

氏名（本籍）	よこ い けん た (大阪府) 横井健汰
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲第54号
学位授与の日付	2022年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Design and Synthesis of Hybrid Compounds of Triscyclometalated Iridium(III) Complex with Cationic Peptides for the Induction of Programmed Cell Death in Cancer Cells (トリスシクロメタレート型イリジウム(III)錯体—カチオン性ペプチドハイブリッドの設計、合成とがん細胞のプログラム細胞死誘導)

論文審査委員	(主査) 教授 青木 伸
	教授 内呂 拓実 教授 早川 洋一
	准教授 原田 陽介 教授 高橋 秀依

論文内容の要旨

Programmed cell death (PCD) is an essential mechanism for the control of intracellular homeostasis for cell survival and proliferation, and is also referred as a cellular suicide, which is recognized as one of the strategies for anticancer therapeutics. Apoptosis, necroptosis, and autophagy have been well known as representative types of PCD, as classified by their morphological and physiological features. Alternative PCD types such as paraptosis, pyroptosis, and ferroptosis have recently been reported and have attracted considerable interest as a potential new target for the elimination of drug-resistant cancer. Among them, paraptosis is a relatively new type of PCD, in which cytoplasm and intracellular organelles undergo vacuolization by the dilation of mitochondria and/or the endoplasmic reticulum (ER), possibly due to a calcium (Ca^{2+}) transfer from the ER to mitochondria. Although various inducers of paraptosis such as viruses, natural

products, organic molecules, and metal complexes have been reported, the mechanisms responsible for this process are complicated and remain unclear.

Meanwhile, cyclometalated iridium(III) (Ir(III)) complexes such as *fac*-Ir(tpy)₃ (tpy: 2-(4'-tolyl)pyridine) possess high stabilities under physiological conditions and excellent photophysical properties such as long Stokes shifts, high quantum yields and long emission lifetimes. Therefore, Ir complexes have been recognized as attractive candidates as phosphorescent materials such as in organic light-emitting diodes (OLEDs), photoredox catalysts, bioimaging probes, anticancer agents, and related tools. Although a lot of Ir complexes for biological applications have been reported, it is difficult to introduce biologically functional groups such as peptide units due to the harsh conditions such as high temperature in the complexation of Ir salt with ligands. We previously reported on the design and synthesis of several types of Ir complex-peptide hybrids (IPHs) that contain cationic peptide units (H₂N-KKGG- (K; lysine, G; glycine)) and death receptor (DR)-binding peptide units via regioselective substitution reactions at the 5'-position of *fac*-Ir(tpy)₃ and that these IPHs induce cell death in cancer cells. In this manuscript, we report on the design and synthesis of IPHs that induce paraptosis in cancer cells and the results of its mechanistic studies.

In Chapter 2, we report on the design and synthesis of IPHs which possess cationic H₂N-KKGG peptide units at the 4'-position of phenylpyridine (ppy) ligands to compare their anticancer activities against Jurkat cells with those of our previous IPHs possessing the same peptide units at the 5'-position of tpy ligands in *fac*-Ir(tpy)₃ complex core. It was found that newly synthesized IPHs exhibit yellow phosphorescence emission, as evidenced by time-dependent density-functional theory (TD-DFT) calculations. The results of MTT assays of Jurkat cells suggest that these IPHs have more potent cytotoxicity against Jurkat cells with EC₅₀ (half-maximal effective concentration) values of 2.4–5.0 μM than the previous IPHs with the same cationic peptide at the 5'-position of tpy ligands (EC₅₀ = 7.3–16 μM) through the same linker, and the dead cells are detected by their strong yellow phosphorescence emission by microscopic observation. Mechanistic studies of the cell death indicate that these IPHs trigger intracellular Ca²⁺ overload, possibly from the ER and is accumulated on mitochondria during the cell death process. According to the results of photoaffinity labeling experiments by using an IPH that possess a photoreactive 3-trifluoromethyl-3-phenyldiazirine (TFPD) moiety at the *N*-terminus of the peptide unit,

Ca²⁺-calmodulin (CaM) complex has been proposed as one of the target biomolecules of IPHs for the induction of cell death.

It was found that strong yellow emission of the IPHs developed in Chapter 2 hampers the co-staining experiments using green- and red-emitting specific probes for intracellular organelles such as MitoTracker Green, MitoTracker Red, and LysoTracker Red, due to the overlap of their emission color. Therefore, we conducted mechanistic studies of cell death induced by the IPH possessing three cationic GGKK peptides at the 5'-position of tpy ligands in Chapter 3. The results strongly suggest that IPHs induce paraptosis in Jurkat cells, a relatively new type of PCD, through Ca²⁺ transport possibly from the ER to mitochondria, loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), the induction of ER stress, and vacuolization of cytoplasm. The induction of paraptosis in Jurkat cells by IPHs was compared with that by celastrol, which is a naturally-occurring triterpenoid isolated from *Tripterygium wilfordii* and had been reported to induce paraptosis. It was found that celastrol also induces paraptosis in Jurkat cells by the enhancement of Ca²⁺ concentration in cytoplasm rather than in mitochondria, indicating that the IPHs and celastrol activate different signaling pathways for the induction of paraptosis in Jurkat cells.

In Chapter 4, we report on the design and synthesis of a new IPH which possesses the cationic peptide at the 4'-position of ppy ligand through electron-donating hydroxyacetic acid (glycolic acid) moiety for the blue shift of emission color of IPHs reported in Chapter 2 and for the improvement of cytotoxicity against Jurkat cells. It was found that a newly synthesized IPH exhibits green emission due to the electron-donating group at the 4'-position of ppy ligand and has more potent anticancer activity than previous IPHs and selective cytotoxicity against cancer cells. Mechanistic studies have revealed that this IPH also induces paraptosis in Jurkat cells with almost same morphological and epigenetic changes.

In Chapter 5, more detailed mechanistic studies of paraptosis induced by the IPH presented in Chapter 4 are conducted, focusing on the direct Ca²⁺ transport from the ER to mitochondria and successive phenomena. In this work, we report on the membrane fusion of mitochondria and the ER in the paraptotic processes induced by the IPH. It was also found that CGP37157, an inhibitor of mitochondrial sodium (Na⁺)/Ca²⁺ exchanger (mNCX) on the outer membrane of mitochondria, induces paraptosis in Jurkat cells via similar intracellular pathways as those induced by IPHs. The

results of Western blot analyses of mitofusins (MFNs) and dynamin-related protein 1 (DRP1), which are mitochondrial membrane fusion and fission proteins, respectively, indicate their upregulation during the paraptotic processes in Jurkat cells. The experimental results reveal that the IPH- and CGP37157-induced paraptosis is inhibited by the small interfering RNA (siRNA) for MFNs and that DRP1 inhibitors negligibly stop the paraptosis induced by these compounds, suggesting that the upregulation of MFN1 and/or MFN2 is important in the paraptosis-inducing mechanisms. We then conclude that the paraptosis induced by IPHs and CGP37157 is mediated by membrane fusion between mitochondria and the ER and is different from the previously-known paraptosis induced by celastrol, which negligibly involves mitochondria-ER membrane fusion. The IPH- and CGP37157-induced paraptosis is named paraptosis-II and the previously known paraptosis induced by celastrol is named paraptosis-I.

In conclusion, we report on the design, synthesis, and anticancer activities of IPHs which induce paraptosis in cancer cells. In addition, multiple signaling pathways for the induction of paraptosis are proposed. The findings in this work would provide useful information not only for the future design and synthesis of metal complex-peptide hybrids for cancer therapy but also for mechanistic studies of paraptosis and other types of PCD.

論文審査の結果の要旨

シクロメタレート型イリジウム(Ir)錯体は優れた燐光発光材料であり、様々な発光色を示すことから有機 EL 素子の発光材料として利用されている。また、その安定性と発光特性から生体内イメージングプローブなどの生物学的応用が注目されている。申請者の研究室では、抗がん活性を有する Ir 錯体の設計、合成をおこなっており、先行研究ではカチオン性ペプチド鎖を配位子の 5'位に導入したハイブリッド錯体(IPHs)がヒト白血病性がん細胞 (Jurkat 細胞) に対してプログラム細胞死を誘導し、死細胞を錯体由来の緑色発光で検出できることを報告した。プログラム細胞死は細胞内の恒常性維持や細胞の生存に重要な役割を果たしており、アポトーシス、ネクロプトーシス、オートファジー、パラトーシスなど様々な種類に分類されている。現在、臨床で用いられている抗がん剤はアポトーシスを誘導するものが多く、異なるプログラム細胞死を誘導する薬剤の開発、その細胞死誘導経路の解明が望まれている。そこで申請者は、IPHs による細胞死誘導活性の向上と細胞死誘導メカニズムの解明を目的として研究に着手した。

第 2 章では、カチオン性ペプチド鎖の導入位置ががん細胞死誘導活性に及ぼす影響に

ついて検討した。具体的には、配位子上のペプチド鎖の導入位置を従来の 5'位から 4'位に変更した IPHs の設計、合成、Jurkat 細胞に対する活性を評価した。新たに合成した錯体は黄色発光を有することが、発光測定、電子密度計算(TD-DFT 計算)の結果からわかった。この錯体の Jurkat 細胞に対する活性を MTT アッセイにより評価したところ、4'位にペプチド鎖を有する錯体よりも高いがん細胞死誘導活性を有していることがわかった。細胞死誘導メカニズムについて検討した結果、細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})濃度の上昇、ミトコンドリアへの集積を経て、細胞死を誘導していることが示唆された。また、標的分子を同定するために、ペプチド鎖の N 末端に光応答性基であるジアジリン基を導入した IPH を設計、合成し、フォトアフィニティーラベリングを行ったところ、カルシウム-カルモジュリン(Ca^{2+} -CaM)複合体が標的分子の一つとして同定された。

第 2 章で合成された IPH は黄色発光を有していたため、細胞死誘導経路の解析で赤色発光を有する細胞内イメージングプローブと発光領域が重複し、併用が困難であった。そこで第 3 章では、緑色発光を有する IPH を用いた細胞死誘導メカニズムの解析を行った。その結果、これら IPH は小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送、ミトコンドリア膜電位の消失、細胞質内の空胞化を経てパラトーシスを誘導することが見出された。さらに、パラトーシスを誘導することが報告されている天然物、セラストロールと比較し、IPH とは異なる経路でパラトーシスを誘導していることが示唆された。

第 4 章では、高い細胞死誘導活性と緑色発光を併せ持つ IPH の設計、合成と細胞死誘導活性の評価およびそのメカニズム解析を行った。Tpy 型配位子 4'位に電子供与基を介してカチオン性ペプチド鎖を導入した IPH を設計、合成し、緑色発光を確認した。本錯体が従来の IPH よりも高い細胞死誘導活性を有し、小胞体からミトコンドリアへ、細胞質を介さない直接的な Ca^{2+} 輸送介してパラトーシスを誘導することを見出した。

第 5 章では、これら IPH によるパラトーシス誘導メカニズムについて、小胞体からミトコンドリアへの直接的な Ca^{2+} 輸送に着目した詳細な検討を行った。その結果、本 IPH はミトコンドリア-小胞体間の膜融合を誘導して、 Ca^{2+} を輸送していることが示唆された。ミトコンドリア-小胞体間の接着に関与するタンパク質、mitofusins (MFNs) の発現量は維持され、dynamamin-related protein 1 (DRP1) の発現量が増大していることがわかった。しかし、DRP1 阻害剤のパラトーシスに対する影響が見られなかったことから、DRP1 の関与はそれほど大きくないと考えられる。また、ミトコンドリア膜上のナトリウム (Na^+)/ Ca^{2+} exchanger (mNCX) の阻害剤である CGP37157 が IPH と同様の経路でパラトーシスを誘導することが見出された。一方、比較化合物としてセラストロールを用いた際には、MFN の発現量減少が見られ、ミトコンドリア-小胞体間の膜融合は観察されず、異なるパラトーシス誘導経路の存在が示唆された。IPH、CGP37157 によるパラトーシス誘導メカニズムを Paraptosis-II、セラストロールによる誘導メカニズムを Paraptosis-I としてそれぞれ報告した。

本論文は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の抗がん剤への応用とそれらに誘導されるパラトーシスのメカニズム解明に関するものであり、抗がん

剤の分子設計およびプログラム細胞死のメカニズム解明に有用な知見を与える内容である。従って本論文は、博士（薬科学）の学位論文として十分に価値あるものと判断した。