

機関番号：34104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009-2010

課題番号：21750177

研究課題名 (和文) 分子認識能を有する抗癌白金錯体の開発

研究課題名 (英文) Development of anticancer platinum complexes that recognize a specific region of nucleic acid.

研究代表者

米田 誠治 (Seiji Komeda)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：60425056

研究成果の概要 (和文)：

化学療法に対して感受性が低いがんにも治療効果が高い次世代白金制がん剤の開発を念頭に、一連のテトラゾレート架橋白金(II)二核錯体の創薬基盤を構築した。テトラゾレート架橋白金(II)二核錯体は、ヒト非小細胞肺癌およびすい臓がん移植ヌードマウスを用いた実験において、非常に高い *in vivo* 腫瘍抑制効果を発揮することが確認され、今後の臨床応用が大いに期待されている。また、これらの白金錯体は臨床白金制がん剤とは異なる様式で、標的分子である DNA と相互作用することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We have synthesized a series of tetrazolate-bridged dinuclear Pt(II) complexes as a new class, in order to develop next-generation platinum-based anticancer drugs which are effective against cancers that are typically resistant to chemotherapy. *In vivo* antitumor efficacy of one of the complexes was evaluated on xenografted tumors of H460 non-small cell lung cancer and PANC-1 pancreatic cancer. The complex exhibited markedly high antitumor efficacy against pancreatic cancer. The tetrazolate-bridged complexes resulted to interact with DNA in a manner different from that of clinical platinum-based drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生態関連化学

キーワード：白金錯体, 制がん剤, X線結晶解析, シスプラチン, DNA

1. 研究開始当初の背景

がんは致死率が非常に高い病症で、世界の死亡原因の第1位はがんである。約5人に1人はがんが原因で死亡し、日本では約3人に1人ががんによって死亡する。がんの化学療法(制がん剤治療)は「患者には耐え難い副作用を伴うこと」、「薬物耐性によって投与量が増大すること」など、未だに多くの問題を抱えてい

る。白金(II)単核錯体であるシスプラチン(図1左)は、現在最も広く用いられている制がん剤の1つで、その薬理効果はDNAとの共有結合性相互作用に起因すると考えられている。白金制がん剤の年間世界市場は、現在も年率20%以上の割合で増加し続けており、副作用や薬物耐性等の諸問題は存在するものの、その制がん効果の高さが臨床での需要

を押し上げていることが分かる。しかしながら、元来化学療法に対して感受性が低いがんや、白金制がん剤に対して耐性を獲得したがんに対する制がん効果は低く、これらのがんにも有効な白金制がん剤の開発が強く求められている。現在承認されている医薬品のほとんどは有機化合物に由来するものであり、医薬品全体に占める含金属化合物の割合は非常に小さい。しかし、含金属化合物には有機化合物には見られない薬理作用が今後も見出される可能性が高く、研究対象としては非常に興味深い。研究代表者らは、白金制がん剤の優れた薬理効果に着目し、白金(II)二核錯体であるピラゾレート架橋錯体 (図1中央) およびトリアゾレート架橋錯体 (図1右) の分子設計を行った。これらの錯体は非常に高い *in vitro* 増殖抑制活性を示したものの、*in vivo* 実験では毒性が強く、期待された腫瘍抑制効果はまだ得られていない。

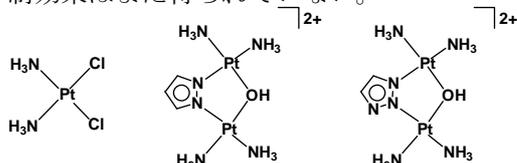


図1 シスプラチン(左)、ピラゾレート架橋錯体(中央)およびトリアゾレート架橋錯体(右)の化学構造式。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子認識能を有する白金(II)二核錯体を分子設計し、化学療法に対して感受性が低いがんにも高い治療効果および安全性を発揮する次世代白金制がん剤を開発することである。近年、研究代表者らが新たに分子設計したテトラゾレート架橋錯体 A (図2左) および B (図2中央) が高い *in vitro* がん細胞増殖抑制活性を発揮したので、テトラゾール5位をアルキル基やアリアル基で置換した5位置換テトラゾレート架橋錯体 (図2右) を合成し、より活性の高いリード化合物の創出を試みる。また、標的分子であるDNAとこれらの白金(II)錯体との相互作用様式を調査することによって、制がんメカニズムの一端を解明する。さらに、金属錯体とDNAとの静電的な相互作用を利用して、DNAの部分構造を選択的に認識する金属錯体の分子設計を試みる。例えば、DNAの副溝および主溝側から配列特異的に結合する金属錯体を分子設計し、制がん医薬品の開発だけでなく、他の難病治療薬や遺伝子診断薬等の開発に応用する。

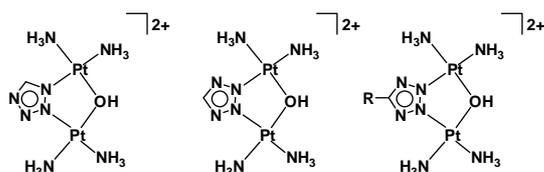


図2 テトラゾレート架橋錯体 A (左)、テトラゾレート架橋錯体 B (中央) および5位置換テトラゾレート架橋錯体(右)の化学構造式。

3. 研究の方法

(1)テトラゾレート架橋錯体の創薬基盤を構築するために、新たに数種の5位置換テトラゾレート架橋錯体を分子設計し、NMRやMSを用いて新規錯体の帰属を行った。これらの錯体について *in vitro* がん細胞増殖抑制活性の測定を行い、*in vivo* 実験を実施する化合物を選定した。

(2)テトラゾレート架橋錯体の *in vivo* 抗腫瘍効果について、H460ヒト非小細胞肺癌およびPanc-1ヒトすい臓がん移植ヌードマウスを用いて検討を行った (n=6)。

(3)一連のテトラゾレート架橋錯体とDNAとの非共有結合性(子牛胸腺DNA)および共有結合性(9-エチルグアニン)の相互作用について検討を行った。非共有結合性相互作用についてはCDスペクトルを用い、共有結合性相互作用については¹H- および¹⁹⁵Pt-NMRを用いて経時的に観察した。

4. 研究成果

(1)一連のテトラゾレート架橋錯体は、概してシスプラチンと同等かそれよりも高い *in vitro* がん細胞増殖抑制活性を示した。中でもテトラゾレート架橋錯体Bの活性が最も高く、非小細胞肺癌細胞に対してシスプラチンの2倍以上高い活性を示した。シスプラチン以外の臨床白金制がん剤はシスプラチンに対して交叉耐性を示すことが知られているが、一連のテトラゾレート架橋錯体は、シスプラチン耐性がんに対しても非常に高い *in vitro* 増殖抑制活性を示した。

(2)最も *in vitro* 活性が高いテトラゾレート架橋錯体Bを、H460ヒト非小細胞肺癌およびPanc-1ヒトすい臓がん移植ヌードマウスに投与した結果、テトラゾレート架橋錯体Bは、すい臓がんに対して非常に高い腫瘍抑制効果を発揮した。テトラゾレート架橋錯体B投与群(10 mg/kgをそれぞれ0, 8, 16, 24, 32, 42日目に投与)の2匹のマウスの移植すい臓がんが消失し、このマウス群の45日目の平均腫瘍体積の増加は、薬剤投与を行わない対象群の1/100以下であった(図3)。

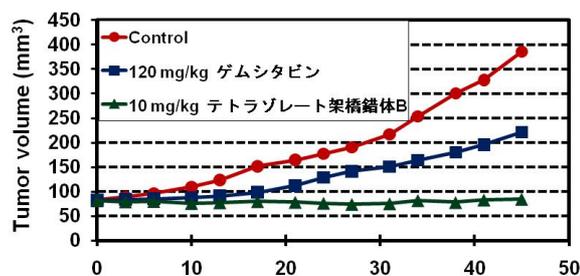


図3 ゲムシタビンおよびテトラゾレート架橋錯体Bを投与したヌードマウスの移植ヒトすい臓がんの体積変化 (n=6)。

また、その腫瘍抑制効果は、すい臓がんの第一選択薬であるゲムシタビン (120 mg/kgをそれぞれ0, 8, 16, 24, 32, 42日目に投与) と比較しても、有意に高かった。体重の変化に有意差は見られず (図4)、慢性的な副作用は小さいことが示唆された。

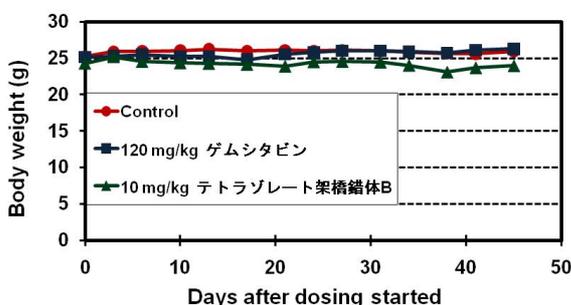


図4 ゲムシタビンおよびテトラゾレート架橋錯体Bを投与したヌードマウスの体重変化 (n = 6)。

(3)テトラゾレート架橋錯体AおよびBと子牛胸腺DNAとの非共有結合性相互作用について、CDを用いて検討を行ったところ、両錯体とも添加後すぐにほぼ同様のスペクトル変化 (280 nm 付近の正のコットン効果の減少) を示した。つまり、非共有結合性相互作用によってB型DNAからC型DNAへのコンフォメーション変化を引き起こすことが確認された (図5)。このコンフォメーション変化はピラゾレート架橋錯体やトリアゾレート架橋錯体でも確認されたが、テトラゾレート架橋錯体は、より低濃度でDNAの構造変化を引き起こす。ピラゾレート架橋錯体が非共有結合性の相互作用によってDNAのA:T塩基対の副溝に結合することが知られていることから、テトラゾレート架橋錯体AおよびBも副溝に結合することによってB型からC型DNAへのコンフォメーション変化を引き起こしている可能性が高い。また、錯体添加から数時間後に250 nm 付近の負のコットン効果が減少し始めたので、このスペクトル変化は共有結合性相互作用に起因するものと推定される。

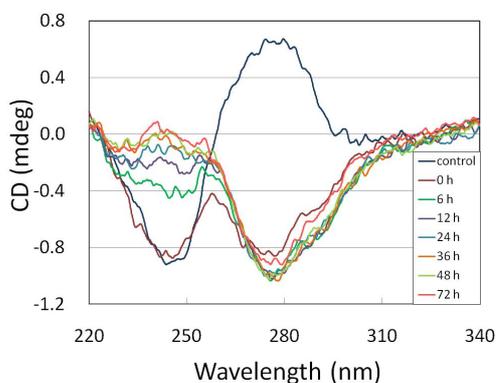


図5 テトラゾレート架橋錯体Bを添加した子牛胸腺DNAの経時的なCDスペクトル変化。

また、テトラゾレート架橋錯体AおよびBについて、9-エチルグアニンとの共有結合性相互作用をNMR分光法を用いて経時的に観察した結果、これらの錯体は2分子の9-エチルグアニンと配位結合を形成する際にウェルナー型正方平面錯体としては非常に珍しい白金原子の転位反応 (異性化反応) を伴うことが確認された。このことから、テトラゾレート架橋錯体AおよびBは、異性化反応によってDNA上で鎖内架橋および鎖間架橋など多様な共有結合性のDNA付加物を形成すると考えられる。つまり、シスプラチンとは異なる様式でDNAと相互作用し、このことがシスプラチン耐性がんに対する有効性に深く関与していると推定される。

以上のように、研究代表者の研究によってすい臓がんに着効を示すリード化合物が創出され、その臨床応用が大いに期待されている。制がん活性を有するテトラゾレート架橋錯体の合成法については、国内と国外を併せて8世界地域で特許出願を行った。研究代表者は今後、出来るだけ多くのテトラゾレート架橋白金(II)二核錯体の合成を行い、それらのDNAとの相互作用様式と腫瘍抑制効果との関連を明らかにすると共に、高い分子認識能を有する金属錯体を創出する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

①Komeda, S.; Casini, A.

“Next-generation anticancer metallodrugs”
Curr. Top. Med. Chem. in press. 査読有

②Komeda, S.

“Unique platinum-DNA interactions may lead to more effective platinum-based antitumor drugs.”

Metallomics **2011** Epub ahead of print. 査読有

③Komeda, S.; Lin, Y-L.; Chikuma, M.

“A tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complex exhibits markedly high *in vivo* antitumor activity against pancreatic cancer.”

ChemMedChem **2011** 6, 987-90. 査読有

④Komeda, S.; Moulaei, T.; Chikuma, M.; Odani, A.; Kipping, R.; Farrell, N. P.; Williams, L. D.

“The phosphate clamp: a small and independent motif for nucleic acid backbone recognition.”

Nucleic Acids Res. **2011** 39, 325-36. 査読有

⑤米田誠治

“次世代白金制がん剤の創薬研究”

日本化学会 生体機能関連化学部会 NEWS

LETTER 2010, 25, 7-10. 査読無

⑥ Kamino, S.; Horio, Y.; Komeda, S.; Minoura, K.; Ichikawa, H.; Horigome, J.; Tatsumi, A.; Kaji, S.; Yamaguchi, T.; Usami, Y.; Hirota, S.; Enomoto, S.; Fujita Y.

“A new class of rhodamine luminophores: design, syntheses and aggregation-induced emission enhancement.”

Chem. Commun. **2010** 46, 9013-5. 査読有

⑦ Kida, N.; Katsuda, Y.; Yoshikawa, Y.; Komeda, S.; Sato, T.; Saito, Y.; Chikuma, M.; Suzuki, M.; Imanaka, T.; Yoshikawa, K.

“Characteristic effect of an anticancer dinuclear platinum(II) complex on the higher-order structure of DNA.”

J. Biol. Inorg. Chem. **2010** 15, 701-7. 査読有

⑧ Watkins, D.; Moulaei, T.; Komeda, S.; Williams, L. D.

“Application of anomalous diffraction methods to the study of DNA and DNA-complexes.”

Methods in Mol. Biol. **2010** 613, 133-52. 査読無

[学会発表] (計 13 件)

① 植村雅子, 藤澤豊, 飯田靖彦, 森井孫俊, 桜井弘, 千熊正彦, 米田誠治

“アゾラト架橋白金(II)二核錯体と DNA の相互作用様式に関する研究”

日本薬学会第 131 年会

2011 年 3 月 29 日

コンベンションアーツセンター「グランシップ」(静岡市)

② 米田誠治

“*In vivo* 制がん活性を有する白金(II)複核錯体と核酸との相互作用様式”

日本薬学会第 131 年会

2011 年 3 月 26 日

コンベンションアーツセンター「グランシップ」(静岡市)

③ Komeda, S.; Chikuma, M.; Farrell, N. P.; Williams, L.D.

“DNA interactions of anticancer polynuclear Pt(II) complexes”

2010 環太平洋国際化学会議

2010 年 12 月 16 日

ハワイコンベンションセンター (米国ハワイ州ホノルル)

④ 米田誠治, Yuh-ling Lin., 鈴木俊宏, 植村雅子, 千熊正彦

“制がん活性を有するアゾラト架橋白金(II)二核錯体”

第 2 回メタロミクス研究フォーラム

2010 年 11 月 3 日

京都薬科大学 (京都市)

⑤ 米田誠治, Yuh-ling Lin., 鈴木俊宏, 植村雅子, Nicholas P. Farrell, Loren D. Williams, 小谷明, 千熊正彦

小谷明, 千熊正彦

“制がん活性を有する白金(II)複核錯体と核酸との相互作用”

第 4 回バイオ関連化学シンポジウム

2010 年 9 月 25 日

大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市)

⑥ 植村雅子, 藤澤豊, 飯田靖彦, 森井孫俊, 桜井弘, 千熊正彦, 米田誠治

“Interactions of anticancer-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with a nucleobase.”

第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム

2010 年 6 月 25 日

徳島文理大学薬学部 (徳島市)

⑦ 木田直子, 勝田陽介, 吉川祐子, 米田誠治, 佐藤卓史, 齊藤睦弘, 千熊正彦, 鈴木麻里, 今中忠行, 吉川研一

“トリアゾール配位子を有する陽電荷白金二核錯体が DNA の高次構造に与える影響”

日本薬学会 第 130 年会

2010 年 3 月 29 日

桃太郎アリーナ (岡山市)

⑧ 植村雅子, 藤澤豊, 飯田靖彦, 森井孫俊, 桜井弘, 千熊正彦, 米田誠治

“制がん活性を有するテトラゾレート架橋白金(II)二核錯体の核酸塩基との相互作用様式に関する研究”

日本薬学会 第 130 年会

2010 年 3 月 29 日

桃太郎アリーナ (岡山)

⑨ 米田誠治

“次世代白金制がん剤の開発研究”

大阪薬科大学 ハイテクリサーチセンター

平成 21 年度公開シンポジウム

2009 年 12 月 5 日

大阪薬科大学 (大阪府高槻市)

⑩ 米田誠治, Nicholas P. Farrell, Loren D. Williams, 小谷明, 千熊正彦

“核酸の特定部位を認識する制がん白金錯体”

第 24 回生体機能関連化学部会シンポジウム

2009 年 9 月 15 日

九州大学医学部百周年会館 (福岡市)

⑪ Komeda, S.; Odani, A.; Chikuma, M.; Farrell, N. P.; Williams, L. D.

“X-ray crystallographic studies on DNA adduct formation by the anticancer-active polynuclear

Pt(II) complexes”
The 2nd International Symposium on Biological
Inorganic Chemistry of the New Era
2009年7月31日
高山コンベンションセンター (岐阜県高山市)

⑫ Komeda, S.; Odani, A.; Chikuma, M.; Farrell,
N. P.; Williams, L. D.
“Design, structure-activity relationships and
x-ray co-crystallography of anticancer-active
polynuclear platinum(II) complexes”
14th International Conference on Biological
Inorganic Chemistry
2009年7月27日
名古屋国際会議場 (名古屋市)

⑬ 米田誠治, Nicholas P. Farrell, Loren D.
Williams, 小谷明, 千熊正彦
“制がん活性を有するカチオン性白金(II)複
核錯体の DNA との相互作用様式”
第55回日本薬学会東海支部
2009年7月11日
愛知学院大学薬学部 (名古屋市)

[図書] (計2件)

①腫瘍薬学(共著) 2010, 南山堂 p177-182

②レアメタル便覧(共著) 2011 丸善株式会社
pIII587-8, pIII595-6, pIII610, pIII613

[産業財産権] (計8件)

①名称: 白金錯体化合物およびその利用
発明者: 米田誠治, 千熊正彦
権利者: 天真堂製薬(株), (株)ヤクルト本社
種類: 特許権
番号: 特願 2009-550001
出願年月日: 2010年7月12日
国内外の別: 国内

②名称: PLATINUM COMPLEX COMPOUND
AND UTILIZATION OF THE SAME
発明者: 米田誠治, 千熊正彦
権利者: 天真堂製薬(株), (株)ヤクルト本社
種類: 特許権
番号: CA 2712408
出願年月日: 2010年7月12日
国内外の別: 国外 (カナダ)

③名称: PLATINUM COMPLEX COMPOUND
AND UTILIZATION OF THE SAME
発明者: 米田誠治, 千熊正彦
権利者: 天真堂製薬(株), (株)ヤクルト本社
種類: 特許権
番号: 200980102212.8
出願年月日: 2010年7月14日
国内外の別: 国外 (中国)

④名称: PLATINUM COMPLEX COMPOUND
AND UTILIZATION OF THE SAME
発明者: 米田誠治, 千熊正彦
権利者: 天真堂製薬(株), (株)ヤクルト本社
種類: 特許権
番号: 12/863,019
出願年月日: 2010年7月15日
国内外の別: 国外 (米国)

⑤名称: PLATINUM COMPLEX COMPOUND
AND UTILIZATION OF THE SAME
発明者: 米田誠治, 千熊正彦
権利者: 天真堂製薬(株), (株)ヤクルト本社
種類: 特許権
番号: 1020107016251
出願年月日: 2010年7月20日
国内外の別: 国外 (韓国)

⑥名称: PLATINUM COMPLEX COMPOUND
AND UTILIZATION OF THE SAME
発明者: 米田誠治, 千熊正彦
権利者: 天真堂製薬(株), (株)ヤクルト本社
種類: 特許権
番号: 1597/MUMNP/2010
出願年月日: 2010年7月24日
国内外の別: 国外 (インド)

⑦名称: PLATINUM COMPLEX COMPOUND
AND UTILIZATION OF THE SAME
発明者: 米田誠治, 千熊正彦
権利者: 天真堂製薬(株), (株)ヤクルト本社
種類: 特許権
番号: 09702559.7
出願年月日: 2010年8月5日
国内外の別: 国外 (欧州)

⑧名称: PLATINUM COMPLEX COMPOUND
AND UTILIZATION OF THE SAME
発明者: 米田誠治, 千熊正彦
権利者: 天真堂製薬(株), (株)ヤクルト本社
種類: 特許権
番号:
出願年月日: 2010年8月11日
国内外の別: 国外 (ユーラシア)

[その他]

ホームページ等

http://www.suzuka-u.ac.jp/achievements/41_pp/p_p_komeda.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 誠治 (Seiji Komeda)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教
研究者番号: 60425056