

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590063

研究課題名(和文) 遷移金属二核錯体を用いた次世代制がん剤の開発

研究課題名(英文) Development of next-generation anticancer drugs using dinuclear transition metal complexes

研究代表者

米田 誠治 (Komeda, Seiji)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：60425056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：高いin vivo抗腫効果を発揮するテトラゾラト架橋錯体の構造活性相関を構築するために、テトラゾール5位に様々な置換基を導入した誘導体22種を新たに合成した。これらは高い細胞毒性を発揮し、シスプラチンに対する交叉耐性も克服していた。これらの錯体のJFCR39に基づく細胞毒性フィンガープリントは、他の制がん剤のそれらとは全く異なるものであった。テトラゾラト架橋錯体は、DNAの二次構造変化と高次構造変化を引き起こす。これらの構造変化は白金制がん剤で観察されることなく、テトラゾラト架橋錯体は、DNAとのユニークな相互作用に起因する新たなメカニズムによって細胞を死に至らしめていると推定した。

研究成果の概要(英文)：To construct a structure-activity relationship, twenty-two derivatives of highly in vivo anticancer-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complex were synthesized with variable substituents at tetrazolate C5. Most derivatives were found to be highly in vitro cytotoxic and to circumvent cross-resistance to cisplatin, which is the representative of platinum-based drugs. In addition, the cytotoxicity fingerprints of some derivatives based on the JFCR39 cytotoxicity data were completely different from those of clinical platinum-based anticancer drugs, as well as other anticancer agents. The tetrazolato-bridged complexes efficiently induce B to C DNA transformation of calf-thymus DNA and compaction of T4 phage DNA. The second- and higher-order structural changes cannot be observed in case of platinum-based drugs. Therefore, tetrazolato-bridged complexes are likely to exhibit cytotoxicity with a novel mechanism of action probably due to the unique interactions with DNA.

研究分野：生物無機化学

キーワード：制がん剤 白金 DNA 薬物耐性 金属錯体

1. 研究開始当初の背景

シスプラチン(図1左)に代表される白金制がん剤は、共有結合性 DNA 付加物を形成することによって、薬理効果を発揮すると考えられている。研究代表者らは、シスプラチンとは異なる DNA 付加物を形成する白金錯体を分子設計することによって、従来の白金製剤が奏功しないがん腫にも著効を示す制がん剤を創出できると推定した。実際に、新奇な構造を有するテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体(図1右; 以下テトラゾラト架橋錯体)を分子設計したところ、テトラゾラト架橋錯体は、膀胱がんに対して顕著な *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮した。

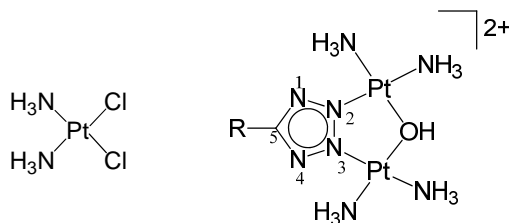


図1 白金制がん剤シスプラチン(左)とテトラゾラト架橋錯体(右)

2. 研究の目的

本研究の目的は、化学療法に対して感受性が低いがんにも効果を発揮する次世代治療薬を創出することと、その制がんメカニズムの一端を解明することである。膀胱がんに対して顕著な *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮するリード化合物を基盤に、新たな誘導体を分子設計し、副作用の軽減と更なる薬理活性の向上を図る。また、制がん作用を初動する DNA との結合様式を詳細に調べ、新たなファーマコフォアの発見を試みる。

3. 研究の方法

(1) 構造活性相関

様々な官能基をテトラゾラト架橋錯体のテトラゾール5位に導入し、以下の分子式で示される誘導体を合成した。

$[\{cis-Pt(NH_3)_2\}_2(\mu-OH)(\mu-5-R-tetrazolato-N2,N3)]^{2+}$ (R = $(CH_2)_nCH_3$ (n = 0 - 8, Alkyl 型錯体), R = $(CH_2)_aCOO(CH_2)_bCH_3$ (a = 0, 1, b = 0 - 2, Ester A 型錯体), R = $(CH_2)_xOCO(CH_2)_yCH_3$ (x = 1, 2, y = 0 - 2, Ester B 型錯体), R = $(CH_2)_aCOO^-$ (a = 0, 1, Carboxylate ion 型錯体), R = $(CH_2)_xOH$ (x = 1, 2, Alcohol 型錯体))

新たに合成された錯体は、¹H-、¹³C-、¹⁹⁵Pt-NMR および質量分析によって帰属された。これらの錯体について、ES-2 (ヒト卵巣がん細胞株)、H460 (ヒト非小細胞肺癌細胞株)、A2780 (ヒト卵巣がん細胞株) および A2780cis (A2780 シスプラチン耐性株) に対する *in vitro* 細胞毒性を明らかにした。また、リード化合物である $[\{cis-Pt(NH_3)_2\}_2(\mu-OH)(\mu-tetrazolato-N2,N3)]^{2+}$ (5-H-Y) について、39 種類の異なるヒトがん細胞株パネルから得られるフィンガープリントを用いて、制がん

メカニズムの推定を行った。

(2) DNA との相互作用様式

DNA との相互作用様式は、二次構造変化(仔牛 DNA、CD スペクトル)および高次構造変化(T4 phage DNA、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡)に分けて観察を行った。

4. 研究成果

(1) 構造活性相関

全ての細胞株において、ほとんどの新規テトラゾラト架橋錯体は、シスプラチンよりも数倍から数十倍高い *in vitro* 細胞毒性を示し、活性を示さないごく少数の誘導体を除く全ての錯体において、シスプラチンに対する交叉耐性の克服が確認された。Alkyl 型錯体の場合、メチレン基数 n = 0 - 4 の誘導体では炭素鎖の伸長に伴って細胞毒性が低下する。逆に、n = 4 - 8 の誘導体では炭素鎖の伸長に伴い、穏やかではあるが細胞毒性が向上するという傾向が得られた。Ester A 型錯体は、有効な活性を示したが、そのけん化誘導体である Carboxylate ion 型錯体は、ほとんど活性を示さなかった。Ester B 型錯体およびそのけん化誘導体の Alcohol 型錯体の活性は非常に高かった。Ester B 型錯体はテトラゾール側のメチレン基数 (x) が小さく末端側のメチレン基数 (y) が大きい場合に活性が増大し、Alcohol 型錯体はメチレン基数 (n) が大きくなると活性が増大するという構造活性相関も得られた。

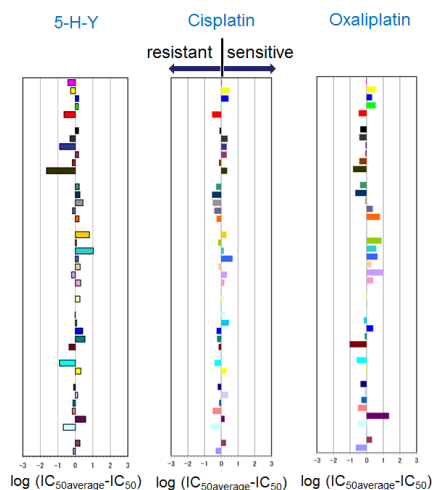


図2 39 種類の異なるがん細胞パネルから得られた 5-H-Y (左)、シスプラチン(中央)およびオキサリプラチン(右)のフィンガープリント。

また、がん細胞パネルを用いた実験から得られた 5-H-Y のフィンガープリント(図2)は、従来の白金制がん剤とは明らかに異なるだけでなく、5-H-Y と相関の高いフィンガープリントを有する制がん剤は、データベース中に存在しなかった。このことから、5-H-Y は全く新しい制がんメカニズムで細胞を死に至らしめている可能性が示唆された。

(2) DNA との相互作用様式

テトラゾラト架橋錯体の添加によって DNA の二次構造と高次構造が著しく変化することが確認された。以下に、Alkyl 型錯体 (n = 0 - 8) を例に取り、これらの詳細について述べる。

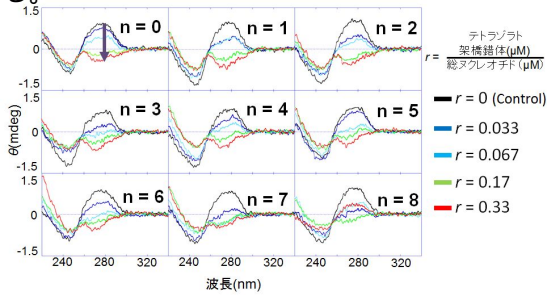


図3 濃度の異なる Alkyl 型錯体 (n = 0 - 8) 共存下で測定した仔牛胸腺 DNA の CD スペクトル

炭素鎖長の異なる Alkyl 型錯体の混合濃度を変化させながら仔牛胸腺 DNA の CD スペクトルを測定すると、280 nm 付近の正のコットン効果の著しい減少が観測された (図 3)。このスペクトル変化は B 型 DNA から C 型 DNA への構造変化に起因している。高濃度の塩化ナトリウム溶液を加えると、元の B 型と同じスペクトルが得られることから、白金錯体とリン酸基の静電的な相互作用によってこの二次構造変化が引き起こされたと推定した。

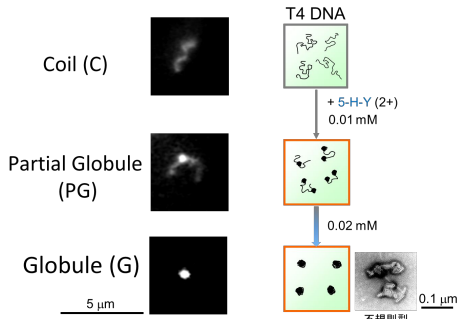


図4 5-H-Y を添加した際に T4 phage DNA が凝縮する様子 (蛍光顕微鏡図 (左) と電子顕微鏡図 (右端))。

一方、テトラゾラト架橋錯体のリード化合物である 5-H-Y は、T4 phage DNA を非常に高効率に凝縮させることが報告されている。この凝縮現象は、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡を用いた観察によって明らかになった (図 4)。例えば、スペルミジンが 5-H-Y と同様の DNA 凝縮を引き起こすためには、5-H-Y の 20 倍のスペルミジン濃度が必要となる。5-H-Y による DNA 凝縮は、二次構造変化と同様に拡散律速の相互作用によるものと推定されるが、高濃度塩を加えても解消されないことから、静電的な相互作用とは異なる比較的強い相互作用によって引き起こされる現象であると考えられる。Alkyl 型錯体についても同様の蛍光顕微鏡観察を実施した結果、メチレン基数 n = 0 - 3 の誘導体では炭素鎖の伸長に伴って凝縮能が低下した。一方、n = 3 - 8 の錯体では逆に、炭素鎖の伸長に伴い凝縮能が向上した (図 5)。この傾向は、Alkyl 型錯体のミセル形成能 (図 6) と相関

があり、短いアルキル鎖と長いアルキル鎖を有する錯体で細胞毒性の傾向が異なるのは、このことに起因しているのかもしれない。

	5-H-Y	n=0	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7	n=8
0.2 μM								C	PG, G	PG, G
0.5 μM								PG, C	PG, G	PG, G
1 μM								G	G	G
2 μM								G	G	G
5 μM	C							G	G	G
10 μM	PG, C	C	C	C	C	C	PG, C			
20 μM	G (PG)	PG, C	PG, C	C	C	C	G (PG)			
30 μM	G	G	PG, G	C	C	C	G			
40 μM			G	PG, C	C	PG, C	G			
50 μM				G	PG, C	PG, G	G			
60 μM					G	PG, G	G			
100 μM					G	PG, C	G			
120 μM						G				
200 μM						G				

図4 Alkyl 型錯体の濃度と T4 phage DNA の高次構造変化。

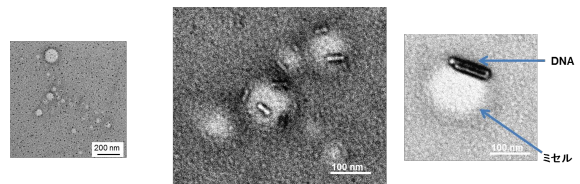


図6 Alkyl 型錯体 (n = 7) のミセル (左) およびミセルと凝縮した T4 phage DNA の電子顕微鏡写真 (中央、右)。

図 7 に示したように、テトラゾラト架橋錯体は、リン酸基との静電的な相互作用によって DNA の二次構造変化を引き起こす。また、テトラゾラト架橋錯体のプロトタイプである $[\{cis-Pt(NH_3)_2\}_2(\mu-OH)(\mu-pyrazolato)]^{2+}$ がマイナーグループに強く結合すること (図 6 下) およびテトラゾラト架橋錯体のマイナーグループ結合を示唆する二次元 NMR データ (NOESY) が得られていることから、テトラゾラト架橋錯体による高次構造変化は、同様のマイナーグループ結合によって起こると推定される。これらの相互作用は、テトラゾラト架橋錯体に特有で、シスプラチンに代表される白金製剤には見られない様式である。

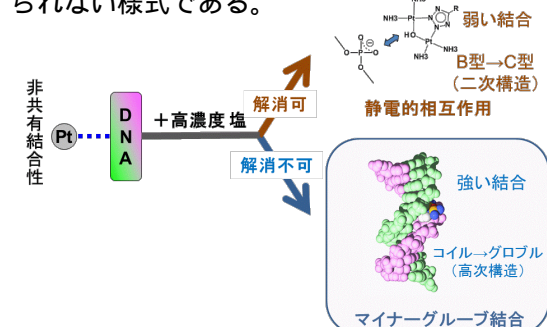


図6 テトラゾラト架橋錯体は、二つの異なる非共有結合性相互作用によって DNA の構造変化を引き起こす。プロトタイプである $[\{cis-Pt(NH_3)_2\}_2(\mu-OH)(\mu-pyrazolato)]^{2+}$ (AMPZ) はマイナーグループに強く結合する (下、X 線結晶構造)。

つまり、シスプラチン耐性がん細胞に対するこれらの錯体の有効性や、がん細胞パネルから推定されるユニークな制がんメカニズムは、DNA との新奇な相互作用様式の違いに起因すると推定される。本研究で構築された構造活性相関は、次世代がん治療薬の創成に大きく寄与すると考えられる。

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 7 件)

Uemura, M.; Yoshikawa, Y.; Sato, T.; Mino, Y.; Yoshikawa, K.; Chikuma, M.; Komeda, S.
Second- and higher-order structural changes of DNA induced by antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with different types of 5-substituent
J. Inorg. Biochem. (2013) 127, 169-174. 査読有
DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2013.05.004

Komeda, S.; Takayama, H.; Suzuki, T.; Odani, A.; Yamori, T.; Chikuma, M.
Synthesis of antitumor azolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with *in vivo* antitumor efficacy and unique *in vitro* cytotoxicity profiles
Metallomics (2013) 5, 461-468. 査読有
DOI: 10.1039/C3MT00040K

Yoneyama, H.; Usami, Y.; Komeda, S.; Harusawa, S.
Efficient transformation of inactive nitriles into 5-substituted-1H-tetrazoles using microwave irradiation and their applications
Synthesis (2013) 45, 1051-1059. 査読有
DOI: 10.1055/s-0032-1318476

Uemura, M.; Yoshikawa, Y.; Chikuma, M.; Komeda, S.
A circular dichroism study uncovers a two-step interaction of antitumor azolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with calf thymus DNA
Metallomics (2012) 4, 641-644. 査読有
DOI: 10.1039/C2MT20022H

Uemura, M.; Suzuki, T.; Nishio, K.; Chikuma, M.; Komeda, S.
An *in vivo* highly antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complex largely circumvents *in vitro* cisplatin resistance: Two linkage isomers yield the same product upon reaction with 9-ethylguanine but exhibit different cytotoxic profiles”
Metallomics (2012) 4, 686-692. 査読有
DOI: 10.1039/C2MT20026K

Mlcouskova, J.; Malina, J.; Novohradsky, V.; Kasparkova, J.; Komeda, S.; Brabec, V.
Energetics, conformation, and recognition of DNA duplexes containing a major adduct of an anticancer azolato-bridged dinuclear Pt^{II} complex”
Biochim. Biophys. Acta - General Subjects (2012) 1820, 1502-1511. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.05.014

Mlcouskova, J.; Kasparkova, J.; Suchankova, T.; Komeda, S.; Brabec, V.

DNA conformation and repair of polymeric natural DNA damaged by antitumor azolato-bridged dinuclear Pt^{II} complex”
J. Inorg. Biochem. (2012) 114, 15-23. 査読有
DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.04.015

〔学会発表〕(計 件)

米田誠治, 植村雅子, 吉川祐子, 千熊正彦, 矢守隆夫
in vivo highly antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes
第 22 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム.
20120531-20120601 金沢市

植村雅子, 藤澤豊, 定金 豊, 飯田靖彦, 森井孫俊, 千熊正彦, 米田誠治
DNA conformational changes induced by antitumor tetrazolato-bridged dinuclear Pt(II) complexes”
第 22 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
20120531-20120601 金沢市

米田誠治: "次世代白金制がん剤の創薬研究"
第 25 回生物無機化学夏季セミナー(招待講演)
20120824-20120826 郡上市

岡本直人, 植村雅子, 米山弘樹, 春沢信哉, 小西宏明, 高木陽光, 松崎健, 米田誠治
新規テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成、細胞毒性およびDNAとの相互作用
第 3 回メタロミクス研究フォーラム
20120830-20120831 町田市

Komeda, S.; Uemura, M.; Yoshikawa, Y. Chikuma, M.; Yamori, T.:
Synthesis, biological evaluation and DNA interaction of the series of antitumor azolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes
11th European Biological Inorganic Chemistry Conference
20120912-20120916 スペイン グラナダ市

Uemura, M.; Chikuma, M.; Komeda, S.
A circular dichroism study on the activity of antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear Pt(II) complex derivatives to change secondary structure of DNA
11th European Biological Inorganic Chemistry Conference
20120912-20120916 スペイン グラナダ市

植村雅子, 千熊正彦, 米田誠治
制がん活性を有するテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体によるDNAの濃度および時間依存的二次構造変化

第6回バイオ関連化学シンポジウム
20120906-20120908 札幌市

米田誠治, 植村雅子, 吉川祐子, 千熊正彦,
矢守隆夫
in vivo 制がん活性を有するアゾラト架橋白金(II)二核錯体の創薬研究
錯体化学会第62回討論会
20120921-20120923 富山市

米田誠治
より有用な白金制がん剤を求めて
第43回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
20121110-20121111 名古屋市

米田誠治, 岡本直人, 植村雅子, 米山弘樹,
春沢信哉, 小西宏明, 高木陽光, 松崎健:
新規制がんテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成、細胞毒性およびDNAとの相互作用
日本薬学会 第133年会
20130327-20130331 横浜市

植村雅子, 岡本直人, 米山弘樹, 吉川研一,
吉川祐子, 今中忠行, 小西宏明, 高木陽光,
松崎健, 千熊正彦, 米田誠治
Second- and higher-order structural changes of
DNA induced by antitumor-active 5-alkyl-tetra-
zolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes
第23回金属の関与する生体関連反応シンポ
ジウム
20130621-20120622 西東京市

土屋考弘, 米山弘樹, 春沢信哉, 小西宏明,
高木陽光, 松崎健, 植村雅子, 米田誠治
テトラゾール5位にエステル基を導入した制
がん白金(II)二核錯体の合成および*in vitro* 細胞
毒性
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会
東海支部合同学術大会 2013
20131110-20131110 鈴鹿市

岡本直人, 植村雅子, 米山弘樹, 春沢信哉,
小西宏明, 高木陽光, 松崎健, 吉川祐子, 今
中忠行, 吉川研一, 米田誠治
テトラゾール5位に飽和アルキル基を導入した
制がん白金(II)二核錯体のDNAとの相互作用
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会
東海支部合同学術大会 2013
20131110-20131110 鈴鹿市

佐藤誠泰, 古川絢子, 植村雅子, 樋口善弘,
米田誠治
プロテオミクスを用いた制がん白金錯体
5-H-Yによるタンパク質発現変動解析
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会
東海支部合同学術大会 2013
20131110-20131110 鈴鹿市

米田誠治
白金およびルテニウム錯体とがん治療
日本薬学会 第134年会
20140327-20140320 熊本市

植村雅子, 星山美有, 古川絢子, 樋口善博,
米田誠治
Structure-activity relationship study, DNA
binding ability, and cellular uptake of anticancer
tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II)
complexes
第24回金属の関与する生体関連反応シンポ
ジウム
20140614-20140615 京都市

植村雅子, 米山弘樹, 土屋考弘, 星山美有,
古川絢子, 樋口善博, 佐藤卓史, 春沢信哉,
米田誠治
制がん tetrazolato 架橋白金(II)二核錯体の構
造活性相関と細胞内取り込み
第4回メタロミクス研究フォーラム
20141107-20141108 西東京市

植村雅子, 米山弘樹, 土屋考弘, 星山美有,
古川絢子, 樋口善博, 春沢信哉, 米田誠治
テトラゾール5位に置換基を導入した制がん
テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の細胞
内取り込みと構造活性相関
日本薬学会 第135年会
20150325-20150328 神戸市

〔その他〕
ホームページ等
http://www.suzuka-u.ac.jp/achievements/41_pp/p_p_komeda.pdf

<http://www.asahi-net.or.jp/~ij4s-kmd/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 誠治 (KOMEDA, Seiji)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授
研究者番号: 60425056

(2) 研究分担者

植村 雅子 (UEMURA, Masako)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手
研究者番号: 70511997