アカデミック フォーラム(2020/11/26)

がん細胞を選択的に細胞死に導く 副作用の少ない抗がん薬の開発

同志社大学 理工学部 小寺 政人

臨床利用されている細胞障害性抗がん薬

<u>抗がん剤として使用されている白金(II)錯体</u>



がん細胞の特異環境

- 弱酸性pH
- 活性酸素種(ROS)濃度が高い
- 抗酸化物質(還元剤)濃度が高い

Kato, Y. et al. *Cancer Cell International* **2013**, *13*:89. Zhou, D. et al. *Adv. Cancer Res.* **2014**, *122*, 1–67. Weidemann, A.; Johnson RS. *Cell Death and Differentiation* **2008**, *15*, 621–627.

がん細胞の特異環境下でのみDNA切断活性を 有する金属錯体の開発を目指した.



ブレオマイシン(Bleomycin)

<u>DNAを酸化切断する細胞障害性抗がん薬:ブレオマイシン(Bleomycin, BLM)</u>



Solomon, E. I. et. al. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 4719-4733.

ブレオマイシンはDNAを酸化切断する細胞障害性の抗がん薬であり、皮膚・頭頸部・肺・食道などのがん、 悪性リンパ腫、子宮頸がん、神経膠腫、胚細胞腫瘍などの様々ながんに効果がある、しかし、がん細胞と 正常細胞の選択性がないため、長期使用により肺毒性などの副作用を示す、

本日の目次

- 弱酸性pH領域において加水分解的DNA切断を促進する二核銅(II)錯体の開発
- 過酸化水素存在下において酸化的DNA切断を促進する二核銅(II)錯体の開発
- 蛍光団を導入した二核銅(II)錯体を用いた細胞内挙動の解明と細胞毒性の機構推定

DNA切断活性を有する金属錯体



Montagner, D. 2014



Agarose gel electrophoresis patterns of SC pUC19 DNA incubated with complex in Tris buffer (pH 8.2) at 37°C for 3 h. Lane 1, DNA control; lane 2, DNA + complex (5 μ M); lane 3, DNA + complex (10 μ M), lane 4, DNA + complex (25 μ M); lane 5, DNA + complex (50 μ M).

Montagner, D. et al. Eur. J. Inorg. Chem. 2014, 25, 4084–4092.



Montagner, D. 2015



DNA cleavage. Agarose gel electrophoresis patterns of SC pUC19 DNA incubated with complex in Tris buffer (pH 8.2) at 37°C for 3 h. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA + complex (5 μ M); lane 3: DNA + complex (25 μ M); lane 4: DNA + complex (50 μ M).

Montagner, D. et al. J. Inorg. Chem. 2015, 145, 101-107.

弱酸性pH領域でのDNA切断活性は調べられていなかった.

DNA切断実験で使用されるpUC19 DNAとその切断活性



効率良く細胞死を誘導するためには、速やかな二本鎖切断が要求される.

Tjioe, L. et al. Inorg. Chem. 2012, 51, 939–953.

p-cresol-2,6-bis(azamacrocyclic) ligand二核銅(II)錯体の合成と構造



M. Kodera, Y. Kadoya, et. al. Bull. Chem. Soc. Jpn. Selected paper, 2019, 92, 739–747.

1-3によるDNAの加水分解切断のpH依存性



pUC19 DNA cleavage activity of **1** (left), **2** (middle) and **3** (right). Experimental conditions: [NaCI] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 5.0, 5.5, 5.9, 6.0 (MES), 7.4 (Tris-HCI), and 8.2 (TAPS)), $[pUC19 \text{ DNA}] = 50 \text{ }\mu\text{M}$ bp, $[complex] = 10 \text{ }\mu\text{M}$ at 37°C for 0, 1, 2, 5, and 10 h.

1,3は,弱酸性のpH 5-6でDNAの加水分解切断を促進し,中性pH付近では切断活性を示さない. これは金属錯体によるDNAの加水分解切断が酸性pHで加速された初めての例である.

1と2の構造的な違い



低い加水分解活性の錯体 2



Figure 3. (A) Distance of the O-atom of the m-OH bridge from the mean plane defined by four N-atoms of macrocyclic NH groups (N2, N3, N5, N6) in 1. (B) Distance of the O-atom of the m-OH bridge from the mean plane defined by four C-atoms of NCH₃ groups (C7, C8, C21, C22) in **2**.

錯体1は、錯体2と比較して架橋OHのCu-O結合距離が長く、外側に大 きく突き出している.



錯体1の架橋OHは, 錯体2の架橋OHに比べて, DNAのリ ン酸エステルへの高い求核性を示すと考えられる.

熱力学的測定



Thermodynamic parameters of the calorimetric titrations for the binding of **1**, **2**, and **3** with the linear 33 mer ds-DNA. 33 mer oligo DNA: 5'-d(GAC TCC ACA GTC CAT ACG TGG GCT CCA ACA GGT)-3' and its complementary strand.

Complex	1			2	3
рН	5.0	5.5	6.0	6.0	6.0
N (sites)	1.29 ± 0.13	0.652 ± 0.12	0.617 ± 0.07	1.14 ± 0.10	1.63 ± 0.06
<i>K</i> (M⁻¹)	(1.81 ± 0.84) × 10 ⁵	(1.23 ± 0.43) × 10 ⁵	(1.05 ± 0.20) × 10 ⁵	(2.64 ± 0.97) × 10 ⁵	(2.63 ± 0.53) × 10 ⁵
ΔH^{0} (kcal mol ⁻¹)	-0.57 ± 0.08	-1.08 ± 0.24	-1.39 ± 0.19	-0.48 ± 0.06	−2.26 ± 0.11
ΔS^{0} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	22.2	19.8	18.5	23.2	17.5

錯体1は、酸性pHでプロトン化によってDNAとの結合定数が増大する。

熱力学的測定

高い加水分解活性の錯体



Thermodynamic parameters of the calorimetric titrations for the binding of **1**, **2**, and **3** with the linear 33 mer ds-DNA. 33 mer oligo DNA: 5'-d(GAC TCC ACA GTC CAT ACG TGG GCT CCA ACA GGT)-3' and its complementary strand.

Complex		1		2	3
рН	5.0	5.5	6.0	6.0	6.0
N (sites)	1.29 ± 0.13	0.652 ± 0.12	0.617 ± 0.07	1.14 ± 0.10	1.63 ± 0.06
<i>K</i> (M ⁻¹)	(1.81 ± 0.84) × 10 ⁵	(1.23 ± 0.43) × 10 ⁵	(1.05 ± 0.20) × 10 ⁵	(2.64 ± 0.97) × 10 ⁵	$(2.63 \pm 0.53) \times 10^5$
ΔH^{0} (kcal mol ⁻¹)	-0.57 ± 0.08	-1.08 ± 0.24	-1.39 ± 0.19	-0.48 ± 0.06	-2.26 ± 0.11
ΔS^{0} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	22.2	19.8	18.5	23.2	17.5

錯体1は,酸性pHで結合定数,ΔH⁰,ΔS⁰が増大する.

錯体1は、酸性pHでプロトン化によってDNAとの結合定数が増大する. 低pHではエントロピー的に有利であり、疎水相互作用でDNAとの結合が強くなる.

熱力学的測定



Thermodynamic parameters of the calorimetric titrations for the binding of **1**, **2**, and **3** with the linear 33 mer ds-DNA. 33 mer oligo DNA: 5'-d(GAC TCC ACA GTC CAT ACG TGG GCT CCA ACA GGT)-3' and its complementary strand.

Complex	1			2	3
рН	5.0	5.5	6.0	6.0	6.0
N (sites)	1.29 ± 0.13	0.652 ± 0.12	0.617 ± 0.07	1.14 ± 0.10	1.63 ± 0.06
<i>K</i> (M ⁻¹)	$(1.81 \pm 0.84) \times 10^5$	$(1.23 \pm 0.43) \times 10^5$	$(1.05 \pm 0.20) \times 10^5$	(2.64 ± 0.97) × 10 ⁵	(2.63 ± 0.53) × 10 ⁵
ΔH^{0} (kcal mol ⁻¹)	-0.57 ± 0.08	-1.08 ± 0.24	-1.39 ± 0.19	-0.48 ± 0.06	−2.26 ± 0.11
ΔS^{0} (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	22.2	19.8	18.5	23.2	17.5

錯体2と3の結合定数はほぼ同じだが、ΔH⁰とΔS⁰の値が顕著に異なる. 錯体2は6つのNH基を持ち疎水相互作用、錯体3は疎水環境を持ち静電相互作用

DNA切断阻害実験



DAPIは, Methyl greenより強く加水分解を阻害した. またDAPIのGCサイトの結合定数(*K*(GC) = 1.2 × 10⁵ M⁻¹)は錯体1の結合定数K = 1.81 ± 0.84 × 10⁵ M⁻¹と近い値であり, 阻害効果をよく説明で きる. 従って, 錯体1はDNAのGCサイトにインターカレーターとして結合すると考えられる.

1によるDNA加水分解切断の推定機構



ここまでのまとめ

- *p*-cresolの2,6位に様々な環状アミンをmethylene-tetherで導入した二核銅(II)錯体の合成を 行い、その構造および特性を明らかにした.
- DNAの加水分解的切断実験では、がん細胞の特異環境の1つである弱酸性pH領域において 錯体1が高い切断活性を示すことを見出した.ここで、環状アミンプロトンおよび架橋OH の存在が重要な役割を果たしていることが見出された.
- 1のDNA加水分解的切断機構を提案した.

1-3によるDNAの酸化切断



pUC19 DNA cleavage activity of **1** (left), **2** (middle) and **3** (right). Experimental conditions: [NaCI] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 50 μ M, [H₂O₂] = 0-500 μ M at 37°C for 0, 1, 2, 3, and 5 h.

錯体1-3は過酸化水素によるDNA切断を促進しない.

M. Kodera, Y. Kadoya, et. al. Bull. Chem. Soc. Jpn. Selected paper, 2019, 92, 739–747.

cyclenをamide-tetherで導入した新規二核化配位子の合成



Hbcamide配位子の合成





二核銅(II)錯体4の合成



- ☑. ESI-MS spectrum
- ☑. X-ray single crystal structure
- ☑. UV-Vis spectrum
- ☑. Elemental analysis

4の水溶液中におけるESIMSスペクトル



ESI-MS spectrum of complex 2 measured in H₂O at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

4は水中でも二核構造を保持していることが明らかになった.

3と4の結晶構造



 $\tau Cu(1) = 0.038$ $\tau Cu(2) = 3.878(1) \text{ A}$ square pyramidal



Cu(1)•••Cu(2) = 3.047(11) Å τ Cu(1) = 0.057 τ Cu(2) = 0.038square pyramidal

3と4の銅イオン周りの構造は互いに類似している.3は外因性の架橋基を持たないが、 amide-tetherで環状アミンを導入した4には外因性のヒドロキソ架橋が存在する.

3と4のDNA酸化切断の比較



Time courses for the decrease of Form I upon reaction of pUC19 DNA (50 μ M bp) with 3 (red) or 4 (purple) (50 μ M) in the presence of H₂O₂ (500 μ M) at pH 6.0 (10 mM MES, 10 mM NaCl) at 37°C.

methylene-tetherからamide-tetherに変更してDNA酸化切断活性が顕著に向上した.

3と4の細胞毒性



amide-tetherに変更することで細胞毒性が約1.6倍向上することが見出された.

4の細胞毒性は臨床利用されている抗がん剤と比較して約1/1000 程度であり、実用化の観点から不十分なことが明らかになった.

triazacyclononane (tacn)を持つ二核化配位子



細胞毒性の向上を目的としてcyclenのNH基を1つ減らしたtacnを amide-tetherで導入した新規二核化配位子を設計・合成した.

錯体5の合成



☑. Elemental analysis

錯体4,5のDNA酸化切断活性と細胞毒性





Di(pyridylmethyl)amine (dpa)は優れた金属結合部位である。そこでdpaをpcresolの2,6位にamide-tetherで導入した二核化配位子を設計した.

錯体6の合成と単結晶X線構造



[Cu₂(µ-1,1-OAc)(µ-1,3-OAc)(L1^{4-H})](OAc) (6)





外因性の架橋基(OAc)が2つ
1つはµ-1,1-OAc
他方はµ-1,3-OAc
→この配位子系においては初の構造

6の溶液中での挙動



水中で μ -1,1-OAc架橋が μ -OH₂架橋に変化することが明らかになった.

5,6のDNA切断活性と細胞毒性







	IC ₅₀ (μΜ)		
Cell	5	6	
子宮頸がん (HeLa)	47.3	72.8	
肺がん (A549)	49.8	92.7	
肺正常 (WI-38)	227	121	
膵臓がん (PK-59)	68.3	66.5	
膵臓正常 (2C6)	235	88.2	

DNA酸化切断は向上した一方で、細胞毒性の 向上は観測されなかった.また、6のがん細胞 選択性も5と比較して低下した.

ここまでのまとめ

- 環状アミンをamide-tetherで導入した二核銅(II)錯体は、対応するmethylene-tether錯体と 比較して酸化的DNA切断活性及び細胞毒性が著しく向上することが明らかになった.
- 環状アミンのNH基を調節することによって疎水性が増し,細胞膜透過性が高くなることで細胞毒性の著しい向上が見出された.
- いくつかの細胞株において、がん細胞選択性が見出された.



細胞毒性の向上を目的とし、HL1^{4-H}の側鎖ピリジル基のピリジン4位に置換基を 導入した新規二核化配位子の設計・合成を行った。

錯体8,9の合成



錯体6,8,9の結晶構造



Cu(1) – O(1) : 2.020(4) Å
Cu(2) – O(1) : 2.166(4) Å
Cu(1) – O(2) : 1.962(4) Å
Cu(2) – O(3) : 1.936(4) Å
Cu(1) – O(4) : 2.210(4) Å
Cu(2) – O(4) : 2.122(4) Å
τCu(1) : 0.378
τCu(2) : 0.471



τCu(2): 0.390

τCu(2) : 0.613

錯体5, 6, 8, 9の細胞毒性



	IC ₅₀ (μΜ)				
Cell	5	6	8	9	cisplatin
子宮頸がん (HeLa)	47.3	72.8	10.0	14.2	2.33
肺がん (A549)	49.8	92.7	20.0	21.3	5.35
肺正常 (WI-38)	227	121	69.9	24.6	6.33
膵臓がん (PK-59)	68.3	66.5	14.7	18.1	2.66
膵臓正常 (2C6)	235	88.2	23.7	9.5	3.16

置換基を導入したことによって, 細胞毒性が飛躍的に向上した.

cisplatinの細胞毒性よりは低いが, がん細胞選択性の観点から有用 であることが見出された.

細胞内挙動の可視化

Bodipy (boron-dipyrromethene)



細胞内可視化実験



細胞内局在位置と細胞毒性の関係性



IC (11NA)	

Cell	5	6	8	9			
子宮頸がん (HeLa)	47.3	72.8	10.0	14.2			
肺がん (A549)	49.8	92.7	20.0	21.3			
肺正常 (WI-38)	227	121	69.9	24.6			
膵臓がん (PK-59)	68.3	66.5	14.7	18.1			
膵臓正常 (2C6)	235	88.2	23.7	9.5			
局在位置	ER・ ゴルジ体	核・ ミトコンドリア	ER・ ゴルジ体	ER・ ゴルジ体			

ER・ゴルジ体に局在化している錯体は、核・ミトコンドリアに局在化している錯体と 比較して細胞毒性が高く、またがん細胞選択性も高いことが見出された。

まとめ

- 環状アミンよりも疎水的なピリジン環をペンダント基に持つ新規二核銅(II)錯体の合成を行った。
- これらの錯体は過酸化水素存在下で高いDNA酸化切断活性を有することが明らかになった。
- しかし, DNA酸化切断活性と細胞毒性に関係性はないことが示唆された.
- ピリジン環の4位に置換基を導入することでがん細胞選択的に高い細胞毒性を発 現することが見出された。
- 蛍光団としてBodipyを導入した錯体で細胞内挙動を可視化した結果と併せて考察 すると、核・ミトコンドリアに局在化する錯体と比較して、小胞体・ゴルジ体に 局在化する錯体は高い細胞毒性を示し、またがん細胞選択的に細胞毒性を示すこ とが明らかになった。