

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18851

研究課題名(和文) がん治療薬を指向した新規カチオン性金属錯体の設計・合成と標的分子の同定

研究課題名(英文) Design and synthesis of new cationic metal complexes for anticancer drugs and identification of their target molecules

研究代表者

久松 洋介 (Hisamatsu, Yosuke)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

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)：カチオン性ペプチドを有する両親媒性 Ir 錯体の細胞死誘導メカニズムの解明を目指したこれまでの研究を継続し、本研究では、Ir 錯体が細胞表面で作用する標的分子の同定を行った。具体的には、光反応性基であるジアジリンを導入したカチオン性 Ir 錯体を設計・合成し、Jurkat 細胞に作用させた後にフォトアフィニティーラベリングを行った。プロテオーム解析の結果、カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンがカチオン性 Ir 錯体の標的タンパク質の一つであることが示唆された。実際に、カチオン性 Ir 錯体は、カルシウム-カルモジュリンと安定な複合体を形成できることが発光滴定実験により明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this work, we have continued the mechanistic studies of cell death induced by amphiphilic Ir complexes containing cationic peptides. We designed and synthesized new cationic amphiphilic Ir complexes having photoreactive diazirine groups for photoaffinity labeling to identify the target molecules of the Ir complex. A proteomic analysis of the products obtained by the photoirradiation of Ir complex with Jurkat cells suggests that the Ca²⁺-binding protein “calmodulin (CaM)” is one of target proteins of the Ir complexes. Indeed, cationic amphiphilic Ir complex forms a stable complex with the Ca²⁺-CaM complex, as evidenced by luminescence titration experiments.

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 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞と正常細胞の細胞表面の電荷の違いに着目したがん治療薬の開発が提案されている (Schweizer, *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, 625, 190)。例えば、カチオン性両親媒性ペプチドである SVS-1 は、がん細胞表面に強く結合し、種々のがん細胞に対して細胞死を誘導する一方で、正常細胞や赤血球に対して低い毒性を示した (Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 6210)。カチオン性両親媒性ペプチドの例を含め、カチオン性両親媒性化合物のがん治療薬への応用研究が注目されているが、化合物と細胞表面との相互作用メカニズム、構造と活性の相関や細胞死誘導メカニズムなど、活性発現に関わる多くの現象に対する理解は未だ十分ではない。

2. 研究の目的

我々は、最近、KKGG (K: リシン、G: グリシン)テトラペプチドを配位子の 5' 位に導入したカチオン性両親媒性トリスクロメタレート型イリジウム(Ir)錯体 **1** (図 1)が、生理条件下、+9 の電荷を有し、ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞に対して、がん細胞選択的に細胞死を誘導することを報告した (EC_{50} (50%効果濃度) = 16 μ M) (*Bioconjugate Chem.*, 2015, 26, 857-879)。さらに、**1** の細胞死誘導メカニズムについて初期検討を行った結果、「Ir 錯体 **1** が、がん細胞表面に結合すると、細胞内カルシウム (Ca^{2+}) 濃度が増大し、その後、細胞死が誘導される」ことが示唆された。

本研究では、光反応性基としてジアジリンを導入した新規カチオン性両親媒性 Ir 錯体 **2** (図 1) を設計・合成し、Ir 錯体の細胞表面の標的分子 (例えば、 Ca^{2+} が関与するチャネルやシアル酸やヘパラン硫酸などが結合した糖タンパク質) の同定を目的とする。

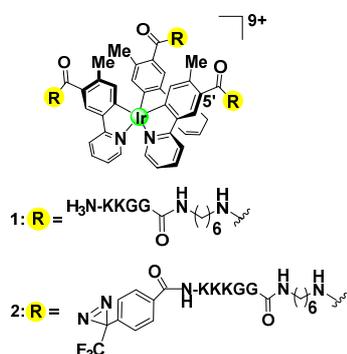


図 1. 配位子の 5' 位にカチオン性ペプチドを導入した両親媒性 Ir 錯体 **1** および光反応性基を導入した Ir 錯体 **2**

3. 研究の方法

光反応性基であるトリフルオロメチルフェニルジアジリンを KKKGG ペプチドの N 末端側に導入した Ir 錯体 (生理条件下での総電荷: +9) を設計・合成した。続いて、Jurkat 細胞に対して Ir 錯体 **2** を添加し、フォトアフィニティーラベリングおよびプロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

ジアジリンを有し、リンカーの炭素数が 6 のカチオン性両親媒性 Ir 錯体 **2** を用いて、フォトアフィニティーラベリングを行った。まず、Jurkat 細胞に対して、Ir 錯体 (5.0 μ M) を添加し、4 $^{\circ}C$ で 1 時間インキュベートし、細胞表面に作用させた後、5 分間 365 nm の光を照射しラベル化を行った。続いて、膜タンパク質抽出キット (インヴェント バイオテクノロジーズ) のプロトコールに従い、膜タンパク質フラクションとサイトゾルのタンパク質フラクションを得た。

それぞれのフラクションに対して電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、発光検出およびクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行った。図 2 には、2 非存在下および存在下での各のフラクションの SDS-PAGE の結果を示した。Ir 錯体 **2** を加えた条件での膜のフラクション (図 2a, レーン 3) では、主に 15-20 KDa 付近に、Ir 錯体由来の発光による二つのバンド A と B が観察でき、それらのバンドは CBB でも染色された (図 2b, レーン 3)。一方、2 存在下のサイトゾルのフラクションでは、Ir 錯体によってラベル化され発光するタンパク質のバンドは観察できなかった (図 2, レーン 5)。

次に図 2 に示す A および B のバンドを切り出し、nano LC/MS/MS 解析を用いたプロテオーム解析を行った。

これまでの実験結果から、カチオン性 Ir 錯体が細胞に作用すると細胞内 Ca^{2+} 経路の活性化を引き起こすこと、酸性タンパク質と相互作用しやすいことが分かっており、それらを踏まえてプロテオーム解析の結果を考察した。その結果、上位に位置付けられた候補タンパク質の中で、 Ca^{2+} 結合タンパク質であり、等電点が 4.1 の酸性タンパク質であるカルモジュリン (CaM) に着目した。一方、バンド B の解析結果からは、Ir 錯体の標的分子として有望なタンパク質を見出すことができなかった。

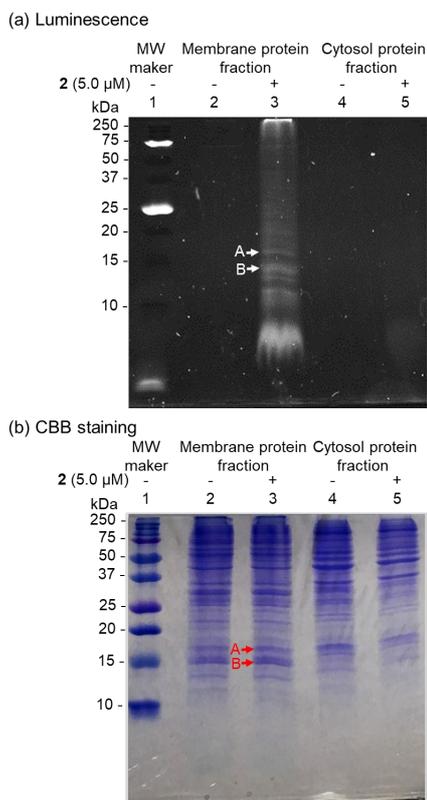


図 2. Ir 錯体 2 存在下でのフォトアフィニティーラベリング後の細胞溶解液から抽出した膜タンパク質とサイトゾルのタンパク質の各フラクションの電気泳動 (SDS-PAGE) の結果 (a) ゲルの発光画像、(b) ゲルの CBB 染色画像

CaM は、 Ca^{2+} の結合によって構造変化が誘起されると標的タンパク質に結合し、例えば、カルモジュリン依存性キナーゼやカルシニューリンなどのホスファターゼ、細胞膜に存在する plasma membrane Ca^{2+} -ATPases (PMCA) など様々なタンパク質の機能制御に関わっている。さらに、 Ca^{2+} -CaM に結合する標的タンパク質のペプチド部位は、カチオン性両親媒性 α -ヘリックス構造を有していることが知られている。これらの知見から、我々は、カチオン性両親媒性 Ir 錯体の標的分子として、 Ca^{2+} -CaM の可能性を考えた。

そこで、実際に、 Ca^{2+} -CaM に対する Ir 錯体 2 の親和性を HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で評価した。具体的には、 Ca^{2+} 存在下、CaM に対する 2 の発光滴定実験を行った (図 3a)。その結果、2 の発光強度が、CaM 濃度依存的に増大し、約 1 当量のところで変化が飽和したことから、2 が Ca^{2+} -CaM に対して高い親和性を示すことが分かった。

Ir 錯体 2 に Ca^{2+} -CaM が結合し増大した 2 の発光強度は、 Ca^{2+} のキレーターである EGTA を添加し、 Ca^{2+} -CaM から Ca^{2+} を除くと再び減少した (図 3b)。さらに、2 の Ca^{2+} -CaM との相互作用による発光強度の変

化は、 Ca^{2+} と EGTA の添加によって可逆的に変化した。発光滴定実験に加えて、 Ca^{2+} -CaM に対して Ir 錯体 2 を添加し照射を行うとラベル化が進行したことから両者の親和性が支持された。

以上の結果より、 Ca^{2+} -CaM が、カチオン性両親媒性 Ir 錯体の標的分子の一つである可能性が示唆された。

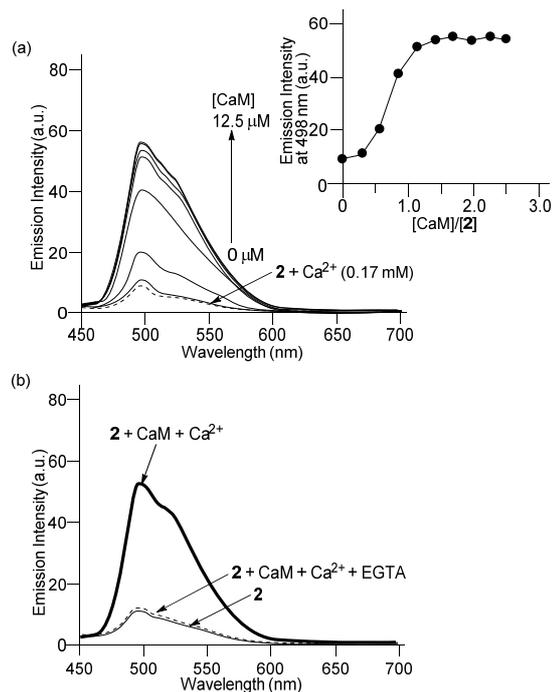


図 3. (a) HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中、 Ca^{2+} (0.17 mM) 存在下、Ir 錯体 2 (5.0 μM) に対して CaM (0-2.5 equiv.) を滴定した際の発光スペクトル変化 (b) Ir 錯体 2 (5.0 μM) (plain curve)、2 + CaM (8.3 μM) + Ca^{2+} (0.17 mM) (bold curve)、2 + CaM (8.3 μM) + Ca^{2+} (0.17 mM) + EGTA (0.34 mM) (dashed plain curve) の発光スペクトル

これまで、1 や 2 に示すように、フェニルピリジン配位子の 5' 位にペプチドを導入した一連の化合物を合成してきた。そこで、カチオン性ペプチドの導入位置を 5' 位から 4' 位に変えた 3a-d (図 4) について、Jurkat 細胞に対する細胞死誘導活性を MTT アッセイによって評価した (3a: $\text{EC}_{50} = 29 \mu\text{M}$, 3b: $\text{EC}_{50} = 5.0 \mu\text{M}$, 3c: $\text{EC}_{50} = 2.4 \mu\text{M}$, 3d: $\text{EC}_{50} = 34 \mu\text{M}$)。その結果、炭素数 6 および 8 を有する 3b, 3c は Jurkat 細胞に対して高い細胞死誘導活性を示し、その活性は、5' 位にペプチドを有する 2 ($\text{EC}_{50} = 16 \mu\text{M}$) よりも高かった。細胞死誘導活性における Ir 錯体の適切なリンカー長は、5' 位にカチオン性ペプチドを導入した Ir 錯体の場合と同様、炭素数 6 もしくは 8 であった。また、細胞死誘導メカニズムの新たな知見として、1 や 3b は、

細胞死誘導過程においてミトコンドリアに局在していることが示唆された。さらに、ジアジリンを導入した **4** を Jurkat 細胞に添加しフォトアフィニティーラベリングを行ったところ、**2** の場合と同様に、CaM が標的分子の一つであることが示唆された。

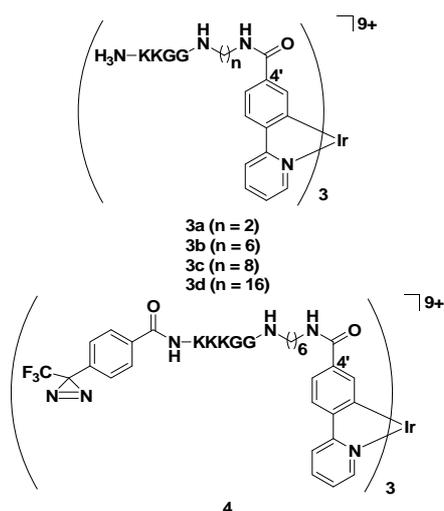


図 4. 4' 位にカチオン性ペプチドを導入した Ir 錯体 **3** および光反応性基を導入した Ir 錯体 **4**

本研究において、我々は、カチオン性 Ir 錯体が作用する細胞表面の標的分子の同定に取り組み、新たなフォトアフィニティープローブ **2** および **4** を設計・合成した。両者を用いてフォトアフィニティーラベリングおよびプロテオーム解析を行った結果、CaM がカチオン性 Ir 錯体の標的タンパク質の一つであることが示唆された。今後、さらなる詳細な検討を行うことで、Ir 錯体の細胞死誘導メカニズムの核心に迫っていきたい。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Kenta Yokoi, Yosuke Hisamatsu, Kana Naito and Shin Aoki, “Design, Synthesis and Anticancer Activity of Cyclometalated Tris(ppy) Iridium(III) Complexes Having Cationic Peptides at the 4'-Position of the Ppy Ligand (Ppy = 2-Phenylpyridine)”, *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2017**, 5295-5309, 査読有, DOI: 10.1002/ejic.201700846.

Yosuke Hisamatsu, Nozomi Suzuki, Abdullah-Al Masum, Ai Shibuya, Ryo Abe, Akira Sato, Sei-ichi Tanuma and Shin Aoki, “Cationic Amphiphilic Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes Induce Cancer Cell

Death via Interaction with Ca^{2+} -Calmodulin Complex”, *Bioconjugate Chemistry*, **2017**, 28(2), 507-523, 査読有, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00627.

Yuichi Tamura, Yosuke Hisamatsu, Ayami Kazama, Kenji Yoza, Kyouhei, Sato, Reiko Kuroda and Shin Aoki, “Stereospecific Synthesis of Tris-Heteroleptic Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes via Different Heteroleptic Halogen-Bridged Iridium(III) Dimers and Their Photophysical Properties”, *Inorganic Chemistry*, **2018**, 57(8), 4571-4589, 査読有, DOI: 10.1021/acs.inorgchem.8b00323.

Yosuke Hisamatsu, Sarvendra Kumar and Shin Aoki, “Design and Synthesis of Tris-Heteroleptic Cyclometalated Iridium(III) Complexes Consisting of Three Different Nonsymmetric Ligands Based on Ligand-Selective Electrophilic Reactions via Interligand HOMO Hopping Phenomena”, *Inorganic Chemistry*, **2017**, 56(2), 886-899, 査読有, DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b02519.

Yuichi Tamura, Yosuke Hisamatsu, Sarvendra Kumar, Taiki Itoh, Kyouhei Sato, Reiko Kuroda and Shin Aoki, “Efficient Synthesis of Tris-Heteroleptic Iridium(III) Complexes Based on the Zn^{2+} -Promoted Degradation of Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes and Their Photophysical Properties”, *Inorganic Chemistry*, **2017**, 56(2), 812-833, 査読有, DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b02270.

Shin Aoki and Yosuke Hisamatsu, “Design and Synthesis of Luminescent Ir Complex-Peptide Hybrids for Theranostics of Cancer”, *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, **2017**, 2(23), 1118. 査読有
久松 洋介, “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”, *薬学雑誌*, **2016**, 136(12), 1601-1611, 査読有, DOI:10.1248/yakushi.16-00196.

[学会発表](計 16 件)

久松洋介、鈴木希美、マスムアブドラアル、渋谷愛、鈴木利宙、安部良、青木伸、細胞死誘導の時間スケールが異なるペプチドを導入した発光性イリジウム錯体の設計・合成と作用メカニズム解析、日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会、京都テルサ、2016 年 6 月 15 日~17 日
久松洋介、鈴木希美、渋谷愛、マスムアブドラアル、佐藤聡、田沼靖一、青木伸、カチオン性両親媒性イリジウム(III)錯体の細胞死誘導とフォトアフィニティーラベリングを用いた分子機構の解析、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、石川県立音楽堂、2016 年 9 月 7 日~9 日
Yosuke Hisamatsu, Yuichi Tamura,

Sarvendra Kumar, Taiki Itoh, Kyouhei Sato, Reiko Kuroda, Miho Hatanaka, Shin Aoki, Novel Synthetic Approaches to Cyclometalated Iridium(III) Complexes Having Three Different Ligands, 錯体化学会第 66 回討論会、福岡大学、2016 年 9 月 10 日 ~ 12 日

久松洋介、青木伸、機能性イリジウム錯体の精密な設計・合成と生物学的応用、第 2 回材料相模セミナー、相模中央化学研究所、2016 年 10 月 21 日

Yosuke Hisamatsu, Nozomi Suzuki, Abdullah-Al Masum, Ai Shibuya and Shin Aoki, Mechanistic Study of Cancer Cell Death Induced by Cationic Amphiphilic Tris-Cyclometalated Iridium (III) Complex and Its Interaction with Target Protein, 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference、オークランド(ニュージーランド)、2016 年 12 月 4 日 ~ 9 日

Abdullah-Al Masum, Yosuke Hisamatsu, Nozomi Suzuki, Shin Aoki, Design and Synthesis of Artificial TRAIL Mimics Based on C_3 -symmetric and Luminescent Iridium Complexes that are Able to Stain and Induce Cell Death of Cancer Cells, 第 15 回次世代を担う有機化学シンポジウム、東京都長井記念館、2017 年 5 月 26 日 ~ 28 日

青木伸、久松洋介、Abdullah-Al Masum、内藤佳奈、横井健汰、鈴木希美、シクロメタレート型イリジウム錯体 - ペプチドハイブリッド化合物によるがん細胞の検出と細胞死誘導 ペプチド配列とペプチド導入位置の影響の検討、日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会、2017 年 6 月 7 日 ~ 9 日

横井健汰、内藤佳奈、久松洋介、青木伸 Phenylpyridine リガンド部の 4' 位にカチオン性ペプチドハイブリッドを導入したシクロメタレート型 Ir(III)錯体の設計、合成とがん細胞死誘導活性、第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、東京理科大学、2017 年 6 月 16 日 ~ 17 日

内藤佳奈、久松洋介、Abdullah-Al Masum、青木伸、シクロメタレート型 Ir(III)錯体 - ペプチドハイブリッドのがん細胞死誘導活性に及ぼすペプチド配列の影響、第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、東京理科大学、2017 年 6 月 16 日 ~ 17 日

Jun Jie Zhu, Yosuke Hisamatsu, Shin Aoki, Selective Cell Death Induction of Cancer Cells of Metal Complexes, 6th Asian Conference on Coordination Chemistry (ACCC6)、メルボルン(オーストラリア)、2017 年 7 月 23 日 ~ 28 日

Abdullah-Al Masum, Yosuke Hisamatsu, Nozomi Suzuki, and Shin Aoki, Detection and Induction of Cell Death of Cancer Cells by Luminescent Iridium Complexes Having

Death Receptor Binding Peptides, 17th Asian Chemical Congress (17ACC)、メルボルン(オーストラリア)、2017 年 7 月 23 日 ~ 28 日

青木伸、Abdullah-Al Masum、久松洋介、内藤佳奈、横井健汰、Detection and Cell Death Induction of Cancer Cells by Cyclometalated Ir Complex-Peptide Hybrids (シクロメタレート型イリジウム錯体 - ペプチドハイブリッドによるがん細胞の検出と細胞死誘導)、2017 年光化学討論会、東北大学、2017 年 9 月 4 日 ~ 6 日

久松洋介、梅澤直樹、樋口恒彦、ヘミン認識能を有する分子ピンセットの開発、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京大学、2017 年 9 月 7 日 ~ 9 日

Kana Naito, Yosuke Hisamatsu, Kenta Yokoi, Abdullah-Al Masum, Shin Aoki, Effect of Peptide Sequences on Cancer Cell Death Induced by Amphiphilic Cyclometalated Iridium(III) Complex-Peptide Hybrids, 錯体化学会第 67 回討論会、北海道大学、2017 年 9 月 16 日 ~ 18 日

久松洋介、梅澤直樹、樋口恒彦、ヘミンを認識するピンセット型ホスト分子の設計・合成と生物活性評価、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、名古屋大学、2017 年 10 月 25 日 ~ 27 日

田村祐一、久松洋介、内藤佳奈、横井健汰、青木伸、りん光を消光する官能基を有するシクロメタレート型イリジウム錯体の設計・合成と応用、第 43 回反応と合成の進歩シンポジウム、富山国際会議場、2017 年 11 月 6 日 ~ 8 日

久松洋介、梅澤直樹、樋口恒彦、プロトポルフィリン IX およびその鉄(III)錯体を認識するピンセット型ホスト分子の設計・合成と応用、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日 ~ 28 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久松 洋介 (HISAMATSU YOSUKE)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：80587270