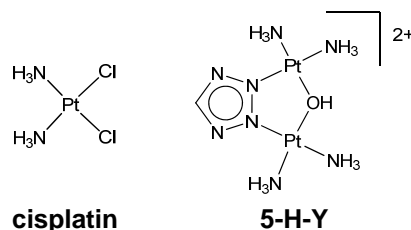


氏名	植村 雅子 <small>うえむら まさこ</small>
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	論博薬科第72号
学位授与の日付	平成27年11月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	制がんテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の DNA との相互作用および細胞内取り込みに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 福永 理己郎 (副査) 教授 辻坊 裕 (副査) 教授 土井 光暢 (副査) 教授 三野 芳紀

## 論文内容の要旨

シスプラチン (Ⅱ) に代表される白金制がん剤は、*cis* 型白金(II)単核構造を基本骨格とする電氣的に中性な錯体である。これらは DNA 上で核酸塩基と共有結合し、架橋を形成することによって制がん活性を初動すると考えられている。現在、開発が望まれている次世代白金制がん剤には、副作用の軽減に加えて、「シスプラチン耐性がん」に対する高い治療効果が求められている。有望な候補化合物として、テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体  $[\{cis-Pt(NH_3)_2\}_2(\mu-OH)(\mu-5-R-tetrazolato-N2,N3)]^{n+}$  (テトラゾラト架橋錯体) が挙げられる。テトラゾラト架橋錯体は、従来の白金制がん剤とは異なり、白金(II)二核構造を有するカチオン性錯体である。従って、テトラゾラト架橋錯体は、DNA との共有結合性および非共有結合性の両方の相互作用によって、DNA と結合することが示唆されている。テトラゾラト架橋錯体のリード化合物である **5-H-Y** (Ⅱ、R = H、n = 2) は、マウス移植腺がんに対して顕著な *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮し、シスプラチン耐性がんにも *in vitro* で有効であることが報告されている。一方で、テトラゾラト架橋錯体の作用機序については、不明な点が多いのも事実である。本研究では、テトラゾラト架橋錯体の作用機序の一端を解明するため、**5-H-Y** に加えて、**5-H-Y** の

結合異性体である **5-H-X** [ $\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-5-H-tetrazolato-}N1,N2)\}^{2+}$ ] および **5-H-Y** の誘導體である **5-Me** (R = CH<sub>3</sub>, n = 2)、**5-Phe** (R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, n = 2)、**5-EtAc** (R = CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, n = 2)、**5-Ace** (R = CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>, n = 1) を用いて、標的分子と推定される DNA との相互作用および細胞内取り込みについて、詳細に検討を行った。



第一章では、テトラゾラト架橋錯体と DNA の共有結合性相互作用について述べている。核酸塩基誘導體 9-エチルグアニン (9EtG) との共有結合性相互作用および反応速度を、NMR 分光法および質量分析法によって解析した結果、次の二点が明らかになった。(1) テトラゾール 5 位の置換基の種類に拘わらず、テトラゾラト架橋錯体は二分子の 9EtG と結合する過程で異性化される。(2) 反応速度は、置換基によって大きな影響を受けない。続いて、仔ウシ胸腺 DNA 上に形成される共有結合性付加物を、ICP-MS を用いて定量した。反応 120 時間における共有結合性付加物の量は、シスプラチンの方が **5-H-Y** より 3.5 倍多かったことから、**5-H-Y** よりシスプラチンの方が、二本鎖 DNA と共有結合する能力が高いことが確認された。

第二章では、DNA との共有結合性および非共有結合性相互作用について述べている。濃度の異なるテトラゾラト架橋錯体を加えた仔ウシ胸腺 DNA 溶液の円二色性スペクトルを測定し、DNA の二次構造変化を観察したところ、①温度非依存性で迅速な相互作用、および、②温度依存性で比較的緩慢な相互作用の二種類の相互作用が観測された。①は非共有結合性相互作用、②は共有結合性相互作用による可能性が高いと推定された。電荷が+1 の **5-Ace** は、①の変化をほとんど示さなかったことから、この相互作用には、化合物の電荷の大きさに影響を受ける静電的相互作用の関与が考えられる。次に、テトラゾラト架橋錯体が、どの程度の濃度で T4 phage DNA の高次構造変化 (凝縮) を引き起こすかを、蛍光顕微鏡を用いて観察した。凝縮能の高さは、**5-Ace** ≈ **5-H-Y** > **5-Me** > **5-EtAc** > **5-Phe** の順に小さくなった。+1 に帯電している **5-Ace** が他のテトラゾラト架橋錯体を凌ぐ凝縮能を示したことから、凝縮を引き起こす非共有結合性相互作用は、単なる静電的な相互作用ではないことが示唆された。

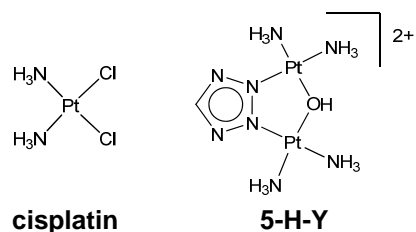
第三章では、*in vitro* がん細胞増殖抑制活性 (*in vitro* 活性) および細胞内取り込みについて述べている。一連のテトラゾラト架橋錯体の L1210 マウス白血病細胞およびそ

のシスプラチン耐性細胞に対する *in vitro* 活性を、MTT Assay によって明らかにした。**5-H-Y** および **5-Me** の *in vitro* 活性は、シスプラチン耐性細胞においてシスプラチンの約 46 倍と非常に高く、また、かさ高い置換基を有する **5-H-Y** 誘導体ほど *in vitro* 活性が低下するという傾向が見られた。さらに、ほとんどのテトラゾラト架橋錯体がシスプラチン耐性を克服していた。興味深いことに、**5-Ace** 以外のテトラゾラト架橋錯体において、*in vitro* 活性と DNA 凝縮能との間に相関が見られた。一方、DNA 凝縮能が最も高い **5-Ace** がほとんど *in vitro* 活性を示さないという結果から、テトラゾラト架橋錯体の *in vitro* 活性を左右する要因は、DNA との相互作用以外にも存在すると考え、両細胞におけるテトラゾラト架橋錯体の細胞内取り込み量を、ICP-MS を用いて経時的に観察した。**5-Ace** を除くテトラゾラト架橋錯体では、両細胞において、シスプラチンより多く細胞内に取り込まれていた。特に、その傾向は、シスプラチン耐性細胞において強く、最も多く取り込まれていた **5-H-Y** および **5-Me** では、シスプラチンをこれらの 10 倍の暴露濃度で作用させた場合と比較しても、cisplatin より約 11 倍多く細胞内に取り込まれていた。従って、テトラゾラト架橋錯体の高効率な細胞内取り込みが、これらの錯体のシスプラチン耐性の克服に寄与していると考えられる。また、**5-Ace** は細胞内にほとんど取り込まれておらず、**5-Ace** の *in vitro* 活性が著しく低かった原因は、標的分子である DNA が存在する核内に到達できなかったことによると推察された。この結果から、十分な量の **5-Ace** が核内に到達すれば、DNA と強く相互作用することが予想され、**5-Ace** はプロドラッグの分子設計に応用できると考えられる。

本研究で明らかになった、テトラゾラト架橋錯体の DNA との相互作用および細胞内取り込みは、一連のテトラゾラト架橋錯体の構造活性相関を裏付ける重要な資料となった。本研究で得られた成果は、新しい制がんメカニズムの提唱および次世代白金制がん剤の開発に大きく貢献すると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

シスプラチン(図)に代表される白金制がん剤は、*cis* 型白金(II)単核構造を基本骨格とする電氣的に中性な錯体である。これらは DNA 上で核酸塩基と共有結合し、架橋を形成することによって制がん活性を初動すると考えられている。現在、開発が望まれている



ている次世代白金制がん剤には、副作用の軽減に加えて、「シスプラチン耐性がん」に対する高い治療効果が求められている。有望な候補化合物として、テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体  $[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-5-R-tetrazolato-}N2,N3)]^{2+}$  (テトラゾラト架橋錯体) が挙げられる。テトラゾラト架橋錯体は、従来の白金制がん剤とは異なり、白金(II)二核構造を有するカチオン性錯体である。従って、テトラゾラト架橋錯体は、DNA との共有結合性および非共有結合性の両方の相互作用によって、DNA と結合することが示唆されている。テトラゾラト架橋錯体のリード化合物である **5-H-Y** (図、 $R = H$ ,  $n = 2$ ) は、マウス移植腫瘍がんに対して顕著な *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮し、シスプラチン耐性がんにも *in vitro* で有効であることが報告されている。一方で、テトラゾラト架橋錯体の作用機序については、不明な点が多いのも事実である。

以上の背景のもと、植村雅子君はテトラゾラト架橋錯体の作用機序の解明を目的に、**5-H-Y** 及びその結合異性体である **5-H-X**  $[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-5-H-tetrazolato-}N1,N2)]^{2+}$  , また **5-H-Y** の誘導體である **5-Me** ( $R = \text{CH}_3$ ,  $n = 2$ )、**5-Phe** ( $R = \text{C}_6\text{H}_5$ ,  $n = 2$ )、**5-EtAc** ( $R = \text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ,  $n = 2$ )、**5-Ace** ( $R = \text{CH}_2\text{COO}^-$ ,  $n = 1$ ) を用いて、標的分子と推定される DNA との相互作用および細胞内取り込みについて、詳細に検討を行った。

第一章では、テトラゾラト架橋錯体と DNA の共有結合性相互作用について解析した。核酸塩基誘導體 9-エチルグアニン (9EtG) との共有結合性相互作用および反応速度を、NMR 分光法および質量分析法によって解析し、(1) テトラゾール 5 位の置換基の種類に拘わらずテトラゾラト架橋錯体は二分子の 9EtG と結合する過程で異性化されること、(2) 反応速度は置換基によって大きな影響を受けないことを示した。さらに、仔ウシ胸腺 DNA 上に形成される共有結合性付加物を ICP-MS で定量し、**5-H-Y** よりシスプラチンの方が二本鎖 DNA と共有結合を形成する能力が高いことを示した。

第二章では、DNA との共有結合性および非共有結合性の相互作用について解析した。

濃度の異なるテトラゾラト架橋錯体を加えた仔ウシ胸腺 DNA 溶液の円二色性スペクトル測定によって DNA の二次構造変化を観察した。その結果、①温度非依存性で迅速な相互作用、および、②温度依存性で比較的緩慢な相互作用の二種類の相互作用を観測し、①は非共有結合性相互作用、②は共有結合性相互作用による可能性が高いと推定した。電荷が+1 の **5-Ace** が①の変化をほとんど示さなかったことから、この相互作用には静電的相互作用の関与が大きいと推察した。さらに、テトラゾラト架橋錯体による T4 phage DNA の高次構造変化（凝縮）について蛍光顕微鏡を用いて観察し、**5-Ace**  $\approx$  **5-H-Y**  $>$  **5-Me**  $>$  **5-EtAc**  $>$  **5-Phe** の順で凝縮能を有することを示した。+1 に帯電している **5-Ace** が他のテトラゾラト架橋錯体を凌ぐ凝縮能を示したことから、凝縮を引き起こす非共有結合性相互作用は、単なる静電的な相互作用ではないことが示唆された。

第三章では、*in vitro* がん細胞増殖抑制活性 (*in vitro* 活性) および細胞内取り込みについて解析した。L1210 マウス白血病細胞およびそのシスプラチン耐性細胞に対する一連のテトラゾラト架橋錯体の *in vitro* 活性を MTT Assay によって検討した。**5-H-Y** および **5-Me** の *in vitro* 活性は、シスプラチン耐性細胞においてシスプラチンの約 46 倍と非常に高く、また、かさ高い置換基を有する **5-H-Y** 誘導体ほど *in vitro* 活性が低下するという傾向を見出した。また、調べたほとんどのテトラゾラト架橋錯体がシスプラチン耐性を克服しており、**5-Ace** 以外のテトラゾラト架橋錯体では *in vitro* 活性と DNA 凝縮能との間に相関が見られた。一方、DNA 凝縮能が最も高い **5-Ace** がほとんど *in vitro* 活性を示さないという結果を踏まえ、テトラゾラト架橋錯体の細胞内取り込み量を ICP-MS を用いて経時的に観察した結果、**5-Ace** を除くテトラゾラト架橋錯体はシスプラチンより多く細胞内に取り込まれることを示した。その傾向は特にシスプラチン耐性細胞において強く、**5-H-Y** および **5-Me** は、10 倍の暴露濃度のシスプラチンと比較して約 11 倍も多く細胞内に取り込まれることが明らかとなった。従って、テトラゾラト架橋錯体の高効率な細胞内取り込みが、これらの錯体のシスプラチン耐性の克服に寄与していると考えられた。また、**5-Ace** の *in vitro* 活性が著しく低いのは、**5-Ace** が細胞内にほとんど取り込まれないためであると推察された。このことは、十分な量の **5-Ace** が核内に到達すれば DNA と強く相互作用する可能性を示しており、プロドラッグの分子設計に応用できると考えられた。

植村雅子君は本研究により、一連のテトラゾラト架橋錯体と DNA との相互作用、

およびそれらの細胞内取り込みについて詳細に解析し、テトラゾラト架橋錯体の構造活性相関について重要な知見を提供した。本研究の成果は、新しい制がんメカニズムの提唱および次世代白金制がん剤の開発に大きく貢献すると考えられる。

以上により、上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。