

令和元年6月17日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15436

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とする白金二核錯体のスクリーニング研究

研究課題名(英文) Screening for cancer stem cell-targeted dinuclear platinum(II) complex

研究代表者

植村 雅子 (Uemura, Masako)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：70511997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がんの再発・転移に、がん幹細胞が関与している可能性が示されている。本研究では、大腸がんに対して *in vivo* 抗腫瘍効果を有する一連のテトラゾラト架橋錯体を用いて、大腸がん幹細胞に対する増殖抑制活性を評価した。その結果、フルオロメチル基を有するテトラゾラト架橋錯体において、がん幹細胞塊のサイズおよび形成数が減少したことから、がん幹細胞の増殖を抑制する可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*in vivo* 抗腫瘍効果が認められている白金錯体について、がん幹細胞に対する *in vitro* 細胞増殖抑制活性も示す可能性が示唆されたことは、非常に興味深い。また、この結果は、テトラゾラト架橋錯体の有効性を裏付ける作用機序を明らかにする上で重要な知見であり、テトラゾラト架橋錯体の更なる構造最適化に役立てることができ。従って、本研究の成果は、臨床におけるニーズに応える次世代白金制がん剤の設計に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cell (CSC) concept, that CSC is concerned in cancer relapse and metastasis, has emerged in recent years. We have developed a series of tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes (tetrazolato-bridged complexes) which has been reported to exert *in vivo* antitumor efficacy on mouse colorectal cancer. In this research, we performed *in vitro* cytotoxicity study of tetrazolato-bridged complexes on CSC of human colorectal cancer. Among them, tetrazolato-bridged complexes with fluoromethyl group decreased sizes and numbers of CSC sphere, suggesting that they could show cytotoxicity on CSCs as well. These results would contribute to a development of tetrazolato-bridged complexes and a next generation platinum anti-cancer drug.

研究分野：生命錯体化学

キーワード：白金錯体 次世代白金制がん剤 大腸がん がん幹細胞 グルタチオン

## 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の投与による耐性がんの出現が、臨床的な問題となっている。白金制がん剤は、細胞内に取り込まれ、DNA 付加物を形成することによって、活性を発揮すると考えられている。そのため、シスプラチン耐性がんでは、細胞内薬剤量の減少、DNA 修復機構の亢進、解毒機構の亢進(主に還元型グルタチオン(GSH)濃度の増加)が認められている。また、近年、耐性がんやがんの転移には、がん幹細胞が関与していることが注目されている。次世代白金制がん剤には、これらの耐性機構を克服し、がん幹細胞にも有効であることが期待されている。

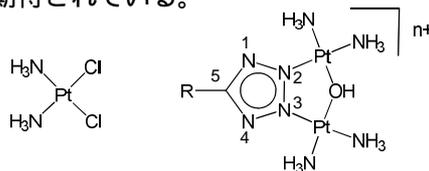


図1 シスプラチン(左)とテトラゾラト架橋錯体(右)の構造

Komeda らによって分子設計された一連のテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体(以下、テトラゾラト架橋錯体、図1右)は、化学療法での治療が難しい膵がんに対して顕著な *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮する [1]。ごく最近、テトラゾラト架橋錯体の誘導体の1つが、大腸がんに対してオキサリプラチン(大腸がん治療薬)よりもはるかに優れた *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮することが分かった(未発表)。一方で、その作用機序については不明な点も多い。今後の開発に向け、作用機序の解明は急務であり、より優れた医薬品候補化合物の分子設計に繋がると考えられる。

一連のテトラゾラト架橋錯体は、様々なシスプラチン耐性細胞に対して高い *in vitro* 細胞増殖抑制活性を示す [2, 3]。これは、テトラゾラト架橋錯体が、(i) 耐性細胞においてシスプラチンよりもはるかに多く細胞内に蓄積されることや[3]、(ii) DNA 修復を受けにくいDNA 付加物を形成することに起因することが明らかにされている[4]。従って、テトラゾラト架橋錯体は、上述したシスプラチン耐性機構 ~ のうち、少なくとも および を克服していると言える。また、テトラゾラト架橋錯体の脱離配位子(OH 架橋)が安定であるため、生体分子との反応性は、従来の白金制がん剤のそれよりもはるかに低い [2, 3, 5]。これらのことから、テトラゾラト架橋錯体は を克服する、つまり、GSH による解毒を受けにくいことも推測される。がん幹細胞では、細胞内 GSH 濃度を調整する細胞膜抗原 CD44 が高発現しており、細胞内 GSH 濃度が特に高いことが報告されている。従って、テトラゾラト架橋錯体は、耐性がんにも、がん幹細胞にも効果を発揮することが期待される。

[1] Komeda S, Chikuma M et al., *Metallomics*, 2013. [2] Uemura M, Komeda S et al., *Metallomics*, 2012. [3] Uemura M, Komeda S et al., *Metallomics*, 2015. [4] Mlcouskova J, Komeda S, Brabec V et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012. [5] Imai R, Komeda S, Uemura M, Maeshima K et al., *Scientific Reports*, 2016

## 2. 研究の目的

本研究では、シスプラチン耐性がんだけでなく、がん幹細胞にも有効な白金制がん剤の創出に必要な知見を得るために、テトラゾラト架橋錯体の「GSH との反応性」および「がん幹細胞に対する *in vitro* 細胞増殖抑制活性」を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 還元型グルタチオン(GSH)との反応

Ishikawa らの報告 [JBC 1993 268(27), 20116-25] と同様に、シスプラチンおよびテトラゾラト架橋錯体と一当量の GSH をリン酸緩衝生理食塩水中で反応させ、その経時変化を紫外吸収スペクトル測定(200~400 nm)によって観察した。さらに詳細な解析を行うため、テトラゾラト架橋錯体(2 mM)と一当量または二当量の GSH(2 mM または 4 mM)を、生理的条件下(120 mM NaCl および 2.7 mM KCl を含む重水素化リン酸バッファー(100 mM pD 7.4))で反応させ、<sup>1</sup>H-NMR を用いて経時的に観察した。

### (2) 細胞内 GSH 濃度の細胞生存率への影響の解明に関する検討

HCT116 ヒト大腸がん細胞において、細胞内の GSH 濃度が高い細胞(GSH-rich 細胞)および低い細胞(GSH-poor 細胞)を得るための条件検討を行った。GSH-rich 細胞については、HCT116 細胞におけるシスタチオン β 合成酵素(CBS)遺伝子のノックダウンを試みた。6 well プレートに HCT116 細胞を播種し(4 × 10<sup>4</sup> cells/well)、Lipofectamine<sup>®</sup>を用いたトランスフェクションによって Dharmacon<sup>™</sup> siRNA(CBS 標的 siRNA およびネガティブコントロール(Non-targeting siRNA)、100 pmol/well)を導入した。CBS 遺伝子のノックダウン効率は、ウェスタンブロッティングによって確認した。GSH-poor 細胞は、HCT116 細胞にグルタチオン合成阻害剤 Buthionine sulphoximine (BSO)を、終濃度 500 μM で作用させることによって得た。GSH-rich

細胞および GSH-poor 細胞における細胞内 GSH の定量は、Enzymatic Recycling Method [Nature Protocols 2006 1(6), 3159-65] によって行った。

### (3) がん幹細胞に対する *in vitro* 細胞増殖抑制活性

ヒト大腸がん幹細胞 Enriched Colorectal Cancer Stem Cell Form HCT116 (HCT116-CSC 細胞、ProMab Biotechnologies 社) を用いて、シスプラチン、オキサリプラチンおよび 6 種類のテトラゾラト架橋錯体の *in vitro* 細胞毒性を評価した。培養は、同社から提供されている Technical Information に従い、がん幹細胞用培養液 Cancer Stem Premium™ 中で、37°C および 5% CO<sub>2</sub> を含む加湿空気下において行った。細胞塊にトリプシンを添加し、分離した細胞を Corning 社の超低接着表面 6well プレートに播種して、二日ごとに culture volume の 10% 量の培養液を追加しながら七日間培養した。この継代および培養操作を合計三回繰り返した。最終的に  $1.5 \times 10^4$  cell/well となるように調整した細胞を、超低接着表面 6well プレートに播種し、各錯体 (1 あるいは 5  $\mu$ M) を合計 144 時間暴露した (n = 3)。回収した細胞は crystal violet で染色し、顕微鏡下で細胞塊の大きさと数を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 還元型グルタチオン(GSH)との反応

本条件下において、シスプラチンは二当量の GSH と反応し共有結合性付加物を形成する。その結果、反応溶液は透明な黄色へ変化し、それに伴って 280 nm 付近の吸光度が徐々に上昇することが報告されている。本実験においても、同様の結果が得られた。一方で、テトラゾラト架橋錯体と GSH の反応においては、反応開始から約 1 時間後に、吸収極大波長が 250 ~ 255 nm 付近から 245 nm 付近へ変化した。この結果は、テトラゾラト架橋錯体自身の陽電荷に起因する静電的相互作用によって GSH と相互作用したことによって生じる可能性が考えられた。また、10 時間後において、吸光度の大幅な減少が確認されたが、この変化に寄与する相互作用は特定できなかった。これ以降、吸収スペクトルは、ほとんど変化しなかった。さらに詳細な解析を行うため、<sup>1</sup>H-NMR を用いて経時観察を行った (図 2)。未反応のテトラゾラト架橋錯体のテトラゾール 5 位の水素由来のピーク (H5) は 8.68 ppm 付近に出現し、反応経過とともに 9.03 ppm 付近に生成物由来の新たなピーク (H5') が出現した。一当量の GSH と反応させた場合 (図 2 左) 反応時間 1 時間で、H5 と H5' の相対強度比は約 1 : 1 となり、それ以降、ほとんど変化は見られなかった。二当量の GSH と反応させた場合 (図 2 右)、反応開始時点で静電的相互作用に由来すると考えられるピーク (H5'') も観察された。反応開始から 3 時間後には、H5 および H5'' の両ピークはほとんど消失し、5 時間後には生成物由来のピークのみが観察された。このことから、テトラゾラト架橋錯体は、二当量の GSH と共有結合性の付加物を形成することが示唆された。また、その半減期は 1 時間を下回ることが分かった。

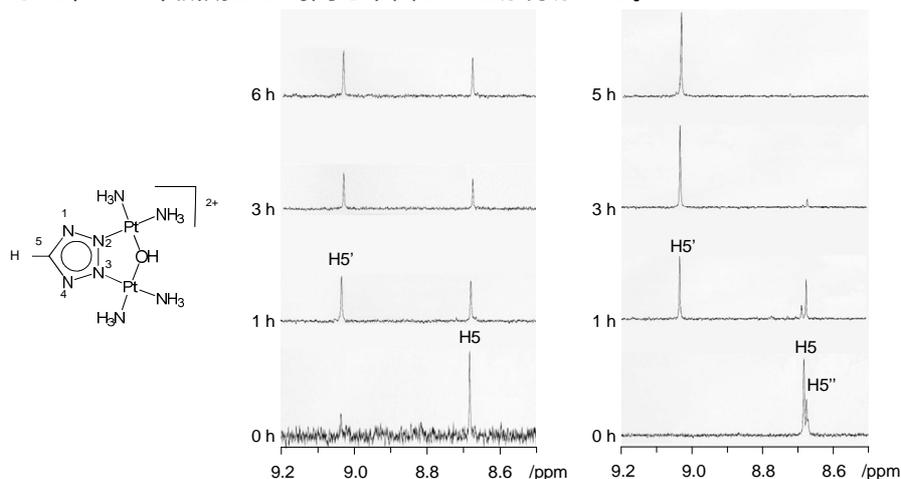


図 2 一当量 (左) および二当量 (右) の GSH とテトラゾラト架橋錯体の反応における <sup>1</sup>H-NMR スペクトル変化

### (2) 細胞内 GSH 濃度の細胞生存率への影響の解明に関する検討

CBS は、メチオニン代謝における中間生成物ホモシステインの代謝酵素である。CBS を欠失させることにより、再メチル化代謝を制御することができる。その結果、NADPH が増加して、グルタチオンの還元が活発になり、細胞内 GSH 濃度が増えることが報告されている [Nature Communications 2014 DOI: 10.1038/ncomms4480]。HCT116 細胞に CBS 標的 siRNA を導入したところ、siRNA 導入から 24 あるいは 48 時間後において、ノックダウン効率は 30 ~ 60% であった。siRNA 導入から 24、36.5、48 時間後の細胞内 GSH 量を定量した結果は、図 3 左に示す通りであった。トランスフェクションから 48 時間後における細胞内 GSH 濃度は、ネガティブコントロールと比較して約 1.5 倍高くなっていた。しかし、再現性について十分な結果が得られなかったため、GSH-rich 細胞を得るための条件検討を引き続き行う必要がある。

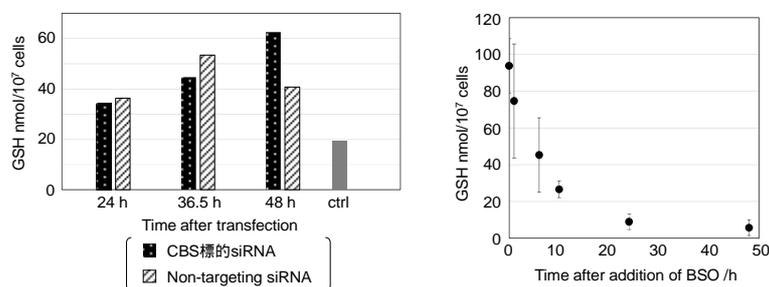


図3 siRNA (左) および BSO (右) 添加後の細胞内 GSH

一方、HCT116 細胞に BSO を作用させ、細胞内 GSH 濃度を定量したところ、図 3 右に示すような結果が得られた。BSO 添加から 24 および 48 時間後の GSH 量はコントロールと比較して、それぞれ約 1/10 および 1/20 であったことから、細胞内 GSH 量が十分低い GSH-poor 細胞を得るための条件を明らかにすることができた。今後、この条件下で細胞増殖抑制活性試験を行い、細胞内 GSH 濃度の細胞生存率への影響を明らかにする予定である。

### (3) がん幹細胞に対する *in vitro* 細胞増殖抑制活性

HCT116-CSC 細胞は、HCT116 細胞中の大腸がん幹細胞マーカー高発現細胞を集めた細胞群で、少なくとも継代数三回までは幹細胞性が維持される [ProMab Biotechnologies 社提供 Technical Information]。HCT116-CSC 細胞を培養したところ、図 4 左のような細胞塊を多数確認することができた。シスプラチン、オキサリプラチンおよび 6 種類のテトラゾラト架橋錯体を、終濃度 1 あるいは 5  $\mu\text{M}$  で合計 144 時間暴露したところ ( $n=3$ )、図 4 右に示すように、暴露した錯体とその濃度によって細胞塊のサイズと数に変化が見られた (グラフは一部省略)。特に、テトラゾール 5 位にフルオロメチル基を導入した錯体 (MFM、DFM、TFM) において、より高濃度の錯体の暴露によって細胞塊数が減少しており、さらに、その数はコントロールと比較して、53~62%まで抑制されていた。この結果から、MFM、DFM、TFM は、がん幹細胞に対する増殖抑制活性を有している可能性が示唆された。

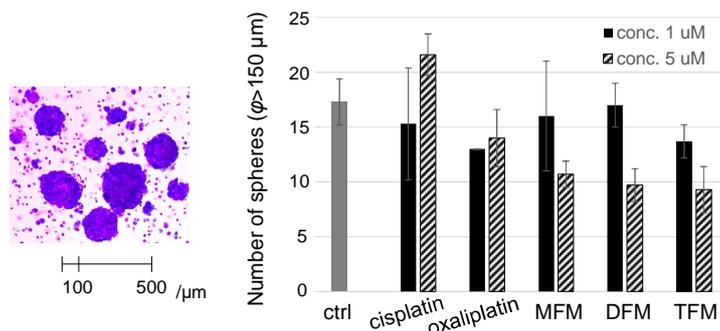


図4 HCT116-CSC 細胞の細胞塊像 (左) と白金錯体添加による細胞塊のサイズおよび数の変化 (右)

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Komeda S., Yoneyama H., Uemura M., Tsuchiya T., Hoshiyama M., Sakazaki T., Hiramoto K., Harusawa S.  
Synthesis and Structure-activity Relationships of Tetrazolato-bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes: A Small Modification at Tetrazole C5 Markedly Influences the In Vivo Antitumor Efficacy  
Journal of Inorganic Biochemistry, **2019**, 192, 82-86 DOI 10.1016/j.jinorgbio.2018.12.009 査読有
- (2) Komeda S., Uemura M., Yoneyama H., Harusawa S., Hiramoto K.  
In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Antitumor Efficacy of Tetrazolato-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes with a Bulky Substituent at Tetrazole C5  
Inorganics, **2019**, 7(1), 5 DOI 10.3390/inorganics7010005 査読有
- (3) Uemura M., Komeda S.  
Kinetic analysis of and platinum(II) migration in the reactions of tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with nucleotides.  
Journal of Inorganic Biochemistry, **2017**, 177, 359-367 DOI 10.1016/j.jinorgbio.2017.08.010. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

(1) 植村雅子、平本恵一、米山弘樹、春沢信哉、米田誠治  
テトラゾール5位にかさ高い置換基を導入したテトラゾラト架橋錯体の *in vitro* 細胞毒性と *in vivo* 抗腫瘍効果  
日本薬学会第139回年会  
2019年3月20~23日、千葉

(2) Uemura, M.; Komeda, S.  
DNA interaction and cellular uptake study of highly antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes.  
43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC2018) (国際学会)  
2018年7月30日~8月4日、Miyagi

(3) 植村雅子、米田誠治  
含フッ素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がん細胞増殖抑制活性  
第64回日本薬学会東海支部総会・大会  
2018年6月30日、愛知

(4) 米田誠治、植村雅子、平本恵一、米山弘樹、春沢信哉  
テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の *in vitro* 細胞毒性と *in vivo* 抗腫瘍効果  
第27回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2018)  
2018年6月29、30日、宮城

(5) 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回年会  
2018年3月25~28日、愛知

(6) Uemura M., 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 (ISPC2017) (国際学会)  
2017年12月10~14日、Australia

(7) 植村雅子、吉川祐子、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  
2017年7月8日、愛知

(8) 植村雅子、米山弘樹、坂崎智哉、長江紀樹、小井阪あゆみ、春沢信哉、米田誠治  
フルオロ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構造活性相関  
第27回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2017)  
2017年6月16、17日、東京

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 米田 誠治

ローマ字氏名: Komeda Seiji