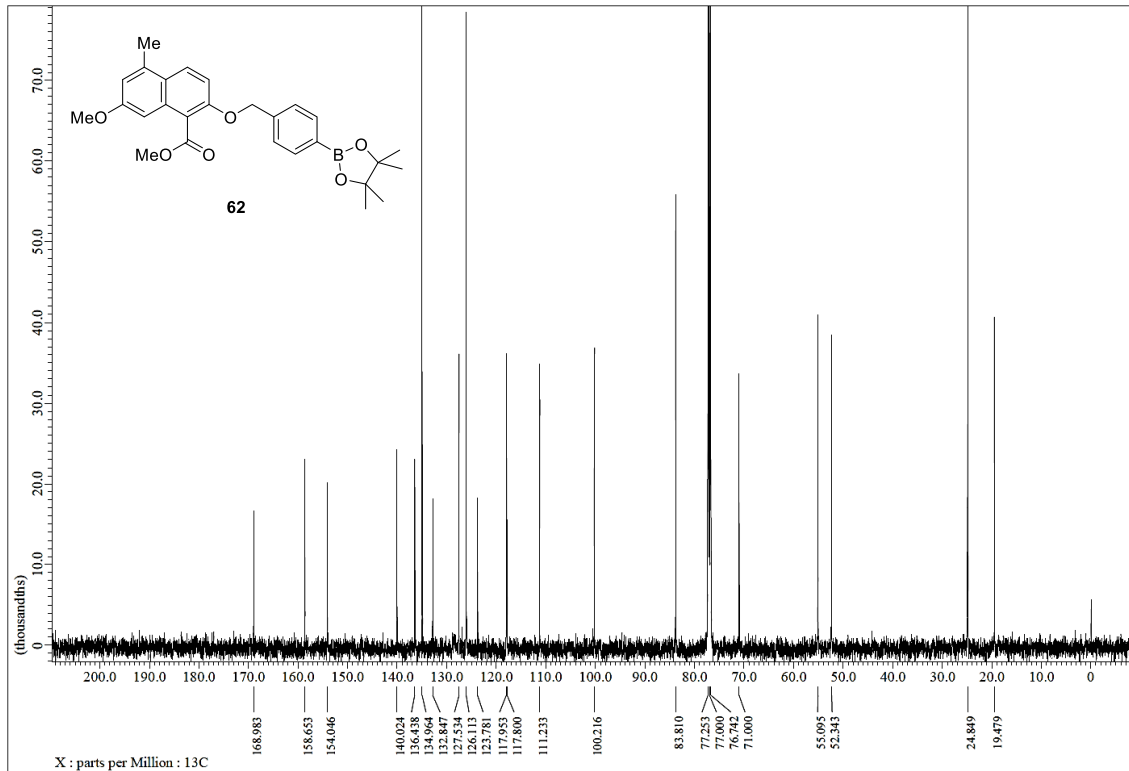


To a solution of **57** (23.3 mg, 0.0946 mmol) in acetone (4.66 mL) were added 4-(bromomethyl)phenylboronic acid pinacol ester (**71**) (34.6 mg, 0.116 mmol) and K_2CO_3 (26.7 mg, 0.193 mmol) at room temperature. After the reaction mixture was stirred under reflux conditions for 17 h, the precipitated solid was removed by suction filtration, washed with $CHCl_3$ (5 mL \times 3), and the filtrate was concentrated in *vacuo*. The residue was subjected to silica gel column chromatography (80/1 $CHCl_3$ /acetone) to give **62** (32.9 mg, 0.0712 mmol, 75% yield). White solid; R_f 0.42 (4/1 *n*-hexane/EtOAc); m.p. 162-163 °C; 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.89 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-4), 7.82 (2H, d, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.44 (2H, d, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.10 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-3), 6.90 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-8), 6.88 (1H, dd, J = 2.0 and 1.0 Hz, H-6), 5.26 (2H, s, ArCH₂), 4.01 (3H, s, COOMe-1), 3.87 (3H, s, OMe-7), 2.59 (3H, s, Me-5), 1.34 (12H, s); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 169.0, 158.7, 154.0, 140.0, 136.4, 135.0, 132.8, 127.5, 126.1, 123.8, 118.0, 117.8, 111.2, 100.2, 83.8, 71.0, 55.1, 52.3, 24.8, 19.5; HRMS (ESI-TOF) m/z 463.2290 (463.2292 calcd. for $C_{27}H_{32}BO_6$, $[M+H]^+$).

NMR spectral charts of **62** in chapter 2

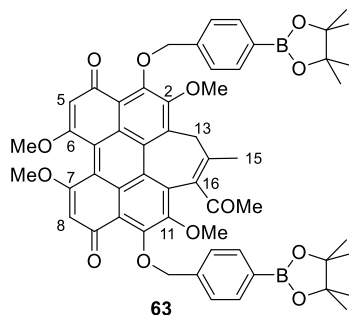


¹H-NMR spectrum of **62**



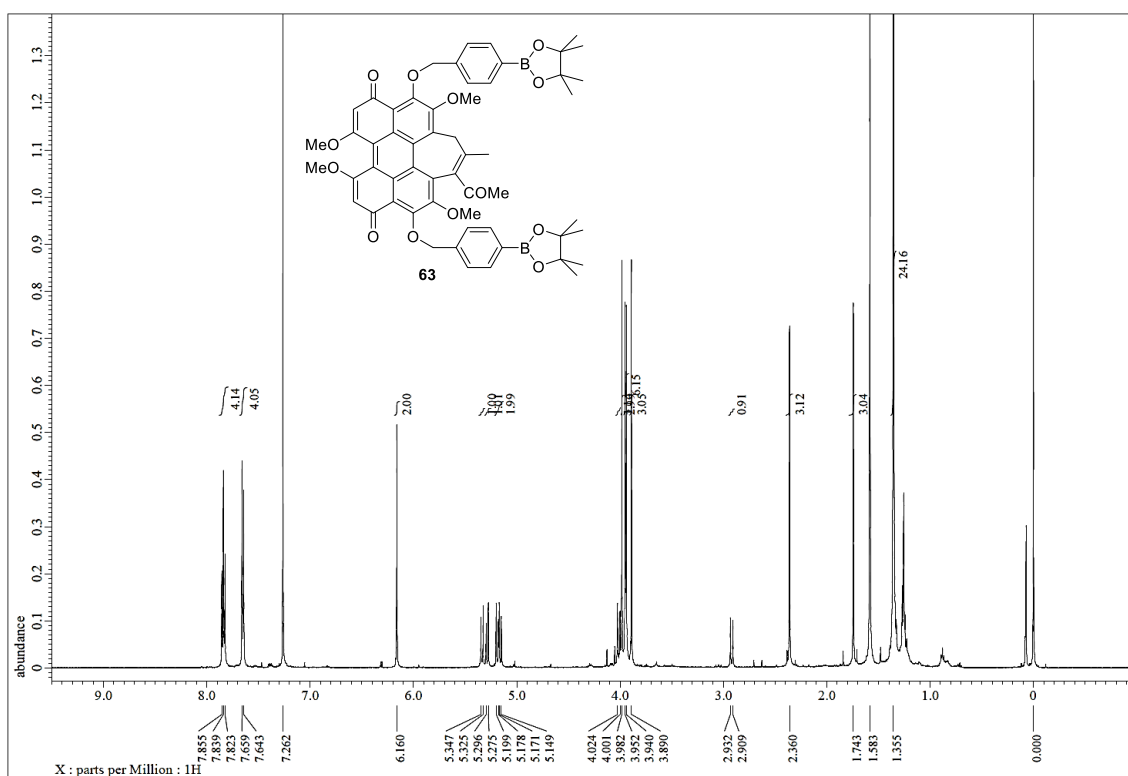
¹³C-NMR spectrum of **62**

Synthetic procedure and characterization data of **63** in chapter 3

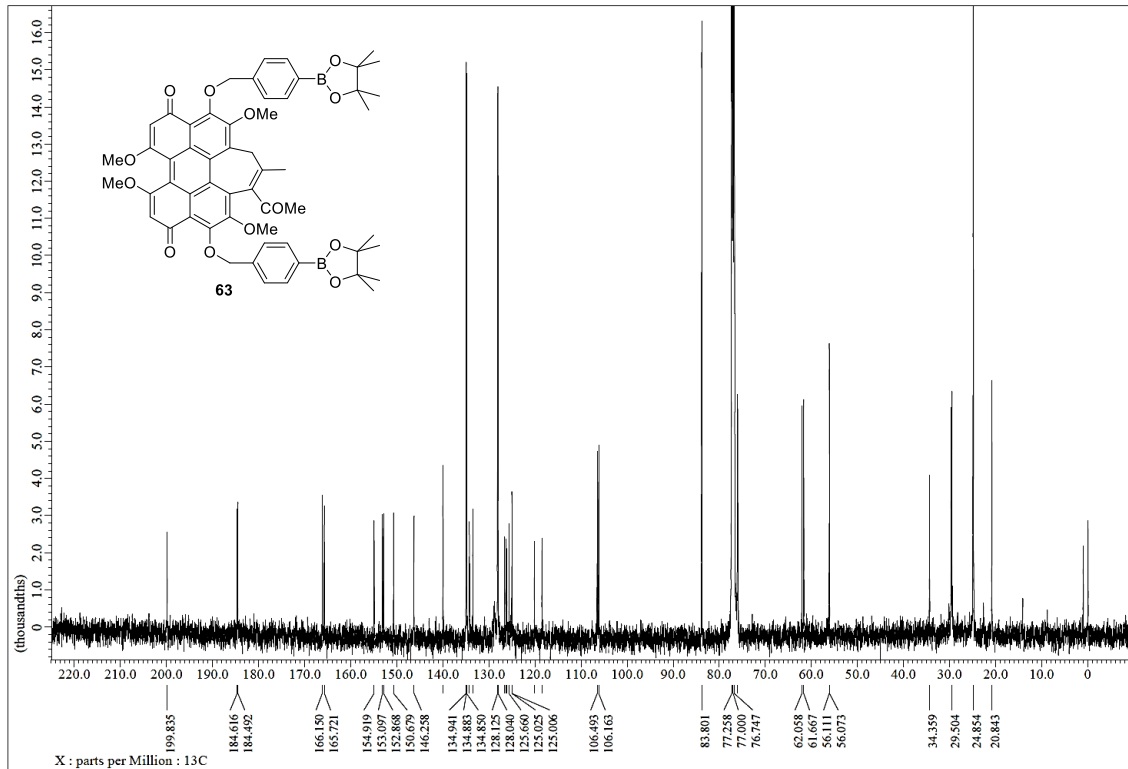


To a solution of hypocrellin B (**39**) (5.7 mg, 10.8 μmol) in dry DMF (285 μL) were added 4-(bromomethyl)phenylboronic acid pinacol ester (**71**) (12.8 mg, 43.1 μmol) and K_2CO_3 (6.0 mg, 43.4 μmol) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 24 h, the reaction mixture was concentrated in *vacuo*. The residue was purified by preparative TLC (1/1 *n*-hexane/acetone) to give **63** (3.9 mg, 4.06 μmol , 38% yield). Orange solid; R_f 0.61 (1/1 *n*-hexane/acetone); m.p. >300 $^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.85 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.83 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.65 (4H, d, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 6.16 (2H, s, H-5, 8), 5.34 and 5.16 (2H, ABq, $J = 11.0$ Hz, ArCH₂), 5.29 and 5.19 (2H, ABq, $J = 10.5$ Hz, ArCH₂), 4.01 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-13a), 3.98 (3H, s, OMe-2), 3.95 (3H, s, OMe-6 or 7), 3.94 (3H, s, OMe-6 or 7), 3.89 (3H, s, OMe-11), 2.92 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-13b), 2.36 (3H, s, Me-15), 1.74 (3H, s, COMe-16), 1.36 (24H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 199.8, 184.6, 184.5, 166.2, 165.7, 154.9, 153.1, 152.9, 150.7, 146.3, 140.0, 139.9, 134.9 \times 3, 134.2, 133.5, 128.1, 128.0, 126.6, 126.3, 126.1, 125.7, 125.0 \times 2, 120.1, 118.5, 106.5, 106.2, 83.8, 76.1, 76.0, 62.1, 61.7, 56.1 \times 2, 34.4, 29.5, 24.9, 20.8; HRMS (ESI-TOF) m/z 961.4144 (961.4142 calcd. for $\text{C}_{56}\text{H}_{59}\text{B}_2\text{O}_{13}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

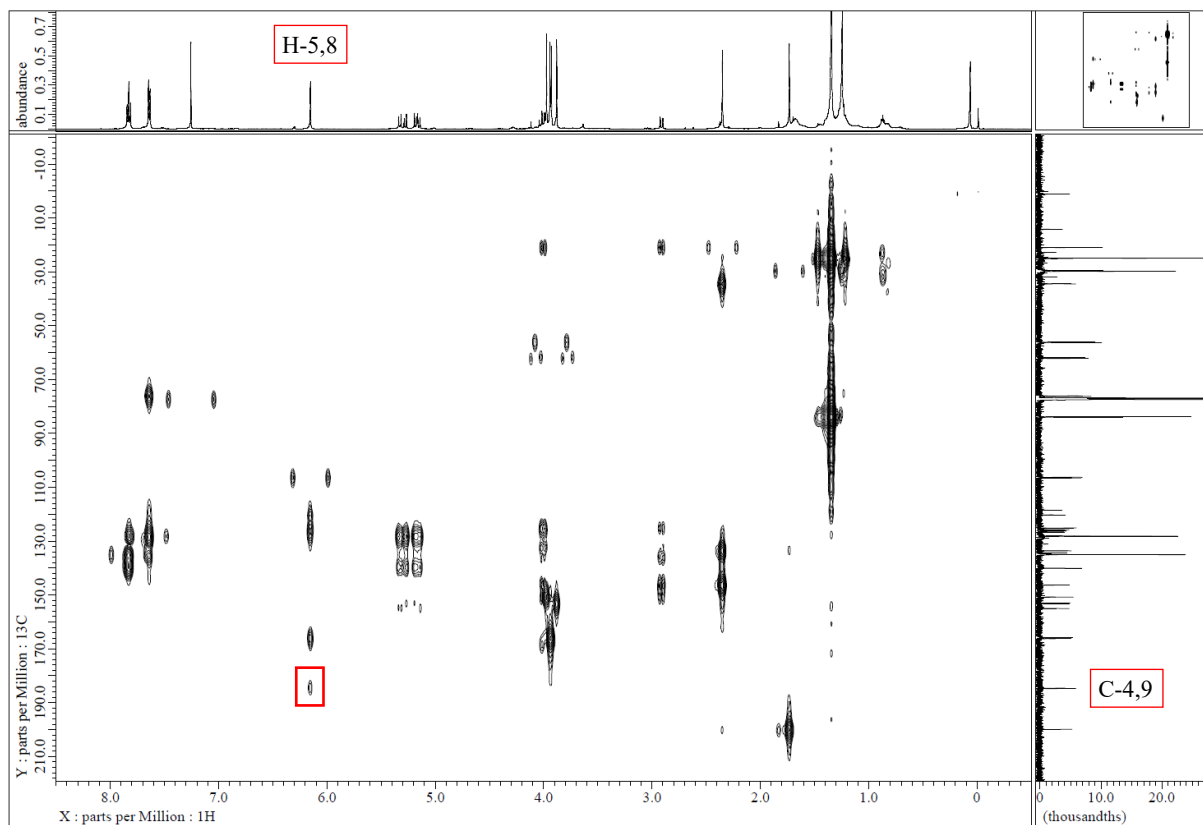
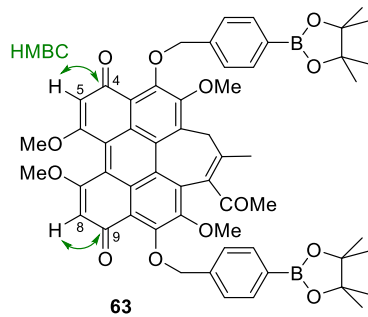
NMR spectral charts of **63** in chapter 3



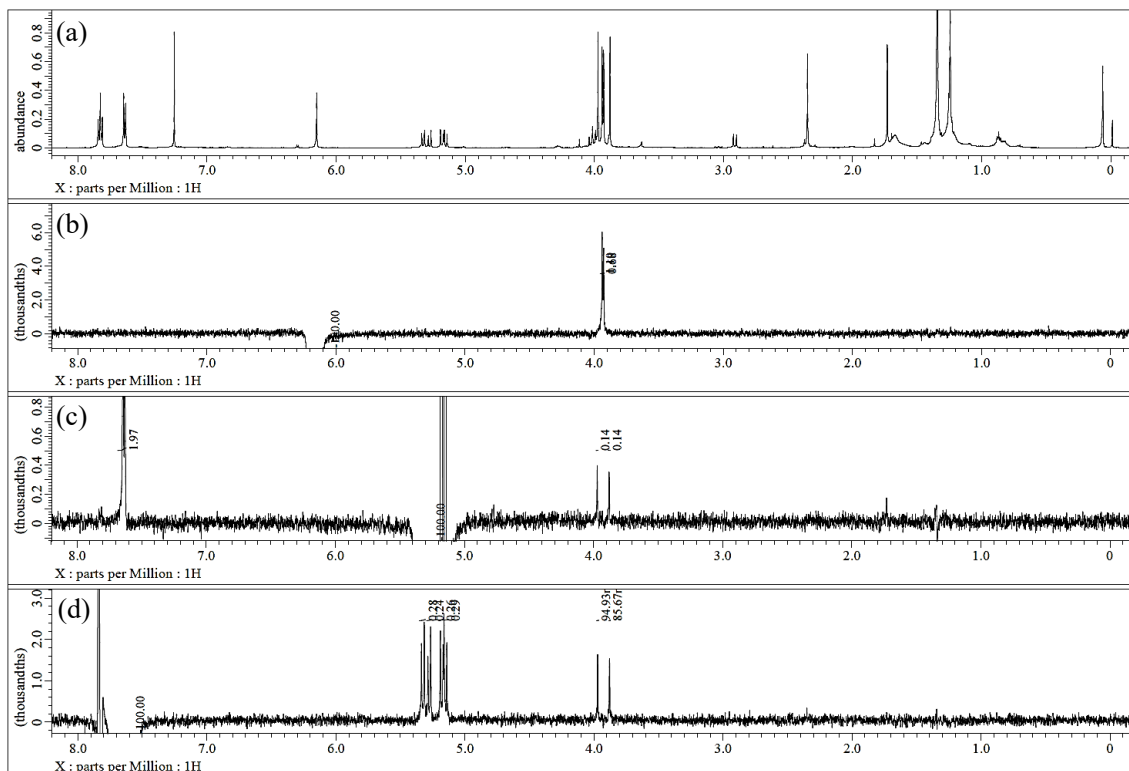
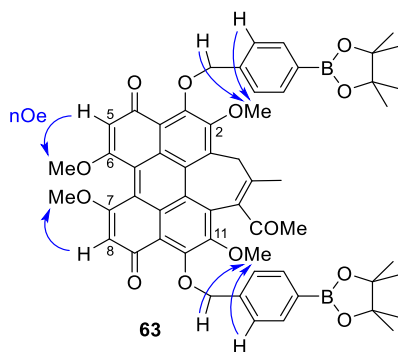
¹H-NMR spectrum of **63**



¹³C-NMR spectrum of **63**



2D-HMBC spectrum of **63**



(a) $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **63**, and nOe spectra of **63** irradiated on (b) H-5 and H-8, (c) benzylic protons and (d) aromatic protons.

Materials for biological assay

Bovine serum albumin (BSA) and hen egg lysozyme (Lyso) were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC. Concanavalin A (Con A) and catalase (from bovine liver) were purchased from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation. 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF) was purchased from Merck Schuchardt OHG. The mouse melanoma cell line, B16F10 (RCB2630), was provided by the RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of the MEXT, Japan. The normal human lung fibroblast cell line, WI-38 (IFO50075), was purchased from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank (Osaka, Japan).

Experimental methods for biological assay in chapter 1

Photodegradation of proteins

The protein photodegradation experiments were performed with BSA, Lyso or Con A (1.5 μ M) in a volume of 10 μ L in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) containing indicated concentrations of each compound at 37 °C for 2 h with or without irradiation using a UV lamp (365 nm, 100 W, Blak-ray (B-100A), UVP. Inc.) placed 10 cm from the sample. After photo-irradiation, 2.00 μ L of electrophoresis buffer consisted of Tris (0.35 M), SDS (10%, wt/vol), glycerol (36%, wt/vol), 2-mercaptoethanol (5%, wt/vol), and bromophenol blue (0.012%, wt/vol) was added to the samples. The photodegradation products were separated by SDS-PAGE in 8% polyacrylamide gels. The gels were run by applying 30 mA for 90 min, stained with SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Bio-Rad Lab. Inc.) for 14 h, destained in acetic acid (7%, vol/vol) and methanol (10%, vol/vol) for 0.5 h, and washed with deionized water. The gels were scanned with a ChemiDoc Touch MP Imaging System (Bio-Rad Lab. Inc.). Molecular weight markers were used in each gel for calibration purpose.

EPR spectrometry

EPR experiments were carried out with a Bruker Biospin EMX EPR, and EPR spectra were recorded under the following conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 20 min. For detection of singlet oxygen, 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (4-oxo-TEMP) was used as a spin-trapping agent. **57** (1.0 mM) and 4-oxo-TEMP (200 mM) were incubated in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) containing 1 mM DETAPAC under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100W) placed 40 cm from a flat cell.

Singlet oxygen productivity assay

A solution of **57** or **59** (1.5 mM) and 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) (500 μ M) in 60% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) was incubated at room temperature for 0-150 s under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 60 cm from the sample in a dark room. After each resultant solution was moved to a 96-well plate, UV-Vis spectra of them were measured using SpectraMax i3 (Molecular Devices) micro plate reader.

Experimental methods for biological assay in chapter 2

Photodegradation of proteins

The protein photodegradation experiments were performed with BSA (1.5 μM) in a volume of 10 μL in 20% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) containing indicated concentrations of **57** or **62** at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h with or without irradiation using a UV lamp (365 nm, 100 W, Blak-ray (B-100A), UVP. Inc.) placed 10 cm from the sample. After photo-irradiation, 2.00 μL of electrophoresis buffer consisted of Tris (0.35 M), SDS (10%, wt/vol), glycerol (36%, wt/vol), 2-mercaptoethanol (5%, wt/vol), and bromophenol blue (0.012%, wt/vol) was added to the samples. The photodegradation products were separated by SDS-PAGE in 8% polyacrylamide gels. The gels were run by applying 30 mA for 90 min, stained with SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Bio-Rad Lab. Inc.) for 14 h, destained in acetic acid (7%, vol/vol) and methanol (10%, vol/vol) for 0.5 h, and washed with deionized water. The gels were scanned with a ChemiDoc Touch MP Imaging System (Bio-Rad Lab. Inc.). Molecular weight markers were used in each gel for calibration purpose.

Singlet oxygen productivity assay

A solution of **57** or **62** (1.5 mM) and 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) (500 μM) in 60% MeCN-PBS (pH 7.4, 10 mM) was incubated at room temperature for 0-150 s under irradiation with a UV lamp (365 nm, 100 W) placed 60 cm from the sample in a dark room. After each resultant solution was moved to a 96-well plate, UV-Vis spectra of them were measured using SpectraMax i3 (Molecular Devices) micro plate reader.

HPLC analysis

Analytical HPLC was performed on JASCO apparatus with a COSMOSIL 5C₁₈-AR-II column (4.6 \times 250 mm, nacalai tesque, Inc.). Detection of products was made by UV detector (JASCO, UV-2077 Plus). A solution of **62** (100 μM) and H₂O₂ (0-300 μM) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 0-180 min, and analyzed by HPLC (3:2 MeCN/H₂O; flow rate 1.0 mL min⁻¹; 30 $^{\circ}\text{C}$; detection by UV (230 nm)).

ROS generating system

Various ROS (100 μM) were administered to **62** as follows. Hydrogen peroxide (H₂O₂), *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP), and hypochlorite (⁻OCl) were delivered from 30%, 70%, and 5% aqueous solutions, respectively. The concentration of H₂O₂ was determined from the absorption at 240 nm ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹⁸² The concentration of ⁻OCl was determined from the absorption at 292 nm ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹⁸² Superoxide (O₂⁻) was added as solid KO₂ in the presence of catalase (5 units). Hydroxyl radical ([•]OH) and *tert*-butoxy radical ([•]O^tBu) were generated by reaction of 1 mM Fe²⁺ with 100 μM H₂O₂ or 100 μM TBHP, respectively. A solution of **62** (100 μM) and various ROS (100 μM) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 20, 40 and 60 min, and analyzed by HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, 4.6 \times 250 mm; 3:2 MeCN/H₂O; flow rate 1.0 mL min⁻¹; 30 $^{\circ}\text{C}$; detection by UV (230 nm)).

Cell culture

<B16F10>

The B16F10 cell line was routinely grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) Fetal bovine serum, 0.5% (v/v) penicillin and kanamycin. The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

<WI-38>

The WI-38 cell line was routinely grown in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% (v/v) Fetal bovine serum, 0.5% (v/v) penicillin and kanamycin. The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

MTT assay

The cells were seeded into 96-well plates (90.0 µL, 4.0×10³ cells). After 24 h, cells were treated with 10.0 µL of **57** or **62** (0, 100, 200, 300, 400 or 500 µM) in 10% DMSO-medium (final conc. of DMSO was 1%) and incubated for 3 h at 37 °C. And then, cells were incubated for 30 min with or without photo-irradiation using a UV lamp (368 nm, 30 W, FL15BLB-368, Sankyo Denki Co., Ltd.) placed 20 cm from the sample. The samples were further incubated for 24 h at 37 °C. Cell viability was evaluated using the MTT assay. 10.0 µL of 5.00 mg mL⁻¹ MTT dissolved in PBS was added to each well. After incubation for 3 h at 37 °C, medium was aspirated and 100 µL of DMSO was added to each well. The absorbance of the mixture was measured using micro plate reader at 540 nm.

Experimental methods for biological assay in chapter 3

Photodegradation of proteins

The protein photodegradation experiments were performed with BSA (1.5 µM) in a volume of 10 µL in 1% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) containing indicated concentrations of **39** or **63** at 37 °C for 2 h with or without irradiation using a LED (660 nm, 3 W, 33 mW cm⁻², EX-660, OPTCODE Corporation) placed 10 cm from the sample. After photo-irradiation, 2.00 µL of electrophoresis buffer consisted of Tris (0.35 M), SDS (10%, wt/vol), glycerol (36%, wt/vol), 2-mercaptoethanol (5%, wt/vol), and bromophenol blue (0.012%, wt/vol) was added to the samples. The photodegradation products were separated by SDS-PAGE in 8% polyacrylamide gels. The gels were run by applying 30 mA for 90 min, stained with SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Bio-Rad Lab. Inc.) for 14 h, destained in acetic acid (7%, vol/vol) and methanol (10%, vol/vol) for 0.5 h, and washed with deionized water. The gels were scanned with a ChemiDoc Touch MP Imaging System (Bio-Rad Lab. Inc.). Molecular weight markers were used in each gel for calibration purpose.

Singlet oxygen productivity assay

A solution of **39** or **63** (5 µM) and DPBF (500 µM) in a volume of 120 µL in 80% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) was incubated at room temperature for 0-120 s under irradiation with a LED (660 nm, 3 W, 10 mW cm⁻²) placed 20 cm from the sample in a dark room. After each resultant solution was moved to a 96-

well plate, UV-Vis spectra of them were measured using SpectraMax i3 (Molecular Devices) micro plate reader.

EPR spectrometry

EPR experiments were carried out with a Bruker Biospin EMX EPR, and EPR spectra were recorded under the following conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 3 min. For detection of singlet oxygen, 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (4-oxo-TEMP) was used as a spin-trapping agent. **39** or **63** (5 μ M) and 4-oxo-TEMP (200 mM) were incubated in 1% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) containing 1 mM DETAPAC under irradiation with a LED (660 nm, 3 W, 10 mW cm⁻²) placed 20 cm from a flat cell.

HPLC analysis

Analytical HPLC was performed on JASCO apparatus with a COSMOSIL 5C₁₈-AR-II column (4.6 \times 250 mm, nacalai tesque, Inc.). Detection of products was made by UV detector (JASCO, UV-2077 Plus). A solution of **63** (20 μ M) and H₂O₂ (0-1000 μ M) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 0-180 min, and analyzed by HPLC (0.01 M TFA-MeCN:0.01 M TFA aq. = 65:35 (0 to 14 min), 65:35 to 100:0 (14 to 15 min), 100:0 (15 to 25 min); flow rate 1.0 mL min⁻¹; 30 $^{\circ}$ C; detection by UV (450 nm)).

ROS generating system

Various ROS (300 μ M) were administered to **63** as follows. Hydrogen peroxide (H₂O₂), *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP), and hypochlorite (⁻OCl) were delivered from 30%, 70%, and 5% aqueous solutions, respectively. The concentration of H₂O₂ was determined from the absorption at 240 nm (ϵ = 43.6 M⁻¹ cm⁻¹).¹⁸² The concentration of ⁻OCl was determined from the absorption at 292 nm (ϵ = 350 M⁻¹ cm⁻¹).¹⁸² Superoxide (O₂⁻) was added as solid KO₂ in the presence of catalase (5 units). Hydroxyl radical ([•]OH) and *tert*-butoxy radical ([•]O^tBu) were generated by reaction of 1 mM Fe²⁺ with 300 μ M H₂O₂ or 300 μ M TBHP, respectively. A solution of **63** (20 μ M) and various ROS (300 μ M) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 120 min, and analyzed by HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, 4.6 \times 250 mm; 0.01 M TFA-MeCN:0.01 M TFA aq. = 65:35 (0 to 14 min), 65:35 to 100:0 (14 to 15 min), 100:0 (15 to 25 min); flow rate 1.0 mL min⁻¹; 30 $^{\circ}$ C; detection by UV (450 nm)).

Singlet oxygen productivity assay in the presence of H₂O₂

A solution of **63** (0 or 25 μ M) and H₂O₂ (1 mM) in 5% DMSO-PBS (pH 7.4, 10 mM) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 2 h. The product (24 μ L) was then added to 96 μ L of DPBF (625 μ M, final conc. of DPBF was 500 μ M) in 98.75% DMSO-PBS (final conc. of DMSO was 80%), and incubated at room temperature for 0-120 s under irradiation with a LED (660 nm, 3 W, 10 mW cm⁻²) placed 20 cm from the sample in a dark room. After each resultant solution was moved to a 96-well plate, UV-Vis spectra of them were measured using a micro plate reader.

Cell culture

<B16F10>

The B16F10 cell line was routinely grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) Fetal bovine serum, 0.5% (v/v) penicillin and kanamycin. The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

<WI-38>

The WI-38 cell line was routinely grown in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% (v/v) Fetal bovine serum, 0.5% (v/v) penicillin and kanamycin. The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

MTT assay

The cells were seeded into 96-well plates (90.0 µL, 4.0×10³ cells). After 24 h, cells were treated with 10.0 µL of **39** or **63** (0, 1, 3, 10 or 30 µM) in 10% DMSO-medium (final conc. of DMSO was 1%) and incubated for 3 h at 37 °C. And then, cells were incubated for 30 min with or without photo-irradiation using a LED (660 nm, 3 W, 17 mW cm⁻²) placed 15 cm from the sample. The samples were further incubated for 24 h at 37 °C. Cell viability was evaluated using the MTT assay. 10.0 µL of 5.00 mg mL⁻¹ MTT dissolved in PBS was added to each well. After incubation for 3 h at 37 °C, medium was aspirated and 100 µL of DMSO was added to each well. The absorbance of the mixture was measured using a micro plate reader at 540 nm.

参考文献

- 1) a) 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」(厚生労働省人口動態統計); b) 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」(全国がん罹患モニタリング集計 (MCIJ)) .
- 2) 厚生労働省「令和2年(2020)人口動態統計(確定数)の概況」.
- 3) a) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. *CA: Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394-424; b) Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. *CA: Cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 87-108; c) Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. *CA: Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 69-90; d) Parkin, D. M.; Bray, F.; Ferlay, J.; Pisani, P. *CA: Cancer J. Clin.* **2005**, *55*, 74-108.
- 4) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. *CA: Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209-249.
- 5) a) Diamantis, N.; Banerji, U. *Br. J. Cancer* **2016**, *114*, 362-367; b) Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 315-337; c) Carter, P. J.; Lazar, G. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 197-223.
- 6) a) Zorzi, A.; Deyle, K.; Heinis, C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 24-29; b) Valeur, E.; Guéret, S. M.; Adihou, H.; Gopalakrishnan, R.; Lemurell, M.; Waldmann, H.; Grossmann, T. N.; Plowright, A. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 10294-10323.
- 7) a) Li, Z.; Rana, T. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 622-638; b) Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541-555; c) Wittrup, A.; Lieberman, J. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 543-552; d) Rupaimoole, R.; Slack, F. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 203-221; e) Khvorova, A.; Watts, J. K. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 238-248; f) Chakraborty, C.; Sharma, A. R.; Sharma, G.; Doss, C. G. P.; Lee, S.-S. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *8*, 132-143; g) Rinaldi, C.; Wood, M. J. A. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14*, 9-21; h) Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 673-694.
- 8) a) Fesnak, A. D.; June, C. H.; Levine, B. L. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 566-581; b) Neelapu, S. S.; Tummala, S.; Kebriaei, P.; Wierda, W.; Gutierrez, C.; Locke, F. L.; Komanduri, K. V.; Lin, Y.; Jain, N.; Daver, N.; Westin, J.; Gulbis, A. M.; Loghin, M. E.; de Groot, J. F.; Adkins, S.; Davis, S. E.; Rezvani, K.; Hwu, P.; Shpall, E. J. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 47-62; c) June, C. H.; O'Connor, R. S.; Kawalekar, O. U.; Ghassemi, S.; Milone, M. C. *Science* **2018**, *359*, 1361-1365; d) June, C. H.; Sadelain, M. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 64-73; e) Riley, R. S.; June, C. H.; Langer, R.; Mitchell, M. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 175-196.
- 9) a) Matsuura, T. *Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi* **1968**, *26*, 217-236; b) Clennan, E. L.; Pace, A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6665-6691; c) Prier, C. K.; Rankic, D. A.; MacMillan, D. W. C. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 5322-5363; d) Romero, N. A.; Nicewicz, D. A. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 10075-10166.
- 10) a) Toshima, K. *Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi* **2005**, *63*, 325-338; b) Toshima, K. *Synlett* **2012**, *23*, 2025-2052.

- 11) a) Tanimoto, S.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7659-7671; b) Toshima, K. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 834-854.
- 12) a) Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4397-4407; b) Takahashi, D.; Toshima, K. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2012**, *24*, 258-276; c) Toshima, K.; Takahashi, D. *Glycoconj. J.* **2015**, *32*, 475-482.
- 13) a) Sato, S.; Tsushima, M.; Nakamura, H. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 6168-6179; b) Lechner, V. M.; Nappi, M.; Deneny, P. J.; Folliet, S.; Chu, J. C. K.; Gaunt, M. J. *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 1752-1829.
- 14) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889-905.
- 15) Dolmans, D. E.; Fukumura, D.; Jain, R. K. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380-387.
- 16) Yano, S.; Hirohara, S.; Obata, M.; Hagiya, Y.; Ogura, S.; Ikeda, A.; Kataoka, H.; Tanaka, M.; Joh, T. *J. Photochem. Photobiol., C* **2011**, *12*, 46-67.
- 17) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. *CA: Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250-281.
- 18) ファイザー株式会社, フォトフリン®静注用 75 mg, 添付文書.
- 19) クリニジェン株式会社, ビスダイイン®静注用 15 mg, 添付文書.
- 20) Meiji Seika ファルマ株式会社, 注射用レザフィリン®100 mg, 添付文書.
- 21) a) Kobayashi, H.; Choyke, P. L. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 2332-2339; b) Wakiyama, H.; Kato, T.; Furusawa, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nanophotonics* **2021**, *10*, 3135-3151; c) Kato, T.; Wakiyama, H.; Furusawa, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Cancers* **2021**, *13*, 2535; d) Kobayashi, H.; Furusawa, A.; Rosenberg, A.; Choyke, P. L. *Int. Immunol.* **2021**, *33*, 7-15; e) Maruoka, Y.; Wakiyama, H.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *EBioMedicine* **2021**, *70*, 103501.
- 22) Mitsunaga, M.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Rosenblum, L. T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1685-1691.
- 23) 楽天メディカルジャパン株式会社, アキシャルックス®点滴静注 250 mg, 添付文書.
- 24) a) Lovell, J. F.; Liu, T. W. B.; Chen, J.; Zheng, G. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2839-2857; b) Li, X.; Kolemen, S.; Yoon, J.; Akkaya, E. U. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1604053; c) Liu, M.; Li, C. *ChemPlusChem* **2020**, *85*, 948-957; d) Zhao, X.; Liu, J.; Fan, J.; Chao, H.; Peng, X. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 4185-4219; e) Pham, T. C.; Nguyen, V.-N.; Choi, Y.; Lee, S.; Yoon, J. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 13454-13619.
- 25) a) Bonnett, R. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 19-33; b) Sharman, W. M.; Allen, C. M.; van Lier, J. E. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 376-400.
- 26) Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Miyamoto, S.; Ronsein, G. E.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 2043-2086.
- 27) a) Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X.-H.; Childs, C. J. H.; Sibata, C. H. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 27-42; b) Allison, R. R.; Sibata, C. H. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2010**, *7*, 61-75; c) van Straten, D.; Mashayekhi, V.; de Bruijn, H. S.; Oliveira, S.; Robinson, D. J. *Cancers* **2017**, *9*, 19; d) dos Santos, A. F.; de Almeida, D. R. Q.; Terra, L. F.; Baptista, M. S.; Labriola, L. *J. Cancer*

- Metastasis Treat.* **2019**, *5*, 25; e) Zhang, Q.; He, J.; Yu, W.; Li, Y.; Liu, Z.; Zhou, B.; Liu, Y. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11*, 427-437; f) Shi, H.; Sadler, P. J. *Br. J. Cancer* **2020**, *123*, 871-873; g) Broadwater, D.; Medeiros, H. C. D.; Lunt, R. R.; Lunt, S. Y. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2021**, *23*, 29-60.
- 28) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 279-293.
- 29) Monro, S.; Colón, K. L.; Yin, H.; Roque, J.; Konda, P.; Gujar, S.; Thummel, R. P.; Lilge, L.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 797-828.
- 30) Casas, A. *Cancer Lett.* **2020**, *490*, 165-173.
- 31) a) O'Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053-1074; b) Gunaydin, G.; Gedik, M. E.; Ayan, S. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 691697.
- 32) Nishida, K.; Tojo, T.; Kondo, T.; Yuasa, M. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 2046.
- 33) a) Li, M.; Xia, J.; Tian, R.; Wang, J.; Fan, J.; Du, J.; Long, S.; Song, X.; Foley, J. W.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14851-14859; b) Lv, W.; Chi, S.; Feng, W.; Liang, T.; Song, D.; Liu, Z. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 7037-7040.
- 34) Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1765-1780.
- 35) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620-2640.
- 36) Bashkatov, A. N.; Genina, E. A.; Kochubey, V. I.; Tuchin, V. V. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2005**, *38*, 2543-2555.
- 37) Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 535-545.
- 38) a) Tamaoki, M.; Ohashi, S.; Hirohashi, K.; Yoshioka, M.; Amanuma, Y.; Muto, M. *The Journal of Japan Society for Laser Surgery and Medicine* **2019**, *40*, 62-66; b) Yamamoto, Y.; Mimura, T.; Kushida, S. *The Journal of Japan Society for Laser Surgery and Medicine* **2019**, *40*, 72-76.
- 39) Lo, P.-C.; Chen, J.; Stefflova, K.; Warren, M. S.; Navab, R.; Bandarchi, B.; Mullins, S.; Tsao, M.; Cheng, J. D.; Zheng, G. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 358-368.
- 40) Bhaumik, J.; Weissleder, R.; McCarthy, J. R. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5894-5901.
- 41) a) Jung, H. S.; Chen, X.; Kim, J. S.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6019-6031; b) Zhang, J.; Wang, N.; Ji, X.; Tao, Y.; Wang, J.; Zhao, W. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 4172-4192.
- 42) He, H.; Lo, P.-C.; Ng, D. K. P. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6241-6245.
- 43) McDonnell, S. O.; Hall, M. J.; Allen, L. T.; Byrne, A.; Gallagher, W. M.; O'Shea, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16360-16361.
- 44) Guo, H.; Jing, Y.; Yuan, X.; Ji, S.; Zhao, J.; Li, X.; Kan, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3844-3853.
- 45) Turan, I. S.; Cakmak, F. P.; Yildirim, D. C.; Cetin-Atalay, R.; Akkaya, E. U. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16088-16092.
- 46) a) Zhang, J.; Peng, F.; Dong, X.; Zhao, W. *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 1524-1526; b) Wang, X.; Tao, Y.; Zhang, J.; Chen, M.; Wang, N.; Ji, X.; Zhao, W. *Chem. Asian J.* **2020**, *15*, 770-774.
- 47) Yuan, B.; Wang, H.; Xu, J.-F.; Zhang, X. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 26982-26990.
- 48) a) Kamiya, M.; Asanuma, D.; Kuranaga, E.; Takeishi, A.; Sakabe, M.; Miura, M.; Nagano, T.; Urano, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12960-12963; b) Asanuma, D.; Sakabe, M.; Kamiya, M.; Yamamoto, K.; Hiratake, J.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Choyke, P. L.; Nagano, T.; Kobayashi, H.; Urano, Y. *Nat. Commun.*

- 2015, 6, 6463; c) Urano, Y.; Sakabe, M.; Kosaka, N.; Ogawa, M.; Mitsunaga, M.; Asanuma, D.; Kamiya, M.; Young, M. R.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Sci. Transl. Med.* **2011**, 3, 110ra119; d) Onoyama, H.; Kamiya, M.; Kuriki, Y.; Komatsu, T.; Abe, H.; Tsuji, Y.; Yagi, K.; Yamagata, Y.; Aikou, S.; Nishida, M.; Mori, K.; Yamashita, H.; Fujishiro, M.; Nomura, S.; Shimizu, N.; Fukayama, M.; Koike, K.; Urano, Y.; Seto, Y. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 26399; e) Piao, W.; Tsuda, S.; Tanaka, Y.; Maeda, S.; Liu, F.; Takahashi, S.; Kushida, Y.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Nakazawa, T.; Uchiyama, M.; Morokuma, K.; Nagano, T.; Hanaoka, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 13028-13032; f) Shin, N.; Hanaoka, K.; Piao, W.; Miyakawa, T.; Fujisawa, T.; Takeuchi, S.; Takahashi, S.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Tahara, T.; Tanokura, M.; Nagano, T.; Urano, Y. *ACS Chem. Biol.* **2017**, 12, 558-563.
- 49) Ichikawa, Y.; Kamiya, M.; Obata, F.; Miura, M.; Terai, T.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T.; Urano, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, 53, 6772-6775.
- 50) Chiba, M.; Ichikawa, Y.; Kamiya, M.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T.; Lange, N.; Urano, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56, 10418-10422.
- 51) Piao, W.; Hanaoka, K.; Fujisawa, T.; Takeuchi, S.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Tahara, T.; Nagano, T.; Urano, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 13713-13719.
- 52) Yuan, L.; Lin, W.; Zhao, S.; Gao, W.; Chen, B.; He, L.; Zhu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 13510-13523.
- 53) Xu, F.; Li, H.; Yao, Q.; Ge, H.; Fan, J.; Sun, W.; Wang, J.; Peng, X. *Chem. Sci.* **2019**, 10, 10586-10594.
- 54) Arslan, B.; Bilici, K.; Demirci, G.; Almammadov, T.; Khan, M.; Sennaroglu, A.; Acar, H. Y.; Kolemen, S. *Dyes Pigm.* **2021**, 195, 109735.
- 55) Bae, J.; McNamara, L. E.; Nael, M. A.; Mahdi, F.; Doerksen, R. J.; Bidwell, G. L.; Hammer, N. I.; Jo, S. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 12787-12790.
- 56) Zeng, Q.; Zhang, R.; Zhang, T.; Xing, D. *Biomaterials* **2019**, 207, 39-48.
- 57) Shen, Z.; Tung, C.-H. *Chem. Commun.* **2020**, 56, 13860-13863.
- 58) Koide, Y.; Urano, Y.; Yatsushige, A.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6058-6059.
- 59) Hu, W.; Xie, M.; Zhao, H.; Tang, Y.; Yao, S.; He, T.; Ye, C.; Wang, Q.; Lu, X.; Huang, W.; Fan, Q. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 999-1005.
- 60) a) Zhang, X.; Zhang, L.; Liu, Y.; Bao, B.; Zang, Y.; Li, J.; Lu, W. *Tetrahedron* **2015**, 71, 4842-4845; b) Gu, K.; Xu, Y.; Li, H.; Guo, Z.; Zhu, S.; Zhu, S.; Shi, P.; James, T. D.; Tian, H.; Zhu, W.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 5334-5340; c) He, Y.; Miao, L.; Yu, L.; Chen, Q.; Qiao, Y.; Zhang, J.-F.; Zhou, Y. *Dyes Pigm.* **2019**, 168, 160-165.
- 61) Zhai, W.; Zhang, Y.; Liu, M.; Zhang, H.; Zhang, J.; Li, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, 58, 16601-16609.
- 62) Digby, E. M.; Sadovski, O.; Beharry, A. A. *Chem. Eur. J.* **2020**, 26, 2713-2718.
- 63) Sun, J.; Du, K.; Diao, J.; Cai, X.; Feng, F.; Wang, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, 59, 12122-12128.
- 64) Yang, Z.; Xu, W.; Wang, J.; Liu, L.; Chu, Y.; Wang, Y.; Hu, Y.; Yi, T.; Hua, J. *J. Mater. Chem. C* **2020**, 8, 8183-8190.

- 65) Ishida, N.; Miyazaki, K.; Kumagai, K.; Rikimaru, M. *J. Antibiot.* **1965**, *18*, 68-76.
- 66) *Neocarzinostatin: The Past, Present and Future of an Anticancer Drug*; Maeda, H., Edo, K., Ishida, N., Eds; Springer-Verlag: Tokyo, 1997.
- 67) Urbaniak, M. D.; Bingham, J. P.; Hartley, J. A.; Woolfson, D. N.; Caddick, S. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4710-4715.
- 68) Maeda, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 169-185.
- 69) Joshi, M. C.; Rawat, D. S. *Chem. Biodivers.* **2012**, *9*, 459-498.
- 70) Napier, M. A.; Holmquist, B.; Strydom, D. J.; Goldberg, I. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *89*, 635-642.
- 71) a) Iseki, S.; Koide, Y.; Ebina, T.; Ishida, N. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 110-113; b) Koide, Y.; Ishii, F.; Hasuda, K.; Koyama, Y.; Edo, K.; Katamine, S.; Kitame, F.; Ishida, N. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 342-346.
- 72) Edo, K.; Mizugaki, M.; Koide, Y.; Seto, H.; Furihata, K.; Otake, N.; Ishida, N. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 331-334.
- 73) a) Lee, M. D.; Dunne, T. S.; Siegel, M. M.; Chang, C. C.; Morton, G. O.; Borders, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3464-3466; b) Lee, M. D.; Dunne, T. S.; Chang, C. C.; Ellestad, G. A.; Siegel, M. M.; Morton, G. O.; McGahren, W. J.; Borders, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3466-3468; c) Lee, M. D.; Manning, J. K.; Williams, D. R.; Kuck, N. A.; Testa, R. T.; Borders, D. B. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1070-1087.
- 74) a) Konishi, M.; Ohkuma, H.; Saitoh, K.; Kawaguchi, H.; Golik, J.; Dubay, G.; Groenewold, G.; Krishnan, B.; Doyle, T. W. *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1605-1609; b) Golik, J.; Clardy, J.; Dubay, G.; Groenewold, G.; Kawaguchi, H.; Konishi, M.; Krishnan, B.; Ohkuma, H.; Saitoh, K.; Doyle, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3461-3462; c) Golik, J.; Dubay, G.; Groenewold, G.; Kawaguchi, G.; Konishi, M.; Krishnan, B.; Ohkuma, H.; Saitoh, K.; Doyle, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3462-3464.
- 75) Konishi, M.; Ohkuma, H.; Matsumoto, K.; Tsuno, T.; Kamei, H.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H.; VanDuyne, G. D.; Clardy, J. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1449-1452.
- 76) a) Hu, J.; Xue, Y.-C.; Xie, M.-Y.; Zhang, R.; Otani, T.; Minami, Y.; Yamada, Y.; Marunaka, T. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1575-1579; b) Otani, T.; Minami, Y.; Marunaka, T.; Zhang, R.; Xie, M.-Y. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1580-1585; c) Zhen, Y.; Ming, X.; Yu, B.; Otani, T.; Saito, H.; Yamada, Y. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1294-1298; d) Yoshida, K.; Minami, Y.; Azuma, R.; Saeki, M.; Otani, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2637-2640; e) Iida, K.; Fukuda, S.; Tanaka, T.; Hirama, M.; Imajo, S.; Ishiguro, M.; Yoshida, K.; Otani, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4997-5000.
- 77) a) Hofstead, S. J.; Matson, J. A.; Malacko, A. R.; Marquardt, H. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1250-1254; b) Leet, J. E.; Schroeder, D. R.; Hofstead, S. J.; Golik, J.; Colson, K. L.; Huang, S.; Klohr, S. E.; Doyle, T. W.; Matson, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7946-7948.
- 78) Ando, T.; Ishii, M.; Kajiura, T.; Kameyama, T.; Miwa, K.; Sugiura, Y. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6495-6498.
- 79) a) Nicolaou, K. C.; Hummel, C. W.; Pitsinos, E. N.; Nakada, M.; Smith, A. L.; Shibayama, K.; Saimoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10082-10084; b) Nicolaou, K. C.; Hummel, C. W.; Nakada, M.;

- Shibayama, K.; Pitsinos, E. N.; Saimoto, H.; Mizuno, Y.; Baldenius, K.-U.; Smith, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7625-7635.
- 80) a) Nicolaou, K. C.; Clark, D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 855-857; b) Clark, D. A.; De Riccardis, F.; Nicolaou, K. C. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11391-11426.
- 81) a) Shair, M. D.; Yoon, T.-Y.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1721-1723; b) Shair, M. D.; Yoon, T.-Y.; Mosny, K. K.; Chou, T. C.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9509-9525.
- 82) Inoue, M.; Ohashi, I.; Kawaguchi, T.; Hiram, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1777-1779.
- 83) a) Myers, A. G.; Horiguchi, Y. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4363-4366; b) Kawata, S.; Ashizawa, S.; Hiram, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12012-12013; c) Ren, F.; Hogan, P. C.; Anderson, A. J.; Myers, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5381-5383; d) Ogawa, K.; Koyama, Y.; Ohashi, I.; Sato, I.; Hiram, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1110-1113.
- 84) a) Takahashi, K.; Hagiwara, M.; Ashizawa, S.; Hiram, M. *Synlett* **1999**, *1*, 71-72; b) Kobayashi, S.; Reddy, R. S.; Sugiura, Y.; Sasaki, D.; Miyagawa, N.; Hiram, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2887-2888; c) Ji, N.; O'Dowd, H.; Rosen, B. M.; Myers, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14825-14827.
- 85) Shibuya, M.; Toyooka, K.; Kubota, S. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1171-1174.
- 86) Shishido, K.; Yamashita, A.; Hiroya, K.; Fukumoto, K.; Kametani, T. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 111-112.
- 87) Takahashi, K.; Suzuki, T.; Hiram, M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4603-4604.
- 88) Takahashi, K.; Tanaka, T.; Suzuki, T.; Hiram, M. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1327-1340.
- 89) Myers, A. G.; Subramanian, V.; Hammond, M. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 587-590.
- 90) Ji, N.; Rosen, B. M.; Myers, A. G. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4551-4553.
- 91) Myers, A. G.; Liang, J.; Hammond, M.; Harrington, P. M.; Wu, Y.; Kuo, E. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5319-5320.
- 92) Myers, A. G.; Glatthar, R.; Hammond, M.; Harrington, P. M.; Kuo, E. Y.; Liang, J.; Schaus, S. E.; Wu, Y.; Xiang, J.-N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5380-5401.
- 93) Kobayashi, S.; Hori, M.; Wang, G. X.; Hiram, M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 636-644.
- 94) Homma, M.; Koide, T.; Saito-Koide, T.; Kamo, I.; Seto, M.; Kumagai, K.; Ishida, N. *Proc. Int. Congr. Chemother.* **1970**, *2*, 410-415.
- 95) Beerman, T. A.; Goldberg, I. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *59*, 1254-1261.
- 96) Ohtsuki, K.; Ishida, N. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 143-148.
- 97) Hatayama, T.; Goldberg, I. H.; Takeshita, M.; Grollman, A. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 3603-3607.
- 98) D'Andrea, A. D.; Haseltine, W. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 3608-3612.
- 99) Sim, S.-K.; Lown, J. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *81*, 99-105.
- 100) Kappen, L. S.; Goldberg, I. H. *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 2959-2968.
- 101) Edo, K.; Iseki, S.; Ishida, N.; Horie, T.; Kusano, G.; Nozoe, S. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1586-1589.
- 102) Sheridan, R. P.; Gupta, R. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *99*, 213-220.

- 103) Goldberg, I. H. *Free Radic. Biol. Med.* **1987**, *3*, 41-54.
- 104) Jones, R. R.; Bergman, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 660-661.
- 105) Darby, N.; Kim, C. U.; Salaün, J. A.; Shelton, K. W.; Takada, S.; Masamune, S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 1516-1517.
- 106) Myers, A. G. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4493-4496.
- 107) Myers, A. G.; Proteau, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1146-1147.
- 108) Uesawa, Y.; Kuwahara, J.; Sugiura, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164*, 903-911.
- 109) Gomibuchi, T.; Hirama, M. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 738-740.
- 110) Toshima, K.; Takai, S.; Maeda, Y.; Takano, R.; Matsumura, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3656-3658.
- 111) Wu, H.; Lao, X.-F.; Wang, Q.-W.; Lu, R.-R.; Shen, C.; Zhang, F.; Liu, M.; Jia, L. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 948-951.
- 112) Kishi, T.; Tahara, S.; Taniguchi, N.; Tsuda, M.; Tanaka, C.; Takahashi, S. *Planta Med.* **1991**, *57*, 376-379.
- 113) Chen, W. S.; Chen, Y.-T.; Wan, X.-Y.; Friedrichs, E.; Puff, H.; Breitmaier, E. *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 1880-1885.
- 114) a) Kuyama, S.; Tamura, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5725-5726; b) Lousberg, R. J. J. Ch.; Weiss, U.; Salemink, C. A.; Arnone, A.; Merlini, L.; Nasini, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 1463-1464.
- 115) a) Kobayashi, E.; Ando, K.; Nakano, H.; Iida, T.; Ohno, H.; Morimoto, M.; Tamaoki, T. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1470-1474; b) Iida, T.; Kobayashi, E.; Yoshida, M.; Sano, H. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1475-1481.
- 116) Yoshihara, T.; Shimanuki, T.; Araki, T.; Sakamura, S. *Agr. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 1683-1684.
- 117) Weiss, U.; Ziffer, H.; Batterham, T. J.; Blumer, M.; Hackeng, W. H. L.; Copier, H.; Salemink, C. A. *Can. J. Microbiol.* **1965**, *11*, 57-66.
- 118) O'Brien, E. M.; Morgan, B. J.; Kozlowski, M. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6877-6880.
- 119) O'Brien, E. M.; Morgan, B. J.; Mulrooney, C. A.; Carroll, P. J.; Kozlowski, M. C. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 57-68.
- 120) Mulrooney, C. A.; O'Brien, E. M.; Morgan, B. J.; Kozlowski, M. C. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3887-3904.
- 121) Arnone, A.; Merlini, L.; Mondelli, R.; Nasini, G.; Ragg, E.; Scaglioni, L.; Weiss, U. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 1447-1454.
- 122) Smirnov, A.; Fulton, D. B.; Andreotti, A.; Petrich, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7979-7988.
- 123) Mazzini, S.; Merlini, L.; Mondelli, R.; Scaglioni, L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 409-416.
- 124) Scaglioni, L.; Mazzini, S.; Mondelli, R.; Merlini, L.; Ragg, E.; Nasini, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 2276-2286.
- 125) Morgan, B. J.; Dey, S. Johnson, S. W.; Kozlowski, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9413-9425.
- 126) Lown, J. W. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 99-119.
- 127) Diwu, Z.; Lown, J. W. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 609-616.

- 128) Miller, G. G.; Brown, K.; Ballangrud, Å. M.; Barajas, O.; Xiao, Z.; Tulip, J.; Lown, J. W.; Leithoff, J. M.; Allalunis-Turner, M. J.; Mehta, R. D.; Moore, R. B. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 714-722.
- 129) Chin, W.; Lau, W.; Cheng, C.; Olivo, M. *Int. J. Oncol.* **2004**, *25*, 623-629.
- 130) Hudson, J. B.; Imperial, V.; Haugland, R. P.; Diwu, Z. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 352-354.
- 131) Diwu, Z.; Lown, J. W. *J. Photochem. Photobiol. A* **1992**, *64*, 273-287.
- 132) Diwu, Z.; Lown, J. W. *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, *18*, 131-143.
- 133) a) Estey, E. P.; Brown, K.; Diwu, Z.; Liu, J.; Lown, J. W.; Miller, G. G.; Moore, R. B.; Tulip, J.; McPhee, M. S. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1996**, *37*, 343-350; b) Zhao, H.; Yin, R.; Chen, D.; Ren, J.; Wang, Y.; Zhanga, J.; Deng, H.; Wang, Y.; Qiu, H.; Huang, N.; Zou, Q.; Zhao, J.; Gu, Y. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2014**, *11*, 204-212; c) Jiang, Y.; Pang, X.; Liu, R.; Xiao, Q.; Wang, P.; Leung, A. W.; Luan, Y.; Xu, C. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 31674-31685; d) Hu, H.; Yan, X.; Wang, H.; Tanaka, J.; Wang, M.; You, W.; Li, Z. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 1116-1123.
- 134) Diwu, Z. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 529-539.
- 135) a) Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 347-364; b) Mansoori, B.; Mohammadi, A.; Doustvandi, M. A.; Mohammadnejad, F.; Kamari, F.; Gjerstorff, M. F.; Baradaran, B.; Hamblin, M. R. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2019**, *26*, 395-404; c) Siewert, B.; Stuppner, H. *Phytomedicine* **2019**, *60*, 152985.
- 136) Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44-84.
- 137) a) Veal, E. A.; Day, A. M.; Morgan, B. A. *Mol. Cell* **2007**, *26*, 1-14; b) Finkel, T. *J. Cell Biol.* **2011**, *194*, 7-15; c) Paulsen, C. E.; Carroll, K. S. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4633-4679; d) Holmström, K. M.; Finkel, T. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 411-421; e) Parvez, S.; Long, M. J. C.; Poganik, J. R.; Aye, Y. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 8798-8888.
- 138) Poljsak, B.; Suput, D.; Milisav, I. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 956792.
- 139) a) Seitz, H. K.; Stickel, F. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 599-612; b) Galluzzi, L.; Blomgren, K.; Kroemer, G. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 481-494.
- 140) a) Punnonen, K.; Ahotupa, M.; Asaishi, K.; Hyöty, M.; Kudo, R.; Punnonen, R. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1994**, *120*, 374-377; b) Ray, G.; Batra, S.; Shukla, N. K.; Deo, S.; Raina, V.; Ashok, S.; Husain, S. A. *Breast Cancer Res. Treat.* **2000**, *59*, 163-170; c) Ho, J. C.; Zheng, S.; Comhair, S. A. A.; Farver, C.; Erzurum, S. C. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 8578-8585; d) Miar, A.; Hevia, D.; Muñoz-Cimadevilla, H.; Astudillo, A.; Velasco, J.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *85*, 45-55.
- 141) a) Szatrowski, T. P.; Nathan, C. F. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 794-798; b) Wang, J.; Zhang, Y.; Archibong, E.; Ligler, F. S.; Gu, Z. *Adv. Biosys.* **2017**, *1*, 1700084.
- 142) a) Hagen, H.; Marzenell, P.; Jentsch, E.; Wenz, F.; Veldwijk, M. R.; Mokhir, A. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 924-934; b) Kita, M.; Yamamoto, J.; Morisaki, T.; Komiyama, C.; Inokuma, T.; Miyamoto, L.; Tsuchiya, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4228-4231.
- 143) Connor, K. M.; Hempel, N.; Nelson, K. K.; Dabiri, G.; Gamarra, A.; Belarmino, J.; Van de Water, L.; Mian, B. M.; Melendez, J. A. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10260-10267.

- 144) Hempel, N.; Ye, H.; Abessi, B.; Mian, B.; Melendez, J. A. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 42-50.
- 145) Park, S. J.; Kim, Y. T.; Jeon, Y. J. *Mol. Cells* **2012**, *33*, 363-369.
- 146) Hempel, N.; Bartling, T. R.; Mian, B.; Melendez, J. A. *Mol. Cancer Res.* **2013**, *11*, 303-312.
- 147) Tochwawng, L.; Deng, S.; Pervaiz, S.; Yap, C. T. *Mitochondrion* **2013**, *13*, 246-253.
- 148) a) Lippert, A. R.; Van de Bittner, G. C.; Chang, C. J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 793-804; b) Andina, D.; Leroux, J.-C.; Luciani, P. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 13549-13573; c) Zheng, D.-J.; Yang, Y.-S.; Zhu, H.-L. *Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 625-651.
- 149) Chang, M. C. Y.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15392-15393.
- 150) Van de Bittner, G. C.; Dubikovskaya, E. A.; Bertozzi, C. R.; Chang, C. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21316-21321.
- 151) Takagi, R.; Takeda, A.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 2656-2659.
- 152) Suzuki, A.; Hasegawa, M.; Ishii, M.; Matsumura, S.; Toshima, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4624-4627.
- 153) Aoki, Y.; Tanimoto, S.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1169-1171.
- 154) Okuyama, M.; Ueno, H.; Kobayashi, Y.; Kawagishi, H.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2169-2172.
- 155) Takahashi, D.; Nagao, T.; Sotokawa, S.; Toshima, K. *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 1224-1228.
- 156) Sotokawa, S.; Kitamura, T.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 10614-10617.
- 157) Hasegawa, M.; Suzuki, A.; Matsumura, S.; Toshima, K. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2006**, *7*, 169-174.
- 158) Suzuki, A.; Tsumura, K.; Tsuzuki, T.; Matsumura, S.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2007**, 4260-4262.
- 159) Tsumura, K.; Suzuki, A.; Tsuzuki, T.; Tanimoto, S.; Kaneko, H.; Matsumura, S.; Imoto, M.; Umezawa, K.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6357-6366.
- 160) Kitamura, T.; Okuyama, M.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Asian J.* **2019**, *14*, 1409-1412.
- 161) Tanimoto, S.; Matsumura, S.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2008**, 3678-3680.
- 162) Okochi, A.; Tanimoto, S.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6027-6029.
- 163) Hirabayashi, A.; Shindo, Y.; Oka, K.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9543-9546.
- 164) Tanimoto, S.; Sakai, S.; Matsumura, S.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2008**, 5767-5769.
- 165) Ishida, Y.; Tanimoto, S.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Med. Chem. Commun.* **2010**, *1*, 212-215.
- 166) Ishida, Y.; Fujii, T.; Oka, K.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2312-2315.
- 167) Tanimoto, S.; Sakai, S.; Kudo, E.; Okada, S.; Matsumura, S.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 911-914.
- 168) Miyake, R.; Owens, J. T.; Xu, D.; Jackson, W. M.; Meares, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7453-7454.
- 169) a) Davies, M. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 761-770; b) Pattison, D. I.; Rahmanto, A. S.; Davies, M. J. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 38-53.
- 170) a) Davies, K. J. A. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9895-9901; b) Dean, R. T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M. J. *Biochem. J.* **1997**, *324*, 1-18; c) Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20313-20316.
- 171) Kitamura, T.; Shiroshita, S.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 14351-14358.

- 172) Kitamura, T.; Nakata, H.; Takahashi, D.; Toshima, K. *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 242-245.
- 173) a) Jones, G. B.; Wright, J. M.; Hynd, G.; Wyatt, J. K.; Yancisin, M.; Brown, M. A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1863-1866; b) Furuta, T.; Sakai, M.; Hayashi, H.; Asakawa, T.; Kataoka, F.; Fujii, S.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Tanaka, K.; Fishkin, N.; Nakanishi, K. *Chem. Commun.* **2005**, 4575-4577.
- 174) Dearden, J. C.; Forbes, W. F. *Can. J. Chem.* **1960**, *38*, 1837-1851.
- 175) Taiwo, F. A. *Spectroscopy* **2008**, *22*, 491-498.
- 176) Olson, P. D.; Varner, J. E. *Plant J.* **1993**, *4*, 887-892.
- 177) Adams, G. E.; Boag, J. W.; Michael, B. D. *Trans. Faraday Soc.* **1965**, *61*, 1417-1424.
- 178) a) Moan, J.; Wold, E. *Nature* **1979**, *279*, 450-451; b) Iwamoto, Y.; Yoshioka, H.; Yanagihara, Y.; Mifuchi, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 5529-5533.
- 179) a) Hadjur, C.; Lange, N.; Rebstein, J.; Monnier, P.; van den Bergh, H.; Wagnières, G. *J. Photochem. Photobiol. B* **1998**, *45*, 170-178; b) Zhou, Y.; Wong, R. C. H.; Dai, G.; Ng, D. K. P. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 1078-1081; c) Sun, J.; Cai, X.; Wang, C.; Du, K.; Chen, W.; Feng, F.; Wang, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 868-878.
- 180) Koren, K.; Jensen, P. Ø.; Kühn, M. *Analyst* **2016**, *141*, 4332-4339.
- 181) Xu, S.; Chen, S.; Zhang, M.; Shen, T. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2048-2050.
- 182) Abo, M.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Komatsu, T.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10629-10637.

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成に当たり、多大なご指導、ご鞭撻を賜りました、慶應義塾大学理工学部 戸嶋一敦教授に心より感謝するとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行および本論文の作成に当たり、数多くのご指導、ご鞭撻を賜りました、慶應義塾大学理工学部 高橋大介准教授に深く感謝するとともに、厚く御礼申し上げます。

本論文の作成に当たり、貴重なご助言、ご指導を賜りました、慶應義塾大学理工学部 藤本ゆかり教授、末永聖武教授、荒井緑教授に深く感謝いたします。

本研究は、本論第二章の共同研究者である城下沙織氏、本論第三章の共同研究者である中田大貴氏とともに行いました。深く感謝いたします。

本研究を行うに当たり、有機合成実験および生化学実験の基礎を教えていただいた外川翔太氏に心より感謝申し上げます。

本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員奨励費、笹川科学研究助成および慶應義塾大学博士課程学生研究支援プログラムのご支援によって行われました。深く感謝いたします。

研究活動を行うに当たり、日々支え、協力していただいた先輩、同期および後輩の皆様に深く感謝いたします。

最後に、長い研究生生活を支えていただいた家族に深く感謝いたします。