

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05456

研究課題名(和文) 複合刺激応答型金属錯体に立脚した選択的抗がん剤の開発

研究課題名(英文) Development of multi-stimuli-responsive metallodrugs

研究代表者

平原 将也 (Hirahara, Masanari)

大阪工業大学・工学部・准教授

研究者番号：90609835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：金属イオンと有機物が結合した金属錯体は、さまざまながんへの抗がん剤として実用化されている。抗がん剤の開発において、プロドラッグを選択的にドラッグに変換し、かつ細胞選択的に作用させることは重要な課題である。本研究課題では、pH応答性と光応答性を併せ持つルテニウム錯体について、抗がん剤への展開を試みた。本研究で用いたルテニウムピラゾール錯体は、pH 7を境に光反応性が大きく変化し、正常細胞とがん細胞間で反応性が異なりうることを示唆された。錯体の肺がん細胞に対する抗がん活性を調べた結果、光照射下において、 10^{-8} Mという極めて低濃度においても抗がん活性を有することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは死因の約半数を占めるだけでなく、壮年期においても主要な死因の一つであり、画期的ながんの治療法が模索されている。シスプラチンに代表される金属錯体由来の抗がん剤は、DNAに金属が直接結合するために活性が高いものの、副作用が大きいことが知られている。本研究課題では、光応答性とpH応答性を併せもつ金属錯体を用いて、がん細胞が存在するpH領域で、抗がん活性のある金属錯体種に変化しがん細胞を細胞死させる反応系の構築を目指した。得られた金属錯体は、光照射によって抗がん活性が増加し、 10^{-8} Mという極めて低濃度で肺がん細胞に対する毒性を示すことが見出され、光駆動型の抗がん剤としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Metal complexes have been used commercially as anticancer agents. In the development of metallodrugs based anticancer agents, increase of cell selectivity is one of the important points. In this study, we developed polypyridyl ruthenium complexes, which are both pH- and photo-responsive into anticancer agents. The photoreactivity of ruthenium pyrazole complexes changed significantly after pH 7, suggesting that the reactivity may differ between normal cells and cancer cells. The anticancer activity of the complex against lung cancer cells (A549) was also investigated, and it was found that the complex had anticancer activity even at a very low concentration of 10^{-8} M under photoirradiation.

研究分野：錯体化学

キーワード：ルテニウム 光配位子置換反応 抗がん剤 光反応 光異性化 メタロドラッグ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの薬物療法において、副作用を抑え、かつがん細胞選択的な抗がん剤を開発することは喫緊の課題である。がんの治療において、光刺激によってがん細胞の細胞死を引き起こすことができれば、遠隔刺激によって腫瘍を取り除くことができる。光刺激によるがん治療方法として、金属錯体の光配位子置換反応が着目されてきた。光配位子置換反応とは、光刺激によって配位子が光解離し、溶媒分子などと置換する反応である。ルテニウム錯体は熱的に極めて安定である一方、適切な分子設計によって光配位子置換反応を制御することができる。この光配位子置換反応を利用して、数多くの光駆動型の抗がん剤の研究が報告されてきたが、既報の錯体には正常細胞およびがん細胞の選択性はないという根本的な課題が残されていた。

研究開始当初の時点において、我々は錯体の光配位子置換反応において、配位子間の分子内水素結合が光安定性を決定する重要な因子であることを予備的に見出した。単座配位子(ピラゾール)間の分子内水素結合の有無により、光安定性は10万倍の差があることを見出した。本課題では、がん細胞と正常細胞中でのpHの違いに着目し、本研究では、がん・正常細胞のpHの違いと、ルテニウム錯体の光反応性を利用した外部環境応答型の抗がん剤の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究課題では、pHにより光反応性が制御できるルテニウム錯体を細胞選択的な抗がん剤へ展開することを主たる目的とした。具体的には、分子内水素結合をpHによって制御できるルテニウムピラゾール錯体を用いて、錯体の光反応性を化学的手法で評価し、抗がん剤としての評価を細胞中で行うこととした。

3. 研究の方法

- (1) 分子ライブラリ作成 分子内水素結合を有する一連のルテニウムピラゾール錯体の合成を行い、NMR, 単結晶X線構造解析により、金属中心の構造および分子内水素結合などの構造情報を得た。紫外可視吸収スペクトル測定により、錯体のpKaを決定した。
- (2) 溶液中での反応性評価 合成した錯体の光反応性を水溶液中で評価した。種々のpH下において水溶液を調製し、LED照射下で紫外可視吸収スペクトルの測定を行った。また、照射に伴う一重項酸素の定量は、1,3-diphenylisobenzofuranを用い評価した。
- (3) 細胞中での評価 一連の錯体について、研究分担者と共同して抗がん剤としての評価を行った。具体的には暗所および光照射下での錯体の活性評価を行った。分担者と共同して、肺がん細胞(A549)を対象に細胞生存率の濃度依存性、光依存性を評価した。

4. 研究成果

(1) ルテニウムピラゾール錯体の合成と同定

図1に示すような一連の錯体を合成した。ピラゾール錯体については、4位にクロロまたは、ニトロ基を導入した錯体を新規に合成した。ニトロ基を有する錯体については、電子吸引性のニトロ基の影響により、中性付近では双方のピラゾールのN-Hプロトンが脱プロトン化するため、水溶液への溶解性が悪く、研究の対象としなかった。一方クロロ基を持つ錯体**2a**はpKa₁が約7と中性付近で脱プロトン化を示した。錯体**1b**については、単結晶が得られたため単結晶X線構造解析を行った。この結果、錯体**1b**は4-クロロピラゾール間で同一平面を形成し、N-H...N分子内水素結合を形成していることが示された。ピラゾール錯体の合成を研究する中で、分子内水素結合を持つ錯体は、従来の熱合成ではなく、光反応でも得られることが実験的にわかった。(M. Hirahara et al., Inorg. Chem., 2021)

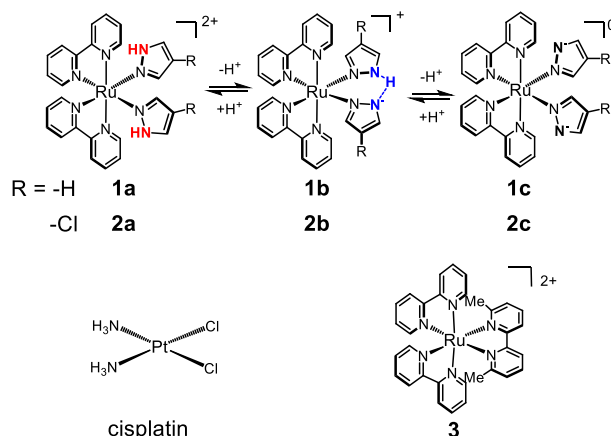


図1. 本研究課題で合成および抗がん活性を評価した錯体

(2) 錯体の光反応性評価

これらのピラゾール錯体 **1a** および **2a** は双方ともに水溶液中で容易に光解離を示した。一方、脱プロトン化により生成する **1b** および **2b** の光配位子置換反応の反応速度は遅くなった。特に中性付近に pK_a をもつ錯体 **2a** は pH = 3.8 で $\Phi = 0.042$ であるのに対し、pH = 7.0 で $\Phi = 0.0065$ 、pH = 7.4 で $\Phi = 0.0043$ と中性付近で大きく減少した。錯体 **3** は pH を変えても光反応量子収率に変化はなかった(図 2)。錯体 **2a** の光配位子置換反応を $^1\text{H NMR}$ により評価した結果、光照射に伴いフリーのクロロピラゾールのピークがあらわれ、選択的なクロロピラゾールの光解離が確認された。

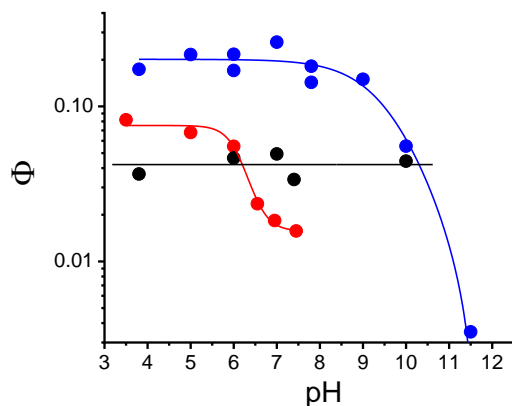


図 2. 水溶液中における錯体 **1** (blue), **2** (red), **3** (black) の光配位子置換反応量子収率(Φ)の pH 依存性。光源：青色 LED ($\lambda = 470 \text{ nm}$, 14 mW cm^{-2})。

(3) 錯体の抗がん活性評価

肺がん細胞 (A549) に対する、一連のルテニウムピラゾール錯体 (**1a**, **2a**)、シスプラチンおよび錯体 **3** の抗がん作用を、暗所および可視光照射下において実験的に評価した(図 3)。光源にはハロゲンランプを用い細胞に 10 分間の光照射を行い、その後 40 時間培養した。錯体 **1**~**3** とシスプラチンの活性については、半減期阻害濃度 (IC_{50}) および Photocytotoxicity Index (PI) により評価した。錯体 **1a** の A549 に対する IC_{50} は $43 \pm 3 \mu\text{M}$ 程度であり、既報のルテニウム錯体と同等の活性であった。錯体 **1a** の活性は、光照射下でわずかに向上し、 $IC_{50} = 12 \pm 2 \mu\text{M}$ となった。ピラゾールにクロロ基を導入した錯体 **2a** は、A549 細胞に対してこれまでにない高い活性を示した。暗所では、**2a** の IC_{50} ($0.44 \pm 0.07 \mu\text{M}$) は **1a** よりはるかに低く、 10^{-7} M オーダーの活性を示した。さらに、可視光照射下で活性は約 7 倍上昇し、 IC_{50} は $0.060 \pm 0.016 \mu\text{M}$ であった。この数値は既報の文献と比較しても極めて高い活性であった。**2a** を添加した後、細胞の周囲に細胞破片が観察され細胞のアポトーシスが起きていることが示唆された。細胞アポトーシスについては、ヒストン複合体化 DNA 断片の免疫化学的測定により評価した。暗所での試料では、錯体の濃度が高くなるにつれて吸光度がわずかに上昇した。一方、光を照射したサンプルでは、吸光度の明確な増加が観察され、細胞死は主にアポトーシスから生じていることが示された。

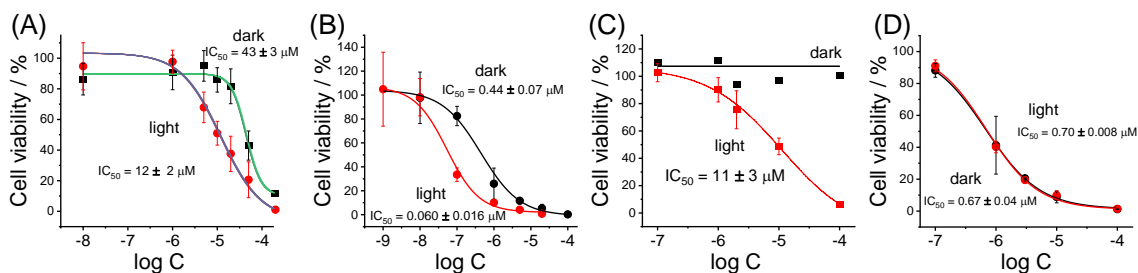


図 3. Cytotoxicity dose responses of metal complexes toward A549 cells: (A) **1a**; (B) **2a**; (C) **3**; and (D) cisplatin. Dark conditions (black line), irradiated samples, 10 min with halogen lamp $> 340 \text{ nm}$ light (red line) ($n = 3$)

次に錯体 **2a** の高い抗がん活性について、追加実験を行った。一般的にルテニウム錯体を用いた抗がん剤研究において、細胞毒性は光配位子置換反応による金属の DNA に対する配位、または一重項酸素の生成によって生じることが知られている。本課題では、一重項酸素の生成を検証するために、1,3-diphenylisobenzofuran を用い評価した。参照物質として用いたトリス(2,2'-ビピリジン)ルテニウムでは、LED 光照射後すぐに一重項酸素の生成が確認された一方、本研究で用いた錯体 **2a** からは一重項酸素の生成はほとんど見られず一重項酸素生成量子収率はトリス

(2, 2'-ビピリジン)ルテニウムの 20 分の 1 程度であった。次に、錯体の脂溶性を評価するために、水-オクタノール分配係数を測定した。この結果、錯体は脱プロトン化によって、錯体全体の電荷が 2+ から 1+ となり脂溶性が大きく増加することが分かった。以上の結果から錯体 **2a** の高い活性は (a) 中性付近での脂溶性増加に伴う細胞膜透過性の増加 (b) 選択的な光配位子置換反応 によって達成される結果が示唆された。

(4) 外部刺激応答性錯体を用いた分子認識と DNA 部分構造への反応性制御

ピラゾール錯体に加えて、三座—非対称二座配位子を有するルテニウム錯体について刺激応答性と反応性評価を行った。図 4 に示す錯体は、外部刺激に応用してアルキル鎖の配置が変化する。この特性に着目し、刺激応答に伴うホストゲスト挙動と、DNA 部分構造 (9-エチルグアニン) との反応性評価を行った。

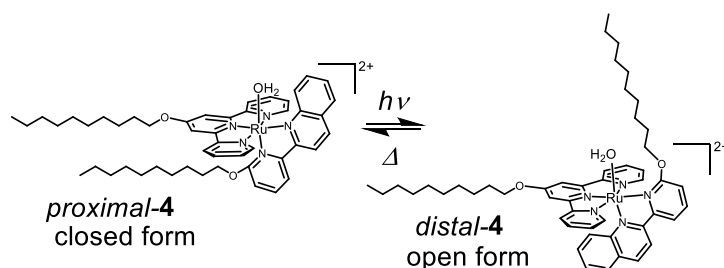


図 4. 錯体 **4** の光異性化反応と熱異性化反応

錯体 **4** とホスト分子 (α , β , γ -シクロデキストリン) とのホストゲスト錯形成挙動を滴定実験により評価した。この結果、*proximal-4* と γ -CD について Job plot を作成すると、比率 0.5 において、極大値が見られた。¹H-¹H ROESY を測定した結果、錯体上のプロトンと CD 空孔内の C-H プロトンの間でクロスピークが観測された。この結果から *proximal-4* と γ -CD は図 5 のようなモデルで 1:1 包接化合物を作ることが示唆された。*proximal-4* は α 、 β -CD に対する結合定数は小さい一方、 γ -CD に対しては比較的高い選択性を有していた。次に γ -CD 存在下で *proximal-4* の異性化を繰り返す実験を行った。*proximal-4* の γ -CD を含む溶液中において、遊離した *proximal-4* と γ -CD が包接している *proximal-4* は 18 : 82 の割合で存在していた。照射による *proximal-4* の光異性化に伴って、溶液中のホストフリーの *proximal-4* と *distal-4* の総量が 34 % に増加した。次に、溶液を暗所下で加熱すると照射前の溶液の組成に戻った。このような組成の変化は複数回繰り返すことが可能であり、再現性良く制御することができた。これらの結果は、機能を付与したホスト-ゲスト反応系の確立を支持する。(M. Hirahara et al., Dalton Trans. 2022)

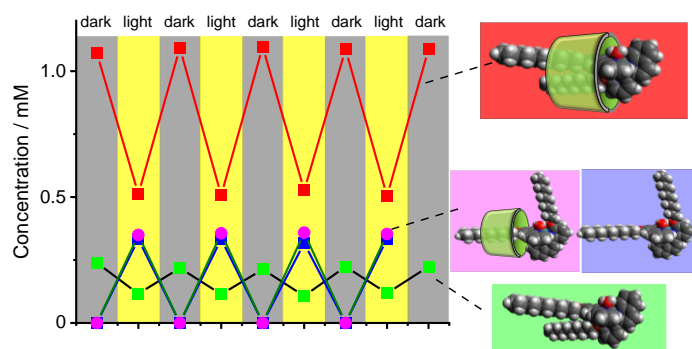


図 5. Changes in the concentrations of free *proximal-4* (green), *proximal-4* \subset γ -CD (red), free *distal-4* (blue), and *distal-4* \subset γ -CD (magenta) upon external stimulation.

また、錯体 **4** は DNA の部分構造である、9-エチルグアニンと反応においても外部刺激応答性を示した。反応場であるルテニウムアqua錯体近傍にキノリン部位がある *proximal-4* については、アqua配位子とキノリン部位の立体反発によりアqua配位子が脱離し、 $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ で 9-エチルグアニンとの反応を示した。一方、異性化した *distal-4* についてはアqua配位子とエーテルの酸素原子との間に分子内水素結合があるために、アqua配位子の脱離が遅く、9-エチルグアニンとの反応速度は *proximal* 型の異性体と比べて一桁小さかった (図 6)。この結果は、刺激応答性材料、メタロドラッグ、分子認識などの設計に寄与すると期待できる。(M. Hirahara et al., submitted)

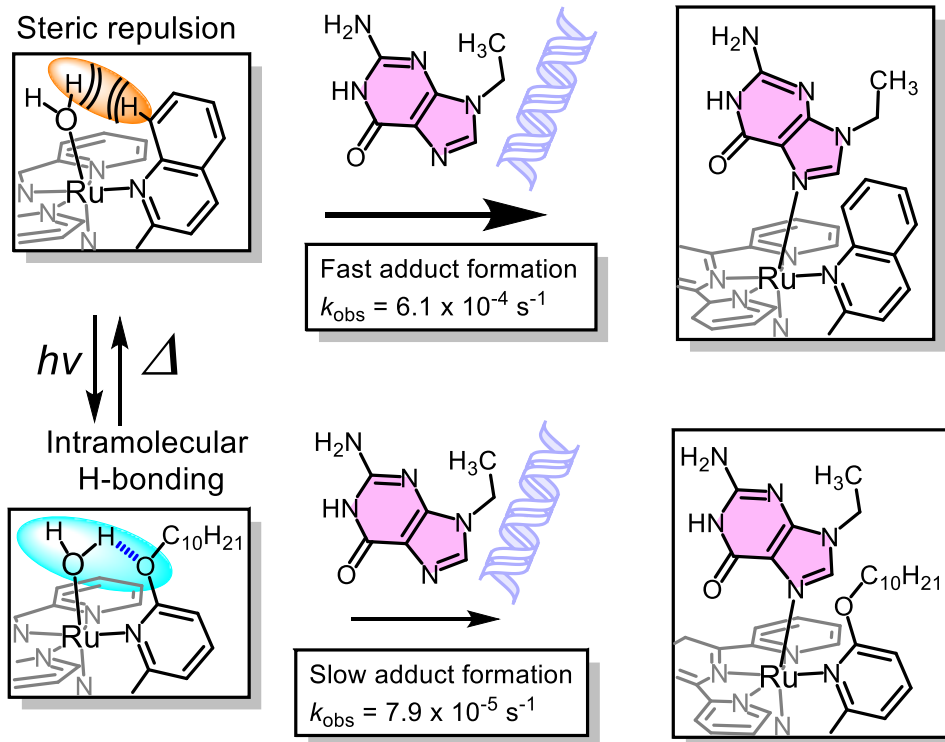


図 6. 錯体 **4** の異性体間での 9-エチルグアニンとの反応性の違い

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirahara Masanari, Umemura Yasushi	4. 巻 60
2. 論文標題 A Synthetic Route to a Ruthenium Complex via Successive Photosubstitution Reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 13193 ~ 13199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.1c01578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanahashi Yuki, Takahashi Kosuke, Tsubonouchi Yuta, Nozawa Shunsuke, Adachi Shin-ichi, Hirahara Masanari, Mohamed Eman A., Zahran Zaki N., Saito Kenji, Yui Tatsuto, Yagi Masayuki	4. 巻 118
2. 論文標題 Mechanism of H ⁺ dissociation-induced O-O bond formation via intramolecular coupling of vicinal hydroxo ligands on low-valent Ru(III) centers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2113910118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2113910118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirahara Masanari, Furutani Shota, Goto Hiroki, Fujimori Keiichi, Moriuchi-Kawakami Takayo	4. 巻 51
2. 論文標題 A visible-light and temperature responsive host-guest system: the photoisomerization and inclusion complex formation of a ruthenium complex with cyclodextrins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 4477 ~ 4483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1dt04003k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirahara Masanari, Goto Hiroki, Yagi Masayuki, Umemura Yasushi	4. 巻 56
2. 論文標題 A multi-stimuli responsive ruthenium complex for catalytic water oxidation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12825 ~ 12828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc04940a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirahara Masanari, Nakano Hiroyuki, Uchida Kyohei, Yamamoto Rei, Umemura Yasushi	4. 巻 59
2. 論文標題 Intramolecular Hydrogen Bonding: A Key Factor Controlling the Photosubstitution of Ruthenium Complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 11273 ~ 11286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.0c00738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanahashi Yuki, Nagai Sho, Tsubonouchi Yuta, Hirahara Masanari, Sato Taisei, Mohamed Eman A., Zahran Zaki N., Saito Kenji, Yui Tatsuto, Yagi Masayuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Efficient Electrocatalytic Water Oxidation by a Dinuclear Ruthenium(II) Complex with Vicinal Aquo and Hydroxo Groups Adsorbed on a TiO ₂ Electrode	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Energy Materials	6. 最初と最後の頁 12172 ~ 12184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsaem.0c02242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Atsushi, Takizawa Shin-ya, Hirahara Masanari	4. 巻 467
2. 論文標題 Photofunctional molecular assembly for artificial photosynthesis: Beyond a simple dye sensitization strategy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Coordination Chemistry Reviews	6. 最初と最後の頁 214624 ~ 214624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccr.2022.214624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsubonouchi Yuta, Watanabe Takeumi, Yoshida Kazuha, Watabe Shunsuke, Inaba Keisuke, Hirahara Masanari, Hatanaka Tsubasa, Funahashi Yasuhiro, Chandra Debraj, Hoshino Norihisa, Zahran Zaki N., Yagi Masayuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Distinctive Aspects in Aquation, Proton-Coupled Redox, and Photoisomerization Reactions between Geometric Isomers of Mononuclear Ruthenium Complexes with a Large-π-Conjugated Tetradentate Ligand	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 13956 ~ 13967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.2c01937	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masanari Hirahara, Hiroki Goto, Yasushi Umemura
2. 発表標題 A Multi-Stimuli-Responsive Water Oxidation Catalyst
3. 学会等名 錯体化学会第70回討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	上北 尚正 (Uekita Takamasa) (50373402)	防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、 電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・准教授 (82723)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------