

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07018

研究課題名(和文) 顕著な抗腫瘍効果と優れた効果持続性を兼ね備えた次世代白金製剤の創出

研究課題名(英文) Development of a next-generation platinum-based drug with a markedly high and long-lasting antitumor efficacy

研究代表者

米田 誠治 (Komeda, Seiji)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60425056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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SK36には、オキサリプラチンと同様に免疫賦活作用が存在するのではないかと推定した。免疫応答性および免疫不全の担がんマウスにオキサリプラチンまたはSK36を投与して腫瘍体積を経時的に観察した結果、免疫応答性マウス群ではSK36およびオキサリプラチン投与による有意な腫瘍増殖抑制が認められ、免疫不全マウス群では腫瘍の増殖抑制は観測されなかった。つまり、SK36やオキサリプラチンの抗腫瘍効果には免疫賦活作用が関連していることが示唆された。SK36の抗腫瘍効果はオキサリプラチンよりも遥かに高く、SK36が有望な次世代白金製剤候補化合物であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、単なる白金製剤類似化合物を合成して薬効を評価するだけの創薬研究ではなく、「型破りな」白金錯体の特性を有効利用し、大幅な薬効の向上と副作用の軽減および作用機序の解明を目的とするものである。研究代表者らによる実験結果から提案された免疫賦活作用は、がん治療に極めて重要な役割を担っており、この免疫賦活作用機序の詳細を明らかにすることで、本医薬品開発研究が加速するのはもちろんのこと、免疫を利用した新たな創薬研究の発展に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：We presumed that SK36, the lead compound of tetrazolato-bridged complexes, might have an immunostimulatory effect similar to oxaliplatin, in addition to its cell-killing effect targeting DNA. We monitored antitumor efficacy by administration of oxaliplatin and SK36 on C26 colon cancer transplanted immunocompetent mice and immunodeficient mice. As a result, significant suppression of tumor growth was observed by administration of SK36 and oxaliplatin in the immunocompetent mouse group. On the other hand, administration of these drugs to immunodeficient mice did not suppress tumor-growth, and there was no significant difference in tumor volume from the control group. Therefore, it was suggested that the tumor-growth inhibition of SK36 and oxaliplatin is related to their immunostimulatory effects. The antitumor efficacy of SK36 was found to be much higher than oxaliplatin, confirming that the tetrazolate bridged complexes are promising candidate for next-generation platinum-based drugs.

研究分野：無機医薬品化学

キーワード：シスプラチン 白金製剤 DNA 免疫 白金錯体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは致死率が非常に高い疾患で、世界の死因の第1位はがんである。シスプラチンに代表される白金製剤(図1左)は、核DNAに結合してDNA複製を阻害し、腫瘍の増殖を抑制する。その抗腫瘍効果は非常に高く、承認後40年が経過した現在においても、シスプラチンは化学療法に不可欠な薬剤である。後に開発されたオキサリプラチンも、切除不能な大腸がんに対する重要な治療薬として臨床使用されている。研究代表者らは、従来の白金製剤とは基本構造が大きく異なるテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体(テトラゾラト架橋錯体、図1右)を分子設計し、これらが非常に有望な医薬品候補化合物であることを見出した。



図1 臨床使用されている白金製剤(左2つ)および次世代白金製剤候補化合物のテトラゾラト架橋錯体(右2つ)の一般構造式とリード化合物。

リード化合物であるSK36(図1右端)は、有意なマウスの体重減少を来すことなく、colon-26大腸がん移植マウスに対してオキサリプラチンよりも遥かに高い抗腫瘍効果を発揮し(図2A, B, D) 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た(図2B)。また、非常に興味深いことに、単回(静脈内)投与後に効果が数週間持続した(図2A)

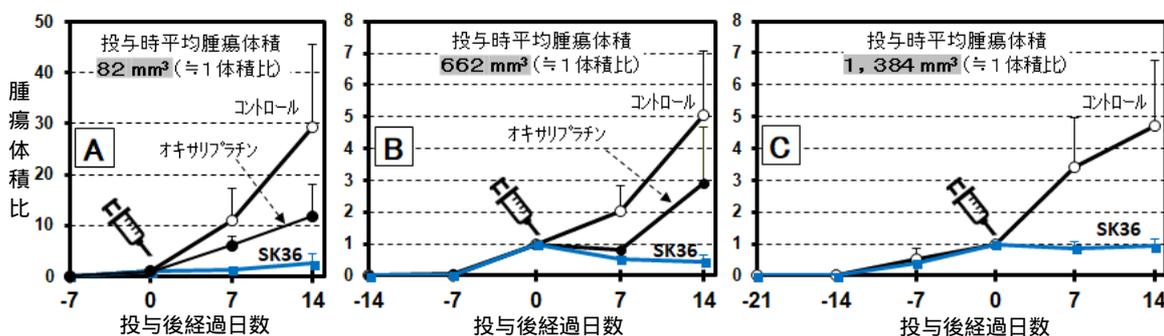


図2 Colon-26 大腸がん移植一週間後(A)、二週間後(B)または三週間後(C)のマウス ($n = 6$) にテトラゾラト架橋錯体 SK36 (10 mg/kg) および大腸がん治療薬オキサリプラチン(10 mg/kg)を単回(静脈内)投与し、平均腫瘍体積比(投与時体積 = 1) ± SD を経時的に観察した。

2. 研究の目的

本研究は、構造および物理化学的性質が大きく異なる白金錯体の特性を有効利用し、大幅な薬効の向上と副作用の軽減、および作用機序の解明を目的とするものである。大きく成長した腫瘍に対して顕著な抗腫瘍効果を発揮するテトラゾラト架橋錯体は、進行がんに奏功する可能性が高い。また、優れた効果持続性によって薬剤の投与頻度が減少すれば、がん患者の QOL (Quality of Life, 生活の質) は確実に向上する。テトラゾラト架橋錯体の持続的かつ顕著な抗腫瘍効果の要因として、**1** がん細胞に修復されにくい DNA 付加物を形成すること、**2** がん細胞に高効率に取り込まれること、**3** 血清アルブミンと複合体を形成することによる EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect, 腫瘍部位への高い漏出性と滞留性) および**4** 生体分子と相互作用することによって起こる非特異的免疫賦活作用や腫瘍微小環境変化が挙げられる。**1** および **2** については、メカニズムの詳細は別として、実際に研究成果として得られている。**3** については、*in silico* docking study でアルブミンの酸性アミノ酸クラスター部位に非常に強く結合することが推定されている。**4** については仮説の域を出ておらず、関連の有無を本研究で明らかにする。

3. 研究の方法

SK36 の非常に高い腫瘍増殖抑制活性と優れた効果持続性から、SK36 には DNA を標的とする殺細胞的な作用に加え、がん細胞を死に至らしめる別の作用機序が存在するのではないかと推定し、以下の実験を行った。

(1) 非特異的免疫賦活作用

長年使用されている制がん剤のいくつかは、既に提案されている作用機序とは別に、免疫賦活作用によって腫瘍の増殖を抑制することが、近年の報告で明らかになっている。白金製剤では、オキサリプラチンがそれに相当する。そこで、免疫応答性マウス (C.B-17/Icr, $n = 5$) と免疫不全マウス (成

熟したB細胞やT細胞を持たないマウス、C.B17/Icrscid/scidJ、 $n=5$)にColom-26大腸がん細胞を移植し、それぞれのマウスにオキサリプラチンまたはSK36を投与して、腫瘍体積を経時的に観察した。

(2) 腫瘍微小環境変化

L1210マウス白血病細胞をシスプラチンまたは一連のテトラゾラト架橋錯体に暴露させ、白金錯体と細胞内蓄積量と細胞毒性の関連を明らかにした。次に、白金錯体に暴露させたL1210細胞のタンパク質発現を二次元電気泳動で検討し、暴露した白金錯体間のタンパク質発現変動を網羅的に解析した。これらのメカニズム解析とは別に、白血病モデルマウス群(BALB/c、 $n=5$)に対してテトラゾラト架橋錯体の効果について延命率を指標に検討を行った。

4. 研究成果

(1) 非特異的免疫賦活作用

Colon-26大腸がん細胞を同種移植した免疫応答性マウス群およびその免疫不全マウス群に対するテトラゾラト架橋錯体の抗腫瘍効果について腫瘍体積変化を指標に評価した免疫応答性マウス群では、SK36およびオキサリプラチン投与による有意な腫瘍増殖抑制が認められた(図3左)。一方で、免疫不全マウス群にこれらの薬物を投与しても、腫瘍の増殖は抑制されず、コントロール群との腫瘍体積に有意差はなかった(図3右)。つまり、SK36やオキサリプラチンの腫瘍増殖抑制活性には免疫賦活作用が関連していることが示唆された。

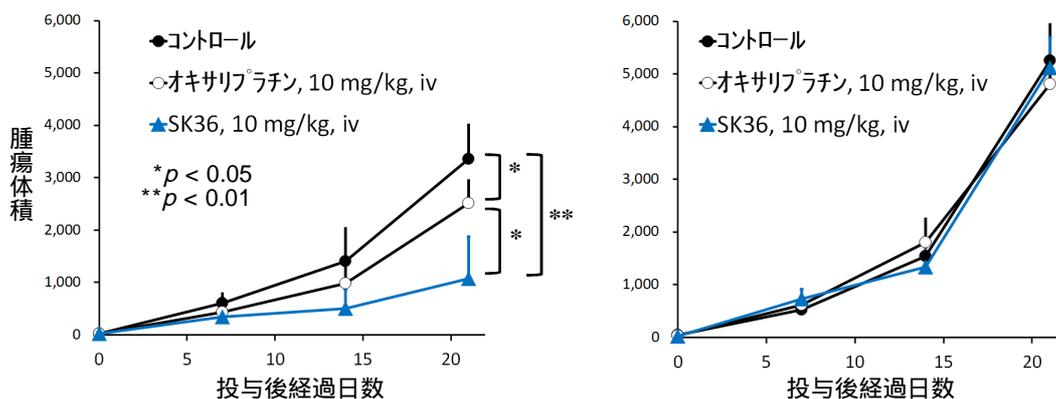


図3 C26大腸がんを免疫応答性マウス(左)および免疫不全マウス(右)に移植し、一週間後($n=6$)にSK36およびオキサリプラチン(10mg/kg)をそれぞれのマウス群に単回(静脈内)投与し、平均腫瘍体積を経時的に観察した。

(2) 腫瘍微小環境変化

シスプラチン、テトラゾラト架橋錯体5HY(R=H)およびSK36の細胞毒性と細胞内蓄積量の関連を明らかにするために、各錯体を24時間、L1210マウス白血病細胞に暴露し、細胞増殖抑制曲線を作製した(図4左)。50%阻害濃度(IC_{50})を算出したところ、SK36($IC_{50}=76\mu M$)は、シスプラチン($IC_{50}=17\mu M$)および5HY($IC_{50}=3.5\mu M$)と比較して、それぞれ約1/4.5および1/21の活性を示すことが分かった。同じ細胞を用いて $1\mu M$ の5HYおよびSK36を暴露した結果(図4右)5HYの細胞内蓄積量は、12時間後と比べて24時間後では約2倍に増加していたが、SK36では減少していた。また、12時間後および24時間後ともに、SK36の細胞内蓄積量は5HYより少なかった。これらの結果から、テトラゾラト架橋錯体の細胞毒性と細胞内蓄積量の間に関連があることが示唆された。また、暴露時間によって5HYとSK36の細胞内蓄積量の増減傾向が異なったことから、これらの白金錯体の細胞外排出機構が異なる可能性がある。

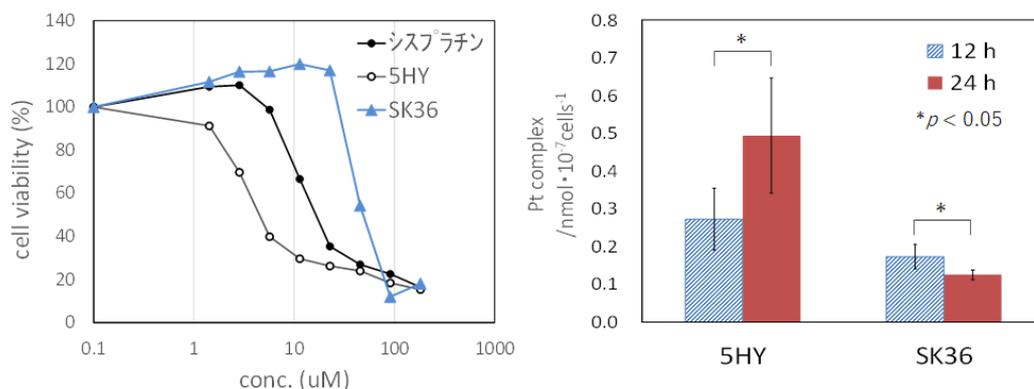
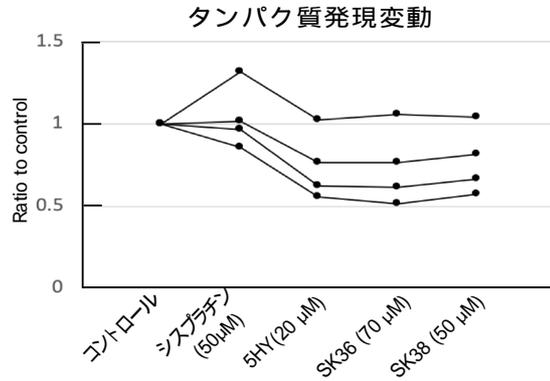


図4 L1210マウス白血病細胞を用いて、シスプラチン、5HY(R=H)およびSK36の細胞増殖抑制曲線を明らかにし、50%阻害濃度(IC_{50})を算出した($n=6$,左)。また、同細胞における5HYおよびSK36の12および24時間後の細胞内蓄積量を調べた($n=4$,右)。

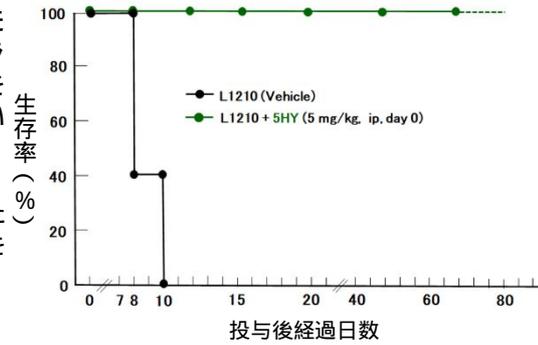
次に、各濃度の白金錯体で処理した L1210 細胞から得られたタンパク質を、蛍光標識 2 次元ディファレンスゲル電気泳動により定量解析した。コントロールと比較して有意な発現変動を示すタンパク質が 42 個存在した。その中で、シスプラチンとそれ以外の白金錯体で異なる発現変動を示したタンパク質は 4 個であり、いずれもシスプラチンと比較して発現が減少したが、その差は 0.5 - 0.7 倍程度であった(図 5)。

図 5 蛍光標識 2 次元ディファレンスゲル電気泳動により、個々のタンパク質について発現変動を定量解析した。コントロールを 1 とした時の、各白金錯体処理条件によるタンパク質発現量の変化を示す。



また、これらのメカニズム解析とは別に、白血病モデルマウス群 (BALB/c, $n=5$) に対してテトラゾラト架橋錯体の効果について延命率を指標に検討を行ったところ、テトラゾラト架橋錯体が非常に高い延命効果を発揮することが確認された(図 6)。

図 6 L1210 マウス白血病細胞を腹腔内に同種移植したマウスについて、5-H-Y を投与群と非投与群の生存率を経時的にプロットした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uemura Masako, Hiramoto Keiichi, Yoneyama Hiroki, Harusawa Shinya, Komeda Seiji	4. 巻 61
2. 論文標題 Introduction of Fluorine into Antitumor-Active Dinuclear Platinum(II) Complexes Leads to Modulation of <i>In Vivo</i> Antitumor Activity in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 12155 ~ 12164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.2c01126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 米田誠治	4. 巻 1220
2. 論文標題 創薬分野における白金と白金族元素	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 金属	6. 最初と最後の頁 758-762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komeda Seiji, Yoneyama Hiroki, Uemura Masako, Tsuchiya Takahiro, Hoshiyama Miyuu, Sakazaki Tomoya, Hiramoto Keiichi, Harusawa Shinya	4. 巻 40
2. 論文標題 Data on synthesis and structure-activity relationships of tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 107697 ~ 107697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2021.107697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kishimoto Toshifumi, Yoshikawa Yuko, Yoshikawa Kenichi, Komeda Seiji	4. 巻 21
2. 論文標題 Different Effects of Cisplatin and Transplatin on the Higher-Order Structure of DNA and Gene Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-15 (34)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21010034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Komeda Seiji, In Yasuko, Tomoo Koji, Minoura Katsuhiko, Sato Takaji, Reedijk Jan, Ishida Toshimasa, Chikuma Masahiko	4. 巻 495
2. 論文標題 Associative intraligand substitution of anticancer azolato-bridged compounds without a square-pyramidal intermediate: Formation of a unique tetranuclear, μ -3-1,2,3-triazolato-N1,N2,N3-bridged Pt(II) compound	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inorganica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 1-6 (118999)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ica.2019.118999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計22件(うち招待講演 4件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 若山実希、米山弘樹、植村雅子、宇佐美吉英、春沢信哉、米田誠治
2. 発表標題 Synthesis and characterization of tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with terminal alkynes
3. 学会等名 第31回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若山実希、米山弘樹、植村雅子、宇佐美吉英、春沢信哉、米田誠治
2. 発表標題 末端アルキンを導入したテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成と細胞毒性
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Uemura Masako, Hiramoto Keiichi, Yoneyama Hiroki, Usami Yoshihide, Harusawa Shinya, Komeda Seiji
2. 発表標題 In vitro and in vivo activity of fluoromethyl group-introduced antitumor-active dinuclear platinum(II) complex
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Metallomics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Komeda Seiji、Uemura Masako、Hiramoto Keiichi
2. 発表標題 Tetrazolato-bridged dinuclear Pt(II) complexes and their potential applications in cancer chemotherapy
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Metallomics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Komeda Seiji、Hiramoto Keiichi、Uemura Masako、Yoneyama Hiroki、Usami Yoshihide、Harusawa Shinya
2. 発表標題 Antitumor and immunostimulatory activities of the tetrazolato-bridged dinuclear Pt(II) complexes
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamada Takuma、Hiramoto Keiichi、Uemura Masako、Komeda Seiji
2. 発表標題 In vivo anticancer efficacy and X-ray crystal structure of the tetrazolato-bridged dinuclear Pt(II) complex
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植村雅子、米田誠治
2. 発表標題 抗腫瘍効果を発揮するテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の開発研究
3. 学会等名 第33回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田拓磨、米田誠治
2. 発表標題 シスプラチン耐性がんにも有効なアゾラト架橋白金(II)二核錯体とモノヌクレオチドの反応
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 若山実希、米山弘樹、植村雅子、宇佐美 吉英、米田 誠治
2. 発表標題 末端アルキンを導入したテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成と細胞毒性
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植村雅子、米田誠治
2. 発表標題 抗腫瘍活性を有する白金(II)二核錯体の細胞輸送におけるトランスポーターの関与
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米田誠治
2. 発表標題 プラチナを用いた費用対効果に優れた 制がん剤の開発
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植村雅子、米田誠治
2. 発表標題 抗腫瘍活性を有する白金(II)二核錯体のoxaliplatin耐性大腸がんに対するin vitro活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植村 雅子、平本 恵一、米山 弘樹、宇佐美 吉英、春沢 信哉、米田 誠治
2. 発表標題 Introduction of fluorine into antitumor-active dinuclear platinum(II) complex changes in vitro/in vivo activity
3. 学会等名 第30回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米田 誠治、植村 雅子、平本 恵一
2. 発表標題 「型破りな」制がん白金錯体のin vivo 抗腫瘍効果
3. 学会等名 生命金属に関する合同年会 (ConMetal 2020) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植村 雅子、平本 恵一、米山 弘樹、宇佐美 吉英、春沢 信哉、米田 誠治
2. 発表標題 抗腫瘍活性を有する白金(II)二核錯体へのフッ素導入によるin vitro/in vivo活性の変化
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井 佑、鎌尾 まや、米田 誠治、廣田 佳久
2. 発表標題 アゾラト架橋白金(II)二核錯体によるアンドロゲン受容体を介したヒト前立腺がん細胞に対する細胞増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植村 雅子、平本 恵一、米山 弘樹、宇佐美 吉英、春沢 信哉、米田 誠治
2. 発表標題 含フッ素白金(II)二核錯体のマウス大腸がんにおける細胞内蓄積量とin vitroおよびin vivo活性評価
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seiji Komeda
2. 発表標題 Next-Generation Platinum-Based Drug
3. 学会等名 Innovation Lecture at Masaryk University supported by Ministry of Education, Youth and Sports (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米田 誠治
2. 発表標題 新奇なプラチナ錯体でがんは完全に治る?
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン2019 ~大学見本市&ビジネスマッチング~
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Komeda
2. 発表標題 A Modification at Tetrazole C5 Markedly Influences the In Vivo Antitumor Efficacy of Tetrazolato-Bridged Dinuclear Pt(II) Complexes
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masako Uemura, Keiichi Hiramoto, Hiroki Yoneyama, Shinya Harusawa, Seiji Komeda
2. 発表標題 In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Antitumor Efficacy of Tetrazolato-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes with a Bulky Substituent at Tetrazole C5
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Komeda, Masako Uemura, Keiichi Hiramoto
2. 発表標題 Development of Next-Generation Platinum-Based Drug with Markedly High and Long-Lasting Antitumor Efficacy
3. 学会等名 第29回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 萩中淳、加藤くみ子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 346
3. 書名 パートナー分析化学 (改訂第4版)	

1. 著者名 津本浩平、城 宜嗣	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 564
3. 書名 生命金属ダイナミクス	

1. 著者名 川西正祐、賀川義之、大井一弥	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 677
3. 書名 図解 腫瘍薬学	

1. 著者名 錯体化学会	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 1000
3. 書名 錯体化合物事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

鈴鹿医療科学大学 薬学部 機器分析学研究室 http://www.asahi-net.or.jp/~ij4s-kmd/publications/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平本 恵一 (Hiramoto Keiichi) (90251793)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授 (34104)	
研究分担者	古川 絢子 (Furukawa Ayako) (10455537)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教 (34104)	
研究分担者	植村 雅子 (Uemura Masako) (70511997)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教 (34104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関