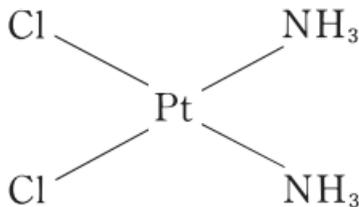
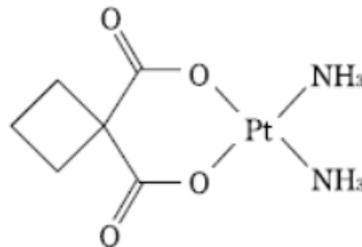


背景

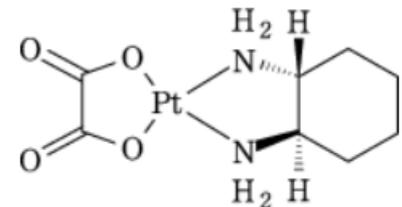
- 現在、抗がん剤として臨床使用されている金属錯体は白金錯体のみである。
- 白金錯体抗がん剤は腎障害、聴力障害、骨髄抑制、末梢神経障害などの重篤な副作用が多く、用量制限毒性が設定されている¹⁾。
- 副作用が少なく、がん細胞選択的に作用する非白金金属錯体抗がん剤の開発が活発に行われており、既に銀錯体を始めとするRu, Au, Cu, Gaなどから構成される金属錯体の抗腫瘍効果が検討されている²⁾。



シスプラチン



カルボプラチン



オキサリプラチン

1) R. Oun, et al., The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists, Dalton Trans. 47(19) (2018) 6645–6653.

2) U. Ndagi, et al., Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective, Drug Des. Dev. Ther. 11 (2017) 599–616.

- 銀の抗菌作用は以前より知られており医薬品・医療機器や日用品に使用されている。



スルファジアジン銀クリーム

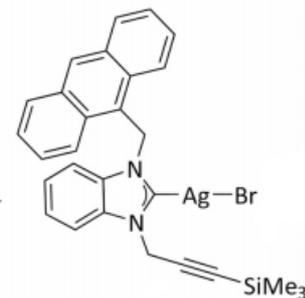
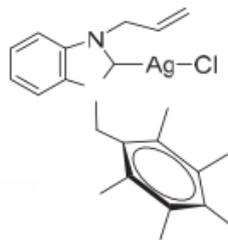
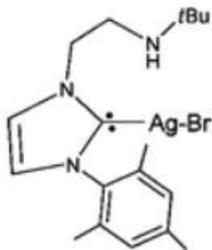


銀コーティング抗菌
泌尿器用カテーテル



銀含有制汗剤

- 銀は遷移金属のなかでも毒性が少なく、抗腫瘍効果がいくつかの銀錯体で報告されていることから注目が集まっている³⁻⁵⁾。



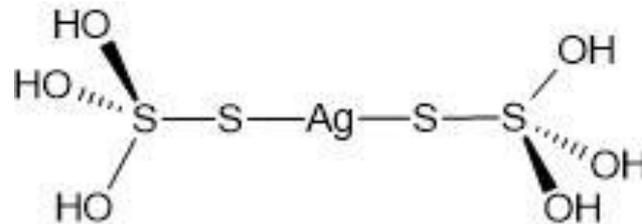
3) Wang CH et al., Preparation and characterization of amino-linked heterocyclic carbene palladium, gold, and silver complexes and their use as anticancer agents that act by triggering apoptotic cell death. *J Med Chem.* 54(14):5245-5249.

4) N. Şahin, et al., Synthesis, characterization and anticancer activity of allyl substituted N-Heterocyclic carbene silver(I) complexes, *J. Mol. Struct.* 1179 (2019) 92–99.

5) F. Guarra, et al., Cytotoxic Ag(I) and Au(I) NHC-carbenes bind DNA and show TrxR inhibition, *J. Inorg. Biochem.* 205 (2020).

目的

抗腫瘍効果が認められた銀錯体において配位子が異なっていたことから、銀自体が抗腫瘍効果を有すると考えた。また、白金が錯体になることで細胞に取り込まれやすくなって抗腫瘍効果を示すと同様に、銀イオン自体は膜透過できないため、銀錯体を合成することで抗腫瘍効果を発揮すると考えた。チオ硫酸銀錯体(Silver thiosulfate :STS)は配位子としてシアン化合物の解毒に用いられるチオ硫酸ナトリウム(sodium thiosulfate)が用いられており、副作用の少ないがん細胞選択的な抗腫瘍効果を表すと考えた。そこで本研究では、チオ硫酸銀錯体(silver thiosulfate; STS)を用いて、その抗腫瘍効果の有無と作用機序をin vitroにおいて検討した。



チオ硫酸銀

Silver thiosulfate (STS)

研究内容

ヒトがん細胞株、正常ヒト細胞を用いて以下のin vitro実験を行った。

- 細胞生存試験
- 細胞周期解析
- 死細胞率測定
- 活性酸素種(Reactive Oxygen Species :ROS)の測定
- 細胞内グルタチオン(Glutathione : GSH)の測定

使用した細胞

がん細胞株

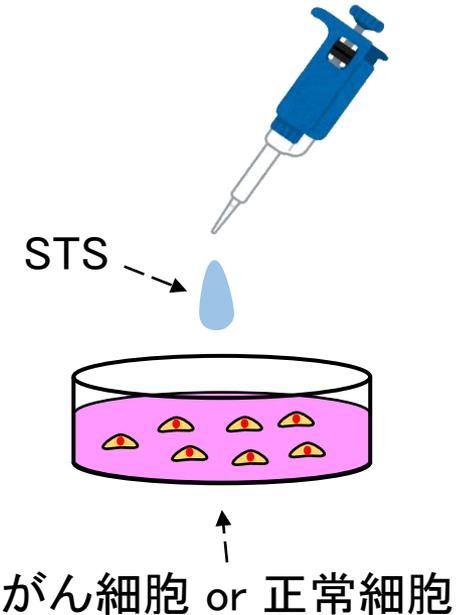
K562 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞)

MCF-7 (ヒト乳癌細胞)

正常細胞

HMSC (正常ヒト骨髄間葉系幹細胞)

HMEC (正常ヒト乳腺上皮細胞)

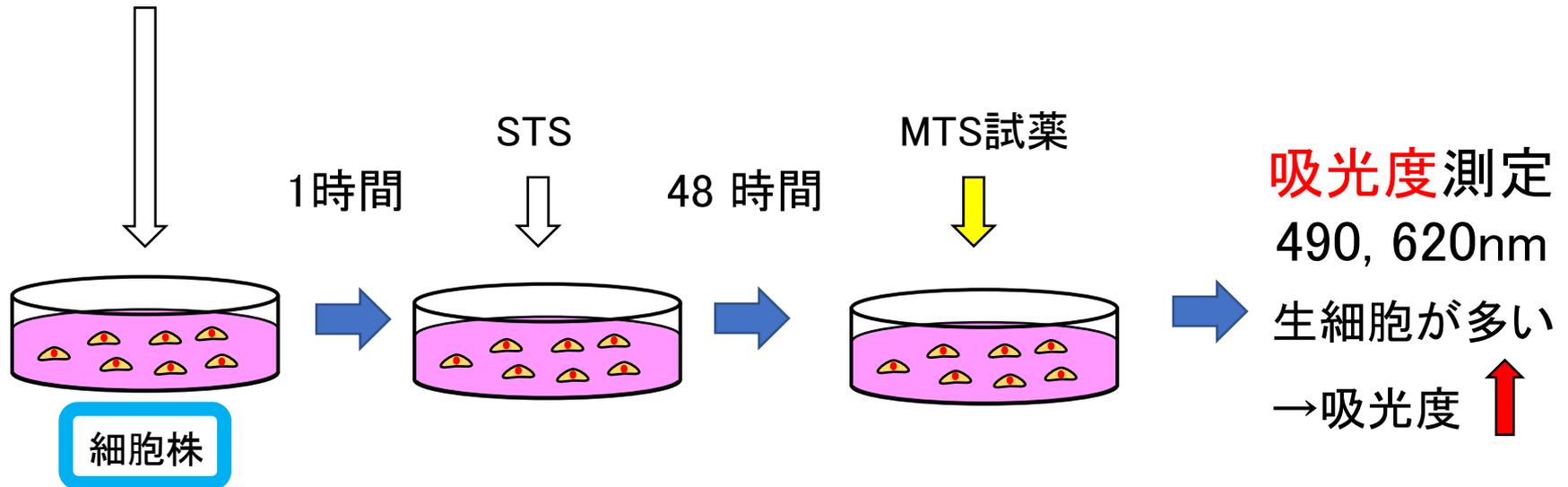


細胞生存試験 (MTS assay)

アポトーシス阻害剤 (Z-VAD)

フェロトーシス阻害剤 (Ferrostatin-1)

活性酸素除去剤 (N-acetylcysteine :NAC)

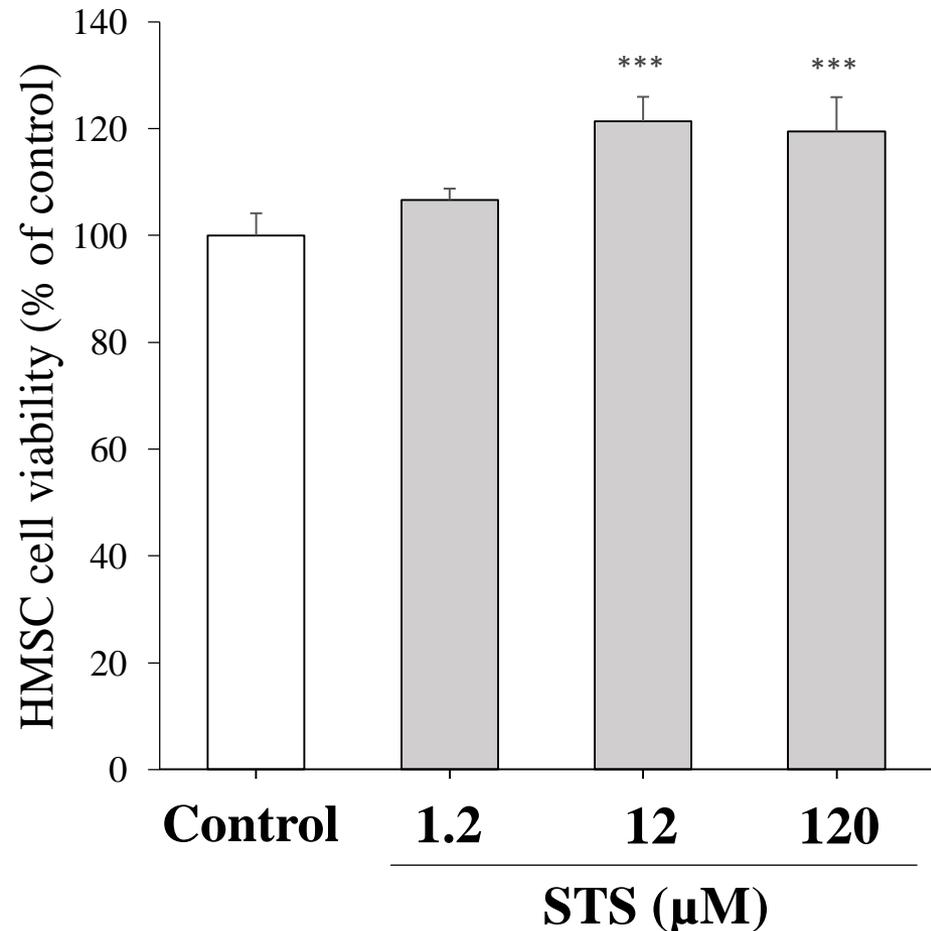
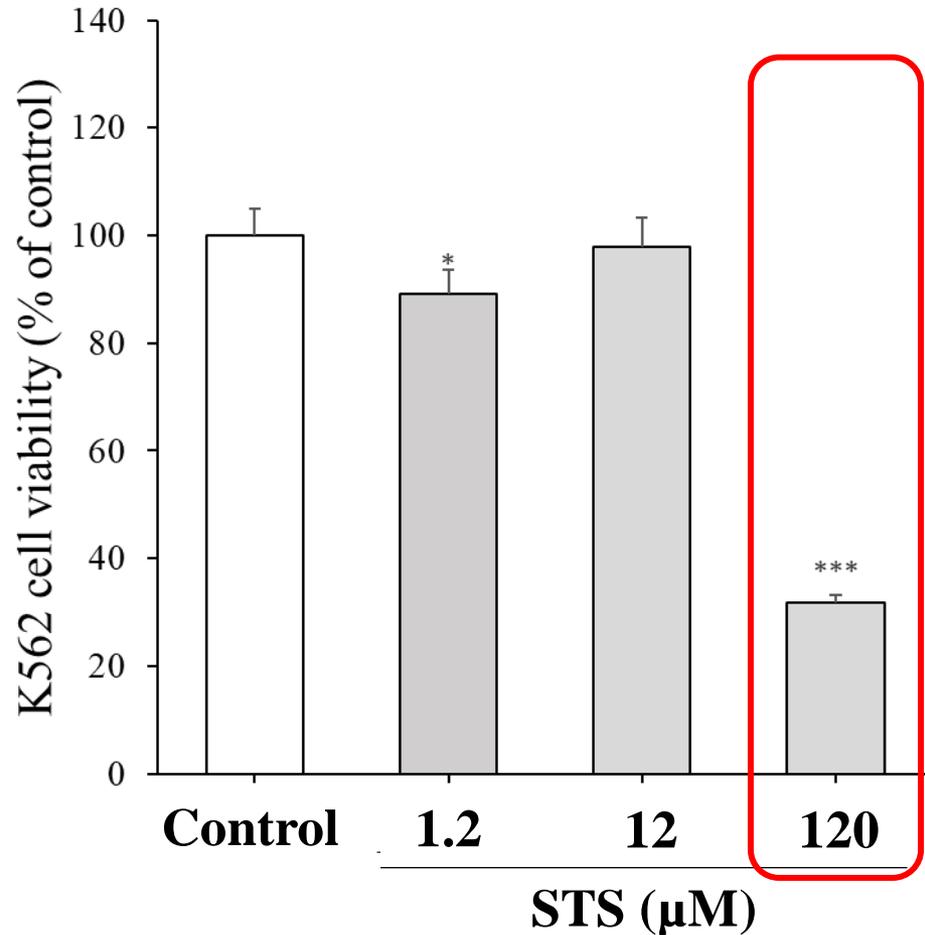


MTS: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]

STSのがん細胞選択的な細胞毒性

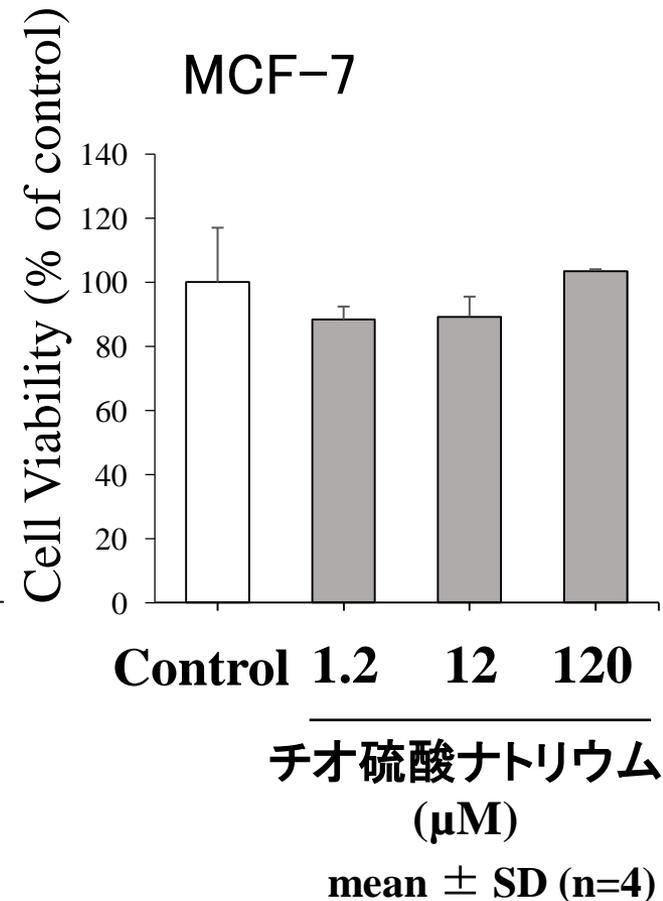
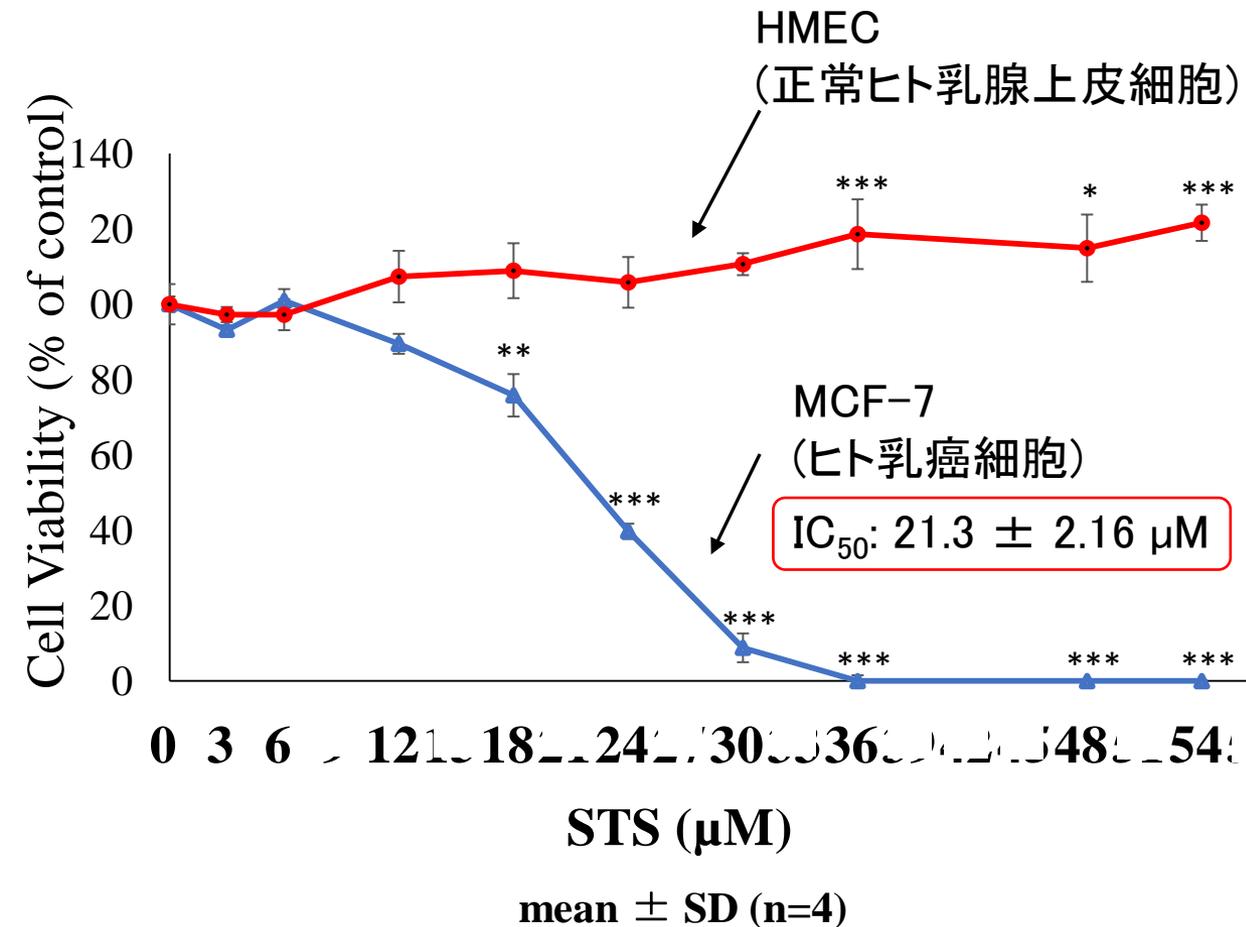
K562 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞)

HMSC (正常ヒト骨髄間葉系幹細胞)



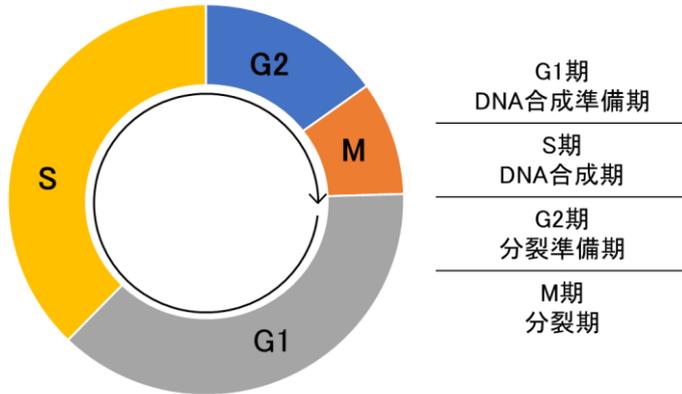
Mean \pm SD (n=4) *p < 0.05, **p < 0.01, or ***p < 0.001 vs. the control group or the no treatment group.

STSのがん細胞選択的な細胞毒性



細胞周期解析および死細胞の検出

細胞周期解析



STS (12, 24 μM)で24時間処理した後、細胞を回収し70%エタノールで固定、ヨウ化プロピジウムで染色した。



フローサイトメーター(S3e™ Cell Sorter)にて細胞数 1×10^4 個以上を測定し各細胞周期の割合(%)を算出した。

死細胞測定

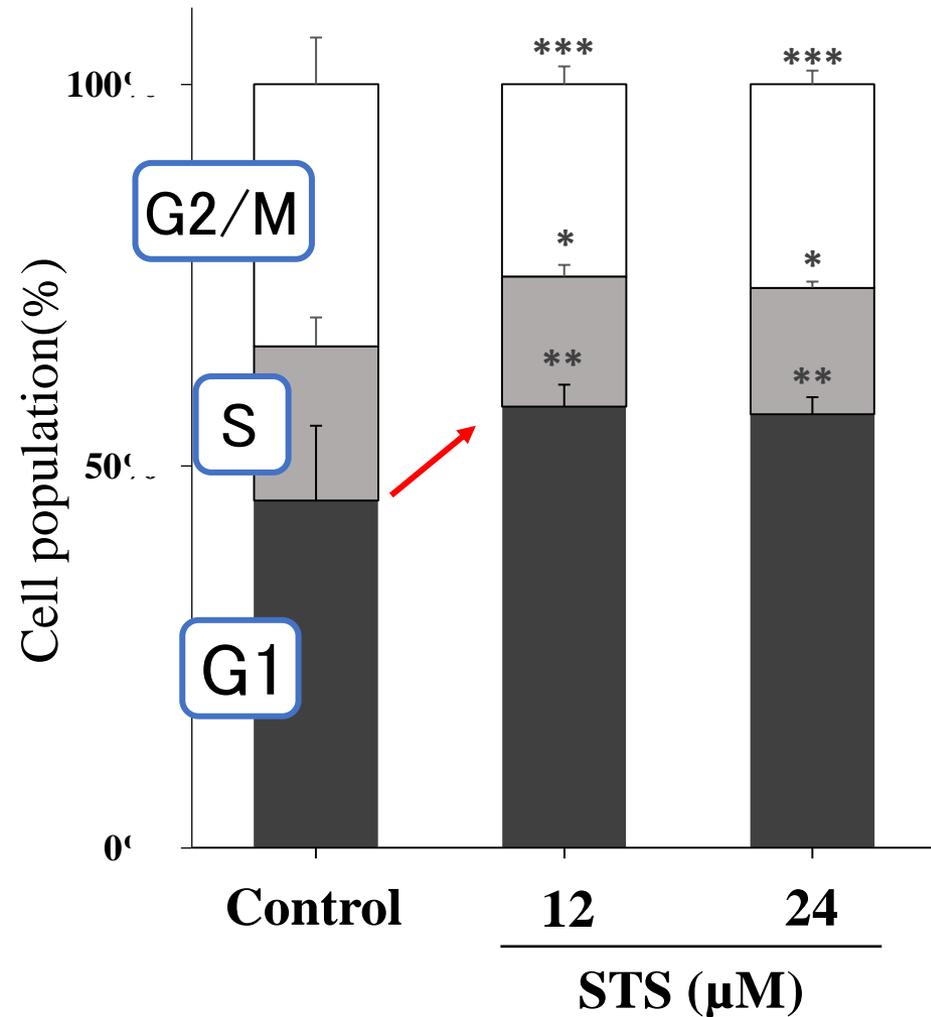
STS (12, 24 μM)で30分処理した後、ヨウ化プロピジウムで染色した。



フローサイトメーター(MoFlo Astrios EQ)にて細胞数 1×10^4 個以上を測定し死細胞率を算出した。

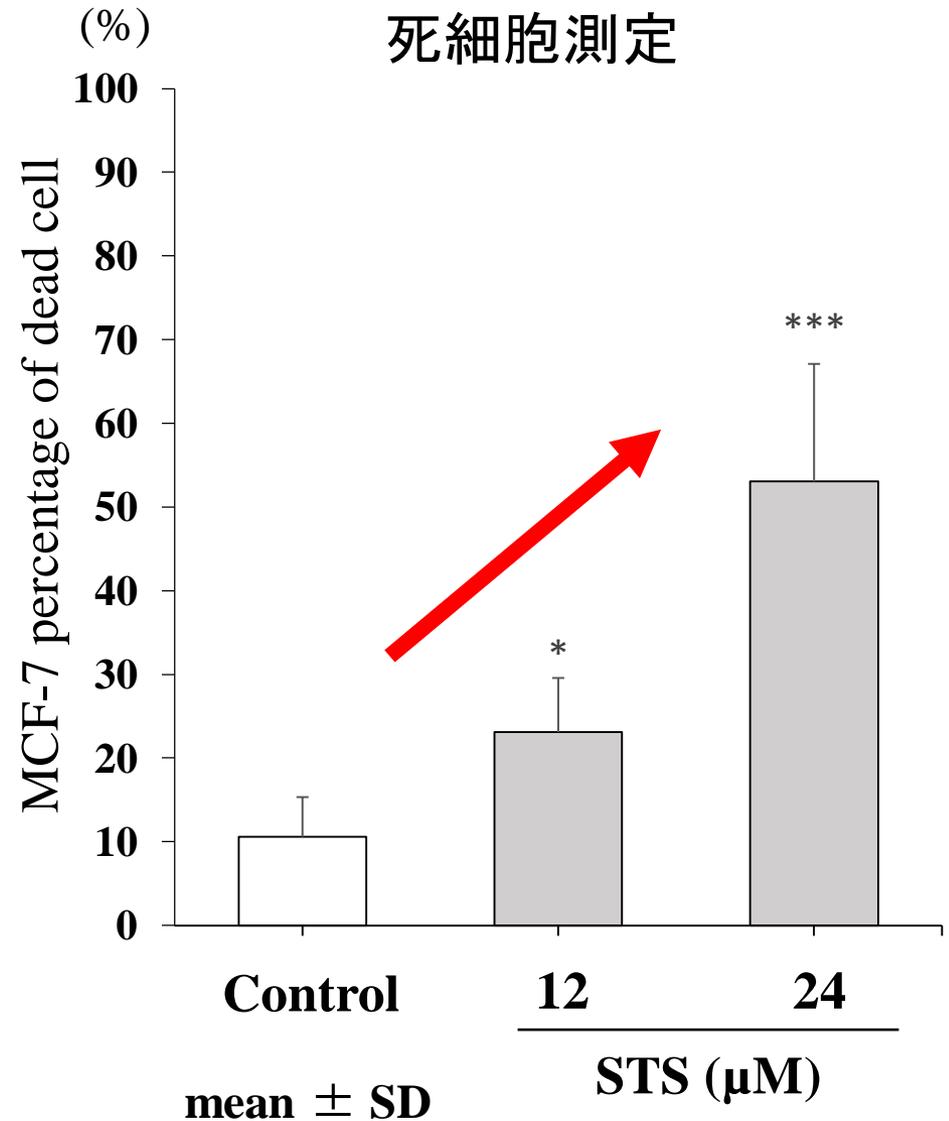
細胞周期解析および死細胞測定

細胞周期解析



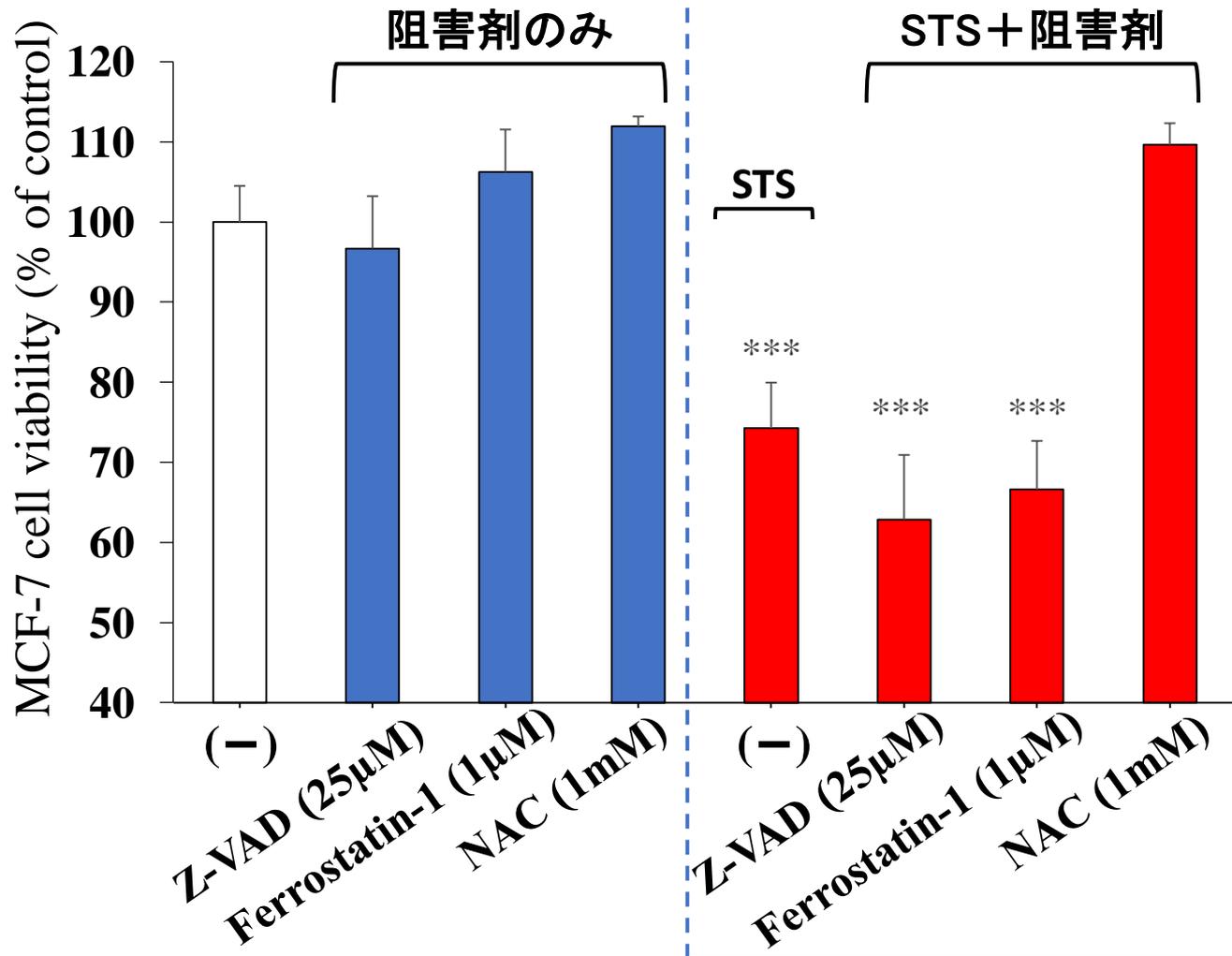
mean ± SD (n=9)

死細胞測定



No treatment :n=9, STS 12 μM :n=6, STS 24 μM :n=6

N-acetyl cysteine (NAC)による細胞死の抑制



Z-VAD: アポトーシス阻害剤

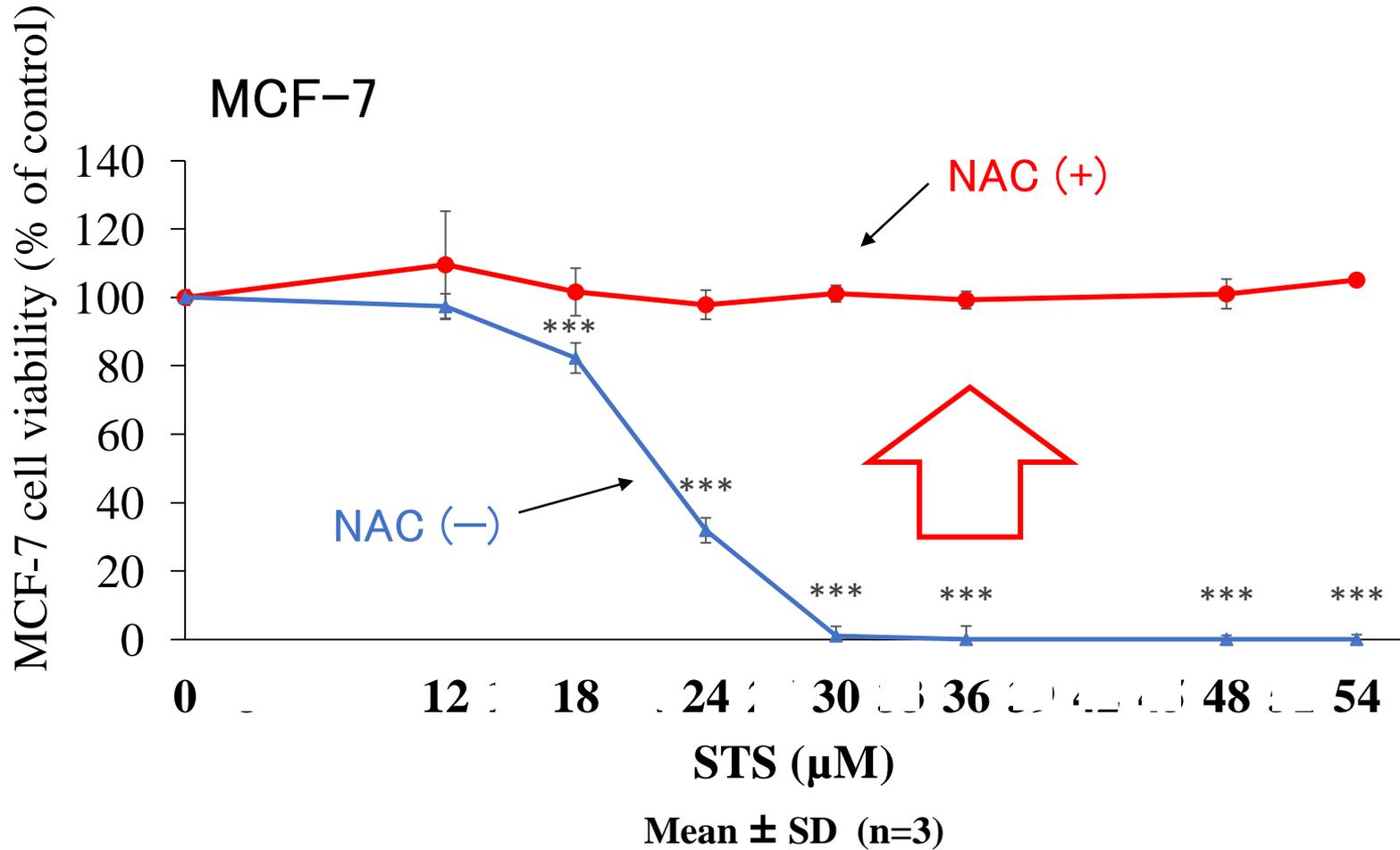
Ferrostatin-1: フェロトーシス阻害剤

N-acetyl cysteine (NAC): 抗酸化物質

+ STS (24 μM)

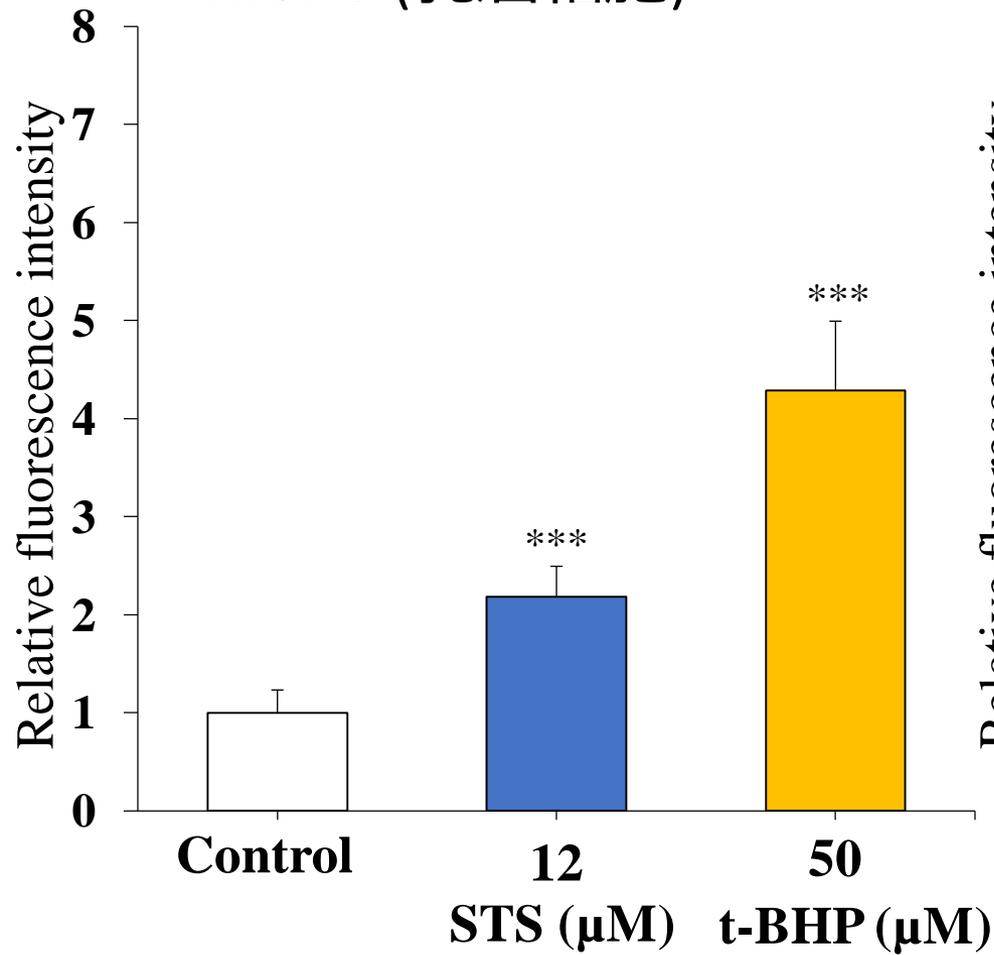
Mean ± SD (n=4)

NAC存在下でのSTSの 細胞傷害性の変化



がん細胞選択的な細胞内ROSの上昇

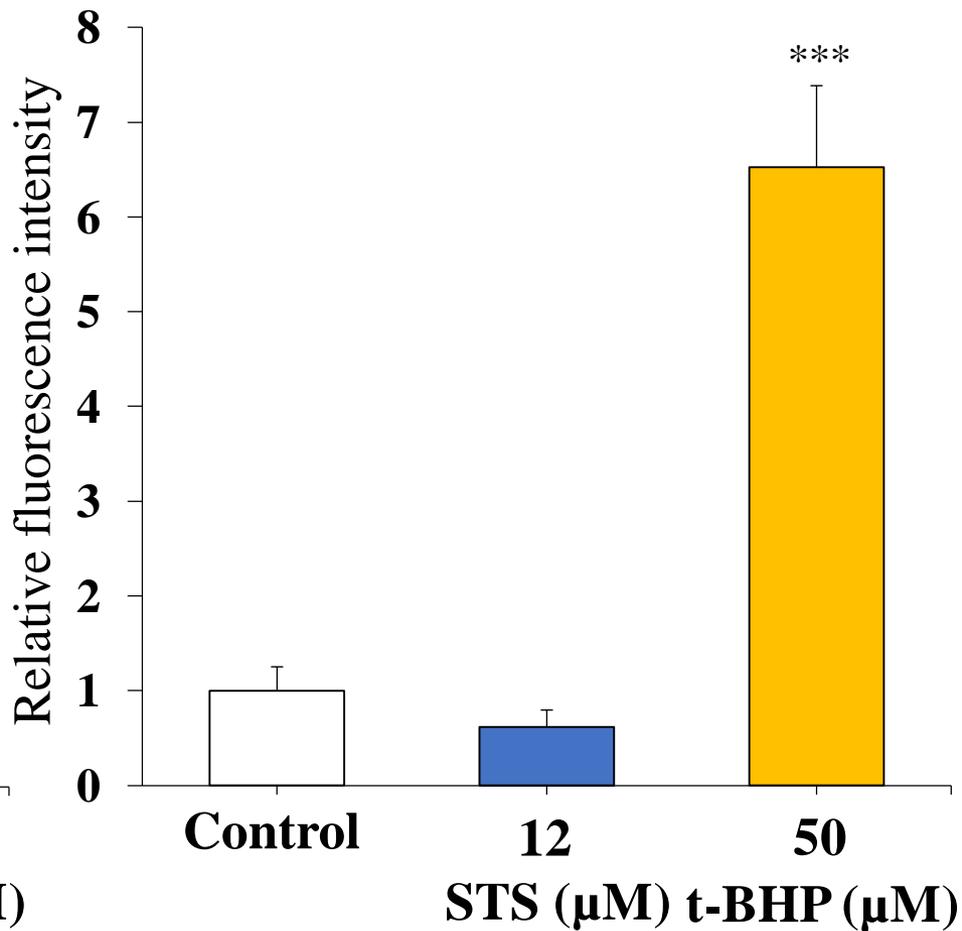
MCF-7 (乳癌細胞)



Mean ± SD

(control: n=9, STS: n=4, tBHP: n=3)

HMEC (正常ヒト乳腺上皮細胞)

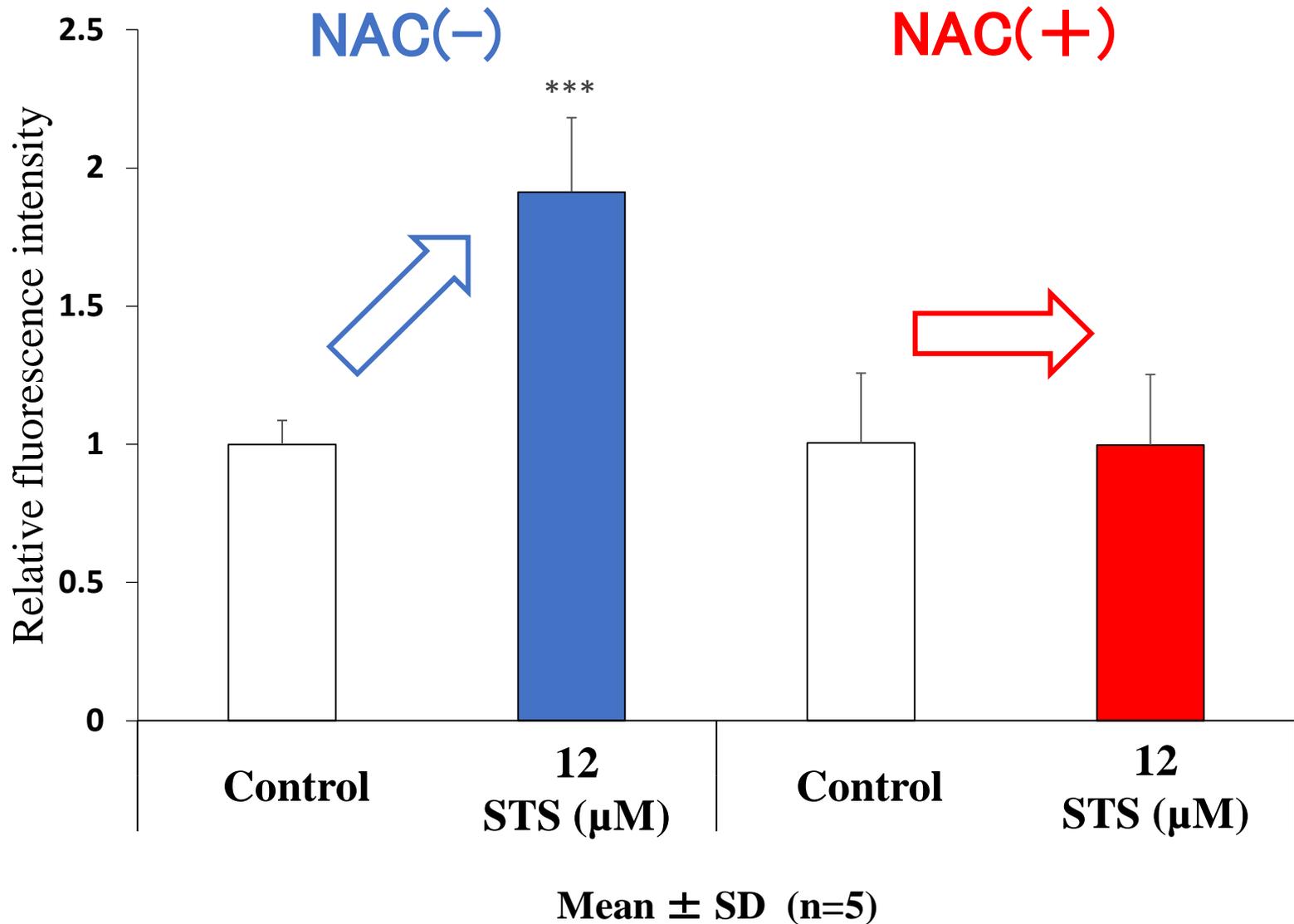


Mean ± SD

(control: n=10, STS: n=6, tBHP: n=3)

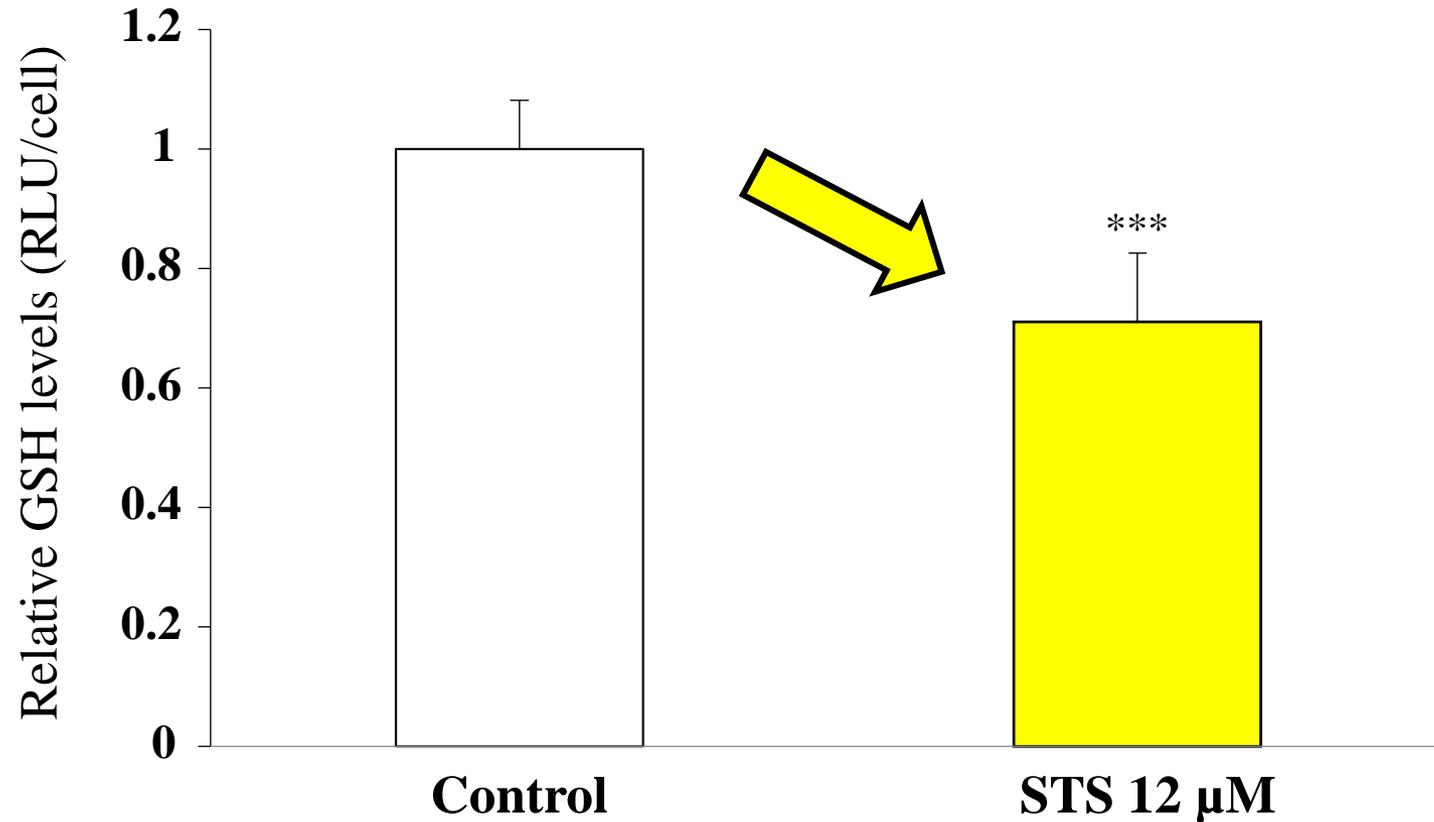
NAC存在下での細胞内ROSの変化

MCF-7 (ヒト乳癌細胞)



細胞内GSH量の変化

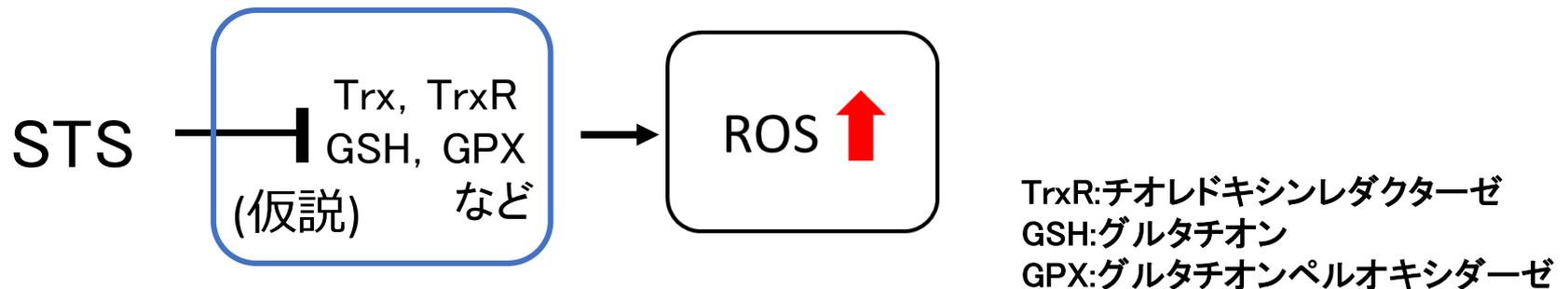
MCF-7 (ヒト乳癌細胞)



Mean \pm SD (n=4)

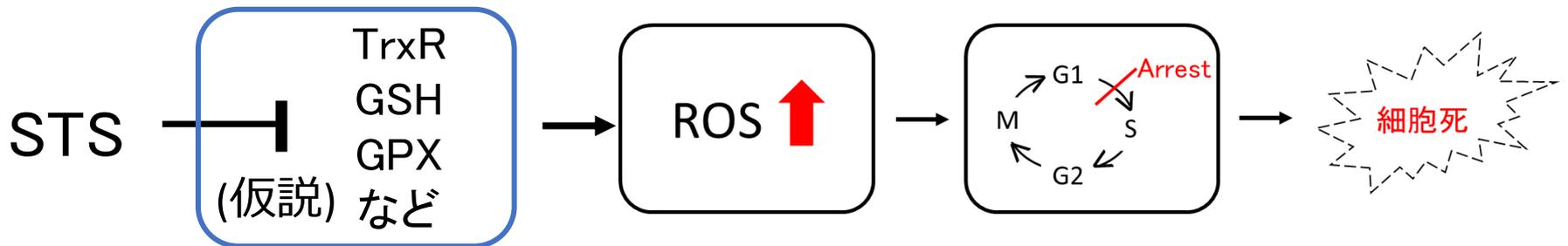
考察 (1)

- 正常骨髄間葉系幹細胞に対して細胞傷害性がみられなかったことからSTSは骨髄抑制が起こりにくいと考えられた。
- STSは濃度依存的に細胞死を誘導した。その細胞死は細胞内のROSの蓄積によることが明らかとなった。これは細胞内のGSHの減少によるものと考えられた。STSは抗酸化能を阻害させることで細胞内ROSの蓄積を引き起こしている可能性が考えられた。



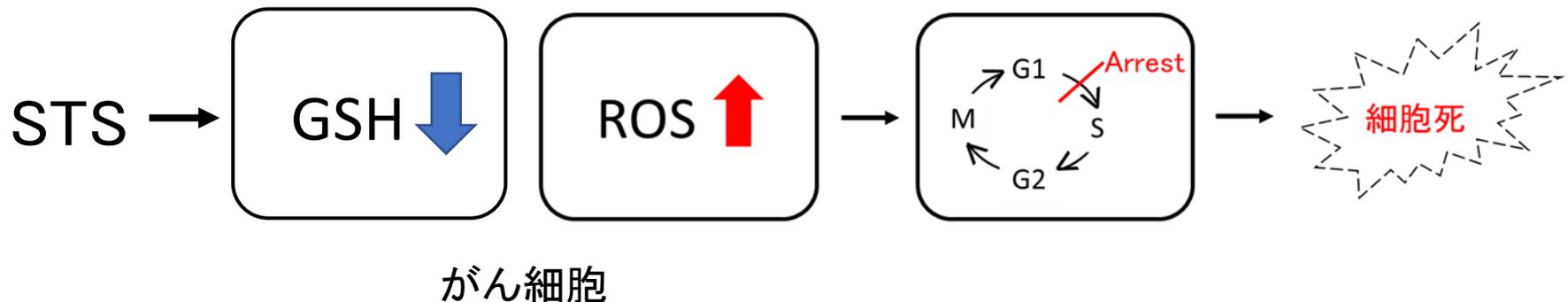
考察 (2)

- STSはMCF-7の細胞周期をG1期で停止させていた。NAC存在下において細胞内ROSの蓄積が抑制されてSTSの細胞傷害性が打ち消され、細胞が増殖できるように回復した。この細胞周期の停止も細胞死もROSの蓄積によるものと示唆された。



結論

- 銀錯体であるSTSのがん細胞に対する抗腫瘍効果を初めて見出した。
- STSは、がん細胞選択的に細胞内のROSを蓄積させ抗腫瘍効果を示すと考えられ、新規抗がん剤として有望であると示唆された。
- 今後はin vivoでの抗腫瘍効果や安全性を検討する必要がある。

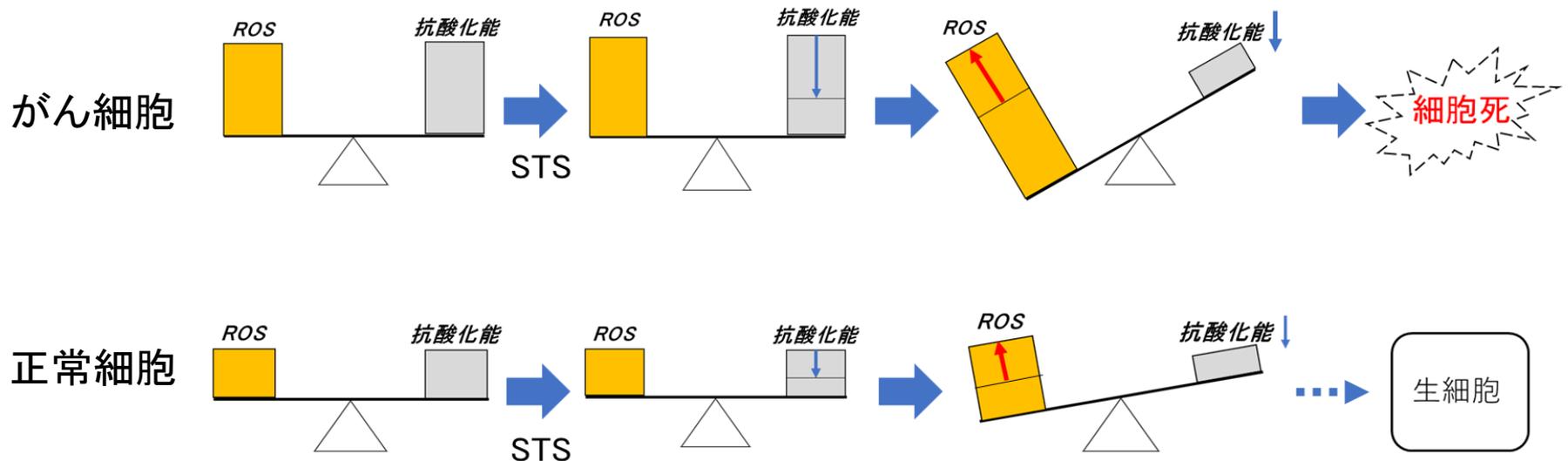


抗腫瘍効果がみられたがん細胞株

- HL60 (ヒト前骨髄性白血病)
- HepG2 (ヒト肝細胞癌)
- PC-3 (ヒト前立腺癌)
- BT-549 (トリプルネガティブ乳がん)
- HCC1937 (トリプルネガティブ乳がん)

考察 (3)

- STSはがん細胞選択的に細胞傷害性をあらわすことが示された。一般にがん化過程においてROSの上昇と、それに伴う抗酸化能の上昇がみられる。そして、抗酸化能が阻害された場合、がん細胞の方が產生されるROSを除去できず、酸化還元バランスの崩壊が起きやすくなり、がん細胞選択的に細胞死が誘導されるという報告がある⁶⁾。STSも同様の現象が起きているのではないかと考えられる。



6) D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, Nat. Rev. Drug Discov. 8(7) (2009) 579–591.