

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550058

研究課題名（和文） シスプラチン耐性に有効な白金錯体の化学特性と抗がん剤への応用

研究課題名（英文） Chemical Properties of Pt(II) Complexes Effective for Cisplatin Resistance Cancer and Its Application to Anticancer Drugs

研究代表者

小谷 明 (ODANI AKIRA)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：60143913

研究成果の概要（和文）：

シスプラチン型白金抗がん剤の欠点である（1）耐性がん効かない、（2）腎毒性が高い、といった副作用は、抗がん剤をイオン形にすることにより軽減できた。シスプラチン結合 DNA-タンパク質会合体の芳香環スタックをモデル化したカチオン白金錯体はプロテアソーム活性阻害を新作用機構として有していた。カチオン、アニオン両錯体ともにシスプラチンより高い *in vitro* 活性を示し、抗がん剤への応用が期待できた。

研究成果の概要（英文）：

The weak points in cisplatin type Pt(II) anticancer drugs are (1) lower activity for cisplatin resistance cancer, (2) high nephrotoxicity, however, these points were solved by the introduction of the ionic form to Pt(II) complexes. The cationic Pt(II) complexes involving aromatic ring stacking, which was shown in cisplatin coordinated DNA-HMG protein adduct, showed the proteasome inhibition as a new anticancer mechanism. Both the cationic and the anionic Pt(II) complexes exhibited the excellent anticancer effect and are considered to be possible to develop the clinical anticancer drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：白金抗がん剤，シスプラチン，耐性，腎毒性，イオン，プロテアソーム活性阻害

1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の 5 人に 2 人はガンで死亡しており 1 位を占める（右図）。また、2003 年 4 月世界保健機関 WHO はガンの発生が 2020 年には今の 1.5 倍に急増する恐れがあると警告しており、抗ガン剤の開発は日本人の健康を守る上で大変重要になってきている。シスプ

ラチンに代表される白金錯体は抗ガン剤の約 20%使用されており、年々増加している。これは様々な抗がん剤が組合されて使われている現状にあって、注目に値する。白金錯体が独自の作用機構を持つために他の作用機構を持つ抗がん剤と組合せて様々な標的をたたくことがよい結果をもたらしており、

シスプラチン、オキザリプラチン等が臨床で使われている。これら白金錯体は NH_3 や dach のようなジアミンと C1 や O といった置換活性な脱離基を有し、細胞内で脱離基が加水分解を受けることにより、反応活性な H_2O 体になって、DNA のグアニン 7 位の窒素と結合することで DNA の複製を妨げ、抗がん作用を及ぼすものと考えられている。シスプラチンは様々ながんに広く強力に効く一方、毒性、ことに腎毒性が高い。致命的な欠点は耐性ができやすいことで、一度投与したら 2 度目には効かなくなる薬剤耐性問題をクリアし、かつ腎毒性の小さな新規抗がん剤が強く要望されている。

2. 研究の目的

シスプラチン型白金抗がん剤の欠点である副作用 (1) 耐性がんに効かない、(2) 腎毒性が高い、を改善すべく、(1) シスプラチン耐性に有効と考えられる異なる配位構造、(2) 腎毒性に有効と考えられる水溶性の高いイオン性白金錯体の検討の結果、カチオンとアニオンのリード薬を見つけた。これら電荷を有する白金錯体のどんな化学特性がシスプラチンで問題となっている (1) シスプラチン耐性がんに効くか、(2) 腎毒性は小さいか、が反映されるかを検討し、白金抗がん剤の作用機構、耐性・腎毒性機構とその対策を化学特性の面から知り、次世代白金抗がん剤の創薬基礎を固めることを目的とする。これら副作用の軽減の化学特性の研究を通して、課題の「耐性がん細胞に効く」「低い腎毒性」を満足させる白金錯体を見出す。一方、抗がん作用強化の研究—抗がんアッセイによる構造—活性相関から、強い抗がん活性のための化学特性と副作用軽減のための化学活性との関連性を明らかにする。研究成果は、金属の生体への作用・副作用について新知見を与えるとともに、新規抗がん剤を通して社会へ寄与する。

3. 研究の方法

下記の諸点から研究を実施する：

(1) 白金錯体の合成と化合物特性解明を行う：

リード薬を基にさまざまな白金錯体を合成し、基本となる化合物特性を明らかにする。(2) 白金錯体の抗がん活性と抗耐性がん活性を次の諸点から解明する：

① ヒトがん細胞を用いた抗がんアッセイ

様々なヒトがん培養細胞への抗がんアッセイを行い、白金錯体の抗がん構造活性相関、抗がん特性を明らかにする。

② シスプラチン耐性がん細胞との抗がんアッセイ

シスプラチン耐性がん細胞への抗がんアッセイを行い、抗がん作用機構の知見を得る。

③ 抗がん機構解明を次の諸点から解明する：

a. DNA との相互作用

白金錯体の加水分解、DNA との反応、DNA との相互作用、から検討する。特にシスプラチンとの差異について、特異的相互作用、特異的作用構造から X 線結晶構造、NMR 等により検討を加える。

b. プロテアソーム阻害作用

プロテアソーム活性阻害アッセイを、蛍光ラベルしたペプチドの加水分解阻害濃度 IC_{50} から評価する。どのタイプのプロテアソーム阻害かをキモトリプシン、トリプシン、カスパーゼ基質の加水分解阻害から明らかにする。

c. 分配係数 $\log P$ の測定

各種白金錯体の分配係数 $\log P$ を測定し、イオン形白金錯体の生体内輸送の基礎データとする。

④ 白金と同じ配位構造を示すパラジウム錯体の合成と錯体化学の諸性質解明を行い、白金、パラジウム錯体の比較から基本となる化合物特性と抗がん活性との関係を示す。

⑤ 開発薬剤の副作用を次の諸点から解明する：

a. 白金およびパラジウム錯体の安定性 (半減期)

特にシスプラチンとの差異について、NMR 等により検討を加える。

b. マウス、ラットを用いた腎毒性評価

血液データから腎毒性を評価する、他、体重、その他のデータから副作用を評価する。

以上より、本研究課題白金錯体の、(1) 副作用を軽減させる化学特性、(2) 抗がん作用を強化させる化学特性、に関する知見を得る。この両化学特性を満足させる白金錯体が、抗がん剤への道を示している。

4. 研究成果

現在臨床で使用されているシスプラチン型白金抗がん剤の欠点であるシスプラチン耐性と腎毒性問題をクリアするため、電荷を有するカチオン、アニオン両白金・パラジウ

ム錯体を合成し、インビトロ生理活性を検討したところ、芳香環スタッキングを有する一連のカチオン錯体に良好な *in vitro* 抗がん活性を見出した。抗がん作用を強化させる化学特性としての分子内芳香環スタックは初めての報告である。数々のがん細胞に対する抗がんパターンは、シスプラチンやその他の抗がん剤とは大きく異なっており、シスプラチンや従来の抗がん剤とは異なる抗がん機構で働くことが示唆された。検討の結果、これらのカチオン錯体は強力なプロテアソーム活性阻害を有していることを見出すに至った。このようなタンパク質を標的とした抗がん作用はシスプラチン等では見られないことから、本錯体がシスプラチンとは異なる作用機構で働いていることが明確に示され、シスプラチン耐性抗がん剤として有望なことが期待された。事実、カチオン Pt-bpy-AtC2 錯体はシスプラチン耐性がん細胞に対してノーマルのがん細胞と同等の IC50 値を示した。本錯体の生理活性の源である化学特性について検討を加えたところ、カチオン錯体に特徴的な芳香環スタッキングは、置換基・金属を変えるだけで大きく変化することがプロトン NMR から認められ、スタッキングが軌道間相互作用であることが支持された。同時に、錯体の物性であるオクタノール/水分配比も大きく変化し、スタッキング構造が錯体の物性を決定していることが明確となった。カチオン白金抗がん剤の白金配位芳香環を大きくして芳香環スタッキングを強めたところ、培養がん細胞増殖抑制効果、プロテアソーム活性阻害作用ともに向上が見られ、抗がん活性とプロテアソーム活性阻害に直線関係が見られたことから、プロテアソーム活性阻害がカチオン白金抗がん剤の主な活性機構と判断された。シスプラチンにプロテアソーム活性は見られなかったことから核酸 DNA 配位以外の生理活性機構を有することがシスプラチン耐性がんに効く要因であることが明らかとなった。

一方、リン酸基含有アニオン白金錯体は、イノシトール六リン酸 IP6 を使った複核錯体ではシスプラチンより抗がん活性が高くなった。抗がんパネルパターンはカチオン錯体ほどではないが、シスプラチンとはかなり違っており、抗がん機構が違うことが示唆された。事実 IP6 白金複核錯体の半減期は 1-3 ヶ月とかなり安定で、数時間以内のシスプラチンとは作用種が違うことが判明した。ラングミアプロットにより得た吸着平衡定数から骨の無機成分であるヒドロキシアパタイトに高い親和性を有していることが示され、

本錯体の骨への選択的デリバリーの可能性が示唆された。

白金錯体の副作用を軽減させる化学特性についてマウス実験の結果、BUN、クレアチニン濃度に反映されたシスプラチン腎毒性はカチオン、アニオンいずれのイオン化合物についても観察することができず、シスプラチンにはない容易に加水分解されない性質、イオンによる高い水溶性が腎毒性の小ささに反映されていることが推定された。従って、当初予測されたシスプラチン結合 DNA-HMG タンパク質がシスプラチン抗がん活性の源であることは、モデル錯体からは実証できず、新しい標的を見出した結果となった。白金と同様の配位構造を示すパラジウム錯体が白金錯体と同レベルの抗がん活性を示したことは、本研究の開発カチオン錯体の活性が配位子側の構造に依存しているとともに、白金にとってかわる新しい金属抗がん剤の開発が可能であることを示している。

白金と同様の配位構造を示すパラジウム錯体が白金錯体と同レベルの抗がん活性を示したことは、本研究の開発カチオン錯体の活性が配位子側の構造に依存しているとともに、白金にとってかわる新しい金属抗がん剤の開発が可能であることを示していた。

これらの結果は北国新聞社に取り上げられ反響を呼んだ（下図）。



副作用を減らした結果、投与量が増やせ、その結果治療効果があがることが判明した。ラット vivo 腎毒性実験の結果、33 μ g/kg 投与でシスプラチン腎毒性が1日後の血液 BUN、クレアチニン値の上昇として認められたが、水溶性がアップしたアニオン3核白金、カチオン白金錯体は全く変動せず、腎毒性は認められなかった。抗がん実験では、シスプラチン 33 μ g/kg 投与では経過観察中にラットが死亡し、実際のアッセイは血液データに腎毒性が認められにくい投与量となった。投与量は、シスプラチンは 8.25 μ g/kg に対し、腎毒性を軽減させたアニオン3核白金、カチオン白金錯体は 16.5 μ g/kg と投与量を増やせた。白金化合物に代表される化学療法剤は投与量を増やして大きな抗がん効果を得ることが多く、水溶性向上による副作用軽減、抗がん効果アップが期待できる。長い半減期を有するアニオン多核白金化合物、加水分解しないカチオン型白金、パラジウム錯体はシスプラチン耐性に関与するカチオンシスプラチン錯体部分を持たないため、シスプラチンとは異なる抗がん作用機構を有することが抗がんパネルパターンから示された。これらの新型白金およびパラジウム抗がん剤がシスプラチン耐性がんに効くことが細胞レベルからも示された。抗がん活性の向上については、カチオン白金およびパラジウム錯体は特徴である芳香環スタッキングを強めることで、アニオン白金錯体は多核化により腎毒性を増やすことなく、それぞれ活性を向上でき、シスプラチンにとって代わる新規白金抗がん剤の開発に成功した。

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 7 件)

- ①小谷明, 桜井弘 "Metal-based drugs 開発研究の最前線" *Yakugaku Zasshi*, 査読有 132(2), 251 (2012). https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/132/3/132_3_251/_pdf
- ②A. Odani, R. Jastrzab, L. Lomozik "Equilibrium study on the interaction of phytic acid with polyamines and metal ions." *Metallomics*. 査読有, 3(7):735-43 (2011) DOI: 10.1039/c1mt00031d
- ③R. Jastrzab, Z. Hnatejko, T. Runka, A. Odani, L. Lomozik "Stability and mode of coordination complexes formed in the silver(I)/nucleoside systems." *New J Chem*. 査読有, 35:1672-7 (2011) DOI: 10.1039/c1nj20230h

- ④J.S. Zhang, M. Anraku, D. Kadowaki, T. Imai, A. Suenaga, A. Odani, M. Otagiri "Spectroscopic studies of interactions of chondroitin sulfates with cisplatin." *Carbohydr Res*. 査読有, 346(5):631-7 (2011) doi:10.1016/j.carres.2011.01.007
- ⑤小谷明 "新しい白金抗がん剤の開発の発想から現状まで" *Biomedical Research on Trace Elements* 査読有, 22(1), 22-26 (2011). <http://ci.nii.ac.jp/naid/10028118026/>
- ⑥S. Komeda, T. Moulaei, M. Chikuma, A. Odani, R. Kipping, N. P. Farrell, L. D. Williams "The phosphate clamp: a small and independent motif for nucleic acid backbone recognition." *Nucleic Acids Res*. 査読有, 39(1):325-336 (2011). doi:10.1093/nar/gkq723
- ⑦Y. Nakabayashi, M. Tashiro, T. Yajima, M. Takani, A. Tani, T. Motoyama, A. Odani, O. Yamauchi "Adduct formation between ternary Pt(II)-amino acid-aromatic diimine complexes and flavin mononucleotide and its effect on redox properties." *Inorg Chim Acta*. 査読有, 362, 777-783 (2009). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2008.03.054>

[学会発表] (計 14 件)

- ①小谷明 "Pt, Zn 含有医薬品から見た元素の体内動態" 日本薬学会第 132 年会, 2012. 3. 29, 北海道大学 (北海道).
- ②竹中淳平, 黄檗達人, 小川数馬, 小谷明 "低腎毒性三核 Pt(II) 抗がん剤の開発" 錯体化学会第 61 回討論会, 2011.9.18, 岡山理科大学 (岡山県).
- ③J. Takenaka, T. Kiyada, K. Ogawa, A. Odani "IP6 containing multinuclear platinum(II) complexes for bone metastasis" The 5th International Conference on Metals and Genetics (ICMG 2011), 2011.9.6, 神戸国際会議場 (兵庫県).
- ④黄檗達人, 加藤正弘, 小川数馬, 小谷明 "プロテアソーム阻害活性を示す白金錯体の構造活性相関" 日本薬学会第 131 年会, 2011.3.29, 静岡グランシップ (静岡県).
- ⑤小谷明, 小川数馬, 黄檗達人, リナタ ジャストラザブ, レコスラフ ロモジク "核内のリン酸アニオン-カチオン特異的相互作用-IP6 とスペルミン" 2 回メタロミクス研究フォーラム, 2010.11.3, 京都薬科大学 (京都府).
- ⑥小谷明, 小川数馬 "腎毒性の小さなイオン性新規抗がん白金(II)化合物 Ionic and less nephrotoxic new anticancer platinum(II)

compounds” 第 69 回日本癌学会学術総会，
2010.9.23，大阪国際会議場（大阪府）。

⑦竹中淳平，黄檗達人，小川数馬，小谷明
“Synthesis and characterization of less
nephrotoxic and bone targeting
multi-nuclear platinum(II) complexes with
IP6” 第 20 回金属の関与する生体関連反応シ
ンポジウム，2010.6.26，徳島文理大学（徳島
県）。

⑧竹森麻美，黄檗達人，小川数馬，小谷明
“シスプラチン結合 DNA をテンプレートとし
た Pt，Pd 錯体の特性” 日本薬学会第 130 年
会，2010.3.28，岡山大学（岡山県）。

⑨ A. Odani，H. Takayama，M. Takemori
“Non-Covalent Interaction Type Anticancer
Pt(II) and Pd(II) Complexes” 14th
International Conference on Biological
Inorganic Chemistry，2009.7.29，名古屋国
際会議場（愛知県）。

⑩ 小谷明 “腎毒性軽減を目指した白金抗が
ん剤の開発” 鈴鹿医療科学大学薬学部セミ
ナー，2009.7.3，鈴鹿医療科学大学（三重県）。

⑪竹中淳平，黄檗達人，小川数馬，小谷明
“リン酸基含有 IP6 多核白金抗がん剤の開発”
日本薬学会北陸支部第 121 回例会，2009.7.11，
金沢大学（石川県）。

⑫竹森麻美，黄檗達人，小川数馬，小谷明
“Cisplatin と異なる抗ガン作用を有する白
金錯体の開発” 日本薬学会北陸支部第 121 回
例会，2009.7.11，金沢大学（石川県）。

⑬ 小谷明 “新しい制がん機構を有する白金錯
体” 第 20 回日本微量元素学会学術集会，
2009.7.3，京王プラザ（東京都）。

⑭ 小谷明，田邊和行，米田誠治，小川数馬。
“骨親和性白金錯体の特性と抗がん剤への応
用” 第 19 回金属の関与する生体関連反応シ
ンポジウム，2009.6.11，大阪大学銀杏会館
（大阪府）。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：金属錯体およびこれを有効成分として
含有する抗がん剤

発明者：小谷明

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2010-08343

出願年月日：2010.3.31

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunseki/
research.html](http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunseki/research.html)

新聞掲載

2010.7.10 北国新聞 朝刊

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 明 (ODANI AKIRA)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：60143913

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし