

機関番号 : 34413

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20590045

研究課題名 (和文) シスプラチン耐性がんに有効な複核白金錯体の多様な核酸認識

研究課題名 (英文) Multiple Recognition of DNA by dinuclear platinum complexes with effective cell growth inhibition in cisplatin resistant cell lines

研究代表者

千熊 正彦 (CHIKUMA MASAHIKO)

大阪薬科大学・薬学部・学長

研究者番号 : 50025699

研究成果の概要 (和文) :

シスプラチンの活性発現機構やがん細胞の耐性獲得機構は、シスプラチンと核酸(DNA)との配位結合様式およびDNAの構造を歪める程度と深く関係している。複核白金錯体においては、DNAとの配位結合様式が多様であり、単核錯体にはない活性発現機構を有する可能性が高いと期待される。我々の開発したピラゾール架橋型複核白金錯体 $[\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-pyrazolato})(\mu\text{-OH})](\text{NO}_3)_2$ (AMPZ) は、配位結合に加えて非共有結合性相互作用を行うことを見出した。本研究では、AMPZとDNAとの相互作用を種々の観点から詳細に検討した。

研究成果の概要 (英文) :

Both mechanisms of anti-tumor activity and cellular resistance to platinum complexes are believed to be related with coordination binding mode of platinum complexes with DNA. Polynuclear complexes are expected to interact variously with DNA and to have different mechanism of action from that of mononuclear complexes such as cisplatin, one of the most effective anti-tumor agents. In an attempt to search for more active platinum complexes and to overcome cisplatin resistance, we have developed a dinuclear platinum(II) cation complex, $[\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-pyrazolato})(\mu\text{-OH})](\text{NO}_3)_2$ (AMPZ) and its derivatives using pyrazole analogues as bridging ligands. These platinum complexes were effective to cisplatin-resistant tumor cell lines. AMPZ was found to interact covalently and non-covalently with DNA. In this study we focused to non-covalent binding mode of AMPZ with DNA and investigated with various methods. The non-covalent binding mode of AMPZ with DNA has been found to an electrostatic interaction. It remains to be elucidated whether the anti-tumor activity of AMPZ is attributed to the non-covalent binding of AMPZ with DNA or not.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
年度			
年度			
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：核酸、抗がん剤、物理系薬学、分子認識、複核白金錯体、白金錯体

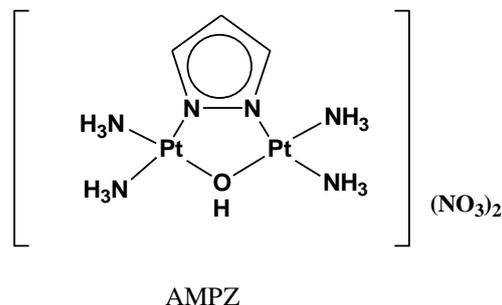
1. 研究開始当初の背景

白金抗がん剤シスプラチンは切れ味の鋭い薬剤であり、1978年に米国FDAの承認を受けて以来30年以上にわたり世界のがん化学療法の先導的役割を果たしている。しかしながら、腎不全などの重篤な副作用や耐性がんの誘発などのため、それらを克服する白金薬剤の開発が望まれている。

シスプラチンの活性発現機構やがん細胞の耐性獲得機構が、シスプラチンと核酸との配位結合様式および核酸の高次構造を歪める程度と深く関係していることが、生物無機化学の研究成果として一般に認識されるようになってきている[B. Lippart (ed), *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley-VCH, 1999]。すなわち、DNAに白金のような重原子が結合することによりDNAの複製が妨害され、またアポトーシスが誘導されるためにシスプラチンの抗がん活性が発現されると考えられている。また、シスプラチンはDNAと結合して、その構造を大きく歪めるが、歪められたDNAは修復酵素により認識され修復されることが知られており、それががん細胞のシスプラチン耐性獲得機構のひとつであると考えられている。多くの研究成果から、シスプラチンのような単核錯体の活性発現機構やがん細胞の耐性獲得機構が基本的に互いに類似しているのに対して、複核白金錯体においては、核酸との配位結合様式が多様であり、単核錯体にはない活性発現機構を有する可能性が高いと期待されるようになった。

そのような背景のもとに申請者を含めて、世界のいくつかの研究グループが高い抗がん活性を有する複核白金錯体を提案し、なか

には臨床治験にまで進展するものも現れてきた。これまでに提案された抗がん活性複核白金錯体には、シスプラチン開発時に得られた経験則からいえば活性のないはずのカチオン錯体が少なからず含まれており、また、シスプラチン耐性がん細胞の増殖抑制能をもつものが多いといった特徴が認められてきた[Wheate and Collins, *Coord. Chem. Rev.*, 2003]。申請者が開発したピラゾールおよびヒドロキソ架橋型二核白金錯体(AMPZ)もカチオン錯体であり、シスプラチン耐性がん細胞に有効であるが、発表当初は電荷を有する錯体なので細胞膜を通過しないであろうという厳しい批判にさらされた。しかし、米国のFarrellグループが提案した白金三核錯体(BBR3464)もカチオン錯体であるが高い抗がん活性を有しており、現在臨床治験が行われている。これらのカチオン錯体は何らかの機構で細胞内に取り込まれていることは間違いないと考えられている(N. Farrell(ed), *Use of Inorganic Chemistry in Medicine*, RSC, 1999)。



以上に述べた学術的背景において、DNAと白金錯体との関わりは、いずれも配位結合を介したものである。しかし、ごく最近、驚くべきことにFarrellグループは、DNAと配位結合(共有結合)する能力のない平面4配

位 Pt-N₄ (N: アミンまたはアンミン) 型三核白金錯体 (AH44, AH78 など) が高い抗がん活性を有することを見出した。Pt-N₄ 型三核白金錯体と DNA との結合様式に関しては、申請者グループとの共同研究による X線結晶構造解析から、各白金原子に結合した 2 つのアンミン配位子と DNA のリン酸基との間に静電的結合が存在することが明らかにされた (Komeda, Chikuma, Farrell, J. Amer. Chem. Soc., 2006)。この結合様式は、複核金属錯体-DNA 間の新しい相互作用様式であり、phosphate clamp と名づけられた。これらの事実は、カチオン白金錯体の抗がん活性発現に非共有結合性相互作用が関与する可能性が高いことを示唆している。

翻って、申請者の開発した AMPZ は、ピラゾール架橋を保持したままヒドロキソ架橋の部分で DNA と置換反応して DNA の構造を大きく歪めることなく配位結合する (Komeda, Chikuma, Eur. J. Inorg. Chem., 2004)。AMPZ がシスプラチン耐性がん細胞に有効であるのは、AMPZ が DNA に結合しても DNA を歪めないために修復酵素により認識されにくいからであると理解することができる。

AMPZ と DNA の配位結合形成反応は極めて遅い (37°C で 48 時間以上) のに対して、反応開始直後から CD スペクトルが変化するなど極めて速い反応の存在が明らかとなった。この速い反応は、カチオン錯体 AMPZ と DNA のリン酸基との間の静電的相互作用とそれに続いて生じるマイナーグループ結合であることを NMR (NEOSY) 法による解析から明らかにすることができた (和田、大阪薬科大学修士論文, 2005)。AMPZ は DNA との間で 2 種の相互作用、すなわち、DNA のリン酸基との間の静電的相互作用とそれに続いて生じるマイナーグループ結合およ

び配位結合を行い、それら多様な相互作用様式が抗がん活性発現に關与している可能性があるかと推定される。

2. 研究の目的

本研究は、申請者のこれまでの成果を基盤として、複核白金カチオン錯体を重点的にとりあげ、それらの核酸との相互作用、とくに非共有結合性相互作用に焦点を絞って精密に解析し、従来得た共有結合 (配位結合) 性相互作用のデータと合わせて、新しい抗がん剤開発のシードとなる錯体を分子設計するための基礎的、系統的なデータを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ピラゾールおよびそれらの誘導体並びに H₂N-(CH₂)_n-NH₂ を架橋配位子とする新規複核白金カチオン錯体を申請者の開発した新規合成法により合成する。白金錯体のキャラクタリゼーションは、核磁気共鳴 (¹H-, ¹⁹⁵Pt-NMR) 法、質量スペクトル法、赤外吸収スペクトル法 (それぞれ大阪薬科大学現有設備) を用いて行う。培養がん細胞に対する毒性は当研究室において検索する。

(2) 新規白金錯体の配位結合に基づく塩基認識能を検索するために、核酸塩基およびモノヌクレオチドとの反応を高速液体クロマトグラフィーおよびキャピラリー電気泳動法により解析し、反応速度定数を求める。

(3) DNA との非共有結合性相互作用を解析するために、子牛胸腺 DNA に対して白金錯体を加えて、円二色 (CD) スペクトルを測定し、白金濃度に応じて 270nm の正のコットン効果が減少することを観測する。また、この減少したコットン効果が、NaCl を添加することにより回復することを観測し、これらの CD スペクトル変化が白金カチオン錯体と DNA のリン酸部との静電的相互作用であることを

証明する。

(4) 等温滴定カロリメトリー法により、子牛胸腺 DNA と白金錯体との間の平衡反応（非共有性相互作用）の熱力学的パラメーターを測定する。【本実験は研究分担者の佐藤が担当する】

(5) 12 塩基対の合成オリゴヌクレオチド d(CGCGAATTCGCG)₂ と複核白金錯体との複合体の結晶構造解析を行う。【X 線結晶構造解析は連携研究者の米田が担当する】

4. 研究成果

(1) ピラゾール、トリアゾールおよびアルキルジアミンを架橋配位子とする白金(II)複核錯体をそれぞれいくつか合成し、それらの制がん活性を比較検討した。アルキルジアミンを架橋配位子とする白金(II)複核錯体の抗がん活性はピラゾールやトリアゾールを架橋配位子とする白金(II)複核錯体のそれより低かった。

本研究で主として用いる複核白金錯体の化学式（略称）は[[cis-Pt(NH₃)₂]₂(μ-pyrazolato)(μ-OH)](NO₃)₂ (AMPZ)である。

(2) ピラゾール架橋型錯体と 1 本鎖あるいは 2 本鎖プラスミド DNA との反応をアガロース電気泳動法により検討した、その際、用いる緩衝液の組成を詳細に比較検討した結果、EDTA-トリス過塩素酸系緩衝液を用いることにした。同一 pH において、緩衝液の濃度が高くなると白金錯体と DNA との反応性は低下することを認めた。

(3) 合成した複核白金錯体は DNA のグアニン塩基と配位結合するが、その反応速度は著しく遅い（37°Cで 48 時間以上）。しかしながら、子牛胸腺 DNA に白金複核錯体を添加して迅速に円二色スペクトル (CD) を観測すると、DNA の示す 270nm 付近の正のコットン効果は白金錯体の濃度に依存して減少

した。白金錯体を添加した直後に正のコットン効果に変化することから、DNA と複核錯体は配位結合（共有結合）ではない相互作用を行うものと考えられる。

(4) 共有結合性相互作用以外の相互作用を解析するために、(1)で合成した白金錯体存在下で DNA の円二色スペクトル (CD) を種々のイオン強度において迅速に観測した。すなわち一定濃度の牛胸腺 DNA の水溶液に種々の濃度のカチオン型白金複核錯体を添加すると DNA のもつ 270nm 付近の正のコットン効果は白金錯体の濃度に依存して減少した。しかし、それらの反応液に NaCl を添加して、徐々に NaCl 濃度を高くすると正のコットン効果は元の牛胸腺核酸のそれに回復した。これらの実験結果から、カチオン型の本複核錯体は、リン酸基を有しているためにマイナス電荷を帯びる DNA との間で、静電的相互作用を生じていることを明らかにした。

(5) 静電的相互作用を定量的に解析するために、等温滴定カロリメトリー法により、子牛胸腺 DNA と白金錯体との間の平衡反応（非共有結合性相互作用）の熱力学的パラメーターを迅速に測定し、 ΔH および ΔS の値を算出した。AMPZ と子牛胸腺 DNA との間では、イオン強度 = 0 において $\Delta H = -2.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ および $\Delta S = 14.6 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{deg}^{-1}$ であった。

(6) 12 塩基対の合成オリゴヌクレオチド d(CGCGAATTCGCG)₂ と複核白金錯体との複合体の X 線結晶構造解析を行い、DNA のリン酸基が、白金錯体のア (ン) ミンを配位子と相互作用することを初めて明らかにすることができた (X 線結晶構造解析の研究は連携研究者の米田誠治が主導して行ったものである)。得られた成果は、DNA と制がん活性物質との新しい相互作用を見出したも

のであり国内外に大きなインパクトを与えた。

(7) 白金錯体の制がん活性が、従来説明されているように配位結合に基づいているのか、あるいは本研究で明らかにした非共有結合性相互作用も関与しているのかを明らかにすることは、今後の白金錯体の開発研究を進めるために極めて重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① A tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complex exhibits markedly high in vivo antitumor activity against pancreatic cancer.

Komeda, S., Lin, Y-L., Chikuma, M.

ChemMedChem, 6, 987-990(2011). 査読有

② The phosphate clamp: A Small and independent motif for nucleic acid backbone recognition.

Komeda, S., Moulaei, T., Chikuma, M., Odani, A., Kipping, R., Farrell, N. P., Williams, L. D. Nucleic Acids Res. , 39, 325-36(2011).

③ Novel and simple loading of cisplatin into liposomes and targeting tumor endothelial cells.

Hirai, M., Minematsu, H., Hiramatsu, Y., Kitagawa, H., Otani, T., Iwashita, S., Kudoh, T., Chen, L., Li, Y., Okada, M., Salomon, D. S. , Igarashi, K., Chikuma, M., Seno M.

International Journal Pharmaceutics, 391, 274-283(2010).

④ Characteristic effect of anticancer dinuclear platinum(II) complex on the higher-order structure of DNA.

Kida, N., Katsuda, Y., Yoshikawa, Y., Komeda, S., Sato, T., Saito, Y., Chikuma, M., Suzuki, M., Imanaka, T., Yoshikawa, K.

Journal of Bioinorganic Chemistry, 15(5), 701-707(2009).

⑤ Cisplatin and its analogues induce a significant change in the higher-order structure of long duplex DNA.

Katsuda, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Saito, Y., Chikuma, M., Suzuki, M., Imanaka, T., Yoshikawa K.

Chemical Physics Letters, 473(1-3), 155-159(2009).

[学会発表] (計 30 件)

① アゾラト架橋白金(II)二核錯体と DNA の相互作用様式に関する研究

米田誠治、日本薬学会 第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、静岡

② 新規制がん性白金二核錯体の合成と DNA との相互作用の検討

佐藤卓史、日本薬学会 第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、静岡

③ Interaction of anticancer active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with a nucleobase.

米田誠治、第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2010 年 6 月 26 日、徳島

④ トリアゾール配位子を有する陽電荷白金二核錯体が DNA の高次構造に与える影響

佐藤卓史、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山

⑤ Effect of cationic anticancer platinum complex on high-order structure of DNA.

佐藤卓史、第 19 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2009 年 6 月 11 日、豊中

⑥ カチオン性制癌白金錯体の DNA との相互作用様式

米田誠治、第 1 回メタロミクス研究フォーラム、2008 年 11 月 28-29 日、東京

⑦ 陽電荷を有する白金錯体による DNA 高次構造変化

佐藤卓史、第58回日本薬学会近畿支部総会、
2008年10月25日、神戸

⑧制がん活性を有する陽電荷白金錯体と核酸
との非共有結合性相互作用

千熊正彦、第58回錯体化学討論会、2008年9
月20-22日、金沢

⑨シスプラチン耐性がんにも有効な白金錯体の
多様な核酸認識

千熊正彦、第2回バイオ関連化学合同シンポ
ジウム、2008年9月18-20日、東京

⑩ X-ray Crystallographic studies on DNA
binding modes of polyamine-bridged polynuclear
Pt(II) complexes.

Seiji Komeda, 9th European Biological Inorganic
Chemistry Conference, September 2-6, 2008,
Wroclaw, Poland.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：白金錯体化合物およびその利用

発明者：米田誠治、千熊正彦

権利者：天真堂製薬(株)、(株)ヤクルト本社

種類：特許権

番号：特願 2009-550001

出願年月日：2010年7月12日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千熊 正彦 (CHIKUMA MASAHIKO)

大阪薬科大学・薬学部・学長

研究者番号：50025699

(2) 研究分担者

佐藤 卓史 (SATO TAKAJI)

大阪薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80257899

齊藤 睦弘 (SAITO YOSHIHIRO)

大阪薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90186974

(3) 連携研究者

米田 誠治 (KOMEDA SEIJI)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：60425056

