

博士学位論文審査要旨

2024年1月13日

論文題目：がん細胞選択的毒性を発現する二核銅錯体の開発及びその構造機能相関の
解明

学位申請者： 畑 真知

審査委員：

主査： 理工学研究科 教授 小寺 政人

副査： 理工学研究科 教授 水谷 義

副査： 理工学研究科 教授 古賀 智之

要 旨：

高齢化に伴い、がんは死亡原因の1位になる状況の中で抗がん剤の開発が注目されている。シスプラチンなどの細胞障害性の抗がん剤は予後の治療にも有効であり重要である。しかし、これらは強い副作用を示す事が問題である。申請者は、副作用の軽減を目指し、正常細胞とは異なるがん細胞の微小環境(活性酸素種(ROS)や還元剤の濃度が高い)に注目した。この環境を利用して細胞毒性を示す金属錯体は、副作用の少ない抗がん剤の開発につながると考えられる。本論文では、過酸化水素や還元剤による酸素活性化で細胞死を引き起こす様々な amide-tether 型二核銅(II)錯体を開発した。ペンダント基として環状アミンの cyclen を持つ二核銅錯体(1)は、過酸化水素との反応でヒドロペルオキシ中間体を生じ、DNA を切断してがん細胞選択的毒性を示した。錯体 1 への DNA 標的の導入とその最適化を通して、これらがミトコンドリアに局在してミトコンドリア DNA の酸化切断を促進し、がん細胞選択的毒性を大きく向上させることを見出した。また、ペンダント基として dpa を持つ二核銅錯体(3)は、還元され易く、酸素分子との反応で ROS を生成して高い細胞毒性を示した。錯体 3 への置換基導入では、ROS の種類を制御できることを見出した。この研究により ROS の種類によってがん細胞選択的毒性が変化する可能性が見出された。以上のように本論文では、がん細胞選択的毒性の発現に有効な錯体の構造機能相関が明らかにされており、これらは副作用の少ない抗がん剤の開発に新たな知見を与えるものとして重要である。よって、本論文は、博士(工学)(同志社大学)の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2024年1月13日

論文題目：がん細胞選択的毒性を発現する二核銅錯体の開発及びその構造機能相関の
解明

学位申請者： 畑 真知

審査委員：

主査： 理工学研究科 教授 小寺 政人

副査： 理工学研究科 教授 水谷 義

副査： 理工学研究科 教授 古賀 智之

要 旨：

本論文提出者は、現在、理工学研究科応用化学専攻博士課程（後期課程）3年次に在学中である。本論文の主たる内容は、*Dalton Trans.* **2022**, *51*, pp.4720–4727 (1編), *Bull. Chem. Soc. Jpn. (Selected Paper)* **2022**, *95*, pp.1546–1552 (1編), *ACS. Omega* **2023**, *8*, pp.28690–28701 (1編)に既に掲載され、十分な評価を得ている。2024年1月13日午前10時00分より約1時間30分にわたって提出論文に対する学術講演会（博士論文公聴会）が開催された。活発な質疑応答がなされ、提出者の説明により十分な理解が得られた。さらに講演終了後、審査委員により論文に関する諸問題につき口頭試問を実施した結果、十分な学力を確認できた。また論文提出者は、英語の語学試験に合格しており、英語による論文発表、学会発表などからも十分な語学能力を有すると認められる。よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

Abstract of Doctoral Dissertation

論文題目： がん細胞選択的毒性を発現する二核銅錯体の開発

Title of Doctoral Dissertation 及びその構造機能相関の解明

Dissertation

氏名： 畑 真知

Name

要旨：

Abstract

現在、がん罹患者は日本だけでなく世界中で増加しており、がんは死因の上位を占めている。このために抗がん剤によるがん治療が注目されている。しかし、現在臨床利用されているシスプラチンなどの抗がん剤は強い副作用を示すことが問題である。この副作用の原因は、抗がん剤が正常細胞とがん細胞のどちらにも同様に作用するためである。そこで、がん細胞に選択的に作用する抗がん剤の開発が望まれている。私は、がん細胞選択的な抗がん剤の開発に向け、正常細胞とは異なるがん細胞の微小環境(正常細胞に比べて、活性酸素種(ROS)濃度や還元剤濃度が高いこと)に着目した。このがん細胞の特異環境下で細胞毒性を発現する金属錯体の研究を通して副作用の少ない抗がん剤の開発に新たな知見を提供できると考えられる。本論文では、活性酸素種の一つである過酸化水素(H_2O_2)との反応および還元剤による酸素活性化で細胞毒性を示す様々な amide-tether 型二核銅錯体を開発した。これらの錯体の構造機能相関を調べることで、がん細胞選択的な細胞毒性に効果的な構造特性の知見を得た。

第一章では、本論文の研究背景を述べる。

第二章では、私の所属する研究グループの角谷氏らが開発した *p*-cresol の 2,6 位にペンダント基として環状アミン 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) を持つ amide-tether 型二核銅錯体 $[Cu_2(\mu-OH)(L^1)](ClO_4)_2$ (1) の 4 位メチル基を $-CONH(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2NHCO$ -phenanthrene で置換した DNA 標的部位を持つ二核銅錯体 $[Cu_2(\mu-OH)(L^{P^2})](ClO_4)_2$ (1^{P^2}) を新たに開発した。分光測定から、 1^{P^1} は 1 と同様に H_2O_2 との反応で安定な μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) 錯体 (2^{P^2}) を形成することが示された。Phenanthrene の導入で 1^{P^2} は 1 と比べて DNA 結合能力が 9 倍向上し、 H_2O_2 存在下での DNA 切断活性が 9.3 倍向上した。さらに、 1^{P^2} の細胞毒性は 1 と比べて約 12 倍向上した。また、細胞死経路の同定から、 1^{P^2} がミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導することを明らかにした。この様に phenanthrene 部位は DNA 標的として作用し、 1^{P^2} のミトコンドリア経路の内因性アポトーシスを介したがん細胞選択的毒性を大きく向上させることが明らかになった。

第三章では、第二章の研究で見出された phenanthrene による DNA 標的の抗がん活性機能の解明とその向上を目指し、 $-CONH(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2NHCO$ -phenanthrene (P-リンカー) の鎖長を変化させた二核銅錯体 $[Cu_2(\mu-OH)(L^{P^n})](ClO_4)_2$ (1^{P^n} ($n = 1, 3$)) と phenanthrenyl 基を methyl で置換した $-CONH(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2NHCO$ -methyl (M-リンカー) を導入した二核銅錯体 $[Cu_2(\mu-OH)(L^{M^n})](ClO_4)_2$ (1^{M^n} ($n = 1, 2, 3$)) を新たに開発した。DNA 二本鎖切断活性と細胞毒性はいずれも、P-リンカーは M-リンカーよりも高く、P-リンカーの長さが短い程高かった。鎖長が最も短い $n = 1$ の P-リンカーを持つ錯体はすい臓がん細胞に対してシスプラチンに匹敵する高い細胞毒性を示すと共に肺がん細胞に対してはシスプラチンでは全く見られない 10 倍以上の高いがん細胞選択的毒性を示した。DNA 二本鎖切断活性と HeLa 細胞に対する細胞毒性の相関を調べたところ、 $1^{P^{1-3}}$ は 44% 相関したが、 $1^{M^{1-3}}$ では 5% であった。この結果から、細胞に取り込まれたときに P-リンカーは特異的に DNA に結合して細胞毒性を大きく向

上させるが、M-リンカーは DNA 特異性がないために向上させない事が明らかになった。従って、P-リンカーを持つ 1^{PI-3} はミトコンドリア DNA の二本鎖切断を通してアポトーシスを誘導することが裏付けられ、DNA 標的としての P-リンカーの役割が明確に示された。

第四章では、私の所属する研究グループの角谷氏らが開発した *p*-cresol の 2,6 位にペンダント基として dipyritydimethylamine (dpa) を有する amide-tether 型二核銅錯体 $[Cu_2(\mu-1,1-OAc)(\mu-1,3-OAc)(L3)](OAc)$ (**3**) の dpa の 4 位に置換基(電子供与 MeO 基および電子求引 Cl 基)を導入した二核銅(II)錯体 $[Cu_2(\mu-1,1-OAc)(\mu-1,3-OAc)(L3^{4-MeO})][Y]$ [$Y = PF_6$ (**3a**^{4-MeO}), OAc (**3b**^{4-MeO})] および $[Cu_2(\mu-1,3-OAc)_2(L3^{4-Cl})][Y]$ [$Y = ClO_4$ (**3a**^{4-Cl}), OAc (**3b**^{4-Cl})] を新たに開発した。分光学的測定および構造解析の結果、置換基の電子効果により、銅の配位構造が変化することが示された。その構造の違いに起因して、AscNa との反応で生成する ROS の種類が **3b**^{4-MeO} では H_2O_2 が優勢であり、**3b**^{4-Cl} では $HO\cdot$ が優勢であることが明らかとなった。また、細胞を用いた測定から、ミトコンドリアや核小体に局在する **3** とは異なり、**3b**^{4-MeO} および **3b**^{4-Cl} は小胞体およびゴルジ体へ集積して ROS を生成することで細胞死を誘導し、高い細胞毒性を発現することが明らかとなった。**3b**^{4-MeO} はがん細胞選択的な細胞毒性を有するのに対し、**3b**^{4-Cl} は有さなかったことから、がん細胞選択的毒性には生成する ROS の種類が関与する可能性が示唆された。

第五章では、**3** が、空気下、アスコルビン酸ナトリウム(AscNa)による還元的酸素活性化で supercoiled plasmid pUC19DNA の 26% を 1 分間で直鎖状 DNA に変換するという、**3** による高速の DNA 二本鎖切断(dsb)機構を解明した。そのために、**3** の活性を Robson 型二核銅(II)錯体 $[Cu_2(\mu-OH)(bpmp)](ClO_4)_2$ (**4**) および N4Py 配位子の鉄(II)錯体 $[Fe(MeCN)(N4Py)](ClO_4)_2$ (**5**) を用いて比較した。**3** は、**4** とは異なり、AscNa で容易に還元され、還元された二核銅錯体の 2 分子が酸素を 3 電子還元してヒドロキシラジカル($HO\cdot$)を生成して高速で DNA を酸化切断した。またこの反応で、**3** は、**5** とは異なり DNA に対してエンタルピー駆動で強く結合することが示された。この結果より、**3** の速い $HO\cdot$ 生成および DNA 結合様式が、高速の DNA dsb を可能にする重要な特徴であることが明らかとなった。

第六章では、**3b**^{4-MeO} および **3b**^{4-Cl} の AscNa 存在下での DNA 切断活性を評価することで、第五章で見出した **3** による急速な DNA dsb の機構解明と要件の裏付けを行った。DNA dsb 活性は **3b**^{4-Cl} < **3** < **3b**^{4-MeO} であり、この関係は短時間での $HO\cdot$ の生成量の大小と一致し、電子効果に起因することが明らかとなった。また、錯体低濃度条件における **3b**^{4-MeO} による DNA dsb 活性は **3b**^{4-Cl} および **3** の約 2 倍以上であった。熱力学的パラメーターの測定から **3b**^{4-MeO} が最もエンタルピー駆動であった。また CD スペクトル測定から **3b**^{4-MeO} が最も低濃度で DNA の二重らせん構造を緩めることが明らかとなった。以上の結果より、DNA に自由度が低い状態で強く結合することが低濃度での高速の DNA dsb に重要であることが示された。

第七章では、低濃度での急速な DNA dsb には DNA との強い結合が重要であったことを踏まえて、**3** の 4 位に P-リンカーおよび M-リンカーを導入した二核銅(II)錯体 $[Cu_2(\mu-1,1-OAc)(\mu-1,3-OAc)(L3^X)](OAc)$ (**3**^X ($X = P, M$)) を開発した。AscNa 存在下において **3**^P は **3** よりも高い DNA dsb 活性を示したが、**3**^M は **3** よりも活性が低かった。また、拡散する $HO\cdot$ の阻害剤である DMSO 存在下で DNA 切断活性の測定を行ったところ、**3** および **3**^M では阻害が見られたが、**3**^P では見られなかった。ITC 測定、電子スペクトルおよび CD スペクトル測定から **3**^P は phenanthrene 部位で DNA に対してエンタルピー駆動で結合することが明らかとなった。これらの結果から、DNA に対して強く結合すると、生じた $HO\cdot$ は直接的に DNA を切断でき DNA dsb 活性が向上したと考えられる。