

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620166

研究課題名(和文)有機/金属ハイブリッドポリマーの抗がん作用の解明

研究課題名(英文)Elucidation of anticancer activity of organic/metallic hybrid polymer

研究代表者

樋口 昌芳 (Higuchi, Masayoshi)

独立行政法人物質・材料研究機構・高分子材料ユニット・グループリーダー

研究者番号：80306852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：有機/金属ハイブリッドポリマーが、イオン相互作用に基づいてDNA鎖と強く結合することをこれまで見出している。本研究では、従来にない抗がん剤の創製を目指し、(1)有機/金属ハイブリッドポリマーとDNA鎖との相互作用の解明、及び(2)有機/金属ハイブリッドポリマーの抗がん作用の解明に関して以下の成果を得た。

ポリマー鎖長の異なる有機/金属ハイブリッドポリマー(オリゴマー)を合成し、がん細胞に対する細胞毒性試験を行ったところ、興味深いことに、DNAに対して強く相互作用する有機/金属ハイブリッドポリマーが高い抗がん特性を示した。

研究成果の概要(英文)：We found organic-metallic hybrid polymer binds with DNA chains strongly due to the ionic interaction before. In this project I tried to reveal (1) the detailed interaction of organic-metallic hybrid polymer with DNA chains and (2) anticancer activity of organic-metallic hybrid polymer. The achievements are following.

We successfully prepared organic-metallic hybrid polymers with different chain length and investigated the cytotoxicity to cancer cells. Interestingly, the organic-metallic hybrid polymer with the stronger binding affinity to DNA showed the higher anticancer activity.

研究分野：高分子科学

キーワード：有機/金属ハイブリッドポリマー 抗がん特性

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬剤投与によるがん治療は、がん細胞に直接作用することで即効性に優れた効果が期待される。シスプラチンに代表される白金錯体は、がん細胞の核内 DNA の塩基対に直接結合し、DNA の複製を防ぐことによって細胞自体を死滅させる。一方、嘔吐など副作用も大きい。「DNA の複製を防ぐことによってがん細胞自体を死滅させる」という概念を維持しつつ、副作用の少ない抗がん剤を開発できれば、がん治療分野に革新をもたらすことができると期待される。

(2) 申請者らは、鉄などの金属イオンとビス(ターピリジン)などの有機配位子を錯形成させることで得られる有機/金属ハイブリッドポリマー(図1)が、DNA と強く結合することをこれまで見出している(引用文献)。

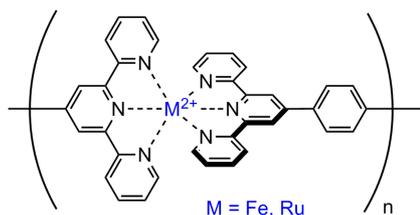


図1 有機/金属ハイブリッドポリマー

(3) 有機/金属ハイブリッドポリマーは金属イオンを多く含むポリカチオンであり、DNA のリン酸アニオンと多点的にイオン結合すると考えられる。分子計算から、有機/金属ハイブリッドポリマー鎖がDNA のマイナグループにグループバインディングする構造が最も安定であることを見出している(図2)。

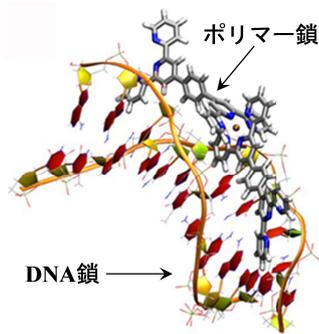


図2 DNA と有機/金属ハイブリッドポリマーの複合化における最安定構造

(4) 有機/金属ハイブリッドポリマーが肺線がん細胞に対して高い抗がん作用を有することを発見している(引用文献)。本研究では、有機/金属ハイブリッドポリマーの本抗がん作用を明らかにするとともに、その

発現機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、有機/金属ハイブリッドポリマーの抗がん特性の解明を目的とする。有機/金属ハイブリッドポリマーを抗がん剤として用いる取り組みはこれまでになく、化学と医学の学際領域研究として、基礎的及び学術的重要性は非常に高い。有機配位子の自在な設計や、金属イオンの選択により、有機/金属ハイブリッドポリマーの機能をチューニングできるため、ターゲットとするがん細胞に応じた適切な構造をテララーメイド合成することで、より効果的な抗がん作用の発現が期待できる。

(2) 具体的には、従来にない抗がん剤の創成を目指し、(1)有機/金属ハイブリッドポリマーと DNA 鎖の相互作用の解明、及び(2)有機/金属ハイブリッドポリマーの抗がん作用の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 有機/金属ハイブリッドポリマーと DNA 鎖の相互作用の解明

ポリマー鎖長の異なる有機/金属ハイブリッドポリマーを設計・合成し、DNA との錯形成挙動を紫外可視吸収スペクトル等によって測定することで、有機/金属ハイブリッドポリマーの構造と DNA との錯形成定数の相関関係を明らかにした。

(2) 有機/金属ハイブリッドポリマーの抗がん作用の解明

有機/金属ハイブリッドポリマーの抗がん作用を明らかにするために、がん細胞に対する細胞毒性試験を行い、ポリマー鎖長と細胞毒性の相関関係を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 有機/金属ハイブリッドポリマーの合成

等モル量の酢酸鉄とビス(ターピリジル)ベンゼンを混合し、酢酸溶液中 120 度で加熱・攪拌することで、鉄を含む有機/金属ハイブリッドポリマーを合成した。錯形成は溶液の色が青紫色に変化することで確認された。24 時間攪拌後、溶液をろ過し、ろ液を減圧下濃縮乾燥することで、目的とする有機/金属ハイブリッドポリマーをほぼ定量的に得た。得られたポリマーは 共役系配位子を有しているが、錯体部位が親水性のため、水やメタノールなどの極性溶媒に高い溶解性を示した。紫外可視吸収スペクトル測定において、本ポリマーは、約 580nm に鉄イオンから有機配位子への電荷移動に基づく吸収が観測された。また、340nm 付近に有機配位子の $\pi-\pi^*$ 遷移に基づくと思われる吸収が確認された。

(2) 有機/金属ハイブリッドオリゴマーの合成

酢酸鉄とビス(ターピリジル)ベンゼンのモル比を変えて混合することで、ポリマー鎖長の短い有機/金属ハイブリッドポリマー(オリゴマー)の合成を試みた。合成条件及び反応後の処理方法は、前述の有機/金属ハイブリッドポリマーの場合と同じとした。いずれのオリゴマーもほぼ定量的に得られた。得られたオリゴマーは、ポリマー同様、水やメタノールに対し高い溶解性を示した。メタノール中で紫外可視吸収スペクトル測定を行ったところ、本オリゴマーにおいても鉄イオンから有機配位子への電荷移動に基づく吸収を示したが、ポリマー鎖長の違いによって吸収波長が変化した。

(3) 有機/金属ハイブリッドオリゴマーとDNAの複合化

有機/金属ハイブリッドポリマーがDNAと強く複合化することをこれまで見出している(引用文献)。今回合成した有機/金属ハイブリッドポリマーを用いてDNAとの複合化を行い、従来の結果の再現性を確認するとともに、同測定条件下における有機/金属ハイブリッドオリゴマーのDNAに対する複合化特性を調べた。具体的には、本ポリマーまたはオリゴマーを溶かした水溶液に、ct-DNAの緩衝溶液を少量ずつ滴下し、その時の紫外可視吸収スペクトル変化を観察した。その結果、いずれのポリマー及びオリゴマーにおいても、580nm付近の電荷移動吸収の長波長シフト及び淡色効果が確認された。溶液中の有機/金属ハイブリッドポリマー及びオリゴマーの繰り返し構造単位あたりのモル数に対し、加えたDNAの核酸塩基あたりのモル数の比を求め、この比に対して電荷移動吸収の吸光度変化をプロットすると、DNAの濃度が低い時は吸光度は直線的に変化したが、途中で吸光度変化が小さくなり、最終的にはDNAを加えても、吸光度変化はほぼ起こらなくなった(飽和した)。この変化は、有機/金属ハイブリッドポリマー及びオリゴマーがDNAと定量的に複合化することを示している。また、この吸光度変化のプロットから、有機/金属ハイブリッドポリマー及びオリゴマーとDNAとの会合定数を算出したところ、ポリマー鎖が長くなるにつれて、会合定数が高くなることが判明した。

上記の実験結果は次のように説明することができる。有機/金属ハイブリッドポリマー及びオリゴマーの主鎖は、中性の有機配位子とカチオン性の金属イオンから構成されているためにポリカチオンと見なすことができる。一方、DNAは多くのリン酸基を有しており、主鎖はポリアニオンと見なすことができる。そのため、有機/金属ハイブリッドポリマー及びオリゴマーの溶液にDNAを加えると、カチオン-アニオン間のイオン相互作用が働く。その結果、有機/金属ハイブリッ

ドポリマー及びオリゴマーとDNAは会合体を形成すると考えられる。ポリカチオンとポリアニオンの会合では、多点的な相互作用により会合がより強固になると考えられる。そのため、有機/金属ハイブリッドオリゴマーにおいて、重合度が大きいほど(=ポリマー鎖長が長いほど)DNAとの会合定数が大きくなったと考えられる。

また、ポリマー鎖長が短いほど会合定数が小さくなるという本実験結果は、有機/金属ハイブリッドポリマー及びオリゴマーのDNA鎖への複合化が、シスプラチンのような平面性の高い小分子でしばしば生じるインターカレーションに基づいた複合化と異なり、グループバインディングによる複合化であると示唆される。

(4) 有機/金属ハイブリッドオリゴマーの抗がん特性

ヒト肺基底上皮腺癌細胞(A549)を用いて、有機/金属ハイブリッドオリゴマーの抗がん特性を調べた。それぞれの有機/金属ハイブリッドオリゴマーについて、異なる濃度の溶液をA549に加え、がん細胞の生存率を調べたところ、興味深いことに、重合度の大きい(=ポリマー鎖長の長い)オリゴマーほど強い抗がん特性を示し、低濃度での添加でも高い抗がん性を示した。興味深いことに、本実験結果では、前述のDNAの会合実験との相関が見られた。即ち、DNA鎖と強く会合する有機/金属ハイブリッドオリゴマーにおいて、強い抗がん特性が確認された。現在、がん細胞を死滅させるメカニズムは不明であるが、何らかの機構によりがん細胞の核に取り込まれた有機/金属ハイブリッドオリゴマーが核内のDNAと複合化することでがん細胞の複製(増殖)を阻害し、細胞を死滅させたと考えられる。

(5) まとめ

金属イオンと有機配位子のモル比を変えて重合を行うことで、ポリマー鎖長の異なる有機/金属ハイブリッドオリゴマーを合成した。得られたオリゴマーは、有機/金属ハイブリッドポリマー同様にDNAと複合化したが、ポリマー鎖長が長いほどDNAとの会合定数は大きくなった。更に本オリゴマーを用いてA549に対する抗がん特性を調べたところ、ポリマー鎖長が長いオリゴマーほど高い抗がん特性を示した。以上の結果から、有機/金属ハイブリッドポリマー及びオリゴマーがDNA鎖とグループバインディングによって複合化すること、更にDNA鎖との相互作用と抗がん特性の間に正の相関関係があることを見出した。

本成果を元に、今後更に詳細な研究を進め、抗がん作用のメカニズムを解明することで、副作用の少ない次世代型抗がん剤の創製を目指す。

<引用文献>

Jinghua Li, Zdenek Futera, Hongfang Li, Yoshitaka Tateyama, Masayoshi Higuchi, “Conjugation of Organic-Metallic Hybrid Polymers and Calf-Thymus DNA”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 4839-4841 (2011).

Jinghua Li, Tatsuya Murakami, Masayoshi Higuchi, “Metallo-Supramolecular Polymers: Versatile DNA Binding and Their Cytotoxicity”, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, **23**, 119-125 (2013).

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

Utpal Rana, Masayoshi Higuchi、
“Synthesis of Helical Metallo-Supramolecular Polymers and their DNA Binding Study”、第63回高分子討論会、長崎大学、2014年9月24-26日

Utpal Rana, Masayoshi Higuchi、
“DNA Binding Properties of Metallo-Supramolecular Polymers”、錯体化学会第64回討論会、中央大学、2014年9月18-20日

Utpal Rana, Masayoshi Higuchi、
“In Vitro Studies on ct-DNA interaction with Metallo-Supramolecular Oligomers”、NIMS Conference 2014、つくば国際会議場、2014年7月1-3日

Utpal Rana, Satoshi Moriyama, Masayoshi Higuchi、
“Conjugation of Metallo-supramolecular Oligomers and ct-DNA”、第63回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、2014年5月28-30日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

樋口 昌芳 (HIGUCHI, Masayoshi)

独立行政法人物質・材料研究機構・高分子材料ユニット・グループリーダー

研究者番号：80306852