

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860016

研究課題名(和文) 生体直交型反応を鍵反応とする自己集積型薬剤の創製

研究課題名(英文) Design and synthesis of metallodrugs based on self-assembly systems

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、リガンドと金属イオンとの錯体形成および自己集積化により構築されるカチオン性両親媒性金属錯体の設計・合成と、がん細胞選択的に細胞死を誘導する薬剤の創製である。具体的には、カチオン性ペプチド Lys-Lys-Gly-Gly (KKGG) と Ir 錯体を長さの異なるアルキルリンカーで連結したカチオン性両親媒性 Ir 錯体が、Jurkat 細胞に対しアルキル鎖長依存的な細胞死誘導活性を示すことを見出した。さらに、細胞死誘導メカニズムについて詳細な検討を行い、Ir 錯体が、まず細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、その後、細胞の形態変化を伴った細胞死が誘導されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We report on the design and synthesis of amphiphilic and luminescent tris-cyclometalated Ir complexes that work as inducers and detectors of cell death. Ir complexes containing cationic peptides such as a KKGG sequence and alkyl chain linkers of adequate length (C6 and C8) exhibit considerable cytotoxicity against Jurkat cells. Mechanistic studies suggest that Ir complexes containing the KKGG peptide interact with anionic molecules on the cell surface and/or membrane receptors to trigger the Ca²⁺ dependent pathway and intracellular Ca²⁺ response, resulting in necrosis accompanied by membrane disruption.

研究分野：生物有機化学、錯体化学

キーワード：がん治療薬 イリジウム錯体 カチオン性ペプチド 細胞死 金属錯体

1. 研究開始当初の背景

がんは多くの国々で死亡原因第1位であり、その予防・診断・治療は人類において克服すべき重要な課題である。日本では、年間30万人以上の方ががんにより亡くなり、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。このような現状を打破するため、新規がん治療薬の創製研究が世界中で行われているが、未だ困難な状況に変わりはない。

がん細胞表面は、正常細胞と比べ負電荷を帯びており、その表面の違いはがん治療薬開発のターゲットの一つとして注目されている。実際に、抗がん活性を持つカチオン性ペプチドなどが多数報告され、その中には臨床試験の段階にある化合物も知られている。

2. 研究の目的

本研究は、リガンドと金属イオンとの錯体形成および自己集積化により構築される C₃-対称性三量体構造を特徴とするカチオン性両親媒性金属錯体の設計・合成と、がん細胞選択的に細胞死を誘導する薬剤の創製を目的とする。

3. 研究の方法

Ir 錯体 **1** (*fac*-Ir(tpy)₃, tpy: 2-(4'-tolylpyridine)) に対して、位置選択的な置換反応を利用し、Ir 錯体 **1** からカルボン酸体 **2** へ導いた後に、カチオン性ペプチド (例えば、KKGG (K: リシン、G: グリシン)) を導入した Ir 錯体 **3-8** を設計・合成 (図1) し、ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat に対する細胞死誘導活性評価を行った。さらに、カチオン性 Ir 錯体の細胞死誘導メカニズムの解析は、細胞に作用する種々の薬剤存在下、Ir 錯体の細胞死が誘導されるかどうかで判定した。Ir 錯体を用いた薬剤に加えて、カチオン性ペプチドを導入した三脚型トリスピリジン配位子の設計・合成にも併せて着手した。

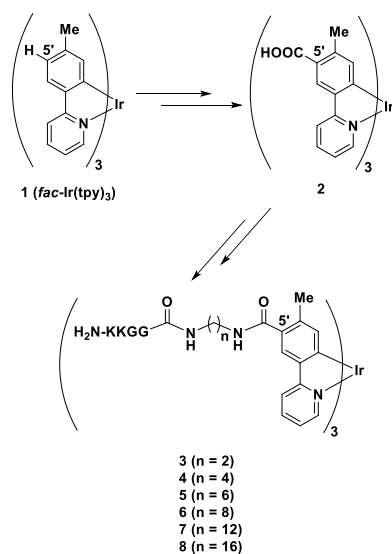


図1 位置選択的な置換反応を鍵反応として合成したカチオン性両親媒性 Ir 錯体 **3-8**.

4. 研究成果

リンカーの炭素数が 2 から 16 のカチオン性両親媒性 Ir 錯体 **3-8** を設計・合成 (図1) し、ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞に対する細胞死誘導活性評価を行った。具体的には、カチオン性両親媒性 Ir 錯体 **4** (n = 4) および **5** (n = 5) (50 μM) を Jurkat 細胞に添加し 37 °C の条件で、1 時間培養した後に蛍光顕微鏡で観察した。その結果、リンカーのアルキル鎖の炭素数が短い **4** では、細胞の形態変化はほとんど見られなかったが (図 2a-c)、炭素数が 6 の **5** では、死細胞が多く観察され、死細胞内で Ir 錯体由来の強い発光が観察できた (図 2d-f)。一方、**5** を 4 °C 下で 1 時間培養しても死細胞はほとんど見られず、細胞膜上に **5** 由来の発光が観察できた (図 2g-i)。この結果は、**5** が細胞表面のアニオン性分子もしくは何らかの膜タンパク質と相互作用していることを示唆している。

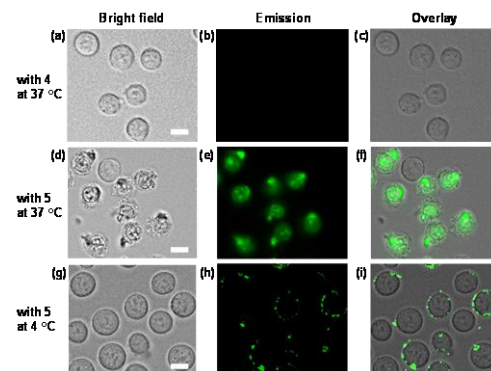


図2 カチオン性両親媒性 Ir 錯体 **4** (n = 4), **5** (n = 5) を Jurkat 細胞に添加し 37 °C もしくは 4 °C の条件で、1 時間培養した後に蛍光顕微鏡で観察した画像。

次に、Ir 錯体 **3-8** の Jurkat 細胞に対する細胞死誘導活性を MTT アッセイにより評価した。その結果、炭素数 6 および 8 を有する **5**, **6** が Jurkat 細胞に対して、高い細胞死誘導活性を示した (**3**: EC₅₀ >50 μM, **4**: EC₅₀ >50 μM, **5**: EC₅₀ = 16 μM, **6**: EC₅₀ = 7.3 μM, **7**: EC₅₀ = 32 μM, **8**: EC₅₀ >50 μM)。すなわち、カチオン性両親媒性 Ir 錯体の細胞死誘導活性において、適切なリンカー長は、炭素数 6 もしくは 8 であることが明らかとなった。また、Ir 錯体 **5** の正常細胞に対する毒性についても検討した。具体的には、Jurkat 細胞がリンパ球のがんであることから、正常細胞としてマウスのリンパ球を用いて比較した。Jurkat 細胞およびリンパ球に **5** を添加し、1 時間培養した後に PI 染色により細胞死誘導活性を評価した。その結果、リンパ球に対する **5** の細胞死誘導活性は EC₅₀ >50 μM と Jurkat 細胞 (**5**: EC₅₀ = 22 μM) に比べ低かった。さらに、アポトーシスやネクロプトーシスの阻害剤によって **5** の細胞死誘導が抑制されなかったこと、死細胞の形態から、**5** は、

ネクローシスを誘導したと考えている。

次に、がん細胞選択的な細胞死誘導活性を示した Ir 錯体 **5** に着目し、**5** の細胞死誘導メカニズムについて詳細な検討を行った。その結果、エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスの阻害剤や ATP 合成酵素阻害剤存在下で、**5** の細胞死誘導は全く抑制なかった。一方、脱共役剤である CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) 存在下で、**5** の細胞死誘導が抑制された。CCCP は、ミトコンドリア膜を脱分極させることにより、酸化的リン酸化を抑制し、エネルギー依存的な経路を抑制する作用とカルシウムのミトコンドリアへの取り込みを阻害する作用が知られている。我々は、**5** による細胞死がエネルギー非依存的であることから、細胞内カルシウム濃度と細胞死の関連性を予想した。そこで、主に細胞質に局在する赤色発光性カルシウムプローブ Rhod-4 を Jurkat 細胞に導入し、細胞死を誘導する **5** および細胞死を誘導しない **4** ($n = 4$) を添加後のカルシウムプローブの発光強度変化を観察した。その結果、**5** の添加により大部分の細胞において発光強度の増大つまりカルシウム濃度の増大が見られ、その後、細胞の形態変化を伴って細胞死が誘導された。一方、細胞死を誘導しない **4** では、**5** と比べカルシウムプローブの発光強度変化は明らかに低く、細胞の形態変化も観察されなかった。さらに、小胞体から細胞質へのカルシウムの放出に関わる inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) 受容体の選択的な阻害剤である xestospongins C 存在下で Ir 錯体の細胞死誘導活性が低下することが明らかとなった。さらなる検討を要するが、細胞内カルシウムが関わる Ir 錯体の細胞死誘導メカニズムにおいて、IP₃ 受容体の関与が示唆された。

以上の結果より、**5** は、おそらく細胞膜上のアニオン性分子もしくは細胞膜上のレセプターと相互作用し、細胞質カルシウム濃度の上昇を引き起こし、その後、細胞の形態変化を伴うネクローシスが誘導したことが示唆された。

本研究では、カチオン性ペプチドを導入したトリスシクロメタレート型 Ir 錯体の設計・合成を行い、細胞表面を認識することによりがん細胞選択的に細胞死を誘導する化合物を見出し、それらの細胞死誘導メカニズムに関しても有用な知見を得ることができた。今後は、これらの化合物が、細胞膜上で相互作用するターゲット分子を同定する必要がある。

さらに、生体内金属イオン (亜鉛、鉄など) との錯体形成により制御される新規配位子として、カチオン性ペプチドを導入した三脚型トリスビピリジン配位子の設計・合成に着手した。トリスビピリジン配位子は、2-ブロモ-5-ヒドロキシピリジンから 8 段階で合成し、現在、配位子に種々のペプチドの導入を検討している。初期検討として、三脚型配位

子と鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)イオンとの錯体形成を UV 滴定により評価した。その結果、三脚型トリスビピリジン配位子 (鉄、コバルト、ニッケル) と 1:1 錯体を形成することがわかった。今後、カチオン性ペプチドを導入した配位子と金属イオンとの自己集積化による細胞死誘導活性の制御を検討する予定である。

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 6 件)

[1] Yosuke Hisamatsu, Ai Shibuya, Nozomi Suzuki, Toshihiro Suzuki, Ryo Abe, and Shin Aoki, “Design, Synthesis and Cytotoxic Activity via Calcium-Dependent Pathway of Amphiphilic and Luminescent Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes Having Cationic Peptides”, *Bioconjugate Chemistry*, **2015**, 26(5), 857–879. 査読有

[2] Aya Kando, Yosuke Hisamatsu, Hiroki Ohwada, Shinsuke Moromizato, Masahiro Kohno and Shin Aoki, “Photochemical Properties of Red-Emitting Tris(cyclometalated) Iridium(III) Complexes Having Basic and Nitro Groups and Application to pH Sensing and Photoinduced Cell Death”, *Inorganic Chemistry*, **2015**, 54(11), 5342–5357. 査読有

[3] Sarvendra Kumar, Yosuke Hisamatsu, Yusuke Tamaki, Osamu Ishitani, and Shin Aoki, “Design and Synthesis of Heteroleptic Cyclometalated Iridium(III) Complexes Containing Quinoline-Type Ligands that Exhibit Dual Phosphorescence”, *Inorganic Chemistry*, **2016**, 55(8), 3829–3843. 査読有

[4] Mohd Zulkefeli, Yosuke Hisamatsu, Asami Suzuki, Yuya Miyazawa, Motoo Shiro, and Shin Aoki, “Supramolecular Phosphatases Formed by the Self-Assembly of Bis(Zn²⁺-cyclen) Complex, Copper(II) and Barbitol Derivatives in Water (Cyclen = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane)”, *Chemistry An Asian Journal*, **2014**, 9(10), 2831–2841. 査読有

[5] Yosuke Hisamatsu, Yuya Miyazawa, Kakeru Yoneda, Miki Miyauchi, Mohd Zulkefeli, and Shin Aoki, “Supramolecular Complexes Formed by the Self-Assembly of Hydrophobic

Bis(Zn²⁺-cyclen) Complexes, Copper, and Di- or Triimide Units for the Hydrolysis of Phosphate Mono- and Diesters in Two-phase Solvent Systems (Cyclen = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane)", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **2016**, 64(5), 451-464 (Cover Picture に選出). 査読有

[6] 青木伸、有安真也、花屋賢悟、久松洋介、須貝威、“8-quinolinol 誘導体の化学反応とバイオケミカルツール・酵素阻害剤への応用”、*有機合成化学協会誌*、**2016**, 74(5), 482-493. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- [1] ペプチドを連結したトリスシクロメタレート型イリジウム(III)錯体の設計・合成と細胞死誘導活性の評価、久松洋介、渋谷愛、鈴木希美、田中裕志、鈴木利宙、安部良、青木伸、日本ケミカルバイオロジー学会 第 9 回年会、大阪大学、2014 年 6 月 11 日~13 日
- [2] 塩基性ペプチドを連結した水溶性トリスシクロメタレート型イリジウム(III)錯体の設計・合成と細胞死誘導活性の評価、久松洋介、鈴木希美、渋谷愛、田中裕志、犬飼岳史、鈴木利宙、安部良、青木伸、錯体化学会第 6 4 回討論会、中央大学、2014 年 9 月 18 日~20 日
- [3] ペプチドを導入したトリスシクロメタレート型イリジウム(III)錯体の設計・合成と生物活性評価、久松洋介、鈴木希美、渋谷愛、田中裕志、犬飼岳史、鈴木利宙、安部良、青木伸、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、岡山大学、2014 年 9 月 11 日~13 日
- [4] 塩基性ペプチドを導入した両親媒性トリスシクロメタレート型イリジウム(III)錯体の設計・合成と生物活性評価、久松洋介、鈴木希美、渋谷愛、田中裕志、犬飼岳史、鈴木利宙、安部良、青木伸、第 58 回日本薬学会関東支部大会、昭和薬科大学、2014 年 10 月 4 日
- [5] Design and Synthesis of Peptide-Conjugated Tris-cyclometalated Ir(III) Complexes for Staining and Cell Death Induction of Cancer Cells, Yosuke Hisamatsu, Nozomi Suzuki, Ai Shibuya, Hiroshi Tanaka, Abdullah-Al Masum, and Shin Aoki, Vietnam Malaysia International Chemical Congress 2014, Hanoi (Vietnam) 2014 年 11 月 7 日~9 日
- [6] 塩基性ペプチドを導入したカチオン性両親媒性トリスシクロメタレート型イリジウム錯体の細胞死誘導に関する構造活性相関とメカニズム解析、久松洋介、渋谷愛、鈴木希美、鈴木利宙、安部良、青木伸、日本薬学会第 135 年会、神戸学院大学ほか、2015 年 3 月 26 日~28 日
- [7] pH 依存的な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の設計と合成、第 69 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、久松洋介、神戸彩、青木伸、横浜国立大学、2015 年 5 月 16 日

[8] 修飾した二核亜鉛錯体と有機ビルディングブロックの組み合わせにより構築される自己集積体のホスファターゼ活性評価、久松洋介、宮内美樹、米田翔、宮澤有哉、青木伸、第 13 回 ホスト・ゲスト化学シンポジウム、東北大学、2015 年 6 月 6 日~7 日

[9] カチオン性両親媒性トリスシクロメタレート型イリジウム(III)錯体により誘導される細胞死とそのメカニズムの解析、久松洋介、渋谷愛、鈴木希美、鈴木利宙、安部良、青木伸、日本ケミカルバイオロジー学会 第 10 回年会、東北大学、2015 年 6 月 10 日~12 日

[10] 生物学的応用を指向したトリス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、渋谷愛、神戸彩、鈴木希美、諸見里真輔、中川朗宏、Sarvendra Kumar、Abdullah-Al Masum、田中裕志、青木伸、錯体化学若手の会 関東支部 前期勉強会、東京大学、2015 年 6 月 13 日

[11] 疎水性二核亜鉛錯体と有機アニオンと銅イオンによる自己集積体の構築とエステル・アミドの加水分解活性、久松洋介、米田翔、宮内美樹、宮澤有哉、青木伸、第 59 回日本薬学会関東支部大会、日本大学、2015 年 9 月 12 日

[12] 錯体形成を鍵とする機能性分子の設計・合成と生物学的応用、久松洋介、第 59 回日本薬学会関東支部大会、日本大学、2015 年 9 月 12 日

[13] Design and Synthesis of C3-Symmetric and Luminescent Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes Having Biologically Active Peptides, Yosuke Hisamatsu, Ai Shibuya, Nozomi Suzuki, Hiroshi Tanaka, Abdullah-Al Masum, and Shin Aoki, Pacificchem 2015, Honolulu (U.S.A.) 2015 年 12 月 15 日~20 日

[14] Design and Synthesis of Luminescent Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes Containing Bioactive Peptides, Yosuke Hisamatsu, Ai Shibuya, Nozomi Suzuki, Abdullah-Al Masum, Hiroshi Tanaka, Sarvendra Kumar, Yuichi Tamura, and Shin Aoki, iPops 2016, 2016 年 2 月 27 日~29 日

[15] 光反応性ジアジリンを有するカチオン性両親媒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、久松洋介、鈴木希美、渋谷愛、鈴木利宙、安部良、青木伸、日本薬学会第 136 年会、パシフィコ横浜 2016 年 3 月 27 日~29 日

[図書] (計 1 件)

Shin Aoki, Mohd Zulkefeli, Masanori Kitamura, and Yosuke Hisamatsu, "Supramolecular Hosts and Catalysts Formed by Synergistic Molecular Assemblies of Multinuclear Zinc(II) Complexes in Aqueous Solution" Synergy in Supramolecular

Chemistry; T. Nabeshima, Ed; CRC: Boca, Raton,
FL. 2015, 担当頁 : 33-56 (全頁数 : 336).

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 :