

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592180

研究課題名(和文) 骨肉腫に対する新規合成プラチナ錯体にカフェインを併用した化学療法の基礎的研究

研究課題名(英文) Efficacy of newly developed platinum complexes against osteosarcoma, bone targeting platinum and proteasome inhibitory platinum.

研究代表者

山本 憲男 (Yamamoto, Norio)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任教授

研究者番号：90332668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規に開発したプラチナ製剤にカフェインを併用した化学療法を骨肉腫細胞株に対して施行し、シスプラチン同様に抗腫瘍効果の増強を確認できた。また新規プラチナ製剤はDNA二本鎖断裂を引き起こすことを確認し、シスプラチン同様の作用機序が示唆された。一方でシスプラチン耐性株に対しても交叉耐性を示さなかったことからシスプラチン耐性といった臨床上の大きな問題にも対応できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Each compound strongly caused concentration-dependent cytotoxic effect. IC50 value of trinuclear compound is superior to cisplatin, and both complexes showed caffeine potentiation. Two novel platinum do not show cross resistance to cisplatin. Apoptosis induction and acetylation of histon H2AX were observed. In vivo, 1Pt showed almost same, 3Pt showed stronger antitumor effect compared to cisplatin. Two novel platinum complexes that we developed showed strong anti-tumor effect in osteosarcoma in vitro and in vivo. 3Pt shows superior anti-tumor effect compared to cisplatin. 1Pt shows strong in vivo anti-tumor activity. Apoptosis is induced by DNA double strand break. Novel platinum compounds may overcome cisplatin resistance.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：新規プラチナ製剤 骨肉腫

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫に対する薬物治療において、開発以来30年を経過したCDDPがまだ第1選択薬剤である。しかしCDDPの腎毒性、血液毒性、薬剤耐性が臨床上問題となっている。我々はビスホスホネートをその化学構造式に含む3価のPt製剤、プロテアソーム阻害を有する1価のPt製剤を新規に開発した。

2. 研究の目的

これら新規プラチナ製剤を用い、骨肉腫に対する抗腫瘍効果をシスプラチンと比較検討し、カフェインの併用によりシスプラチン同様に抗腫瘍効果の増強が得られるかを検討した。

3. 研究の方法

通常骨肉腫細胞株(LM8, MG63, 143B), CDDP耐性骨肉腫細胞株(LM8-cisR, MG63-cisR, 143B-cisR)を用い in vitro での腫瘍抑制効果について WST-8 assay を用い評価した。アポトーシスの誘導は DNA ladder, Annexin V / PI によるフローサイトメトリーにて評価した。DNA との相互作用については HistonH2AX のリン酸化を評価した。In vivo ではヌードマウス (balb c nu/nu) の脛骨に 143B を移植した orthotopic model を作成, 各薬剤投与を行い抗腫瘍効果の評価を行った。

4. 研究成果

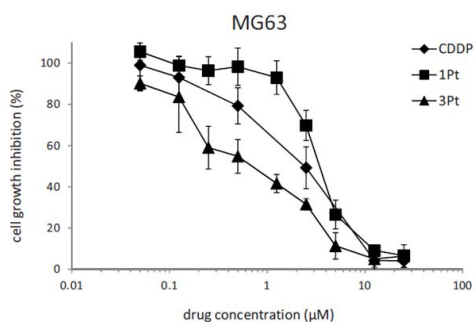
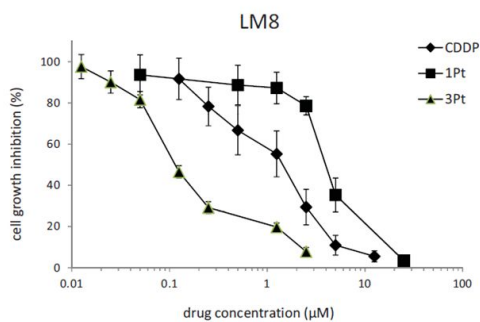


Table 1. IC<sub>50</sub> value of cisplatin and 1Pt, 3Pt against LM8, MG63, and 143B cells with and without adding 1mM of caffeine.

	CDDP IC <sub>50</sub> (μM)		1Pt IC <sub>50</sub> (μM)		3Pt IC <sub>50</sub> (μM)	
		+CAF 1mM		+CAF 1mM		+CAF 1mM
LM8	1.09±0.24	0.47±0.10**	3.38±0.49	1.46±0.29**	0.12±0.01	0.08±0.013**
MG63	1.85±0.48	1.02±0.09**	3.46±0.47	2.32±0.29**	0.72±0.15	0.48±0.07**
143B	2.19±0.15	1.24±0.10**	5.83±0.30	3.31±0.53*	0.42±0.07	0.48±0.08**

Osteosarcoma cells were incubated with other platinum complexes with and without caffeine for 72 hrs and then assessed via the WST-8 assay.

Table 2. IC<sub>50</sub> value of cisplatin and 1Pt, 3Pt against LM8, MG63, 143B, LM8cisR, MG63cisR, 143BcisR cells.

Drug	LM8 IC <sub>50</sub> (μM)	LM8-cisR IC <sub>50</sub> (μM)	RI	MG63 IC <sub>50</sub> (μM)	MG63-cisR IC <sub>50</sub> (μM)	RI	143B IC <sub>50</sub> (μM)	143B-cisR IC <sub>50</sub> (μM)	RI
CDDP	1.20±0.06	3.41±0.10	2.85	1.99±0.06	4.53±0.21	4.17	1.96±0.03	1.85±0.10	1.83
1Pt	2.72±0.18	2.74±0.13	1.01	2.47±0.12	2.41±0.11	0.97	2.10±0.05	1.97±0.10	0.93
3Pt	0.65±0.096	0.64±0.064	0.98	0.17±0.014	0.17±0.021	1.01	0.99±0.007	0.97±0.007	0.85

Resistance index = cisplatin-resistant/cisplatin-sensitive IC<sub>50</sub>. Osteosarcoma cells were incubated with cisplatin, 1Pt, or 3Pt for 72 hrs and assessed by the WST-8 assay.

各骨肉腫細胞株において 3Pt では CDDP よりも強い腫瘍抑制効果が得られた。また、カフェイン併用群では薬剤単独に比し強い腫瘍抑制効果が得られた。

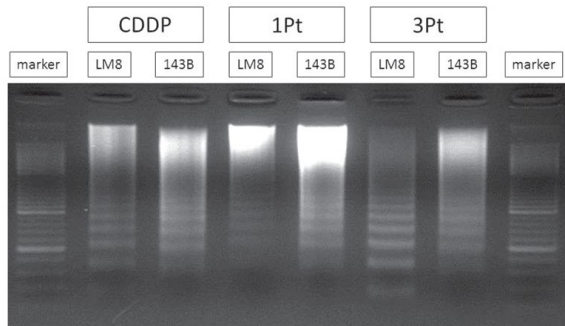


Fig. (4). Agarose gel electrophoresis for analysis of DNA fragmentation induced by the platinum complexes. Osteosarcoma cells were exposed to 12.5 μM of each compound for 48 hrs. DNA was extracted and electrophoresed in an agarose gel. The DNA fragments were then visualized by exposing the gel to ultraviolet light.

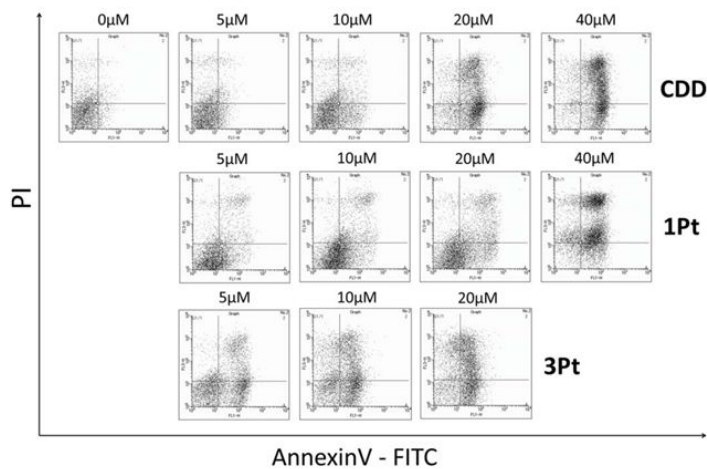


Fig. (5). The annexin V-FITC/PI assay to assess apoptosis of 143B cells induced by the platinum complexes. 143B cells were exposed to each compound for 24 hrs, and flow cytometry assay was performed using an annexin V-FITC/PI assay kit.

薬剤作用後にはいずれも DNA ladder が検出され、フローサイトメトリーでは濃度依存性にアポトーシスを生じていた。

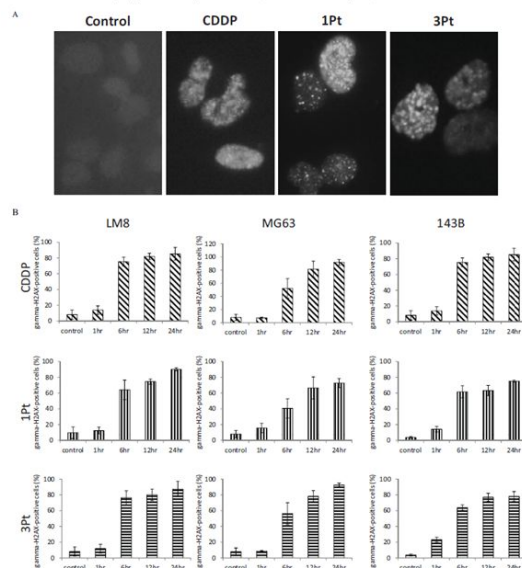


Fig. (6). A. Formation of gamma-H2AX foci induced by the platinum complexes in 143B cells. The cells were incubated with each platinum complex for 48 hr, fixed, and subjected to immunofluorescence staining for gamma-H2AX. B. Formation of gamma-H2AX foci induced by the platinum complexes in LM8, MG63 and 143B cells. They were then fixed and subjected to immunofluorescence staining for gamma-H2AX and the percentage of cells containing gamma-H2AX foci was determined. Data are mean±s.e.

薬剤作用後に histonH2AX のリン酸化が確認された .orthotopic model では CDDP よりも強力な抗腫瘍効果を確認した。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

#### **がん若手研究者ワークショップ** 薬科

高原グランドホテル滝の湯(長野県・茅野市) 平成 24 年 9 月 4 日

骨親和性新規プラチナ製剤の骨肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果とカフェインによる増強

五十嵐健太郎, 山本憲男, 西田英司, 木村浩明, 武内章, 下崎真吾, 加藤貴士, 青木裕, 小谷明, 土屋弘行

第 85 回日本整形外科学会 京都国際会議場(京都府・京都市) 平成 24 年 5 月 17-20 日

新規プラチナ製剤の骨肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果 シスプラチン耐性株に対する抗腫瘍効果を含め

五十嵐健太郎, 山本憲男, 白井寿治, 林克洋, 西田英司, 武内章彦, 丹沢義一, 木村浩明, 三輪真嗣, 稲谷弘幸, 下崎真吾, 小谷明, 土屋弘行

**International Society of Limb Salvage 17<sup>th</sup> General Meeting** ( Bologna, Italy ) June 11-13, 2013

Efficacy of newly developed two platinum complexes against osteosarcoma, bone targeting platinum and proteasome inhibitory platinum

K. Igarashi, N. Yamamoto, T. Shirai, H. Nishida, Y. Tanzawa, K. Hayashi, H. Kimura, A. Takeuchi, S. Miwa, H. Inatani, S. Shimozaki, T. Kato, A. Odani, H. Tsuchiya

**14th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology ( EFORT ) Congress.** (Istanbul, Turkey) June 5-8, 2013

Efficacy of newly developed platinum complexes against osteosarcoma, bone

targeting platinum and proteasome inhibitory platinum.

K. Igarashi, N. Yamamoto, T. Shirai, H. Nishida, Y. Tanzawa, K. Hayashi, H. Kimura, A. Takeuchi, S. Miwa, H. Inatani, S. Shimozaki, T. Kato, A. Odani, H. Tsuchiya

17th World Congress on Advances in Oncology and 15th International Symposium on Molecular Medicine ( Crete, Greece ) October 11-13, 2012

Efficacy of novel platinum complexes against osteosarcoma bone targeting platinum and proteasome inhibitory platinum

Igarashi K, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Takeuchi A, Tanzawa Y, Kimura H, Miwa S, Inatani H, Shimozaki S, Odani A, Tsuchiya H

ASCO annual meeting ( Chicago, USA ) June 1-5, 2012

Efficacy of newly developed platinum complexes against osteosarcoma, bone targeting platinum and proteasome inhibitory platinum

Igarashi K, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Takeuchi A, Tanzawa Y, Kimura H, Miwa S, Inatani H, Shimozaki S, Odani A, Tsuchiya H

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 憲男 (YAMAMOTO, Norio)  
金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任教授

研究者番号：90332668

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：