

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05533

研究課題名(和文) レドックス制御と低酸素部位指向性配位子設計による固形がん用プロドラッグ錯体の開発

研究課題名(英文) Development of the redox controlled Co(III) complexes having hypoxic tumor targeting ligands for solid tumors

研究代表者

中井 美早紀 (Nakai, Misaki)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：40527115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Co(III)錯体ならびにCo(II)錯体は、これまで細胞毒性はなく、抗がん作用を持つ配位子を組み合わせるにより、drug delivery systemとして用いられてきた。本研究では、細胞毒性のない配位子をもつポリピリジル炭酸Co(III)錯体が、細胞毒性ならびに特に低酸素腫瘍細胞に細胞毒性を持つことを見出し、Co(III)錯体自体に抗がん作用を持つことを見出した。特に還元剤であるアスコルビン酸との反応性が早い4-methyl-1,10-phenanthroline配位子を持つCo(III)錯体が低酸素腫瘍細胞に対して、最も強い細胞毒性を持つことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素腫瘍細胞は、がんの浸潤や転移といった、がんの悪性化につながるにも関わらず、シスプラチンなどの従来の抗がん薬に対して耐性を持つ。また、溶存酸素を利用する光線力学的療法や、放射線治療も効果が期待できず、低酸素腫瘍細胞に効果的な抗がん薬の開発が望まれている。Co(III)錯体自体が、従来抗がん作用はないと報告されてきた。しかしながら、Co(III)錯体自体の抗がん作用と抗がん作用メカニズムが解明されれば、低酸素腫瘍細胞の治療に加えて、今まで抗がん薬として開発されてきたPt錯体、Pd錯体、Ru錯体のような、高価な金属に代わって、安価な抗がん薬の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：It was reported that Co(III) and Co(II) complexes were non-cytotoxic, and that Co(III) complexes have been used as a drug delivery system by coordinating anticancer ligands. However, we found that Co(III) complexes having non-cytotoxic ligands, i.e., polypyridine, exhibited antitumor activities, especially high anti-tumor activities against hypoxic tumor cells. In particular, It was found that Co(III) complex with 4-methyl-1,10-phenanthroline ligands had the most cytotoxic against hypoxic tumor cells. And, the reduction rate of Co(III) complex with 4-methyl-1,10-phenanthroline ligands with ascorbic acid is the fastest, suggesting the hypoxia antitumor activities of Co(III) complexes were dependent of their reduction activities. These results suggested that the anticancer activity of Co(III) complexes against hypoxic tumor strongly depends on the reducibility of the Co(III) complexes and their reactivity with ascorbic acid.

研究分野：生物無機化学

キーワード：Co(III)錯体 低酸素腫瘍細胞 抗がん薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

固形がんの中心にある低酸素腫瘍細胞は、がんの浸潤や転移といった悪性化につながるため、低酸素腫瘍細胞の治療は重要な研究課題の一つである。しかしながら、低酸素腫瘍細胞はシスプラチンなどの従来の抗がん薬に対して抵抗性を持つ。また光線力学的療法や、放射線療法は細胞内の溶存酸素を利用するため、低酸素腫瘍細胞には適応が困難である。そこで低酸素腫瘍細胞に効果的な治療法として Co(III)錯体の利用が報告されてきた。低酸素腫瘍細胞は、他の正常細胞に比べて、還元的雰囲気下にあると言われている。Co(III)錯体は置換不活性であるため配位子の解離は観測されないが、Co(II)錯体は置換活性のため、一部の配位子の解離が観測される。そこで低酸素腫瘍細胞が還元的雰囲気下にあることを利用して、低酸素腫瘍細胞に取り込まれたときのみ、Co(II)錯体に還元され、Fig. 1.の赤色で示した、*N,N*-ビス(2-クロロエチル)エチルアミンなどの細胞毒性のある配位子が解離されて、低酸素腫瘍細胞のみに毒性のある Co(III)錯体の開発がされてきた。(Fig. 1)

これまでの研究では配位子を放出した Co(III)錯体自体に細胞毒性はなく、Co(III)錯体は、drug delivery system として使用されてきた。しかしながら、Ru(II)錯体に多く報告される通り、配位子を放出した金属錯体は DNA と結合し、細胞毒性を示すことが知られている。そこで本研究では配位子に毒性のない Co(III)錯体の低酸素腫瘍細胞への抗がん効果を調べることにより、従来のレアメタル(Pt, Pd, Ru など)依存の金属抗がん薬にたいして、安価な金属抗がん薬の開発を目指す。

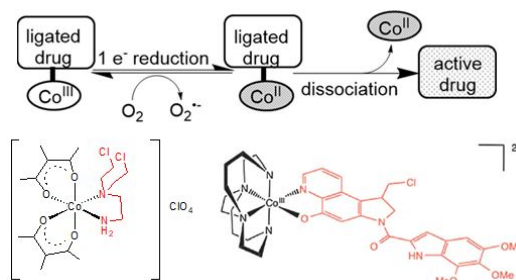


Fig. 1. The mechanism of the Co(III) complexes as drug delivery system and the Co(III) complexes having cytotoxic ligands.

### 2. 研究の目的

#### (1) 低酸素腫瘍細胞に対して抗がん活性をもつ Co(III)錯体の開発

既報の合成錯体をもとに配位子として 2,2'-bipyridine, 1,10-phenanthroline およびポリピリジル配位子を持つ Co(III)錯体の合成を行い、その抗がん活性評価を行う。また Co(III)錯体の還元電位と抗がん活性評価を検討するために tripyridilamine 配位子を持つ Co(III)錯体の合成と細胞毒性評価を行う。

#### (2) 蛍光性配位子を持つ Co(III)錯体の開発

低細胞腫瘍細胞内で配位子の解離を観測するために、クマリン誘導体を持つ傾向性配位子の合成と Co(III)錯体の合成を行い、低酸素腫瘍細胞内でのクマリンからの蛍光を観測する。

### 3. 研究の方法

(1) 既報をもとに、Fig.2 に示される Co(III)錯体の合成と同定を行う。これらの酸化還元電位、アスコルビン酸などの還元剤を用いた還元雰囲気下での化学種の特定、反応速度と抗がん活性評価を行うことにより、低酸素腫瘍細胞への効果的な Co(III)錯体の効果的なドラッグデザインの最適化を行う。(2020 ~ 2022 年)

(2) 実際に低酸素腫瘍内で Co(III)錯体が Co(II)に還元され、結合した配位子の解離が起こっているかを検討するために、ポリピリジル Co(III)錯体にクマリン誘導体を持つ配位子の導入を検討した。

Co(III)錯体にクマリン部位を持つ配位子が結合している状態では、光によって励起されたクマリンの電子は、Co(III)イオンへ電子移動を起こし、蛍光が消失するが、Co(III)錯体が Co(II)錯体に還元されて、配位子が解離した際、この電子移動は起こらず、クマリンからの蛍光が観測される。クマリン誘導体連結 acetylacetonate 部位を持つ配位子ならびに、セミカルバジド部位を持つ配位子の合成と Co(III)錯体の開発を検討する。(2021 ~ 2022 年)

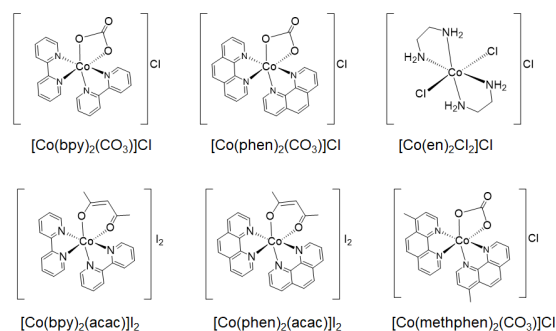


Fig. 2. The Co(III) complexes in this study

### 4. 研究成果

#### (1) 低酸素腫瘍細胞に対して抗がん活性をもつ Co(III)錯体の開発

既報にもとづいて、Co(III)錯体 $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$ ,  $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$ ,  $\text{trans}-[\text{Co}(\text{en})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$  (bpy = 2,2'-bipyridine, phen = 1,10-phenanthroline, en = ethylenediamine)の合成を行なった。これらの大気下ならびに低酸素状態での HeLa 細胞への細胞毒性を検討したところ、 $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$ ,  $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  錯体は大気下ならびに低酸素状態の細胞に対して細胞毒性を示した (Table 1)。さらにこのポリピリジル炭酸 Co(III)錯体はシスプラチンに比べて、がん細胞に強く細胞毒性を示し、細胞選択性があることが判明した。

これらのポリピリジン炭酸 Co(III)錯体の酸化還元電位を検討したところ、KCl 水溶液では、 $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  は -0.06 V 付近に、 $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  は 0.05 V 付近に非可逆な Co(III) / Co(II) の還元由来するピークが観測された。このことより、これらの Co(III)錯体は低酸素腫瘍細胞内で充分還元される電位を持つことが判明した。また、アスコルビン酸存在下での UV-vis 測定を行ったところ、d-d 遷移由来する 500 nm 付近のピークが減少し、そこから、急激にピークが変化することが判明した (Fig 3)。500 nm のピークの減少は Co(III)から Co(II)への還元由来するものであり、急激なピークの変化は  $\text{CO}_3^{2-}$  が外れた結果であると考えられる。この結果より、 $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  と  $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  錯体は還元的雰囲気下では還元されて  $\text{CO}_3^{2-}$  が外れている可能性が示唆された。(2020 年度成果)

**Table 1.** IC<sub>50</sub> of the Co(III) complexes against HeLa

complex	IC <sub>50</sub> ± SD / μM (HeLa)		
	aerobic		A / H ratio <sup>b)</sup>
	72 h	hypoxic <sup>a)</sup> 72 h	
$[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$	156 ± 9.8	88.2 ± 1.6	1.7
$[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$	8.8 ± 2.1	4.5 ± 0.1	1.9
$\text{trans}-[\text{Co}(\text{en})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$	> 500	> 500	-
$[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{acac})]_2$	> 500	119 ± 0.5	> 4.2
$[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{acac})]_2$	> 500	200 ± 3.5	> 2.5
$[\text{Co}(\text{methphen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$	> 500	40 ± 8.5	> 12.5

<sup>a)</sup>O<sub>2</sub> < 1%. <sup>b)</sup>A / H = IC<sub>50</sub> (aerobic) / IC<sub>50</sub> (hypoxic)

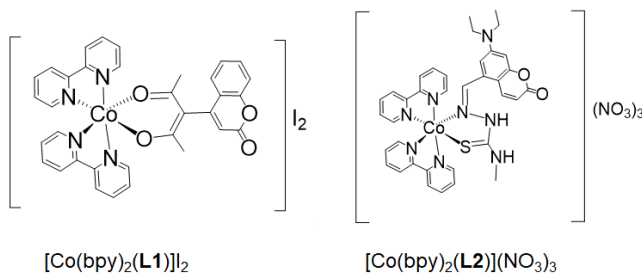
ポリピリジル炭酸 Co(III)錯体は低酸素腫瘍細胞に対して効果的であることが判明したので、この知見をもとに、新たな Co(III)錯体  $[\text{Co}(\text{acac})(\text{bpy})_2]\text{I}_2$ ,  $[\text{Co}(\text{acac})(\text{phen})_2]\text{I}_2$ ,  $[\text{Co}(\text{methphen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  (acac<sup>-</sup> = acetylacetonate, methphen = 4-methyl-1,10-phenanthroline)の合成を行い、これらの錯体のアスコルビン酸との反応性を低酸素腫瘍細胞における細胞毒性評価を検討した。 $[\text{Co}(\text{acac})(\text{bpy})_2]\text{I}_2$ ,  $[\text{Co}(\text{acac})(\text{phen})_2]\text{I}_2$ ,  $[\text{Co}(\text{methphen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  の KCl 水溶液の CV 結果より、いずれの錯体も -0.2 ~ -0.4 V に Co(III) / Co(II)の還元由来する非可逆なピークを観測した。これらの錯体は先行実験の  $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$ ,  $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  よりも還元されにくいことが判明した。

これらの錯体とアスコルビン酸との反応性を検討したところ、 $[\text{Co}(\text{acac})(\text{bpy})_2]\text{I}_2$ ,  $[\text{Co}(\text{acac})(\text{phen})_2]\text{I}_2$  は  $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  や  $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  に比べてアスコルビン酸に対する反応速度が遅く、反対に  $[\text{Co}(\text{methphen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  は  $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  や  $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  に比べて還元されにくいにも関わらず、アスコルビン酸との反応性が最も速いことが判明した。これらの新規の Co(III)錯体の低酸素腫瘍細胞への細胞毒性を検討したところ、いずれも大気下では細胞毒性は示さず、低酸素状態の時のみ、細胞毒性を示すことが判明した。これは  $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$ ,  $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  よりも  $[\text{Co}(\text{acac})(\text{bpy})_2]\text{I}_2$ ,  $[\text{Co}(\text{acac})(\text{phen})_2]\text{I}_2$ ,  $[\text{Co}(\text{methphen})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  の還元電位が低く大気下では Co(II)に還元されなかったためであると考えられる。以上の結果より、Co(III)錯体の低酸素腫瘍細胞への細胞毒性は、酸化還元電位よりも、アスコルビン酸などの還元剤との反応の速さが重要であることが示唆された。(2021 ~ 2022 年成果)

## (2) 蛍光性配位子を持つ Co(III)錯体の開発

実際に低酸素腫瘍内で Co(III)錯体が Co(II)に還元され、結合した配位子の解離が起きているかを検討するために、acac 部位を持つ Co(III)錯体ならびに、チオセミカルバジド部位を持つ Co(III)錯体の合成の検討を行った。acac 部位を持つ蛍光性配位子は 4-hydroxycoumarin を出発物質として 3 段階で合成を行った。得られたクマリン結合 acac 配位子を  $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CO}_3)]\text{Cl}$  に導入し、 $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{L1})]\text{I}_2$  錯体を合成した。

一方、クマリン結合チオセミカルバジド部位を持つ配位子は 7-(diethylamino)-4-methylcoumarin を出発原料として 3 段階で合成し、 $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3$  錯体を原料として、クマリン結合配位子を持つ Co(III)錯体  $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{L2})](\text{NO}_3)_3$  の合成を行った。得られた錯体は <sup>1</sup>H NMR 等を用いて同定を行った (Fig. 3)。現在これらの Co(III)錯体とアスコルビン酸との反応性の検討を行っている (2021 ~ 2022 年度成果)



**Fig.3.** the Co(III) complexes having coumarin moiety.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yano Masafumi, Inada Yoshinori, Hayashi Yuki, Nakai Misaki, Mitsudo Koichi, Kashiwagi Yukiyasu	4. 巻 197
2. 論文標題 Near-infrared absorption of a benzothiophene-appended triphenylamine radical cation: A novel molecular design of NIR-II dye	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dyes and Pigments	6. 最初と最後の頁 109929 ~ 109929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dyepig.2021.109929	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徐 暁・中井 美早紀・矢島辰雄・石田 斉
2. 発表標題 ジチオジピリジル配位子を有するルテニウム錯体の 合成と光反応挙動
3. 学会等名 第71回錯体化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井美早紀 , 野間智寛, 石川 典, 矢野重信 , 中林安 雄
2. 発表標題 ポリピリジン Pt(IV)錯体の合成と酸化的 DNA 切断活性評価
3. 学会等名 第53回酸化反応討論会
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	矢野 重信  (Yano Shigenobu)  (60011186)	奈良女子大学・大和・紀伊半島学研究所・協力研究員    (14602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小倉 俊一郎  (Ogura Syunichiro)  (90343160)	東京工業大学・生命理工学院・准教授     (12608)	

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