

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25288027

研究課題名(和文)白金錯体の非共有性相互作用に基づく抗がん活性解明と創薬化

研究課題名(英文) Study of anticancer Pt complexes involving with non-covalent interactions and its application for drug

研究代表者

小谷 明 (ODANI, Akira)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：60143913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,400,000円

研究成果の概要(和文)：芳香環スタッキングを有する混合配位子白金錯体が臨床白金抗がん剤シスプラチンよりも高い抗がん活性，低い副作用を示した．リン酸基と白金配位アミン間の水素結合は骨へのデリバリー，低副作用化に有用であり，金属ポルフィリンと組み合わせられた白金錯体は光により活性化され高いin vivo抗がん活性を示した．これらは相互作用が動的な生体過程で働いていることを示唆しており，非共有性相互作用の金属錯体への導入は創薬に有用なツールであった．

研究成果の概要(英文)：Mixed ligand Pt complexes involving aromatic ring stacking revealed excellent antitumor effect and low side effect. The hydrogen bond between the phosphate and the amine was useful for bone delivery and low side effect. The Pt complexes with the metal-porphyrin showed pronounced antitumor effect activated by the light. These indicated the non-covalent interaction could play in dynamic biological process, and the introduction of non-covalent interaction into the metal complex is a useful tool for metal-drug application.

研究分野：生物無機化学

キーワード：非共有性相互作用 混合配位子白金錯体 白金抗がん剤 シスプラチン ドラッグデリバリー 低副作用 P D T 金属ポルフィリン錯体

1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の5人に2人はがんで死亡しており1位を占める。この割合は年々増加しており、より有効な抗ガン剤の新開発は日本人の健康を守る上で大変重要になってきている。現在シスプラチン、オキサリプラチンを代表とする臨床白金抗がん剤は抗ガン剤の約20%使用されている。昔のように単剤によるがん治療と違い、現在では多剤治療ががん治療の標準となっており、多剤のペアに白金抗がん剤が組合される確率が高いことは注目に値する。これは白金錯体が、タンパク質を標的とする標的薬等の抗がん剤ではまねのできないDNAへの金属配位ができるためと考えられ、今後も活躍が期待される。白金抗がん剤の特徴として、様々ながんに効く広い抗がんスペクトルを持つ一方、シスプラチンだと腎毒性、オキサリプラチンだと痺れ、といった副作用が出やすいことがあげられる。日本のがん患者は今後高齢者が増加すると思われ、低副作用白金抗がん剤の開発が必須である。副作用は、白金が標的でないタンパク質と結合するために起こると考えられ、タンパク質に配位しない白金抗がん剤の開発が緊迫の課題となっている。これらの社会的要請に答えるべく本研究は、非共有性相互作用を有する白金錯体を用いて課題をクリアすることを目標とした。

2. 研究の目的

高齢者にも使えるように、広い抗がん作用を有し、副作用の小さな抗がん剤の開発を目指した。タンパク質に配位せず、核酸だけに結合する白金抗がん剤をいかに作るか。申請者はアイデアをシスプラチンの体内存在形に求めた。シスプラチンは標的DNAのグアニンと結合した後、HMGタンパク質と非共有性相互作用である芳香環スタッキングにより会合体シスプラチン結合DNA-HMGを形成することが知られている。しかし、会合体形成後の詳細は不明であり、ある意味シスプラチン

の生理活性体は不明である。申請者はシスプラチン結合DNA-HMGの特異構造がシスプラチンの生理活性を発現させるものと仮定して本研究を実施した。すなわち、4N配位はタンパク質に配位できない配位構造であることに着目し、4N配位、芳香環スタッキングといった構造的特徴を兼ね備えた白金錯体モデルを用意して、体外から投与して生理活性発現・化学的諸性質の解明を試みた。また、シスプラチンがDNAに配位する直前の構造モデルに相当するリン酸と白金配位アミン間の水素結合を有する白金錯体についても同様に検討を加えることとした。これらモデル錯体により、混合配位子錯体A-Pt-Bの配位子AB間に非共有性相互作用(水素結合、芳香環スタッキング)を導入して生理活性・新機能が発現されるかについて検討した。従来型の白金抗がん剤シスプラチン、オキサリプラチンは同じ混合配位子錯体A-Pt-Bであるが、非共有性相互作用を有しない違いがある。非共有性相互作用含有白金錯体から得た知見を基に、副作用が少ない抗がん治療として近年注目されているがん光照射療法に注目し、用いる光増感剤について光エネルギーを集めるポルフィリンと白金錯体を結合させた混合配位子白金錯体A-Pt-Bとして開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 白金錯体の合成

芳香環スタッキング構造をモデル化した $[Pt(Ar)(At-X)]Cl_2$ 錯体(Ar:1,10-フェナントロリン誘導体 R-phen, At-X:アントラセン含有ジアミン誘導体)はPt(Ar)Cl₂から常法により、[(シスプラチンまたはオキサリプラチン)_n(IP6)](IP6:イノシトール六リン酸, n = 1-3), 4シスプラチン-テトラピリジルポルフィリンまたはポルフィリン金属錯体はAg法により合成し、NMR, 元素分析より同定した。IP6のPt結合部位はP-NMRのpH依存性から推定した。

(2) 芳香環スタッキング含有 Pt(Ar)(At-X)

培養がん細胞への増殖抑制 (50%抑制する薬物濃度 IC50 で評価) の Ar, X 依存性が見られ, Pt(5CH3-phen)(AtC3) が 0.2 μ M とシスプラチン 7 μ M より 1 オーダー活性が高い錯体を見つけた. IC50 値の構造活性相関, スタッキング構造との検討の結果, 白金 - 芳香環相互作用の寄与が示唆された. また, 生理活性と水-オクタノール分配比 log P の相関も金属 - 芳香環相互作用由来と推定された. in vivo での抗がん活性を, 大腸がん colon26 担がんマウス, 骨転移がんラットや腎臓がん ACHN 担がんヌードマウスで検討したところ, シスプラチンやスニチニブよりも小さな腫瘍体積を示し, 多様ながんに効くことが示された. アッセイ期間中体重減少は見られず, 低副作用が示唆された. シスプラチン腎毒性試験についても毒性を示さず, 低副作用の錯体であることが明らかとなった. 優れた抗がん活性源は DNA への結合とは異なり, プロテアソーム阻害が主と推定された. このことは, シスプラチン耐性がん細胞に対して非耐性がんと同様な増殖抑制効果を示したことから支持された. 従って, シスプラチンの抗がん効果にはシスプラチン結合 DNA-HMG のプロテアソーム阻害が含まれているかもしれない.

(3) P03---NH 水素結合含有(シスプラチン or オキサリプラチン)n(IP6)

(シスプラチン or オキサリプラチン)n(IP6)のリン酸 - アミン間水素結合はリン酸基の pKa 値の減少から推定された. 非常に長い半減期も強い配位子間相互作用を裏付けていた. IC50 値測定において 1 本鎖修復酵素を持つがん細胞と持たないがん細胞間の感受性の差から(シスプラチン)(IP6)は 1 本 DNA 鎖にのみ結合し, (オキサリプラチン)(IP6), はシスプラチン同様, DNA 鎖間結合を含んでいることが明らかとなった. 鎖間

結合はより強力な細胞増殖抑制効果 (低い IC50) を示し, シスプラチンの作用機構解明の一助となった. 1 本鎖結合はがん細胞による感受性の差が小さいが, 鎖間では差が大きくなることも確認された. IC50 値から単核, 複核, 三核の順に増殖抑制効果が強くなるともに, 核酸 GMP との反応速度も速くなり, シスプラチン同様, 核酸標的と考えられた. 三核白金錯体ではシスプラチンを超える抑制効果が見られた. in vivo では, 骨転移がんラットの腫瘍体積を対照抗がん剤であるシスプラチンよりも減少させると同時に, 骨転移特有の疼痛を緩和させた. 水素結合による白金錯体の骨成分ヒドロキシアパタイトへの吸着が骨への集積となっていることが白金の動態解析から確認でき, 骨関連がんへの有用なアプローチを確立した. また, 腎毒性は認められず, 低副作用であることが確認された.

(4) ポルフィリン含有多核シスプラチン化合物 4 シスプラチン - テトラピリジルポルフィリン

光照射下での一重項酸素 1O_2 発生量がポルフィリン近傍に白金があると増加することを認めた. 白金がポルフィリン同士の会合をブロックし, 光エネルギーがポルフィリンに蓄積したためと推定された. がん細胞増殖抑制効果は Colon26, LS180 で 0.1-0.2 μ M とシスプラチンの 2-5 μ M より 1 オーダー高かった. 非光照射下ではシスプラチンの 3-6 μ M に対し, 10-100 以上 μ M と 1 オーダー低く, 光の ON/OFF による選択的治療に適した性質を示した. 特に Ga ポルフィリンに大きな選択性があり, ポルフィリンまたは金属ポルフィリンとシスプラチン間に弱い相互作用が示唆される. 光照射による in vivo での抗がん活性を, 大腸がん colon26 担がんマウスで検討したところ, 2 週間後のコントロールが 6 倍増加に対しほとんど同じ腫瘍体積を示し, 非常に良好なアッセイ結果が示された.

アッセイ期間中体重減少は見られず，低副作用が示唆された．白金の臓器集積性はポルフィリンが活躍する肺に多く，24hr 後に極大を示した後減少し，長い体内滞留性が特徴的であった．

4．研究の成果

3 項研究の方法に示したように，現臨床で使用されているシスプラチン，オキサリプラチンに IP6 リン酸基との水素結合を導入すると，混合配位子錯体の安定化に加え，骨ヒドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ との吸着に基づく錯体デリバリー，核クロマチンにおけるヒストン脱アセチル化阻害といった機能が付加できることが判明した．シスプラチンにポルフィリンまたはポルフィリン金属錯体を結合させて，光エネルギーによる一重項酸素発生を増加させることに成功し，強いがん細胞増殖抑制効果（低い IC50 値）を持たせることに成功した．芳香環スタッキング含有白金錯体の生理的意義は大きく，モデル錯体が示した抗がん高活性は，これまで不明であったシスプラチンの抗がん活性体がシスプラチン結合 DNA-HMG 会合体であり，同時に会合体の受容体（結合して作動するタンパク質）の存在を示唆している．また，芳香環スタッキング含有白金錯体が示した強力なプロテアソーム阻害は本研究により初めて示され，シスプラチンが持つ副作用 - 腎毒性，耐性問題へ有用な解決方法を示している．

非共有結合性相互作用により発現した諸機能は，創薬過程で重要な実験である動物を用いた in vivo アッセイでも有効に働いており，非共有結合性相互作用の金属錯体への導入が創薬ツールとして有用なことが確認できた．

本研究成果の一つとして，芳香環スタッキング含有白金錯体は高校生でも簡単に合成できる特徴を有し，H27, H28 ひらめきときめきサイエンスで成果を紹介したところ，好評を得た．

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 20 件)

Xiaojun Hu, Kazuma Ogawa, Siqiaozhi Li, Tatsuto Kiwada, Akira Odani, Synergistic Effect of Metalation on 4Cisplatin-Porphyrin in Cancer Photodynamic Therapy, *Chemistry Letters*, 査読有, Vol.46(5), 764-766 (2017). doi/abs/10.1246/cl.170095

Xiaojun Hu, Kazuma Ogawa, Tatsuto Kiwada, Akira Odani, Water-soluble metallo-porphyrinates with excellent photo-induced anticancer activity resulting from high tumor accumulation, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 査読有, 170 (2017) 1-7. doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.02.001

K. Ogawa, M. Aoki, T. Fukuda, S. Kadono, T. Kiwada, A. Odani. Complexes of myo-inositol-hexakisphosphate (IP6) with zinc or lanthanum for the decorporation of radiocesium. *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, 65, 261-267(2017). doi.org/10.1248/cpb.c16-00792

A. Sigel, B.P. Operschall, R. Griesser, B. Song, A. Okruszek, A. Odani, T. Katsuta, B. Lippert, H. Sigel, (N7)-Platination and its effect on (N1)H-acidification in nucleoside phosphate derivatives., *Inorganica Chimica Acta*, 査読有, 452:137-151 (2016). doi.org/10.1016/j.ica.2016.02.048

K. Igarashi, N. Yamamoto, K. Hayashi, A. Takeuchi, S. Miwa, A. Odani, H. Tsuchiya, Effectiveness of two novel anionic and cationic platinum complexes in the treatment of osteosarcoma. *Anticancer Agents Med Chem.*, 査読有, 15(3), 390-399 (2015). <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/acamc/2015/00000015/00000003/art00017>

K. Ogawa, J. Yu, A. Ishizaki, M. Yokokawa, M. Kitamura, Y. Kitamura, K. Shiba, and A. Odani, Radiogallium complex-conjugated bifunctional peptides for detecting primary cancer and bone metastases simultaneously. *Bioconjug Chem.*, 査読有, 26(8), 1561-1570 (2015).

DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00186

桜井 弘, 小谷 明, Metal-based Drugs研究の新展開, *Yakugaku Zasshi*, 査読有, 135(4), 543-544(2015).

https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/135/4/135_14-00227-F/_pdf

Development of novel radiogallium-labeled bone imaging agents using oligo-aspartic acid peptides as carriers, K. Ogawa, A. Ishizaki, K. Takai, Y. Kitamura, T. Kiwada, K. Shiba, A. Odani, *PLoS ONE*, 査読有, 8(12):e84335 (2013).

doi.org/10.1371/journal.pone.0084335

Synthesis of antitumor azolato-bridged dinuclear platinum(ii) complexes with in vivo antitumor efficacy and unique in vitro cytotoxicity profiles, S. Komeda, T. Takayama, T. Suzuki, A. Odani, T. Yamori, M. Chikuma, *Metallomics*, 査読有, 5(5):461-8 (2013).

DOI:10.1039/C3MT00040K

〔学会発表〕(計 31 件)

小谷明, 小川数馬, 黄檜達人, 坂口綾, 山田喜美子, 坂林加奈子, 涼風裕生, 松永司, 中家裕美子, 篠原厚, 吉村崇, 高橋成人, 林良彦, 神田晃充, 非共有性結合の導入による白金抗がん剤の開発, 日本分析化学会第65年会, 2016.9.15, 北海道

大学(札幌市)

小谷 明, 白金抗がん剤を例とした金属医薬品開発の試み, 京都大学大学院薬学研究科大学院講義, 2014.6.6, 京都大学(京都市)

小谷 明, 金属医薬品の基礎と新規白金抗がん剤研究の展開, 岐阜薬科大学大学院講義, 2013.10.28, 岐阜薬科大(岐阜市)

山賀靖子, 松岡由貴, 黄檜達人, 小川数馬, 小谷明, 芳香環スタッキングを有するカチオン性新規白金抗がん剤とその抗がん効果, 日本薬学会北陸支部第 126 回例会, 2014.11.16, 北陸大学(金沢市), 学生優秀発表賞

山賀靖子, 松岡由貴, 黄檜達人, 小川数馬, 小谷明, 芳香環スタッキングを有する白金()錯体の特性とその抗がん効果, 第 33 回分析化学中部夏季セミナー, 2014.9.5, いそつば(富山県), 最優秀ポスター発表賞

小谷明, シスプラチンを超えた金属抗がん剤, 中部地区医療・バイオ系シーズ発表会, 2013.12.12, ウィンク愛知(名古屋市)

〔図書〕(計 1 件)

Developments in platinum anticancer drug, B. Tylkowski, R. Jastrzab, A. Odani, in "New-Generation Bioinorganic Complexes",

De Gruyter, 160-173(2016).

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

名称：金属錯体およびこれを含有する抗癌剤

発明者：小谷 明，小川数馬

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2014-207055

出願年月日：2014年10月8日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunseki/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 明 (ODANI, Akira)

金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授

研究者番号：60143913

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小川 数馬 (OGAWA, Kazuma)

金沢大学・新学術創成研究機構・准教授

研究者番号：30347471

黄檗 達人 (KIWADA, Totto)

金沢大学・医薬保健研究域薬学系・助教

研究者番号：50414131

篠原 厚 (SHINOHARA, Atsushi)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：60183050

吉村 崇 (YOSHIMURA, Takashi)

大阪大学・RIセンター・教授

研究者番号：90323336

土屋 弘行 (TSUCHIYA, Hiroyuki)

金沢大学・医薬保健研究域医学系・教授

研究者番号：40227434

山本 憲男 (YAMAMOTO, Norio)

金沢大学・医薬保健研究域医学系・

特任教授

研究者番号：90332668

松永 司 (MATSUNAGA, Tsukasa)

金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授

研究者番号：60192340

(4) 研究協力者

シーゲル ヘルムート (SIGEL, Helmut)

ジャストラザブ リナタ

(JASTRZAB, Renata)

メッソリ ルイギ (MESSORI, Luigi)

五十嵐 健太郎 (IGARASHI, Kentaro)