

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460047

研究課題名(和文)細胞イメージングによる白金4価錯体の輸送・代謝動態の解明

研究課題名(英文) Determination of intra-cellular dynamics of platinum(IV) complexes using imaging technique

研究代表者

小嶋 仲夫 (Kojima, Nakao)

鈴鹿医療科学大学・医用工学部・その他

研究者番号：80333178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：白金4価[Pt(IV)]錯体は、抗がん性白金2価[Pt(II)]錯体のプロドラッグであり、Pt(II)錯体シスプラチンの耐性化問題を克服できることが期待されている。本研究では、シスプラチン感受性あるいは耐性をもつヒト卵巣がん細胞を用いて、Pt錯体の細胞内動態、Pt(IV)錯体による耐性克服機構の解明を試みた。その結果、シスプラチンのPt(IV)錯体であるcis-Pt(IV)の細胞内動態は、シスプラチンと同一であるが、シスプラチン耐性ヒト卵巣がん細胞に対して細胞障害性を示し、その過程で活性酸素種を産生していることが明らかとなった。この成果は、Pt(IV)錯体の最適化に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Platinum(IV) [Pt(IV)] complexes are one of the attractive next-generation anticancer drugs. Beside Pt(II)-based drugs such as cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin, Pt(IV) complexes show less adverse effects and can be administrated orally. In addition, because Pt(IV) complexes adopt octahedral coordination geometry, it also have an advantage that can be coordinated with more functional ligands than Pt(II) complexes. These different features prompted us to investigate the effectiveness of Pt(IV) complexes on cisplatin-resistant cancer cells with its mechanisms. This study aims to elucidate the anti-cancer effects of Pt(IV) complexes.

研究分野：衛生薬学

キーワード：白金4価錯体 活性酸素種 酸化ストレス グルタチオン 薬物耐性 タイムラプス解析 ヒト卵巣がん

1. 研究開始当初の背景

シスプラチン(図1)は白金2価錯体の中でも極めて有用性が高い抗がん剤であるが、患者は過酷な副作用に直面する。一方、近年臨床研究が進んでいる白金4価錯体(サトラプラチン、図1)は化学的に安定であり経口投与が可能であるとともに、シスプラチンに見られる腎臓・中枢神経系への毒性が低いという利点がある。しかしながら、第3相臨床試験においてサトラプラチンは一定の効果(がん進行抑制、疼痛軽減)は確認されたものの、生存率の上昇は認められていないため開発が中断されている(J. Clin. Oncol. 27, 5431-5438, 2009)。その他の臨床試験段階にある白金4価錯体 LA-12(図1)はサトラプラチンと類似の構造を持ち、シスプラチンおよびサトラプラチンとは異なる抗がんスペクトルを示す(J. Med. Chem. 47, 761-763, 2004; Anticancer Drugs 15, 537-543, 2004; Mol. Cancer 9, 147, 2010)。LA-12の有効性に関しては臨床試験の結果が待たれるものの、サトラプラチンの事例から考えると、白金4価錯体の性能を最大限発揮するためには薬理作用を決定づける新規配位子の開発が必要である。

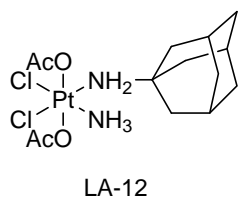
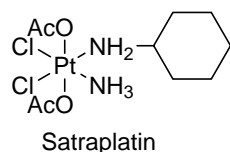
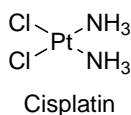


図1. シスプラチンおよび白金4価錯体

2. 研究の目的

本研究課題では、白金4価錯体の抗がん活性を規定する配位子の最適化を目指し、その前段階として白金4価錯体が持つ白金2価錯体とは異なる抗がん機構を明らかにすることを目的とした。抗がん機構の解析には、各種バイオイメージング技術を利用し、細胞応答をリアルタイムにモニターするための方法論を確立、その分子機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 試薬

cis-ジアンミン-テトラクロロ-白金(IV) [*cis*-Pt(IV)、99%]および *trans*-ジアンミン-テトラクロロ-白金(IV) [*trans*-Pt(IV)、

98%]は Strem Chemicals, Inc (Newburyport, MA, USA)、シスプラチン [*cis*-Pt(II)]およびトランスプラチン [*trans*-Pt(II)]、ジエチレントリアミン-*N,N,N',N'',N''*-五酢酸(DTPA)、アスコルビン酸(AsA)、還元型グルタチオン(GSH)は和光純薬工業(大阪)、メナジオンはナカライテスク(京都)、2'-(4-エトキシフェニル)-5-(4-メチル-1-ピペラジニル)-2,5'-ビ-1H-ベンズイミダゾール三塩酸塩溶液(Hoechst 33342)は Lonza (Basel, Switzerland)、ミトコンドリア膜電位検出試薬[テトラメチルローダミンメチルエステル(TMRM)]および活性酸素種(ROS)検出試薬(CellROX Green Reagent)は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)、Muse™ Oxidative Stress Reagent および Muse™ Mito Potential Dye、Muse™ 7-AAD は Merck Millipore (Billerica, MA, USA) から、それぞれ購入した。

(2) 細胞培養

ヒト卵巣がん細胞(A2780)およびそのシスプラチン耐性株(A2780cis)は European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) から入手した。

A2780 および A2780cis 細胞は 10%ウシ胎児血清(ニチレイバイオサイエンス、東京)および 1%ペニシリン/ストレプトマイシン(和光)を含む RPMI1640 培地(和光)を用いて維持し、37 °C/5% CO₂条件下のインキュベーター内で培養した。A2780cis は耐性能を維持するために、2-3 回の継代毎にシスプラチンを最終濃度 1 μM となるよう培地に添加した。

(3) アガロースゲル電気泳動

二本鎖 DNA と白金錯体との相互作用を検証するために、アガロースゲル電気泳動を実施した。本法では、白金錯体による DNA 架橋形成が臭化エチジウムの DNA インターカレーションを阻害することに着目して評価した。白金錯体(100 μM)および還元性物質(100-400 μM)、仔牛胸腺 DNA(100 μM base)を 4 mM リン酸緩衝液(pH 7.8、5 μM DTPA) 400 μL に溶解し、37 °C、24 時間培養した。反応後、200 μM DTPA を加えて試験溶液とし、1%アガロースゲル電気泳動により分離した。

(4) 円偏光二色性(CD)スペクトル

白金化合物の結合に起因する二本鎖 DNA の構造的変化を CD スペクトル測定によって明らかにした。仔牛胸腺 DNA(100 μM base)を白金錯体(100 μM)および AsA(200 μM)とともに培養し、サンプル溶液を調製した。CD スペクトルの測定には、CD 分光光度計(J-725、日本分光、東京)を使用した。CD スペクトルの測定条件は次のとおりである、光路長 1 cm、波長範囲 240-320 nm、バンド幅 1.0 nm、感度 200 mdeg、分解能 0.5 nm、レスポンス 2 秒、スピード 200 nm/min。

(5) 細胞生存試験

細胞生存率の測定には、蛍光細胞生存率測定試薬を用いた。細胞を 96 ウェルプレート

に 10,000 細胞/100 μL /ウェルの密度で播種した。24 時間培養後、白金錯体を目的濃度に達するように添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 72 時間培養した。細胞生存率は、蛍光強度から算出した。

(6) ICP-MS による Pt の定量

誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) (アジレントテクノロジー社、Santa Clara, CA, USA) を用いて Pt 量を定量した。A2780 および A2780cis を 6 ウェルプレート (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、Waltham, MA, USA) に 1.0×10^6 個ずつ播種し 24 時間培養した。その後、Pt 錯体 (5 μM) 200 μL を添加した。1 時間培養後、Ca/Mg 不含-リン酸緩衝液 (PBS(-)) で洗浄し 0.1w/v% トリプシン-1 mM EDTA 溶液を用いて細胞を回収した。細胞数はセルカウンター (Scepter 2.0, Merck Millipore) を用いてカウントした。細胞ペレット (1.0×10^6 個) に対して硝酸 (61%) を 200 μL 加えて分解し、最終的に硝酸濃度が 2% になるように希釈し、ICP-MS 分析に供した。

(7) 細胞の分画

各オルガネラ分画 (核、ミトコンドリア、細胞質) の Pt 蓄積量を測定するために、細胞を分画した。細胞に Pt 錯体を 4 時間処理したのちトリプシン-EDTA 処理により細胞を回収し、 1×10^7 個の細胞を用いた。オルガネラ分画には、細胞分画キット (EzSubcell Fraction, アト株式会社、東京) を用いて実施した。得られたオルガネラ分画は、第(6)項と同様に硝酸を用いて回収し、硝酸終濃度を 2% として ICP-MS 分析に供した。

(8) ライブコンテンツイメージング法によるカスパーゼ 3/7 活性および細胞死のリアルタイム測定

白金錯体による細胞障害性について、細胞内カスパーゼ 3/7 活性およびヨウ化プロピジウム (PI) 染色性を指標に評価した。細胞をイメージング用 96 ウェルプレートに 1.0×10^4 細胞/100 μL /ウェルとなるように播種し、24 時間培養した。その後、Pt 錯体 (終濃度 1 あるいは 2.5、5、10、20、40、60、80、100 μM) および陽性コントロールとしてエトポシド 100 μM を添加した。さらに、細胞内イベントの観察のために、死細胞染色薬 PI (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびカスパーゼ 3/7 基質 CellEvent (1 μM) を加え、生細胞イメージングシステム (IncuCyte ZOOM, エッセンバイオサイエンス社、Ann arbor, MI, USA) 内に設置した。その後、48 時間まで 1 時間毎に位相差像、カスパーゼ-3/7 活性 (緑色蛍光像)、PI 染色による死細胞 (赤色蛍光像) を撮影した。その後、IncuCyte ZOOM 2013B (エッセンバイオサイエンス社) のソフトウェアにて解析した。

(9) ハイコンテンツイメージング法による細胞内 ROS 生成およびミトコンドリア膜電位のリアルタイム測定

細胞内 ROS 生成をスーパーオキシドアニオンラジカルおよびヒドロキシラジカル特異的蛍光試薬によって、ミトコンドリア膜電位

を TMRM によってタイムラプス測定した。細胞をイメージング用 96 ウェルプレートに 1.5×10^4 細胞/100 μL /ウェルとなるように播種し、24 時間培養した。その後、Pt 錯体 (100 μM) および陽性コントロールとしてメナジオン (100 μM) を添加した。続いて、全細胞の染色試薬 Hoechst 33342 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および活性酸素蛍光指示薬 CellROX Green Reagent (5 μM)、TMRM (50 nM) を加え、ハイコンテンツイメージングシステム (ImageXpress Micro, モレキュラーデバイス社、Sunnyvale, CA, USA) にセットアップした。Hoechst 33342 染色による細胞核を青色蛍光像、CellROX Green Reagent に検出される ROS を緑色蛍光像、TMRM に検出されるミトコンドリア膜電位を赤色蛍光にて撮影した。その後、MetaXpress Image Analysis Version 5.1 (モレキュラーデバイス社) を用いて解析した。

(10) フローサイトメトリーによる細胞内 ROS およびミトコンドリア膜電位の測定

細胞内 ROS としてスーパーオキシドアニオンラジカル特異的蛍光指示薬 (Muse Oxidative Stress Reagent) およびミトコンドリア膜電位測定試薬 (Muse Mito Potential Dye) を用いて、細胞内イベントを測定した。フローサイトメーターとして、細胞解析装置 (Muse Cell analyzer, メルクミリポア社) を用いて細胞数と細胞内 ROS およびミトコンドリア膜電位を測定した。その後、Muse 1.4 Analysis (メルクミリポア社) を用いて解析した。

(11) 細胞内グルタチオンレベルの測定

白金錯体を一定時間処理した細胞をトリプシン-EDTA 処理により回収し、10 mM 塩酸水溶液を加えて液体窒素で凍結融解を繰り返すことで細胞を破碎した。解凍したサンプルに 5-スルホサリチル酸二水和物を 0.5% となるように加えた。グルタチオンの測定には、グルタチオン測定キット (GSSG/GSH Quantification Kit, 同仁化学社、熊本) の手順に従いマイクロプレートリーダーにて 405 nm の吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) DNA 結合活性の測定

白金錯体の DNA 結合活性を 2 つの方法 (アガロースゲル電気泳動法および CD スペクトル測定) により評価した (図 2、発表論文より引用)。cis-Pt(IV) および trans-Pt(IV) 自身は DNA と Pt との結合に影響を及ぼさないが、AsA 共存下で強い DNA 結合性を示した (図 2A)。CD スペクトル測定において、アガロースゲル電気泳動の結果と同様に AsA は Pt(IV) 錯体の DNA 結合性を惹起した。また、DNA 結合によるスペクトル変化はそれぞれの Pt(II) 錯体と同様のパターンであることから、Pt(IV) 錯体は AsA により Pt(II) へと還元されて DNA 結合性を獲得していると考えられる (図 2B)。

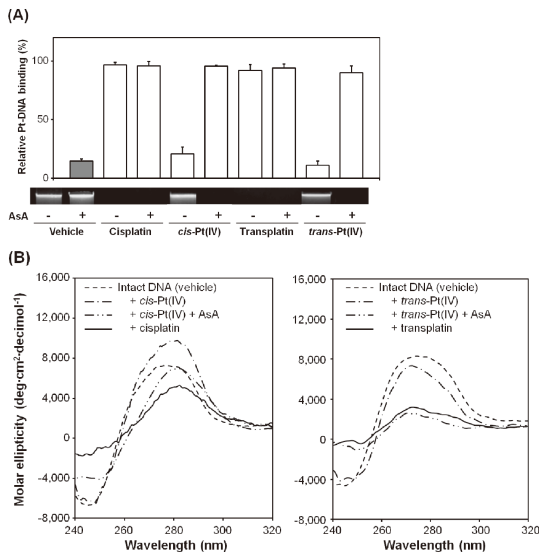


図 2. アガロースゲル電気泳動 (A) および CD スペクトル測定 (B) による DNA-白金結合の評価

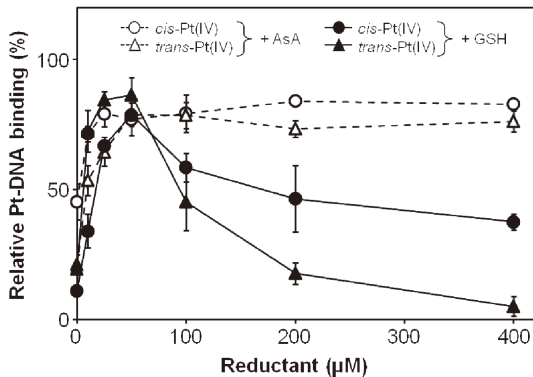


図 3. 生体内還元物質の用量依存的な白金の DNA 結合性変化

AsA に加えて、生体内還元物質である GSH による還元作用についても評価した (図 3、発表論文 より引用)。その結果、AsA は用量依存的に Pt(IV) 錯体の DNA 結合性を増強し、GSH については 50 μM をピークにその後抑制された。

(2) 細胞生存率の減少

細胞障害性の程度は、次の順序であった：*cis*-Pt(IV) > シスプラチン > *trans*-Pt(IV) > > トランスプラチン。したがって、*cis*-Pt(IV) は、シスプラチンにはない特有の細胞障害作用を示すことが示唆された。

(3) 細胞内 Pt 動態

細胞内への Pt 蓄積について評価した結果、A2780 細胞に比べて A2780cis 細胞では明らかに Pt 蓄積量が高かった (未発表データにつき、データは示していない)。このとき、シスプラチンおよび *cis*-Pt(IV) 錯体は、いずれも同様の取り込みレベルであったことから、*cis*-Pt(IV) 錯体による高い細胞障害性には細胞内への Pt 蓄積量は影響していないことが示唆された。一方、一定濃度の Pt 錯体を処理した後、細胞内 Pt 量の減少を評価した

ところ、細胞内取り込みと同様に、シスプラチンおよび *cis*-Pt(IV) 錯体間に明らかな差は見られなかった。さらに、細胞内での Pt のオルガネラ分布挙動を測定した結果、シスプラチンおよび *cis*-Pt(IV) 錯体間に明らかな差は見られなかった。以上のことから、*cis*-Pt(IV) 錯体による高い細胞障害性には、細胞内の Pt 動態は関与していないことが示唆された。

(4) ライブコンテンツイメージングによるカパーゼ 3/7 活性および細胞死の変化

シスプラチンは DNA 結合を形成することによりアポトーシスを誘導すると報告されているため、A2780 および A2780cis 細胞を用いてシスプラチンおよび *cis*-Pt(IV) 錯体のアポトーシスおよび細胞死誘導についてタイムラプス法により経時的に測定した。両細胞において *cis*-Pt(IV) はシスプラチンよりもアポトーシスのシグナルである caspase-3/7 活性を強く誘導した (未発表データにつき、データは示していない)。さらに caspase-3/7 活性の上昇に伴い死細胞数も増加した。以上より *cis*-Pt(IV) はシスプラチンよりも強くアポトーシスによる細胞死を誘導することが示唆された。以上のように、細胞内 Pt 動態に差は認められなかったが、細胞障害作用は *cis*-Pt(IV) において明らかに高かったことから、Pt(IV) 錯体特有の作用機序の存在が示唆された。

(5) 細胞内 ROS レベルの変化

A2780 および A2780cis におけるシスプラチンおよび *cis*-Pt(IV) 処理後の細胞内 ROS レベルを生細胞蛍光イメージング法およびフローサイトメトリー法により評価した (未発表データにつき、データは示していない)。シスプラチンは両細胞株の ROS レベルに影響を与えなかったが、*cis*-Pt(IV) は A2780cis において 6 時間の時点から ROS レベルの上昇を誘導した。*cis*-Pt(IV) による A2780cis 細胞死誘導は Pt 処理後約 10 時間を要するが、ROS レベルの上昇はこの細胞死に先行して観察されたことから、*cis*-Pt(IV) が高い細胞障害性を示す原因のひとつには、細胞内での酸化ストレス誘導が関与している可能性が考えられる。

(6) ミトコンドリア膜電位の変化

cis-Pt(IV) による細胞内 ROS 上昇がミトコンドリアからの ROS の漏出が関与しているかどうかを確認するために、ミトコンドリアの膜電位を測定して、ミトコンドリアの機能変化を測定した。ミトコンドリア膜電位は、生細胞蛍光イメージング法およびフローサイトメトリー法により評価した。*cis*-Pt(IV) は A2780cis に対して ROS の生成が見られた時点において、ミトコンドリア膜電位に影響を与えなかった (未発表データにつき、データは示していない)。したがって、*cis*-Pt(IV) による ROS 産生は、ミトコンドリアからの漏出ではないことが示唆された。

(7) 細胞内 GSH レベルの変化

細胞内の主要な抗酸化物質であり、ROS 消去に重要な役割を果たす GSH レベルを測定した。GSH 量の測定には、チオール基比色定量試薬を用いた酵素リサイクリング法により実施した。シスプラチンは、今回の処理時間において GSH レベルに明らか影響を及ぼさなかったが、*cis*-Pt(IV)は A2780cis 細胞内 GSH レベルの低下を引き起こした(未発表データにつき、データは示していない)。したがって、*cis*-Pt(IV)による細胞内 ROS の上昇には、細胞内 GSH 減少が関係していることが示唆された。

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 5 件)

Yuki Taniguchi, Takao Tobe, Hideyuki Hayami, Yoshinori Okamoto, Koji Ueda, Tatsuyuki Takada, Nakao Kojima, Neural differentiation of pluripotent stem cells and application for metal-induced neural toxicity study, *Yakugaku Zasshi*, 査読有、134 巻、2014、793-795

DOI:10.1248/yakushi.14-00017-3

Koji Ueda, Rena Makino, Takao Tobe, Yoshinori Okamoto, Nakao Kojima, Effects of organic and inorganic mercury(II) on gene expression via DNA conformational changes, *Fund. Toxicol. Sci.*, 査読有、1 巻、2014、73-79

DOI:

http://www2.e-kenkyu.com/fts_journal/papers?number=2&volume=1&year=2014
Yoshinori Okamoto, Takao Tobe, Koji Ueda, Tatsuyuki Takada, Nakao Kojima, Oral administration of Brazilian propolis exerts estrogenic effect in ovariectomized rats, *J. Toxicol. Sci.*, 査読有、40 巻、2015、235-242

DOI: 10.2131/jts.40.235.

Takao Tobe, Koji Ueda, Motozumi Ando, Yoshinori Okamoto, Nakao Kojima, Thiol-mediated multiple mechanisms centered on selenodiglutathione determine selenium cytotoxicity against MCF-7 cancer cells, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 査読有、20 巻、2015、687-694

DOI:10.1007/s00775-015-1254-6.

Yoshinori Okamoto, Tsuyoshi Nakai, Motozumi Ando, Koji Ueda, Nakao Kojima, Induction of the anticancer effects of cisplatin platinum(IV) derivatives against cisplatin-resistant human ovarian cancer cells, *J. Res. Inst. Meijo Univ.*, 査読有、12 巻、2013、35-41
DOI:N/A

[学会発表](計 10 件)

岡本誉土典, 植田康次, 小嶋仲夫, 神野透人、白金 4 価錯体によるシスプラチン耐性ヒト卵巣がん細胞障害作用への活性酸素種生成の寄与、日本酸化ストレス学会東海支部・第 4 回学術集会、2016 年 2 月 6 日、鈴鹿医療科学大学白子キャンパス(鈴鹿)

戸邊隆夫、清水崇光、棚橋侑也、野中志保、岡本誉土典, 植田康次, 神野透人、Cisplatin 耐性がん細胞に対する *cis*-Pt(IV)の細胞障害性と活性酸素種生成、メタルバイオサイエンス研究会 2015、2015 年 8 月 28 日、名古屋国際センタービル(名古屋)

戸邊隆夫、清水崇光、野中志保、植田康次, 岡本誉土典, 小嶋仲夫, 神野透人、*cis*-Diammine-tetrachloro-platinum(IV)は活性酸素種生成を介してシスプラチン耐性ヒト卵巣がん細胞に障害作用を引き起こす、第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会、2015 年 6 月 11 日、かごしま県民交流センター(鹿児島)

Yoshinori Okamoto, Takao Tobe, Koji Ueda, Nakao Kojima, Anti-cancer effect of platinum(IV) complex against cisplatin-resistant human ovarian cancer, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015、2015 年 4 月 21 日、フィラデルフィア(アメリカ合衆国)

Takao Tobe, Karin Shimizu, Miki Motoyama, Koji Ueda, Yoshinori Okamoto, Nakao Kojima, Anti-cancer effects of Pt(IV) complex in cisplatin-resistant ovarian cancer cells, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference、2014 年 8 月 27 日、チューリッヒ(スイス)

戸邊隆夫、清水香琳、本山美貴、植田康次, 岡本誉土典, 小嶋仲夫, Molecular mechanism analysis of cytotoxicity induced by platinum(IV) complexes against cisplatin-resistant human ovarian cancer, 第 41 回日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月 3 日、神戸コンベンションセンター(神戸)

清水崇光、戸邊隆夫、清水香琳、本山美貴、岡本誉土典, 植田康次, 小嶋仲夫, Cytotoxicity of Pt(IV) complexes against cisplatin-resistant human ovarian cancer cells -Potential role of reactive oxygen species-, 第 24 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム SRM2014、2014 年 6 月 14 日、京都薬科大学(京都)

清水香琳、戸邊隆夫、臼井健悟、徐佳典、植田康次, 岡本誉土典, 小嶋仲夫, Pt(IV)錯体の配位子依存的がん細胞障害

性と細胞内分布挙動、フォーラム 2013 :
衛生薬学・環境トキシコロジー、2013 年
9 月 13 日、九州大学医学部 (福岡)
戸邊隆夫、臼井健吾、徐 佳典、植田康
次、岡本 誉土典、小嶋 仲夫、
Ligand-dependent influx/efflux
pattern of Pt(IV) complexes and their
relevance to cytotoxicity in human
ovarian cancer cells、第 23 回金属の関
与する生体関連反応シンポジウム
SRM2013、2013 年 6 月 21、武蔵野大学薬
学部 (武蔵野)
岡本 誉土典、臼井健吾、徐 佳典、清水
香琳、本山美貴、植田康次、小嶋仲夫、
白金 4 価錯体による酸化的遺伝子損傷お
よび配位子依存性、第 66 回日本酸化スト
レス学会学術集会、2013 年 6 月 13 日、
ウインクあいち (名古屋)

〔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
<http://www2.meijo-u.ac.jp/~jinno/cms/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 仲夫 (KOJIMA, Nakao)
鈴鹿医療科学大学・医用工学部・
非常勤講師
研究者番号 : 8 0 3 3 3 1 7 8

(2) 研究分担者

植田 康次 (UEDA, Koji)
名城大学・薬学部・助教
研究者番号 : 3 0 3 5 1 0 9 2

岡本 誉土典 (OKAMOTO, Yoshinori)

名城大学・薬学部・助教
研究者番号 : 5 0 5 1 2 3 2 3

(3) 連携研究者
該当なし