

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07905

研究課題名(和文) 顕著な抗腫瘍効果を発揮する白金二核錯体を基盤とした創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery research based on dinuclear platinum complexes with markedly high antitumor activity

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体に標的指向性DDSキャリアまたはハロゲンを導入し、更なる薬効の向上および副作用の軽減を図った。その結果、非常に高い抗腫瘍効果および効果持続性を発揮する誘導体を見出すことが出来た。リード化合物はColon-26大腸がん皮下移植マウスに対して、白金製剤オキサリプラチンよりも遥かに有効な抗腫瘍効果を発揮した。また、腫瘍が大きく成長してから投与した場合においても高い効果を発揮し、その効果は単回(静脈内)投与後数週間持続した。これらのことから、テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体は、進行がんに奏功する有望な次世代白金製剤として、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：New tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes were designed and synthesized to combine with DDS carrier or to introduce halogen into the complexes. Our in vivo study using mice with a subcutaneous homograft of Colon-26 colorectal cancer cells indicates that the tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes are promising next-generation platinum-based drug candidates with markedly high and long-lasting antitumor efficacy. Indeed, the tumour growth in mice treated with the lead compound was much slower than that in mice treated with platinum-based drug oxaliplatin, which is used for the treatment of colorectal cancer. Even more remarkable, the lead compound exhibited high tumor-reduction effects against large-sized tumours, which sustained for a few weeks after a single intravenous dose of the compound.

研究分野：生物無機化学

キーワード：白金錯体 制がん剤 DDS 創薬 難治性がん 白金製剤

1. 研究開始当初の背景

白金製剤シスプラチン (図1 上段) は、臨床使用が始まってから 40 年近く経過した現在においても、がん化学療法には欠かせない薬剤であり、第二、第三世代の白金製剤カルボプラチン、オキサリプラチン (図1 上段) も、非常に重要ながん治療薬として臨床使用されている。ただし、近年においては、単なるシスプラチン誘導体では、既存の薬剤を置き換えるほど有効な臨床的利点は得られない、という見解が主流である。つまり、白金錯体の切れ味鋭い腫瘍縮小効果を利用して新たな適応を開拓するには、既存の白金製剤とは基本骨格が大きく異なる白金錯体の分子設計が不可欠であると考えられる。研究代表者らは、テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体 5-H-Y (図1 下段左) が有望な次世代白金製剤候補化合物であることを見出した。5-H-Y は化学療法が奏功し難い膵がんやメラノーマに対して、それぞれの第一選択薬よりも高い *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮したので、テトラゾール 5 位に様々な官能基を導入した一連の 5-H-Y 誘導体 (図1 下段右) を合成した。

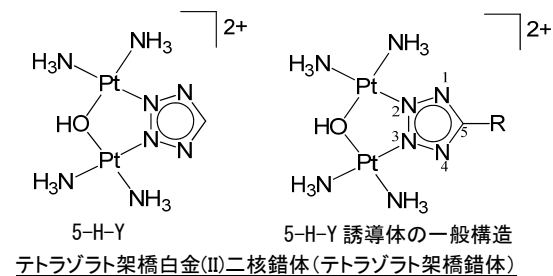
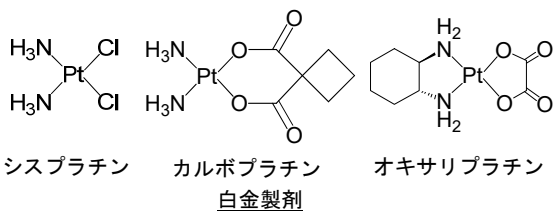


図1 白金製剤 (上段) とテトラゾラト架橋錯体 (下段) の構造

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん患者の Quality of Life (QOL) を大幅に向上しうる次世代がん治療薬を創出することである。本錯体の化学構造は、次世代がん治療薬として非常に有望な基本骨格であると考えられる。現在までに一連のテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体を 20 種以上合成し、その創薬基盤を構築した。本研究では、これらの制がん白金錯体について、スクリーニングを進めるとともに、標的指向性 DDS キャリアである葉酸修飾 β -シクロデキストリン (図2、FACD) を導入し、葉酸受容体を過剰発現している腫瘍への選択的送達を図る。また、医薬品候補化合物にフッ素を導入することで、薬効及び副作用の程度が有意に変化することが報告されていることから、フッ素を導入した構造最適化も行う。

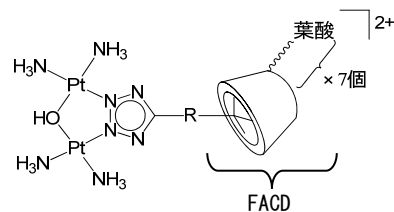


図2 テトラゾラト架橋錯体と葉酸修飾 β -シクロデキストリン (FACD) を組み合わせたテトラゾラト架橋錯体-FACD 複合体。

3. 研究の方法

(1) 新規テトラゾラト架橋錯体の合成

β -シクロデキストリンはアダマンタンを強く包接するので、分子の末端にアダマンタンを導入し、がん細胞内で加水分解を受けて活性体とするために、アダマンタンとテトラゾールの間にエステル基を導入した (図3、エステル A 型 (SK36-39) および B 型錯体 (SK40-42))。これらの化合物の抗腫瘍効果は、構造中のエステル基の加水分解の受け易さと受け難さに影響されると推定されるので、図3の *a, b* および *c, d* で示されるエステル基両端のメチレン基数が異なる誘導体を合成して効果を比較した。また、フッ素導入錯体として、テトラゾール 5 位にフルオロメチル基を導入した錯体 (図3、フルオロメチル型錯体 (5-MF₁₋₃)) を三種類合成し、フッ素数と薬効の関連を調べた。

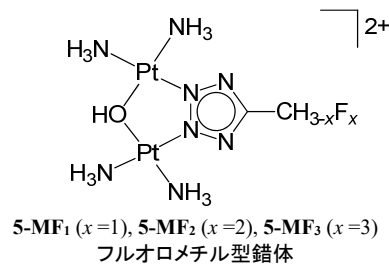
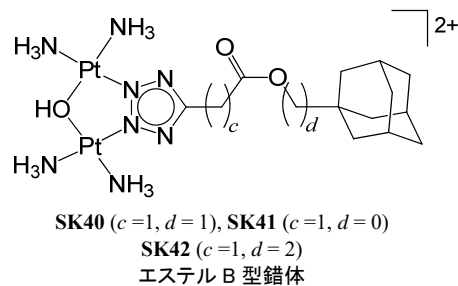
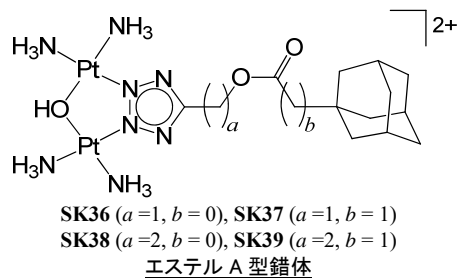


図3 本研究で合成されたテトラゾラト架橋錯体。

(2) *in vivo* 抗腫瘍効果

FACD の効果を見極めるために、葉酸受容体を過剰発現していること知られる Colon-26 マウス大腸がん細胞移植マウス (Balb/c マウス 5-6 匹/群) を用いて検討を行った。大腸がん治療薬である白金製剤オキサリプラチン (陽性対照)、5-H-Y および SK36-42 について、それぞれの白金錯体の 5% グルコース溶液および白金錯体と FACD をモル比 1 : 1 で混合した 5% グルコース溶液を調製した。白金錯体の投与量が 10 mg/kg になるようにそれぞれの溶液をマウスに静脈内投与し、マウスの腫瘍体積を計測し、各投与群の *in vivo* 抗腫瘍効果を明らかにした。また、同様の *in vivo* 実験をフルオロメチル型錯体にも適用し、構造活性相関を構築した。さらに、進行がんに対する活性を推定する目的で、腫瘍を取って増殖させてからリード化合物を投与し、その抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 新規テトラゾラト架橋錯体の合成

新規合成された錯体は、 ^1H 、 ^{13}C および ^{195}Pt NMR および質量分析により帰属された。それぞれの化合物の収率を表 1 に示した。

表 1 本研究で新規合成されたテトラゾラト架橋錯体の収率 (%)。

エステル A 型錯体	収率 (%)	エステル B 型錯体	収率 (%)	フッ素導入錯体	収率 (%)
SK36	19.3	SK40	35.5	5-MF ₁	28.2
SK37	19.3	SK41	43.3	5-MF ₂	15.3
SK38	15.5	SK42	23.6	5-MF ₃	21.7
SK39	24.5				

(2) *in vivo* 抗腫瘍効果

図 4 に投与後の腫瘍体積経過 (A, B) および投与 30 日後の腫瘍増殖抑制率 (C) を示した。全てのマウスは生存しており、全ての投与群において、マウスの有意な体重減少は見られなかった。腫瘍増殖抑制率が特に高かったのはエステル A 型錯体の SK38 および SK36 (ともに単独投与) で、それぞれの腫瘍増殖抑制率は 99.8% および 69.1% であった。一方、これらの錯体の FACD 複合体投与群では、腫瘍増殖抑制率が大幅に減少した。つまり、エステル A 型錯体は、FACD 複合体として投与するよりも、錯体単独で投与した方が、薬効が高くなるという結果が得られた。エステル B 型錯体 (SK40-42) では、単独投与群よりも FACD 複合体投与群で腫瘍増殖抑制率が增加する場合 (SK40 および 41) と、減少する場合 (SK42) に分かれた。FACD 複合体として投与した化合物群の腫瘍増殖抑制率は、陽性対照であるオキサリプラチンの場合と比較して特に低いわけではなく、概ね有効な腫瘍増殖抑制率を示したと判断できる。

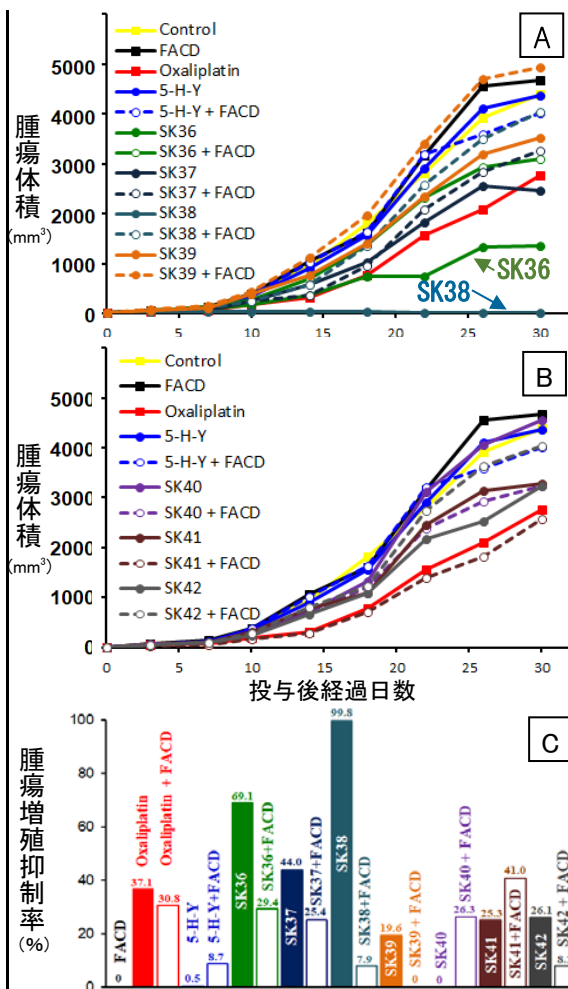


図 4 Colon-26 大腸がん細胞移植 Balb/c マウスへの白金錯体投与後の腫瘍体積経過 (A; SK36-39, B; SK40-42) および平均腫瘍増殖抑制率 (C)。

次に、フルオロメチル型錯体の抗腫瘍効果について調べた。フルオロメチル基の代わりに CH_3 をテトラゾール 5 位に導入したテトラゾラト架橋錯体 (5-Me) は、最も高い腫瘍増殖抑制活性を示したが、半数のマウスが投与後一週間で死亡した。一方、フルオロメチル型錯体投与群のマウスは、投与三週間後も全て生存していた。5-MF₁ および 5-MF₂ は、オキサリプラチンよりも高い活性を示し、5-MF₂ は 5-Me に匹敵する活性を発揮した。5-MF₃ 投与群においては、ほとんど効果が見られなかった。このように、フッ素原子の導入数によって、*in vivo* 活性が大きく変化した。

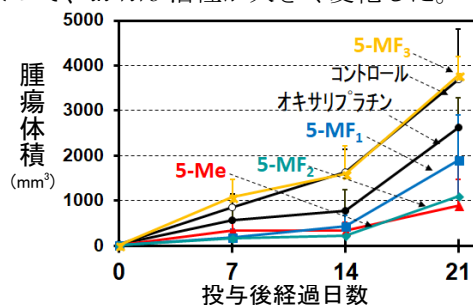


図 5 フルオロメチル型錯体、5-Me またはオキサリプラチン投与後の Colon-26 大腸がん細胞移植 Balb/c マウスの腫瘍体積経過。大腸がん移植一週間後に単回 (静脈内) 投与し、平均腫瘍体積 \pm SD ($n = 6$) を経時的に観察した。

高い腫瘍増殖抑制活性を發揮した SK36 および SK38 について、*in vivo* 実験を進めた結果、SK36 がより有効な腫瘍増殖抑制活性ならびに効果持続性を有することが分かった。そこで、colon-26 大腸がん移植後 7、14、21 日目に SK36 を一度だけ静脈内投与して、体積の大きい腫瘍に対しても同様に高い効果を發揮できるかを調べた。その結果、SK36 はオキサリプラチンよりも遥かに高い腫瘍増殖抑制活性を發揮し (図 6A、B)、腫瘍が大きく成長してから投与した場合においても高い効果を發揮した (図 6B、C)。また、非常に興味深いことに、単回 (静脈内) 投与後二週間以上の間、効果が持続した。

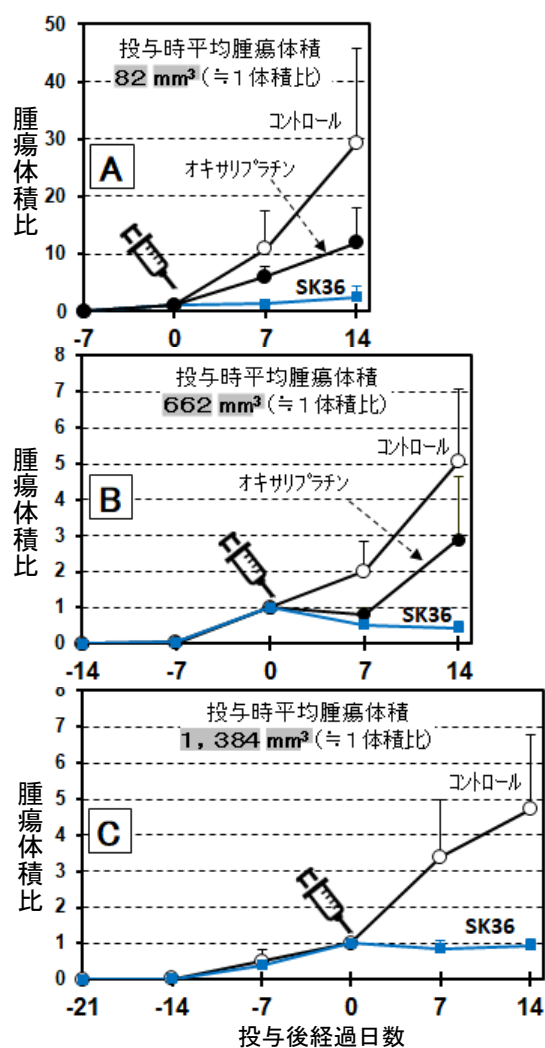


図6 リード化合物 SK36 またはオキサリプラチン投与後の Colon-26 大腸がん細胞移植 Balb/c マウスの腫瘍体積経過。Colon-26 大腸がん移植一週間後 (A)、二週間後 (B) および三週間後 (C) に単回 (静脈内) 投与し、平均腫瘍体積比 ± SD (n = 6) を経時的に観察した。

以上、主に新規テトラゾラト架橋錯体の *in vivo* 抗腫瘍効果について述べたが、その他にもテトラゾラト架橋錯体の生物学的活性および生体高分子との相互作用に関する、次の研究成果が得られた。

①白金製剤よりも遥かに多くがん細胞内に取り込まれる (異なる機構でがん細胞内に取

り込まれる)。
 ②新規錯体以外の誘導体にも非常に高い *in vivo* 抗腫瘍効果を發揮するものがある。
 ③非共有結合性および共有結合性の DNA 付加物を形成し、クロマチンを凝縮させる。
 ④静電的相互作用と水素結合を介して血清アルブミンと強く結合する。

本研究によって、更に有望なリード化合物が見出され、従来の白金製剤との差異も明らかになった。リード化合物の大腸がんに対する抗腫瘍効果は、大腸がん治療薬オキサリプラチンよりも遥かに高い。さらに、効果持続性も非常に高いことから、新たな白金製剤として臨床応用されれば、がん患者の QOL を大幅に改善できると考えられる。今後は、リード化合物の臨床試験導入を念頭に詳細な前臨床試験を行う予定である。

5. 主な発表論文等 [雑誌論文] (計 7 件)

① Uemura, M. and Komeda, S.
 Kinetic analysis of and platinum(II) migration in the reactions of tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with nucleotide
 J. Inorg. Biochem. (2017) 177, 359-367. 査読有
 DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.08.010

② Shimizu, Y.; Yoshikawa, Y.; Kenmotsu, T.; Komeda, S.; Yoshikawa, K.
 Conformational transition of DNA by dinuclear Pt(II) complexes causes cooperative inhibition of gene expression
 Chem. Phys. Lett. (2017) 678, 123-129. 査読有
 DOI: 10.1016/j.cplett.2017.04.039

③ Komeda, S.; Yoneyama, H.; Uemura, M.; Muramatsu, A.; Okamoto, N.; Konishi, H.; Takahashi, H.; Takagi, A.; Fukuda, W.; Imanaka, T.; Kanbe, T.; Harusawa, S.; Yoshikawa, Y.; Yoshikawa, K.
 Specific conformational change in giant DNA caused by anticancer tetrazolatobridged dinuclear Pt(II) complexes: Middle-length alkyl substituents exhibit minimum Effect
 Inorg. Chem. (2017) 56, 802-811. 査読有
 DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b02239

④ Komeda, S.; Qu, Y.; Mangrum, J. B.; Hegmans, A.; Williams, L. D.; Farrell, N. P.
 The phosphate clamp as recognition motif in platinum-DNA interactions
 Inorg. Chim. Acta (2016) 81, 2399-2404. 査読有
 DOI: 10.1016/j.ica.2016.04.052

⑤ Imai R, Komeda S.; Shimura M.; Tamura S., Matsuyama S.; Nishimura K.; Rogge R.; Matsunaga A.; Hiratani I.; Takata H.; Uemura M.; Iida Y.; Yoshikawa Y.; Hansen J. C.; Yamauchi K.; Kanemaki M. T.; Maeshima K.

Chromatin folding and DNA replication inhibition mediated by a highly antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complex
Scientific Reports (2016) 24712. 査読有
DOI: 10.1038/srep24712

⑥ Uemura M.; Hoshiyama M.; Furukawa A.; Sato T.; Higuchi Y.; Komeda S.
Highly efficient uptake into cisplatin-resistant cells and the isomerization upon coordinative DNA binding of anticancer tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes
Metallomics (2015) 7, 1488-1496. 査読有
DOI: 10.1039/c5mt00174a

⑦ 植村雅子, 米田誠治
白金制がん剤の今とこれから
Biomed. Res. Trace Elements (2015) 26, 157-165.
査読有
DOI: 10.11299/brte.26.157

[学会発表] (計 18 件)

① 植村雅子, 米山弘樹, 春沢信哉, 米田誠治
メチル基を有するテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の DNA との相互作用および細胞内取り込みにおけるフッ素導入効果の検討
日本薬学会 第 138 年会 金沢市 20180325-20180328

② Komeda, S. (招待講演)
Antitumor evaluation and DNA-binding property of tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes
12th International Symposium on Platinum Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy (国際学会) オーストラリア シドニー 20171210-20171214

③ Uemura, M.; Yoneyama, H.; Harusawa, S.; Komeda, S.
DNA interactions and structure-activity relationship of tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with methyl and fluoromethyl group
12th International Symposium on Platinum Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy (国際学会) オーストラリア シドニー 20171210-20171214

④ 米田 誠治 (依頼講演)
顕著な in vivo 抗腫瘍効果を発揮するテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体
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 2017 鈴鹿市 20171126-20171126

⑤ 植村雅子, 米山弘樹, 岡本直人, 村松 晃, 福田青郎, 小西宏明, 高木 陽光, 松崎 健, 春沢信哉, 吉川祐子, 今中忠行, 吉川研一, 米

田誠治
制がん白金(II)二核錯体の DNA 凝縮能および細胞内取り込みに関する研究
第 63 回日本薬学会東海支部 総会・大会 岐阜市 20170708-20170708

⑥ Komeda, S.; Uemura, M.; Hiramoto, K.; Yoshikawa, Y.; Yoshikawa, K.; Yoneyama, H.; Harusawa, S.
Structure-activity relationships, DNA compaction efficiencies and intracellular accumulations on anticancer-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes
14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会) フランス トゥールーズ 20170606-20170607

⑦ Uemura, M.; Yoneyama, H.; Sakazaki, T.; Nagae, N.; Koisaka, A.; Harusawa, S.; Komeda, S.
DNA interaction and structure-activity relationship of tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with fluoromethyl group
第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 東京 20160616-20160617

⑧ 植村 雅子, 米田 誠治, 吉川 研一, 吉川 祐子, 春沢 信哉, 米山 弘樹
顕著な抗腫瘍効果を有する白金(II)二核錯体のユニークな作用機構
日本薬学会 第 137 年会 仙台市 20170324-20170327

⑨ Shimizu, Y.; Yoshikawa, Y.; Uemura, M.; Kenmotsu, T.; Komeda, S.; Yoshikawa, K.
Significant effect of dinuclear Pt(II) complexes on the higher-order structure of genomic DNA
8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会) ニュージーランド オークランド 20161204-20161209

⑩ Komeda, S. (招待講演)
Structure-activity relationships and DNA compaction efficiencies of anticancer tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes
8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会) ニュージーランド オークランド 20161204-20161209

⑪ Uemura, M.; Komeda, S.
Covalent interaction of anticancer azolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with nucleotide and double-helical DNA
第 26 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 札幌市 20160616-20160617

⑫ Komeda, S.; Uemura, M.; Yoneyama, H.; Muramatsu, A.; Okamoto, N.; Harusawa, S.;

Yoshikawa, Y.; Yoshikawa, K.
Biological efficiency of anticancer tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with different length of alkyl substituent in relation to the structural effect of DNA

第 26 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 札幌市 20160616-20160617

⑬米田誠治, 植村雅子, 米山弘樹, 岡本直人, 村松 晃, 福田青郎, 小西宏明, 高木陽光, 松崎 健, 春沢信哉, 吉川祐子, 今中忠行, 吉川研一

長短鎖アルキル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込および DNA 凝縮能

日本薬学会 第 136 年会横浜市 20160326-20160329

⑭Komeda, S.

Azolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with markedly high *in vivo* antitumor efficacy against pancreatic cancer and unique *in vitro* cytotoxicity profiles

1st International Symposium on Clinical and Experimental Metallodrugs in Medicine: Cancer Chemotherapy (国際学会) 米国ハワイ州 20151213-20151215

⑮Uemura, M.; Yoneyama, H.; Yoshikawa, T.; Tsuchiya, T.; Hoshiyama, M.; Sato, T.; Yoshikawa, K.; Harusawa, S.; Komeda, S.

Cellular uptake and DNA compaction of anticancer tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with various substituents at tetrazole C5

1st International Symposium on Clinical and Experimental Metallodrugs in Medicine: Cancer Chemotherapy (国際学会) 米国ハワイ州 20151213-20151215

⑯米田誠治 (依頼講演)

遷移金属二核錯体を用いた次世代制がん剤の開発

三重大学・鈴鹿医療科学大学 合同産学官交流フォーラム 津市 20151009-20151009

⑰Shimizu, Y; Yoshikawa, Y; Tsuchiya, T; Hiroki Yoneyama, H; Harusawa, S; Komeda, S; Imanaka, T; Kenmotsu, T; Yoshikawa, K.

Action of novel anticancer-active, dinuclear platinum complexes with ester group on the higher order structure and genomic activity of DNA

第 53 回生物物理学会 (国際学会) 金沢市 20150913-20150915

⑱Uemura, M.; Yoneyama, H.; Yoshikawa, Y; Tsuchiya, T.; Hoshiyama, M.; Sato, T.; Yoshikawa, K.; Harusawa, S.; Komeda, S.

Cellular uptake and DNA compaction of anticancer tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with various substituents at tetrazole C5

第 25 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 長崎市 20150530-20150531

〔図書〕 (計 1 件)

①能田 均、萩中 淳、山口政俊、水野 初、本間 浩、米田誠治、山下幸和、北村陽二、黒沢隆夫、明樂一己、藤岡稔弘、石濱 泰、大江知行、眞野成康、吉田秀幸 巴山 忠、寺西正憲、金田典雄、畑中保丸、友廣岳則他 パートナー分析化学 II 改訂第 3 版 南江堂

〔産業財産権〕 取得状況 (計 3 件)

名称 : Platinum complex compound and utilization of the same

発明者 : Komeda, S.; Chikuma, M.

種類 : 特許権

査定国 (番号, 取得年) :

インド (276300, 2016)

カナダ (2712408, 2015)

韓国 (10-1566568, 2015)

〔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 : 6 0 4 2 5 0 5 6

(2) 研究分担者

植村 雅子 (UEMURA, Masako)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号 : 7 0 5 1 1 9 9 7

(3) 連携研究者

平本 恵一 (HIRAMOTO, Keiichi)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号 : 9 0 2 5 1 7 9 3

春沢 信哉 (HARUSAWA, Shinya)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 9 0 1 6 7 6 0 1

米山 弘樹 (YONEYAMA, Hiroki)

大阪薬科大学・薬学部・助教

研究者番号 : 9 0 6 2 7 0 0 1

吉川 祐子 (YOSHIKAWA, Yuko)

同志社大学・生命医科学部・嘱託講師

研究者番号 : 8 0 2 9 1 8 7 1