

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

2015

植村 雅子

目次

略語一覧

序論	1
----------	---

本論

1. テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の核酸塩基および二本鎖 DNA との共有結合性相互作用	6
1-1. 5-H-X および 5-H-Y の核酸塩基誘導体との反応機構の解明	6
1-2. 核酸塩基誘導体との反応における反応速度論的解析	20
1-3. 二本鎖 DNA との反応における Pt-DNA 付加物の定量.....	38
2. テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の非共有結合性相互作用による DNA の構造変化	46
2-1. 仔ウシ胸腺 DNA の二次構造変化の解析.....	46
2-2. T4 phage DNA の高次構造変化の解析.....	60
3. テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の <i>in vitro</i> 細胞増殖抑制活性、構造活性相関および細胞内取り込み量.....	71
3-1. 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 <i>in vitro</i> 細胞増殖抑制活性および構造活性相関	71
3-2. 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おける時間依存的細胞内取り込み量の変化.....	77
結論	87
論文目録.....	90
謝辞.....	91
参考文献.....	92

略語一覽

2-ME	2-mercaptoethanol
9EtG	9-ethylguanine
A	adenine
C	cytosine
CD	circular dichroism
DHBD	dihydroxo-bridged dimer (<i>cis</i> -[Pt(NH ₃) ₂ (μ-OH)] ₂ ²⁺)
diaqua complex	<i>cis</i> -[Pt(NH ₃) ₂ (H ₂ O) ₂] ²⁺
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	electrospray ionization
FBS	fetal bovine serum
FM	fluorescence microscopy
G	guanine
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
ICP	inductively coupled plasma
L1210R	L1210 mouse leukemia cell resistant to cisplatin
L1210W	L1210 mouse leukemia cell sensitive to cisplatin
m/z	mass to charge ratio
MS	mass spectrometry
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	phosphate buffered saline
RNA	ribonucleic acid
T	thymine
TBP	TATA-binding protein
TEM	transmission electron microscopy

序論

白金制がん剤 (Fig. 1) は、現在の我が国におけるがんの治療において、中心的な役割を果たしている薬物の一つである。国立がん研究センターの発表によると、2013年の部位別がん粗死亡率の上位三位を占めるがんは、一位:肺がん(全がん死亡者数に対する割合:19.9%)、二位:胃がん(13.3%)、三位:大腸がん(13.1%)で、この三つのがんが占める割合は半分近くにも上る¹。これらのがんに対する化学療法は、主として手術療法や放射線療法が適用できない場合に実施されており、そのほとんどの推奨療法に、白金制がん剤が用いられている²⁻⁴。

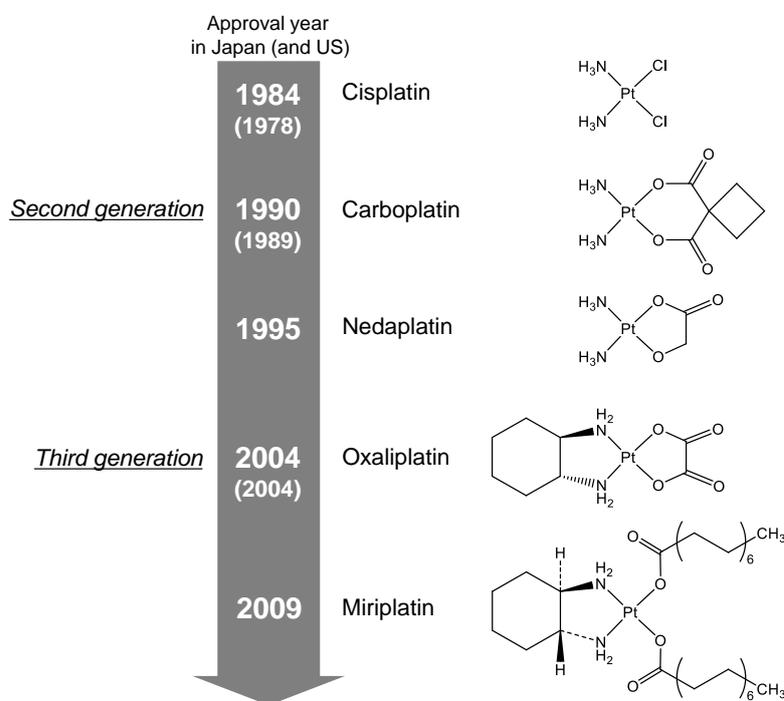


Fig. 1. Schematic representation and approval year of cisplatin, carboplatin, nedaplatin, oxaliplatin and miriplatin, which are all approved for clinical use in Japan.

白金制がん剤の代表格であるシスプラチンは、広い作用スペクトルを有する。我が国では、1984年に承認されて以来、上記三つのがん以外にも、睾丸腫瘍、膀胱腫瘍、腎盂・尿管腫瘍、前立腺癌、卵巣癌、頭頸部癌、食道癌、子宮頸癌、神経芽細胞腫、骨肉腫、胚細胞腫瘍(精巣腫瘍、卵巣腫瘍、性腺外腫瘍)などに対して効能・効果が認められている。2010年には、欧米や日本における臨床試験の結果から、切除不能胆道がんに対する標準的がん化学療法として、塩酸ゲムシタビンとシスプラチンの併用療法の有用性が示された^{5,6}。これを受けて、2011年に、日本でも胆道がんに対してシスプラチンが保険適応となり、塩酸ゲムシタビンとシスプラチン併用療法が切除不能胆道がん

対する標準治療となった。白金制がん剤は、承認から 30 年近くを経ても新たな適応が見出されており、その作用スペクトルは、さらに広がる可能性がある。多種多様ながんに対して薬効を示し、今後の応用開拓が期待される白金制がん剤は、我が国のがん治療において切り離すことのできない重要な薬剤である。

白金制がん剤の標的分子は、DNA であると言われている。その作用機序について、シスプラチンを例にとり説明する。血中から細胞内に移動したシスプラチンは、水分子によって chloride 配位子が置換される (Fig. 2)。この置換反応によって、シスプラチンは反応性の高い分子種 ($cis\text{-}[(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ 、 $cis\text{-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$) を生じ、核酸塩基と共有結合を形成する。白金(II)原子は、DNA の構成分子である核酸塩基の中でも、guanine 塩基の N(7)窒素原子と優先的に共有結合する^{7,8} (Fig. 3)。一つ目の共有結合が形成された後、距離的に隣接する purine 塩基の N(7)窒素原子に接近し、二つ目の共有結合を形成することで、DNA に架橋を形成する。シスプラチンの場合、隣接した purine 塩基を共有結合によって架橋した 1,2-鎖内架橋を優位に (80–85%) 形成し⁹⁻¹²、また、割合は少ない (1.5%) が、鎖間架橋も形成する^{9,13} (Fig. 2)。これらの DNA 付加物の形成こそが制がん作用を示す所以であり、これを引き金に、転写因子阻害やポリメラーゼ阻害、クロマチン構造の破壊を引き起こし、細胞死、つまりアポトーシスが誘導されると考えられている。

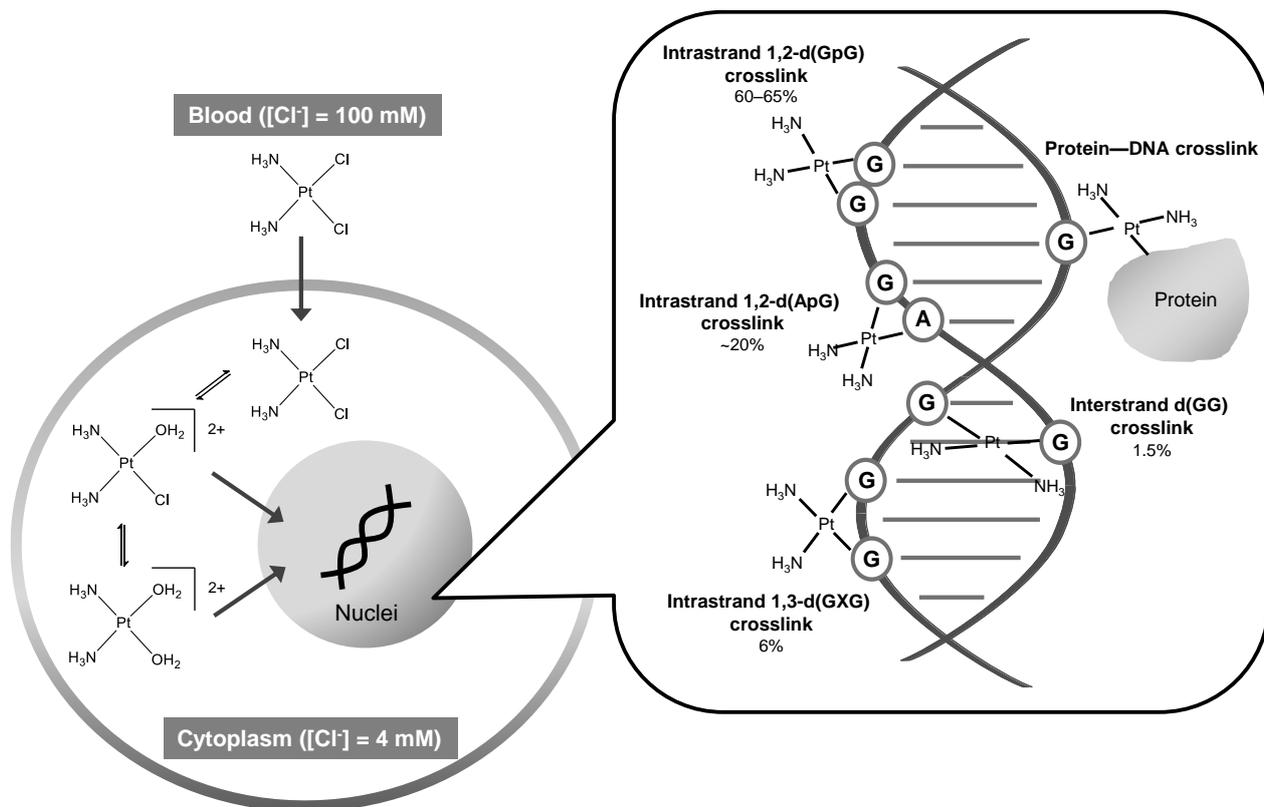


Fig. 2. Equilibrium of cisplatin and various types of Pt—DNA adducts formed.

Cl⁻濃度が十分高い ([Cl⁻] = 100 mM) 循環血液中では、シスプラチンの水分子による置換反応はほとんど起こらないが、わずかに生じた反応性の高い分子種は、急性の腎障害、悪心・嘔吐などを生じる原因となる。シスプラチンの細胞内への移動は、主に単純拡散によるとされているが、近年では copper transporter などの関与も示されている^{14, 15}。従って、シスプラチンは、がん組織細胞だけでなく正常組織細胞にも取り込まれ、生体高分子と相互作用し、正常組織細胞をアポトーシスまたはネクローシスへ導くこととなる。つまり、他の制がん剤と同様に、がん細胞への非選択的な取り込みが、副作用をもたらす一つの要因となっている。

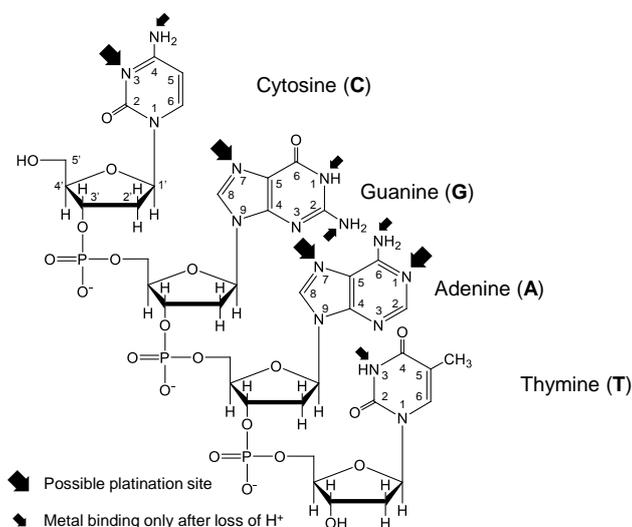


Fig. 3. Possible platinum binding sites on DNA.

シスプラチンの優れた抗腫瘍効果をさらに高め、副作用を軽減するため、また、白金制がん剤の新たな適応を開拓するために、様々な配位子を有する「シスプラチン誘導体」が合成されてきた。これらの研究結果から、下記の条件を満たす白金錯体が制がん活性を有することが分かっている。

- (1) 脱離配位子が cis 配位である。
- (2) 適度に置換活性な脱離配位子を有している。
- (3) 置換不活性な配位子を有する。
- (4) 無電荷白金錯体である。

「シスプラチン誘導体」は、脱離基である chloride 配位子を改変した第二世代、および、ammine 配位子を改変した第三世代に分類することができる¹⁶(Fig. 1)。それぞれを代表する化合物として、第二世代ではカルボプラチンおよびネダプラチン、また、第三世代ではオキサリプラチンおよびミリプラチンが挙げられ、これらの化合物は、我が国において臨床応用されている。

生理的 pH 溶液において、シスプラチンの二つの chloride 配位子が水に置換された場合、dihydroxo 架橋を有する白金(II)二核錯体 $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-OH})_2]^{2+}$ (dihydroxo-bridged dimer: **DHBD**, Fig. 4) を形成

する^{17, 18}。DHBD の核酸塩基との反応は、2つの hydroxo 架橋が置換されることにより、最終的には単核錯体として核酸複合体を形成するが、hydroxo 架橋の一つ保持した中間生成物も生じることから、DHBD は単核錯体とは異なる結合様式で DNA と相互作用することが示唆された。この結合様式の有用性に着目し、置換活性な hydroxo 架橋と置換不活性な架橋配位子を有する白金(II)二核錯体の分子設計が行われてきた¹⁹。その結果、Chikuma らは、架橋配位子として pyrazole を用いたピラゾラト架橋錯体 $[\{cis-Pt(NH_3)_2\}_2(\mu-OH)(\mu-pyrazolato-N1,N2)]^{2+}$ (AMPZ、Fig. 4) に、優れた *in vitro* がん細胞増殖抑制活性を見出した²⁰。AMPZ は二当量の核酸塩基と反応し²⁰、DNA の同鎖内に隣接する核酸塩基と鎖内架橋を形成する²¹。この時、シスプラチンによる架橋が DNA 鎖の大きな歪みを伴うのに対し²²、AMPZ による架橋は DNA 鎖をほとんど歪めない²¹ことが、X 線結晶構造解析や NMR によって明らかにされている。また、AMPZ は、DNA 鎖のマイナーグループに結合することが示されており (PDB ID : 3X0Z)、これは錯体の持つ電荷に起因する相互作用であると考えられている。さらに、架橋配位子として 1,2,3-triazole を用いたトリアゾラト架橋錯体 $[\{cis-Pt(NH_3)_2\}_2(\mu-OH)(\mu-1,2,3-triazolato-N1,N2)]^{2+}$ (AMTA、Fig. 4) において、二当量の核酸塩基と反応する際、白金(II)原子が triazole 環の N(2)から N(3)窒素原子へ移動するという分子内転移反応を伴うことが報告されている²³。AMPZ および AMTA における DNA との相互作用に関する研究によって、アゾラト架橋錯体が、シスプラチンとは異なる独自の相互作用を示し、それが「単なる『シスプラチン誘導体』ではない構造」に起因することが予想された。

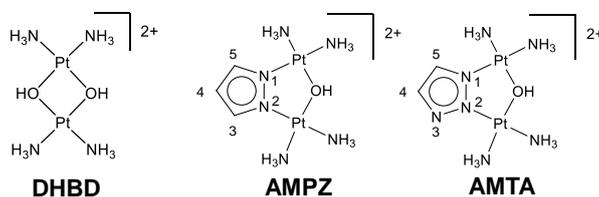


Fig. 4. Schematic representation of DHBD and pyrazolato- and triazolato-bridged complex.

近年、AMPZ および AMTA に続き、架橋配位子に tetrazole を用いたテトラゾラト架橋錯体 $[\{cis-Pt(NH_3)_2\}_2(\mu-OH)(\mu-5-R-tetrazolato-N2,N3)]^{n+}$ (Fig. 5) が合成された。テトラゾラト架橋錯体のリード化合物である **5-H-Y** (R = H, n = 2) は、マウス移植臓がんに対して顕著な *in vivo* 抗腫瘍活性を発揮することが報告されている²⁴。腫瘍をマウスへ移植してから 42 日後の腫瘍体積の増加の様子を移植初日 (0 日後) の腫瘍体積と比較して表すと、コントロールでは 366%、臓がんに対する第一選択薬であるゲムシタピンでは 169%であるのに対して、**5-H-Y** では 3.5%であった。さらに、**5-H-Y** を投与した 6 匹のマウスのうち 2 匹において、移植した腫瘍が消失し、これらのマウスにおいて、副作用の指標となる有意な体重減少を伴わないことが確認されている。**5-H-Y** は、価値ある基本骨格であると考えられたため、**5-H-Y** の tetrazole 環の 5 位に様々な置換基を導入した **5-H-Y** 誘導体である **5-Me** (R = CH₃, n = 2)、**5-Phe** (R = C₆H₅, n = 2)、**5-EtAc** (R = CH₂COOCH₂CH₃, n = 2)、**5-Ace** (R = CH₂COO⁻, n = 1) が合成された²⁵ (Fig. 5)。**5-H-Y** の結合異性体である

$[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-5-H-tetrazolato-N1,N2})]^{2+}$ (**5-H-X**, Fig. 5) および **5-H-Y** 誘導体の多くは、ヒト非小細胞肺癌細胞に対して、シスプラチンより高い *in vitro* 細胞増殖抑制活性を有し、シスプラチン耐性を克服することが分かっている^{24,25}。さらに、**5-H-Y** 誘導体のうち、**5-EtAc** において、マウス移植腺がんに対して、コントロールと比較して 80% の腫瘍体積増殖抑制を示すことが報告されている²⁵。

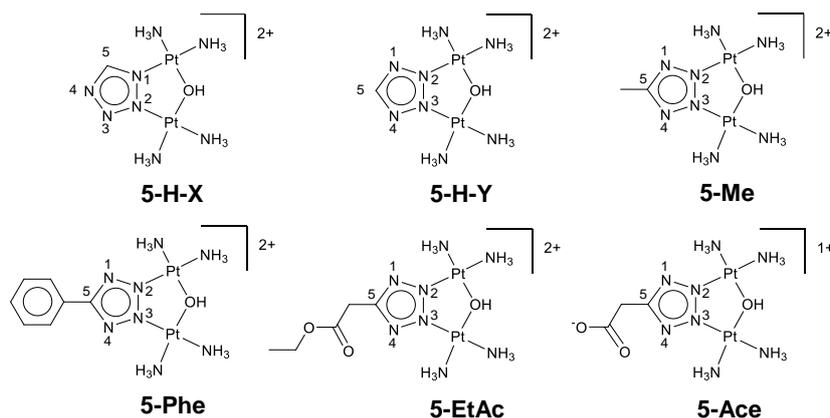


Fig. 5. Schematic representation of tetrazolato-bridged complexes.

近年では、シスプラチンの連続投与によって、シスプラチンはもちろんのこと、他の白金制がん剤の抗腫瘍活性が著しく低下する、つまりがん細胞が耐性を獲得することが、臨床で大きな問題となっている²⁶。このようなシスプラチン耐性がんには、従来の白金制がん剤と類似した構造を有する白金錯体では十分な薬効が得られない。現在は、シスプラチン耐性がんに対しても有効な白金制がん剤の創製が望まれている。従って、シスプラチンの構造を大幅に改変した白金錯体、つまり、「単なる『シスプラチン誘導体』ではない化合物」に、「次世代白金制がん剤」としての期待が高まっている。テトラゾラト架橋錯体は、顕著な *in vivo* 抗腫瘍活性を発揮するだけでなく、シスプラチン耐性がん細胞に対しても非常に高い増殖抑制活性を示すことから、次世代白金制がん剤の有望な候補化合物の一つであると言える。しかし、その作用機序については、明らかにされていない点が多い。そこで、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に、本研究を計画した。

「本論 1」では、テトラゾラト架橋錯体の DNA との共有結合性相互作用について明らかにするために、核酸塩基および二本鎖 DNA との反応を、NMR および質量分析法および Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) を用いて解析した。「本論 2」では、テトラゾラト架橋錯体が、非共有結合性相互作用によって DNA の二次あるいは高次構造を変化させる様子を明らかにするために、仔ウシ胸腺 DNA および T4 phage DNA との反応を、円偏光二色性 (circular dichroism : CD) 分光法および顕微鏡法を用いて観察した。「本論 3」では、L1210 マウス白血病細胞 (L1210W 細胞) およびシスプラチン耐性 L1210 マウス白血病細胞 (L1210R 細胞) を用いた *in vitro* 細胞増殖抑制活性試験を行い、さらに、L1210W および L1210R 細胞における細胞内取り込み量を、ICP-MS を用いて経時的に定量した。

本論

1. テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の核酸塩基および二本鎖 DNA との共有結合性相互作用

1-1. 5-H-X および 5-H-Y の核酸塩基誘導体との反応機構の解明

1-1-1. 背景および目的

白金錯体の核酸塩基との反応機構を明らかにすることによって、その白金錯体の制がん作用を明らかにし、評価する上で重要な情報を得ることができる。ピラゾラト架橋錯体 **AMPZ** およびトリアゾラト架橋錯体 **AMTA** と核酸塩基誘導体 9-ethylguanine (9EtG, Fig. 1-1-1) との反応について、各錯体はそれぞれ二当量の 9EtG と反応し^{20, 23}、さらに、**AMTA** は興味深い分子内異性化反応を示すことが報告されている²³。この反応において、**AMTA** が 9EtG と共有結合性付加物を形成する際に、**AMTA** の triazole 環の N(2)窒素原子に結合している白金(II)原子が N(3)窒素原子に転移する。

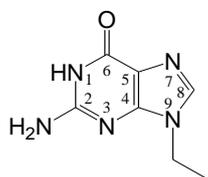


Fig. 1-1-1. Schematic representation of 9EtG.

これまでに、inosine²⁷ や adenosine²⁸、9-methyladenine^{29, 30} 等との Pt—核酸塩基錯体において、異性化反応が起こることが報告されている。これらの反応では、白金(II)原子は核酸塩基の環内あるいは環外の異なる窒素原子に転移する。例えば、inosine や adenosine と [Pt(dien)]²⁺ (dien = diethylenetriamine) との反応における異性化反応では、各 purine 塩基上の N(1)から N(7)窒素原子へ、9-methyladenine の Pt—核酸塩基付加物では、adenine の N(7)窒素原子から N(6)²⁹ あるいは N(1)窒素原子³⁰ へ白金(II)原子が移動する。反応は、比較的ゆっくりとした速度 (数時間～数十時間) で進行する。また、異性化反応が起こる反応条件は高温 (65°C 以上) であり、中性付近の水溶液中では観察されない。これは Pt—N 結合の不活性さ、および熱力学的安定性が影響していると考えられている。

一方、AMTA において観察された異性化反応では、白金(II)原子は核酸塩基上ではなく、AMTA の架橋性配位子である triazole 環に隣接する窒素原子間を移動する²³。この反応における遷移状態は、Fig. 1-1-2 の通りであると推察される。

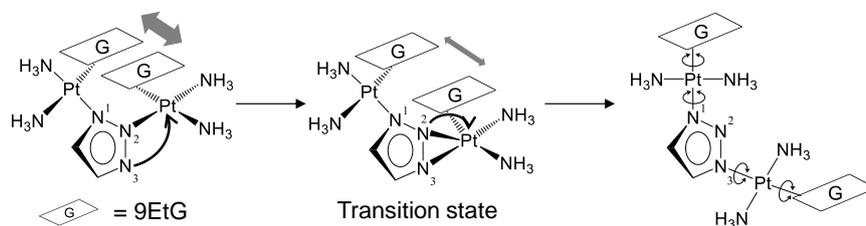


Fig. 1-1-2. Intramolecular substitution in the reaction of AMTA with two molar equiv. of 9EtG.

遷移状態において、白金(II)原子が結合している N(2)窒素原子に隣接する N(3)窒素原子は、その位置から考えて、axial 位からはほど遠い位置から白金(II)原子へ求核攻撃を行っているはずである。この置換反応は、Werner 型平面正方形錯体としては、非常に珍しい反応であることが報告されている。さらに、この反応は非常に素早く起こるため、中間生成物は検出されない。また、37°C の重水中、つまり中性付近 (pD 7.8–8.2) の条件下で観察されたことから、これまで報告された白金(II)原子の異性化反応とは多くの点で異なっている。5-H-X や 5-H-Y においても、AMTA と同様の異性化反応が起こるのかということについては非常に興味深い。

本章では、5-H-X および 5-H-Y と二当量の 9EtG との反応によって得られる最終生成物、およびその反応機構について、NMR 分光法や質量分析法を用いて明らかにした。

1-1-2. 結果および考察

5-H-X あるいは **5-H-Y** (4 mM) と二当量の 9EtG (8 mM) を、それぞれ 37°C の重水溶液中で反応させ、¹H-NMR を用いて経時的に観察した。各反応時間における ¹H-NMR スペクトルを Fig. 1-1-3 および 4 に示した。**5-H-X** (A) および **5-H-Y** (B) の反応開始直後 (0 時間) におけるスペクトルに注目すると、tetrazole 環の 5 位の水素原子 (tz(5)) 由来のシグナルは、それぞれ 8.87 (**5-H-X**) および 8.67 ppm (**5-H-Y**) に、また、未反応の 9EtG の 8 位の水素原子 (H8) 由来のシグナルは、7.82 ppm に確認された。反応の進行に伴い、各シグナル強度は減少し、図中の青四角 (■) で示した最終生成物由来のシグナルが出現し、増大していく様子が観察された。興味深いことに、**5-H-X** と **5-H-Y** の反応で新たに出現した全てのシグナルは、お互い全く同じ化学シフトを示していた。つまり、8.68 ppm の tetrazole 環由来のシグナルと、4.05 および 1.30 ppm 付近に観察される 9EtG 中の 9 位の ethyl 基の水素原子 (9Met および 9Men) 由来のシグナル (9Met(a)、9Met(b) および 9Men(a)、9Men(b)) は、**5-H-X** と **5-H-Y** の両反応において、同一の化学シフトを示した。このことは、結合異性体である **5-H-X** および **5-H-Y** が二当量の 9EtG と反応した結果、同一の最終生成物、つまり、 $[\{cis-Pt(NH_3)_2(9EtG-N7)\}_2(\mu\text{-terazolato})]^{3+}$ を生成したということを示唆していると考えられる。未反応の 9EtG 由来の H8 のシグナルと比較してわずかに低磁場 (8.09 および 7.90 ppm) に確認できる二本のシグナル (H8(a) および H8(b)) は、N(7)窒素原子に白金(II)原子が配位していた 9EtG の H8 由来のものとして帰属した。また、8.66 ppm に出現したシグナルは tz(5) 由来であるとした。これらのシグナルの化学シフトを Table 1-1-1 に示した。

Table 1-1-1. ¹H-NMR data (δ) for the reaction of **5-H-X** and **5-H-Y** with two molar equiv. of 9EtG.

Complex	tz(5)		H8		9Men		9Met	
	Reactant	Product	Reactant	Product	Reactant	Product	Reactant	Product
5-H-X	8.87(s)	8.68(s)	7.82(s)	a 8.09(s) b 7.90(s)	4.08(q)	a 4.06(q) b 4.01(q)	1.43(t)	a 1.37(t) b 1.32(t)
5-H-Y	8.67(s)	8.68(s)	7.82(s)	a 8.09(s) b 7.90(s)	4.08(q)	a 4.06(q) b 4.01(q)	1.43(t)	a 1.37(t) b 1.32(t)

5-H-X

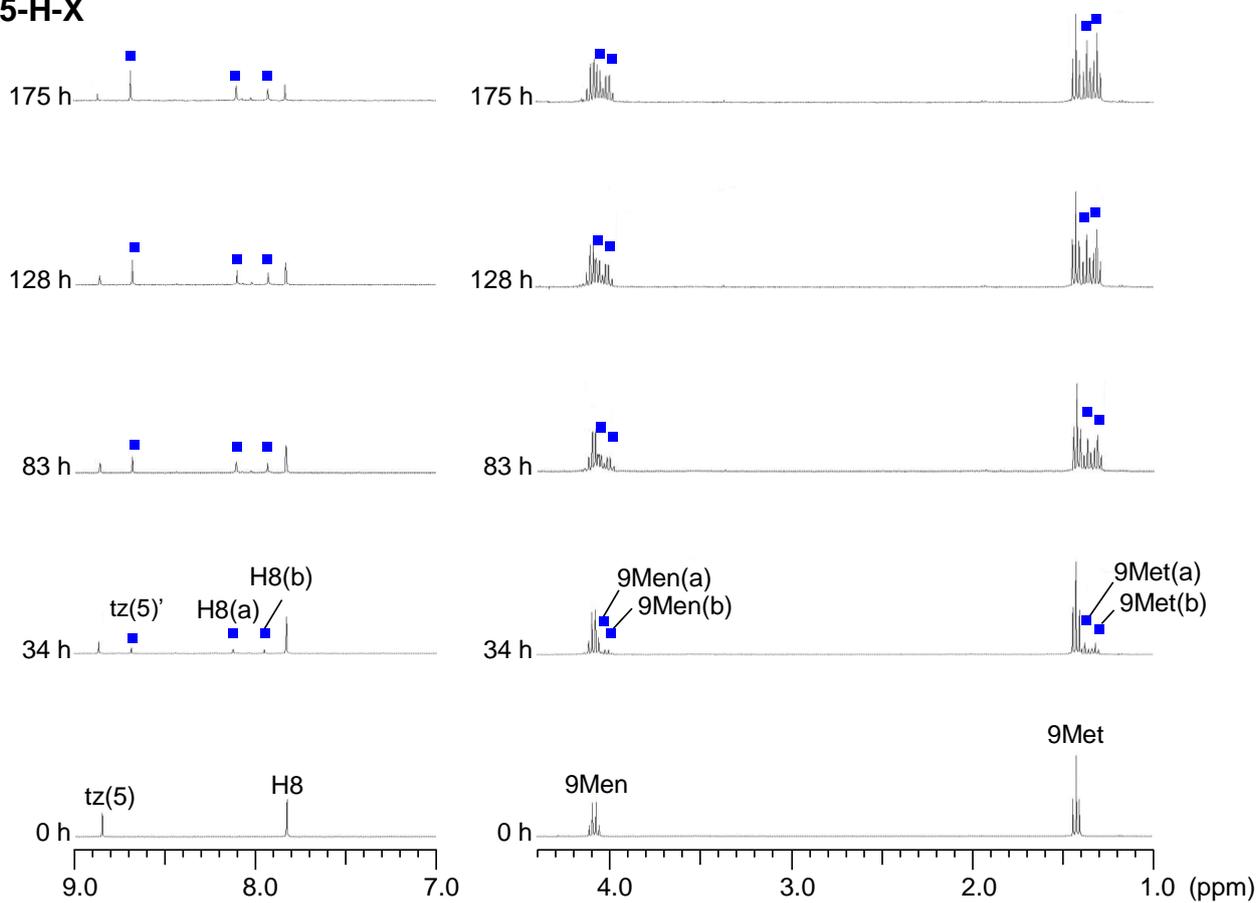


Fig. 1-1-3. ¹H-NMR spectra in the reactions of **5-H-X** with two molar equiv. of 9EtG at 37°C.

5-H-Y

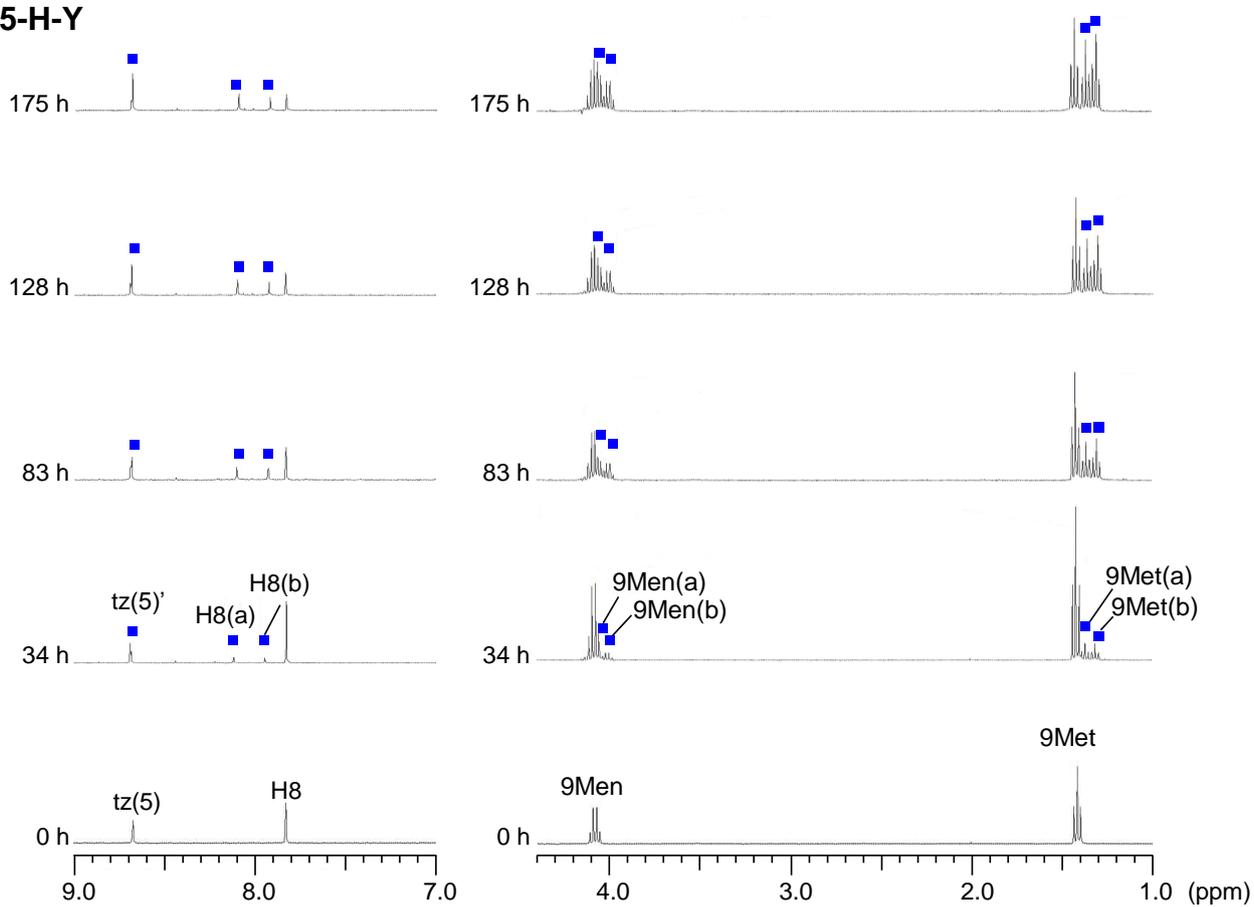


Fig. 1-1-4. ¹H-NMR spectra in the reactions of **5-H-Y** with two molar equiv. of 9EtG at 37°C.

AMPZ および AMTA と二当量の 9EtG との反応における最終生成物である $[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-pyrazolato-N1,N2})]^{3+}$ (Fig. 1-1-5, **pz(9EtG)₂**) および $[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-1,2,3-triazolato-N1,N2})]^{3+}$ (Fig. 1-1-5, **ta(9EtG)₂**) は、両者とも azole 環を中心とした対称性を有する化合物である。従って、**pz(9EtG)₂** および **ta(9EtG)₂** 中の二つの 9EtG 配位子は化学的に等価であり、その H8 の ¹H-NMR シグナルは一種類のみ観測されることが報告されている²³。この時、**pz(9EtG)₂** 中の H8 のシグナルでは、未反応の 9EtG と比較して、高磁場側へシフトすることが確認されている。これは、9EtG の分子内 stacking 相互作用によって、purine 塩基環内の電子密度が上昇しているためである。一方、テトラゾラト架橋錯体における最終生成物では、tz(5)由来のシグナルが一種類であるということから、最終生成物は一種類であるということが分かった。また、H8 由来のシグナルが二種類存在することから、tetrazole 環に配位している二つの白金(II)原子は非対称な位置関係で tetrazole 環に結合しているということが考えられる。さらに、**pz(9EtG)₂** の H8 のシグナルと比較した場合、テトラゾラト架橋錯体における最終生成物では低磁場側にシフトしており、分子内 stacking 相互作用が非常に弱いことが示唆された。

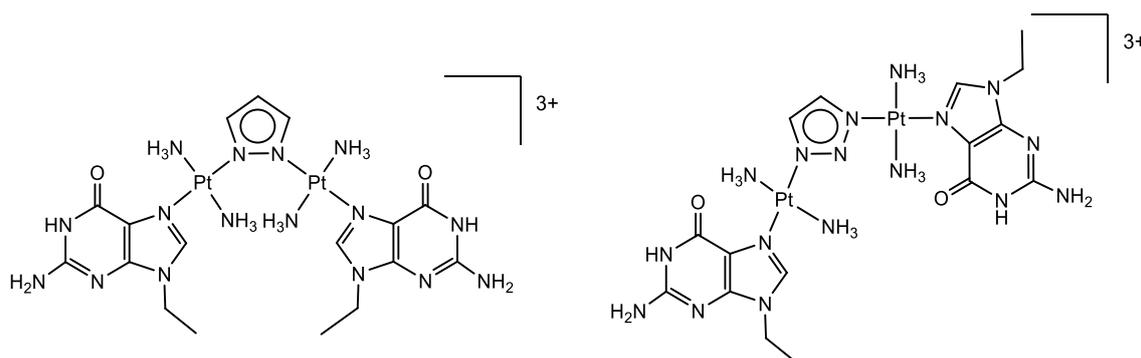


Fig. 1-1-5. Schematic representation of **pz(9EtG)₂** (left) and **ta(9EtG)₂** (right).

最終生成物の非対称性は、 ^{195}Pt -NMR (Fig. 1-1-6) においても確認することができた。最終生成物由来のシグナルは、二つ出現し、それぞれの化学シフトは、 -2490 および -2497 ppm であった。この結果から、最終生成物は、分子内にわずかに環境の異なる二種類の $\text{Pt}[\text{N}_4]$ 配位平面を含むことが示唆された。

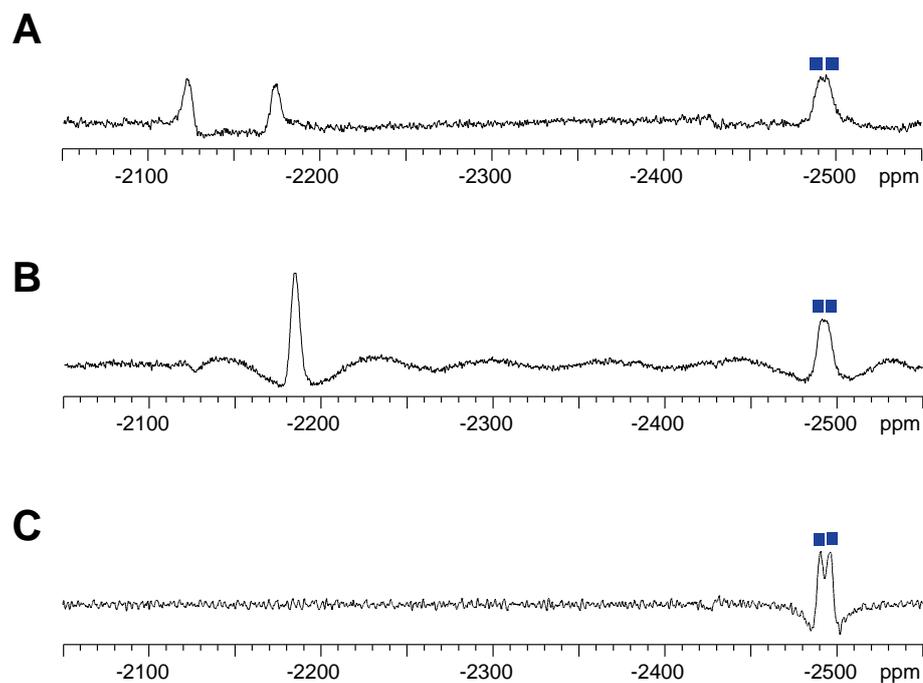


Fig. 1-1-6. ^{195}Pt -NMR spectra of the D_2O solutions of 4 mM **5-H-X** (A) and **5-H-Y** (B) reacted with 8 mM 9EtG at 37°C for 5 days. C is obtained from the purified product.

各反応が進行する様子について、ESI-MS を用いて経時的な観察を行った。その結果を Fig. 1-1-7 (A : **5-H-X**、B : **5-H-Y**) に示した。反応の進行とともに新たに出現するピーク (青四角 (■)) の大部分は、最終生成物由来の化学種として帰属することができた。例えば、 m/z 1084.1 に生じるピークは、 $[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-terazolato}) + 2\text{ClO}_4]^+$ に由来すると考えられる。この結果から、**5-H-X** および **5-H-Y** と 9EtG が、それぞれ 1:2 の反応比で結合した化合物が生成していることが確認できた。

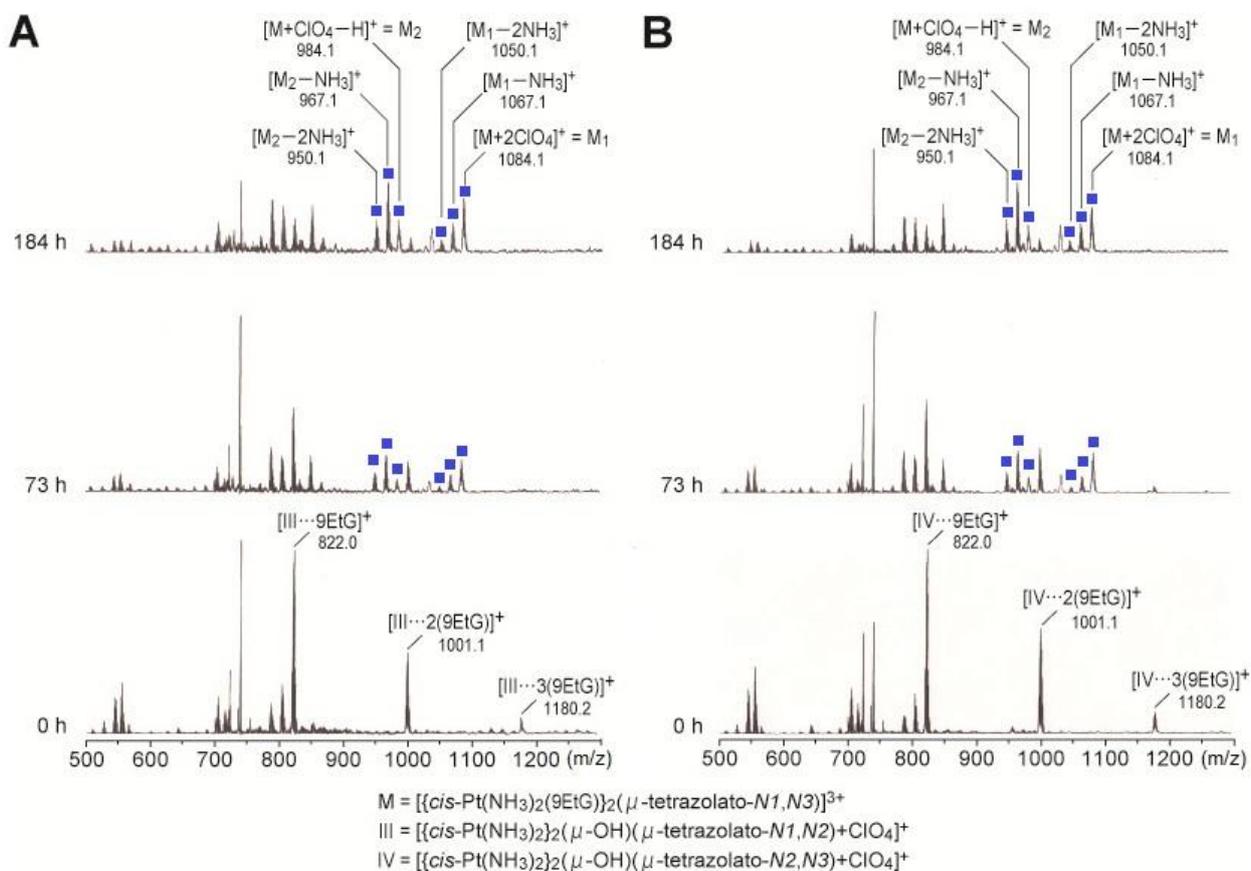


Fig. 1-1-7. Mass spectra of the reactions of **5-H-X** (A) and **5-H-Y** (B) with 2 molar equiv. of 9EtG at 37°C.

最終生成物の構造を詳細に検討するため、pH 滴定を行った。各 pD における D₂O 中の最終生成物の H8 の ¹H-NMR を測定し、pD に対して各化学シフト (δ) をプロットして滴定曲線 (Fig. 1-1-8 A) を作成した。**5-H-X** および **5-H-Y** から得られた最終生成物の滴定曲線は、ほぼ同一のものであることが分かり (Fig. 1-1-8 B)、このことから、両錯体から同一の最終生成物が得られたということが確認された。未反応の 9EtG の H8 は図中の灰丸 (●) で示したような変化を示すが、白金(II)原子が 9EtG の N(7)窒素原子に配位した場合、この窒素原子に対して酸性領域におけるプロトン付加(あるいは脱離)が起こらないために、この領域における化学シフトの変化が観察されなくなる。従って、Fig. 1-1-8 A で示した滴定曲線から、9EtG の N(7)窒素原子に白金(II)原子が配位していることが分かった。さらに、9EtG の N(7)窒素原子への配位は、電子吸引性誘起効果による 9EtG の N(1)窒素原子のプロトン (N(1)H) の酸性化を引き起こす。得られた滴定曲線をもとに、各最終生成物中の二種類の N(1)H の酸解離定数 pK_{a/H_2O} を算出したところ、**5-H-X** では、a : 8.00 および b : 8.04、**5-H-Y** では、a : 8.07 および b : 8.11 であり、その平均は a : 8.03 および b : 8.08 であった。未反応の 9EtG の N(1)H の pK_{a/H_2O} は 9.73 である³¹ことから、N(1)H の酸性化が引き起こされていることは明らかであり、白金(II)原子が 9EtG の N(7)窒素原子に配位していることが再確認された。

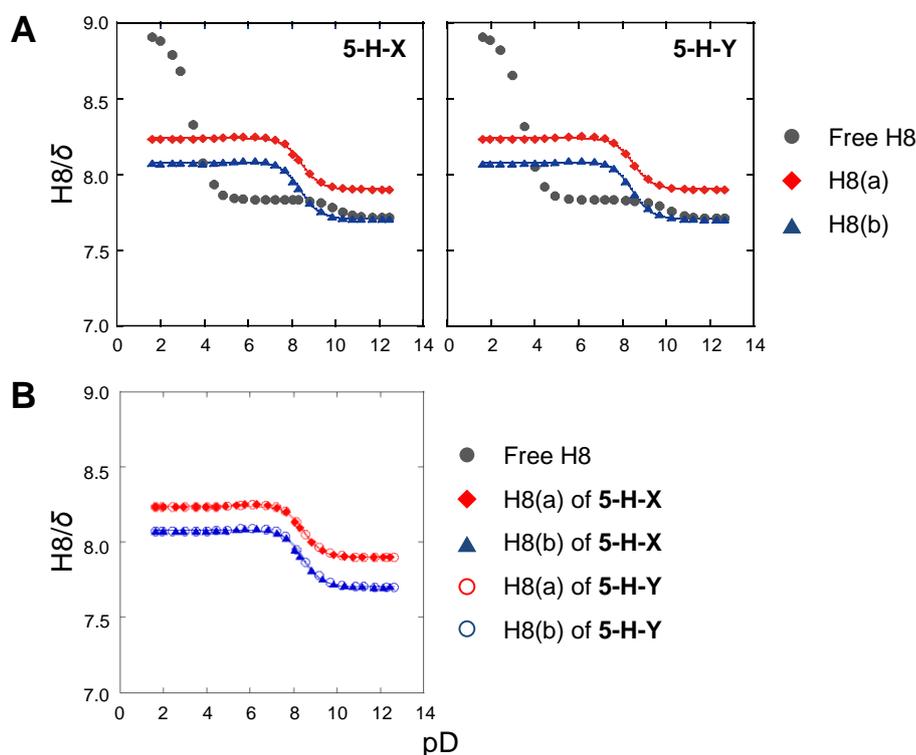


Fig. 1-1-8. Plots of the chemical shift (δ) of H8 resonance for free 9EtG and 9EtG binding to Pt of the product (A) and superimposed plots of **5-H-X** and **5-H-Y** (B).

Fig. 1-1-9 には、各 pD における最終生成物中の H8 の $^1\text{H-NMR}$ シグナルの半値幅を pD に対してプロットした結果を示した。**pz(9EtG)₂** では、比較的広い半値幅 (5–20 Hz) を示し、N(1)H のプロトンの脱離に伴い、半値幅が増大することが報告されている²³。これは、9EtG の分子内 stacking 相互作用によって、Pt—N 原子の結合における自由回転が妨げられ、シグナルの幅が広められたことによると考えられている。一方で、**5-H-X** および **5-H-Y** の反応から得られた最終生成物の各 pD における H8 由来のシグナルは、pD 1.62–12.66 の範囲においてシャープであり、その半値幅は 1.45–4.04 Hz であった。この特徴的な H8 の共鳴の様子は、**ta(9EtG)₂** においても同様であった²³。従って、**5-H-X** および **5-H-Y** における最終生成物では、Pt—N 原子の結合が自由に回転している、つまり、分子内 stacking 相互作用が存在していないことが示唆された。

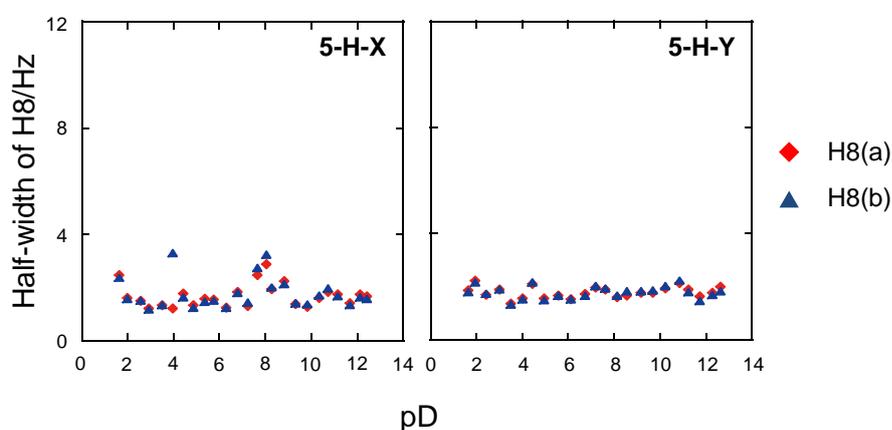


Fig. 1-1-9. Plots of the half-width (Hz) of H8 vs. pD for 9EtG of the product.

以上の結果から、最終生成物は、 $[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-}(9\text{EtG-N}7)\}_2(\mu\text{-terazolato-N}1,\text{N}3)]^{3+}$ (**tz(9EtG)₂**, Fig. 1-1-10) であると同定した。

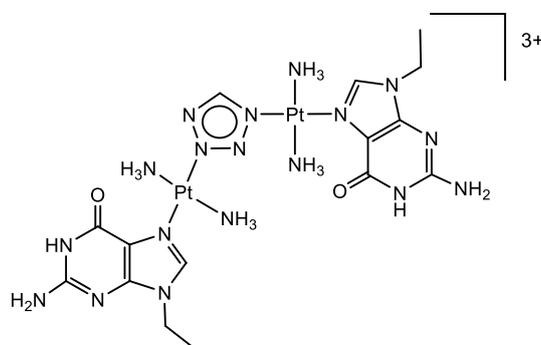
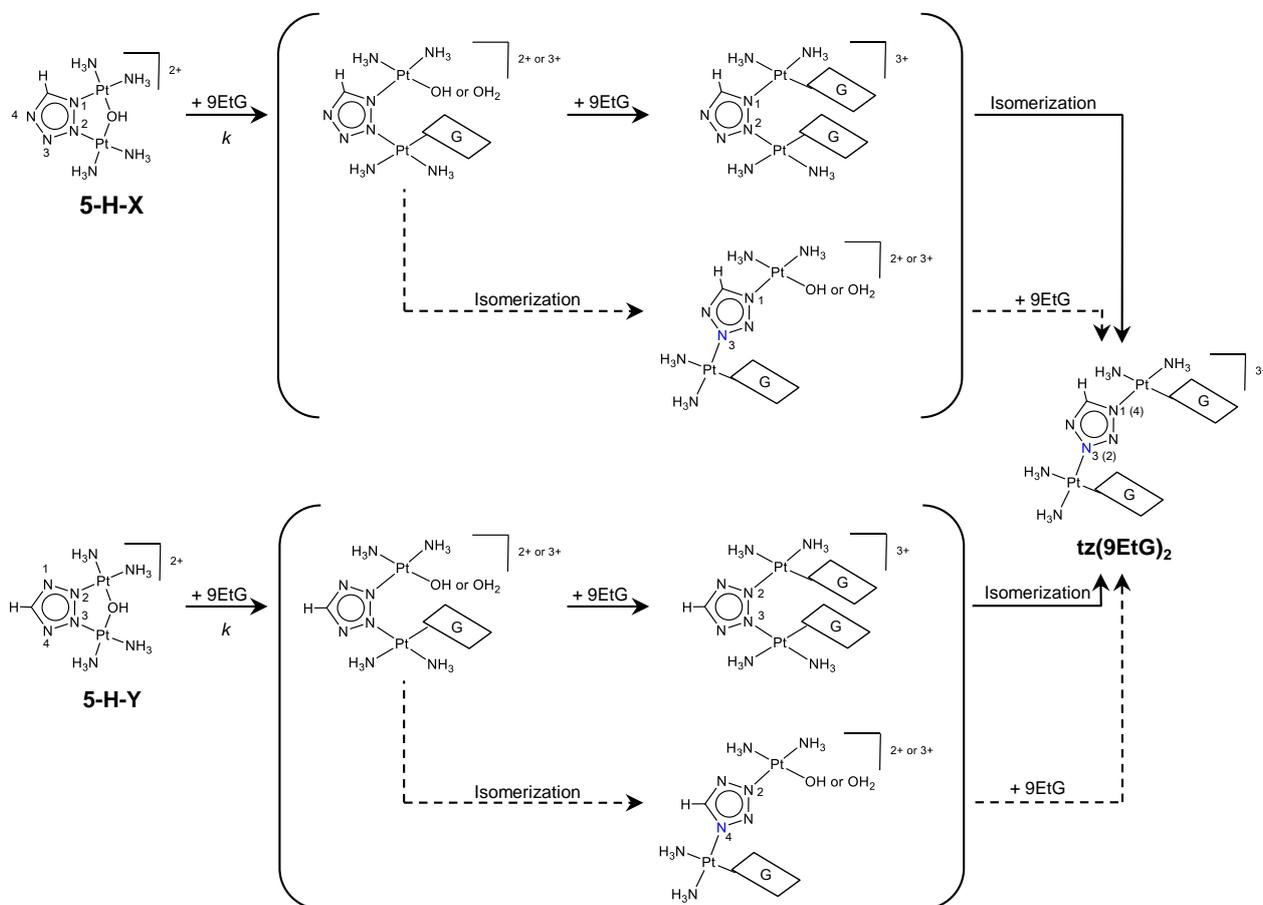


Fig. 1-1-10. Schematic representation of **tz(9EtG)₂**.

5-H-X あるいは **5-H-Y** と二当量の **9EtG** との反応機構は、Scheme 1-1-1 に示した通りに進行すると推定した。この反応では、OH 基が一分子目の **9EtG** の N(7)窒素原子に置換された後、二分子目の **9EtG** による置換反応が起こり、最終的に 1 : 2 の反応比で結合した化合物が生成すると考えられる。ただし、**5-H-X** において、どちらの白金(II)原子に一分子目の **9EtG** が結合するかについては明らかにはできなかった。また、白金(II)原子の転移反応が、二分子目の **9EtG** の置換反応の前後のどちらで起こるかについては明確には分からなかった。これは、Scheme 1-1-1 において括弧内に示した予想される中間生成物が、ほとんど検出されなかったことによる。このことから、一つ目の **9EtG** による置換反応が律速反応であると考えられた。白金(II)原子の分子内転移反応について、**5-H-X** では tetrazole 環上の N(2)から N(3)窒素原子へ、**5-H-Y** では N(3)から N(4)窒素原子へ、あるいは、N(2)から N(1)窒素原子へ起きていることが分かった。**5-H-Y** の反応において確認された分子内転移反応は、**AMTA** で観察された分子内転移反応²³と同様の反応であったが、**5-H-X** の反応で確認された分子内転移反応は新しい種類のものであった。詳細に述べると、**5-H-Y** では二つの窒素原子に挟まれた窒素原子 (N(3)あるいは N(2)) から炭素原子と窒素原子に結合した窒素原子 (N(4)あるいは N(1)) へ白金(II)原子が転移しているが、**5-H-X** では最初に結合している N(2)窒素原子および転移後に結合している N(3)窒素原子とも、二つの窒素原子に挟まれている。**AMTA** における分子内転移反応に関する考察では、白金(II)原子の分子内転移反応は、窒素原子の求核性が異なっている結果、引き起こされる反応であるとされていた²³。しかし、**5-H-X** の N(2)および N(3)窒素原子の求核性は、ほとんど同じであると考えられる。従って、本結果から、窒素原子の求核性に加えて、リガンドである二つの **9EtG** 間の反発力も、転移反応を引き起こす driving force となる可能性が示された。



Scheme 1-1-1. Possible reaction schemes of **5-H-X** and **5-H-Y** with two molar equiv. of 9EtG.

1-1-3. まとめ

5-H-X あるいは **5-H-Y** と 9EtG との反応において、それぞれ 1 : 2 の反応比で結合した非対称性の同一の共有結合性付加物を生成することが分かった。さらに、その反応は異性化反応を伴うことが分かった。この異性化反応において、白金(II)原子が tetrazole 環上の N(2)から N(3)窒素原子へ、あるいは N(3)から N(4) (あるいは、N(2)から N(1)) 窒素原子へ移動することが確認された。これらの反応によって、DNA 上で多様な架橋が形成されると考えられる。つまり、最終生成物における Pt—Pt 間の距離を考慮すると、シスプラチンと比較して、より離れた距離に存在する核酸塩基間の架橋を形成することができる可能性がある。分子内転移反応が、制がん活性へどのように寄与しているのかについても大変興味深い。

1-1-4. 実験方法

1-1-4-1. 試薬

5-H-X および **5-H-Y** は、米田らにより報告された方法に従って合成、精製および同定し、¹H-NMR により純度の確認を行った²⁴。9EtG は Sigma-Aldrich 社の製品を用いた。その他の試薬は特級以上の品位の市販品を精製することなく用いた。また、MILLIPORE 社の純水製造装置 DIRECT-Q[®]3 UV によって製造した超純水を使用した。

1-1-4-2. NMR 分光法

¹H-NMR は Varian 社の NMR 装置 Varian NMR System 400 NB、¹⁹⁵Pt-NMR は Varian 社の Varian NMR System 600 NB を用いて測定した。基準物質には、¹H-NMR の測定では sodium 3-trimethylsilyl-propionate-2,2,3,3-*d*(4) (TSP、 $\delta = 0$)、¹⁹⁵Pt-NMR の測定では K₂PtCl₄ ($\delta = -1614$) を用いた。

1-1-4-3. NMR 分光法を用いた 9EtG との反応の解析

4 mM の **5-H-X** あるいは **5-H-Y** を 37°C の重水溶液中で 8 mM 9EtG と反応させた。反応は NMR 測定用試験管内で約 10 日間行い、適当な時間間隔をおいて、37°C における ¹H-NMR を測定した。反応開始前および終了後に、重水溶液の pD を堀場社の pH 測定装置 D-13 pH meter あるいは IQ Scientific Instruments 社の pH 測定装置 IQ150 を用いて測定した。(各テトラゾラト架橋錯体の pD(反応開始前→終了後) は以下の通りであった。**5-H-X**: 8.73→8.47、**5-H-Y**: 9.33→8.91。

1-1-4-4. 質量分析法を用いた 9EtG との反応における最終生成物の解析

4 mM の **5-H-X** あるいは **5-H-Y** を 37°C の水溶液中で 8 mM 9EtG とマイクロチューブ内において反応させた。反応開始後、0、24、48、73、121 および 184 時間後に溶液の一部を採取し、2、5 または 10 倍希釈後、マススペクトルを測定した。マススペクトルの測定には JEOL 社の質量分析装置 JMX-700 MS を用い、positive モードで行った。

1-1-4-5. pH 滴定

4 mM の **5-H-X** あるいは **5-H-Y** を 37°C の水溶液中で 8 mM 9EtG とマイクロチューブ内において 100 時間反応させた。各反応溶液を凍結乾燥後、反応液と同量の重水で溶解し、NMR 測定用試験管に分注した。堀場社の pH 測定装置 D-13 pH meter あるいは IQ Scientific Instruments 社の pH 測定装置 IQ150 を用いて、室温における重水溶液の pD を測定しながら 0.1 M DNO₃ および NaOD を添加し、pD が適当な値となるように調製した後、室温における ¹H-NMR を測定した。pH 滴定の結果は、(1-1-1)式を用いて解析した。pK_a を最終生成物中の N(1)H の酸解離定数、 δ_A を未反応の 9EtG、 δ_B を最終生成物中の H8 の化学シフト (ppm) とするとき、以下の式が成り立つ。

$$\delta = \frac{\delta_A [\text{H}^+] + \delta_B \text{p}K_a}{[\text{H}^+] + \text{p}K_a} \quad (1-1-1)$$

近似曲線の作成には Synergy Software 社の解析プログラム KaleidaGraph を用いた。上記の計算によって求められた重水中の酸解離定数 ($\text{p}K_a$ in D_2O) は、(1-1-2)式を用いて軽水中の酸解離定数 ($\text{p}K_a$ in H_2O) に換算した。

$$\text{p}K_{a \text{ in } \text{H}_2\text{O}} = \text{p}K_{a \text{ in } \text{D}_2\text{O}} - 0.4 \quad (1-1-2)$$

1-1-4-6. $[\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{9EtG})\}_2(\mu\text{-tetrazolato-}N1,N3)]^{3+}$ の精製

10 mM **5-H-X** および 25 mM 9EtG を 40°C の 1 μM HClO_4 溶液 (pH 2.90) 中で 5 日間反応させた。反応後の溶液 (pH 2.90) をフィルターろ過 (孔径 0.45 μm) し、回転蒸発により元の体積の 30% の容積になるまで濃縮した。山善社の中圧分取液体クロマトグラフ装置 YFLC W-Prep 2XY を用いて逆相クロマトグラフ法により $[\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{9EtG})\}_2(\mu\text{-tetrazolato-}N1,N3)]^{3+}$ を精製した。分取用カラムとして、ODS 樹脂を充填したカラム (カラムサイズ 500 mm \times 30 mm, 平均粒子径 25 μm) を用い、グラディエント溶離法 (移動相 0.1 M LiClO_4 (pH 3.0) + acetonitrile 5% \rightarrow 80%) を適用した。溶離された $[\{\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{9EtG})\}_2(\mu\text{-tetrazolato-}N1,N3)]^{3+}$ が含まれる溶液は、0.1 M LiOH によって中和後、容量が半分になるまで回転蒸発により濃縮し凍結乾燥させた。得られた白色粉末を回収し、リチウム過塩素酸塩を除去するために isopropanol および diethylether によってガラスフィルター上で洗浄した。

1-2. 核酸塩基誘導体との反応における反応速度論的解析

1-2-1. 背景および目的

DNA中の核酸塩基と白金(II)原子が共有結合性付加物を形成する能力は、白金制がん剤の生物学的活性と関連があると考えられている。白金制がん剤は、白金(II)原子と強く結合した二つの担体配位子と、比較的不安定な二つの脱離基を構造的に有し、白金制がん剤とDNAとの反応速度は、配位子や脱離基の種類によって変化する。例えば、シスプラチンおよびカルボプラチンにおいて、リン酸緩衝液中 (pH 7.5, 37°C) における各白金錯体の水分子による置換反応の反応速度定数は、それぞれ、 8×10^{-5} および $7.2 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ である³²。カルボプラチンの脱離基であるcyclobutane dicarboxylate配位子はキレートを形成しており、シスプラチンの脱離基であるchloride配位子よりも安定である。つまり、脱離基の安定性が反応速度の差を生み出している。また、これらの核酸塩基との反応速度の差異は、二本鎖DNAに対する反応性の差異を反映していると考えられている³²。故に、白金制がん剤と核酸塩基との反応を反応速度論的に解析することで、白金制がん剤の生物学的活性を評価する上で重要な情報が得られる。

ピラゾラト架橋錯体AMPZおよびトリアゾラト架橋錯体AMTAにおいて、二当量の9-ethylguanine (Fig. 1-1-1, 9EtG) との反応における反応速度論的解析が行われている²³。それによると、AMPZおよびAMTAにおける二次反応速度定数 (k) は、それぞれ、 1.57×10^{-4} および $2.53 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である。このような反応速度の差異は、AMPZおよびAMTAとの構造的差異によって生じていると考察されている。AMTAでは、二分子の白金(II)原子を架橋しているtriazole環のN(3)窒素原子と、ammine配位子の間に水素結合が存在することが、X線結晶構造解析によって明らかにされている²³。一方で、AMPZでは、pyrazole環の3位の原子は炭素であり、水素結合は形成されない²⁰。そのため、分子内水素結合によって、AMTAのhydroxo架橋配位子は比較的不安定化され、9EtGに置換されやすくなるのではないかと推定されている。テトラゾラト架橋錯体5-H-Xおよび5-H-Yにおいて、AMPZおよびAMTAと比較して、核酸塩基との反応速度がどのように変化するかについては興味を持たれる。また、本節の冒頭で述べたように、反応速度に関する情報は、テトラゾラト架橋錯体の作用機序および生物学的活性との関連を明らかにする上で有益であると予想される。

本章では、5-H-Xおよび5-H-Yと二当量の9EtGとの反応において、AMPZおよびAMTAと同様の反応速度論的解析を行い、反応速度定数を明らかにした。さらに、様々な置換基を5-H-Yのtetrazole環の5位に導入した5-H-Y誘導体 $[[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2]_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-5-R-tetrazolato-N2,N3})]^{n+}$ (R = CH₃ (5-Me)、C₆H₅ (5-Phe)、CH₂COOCH₂CH₃ (5-EtAc)、CH₂COO⁻ (5-Ace)、n = 2 (5-Me、5-Phe、5-EtAc) or 1 (5-Ace)、Fig. 1-2-1) を用いて、二当量の9EtGとの反応における最終生成物の同定および反応速度論的解析を行い、反応速度に与える置換基の影響を明らかにした。

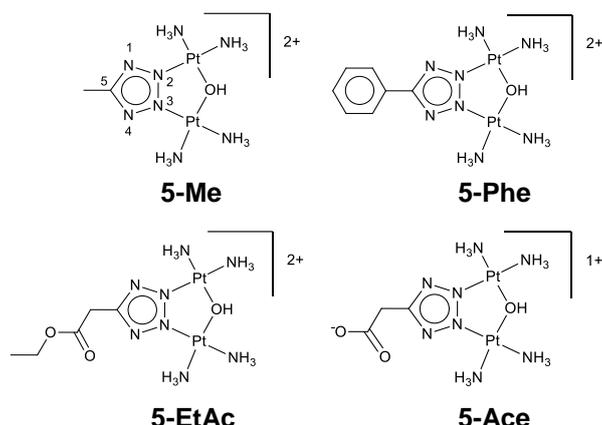


Fig. 1-2-1. Schematic representation of **5-Me**, **5-Phe**, **5-EtAc** and **5-Ace**.

1-2-2. 結果および考察

1-2-2-1. 5-H-Y 誘導体と 9EtG の反応における最終生成物

「本論 1-1」と同様に、**5-Me**、**5-Phe**、**5-EtAc** および **5-Ace** (4 mM) をそれぞれ二当量の 9EtG (8 mM) と反応させ、その経時的な変化を ¹H-NMR を用いて観察した (Fig. 1-2-2-5)。反応開始直後 (0 時間) における 9EtG、つまり、未反応の 9EtG の 8 位の水素原子 (H8) 由来のシグナルは、7.8 ppm 付近に確認され、9 位の ethyl 基の 1 位の水素原子 (9Men) および 2 位の水素原子 (9Met) 由来のシグナルは、それぞれ 4.1 および 1.4 ppm 付近に確認された。tetrazole 環 5 位の置換基由来のシグナルは、**5-Me** (Fig. 1-2-2) では 2.51 ppm (5Met, singlet)、**5-Phe** (Fig. 1-2-3) では 8.03 (5Phe(3,5), triplet), 7.60 (5Phe(2,6), doublet) および 7.59 ppm (5Phe(4), doublet)、**5-EtAc** (Fig. 1-2-4) では 4.24 (5Men2, quadruplet), 4.08 (5Men, triplet) および 1.27 ppm (5Met, triplet)、**5-Ace** (Fig. 1-2-5) では 3.83 ppm (5Men, singlet) 付近に確認された。

反応時間の経過とともに、新たなシグナルの出現が確認された (Fig. 1-2-2-5)。時間経過に伴う増大が確認されたシグナルは、最終生成物由来のシグナルであると考えられ、図中に青四角 (■あるいは□) で示した。最終生成物の H8 のシグナル (H8(a) および H8(b)) は、**5-EtAc** を除く三つの錯体において二本、**5-EtAc** では四本出現した。これらのシグナルの化学シフトは、**5-Me** では 8.29 および 7.99 ppm、**5-Phe** では 8.41 および 7.59 ppm、**5-EtAc** では 8.35、8.25、7.89 および 7.85 ppm、**5-Ace** では 8.30 および 7.94 ppm であった。従って、各最終生成物の H8 の中で、未反応の 9EtG と比較して、より低磁場に出現したシグナル (H8(a)) は 8.30–8.12 ppm、より高磁場に出現したシグナル (H8(b)) は 7.89–7.32 ppm に出現していた。

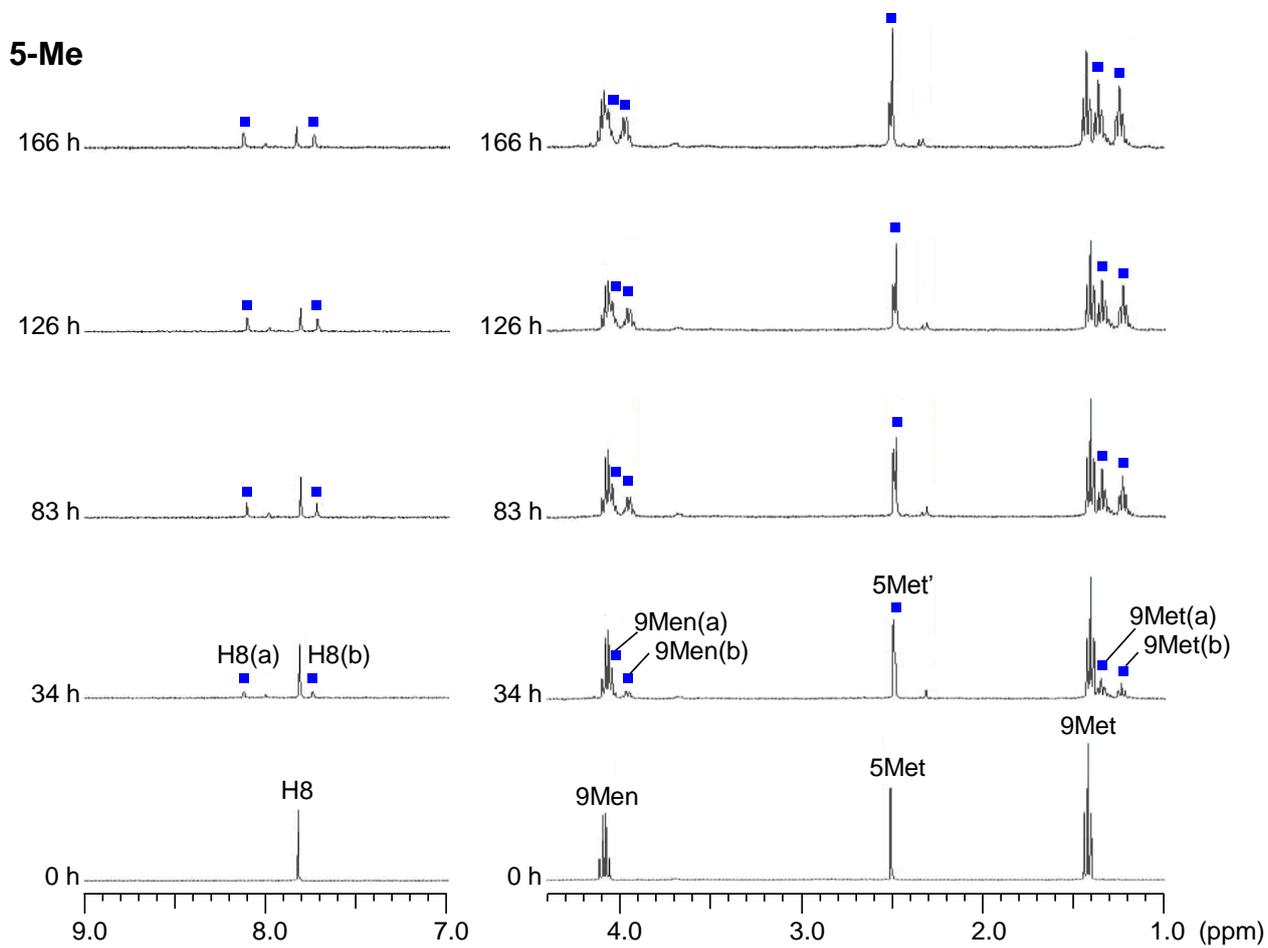


Fig. 1-2-2. $^1\text{H-NMR}$ spectra in the reactions of **5-Me** with two molar equiv. of 9EtG at 37°C .

5-Phe

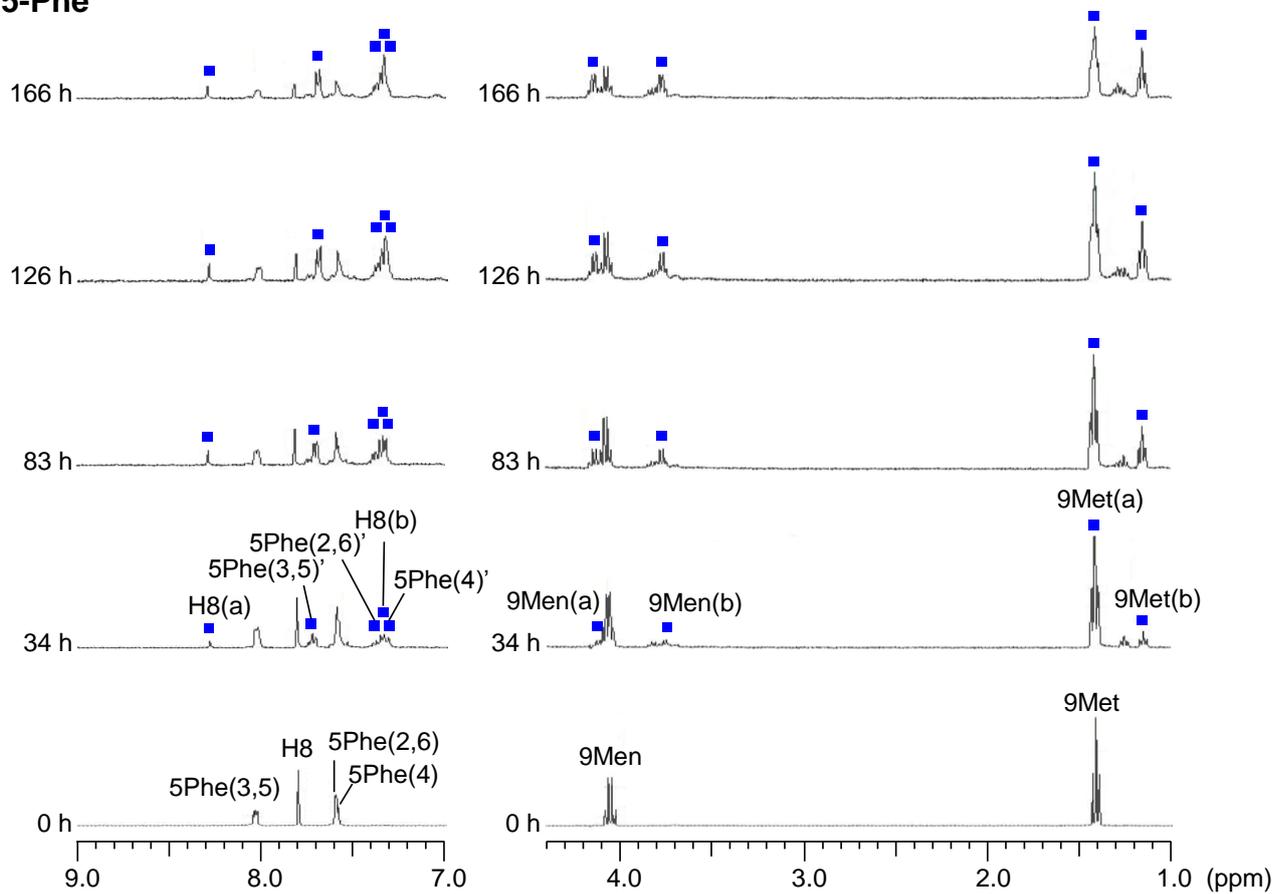


Fig. 1-2-3. ¹H-NMR spectra in the reactions of **5-Phe** with two molar equiv. of 9EtG at 37°C.

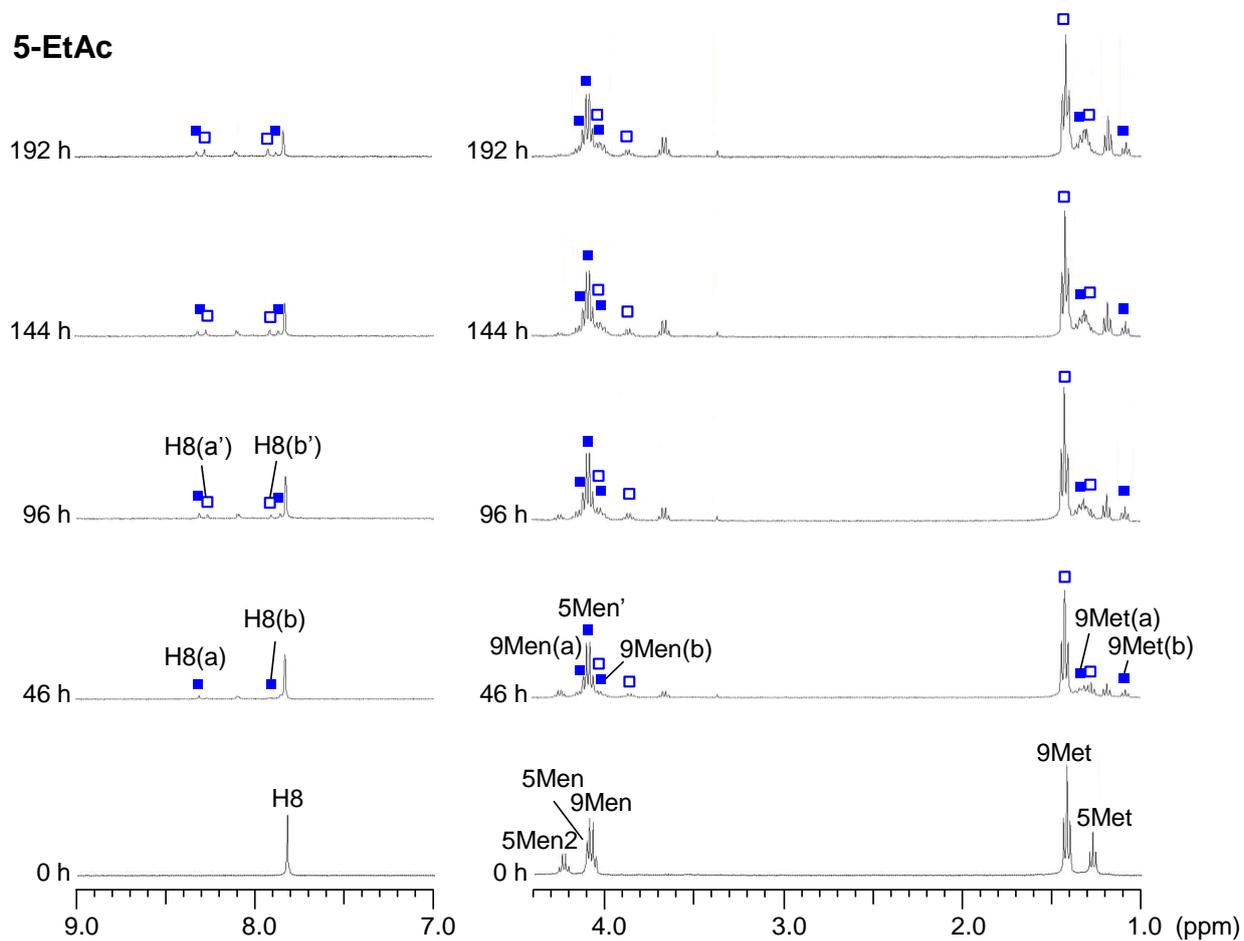


Fig. 1-2-4. $^1\text{H-NMR}$ spectra in the reactions of **5-EtAc** with two molar equiv. of 9EtG at 37°C .

5-Ace

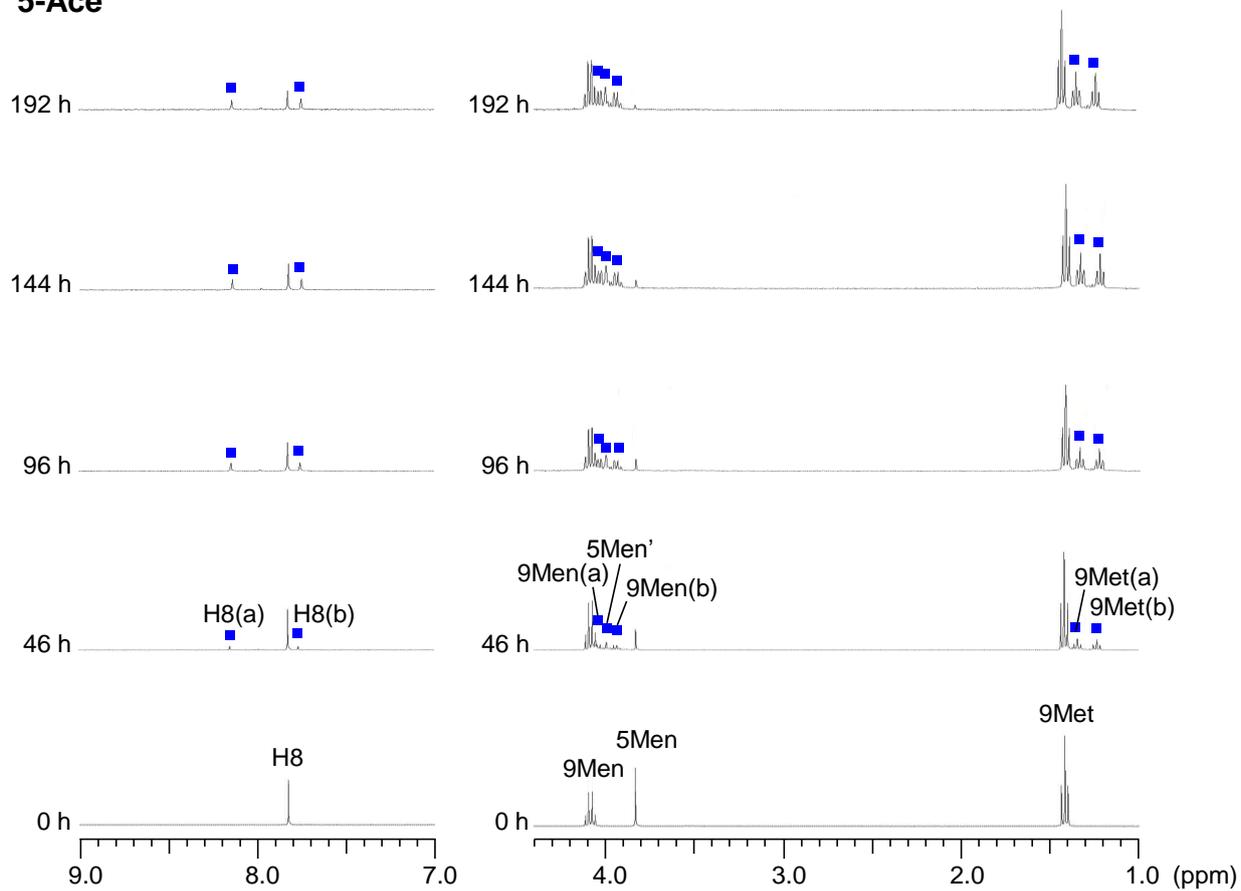


Fig. 1-2-5. ¹H-NMR spectra in the reactions of **5-Ace** with two molar equiv. of 9EtG at 37°C.

最終生成物について、「本論 1-1」と同様の pH 滴定を行い、その結果を滴定曲線として表した (Fig. 1-2-6 A)。**5-Phe** の H8(b)の滴定曲線は、図中の青三角 (▲) で示した変化を示し、反応溶液中 (pD 7.5)における化学シフトは 7.3 ppm 付近となることが分かった。このことから、Fig. 1-2-3 の ¹H-NMR スペクトルにおいて 7.32 ppm に出現し、時間経過とともに増大する singlet のシグナルを H8(b)であると帰属した。また、**5-EtAc** の最終生成物から得られた四つの滴定曲線のうち、二つの滴定曲線 (赤ひし形 (◇) および青三角 (△)) が、**5-Ace** の H8(a)および(b)の滴定曲線 (赤ひし形 (◆) および青三角 (▲)) に一致することが分かった (Fig. 1-2-6 B)。これにより、**5-EtAc** が有する ester 結合は、9EtG との共有結合性付加物の形成前あるいは後に加水分解 ($\text{—CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{—CH}_2\text{COO}^- \text{H}^+ + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) を受け、その結果、**5-Ace** と同じ共有結合性付加物を生じると推定された。従って、Fig. 1-2-4 において、**5-EtAc** の最終生成物のうち、8.35 および 7.85 ppm に出現するシグナルを、ester 結合が加水分解されていない状態の最終生成物の H8 に由来するシグナル (青四角 (■))、8.25 および 7.89 ppm に出現するシグナルを、ester 結合が加水分解された状態の最終生成物の H8 に由来するシグナル (青四角 (□)) であると帰属した。

酸性領域における滴定曲線の変化について、未反応の 9EtG の H8 では、化学シフトの増大が観察されるにも関わらず、各最終生成物の H8(a)および(b)では観察されなかった。「本論 1-1」において述べたように、9EtG の H8 は、白金(II)原子が 9EtG の N(7)窒素原子と配位結合を形成した場合、酸性領域における N(7)窒素原子の水素付加の影響、つまり、H8 シグナルの低磁場シフトが観察されなくなる。従って、白金(II)原子が 9EtG の N(7)窒素原子に配位していることは明らかであった。

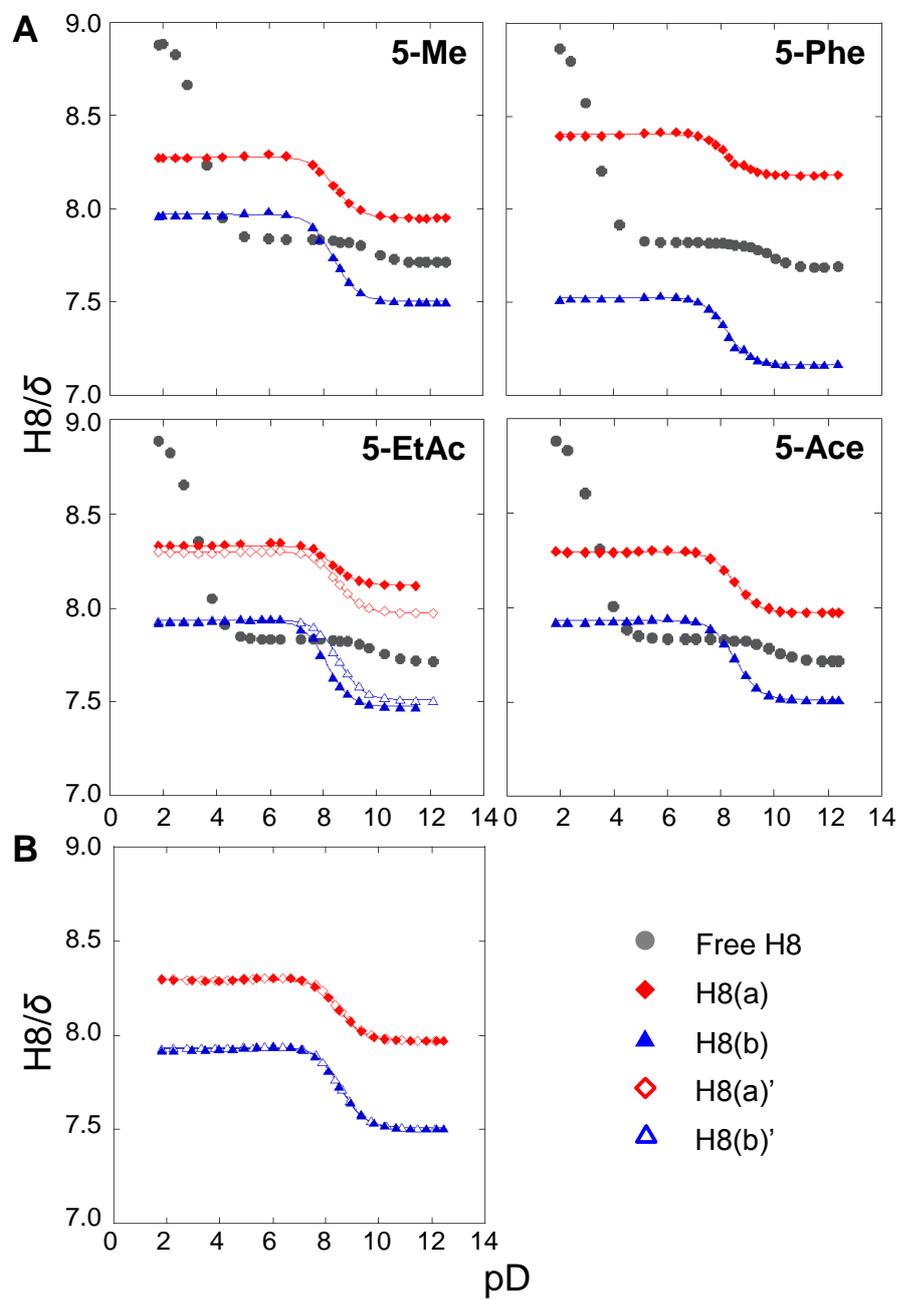


Fig. 1-2-6. Plots of the chemical shift (δ) of H8 resonance for free 9EtG and 9EtG binding to Pt of the product (A) and superimposed plots of 5-EtAc and 5-Ace (B).

続いて、滴定曲線を基に、各最終生成物中の二種類の N(1)H の酸解離定数 pK_{a/H_2O} を算出した結果を Table 1-2-1 に示した。表には、比較のために、「本論 1-1」で明らかにした **5-H-X** および **5-H-Y** の pK_{a/H_2O} も併記した。**5-H-Y** 誘導体の pK_{a/H_2O} は、低磁場側に H8 が観測された 9EtG(a) では 7.71–8.12、高磁場側に H8 が観測された 9EtG(b) では 7.81–8.16 であった。未反応の 9EtG の N(1)H の pK_{a/H_2O} は 9.73 である³¹ことから、**5-H-X** および **5-H-Y** の場合と同様に、9EtG の N(7)窒素原子の白金(II)原子への配位に伴って、電子吸引力誘起効果による 9EtG の N(1)H の酸性化が引き起こされていることが分かった。つまり、白金(II)原子が 9EtG の N(7)窒素原子に配位していることが、各最終生成物中の 9EtG の N(1)H の pK_{a/H_2O} の値が未反応における値より減少していることから確認することができた。

Table 1-2-1. pK_{a/H_2O} values at the N(1)H of the 9EtG ligands for each product.

Complex	pK_{a/H_2O} at N(1)H	
	a	b
5-H-X	8.00	8.04
5-H-Y	8.07	8.11
5-Me	8.05	7.98
5-Phe	7.85	7.81
5-EtAc	7.71	8.01
5-Ace	8.12	8.16

各 pD における H8 の半値幅は、Fig. 1-2-7 に示した通りに、約 0.1–5.0 Hz の範囲内の値を示していた。**5-Me** の pD 7.86 における H8 のように、他のシグナルと重なって出現しており、その影響を受けて、他の値と比較して大きい半値幅を示していたシグナルは除外した（データ不掲載）。**5-Phe** の pD 8.06 や、**5-EtAc** の pD 8.36 における H8 のシグナルについても、同様の理由で除外した（データ不掲載）。アゾラト架橋錯体と共有結合性付加物を形成した二分子の **9EtG** について、**pz(9EtG)₂**（「本論 1-1」 Fig. 1-1-5）では、前述の通り、それぞれ pyrazole 環の N(1) および N(2) 窒素原子に結合しており、分子内 stacking 相互作用を示す²⁰。一方、**ta(9EtG)₂**（「本論 1-1」 Fig. 1-1-5）では、分子内転移反応によって triazolato 環の N(1) および N(3) 窒素原子に結合した白金(II)原子はお互いに近接していないため、それぞれの **9EtG** 配位子間の分子内 stacking 相互作用が小さい²³。各最終生成物の H8 の半値幅は、**pz(9EtG)₂** で比較的広い半値幅（5–20 Hz）を示す一方、**ta(9EtG)₂** で比較的狭い半値幅（約 2 Hz）を示すことが分かっている²³。この結果から、**5-H-X** および **5-H-Y** の場合と同様に、**5-H-Y** 誘導体においても、最終生成物が分子内 stacking 相互作用を示さない、つまり、最終生成物における二つの白金(II)配位平面には、tetrazole 環上の N(1) および N(3)（あるいは N(2) および N(4)）窒素原子を含む可能性が高いと考えられる。

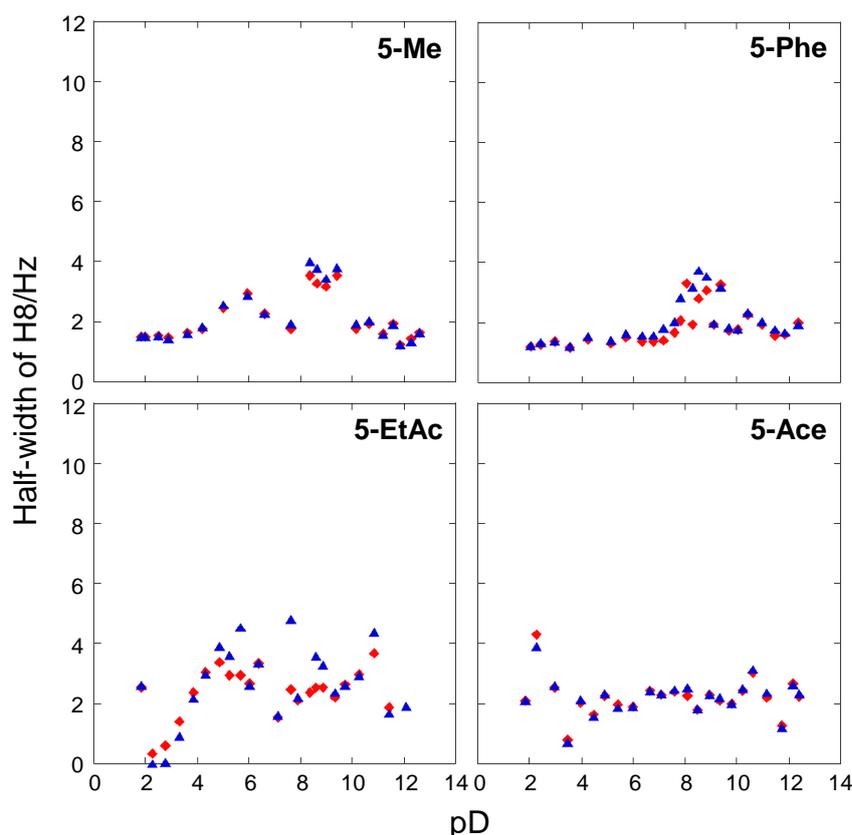


Fig. 1-2-7. Plots of the half-width (Hz) of H8 vs. pD for 9EtG of the product.

各錯体と 9EtG との反応における最終生成物を ESI-MS を用いて同定した (Table 1-2-2)。例えば、**5-Me** において、 m/z 880.2 に出現したピークは、最終生成物 $[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-5-CH}_3\text{-tetrazolato}) - \text{NH}_3 - 2\text{H}]^+$ 由来であると考えられる。これらの結果から、各反応において、各錯体と 9EtG が 1:2 の反応比で結合した化合物が生成していることを確かめることができた。また、**5-EtAc** における反応では、**5-EtAc** における最終生成物由来のピーク ($[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-5-CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3\text{-tetrazolato}) - \text{NH}_3 - \text{H}]^{2+}$, m/z 476.6) に加え、**5-Ace** における最終生成物由来のピーク ($[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-5-CH}_2\text{COO}^-\text{-tetrazolato}) - \text{NH}_3]^{2+}$, m/z 462.6) が出現した (データ不掲載)。従って、 $^1\text{H-NMR}$ を用いた観察によって明らかにされたように、**5-EtAc** が有する ester 結合は、9EtG との共有結合性付加物の形成前あるいは後に加水分解 ($-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow -\text{CH}_2\text{COO}^- \text{H}^+ + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) を受けることが改めて確認された。

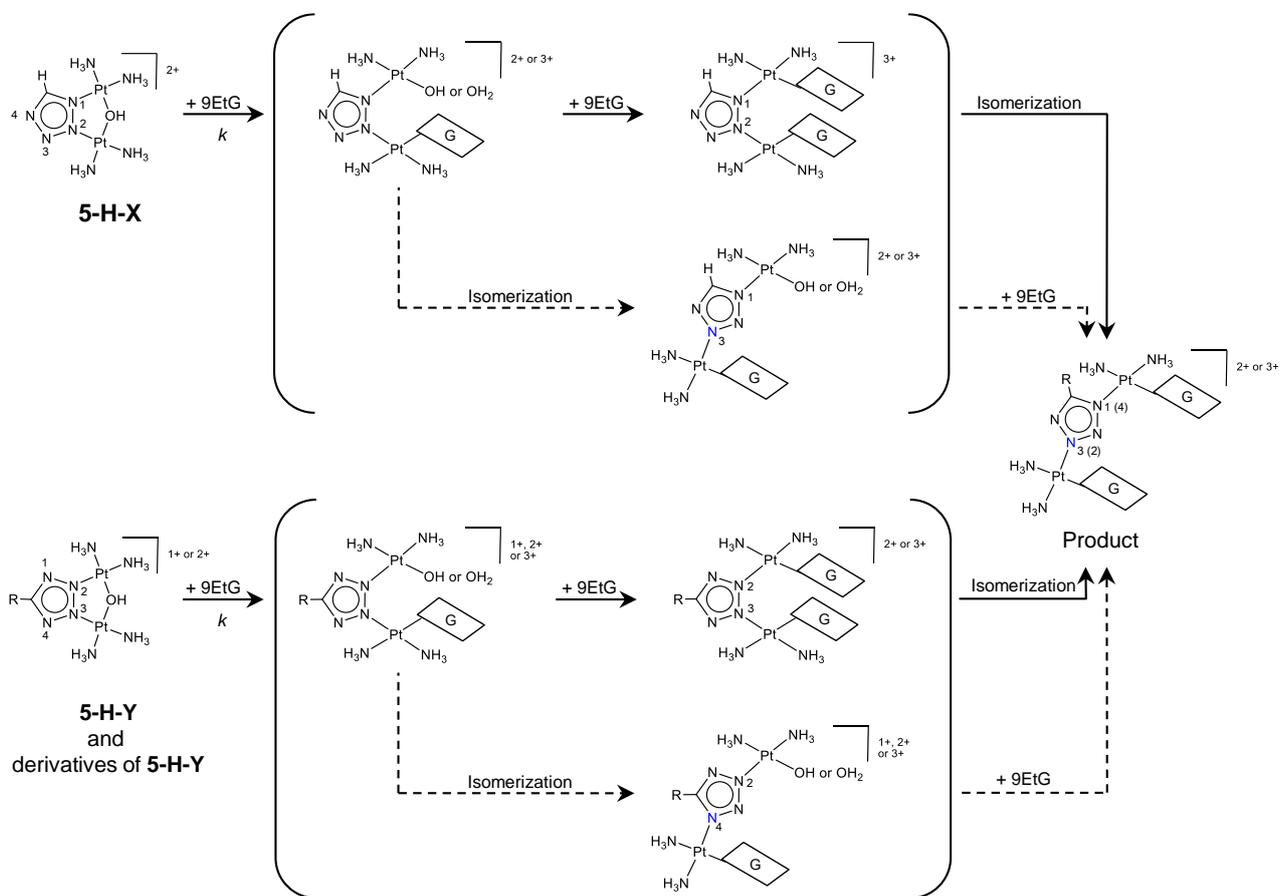
Table 1-2-2. Results of mass analysis for the product of each reaction using ESI-MS.

Complex	Molecular formular of product	Accurate mass	Exact mass
5-H-X	$[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-tetrazolato}) + 2\text{ClO}_4]^+$	1084.1	1084.1143
5-H-Y	$[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-tetrazolato}) + 2\text{ClO}_4]^+$	1084.1	1084.1143
5-Me	$[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-5-CH}_3\text{-tetrazolato}) - \text{NH}_3 - 2\text{H}]^+$	880.2	880.1907
5-Phe	$[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-5-C}_6\text{H}_5\text{-tetrazolato}) - \text{NH}_3 - \text{H}]^{2+}$	471.6	471.6071
5-EtAc	$[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-5-CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3\text{-tetrazolato}) - \text{NH}_3 - \text{H}]^{2+}$	476.6	476.6098
5-Ace	$[\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(9\text{EtG-N7})\}_2(\mu\text{-5-CH}_2\text{COO}^-\text{-tetrazolato}) - \text{NH}_3]^{2+}$	462.6	462.5942

以上の結果を踏まえて、最終生成物の H8 由来のシグナルの化学シフトは Table 1-2-3 の通りであると決定した。さらに、最終生成物の 5 位の置換基由来のシグナルの化学シフトについても同表に示した。最終生成物の H8 由来のシグナルが二つ存在することから、**5-H-X** および **5-H-Y** から得られた錯体 (**tz(9EtG)**₂ (「本論 1-1」 Fig. 1-1-10)) と同様に、非対称性の最終生成物 [*cis*-Pt(NH₃)₂-(9EtG-N7)]₂(μ -5-R-terazolato-N1,N3)]²⁺ (Scheme 1-2-1, R = CH₃ (**5-Me(9EtG)**₂), C₆H₅ (**5-Phe(9EtG)**₂), CH₂COOCH₂CH₃ (**5-EtAc(9EtG)**₂), CH₂COO⁻ (**5-Ace(9EtG)**₂), n = 3 (**5-Me(9EtG)**₂, **5-Phe(9EtG)**₂, **5-EtAc(9EtG)**₂) or 2 (**5-Ace(9EtG)**₂)) が生じると考えられた。つまり、**5-H-Y** 誘導体においても、異性化反応が起こることが示された (Scheme 1-2-1)。**5-EtAc** の 8.08 ppm に出現したシグナル (Fig. 1-2-4) については、中間生成物である可能性や対称性の最終生成物である可能性が考えられたが、帰属するには十分な情報が得られなかった。また、**5-EtAc** の最終生成物の 5Men、5Men2、9Men、9Met および 5Met (Fig. 1-2-4) については、脂肪族領域に現れるシグナルが重複していたため、全てのシグナルを帰属することはできなかった (Table 1-2-3 中 'overlapped')。

Table 1-2-3. ¹H- NMR data for the reaction of **5-Me**, **5-Phe**, **5-EtAc** and **5-Ace** with two molar equiv. of 9EtG.

Complex	5-substituent		H8		9Men		9Met	
	Reactant	Product	Reactant	Product	Reactant	Product	Reactant	Product
5-Me	2.51(s)	2.50(s)	7.83(s)	a 8.12(s) b 7.74(s)	4.08(q)	a 4.07(q) b 3.97(q)	1.42(t)	a 1.37(t) b 1.25(t)
5-Phe	8.03(t) 7.60(d) 7.59(d)	7.69(t) 7.37(d) 7.34(d)	8.03(s)	a 8.26(s) b 7.32(s)	4.04(q)	a 4.14(q) b 3.77(q)	1.42(t)	a 1.42(t) b 1.16(t)
5-EtAc	4.24(q) 4.00(s) 1.27(t)	overlapped	7.82(s)	a 8.30(s) b 7.89(s) a'8.25(s) b'7.85(s)	4.08(q)	overlapped	1.42(t)	overlapped
5-Ace	3.83(q)	4.00(s)	7.82(s)	a 8.13(s) b 7.74(s)	4.08(q)	a 4.02(q) b 3.93(q)	1.42(t)	a 1.34(t) b 1.23(t)



R	5-H-Y and derivatives of 5-H-Y	Product
H	5-H-Y	$\text{tz}(9\text{EtG})_2$
CH_3	5-Me	$5\text{-Me}(9\text{EtG})_2$
C_6H_5	5-Phe	$5\text{-Phe}(9\text{EtG})_2$
$\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	5-EtAc	$5\text{-EtAc}(9\text{EtG})_2$
CH_2COO^-	5-Ace	$5\text{-Ace}(9\text{EtG})_2$

Scheme 1-2-1. Possible reaction schemes of **5-H-X**, **5-H-Y**, **5-Me**, **5-Phe**, **5-EtAc** and **5-Ace** with two molar equiv. of 9EtG.

1-2-2-2. 5-H-X、5-H-Y および 5-H-Y 誘導体と 9EtG の反応における反応速度論的解析

一連のテトラゾラト架橋錯体と二当量の 9EtG との反応において、中間生成物はほとんど確認されなかった。あるいは、解析を行うのに十分な量が生成していなかった。従って、一分子目の 9EtG がテトラゾラト架橋錯体の OH 架橋を置換する反応が律速段階であり (Scheme 1-2-1)、律速反応は、反応物である各テトラゾラト架橋錯体と 9EtG の二種類の分子が関与している二次反応であると考えられる。律速反応における反応速度定数 (k) を求めるために、最終生成物中の 9EtG の 8 位の水素原子 (H8(a)および(b)) の相対強度を用いて、各反応時間における最終生成物の濃度を算出し、二次反応速度式に従って、Second-order Guggenheim plot を作成した (Fig. 1-2-8)。また、それぞれの直線の傾きから、 k および半減期 ($t_{1/2}$) を算出した (Table 1-2-4)。表には、比較のために、AMPZ および AMTA における結果²³を併記した。5-Phe における解析では、H8(b)のシグナルが、最終生成物の tetrazole 環の 5 位の phenyl 基のシグナル(5Phe(2,6)'および 5Phe(4)')と重なっていたため (Fig. 1-2-3)、H8(a)のシグナル強度を二倍することで、最終生成物の濃度を算出した。また、5-EtAc における解析では、H8(a)および(b)に加えて、H8(a)'および(b)'のシグナルも最終生成物の濃度の算出に用いた。

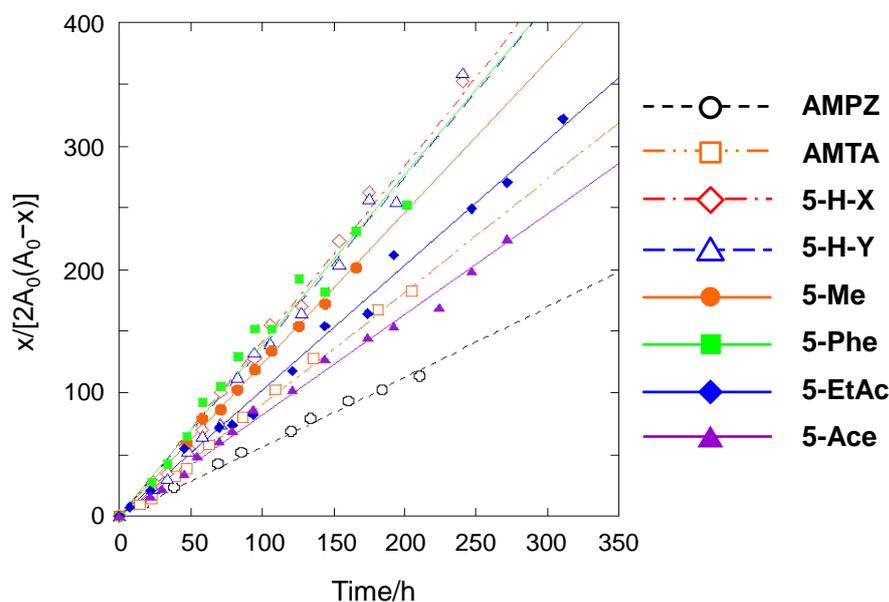


Fig. 1-2-8. Second-order Guggenheim plots of the reactions of tetrazolato-bridged complexes with 9EtG in D_2O at $37^\circ C$.

Table 1-2-4. Half-life values ($t_{1/2}$) and second-order rate constants (k) for the reactions of azolato-bridged complexes with two molar equiv. of 9EtG in D₂O at 37°C.

Complex	$k/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{h}$
AMPZ ²³	1.57×10^{-4}	221
AMTA ²³	2.53×10^{-4}	137
5-H-X	3.97×10^{-4}	87.3
5-H-Y	3.87×10^{-4}	89.8
5-Me	3.41×10^{-4}	102
5-Phe	3.84×10^{-4}	90.5
5-EtAc	2.82×10^{-4}	123
5-Ace	2.27×10^{-4}	153

結合異性体である **5-H-X** および **5-H-Y** の反応速度は、ほとんど同程度であった。これらの反応速度を、**AMPZ** および **AMTA** における反応速度と比較すると、**5-H-X** および **5-H-Y** の反応速度は、**AMPZ** より約 2.5 倍および **AMTA** より 1.5 倍速いことが分かった。この結果から、一連のアゾラト架橋錯体の核酸塩基との反応速度は、azole 環の窒素原子の数の増加とともに、増大することが分かった。反応速度に影響を与える要因として、律速反応において脱離する hydroxo 架橋配位子の安定性が挙げられた。hydroxo 架橋配位子に対して影響を及ぼす要因として、本節の冒頭で述べたような分子内水素結合による hydroxo 架橋配位子の不安定化に加えて、amine 配位子の *trans* 効果や π -acceptor 効果が影響している可能性が考えられる。しかし、脱離基である hydroxo 架橋配位子に対して、*trans* 位に位置する amine 配位子が及ぼす *trans* 効果は、各アゾラト架橋錯体間で等価であると推定された。一方、 π -acceptor 効果は、白金錯体のような平面正方配位錯体の配位子置換反応の反応速度に影響を及ぼすことが報告されている³³。アゾラト架橋錯体の場合、hydroxo 架橋配位子に対して *cis* 位に位置する azole 環が *cis*- π -acceptor 効果を発揮すると考えられる。従って、各 azole 環の π -acceptor として能力の違いが、hydroxo 架橋配位子の不安定化に差を生み、結果的に反応速度に違いを生じさせる可能性が考えられる。

5-H-Y および **5-H-Y** 誘導体の反応速度は、**5-H-Y** \approx **5-Phe** > **5-Me** > **5-EtAc** > **5-Ace** の順に小さいことが分かった。**5-Phe** の反応速度は **5-H-Y** とほぼ同じであり、**5-Me** においても、比較的 **5-H-Y** に近い反応速度で反応が起こっていることが分かった。注目すべき点は、**5-Phe** のような立体的にかさ高い置換基を有する錯体であっても反応速度に差はほとんど生じなかったことである。**AMTA** においても、同様の例が報告されている²³。**AMTA** の k が、 $2.53 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であるのに対し、triazole 環の

C4位にphenyl基を導入した錯体[$\{cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-4-phenyl-1,2,3-triazolate-N1,N2})\}^{2+}$]における k は、 $2.53 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である。これらの結果から、白金(II)原子から比較的離れた距離に存在するalkyl基やaryl基などの置換基は、アゾラト架橋錯体と核酸塩基との反応速度にほとんど影響を及ぼさない可能性が考えられる。一方で、**5-EtAc**および**5-Ace**の反応速度は、**5-H-Y**誘導体の中では小さく、**AMTA**に近いことが分かった。両錯体は、carboxylate基を有し、分子内に酸素原子が存在する。従って、未反応の9EtGのN(7)窒素原子が白金(II)原子に対して求核攻撃をする際、9EtGと水素結合を形成する可能性が考えられる。これによって、遷移状態である五配位白金錯体の形成が妨げられ、他のテトラゾラト架橋錯体と比較して、**5-EtAc**および**5-Ace**の反応速度が低下していると推定された。

1-2-3. まとめ

5-H-Y 誘導体は、二当量の9EtGと反応し、**5-H-Y**と同様の異性化反応を呈することが分かった。つまり、置換基の種類と関係なく、白金(II)原子はN(3)からN(4)（あるいは、N(2)からN(1)）窒素原子へ転移し、非対称性の最終生成物を生じることが明らかにされた。**5-H-Y** 誘導体における反応速度についても、5位の置換基の影響を大きく受けないことが分かった。しかし、アゾラト架橋錯体間の比較によって、分子内の二つの白金(II)原子を架橋しているazole環の窒素原子の数が増加すると、反応速度も増加することが確認された。これらの反応速度が、DNAとの反応および*in vitro*細胞増殖抑制活性に寄与しているかどうかについては大変興味深い。

1-2-4. 実験方法

1-2-4-1. 試薬

テトラゾラト架橋錯体は、米田らにより報告された方法に従って合成、精製および同定し、¹H-NMR により純度の確認を行った^{24, 25}。9EtG は Sigma-Aldrich 社の製品を用いた。その他の試薬は特級以上の品位の市販品を精製することなく用いた。また、MILLIPORE 社の純水製造装置 DIRECT-Q[®]3 UV によって製造した超純水を使用した。

1-2-4-2. NMR 分光法

¹H-NMR は Varian 社の NMR 装置 Varian NMR System 400 NB を用いて測定した。基準物質には、sodium 3-trimethylsilyl-propionate-2,2,3,3-*d*(4) (TSP、 $\delta = 0$) を用いた。

1-2-4-3. NMR 分光法を用いた 9EtG との反応の解析

4 mM の各テトラゾラト架橋錯体を 37°C で 8 mM 9EtG と重水溶液中で反応させた。各反応は NMR 測定用試験管内で約 10 日間行い、適当な時間間隔において 37°C における ¹H-NMR を測定した。反応開始前および終了後に、重水溶液の pD を堀場社の pH 測定装置 D-13 pH meter あるいは IQ Scientific Instruments 社の pH 測定装置 IQ150 を用いて測定した。各テトラゾラト架橋錯体の pD 変化 (反応開始前→終了後) は以下の通りであった。**5-Me**: 8.49→8.38、**5-Phe**: 8.69→8.32、**5-EtAc**: 8.58→8.46、**5-Ace**: 7.75→7.07。

1-2-4-4. 質量分析法を用いた 9EtG との反応における最終生成物の解析

4 mM の各テトラゾラト架橋錯体を 37°C で 8 mM 9EtG とマイクロチューブ内において水溶液中で反応させた。反応開始から 193 時間後に溶液の一部を採取し、100 倍希釈後、マススペクトルを測定した。マススペクトルの測定には、BRUKER 社の質量分析装置 microTOF-Q を用い、positive モードで行った。

1-2-4-5. pH 滴定

4 mM の各テトラゾラト架橋錯体を 37°C の水溶液中で 8 mM 9EtG とマイクロチューブ内において 100 時間反応させた。各反応溶液を凍結乾燥後、反応液と同量の重水で溶解し、NMR 測定用試験管に分注した。堀場社の pH 測定装置 D-13 pH meter あるいは IQ Scientific Instruments 社の pH 測定装置 IQ150 を用いて、室温における重水溶液の pD を測定しながら、0.1 M DNO₃ および NaOD を添加し、pD が適当な値となるように調製した後、室温における ¹H-NMR を測定した。pH 滴定の結果は (1-2-1)式を用いて解析した。p*K*_a を最終生成物中の N(1)H の酸解離定数、 δ_A を未反応の 9EtG、 δ_B を最終生成物中の H8 の化学シフト (ppm) とするとき、以下の式が成り立つ。

$$\delta = \frac{\delta_A [\text{H}^+] + \delta_B \text{p}K_a}{[\text{H}^+] + \text{p}K_a} \quad (1-2-1)$$

近似曲線の作成には、Synergy Software 社の解析プログラム KaleidaGraph を用いた。上記の計算によって求められた重水中の酸解離定数 (pK_a in D_2O) は、(1-2-2)式を用いて軽水中の酸解離定数 (pK_a in H_2O) に換算した。

$$pK_{a\text{in}H_2O} = pK_{a\text{in}D_2O} - 0.4 \quad (1-2-2)$$

1-2-4-6. 反応速度論的解析

1-2-4-3 で得られた 1H -NMR スペクトルをもとに、(1-2-3)式から二次反応速度定数、(1-2-4)式から半減期を求めた。 k を一連の反応 (Scheme 1-2-1) の律速段階の二次反応速度定数 ($M^{-1} h^{-1}$)、 x を反応開始 t 時間後における最終生成物の濃度 (M)、 A_0 を各テトラゾラト架橋錯体の初期濃度 (M)、 $t_{1/2}$ を半減期 (h) とするとき、以下の式が成り立つ。

$$kt = \frac{x}{2A_0(A_0 - x)} \quad (1-2-3)$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{kA_0} \quad (1-2-4)$$

各反応時間における最終生成物の濃度の算出には、H8 の相対強度を用いた。

1-3. 二本鎖 DNA との反応における Pt—DNA 共有結合性付加物の定量

1-3-1. 背景および目的

一連のアゾラト架橋錯体は、核酸塩基と 1 : 2 の反応比で結合し、共有結合性付加物を生成する（「本論 1-1 および 2」）。一方で、序論において述べたように、シスプラチンと二本鎖 DNA との相互作用によって生成する共有結合性付加物は、同鎖上の d(GpG)あるいは d(ApG)における 1,2-鎖内架橋が主である^{9,12}。主要付加物に比べて生成量は少ないが、二本鎖の向かい合った位置に存在する d(GpC)・d(GpC)における鎖間架橋も存在すると報告されている^{9,13}。このことから、白金錯体の二本鎖 DNA との共有結合性付加物の生成量および速度は、天然に存在する DNA 上のターゲット塩基配列の存在比率や位置などによって影響を受けると考えられる。従って、実際の細胞あるいは細胞核内に近い条件下で、白金錯体と二本鎖 DNA との反応性について明らかにすることは、制がん活性との関連を議論する上で、非常に重要であると考えられる。

細胞内に取り込まれたシスプラチンは、主に三つの生体高分子に結合すると言われている³⁴。(1) 細胞質中に高濃度で存在する RNA (50%)、(2) DNA (40%) 並びに (3) タンパク質 (10%) である。中でも、シスプラチンの標的分子である DNA は、細胞核内において、クロマチン構造により小さく折りたたまれている。クロマチン構造は、ヌクレオソームを基本単位としており、一つのヒストンコアにつき DNA 鎖が二回転分巻き付いた構造をとっている。このような折りたたみ構造を有しているにもかかわらず、クロマチン構造中においても³⁵、超らせん構造を有している DNA 鎖においても³⁶、Pt—DNA 付加物の生成速度は、影響を受けないということが分かっている。このことから、単離された DNA と白金錯体との水溶液中における反応は、細胞内における Pt—DNA 付加物の反応速度論的解析に関する解析を行うのに妥当なモデルと言える。

そこで、本章では、天然に存在する二本鎖 DNA のモデルとして、仔ウシ胸腺 DNA を用い、シスプラチンあるいは **5-H-Y** と仔ウシ胸腺 DNA の共有結合性付加物を Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) を用いて経時的に定量し、その生成量や生成速度を比較した。

1-3-2. 結果および考察

仔ウシ胸腺 DNA と白金錯体のモル比が 1 : 0.08 となるように、37°C の 10 mM HEPES (pH 7.5)、100 mM KClO₄、2 mM MgCl₂ 水溶液中で反応させた。仔ウシ胸腺 DNA の nucleotide 濃度は 100 μM とし、260 nm における仔ウシ胸腺 DNA 溶液の吸光度からモル吸光係数 6,600 (mol/L)⁻¹·cm⁻¹ を用いて算出した³⁷。シスプラチンの chloride 配位子は、溶液中で水配位子に置換される(「序論」Fig. 2)。シスプラチンの chloride 配位子が水配位子に置換された状態である aqua 錯体は、chloride 配位子を有する状態より反応性に富む。従って、反応液中の Cl⁻ の濃度は、仔ウシ胸腺 DNA に対する共有結合性付加物の生成速度に影響を及ぼすと考えられる。本反応では、Cl⁻ の濃度を 4 mM、さらに反応溶液の pH を 7.5 とし、細胞質に近い条件で各白金錯体と仔ウシ胸腺 DNA を反応させた。

Pt—DNA 共有結合性付加物を定量するにあたり、反応溶液中に存在する未反応の白金錯体や非共有結合性相互作用によって DNA に結合している白金錯体を取り除く必要性があった。特に、この前処理は、DNA に対して非共有結合性相互作用を示すと予想されるテトラゾラト架橋錯体については、重要であると考えられる。これまでの報告では、ピラゾラト架橋錯体と、仔ウシ胸腺 DNA あるいはプラスミド DNA との相互作用について明らかにする実験において、Pt—DNA 共有結合性付加物を精製する方法として、透析法や EtOH 沈澱法が用いられていた³⁸。しかし、透析法や EtOH 沈澱による精製では、テトラゾラト架橋錯体の非共有結合性付加物を除去することができなかったため(データ不掲載)、DNA と白金錯体の反応液の前処理として限外ろ過法を試みた(Fig. 1-3-1 B)。

適当な時間間隔において反応液 (250 μL) を採取し、同量の 4 M NH₄Cl と混合し、限外ろ過を行った。4 M NH₄Cl を添加することで、十分量の Cl⁻ と共存させ、精製過程において、上述のシスプラチンの配位子置換反応を起こりにくくし、反応液の採取後から前処理の間に、新たに反応性の高い分子種が増加しないようにした。また、限外ろ過処理の途中で、最終濃度がそれぞれ 0.2 mM、200 mM となるように、EDTA および NaOH を添加した。この時の溶液の pH の実測値は、8.50–8.70 程度であった。この pH において、DNA の二本鎖構造の変化が生じることが知られており^{39,40}、この操作を経ることによって、DNA の major/minor groove において、非共有結合性相互作用によって結合している白金錯体の除去を試みた。この操作の後、4 M NH₄Cl あるいは超純水を添加して限外ろ過を行った。この時の pH の実測値は、それぞれ 6.97–7.23 あるいは 6.89–7.13 となっており、続く吸光度法による DNA の定量には影響を与えないと考えられる³⁹。

Fig. 1-3-1 B に示した方法に従って前処理を行った後、DNA に結合している白金錯体を ICP-MS によって定量し、結合比 (r_b = DNA に結合している白金錯体の量 (mol) / 仔ウシ胸腺 DNA の量 (mol in nucleotide)) を算出した(データ不掲載)。その結果、反応時間 0–6 時間における r_b が、それ以降の反応時間における r_b より大きくなった。一度形成された Pt—DNA 共有結合性付加物から、白金錯体が遊離することは、Pt—N 間の結合の強さから考えて、本反応条件下では起こりにくいと考えられる。従って、反応時間 0–6 時間における r_b が大きくなったのは、未反応の白金錯体および非共有結合性相互作用によって DNA に結合している白金錯体が、Fig. 1-3-1 B に示した方法では、十分に取り除かれていないためであると推察された。そこで、限外ろ過法による前処理の前段階として、陽イオン交換樹脂を用いた処理 (Fig. 1-3-1 A) を行うことにより、反応時間 0–6 時間における前処

理の改善を試みた。

限外ろ過法の場合と同様に、採取した反応液（250 μL ）を 4 M NH_4Cl （100 μL ）と混合し、全量を陽イオン交換樹脂に通して処理を行った。この処理における陽イオン交換樹脂の conditioning step および washing step では超純水を用いた。その結果、反応初期における r_b について良好な結果が得られたため ($r_b = < \sim 0.01$ 、データ不掲載)、Pt—DNA 共有結合性付加物の定量を行うために、Fig. 1-3-1 の通りに前処理を行うこととした。

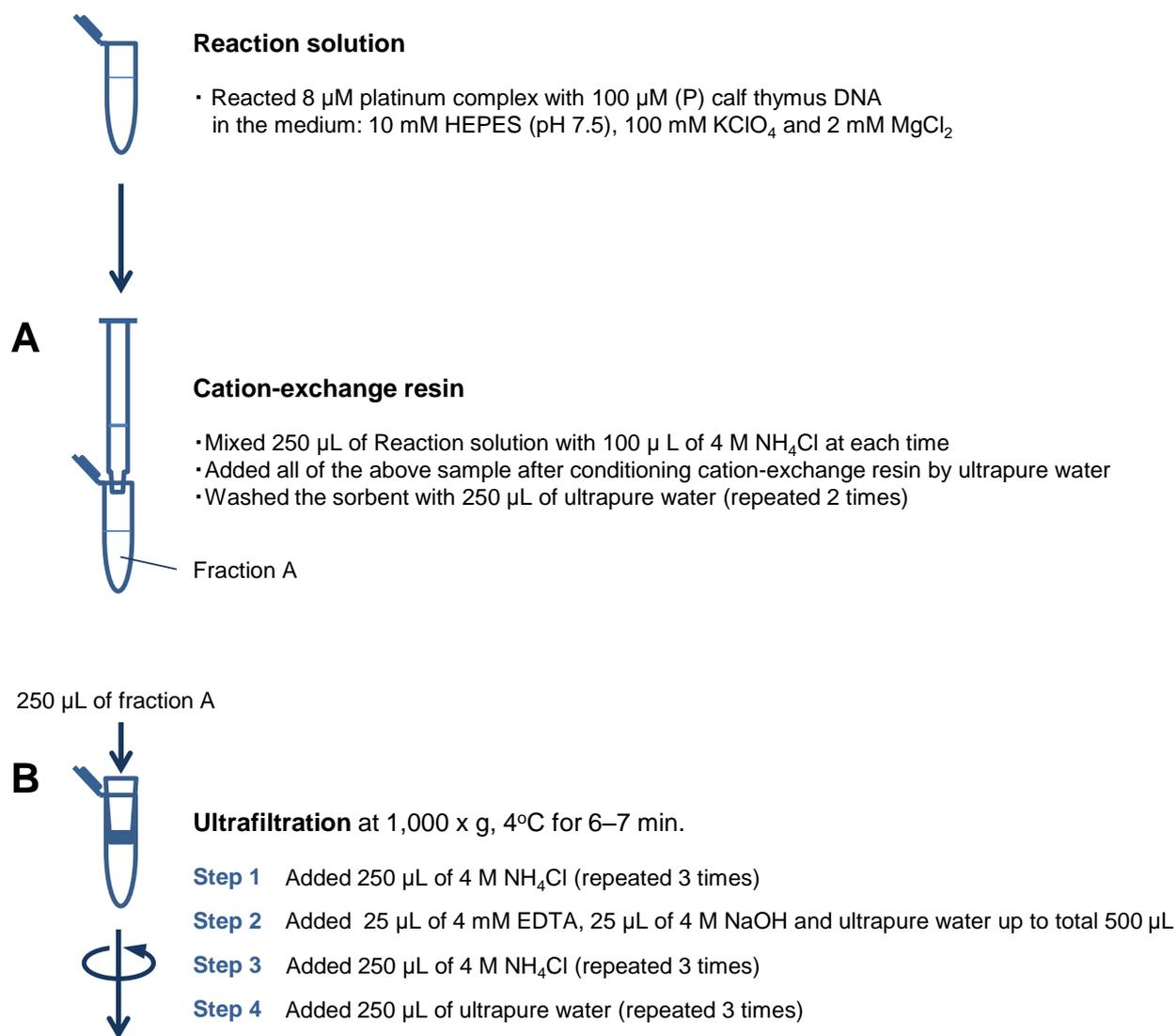


Fig. 1-3-1. Pretreatment method for the quantification of Pt—calf thymus DNA covalent adduct.

シスプラチンおよび **5-H-Y** における r_b の時間経過に伴う変化の様子を Fig. 1-3-2 に示した。錯体としての結合量を示すため、一分子内に二分子の白金原子を有する **5-H-Y** では、得られた値を 2 で除して r_b を得た (式(1-3-3'))。シスプラチンでは、反応時間 100 時間を過ぎたあたりから r_b の増加は見られなくなり、最終的に $r_b \sim 0.017$ を示した。一方、**5-H-Y** では、測定した反応時間内を過ぎても、 r_b が漸増していくことが予想されるような変化の様子を示し、反応時間 120 時間における r_b は、約 0.0044 であった。反応開始から 120 時間後において、シスプラチンの方が、共有結合性付加物を形成している錯体の量が約 3.5 倍多いことが分かった。

共有結合性付加物の生成速度の指標として、反応開始から 24、48 および 120 時間後における r_b を比較すると、シスプラチンの方が **5-H-Y** よりそれぞれ 5.6、7.8 および 3.5 倍大きかった。共有結合性付加物の生成速度に影響を与える要因として、 Cl^- の濃度や pH の他に、温度やイオン強度、共存物質の種類などを考慮する必要があると考えられるが、本結果から、二本鎖 DNA と共有結合性付加物を形成する速度は、**5-H-Y** よりシスプラチンの方が大きいことが示唆された。

仔ウシ胸腺 DNA との共有結合性付加物の生成速度および生成量は、*in vitro* 細胞増殖抑制活性と比較すると、相関が無いことが分かった。例えば、シスプラチンおよび **5-H-Y** の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は、H460 非小細胞肺癌において、23 (シスプラチン) および 9.2 μM (**5-H-Y**) であることが分かっている²⁴。また、同じ非小細胞肺癌である PC9 細胞において、0.7 (シスプラチン) および 0.5 μM (**5-H-Y**)、PC14 細胞において *in vitro* 細胞増殖抑制活性を調べると、1.7 (シスプラチン) および 0.2 μM (**5-H-Y**) であった。それぞれの IC_{50} を比較すると、ほぼ同等か、あるいは、シスプラチンの方が高い値、つまり低い *in vitro* 細胞増殖抑制活性を示した。さらに、PC9 および PC15 細胞のシスプラチン耐性細胞である PC9R および PC14R 細胞における IC_{50} は、PC9R 細胞では 12.0 (シスプラチン) および 0.4 μM (**5-H-Y**)、PC14R 細胞では 18.0 (シスプラチン) および 0.4 μM (**5-H-Y**) で、シスプラチンの *in vitro* 細胞増殖抑制活性が、それぞれのシスプラチン感受性細胞と較べて大きく減弱している一方で、**5-H-Y** の *in vitro* 細胞増殖抑制活性は、わずかに増強あるいは同程度を維持していることが分かった。シスプラチン感受性および耐性細胞に取り込まれた後、核内で DNA と反応して共有結合性付加物を生成する反応において、両細胞間で生成速度および生成量に、大きな差はないと予想される。従って、無細胞条件下での二本鎖 DNA と共有結合性付加物の形成速度は、*in vitro* 細胞増殖抑制活性と相関が無いことが分かった。つまり、**5-H-Y** の高い活性には、二本鎖 DNA あるいは核酸塩基との共有結合性付加物の生成速度および生成量以外の要因、特に細胞核に到達する以前の経路における要因が影響している可能性が考えられる。

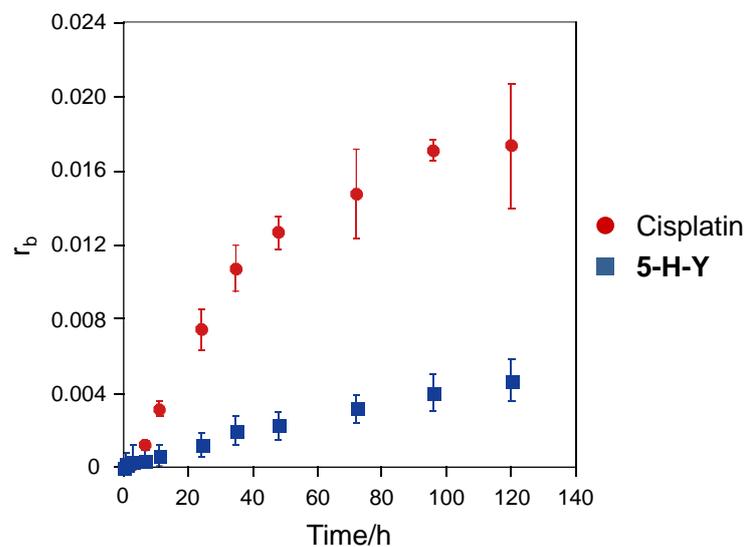


Fig. 1-3-2. Kinetics of the covalent binding of cisplatin and **5-H-Y** to calf thymus DNA in the buffer solution composed of 10 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM KClO₄, 2 mM MgCl₂ at 37°C ($n = 4$, mean \pm SD).

1-3-3. まとめ

細胞質と同等の条件におけるシスプラチンあるいは**5-H-Y**と仔ウシ胸腺 DNA の共有結合性相互作用について、共有結合性付加物生成量および生成速度の両方において、シスプラチンの方が**5-H-Y**を上回っていることが分かった。しかしながら、これまでに分かっている *in vitro* 細胞増殖抑制活性はシスプラチンよりも**5-H-Y**の方が高い。このことから、両錯体間における *in vitro* および *in vivo* 活性における違いは、共有結合性付加物生成量および生成速度にはよらず、標的細胞に到達するまでの経路や細胞に取り込まれる量などの違いによって生じているのではないかと考えられる。

1-3-4. 実験方法

1-3-4-1. 試薬

テトラゾラト架橋錯体は米田らにより報告された方法に従って合成、精製および同定し、¹H-NMRにより純度の確認を行った²⁴。シスプラチンはAlderdenらにより報告された方法に従って合成した⁴¹。仔ウシ胸腺 DNA は Sigma 社の calf thymus DNA type I (15–23 kbp)を用いた。HNO₃は関東化学社の Ultrapur-100 Nitric Acid 1.42 を用いた。ICP-MS の白金標準試液およびタリウム標準試液は、それぞれ和光純薬工業社から購入した。抗生物質は、Invitrogen (Life Technologies) 社から購入した。Cell Counting Kit-8 溶液は同人化学研究所の製品を用いた。その他の試薬は特級以上の品位の市販品を精製することなく用いた。また、MILLIPORE 社の純水製造装置 DIRECT-Q[®]3 UV によって製造した超純水を使用した。

1-3-4-2. CT DNA との反応および白金—DNA 付加物の精製

8 μM の各テトラゾラト架橋錯体を 37°C の 10 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM KClO₄, 2 mM MgCl₂ 水溶液中で、100 μM in phosphate 仔ウシ胸腺 DNA と反応させた。反応開始から 0、1、3、6、9、12、24、36、48、72 時間後に反応液 250 μL を採取した。各反応液は、(1) SUPELCO 社の陽イオン交換樹脂 Discovery[®] DSC-WCX および(2) PALL 社の限外ろ過装置 NANOSEP を用いて前処理を行った (Fig. 1-3-1)。

前処理(1)は、GL Science 社の GL-SPE 吸引マニホールキットを用いて、以下の手順に従って行った。陽イオン交換樹脂に超純水 500 μL を添加後、吸引し、この操作を計 2 回行うことで conditioning を行った。続いて、反応液 250 μL を採取し、4 M NH₄Cl 100 μL と混合後、全量を陽イオン交換樹脂に添加し、マイクロチューブへ吸引捕集した。超純水 250 μL を添加後、同じマイクロチューブへ吸引捕集し、この操作を計 2 回行うことで washing を行い、反応液と washing 液を合わせて回収した。

前処理(2)は、以下の通りに i–v)の順に従って行った。手順 ii)は 2 回、手順 iv)および v)はそれぞれ 3 回繰り返した。遠心操作は、TOMY 社の微量高速冷却遠心機 MX-301 を用いて、4°C、1,000×g で 6–7 分間行った。i) 前処理(1)を行った溶液 250 μL を限外ろ過ユニットに移し、4 M NH₄Cl 250 μL と混和後、遠心した。ii) 4 M NH₄Cl 250 μL を添加し混和後、遠心した。iii) 得られた溶液の容量を測定し、全量が 500μL となるように超純水を添加後、4 mM EDTA 25 μL、4 M NaOH 25 μL をそれぞれ添加し混和後、遠心した。iv) 4 M NH₄Cl 250 μL を添加し混和後、遠心した。v) 超純水 250 μL を添加し混和後、遠心した。

1-3-4-3. ICP-MS による白金—DNA 付加物の定量

1-3-4-2 で得られた溶液 50 μL をマイクロチューブに取り、超純水 950 μL を添加し超音波処理を行った。超音波処理には TAITEC 社の超音波破碎機 VP-050 を用い、パルス幅変調制御機能を利用して、1 サイクルを 30 秒 ON および 30 秒 OFF として 5 サイクル行った。この溶液に 4%(v/v) HNO₃ 1 mL を添加し混和した後、Agilent 社の ICP-MS 装置 7500CX を用いて白金の定量を行った。

ICP-MS装置は白金の測定に最適な設定を行った。検量線は白金濃度が0.1、1、10、100 $\mu\text{g/L}$ の2%(v/v) HNO_3 溶液を用いて作成した。内標準には、タリウム (m/z 204) を用いた。500 $\mu\text{g/L}$ タリウムの2%(v/v) HNO_3 溶液を流速20 $\mu\text{L/min}$ で流路に添加することで、タリウムの最終濃度が10 $\mu\text{g/L}$ となるようにした。

1-3-4-4. 白金—DNA 付加物の結合比 r_b の算出

1-3-4-2 で得られた溶液の容量 P (μL) を測定後、260 nm における吸光度 Abs_{260} を GE Healthcare Life Science 社の紫外可視吸光時計 Gene Quant pro を用いて測定した。仔ウシ胸腺 DNA のモル吸光係数 6600 ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) から(1-3-1)式に従って溶液中の DNA の量 Y (mol in nucleotide) を算出した。

$$Y = \frac{\text{Abs}_{260}}{6600} \times X \times 10^{-6} \quad (1-3-1)$$

1-3-4-3 で得られた白金濃度 P ($\mu\text{g/L}$) およびブランク値として仔ウシ胸腺 DNA に超純水を添加し(1-3-1)式と同様の式で求めた白金濃度 Q ($\mu\text{g/L}$) から 1-3-4-2 で得られた溶液中の DNA に結合している白金錯体の量 Z (mol) を(1-3-2)式に従って算出した。

$$Z = (P - Q) \times 2 \times 10^{-3} \times \frac{1}{195} \times 10^{-6} \times \frac{X}{50} \quad (1-3-2)$$

(1-3-1)および(1-3-2)式から求めた DNA および白金錯体の量から白金-DNA 付加物の結合比 r_b を(1-3-3)式から算出した。

$$r_b = \frac{Z}{Y} \quad (1-3-3)$$

テトラゾラト架橋錯体は分子内に白金原子を二つ有しているため、錯体の量に換算するために(1-3-3)'式を用いた。

$$r_b = \frac{Z}{Y} \times \frac{1}{2} \quad (1-3-3)'$$

1-3-4-5. 使用細胞、培養条件および *in vitro* 細胞増殖抑制活性試験

非小細胞肺癌である PC9、PC14 細胞およびそのシスプラチン耐性細胞 PC9R、PC14R 細胞は、10% (v/v) FBS、各種抗生物質 ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ penicillin、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ streptomycin) を含む RPMI1640

培地中で、湿度が十分に保たれた CO₂ インキュベータ (5% CO₂、37°C) 内で培養した。

白金錯体を添加する前日に、各細胞を最終濃度 $2 \times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ となるように調製し、96-well プレート各 well に 100 μL ずつ分注した。各錯体を最終濃度 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ となるように PBS に溶解した。この溶液を様々な濃度に希釈し、100 μL ずつ各 well に添加した。湿度が十分に保たれた CO₂ インキュベータ (5% CO₂、37°C) 内で 72 時間定温放置した後、Cell Counting kit-8 溶液を各 well に 10 μL ずつ添加し、さらに 3 時間定温放置した。計 75 時間の定温放置後、Bio-Rad 社のマイクロプレートリーダー Benchmark を用いて 450 nm における吸光度を測定した。各実験の繰り返し回数 (n) は 3-4 回であり、各濃度における吸光度は、6 well における結果を平均して求めた。白金錯体の濃度が 0 μM における formazan 生成量に対して、50% の量の formazan を生じている濃度から IC₅₀ を算出した。

2. テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の非共有結合性相互作用による DNA の構造変化

2-1. 仔ウシ胸腺 DNA の二次構造変化の解析

2-1-1. 背景および目的

DNA 鎖は大幅な構造的柔軟性を有する。通常は二本鎖で存在し、その柔軟性から生じる様々な二次構造をとる。二本鎖 DNA の二次構造は、らせんの向きや直径、らせん一回転あたりに存在する核酸塩基の数、DNA 鎖の軸に対する核酸塩基の傾きなどの構造的特徴を基に分類される。代表的な二次構造として A 型、B 型、Z 型などが挙げられ、配列が分かっている DNA のうち、90%以上が B 型 DNA に類似した構造をとっていると分類することができる⁴²。

DNA の二次構造は、intercalator や groove binder などの DNA と相互作用する化合物によって変化することが知られている⁴²。これらの化合物が引き起こす二次構造の変化は、円偏光二色性 (circular dichroism : CD) スペクトルを観察することによって捉えることができる⁴³。DNA では、波長が 210–290 nm における CD スペクトルを測定することが多い。CD は DNA の構造に非常に敏感であり、そのため、DNA の多形、つまり DNA の二次構造変化を観察するのに好ましい手法として非常によく用いられている。CD スペクトルは、連続体中の平均化された分子構造を表現している。言い換えると、それ自体では、特定の塩基や残基の配向性を決定することはできない。しかし、溶液や温度などの条件が変化した場合や、薬物などが結合した場合において、巨視的な構造変化が起こったかどうかを決定できる。つまり、DNA 溶液に DNA と相互作用する化合物を添加した時の CD スペクトルを測定することで、その化合物が DNA の二次構造に与える影響が分かる。さらに、CD スペクトルがどのような変化を引き起こすかを調べれば、DNA との相互作用様式を解明することができる。

本章では、アゾラト架橋錯体の共有結合性相互作用および拡散律速的な非共有結合性相互作用について明らかにするために、仔ウシ胸腺 DNA 水溶液にアゾラト架橋錯体を添加し、アゾラト架橋錯体の濃度依存性、あるいは、添加後の時間依存性の CD スペクトル変化を観察した。

2-1-2. 結果および考察

二本鎖 DNA の二次構造が、共存化合物の影響を受けて変化する様子は、化合物を用いた滴定を行うことによって調べることができる。仔ウシ胸腺 DNA の二次構造が、白金錯体の濃度依存的にどのように変化するかを調べるために、濃度の異なるシスプラチン, $cis-[Pt(NH_3)_2(\mu-OH)]_2^{2+}$ (dihydroxo-bridged dimer : **DHBD**, Fig. 2-1-1), および一連のアゾラト架橋錯体を仔ウシ胸腺 DNA 溶液に添加し、それぞれの CD スペクトルを測定した。仔ウシ胸腺 DNA は、二本鎖 DNA の二次構造と白金錯体の生物学的活性との関係を調べるために、しばしば用いられている。

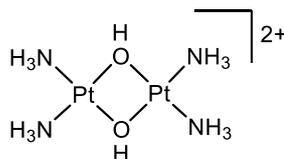


Fig. 2-1-1. Schematic representation of **DHBD**.

それぞれの白金錯体 (0, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 30 μM) の添加直後に測定した仔ウシ胸腺 DNA (30 μM in nucleotide) の CD スペクトルを Fig. 2-1-2 に示した。シスプラチンを添加した場合、CD スペクトルの変化は、ほとんど観察されなかった。Fig. 2-1-2 には、モル混合比 ($r =$ 白金錯体濃度 / DNA nucleotide 濃度) が 0–0.33 における結果を示した。シスプラチンを $r = 1.0$ まで添加しても CD スペクトルの変化はほとんど見られなかった (データ不掲載)。一方で、**5-Ace** を除くアゾラト架橋錯体および **DHBD** を添加した場合、著しい CD スペクトルの変化が観察された。特に、275 nm 付近における楕円率の変化が顕著であり、正の Cotton 効果の強度が大きく減少していた。白金錯体の濃度が上昇するにつれて、Cotton 効果が減少する傾向があり、さらに、これらの変化は、243 nm 付近の負の Cotton 効果の比較的小さな変化を伴って起こることが分かった。

Fig. 2-1-3 には、278 nm における楕円率の変化量 ($\Delta\theta$) を、 r に対してプロットしたグラフを示した。 $\Delta\theta$ は、(2-1-1)式によって求めた。なお、 θ_0 は $r = 0$ 、つまり、白金錯体の非存在下における楕円率、 θ_r は $r = r$ における楕円率である。($r = 0, 0.033, 0.067, 0.17, 0.33, 0.67, 1.0$)

$$\Delta\theta = \theta_0 - \theta_r \quad (2-1-1)$$

各錯体とも、 $r = 0.33$ 以降では、 $\Delta\theta$ の増加がほとんど見られなくなった。 $\Delta\theta$ の値は錯体によって異なっており、二次構造を変化させる能力が錯体間で異なることが示唆された。

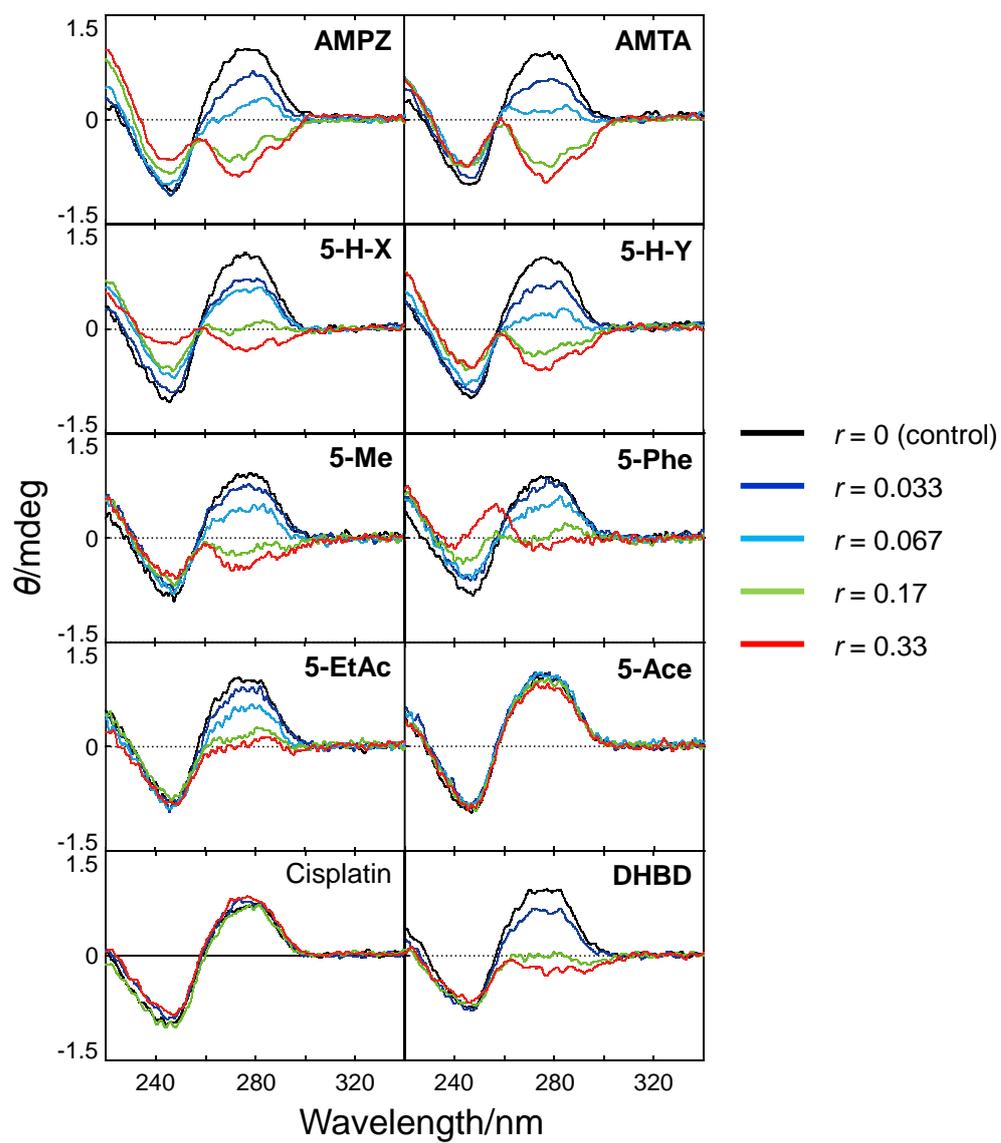


Fig. 2-1-2. CD spectra of calf thymus DNA obtained in the presence of different concentrations of each complex.

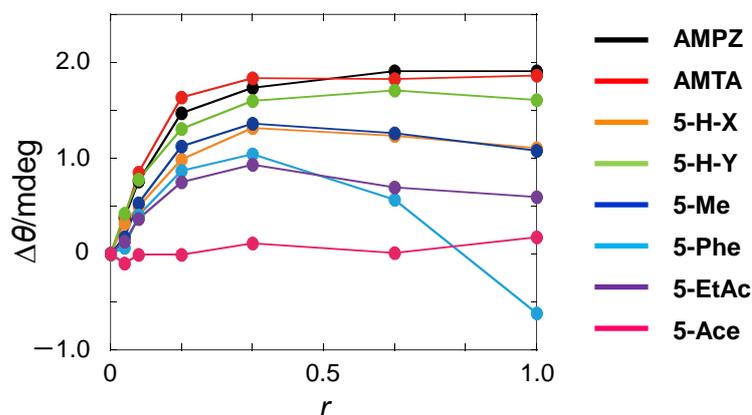


Fig. 2-1-3. Plots of $\Delta\theta$ at 278 nm vs. molar ratios (Pt complex/P).

アゾラト架橋錯体間の濃度依存性の CD スペクトル変化 (Fig. 2-1-2) を比較すると、**5-Phe** および **5-Ace** を除く 6 つの錯体における結果は、類似していることが分かった。特に、275 nm 付近の楕円率および位相は、6 つの錯体に共通して、上述した変化を示していた。アゾラト架橋錯体の中で、**AMPZ**、**AMTA**、**5-H-Y** および **5-Me** では、 $r=0.17$ および 0.33 における楕円率が、負の値にまで大きく変化しており、**5-H-X** および **5-EtAc** では、楕円率の減少の度合いが比較的小さかった。278 nm 付近のスペクトルの変化は、らせん一回転あたりに存在する核酸塩基の数の変化に対応していることが報告されている⁴⁴。また、B 型 DNA の CD スペクトルと比較して、260 nm 以下の負の Cotton 効果が小さく、260 nm 以上でも負の Cotton 効果を示す CD スペクトルは、C 型 DNA に特徴的であることが知られている⁴⁵。つまり、仔ウシ胸腺 DNA は、**AMPZ**、**AMTA**、**5-H-Y** および **5-Me** の添加によって、B 型 DNA から C 型 DNA に変化していることが示唆された。B 型 DNA 中の構造は、リン酸基の方向によって、さらに B_I および B_{II} 型の構造に分類できるが、C 型 DNA は、B 型 DNA と比較して ' B_{II} -rich' な構造である^{46, 47}。C 型 DNA となる条件として、低い相対湿度であることが挙げられ⁴⁸、他にも Li^+ 、 Mg^{2+} など、共存する金属イオンの関与も報告されている^{44, 45}。これらのイオンは、高い電荷密度を有する金属イオンであり、DNA のリン酸基の酸素原子に強く結合する。これらの金属イオン (数十 mM)⁴⁹ と比較して、アゾラト架橋錯体は、非常に低い濃度で C 型 DNA への二次構造変化をもたらすことが明らかにされた。

5-Phe では、特徴的な CD スペクトルが観察された。278 nm 付近の楕円率の減少とともに、260 nm 付近の楕円率の増加が観察された。さらに高濃度の **5-Phe** を添加すると ($r = 0.67, 1.0$)、260 nm 付近の正の Cotton 効果の度合いが増加した (Fig. 2-1-4 上)。この変化は、赤方偏移を伴っており、また、278 nm 付近の変化と比べて顕著で、 $r = 1.0$ における楕円率は、control における楕円率を上回っていた。その結果、Fig. 2-1-3 において、**5-Phe** の r が増加するにつれて、 $\Delta\theta$ が負の値をとるようになった。また、仔ウシ胸腺 DNA の非存在下で、様々な濃度の **5-Phe** の CD スペクトルを測定したところ、260 nm における CD の変化は、ほとんど観察されなかった (Fig. 2-1-4 下)。**5-Phe** が、265 nm 付近において、特徴的なスペクトル変化を呈していることは、注目に値した。この変化は、**5-Phe** の濃度の上昇に伴って著しく増加したにも関わらず、仔ウシ胸腺 DNA の非存在下では観察されなかったことから、tetrazole 環の 5 位の phenyl 基によって、他のアズラト架橋錯体とは異なる作用が引き起こされた可能性が考えられる。phenyltetrazole を結合させた核酸塩基を構成要素とする二本鎖 DNA において、**5-Phe** の結果と似通った CD スペクトルが観察されている⁵⁰。この実験において、265 nm 付近の楕円率およびモル楕円率が、DNA 鎖に含まれる phenyltetrazole の数に比例して増加することが報告されている。従って、**5-Phe** も同様に、DNA と相互作用した結果、仔ウシ胸腺 DNA のらせん構造に沿って、ある程度規則正しく配列していると予想された。

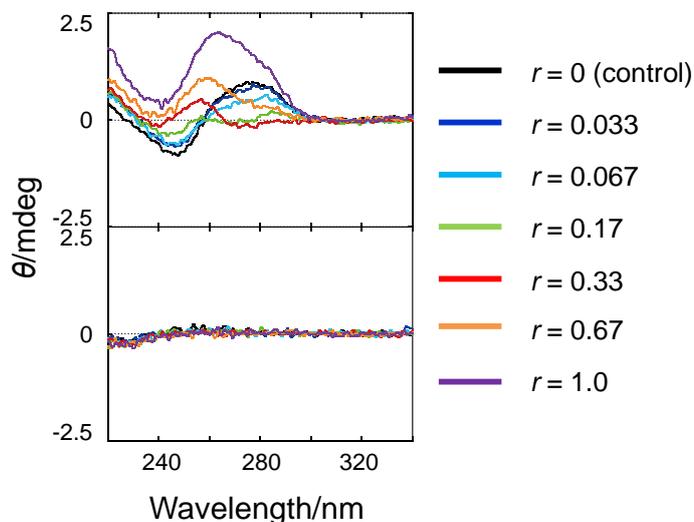


Fig. 2-1-4. CD spectra obtained from 0–30 μM **5-Phe** at 37°C with (upper) / without (lower) 30 μM calf thymus DNA.

一方で、**5-Ace** では、観測した波長における CD スペクトルの変化はほとんど観察されなかった。従って、Fig. 2-1-3 において、**5-Ace** の $\Delta\theta$ は、観察を行った全ての r において 0 付近の値となった。**5-Ace** は、一連のアゾラト架橋錯体の中で、唯一、錯体の総電荷が +1 の錯体である。DNA の糖-リン酸骨格のリン酸基の pK_a は、1.2 であると報告されている⁵¹。従って、本条件下 (pH 7.4) において、DNA 中のリン酸基は、負に帯電しており、一連のアゾラト架橋錯体と静電的な相互作用を示すと考えられる。**5-Ace** で CD スペクトルの変化は観察されなかったのは、錯体の電荷が減少したために、静電的な相互作用が弱められたことが影響したと推察された。

アゾラト架橋錯体の呈する静電的相互作用について、さらに詳細に理解するために、仔ウシ胸腺 DNA において、高濃度の無機塩存在下で、同様の CD スペクトル変化が起こるかどうかを確認した。Na⁺は、DNA のリン酸基の酸素原子に強く結合する^{44, 45}。Fig. 2-1-5 に、仔ウシ胸腺 DNA に対して、終濃度 200 mM となるように NaCl を添加した直後、あるいは、添加後 30 分が経過した後、各錯体を添加した際の CD スペクトル (薄青あるいは青) を示した ($r = 0.33$)。**5-Ace** を除く 5 つのテトラアゾラト架橋錯体において、錯体のみを添加した結果 (黒) と比較して、NaCl 添加直後あるいは 30 分後に各錯体を添加した結果は、大きく異なり、コントロール (灰) と比較すると、ほとんどスペクトル変化が引き起こされていないことが分かった。つまり、Na⁺によって、各錯体と仔ウシ胸腺 DNA との静電的相互作用は減弱されるということが分かった。この結果から、アゾラト架橋錯体の呈する相互作用が、DNA 中のリン酸基周辺で引き起こされている可能性が高いことが示された。

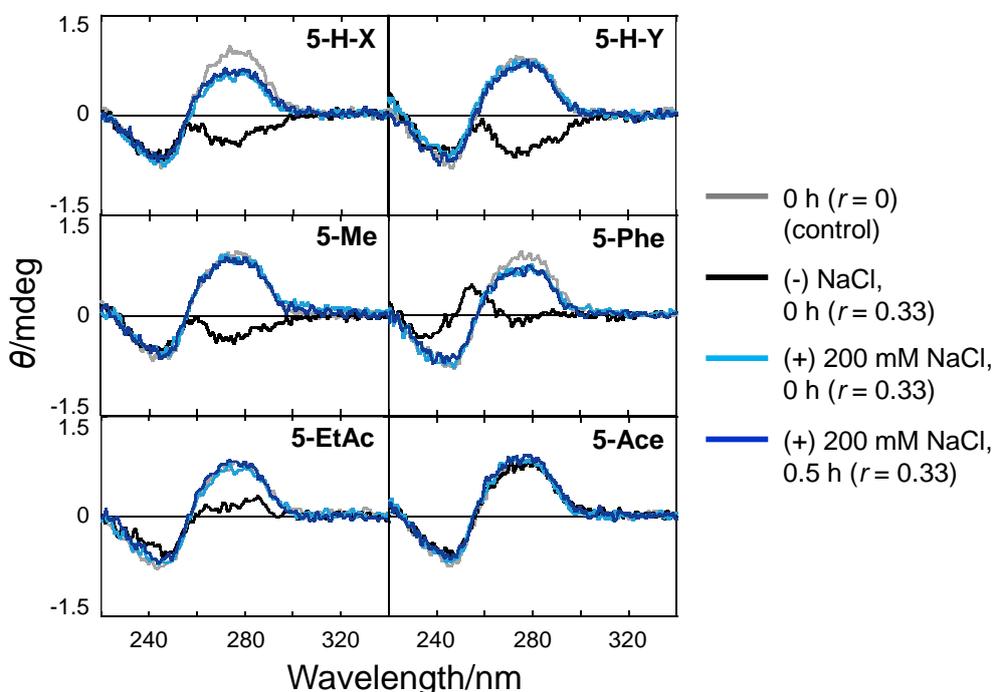


Fig. 2-1-5. Changes of CD spectra induced by adding NaCl at 37°C.

錯体の添加後、仔ウシ胸腺 DNA の二次構造が時間経過とともにどのように変化するかを調べるために、仔ウシ胸腺 DNA (30 μM in nucleotide) と 10 μM の各錯体 ($r = 0.33$) を 37°C の条件下で定温放置し、適当な時間間隔をおいて、CD スペクトルを測定した。その結果を Fig. 2-1-6 に示した。

シスプラチンは、比較的短い DNA 鎖の d(GpG) 部位への白金(II)原子の結合によって、局所的に A 型 DNA に近い構造へ変化させることが知られている^{52, 53}。この時、スペクトルの変化が観察される理由として、シスプラチンが DNA と共有結合性付加物を形成したことによって、Watson-Crick 型塩基対の乱れが生じ、部分的に DNA の変性が起きているためであると解釈されている。一方、仔ウシ胸腺 DNA (15–23 kbp) においては、278 nm 付近の Cotton 効果が赤方偏移を伴いながら減少していた (Fig. 2-1-6)。この現象は、*cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ (**diaqua 錯体**) と反応させた場合においても観察することができた。また、6 時間後のスペクトル (薄青) の比較から、**diaqua 錯体** におけるスペクトルの変化は、シスプラチンにおける変化よりも素早く起こっていることが分かった。このことから、シスプラチンで見られた時間依存的な CD スペクトルの変化は、白金(II)単核錯体による白金(II)原子の共有結合性相互作用によるものであると考えられる。

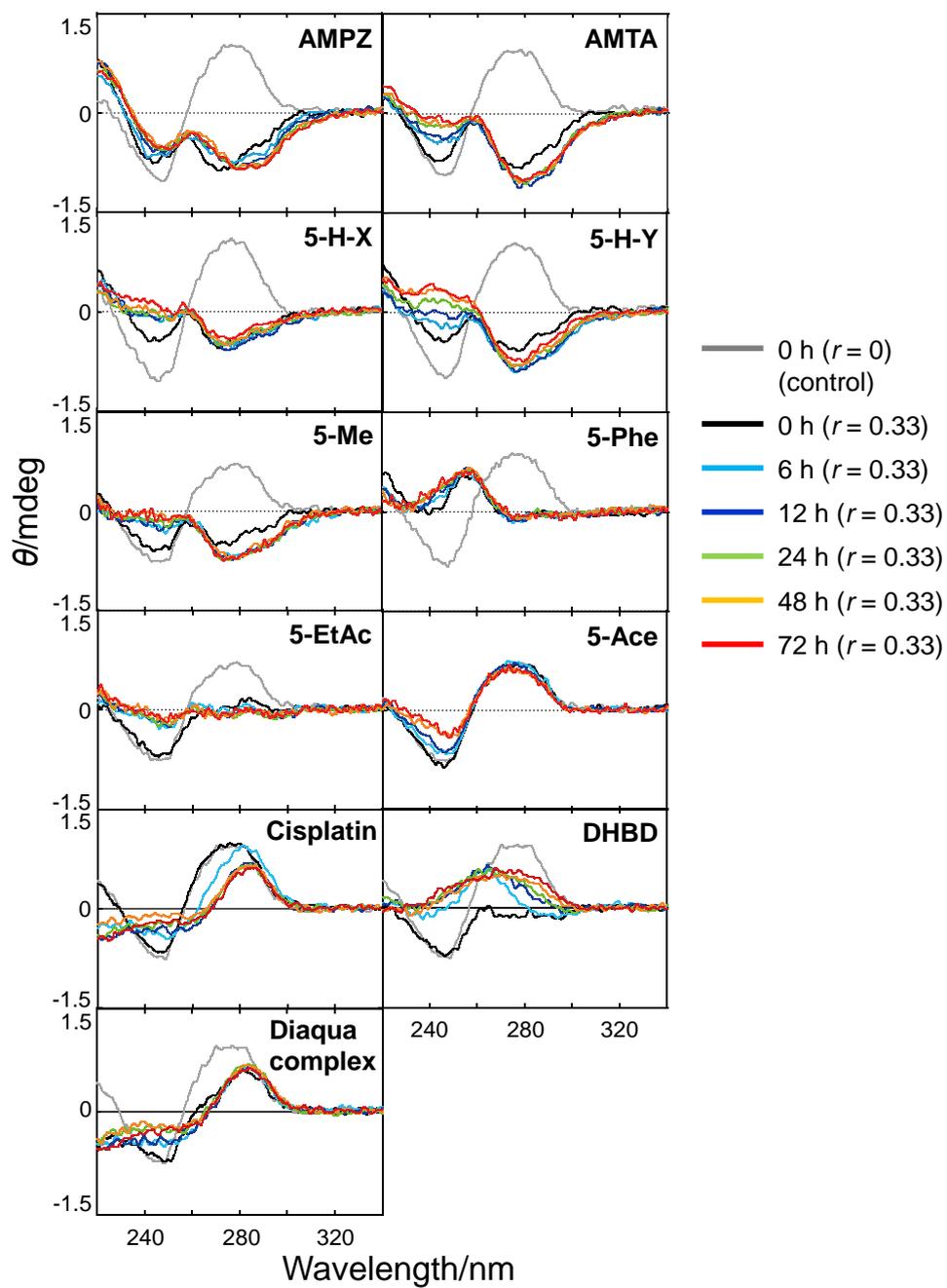


Fig. 2-1-6. CD spectra of 30 μM calf thymus DNA reacted with 10 μM each complex for 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h at 37°C.

アゾラト架橋錯体と仔ウシ胸腺 DNA の 37°C における反応では、特徴的な時間依存的変化が、243 nm 付近の CD バンドにおいて観察された (Fig. 2-1-6)。一方で、Fig. 2-1-7 に示すように、4°C における反応では、37°C で見られた 243 nm 付近の特徴的な CD スペクトルの変化は見られず、72 時間の反応後においてもほとんど観察されなかった。このことから、243 nm 付近のスペクトル変化は、明らかに反応温度の低下に伴って減少することが明らかにされた。従って、この変化を引き起こす反応は、温度依存性の共有結合性相互作用によるものである可能性が高いと考えられる。つまり、アゾラト架橋錯体の hydroxo 架橋配位子と核酸塩基の会合的置換反応の結果、共有結合性付加物 Pt—DNA が形成されたことによって、243 nm 付近のスペクトルが変化したと考えられる。一方で、DHBD と仔ウシ胸腺 DNA の 37°C における反応では、時間依存的な CD スペクトル変化が観察され (Fig. 2-1-6)、4°C においても時間依存的なスペクトル変化が明らかに起こっていた (Fig. 2-1-7)。この理由として、アゾラト架橋錯体と比較して、DHBD の OH 架橋配位子がより不安定であるために、共有結合性相互作用によって、より素早いスペクトル変化をもたらしたことが推察された。

時間依存的 CD スペクトル変化に錯体間で差がある、特に、AMPZ における時間依存的変化が小さい理由として、各スペクトル変化が DNA との共有結合性相互作用における反応速度を反映している可能性が挙げられた。例えば、「本論 1-2」で示したように、核酸塩基誘導体との反応において、AMPZ は、アゾラト架橋錯体の中で、最も小さい反応速度定数を示していた。それと関連して、243 nm 付近の楕円率変化について、AMPZ は、アゾラト架橋錯体の中で最も小さくなったと考えられる。

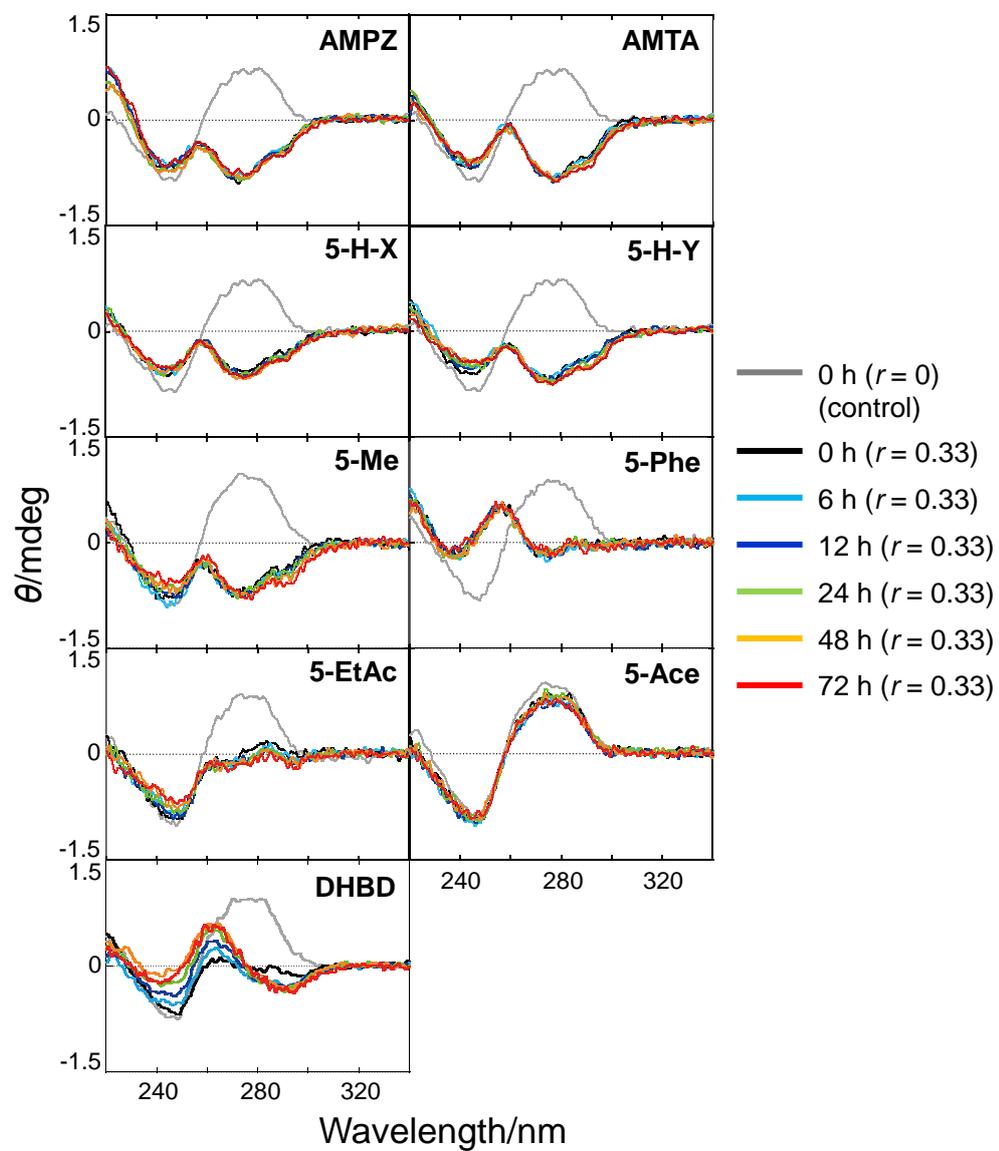


Fig. 2-1-7. CD spectra of 30 μ M calf thymus DNA reacted with 10 μ M each complex for 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h at 4°C.

濃度依存性および時間依存性のスペクトルを観察して、アゾラト架橋錯体と二本鎖 DNA との反応には、二段階の相互作用が存在することが示唆された。第一段階の相互作用は拡散律速反応であり、278 nm 付近における正の Cotton 効果の顕著な減少に特徴づけられた。第二段階の相互作用は、比較的ゆっくりとした速度で進行し、243 nm 付近における負の Cotton 効果の減少に特徴づけられた。

第一段階の CD スペクトル変化は、白金錯体添加後すぐに起こり、かつ低温条件下においても観察されることから、このスペクトル変化は主に非共有結合性相互作用によって引き起こされていると考えられる。可能な非共有結合性相互作用として、静電的相互作用が挙げられる。つまり、アゾラト架橋錯体と二本鎖 DNA との反応の前段階として起こる DNA との会合は、アゾラト架橋錯体の持つ陽電荷に起因するものであり、リン酸基を有するために負に帯電している DNA と引き合うことによって起こると考えられる。電気的に中性な分子であるシスプラチンの添加が、278 nm 付近の CD バンドをわずかしか変化させなかったことも、アゾラト架橋錯体の静電的相互作用を裏付けている (Fig. 2-1-2)。さらに、陽電荷の寄与の可能性は、**5-Ace** における結果からも裏付けることができた。pH 滴定により求めた **5-Ace** の carboxylate 基の pK_a は 3.23 であった (Fig. 2-1-8)。本反応条件下 (pH 7.4) では、Henderson-Hasselbalch の式によると、**5-Ace** は全分子中の 99.993% の分子において、分子内の carboxylate 基のプロトンが遊離した状態、つまり分子全体の電荷が +1 の状態で存在していることが分かった。従って、**5-Ace** は、他のアゾラト架橋錯体と比較して、電荷が小さい状態で DNA 溶液中に存在しており、その結果、負に帯電する DNA のリン酸基との相互作用が减弱したと考えられる。さらに、アゾラト架橋錯体ほど高効率に、B 型から C 型 DNA への二次構造変化を引き起こすカチオンは存在しないことから、ここで扱う非共有結合性相互作用は、単純な静電的会合ではなく、アゾラト架橋錯体の分子構造に特有の相互作用であることが示唆された。

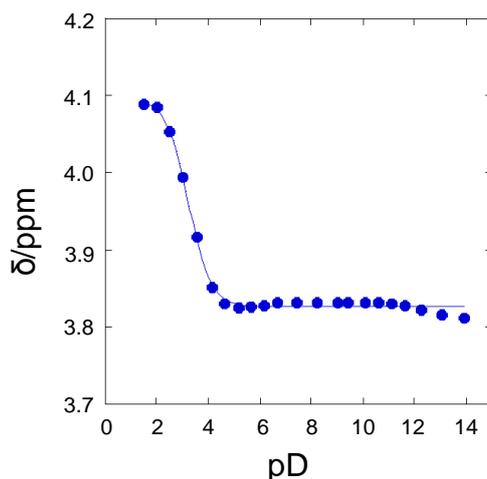


Fig. 2-1-8. Plots of the chemical shift (δ) of resonance of CH_2 protons vs. pD for free **5-Ace**.

一方で、第二段階のスペクトル変化は、共有結合性相互作用が関与している可能性が高いと考えられる。このスペクトル変化が、低温条件下において減弱された、あるいは、観察されなくなったことが、主な理由として挙げられた。共有結合性相互作用は、シスプラチンが制がん活性を発揮する引き金と考えられている作用である。本実験における結果は、シスプラチンの添加によって、時間依存的な DNA の二次構造変化が徐々に起こっていることを示していた (Fig. 2-1-6)。また、錯体の添加から 72 時間後の CD スペクトルについて、アズラト架橋錯体における CD スペクトルは、シスプラチンや **DHBD** における CD スペクトルとは完全に異なっていた。従って、共有結合性付加物が形成された DNA の構造は、シスプラチンとアズラト架橋錯体で異なることが示唆された。

以上から、アズラト架橋錯体と DNA は、糖—リン酸骨格付近における拡散律速的な非共有結合性相互作用によって DNA に結合し、続く共有結合性相互作用によって、鎖内架橋や鎖間架橋が形成されているという可能性が示された。アズラト架橋錯体が引き起こす DNA の構造変化の様子は、どちらの相互作用の段階においてもアズラト架橋錯体間で類似していたが、その作用の強さなどについて、アズラト架橋錯体間である程度の違いが存在していた。従って、この違いと *in vitro* 細胞増殖抑制活性との関連を調べることは、より有効なアズラト架橋錯体を分子設計する上で重要であると考えられる。

2-1-3. まとめ

AMPZ、**AMTA** および **5-H-Y** は、シスプラチンに対する交差耐性を大きく克服する。従って、その作用機序は、少なくとも、ある部分においてシスプラチンとは異なっているはずである。CD スペクトルの観察によって、DNA の二次構造変化において、アズラト架橋錯体とシスプラチンの間に差異が存在することが明らかとなった。アズラト架橋錯体は二段階の相互作用によって DNA に結合している。その作用は、非共有結合性相互作用および共有結合性相互作用から成っていると考えられる。これらの作用が制がん活性を示すのにどの程度寄与しているかを明らかにするためには、*in vitro* 細胞増殖抑制活性との関係について調べる必要がある。

2-1-4. 実験方法

2-1-4-1. 試薬

アゾラト架橋錯体は、米田らにより報告された方法に従って合成、精製および同定し、¹H-NMRにより純度の確認を行った^{20, 23, 24, 25}。シスプラチンおよび**DHBD**は、Alderdenらにより報告された方法に従って合成した⁴¹。仔ウシ胸腺 DNA は Sigma 社から販売されている calf thymus DNA type I (15–23 kbp)を用いた。その他の試薬は、特級以上の品位の市販品を精製することなく用いた。また、MILLIPORE 社の純水製造装置 DIRECT-Q[®]3 UV によって製造した超純水を使用した。

2-1-4-2. CD スペクトルの測定

全ての CD スペクトルの測定には、日本分光社の円二色性分光計 J-805 を用いた。セル長が 0.5 cm のウォータージャケット付き石英製セルを用いることで反応液を 25°C に保ち、220–340 nm のスペクトルをスキャン速度 50 nm/min で測定した。

2-1-4-3. NMR 分光法

¹H-NMR は Varian 社の NMR 装置 Varian NMR System 400 NB を用いて測定した。基準物質には、sodium 3-trimethylsilyl-propionate-2,2,3,3-*d*(4) (TSP、 $\delta = 0$) を用いた。

2-1-4-3. 仔ウシ胸腺 DNA との反応

白金錯体の濃度依存的な仔ウシ胸腺 DNA の CD スペクトルの変化を測定するために、0.3 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で、30 μ M in nucleotide 仔ウシ胸腺 DNA と各白金錯体を濃度比 $r = \text{白金錯体濃度} (\mu\text{M}) / \text{仔ウシ胸腺 DNA 濃度} (\mu\text{M in nucleotide}) = 0, 0.033, 0.067, 0.17, 0.33, 0.67, 1.0$ で混合し、混合直後の CD スペクトルを測定した。ただし、シスプラチン、**aqua** 錯体、**DHBD** では、 $r = 0, 0.033, 0.17, 0.33, 1.0$ とした。

NaCl の添加の影響を調べる実験では、0.3 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で、30 μ M in nucleotide 仔ウシ胸腺 DNA に最終濃度 200 mM となるように NaCl を添加した。NaCl の添加直後、あるいは、添加してから 30 分後に、各白金錯体を $r = 0.33$ で混合し、白金錯体の添加直後の CD スペクトルを測定した。

時間依存的な仔ウシ胸腺 DNA の CD スペクトルの変化を測定するために、0.3 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で、30 μ M in nucleotide 仔ウシ胸腺 DNA と 10 μ M の各白金錯体 ($r = 0.33$) を反応させた。反応は 4°C あるいは 37°C で 72 時間行い、適当な時間間隔を空けてサンプルを採取し、CD スペクトルを測定した。

仔ウシ胸腺 DNA は、260 nm における吸光度 Abs_{260} を GE Healthcare Life Science 社の紫外可視吸光時計 Gene Quant pro を用いて測定し、仔ウシ胸腺 DNA のモル吸光係数 6600 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) から (2-1-2)式に従って溶液中の DNA の量 Y (mol in nucleotide) を算出した。

$$Y = \frac{\text{Abs}_{260}}{6600} \times X \times 10^{-6} \quad (2-1-2)$$

1-2-4-5. pH 滴定

4 mM **5-Ace** 重水溶液を調製した。IQ Scientific Instruments 社の pH 測定装置 IQ150 を用いて室温における重水溶液の pD を測定しながら、0.1 M DNO₃ および NaOD を添加し、pD が適当な値となるように調製した後、室温における ¹H-NMR を測定した。pH 滴定の結果は (2-1-2)式を用いて解析した。pK_aを **5-Ace** 中の CH₂COO⁻ H⁺の酸解離定数、δ_A および δ_B を CH₂COO⁻ H⁺中の CH₂ の水素の化学シフト (ppm) とするとき、以下の式が成り立つ。

$$\delta = \frac{\delta_A [\text{H}^+] + \delta_B \text{p}K_a}{[\text{H}^+] + \text{p}K_a} \quad (2-1-2)$$

近似曲線の作成には、Synergy Software 社の解析プログラム KaleidaGraph を用いた。上記の計算によって求められた重水中の酸解離定数 (pK_a in D₂O) は、(2-1-3)式を用いて軽水中の酸解離定数 (pK_a in H₂O) に換算した。

$$\text{p}K_{a \text{ in H}_2\text{O}} = \text{p}K_{a \text{ in D}_2\text{O}} - 0.4 \quad (2-1-3)$$

2-2. T4 phage DNA の高次構造変化の解析

2-2-1. 背景および目的

現在、臨床応用されている白金制がん剤は、DNA と共有結合性付加物を形成することで DNA の複製を阻害し、がん細胞を細胞死へ導く。シスプラチンによって架橋された DNA は、通常の B 型 DNA の構造と比較して、局所的に大きく歪められていることが、X 線結晶構造解析^{22, 54}や二次元 NMR 法⁵⁵による構造解析から明らかにされている。このとき、隣接した guanosine 残基の N(7)窒素原子に結合したシスプラチン (Pt-d(GpG)) は、DNA を 35–40°折り曲げ、21°巻き戻す。さらに、コンピュータシミュレーションによる 3D 構造解析から、転写機構に不可欠な TATA-box 結合タンパク質である TBP と TATA-box の複合体と Pt-d(GpG)の構造の間に高い類似性が見られることが明らかにされた⁵⁶。この解析結果から、TBP の Pt-d(GpG)部位への結合が ‘hijack’ され、通常の転写機構が働かなくなるという、作用機序に関する提案が導かれている。このように、薬物と DNA の相互作用を明らかにすることによって、薬物の作用機序の一端を解明することができ、より有効な薬物の開発に寄与すると期待される。

上述の通り、X 線結晶構造解析や二次元 NMR 法を用いた実験は、オリゴヌクレオチドのように、短い鎖長の DNA の局所的な構造や結合様式を決定する上で、非常に有用であるということが示されている。しかし、そのような短鎖長 DNA は剛体棒のような挙動を示し、簡単には折り曲がらないため、実際のゲノム DNA の挙動とは異なると考えられる。なぜなら、実際のゲノム DNA は、長さにして数 cm にも及ぶほどの非常に長い重合体であり、構造的に自由自在な鎖のように振る舞うからである。Yoshikawa らは、蛍光顕微鏡を用いて DNA 分子を水溶液中で観察した結果、100 kbp 以上の長さをもつ長鎖二重らせん DNA 分子が、様々な凝縮剤の添加に伴って、コイル状の形態から折り畳まれたコンパクトな形態に変化するということを報告している⁵⁷。また、Liu らは、原子間力顕微鏡を用いた観察によって、シスプラチンと DNA との付加物形成における薬物–DNA 間相互作用は、DNA の鎖長に影響されることを明らかにした⁵⁸。要するに、鎖長 100 kbp 以上の DNA 分子は、生細胞中の DNA の実体に近いモデルであると考えられる。

本節では、テトラゾラト架橋錯体が、DNA の高次構造に及ぼす影響を明らかにするために、テトラゾラト架橋錯体の添加に伴う T4 phage DNA (鎖長 166 kbp) の構造変化について、蛍光顕微鏡 (fluorescence microscope : FM) および透過電子顕微鏡 (transmission electron microscope : TEM) を用いた観察を行った。

2-2-2. 結果および考察

水溶液中の DNA 分子の代表的な FM 観察像 (A-D) を Fig. 2-2-1 に示した。A'-D' は、A-D の各像の蛍光強度に対応した擬似 3D 像である。DNA の多分子凝集を防ぐために、観察は DNA 濃度が十分に低い条件下 (1 μM) において行った。化合物の非存在下、すなわち、凝縮などを起こしていない状態の DNA 分子は、細長いコイル状態 (A: elongated coil) をしており、水溶液中では、並進運動および分子内ブラウン運動を示す。化合物の添加によって、DNA 分子は B \rightarrow C \rightarrow D の順に状態が推移する。各状態は、B: coil、C: partial-globule、D: compact-globule と分類できる。中間体にあたる partial-globule 状態は、一つの DNA 分子中に、細長い部分と凝縮された部分が共存している状態である。テトラゾラト架橋錯体の添加によって partial-globule や compact-globule 状態に変化した DNA 分子は、高濃度の塩の存在下においても安定な構造を維持していた。つまり、テトラゾラト架橋錯体の添加に伴う構造変化は不可逆的であることが分かった。実際に、**5-H-Y** の添加によって凝縮した DNA 分子に対して、200 mM NaCl を添加した後、1 時間が経過しても構造に変化は見られなかった。ただし、**5-Ace** によって凝縮した DNA は、NaCl の添加によって凝集した。このことから、**5-Ace** は、他のテトラゾラト架橋錯体とは多少異なる相互作用をしている可能性が示唆された。

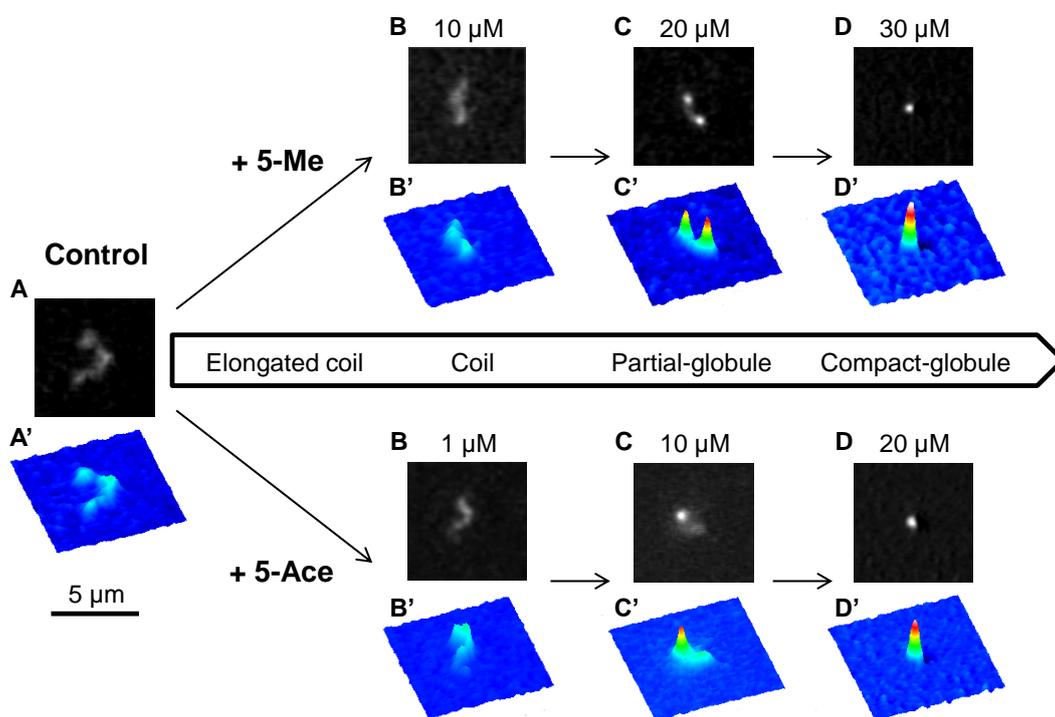


Fig. 2-2-1. Images of individual T4 DNA molecules moving freely in solution observed by using FM (A-D) and corresponding quasi-3D profiles of the fluorescence intensity (A'-D').

Fig. 2-2-2 は、種々の濃度の白金錯体を T4 phage DNA に添加した時の、DNA 分子の長軸長の分布を示した棒グラフである。さらに、各長軸長における棒は、DNA 分子の状態に基づいて色分けされている（白：elongated coil、灰：partial-globule、黒：compact-globule）。各白金錯体とも、添加する錯体の濃度が上昇するにつれ、グラフ中の最も頻度が高い棒が左へシフトしており、長軸長が短くなることが分かった。それと同時に、灰や黒の割合が増加し、partial-globule あるいは compact-globule 状態の分子が増加することが分かった。これらは、錯体の添加に伴う何らかの相互作用によって DNA の凝縮が起こっているためであると考えられる。

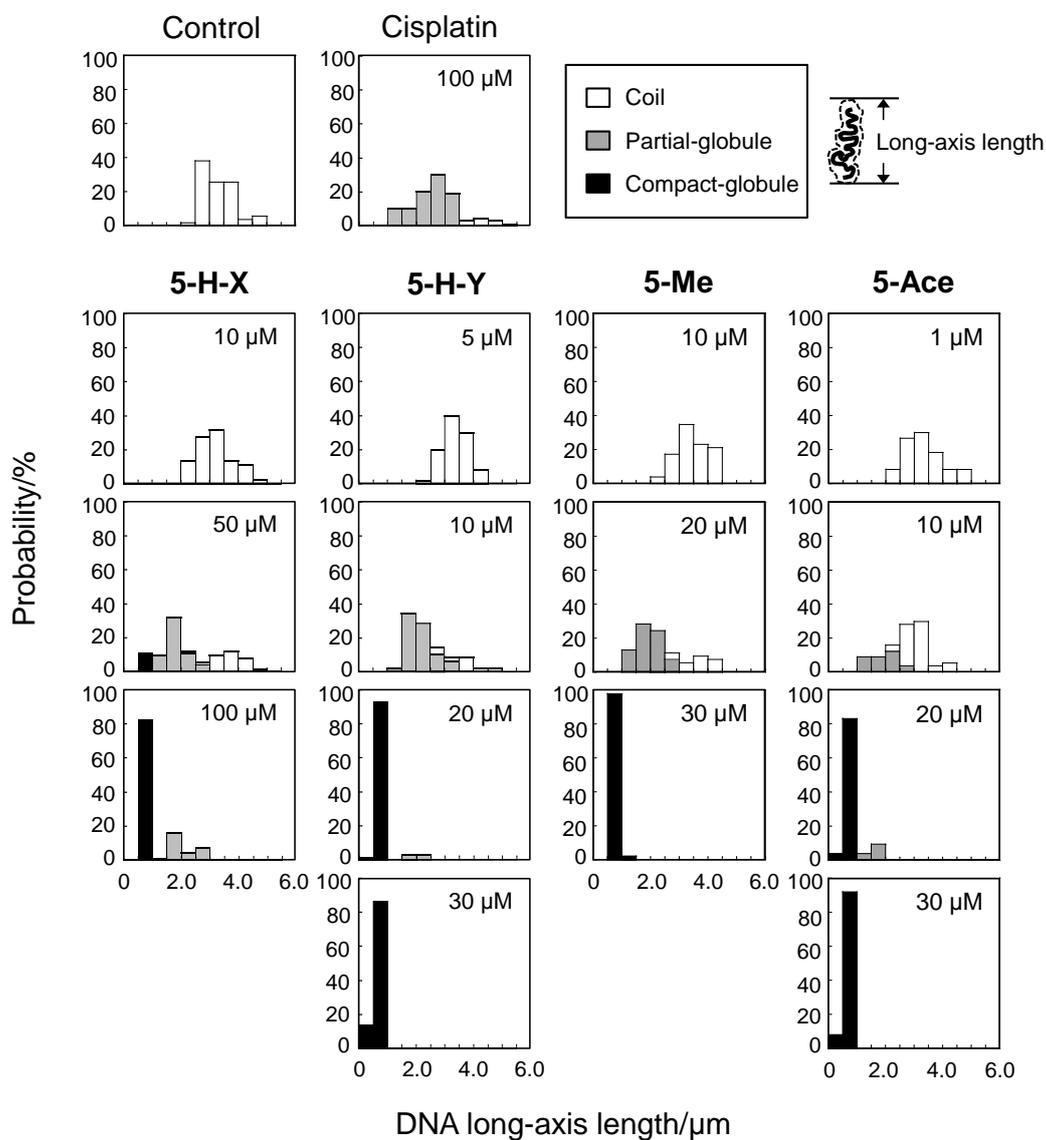


Fig. 2-2-2. Comparison of the distribution of the long-axis length of DNA in solution together with assignment of the conformational characteristics of the DNA images.

構造異性体である **5-H-X** および **5-H-Y** の結果について着目すると、10 μM **5-H-Y** 溶液中では、大部分の DNA 分子が partial-globule 状態に変化していた一方で、同濃度の **5-H-X** 溶液中では、全ての DNA 分子が elongated-coil 状態であった (Fig. 2-2-2)。**5-H-Y** では、20 μM 溶液中で 94% の DNA 分子が compact-globule 構造に変化し、30 μM 溶液中では、DNA 分子の長軸長がさらに短くなっていることが分かった。それに対して、**5-H-X** では、50 μM 存在下でも compact-globule 状態の DNA 分子は全体の 8% に過ぎず、100 μM の存在下でも partial-globule 状態の分子が存在していた。このことから、DNA を凝縮する能力は **5-H-Y** の方が高いということが分かった。

5-H-Y 誘導体の中で高い凝縮能を示したのは、**5-Me** および **5-Ace** であった。これらの 10 μM 溶液中の DNA 分子の状態を比較すると、**5-Ace** では 33% の DNA 分子が partial-globule 状態に変化していたが、**5-Me** ではすべての分子が elongated coil 状態であった。白金錯体 20 μM 溶液の場合、**5-Ace** では 87% の DNA 分子が compact-globule 状態であり、**5-Me** では partial-globule 状態の DNA 分子が 74% を占めていた。また、30 μM 溶液では、両錯体とも、全ての DNA 分子が compact-globule 状態に変化していることが確認されたが、その平均的な長軸長を比較すると、**5-Ace** の方がより短かった。以上から、**5-Me** および **5-Ace** の二つの錯体間では、**5-Ace** の凝縮能がより高いことが分かった。また、**5-Ace** を添加して得られた結果は、**5-H-Y** における結果とほとんど同様であり、両錯体の DNA 凝縮能は、ほぼ等しいと考えられる。

5-H-Y およびすべての **5-H-Y** 誘導体 (**5-Me**、**5-Phe**、**5-EtAc**、**5-Ace**) について、溶液中の白金錯体の濃度と DNA 分子の状態をまとめた (Fig. 2-2-3)。全 DNA 分子中、80% 以上の分子が compact-globule 状態に変化した時の錯体の濃度を「臨界濃度」とし、図中に「G」で表した。同程度の DNA 凝縮能を有する **5-H-Y** および **5-Ace** の臨界濃度は、両錯体ともに 20 μM であり、表中の 5 つのテトラゾラト架橋錯体の中で最も低いことが分かった。つまり、最も効率よく DNA 凝縮を引き起こしていると考えられた。次いで **5-Me** の凝縮能が高く、**5-Phe** および **5-EtAc** については、**5-H-Y** および **5-Ace** と比較して臨界濃度が 7.5–10 倍大きく、凝縮能が低いという結果になった。

Complex \ Conc. / μM	1	2	5	10	20	30	100	150	200
5-H-Y	-	-	C	PG(G)	G	-	-	-	-
5-Me	-	-	-	C	PG(C)	G	-	-	-
5-Phe	-	-	-	C	-	-	C	PG(G)	G
5-EtAc	-	-	-	C	C	C(PG)	PG(G)	G	-
5-Ace	C	C(PG)	-	PG(C)	G	-	-	-	-

C: coil, PG: partial-globule, G: compact-globule
 - : the experiment was not done at this concentration of the complex

Fig. 2-2-3. List of DNA states observed in the presence of various concentrations of each complex.

凝縮した DNA 分子の詳細な形態を明らかにするため、TEM による観察を行った (Fig. 2-2-4)。100 μM の **5-H-X** あるいは 20 μM の **5-H-Y** 溶液中で、不規則に折りたたまれた DNA 分子が観察された。凝縮された DNA 分子のサイズは約 0.1 μm であった。両錯体間で、凝縮した DNA 分子の形態に違いはなかったため、凝縮を引き起こすメカニズムは類似しているが、DNA を凝縮させる能力が異なるということが示唆された。

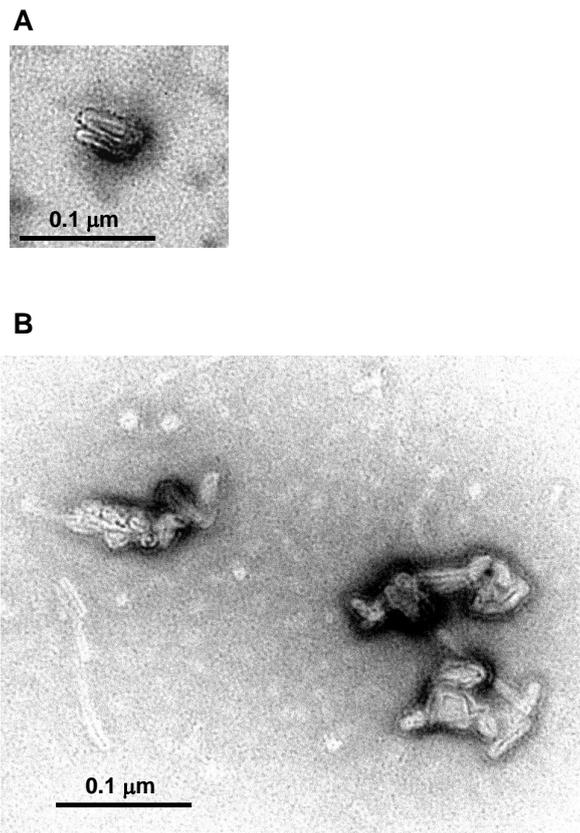


Fig. 2-2-4. TEM images of compacted DNA particles in the presence of (A) 100 μM **5-H-X** and (B) 20 μM **5-H-Y**.

T4 phage DNA の高次構造変化に関して更なる理解を得るために、錯体の添加に伴って二次構造がどのように変化するかについて、CD スペクトルを用いて明らかにした。**5-H-X** あるいは **5-H-Y** を T4 phage DNA 溶液に添加した際の CD スペクトルの変化を Fig. 2-2-5 に示した。シスプラチンでは、錯体の添加に伴う CD スペクトルの変化はほとんど観察されなかった (データ不掲載)。その一方で、**5-H-X** および **5-H-Y** では劇的な変化が観察された。シスプラチンを添加した際、数時間の定温放置の後、B 型 DNA から A 型 DNA への構造変化が起こることが報告されている⁵³。従って、**5-H-X** や **5-H-Y** の DNA の二次構造を変化させる作用は、少なくともその速度に関して、シスプラチンよりも著しく高いということが考えられる。**5-H-X** や **5-H-Y** の添加に伴う CD スペクトルの変化について見てみると、280 nm 付近の正の Cotton 効果の大幅な減少と 245 nm 付近の負の Cotton 効果のわずかな減少が同時に起こっていた。この結果から、両錯体の添加によって、B 型 DNA から C 型 DNA への構造変化が引き起こされたということが分かった。また、両錯体における結果を比較すると、特に **5-H-Y** の方が、低濃度でより大きなスペクトル変化を引き起こしていることから、**5-H-Y** の方がより高効率に DNA の二次構造変化を引き起こすことが示唆された。また、これらの結果は、「本論 2-1」の仔ウシ胸腺 DNA における二次構造変化の結果と合致していた。

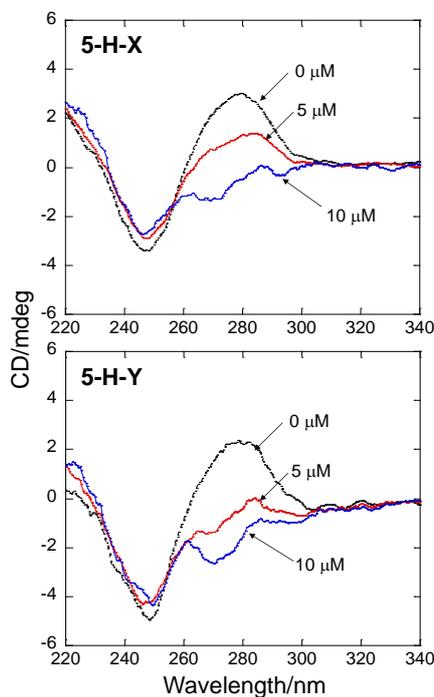


Fig. 2-2-5. CD spectra of T4 phage DNA in the presence of **5-H-X** (upper) and **5-H-Y** (lower).

一般的に、電荷を有する化合物の DNA への結合は、共存する塩濃度の影響を受ける。二価の陽電荷を有する tetraammineplatinum(II) ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$) は、白金(II)原子の配位圏が置換不活性な配位子で満たされているため、新たな配位結合を形成しないと考えられる錯体である。この化合物の 1 mM 溶液中で、T4 phage DNA は完全な DNA 凝縮状態となるが、この高次構造変化は塩の添加 (100 mM NaCl) によって引き戻される。つまり、可逆的な DNA 凝縮であることが報告されている⁵⁹。従って、**5-Ace** 以外のテトラゾラト架橋錯体で観察された非可逆的な DNA 凝縮は、共有結合性相互作用や比較的強い非共有結合性相互作用が介在している可能性が考えられる。

テトラゾラト架橋錯体によって引き起こされた DNA 分子の高次構造における変化は、段階的凝縮 (gradual shrinking) であると特徴づけた。Fig. 2-2-2 の DNA 分子の長軸長の分布において、単峰型の分布を維持しながら DNA 分子の長軸長が段階的に減少していた。また、**5-H-X** および **5-H-Y** によって引き起こされた DNA の凝縮は、CD スペクトルの変化を伴っていた。この変化は、spermidine や hexaamminecobalt(III) ($[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$) といった三価の陽電荷を有する DNA 凝縮剤による凝縮の過程とは大きく異なっている。spermidine や $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ では、T7 DNA (40 kbp)⁶⁰ や λ DNA (48 kbp)⁶¹ など、より小さいサイズの DNA を用いた実験で、CD スペクトルの変化を引き起こすことなく、DNA 凝縮が起こることが確認されている。DNA 凝縮が起こるまでの過程について、**5-H-Y** と spermidine との違いを Fig. 2-2-6 に概略的に示した。spermidine による DNA 凝縮 (A → F → G) は all or none manner に則っている^{62, 63}。すなわち、elongated coil 状態から中間状態を経ることなく、compact-globule 状態に遷移している。spermidine によって凝縮した DNA 分子の代表的な状態は、H のようにドーナツ状の形であり、緊密かつ規則的に折りたたまれている^{60-62, 64-68}。一方で、**5-H-Y** による DNA 凝縮 (A → B → C) は、一つの DNA 分子中に細長い部分と凝縮された部分が共存する中間状態を経て、D のように不規則に折りたたまれた状態で凝縮された。また、**5-H-Y** が完全に DNA 凝縮を引き起こす濃度は 20 μM であり、これは、同程度の高次構造変化を引き起こす spermidine 濃度 (1 mM) と比較して、著しく低い濃度であった。さらに、diaminoalkane (2+)⁶⁹ や Mg^{2+} ⁷⁰ が DNA 凝縮や凝集を引き起こすには、数十 mM 以上の濃度が必要であることが知られている (Fig. 2-2-6 E)。以上を踏まえると、テトラゾラト架橋錯体の性質は、単に二価や三価の陽電荷を帯びた化合物とは異なり、特徴的な静電的相互作用や、それ以外の作用も関与している可能性が示唆された。

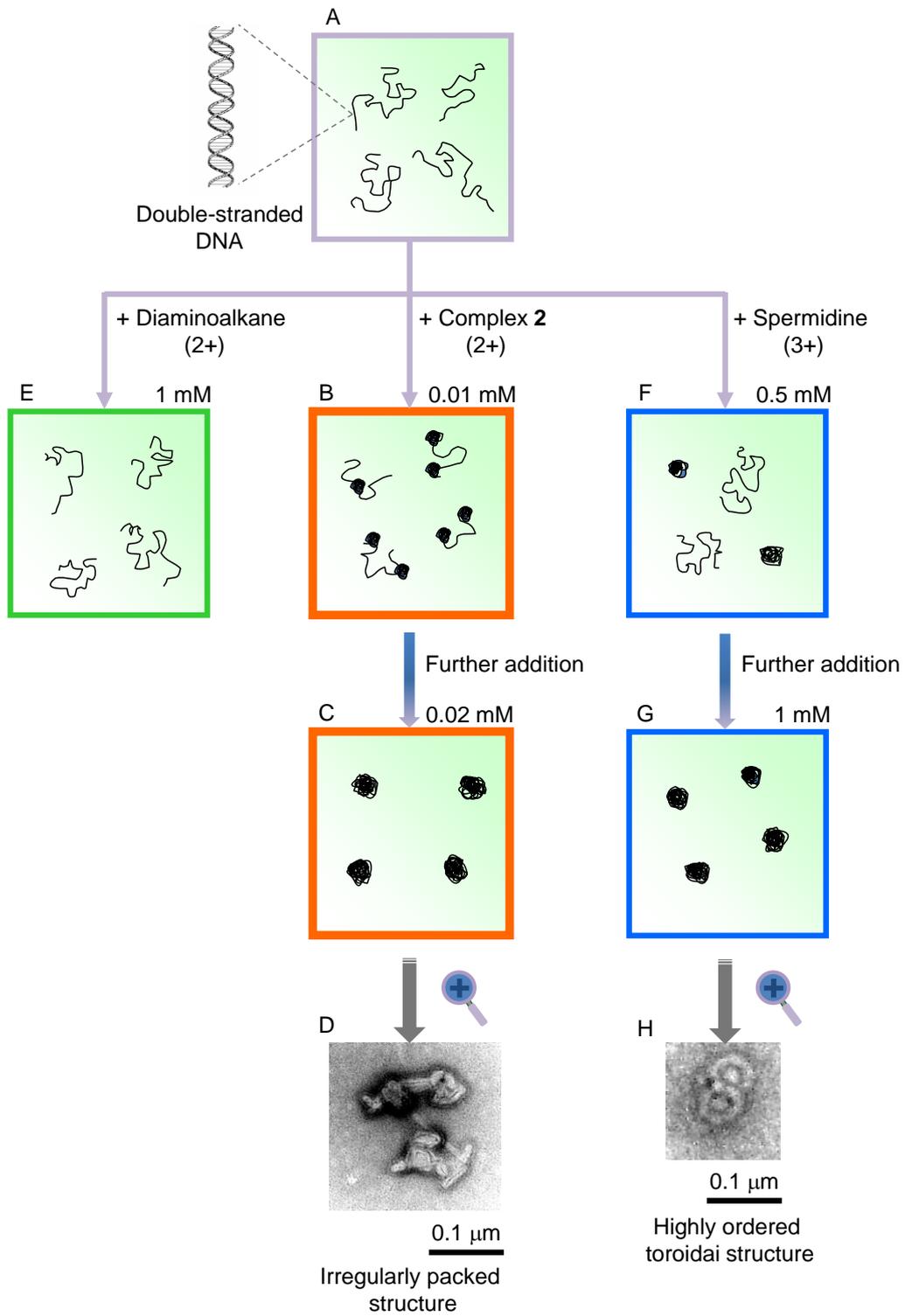


Fig. 2-2-6. Schematic representation of the change in the conformation of a single DNA molecule.

特に、**5-Ace** は DNA の二次構造には、ほとんど変化を与えない（「本論 2-1」）にもかかわらず、**5-H-Y** と同程度の高い DNA の凝縮能を有するという興味深い結果が得られた。テトラゾラト架橋錯体による DNA の凝縮および二次構造変化は、錯体の添加直後に観察された。また、「本論 1-2」で明らかにされたように、テトラゾラト架橋錯体は、シスプラチンと比較して、核酸塩基誘導体（9EtG）との共有結合形成に関する反応は、有意に遅く進行した。これらから、テトラゾラト架橋錯体による DNA の構造変化における共有結合性相互作用の寄与は小さく、主に非共有結合性相互作用が関与していると考えられる。しかし、**5-Ace** は、テトラゾラト架橋錯体の中で陽電荷数が小さく、単純に考えて非共有結合性相互作用を担う静電的相互作用は弱いと推察された（「本論 2-1」）。よって、非共有結合性相互作用は、さらに二つに分類できると考えられた。一つは DNA の二次構造を変化させる作用であり、もう一つは高次構造を変化させる作用である。ピラゾラト架橋錯体 **AMPZ** の DNA との非共有結合性相互作用によって生じる付加物の構造が、高分解能 X 線結晶構造解析によって明らかにされている（PDB ID: 3X0Z）。それによると、**AMPZ** は、AT 繰り返し配列の minor groove において、水素結合および C—H/ π 相互作用を介して DNA と結合している。この X 線結晶構造解析結果を加味すると、アゾラト架橋錯体が示し得る DNA との相互作用として、糖—リン酸骨格周辺における単純な静電的相互作用だけでなく、van der Waals 力や水素結合などによって介在される非共有結合性相互作用も考慮に入れる必要があると考えられる。水素結合の形成能に関して、テトラゾラト架橋錯体は四つの ammine 配位子、および一つの hydroxo 架橋配位子を有しているため、主に水素結合供与体として振る舞う。テトラゾラト架橋錯体の中で、**5-Ace** は、強力な水素結合受容体となる acetate 基を有している。言い換えれば、**5-Ace** は、他のテトラゾラト架橋錯体と比較して、より多くの水素結合を形成する可能性を持っている。そのため、DNA の minor および major groove において核酸塩基とより強固に結合することができ、結果的に二次構造変化と高次構造変化において相反する変化を引き起こしたと予想された。ただし、**5-Ace** によって凝縮した DNA に NaCl を添加すると、DNA 凝集が解消されたことについて、明確な理由はまだ得られていない。

in vitro および *in vivo* における活性との関連について、シスプラチンにおける結果と比較して考察した。電気的に中性な分子であるシスプラチンにおいても、T4 phage DNA の高次構造変化が観察されることが報告されている⁵⁹。しかし、この高次構造変化が起こるのは、DNA を本実験条件よりも高濃度のシスプラチン（0.1 mM）溶液中で 24 時間、定温放置した場合である。しかも、この条件下においても、T4 phage DNA は完全な凝縮状態には到達せず、大部分が partial-globule 状態として存在していた。従って、これまでに報告されてきた **5-H-Y** の高い活性およびシスプラチン耐性ががんに対する交差反応性の克服は、シスプラチンと比較して、より効果的に引き起こされる DNA 凝縮が寄与している可能性が考えられた。

DNA 断片は、通常、水溶液中でお互いに反発しながらフレキシブルな重合体として存在している。従って、DNA 凝集あるいは凝縮を引き起こすために、負電荷を帯びた DNA 断片同士の間には存在する反発しあう静電的相互作用を克服し、十分な引力が与えられる必要がある。実際、TEM による観察像（Fig. 2-2-4）から凝縮した DNA 上に平行配列が形成されていることが確認できた。従

って、DNA 断片が、テトラゾラト架橋錯体によって形成される断片間の複数の架橋で介在される平行配列をとる時、十分な引力は一定の基準に達することになると考えられた。また、興味深いことに、**5-H-X** および **5-H-Y** における高次構造の変化は、CD スペクトルの測定によって明らかにされたように、二次構造の変化を伴って起こった。高次構造変化と二次構造変化を引き起こす錯体の濃度を詳細に分析すると、5 μ M **5-H-Y** 溶液中で高次構造変化がほとんど確認されないにも関わらず (Fig. 2-2-2)、二次構造変化に伴う CD スペクトルの変化が観察される (Fig. 2-2-5) ことから、二次構造変化の方が DNA 凝縮に先立って起こることが示唆された。以上から、テトラゾラト架橋錯体は、添加量の増加に伴って徐々に DNA に結合する可能性が考えられ、これが DNA の中間状態が形成される理由であると推察された。

本研究で用いたテトラゾラト架橋錯体の作用濃度は 5–100 μ M であった。生細胞における薬物の有効濃度に関して、細胞内環境として込み合い効果を考慮に入れる必要がある。DNA 分子の凝縮状態への変化が、他の高分子の共存によって促進されることはよく知られている。この込み合い効果が、細胞内環境において比較的低い濃度で存在する薬物による DNA 凝縮を促進していることも考えられる⁷¹。in vitro で観察された長鎖 DNA の凝縮が、がん細胞における薬物の実際の作用にどのように関与しているのかということについては、依然として未解決の問題ではある。しかしながら、本節で得られた結果は、ゲノム DNA の高次構造の変移を通して、制がん活性を有する薬物が及ぼし得る作用を提案していると考えられる。

2-2-3. まとめ

本節では、水溶液中の DNA の一分子観察によって、テトラゾラト架橋錯体が非可逆的な DNA 凝縮を引き起こすことが明らかにされた。また、その作用は、一連のテトラゾラト架橋錯体の中で **5-H-Y** が最も強いことが分かった。さらに、**5-H-Y** と同等の凝縮能を有する **5-Ace** の特徴的な作用から、非共有結合性相互作用は、二つの異なる作用に分けられることが示唆された。一つはイオン引力に起因するもの、もう一つは C—H/ π 相互作用と水素結合形成に起因するものと推定された。

リード化合物である **5-H-Y** は、非常に効率的な DNA 凝縮を引き起こすことが示された。DNA 凝縮を引き起こし得る配位化合物の探索は初期段階にある。カチオン性の遷移金属配位化合物は陽電荷を有し、様々な配位子や金属の組み合わせで、多種多様な分子構造を構築することが出来る。また、これらは、有機分子にはない配位結合によって形成された金属錯体特有の分子構造である。従って、**5-H-Y** は、新規制がん剤の候補化合物としてだけでなく、効率良く DNA を凝縮させる試薬の開発においても好ましい基本骨格を有する化合物であると考えられる。

2-2-4. 実験方法

2-2-4-1. 試薬

6種類の特ラゾラト架橋錯体は、米田らにより報告された方法に従って合成、精製および同定し、¹H-NMRにより純度の確認を行った^{24,25}。シスプラチンはAlderdenらにより報告された方法に従って合成した⁴¹。T4 phage DNA (166 kbp、DNA鎖長: 57 μm) はニッポンジーン社、YOYO-1はMolecular Probes Inc.社、2-MEは和光純薬工業社からそれぞれ購入した。その他の試薬は、特級以上の品位の市販品を精製することなく用いた。また、MILLIPORE社の純水製造装置DIRECT-Q[®]3 UVによって製造した超純水を使用した。

2-2-4-2. 蛍光顕微鏡による溶液中でのDNAの高次構造の観察

0.1 μM in phosphateのT4 phage DNAを5–100 μMの各白金錯体の存在下で10 mM Tri-HCl (pH 7.6)、4% (v/v) 2-MEの溶液に溶解した。DNA分子を蛍光顕微鏡で観察するために、0.05 μMのYOYO-1をDNA分子の観察の直前に添加した。蛍光画像は、Carl Zeiss社の蛍光顕微鏡Axiovert 135 TVを用いた。この顕微鏡には100倍の油浸対物レンズおよび浜松フオトニクス社のEBCCDカメラが装備されており、画像をDVDに記録することができる。記録したビデオ画像はCosmos画像解析ソフトを用いて解析した。

2-2-4-3. 透過電子顕微鏡によるDNAの観察

DNA試料をcarbon-coated copper grid (no. 200)に乗せ、2% ammonium molybdateによってnegative染色を行った。観察には、JEOL社の透過電子顕微鏡JEM-1400EXを用いた。DNAの濃度は0.1 μMとした。

2-2-4-4. CDスペクトルの測定

CDスペクトルの測定は、日本分光社の円二色性分光計J-820を用い、25°C、10 mM Tris-HCl (pH 7.6)の溶液で行った。T4 phage DNAの濃度は30 μM、各白金錯体の濃度は0、5、10 μMとした。セル長が1.0 cmのセルを用い、220–340 nmのスペクトルをスキャン速度50 nm/minで測定した。

3. テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性、構造活性相関および細胞内取り込み量

3-1. 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* 細胞増殖抑制活性および構造活性相関

3-1-1. 背景および目的

tetrazole 環の 5 位の置換基あるいは結合異性体による構造的差異によって、テトラゾラト架橋錯体の DNA との相互作用に差異が生じることが明らかにされた。ここでいう相互作用とは、核酸塩基との反応（共有結合性相互作用、「本論 1」）や二本鎖 DNA の二次および高次構造を変化させる能力（非共有結合性相互作用、「本論 2」）のことである。これらの DNA との相互作用と *in vitro* 細胞増殖抑制活性との関連を知ることは、より有効な誘導体を分子設計する上で、非常に重要である。そのためにはまず、一連のテトラゾラト架橋錯体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性試験を実施する必要がある。

ピラゾラト架橋錯体 **AMPZ** やテトラゾラト架橋錯体 **AMTA** について、H460 非小細胞肺癌細胞²⁴、MCF7 乳がん細胞⁷²、IGROV 卵巣がん細胞⁷²、WIDR 大腸がん細胞⁷²などの種々のがん細胞を用いて *in vitro* 細胞増殖抑制活性試験を行った結果、両錯体ともシスプラチンと同等、あるいはシスプラチンよりも数十倍高い *in vitro* 細胞増殖抑制活性を有するということが明らかにされている。また、L1210 マウス白血病細胞（L1210W 細胞）およびシスプラチン耐性 L1210 マウス白血病細胞（L1210R 細胞）を用いた *in vitro* 細胞増殖抑制活性試験では、**AMTA** はシスプラチン耐性細胞にも著効するということが明らかにされた²³。上述した相関に加えて、テトラゾラト架橋錯体が、シスプラチン耐性をどれほど克服するかということについては、非常に興味深い。

本節では、L1210W および L1210R 細胞を用いて *in vitro* 細胞増殖抑制活性試験を行い、テトラゾラト架橋錯体の構造活性相関を構築するとともに、シスプラチン耐性細胞に対する有効性を検討した。

3-1-2. 結果および考察

各テトラゾラト架橋錯体およびシスプラチンを作用させた場合における細胞増殖曲線は、Fig. 3-1-1 に示す通りであった。細胞増殖曲線は、解析プログラム KaleidaGraph を用いて作成した。

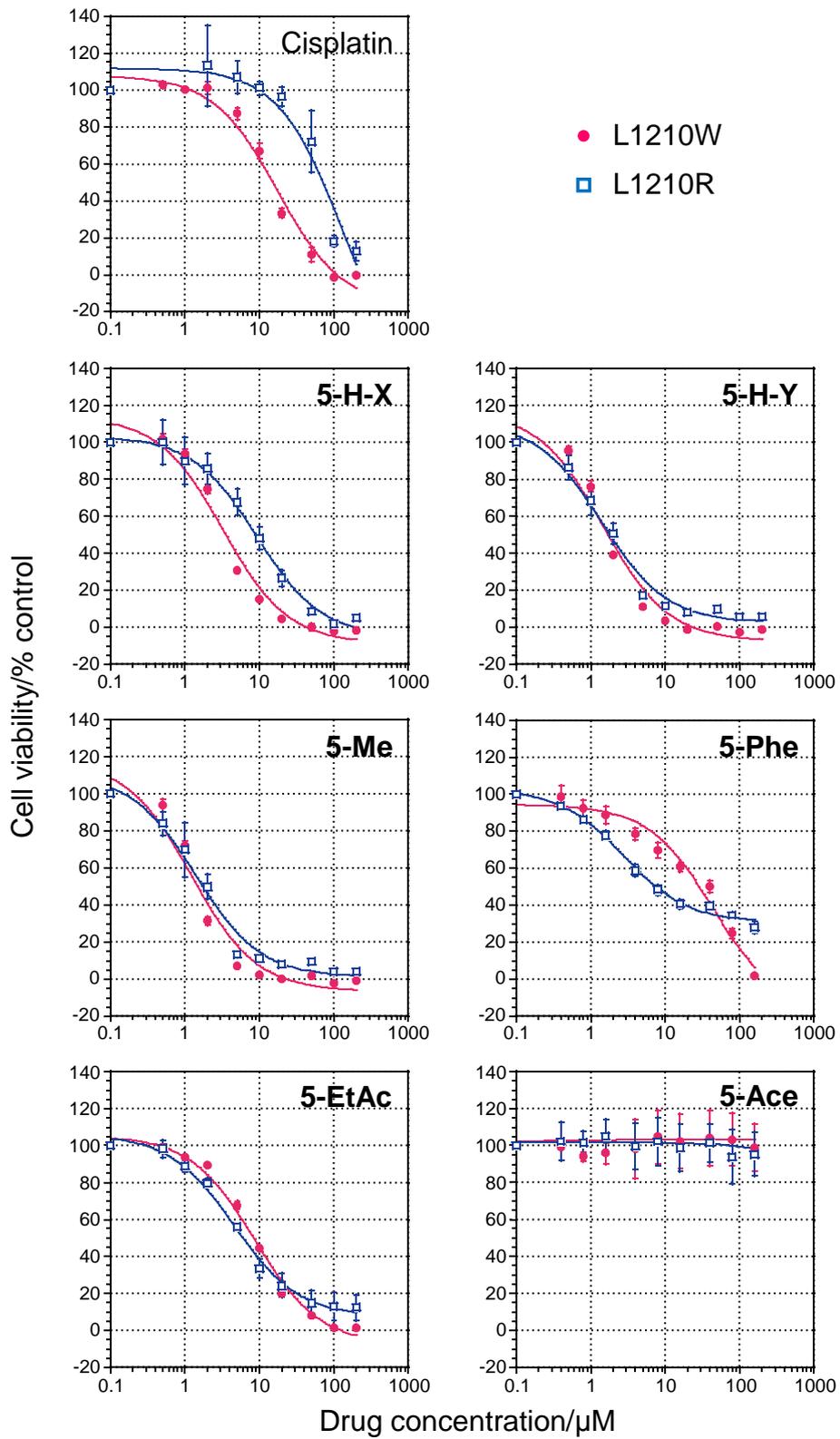


Fig. 3-1-1. Dose-response curves for L1210W and L1210R cells (n = 4, mean \pm SD).

錯体の濃度が 0 μM における細胞の増殖率を 100%とした時、細胞の増殖率を 50%抑制する錯体の濃度 (μM) を 50%阻害濃度 (IC_{50}) とした。各錯体における IC_{50} は、細胞増殖曲線の近似式のパラメータとして得られた値を採用し、**5-Phe** のみ、細胞増殖曲線からその値を読み取った。 IC_{50} を resistant factor (RF) とともに Table 3-1-1 に示した。RF 値は、L1210R 細胞における IC_{50} を L1210W 細胞における IC_{50} で除した値である。

Table 3-1-1. Results of an *in vitro* cytotoxicity assay in L1210W and L1210R cells.

Complex	$\text{IC}_{50}/\mu\text{M}$		RF
	L1210W	L1210R	
Cisplatin	17.8 \pm 2.1	65.0 \pm 8.5	3.7
5-H-X	3.3 \pm 0.1	9.4 \pm 1.5	2.9
5-H-Y	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 0.3	1.0
5-Me	1.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.4	1.2
5-Phe	44.5 \pm 10.5	8.1 \pm 1.3	0.2
5-EtAc	8.7 \pm 0.3	4.6 \pm 0.5	0.5
5-Ace	>160	>160	–

L1210W 細胞における IC_{50} は、**5-Phe** および **5-Ace** を除く 4 つの錯体でシスプラチンより低く、シスプラチンよりも高い *in vitro* 細胞増殖抑制活性を有することが分かった。また、L1210R 細胞においては、**5-Ace** 以外の 5 つの錯体において、シスプラチンよりも *in vitro* 細胞増殖抑制活性が高かった。これらの錯体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性は、L1210W 細胞においてシスプラチンの 2.0–15 倍であり、L1210R 細胞において 6.7–45 倍であった。

結合異性体である **5-H-X** および **5-H-Y** における *in vitro* 細胞増殖抑制活性は、両細胞ともに **5-H-Y** の方が高かった。この傾向から、これまで明らかにされてきた DNA との非共有結合性あるいは共有結合性相互作用が影響を及ぼしている可能性が考えられる。核酸塩基誘導体との反応では、**5-H-Y** は **5-H-X** とほぼ同等の反応速度を示したが（「本論 1-2」）、**5-H-Y** は **5-H-X** よりも高効率に仔ウシ胸腺 DNA の二次構造（「本論 2-1」）および T4 phage DNA の高次構造（「本論 2-2」）を変化させた。従って、**5-H-Y** の方がより二本鎖 DNA との反応性に富んでいると考えられ、その結果、より高い *in vitro* 細胞増殖抑制活性を示したと推定した。

5-H-Y および **5-H-Y** 誘導体の活性は、両細胞において **5-Me** \approx **5-H-Y** > **5-EtAc** > **5-Phe** > **5-Ace** の順に小さくなり、**5-Ace** 以外の錯体については、tetrazole 環 5 位の置換基のかさ高さが増すと、*in vitro*

細胞増殖抑制活性が低下する傾向が示唆された。また、DNA凝縮能とも概ね相関があった。**5-Ace**は、*in vitro*細胞増殖抑制活性試験における暴露濃度の範囲内において、両細胞ともに*in vitro*細胞増殖抑制活性を示さなかった。**5-Ace**は、**5-H-Y**や**5-Me**とほぼ同等にDNAの高次構造を変化させるにも関わらず（「本論2-2」）、**5-H-Y**、**5-Me**並びに**5-Phe**よりも著しく低い*in vitro*細胞増殖抑制活性を示していた。この原因として、**5-Ace**のみ、+1の電荷を有するということが関与している可能性が考えられ、置換基のかさ高さやDNAとの相互作用以外にも、*in vitro*細胞増殖抑制活性に影響を及ぼす要因が存在することが示唆された。

RF値を算出することができた5つの錯体は、全てシスプラチンのRF値(3.6)より小さい値を示しており(Table 3-1-1)、シスプラチン耐性を克服することが分かった。また、**5-H-X**(RF値=2.9)を除く4つの錯体のRF値は0.2-1.2であり、L1210R細胞に対して、L1210W細胞における*in vitro*細胞増殖抑制活性とほぼ同等、あるいはそれ以上の活性を発揮するということが明らかとなった。

シスプラチンに対する耐性獲得機構は、多くの要因が関与していると考えられている^{73,74}。一般的には、(1)細胞外排出機構の亢進や細胞内取り込み機構の抑制による細胞内取り込み量の減少、(2)glutathioneやmetallothioneinなどによる薬物解毒作用の増強、および(3)DNA修復機構の亢進によって耐性を獲得していると言われている。L1210R細胞では、L1210W細胞と比較して、細胞内へのシスプラチンの取り込み速度が小さいことが報告されており⁷⁵、テトラゾラト架橋錯体のL1210R細胞に対する有効性を解く鍵は、細胞内取り込みにあると考えられる。

3-1-3. まとめ

テトラゾラト架橋錯体の*in vitro*細胞増殖抑制活性は、置換基のかさ高さやDNAとの相互作用の強さによって左右される傾向が見られた。しかし、**5-Ace**においては、これらの要因と*in vitro*細胞増殖抑制活性との関係に矛盾が生じるため、錯体自身の電荷の他に、*in vitro*細胞増殖抑制活性に影響を与えている要因が存在する可能性が考えられる。テトラゾラト架橋錯体は、シスプラチン耐性細胞に対しても*in vitro*細胞増殖抑制活性を示し、RF値によって示されたように、シスプラチンに対する交差耐性を克服することが明らかとなった。この結果から、シスプラチンとは異なる作用機序によって制がん活性を発揮しており、多因子的にシスプラチン耐性を克服している可能性が示唆された。

3-1-4. 実験方法

3-1-4-1. 試薬

6種類の特ラゾラト架橋錯体は、米田らにより報告された方法に従って合成、精製および同定し、¹H-NMRにより純度の確認を行った^{24,25}。シスプラチンは、Alderdenらにより報告された方法に従って合成した⁴¹。Ham F-10培地はLife Technologies社のGibco®製品、RPMI1640培地はナカライテスク社の製品を用いた。ウシ胎児血清(FBS)は、Ham F-10培地にはLife Technologies社のGibco®製品、RPMI1640培地にはニチレイバイオサイエンス社の製品(Lot No. 9B0148あるいは12A410)を用いた。抗生物質および抗菌剤には、ナカライテスク社のAntibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solutionを用いた。MTTは同人化学研究所の製品を用いた。その他の試薬は、細胞培養に適した品位の市販品を精製することなく用いた。また、MILLIPORE社の純水製造装置DIRECT-Q®3 UVによって製造した超純水を使用した。

3-1-4-2. 使用細胞および培養条件

L1210マウス白血病細胞(L1210W細胞)は、金沢大学大学院医学系研究科薬理学教室より提供を受けた。シスプラチン耐性L1210マウス白血病細胞(L1210R細胞)は、シスプラチンの反復暴露(10 μM、三か月)および限界希釈法によって樹立された細胞株であり、大阪薬科大学薬品分析化学教室より提供を受けた。L1210W細胞は、10%(v/v) FBS、40 μM 2-ME、各種抗生物質(100 U·mL⁻¹ penicillin、100 μg·mL⁻¹ streptomycin)および抗菌薬(25 μg·mL⁻¹ amphotericin B)を含むHam F-10培地中で、湿度が十分に保たれたCO₂インキュベータ(5% CO₂、37°C)内で培養した。L1210R細胞は、10%(v/v) FBS、各種抗生物質(100 U·mL⁻¹ penicillin、100 μg·mL⁻¹ streptomycin)および抗菌薬(25 μg·mL⁻¹ amphotericin B)を含むRPMI1640培地中で、湿度が十分に保たれたCO₂インキュベータ(5% CO₂、37°C)内で培養した。

3-1-4-3. MTT assay

L1210WあるいはL1210R細胞を最終濃度 2×10^5 cells·mL⁻¹となるように調製し、96-wellプレート(Corning社製 product No. 3585)の各wellに50 μLずつ分注した。白金錯体溶液(10%(v/v) DMSO)を用時調製し、細胞に暴露する濃度(0–200 μM)の二倍の濃度となるように培地にそれぞれ添加した。この錯体を含む培地(0.2%(v/v) DMSO)を各wellに50 μLずつ添加した後、湿度が十分に保たれたCO₂インキュベータ(5% CO₂、37°C)内で24時間培養した。白金錯体の細胞への暴露から22時間経過後、5 mg/mL MTT PBS溶液を各wellに10 μLずつ添加した。培地に添加した錯体およびMTTの溶液は、全てフィルター(孔径0.25 μm)による滅菌を行った。24時間の暴露終了後、各wellにPBS 100 μLを添加し、トミー精工社の卓上遠心分離機LC-200を用いて510×gで10分間遠心した。上清を傾斜法により除去し、プレートを裏側に向けて5分間室温で静置した後、各wellにDMSO 100 μLを添加し、ボルテックスミキサーを用いて穏やかに10分間振とうした。生成したformazanの定量は、Molecular Device社のマイクロプレートリーダーSpectra Max M5を用いて540 nmにおける吸光度を測定することによって行った。細胞および白金錯体を含まない培地を100 μL分

注した well における吸光度をブランクとして用いた。白金錯体の濃度が 0 μM の well における吸光度 Abs_0 および各作用濃度における吸光度 Abs_x から(3-1-1)式に従って細胞の生存率 S (%) を求めた。

$$S = \frac{\text{Abs}_x}{\text{Abs}_0} \times 100 \quad (3-1-1)$$

細胞の生存率をもとに細胞増殖曲線を Synergy Software 社の解析プログラム KaleidaGraph を用いて作成し、50%阻害濃度 IC_{50} (μM) を(3-1-2)式から求めた。生存率の最大および最小値をそれぞれ S_{max} および S_{min} 、各濃度 X (μM) における生存率を Y (%) とするとき、以下の式が成り立つ。

$$Y = S_{\text{min}} + \frac{S_{\text{max}} - S_{\text{min}}}{1 + \frac{X}{\text{IC}_{50}}} \quad (3-1-2)$$

測定繰り返し回数 (n) は、96-well プレート 1 枚から得られる結果を $n = 1$ とした場合において $n = 4$ とし、 IC_{50} (μM) の結果は 4 回の平均値 \pm 標準偏差 (μM) として表記した。

3-2. 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おける時間依存的細胞内取り込み量の変化

3-2-1. 背景および目的

白金錯体の優れた制がん活性は、様々な要因によって左右される。*in vitro* 細胞増殖抑制活性においては、細胞核内の DNA との反応や細胞内における挙動、細胞内への取り込み量が、活性に影響を与える主な要因として挙げられる。

これまでに明らかにした共有結合性および非共有結合性相互作用は、細胞核内の DNA との反応性に影響を与える。**5-Ace** は、DNA の高次構造変化を引き起こす能力に長けているにも関わらず、*in vitro* 細胞増殖抑制活性をほとんど示さないという例外的な結果が得られた。また、シスプラチン耐性細胞に対して、シスプラチンは何らかの要因によって *in vitro* 細胞増殖抑制活性を示さなくなる一方で、ほとんどのテトラゾラト架橋錯体は、シスプラチン耐性細胞に対して非常に高い *in vitro* 細胞増殖抑制活性を示した。これは、テトラゾラト架橋錯体による DNA とのユニークな相互作用だけでなく、その他の要因の存在が推察される。

近年、多元素の高感度分析が可能な元素分析装置 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) の発展に伴い、ICP-MS を用いた白金錯体の細胞内取り込み量に関する研究が盛んになされている⁷⁶⁻⁸¹。白金は通常的环境中には存在しないため、白金錯体を作用させた細胞を灰化した試料を測定して得られる白金量は、細胞内に取り込まれた白金量に近似できる。また、ICP-MS は、測定元素について、ppt の濃度レベルの測定が可能であり、白金錯体の細胞内取り込み量を明らかにするのに非常に有益なツールである。

本節では、テトラゾラト架橋錯体の L1210 マウス白血病細胞 (L1210W 細胞) および cisplatin 耐性 L1210 マウス白血病細胞 (L1210R 細胞) における、時間経過に伴う白金錯体の細胞内取り込み量の変化を ICP-MS を用いて測定し、*in vitro* 細胞増殖抑制活性との関連を明らかにした。

3-2-2. 結果および考察

L1210W および L1210R 細胞に対して、最終濃度が $1 \mu\text{M}$ となるようにシスプラチンおよび各テトラゾラト架橋錯体を暴露させた際の細胞増殖曲線を Fig. 3-2-1 に示した。播種細胞濃度は、各細胞のコンフルエント細胞濃度 (L1210W 細胞 : $7\text{--}7.5 \times 10^5$ 、L1210R 細胞 : $4\text{--}4.5 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$) を参考に、L1210W 細胞で 1×10^5 、L1210R 細胞で $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ となるように調製した。この細胞濃度では、両細胞ともに、対数増殖期における白金錯体の細胞内取り込み量を明らかにすることができると考えられる。白金錯体の作用濃度の決定は、*in vitro* 細胞増殖抑制活性が高い **5-H-Y** および **5-Me** の IC_{50} (L1210W 細胞で **5-H-Y** : 1.5 ± 0.05 、**5-Me** : 1.23 ± 0.05 、L1210R 細胞で **5-H-Y** : 1.4 ± 0.32 、**5-Me** : $1.4 \pm 0.37 \mu\text{M}$) を参考にいき、観測時間中に細胞が死滅しないと考えられる濃度 ($1 \mu\text{M}$) を選択した。Fig. 3-2-1 に示したように、細胞増殖抑制効果は IC_{50} とおおよそ相関があり、特に、両細胞において $\text{IC}_{50} > 160 \mu\text{M}$ である **5-Ace** では、本条件下において、細胞増殖抑制はほとんど観察されなかった。

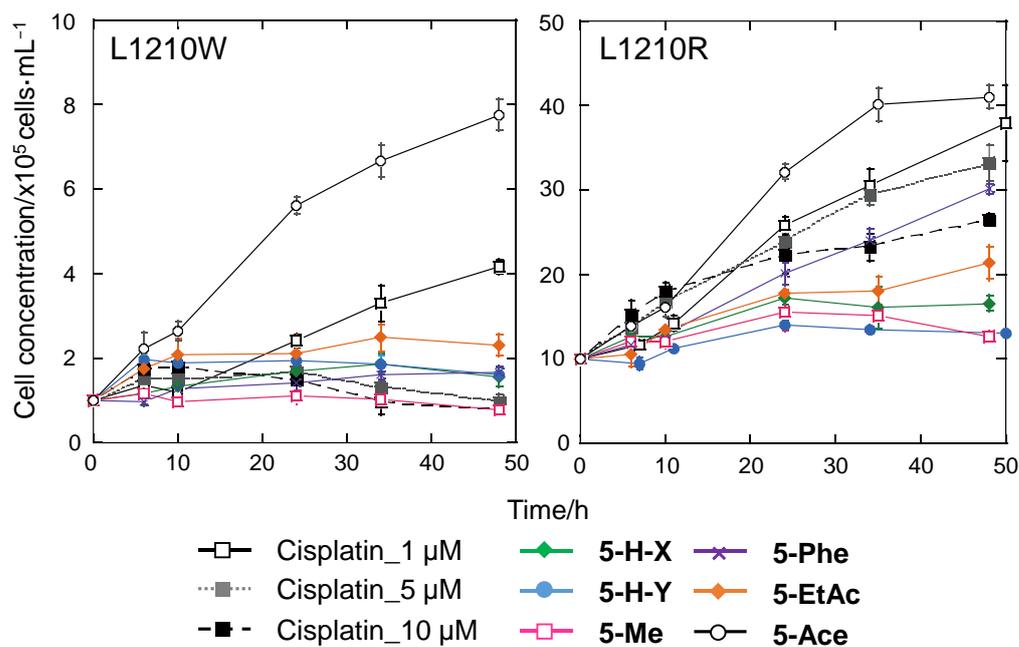


Fig. 3-2-1. Cell growth curves in L1210W and L1210R cells (n = 3, mean \pm SD).

細胞内取り込み量の経時変化を Fig. 3-2-2 に示した。縦軸の値は、細胞 10^7 個あたりに取り込まれた白金錯体の量 ($\text{nmol} \cdot (10^7 \text{ cells})^{-1}$) を表している。テトラゾラト架橋錯体については、一分子中に二つの白金原子が存在するため、シスプラチンの細胞内取り込み量を算出するのに用いた式 (3-2-1) から得られた値を 2 で除して求めた (3-2-1)' 式)。両細胞において、ほとんどの錯体の細胞内取り込み量が、時間経過とともに増加する傾向が見られた。観測時間中の細胞内取り込み量の増加は、暴露時間約 24 時間までが顕著であり、その後の細胞内取り込み量は、一定となるか、減少していた。細胞内取り込み量は、細胞外からの取り込みと細胞内からの排出の均衡によって決定される。従って、この変化の様子は、暴露時間 24 時間前後で取り込みと排出が平衡となり、細胞内濃度が飽和状態になったことによる可能性が考えられる。

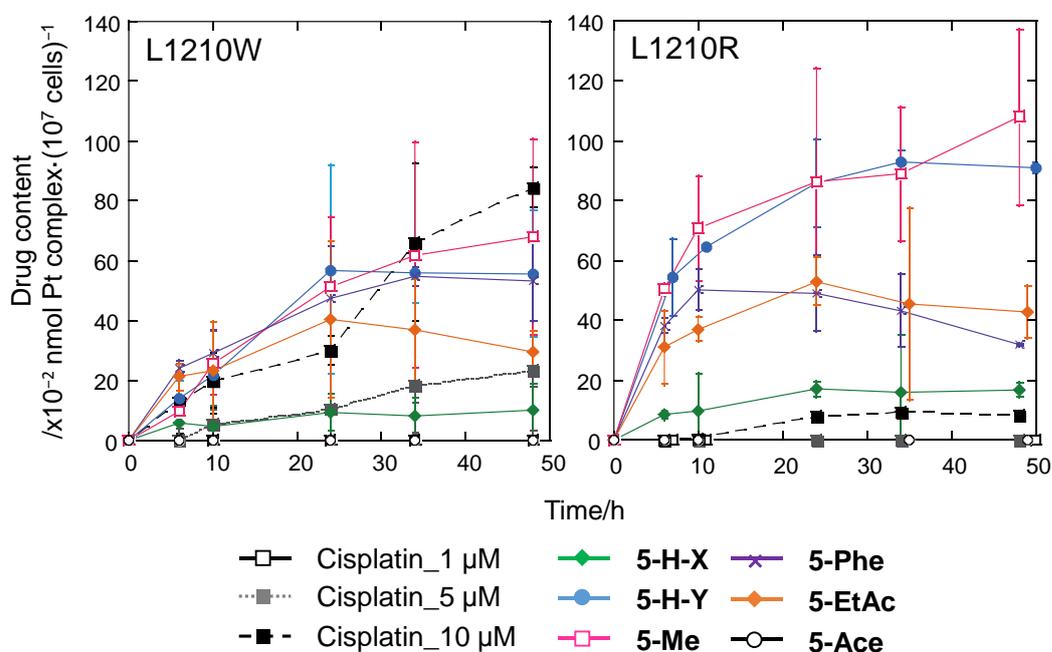


Fig. 3-2-2. Time-dependent change in intracellular drug content ($n = 3$, mean \pm SD).

Table 3-2-1 には、各錯体を暴露した際の 24 時間後の細胞内取り込み量を示した。表中には、L1210W 細胞における取り込み量と L1210R 細胞における取り込み量の比 (r) を併記した。シスプラチンの細胞内取り込み量は、L1210R 細胞において大きく減少していることが分かった ($r=0.3$)。従って、L1210R 細胞が、シスプラチンの細胞内への集積を妨げる機構を有していることは明らかであった。L1210W 細胞と L1210R 細胞の取り込み量を比較すると、ほとんどのテトラゾラト架橋錯体は、L1210R 細胞において、より多く取り込まれるという傾向を示しており、ほとんど取り込まれなかった **5-Ace** を除いたテトラゾラト架橋錯体の r は 1.0–1.7 であった。また、暴露開始後 24 時間までにテトラゾラト架橋錯体が細胞内に取り込まれる様子について、L1210W 細胞と L1210R 細胞で、細胞内取り込み量の増加の速さに違いがあることが分かった (Fig. 3-2-2)。平衡状態に達すると考えられる 24 時間後における細胞内取り込み量に対する 6 (あるいは 7) および 10 (あるいは 11) 時間後の細胞内取り込み量の割合は、L1210W 細胞では、各錯体の結果を平均して、約 42 および 52% である一方、L1210R 細胞では約 64 および 79% であった。つまり、これらの結果は、テトラゾラト架橋錯体は、L1210W 細胞よりも L1210R 細胞において、より多く、かつ、より早く取り込まれるということを示していると考えられる。テトラゾラト架橋錯体は、「本論 3-1」において、同細胞を用いた *in vitro* 細胞増殖抑制活性試験の結果から求めた RF 値からも分かるように、シスプラチン耐性を克服する。従って、L1210R 細胞における取り込み量および速度の増大が、シスプラチン耐性細胞に対する高い *in vitro* 細胞増殖抑制活性に大きく寄与することが示唆された。

Table 3-2-1. Amounts of each compound taken up by L1210W and L1210R cells after 24 h of exposure.

Complex	Intracellular content at 24 h / 10^{-2} nmol Pt complex · (10^7 cells) $^{-1}$		r
	L1210W	L1210R	
Cisplatin (1 μ M)	N. D.	N. D.	–
Cisplatin (5 μ M)	5.3 \pm 4.4	N. D.	–
Cisplatin (10 μ M)	15.4 \pm 2.5	3.9 \pm 0.7	0.3
5-H-X	4.8 \pm 1.6	8.7 \pm 0.7	1.8
5-H-Y	29.2 \pm 8.9	44.0 \pm 3.7	1.5
5-Me	26.4 \pm 6.0	44.4 \pm 9.6	1.7
5-Phe	24.4 \pm 4.4	25.2 \pm 3.2	1.0
5-EtAc	20.8 \pm 6.7	27.2 \pm 2.0	1.3
5-Ace	N. D.	N. D.	–

N.D.: Not determined (below the limit of quantitation)

本条件におけるシスプラチンの細胞内取り込み量は、下限値以下であった ($< 0 \text{ nmol Pt complex} \cdot (10^7 \text{ cells})^{-1}$)。「序論」において述べたように、シスプラチンが細胞内へ取り込まれる機構は、単純拡散によるものが多い。従って、シスプラチンの細胞内取り込み量は、暴露濃度の影響を受けると考えられる。L1210W 細胞に対して、シスプラチンを最終濃度 5 または 10 μM で暴露させた場合、24、36 および 72 時間後における細胞内取り込み量は、それぞれ 5.3 ± 4.4 、 9.4 ± 4.7 および 12.0 ± 4.3 、または、 15.4 ± 2.5 、 34.0 ± 13.5 および $43.4 \pm 3.4 \text{ nmol Pt complex} \cdot (10^7 \text{ cells})^{-1}$ であり、暴露濃度の増加とともに細胞内取り込み量も増加していた。シスプラチンの IC_{50} は、L1210W 細胞で 17.8 ± 2.1 、L1210R 細胞で $65.0 \pm 8.5 \mu\text{M}$ であり、1 μM で暴露させた場合は、暴露濃度は IC_{50} の 1-5% 程度にしか満たない。しかし、L1210W 細胞に対して、シスプラチンの暴露濃度が 10 μM の場合は、**5-H-Y** ($\text{IC}_{50} = 1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$) や **5-Me** ($\text{IC}_{50} = 1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$) の暴露濃度が 1 μM の場合と同等の *in vitro* 細胞増殖抑制活性を発揮すると考えられる。それと相関して、10 μM シスプラチン暴露下の 24-72 時間後における細胞内取り込み量は、1 μM **5-H-Y** または **5-Me** 暴露下における結果と近い値を示していた。つまり、一定の *in vitro* 細胞増殖抑制活性を発揮する濃度のシスプラチンに暴露させると、細胞内取り込み量は時間経過に伴い増大することが確認された。これらの結果から、tetrazolato 架橋錯体は、効率よく細胞内に取り込まれていると推定された。

シスプラチンと同様、本条件における **5-Ace** の細胞内取り込み量は、下限値以下であった ($< 0 \text{ nmol Pt complex} \cdot (10^7 \text{ cells})^{-1}$)。本実験では、細胞全体中に存在する白金錯体の定量を行っているため、当然ながら、**5-Ace** は白金制がん剤の標的分子である DNA が存在する細胞核内へも到達していないということを意味する。つまり、**5-Ace** が顕著な DNA 凝縮能を有する錯体であるにもかかわらず、*in vitro* 細胞増殖抑制活性をほとんど示さないのは、**5-Ace** が細胞内に取り込まれず、DNA との相互作用が起こらなかったためであると推察された。

5-Ace の細胞内取り込み量が顕著に低い理由として、carboxylate 基の導入による影響が考えられる。**5-Ace** のように、白金錯体に carboxylate 基を導入することによって、*in vitro* 細胞増殖抑制活性および細胞内取り込み量が減少することが報告されている⁸²。白金(IV)単核錯体 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2(p\text{-CO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{-H})_2]$ に対して、二つの carboxylate 基を導入した $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2(p\text{-CO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{-CO}_2\text{H})_2]^{2-}$ では、リード化合物と比較して、ヒト肺基底上皮腺癌細胞 A549 細胞株における *in vitro* 細胞増殖抑制活性が 98% 以上減少し、かつ、10 μM で 6 時間暴露させた場合、細胞内取り込み量が 95% 以上減少する。carboxylate 基の導入は、錯体の総電荷に影響を与える。白金(IV)単核錯体の例においても、carboxylate 基の導入によって、錯体の電荷数は 0 から -2 へと減少する。すなわち、錯体の電荷数の減少によって、細胞内取り込み量は減少する可能性も考えられる。このような例は、白金(II)三核錯体 BBR3464 ($[\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)_2]^{2+}$)、および、その類似体二種においても見られる⁸³。BBR3464 の類似体は、+4 に帯電している BBR3464 と比較して、アニオン性の chloride 配位子または中性溶液中でプロトン化する amino 基の数が異なっており、それぞれ +6 あるいは +8 に帯電している。細胞内取り込み量は電荷に比例して多くなり、+8 の電荷を有する類似体では、BBR3464 の約 5 倍の細胞内取り込みが観察されている。**5-Ace** の carboxylate 基の pK_a は 3.23 である（「本論 2-1」）。L1210W および L1210R 細胞の培養は、pH 7.2-7.4 の環境下

で行われているため、Henderson-Hasselbalch の式によると、培養液中で、**5-Ace** の carboxylate 基の 99.990–99.993% が carboxylate ion として存在する。つまり、錯体の総電荷が+1 の状態で存在していることが分かる。従って、**5-Ace** は、carboxylate 基を導入した結果、総電荷が減少し、取り込み量が減少したと考えられる。

5-H-X も他のテトラゾラト架橋錯体と比較して取り込み量が少なかった。特に、**5-H-X** および **5-H-Y** は結合異性体であるにも関わらず、両錯体の 24 時間後の細胞内取り込み量は大きく異なっていた (Table 3-2-1)。**5-H-X** および **5-H-Y** の 24 時間後の細胞内取り込み量は、それぞれ、L1210W 細胞で 9.3 ± 6.1 および 56.9 ± 34.8 、L1210R 細胞で 17.0 ± 2.6 および 85.8 ± 14.5 nmol Pt complex $\cdot (10^7$ cells) $^{-1}$ であり、各細胞において、**5-H-Y** の方が約 5–6 倍多く細胞内に取り込まれていた。両錯体の構造的な違いは、分子内の二つの白金(II)原子が結合している窒素原子である。各白金(II)原子は、**5-H-X** では、tetrazole 環の N(1)および N(2)窒素原子、**5-H-Y** では N(2)および N(3)窒素原子に配位している。分子内において対称性を有する **5-H-Y** とは異なり、**5-H-X** は非対称性分子であり、N(4) 窒素原子が露出した構造を有すると見なすことができる。従って、水溶液中において、**5-H-X** 中の N(4) 窒素原子は溶媒分子との接近性が高くなると推定された。N(4) 窒素原子は芳香族炭化水素よりも極性が大きいので、**5-H-X** は、より高い水溶性を獲得していると考えられ、疎水性の高い細胞膜の通過時にマイナスファクターとして作用した結果、細胞内取り込み量が低下した可能性が考えられる。これと同様の現象は、**5-H-X** および **5-H-Y** の合成において、観察される。両錯体は逆相クロマトグラフィーによって分離精製されるが、**5-H-X** の方がより早く溶出される²⁴。結果的に、**5-H-X** における細胞内取り込み量の低下が、*in vitro* 細胞増殖抑制活性の低下にも影響していると考えられる。従って、**5-H-X** および **5-H-Y** における *in vitro* 細胞増殖抑制活性の相違は、「本論 1-1 および 2」や「本論 2-1 および 2」で述べた DNA との反応性の違いに加え、細胞内取り込み量が関与していると推察された。

テトラゾラト架橋錯体について、両細胞における IC_{50} と 24 時間後における細胞内取り込み量の関係をまとめると、Fig. 3-2-3 の通りになった。両細胞において、 IC_{50} の低い **5-H-Y** および **5-Me** では 24 時間後の細胞内取り込み量が多かった。特に、L1210R 細胞においては、**5-Ace** を除く 5 つのテトラゾラト架橋錯体の結果から、 IC_{50} と 24 時間後の細胞内取り込み量の間に関係があることが分かった (Fig. 3-2-3 右、決定係数 $R^2 = 0.886$)。その一方で、L1210W 細胞における相関は弱かった (Fig. 3-2-3 左、 $R^2 = 0.0033$)。ただし、L1210W 細胞における相関について、**5-H-X** を除くと $R^2 = 0.368$ 、さらに **5-Phe** を除くと $R^2 = 0.836$ となり、**5-H-X** および **5-Phe** を除く **5-H-Y**、**5-Me** および **5-EtAc** の 3 つのテトラゾラト架橋錯体間では、 IC_{50} との相関が高いことが分かった。

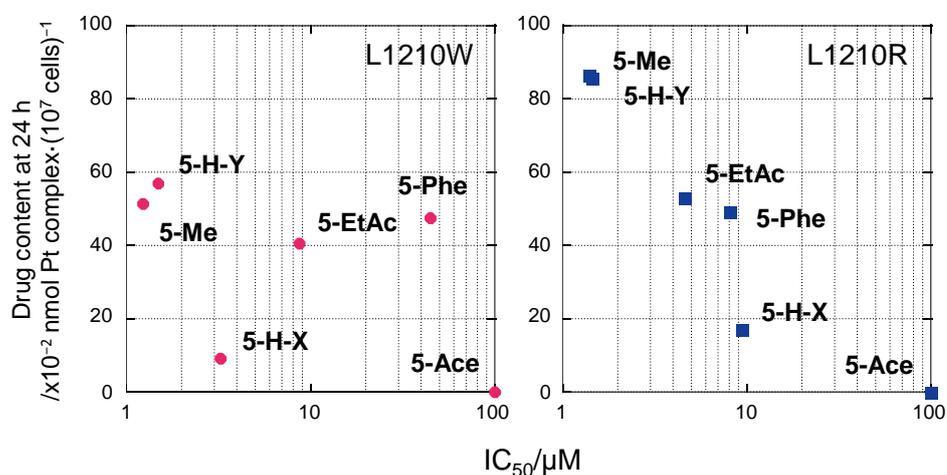


Fig. 3-2-3. Correlation between IC_{50} and intracellular drug content in L1210W and L1210R cells after exposure to each complex for 24 h.

5-Phe の細胞内取り込み量は、L1210W 細胞において、**5-H-Y** および **5-Me** と同程度でありながら、*in vitro* 細胞増殖抑制活性は、**5-Ace** を除くテトラゾラト架橋錯体の中で最も低かった。また、**5-Phe** の両細胞における細胞内取り込み量について大きな差は無いにも関わらず、L1210R 細胞に対する *in vitro* 細胞増殖抑制活性の方が高かった (RF = 0.2、「本論 3-1」Table 3-1-1)。テトラゾラト架橋錯体の他の誘導体においても、疎水性が増加すると、シスプラチン感受性細胞よりシスプラチン耐性細胞に対してより高い *in vitro* 細胞増殖抑制活性を発揮する例が確認されている (未発表)。テトラゾラト架橋錯体が細胞内に取り込まれる過程において、錯体が細胞膜に局在する可能性なども考えられるため、**5-Phe** のような特徴的な結果を生じる原因を明らかにするためには、錯体を暴露した細胞を分画し、錯体の局在を明らかにすることなどが必要であると考えられる。また、**5-Phe** は、DNA との非共有結合性相互作用において、他のテトラゾラト架橋錯体とは異なる二次構造の変化を引き起こすことが、**5-Phe** 添加時の仔ウシ胸腺 DNA の CD スペクトル変化から示唆された (「本論 2-1」)。DNA の二次構造の変化が *in vitro* 細胞増殖抑制活性にどのように関与しているかということに加え、細胞内取り込み以外にも *in vitro* 細胞増殖抑制活性に影響を与える要因が存在する可能性が考えられる。

3-2-3. まとめ

テトラゾラト架橋錯体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性と DNA との反応性の間における関係について生じた例外的な結果は、シスプラチン感受性および耐性細胞における細胞内取り込み量を明らかにすることで説明することができた。つまり、*in vitro* 細胞増殖抑制活性は、DNA との反応性の大小だけでなく、細胞内取り込み量に大きく影響されていることが分かった。さらに、*in vitro* 細胞増殖抑制活性および細胞内取り込み量の両方に変化を与える要因として、テトラゾラト架橋錯体の tetrazole 環 5 位に存在している置換基および置換基によって変化する錯体の総電荷が重要であると考えられた。シスプラチン耐性細胞である L1210R 細胞における高い *in vitro* 細胞増殖抑制活性には、テトラゾラト架橋錯体が高効率に細胞内に取り込まれることが寄与していると考えられる。特に、暴露開始後 24 時間までの L1210R 細胞への取り込み量および速度の充進は、シスプラチン耐性機構を明らかにする上で大変興味深い。これらが解明されることで、シスプラチン耐性を克服することのできる白金制がん剤の開発に寄与することが期待される。

3-2-4. 実験方法

3-2-4-1. 試薬

6種類のテトラゾラト架橋錯体は、米田らにより報告された方法に従って合成、精製および同定し、¹H-NMRにより純度の確認を行った^{24,25}。シスプラチンは、Alderdenらにより報告された方法に従って合成した⁴¹。Ham F-10培地はLife Technologies社のGibco®製品、RPMI1640培地はナカライテスク社の製品を用いた。ウシ胎児血清(FBS)は、Ham F-10培地にはLife Technologies社のGibco®製品、RPMI1640培地にはニチレイバイオサイエンス社の製品(Lot No. 9B0148あるいは12A410)を用いた。抗生物質および抗菌剤は、ナカライテスク社のAntibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solutionを用いた。HNO₃は関東化学社のUltrapur-100 Nitric Acid 1.42を用いた。ICP-MSの白金標準試液およびタリウム標準試液は、それぞれ和光純薬工業社から購入した。その他の試薬は、細胞培養あるいは分析に適した品位の市販品を精製することなく用いた。また、MILLIPORE社の純水製造装置DIRECT-Q®3 UVによって製造した超純水を使用した。

3-2-4-2. 使用細胞および培養条件

L1210マウス白血病細胞(L1210W細胞)は、金沢大学大学院医学系研究科薬理学教室より提供を受けた。シスプラチン耐性L1210マウス白血病細胞(L1210R細胞)は、シスプラチンの反復暴露(10 μM、三か月)および限界希釈法によって樹立された細胞株であり、大阪薬科大学薬品分析化学教室より提供を受けた。L1210W細胞は、10%(v/v) FBS、40 μM 2-ME、各種抗生物質(100 U·mL⁻¹ penicillin、100 μg·mL⁻¹ streptomycin)および抗菌薬(25 μg·mL⁻¹ amphotericin B)を含むHam F-10培地中で、湿度が十分に保たれたCO₂インキュベータ(5% CO₂、37°C)内で培養した。L1210R細胞は、10%(v/v) FBS、各種抗生物質(100 U·mL⁻¹ penicillin、100 μg·mL⁻¹ streptomycin)および抗菌薬(25 μg·mL⁻¹ amphotericin B)を含むRPMI1640培地中で、湿度が十分に保たれたCO₂インキュベータ(5% CO₂、37°C)内で培養した。

3-2-4-3. 白金錯体の細胞への暴露

L1210WあるいはL1210R細胞をそれぞれ1×10⁵、1×10⁶ cell·mL⁻¹となるように調製し、直径60 mmの細胞培養皿(Corning社製 product No. 430589)に3 mLずつ分注した。白金錯体の最終濃度が1 μMとなるように、100 μM白金錯体溶液(10%(v/v) DMSO)を30 μLずつ各培養皿に添加し、湿度が十分に保たれたCO₂インキュベータ(5% CO₂、37°C)内で培養することで、細胞に白金錯体を暴露させた。白金錯体物溶液は細胞に暴露させる前にフィルター滅菌を行った。暴露時間は、0、6(あるいは7)、10(あるいは11)、24、34(あるいは35)、48(49あるいは50)時間とした。また、測定繰り返し回数(n)は3とした。

各暴露時間において、細胞の濃度(cells·mL⁻¹)を計測した後、全細胞を15 mL用量の遠沈管に回収した。トミー精工社の卓上遠心分離機MX-301を用いて6,000×gで5分間遠心を行い、上清の培地を傾斜法により除去した。沈澱として残った細胞に2 mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を添加し、ピペッティング操作により再懸濁後、同様の遠心操作によって細胞を沈澱させ、上清の

PBS を傾斜法により除去することで細胞の洗浄を行った。PBS による洗浄操作を合計 3 回繰り返し、最終的に得られた細胞に 200 μL の超純水を加え、再懸濁させた。

3-2-4-4. ICP-MS による細胞内に取り込まれた白金錯体の定量

細胞懸濁液全量 (約 200 μL) をガラス製の容器に移し、これに対して 800 μL の濃 HNO_3 を添加し、時計皿で蓋をしながらホットプレート上で加熱した。加熱は、40°C で 30 分間、70°C で 30 分間、90°C で 60 分間、120°C で 60 分間行った。続いて、時計皿を取り外し、120°C で蒸発乾固させた後、500 μL の濃 HNO_3 を添加し、120°C で加熱し再び蒸発乾固させた。得られた残渣に対して 2 mL の 2%(v/v) HNO_3 を添加し溶解した。

Agilent 社の ICP-MS 装置 7500CX を用いて白金の定量を行った。ICP-MS 装置は白金の測定に最適な設定を行った。検量線は白金濃度が 0.1、1、10、100 $\mu\text{g/L}$ の 2%(v/v) HNO_3 溶液を用いて作成した。内標準にはタリウム (m/z 204) を用いた。500 $\mu\text{g/L}$ タリウムの 2%(v/v) HNO_3 溶液を流速 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ で流路に添加することで、タリウムの最終濃度が 10 $\mu\text{g/L}$ となるようにした。

3-2-4-5. 細胞内に取り込まれた白金錯体量の算出

3-2-4-3 で計測した細胞回収時の細胞の濃度を X ($\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$)、3-2-4-4 で測定した白金量を Y (ppb)、ブランク値として各細胞に 10%(v/v) DMSO を 30 μL を添加した際に得られた 10^7 cells あたりの白金量を W (ppb) とし、 10^7 cells あたりの白金含有量 Z ($\text{nmol Pt complex}\cdot(10^7\text{cells})^{-1}$) を(3-2-1)式から算出した。

$$Z = \left(Y \times 2 \times \frac{10^7}{X \times 3} - W \right) \times \frac{1}{195} \quad (3-2-1)$$

テトラゾラト架橋錯体は分子内に白金原子を二つ有しているため、錯体の量に換算するために(3-2-1)'式を用いた。

$$Z = \left(Y \times 2 \times \frac{10^7}{X \times 3} - W \right) \times \frac{1}{195} \times \frac{1}{2} \quad (3-2-1)'$$

結論

一連の制がんテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体の作用機序の解明を目的とし、本研究において、これらの錯体の DNA との相互作用および細胞内取り込みについて詳細に調べた結果、以下のことが明らかになった。

(1) DNA との相互作用には、共有結合性および非共有結合性相互作用の二種類が存在する。

アゾラト架橋錯体と DNA との相互作用は、共有結合性および非共有結合性相互作用に分類された。その様子は、CD 分光法によって、仔ウシ胸腺 DNA の二次構造変化を捉えることによって明らかにすることができた（「本論 2-1」）。非共有結合性相互作用は、拡散律速反応として起こり、DNA の二次構造を B 型から C 型へ変化させた。一方で、共有結合性相互作用は、非共有結合性相互作用に引き続いて、温度依存的に起こることが分かった。

(2) 共有結合性付加物の形成は、シスプラチンと比較してゆっくり起こる。

白金制がん剤は、DNA の核酸塩基と共有結合を形成することによって、制がん作用を初動すると考えられている。テトラゾラト架橋錯体の核酸塩基との共有結合性相互作用を明らかにするために、核酸塩基誘導体 9EtG との反応について、速度論的解析を行った（「本論 1-2」）。得られた二次反応速度定数は $5\text{-H-X} \approx 5\text{-H-Y} \approx 5\text{-Phe} > 5\text{-Me} > 5\text{-EtAc} > 5\text{-Ace}$ の順に小さくなることが明らかになった。テトラゾラト架橋錯体間における差は、結合異性体間および様々な置換基を導入した 5-H-Y 誘導体間において、比較的小さいことが分かった（平均半減期 ($t_{1/2}$) 108 ± 25.9 h）。一方で、アゾラト架橋錯体間で比較すると、azole 環の窒素原子の数が減少するにつれて、反応速度定数が減少することが確認された（ピラゾラト架橋錯体 $t_{1/2}$: 221 h、トリアゾラト架橋錯体 $t_{1/2}$: 137 h）。また、テトラゾラト架橋錯体が二当量の 9EtG と複合体を形成する際に、異性化反応、つまり、白金(II)原子が tetrazole 環上の N(2)から N(3)窒素原子へ、あるいは N(3)から N(4)（あるいは、N(2)から N(1)）窒素原子に移動する分子内転移反応を伴って起こっていた（「本論 1-1 および 1-2」）。これにより、シスプラチンと比較して、より離れた距離に存在する核酸塩基間の架橋形成が可能になり、DNA 上では多様な共有結合性付加物が形成されると推察された。

また、仔ウシ胸腺 DNA との共有結合性付加物の生成量および生成速度を明らかにした（「本論 1-3」）。その結果、共有結合性付加物の生成量および生成速度の両方において、シスプラチンの方が 5-H-Y を上回っていることが分かった（シスプラチン $> 5\text{-H-Y}$ ）。つまり、DNA 上の共有結合性付加物の生成量と *in vitro* 細胞増殖抑制活性（シスプラチン $< 5\text{-H-Y}$ ）に相関は見られなかった。がん細胞内における核酸塩基および DNA との共有結合性付加物の生成量および生成速度は、がん細胞内にどれだけ白金錯体が存在するかによって大きく左右されるため、細胞内取り込み実験（「本論 3-2」）の実施が提案された。

(3) 非共有結合性相互作用には、静電的相互作用や水素結合が関与している。

非共有結合性相互作用は、電氣的に中性である従来の白金制がん剤には、ほとんど観測されず、陽電荷を有するアゾラト架橋錯体に特徴的な相互作用である。この相互作用は、DNA の二次構造（「本論 2-1」）および高次構造の変化、つまり、凝縮（「本論 2-2」）を引き起こした。二次構造変化を引き起こす作用は、**5-H-Y** \approx **5-Me** $>$ **5-H-X** $>$ **5-Phe** $>$ **5EtAc** \gg **5-Ace** の順に低下した。**5-Ace** の電荷が他のテトラゾラト架橋錯体と比較して小さく、二次構造変化をほとんど引き起こさなかったことから、非共有結合性相互作用は、白金錯体の陽電荷と DNA 背後骨格のリン酸基の負電荷の間の静電的相互作用が関与していると考えられた（「本論 2-1」）。一方で、凝縮を引き起こす効率は、**5-H-Y** \approx **5-Ace** $>$ **5-Me** $>$ **5-Phe** $>$ **5EtAc** の順に低下した。他の錯体よりも陽電荷が小さい **5-Ace** が非常に高効率に凝縮を引き起こすことから、凝縮を引き起こす非共有結合性相互作用は、単なる静電的相互作用ではなく、水素結合なども関与しているということが示唆された（「本論 2-2」）。

(4) *in vitro* 細胞増殖抑制活性は、細胞内取り込み量に依存し、細胞内取り込み量は錯体の総電荷に大きく影響を受ける。

MTT Assay によって明らかにされたテトラゾラト架橋錯体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性は、錯体のかさ高さや DNA の凝縮能によって左右される傾向が見られた（「本論 3-1」）。しかし、**5-Ace** においては、高い DNA 凝縮能を有するものの、*in vitro* 細胞増殖抑制活性が著しく低い ($IC_{50} > 160 \mu M$) という例外的な結果が得られた。この結果の原因を解明するために、シスプラチン感受性および耐性細胞における細胞内取り込み量を調べた（「本論 3-2」）。その結果、*in vitro* 細胞増殖抑制活性は、細胞内取り込み量に大きく影響されることが分かった。また、細胞内取り込み量は、テトラゾラト架橋錯体の tetrazole 環 5 位の置換基の種類にも依存するが、錯体の総電荷に最も影響を受けることが示唆された。他の誘導體 (+2) よりも陽電荷が 1 小さい **5-Ace** (+1) は、細胞内にほとんど取り込まれておらず、**5-Ace** の著しく低い *in vitro* 細胞増殖抑制活性は、このことに起因すると推定した。

(5) 高効率な細胞内取り込みが、シスプラチン耐性の克服に大きく寄与している。

テトラゾラト架橋錯体は、シスプラチン耐性細胞に対しても *in vitro* 細胞増殖抑制活性を示し、シスプラチンに対する交差耐性を克服することが明らかとなった（「本論 3-1」）。シスプラチン耐性を克服する要因として、テトラゾラト架橋錯体のシスプラチン耐性細胞における高効率な細胞内取り込みが挙げられた（「本論 3-2」）。特に、シスプラチン耐性細胞における暴露時間 24 時間までの細胞内取り込み量および速度の充進は、シスプラチン耐性機構を明らかにする上で大変興味深かった。一方で、シスプラチン感受性および耐性細胞において同程度取り込まれていたにも関わらず、両細胞に対する *in vitro* 細胞増殖抑制活性が異なる誘導體も存在することから、細胞内取り込みだけでなく、多因子的にシスプラチン耐性を克服していることが推定された。

次世代白金制がん剤には、副作用の軽減およびシスプラチン耐性がんに対する有効性が期待されている。本研究では、従来の白金制がん剤が示す共有結合性相互作用に加えて、非共有結合性相互作用によって標的分子である DNA に結合するという、テトラゾラト架橋錯体に特徴的な DNA との相互作用が明らかにされた。これらの情報は、新しい制がんメカニズムの提唱や、シスプラチン耐性を克服することのできる白金制がん剤の創製につながると期待される。また、錯体の総電荷によって、細胞内取り込みと *in vitro* 細胞増殖抑制活性が大きく変化することが明らかになった。この発見は、テトラゾラト架橋錯体を基盤とする薬物送達システムの構築や *prodrug* の創製に大きく寄与すると考えられる。以上より、本研究で得られた知見が、次世代白金制がん剤の開発に貢献することが期待される。

論文目録

本論文の内容は、以下の雑誌に公表した。

- (1) Yuko Yoshikawa, Seiji Komeda, Masako Uemura, Toshio Kanbe, Masahiko Chikuma, Kenichi Yoshikawa and Tadayuki Imanaka
‘Highly Efficient DNA Compaction Mediated by an In Vivo Antitumor-Active Tetrazolato-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complex’
Inorganic Chemistry **2011**, *50*, 11729–11735.
- (2) Masako Uemura, Toshihiro Suzuki, Kazuto Nishio, Masahiko Chikuma and Seiji Komeda
‘An In Vivo Highly Antitumor-Active Tetrazolato-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complex Largely Circumvents In Vitro Cisplatin Resistance: Two Linkage Isomers Yield the Same Product upon Reaction with 9-Ethylguanine but Exhibit Different Cytotoxic Profiles’
Metallomics **2012**, *4*, 686–692.
- (3) Masako Uemura, Yuko Yoshikawa, Masahiko Chikuma and Seiji Komeda
‘A Circular Dichroism Study Uncovers a Two-Step Interaction of Antitumor Azolato-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes with Calf Thymus DNA’
Metallomics **2012**, *4*, 641–644,.
- (4) Masako Uemura, Yuko Yoshikawa, Kenichi Yoshikawa, Takaji Sato, Yoshiki Mino, Masahiko Chikuma and Seiji Komeda
‘Second- and Higher-Order Structural Changes of DNA Induced by Antitumor-Active Tetrazolato-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes with Different Types of 5-Substituent’
Journal of Inorganic Biochemistry **2013**, *127*, 169–174.

謝辞

終わりに臨み、本研究に際し、長きに亘り、御厚意あふれる御指導と御鞭撻を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部 米田誠治准教授に、謹んで心より感謝の意を表します。

また、大阪薬科大学における論文博士の申請にあたり、貴重な御時間を割いていただき、御助言と御推薦を賜りました大阪薬科大学 三野芳紀教授に、厚く感謝申し上げます。

本研究は、多くの方々の御協力無くしては、成し得ませんでした。共著論文を学位論文として使用することに対して御承諾いただいた共著者の先生方には、感謝して止みません。DNA の高次構造に関する貴重な実験データの御提供を賜りました同志社大学生命医科学部 吉川研一教授、立命館大学生命科学部 吉川祐子客員教授および今中忠行教授、そして、名古屋大学 神戸俊夫教授に、深く感謝いたします。研究初期段階に *in vitro* 細胞増殖抑制活性試験の結果の御提供を賜りました明治薬科大学 鈴木俊宏教授および近畿大学 西尾和人教授に、また、L1210R 細胞の御提供と細胞内取り込み実験に関する御助言を賜りました大阪薬科大学 佐藤卓史講師に、そして、L1210W 細胞の御提供と細胞培養および MTT Assay の手技の御教授を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部 樋口善博教授および古川絢子助手に、心より御礼申し上げます。質量分析を行っていただきました大阪薬科大学 藤嶽美穂代講師および春沢信哉教授に、心より御礼申し上げます。貴重な御助言と御激励を賜りました大阪薬科大学 千熊正彦教授に、心より御礼申し上げます。

鈴鹿医療科学大学薬学部 物理系薬学分野 半田哲郎教授、飯田靖彦教授、定金豊教授、藤澤豊助手、および同分野を御退職された桜井弘教授、森井孫俊教授には、多くの知識や示唆を賜りました。心より御礼申し上げます。

学位取得に際し、多々御迷惑をお掛けし、御配慮を賜りました広島大学薬学部 小池透教授、御助言、御激励を賜りました広島大学薬学部 松尾裕彰教授には、この場をお借りして、深く感謝申し上げます。

最後に、鈴鹿医療科学大学薬学部において、助手に着任して以来、多くの方々に支えられ、本学位論文を完成させるに至りましたことについて、本学の教職員の皆様、家族、友人、これまで御世話になりました全ての皆様へ、改めてここに心からの感謝を表します。

2015年7月 植村雅子

参考文献

1. 国立がん研究センターがん情報サービス 「がん登録・統計」 2013 年.
2. 胃癌治療ガイドライン—付 胃悪性リンパ腫診断の手引き— 医師用. 金原出版: 2010.
3. 大腸癌治療ガイドライン 医師用. 金原出版: 2010.
4. *EBM* の手法による肺癌診療ガイドライン 2014 年版. 金原出版: 2014.
5. 古瀬純司, 癌 Experts 「エリアレビュー胆道癌」 GC 療法は日本人進行胆道癌で生存期間を延長 (癌治療学会 2012) . In 日経メディカル オンライン: 2012.
6. Valle, J. W.; Furuse, J.; Jitlal, M.; Beare, S.; Mizuno, N.; Wasan, H.; Bridgewater, J.; Okusaka, T., *Annals of Oncology* **2013**, mdt540.
7. Mansy, S.; Rosenberg, B.; Thomson, A., *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 1633–1640.
8. Blommaert, F. A.; van Dijk-Knijenburg, H. C.; Dijt, F. J.; den Engelse, L.; Baan, R. A.; Berends, F.; Fichtinger-Schepman, A. M. J., *Biochemistry* **1995**, *34*, 8474–8480.
9. Eastman, A., *Biochemistry* **1986**, *25*, 3912–3915.
10. Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Van der Veer, J. L.; Den Hartog, J. H.; Lohman, P. H.; Reedijk, J., *Biochemistry* **1985**, *24*, 707–713.
11. Fichtinger-Schepman, A. M. J.; van Oosterom, A. T.; Lohman, P. H.; Berends, F., *Cancer Research* **1987**, *47*, 3000–3004.
12. Reed, E.; Ostchega, Y.; Steinberg, S. M.; Yuspa, S. H.; Young, R. C.; Ozols, R. F.; Poirier, M. C., *Cancer Research* **1990**, *50*, 2256–2260.
13. Plooy, A. C.; Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Schutte, H. H.; van Dijk, M.; Lohman, P. H., *Carcinogenesis* **1985**, *6*, 561–566.
14. Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 14298–14302.
15. Arnesano, F.; Natile, G., *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 2070–2081.
16. Reedijk, J., *Platinum Metals Review* **2008**, *52*, 2–11.
17. Faggiani, R.; Lippert, B.; Lock, C.; Rosenberg, B., *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 777–781.
18. Faggiani, R.; Lippert, B.; Lock, C.; Rosenberg, B., *Inorganic Chemistry* **1977**, *16*, 1192–1196.
19. 米田誠治. 大阪薬科大学大学院薬学研究科修士論文. 1996.
20. Komeda, S.; Ohishi, H.; Yamane, H.; Harikawa, M.; Sakaguchi, K.-i.; Chikuma, M., *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1999**, 2959–2962.
21. Teletchéa, S.; Komeda, S.; Teuben, J. M.; Elizondo - Riojas, M. A.; Reedijk, J.; Kozelka, J., *Chemistry-A European Journal* **2006**, *12*, 3741–3753.
22. Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J., *Nature* **1995**, *377*, 649–652.

23. Komeda, S.; Lutz, M.; Spek, A. L.; Yamanaka, Y.; Sato, T.; Chikuma, M.; Reedijk, J., *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 4738–4746.
24. Komeda, S.; Lin, Y. L.; Chikuma, M., *ChemMedChem* **2011**, *6*, 987–990.
25. Komeda, S.; Takayama, H.; Suzuki, T.; Odani, A.; Yamori, T.; Chikuma, M., *Metallomics* **2013**, *5*, 461–468.
26. Stewart, D. J., *Critical reviews in oncology/hematology* **2007**, *63*, 12–31.
27. Martin, R. in *Platinum, Gold, and Other Metal Chemotherapeutic Agents: Chemistry and Biochemistry* (SJ Lippard, ed.), 1983; American Chemical Society, Washington, DC, ACS Symposium Series: 1983.
28. Arpalahti, J.; Klika, K. D.; Sillanpää, R.; Kivekäs, R., *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1998**, 1397–1402.
29. Viljanen, J.; Klika, K. D.; Sillanpää, R.; Arpalahti, J., *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 4924–4925.
30. Arpalahti, J.; Klika, K. D.; Molander, S., *European Journal of Inorganic Chemistry* **2000**, *2000*, 1007–1013.
31. Song, B.; Zhao, J.; Griesser, R.; Meiser, C.; Sigel, H.; Lippert, B., *Chemistry-A European Journal* **1999**, *5*, 2374–2387.
32. Knox, R. J.; Friedlos, F.; Lydall, D. A.; Roberts, J. J., *Cancer Research* **1986**, *46*, 1972–1979.
33. Jaganyi, D.; Hofmann, A.; van Eldik, R., *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 1680–1683.
34. Pascoe, J. M.; Roberts, J. J., *Biochemical Pharmacology* **1974**, *23*, 1345–1357.
35. Foka, M.; Paoletti, J., *Biochemical Pharmacology* **1986**, *35*, 3283–3291.
36. Bouayadi, K.; Calsou, P.; Pedrini, A.; Salles, B., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1992**, *189*, 111–118.
37. Arthanari, H.; Basu, S.; Kawano, T. L.; Bolton, P. H., *Nucleic Acids Research* **1998**, *26*, 3724–3728.
38. Mlcouskova, J.; Kasparkova, J.; Suchankova, T.; Komeda, S.; Brabec, V., *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *114*, 15–23.
39. Wood, D. O.; Dinsmore, M. J.; Bare, G. A.; Lee, J. S., *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 2244–2250.
40. Lee, J. S.; Latimer, L. J.; Reid, R. S., *Biochemistry and Cell Biology* **1993**, *71*, 162–168.
41. Alderden, R. A.; Hall, M. D.; Hambley, T. W., *Journal of Chemical Education* **2006**, *83*, 728.
42. Nakamoto, K.; Tsuboi, M.; Strahan, G. D., *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra*. in John Wiley & Sons: 2008; Vol. 51.
43. Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčíuk, D.; Vorlíčková, M., *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, 1713–1725.
44. Baase, W. A.; Johnson, W. C., *Nucleic Acids Research* **1979**, *6*, 797–814.
45. Ivanov, V.; Minchenkova, L.; Schyolkina, A.; Poletayev, A., *Biopolymers* **1973**, *12*, 89–110.
46. van Dam, L.; Korolev, N.; Nordenskiöld, L., *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 419–428.
47. van Dam, L.; Levitt, M. H., *Journal of Molecular Biology* **2000**, *304*, 541–561.
48. Fasman, G. D., *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Springer Science & Business Media: 2013.
49. Rill, R.; Van Holde, K., *Journal of Biological Chemistry* **1973**, *248*, 1080–1083.
50. Andersen, N. K.; Chandak, N.; Brulíková, L.; Kumar, P.; Jensen, M. D.; Jensen, F.; Sharma, P. K.; Nielsen, P.,

Bioorganic & Medicinal Chemistry **2010**, *18*, 4702–4710.

51. Segers-Nolten, G.; Sijtsema, N.; Otto, C., *Biochemistry* **1997**, *36*, 13241–13247.
52. Malinge, J.-M.; Pérez, C.; Leng, M., *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*, 3834–3839.
53. Poklar, N. a.; Pilch, D. S.; Lippard, S. J.; Redding, E. A.; Dunham, S. U.; Breslauer, K. J., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 7606–7611.
54. Todd, R. C.; Lippard, S. J., *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, *104*, 902–908.
55. Yang, D.; van Boom, S. S.; Reedijk, J.; van Boom, J. H.; Farrell, N.; Wang, A. H.-J., *Nature Structural & Molecular Biology* **1995**, *2*, 577–586.
56. Vichi, P.; Coin, F.; Renaud, J. P.; Vermeulen, W.; Hoeijmakers, J.; Moras, D.; Egly, J. M., *The EMBO Journal* **1997**, *16*, 7444–7456.
57. Yoshikawa, K.; Yoshikawa, Y.; Mahato, R.; Kim, S., *Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid-based Therapeutics*. in Taylor and Francis, London: 2002.
58. Liu, Z.; Tan, S.; Zu, Y.; Fu, Y.; Meng, R.; Xing, Z., *Micron* **2010**, *41*, 833–839.
59. Katsuda, Y.; Yoshikawa, Y.; Sato, T.; Saito, Y.; Chikuma, M.; Suzuki, M.; Yoshikawa, K., *Chemical Physics Letters* **2009**, *473*, 155–159.
60. Gosule, L. C.; Schellman, J. A., *Nature* **1976**, *259*, 333–335.
61. Widom, J.; Baldwin, R. L., *Journal of Molecular Biology* **1980**, *144*, 431–453.
62. Takahashi, M.; Yoshikawa, K.; Vasilevskaya, V.; Khokhlov, A., *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 9396–9401.
63. Yoshikawa, K.; Yoshikawa, Y.; Kanbe, T., *Chemical Physics Letters* **2002**, *354*, 354–359.
64. Bloomfield, V. A., *Current Opinion in Structural Biology* **1996**, *6*, 334–341.
65. Chattoraj, D. K.; Gosule, L. C.; Schellman, J. A., *Journal of Molecular Biology* **1978**, *121*, 327–337.
66. Hud, N. V.; Vilfan, I. D., *Annual Review Biophysics and Biomolecular Structure* **2005**, *34*, 295–318.
67. Yoshikawa, K.; Kidoaki, S.; Takahashi, M.; Vasilevskaya, V.; Khokhlov, A., *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie* **1996**, *100*, 876–880.
68. Yoshikawa, Y.; Yoshikawa, K.; Kanbe, T., *Langmuir* **1999**, *15*, 4085–4088.
69. Ma, C.; Bloomfield, V. A., *Biophysical Journal* **1994**, *67*, 1678–1681.
70. Yoshikawa, Y.; Yoshikawa, K., *FEBS Letters* **1995**, *361*, 277–281.
71. Yoshikawa, K.; Hirota, S.; Makita, N.; Yoshikawa, Y., *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2010**, *1*, 1763–1766.
72. Komeda, S.; Lutz, M.; Spek, A. L.; Chikuma, M.; Reedijk, J., *Inorganic Chemistry* **2000**, *39*, 4230–4236.
73. Kartalou, M.; Essigmann, J. M., *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2001**, *478*, 23–43.
74. Richon, V. M.; Schulte, N.; Eastman, A., *Cancer Research* **1987**, *47*, 2056–2061.
75. Hromas, R. A.; North, J. A.; Burns, C. P., *Cancer Letters* **1987**, *36*, 197–201.
76. Gabano, E.; Colangelo, D.; Ghezzi, A. R.; Osella, D., *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, *102*,

629–635.

77. Gately, D.; Howell, S., *British Journal of Cancer* **1993**, *67*, 1171–1176.
78. Hall, M. D.; Okabe, M.; Shen, D.-W.; Liang, X.-J.; Gottesman, M. M., *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2008**, *48*, 495–535.
79. Marqués-Gallego, P.; Kalayda, G. V.; Jaehde, U.; den Dulk, H.; Brouwer, J.; Reedijk, J., *Journal of Inorganic Biochemistry* **2009**, *103*, 791–796.
80. Ohmori, T.; Morikage, T.; Sugimoto, Y.; Fujiwara, Y.; Kasahara, K.; Nishio, K.; Ohta, S.; Sasaki, Y.; Takahashi, T.; Saijo, N., *Cancer Science* **1993**, *84*, 83–92.
81. Screnci, D.; McKeage, M.; Galettis, P.; Hambley, T.; Palmer, B.; Baguley, B., *British Journal of Cancer* **2000**, *82*, 966–972.
82. Ang, W. H.; Pilet, S.; Scopelliti, R.; Bussy, F.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J., *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 8060–8069.
83. Harris, A. L.; Yang, X.; Hegmans, A.; Povirk, L.; Ryan, J. J.; Kelland, L.; Farrell, N. P., *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 9598–9600.