

がんの治療に向けたキレート型分子の創製：細胞内銅イオンの定量と制御

Development of Chelating-based Chemical Tools for Cancer Therapy: Quantification and Regulation of Subcellular Copper Ions

カリフォルニア大学バークレー校 大井 未来

研究期間 2023 年 6 月 1 日～2024 年 5 月 31 日

滞在研究機関 Department of Chemistry, University of California, Berkeley
Berkeley, CA 94720-1460, United States

共同研究者等 Prof. Christopher J. Chang

区分 個人 B

Copper is an essential metal element for living systems; however, dysregulation of copper ion (Cu) stores can induce oxidative stress and cytotoxicity. There is increasing recognition of the link between copper and cancer, as tumor growth and metastasis are driven by this metal nutrient, promoting copper-dependent cell growth and proliferation—recently termed cuproplasia—which parallels a newly identified form of copper-dependent cell death known as cuproptosis. Therefore, elucidating the relationship between Cu levels and cancer provides valuable insights into cancer pathogenesis and offers opportunities to exploit copper-related vulnerabilities as therapeutic targets. To enable precise analysis of copper-dependent cellular mechanisms, chelator-based molecular tools have been developed for the quantification and manipulation of intracellular copper levels. Sensitive and selective detection of copper dynamics has been achieved using stimulated Raman scattering (SRS) and ratiometric fluorescent probes. Concurrently, polydopamine-based chelating nanoparticles have been employed to modulate intracellular copper concentrations. These approaches have clarified the effects of copper on cell death and metabolic responses, enhancing understanding of copper-dependent regulatory pathways in cancer. The integration of quantitative imaging and copper-control systems is expected to facilitate mechanistic studies and support the development of copper-targeted therapeutic strategies.

研究目的

銅は生体に必須の金属元素であり、酸化還元反応、エネルギー代謝、抗酸化反応など、さまざまな生理機能に関与している¹。その一方で、銅イオン(Cu)濃度の調整異常は細胞毒性を引き起こすことが知られており、生体内においては Cu 濃度が厳密に制御されている。近年、がん細胞において銅の輸送および蓄積メカニズムが活性化されることにより、細胞増殖や腫瘍形成が促進される現象が明らかとなり、この銅依存的増殖機構は Cuproplasia と定義された²。さらに、銅の異常蓄積によって誘導される新たな細胞死機構である Cuproptosis が報告され³、これらの知見は銅依存性の細胞機構を標的とする新たながん治療の可能性を示している。しかしながら、Cu を標

的とした治療法においては、正常細胞への影響を最小限に抑えつつ効果を発揮するための最適な細胞内 Cu 濃度の基準が明確でなく、これが治療効果の限界や副作用の一因となっている。加えて、細胞内 Cu 濃度の動態を精密に制御するための手法も十分に確立されておらず、がんにおける銅の役割に関する理解の深化が求められている。したがって、Cu 濃度の定量測定・制御するための新たな技術の開発は、がんの診断・治療法の確立に向けた課題として位置づけられる。本研究は、細胞内 Cu 濃度の定量および調整を目的とするキレート型分子の開発により、がん細胞に銅が及ぼす作用・動態機構を明らかにすることを目的とする。

研究経過

1) 誘導ラマン散乱 (SRS) による $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ 多重イメージング分子の開発

細胞内における銅イオン ($\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$) の酸化状態を識別し、同時にイメージングすることを目的として、誘導ラマン散乱(Stimulated Raman Scattering: SRS) プローブの設計および合成を行った。銅は細胞内において酵素の活性中心として働く Cu^{2+} と、各種銅輸送体と可逆的に結合する遊離性銅プール Cu^+ という、異なる二つの酸化状態で存在している。これまでに両者をそれぞれ検出可能な蛍光プローブは報告されているが⁴、蛍光分光法はスペクトルが幅広く重なりやすいため、異なる酸化状態の化学種を識別しつつ同時に可視化することは困難であった。そこで本研究では、 $^{13}\text{C}\equiv\text{N}$ または $^{13}\text{C}\equiv^{15}\text{N}$ 同位体タグを有する SRS 応答性色素骨格に、銅イオンとキレートすることで活性化されるアシルイミダゾール(CDI) 基を縮合したプローブの設計およびその合成に携わった。SRS 法の高いスペクトル分解能と、 $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ それぞれに選択的な CDI 基の特性を組み合わせることで、バックグラウンドの少ない高分解能な銅のイメージングを可能とした。

2) ナノ粒子を用いたトリプルネガティブ乳がんにおける銅依存的細胞応答機構の解明

ポリドーパミンナノ粒子 (PDANPs) を銅補足剤として用い、細胞内銅濃度を制御することで、Cuproplasia を標的としたトリプルネガティブ乳がん (TNB) の治療法の開発およびその作用機構の解明を試みた。PDA は、水中金属イオンの除去に用いられており、粒子表面に存在するキレート基が銅を補足する。本研究では、PDA を TNB 細胞に添加し、37 °C で 24 時間培養した結果、PDA 添加量依存的に TNB 細胞の生存率が低下することを確認した。この細胞毒性の発現機構を検討するため、 Cu^+ 選択的プローブ FCP-1 イメージングおよび誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) により、細胞内 Cu^+ 濃度と銅総量をそれぞれ測定した。その結果、 Cu^+ 濃度は有意に減少した一方で、銅総量には有意差が認められなかった。これにより、PDA による TNB 細胞の細胞死には、 Cu^+ の枯渇が関与していることが示唆された。さらに、ミトコンドリア膜電位、ミトコンドリア活性、ストレス試験、活性酸素種 (ROS) の生成、細胞代謝指標などを用いたより詳細な機構解析を行なっ

た。その結果、PDA はミトコンドリアと相互作用し、膜電位の上昇に伴う ROS 産生の促進および、 Cu^+ の減少に起因した銅依存性抗酸化酵素 SOD1 の活性低下により、TNB 細胞に酸化ストレスを誘導することが示された。さらに、代謝解析の結果、細胞エネルギー代謝は酸化的リン酸化から解糖系へとシフトしており、ミトコンドリア機能の低下が示唆された。これらの変化が相乗的に酸化ストレスを増幅させ、TNB 細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

3) Cu^+ 選択的キレート型レシオメトリックプローブの開発

細胞内 Cu^+ の定量測定を目的として、キレート型レシオメトリック (Ratio) プローブの開発に取り組んだ。レシオイメージングは、異なる 2 種類の蛍光強度の比を用いることで、生体試料や蛍光分子の状態や環境要因に起因する誤差を補正し、定量的なイメージングを可能にする手法として広く活用されている。これまでも銅を標的とした Ratio プローブは報告されているが、銅に対する選択性や検出感度に課題が残されている。実用的なプローブの設計には、蛍光団の光特性やキレート基の配位能を精密に設計する必要があるものの、現状では多くが経験則に依存している。そこで本研究では、理論計算に基づく分子により、上記の課題を克服するプローブの開発を試みた。

蛍光団の母骨格となる X 構造は、高い蛍光量子収率と細胞透過性を有する一方、紫外光照射による励起を必要とするため、細胞へのダメージが懸念される。そこで X に電子供与基としての銅キレート基、ならびに電子求引基を導入することで励起波長の長波長化を図った。Gaussian 16 を使用した DFT 計算 (B3LYP/6-31G*) の結果、X に電子供与性銅キレート基 Y を導入した XY-1、ならびに X に導入したアール基上に Y を導入した XY-2 は、それぞれ X と比較してそれぞれ 64 nm、92 nm の長波長シフトを示し、可視光照射による励起が可能であると予測された。また、 Cu^+ に対するキレート基の構造最適化に向けては、DFT 計算 (B3LYP/Lanl2DZ (for Cu) & 6-31G* (for other atoms)) により、銅-配位元素間の結合距離を評価し、配位能力が高いと予測される構造を選定した。これらの検討を踏まえて、銅選択的なレシオメトリックプローブとして Cu XY-1 の合成に着手し

た。

合成においては、さまざまな銅配位基を合成終盤で導入可能とする戦略により、共通中間体として化合物 **9** を 11 段階 25% 収率にて合成した。化合物 **9** に対して二座配位子を用いたパラジウム触媒によるクロスカップリング反応により、67% 収率にて銅配位基前駆体のリンカーを導入した化合物 **10** を合成した。最終的に、総 22 工程、総収率 3.3% にて目的化合物 Cu XY-1 を合成した。また、細胞試験への適用を目的とし、Cu XY-1 から 1 段階で Cu XY-1 エステル誘導体 (Cu XY-1 ester) を合成した。

次に、得られた Cu XY-1 の光化学特性を *in vitro* 条件で評価した。バッファー中、Cu⁺非存在下においては、理論計算結果の予測と一致して、Cu XY-1 は X よりも長波長側の可視光領域に最大吸収波長を示した。さらに、本分子は電子供与部位と電子求引部位を有しており、分子内電荷移動 (Internal Charge Transfer, ICT) 機構が誘導される構造であることから、Cu XY-1 は 164 nm に及ぶ大きなストークスシフトを示した。一方、Cu⁺存在下の条件では、Cu⁺添加後速やかに最大吸収波長が短波長シフトし、レシオメトリック応答性を示した。現在は、Cu XY-1 ester を用いた細胞内 Cu⁺の応答性評価、並びに各種がん細胞における Cu⁺の定量解析を進めている。

考察

本研究では、がん治療への将来的な応用を見据え、キレート型分子を用いた細胞内銅イオン濃度の定量と制御を通じて、銅濃度の変化に対する細胞応答機構をより詳細に解析するための技術開発に取り組んだ。誘導ラマン散乱 (SRS) プローブやレシオメトリックプローブの開発により、細胞内銅イオンの酸化状態および濃度変化を高感度かつ高選択的に可視化・定量することが可能となった。さらに、銅イオンを制御するキレート型ナノ分子を用いて細胞内銅濃度を人為的に変化させることで、銅ががん細胞に及ぼす影響の解明にも取り組んだ。その結果、銅が細胞死や代謝変化を含む多様な細胞応答に影響を及ぼすことを明らかにし、がん細胞における銅依存的な分子機構の一端を解明した。現在は、銅制御分子のがん細胞への選択的集積を可能にする標的化分子の開発も進めている。

今後は、定量可能なプローブと銅濃度を制御する分子を併用することで、細胞内の銅濃度や酸化状態

と薬効、さらには Cuproplasia, Cuproptosis との関連を定量的に把握することが期待される。また、本研究の成果は、がんをはじめとする多様な疾患細胞における銅動態の精密な制御と評価を可能にし、これにより銅を標的とする治療法の作用機構の理解を深め、より効果的な治療戦略の開発に貢献することが期待される。さらに、この手法は亜鉛、鉄、マンガンなど他の生体金属イオンの動態解析にも応用可能であり、金属依存性疾患に対する新たな診断法および治療法の開発にも大きく寄与すると考えられる。

参考文献

1. Tsang T.; Davis, C. I.; Brady D. C. Copper biology. *Curr. Biol.* **2021**, *31*, R415–R429.
2. Ge, E. J.; Bush, A. I.; Casini, A. *et al.* Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia. *Nat. Rev. Cancer*, **2022**, *22*, 102–113.
3. Tsvetkov, P.; Coy, S.; Petrova, B. *et al.* Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science*, **2022**, *375*, 1254–1261.
4. (a) Lee, S.; Chung, C. Y-S.; Liu, P. *et al.* Activity-Based Sensing with a Metal-Directed Acyl Imidazole Strategy Reveals Cell Type-Dependent Pools of Labile Brain Copper. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 35, 14993–15003. (b) Pezacki, A. T.; Matier, C. D.; Gu, X. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2022**, *119*, 43, e2202736119.

誌上发表

1. Jiang, Y.; Khoury, E. E.; Pezacki, A. T.; Qian, N.; **Oi, M.**; Torrente, L.; DeNicola, G. M.; Min, W.; Chang, C. J.*, Activity-based Raman probes for multiplex stimulated Raman scattering mapping of intracellular labile copper pools. *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 49, 33324–33337.
2. Bonet-Aleta, J.; Encinas-Gimenez, M.; **Oi, M.**; Pezacki, A. T.; Sebastian, V.; de Martino, A.; Martin-Pardillos, A.; Martin-Duque, P.; Hueso, J. L.; Chang, C. J.*; Santamaria, J.*, Nanomedicine Targeting Cuproplasia in Cancer: Labile Copper Sequestration Using Polydopamine Particles Blocks Tumor Growth In Vivo through Altering Metabolism and Redox Homeostasis. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2024**, *16*, 23, 29844–29855.