

令和元年6月11日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10396

研究課題名(和文)p53標的創薬による新規放射線防護剤の開発

研究課題名(英文)Development of novel radioprotectors that target p53

研究代表者

森田 明典(MORITA, Akinori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：90334234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：放射線による骨髄障害の防護にはp53阻害が有効であるが、腸管障害の防護にはゲノムを防護するp53の機能を高めることが有効である。そのため本研究では、p53調節作用を有する5-クロロ-8-キノリノール(5CHQ)に着目した。5CHQは、p53標的遺伝子のうち、細胞死に拮抗するp21の発現を亢進させ、細胞死を促進するPUMAの発現を抑制するp53転写調節作用を示し、p53依存性細胞死を防ぐ特異な活性を有していた。本化合物の防護活性を示す線量減少率は、骨髄死相当線量のマウス全身照射試験で1.2、腸死相当線量の腹部照射試験で1.3と、新規の放射線防護剤シードとして良好な値を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高精度放射線療法の進展は目覚ましく、線量集中性の向上によって高い治療効果が得られるようになった。しかしながら、周辺のリスク臓器に有害事象が生じないようにするため依然として正常組織障害が処方できる腫瘍線量の限界を決めており、物理的な線量分布の改善だけでなく、生命科学の知見を応用した正常組織選択的な放射線防護剤の開発が期待されている。p53制御剤は、正常なp53機能をもつ正常組織の放射線細胞死を選択的に防護し、p53機能を喪失しているがん細胞は防護しないため、放射線治療の耐容線量や、抗がん剤の耐用量を向上させる副作用軽減剤として、がんゲノム医療に相応しい特性を示す防護剤として注目されている。

研究成果の概要(英文)：Inhibiting p53-dependent apoptosis by chemical p53 inhibitors is effective for preventing radiation-induced damage in hematopoietic lineages, while p53 and p21 also play radioprotective roles in the gastrointestinal epithelium. Among the radioprotective 8-quinolinol derivatives that were reported in our previous work, 5CHQ proved to be unique in showing a shifting its transactivation from proapoptotic to protective responses including enhancing p21 induction and suppressing PUMA induction. We also found that 5CHQ has a remarkable activity for protecting mice from gastrointestinal death by abdominal irradiation. These findings indicate that the pharmacological upregulation of radioprotective p53-target genes is an effective strategy for gastrointestinal syndrome.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線防護剤 細胞死 分子標的創薬 p53 正常組織防護

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、抗酸化作用に依拠せず、細胞死機構を制御することで生体の放射線耐性を高める防護剤開発が進みつつある。研究代表者の研究グループは、放射線誘発アポトーシスの分子機構の解明とそれに基づく新しいタイプの放射線防護剤の開発、特に「p53 阻害剤」の開発に取り組んできた。p53 阻害剤は、造血系組織に代表される放射線高感受性組織の被ばく後の過剰な細胞死（アポトーシス）の原因となる p53 を一過的に抑制することで急性障害を軽減する新しいタイプの放射線防護剤である。正常な p53 機能をもつ正常細胞のアポトーシスを選択的に抑制し、p53 機能を喪失しているがん細胞は防護しないため、放射線被ばく事故での救命への応用だけでなく、その正常組織選択性から放射線治療の耐容線量や、抗がん剤の投与量制限を克服する副作用軽減剤としての応用が期待されている。

2. 研究の目的

申請者らは、オルトバナジン酸ナトリウム（バナデート）が、p53 転写依存性・非依存性の両経路を抑制する阻害剤として機能し、12 Gy 被ばくによる腸死にも有効な p53 阻害剤であることを発見した（*Cancer Res.* 70, 257-265, 2010）。このバナデート効果（p53 不活性化作用）を模した化合物として、p53 分子内の亜鉛結合部位（図 1）を標的とする化合物の合成、探索を進め、「p53 阻害剤」だけでなく、p53 活性を調節するタイプの化合物等、種々の新規放射線防護剤候補化合物を新たに見出した。本研究では、これまでに得られた有望化合物をシードとし、その p53 制御機構の分子機構の解明を進め、防護活性向上を目指した化合物合成展開、および活性評価を実施した。

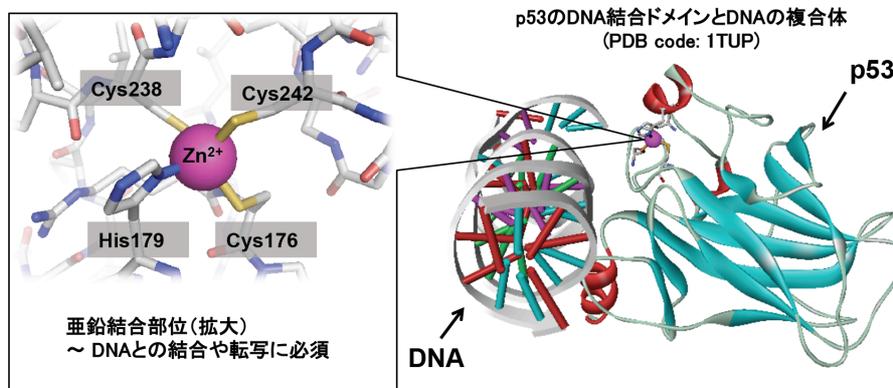
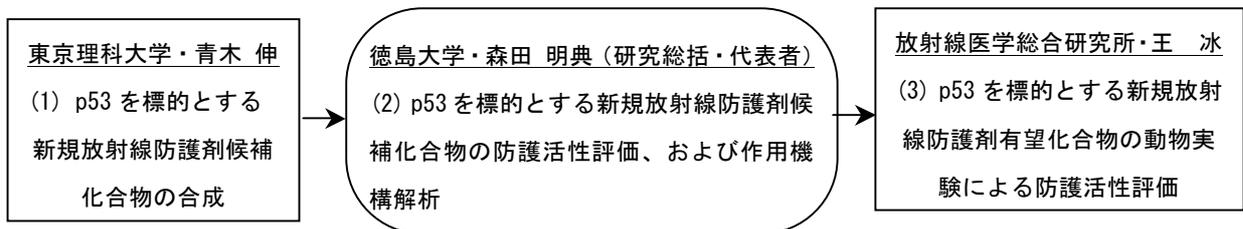


図 1. p53 の亜鉛結合部位

Protein Data Bank (PDB code: 1TUP) の構造データを基に作成した。3 つのシステインと 1 つのヒスチジンから成る Zinc フィンガー様の亜鉛結合部位を拡大図した。亜鉛結合部位は DNA 結合面に位置する。

3. 研究の方法

本研究では、共同研究体制として森田、青木、王の三者が中心となって以下の研究を推進した。



(1) p53 を標的とする新規放射線防護剤候補化合物の合成（青木）

東京理科大学薬学部青木研究室において放射線防護活性を有することが既に明らかとなっている 8-HQ 誘導体の官能基置換体を合成した。先行研究成果として、8-HQ 誘導体においてキノリン環の 5 位と 7 位に 2 つのメチルアミノスルホニル基を導入すると防護活性を保持し細胞毒性の低い放射線防護剤となること等、いくつかの重要知見に基づいて合成展開を進めた。

(2) p53 を標的とする新規放射線防護剤候補化合物の防護活性評価および作用機構解析（森田）

先に述べたように、放射線細胞死における p53 の役割は多岐に渡り、組織毎の応答も異なる。この複雑な応答を制御する候補化合物の探索のため、生化学・分子生物学・細胞生物学的手法を駆使した多面的な活性評価を実施した。

(3) p53 を標的とする新規放射線防護剤有望化合物の動物実験による防護活性評価（王）

森田らによる防護活性評価で有効と評価された有望化合物の動物試験を実施した。骨髄死相当線量や腸死相当線量を照射した成体の ICR マウスを用い、全身・腹部照射後の急性障害に対する放射線防護効果について検討した。全身照射では 30 日間のマウス生存率、腹部照射では肺野被ばくによる線維化に起因する死も観察するため、60 日間のマウス生存率を指標とした。始めに、30 日間の生存を指標として妥当な腹腔内投与タイミングと安全投与量の検討を行い、得られた結果をもとに、最適な投与タイミングと安全投与量で照射前、照射後に投与し、線量減少比 dose reduction factor を求めた。

4. 研究成果

本研究では、1つの亜鉛イオンに対して2つの分子で錯体形成する2座配位性の8-キノリノール(8-HQ)に特に着目した。これら2座配位性キレート化剤は一般にキレート活性が低く、細胞や生体に対する毒性が低いこと、また、p53分子中の亜鉛イオンを奪うことなく、既に配位数4でp53分子に結合している亜鉛の空位の第5・第6配位子部位に結合することによってp53-DNA間の相互作用に影響を及ぼすことを期待した。種々の8-HQ誘導体の合成、探索を進めた結果、p53活性を制御するいくつかのの新規放射線防護剤を見出した。しかしながら、p53活性を「阻害」する多くの化合物は、骨髄死には有効性を示すが腸死には有効性を示さない化合物であった。p53阻害剤が示した放射線防護活性の限界は、骨髄では放射線誘発アポトーシスを引き起こすメディエーターとして機能するのに対し、腸上皮では非アポトーシス性の分裂死(mitotic death)に対する抵抗性因子として働くp53機能の二面性(Nature 443, 214-217, 2006; Science 327, 593-596, 2010)にあると考えられた。

そのため本研究では、放射線による腸管障害を抑制するp53の機能を高める化合物として8-HQ誘導体である5-クロロ-8-キノリノール(5CHQ)に着目した。5CHQは、p53標的遺伝子のうち、細胞死に拮抗するp21の発現を亢進させ、細胞死を促進するPUMAの発現を抑制するp53転写調節作用を示し(図2)、p53依存性細胞死を防ぐ特異的な活性を有していた。本化合物の防護活性を示す線量減少率DRF(dose reduction factor)は、骨髄死相当線量のマウス全身照射試験で1.2、腸死相当線量の腹部照射試験で1.3(図3)と、新規の放射線防護剤リードとして良好な値を示した。また、小腸陰窩生存率についても有意な放射線防護活性を示した。これらの結果は、放射線防護においてp53機能を高める分子標的創薬の有用性を支持する結果と考えられた。

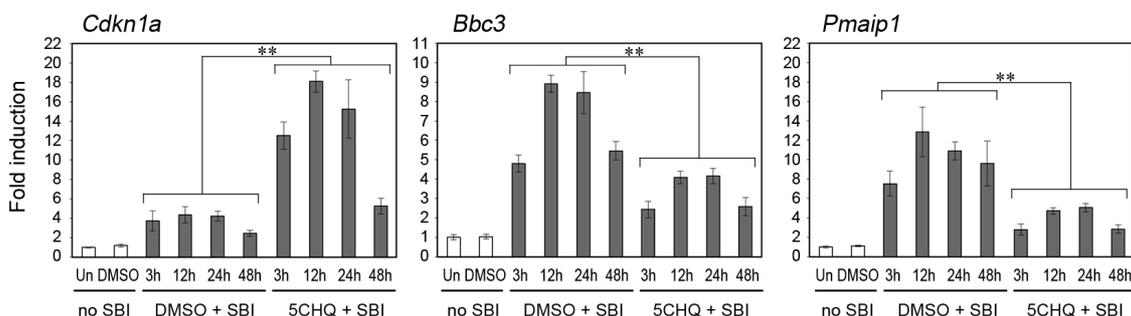


図2. 腹部21 Gy照射ICRマウス空腸上皮におけるp53標的遺伝子発現変化

腸上皮より抽出したRNAを逆転写し、定量的PCR法($\Delta\Delta Ct$ 法)により、p21をコードする*Cdkn1a*、PUMAをコードする*Bbc3*、NOXAをコードする*Pmaip1*のmRNA発現量を定量した。*β-Actin*をコードする*Actb* mRNAを内在性標準遺伝子とした。

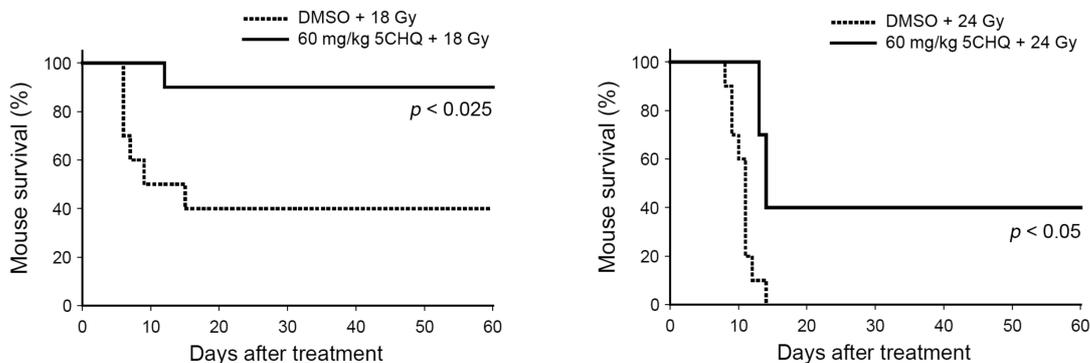


図3. γ 線18 Gyおよび24 Gy腹部照射マウスにおける5CHQの防護効果(DRF = 1.3)

腹部照射によって骨髄死を回避し、腸死に対する防護活性評価を行った。左図に18 Gy腹部照射マウス、右図に24 Gy腹部照射マウスの60日生存率を示した。各群それぞれ10匹の8週齢雌性ICRマウスを用いた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Akinori Morita*, Ippei Takahashi, Megumi Sasatani, Shin Aoki, Bing Wang, Shinya Ariyasu, Kaoru Tanaka, Tetsuji Yamaguchi, Akiko Sawa, Yurie Nishi, Tatsuro Teraoka, Shohei Ujita, Yosuke Kawate, Chihiro Yanagawa, Keiji Tanimoto, Atsushi Enomoto, Mitsuru Neno, Kenji Kamiya, Yasushi Nagata, Yoshio Hosoi and Toshiya Inaba : A chemical modulator of p53 transactivation that acts as a radioprotective agonist, *Mol. Cancer Ther.* 17, 432-442, 2018; Focus selection (*Corresponding author). 査読有. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0554.

〔学会発表〕(計19件)

- ① Yuichi Nishiyama, Akinori Morita, Wang Bing, Tanaka Kaoru, Katsube Takanori, Murakami Masahiro, Ochi Shintaro, Teraoka Tatsuro, Dwindling Ramadhani, Shimokawa Takashi, Neon Mitsuru and Aoki Shin : Protective effects of p53-regulating agents against high-LET radiation-induced injury in mice, 2nd Technological Competency as Caring in the Health Sciences 2018, 2018.
- ② 越智 進太郎, 佐藤 秀哉, 氏田 将平, 多田 佳寿美, 松下 洋輔, 水野 皓介, 出口 雄一, 鈴木 啓司, 田中 義正, 植田 弘師, 稲葉 俊哉, 細井 義夫, 青木 伸, 森田 明典 : 化合物ライブラリーから選抜された p53 依存性細胞死抑制剤の作用機構解析, 日本放射線影響学会 第 61 回大会, 2018 年.
- ③ 坂井 卓磨, 氏田 将平, 榎本 敦, 川手 耀介, 西山 祐一, 寺岡 達朗, 青木 伸, 王 冰, 金井 昭教, 稲葉 俊哉, 森田 明典 : 放射線防護剤 5CHQ の遺伝子発現調節作用の網羅的解析, 日本放射線影響学会 第 61 回大会, 2018 年.
- ④ 西山 祐一, 國井 大誓, 笹谷 めぐみ, 寺岡 達朗, 坂井 卓磨, 西山 祐一, 神谷 研二, 王 冰, 青木 伸, 森田 明典 : p53 調節剤 5CHQ の類縁体探索から見出された 5QX の放射線防護活性評価, 日本放射線影響学会 第 61 回大会, 2018 年.
- ⑤ 森田 明典, 王 冰, 田中 薫, 勝部 孝則, 村上 正弘, 西山 祐一, 越智 進太郎, 寺岡 達朗, ラマダニー ドゥウィー, 下川 卓史, 根井 充, 青木 伸 : p53 制御剤による重粒子放射線防護効果, 日本放射線影響学会 第 61 回大会, 2018 年.
- ⑥ 森田 明典, 王 冰, 田中 薫, 勝部 孝則, 村上 正弘, ラマダニー ドゥウィー, 下川 卓志, 根井 充, 越智 進太郎, 西山 祐一, 寺岡 達朗, 青木 伸 : 細胞死制御剤による重粒子放射線防護効果, 第 56 回 日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会, 2018 年.
- ⑦ 氏田 将平, 榎本 敦, 川手 耀介, 寺岡 達朗, 青木 伸, 森田 明典 : 放射線防護剤 5-chloro-8-quinolinol による照射後の p53 標的遺伝子発現変化の網羅的解析, 第 256 回 徳島医学会学術集会, 2018 年.
- ⑧ Shohei Ujita, Akinori Morita, Shin Aoki, Yurie Nishi, Tatsuro Teraoka, Megumi Sasatani, Bing Wang, Ippei Takahashi, Kaoru Tanaka, Tomoaki Yamakawa, Mitsuru Neno, Kenji Kamiya and Toshiya Inaba : Requirement of the 8-hydroxyl group in the 5-chloro-8-quinolinol for its action as a radioprotective agonist, The 1st International Symposium of the network-type Joint Usage/ Research Center for Radiation Disaster Medical Science, 2017.
- ⑨ 越智 進太郎, 氏田 将平, 多田 佳寿美, 松下 洋輔, 水野 皓介, 佐藤 秀哉, 青木 伸, 出口 雄一, 鈴木 啓司, 田中 義正, 植田 弘師, 稲葉 俊哉, 細井 義夫, 森田 明典 : ケミカルライブラリーから選抜された p53 制御性放射線防護剤の作用機構解析, 日本放射線影響学会 第 60 回大会, 2017 年.
- ⑩ 氏田 将平, 榎本 敦, 森田 明典 : 放射線防護剤 5CHQ による照射後の遺伝子発現変化の網羅的解析, 日本放射線影響学会 第 60 回大会, 2017 年.
- ⑪ 山川 知晃, 寺岡 達朗, 森田 明典, 氏田 将平, 青木 伸 : 5-クロロ-8-キノリノール誘導体の放射線防護活性評価, 日本放射線影響学会 第 60 回大会, 2017 年.
- ⑫ 青木 伸, 寺岡 達朗, 西 友里恵, 佐藤 秀哉, 水野 皓介, 嵯峨 裕, 氏田 将平, 山川 知晃, 越智 進太郎, 大和田 勇人, 王 冰, 森田 明典 : 亜鉛酵素研究・機械学習・ランダムスクリーニングに基づく p53 制御性放射線防護剤の設計・合成・活性評価, 第 35 回 メディシナルケミストリーシンポジウム, 2017 年.
- ⑬ 寺岡 達朗, 西 友里恵, 大和田 勇人, 森田 明典, 氏田 将平, 山川 知晃, 青木 伸 : キノリノール骨格を持った放射線防護剤の設計, 合成および活性評価, 第 61 回 日本薬学会関東支部大会, 2017 年.
- ⑭ 森田 明典 : 正常組織の耐容線量を高める放射線防護剤の開発, 第 255 回 徳島医学会学術集会, 2017 年.
- ⑮ 森田 明典 : 医療応用を目指した正常組織の放射線防護, 第 58 回 原子爆弾後障害研究会, 2017 年.
- ⑯ Akinori Morita, Ippei Takahashi, Shin Aoki, Bing Wang, Shinya Ariyasu, Megumi Sasatani, Kaoru Tanaka, Tetsuji Yamaguchi, Keiji Tanimoto, Mitsuru Neno, Kenji

Kamiya, Yasushi Nagata, Yoshio Hosoi and Toshiya Inaba : A chemical modulator of p53 transactivation that acts as a radioprotective agonist, 4th international postgraduate conference on pharmaceutical sciences (iPoPs 2016), 2016.

- ⑬ 森田 明典, 高橋 一平, 笹谷 めぐみ, 青木 伸, 王 冰, 有安 真也, 田中 薫, 山口 哲司, 谷本 圭司, 根井 充, 神谷 研二, 永田 靖, 細井 義夫, 稲葉 俊哉 : p53 標的創薬による放射線防護, 日本放射線影響学会 第 59 回大会, 2016 年.
- ⑭ 氏田 将平, 森田 明典, 青木 伸, 西 友里恵, 寺岡 達郎, 王 冰, 笹谷 めぐみ, 田中 薫, 山川 知晃, 根井 充, 神谷 研二, 稲葉 俊哉 : p53 を標的とする放射線防護剤 5-chloro-8-quinolinol の作用機構解析, 日本放射線影響学会 第 59 回大会, 2016 年.
- ⑮ 森田 明典, 高橋 一平, 笹谷 めぐみ, 青木 伸, 王 冰, 有安 真也, 田中 薫, 澤 晶子, 西 友里恵, 寺岡 達郎, 氏田 将平, 谷本 圭司, 根井 充, 神谷 研二, 永田 靖, 細井 義夫, 稲葉 俊哉 : p53 標的創薬研究から得られた p53 転写調節剤 5-クロロ-8-キノリノールの放射線防護作用機構解析, 日本 Cell Death 学会, 2016 年.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

https://www.tokushima-u.ac.jp/med/health_science/course/iyohoshasen/iyo_rikogaku/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 青木 伸

ローマ字氏名 : (AOKI, Shin)

所属研究機関名 : 東京理科大学

部局名 : 薬学部生命創薬科学科

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 00222472

研究分担者氏名 : 王 冰

ローマ字氏名 : (WANG, Bing)

所属研究機関名 : 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

部局名 : 放射線医学総合研究所 放射線影響研究部

職名 : チームリーダー

研究者番号 (8 桁) : 10300914

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。