

## 1. プログラム細胞死 paraptosis の解明と抗がん剤の開発

青木 伸

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

Key words : 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, プログラム細胞死, paraptosis, 抗がん剤

## 緒 言

プログラムされた細胞死 (Programmed Cell Death : PCD) は、固体の生命維持のために遺伝子によって制御された細胞死であり、発生時の形態形成や恒常性維持、がん、自己免疫疾患、ウイルス感染症等と密接に関わっている。従来、細胞死は「PCD としてのカスパーゼ依存性 apoptosis」と「受動的な死=necrosis」に分類されていたが、最近 necroptosis、autophagic cell death、paraptosis など多様な PCD 様式が明らかになり、それらを利用するがん治療の可能性が指摘されている [1]。例えば、アポトーシス耐性を獲得したがん細胞の細胞死を誘導するためには、異なる PCD を誘起する薬剤が必要不可欠であると考えられる。

種々の塩基性ペプチドが、非ウイルス性遺伝子導入剤や抗がん剤候補として機能することが報告されている [2]。一方、シクロメタレート型イリジウム (III) (Ir) 錯体 (例: 図 1 の *fac*-1 (Ir (tpy)<sub>3</sub>)) は、tpy (=2-(4'-tolyl) pyridine) などのリガンドが C と N を介して Ir に配位した錯体である。これらの錯体は水中で安定であり、三重項励起状態を経由した強いりん光を発する ( $\mu s$  オーダーの発光寿命)。また、配位子の変換や修飾による発光制御が可能である。

筆者ら、独自の方法で Ir 錯体にペプチドを導入した Ir 錯体-ペプチドハイブリッド (Ir complex-peptide hybrid, IPH) 2~8 (図 1) を設計、合成し、これらが、ヒト T 細胞性白血病 Jurkat 細胞の細胞死を誘導し、死細胞中で強く発光することを見出した [3~6]。つまり IPHs は、一つの分子でがん細胞の細胞死誘導と、死細胞の検出という複数の機能を有するという特徴を持つ。

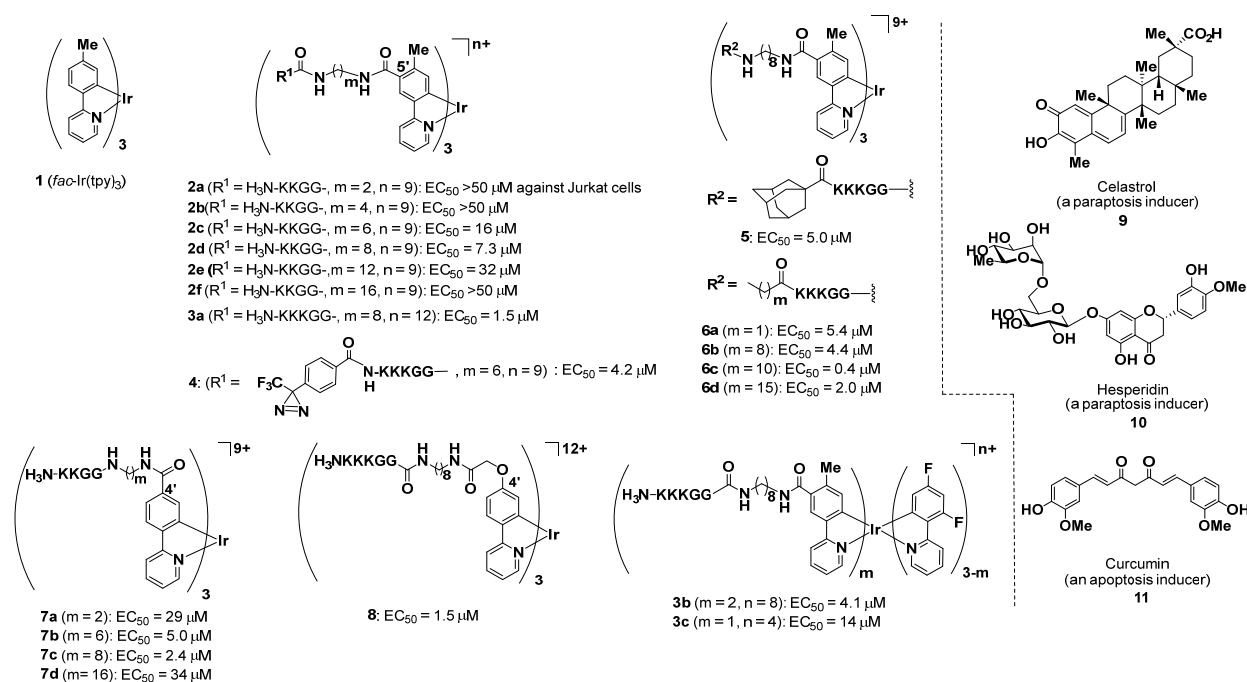


図 1. がん細胞の paraptosis を誘導するシクロメタレート型イリジウム錯体と天然物

すでに我々はIPHs 2~8がPCDの代表例であるapoptosisではなく、小胞体やミトコンドリアの液胞化(vacuolization) (図2、①) を伴うparaptosisであることを見出した[3~6]。そして、2の活性がペプチド配列やIr 錯体中心とペプチド間のリンカー長に依存して、2a~fでは2dが最も強い活性をもち、分子全体の正電荷とIr 錯体部分の疎水性だけでなく、何らかの細胞内分子を分子認識して抗がん活性作用を発揮していると考えられた。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇 (図2、②)、 $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパクであるカルモジュリン (CaM) との結合 (図2、③)、アクチンフィラメントとの結合 (図2、④)、⑤) などを誘導することが明らかになっていた。しかし、これらのparaptosis誘導シグナル活性化の重要な分子とメカニズムは未解明であった。

paraptosisは近年発見されたPCDの一つであり、*Tripterygium wilfordii* Hook, f. (ライコウトウ) から単離されたトリテルペノイドであるcelastrol (9)、*Citrus* (柑橘類) から単離されたhesperidin (10) (図1) などもparaptosisを誘導すること (図2、⑥) が報告されている。また、autophagyとの関係も指摘されている (図2、⑦)。そこで本研究は、我々のIPHと天然物9と10が共通のシグナル伝達分子を活性化すると仮定して、ターゲット分子の探索と同定を行い、paraptosisの分子機構を明らかにすることを目的とした (図2、⑧については後述)。

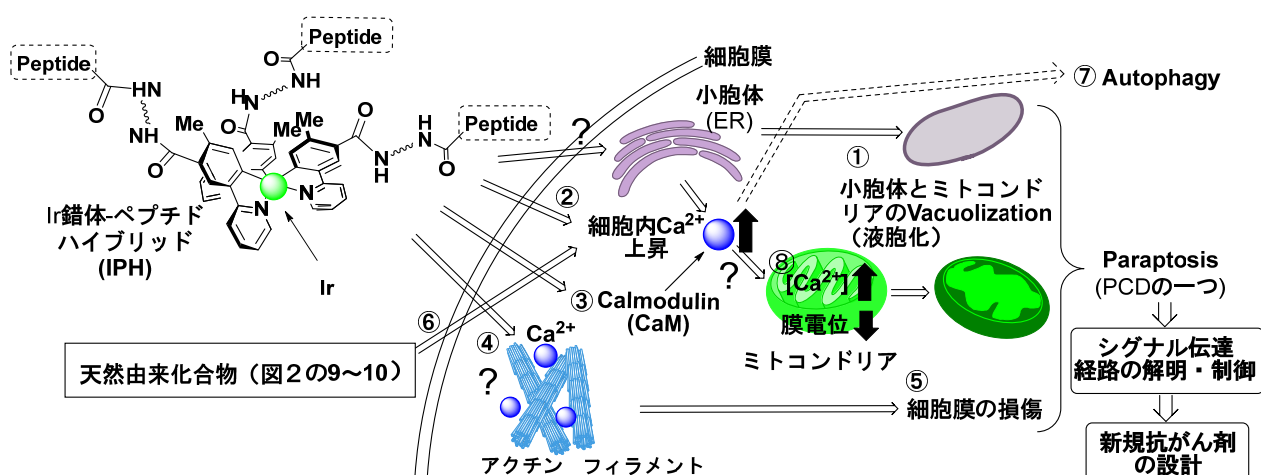


図2. IPHや天然物によるがん細胞のプログラム化細胞死 (paraptosis) の推定メカニズムの概略

## 方法および結果

### 1. IPHsによるJurkat細胞のparaptosis誘導と細胞形態変化、細胞内器官への影響、celastrolとの比較

本研究では、これまでに合成したIPHs 2~7 (図1) のJurkat細胞に対する細胞死誘導活性 (図1の化学構造の下にJurkat細胞に対する $\text{EC}_{50}$ 値を記載した) のデータをもとに、KKKGGペプチドの数が2つ、1つである3b、cを合成し、その抗がん活性を測定した。これらの合成には、我々がもつ錯体化学の知見を利用した。3a、b、cのペプチド数 (それに伴う正電荷) と、抗がん活性の間に良い相関があることを確認した ( $\text{EC}_{50}$ 値の比較:  $1.5 \mu\text{M}$  for (3a) <  $4.1 \mu\text{M}$  for (3b) <  $14 \mu\text{M}$  for (3c) [8]。

3a、b、cと、リガンド部の4'位にKKKGGペプチドを導入した7cおよび8によって誘導されるparaptosisを、celastrol (9) およびhesperidin (10) によるparaptosisと比較した。その結果、i) IPHsは数時間単位でparaptosisを誘導するが、9は約一日必要とすることと、10の細胞死誘導活性は非常に弱いことがわかった。ii) 死細胞の透過型電子顕微鏡 (tunneling electron microscopy: TEM) 画像 (図3) から、paraptosisの特徴的な現象であると報告されている細胞内器官の液胞化が確認された[7~9]。さらに、IPHsの細胞内挙動を追跡したところ、IPHsが細胞膜へ結合した後ミトコンドリアへ移行することが示唆された[8, 9]。

次に、2bと9の、リソソームと小胞体の構造への影響を検討した。これらの細胞内器官の発光プローブである

LysoTracker と ER-RFP を用いて共染色実験を行ったところ、**2b** では LysoTracker と ER-RFP の発光が顕著に低下したのに対し（図 4a、b の白い矢印）、**9** では LysoTracker の発光だけが低下した（図 4c、d） [9]。図 3 の結果と考えると、**2b** がリソソームと小胞体の液胞化、**9** がリソソームの液胞化を誘導する可能性が高い。また、**2b** が最初にかん細胞膜へ分布した後ミトコンドリアへ移行し、ミトコンドリア膜電位を低下させることがわかった [8, 9]。それに対して celastrol は細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させるが、ミトコンドリア内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度とミトコンドリア膜電位には影響しない [9]。

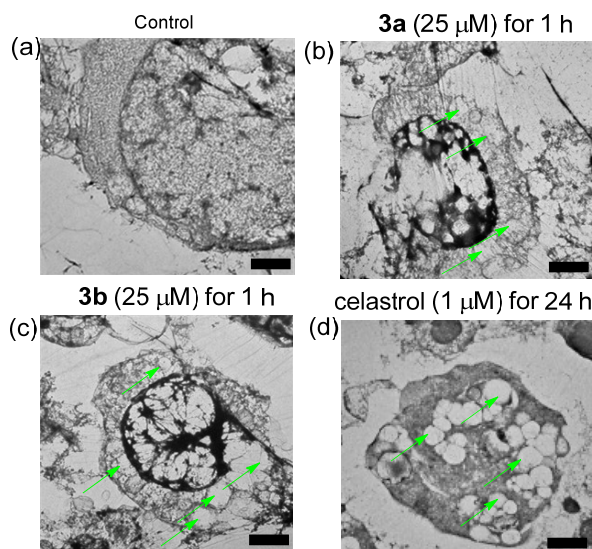


図3. **3a**、**3b**、celastrolで処理したJurkat細胞のTEM画像

a) コントロール、b) **3a** (25 μM)、c) **3b** (25 μM)、d) celastrol (1 μM)  
(緑色の矢印が液胞化している場所を示す)。(スケールバー：2 μm)

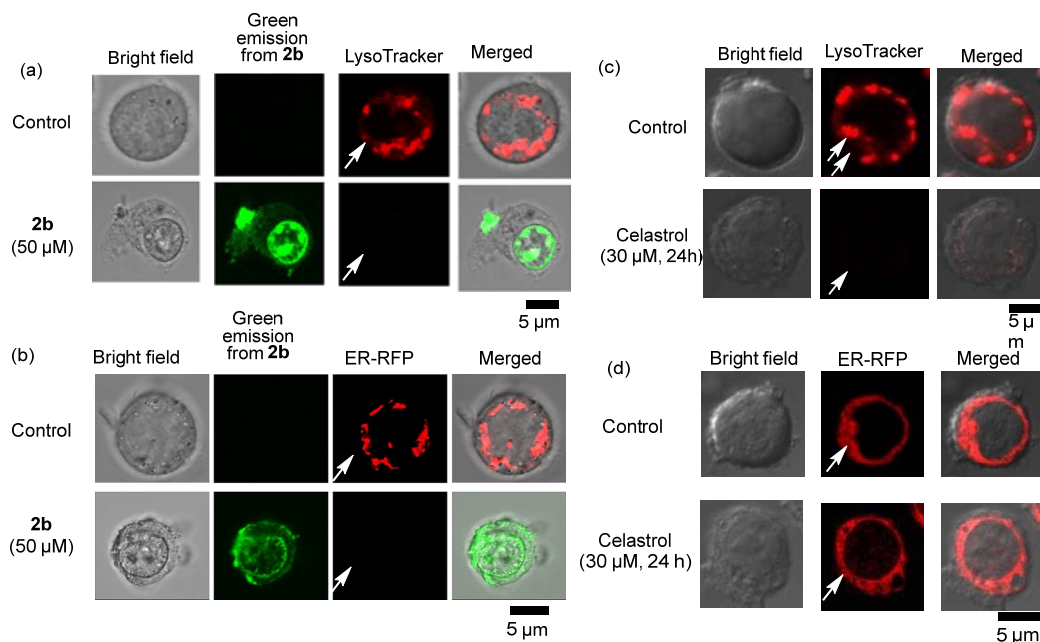


図4. **2b**とcelastrolで処理したJurkat細胞を、LysoTrackerとER-RFPで共染色した画像

a) **2b**とLysoTracker、b) **2b**とER-RFP、c) CelastrolとLysoTracker、d) CelastrolとER-RFP。  
(スケールバー：5 μm)

## 2. 細胞内器官内のカルシウムイオン濃度変化

次に、3a、3b、3c および 9 で処理した Jurkat 細胞の細胞質内およびミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を、それらの選択的プローブ (Rhod-4 と Rhod-2) を用いた染色実験とフローサイトメトリ解析によって測定した。その結果、paraptosis 誘導活性が高い 3a、3b がミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を誘起し (図 5b、d)、3c と 9 は殆どミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変えなかった (図 5f) [9]。一方、9 は比較的遅い細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を示した (図 5g)。

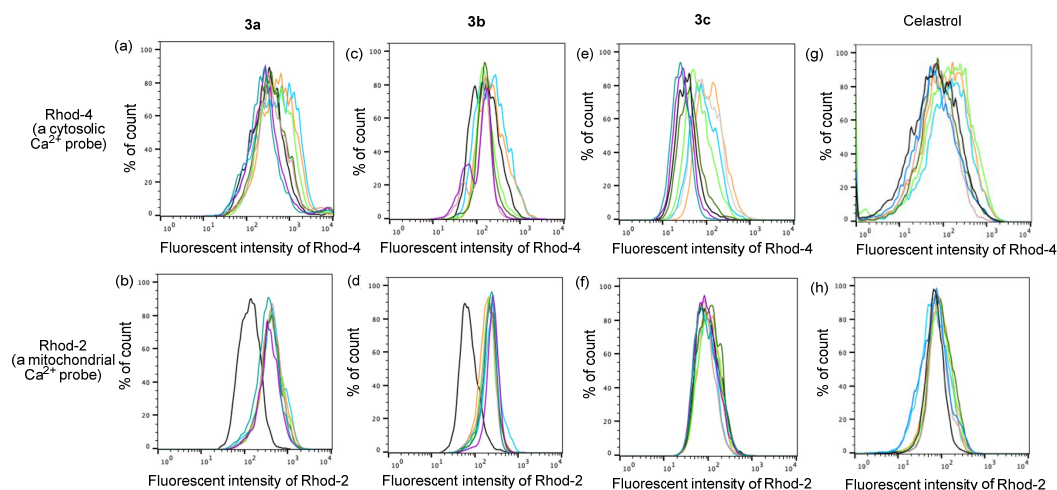


図5. 3a～cおよびcelastrolで処理したJurkat細胞を、細胞質内 $\text{Ca}^{2+}$ プローブ (Rhod-4) とミトコンドリア内 $\text{Ca}^{2+}$ プローブ (Rhod-2) で染色したフローサイトメトリ解析結果

a) 3aとRhod-4、b) 3aとRhod-2、c) 3bとRhod-4、d) 3bとRhod-2、e) 3cとRhod-4、f) 3cとRhod-2、g) celastrolとRhod-4、h) celastrolとRhod-2の結果 (化合物添加後0、5、10、20、30、40、50、60分後)。

## 3. IPHsによって誘導される paraptosis の機構解析と autophagy との関連

様々な細胞内シグナル伝達経路の阻害剤を用いて、IPHs による paraptosis のメカニズムを検討した。図 6a、b に示す阻害剤の影響を調べたところ、脱共役剤である carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) だけが 2c による paraptosis を抑制し、その他の化合物では殆ど影響が見られなかった [7～9]。上記したように IPHs はミトコンドリア膜電位を低下させるが、CCCP がその膜電位変化を相殺するために、paraptosis が阻害されると考えられる。

一方、IPHs による paraptosis に伴って autophagy 関連分子の発現上昇が認められた [6, 7]。しかし、autophagy 経路に関与する酵素の阻害剤は paraptosis を抑制しなかった (図 6c、d)。また図 6e、f の Western blot の結果から、小胞体ストレスマーカーである Bip や CHOP などの発現亢進が観測された。これらの結果から、IPHs による paraptosis 誘導に小胞体ストレスを介して誘導されている可能性と、autophagy が paraptosis に付随した現象であることが示唆された [9]。

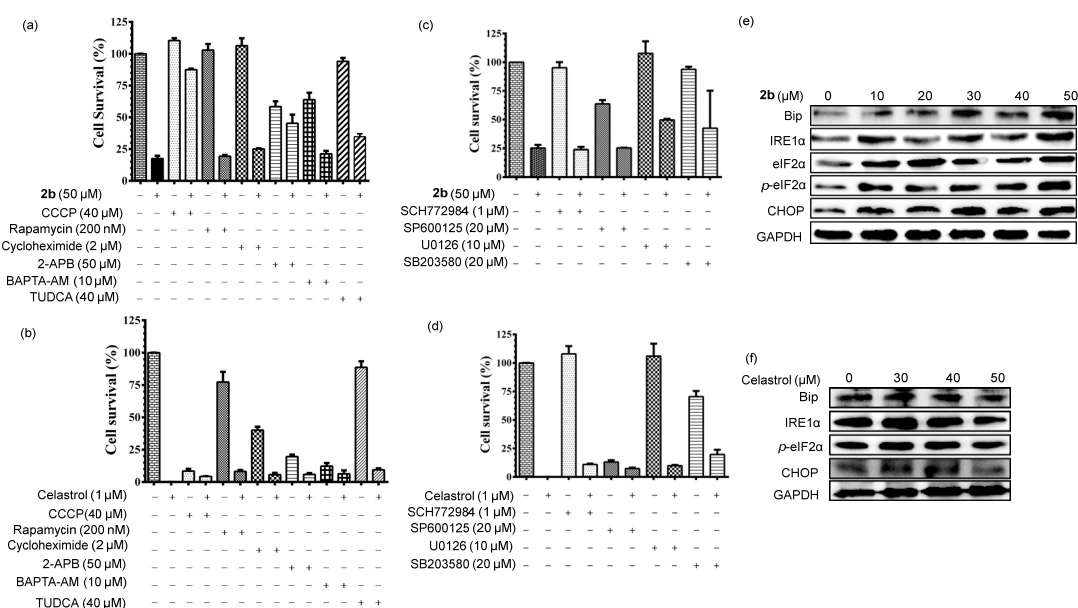


図6. 2bとcelastrolによって誘起されるparaptosisに対する、種々の細胞内シグナル伝達機構

a～d) 阻害剤の影響。

e、f) 小胞体ストレス関連分子のWestern blot結果。

## 考 察

上記の結果から、IPHsとcelastrolが異なる細胞内シグナル伝達経路を活性化してJurkat細胞のparaptosisを誘導することが強く示唆された。そして、i) IPHsはカルモジュリンまたはカルモジュリンの $\text{Ca}^{2+}$ 錯体に結合すること、ii) IPHsは最初に細胞膜へ移行し、その後ミトコンドリアへ移行すること、iii) IPHsは小胞体からミトコンドリアへの $\text{Ca}^{2+}$ 輸送を促進し、ミトコンドリア膜電位を低下させること（図2、⑧）、iv) iiiと前後して小胞体ストレスが誘導されることが明らかになった。また、IPHsによるparaptosis誘導はautophagy様現象を伴うが、autophagyはparaptosisに付随して起きた現象であることが示唆された。同時に、Ir錯体部分を有機分子に置き換えた分子の合成にも成功しており、IPHsと同様のメカニズムで、IPHsよりも強い抗がん活性を有することが示唆されている。今後は、IPHsとcelastrolのparaptosis誘導機構の違いを明らかにすると同時に、IPHsとカルモジュリンとの相互作用や、ミトコンドリアと小胞体の接合および膜融合に関与する分子などに着目して詳細な解析を行い、新たな抗がん剤の開発へ展開する予定である。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京理科大学薬学部生物有機化学研究室の Chandrasekar Balachandran 博士（現在東京理科大学生命医科学研究所）、 Haribabu Jebiti 博士（現在チリ Atacama 大学）、横井健汰修士、小山田有紗学士、東京理科大学総合研究院の梅澤雅和博士、土屋好司博士、群馬大学理工学部の飛田成史博士、吉原利忠博士、インド National Institute of Technology の Ramasamy Karvembu 博士である。

## 文 献

- 1) (a) Zhivotovsky, B, Orrenius, S, Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium*. 2011 50:211-21. DOI: 10.1016/j.ceca.2011.03.003. (b) Harr MW, Distelhorst CW, Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2020 2:a005579. DOI: 10.1101/cshperspect.a005579. (c) Lee D, Kim IY, Saha S, Choi, KS. Paraptosis in the anticancer arsenal of natural products. *Pharmacol. Ther.* 2016 162:120-33. DOI: org/10.1016/j.pharmthera.2016.01.003.
- 2) (a) Nakase I, Tanaka G, Futaki S, Cell-penetrating peptides (CPPs) as a vector for the delivery of siRNAs into cells. *Mol. BioSyst.* 2013 9: 855-61. DOI: org/10.1039/C2MB25467K. (b) Gasper D, Veiga AS, Castanho ARB. From antimicrobial to anticancer peptides. A Review. *Front. Microbiol.* 2013 4:294. DOI: org/10.3389/fmicb.2013.00294.
- 3) 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.* 2015 26:857-79. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00095.
- 4) Hisamatsu Y, Suzuki N, Suzuki T, Abe R, Aoki S, Cationic amphiphilic tris-cyclometalated iridium(III) complexes induce cancer cell death via interaction with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complex. *Bioconjugate Chem.*, 2017 28: 507-23. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00627.
- 5) Yokoi K, Hisamatsu Y, Naito K, Aoki S, Design, synthesis and anticancer activity of cyclometalated tris(ppy) iridium (III) complexes having the cationic peptides at the 4'-position of ppy ligand (ppy = 2-phenylpyridine). *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017 5295-309. DOI: 10.1002/ejic.201700846.
- 6) Naito K, Yokoi K, Balachandran C, Hisamatsu Y, Aoki S, Design, synthesis, and anticancer activity of iridium(III) complex-peptide hybrids that contain hydrophobic acyl groups at the N-terminus of the peptide units. *J. Inorg. Biochem.* 2019 199:Article 110785 (17 pages). DOI: org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110785.
- 7) Yokoi, K, Balachandran C, Umezawa M, Tsuchiya K, Mitrić A, Aoki S, Amphiphilic cationic triscyclometalated iridium(III) complex-peptide hybrids induce paraptosis-like cell death of cancer cells via an intracellular Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway. *ACS Omega*, 2020 5:6983-7001. DOI:org/10.1021/acsomega.0c00337.
- 8) Jebiti H, Tamura T, Yokoi K, Balachandran C, Umezawa M, Tsuchiya K, Yamada Y, Karvembu R, Aoki S, Synthesis and anticancer properties of bis and mono(cationic peptide) hybrids of cyclometalated Ir(III) complexes: effect of the number of peptide units on anticancer activity. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2021 2021: in press. DOI: 10.1002/ejic.202100154.
- 9) Balachandran C, Yokoi K, Naito K, Haribabu J, Umezawa M, Tsuchiya K, Yoshihara T, Tobita S, Aoki S, Cyclometalated iridium(III)-cationic peptide hybrids trigger paraptosis in cancer cells via an intracellular Ca<sup>2+</sup> overload from the endoplasmic reticulum and a decrease in mitochondrial membrane potential. Submitted for publication.
- 10) 青木伸、横井健汰、Chancrasekar Balachandran、久松洋介、有機合成化学協会誌、投稿中