

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18790892  
 研究課題名 (和文) マクロファージの低酸素腫瘍移行性を利用した放射線増感剤・p53再活性化剤の開発  
 研究課題名 (英文) Design of radiosensitizer and p53-reactivator using hypoxic tumor associated macrophage  
 研究代表者  
 宇都 義浩 (UTO YOSHIHIRO)  
 徳島大学・大学院バイオケミカル研究部・准教授  
 研究者番号：20304553

研究成果の概要：癌の放射線治療において障害となっている低酸素癌細胞に選択的に集積して放射線治療の効果を高める新規薬剤の創製を目的として、グルコースやN-アセチルガラクトサミンなどの単糖類と2-ニトロイミダゾール型放射線増感剤 TX-1877 とを結合させた糖ハイブリッド薬剤を分子設計し、放射線増感活性・腫瘍集積性・マクロファージ活性化能を有する TX-2068・TX-2141・TX-2244 の創製に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：メディシナルケミストリー

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線増感剤, マクロファージ, 低酸素腫瘍細胞

## 1. 研究開始当初の背景

がんの低酸素細胞はがんの基本環境である低酸素下での低速増殖型低栄養型細胞であり、近年、血管新生・浸潤・転移・遺伝子不安定性などががん細胞特性に深く関わっていることが明らかとなってきた。これまでに、この低酸素腫瘍細胞に対する放射線の効果を増強する薬剤として種々の低酸素細胞放射線増感剤が数多く開発されてきたが、従来の低酸素細胞放射線増感剤がもつ低酸素腫瘍細胞への集積性は薬剤の還元による受動的なものであり、能動的な機能をもつ薬剤、

すなわち低酸素腫瘍細胞特異的な薬剤は未だ開発された成功例はない。そこで私は、マクロファージが腫瘍細胞、特に低酸素腫瘍細胞周辺に集積することを利用して薬剤の低酸素腫瘍細胞移行性の向上を達成できないかと考えた。この薬剤がマクロファージに結合してマクロファージが活性化し薬剤とともに低酸素腫瘍細胞に移行すれば、薬剤を低酸素腫瘍細胞に集積させるだけでなく、活性化したマクロファージ自身による殺細胞効果との相乗効果が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、低 LET 放射線及び温熱治療の効果増強を目指したマクロファージ結合型低酸素細胞放射線増感剤・p53 再活性化剤を分子設計・合成し、それらの薬理活性を評価し、構造活性相関からリード薬剤を創製することである。

## 3. 研究の方法

(1) 低酸素細胞放射線増感剤 TX-1877 と種々の単糖（グルコース・ガラクトース・N-アセチルグルコース・N-アセチルガラクトース・マンノース）を結合させた糖ハイブリッド放射線増感剤を分子設計・合成する。その際、分子の放射線増感活性を予測するために分子軌道計算ソフト Gaussian03 を用いて電子親和性を求めて構造最適化を図る。

(2) マウス乳腺癌由来 EMT6/KU 細胞を低酸素処理して薬剤を投与し、X線照射を行った後コロニー形成法により *in vitro* 放射線増感活性を評価する。

(3) マウス腹腔から単離したマクロファージに薬剤を投与し、ヒツジ赤血球に対する食食活性から候補分子のマクロファージ活性化能を評価する。

(4) 得られたすべてのデータを用いて構造活性相関を行い、マクロファージ結合型低酸素細胞放射線増感剤のリード化合物を創製する。

## 4. 研究成果

(1) 低酸素細胞放射線増感剤 TX-1877 とマクロファージ結合性糖鎖 N-アセチルガラクトサミンを 1 位でグリコシド結合させた TX-2068 を分子設計し、分子軌道計算ソフト Gaussian03 を用いて解析したところ、2-ニトロイミダゾール基に LUMO が、N-アセチルガラクトサミンの 2 位の N-アセチル基に HOMO が局在しており、また、-LUMO 値 (=EA, 電子親和性) も TX-1877 と同等の値であったことから、TX-2068 は TX-1877 と同程度の低酸素細胞放射線増感活性を有していることが示唆された。また、マクロファージ結合性糖構造を比較するために、グルコサミン・ガラクトサミン・マンノサミンと TX-1877 を結合させた TX-2141, 2218, 2217 も分子設計し、分子軌道計算より 2-ニトロイミダゾール基に LUMO が局在していることを確認した。

(2) 上記分子の合成については、ペンタアセチル化糖を用いてニトロメタン中、三フッ化ジエチルエーテル錯体による TX-1877 のグリコシル化し、次いでアルカリ処理にて脱アセチル化して最終目的物をグラムスケールで

得た。各化合物の総収率は 10%程度であった。グリコシル化の際の立体選択性については、マンノースのみが  $\alpha$  選択的で残り 3 種はすべて  $\beta$  選択的であった。TX-2068 の疎水性パラメータ (P) を水-オクタノール分配係数より求めたところ、 $P=0.001$  と TX-1877 ( $P=0.056$ ) と比較してかなり高い水溶性を示すことが分かった。残りの 3 化合物も計算値から高い水溶性を有することが示唆された。

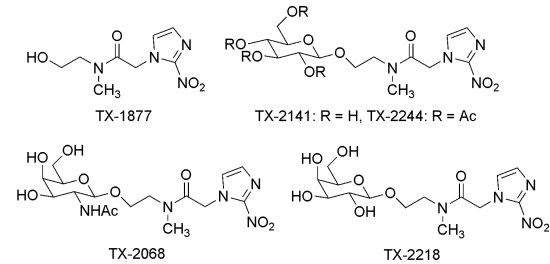


図 1. 各薬剤の化学構造

(3) また、分子設計・合成した糖ハイブリッド低酸素細胞放射線増感剤の *in vitro* 生物活性を評価したところ、テトラアセチルグルコース構造を有する TX-2244 (増感比 2.30) やテトラアセチルマンノース構造を有する TX-2246 (増感比 1.88) が高い放射線増感活性を示す一方、ヒドロキシル基がフリーの糖構造を有する薬剤のすべてがほとんど増感効果を示さなかった (増感比 1.33~1.43)。

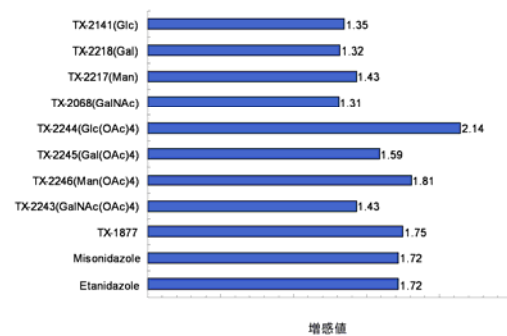


図 2. 各薬剤の放射線増感活性

(4) マクロファージ活性化能については、マウス腹腔から単離したマクロファージの羊赤血球細胞食食活性試験の結果から、N-アセチルガラクトサミン構造を有する TX-2068 のみ 1mM においてポジティブコントロール化合物である LPS と同等の活性化能を示した。

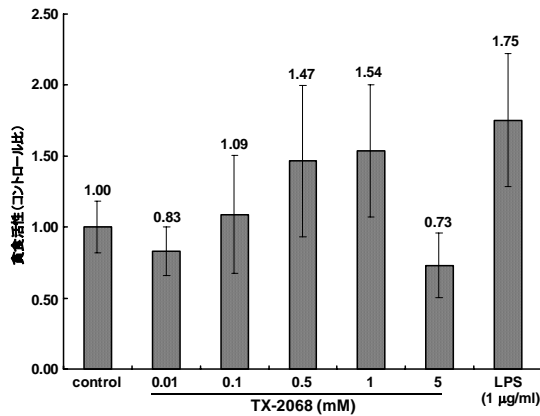


図3. TX-2068 のマクロファージ活性化能

(5) 候補薬剤 TX-2244 の腫瘍移植鶏卵を用いた薬物動態解析の結果より、静脈注射 30 分後に最大の腫瘍内濃度を示し、その後時間とともに濃度が低下し、代謝物（分解物）も確認されたが、候補薬剤 TX-2141 は静脈注射 3 時間後まで同程度の腫瘍内濃度を維持し、腫瘍への取り込み率も TX-2244 より高い値を示した。また、TX-2244 と異なり代謝物（分解物）は確認されなかった。

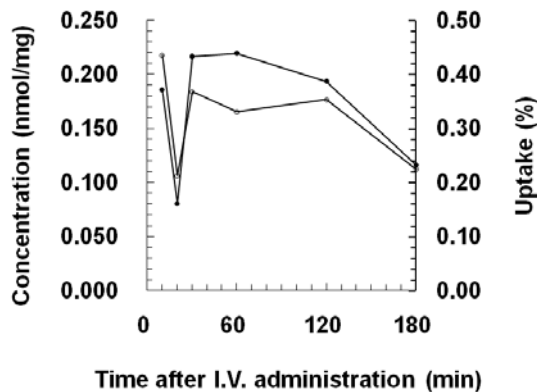


図4. TX-2141 の腫瘍内濃度変化

(6) 以上の結果より、マクロファージ活性化能を有する糖ハイブリッド放射線増感剤 TX-2068 及び高い放射線増感活性を有する糖ハイブリッド放射線増感剤 TX-2141・TX-2244 の創製に成功したことが示された。得られた成果の国内外における位置づけとインパクトについては、現在治療薬として用いられている薬剤はデンマークにおける頭頸部癌に対するニモラゾールのみであり、現在でも開発研究を続けている国内外のグループも極めて少ない一方、癌治療における放射線治療の割合が高くなりつつある現状を考えると、本研究成果は将来が期待できインパクトの高いものであると推察される。また、多くの欧米紙における研究論文及び総説依頼から

もインパクトの高さが示されている。今後の展望として、腫瘍移植鶏卵モデルを用いた in ovo (in vivo) 薬理活性を指標として構造活性相関を行い、臨床応用を目指した放射線増感剤の創製を行っていきたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) 宇都 義浩, 中田 栄司, 永澤 秀子, 堀均, ハイポキシアを標的とした抗癌剤, 実験医学(増刊), 27 巻, 177-183 頁, 2009 年, 査読無
- 2) Miyake K, Shimada M, Nishioka M, Sugimoto K, Batmunkh E, Uto Y, Nagasawa H, Hori H, Downregulation of matrix metalloprotease-9 and urokinase plasminogen activator by TX-1877 results in decreased tumor growth and metastasis on xenograft model of rectal cancer, Cancer Chemotherapy Pharmacology, in press, 2009, 査読有
- 3) Miyake K, Shimada M, Nishioka M, Sugimoto K, Batmunkh E, Uto Y, Nagasawa H, Hori H, The novel hypoxic cell radiosensitizer, TX-1877 has antitumor activity through suppression of angiogenesis and inhibits liver metastasis on xenograft model of pancreatic cancer, Cancer Letters, 272, 325-335, 2008, 査読有
- 4) Nakashima H, Uto Y, Nakata E, Nagasawa H, Ikkyu K, Hiraoka N, Nakashima K, Sasaki Y, Sugimoto H, Shiro Y, Hashimoto T, Okamoto Y, Asakawa Y, Hori H, Synthesis and biological activity of 1-methyl-tryptophan-tirapazamine hybrids as hypoxia-targeting indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16, 8661-8669, 2008, 査読有
- 5) Uto Y, Nagasawa H, Jin CZ, Nakayama S, Tanaka A, Kiyoi S, Nakashima H, Shimamura M, Inayama S, Fujiwara T, Takeuchi Y, Uehara Y, Kirk KL, Nakata E, Hori H, Design of antiangiogenic hypoxic cell radiosensitizers: 2-Nitroimidazoles containing a 2-aminomethylene-4-cyclopentene-1,3-dione moiety, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16, 6042-6053, 2008, 査読有
- 6) Nakae T, Uto Y, Tanaka M, Shibata H, Nakata E, Tominaga M, Maezawa H,

- Hashimoto T, Kirk KL, Nagasawa H, Hori H, Design, synthesis, and radiosensitizing activities of sugar-hybrid hypoxic cell radiosensitizers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 675-682, 2008, 査読有
- 7) 宇都 義浩, 中江 崇, 永澤 秀子, 中田 栄司, 堀 均, 解糖系代謝のエネルギー源となる単糖に対するがん細胞特異性: 糖ハイブリッド低酸素細胞放射線増感剤/制癌剤の分子設計-Pharmacokinetic drug designのすすめ-, 放射線生物研究, 43, 68-79, 2008, 査読無
  - 8) Ohkura K, Uto Y, Nagasawa H, Hori H, Effect of molecular chirality and side chain bulkiness on angiogenesis of haloacetylcarbamoyl-2-nitroimidazole compounds, *Anticancer Research*, 27, 3693-3700, 2007, 査読有
  - 9) Ohkura K, Nagasawa H, Uto Y, Okamura N, Murakami A, Hori H, The Role of Gc Protein Oligosaccharide Structure as a Risk Factor for COPD, *Anticancer Research*, 26, 4073-4078, 2006, 査読有
  - 10) Nagasawa H, Uto Y, Kirk KL, Hori H, Design of Hypoxia-Targeting Drugs as New Cancer Chemotherapeutics, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29, 2335-2342, 2006, 査読無
- [学会発表] (計22件)
- 1) 新元 優也, 宇都 義浩, 遠藤 良夫, 安部 千秋, 中島 宏一郎, 佐野 圭一郎, 佐々木 有紀, 皆巳 和賢, 前澤 博, 増永 慎一郎, 中田 栄司, 堀 均, 腫瘍移植鶏卵を用いた in ovo 放射線増感活性評価系の確立, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都市
  - 2) 辻 祐亮, 宇都 義浩, 中田 栄司, 永澤 秀子, 河野 悠介, 藤田 秀司, 千葉 一裕, 堀 均, マクロファージ活性化に関わるGalNAcの結合様式, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都市
  - 3) 金園 剛行, 宇都 義浩, 中江 崇, 柴田 明奈, 中島 宏一郎, 佐野 圭一郎, 富永 正英, 前澤 博, 中田 栄司, 堀 均, メチル化グルコース・糖ハイブリッド低酸素細胞放射線増感剤の分子設計, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都市
  - 4) 中江 崇, 宇都 義浩, 安部 千秋, 新元 優也, 金園 剛行, 中島 宏一郎, 佐野 圭一郎, 富永 正英, 前澤 博, 増永 慎一郎, 遠藤 良夫, 中田 栄司, 堀 均, 腫瘍移植鶏卵モデルによる糖ハイブリッド低酸素細胞放射線増感剤TX-2244 の腫瘍移行性, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都市
  - 5) 宇都 義浩, 安部 千秋, 新元 優也, 中江 崇, 中島 宏一郎, 佐野 圭一郎, 遠藤 良夫, 皆巳 和賢, 前澤 博, 増永 慎一郎, 中田 栄司, 堀 均, 腫瘍移植鶏卵を用いた in ovo 放射線増感活性評価系の確立, 第 11 回癌治療増感研究シンポジウム, 2009 年 2 月, 奈良市
  - 6) 堀 均, 宇都 義浩, 永澤 秀子, 島村 真里子, 稲山 誠一, 上原 至雅, 2-アミノメチレン-4-シクロペンテン-1, 3-ジオン構造を有する抗血管新生低酸素細胞放射線増感剤の創製, 第 67 回 日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月, 名古屋市
  - 7) 宇都 義浩, 遠藤 良夫, 前澤 博, 永澤 秀子, 堀 均, 腫瘍移植鶏卵を用いた in vivo放射線増感活性評価モデルの開発, 第 67 回 日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月, 名古屋市
  - 8) 皆巳 和賢, 宇都 義浩, 中江 崇, 中田 栄司, 永澤 秀子, 堀 均, 前澤 博, 低酸素細胞に対するニトロイミダゾールアセトアミド誘導体の放射線増感効果, 第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会, 2008 年 6 月, 高知市
  - 9) 宇都 義浩, 中江 崇, 佐々木 有紀, 安部 千秋, 中島 宏一郎, 新元 優也, 佐野 圭一郎, 遠藤 良夫, 皆巳 和賢, 前澤 博, 中田 栄司, 永澤 秀子, 堀 均, 次世代動物実験系としての腫瘍移植鶏卵の構築と放射線照射による腫瘍成長阻害活性, 第 14 回癌治療増感研究会, 2008 年 6 月, 鈴鹿市
  - 10) 中島 宏一郎, 中江 崇, 柴田 明奈, 田中 智子, 宇都 義浩, 富永 正英, 前澤 博, 中田 栄司, 永澤 秀子, 堀 均, がんによるグルコースの高い取り込みを利用した糖ハイブリッド低酸素細胞放射線増感剤の分子設計, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜市
  - 11) 柴田 明奈, 中江 崇, 滝口 公康, 宇都 義浩, 中田 栄司, 永澤 秀子, 堀 均, マクロファージ活性化因子GcMAFの糖鎖構造部位をミミックしたGalNAc-Thrデンドリマーの分子設計, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜市
  - 12) 皆巳 和賢, 宇都 義浩, 中江 崇, 中田 栄司, 永澤 秀子, 堀 均, 前澤 博, ニトロイミダゾールアセトアミド誘導体による低酸素放射線増感効果, 第 10 回癌治療増感研究シンポジウム, 2008 年 2 月, 奈良市
  - 13) 滝口 公康, 荒井 健, 辻 祐亮, 永澤 秀子, 宇都 義浩, 中田 栄司, 鬼塚 伸也, 野中 孝一, 藤岡 ひかる, 堀 均, マクロファージ活性化に関わるGc proteinの糖ペプチド構造解析, 第 11 回 バイオ治

- 療法研究会学術集会, 2007年12月, 福岡市
- 14) 三宅 講太郎, 西岡 将規, 杉本 光司, 宮谷 知彦, 宇都 義浩, 永澤 秀子, 堀均, 島田 光生, 直腸癌に対する低酸素細胞放射線増感剤TX-1877の放射線増感作用と抗腫瘍効果に関する基礎的研究, 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月, 横浜市
  - 15) 宇都 義浩, 堀均, 永澤 秀子, 解糖系基質と低酸素細胞放射線増感剤のハイブリッド分子設計, 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月, 横浜市
  - 16) 宇都 義浩, 富永 正英, 中江 崇, 田中 智子, 村上 綾, 佐々木 有紀, 柴田 明奈, 中島 宏一郎, 中田 栄司, 永澤 秀子, 堀均, 低酸素がん選択的ハイブリッド型放射線増感剤の創製, 第13回癌治療増感研究会, 2007年5月, 前橋市
  - 17) 荒井 健, 宇都 義浩, 岡村 菜摘子, 滝口 公康, 村上 綾, 永澤 秀子, 堀均, Non-secosteroidal Vitamin D mimicを用いたGc-Proteinのアフィニティーカラムの作成, 第127年会日本薬学会, 2007年3月, 富山市
  - 18) 田中 智子, 宇都 義浩, 富永 正英, 中江 崇, 村上 綾, 永澤 秀子, 堀均, 低酸素腫瘍移行性糖ハイブリッド放射線増感剤の創製, 第9回癌治療増感研究シンポジウム, 2007年2月, 奈良市
  - 19) 滝口 公康, 宇都 義浩, 岡村 菜摘子, 村上 綾, 永澤 秀子, 鬼塚 伸也, 野中 孝一, 藤岡 ひかる, 堀均, 多機能性糖タンパク質Gc protein及びその糖ペプチドの構造解析, 第10回バイオ治療法研究会学術集会, 2006年12月, 東京都

- 20) 宇都 義浩, 永澤 秀子, 堀均, マクロファージ活性化能を有する糖ハイブリッド低酸素細胞放射線増感剤の創製, 第65回日本癌学会学術総会, 2006年9月, 横浜市
- 21) 三宅 講太郎, 西岡 将規, 永澤 秀子, 宇都 義浩, 堀均, 島田 光生, 膵臓癌に対する低酸素細胞放射線増感剤TX-1877誘導体の放射線増感作用と抗腫瘍効果に関する基礎的研究, 第65回日本癌学会学術総会, 2006年9月, 横浜市
- 22) 中江 崇, 宇都 義浩, 村上 綾, 田中 彩子, 堀均, 永澤 秀子, 細胞表面を構成するsugar scaffoldに基づくハイブリッド型低酸素細胞放射線増感剤の創製, 第4回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2006年5月, 大阪市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇都 義浩 (UTO YOSHIHIRO)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・  
准教授

研究者番号: 20304553