

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 27 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590045

研究課題名（和文）ピラゾール型架橋配位子を有する陽電荷白金二核錯体の制がん活性発現機構の解明

研究課題名（英文）anti-tumor activity of dinuclear pyrazorato platinum complex

研究代表者

佐藤 卓史 (SATO TAKAJI)

大阪薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80257899

研究成果の概要（和文）：

ピラゾール及び水酸化物イオンを架橋配位子とする新規制がん性白金二核錯体AMPZの作用機序を解明することを目指した。当初、従来の制がん性白金錯体とは全く異なる構造、電荷および反応性を持つAMPZの標的がタンパク質である可能性も想定していた。そこで、まず、マレイミド型架橋試薬を用いてAMPZをメルカプトアルブミンに結合させたものを免疫原としてAMPZ に対する抗体を作製し、この抗体を用いてAMPZ の細胞内分布の検討を計画した。しかしながら、目的にかなうような抗体は得られなかった。そのため、細胞内白金量変化を指標として、AMPZ の細胞内での挙動を追跡した。その結果、細胞内のタンパク質に結合した白金は速やかに細胞から消失するのに対して、核DNAに結合した白金の細胞からの消失は遅かった。また、AMPZ による細胞内タンパク質の変化をプロテオーム解析およびウエスタンブロット法により解析したところ、細胞増殖にかかわるタンパク質のリン酸化や細胞周期停止に関与するタンパク質の発現の増加が確認された。最後に、アポトーシス関連タンパク質の変化をウエスタンブロット法および酵素活性測定によって追跡したところ、AMPZ によるアポトーシス誘導経路には、ミトコンドリアからのシトクロームCの遊離はほとんど見られず、カスパーズ12が関与していた。これらの結果から、AMPZ は核DNA標的とし、細胞内のタンパク質の発現に変化を与え、その結果、小胞体レベルでのストレスを誘起してアポトーシスが誘導される可能性が極めて高いものと考えられた。このように、AMPZの標的分子は、シスプラチンをはじめとする白金錯体と同様にDNAであったが、細胞に与える影響やアポトーシス誘導経路は、それらとは全く異なることが明らかにされた。この結果は、従来とは異なる機序を持つ制がん性白金錯体の開発にひとつの指針を示すものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

[[*cis*-(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Pt(II)]<sub>2</sub>(μ-OH)(μ-pz)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (AMPZ) is more effective in L1210 cell than cisplatin. However, the apoptosis induction potency of AMPZ was lower than that of cisplatin. In L1210, AMPZ led to G<sub>2</sub> cell cycle arrest as well as cisplatin. In proteome analysis, annexin A1 was one of the most elevated proteins in the cell treated with cisplatin. Cytochrome C pathway apoptosis induction by cisplatin was markedly decreased in the cisplatin resistant cell. However, resistant cell did not alter the apoptosis and cell cycle arrest induced by AMPZ. These results suggest that cytochrome C is related to induction of apoptosis by cisplatin but not AMPZ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	600,000	180,000	680,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：制がん剤、白金、シスプラチン、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

応募者らは陽電荷白金二核錯体である  $[[cis-(NH_3)_2Pt(II)]_2(\mu-OH)(\mu-pz)](NO_3)_2$  (AMPZ) がシスプラチンと同程度の制がん活性を持ち、シスプラチン耐性がんにも有効であることを見出した。当初、AMPZ もシスプラチンと同様に DNA と配位結合して活性を発現するものと考えて、DNA とその錯体との反応を検討していた。しかし、その過程において DNA に対するこの錯体の配位結合形成能は極めて低く、錯体の電荷に基づく DNA のリン酸基に対する特異的相互作用とその立体構造に基づく DNA の minor groove への結合といった配位結合以外の様式で DNA と相互作用することを見出した。さらに、AMPZ の架橋配位子であるピラゾールの 4 位にアルキル基を導入するとその制がん活性が増大することを見出し、4 位に置換基を有する一連のピラゾール誘導体を架橋配位子とする白金錯体を合成し、その反応性と活性との関連を評価してきた。その結果、導入した置換基により、DNA との反応性、細胞内への移行性、活性が変化することが明らかとなった。それらの性質のうち、細胞への移行性は活性を支配する一因となっていると考えられたが、DNA との反応性と活性の間には、明確な相関関係は得られなかった。また、培養細胞を用いた検討から、これらの錯体が細胞にアポトーシスを誘導するものの、シスプラチンの場合とは異なり、p53 タンパク質の関与は認められなかった。p53 は DNA が損傷をうけた場合のアポトーシス誘導における最上流のシグナルであり、本錯体におけるアポトーシス誘導は DNA の損傷に起因するものではない可能性が考えられた。そこで、細胞分画中の白金量を測定したところ、核以外のミクロソーム画分、ミトコンドリア画分にも比較的高い白金が検出された。また、AMPZ は DNA だけでなくタンパク質の構造にも変化を与えることを見出した。

このように、その標的が核の DNA ではなくタンパク質である可能性が考えられ、AMPZ の制がん活性発現機構は従来の白金錯体とは全く異なる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、現在までに行ってきた AMPZ の反応性に関する基礎的解析および細胞において得られた情報を基盤として以下のことを行う。まず、AMPZ を認識する抗体を作製し、その抗体を用いて細胞内でのこの錯体の挙動を追跡することで、AMPZ が標的としている細胞内の分子あるいは細胞内小器官を特定する。次いで、錯体を作用させた場合の細胞内タンパク質量の変化をプロテオーム解析により網羅的に捉える。さらに、アポトーシス誘導関連タンパク質の変化を解析する。これらの解析から、AMPZ の作用機構を明らかにすることを目的とし、さらには、本錯体の制がん活性機構の解明によって、今後の新たな制がん性白金錯体を分子設計するための指針を導き出すことを目的とする。

3. 研究の方法

AMPZ に対する抗体を作成する。蛍光標識したその抗体を用いて AMPZ の細胞内分布を解析する。また、プロテオーム解析による細胞内タンパク質の量的変化、およびウエスタンブロット法等での解析を行い、標的となる細胞内小器官の特定を行う。アポトーシス関連タンパク質の変動を解析する。それらの結果に基づき AMPZ の作用機構を明らかにする。

4. 研究成果

当初、AMPZ の架橋配位子であるピラゾール

の4位に官能基を導入し、その部分を介してアルブミンにAMPZを結合させて、これを免疫原として抗体を調製することを計画していた。しかしながら、この方法による抗体作成には成功しなかった。そこで、AMPZのもう一方の架橋配位子である水酸化物イオンを塩化物イオン2つに置換した新たな錯体を合成し、この部分を介してAMPZをアルブミンに結合させた。これを免疫原として抗体を調製した。ただ、この抗体は、AMPZだけでなく、ピラゾールにも交差し、そのAMPZとの親和性もあまり高くなかった。そのため、直接細胞を抗体染色して、AMPZの局在を明らかにすることはできなかった。しかしながら、細胞を分画後、AMPZ処理群と未処理群について、抗体を用いた比較およびICP-MSによる白金量の測定を行ったところ、明らかに、核、ミトコンドリア、ミクロソーム画分が抗体によって認識される物質を含み、かつ白金含量が高かった。また、プロテオーム解析では、直接AMPZが反応していると思われるタンパク質は確認されなかったが、シスプラチンの場合とは大きく異なり、アポトーシス関連タンパク質よりむしろ、発現が制御された結果として細胞増殖や細胞周期にかかわるタンパク質に変動が見られた。このことから、AMPZの標的がシスプラチンの場合のDNAとは異なっている可能性が示唆された。さらに、ウエスタンブロッティングの結果、シスプラチン感受性細胞では、シスプラチンでもAMPZによってもシトクロームCの細胞質レベルの増加が認められたが、シスプラチン耐性細胞では、シスプラチンでもAMPZによってもシトクロームCの細胞質レベルの増加は認められなかった。しかしながら、シスプラチンの場合とは異なり、AMPZではアポトーシスが誘導された細胞が確認された。

ピラゾール及び水酸化物イオンを架橋配位子とする新規制がん性白金二核錯体AMPZの作用機序を解明することを目指した。当初、従来の制がん性白金錯体とは全く異なる構造、電荷および反応性を持つAMPZの標的がタンパク質である可能性も想定していた。そこで、まず、マレイミド型架橋試薬を用いてAMPZをメルカプトアルブミンに結合させたものを免疫原としてAMPZに対する抗体を作製し、この抗体を用いてAMPZの細胞内分布の検討を計画した。しかしながら、目的にかなうような抗体は得られなかった。そのため、細胞内白金量変化を指標として、AMPZの細胞内での挙動を追跡した。その結果、細胞内のタンパク質に結合した白金は速やかに細胞から消失するのに対して、核DNAに結合した白金の細胞からの消失は遅かった。また、AMPZによる細胞内タンパク質の変化をプロテオーム解析およびウエスタンブロット法により解析したとこ

ろ、細胞増殖にかかわるタンパク質のリン酸化や細胞周期停止に関するタンパク質の発現の増加が確認された。最後に、アポトーシス関連タンパク質の変化をウエスタンブロット法および酵素活性測定によって追跡したところ、AMPZによるアポトーシス誘導経路には、ミトコンドリアからのシトクロームCの遊離はほとんど見られず、カスパーゼ12が関与していた。これらの結果から、AMPZは核DNA標的とし、細胞内のタンパク質の発現に変化を与え、その結果、小胞体レベルでのストレスを誘起してアポトーシスが誘導される可能性が極めて高いものと考えられた。このように、AMPZの標的分子は、シスプラチンをはじめとする白金錯体と同様にDNAであったが、細胞に与える影響やアポトーシス誘導経路は、それらとは全く異なることが明らかにされた。この結果は、従来とは異なる機序を持つ制がん性白金錯体の開発にひとつの指針を示すものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

川端美慧、佐藤卓史、高橋直子、近藤沙耶、浪本寛也、飯田有香、安宅希美子、吉田卓也、東剛志、三野芳紀、シスプラチン耐性がん細胞に有効な新規白金(II)二核錯体の培養細胞に与える影響、日本薬学会第133年会、2013年3月、横浜

渡辺莉奈、佐藤卓史、青野真織、池本優貴、足立那々緒、東剛志、三野芳紀、シスプラチン耐性がん細胞に有効な新規白金(II)二核錯体のDNAとの相互作用、日本薬学会第133年会、2013年3月、横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 卓史 (SATO TAKAJI)  
大阪薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：80257899

### (2) 研究分担者

市川 隼人 (ICHIKAWA HAYATO)  
日本大学・生産工学部・助教  
研究者番号：10351488

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：