

博士学位論文審査要旨

2021年1月30日

論文題目： がん細胞選択的細胞死の誘導を目的とした高いDNA切断活性を有する新規二核銅(II)錯体の開発に関する研究

学位申請者： 角谷 優樹

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 東 信行

副査：理工学研究科 教授 水谷 義

要 旨：

細胞障害性の抗がん剤は適用範囲が広く高い抗がん活性を示し、予後の治療にも有効な優れた抗がん剤であるが、強い副作用が問題である。本論文では、がん細胞の特異環境下で細胞毒性を示し、がん細胞を選択的に細胞死に導く抗がん剤の開発を目的として、*p*-cresol から誘導される様々な配位子の二核銅(II)錯体を合成した。初めに、*p*-cresol の2,6位に様々な環状アミンを methylene-tether で導入した配位子 Hbcmp, HMe₂bcmp, Hbcc の二核銅(II)錯体を用いて加水分解的DNA切断活性のpH依存性を見出し、熱力学的測定の結果と併せてその反応機構を提案した。次に、*p*-cresol の2,6位に cyclen を amide-tether で導入した新規配位子 Hbcamide を合成し、その二核銅(II)錯体を用いてH₂O₂による酸化的DNA切断を実現し、詳細な分光学的測定によって活性種の検出に成功した。さらに、*p*-cresol の2,6位に dpa を amide-tether で導入した新規配位子 HL1とその二核銅(II)錯体を合成した。この錯体は高いDNA酸化切断活性を示すと同時に、がん細胞選択的細胞毒性を発現した。また、この錯体に蛍光団を導入し、細胞内挙動の可視化にも成功した。また、HL1やそのペンダントピリジル基に置換基(X = Cl, MeO)を導入した新規二核化配位子 HL1^{4-X}の二核銅(II)錯体はアスコルビン酸ナトリウム存在下で酸素分子を活性化して非常に高いDNA酸化切断活性を示すことを見出した。最終的にMeO基が置換したHL1^{4-OMe}の錯体は、がん細胞に対して高い選択性と高い抗がん活性を示した。本研究は、副作用の少ない抗がん剤の研究に対して新たな知見を与えるものとして価値が高い。よって、本論文は、博士(工学)(同志社大学)の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2021年1月30日

論文題目： がん細胞選択的細胞死の誘導を目的とした高い DNA 切断活性を有する新規二核銅(II)錯体の開発に関する研究

学位申請者： 角谷 優樹

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 東 信行

副査：理工学研究科 教授 水谷 義

要 旨：

本論文提出者は、現在、本学大学院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、*Bull. Chem. Soc. Jpn. (Selected Paper)* 2019, 92, 739–747 (1編), *Inorg. Chem.* 2019, 58, 14294–14298 (1編), *Inorg. Chem.* 2020 (1編)に既に掲載され、十分な評価を得ている。2021年1月30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

論文題目： がん細胞選択的細胞死の誘導を目的とした高い DNA 切断活性を有する新規二核銅(II)錯体の開発に関する研究

氏名： 角谷 優樹

要旨：

がんは、日本や海外において死因の上位を占める。そのため、様々な抗がん剤が開発され、臨床利用されてきた。その中で、シスプラチンやブレオマイシンなどの金属錯体が優れた細胞障害性の抗がん剤として知られている。しかしながら、細胞障害性の抗がん剤は、がん細胞選択性を持たないため、正常細胞にも同様に作用して深刻な副作用を引き起こすことが問題点となっている。金属錯体は、配位子構造や中心金属によって多様な性質を示す。これらの性質を調節し、がん細胞選択的に抗がん活性を発現させることができれば、副作用の少ない抗がん剤の開発に対して研究基盤を提供できると期待される。がん細胞は、正常細胞と比較して弱酸性 pH 領域に生存し、過酸化水素などの活性酸素種を多く含み、またそれに伴い抗酸化物質が多く発現していることが知られている。本論文では、がん細胞のこのような特異環境下で細胞毒性を示し、がん細胞選択的細胞死を誘導することができる金属錯体の開発を目的として *p*-cresol から誘導される様々な配位子の二核銅(II)錯体を合成した。これらは高い DNA 切断活性を示し、がん細胞選択的に細胞毒性を及ぼすことを見出した。

第一章では、本論文の研究背景を述べる。

第二章では、*p*-cresol の 2,6 位に様々な環状アミンを有する 3 種類の二核化配位子 2,6-bis(1,4,7-triazacyclononylmethyl)-4-methylphenol (Hbcmp), 2,6-bis(1,4,7-triaza-4,7-dimethylcyclononylmethyl)-4-methylphenol (HMe₄bcmp), 2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecylmethyl)-4-methylphenol (Hbcc) 及びその二核銅錯体 [Cu₂(μ-X)(bcmp)](ClO₄)₂ [X = OH (**1a**) and Cl (**1b**)], [Cu₂(μ-OH)(Me₄bcmp)](ClO₄)₂ (**2**), 及び [Cu₂(bcc)](ClO₄)₃ (**3**) を合成し、その構造を様々な分光学的測定によって明らかにした。また、これら金属錯体の加水分解的 DNA 切断活性の pH 依存性を調査した。**1a**, **1b** 及び **3** は pH 5-6 の弱酸性 pH 領域で DNA 切断を大きく加速するが、pH 7-8 の範囲では殆ど活性を示さないことを見出した。これは、二核銅(II)錯体による pH 依存的 DNA 切断についての初めての例である。これらの実験結果と各種分光学的測定、DNA 結合能測定、DNA binder を用いた阻害実験などの結果から、pH 依存的 DNA 切断の推定機構を提案した。

第三章では、*p*-cresol から誘導される全く新しいタイプの amide-tether 型配位子 2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecyl-1-carboxyamido)-*p*-cresol (Hbcamide) 及びその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OH)(bcamide)]²⁺ (**4**) を合成し、その構造を様々な分光学的測定によって明らかにした。また、過酸化水素存在下での酸化的 DNA 切断実験を行った。methylene-tether 型錯体 [Cu₂(bcc)]³⁺ (**3**) は、過酸化水素による DNA 酸化切断を全く加速しないが、**4** は過酸化水素濃度に依存して DNA 酸化切断を大きく加速することを見出した。さらに、**4** と過酸化水素が反応して μ-1,1-hydroperoxo 錯体 (**5**) が生成することを分光学的に検出し、これが酸化的 DNA 切断における直接の活性種であることを明らかにした。がん細胞の HeLa 細胞に対する細胞毒性で、**4** は **3** に比べて約 1.6 倍高い細胞毒性を示した。本研究では、*p*-cresol の 2,6 位に amide-tether でペンダント基を導入した全く新しいタイプの amide-tether 型配位子の二核銅錯体が高い DNA 酸化切断活性を示すことを見出した。

第四章では、*p*-cresol の 2,6 位に di(2-pyridylmethyl)amine (dpa) 三座配位子を amide-tether で導入した新規二核化配位子 HL1^{4H} (2,6-bis[*N,N*-di(2-pyridylmethyl)carboxyamido]-*p*-cresol) 及びその二核

銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L1}^{4\text{H}})](\text{ClO}_4)_2$ (**6**), $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,1-OAc})(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L1}^{4\text{H}})]\text{X}$ [$\text{X} = \text{ClO}_4$ (**7a**) and OAc (**7b**)]を合成し、様々な分光学的測定によってこれらの構造を明らかにした。**7b**は、中性付近の pH で過酸化水素を活性化して DNA 酸化切断を大きく加速するとともに、がん細胞に対する高い細胞毒性を示すことが見出された。これらは、methylene-tether 型錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bpmp})]^{2+}$ (**8**) (Hbpmp = 2,6-bis[di(2-pyridylmethylaminomethyl)]-*p*-cresol)と比較して高活性であった。細胞内挙動を可視化するため、**7b**を boron dipyrromethene (Bodipy)で修飾した新規二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})_2(\text{L2}^{4\text{H}})](\text{OAc})$ (**9**)を合成し、その細胞内挙動を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、**9**は核小体やミトコンドリアに局在することが明らかになった。また、フローサイトメトリーの結果から、**7b**は HeLa 細胞をアポトーシス経路で細胞死に導くことが示された。これらの結果から、**7b**は、細胞内で核小体やミトコンドリアに局在し、それぞれの RNA や DNA を切断してアポトーシスを誘導すると考えられる。さらに、**7b**は関連する錯体の中では高い細胞毒性を示すとともに、がん細胞選択的に細胞死を導くことが見出された。

第五章では、**7b**の側鎖ピリジル基の4位に電子供与基として OMe 基を、電子求引基として Cl 基を導入した新規二核化配位子 $\text{HL1}^{4\text{X}}$ [$\text{X} = \text{OMe}$ and Cl]とその二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,1-OAc})(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L1}^{4\text{OMe}})]\text{X}$ [$\text{X} = \text{PF}_6$ (**10a**) and OAc (**10b**)]及び $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,1-OAc})_2(\text{L1}^{4\text{Cl}})]\text{X}$ [$\text{X} = \text{ClO}_4$ (**11a**) and OAc (**11b**)]を合成し、単結晶 X 線構造解析や様々な分光学的測定によって構造を決定した。HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT assay によって評価したところ、**10b**と**11b**は**7b**と比較して約7倍と5倍高い細胞毒性を示した。また、ヒト肺・膵臓細胞を用いた細胞毒性を評価した結果、**10b**と**11b**はがん細胞選択的に細胞毒性を及ぼすことが明らかになった。これらの錯体の細胞内挙動を可視化するため、**10b**と**11b**を Bodipy で修飾した新規二核銅錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})_2(\text{L2}^{4\text{X}})]^+$ [$\text{X} = \text{OMe}$ (**12**) and Cl (**13**)]を合成し、その細胞内挙動を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、**12**と**13**は核やミトコンドリアではなく、ゴルジ体や小胞体に局在することが明らかになった。これらの結果、**10b**と**11b**はゴルジ体や小胞体に局在化し、ストレス応答を引き起こすことによって細胞毒性を発現していることが示唆された。

第六章では、**7b**, **10b** 及び **11b** を用いて、過酸化水素を酸化剤として用いた過酸化水素活性化による、及び、還元剤としてアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)を用いた酸素活性化による DNA 切断活性を詳細に調べた。これらの錯体は中性付近の pH で過酸化水素を活性化してスーパーコイルドプラスミド DNA の酸化切断を大きく加速することが見出され、電子求引基であるクロロ基を持つ**11b**が最も高い活性を示した。また、還元剤存在下で DNA 切断実験では、これらの錯体は過酸化水素を酸化剤とする反応よりもはるかに高い DNA 切断活性を示した。**7b**, **10b** 及び **11b** は、反応開始1分後にはそれぞれ30, 57, 21%の DNA Form III を生成し、電子供与基であるメトキシ基を持つ**10b**が最も高い活性を示した。この活性は、methylene-tether 錯体である**8**や、ブレオマイシンの活性中心を模倣した N4Py (*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)-*N*-bis(2-pyridyl)methylamine)配位子の単核鉄(II)錯体 $[\text{Fe}(\text{N4Py})(\text{MeCN})]^{2+}$ (**14**)に比べてはるかに高かった。従って、*p*-cresol の2,6位にペンダント基として dpa を amide-tether で導入した配位子の二核銅錯体は、酸素分子の還元的活性化により特異的に高い DNA 酸化切断活性を示すことが見出された。また、電子供与性のメトキシ基は酸素分子との反応を加速させることができ、DNA 酸化切断を最も大きく促進した。

第七章では、以上の結果を総括としてまとめ、今後の展望について言及した。