

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890256

研究課題名(和文) がん細胞の認識、検出と治療を同時に達成する新規金属含有がん治療薬の創出

研究課題名(英文) Design and Synthesis of the Artificial Luminescent Death Ligands Based on C3-Symmetric Cyclometalated Iridium Complexes for Selective Staining and Apoptosis Induction of Cancer Cells

研究代表者

久松 洋介 (Hisamatsu, Yosuke)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：80587270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：TRAILは、細胞膜上に発現するデスレセプター(DR)に結合し、がん細胞選択的にアポトーシスを誘導する。本研究では、Ir錯体にDR結合性ペプチドを導入した化合物を設計・合成し、がん細胞に対する細胞死誘導活性評価とイメージングを行った。その結果、Jurkat細胞を用いた染色実験で、DR5結合性ペプチドを導入したIr錯体由来の緑色発光が、DR5を発現する細胞膜上で観察された。さらに、フローサイトメーターを用いて、Jurkat細胞、Molt-4細胞、K562細胞に対するIr錯体の結合量を評価した結果、DR5発現量と相関性が示唆された。現在、細胞死誘導活性の向上を指向し、化合物の最適化を検討している。

研究成果の概要(英文)：TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) having a C3-symmetric homotrimeric structure induces the apoptosis in various tumor cells and tissues through the interaction with death receptor (DR) on cell surface. In this study, we have addressed the design and synthesis of new C3-symmetric tris-cyclometalated Ir complexes having dual activity both agonist activity for apoptosis induction and luminescent imaging of cancer cells. Staining experiments of Jurkat cell with Ir complex having the DR5 binding cyclic peptide suggested that green emission was localized on the cell membrane. Moreover, flow cytometer analysis suggested that the correlation between DR5 expressions of cancer cells (Jurkat cells, Molt-4 cells, K562 cells) and emission intensities derived from Ir complex. Optimizations of Ir complexes for improvement of their TRAIL-like activity are undergoing.

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：がん治療薬 イリジウム錯体 燐光 ペプチド pHプローブ

1. 研究開始当初の背景

昭和 56 年以降、日本人の死亡原因第 1 位であるがんは、平成 18 年には、全死者の 3 割に達する最大の疾病であり、多くの人々が抗がん剤の副作用に苦しみながら闘病生活を送っている。このような現状から、より有効な治療法として、副作用の少ない抗がん剤の開発が強く望まれており、標的がん細胞に対してピンポイントに薬効を示す化合物設計が不可欠である。TRAIL (tumor necrosis factor(TNF)-related apoptosis-inducing ligand) は、TNF ファミリーに属するデスリガンドの一種で、がん細胞に過剰発現するデスレセプター (DR) に結合することにより、がん細胞選択的にアポトーシスを誘導する。従って、TRAIL 様活性を示す人工化合物は、副作用の少ないがん治療薬の候補化合物として有望である。

トリスシクロメタレート型イリジウム錯体は、優れた発光特性や一重項酸素生成能を有しており、生化学領域への応用が期待されているが、がんの診断と治療を同時に達成するような化合物の例は、ほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、副作用の少ない新規金属含有がん治療薬の創製を目指し、TRAIL を模倣した人工デスリガンドの開発を研究目的とする。TRAIL は、 C_3 -対称性ホモ三量体構造を有し、細胞膜上に発現する DR に結合することでアポトーシスを誘導する。そこで、同じく C_3 -対称性構造と優れた発光特性を備えたトリスシクロメタレート型イリジウム錯体に着目し、イリジウム錯体の適切な位置に DR に結合することを期待したペプチドを導入した人工デスリガンドを設計・合成し、DR を発現するがん細胞に対して TRAIL 様活性の評価とがん細胞のイメージングに取り組んだ。

3. 研究の方法

人工デスリガンドとして、トリスシクロメタレート型イリジウム錯体の 5' 位にペプチドを導入した化合物を設計・合成し、DR を発現する Jurkat 細胞を用いて TRAIL 様活性評価を行った。

具体的な設計については、以下に示す。TRAIL と DR の一つである DR5 との共結晶構造 (Hymowitz et al. *Mol. Cell*, **1999**, *4*, 563–571) から、TRAIL のアミノ酸配列に含まれる Patch A ペプチドが、DR5 との結合に重要であることが示唆された。また、最近、DR5 に対して、解離定数が \sim nM オーダーで結合する環状ペプチドが報告された (Pavet, et al. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1101–1110)。そこで、本研究では、イリジウム錯体に PatchA ペプチドおよび DR5 結合性環状ペプチドを導入した化合物 **1-4** を設計・合成し、細胞死誘導活性を MTT

(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイにより評価した。さらに、イリジウム錯体の発光特性を活かし、細胞染色によるがん細胞のイメージングについても検討を行った。

4. 研究成果

(1) 本研究では、 $\text{Ir}(\text{tpy})_3$ (tpy: 2-(4'-tolyl)pyridine) の 5' 位選択的置換反応を鍵反応とし、対応する誘導体へと導いた。そして、別途、ペプチド固相合成法により合成した PatchA ペプチドおよび環状ペプチドを、アルキルリンカーを介してイリジウム錯体に導入し、人工デスリガンド **1-4** を合成した。

PatchA ペプチドを導入したイリジウム錯体 **1, 2** の TRAIL 様活性は、DR5 を発現するヒト急性 T 細胞性白血病細胞由来細胞株である Jurkat 細胞を用いた MTT アッセイにより評価した。その結果、化合物 **1, 2** は、最高濃度 75 μM において、細胞生存率が 25% 程度減少した。そこで、細胞死のメカニズムについて検討するために、カスパーゼ阻害剤存在下で、**1, 2** を用いた MTT アッセイを行った。その結果、細胞生存率の減少は、カスパーゼ阻害剤によって抑制されなかったため、化合物 **1, 2** は、アポトーシスではなくネクロシス様の細胞死であることが示唆された。また、**1, 2** を用いて Jurkat 細胞の染色実験を行ったが、イリジウム錯体由来の発光は観察されなかった。

次に、DR5 結合性環状ペプチドを導入したイリジウム錯体 **3, 4** について、同様に、Jurkat 細胞の染色実験を行った。その結果、DR5 を発現する細胞膜に局在した発光が観察された。さらに、**4** を用いて、DR5 の発現量の異なるがん細胞 (Molt-4 細胞、K562 細胞) の染色実験を行い、フローサイトメトリーを用いて、**4** の細胞への結合量を評価したところ、DR5 の発現量と発光強度に相関関係が示唆された。また、化合物 **3, 4** について、MTT アッセイを行ったところ、最高濃度 1 μM 以下 (溶解性の問題) の濃度条件下では、細胞死誘導活性は見られなかった。

現在、化合物の溶解性の向上を期待し、環状ペプチドとイリジウム錯体を連結するリンカー部位に親水性を付与した化合物を設計・合成し、その評価を進めている。

(2) ペプチドを連結したシクロメタレート型イリジウム錯体に加えて、pH 応答性と照射による細胞死誘導活性を有するピリジン体 **5** についても設計・合成を行い、pH 依存的な発光特性を調べた。その結果、**5** は、中性～塩基性条件では緑色の発光を示し、酸性条件下でピリジル基がプロトン化することにより発光波長が長波長化し赤色の発光が観測された。この発光特性は、同じ位置にアミノ基を有する **6** とは対照的な発光変化であることが明らかとなった (図 1)。ま

た、**5** は、光照射による一重項酸素生成能を有していることを一重項酸素検出試薬である DPBF (1,3-Diphenylisobenzofuran) を用いた実験により確認した。実際、**5** を HeLa-S3 細胞に導入し、光照射 (465 nm) を行うと、ネクロシス様の細胞死が誘導された。

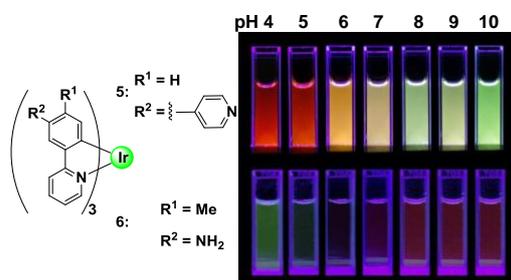


図 1 ピリジル基およびアミノ基を有するイリジウム錯体の pH 依存的な発光挙動

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 3 件)

[1] Shinsuke Moromizato, Yosuke Hisamatsu, Yasuki Matsuo, Toshihiro Suzuki, Ryo Abe, Shin Aoki, Design and Synthesis of a Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Complex Having N,N-Diethylamino Group that Stains Acidic Intracellular Organelles and Induces Cell Death by Photoirradiation, *Inorganic Chemistry*, 2012 年, 52 巻, pp12697-12706. 査読有

[2] Yosuke Hisamatsu, Supratim Banerjee, M. B. Avinash, T. Govindaraju, Carsten Schmuck, A Unique pH-Responsive Supramolecular Gel from a Novel Quadruple Zwitterion which Responds to both Acid and Base, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013 年, 52 巻, pp12550-12554 (Hot Paper に選出). 査読有

[3] Akihiro Nakagawa, Yosuke Hisamatsu, Shinsuke Moromizato, Masahiro Kohno, Shin Aoki, Synthesis and Photochemical Properties of pH Responsive Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes That Contain a Pyridine Ring on the 2-Phenylpyridine Ligand, *Inorganic Chemistry*, 2014 年, 53 巻, pp409-422. 査読有

[学会発表] (計 26 件)

[1] ピリジン環を導入した発光性シクロメタレート型イリジウム錯体の合成と発光特性, 中川 朗宏, 久松 洋介, 大和田 紘喜, 松生 泰樹, 大多和 修平, 諸見里 真輔, 青木 伸, 第 62 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム, 千葉, 2012 年 5 月

[2] C₃-対称性イリジウム錯体を中心骨格とする人工デスリガンドの設計・合成と活性評価,

渋谷 愛, 大多和 修平, 大和田 紘喜, 鈴木 利宙, 安部 良, 久松 洋介, 有安 真也, 北村 正典, 安部 良, 青木 伸, 第 62 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム, 2012 年 5 月

[3] Development of Photochemical Devices for Diagnosis and Treatment of Cancer, Shin Aoki, Shinya Ariyasu, Yosuke Hisamatsu, Shinsuke Moromizato, Ai Shibuyaa, Eita Watanabec, Toshihiro Suzuki, Masanori Hayase, Ryo Abe, 1st International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2012 (iPoPS 2012), 2012 年 6 月

[4] Design and Synthesis of pH-Responsive Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Complex for Cell Imaging and Phototherapy, Shinsuke Moromizato, Yosuke Hisamatsu, Toshihiro Suzuki, Ryo Abe, Shin Aoki, 1st International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2012 (iPoPS 2012), 2012 年 6 月

[5] pH 応答性および酸素活性化能を有するシクロメタレート型イリジウム錯体の設計と合成, 諸見里 真輔, 久松 洋介, 松生 泰樹, 有安 真也, 鈴木 利宙, 安部 良, 青木 伸, 第 62 回配位化合物の光化学討論会, 2012 年 8 月

[6] シクロメタレート型イリジウム錯体の位置選択的置換反応とそのバイオケミカルツールへの応用, 青木 伸, 久松 洋介, 諸見里 真輔, 渋谷 愛, 大多和 修平, 大和田 紘喜, 有安 真也, 第 62 回配位化合物の光化学討論会, 2012 年 8 月

[7] Structure and Monophosphate Hydrolysis Activity of Supramolecular Complexes Formed by Self-Assembly of Various Diimide Compounds with Dimeric Zinc(II) Complex and Copper, Shin Aoki, Mohd Zulkefeli, Asami Suzuki, Ryo Tanaka, Yosuke Hisamatsu, Motoo Shiro, 第 62 回錯体化学討論会, 2012 年 9 月

[8] pH 依存的な発光特性と細胞死誘導活性を備えたシクロメタレート型イリジウム錯体の設計と合成, 久松 洋介, 諸見里 真輔, 鈴木 利宙, 松生 泰樹, 安部 良, 青木 伸, 第 62 回錯体化学討論会, 2012 年 9 月

[9] Design and Synthesis of Cyclometalated Iridium Complexes for Cell Imaging and Phototherapy, Shin Aoki, Shinsuke Moromizato, Ai Shibuya, Shuhei Ohtawa, Yosuke Hisamatsu, Shinya Ariyasu, Toshihiro Suzuki, Ryo Abe, 13th Tetrahedron Symposium, Asia Edition, 2012 年 11 月

[10] 二核亜鉛錯体と官能基化されたビルディングブロックの自己集積による超分子ホスファターゼの構築とリン酸加水分解活性, 青木 伸、鈴木 麻美、田中 亮、Mohd Zulkefeli, 久松 洋介、城 始勇, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月

[11] 青・緑・赤色発光性トリスクロメタレート型イリジウム(III)錯体の設計・合成と発光挙動, 久松 洋介、諸見里 真輔、中川 朗宏、神戸 彩、青木 伸, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月

[12] ピリジル基を導入したシクロメタレート型イリジウム(III)錯体の設計・合成と発光特性, 中川 朗宏、久松 洋介、青木 伸, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月

[13] 複核亜鉛錯体と有機化合物の自己集積による超分子ホスファターゼの構築とビルディングブロック修飾の効果, 青木 伸、Mohd Zulkefeli、鈴木 麻美、田中 亮、鈴木 麻美、城 始勇、久松 洋介, 第 10 回ホストゲスト化学シンポジウム, 2013 年 5 月

[14] pH 応答性を備えた赤色発光性シクロメタレート型イリジウム錯体の設計と合成, 神戸 彩、諸見里 真輔、久松 洋介、河野雅弘、青木 伸, 第 23 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 東京, 2013 年 6 月

[15] Design and Synthesis of Luminescent Iridium Complexes as Photochemical and Biomedical Tools, Shin Aoki, Yosuke Hisamatsu, Shinsuke Moromizato, Akihiro Nakagawa, Ai Shibuya, Aya Kando, Hiroshi Tanaka, Toshihiro Suzuki, and Ryo Abe, 15th Asian Chemical Congress (15ACC), Singapore, 2013 年 8 月

[16] Design and Synthesis of Artificial Dimetallic Catalysis Inspired by an Active Center of Alkaline Phosphatase, Yuuya Miyazawa, Yosuke Hisamatsu, and Shin Aoki, 2nd International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2013 (iPoPS 2013), Malaysia, 2013 年 9 月

[17] C₃-対称性イリジウム錯体を中心骨格とする TRAIL 様人工デスリガンドの設計・合成と活性評価, 渋谷 愛, 久松 洋介, 田中 裕志, 鈴木 利宙, 安部 良, 青木 伸, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2013 年 9 月

[18] Design, Synthesis and Biological Applications of Luminescent Cyclometalated Ir(III) Complexes, Yosuke Hisamatsu, Aya Kando, Shinsuke Moromizato, Ai Shibuya, Hiroshi Tanaka, Akihiro Nakagawa, Toshihiro Suzuki, Ryo Abe and Shin Aoki, 9th AFMC International

Medicinal Chemistry Symposium, Taiwan, 2013 年 10 月

[19] Development of Photochemical Devices for Diagnosis and Treatment of Cancer, Shin Aoki, Shinya Ariyasu, Yosuke Hisamatsu, Shinsuke Moromizato, Ai Shibuya, Eita Watanabe, Toshihiro Suzuki, Masanori Hayase, and Ryo Abe, 9th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, Taiwan, 2013 年 10 月

[20] C₃-対称性シクロメタレート型イリジウム錯体を中心骨格に有する TRAIL 様人工デスリガンドの設計・合成と活性評価, 久松 洋介, 渋谷 愛, 田中 裕志, 鈴木 希美, 鈴木 利宙, 安部 良, 青木 伸, 第 57 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2013 年 10 月

[21] 生体内金属イオンを中心とする自己集積三量体型人工デスリガンドの設計と合成, 鯉沼 香織、宮田 悠、久松 洋介、有安 真也、青木 伸, 第 57 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2013 年 10 月

[22] 非対称性超分子構築を目的とするビルディングブロックの設計・合成と分子集積の検討, 田中 亮、鈴木 麻美、久松 洋介、青木 伸, 第 57 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2013 年 10 月

[23] シクロデキストリン及び亜鉛錯体を有するロタキサンの設計と合成, 大田 麻人、田中 智博、久松 洋介、青木 伸, 第 57 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2013 年 10 月

[24] 位置選択的な置換基導入反応に基づくトリスシクロメタレート型イリジウム(III)錯体の合成・発光特性の制御と生物学的応用, 久松 洋介, 諸見里 真輔, 中川 朗宏, 神戸 彩, 渋谷 愛, 田中 裕志, 青木 伸, 錯体化学会第 63 回討論会, 沖縄, 2013 年 11 月

[25] ピリジン環を導入したシクロメタレート型イリジウム(III)錯体の設計・合成と pH 依存的発光特性, 中川 朗宏, 久松 洋介, 諸見里 真輔, 河野雅弘, 青木 伸, 錯体化学会第 63 回討論会, 沖縄, 2013 年 11 月

[26] 環状ペプチドを連結した C₃-対称性トリスシクロメタレート型イリジウム錯体の設計・合成と人工デスリガンドとしての機能評価, 久松 洋介, 渋谷 愛, 田中 裕志, 鈴木 希美, 有安 真也, 鈴木 利宙, 安部 良, 青木 伸, 日本薬学会第 133 年会, 熊本, 2014 年 3 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久松 洋介 (HISAMATSU YOSUKE)

東京理科大学・薬学部・生命創薬科学科・
助教

研究者番号：80587270

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：