

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16488

研究課題名(和文) 抗がん剤結合PIポリアミドによる抗腫瘍効果の高い放射線増感剤の開発

研究課題名(英文) PI polyamide combined with carcinostatic as radiosensitizer

研究代表者

石橋 直也 (ISHIBASHI, Naoya)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：40649331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線増感効果が知られている既存の抗がん剤シスプラチン類似化合物である白金錯体(Pt)をPIポリアミドに結合させたPIP-Ptを複数合成した。合成したPIP-Ptの31Hおよび31-Meを1pMから10nMの範囲で腫瘍細胞に投与し1Gyから10Gyの範囲のX線を照射した。放射線増感効果はWST法による細胞生存率の評価とColony formation assayによるコロニー形成能力の評価により確認した。WST法およびColony formation assayにおいて化合物非投与群と比べ生細胞数の減少が認められる傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療の効果を高める放射線増感剤は、腫瘍細胞への選択性・特異性の低さや細胞毒性による副作用の問題から一般的に臨床応用されているものはない。本研究では、核DNAに配列特異的に結合する性質を持つPIポリアミド分子に対し、既存の抗がん剤である白金製剤cisplatinの類似白金錯体(Pt)を結合したPIP-Ptを合成し、放射線照射による核DNA損傷を低濃度で効率的に増強させる放射線増感剤の開発を試みた。PtをPIポリアミドと結合させることにより放射線による効率的な核DNA損傷を引き起こした可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We combined PI polyamide with the platinum complex which is an anticancer drug cisplatin analog as the radiosensitizer. Synthesized PIP-Pt 31-H or 31-Me were applied to tumor cells at a final concentration of from 1pM to 10nM and the cells were exposed to from 1Gy to 10Gy. The radiation sensitizing effect were confirmed by the cell viability rate by WST assay and the colony forming ability by colony formation assay. The cells treated with PIP-Pt tended to lower viability compared with non-treated group in WST assay and colony formation assay.

研究分野：放射線治療

キーワード：抗がん剤結合PIポリアミド 放射線増感剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

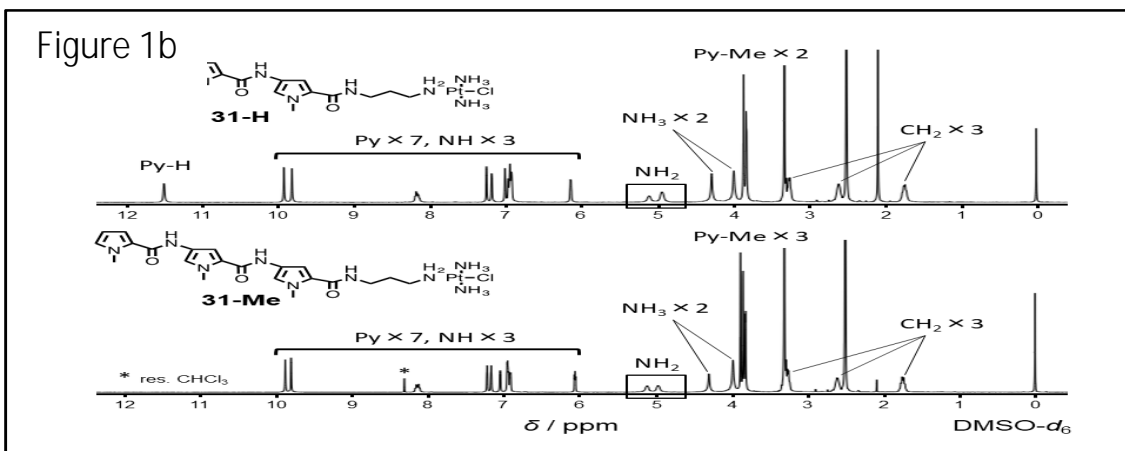
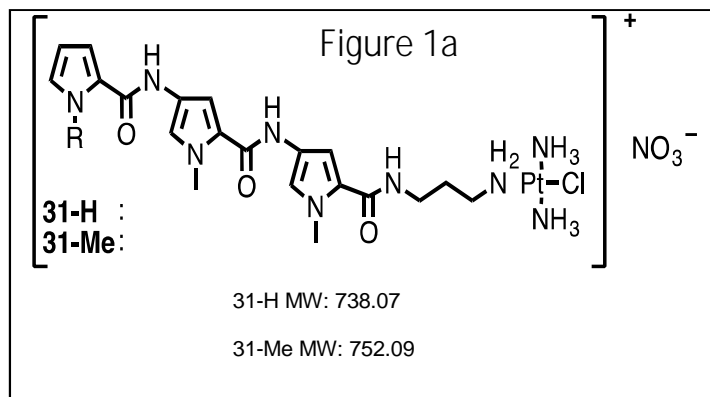
放射線治療は化学療法や手術と並ぶ悪性腫瘍の治療法の一つであるが、放射線に対する感受性は腫瘍ごとに多様であり、放射線感受性の低い細胞に対しては放射線増感剤を用いる必要がある。しかしながら、既存の放射線増感剤には腫瘍細胞への取り込みの選択性・特異性の低さや細胞毒性による副作用といった問題点がある。例えば抗がん剤であるシスプラチンは、放射線増感効果も持つことから、化学放射線療法で併用されることが多いが、その強い副作用から高濃度での投与が困難である。シスプラチンは、核内にて DNA 損傷を誘発することで抗腫瘍効果および放射線増感効果を示すが、核以外のミトコンドリア等の細胞内小器官にも取り込まれ、その結果腎不全などの傷害を惹起する。そこで我々は、核 DNA に配列特異的に結合する性質を持つピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドを用いて、核内に選択的に取り込まれる放射線増感剤の開発を企画した。PI ポリアミドは芳香族アミノ酸 *N*-methylpyrrole (Py) および *N*-methylimidazole (Im) で構成されるポリアミドであり、核 DNA に配列特異的に結合することが P.B. Dervan らにより報告されている (Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(22): 10389-10392.)。Py と Im の組み合わせ次第で、多様な配列の核 DNA に結合させることができ、遺伝子の転写因子結合部位を認識するよう設計した PI ポリアミドは、転写因子の結合を競合的に阻害し、転写抑制効果を発揮する。また、特別な担体を用いずとも核内に効率良く取り込まれ、安定性が高いという利点もあることから、PI ポリアミドに低分子の抗がん剤を結合し、核 DNA 近傍に移送させる輸送担体としても利用できる。既に放射線増感効果が知られている抗がん剤 cisplatin 類似化合物である白金錯体 (Pt) を PI ポリアミドに結合させた PIP-Pt も同様に複数合成しており、その作用を検討する。

2. 研究の目的

放射線治療の効果を高める放射線増感剤は、腫瘍細胞への選択性・特異性の低さや細胞毒性による副作用の問題から一般的に臨床応用されているものはない。本研究では、核 DNA に配列特異的に結合する性質を持つ PI ポリアミド分子に対し、既存の抗がん剤である白金製剤 cisplatin の類似白金錯体 (Pt) を結合した PIP-Pt を合成し、放射線照射による核 DNA 損傷を低濃度で効率的に増強させる放射線増感剤の開発を試みる。さらに腫瘍細胞におけるゲノム増幅が報告されている癌遺伝子の DNA 配列を認識する PIP-Pt を設計し、増幅細胞株でより強力に放射線増感効果を示すか検討する。以上の研究から抗がん剤との相乗効果による抗腫瘍効果のある全く新しいタイプの放射線増感剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

放射線増感効果が知られている既存の抗がん剤シスプラチン類似化合物である白金錯体 (Pt) を PI ポリアミドに結合させた PIP-Pt を複数合成した。まずは DNA に効率的に結合させるために標的遺伝子を特定しない短い PI ポリアミドを合成した。この PI ポリアミドに Pt を結合させた PIP-Pt を合成した。さらにこの PIP-Pt の末端に水酸基あるいはメチル基を結合させた 31-H および 31-Me を合成した (Figure 1a)。合成はペプチド合成機 PSSM8 を用いて行い、HPLC による精製、質量分析機により分子量を確認した (Figure 1b)。



これらの化合物は 100%DMSO で容易に溶解可能であった。
合成した PIP-Pt の 31H および 31-Me を 1pM から 10nM の範囲で腫瘍細胞に投与し 1Gy から 10Gy の範囲の X 線を照射した。X 線照射は日立 X 線照射装置 (MBR-1520R-3) を用いて行った。放射線増感効果は WST 法による細胞生存率の評価と Colony formation assay によるコロニー形成能力の評価により確認した。化合物非投与群を陰性コントロールとし、加えて既存の抗がん剤 cisplatin そのものの放射線増感効果と比較した。腫瘍細胞株は臨床の現場で一般的に cisplatin 併用の放射線治療が行われているヒト子宮頸癌 HeLa 細胞や膀胱癌細胞 T24 を用いた。

(1) WST 法

96 穴平底マイクロプレートに HeLa 細胞を 5000cells/100 μ l の細胞密度で播種した。

24 時間培養後に 31-H を終濃度 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M になるように添加した。

Cisplatin も同様に終濃度 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M になるように添加した。

24 時間培養後に X 線を 2Gy および 5Gy 照射した。

コントロールの非照射群も同様に培養した。

その後生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性を利用して、吸光度測定により生細胞数を計測する還元発色試薬 WST-8 を添加した。非照射群との比色定量により生細胞数の評価を行った。

(2) Colony formation assay

6 穴平底マイクロプレートに HeLa 細胞を 100cells/ml の細胞密度で播種した。

24 時間培養後に 31-H を終濃度 10 μ M になるように添加した。

Cisplatin も同様に終濃度 10 μ M になるように添加した。

24 時間培養後に X 線を 1Gy および 2Gy 照射した。

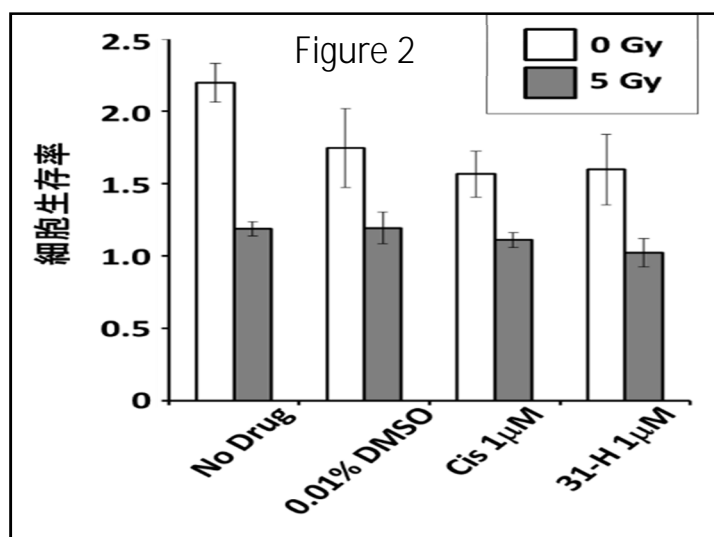
コントロールの非照射群も同様に培養した。

培養 10 日目にディフ・クイック染色により固定染色した。

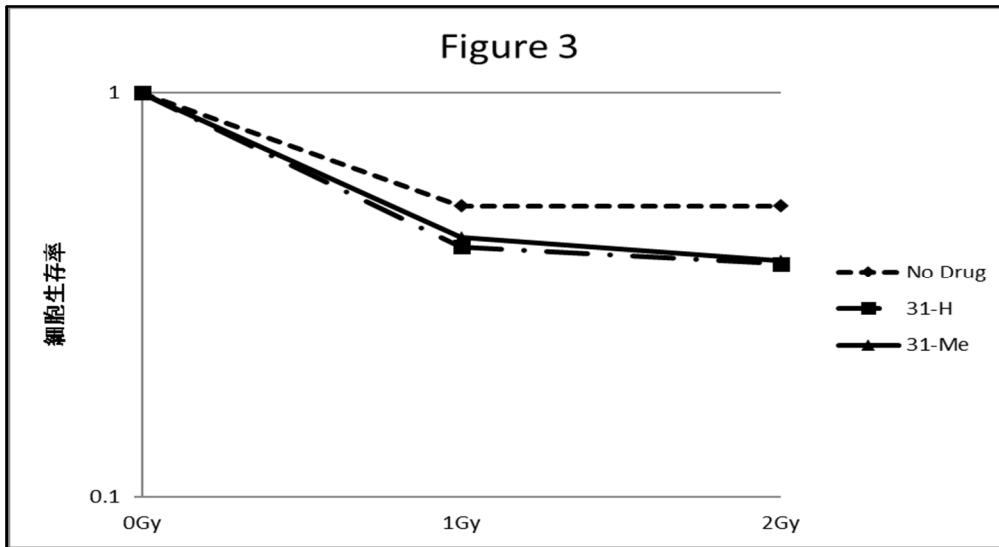
コロニー数を画像解析ソフト Lumina Vision で計測し細胞生存率から生存率曲線を作成した。細胞生存率は照射後に形成されたコロニー数/(播種した細胞数 x コロニー形成率/100)で算出した。なお、コロニー形成率とは播種した細胞のうちコロニーに成長したパーセントとした。

4. 研究成果

WST 法において化合物非投与群と比べ 31-H 投与群で生細胞数の減少が認められる傾向にあった (Figure 2)。また既存の抗がん剤である白金製剤 cisplatin 投与群と比べても 31-H 投与群で生細胞数の減少が認められる傾向にあった。これは既存の抗がん剤であるアルキル化剤 chlorambucil (ChB) を PI ポリアミドに結合させた以前の PIP-ChB 投与群と同様の結果であった。



Colony formation assay において化合物非投与群と比べ 31-H および 31-Me 投与群で 1Gy および 2Gy で細胞生存率の低下が認められる傾向にあった (Figure 3)。化合物非投与群では 1Gy と 2Gy では細胞生存率に著変なかった。



なお、本研究においてはWST法およびcolony formation assayにおいてcisplatinについては明らかな放射線増感効果を確認できなかった。これはcisplatinをPIポリアミド同様にDMSOで溶解したが保存するとDMSOにより失活した可能性が考えられた。

本研究の結果からPtをPIポリアミドと結合させることにより放射線による効率的な核DNA損傷を引き起こした放射線増感効果の可能性はある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----