

24. がん細胞表面で合成されるがん治療薬・診断薬の開発

久松 洋介

Key words : がん治療薬, イリジウム錯体, 細胞死

東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科
生物有機化学研究室

緒言

がんは日本をはじめとした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. TRAIL (tumor necrosis factor(TNF)-related apoptosis-inducing ligand) は, C_3 -対称性ホモ三量体構造を有し, がん細胞に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.

一方, 我々は, これまでにトリスシクロメタレート型イリジウム (Ir) 錯体の 5' 位選択的な置換反応を見出し, さらに官能基を変換することで, 様々な機能性 Ir 錯体の開発を行った¹⁻⁴⁾. 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研究に着手した. 具体的には, TRAIL と同様の C_3 -対称性構造に加えて優れた発光特性を備えたトリスシクロメタレート型 Ir 錯体を中心骨格に有し, 適切な位置に DR 結合性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する TRAIL 様活性評価とがん細胞のイメージングに取り組んだ. また, がん細胞表面は, 正常細胞と比べ, シアル酸やヘパラン硫酸などのアニオン性化合物が多く存在し負電荷を帯びていることから, 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. そこで, がん細胞選択的に細胞死を誘導するカチオン性両親媒性 Ir 錯体についても併せて検討した.

方法、結果および考察

1. 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・合成と細胞死誘導活性評価

TRAIL と DR の一つである DR5 との共結晶構造から, TRAIL のアミノ酸配列に含まれる 7 残基ペプチド Patch A が, DR5 との結合に重要であることが示唆された⁵⁾. また, 最近, DR5 結合性の環状ペプチドが報告され, DR5 に特異的に結合することにより, TRAIL 様活性を示すことが報告された⁶⁾. そこで, 我々は, 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, Patch A ペプチドや DR5 結合性ペプチドを導入した Ir 錯体と比較化合物として KKGG ペプチド (K: リシン, G: グリシン) を導入した Ir 錯体 **3-8** (Fig. 1) を設計・合成し, DR5 を発現するヒト白血病 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.

まず, Patch A ペプチドおよび DR5 結合性環状ペプチドを導入した Ir 錯体の細胞死誘導活性を, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイにより評価したが, いずれの化合物も Jurkat 細胞に対する細胞死誘導活性は低かった. そこで, Ir 錯体の発光特性を活かし, DR5 選択的ながん細胞のイメージングについても検討を行った. その結果, DR5 結合性環状ペプチドを導入した Ir 錯体は, DR5 を発現する Jurkat 細胞の細胞膜上で緑色に強く発光した. さらに, この化合物を DR5 の発現量の異なるがん細胞 (Jurkat 細胞, Molt-4 細胞, K562 細胞) に対し添加し, フローサイトメトリーを用いて評価したところ, DR5 の発現量依存的に Ir 錯体の発光強度が増大した⁷⁾. 現在, TRAIL 様活性の向上を期待し, 新たなイリジウム錯体を設計・合成しその評価を進めている.

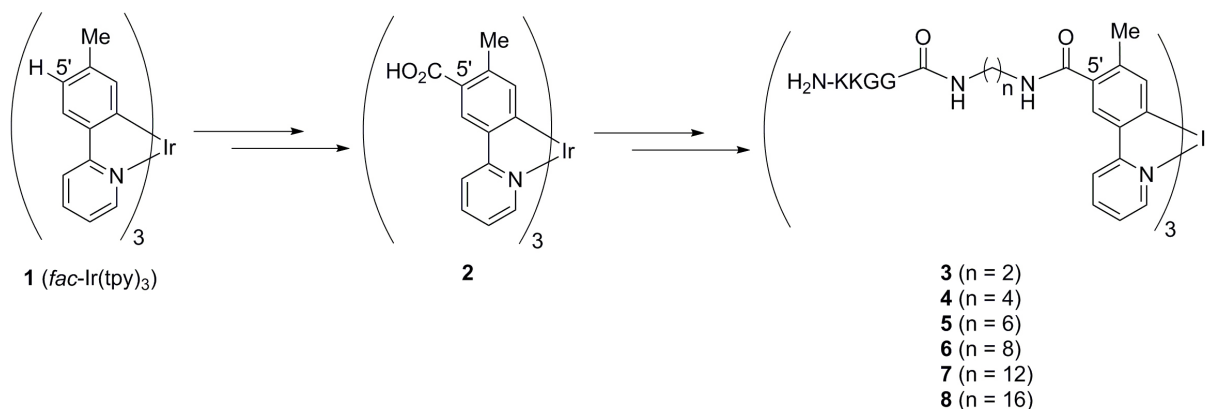


Fig. 1. The synthesis of amphiphilic tris-cyclometalated Ir complexes **3-8** having basic peptides via regioselective substitution reactions.

一方、当初、比較化合物であった KKGG ペプチド導入したカチオン性両親媒性 Ir 錯体 **4** (*n* = 4), **5** (*n* = 6), **8** (*n* = 16) を Jurkat 細胞に添加し 37°C の条件で 1 時間インキュベーションし、蛍光顕微鏡で観察したところ、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、炭素数が 6 の **5** では、死細胞において Ir 錯体由来の強い発光が観察できた (Fig. 2a-f). さらに、アルキル鎖の炭素数が 16 の **8** を添加すると、細胞の形態変化はほとんど見られず、**8** は、主に細胞膜上に局在した (Fig. 2g-i).

一方、**5** を 4°C 下、1 時間インキュベーションすると、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 (Fig. 2j-l). 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。

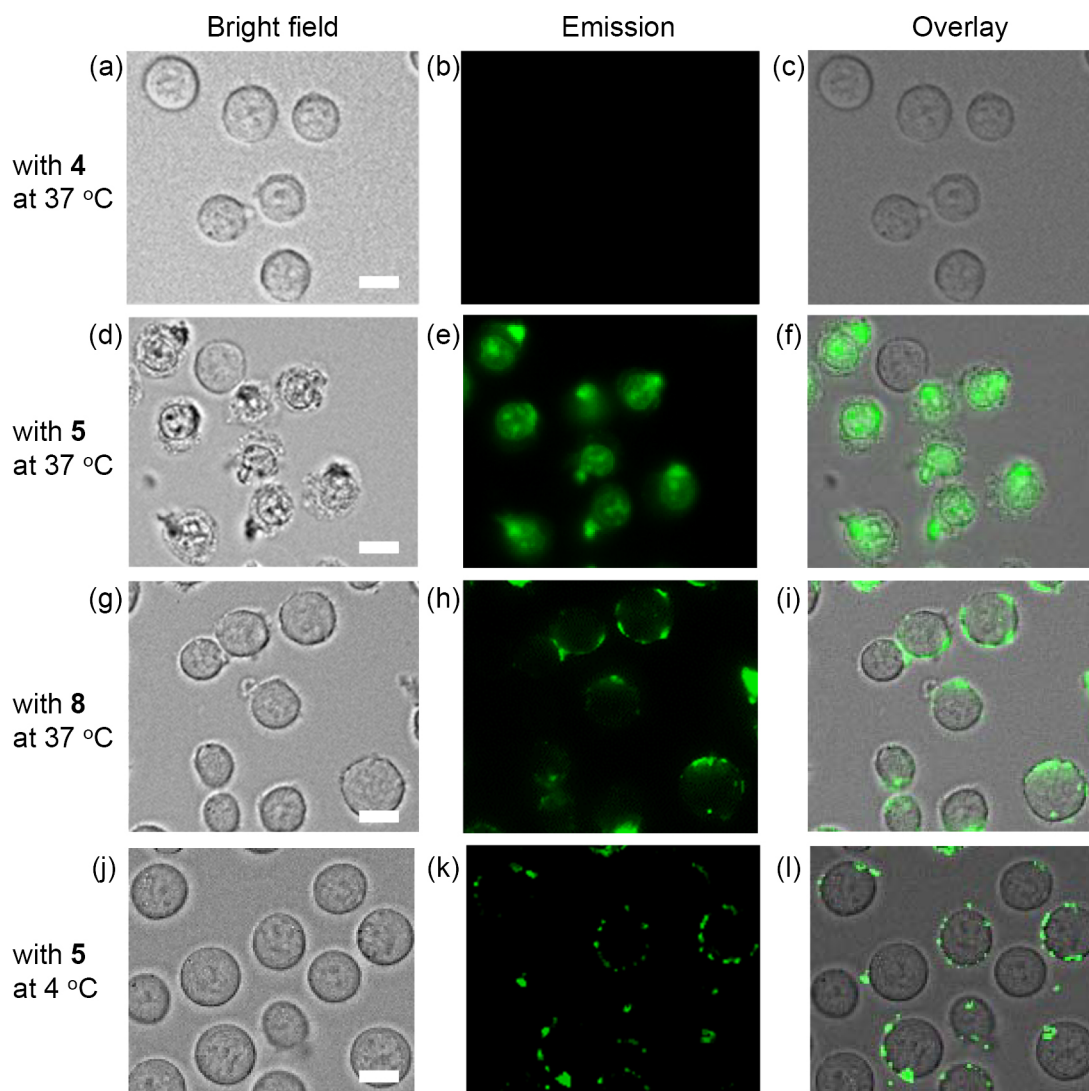


Fig. 2. Typical luminescence microscopy images (Biorevo, BZ-9000, Keyence) of Jurkat cells treated with Ir complexes **4** (75 μ M) (a-c), **5**, (d-f) and **8** (50 μ M) (g-i) for 1 hr at 37 $^{\circ}$ C and **5** (50 μ M) for 1 hr at 4 $^{\circ}$ C (j-l). Scale bar (white) : 10 μ m.

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** 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** : $EC_{50} > 50\mu$ M, **4** : $EC_{50} > 50\mu$ M, **5** : $EC_{50} = 16\mu$ M, **6** : $EC_{50} = 7.3\mu$ M, **7** : $EC_{50} = 32\mu$ M, **8** : $EC_{50} > 50\mu$ M) (Fig. 3)。これらの結果は、カチオン性両親媒性 Ir 錯体の疎水性と親水性のバランスが Jurkat 細胞に対する活性に重要であることを示唆している。また、化合物 **5** により誘導された細胞死は、アポトーシスやネクロプトーシスの阻害剤存在下で抑制されなかったことから、おそらくネクローシスであると考えている (Fig. 3)。

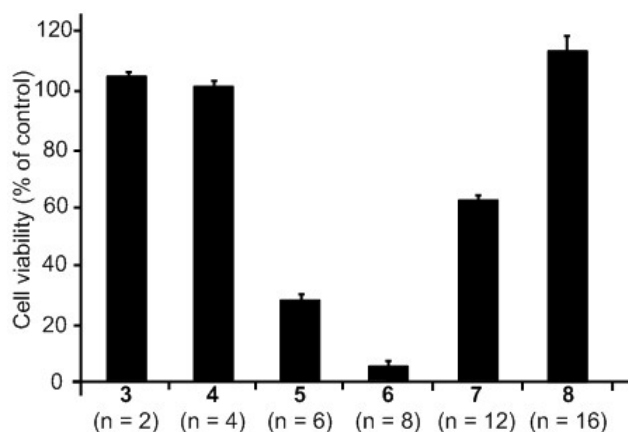


Fig. 3. Cell viability of Jurkat cells (% of control: 0 μM of Ir complex) in the presence of Ir complexes **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, and **8** at 25 μM.

次に Ir 錯体 **5** の細胞死誘導活性のがん細胞選択性について検討した。具体的には、正常細胞としてマウスのリンパ球、Jurkat 細胞および子宮頸がん細胞株である HeLa-S3 細胞に対して **5** を添加し、1 時間インキュベーションした後、PI 染色により細胞死を評価した。その結果、リンパ球に対する **5** の細胞死誘導活性は $EC_{50} > 50 \mu\text{M}$ と Jurkat 細胞や HeLa-S3 細胞に比べ低かった (Fig. 4).

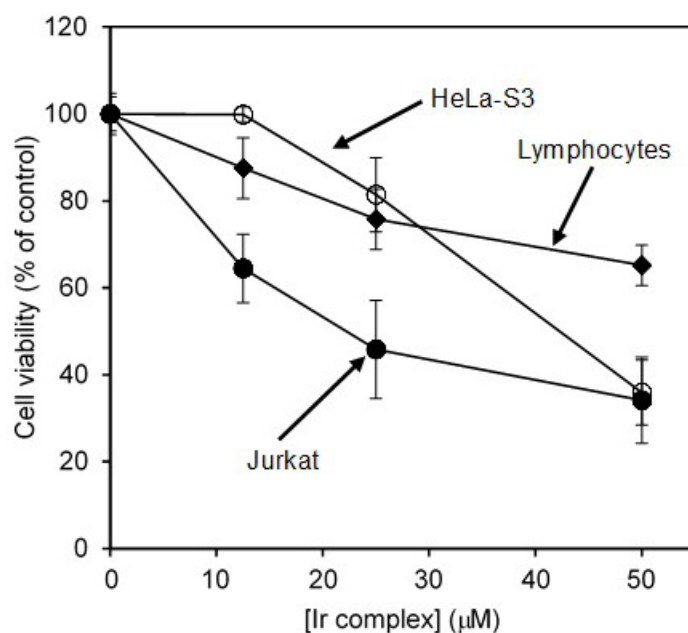


Fig. 4. Cell viability of **5** against normal mouse lymphocytes (filled diamonds), Jurkat cells (filled circles), and HeLa-S3 cells (open circles) in 10% FCS RPMI 1640 medium (determined by PI staining after incubation at 37°C for 1 hr).

次に、比較的高い細胞死誘導活性を示した Ir 錯体 **5** の Jurkat 細胞に対する細胞死誘導メカニズム解析を行った。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** の細胞死誘導は抑制されなかったことから、**5** による細胞死は、エネルギー非依存的であることが示唆された。

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、酸化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** を添加し、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カルシウムプローブの発光強度が増大し、その後、細胞の形態変化が観察できた。一方、細胞死を誘導しない **4** では、カルシウムに応答する細胞も見られたが、その頻度は **5** と比べ明らかに低く、細胞の形態変化も観察されなかった。化合物 **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、細胞死を誘導したことが示唆された⁸⁾。

本研究では、種々のペプチドを導入したトリスクロメタレート型 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ついても有用な知見を得ることができた。今後、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。

2. 中性付近の pH 変化に応答する赤色発光性 Ir 錯体の設計・合成

ペプチドをした導入したトリスクロメタレート型 Ir 錯体に加えて、赤色発光性トリスクロメタレート型 Ir 錯体である Ir(tfpiq)₃ **9** (tfpiq:1-(4'-trifluoromethylphenyl)isoquinoline) の 5'位選択的な置換反応および官能基変換反応を利用し、イミノイミダゾリジル基を導入した化合物 **10** を設計・合成し、pH 依存的な発光特性を評価した (Fig. 5)。その結果、**10** は、中性付近の pH に応答し、pH 7 よりも低い pH で ca. 600 nm の発光強度が増大する pH プローブとして機能することが明らかとなった。化合物 **10** を HeLa-S3 細胞に添加し、蛍光顕微鏡で観察したところ、**10** は細胞内酸性小器官であるリソソームでプロトン化され、赤色に発光した。さらに、HeLa-S3 細胞に **10** を導入した後に光照射 (ca. 465 nm) を行ったところ、ネクローシス様の細胞死が誘導された⁹⁾。

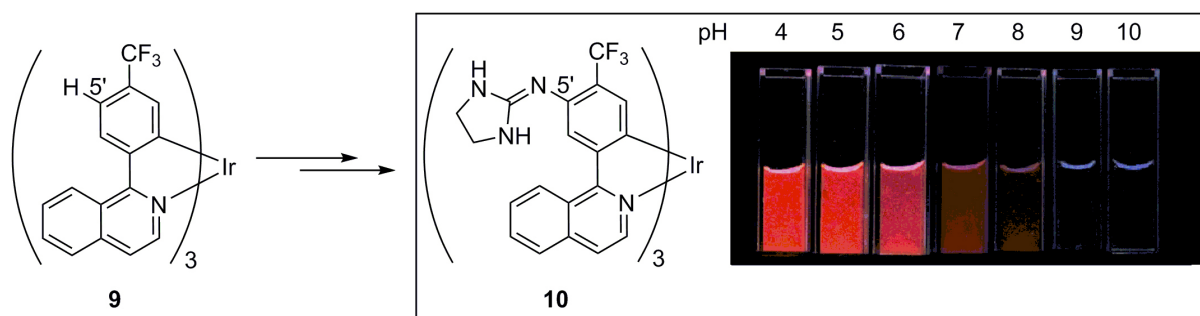


Fig. 5. Design and synthesis of pH activatable probe **10**. Photograph showing solutions of **10** (5 μ M) in degassed DMSO/100 mM buffer (from pH 4 to 10) at 25 $^{\circ}$ C. Excitation at 365 nm.

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京理科大学薬学部生命創薬科学科の青木 伸教授、渋谷 愛修士、鈴木希美学士、神戸 彩修士、大和田紘喜修士、東京理科大学生命医科学研究所の安部 良教授、鈴木利宙博士、東京工業大学大学院生命理工学研究科の河野雅弘教授である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Aoki, S., Matsuo, Y., Ogura, S., Ohwada, H., Hisamatsu, Y., Moromizato, S., Shiro, M. & Kitamura, M. : Regioselective aromatic substitution reactions of cyclometalated Ir(III) complexes : synthesis and photochemical properties of substituted Ir(III) complexes that exhibit blue, green, and red color luminescence emission. *Inorg. Chem.*, **50** : 806-818, 2011.
- 2) Hisamatsu, Y. & Aoki, S. : Design and synthesis of blue-emitting cyclometalated iridium(III) complexes based on regioselective functionalization. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2011** : 5360-5369, 2011.
- 3) Moromizato, S., Hisamatsu, Y., Suzuki, T., Matsuo, Y., Abe, R. & Aoki, S. : Design and synthesis of luminescent cyclometalated iridium(III) complex having N,N-diethylamino group that stains acidic intracellular organelles and induces cell death by photoirradiation. *Inorg. Chem.*, **51** : 12697-12706, 2012.
- 4) Nakagawa, A., Hisamatsu, Y., Moromizato, S., Kohno, M. & Aoki, S. : Synthesis and photochemical properties of pH responsive tris-cyclometalated iridium(III) complexes that contain a pyridine ring on the 2-phenylpyridine *ligand*. *Inorg. Chem.*, **53** : 409-422, 2014.
- 5) Hymowitz, S. G., Christinger, H. W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R. F., Ashkenazi, A. & de Vos, A. M. : Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell*, **4** : 563-571, 1999.
- 6) Pavet, V., Beyrath, J., Pardin, C., Morizot, A., Lechner, M. C., Briand, J. P., Wendland, M., Maison, W., Fournel, S., Micheau, O., Guichard, G. & Gronemeyer, H. : Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. *Cancer Res.*, **70** : 1101-1110, 2010.
- 7) Hisamatsu, Y., Masum, A. A., Tanaka, H., Shibuya, A., Suzuki, N., Suzuki, T., Abe, R. & Aoki, S. : *Manuscript in preparation*.
- 8) Hisamatsu, Y., Shibuya, A., Suzuki, N., Suzuki, T., Abe, R. & Aoki, S. : Design and synthesis of amphiphilic and luminescent tris-cyclometalated iridium(III) complexes containing cationic peptides as inducers and detectors of cell death via a calcium-dependent pathway. *Bioconjugate Chem.*, **26** : 857-879, 2015.
- 9) Kando, Y., Hisamatsu, Y., Ohwada, H., Moromizato, S., Kohno, M. & Aoki, S. : Design and synthesis of red-color emitting tris-cyclometalated iridium(III) complexes as pH probes and singlet oxygen sensitizers. *Inorg. Chem.*, **54** : 5342-5357, 2015.