

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16340

研究課題名(和文) 制がん白金二核錯体の輸送機構の解明とオキサリプラチン耐性大腸がんに対する活性評価

研究課題名(英文) Study of anticancer platinum dinuclear complex on transport mechanism and in vitro cytotoxicity toward oxaliplatin-resistant colorectal tumor

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) 3,200,000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(テトラゾラト架橋錯体)は、数種のがんに対して抗がん効果が認められることから、次世代白金製剤としての開発が期待される。本研究では、テトラゾラト架橋錯体のがん細胞内/外への輸送に、それぞれ有機カチオントランスポーター/Na, K-ATPaseが関与していることが分かった。また、大腸がん治療薬オキサリプラチンに耐性を示すヒト大腸がんHCT116細胞を新たに樹立し、テトラゾラト架橋錯体およびその誘導体がオキサリプラチン耐性を克服することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オキサリプラチンを含む白金製剤を用いた治療では、反復投与によって生じるがん細胞の耐性によって治療法の選択肢が狭められることが問題となる。本研究では、オキサリプラチン耐性がん細胞にも有効なテトラゾラト架橋錯体の創出において、さらなる構造最適化をする上で有用な知見が得られた。また、テトラゾラト架橋錯体は慢性毒性が軽度であることがすでに明らかにされているため、本研究の成果が多く臨床的利点を兼ね備えた次世代白金製剤の創出に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes (tetrazolato-bridged complexes) show anti-cancer activity against several types of cancer. Therefore, they are expected to be developed as a next-generation platinum anti-cancer drugs. In this study, we revealed that organic cation transporters/Na, K-ATPases are involved in the transport of tetrazolate-bridged complexes into/out of cancer cells, respectively. In addition, we newly synthesized HCT116 human colorectal cancer cells which are resistant to oxaliplatin, and found that tetrazolate-bridged complexes and their derivatives overcome cross-resistance to oxaliplatin.

研究分野：生物無機化学

キーワード：白金錯体 抗がん剤 大腸がん オキサリプラチン耐性 細胞内蓄積量 トランスポーター

### 1. 研究開始当初の背景

シスプラチン(図1)に代表される白金製剤は、現在のがん治療には欠かせない。その一方で、シスプラチン耐性がんの発現が臨床的な問題となっている。がん細胞のシスプラチン耐性機構には、主に(1)細胞内への薬剤取り込み量の減少、(2)細胞外への薬剤排出量の増加、(3)解毒機構の亢進、(4)DNA修復機構の亢進などが関与していることが報告されている。白金製剤が、その標的分子であるDNAと結合して抗腫瘍効果を発揮するには、十分な量の薬剤が標的細胞内に取り込まれる必要がある。しかし、(1)および(2)の耐性機構を獲得したがん細胞では、シスプラチンの細胞内蓄積量は著しく減少し、期待された抗腫瘍効果がほとんど得られないことが知られている。このような耐性機構は、第二、三世代の白金製剤カルボプラチンやオキサリプラチン(図1)においても同様である可能性が高い。また、シスプラチン耐性がんの場合と同じく、これらの耐性がんの発現は臨床における治療法の選択肢を狭めている。

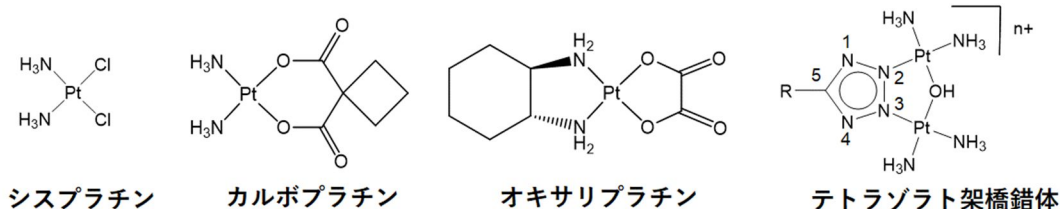


図1 臨床応用されている白金製剤とテトラゾラト架橋錯体の構造

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  $\{[cis-Pt(NH_3)_2]_2(\mu-OH)(\mu-5-R-tetrazolato-N2,N3)]X_2$  ( $X = NO_3^-$  or  $ClO_4^-$ ) (以下、テトラゾラト架橋錯体、図1)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。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、テトラゾラト架橋錯体の優れた活性に寄与する作用機序については不明な点が多い。冒頭で述べた「シスプラチン耐性がんにおけるシスプラチンの細胞内蓄積量の減少」に注目した結果、「テトラゾラト架橋錯体は、オキサリプラチンよりも細胞内に効率よく蓄積されることで、高い抗腫瘍効果を発揮しているのではないか」と予想された。

### 2. 研究の目的

細胞内蓄積量と抗腫瘍効果に相関があれば、細胞内により多く蓄積されるテトラゾラト架橋錯体を創出することで、オキサリプラチンに耐性を示すがん細胞にも有効な白金錯体を創出することが可能となる。そのために、テトラゾラト架橋錯体の細胞内への蓄積に関与するトランスポーターを明らかにすることが重要である。従って、本研究は「大腸がん細胞におけるテトラゾラト架橋錯体の細胞輸送に関与するトランスポーターの同定によって作用機序の一端を解明し、オキサリプラチン耐性がん細胞にも有効なテトラゾラト架橋錯体の創出に有益な構造活性相関を構築すること」を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) オキサリプラチン耐性 HCT116 細胞 (HCT116R 細胞) の作製

HCT116 ヒト大腸がん細胞(HCT116W 細胞)に暴露濃度を漸増させながら長期間オキサリプラチンを反復暴露し、オキサリプラチン 20  $\mu M$  暴露下で増殖する HCT116R 細胞を得た。さらにシングルセルクローニングによって5つの HCT116R 細胞株を樹立し、WST assay によって *in vitro* 細胞毒性を評価し、耐性を求めた。

#### (2) 細胞輸送に関与するトランスポーターの同定

##### (i) 競合阻害実験による解析

臨床応用されている白金製剤の細胞輸送には有機カチオントランスポーター(OCT)やNa, K-ATPase が関与するという報告がある。OCTの基質であるシメチジンおよびNa, K-ATPaseの基質ウアバイン、両トランスポーターの基質である tetraethylammonium (TEA) を用いて *in vitro* 細胞毒性と細胞内蓄積量に関する競合阻害実験を行い、テトラゾラト架橋錯体の細胞輸送にこれらのトランスポーターが関与しているかについて調べた。

##### (ii) 二次元電気泳動ディファレンシャル解析

HCT116W 細胞および(1)で作製した HCT116R 細胞を用いて、二次元電気泳動ディファレンシャル解析(外部委託)を行い、タンパク質発現量の差から「テトラゾラト架橋錯体の細胞輸送に関与する候補トランスポーター」の探索を行った。

#### (3) HCT116R 細胞における *in vitro* 細胞毒性の評価

(1)で作製した HCT116R 細胞を用いて、一連のテトラゾラト架橋錯体の *in vitro* 細胞毒性を評価し、HCT116R 細胞に対して高い細胞増殖抑制活性を示す誘導体を明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) オキサリプラチン耐性 HCT116 細胞 (HCT116R 細胞) の作製

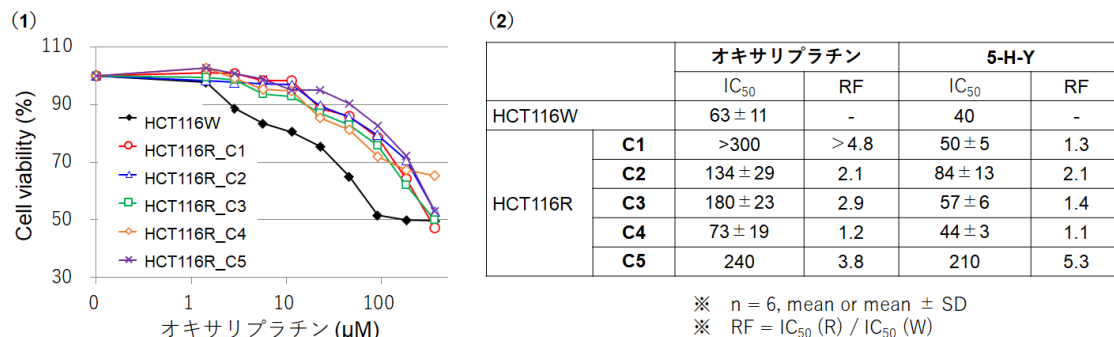


図2 (1) HCT116W および HCT116R 細胞の各クローン株のオキサリプラチンに対する細胞生存率、(2) 各細胞におけるオキサリプラチンおよび 5-H-Y の 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) と耐性度 (resistance factor: RF)

オキサリプラチン 20 μM 暴露下で増殖する HCT116R 細胞をシングルセルクローニングして得られた HCT116R-C1、C2、C3、C4 および C5 細胞では、HCT116W 細胞と比較してオキサリプラチン暴露下における細胞生存率が増加しており、オキサリプラチンに対する耐性を有していることが分かった (図 2 (1))。各クローン細胞株における 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) および耐性度 (RF) は図 2 (2) に示した通りであった。細胞の凍結融解を行うことでオキサリプラチンの IC<sub>50</sub> および RF が小さくなる、つまり、耐性が低下する傾向が見られたが、細胞生存率曲線から判断してオキサリプラチンに対する耐性を有することを確認した (結果省略)。テトラゾラト架橋錯体のリード化合物である 5-H-Y (R=H) は、特に HCT116R-C1、C3、C4 細胞株において、オキサリプラチン耐性を克服していた。一方で、HCT116R\_C5 細胞株において、5-H-Y はオキサリプラチンに交叉耐性を示すことが分かった。この結果から、HCT116R-C5 細胞株においてオキサリプラチン耐性を示す機序が、5-H-Y の細胞増殖抑制を示す機序にも関与していることが示唆された。

### (2) テトラゾラト架橋錯体の細胞輸送に関与するトランスポーターの同定

#### (i) 競合阻害実験による解析

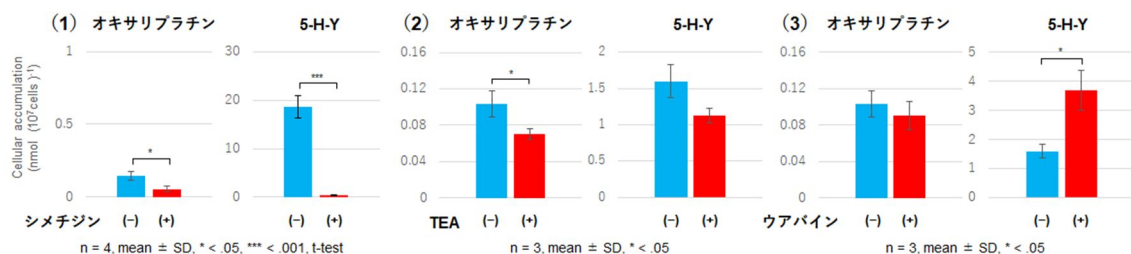


図3 阻害剤添加によるオキサリプラチンおよび 5-H-Y の HCT116W 細胞における細胞内蓄積量の変化 (阻害剤: (1) シメチジン、(2) TEA、(3) ウアバイン)

オキサリプラチンおよび 5-H-Y を暴露して 6 時間後の各錯体の細胞内蓄積量は、シメチジンの添加によって、オキサリプラチンでは約 3 分の 1、5-H-Y では約 400 分の 1 に減少した (図 3 (1))。これらの結果から、両化合物の細胞内への輸送には OCT が関与していることが明らかになった。OCT には数種のアイソフォームが存在することが知られている。そこで、realtime RT-PCR 法によって mRNA 量を測定し、HCT116W 細胞に多く発現している OCT のアイソフォーム同定を試みた。しかし、OCT の発現量の問題から、どの OCT アイソフォームが 5-H-Y の輸送に関与しているかを明らかにするまでは至らなかった。

オキサリプラチンおよび 5-H-Y を暴露して 6 時間後の各錯体の細胞内蓄積量は、ウアバインの添加によってオキサリプラチンでは 10%減少、5-H-Y では約 2.3 倍増加した (図 3 (3))。ウアバインの共存下で 5-H-Y の細胞内蓄積量が増えていることから、ウアバインにより Na, K-ATPase による 5-H-Y の細胞外への輸送が阻害されている可能性が示された。TEA の添加によって、5-H-Y の細胞内蓄積量はともに約 30%減少しているが (図 3 (2))、TEA によって、5-H-Y の細胞内外両方への輸送が阻害された結果、細胞内蓄積量の減少の程度がシメチジンを追加した場合と比較して小さくなったと考えられた。

#### (ii) 二次元電気泳動ディファレンシャル解析

(1) で HCT116R-C5 細胞が 5-H-Y にも耐性を示したことに着目し、HCT116R-C5 細胞にシ

スプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、5-H-Y を 6 時間暴露したときの細胞内蓄積量を明らかにした (暴露濃度 1  $\mu\text{M}$ )。その結果、HCT116W 細胞株の細胞内蓄積量と比較して、5-H-Y においてのみ、有意に細胞内蓄積量が低下することが明らかになった (図 4)。この結果から、HCT116R 細胞では、テトラゾラト架橋錯体の細胞内/外への輸送に関与するトランスポーターの発現量が減少/増加している可能性が示された。

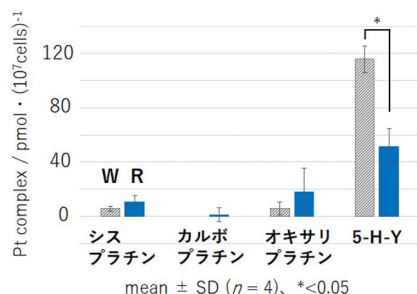


図 4 HCT116W 細胞および HCT116R-C5 細胞における白金錯体暴露 6 時間後の細胞内白金蓄積量

そこで、二次元電気泳動ディファレンシャル解析によって、HCT116W 細胞と HCT116R-C5 細胞で発現しているタンパク質量の比較を行った。本解析によって同定された 3,777 種のタンパク質のうち、HCT116\_R 細胞において発現量が 1.5 倍以上増加したタンパク質は 189 種、1/1.5 以下に減少していたタンパク質は 33 種であった。これらのタンパク質には細胞死に関するものや、がん細胞において多く発現が認められているものが含まれていて、細胞輸送に関するタンパク質は見当たらなかった。さらに、3,777 種のタンパク質を精査したところ、HCT116 細胞および HCT116R 細胞間の発現量比が 1.5 を下回るものの、6 つのトランスポーターの発現が増加していることが明らかになった。これらのトランスポーターがテトラゾラト架橋錯体の細胞内外への輸送に関与するかについて、阻害実験等の検討は行っていないため、引き続き解析を行う。

### (3) HCT116R 細胞におけるテトラゾラト架橋錯体の *in vitro* 細胞毒性の評価

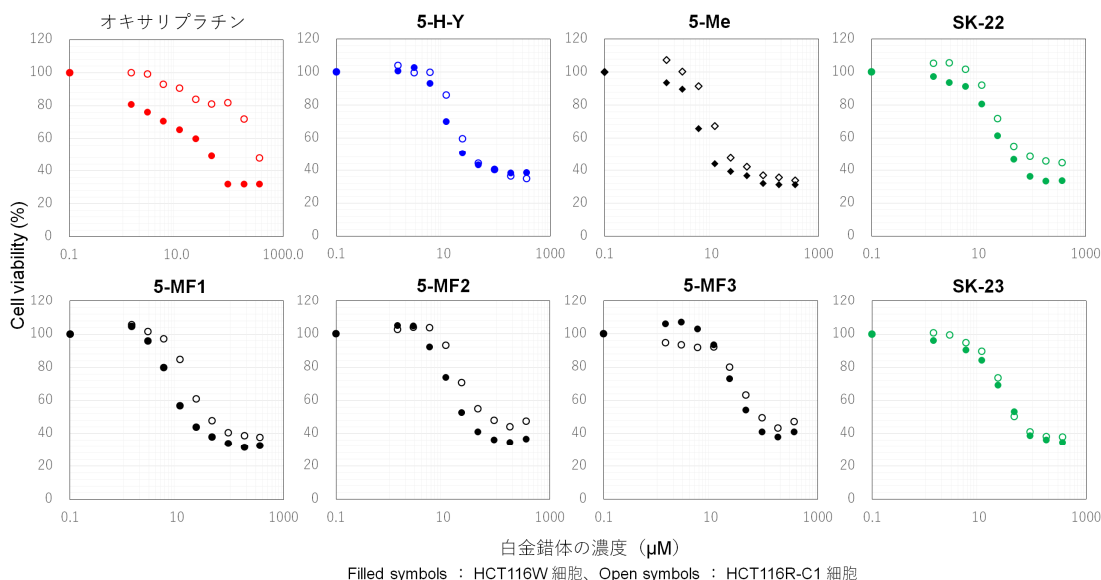


図 5 オキサリプラチン、テトラゾラト架橋錯体の HCT116W 細胞/HCT116R-C1 細胞に対する細胞生存率曲線

図 5 は、5-H-Y の 6 つの誘導体 5-Me、5-MF1、5-MF2、5-MF3、SK-22、SK-23 (R = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>F, CHF<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) に対する HCT116W 細胞および HCT116R-C1 細胞の細胞生存率曲線を示している。5-H-Y の 6 つの誘導体はすべて、HCT116W 細胞および HCT116R-C1 細胞株の両細胞に対してオキサリプラチンと比較して低い IC<sub>50</sub> を示した。さらに、RF に着目すると、これらの誘導体は、オキサリプラチン耐性細胞に対しても、オキサリプラチン感受性細胞に対する細胞増殖抑制活性と同等の活性を示すことが分かった。特に、エステル基を有する 2 つの誘導体 SK-22 および SK-23 の RF は 1.1 および 1.4 であった。この結果から、オキサリプラチン耐性を克服するには、5-H-Y へのエステル基導入がより良い誘導体化であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件(うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件)

1. 著者名 Uemura M., Hiramoto K., Yoneyama H., Harusawa S., Komeda S.	4. 巻 61
2. 論文標題 Introduction of Fluorine into Antitumor-Active Dinuclear Platinum(II) Complexes Leads to Modulation of In Vivo 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 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 ~ 107708
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 -

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

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新規テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の合成
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masako UEMURA, Keiichi HIRAMOTO, Hiroki YONEYAMA, Yoshihide USAMI, Shinya HARUSAWA, and Seiji KOMEDA
2. 発表標題 in vitro/in vivo activity of fluoromethyl group-introduced antitumor-active dinuclear platinum(II) complex
3. 学会等名 8th ISM (International Symposium on Metallomics) (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 (BRTE33) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植村雅子、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回年会
4. 発表年 2023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)二核錯体のin vitro/in vivo活性に対するフッ素導入効果
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 (SRM2021)
4. 発表年 2021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回年会
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 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回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植村雅子、平本恵一、米田誠治
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 Consortium of Metal Biosciences 2020 プログラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米田誠治、植村雅子、平本恵一
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28回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植村雅子、平本恵一、米山弘樹、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回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Seiji Komeda, Masako Uemura, Kenichi Yoshikawa, Yuko Yoshikawa (Ch. 8) Jens Muller, Bernhard Lippert (Eds.)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Taylor & Francis Group	5. 総ページ数 464
3. 書名 Modern Avenues in Metal-Nucleic Acid Chemistry (Ch. 8: How do cationic Pt(II) complexes modify the higher-order structure of DNA?)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------