HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	X線によるアゾ結合の還元的開裂を鍵反応とするケージド化合物の開発に向けた検討
Author(s)	小河原, 浩輝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第16786号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16786
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99631
Type	doctoral thesis
File Information	Koki_Ogawara_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）氏　名　　小 河 原　浩 輝

審査担当者	主　査	教　授	小 川 美 香 子
	副　査	教　授	市 川　　聡
	副　査	准教授	家 田 直 弥
	副　査	講　師	勝 山　　彬

学 位 論 文 題 名

X 線によるアゾ結合の還元的開裂を鍵反応とするケージド化合物の開発に向けた検討

博士学位論文審査等の結果について（報告）

ケージド化合物は、外部刺激により保護基が脱離することで生理活性物質として機能する分子である。特に光で活性化するケージド化合物は光の照射位置やタイミングを調節することで時空間的に優れた制御ができるため、神経科学や細胞生物学の分野で広く利用されている。これらのケージド化合物の多くは紫外-可視光によって活性化されるため、細胞やマウスなどの小動物に適応が限られていた。そこで、近年ではヒトへの応用に向け、さらに生体透過性の高い近赤外光により活性化するケージド化合物が開発されている。しかし、生体深部においては近赤外光を用いたとしても組織からの吸収や散乱による減衰の影響が無視できない。従って、生体深部においてケージド化合物を活性化させるためにはさらに透過性の高い外部刺激の利用が求められる。

そこで本研究では生体深部でのケージド化合物の制御を達成するため、生体透過性に優れた電磁波である硬 X 線を用いてケージド化合物を活性化することを考案した。しかし、硬 X 線は有機分子と相互作用しにくいため従来のケージド化合物の設計指針を適用することはできない。そこで、硬 X 線による水の放射線分解に着目した。硬 X 線を生体に照射すると、生体内に豊富に存在する水が光電効果やコンプトン散乱によって励起・電離され、ヒドロキシルラジカルや水和電子などの活性種が生成する。これらの活性種は極めて高い酸化・還元力を有し、通常は生体分子と速やかに反応して失活する。従って、生体分子との反応よりも高効率で進行する反応を開発できれば、硬 X 線によるケージド化合物の鍵反応として応用できる可能性がある。そのような反応としてアゾ結合（-N=N-）の開裂に着目した。これまでに、1-phenylazo-2-naphthol のアゾ結合が、約 2000 Gy という高線量のγ線により生じた水和電子により還元的に開裂し、生成物としてアニリンを生じることが報告されている。そこで、水和電子との反応性を高める分子設計を行うことで、アゾ結合の開裂反応をケージド化合物の鍵反応として応用できると考えた。

まず、ヒドロキシ基やアミノ基などの水素結合ドナーを導入したアゾ化合物 Azo1-4 を設計・合成した。これらの官能基はアゾ基の非共有電子対と水素結合を形成することで、アゾ基の電子密度を低下させ、水和電子との反応性を高めうると考えられる。サイクリックボルタンメトリーおよび量子化学計算の結果から、ヒドロキシ基の導入に伴い設計指針通りアゾ結合の還元電位や LUMO エネルギーが低下し還元反応が起こりやすくなる可能性が示された。しかし、硬 X 線照射を用いた検討ではアゾ結合が開裂することはが示され

たが開裂効率は Azo1-4 の間で有意差は無く、ヒドロキシ基やアミノ基を複数個有する Azo2-4 ではラジカル付加等の酸化的な副反応が増大することが示された。この結果から、アゾ結合の開裂反応を効率的に起こすためには水素結合によるアゾ結合の電子密度を低下では不十分であり。電子密度の増大に起因する副反応が起こりやすくなることが示された。

そこで、アゾ結合をπ共役系に組み込むことで電子密度を低下させる設計を考案した。そこで、ローダミン骨格を有するアゾ化合物 Azo-Rho1-3 を合成した。ローダミン骨格は長いπ共役系を有するため、LUMO エネルギーが効果的に低下し、アゾ結合の開裂を起こりやすくすると考えられる。また、正電荷を有するため、水和電子との静電相互作用による反応促進も期待される。Azo-Rho1-3 はローダミン骨格の構造は同一であるが、アゾ結合の反対に位置するベンゼン環のオルト位に異なる置換基 (水素、ヒドロキシ基、カルボキシ基)) を導入した。Azo-Rho1-3 の溶液に硬 X 線を照射するといずれの溶液からも、アゾ結合が開裂した N,N-diethylrhodamine（DR）が検出された。特にベンゼン環にヒドロキシ基を 2 つ有する Azo-Rho2 では、最も効率的にアゾ結合が開裂し、前章の Azo1-4、Azo-Rho1 および Azo-Rho3 の約 5 倍の効率で開裂した。一方で、Azo-Rho1-3 の分解量は同程度であった。なお、Azo-Rho1-3 のいずれの照射後の溶液からもラジカル付加に由来する副生成物は検出されなかった。

量子化学計算を用いて、Azo-Rho1 の LUMO および一電子還元状態の SOMO の分布を比較した。その結果、いずれの軌道もローダミン骨格からアゾ結合周辺にかけて分布することが認められ、水和電子の付着によりアゾ結合が還元されることが示唆された。さらに、HPLC、MS での分解物の解析の結果と量子化学計算の結果から、水和電子によるアゾ結合の還元は (1) 二電子還元によるヒドラジン中間体の形成；(2) ベンゼン環部のヒドロキシ基からの電子供与による 1,6-脱離の二段階の機構でアゾ結合が開裂することが明らかとなった。Azo-Rho2 はベンゼン環部の 2 つのヒドロキシ基からの共鳴効果によって脱離過程が促進するため、最も効率よくアゾ結合が開裂したと考えられる。従って、アゾ結合の開裂効率を高めるためにはローダミン骨格を導入するだけではなく二段階目の脱離反応を効率的に起こすような電子供与性置換基が必要があることが明らかとなった。

最後に、硬X線によるアゾ結合の開裂が細胞内のような夾雑環境においても起こるか検証し、さらに解明した反応機構に基づき抗がん剤を導入したケージド化合物を設計することで、硬 X 線によるアゾ結合の開裂がケージド化合物の活性化の鍵反応として応用できるか検討した。Azo-Rho2 を細胞内に取り込ませた後に硬 X 線を照射し、細胞内で生成した DR の蛍光強度を測定することでアゾ結合の開裂を評価した。その結果、硬 X 線を照射した細胞の DR の蛍光強度は線量依存的に増加することが示された。従って、細胞内においても硬X線によってアゾ結合の開裂を起こすことができることが示された。次に、アゾ結合の開裂を鍵反応として薬剤放出できるか検証するため、放出する薬剤として doxorubicin (dox) およびナイトロジェンマスタード(NM)を導入したアゾ化合物 AzoNMe-Dox、AzoOH-Dox、Azo-NM を合成した。AzoNMe-Dox、AzoOH-Dox に 20-60 Gy の硬X線を照射した結果、AzoNMe-Dox からは 40 Gy の線量でのみ dox が生成したことが示された。また AzoOH-Dox では、いずれの線量でも dox が生成された。また、Azo-NM は硬 X 線照射により NM を生成し、これが細胞増殖阻害を誘起するためのアジリジニウムカチオンを経由した置換反応を起こすことが示唆された。さらに、A549 細胞を用いたコロニーアッセイの結果から Azo-NM は 放射線増感効果を示すことが明らかとなった。これらの結果から、アゾ結合の開裂を応用すること硬X線により薬剤を放出できることが示唆された。

以上の結果より、ローダミン骨格を導入することでアゾ結合の電子密度を低下させる分子設計は水和電子との反応性を高める上で有効であり、生体内でも硬 X 線によってアゾ結合の開裂が起こせることが示された。また、この反応を利用した薬剤の放出も可能であることが示された。本研究成果は硬 X 線によるアゾ結合の開裂がケージド化合物の活性化の鍵反応となる可能性を示すものであり、生体深部において薬剤の活性化を制御することで副作用を低減させた新たな治療法への応用可能性を提示するものである。

よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。