

コラーゲンの線維形成を調節するプラチナ錯体に関する研究

早稲田大学理工学術院

小 出 隆 規

Excessive deposition of collagen fibers in tissues causes various fibrotic diseases. Inhibition of the collagen fibril-formation is thus regarded as a promising mechanism for the development of antifibrotic drugs. A cisplatin-DMSO complex, which was obtained as a potential inhibitor of the *in vitro* collagen fibril-formation, was revealed to interact with specific sites on the collagen triple helix. Collagen fibril-deposition in a cell culture system was inhibited by the treatment with the cisplatin-DMSO complex. The cisplatin-DMSO complex was revealed to be less toxic to cultured cells than cisplatin.

1. 緒 言

コラーゲンは生体内で最も多量に存在する、3重らせん構造を持つ細胞外マトリックスタンパク質である。コラーゲンには28種類の異なる型が存在し、高次構造により複数のサブファミリーに分類される。その中でも全コラーゲンの9割を占めるI型コラーゲンに代表される、線維形成型コラーゲンに着目する。線維形成コラーゲンの3重らせん分子は、長軸方向に約4分の1ずつずれながら自己集合し、細線維を形成する。細線維はさらに集合してコラーゲン線維を形成する。コラーゲンの規則正しい自己集合において、コラーゲン分子が全て同じ方向を向いていること、コラーゲンのNおよびC末端に存在する非3重らせん領域(テロペプチド)のアミノ酸配列の重要性などが報告されているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない¹⁻⁴⁾。

コラーゲン線維は組織や臓器の強度を維持するだけでなく、細胞の接着・移動・分化などの制御など生体維持にも重要な機能を発揮している。しかし、コラーゲン線維が過剰に生成されると、肝硬変、肺線維症、強皮症などの線維化疾患を引き起こす。これまでに、コラーゲンの線維形成を阻害する戦略として、(1)コラーゲンの生成を促進する因子を阻害する⁵⁻⁷⁾、(2)コラーゲンの合成を阻害する⁸⁾、(3)コラーゲン分子間のクロスリンクを阻害する⁹⁾など、いくつかのメカニズムが提示されている。本研究では、コラーゲン分子に直接働いてその細線維形成を阻害する方法に着目した。

これまでに、コラーゲンの分子間の自己集合を阻害する物質として、II型コラーゲンに対する抗体が報告されてい

る。この抗体は*in vitro*でII型コラーゲンの細線維形成を阻害するが、I型コラーゲンに対する阻害能は有していなかった¹⁰⁾。また、テロペプチドのアミノ酸配列を模した合成ペプチドもコラーゲン細線維形成を阻害することが報告されている。この実験では、I型コラーゲンのC末端のテロペプチドを模したペプチドがI型コラーゲンの細線維形成を阻害することが示されている^{1,4)}。

本研究の目的は、低分子量のコラーゲン細線維形成阻害物質を探索し、得られた化合物を線維化疾患治療薬のリードとして応用することである。我々は、以前報告したハイスループットスクリーニングシステム¹¹⁾を用いて探索を行い、コラーゲンの細線維形成を阻害する化合物として、抗がん剤である、cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin)を見出した。しかし、コラーゲン細線維形成阻害効果を有しているのは、cisplatinそのものではなく、溶媒であるジメチルスルフォキシド(DMSO)と反応して生成したcisplatin誘導体であることが示唆された。

本報告では、cisplatin誘導体のコラーゲン細線維形成阻害効果の解析、cisplatin誘導体とコラーゲン間の相互作用、他のプラチナ系抗がん剤を用いた構造活性相関、cisplatin誘導体の活性本体の推定、および培養細胞系を用いた検討についてその結果を述べる。なお、以下ではcisplatinとDMSOを混合して生じた活性物をcisplatin (DMSO)と表記する。

2. 実 験

2.1 コラーゲン細線維の走査型電子顕微鏡(SEM)観察

I型コラーゲン溶液20 μ lをカバーガラスにコートし、自然乾燥させた。コラーゲンをコートしたカバーガラスを、buffer (20mM sodium phosphate (pH 7.4)、100mM NaCl、10 μ M cisplatin (DMSO)) 2mlに入れて、37℃で2時間インキュベートした。室温で2%グルタルアルデヒド水溶液にて1時間固定した後に、濃度の異なるエタノールで段階的に脱水した。次にt-ブタノール溶液にて置換し、凍結乾燥した。白金を約3 nm蒸着した後にSEM(HITACHI



A platinum complex that inhibits the collagen fibril-formation

Takaki Koide

Faculty of Science and Engineering,
Waseda University

S-3000N) 装置を用いて加速電圧15kVにて観察した。

2.2 コラーゲン細線維化阻害アッセイ

アッセイは、Okano-Kosugiらの論文に従って実施した¹¹⁾。吸光度測定にはGreiner 384 well UV-star plateを用いた。プレート上で、コラーゲン溶液を含む反応溶液の調製を行い、プレートリーダーを用いて、37℃で2.5時間、5分ごとに313nmにおける吸光度を測定した。

細線維化阻害能評価は、コラーゲンのみの場合の最終測定点(145分)における313nmの吸光度の値を線維形成100%とし、サンプル存在下での吸光度を線維形成(%)で表すことにより評価した。

$$\text{線維形成 (\%)} = A \times 100 / \Delta$$

(A: サンプル存在下の吸光度変化、 Δ : コラーゲンのみの吸光度変化)

特に記述がない場合、濃度はすべて仕込み終濃度とした。

2.3 ペプチド合成

ペプチド鎖の合成は、Rink amide resinを担体として通常のFmoc固相法により行った。ペプチドの脱保護及び固相担体からの切り出しは、水: *m*-クレゾール: チオアニソール: エタンジチオール: TFA (2: 2: 2: 1: 33, v/v, 5 ml) 中で1時間(Argがペプチド鎖に含まれている場合は4時間) 振とうすることにより行った。ペプチドの精製および純度の確認は逆相HPLCを用い行い、MALDI-TOF型質量分析により目的物であることを確認した。

2.4 細胞が分泌したコラーゲンの共焦点顕微鏡観察

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をEGM-2培地を用いてガラスベースディッシュ上でコンフルエントになるまで培養を行った後に、100 μ M cisplatin (DMSO)、0.1% DMSO、0.2mM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物となるようにサンプルを加え、37℃で3日間培養した(毎日培地交換とサンプルの添加を行った)。この際、cisplatin (DMSO) なしで0.1% DMSO、0.2mM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物のみを加えたものをコントロールとした。培養後、PBS(+) (1.0mM CaCl₂、0.5mM MgCl₂) で細胞を洗浄し、4%ホルムアルデヒド/PBSにて4℃で15分間固定した。PBS(+) で洗浄した後に10% FBS、5% スキムミルク/PBSにて室温で30分間ブロッキング処理を行った。PBS(+) で洗浄後、1/100 anti-collagen type I, rabbit polyclonal antibody/10% FBS、5% BSA/PBSを添加し、室温で1時間静置した。PBS(+) で洗浄後、1/20 FITC-goat anti-rabbit IgG antibody/10% FBS、5% BSA/PBSを添加し室温で1時間静置した。PBS(+) で洗浄後、共焦点顕微鏡にて観察を行った。

2.5 HUVECのタンパク質産生におけるcisplatin (DMSO) の影響(Western Blotting)

HUVECをEGM-2培地中100 μ M cisplatin (DMSO)、0.1% DMSO、0.2mM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物となるようにサンプルを加え、37℃で3日間培養した(毎日培地交換とサンプルの添加を行い、回収した培地は4℃で保存した)。この際、cisplatin (DMSO) なしで0.1% DMSO、0.2mM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物のみとなるようにサンプルを加えたものをコントロールとして作製した。インキュベート後、PBSで細胞を洗浄し、抽出バッファー(50mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、5.0mM EDTA、1% NP-40、2.0mM *N*-ethymaleimide、2.0mM 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride、1 μ g/ml leupeptin、1 μ g/ml pepstatin) を1ml加えて4℃で15分間放置した。細胞を剥離回収し、1.5ml tubeに溶液を移して遠心分離を行い(13,000 min⁻¹、4℃、15分間)、上清(コントロール、cisplatin (DMSO) 添加サンプル共に1.45ml) と沈殿に分けた。以下、(i)上清、(ii)沈殿、(iii)保存していた培地のSDS-PAGEのサンプル作製法を示す。

(i)上清: 上清の全量(1.45ml)に2% デオキシコール酸ナトリウム10.3 μ l、100% トリクロロ酢酸124.7 μ lを加えて、4℃で30分間放置した後に遠心分離(13,000 min⁻¹、4℃、5分間)を行い上清と沈殿に分けた。沈殿をアセトンで3回洗浄した後に、デシケーターで乾燥させた。乾燥した沈殿を145 μ lの1 $\times$ SDS-サンプルバッファーに溶解し、SDS-サンプルとした。

(ii)沈殿: 沈殿を145 μ lの1 $\times$ SDS-サンプルbufferに溶解し、SDS-サンプルとした。

(iii)培地: 回収した培地10mlに2% デオキシコール酸ナトリウム71 μ l、100% トリクロロ酢酸860 μ lを加えて、4℃で30分間放置した後に遠心分離(13,000 min⁻¹、4℃、5分間)を行い上清と沈殿に分けた。沈殿をアセトンで3回洗浄した後に、乾燥させた。乾燥した沈殿を500 μ lの1 $\times$ SDS-サンプルバッファーに溶解し、電気泳動用サンプルとした。

(i)、(ii)、(iii)で作成したSDS-サンプルを5%ゲルにて電気泳動し、PVDFに3時間トランスファーを行った。トランスファー後、メンブレンを5% スキムミルク/TBSに浸け、終夜4℃でブロッキングを行った。メンブレンをTBS-T (1% Tween 20) で洗浄した後に、1/1000 anti-collagen type I, rabbit polyclonal antibody/1% スキムミルク/TBSを5mlメンブレンに乗せて室温で50分間静置した。TBS-Tで洗浄した後に、1/2000 goat anti-rabbit IgG-AP antibody/1% スキムミルク/TBSを5mlメンブレンに乗せて室温で30分間静置した。TBS-Tで洗浄した後に、alkaline phosphatase conjugate kit (BIO RAD) を

用いて、バンドを可視化した。

2.6 Cisplatin (DMSO) の細胞毒性の検討

HeLa細胞を96穴マイクロプレートに無血清培地 HFDM-1を用いて100 μ lずつ播種し(3000 cells/well)、37℃で24時間培養した。培地を新しいものに交換した後に、各濃度のcisplatin (DMSO) (あるいはcisplatin (saline))、1% DMSO (salineに溶解したサンプルの場合は0% DMSO) となるようにサンプルを加え、37℃で48時間培養した。その後、cell counting kit-8を10 μ l加え37℃で1時間インキュベートして生細胞を呈色し、450nmにおける吸光度を測定することにより生細胞数を定量した(n=3)。

3. 結果と考察

3.1 Cisplatin (DMSO) 存在下で形成したコラーゲン細線維の形態

Cisplatin (DMSO) 存在下でコラーゲンの細線維を形成させ、それをSEMにて観察した。その結果、正常なコラーゲン細線維 (Fig. 1A) と比較して、cisplatin (DMSO)

存在下で形成したコラーゲン細線維 (Fig. 1B) は線維の直径が小さく、また線維の全体量が減少していることがわかった。この結果より、cisplatin (DMSO) はコラーゲンの集合を阻害し、細線維の形成を抑制していることがわかった。

3.2 Cisplatin (DMSO) がコラーゲン3重らせん構造に与える影響

Cisplatin (DMSO) と反応させたコラーゲンの円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定した。その結果、3重らせん構造に特有の225nm付近の正のコットン効果が観察された (Fig. 2)。算出した R_{pn} 値 (CD極小絶対値と極大絶対値の比) は0.11であり、天然のコラーゲン (0.13) と同程度の値であった¹²⁾。このことから、cisplatin (DMSO) を作用させたコラーゲンは、元の3重らせん構造をほぼ保持していることがわかった。これにより、cisplatin (DMSO) のコラーゲン細線維形成阻害効果は、コラーゲンの3重らせん構造を変性させることによるものでないことが強く示唆された。

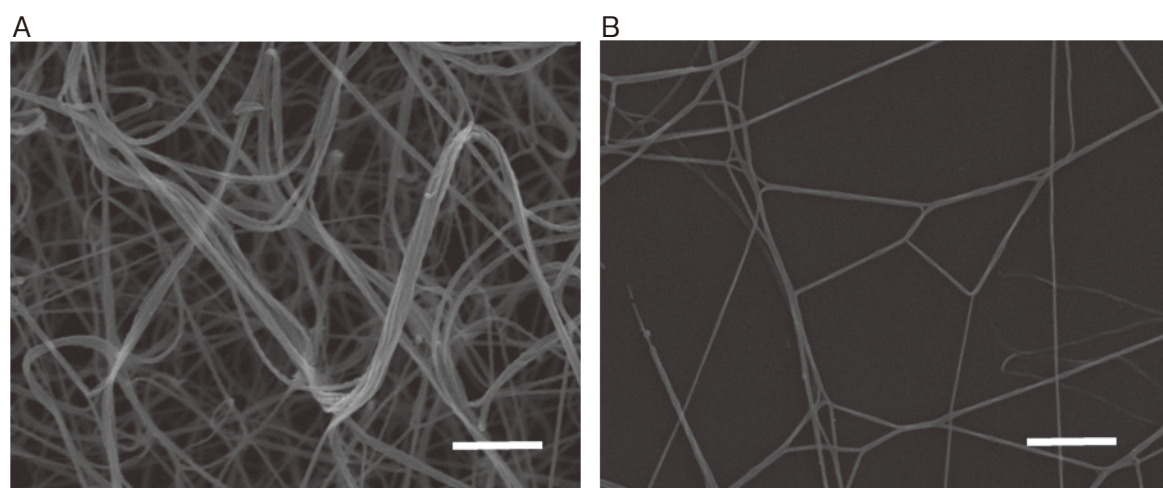


Fig. 1 SEM images of the collagen fibrils. A, Type I collagen only; B, Type I collagen plus cisplatin (DMSO). Scale bar = 2 μ m.

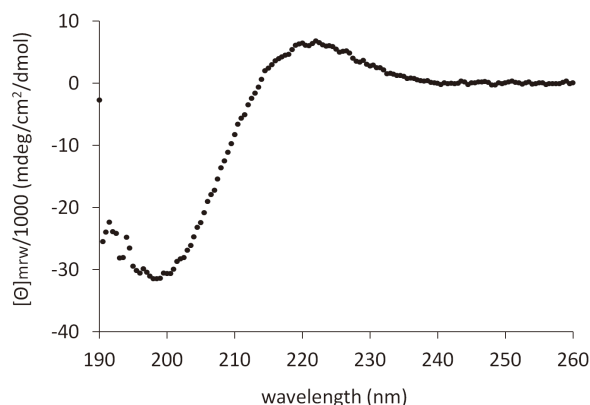


Fig. 2 CD spectrum of cisplatin (DMSO)-bound type I collagen.

3.3 コラーゲンと cisplatin (DMSO) との結合の stoichiometry

コラーゲン 1 分子に結合する cisplatin (= Pt) の数を定量した。I 型コラーゲンと cisplatin (DMSO) を溶液内で相互作用させ、限外濾過により遊離の cisplatin を分離した。遊離の cisplatin を原子吸光測定により定量し、仕込んだ cisplatin 量から差し引くことにより、コラーゲンに結合している cisplatin の数を見積もった。その結果、未変性コラーゲン 1 分子に対して cisplatin は約 3 ~ 4 個結合しうものを見積もられた (Fig. 3)。一方、熱変性させたコラーゲン (ゼラチン) を用いた場合には、明確な結合飽和曲線を描かず、非特異的吸着が示唆された。これにより、コラーゲンが 3 重らせん構造を取ることによって特異的な結合部位がコラーゲン上に生じ、そこに cisplatin (DMSO) が結合するものと考えられた。

3.4 コラーゲン上における cisplatin (DMSO) 結合部位の推定

次に、cisplatin のコラーゲン上の特定結合部位を推定す

るために cisplatin (DMSO) と相互作用するアミノ酸を調べた。そのために用いるツールとして、コラーゲン様 3 重らせんペプチドを合成した (Table 1)。合成したペプチドが 3 重らせん構造を保持できるように、Gly-Pro-Hyp (Hyp=4-hydroxyproline) 繰り返しをホスト配列として用い、プラチナ原子に対して配位能を有する側鎖を持つアミノ酸 (Met, His, Ser, Thr, Glu, Asp, Lys, Arg) をそれぞれホスト配列ではさんだ。これらペプチドが 37℃ で、3 重らせん構造をとっていることは CD スペクトル測定により確認した。

ペプチドと cisplatin (DMSO) を中性バッファー内でブレインキュベートした後にコラーゲン溶液と混合し、cisplatin (DMSO) のコラーゲン細線維形成阻害効果を実験 2.2 に示した方法によって調べた。このアッセイで、合成したペプチド自身がコラーゲンの細線維形成に影響を及ぼさないことは別途確認した。Fig.4 に示すように、Met 及び His を含んだペプチド pep-H、pep-M の共存によって、cisplatin (DMSO) の線維形成阻害効果が減弱することがわかった。これは、cisplatin (DMSO) が 3 重らせんペプ

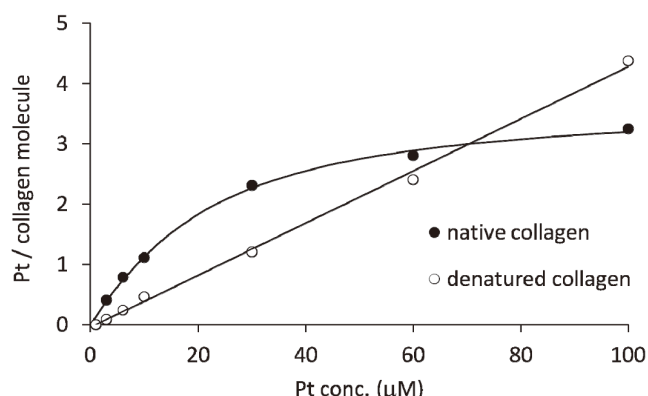


Fig. 3 Binding of platinum to native and denatured type I collagen.

Table 1 Collagen-like peptides tested for the cisplatin (DMSO) - binding.

Peptide	Sequence
Pep-M	(POG) ₃ PMG(POG) ₄ P-amide
Pep-H	(POG) ₄ PHG(POG) ₄ P-amide
Pep-T	(POG) ₄ PTG(POG) ₄ P-amide
Pep-S	(POG) ₄ PSG(POG) ₄ P-amide
Pep-E	(POG) ₃ PEG(POG) ₄ P-amide
Pep-D	(POG) ₄ PDG(POG) ₄ P-amide
Pep-K	(POG) ₄ PKG(POG) ₄ P-amide
Pep-R	(POG) ₃ PRG(POG) ₄ P-amide

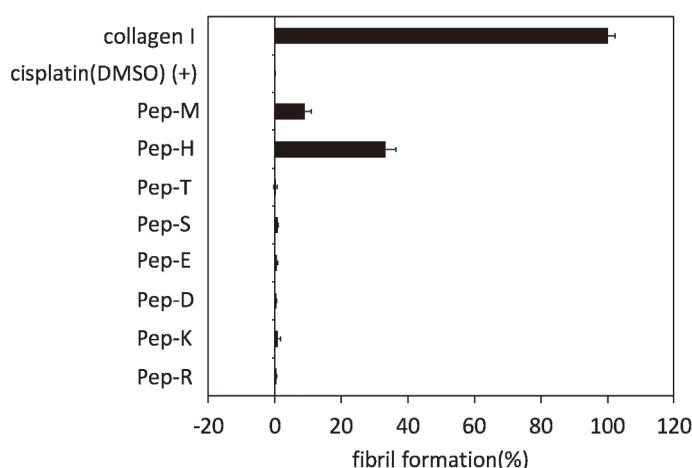


Fig. 4 Identification of amino acids responsible for the cisplatin (DMSO) - binding.

チド上のペプチドに含まれたMet及びHisに結合し、コラーゲンと結合することができなくなったためであると考えられる。この結果から、コラーゲン上の cisplatin (DMSO) 結合部位にはMetあるいはHis残基が含まれるものと推定された。

3.5 Cisplatin (DMSO) に含まれる活性本体の推定

CisplatinとDMSOとの反応による生成物を調べるために、cisplatin (DMSO) をESI-TOF MSによって分析した。その結果、 $m/z = 257, 288, 307, 343, 367, 403$ の6つのピークが検出された (Fig. 5)。解析の結果、 $m/z = 288, 307, 343, 367, 403$ それぞれのピークは、 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{DMSO})]$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{DMSO})]$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})(\text{DMSO})]^+$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{DMSO})_2]$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{Cl})(\text{DMSO})_2]^+$ に相当した。今回得られたMSの結果は以前報告されたものと同様であった¹³⁾。これにより、cisplatinはDMSOと反応すると少なくとも、 Cl^- がDMSOに置換した1置換錯体と、 Cl^- と

NH_3 の2つがDMSOに置換した2置換体錯体が生成することがわかった。

Cisplatinの構造異性体である transplatin、そして cisplatin と同様にプラチナ系抗がん剤である carboplatin と oxaliplatin (Fig. 6) のDMSO溶液および水溶液についてもコラーゲン細線維形成阻害効果を有するかを、同様の方法によって調べた。その結果、transplatinのDMSO溶液のみが、cisplatin (DMSO) と同程度の阻害効果を有することがわかった (Table 2)。次に cisplatin と同様に、化合物のDMSO溶液をESI-MSにより分析した。その結果、Fig. 5に示した構造と推定されるピークが検出された (data not shown)。この結果より、阻害能を持つ cisplatin と transplatin のDMSO溶液には共通して Cl^- の1つがDMSOに置換した錯体が検出された。この結果より、DMSOの1置換体である $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})(\text{DMSO})]^+$ が活性本体の候補として考えられた。

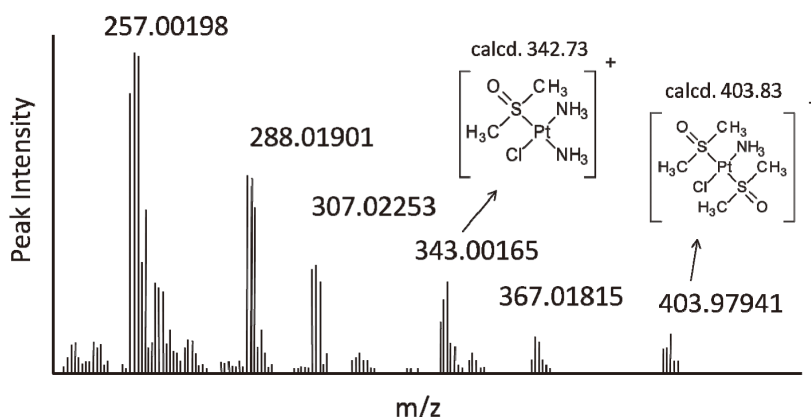


Fig. 5 ESI-MS analysis of cisplatin after incubation in DMSO.

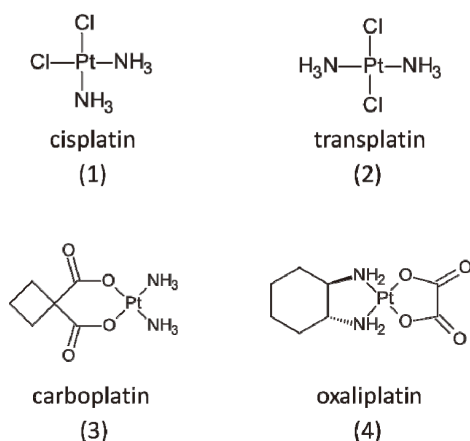


Fig. 6 Structures of platinum-containing anticancer drugs.

Table 2 Inhibitory activity of platinum-containing cancer drugs against collagen-fibril formation.

Compound	Collagen fibril formation IC ₅₀ (μM)	
	water solution	DMSO solution
1	>100	2.3
2	not determined	6.0
3	>100	>100
4	>100	>100

3.6 HUVECが分泌するコラーゲン細線維に対する cisplatin (DMSO) の影響

培養細胞が分泌するコラーゲンに対する cisplatin (DMSO) の細線維形成阻害効果の作用を評価した。Cisplatin (DMSO) を含んだ培地で HUVEC を培養し、細胞外のコラーゲンを免疫染色した後に共焦点顕微鏡にて観察を行った。その結果、層状に蓄積したコラーゲン線維が染色されているコントロール (Fig. 7A) と比較して、cisplatin (DMSO) を作用させた場合、細胞付近に細い線維が凝集し、ドット型の染色が見られた (Fig. 7B)。つまり細胞が分泌したコラーゲン分子に cisplatin (DMSO) が作用することで、正常なコラーゲン細線維形成が阻害されたと考えられる。

3.7 培養細胞のタンパク質産生に対する cisplatin (DMSO) の影響

3.6で示した cisplatin (DMSO) による細線維形成阻害効果が細胞によるコラーゲン産生阻害によるものかどうか

を知るために、cisplatin (DMSO) が含まれた培地で HUVEC を3日間培養し、cell layerの可溶性画分、不溶性画分および培地の3種類に関して Western Blottingを行い、コラーゲンの含有量を評価した (Fig. 8)。その結果、cisplatin (DMSO) を添加した場合と添加していない場合における cell layerの可溶性画分、不溶性画分および培地に含まれるコラーゲン量はほぼ変わらないことが示された。したがって、cisplatin (DMSO) のコラーゲン細線維形成阻害効果は、細胞のコラーゲン産生阻害によるものではなく、分泌後の細線維形成阻害によることが明らかになった。

3.8 Cisplatin (DMSO) の細胞毒性

Cisplatin (DMSO) の細胞毒性を調べるために、HeLa 細胞を cisplatin (DMSO) および生理食塩水に溶解した cisplatin を含んだ培地で48時間培養し、細胞の生存率を測定した。その結果、cisplatin (saline) に見られる濃度依存的な細胞毒性が、cisplatin (DMSO) では大幅に低くなっていることが示された (Fig. 9)。Cisplatin の DMSO 溶液

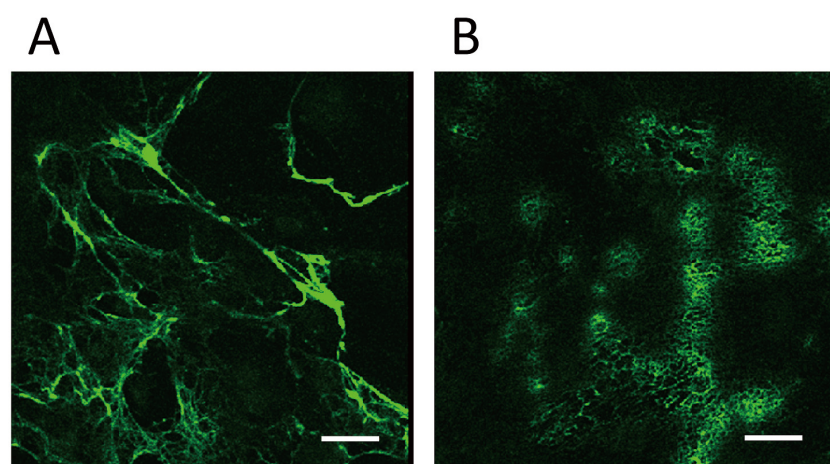


Fig. 7 Confocal microscopic images of collagen fibrils secreted by HUVEC. A, control; B, treated with 100 μ M cisplatin (DMSO). Scale bar = 30 μ m

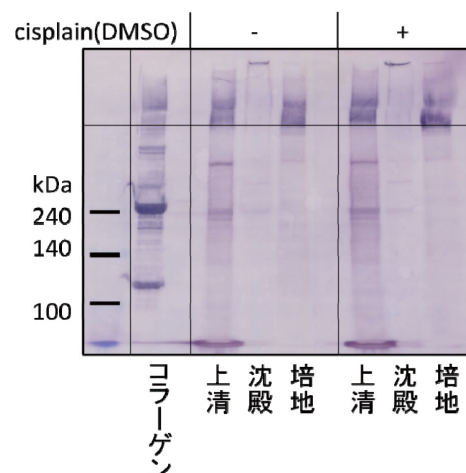


Fig. 8 Collagen production by HUVEC is not inhibited by the treatment with cisplatin (DMSO).

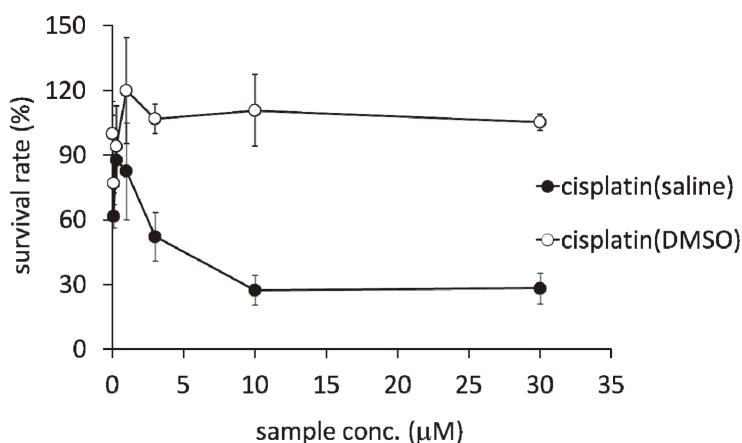


Fig. 9 Cytotoxicity of cisplatin (saline) and cisplatin (DMSO) to HeLa cells.

の細胞毒性が減少する例は以前に報告されているが¹³⁻¹⁵⁾、本実験では無血清培地を用いることにより、血清に含まれるアルブミン等のタンパク質への cisplatin の非特異的な結合の可能性を排除した条件で行ったため、より正確な cisplatin (DMSO) の細胞毒性についての結果を得ることができたものと考えられる。以上の実験結果より、cisplatin は DMSO に溶解することで DMSO と反応し、低毒性の cisplatin 誘導体を生成することが推定された。

4. 総 括

*In vitro*でのランダムスクリーニングから得られた cisplatin (DMSO) は、コラーゲンの細線維化を培養細胞レベルで抑制することが明らかになった。その活性発現には DMSO がプラチナ原子に配位していることが必須であった。また、この誘導体化によって cisplatin の細胞毒性がほとんど消失した。データは示さなかったが、cisplatin (DMSO) は、コラーゲンだけでなく他のタンパク質にも作用するとの知見を得ており、このままのかたちで個体に応用することは困難であると予想される。一方、cisplatin (DMSO) がコラーゲン 3 重らせん上の特異なアミノ酸配列部位に結合することから、本プラチナ錯体は、コラーゲン細線維化過程における分子間での相互認識の機構を研究する上で有用なツールになるものと考えられる。

謝 辞

本研究に協力いただいた全田未悠氏、大石真也博士、安井裕之博士に感謝します。

(引用文献)

- 1) Fertala A, Prockop DJ.: Inhibition of the self-assembly of collagen I into fibrils with synthetic peptides, *J.Biol. Chem.*, 273, 15598-15604, 1998.
- 2) Orgel JPRO, Irving TC, Miller A, Wess TJ.: Microfibrillar structure of type I collagen in situ, *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 103, 9001-9005, 2006.
- 3) Chung HJ, Steplewski A, Chung KY, Uitto J, Fertala A.: Collagen Fibril Formation, *J.Biol.Chem.*, 283, 25879-25886, 2008.
- 4) Kunii S, Morimoto K, Nagai K, Saito T, Sato K, Tonomura B.: Actinidain-hydrolyzed type I collagen reveals a crucial amino acid sequence in fibril formation, *J.Biol.Chem.*, 285, 17465-17470, 2010.
- 5) Shah M, Foreman DM, Ferguson MW.: Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring, *J.Cell Sci.*, 108, 985-1002, 1995.
- 6) Serra R, Crowley MR.: Mouse models of transforming growth factor beta impact in breast development and cancer, *Endocr.Relat.Cancer*, 12, 749-760, 2005.
- 7) Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA, O'Quinn M, Yost MJ, Gourdie RG.: Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds, *Trends Biotechnol.*, 26, 173-180, 2008.
- 8) Riley DJ, Berg RA, Edelman NH, Prockop DJ.: Prevention of collagen deposition following pulmonary oxygen toxicity in the rat by cis-4-hydroxy-L-proline, *J.Clin.Invest.*, 65, 643-651, 1980.
- 9) Chang K, Uitto J, Rowold EA, Grant GA, Kilo C, Williamson JR.: Increased collagen cross-linkages in experimental diabetes: reversal by beta-aminopropionitrile and D-penicillamine, *Diabetes*, 29, 778-781, 1980.
- 10) Gray RE, Seng N, Mackay IR, Rowley MJ.: Measurement of antibodies to collagen II by inhibition of collagen fibril formation in vitro, *J. Immunological Methods*, 285, 55-61, 2004.
- 11) Okano-Kosugi H, Matsushita O, Asada S, Herr AB, Kitagawa K, Koide T.: Development of a high-throughput screening system for the compounds that inhibit collagen-protein interactions, *Analytical Biochemistry*, 394, 125-131, 2009.
- 12) Feng Y, Melacini G, Taulane JP, Goodman M.: Acetyl-terminated and template-assembled collagen-based polypeptides composed of Gly-Pro-Hyp sequences. 2, *J.Am.Chem.Soc.*, 118, 10351-10358, 1996.
- 13) Fischer SJ, Benson LM, Fauq A, Naylor S, Windebank AJ.: Cisplatin and dimethyl sulfoxide react to form an adducted compound with reduced cytotoxicity and neurotoxicity, *Neurotoxicology*, 29, 444-452, 2008.
- 14) Garrone O, Rosso R, Dini D.: Topical dimethylsulfoxide for the prevention of soft tissue injury after extravasation of vesicant cytotoxic drug: A prospective clinical study. *J. Clinical Oncology* 13:2851-2855, 1995.
- 15) Dernel WS, Straw RC, Withrow SJ, Powers BE, Fujita SM, Yewey GS, Joseph KF, Dunn RL, Whitman SL, Southard GL.: Apparent interaction of dimethylsulfoxide with cisplatin released from polymer delivery devices injected subcutaneously in dogs. *J. Drug Targeting* 5:391-396, 1998.