

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659051

研究課題名（和文） シスプラチン誘導体の線維化疾患治療薬としてのポテンシャル

研究課題名（英文） Potential of cisplatin derivatives as antifibrotic drugs

研究代表者

小出 隆規 (KOIDE TAKAKI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：70322253

研究成果の概要（和文）：本研究では、*in vitro*でのランダム探索から見出されたシスプラチン誘導体の、コラーゲン細線維化阻害活性の分子機構を解析するとともに、その線維化疾患治療薬としての応用可能性を追求した。活性本体であると考えられるシスプラチン-DMSO 錯体は、コラーゲン3重らせん上のHisあるいはMet残基を標的として結合していることが示唆された。また、この錯体は、*in vitro*細胞培養系においても分泌されたコラーゲン線維の沈着を阻害した。

研究成果の概要（英文）：Molecular mechanism for the inhibitory action of a cisplatin-DMSO complex on the collagen-fibril formation was investigated *in vitro*. The cisplatin complex was strongly suggested to target His and/or Met residues on the collagen triple helices. The complex was also shown to effectively inhibit the collagen fibril-formation and deposition in a human cell culture system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：コラーゲン、線維化、シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

肝硬変、肺線維症、強皮症などの線維化疾患は、一般に難治性で予後不良である。線維化疾患の病態は、過剰な線維形成により組織が硬化し、正常な機能を喪失することによって形成される。したがって、過剰なコラーゲンの線維形成を抑制することは、線維化の進行予防あるいは治療につながるものと考えられている。実際に、コラーゲンの線維化を抑制するモノクローナル抗体を、線維化疾患の治療薬として利用しようとする試みがなされている。

本研究では、既存の薬物を含む約15,000種類の低分子量化合物からの*in vitro*ランダムスクリーニングにより見出されていた

シスプラチン誘導体を出発点として、あたらしい線維化阻害剤開発の可能性を探ることとした。

2. 研究の目的

本研究では、*in vitro*でのコラーゲン細線維化阻害剤探索により発見されたシスプラチン-DMSO 錯体のコラーゲンに対する作用メカニズムを分子のレベルで明らかにするとともに、ヒト培養細胞系におけるその効果についても調べた。また皮膚科領域での利用を目指した予備的な*in vivo*試験を行い、新規線維化阻害剤としての応用可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 活性本体の同定：シスプラチンのDMSO溶液中に存在する活性本体を明らかにすることを目的として、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析を行い、活性本体となる錯体構造を推定した。また、シスプラチン-DMSO 錯体を大量合成し、その中から活性本体化合物を結晶化あるいはクロマトグラフィーを用いて単離することを試みた。

(2) コラーゲン上のシスプラチン-DMSO 錯体結合様式の解析：シスプラチン-DMSO 錯体が、コラーゲンのどのような構造を認識して結合するのかを明らかにするために、シスプラチン-DMSO 錯体のコラーゲン1分子当たりの結合数を原子吸光スペクトルをもちいて定量した。また、円偏光二色性 (CD) スペクトルによって、シスプラチン-DMSO 錯体が結合したコラーゲンのコンフォメーションを解析した。さらに、様々なアミノ酸置換を施したコラーゲン様3重らせんペプチドの中から、コラーゲン線維化に対するシスプラチン-DMSO 錯体の効果を中和しうるものを選択し、それらのアミノ酸配列からシスプラチン-DMSO 錯体が結合するコラーゲン上のアミノ酸に関する情報を得た。

(3) 構造-活性相関研究：より有用なプラチナ錯体を探索する目的で、構造-活性相関研究を実施した。シスプラチン以外のプラチナ錯体性抗がん剤と様々なスルフォキシドを組み合わせて調製した。これらプラチナ-スルフォキシド錯体の、コラーゲン線維化阻害剤としての効果を *in vitro* で検討した。また、プラチナ-スルフォキシド錯体の ESI 質量分析を行い、活性を示す錯体に共通する構造を探した。

(4) 培養細胞を用いた薬効検定：上記検討において *in vitro* でコラーゲン細線維形成に影響を及ぼすことが認められた錯体については、培養細胞を用いた検討を行った。ここではヒト臍帯血内皮細胞 (HUVEC) を使い、分泌したコラーゲンの蛍光免疫染色によりシスプラチン錯体誘導体の薬効を調べた。加えて、様々な培養細胞を用いてシスプラチン-DMSO 錯体の毒性についても、MTT アッセイを用いて検討した。

(5) *in vivo* での予備的な薬効検定：本項では、プレオマイシン誘導強皮症マウスモデルを用いてシスプラチン誘導体の線維化阻害剤としての薬効の検討をおこなった。

4. 研究成果

(1) 活性本体の同定：ESI 質量分析によりシスプラチン中の塩化物イオンがひとつ DMSO

に置換した一価の陽イオン錯体 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})(\text{DMSO})]^+$ および、二置換体の陽イオンである $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{Cl})(\text{DMSO})_2]^+$ が検出された。そのほかにも、構造不明のプラチナ錯体が複数検出された [図 1]。

これらプラチナ錯体をグラムスケールで合成し、錯体混合物からそれぞれを単離することを試みたが、現状では成功していない。

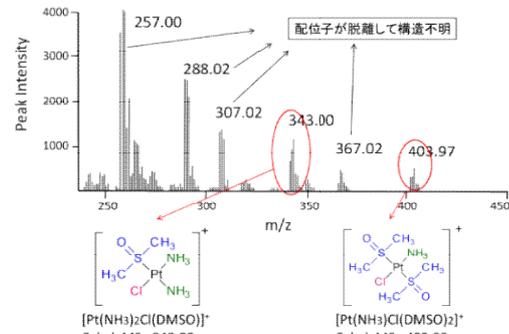


図 1. シスプラチン DMSO 溶液の ESI 質量分析スペクトル

(2) コラーゲン上のシスプラチン-DMSO 錯体結合様式の解析：シスプラチン-DMSO 錯体と3重らせん構造を持ったコラーゲンとの結合は、飽和曲線を示し、コラーゲン1分子当たり最大約3個のプラチナが結合しうることが分かった。また、この結合はコンフォメーション依存性であった。すなわち、コラーゲンを熱変性してゼラチン化したものに対しては、シスプラチン-DMSO 錯体は、非特異的かつ、低い親和性しか示さなかった [図 2]。

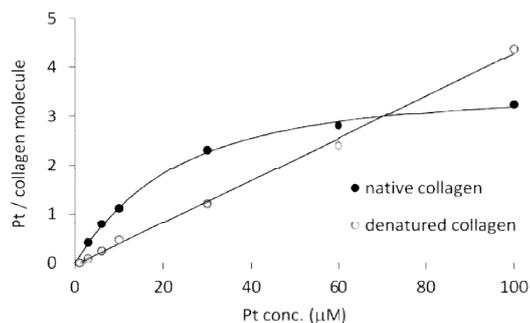


図 2. シスプラチン-DMSO 錯体の変性および非変性コラーゲンへの結合

さらに、複合体の CD スペクトル解析によって、シスプラチン-DMSO が結合してもコラーゲンのコンフォメーションはほとんど変化しないことが明らかになった [図 3]。この結果によって、シスプラチン-DMSO による細線維形成阻害が、3重らせんの変性によるものではなく、コラーゲン分子間の自己集合様式の改変によるものであることが示唆された。

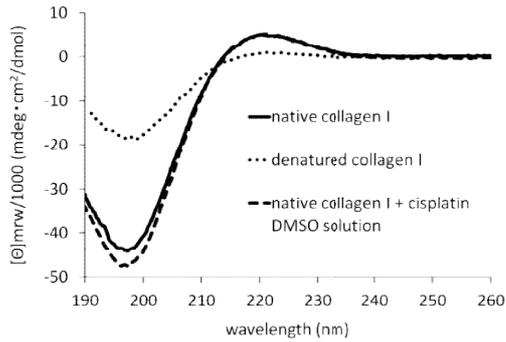


図3. シスプラチン-DMSO 錯体が結合したコラーゲンの CD スペクトル (縦軸はアミノ酸残基平均モル楕円率)

In vitro でのシスプラチン-DMSO のコラーゲン細線維化阻害効果は、His あるいは Met を含有する化学合成 3 重らせんペプチドを共存させることにより有意に減弱した [表 1、図 4]。この結果は、コラーゲン 3 重らせん上の His あるいは Met 残基側鎖が置換配位子としてシスプラチン-DMSO 錯体のターゲットとなっていることを強く示唆するものである。

表 1. 使用したペプチドのアミノ酸配列

Peptide	Sequence
Pep-M	(POG) ₃ PMG(POG) ₄ P-amide
Pep-H	(POG) ₄ PHG(POG) ₄ P-amide
Pep-T	(POG) ₄ PTG(POG) ₄ P-amide
Pep-S	(POG) ₄ PSG(POG) ₄ P-amide
Pep-E	(POG) ₃ PEG(POG) ₄ P-amide
Pep-D	(POG) ₄ PDG(POG) ₄ P-amide
Pep-K	(POG) ₄ PKG(POG) ₄ P-amide
Pep-R	(POG) ₃ PRG(POG) ₄ P-amide

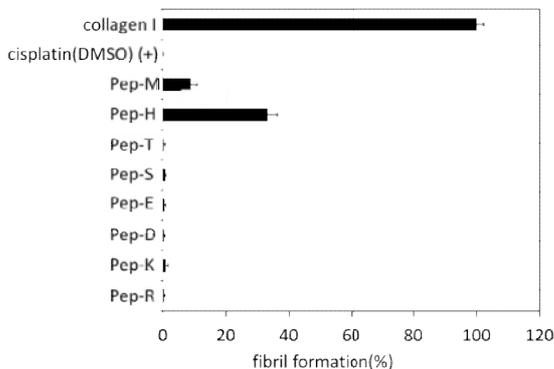


図 4. シスプラチン-DMSO 錯体の効果を中和するペプチドの探索

(3) 構造—活性相関研究：トランスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチンのようなプラチナ系抗がん剤について、シスプラチン同様にコラーゲン細線維形成阻害能を検討するとともに、ESI 質量分析によりそのスルフォキシド溶液中に含まれる錯体構造を解析した。その結果、シスプラチンと同じ様式の DMSO 錯体を形成していたトランスプラチンのみに、コラーゲン細線維化形成阻害能を検出した。このことから、活性本体は $[Pt(NH_3)_2(C1)(DMSO)]^+$ と考えられた [表 2]。

表 2. プラチナ錯体系抗がん剤の DMSO 溶液の ESI 質量分析結果と推定される錯体の構造

Compound	found mass [M+H] ⁺	Possible structure (calcd. mass)
(1)	343.00	 monoisotopic mass : 342.00 average mass : 342.73
	403.98	 monoisotopic mass : 402.99 average mass : 403.83
(2)	343.01	 monoisotopic mass : 342.00 average mass : 342.73
(3)	433.05	 monoisotopic mass : 432.03 average mass : 432.35
(4)	476.12	 monoisotopic mass : 475.07 average mass : 475.42

表中化合物：(1) シスプラチン、(2) トランスプラチン、(3) カルボプラチン、(4) オキサリプラチン

(4) 培養細胞を用いた薬効検定：シスプラチン-DMSO 錯体は、HUVEC 培養系においても I 型コラーゲン線維のディッシュへの沈着を阻害した [図 5]。抗コラーゲン抗体をもちいた蛍光像では、コントロール処理のコラーゲンが線維状に染色されているのに対して、シスプラチン-DMSO で処理した細胞の周りのコラーゲンはドット状に観察された。また、ウェスタンブロッティングによりコラーゲンタンパク質の量を比較したが、両者に差はなかった。よって、シスプラチン-DMSO による処理はコラーゲンの産生量には影響を与えず、正常な線維化のステップを阻害していることが、細胞レベルで示された。

また、さまざまな種類の培養細胞 (HeLa, Jurkat, KCL-22, THP-1, human dermal fibroblast) を用いて、シスプラチン-DMSO 錯体の細胞毒性を検討した。調べたすべての細胞で、コラーゲン細線維化阻害活性を発現する濃度域において細胞毒性は検出されなかった [図 6]。このことから、シスプラチンは、DMSO と錯体を形成することにより、コラーゲン細線維化阻害能を獲得すると同時に、その細胞毒性 (すなわち抗がん剤としての薬

理活性) を失うことが明らかになった。

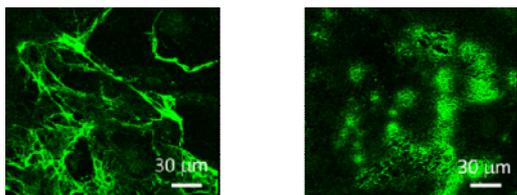


図5. HUVEC が分泌したコラーゲンの蛍光免疫染色。(左)無処理、(右)シスプラチン-DMSO (100 μM) 処理

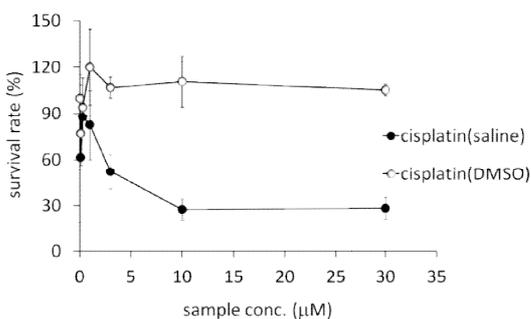


図6. HeLa 細胞に対するシスプラチンおよびそのDMSO 錯体の細胞毒性

(5) *in vivo* での予備的な薬効検討: マウス強皮症モデルでの予備的検討において望ましい薬効は検出されていない。その理由として薬物が他のタンパク質により中和されている可能性が考えられた。実際、シスプラチン-DMSO 錯体は、*in vitro* においてアミロイド-βペプチドの線維化(アミロイド化)を阻害し、アルブミン等他のタンパク質にも結合する。

(6) まとめと今後の展望: 本研究により、抗がん剤として使用されてきたシスプラチンがDMSO 錯体となることでコラーゲン細線維化阻害活性を発現し、同時に抗がん活性を失うことが示された。このメカニズムは以下のように説明できる。まずシスプラチンにDMSO が配位することにより陽イオン性の錯体が形成される。このDMSO 錯体はその電荷の存在により細胞に取り込まれにくくなっているものと推定される。

一方、コラーゲン3重らせん上のHisおよびMet 残基は、直接プラチナ原子に配位することで、強固に結合する。この際、配位子としてのDMSO はS 原子のトランス効果によるアンモニア配位子の易置換性を向上させているものと考えられる。プラチナとの結合によって、コラーゲン3重らせん構造は変性しないが、プラチナ錯体が結合していることにより、コラーゲン分子間での正常な側方的自己集合が妨げられたものと考えられる[図7]。

シスプラチン-DMSO 錯体は、他の生体分子(タンパク質)とも結合することから、このままの形では、薬物にはなりえないと考えられる。今後、より選択性の高い錯体の探索、あるいは投与形態の改変といった観点からの研究が必要である。

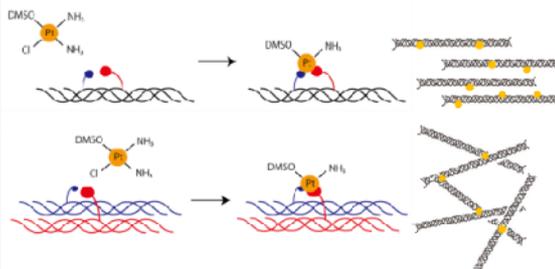


図7. シスプラチン-DMSO 錯体によるコラーゲン細線維化阻害の推定されるメカニズム

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)

[学会発表] (計1件)

全田未悠他「シスプラチン誘導体のコラーゲン産生阻害能とそのメカニズム」日本化学会第93春季年会、2013年3月23日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(草津市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.waseda.ac.jp/koide/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 隆規 (KOIDE TAKAKI)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号: 70322253

(2) 連携研究者

宇谷 厚志 (UTANI ATSUSHI)
長崎大学・医学部・教授
研究者番号: 10292707

安井 裕之 (YASUI HIROYUKI)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 20278443