

平成30年6月7日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21363

研究課題名(和文) 生細胞内クリックケミストリー実行時の毒性を抑制する抗酸化剤の開発

研究課題名(英文) Development of antioxidant that suppresses cytotoxicity during click chemistry in live cells

研究代表者

安田 大輔 (YASUDA, Daisuke)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・特任助教

研究者番号：40736097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：二種の分子を簡便に連結するクリックケミストリーは様々な分野で応用されているが、生細胞内で行うにあたっては触媒である銅と還元剤のアスコルビン酸(AsA)の併用により生じる活性酸素の毒性が問題となる。本研究ではこれを回避し、生細胞内クリックケミストリーを可能とする新規抗酸化剤の開発を試みた。

5-ヒドロキシオキシインドール(5-HOI)はAsAやその他の抗酸化剤と異なり、銅との併用で活性酸素を生成しなかった。5-HOIの誘導体を用い、生細胞内クリックケミストリーの効率とその時の細胞生存率を評価したところ、細胞内での反応の進行が確認され、また抗酸化剤無添加時よりも細胞生存率が改善した。

研究成果の概要(英文)：Click chemistry is one of the simple method for chemical ligation. However, due to the copper (catalyst) and ascorbic acid (reductant)-produced reactive oxygen species-dependent cytotoxicity, it is difficult to apply click chemistry in live cells. In this study, development of novel antioxidant that could suppress the cytotoxicity during click chemistry in live cells. Combination with a newly antioxidant, 5-hydroxyoxindole, and copper did not produce reactive oxygen species unlike the case of combination with copper and ascorbate or other antioxidants. Then, click chemistry reaction efficiency in live cells and cell viability using the 5-hydroxyoxindole derivative as a cytoprotectant was evaluated. As a result, the reaction proceeded without any problems apparently, furthermore, the cell viability increased by addition of the cytoprotectant compared to without no cytoprotectant treatment group.

研究分野：創薬化学、有機化学

キーワード：クリックケミストリー 抗酸化剤 5-ヒドロキシオキシインドール 生細胞イメージング 細胞毒性  
銅 アスコルビン酸

## 1. 研究開始当初の背景

クリックケミストリーは 2001 年に Sharpless らによって提唱された、二種の分子を簡便かつ高収率に連結する手法の一つである。この名称は、ベルトとバックルをカチッと合はめる ("click"する) イメージから命名された。近年、クリックケミストリーにおいて専ら汎用される反応が Huisgen 環化付加反応である。以下、本文中でクリックケミストリーと言う場合はこの反応を指す。これは、末端アルキンとアジド基を反応させ、1,2,3-トリアゾール環を構築する反応である。この反応は一価の銅イオン ( $\text{Cu}^+$ ) の存在下、非常に素早く進行し、また望まない副生成物を出さず、位置選択性に優れ、高収率で目的の化合物を得ることができる。さらに水中でも問題なく進行することから、有機合成化学のみならず、生化学や分子生物学の分野でも応用の幅が広がっている。しかし、生きた細胞の中でクリックケミストリーを実行するためには、銅イオンによる毒性発現の問題があり現在まで実用化の域には達していない。生細胞内でのクリックケミストリーを簡便に行えるようになれば、生命現象の解析や創薬へのさらなる応用が期待できる。

細胞系におけるクリックケミストリーにおいては、銅イオンそのものの毒性もさることながら、銅を還元状態の二価に保つため添加されるアスコルビン酸との組み合わせが最も問題である。一価銅は空気中の酸素を還元し、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) であるスーパーオキシド ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) を生成する。ここで酸化された銅イオン ( $\text{Cu}^{2+}$ ) はアスコルビン酸によって  $\text{Cu}^+$  へ還元され、ROS 生成サイクルが形成される。抗酸化物質であるアスコルビン酸が遷移金属イオン存在下でこのような酸化促進作用を示すことをプロオキシダント効果と呼び、このプロオキシダント効果が細胞系におけるクリックケミストリー条件の主たる毒性発現要因であると考えられる。

## 2. 研究の目的

生細胞内でクリックケミストリーを実現するためには、 $\text{Cu}^+$  とアスコルビン酸による毒性を抑える必要がある。最も単純かつ効果的と思われる方策は、プロオキシダント効果によって生じる ROS を補足・消去することである。しかし、アスコルビン酸がそうであるように、ROS を消去する抗酸化物質は銅イオンを還元するおそれがあるため添加により毒性が増強する可能性がある。研究代表者は、鉄イオン及び銅イオン存在下でプロオキシダント効果を示さず、一方で強い抗酸化活性を有する新規抗酸化剤 5-ヒドロキシオキシインドール (Fig. 1) を見出ししている。また研究代表者は、この 5-ヒドロキシオキシインドールの抗酸化活性を保ったまま、脂溶性を向上し細胞内以降性を高める修飾法も既に

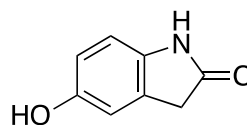


Fig.1 5-ヒドロキシオキシインドール

開発しており、5-ヒドロキシオキシインドールはプロオキシダント効果のない新規抗酸化物質の基本骨格として有用であると考えられる。そこで研究代表者は、5-ヒドロキシオキシインドールを基に生細胞内クリックケミストリー実行時の毒性を抑制する新規ツール化合物の創製に着手した。

## 3. 研究の方法

実際に生細胞内クリックケミストリーを行う前に、銅+アスコルビン酸による毒性の詳細な評価と、クリックケミストリーに汎用される配位子 (銅イオンの触媒活性をさらに高めるもの) の ROS 生成作用に及ぼす効果を評価した。また、5-ヒドロキシオキシインドール及びその他既存の抗酸化物質の銅存在下でのプロオキシダント効果を精査した。さらに、細胞内への取り込みを増強させるため、エステル化によりプロドラッグとした 5-ヒドロキシオキシインドール誘導体の合成と、それら自身の細胞毒性を評価した。最後に、Huisgen 反応が起こると蛍光を発するアルキン誘導体を用いて、5-ヒドロキシオキシインドール誘導体を併用した場合の細胞内クリックケミストリーの効率と毒性軽減効果を評価した。

## (1) 銅+アスコルビン酸の細胞毒性

銅+アスコルビン酸併用による細胞毒性を、ROS 感受性の高いヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 を用いて検討した。細胞生存率は Vi-CELL XR (BECKMAN COULTER) を用いたトリパンブルー色素排除法により評価した。

## (2) クリックケミストリー用配位子の ROS 生成効果

銅イオンと抗酸化物質のプロオキシダント効果によって発生するヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) を DMSO と反応させホルムアルデヒドへと変換し、Nash 試薬 (発色剤) とホルムアルデヒドの反応によって生成したルチジン誘導体の 412 nm における吸光度を測定することにより、ROS 生成量を間接的に求めた。

マイクロプレート (96 ウェル) に、被検化合物の DMSO 溶液 (5  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) 及びアスコルビン酸ナトリウムのナトリウムリン酸緩衝液溶液 (pH7.4, 100  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{M}$ ) を加え、氷上に静置した。次いで、硫酸銅五水和物 (45  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) を加え、37°C で振盪した。1 時間後、Nash 試薬を加え 37°C で 40 分間振盪し

た。マイクロプレートリーダーにより 412 nm (参照波長 600 nm) の吸光度を測定し、硫酸銅無添加群との吸光度の比から相対的 ROS 生成量を算出した。

### (3) 抗酸化剤のプロオキシダント効果

前項と同様の方法で、アスコルビン酸を各種抗酸化剤に置き換えて比色法により ROS 生成量を求めた。

### (4) プロドラッグ化を志向した 5-ヒドロキシオキシインドール誘導体の合成

市販の 5-ヒドロキシオキシインドールと酸クロリドをジクロロメタン中、ピリジンを添加して反応させることにより、5-アシロキシオキシインドール類を得た。

### (5) 新規 5-アシロキシオキシインドール誘導体の細胞毒性

HL-60 細胞または OVCAR-5 細胞に対して所定濃度の被検化合物を曝露し、24 時間インキュベート後の細胞生存率を Vi-CELL XR により求めた。

### (6) 生細胞内クリックケミストリー効率と細胞生存率の評価

以上の実験より得た知見から、抗酸化剤として 5-アセトキシオキシインドール、配位子としてトリス[(1-ベンジル-1*H*-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル]アミン (TBTA) を選択し、生細胞内クリックケミストリー効率と細胞生存率の同時評価を行った。

OVCAR-5 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL で播種し 24 時間プレインキュベート) に 5-アセトキシオキシインドール、3-アジド-7-ヒドロキシ-2*H*-クロメン-2-オン、4-エチルアニソールそれぞれの DMSO 溶液 (各 100  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ L) を加えて 1 時間プレインキュベートした。次いで、培地を吸引除去し、細胞を PBS で 3 回洗浄後、新しい培地を加え、予め調整した銅 (100  $\mu$ M) : TBTA (400  $\mu$ M) 混液および L-アスコルビン酸ナトリウム (400  $\mu$ M) を添加した。3 時間後、3-アジド-7-ヒドロキシ-2*H*-クロメン-2-オンと 4-エチルアニソールの Huisgen 反応による連結体の蛍光発光を蛍光顕微鏡により観察した。また、24 時間後の細胞生存率を Vi-CELL XR により評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 銅+アスコルビン酸の細胞毒性

硫酸銅 (100  $\mu$ M) とアスコルビン酸 (100~400  $\mu$ M) の併用により、細胞生存率は有意に低下した (Fig. 2)。アスコルビン酸は 100  $\mu$ M 添加時で細胞生存率を 20%まで低下させた。一般的にクリックケミストリーを円滑に進行させるため加えるアスコルビン酸濃度は数百  $\mu$ M 程度であり、そのような濃度では細胞へのダメージが非常に大きいことが示された。なお、銅 (100  $\mu$ M) 及びアスコルビ

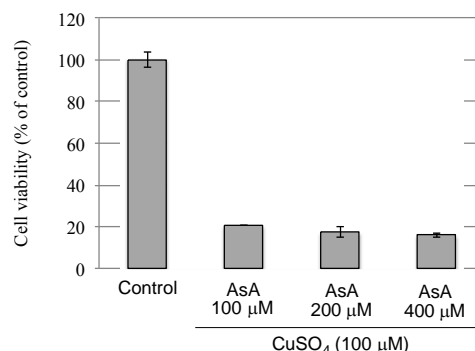


Fig. 2 銅+アスコルビン酸の細胞毒性

AsA: sodium L-ascorbate

ン酸 (400  $\mu$ M) をそれぞれ単独で添加した場合では、有意な細胞毒性は見られなかった (data not shown)。

### (2) クリックケミストリー用配位子の ROS 生成効果

クリックケミストリーに汎用される配位子として、TBTA、トリス(2-ベンゾイミダゾリルメチル)アミン ((BimH)<sub>3</sub>)、トリス(3-ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル)アミン (THPTA) の三種について銅+アスコルビン酸存在下における ROS 生成への影響を検討した。その結果、TBTA は配位子を加えない条件よりもわずかに ROS 生成を増強し、一方で (BimH)<sub>3</sub> は ROS 生成に影響しなかった (Fig. 3)。しかし、THPTA を加えた際、ROS 生成量はコントロールの約 25 倍まで増強した。これには Cu<sup>+</sup>に対する配位能の高さが影響していると考えられる。THPTA は他の配位子に比べ水溶性が高く培地中などでも扱いやすいものの、ROS 生成増強能の高さを考えると細胞系におけるクリックケミストリーに用いるには不適であると考えられる。なお、各配位子はアスコルビン酸無添加時では ROS 生成増強効果を示さなかった (Fig. 3)。

### (3) 抗酸化剤のプロオキシダント効果

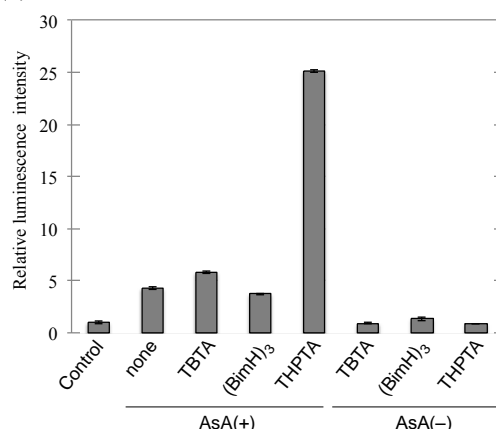
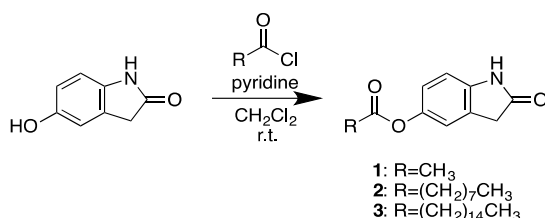


Fig. 3 配位子類の ROS 生成促進効果

5-ヒドロキシオキシインドール、エダラボン (ラジカル消去剤)、タイロン ( $O_2\cdot$  消去剤)、エブセレン ( $H_2O_2$  消去剤) について銅依存プロオキシダント効果を評価した。5-ヒドロキシオキシインドールは 5000  $\mu$ M まで有意なプロオキシダント効果を示さなかった。エダラボンは 200  $\mu$ M 以上で有意なプロオキシダント効果を示し、1000  $\mu$ M でコントロールの 3 倍程度まで ROS 生成を増強した。タイロンも 250~1000  $\mu$ M までで 3 倍程度まで ROS 生成を増強したが、濃度依存性は見られなかった。エブセレンは 250  $\mu$ M で 6 倍程度の ROS 生成増強効果を示した。以上より、5-ヒドロキシオキシインドールは高濃度でもプロオキシダント効果を示さない抗酸化剤であることが示された。

#### (4) プロドラッグ化を志向した 5-ヒドロキシオキシインドール誘導体の合成



Scheme 1 5-アシロキシオキシインドール類の合成

5-ヒドロキシオキシインドールと対応するアシルクロリドの反応により、5-アセトキシオキシインドール、5-(オクタノイルオキシ)オキシインドール、5-(パルミトイルオキシ)オキシインドールをそれぞれ合成した (Scheme 1)。各誘導体の収率は、1: 86%、2: 78%、3: 95%であった。

#### (5) 新規 5-アシロキシオキシインドール誘導体の細胞毒性

HL-60 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  cell/mL) に対し 5-ヒドロキシオキシインドール及び化合物 1、2、3 を曝露したところ、5-ヒドロキシオキシインドール及び 1 は 200  $\mu$ M まで細胞毒性を示さず、むしろ細胞増殖を促進した (Fig. 4)。一方で 2 は濃度依存的な細胞毒性を示した (Fig. 4)。また、3 はいずれの濃度でも細胞生存率に影響しなかった (Fig. 4)。

化合物 1 と 2 の結果から、アルキル基を伸長しすぎると毒性が増強することが示された。また、さらにアルキル基を伸長した 3 は培地中での析出が観察されたことから、脂溶性が高すぎるため培地中に分散できず、細胞内に入らなかったと予想される。以上より、1 を 5-ヒドロキシオキシインドールのプロドラッグとして細胞内クリックケミストリー

の assay に用いることとした。

実際にクリックケミストリー assay に用いる OVCAR-5 細胞に対しても化合物 1 の毒性を同様に検討した結果、1 はやはり 200  $\mu$ M まで有意な毒性を示さなかった (data not shown)。

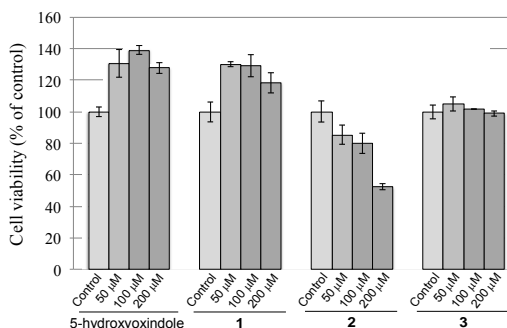


Fig. 4 5-アシロキシオキシインドール類の HL-60 に対する細胞毒性

#### (6) 生細胞内クリックケミストリー効率と細胞生存率の評価

3. 研究の方法 (6) に従い、各種化合物を加えて Huisgen 反応を試みたところ、反応開始 4 時間で反応生成物による蛍光が細胞と重なる部位でのみ観察された。この時、抗酸化剤 1 (100  $\mu$ M) を添加しなかった群では培地中での蛍光発光が見られたことから、細胞死により蛍光物質が漏出したことが示唆された。また反応開始 24 時間後の細胞生存率を Vi-CELL XR により評価したところ、抗酸化剤 1 無添加群では細胞生存率が 15%程度だったのであったのに対し、1 添加群では 60%程度の細胞生存率を維持していた。

以上の結果より、本研究においてプロオキシダント効果のない抗酸化剤の添加により細胞毒性を軽減しつつ生細胞内でクリックケミストリーを行うことが可能であることが示された。現在、5-ヒドロキシオキシインドールの各活性酸素種に対する消去活性と、細胞生存率を 100%に維持するための方法を探索しており、さらに LC-MS を用いた細胞内クリックケミストリー効率の詳細な評価、及び実用化に向けた毒性以外の問題点解決についての検討を予定している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Daisuke Yasuda, Kyoko Takahashi, Tomoyuki Ohe, Shigeo Nakamura, Tadahiko Mashino, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **2016**, 59, 165-173 (査読あり)。

〔学会発表〕(計4件)

新野智美、小室友紀、上田史仁、多胡憲治、柳澤健、安田大輔、高橋恭子、増野匡彦、多胡めぐみ、田村悦臣、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日、横浜。

新野智美、小室友紀、上田史仁、多胡憲治、柳澤健、安田大輔、高橋恭子、増野匡彦、多胡めぐみ、田村悦臣、5-Hydroxyoxindole 誘導体の LPS シグナル経路阻害による抗炎症作用、第89回日本生化学会大会、2016年9月25日、仙台。

新野智美、安田大輔、高橋恭子、増野匡彦、多胡めぐみ、田村悦臣、5-Hydroxyoxindole 誘導体による抗炎症作用機序の解明、第60回日本薬学会関東支部大会、2016年9月17日、東京。  
新野智美、小室友紀、上田史仁、多胡憲治、柳澤健、安田大輔、高橋恭子、増野匡彦、多胡めぐみ、田村悦臣、5-Hydroxyoxindole 誘導体を示す抗炎症作用の分子機構の解析、第69回日本酸化ストレス学会学術集会、2016年8月30日、仙台。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 大輔 (YASUDA Daisuke)

慶應義塾大学・薬学部・特任助教

研究者番号：40736097

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )