

抗がん薬としての高機能性金属錯体の開発とその生理評価

中 井 美早紀*

Development of functional metal complexes having anti-tumor activities and their anti-tumor effects

Misaki NAKAI

1. はじめに

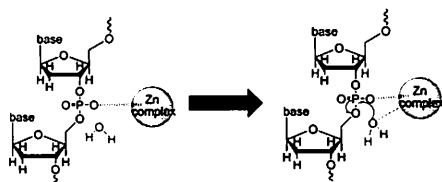
ここ10年における日本人の三大死亡原因はガン、心疾患、脳血管疾患であり、この三大原因だけで日本人死亡原因の60%を占めている。また2008年の厚生省のデータでは日本人の3人に1人が、がんで死亡している。そこでがんの克服は日本人のみならず人類にとって重要な研究課題である。現在、放射性を使った放射線治療法、外科的手術療法、抗がん薬を使用した化学療法、光を用いた光線力学的療法、免疫細胞療法等が開発されている。化学療法剤として臨床にもちいられている金属錯体として最も有名なものはシスプラチン ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$) である。しかしながら、シスプラチンは、嘔吐、腎毒性といった副作用を示すのが欠点であり、また近年ではシスプラチン耐性がんも報告されている。そこで新たな治療薬、治療法の開発が重要となってくる。

シスプラチンに代わる化学療法薬としては、プラチナ原子を利用したカルボプラチンや、オキサリプラチン

ンなどが臨床に用いられている¹⁾。プラチナと同族元素であるパラジウム錯体はシスプラチン耐性ガンに対して開発がされている²⁾。また、ルテニウム錯体は置換不活性であるため、体内に投与した際、安定に存在されることが示唆される。そこでビピリジン誘導体を配位させたポリビピリジン系ルテニウム錯体は古くから、DNA との相互作用が検討されてきた³⁾。このポリビピリジン系ルテニウム錯体はシスプラチンのように直接 DNA に結合して、DNA の立体構造をゆがませ、抗がん作用を示す。また、ルテニウム錯体は酸化還元に対して非常に安定であるため、過酸化水素存在下では活性酸素の一部であるヒドロキシラジカルを発生させる。ヒドロキシラジカルは非常に酸化力が強く、DNA を酸化させて切断を起こし、抗がん作用を発生させるというものである。さらに、このポリビピリジン系ルテニウム錯体は可視光を吸収するため、光線力学的療法薬としても開発されている。

ほかの金属としては銅錯体や亜鉛錯体があげられる。銅錯体や亜鉛錯体は DNA のリン酸部分に結合できる。そこで水分子を活性化させ、DNA のリン酸エステルの加水分解を促進する。この作用により DNA をマイルドに切断し、抗がん作用を示す (図1)^{4, 5)}。

新たな治療法の開発として近年注目を浴びているのが光を利用した光線力学的療法 (Photodynamic therapy, PDT) である。放射線治療と違って LED ライトで治療ができるため、大掛かりな装置の必要がなく、手軽に治療ができるのが利点である。この光線力学的療法剤のメカニズムは下記のとおりである。1. 光に反応する薬剤を患者に投与する。2. 幹部に薬剤が集積された時間を見計らってレーザーや LED ライトを照射する。3. 薬剤が活性化し、周辺の溶存酸素



1. 亜鉛は DNA のりん酸
エステル部位に配位結合
する

2. 近くの水分子を活性化
させ、エステルを加水分
解することで DNA を切
断する

図1. 亜鉛錯体の DNA 加水分解

原稿受付 平成23年 9 月12日

*化学生命工学部 化学・物質工学科 助教

にエネルギー移動をおこす。溶存酸素は活性化され一重項酸素となる。この一重項酸素は活性酸素のひとつであり、やはり DNA を酸化して切断する (図 2)⁶⁾。光を照射した部分のみ活性酸素を発生させるため、化学療法に比べて毒性の軽減が期待される。PDT 臨床にはポルフィリン化合物 (foscan[®] など) が使用されている。しかしながら、これらの化合物は水溶性に乏しいため、体内から排出されるのに時間がかかるという難点があげられる。したがって患者は数か月間、暗所での安静を余儀なくされるのである。

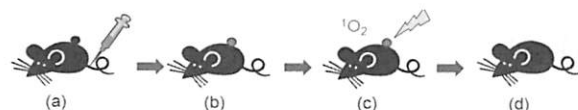


図 2. 光線の力学療法メカニズム
(a) 光に反応する薬剤を患者に投与する。
(b) 幹部に薬剤が集積される。
(c) レーザーや LED ライトを照射し、一重項酸素が発生する。
(d) 細胞が壊死する。

図 2. 光線の力学療法メカニズム

そこで当研究室では、上記に挙げた抗がん薬および光線力学的療法薬に糖質を導入することを検討した。糖質は複数のヒドロキシ基を有するため水溶性の向上が期待できる。さらに、がん細胞は正常細胞に比べて糖質を多く取り込む性質があるので、がん細胞へのターゲティングも期待される。

2. 糖連結亜鉛錯体の DNA 加水分解作用

前述したとおり、亜鉛錯体は DNA のリン酸部位に結合し水分子を活性化させる⁷⁾。この水分子が DNA のリン酸エステルを加水分解させて、DNA を切断させる。したがって亜鉛錯体と DNA との相互作用はその亜鉛錯体の抗がん作用に大きく影響をおよぼすと考えられる。そこでグルコースの水酸基をアセチル基で保護した $[\text{Zn}(\text{OAcGlcSal})_2]$ (1) ($\text{HOAcGlcSal} = N$ -(2-deoxy- β -D-1,3,4,6-tetraacetylglucopyranosyl-2-salicylaldimino) とグルコースを連結した Schiff ベース亜鉛錯体 $[\text{Zn}(\text{GlcSal})_2]$ (2) ($\text{HGlcSal} = N$ -(2-deoxy- β -D-1,3,4,6-glucopyranosyl-2-salicylaldimino) を合成し核酸塩基との相互作用を検討した (図 3 (a))。

核酸塩基との相互作用は¹H NMR にて検討を行ったが、核酸塩基と亜鉛錯体とのピークのほかに、錯体からかい離した配位子由来のシグナルも観測された。これは錯体の一部で、配位子がかい離し、核酸塩基が配位していることを示唆している。¹H NMR では複数の化合物のピークが確認され、亜鉛錯体に配位した核酸塩基のシグナルを帰属するのが困難であった。そこで³¹P NMR を測定することにより、核酸塩基と亜鉛錯

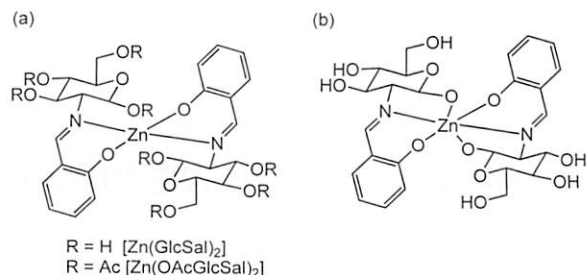


図 3. (a) 糖連結亜鉛錯体の構造, (b) $[\text{Zn}(\text{GlcSal})_2]$ の推定された構造

体の相互作用を検討した。フリーの核酸塩基の³¹P NMR シグナルに比べて、亜鉛錯体存在下での核酸塩基の³¹P のシグナルはピークのプロード化が観測され、さらに低磁場側にシフトしていることが確認された。これは、核酸塩基が亜鉛錯体に配位していることを示している。さらに亜鉛錯体 2 が存在する溶液では、亜鉛錯体 1 に比べて、ケミカルシフトが大きいことが判明した。このことより、亜鉛錯体 2 よりも亜鉛錯体 1 のほうが核酸塩基に強く相互作用を起こすことを示唆している。これは紫外可視吸収スペクトル変化より算出した亜鉛錯体と CMP との結合定数からも同様の結果を示した。この核酸塩基との相互作用の違いは、亜鉛錯体 2 の 1 位もしくは 6 位の OH が亜鉛錯体に axial 配位し、6 配位をとるため、核酸塩基のリン酸部位が配位することができないためであると考えられる (図 3 (b))。

これらの亜鉛錯体、および酢酸亜鉛、配位子の DNA 切断能は大腸菌のプラスミド DNA (pBU322) を用いて検討を行った。過酸化水素存在下では配位子はいずれも DNA 切断を示さなかった。亜鉛錯体の DNA 切断能は酢酸亜鉛 < 亜鉛錯体 2 < 亜鉛錯体 1 であった (図 4)。実験データは得られていないが、亜

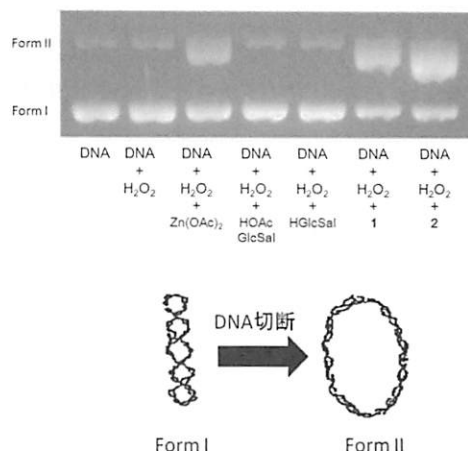


図 4. プラスミド DNA (pBR 322) を用いた亜鉛錯体の DNA 切断能評価。DNA が切断されると Form I から Form II が形成される。

鉛錯体と亜鉛錯体 2 との DNA の切断能の違いは、亜鉛錯体 2 にあるグルコース部位の水酸基に由来するものであると示唆される。亜鉛錯体 2 の水酸基が DNA と水素結合を形成し、酢酸亜鉛に比べて DNA と強く結合するため、DNA 切断活性が上がったと考えられる。また、亜鉛錯体 2 と亜鉛錯体 1 の DNA 切断能の差は、NMR データや、可視吸収スペクトルが示すとおり、DNA の結合能力の差であると考えられる。したがって、亜鉛錯体の加水分解による DNA 切断能は DNA との相互作用の強さに依存することが判明した。これは今後、糖質を導入した抗がん作用をもつ亜鉛錯体の開発において重要な知見である。

3. 光線力学的療法薬および画像診断薬としてのインジウムポルフィリンの開発

PDT は、光線力学的療法薬に可視光を照射しない限り一重項酸素は発生しないので、腫瘍細胞へのピンポイントな治療が可能になる。さらに、光線力学的療法薬は一定時間が過ぎると体外に排出される。そこで、光線力学的療法薬に求められる条件として、1. 暗所での毒性がない。2. 体内で十分な安定性を示す。3. 出来るだけ少ない光でより多くの一重項酸素を発生させる。4. 一定期間が経過したら、一重項酸素の発生をやめ、体外に排出される。5. 腫瘍に対しての選択性が高い。主にこの 5 項目が挙げられ、この要求を満たした光線力学的療法薬の開発が求められている⁶⁾。光線力学的療法薬として、現在最も開発されている物質のひとつがポルフィリン誘導体である。ポルフィリンは体内での毒性が低く、また暗所毒性が殆ど無い。さらに、一重項酸素の発生物質としても有名なことから、PDT に応用されている。

また最近では光線力学的療法薬に画像診断薬としての機能を持たせた薬剤の研究が行われている。腫瘍の診断には主に核磁気共鳴画像 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) や単光子放出コンピュータ断層撮影 (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT) が用いられている。これらの画像診断剤には⁶⁸Gd や¹¹¹In などが主に用いられている⁸⁾。しかし、画像診断剤と光増感剤を別々に投与していたのでは、治療にかかる期間が長期化してしまい、患者への負担も大きくなってしまいます。そこで、画像診断薬と光線力学的療法薬の両方の機能を持たせることで治療期間が短縮され、治療に対する患者の負担軽減が大いに期待される。

本研究では、¹¹¹In の安定な同位体である¹¹³In を用いたグルコース連結インジウム (III) ポルフィリン錯体 Indium (III) 5-[4-(2-O-(β-D-gluconopyranosyl)

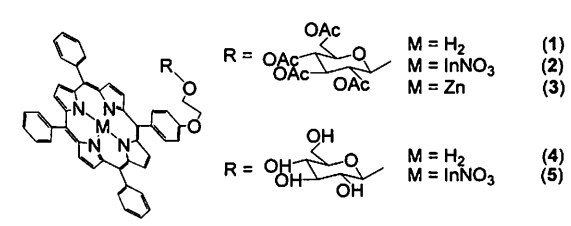


図 5. 糖連結インジウムポルフィリンとその誘導体

ethoxy) phenyl]-10,15,20-triphenylporphyrin nitrate (5) およびその誘導体を合成した (図 5)。また、光増感剤として最も研究されているグルコース連結亜鉛 (II) ポルフィリン錯体 Zinc (II) 5-[4-(2-O-(tetraacetyl-β-D-gluconopyranosyl) ethoxy) phenyl]-10,15,20-triphenylporphyrin (3) を参考物質として合成した。

これらの化合物の光毒性評価は、ヒトメラノーマである Colo 679 を用いて行った。細胞にこれらの化合物を与え、24 時間インキュベートした後、663nm の光を照射し、さらに 24 時間インキュベートして、生存細胞の割合を算出した。ポルフィリン 1 は光照射下、50mM 以下濃度では、光による殺細胞効果は観測できなかった。ポルフィリン 2, 3, 4, 5 は、それぞれ、ポルフィリン濃度が高くなるにつれて、細胞の生存率が低くなることが判明した。そこで、このグラフをもとに細胞生存率が 50% になる値、IC₅₀ 値を算出した。IC₅₀ 値が小さいほど細胞毒性が強いことを示している。暗所下、光照射後のそれぞれの IC₅₀ 値の表 1 に示した。また暗所と明所での細胞毒性の差を算出した。この差が大きいほど PDT 効果が大きいことを示している。市販薬である NP6 を比較物質として使用した。この結果、今回合成されたポルフィリンの細胞への暗所毒性と光毒性の差は NP6 よりも大きく、効果的な光線力学的療法薬であることが判明した。化合物 5 が最も暗所毒性と光毒性の差が大きく、また、少量で PDT を発生させることができ、これらの化合物の中で最も優れた光線力学的療法薬であることが明らかとなった。

これらのポルフィリンの PDT 効果の差を検討する

表 1 暗所および光照射下での IC ₅₀ 値			
compound	(a) IC ₅₀ /mM in dark condition	(b) IC ₅₀ /mM with light irradiation	(a)/(b)
1	160	>47	<3.4
2	0.90	0.35	2.6
3	1.5	0.50	3.0
4	4.6 × 10 ⁻²	1.2 × 10 ⁻²	3.8
5	81	27	3.0
NP6 ^k	31	14	2.2

ために、ポルフィリンの一重項酸素発生の評価を1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) を用いて行った。この DPBF は一重項酸素により酸化されると、この418nmの吸収が減少することが分かっている。そこで、この吸収減少を可視吸収スペクトルで追跡することにより、一重項酸素発生能を評価できる。

一重項酸素発生能は金属の配位していないポルフィリン1, 4に比べて、インジウムポルフィリン2, 5および亜鉛ポルフィリン3は約3倍の活性をもつことが判明した(表2)。そこで、ポルフィリン5のPDT効果は中心金属がポルフィリンに挿入されたことで一重項発生能が上がったためであると考えられる。

さらに、アセチル保護グルコース連結ポルフィリン1とグルコース連結ポルフィリン3のPDT効果の差を調べるために、細胞の取り込み量を共焦点顕微鏡を用いて測定した。ポルフィリンに光を照射すると赤色発光を示すため、細胞内に取り込まれているポルフィリンを観測することができる。その結果、アセチル保護グルコース連結ポルフィリン1ではほとんど細胞に取り込まれていないのに対し、グルコース連結ポルフィリン3は細胞によく取り込まれていることが分かった。したがって、このポルフィリンの光毒性の差は細胞の取り込み量に違いによって引き起こされるものであり、PDT薬剤において、糖質部分の設計は光毒性能において重要であることが判明した。

4. おわりに

人類はがんを克服したとはいえず、依然新しい抗がん薬が求められている。今回、従来報告されている抗がん薬に糖質を導入することは、がん細胞の取り込みや、DNAの相互作用に大きく影響することが判明した。これは今後の抗がん薬の開発において重要な知見である。

しかしながら、亜鉛錯体は置換活性が知られており、体内や細胞内ではしばしば錯体の分解が知られている。したがって、分解を抑えるドラッグデザインや、細胞内での亜鉛錯体の追跡といった研究が今後必要であると思われる。

また糖質を導入したインジウムポルフィリンは従来のポルフィリン化合物に比べて高いPDT活性をしめた。しかしながら、暗所での細胞毒性も強いことが

判明した。この毒性はインジウムによるものなのかはまだよく分かっていない。そこでインジウム錯体での高い抗がん作用を持つドラッグデザインが必要となってくるであろう。

参考文献

- 1) E. R. Jamieson and S. J. Lippard, *Chem. Rev.* 1999, 99, 2467-2498.
- 2) D. Eddings, C. Barnes, N. Gerasimchuk, P. Durham and K. Domasevich, *Inorg. Chem* 2004, 43, 3894-3909.
- 3) M. J. Clarke, *Coord.Chem.Rev.* 2003, 236, 209-233.
- 4) S. Anbu, M. Kandaswamy, S. Kamalraj, J. Muthumarry and B. Varghese, *Dalton Trans.* 2011, 40, 7310-7318.
- 5) J. Tan, B. Wang and L. Zhu, *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 614-620.
- 6) K. Szaciłowski, W. Macyk, A. Drzewiecka-Matuszek and Graz'yna Stochel Małgorzata Brindell, *Chem. Rev.* 2005, 105, 2647-2694.
- 7) C. Bazzicalupi, A. Bencini, C. Bonaccini, C. Giorgi, P. Gratteri, S. Moro, M. Palumbo, A. Simionato, J. Sgrignani, C. Sissi and B. Valtancoli, *Inorg. Chem.* 2008, 47, 5473-5484.
- 8) R. McRae, P. Bagchi, S. Sumalekshmy and C. J. Fahrni, *Chem. Rev.* 2009, 109, 4780-4827.

表2 相対的な一重項酸素発生能評価

compound	H ₂ TPP	1	2	3	4	5
相対的な一重項 酸素発生効率	1.0	0.44	2.7	1.0	2.3	2.1

Tetraphenylporphyrin (H₂TPP) を1.0と仮定した。