

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03618

研究課題名（和文）糖脂質SQAPが作用する腫瘍内低酸素環境解除スイッチの同定と放射線治療への展開

研究課題名（英文）Screening for interacting proteins with glycolipid SQAP and application to radiotherapy

研究代表者

大重 真彦（Oshige, Masahiko）

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：00451716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：含硫糖脂質SQAPの放射線増感剤としての臨床研究は進展しているが、SQAPが放射線増感作用を引き起こす理由等の基礎研究が遅れていた。本研究では、低酸素環境適応に機能するHIF-1（Hypoxia Inducible Factor-1；低酸素誘導因子1）とNF-κB（nuclear factor-kappa B；核内因子κB）タンパク質量がSQAPにより減少することを明らかにした。この結果から、SQAPの作用により低酸素環境下でもミトコンドリアの機能が回復すると考え、その指標としての活性酸素種（ROS）産生量の変化を確認し、低酸素環境下においてROS産生量が増大することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍に対する治療法として放射線療法が重視され、患者の生活の質を維持するために照射線量低減を目的とした放射線増感剤開発が行われ、ハロゲン化ピリミジンや低酸素細胞増感剤等が開発された。しかし、毒性や副作用等の問題を克服できず実用化されていない。一方、DNAポリメラーゼ阻害剤として同定した含硫糖脂質SQMG（sulfoquinovosylmonoacylglycerol）とその構造改変化合物SQAP（Sulfoquinovosylacylpropanediol；薬剤名レプリチン）は、放射線増感剤として自然発症のがん患者に対して有効性が示されている。SQAPの実用化を目指すための基礎研究を実施した。

研究成果の概要（英文）：Clinical studies on the sulfur-containing glycolipid SQAP as a radiation sensitizer have been advancing, but basic research on SQAP as a mechanism of radiosensitization did not advance very much. In this study, we have revealed that SQAP decreases the protein levels of HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) and NF-κB (nuclear factor-kappa B), which function in adaptation to low-oxygen environments. Based on these results, we hypothesized that the action of SQAP facilitates the restoration of mitochondrial function even under low-oxygen conditions. To assess this, we confirmed the changes in the production of reactive oxygen species (ROS) as an indicator and found that ROS production increases in a low-oxygen environment.

研究分野：放射線科学

キーワード：含硫糖脂質 SQAP レプリチン 放射線治療 放射線増感 放射線増感剤 低酸素環境 酸素分圧

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する治療法として放射線療法が重視されるなかで、患者の生活の質 (QOL) を維持するために照射線量低減を目的とした放射線増感剤開発が試みられている。これまでに、放射線増感剤としてハロゲン化ピリミジンや低酸素細胞増感剤等が主に開発されてきた[1]。しかし、これらの薬剤は、毒性や副作用の問題を克服できず実用化には至っていない[1]。一方、自然発症のがん患畜に対して、現時点において通常の 1/4-1/6 の放射線照射線量で腫瘍を縮小・消滅させる放射線増感剤である含硫糖脂質 SQAP (Sulfoquinovosylacyl-propanediol、薬剤名:レブリチン、Fig. 1) は、臨床研究が先行して実施されており、基礎的研究である固形腫瘍内の低酸素環境がどのようにして高酸素環境に変化するのかが明らかにできていなかった。SQAP について、

- (1) 小動物への重篤な毒性が認められない (未発表データ)。
- (2) 腫瘍培養細胞の細胞膜に局在する [2]。
- (3) 担癌マウスへの投与後、腫瘍組織に滞留する [3]。
- (4) SQAP により放射線感受性が上昇する [4]。
- (5) 静脈投与により腫瘍組織内の低酸素環境が高酸素環境になる [5]。
- (6) イヌやネコのがん患畜治療に有効である [6]。

そのため、SQAP は実用化可能な放射線増感剤の候補と考えている。

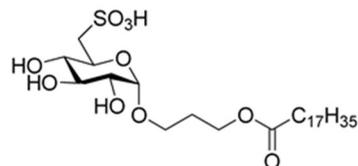


Fig.1 SulfoQuinovosylAcyl-Propanediol (SQAP)

2. 研究の目的

SQAP は重篤な毒性がなく、自然発症のがん患畜への放射線治療では有効である。しかし、固形腫瘍内の低酸素環境がどのようにして解除されるのか等の基礎的内容について不明な点が多く残っており、この問題を解決するために研究を実施した。具体的には、下記の内容を明らかにすることを目的に研究を実施した。

- (1) SQAP の機能は分子構造のどの構造が必須であるのか?
- (2) 細胞膜に局在することから細胞膜に SQAP 受容体が存在するのか?
- (3) どのような情報伝達経路により低酸素環境が高酸素環境に変化するのか?

3. 研究の方法

(1) SQAP 誘導体の合成

SQAP は最適な構造であるかも不明であった。そのため、構造の違いによる生理活性の相違を明らかにする目的で SQAP 誘導体を合成した。1 つは、SQAP のエステル結合が生体内で投与後すぐに分解されることを明らかにしており [3]、体内での分解速度を遅らせる可能性のある SQAP 誘導体である SQAP のエステル結合をエーテル結合に改変した 3-octadecanoxypopyl 6-deoxy-6-sulfo- α -d-glucopyranoside (ODSG) の合成した (Fig. 2) [7]。2 つめは、SQAP と結合したタンパク質を同定するために、SQAP と結合したタンパク質を架橋する官能基および樹脂による回収を容易にするためのビオチンを導入した SQAP 誘導体の合成を試みた (特許申請を考慮しているため構造の明示は控える)。この SQAP 誘導体については、目的の最終化合物から 4 段階前 (全 17 段階) の反応効率と収率の改善を試みており、合成経路の確定および大量合成まで完了できなかったため、引き続き実施する予定である。

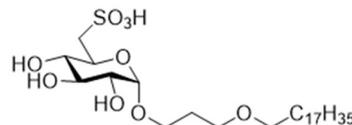


Fig.2 3-octadecanoxypopyl 6-deoxy-6-sulfo- α -d-glucopyranoside (ODSG)

(2) 通常酸素環境下および低酸素環境下における SQAP/ODSG の細胞毒性

低酸素環境下での SQAP の生理活性測定を行うために、低酸素環境下における SQAP の細胞毒性試験を行い、通常酸素下での SQAP の細胞毒性試験の結果を比較した。具体的には、Cell Counting Kit-8 (CCK-8、DOJINDO、SZ004) を使用した。CCK-8 は細胞増殖または化学物質の感受性試験において生細胞数を測定することを可能とし、高感度水溶性ホルマゼンを生成する新規テトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質としている。WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマゼンを生成する。このホルマゼンの 450 nm の吸光度を直接測定することにより、容易に生細胞数を計測することができる。この原理を利用して生細胞数を測定し、細胞毒性を評価した。

(3) 培地への SQAP 添加により影響を受けるタンパク質分子の同定

SQAP の生理活性として低酸素環境から高酸素環境への変化が明らかになっている [4]。そのため、SQAP は低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor : HIF) 関連因子に何らかの影響を与えている可能性があると考えられた。HIF 関連因子には HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) と

呼ばれる低酸素環境への適応に必要な遺伝子の転写を促進する転写因子が知られており、1分子の α サブユニット (HIF-1 α) と1分子の β サブユニット (HIF-1 β) から成るヘテロダイマーであり、HIF-1 α と類似構造を持つ HIF-2 α および HIF-3 α も同定されている[8]。通常酸素環境下では、HIF-1 α タンパク質は水酸化修飾を受けて常に分解されており、HIF-1 の転写活性は抑制されている。また、NF- κ B (核内因子 κ B、nuclear factor- κ B) は転写因子として働くタンパク質複合体で、構成するタンパク質 (NF- κ B ファミリー) は、哺乳類では p50、p52、p65 (RelA)、c-Rel、RelB の 5 種類が知られており、NF- κ B は HIF-1 の発現を誘導し、HIF-1 は NF- κ B p65 を誘導することから、両者は低酸素環境を維持するために機能していると考えられている。これらの因子について、ウエスタンブロット解析により、SQAP に影響を受けるタンパク質を明らかにすることを試みた。

(4) SQAP の添加の有無による活性酸素種 (ROS) 産生量変化の測定

HIF-1 はミトコンドリアの機能障害や活性酸素種産生に関わる酵素群を抑制し、ROS 産生量を抑制している[8]。そのため HIF-1 は、ROS 産生としての酸素消費を抑え、組織や細胞を低酸素環境に対応させる機能を持つと考えられている[8]。SQAP が HIF-1 関連因子に影響を与えていれば、ROS 産生量の変化として捉えることができるのではないかと考えた。この変化を捉えるために CellROX Green Reagent (Thermo Fisher Scientific ; C10444) を使用した。CellROX Green Reagent は、生細胞の酸化ストレスを測定するための蛍光プローブであり、酸化すると DNA に結合する DNA 色素であり、最大吸光波長/発光波長=485 nm/520 nm で明るい緑色の光安定蛍光を示し、ROS を特異的に検出する色素である。具体的な方法として、培養した A549 細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞) もしくは SUIT-2 細胞 (膵臓がん細胞) を蛍光用 96well-plate (Greiner Bio-One ; 675076) に播種し、DMEM 培地中で 24 時間、37°C の 5%CO₂ インキュベーターで静置した。そして、各濃度に調整した SQAP 溶液を添加し、さらに 37°C の 5%CO₂ インキュベーターで静置した。その後、最終濃度 5 μ M になるように Cell ROX Green Reagent を加え、37°C の 5%CO₂ インキュベーターで静置した後、1 \times PBS (-) で 2 回洗浄し、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices、SpectraMax i3x) で蛍光強度 (ex/em=485 nm/520 nm) を測定した。

(5) 担癌マウスの準備

SQAP および合成した SQAP 誘導体の放射線増感剤としての効果を調べるために、ヌードマウスへの A549 細胞の移植腫瘍組織の形成を試みた。しかし、移植した A549 細胞の定着率が悪く、腫瘍組織としての増殖率も悪かった。様々な条件で検討を行ったが、目的の大きさの移植腫瘍組織にし、薬剤の投与と経過観察を経て結果をえるまでに 6 ヶ月かかることが判明した。できる限りその動物に苦痛を与えないという観点から、A549 細胞により担癌マウスを準備することは適切ではないと判断し、過去の論文を参考に[5]、マウスの扁平上皮癌細胞である SCC-7 細胞により担癌マウスを準備している。

4. 研究成果

(1) ODSG のリパーゼ耐性試験結果

SQAP の体内動態試験では、静脈投与後すぐにエステル結合の加水分解が始まることが判明し、リパーゼによる分解であると推測した。また、体内での分解速度を遅らせることにより、より効果の高い放射線増感剤になる可能性がある。このことを念頭に、SQAP のエステル結合をエーテル結合に改変した SQAP 誘導体である ODSG の合成に成功し、ブタの膵臓由来のリパーゼによる分解試験を行った。その結果、SQAP はリパーゼにより容易に分解されたが、ODSG はリパーゼに対して耐性があることを明らかにし (Fig. 3)、体内動態試験結果である SQAP の分解は、リパーゼによるものであることが高いことを明らかにした[7]。

(2) A549 細胞の SQAP 毒性試験結果

通常酸素環境における SQAP による A549 細胞生存率は、250 μ M 以下で 60% 以上、300 μ M で 45% となり、以降の濃度上昇に伴って細胞生存率は低下した。1% 低酸素環境においては 150 μ M 以下で 60% 以上、200 μ M で 25% となり、以降の濃度上昇に伴って細胞生存率は低下した

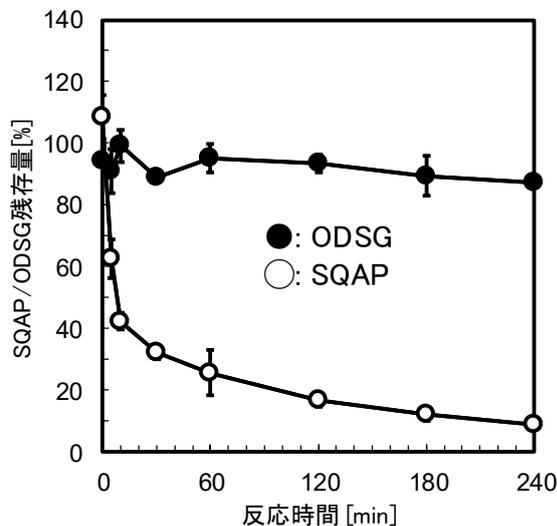


Fig.3 リパーゼによるSQAP/ODSGの分解実験

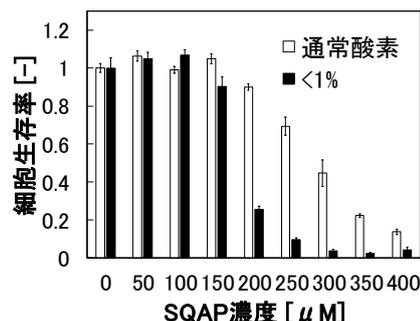


Fig.4 通常環境/低酸素環境におけるSQAPのA549細胞に対する細胞毒性

(Fig. 4)。

(3) A549 細胞の ODSG 毒性試験結果

通常酸素環境における ODSG 処理による A549 細胞生存率は、150 μM 以下で 60% 以上、200 μM で 26% となり、以降の濃度上昇に伴って細胞生存率は低下した。1% 低酸素環境においては 100 μM 以下で 60% 以上、150 μM で 45% となり、以降の濃度上昇に伴って細胞生存率は低下した (Fig. 5)。

(4) SUIT-2 細胞の SQAP 毒性試験結果

通常酸素環境における SQAP 処理による SUIT-2 細胞生存率は、250 μM 以下で 60% 以上、300 μM で 39% となり、以降の濃度上昇に伴って細胞生存率は低下した。1% 低酸素環境においては 50 μM で 44% となり、以降の濃度上昇に伴って細胞生存率は低下した (Fig. 6)。

(5) 培地への SQAP 添加により影響を受けるタンパク質分子のウエスタンブロット法による同定

下記の抗体を使用し、低酸素培養 0、4、8、24h 行った A549 培養細胞の細胞抽出液 (1 μg /レーン) を用いてウエスタンブロット解析を行った (データ省略)。

BD Transduction Laboratories; Purified Mouse Anti-Human HIF-1 α [610959]

ROCKLAND; Anti-NFKB p65 (Rel A) (RABBIT) Antibody [100-4165]

Medical & Biological Laboratories; Anti- β -Actin pAb-HRP-Direct [PM053-7]

β -actin はコントロールとして使用した。HIF-1 α について、低酸素処理時間 0h ではウエスタンブロットによるバンドは検出されず、4-24h でバンドが検出された (データ省略)。また、NF- κ B については、低酸素処理時間 0h ではウエスタンブロットにより微量で存在し、4-24h では 0h よりも増加したバンドが検出された (データ省略)。次に、低酸素環境中の A549 細胞を各 SQAP 濃度 0、10、100 μM で処理したサンプルを準備し、ウエスタンブロット法により SQAP が HIF-1 α 、NF- κ B タンパク質量に影響を与えているかどうかを確認する実験を行った (Fig. 7)。HIF-1 α について、SQAP 0 μM と比較し、10 と 100 μM ではタンパク質発現量が減少した。また、NF- κ B について、SQAP 0 μM と 10 μM ではタンパク質発現量に差がみられなかったが、100 μM では発現量が減少することを明らかにした。この結果から、SQAP は HIF-1 α の制御に関わる代謝経路に影響を及ぼしている可能性があることを明らかにした。

(6) SQAP による A549 細胞の ROS 産生量測定結果

A549 細胞に SQAP を添加せずに培養した 0 μM を 1 となるように基準とし、各濃度の SQAP で処理した細胞の ROS 産生量を比較した。またポジティブコントロールとして 100 μM のメナジオンを用いた。通常酸素濃度において SQAP 濃度 50 μM 、100 μM では ROS 産生量の増加は見られなかったが、150 μM においては約

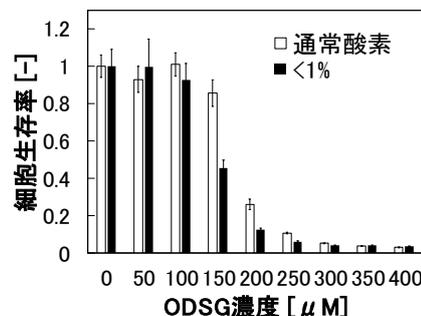


Fig.5 通常環境/低酸素環境における ODSG の A549 細胞に対する細胞毒性

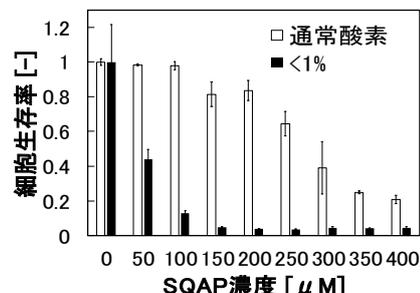


Fig.6 通常環境/低酸素環境における SQAP の SUIT-2 細胞に対する細胞毒性

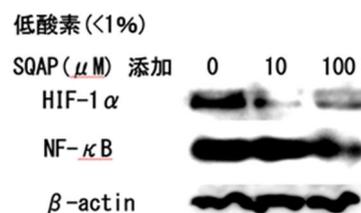


Fig.7 低酸素環境下において A549 細胞に SQAP 添加による各種タンパク質量変化

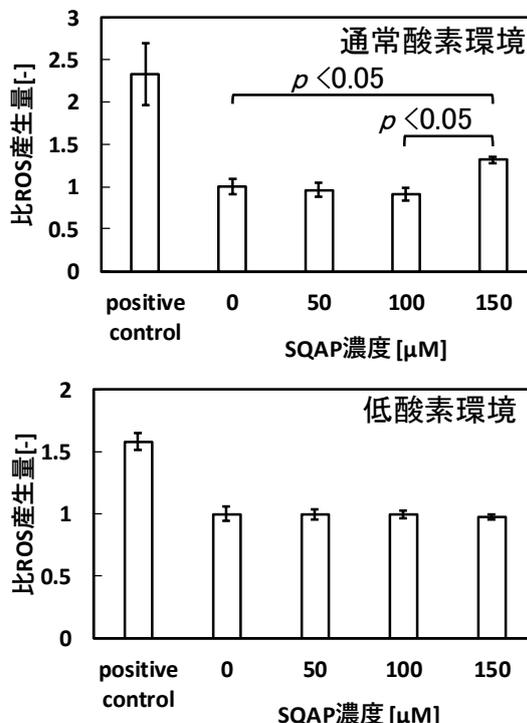


Fig.8 SQAP による A549 の ROS 産生量変化 (通常酸素環境/低酸素環境)

1.5 倍の増加が見られなかったが、150 μM においては約

1.3 倍の ROS 産生量の増加を確認した (Fig. 8 上)。1%低酸素環境においては SQAP 濃度 50-150 μM の範囲で変化は見られなかった (Fig. 8 下)。

(7) A549 細胞における ROS 産生を指標とした SQAP の構造相関

SQAP の体内での分解産物が生理活性を持つかを確認するため、糖部分にあたる SQP、脂肪酸部分にあたるステアリン酸、SQP とステアリン酸の混合物の溶液を A549 細胞に加えて ROS 産生量測定を行った。分解産物を用いた溶液を添加した場合いずれにおいても 150 μM SQAP に見られた ROS 産生量の増加は見られなかった (Fig. 9)。

(8) SQAP による SUIT-2 細胞の ROS 産生量測定結果
SUIT-2 細胞に SQAP を添加せずに培養したもの 0 μM を 1 となるように基準とし、各濃度の SQAP で処理した細胞の ROS 産生量を比較した。またポジティブコントロールとして 100 μM のメナジオンを用いた。通常酸素環境においては SQAP 濃度による変化は見られなかった (Fig. 10 上)。1%低酸素環境においては SQAP 濃度 50 μM において ROS 産生量が約 2 倍に増加した (Fig. 10 下)。

(9) 総括

SQAP の機能は分子構造のどの構造が必須であるのかについて、すべての構造が必須であることを明らかにした (Fig. 9)。

細胞膜に局在することから細胞膜に SQAP 受容体が存在するのかについて、反応効率と収率の改善を試みており、引き続き実施する予定である。

どの情報伝達経路により低酸素状態が解除されるのかについて、HIF-1 の制御経路に影響を与えていることを明らかにした (Fig. 7)。

また、Fig. 8 の A549 細胞の ROS 産生結果と Fig. 10 の SUIT-2 細胞の ROS 産生結果は、真逆な結果となっており、この結果は細胞種の違いによるものなのか調べる必要がある。

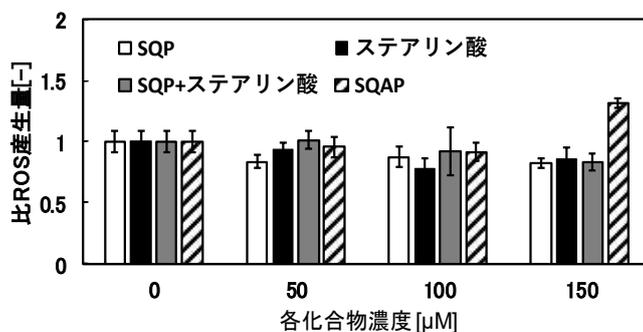


Fig.9 通常酸素環境におけるA549のROS産生量とSQAPの構造

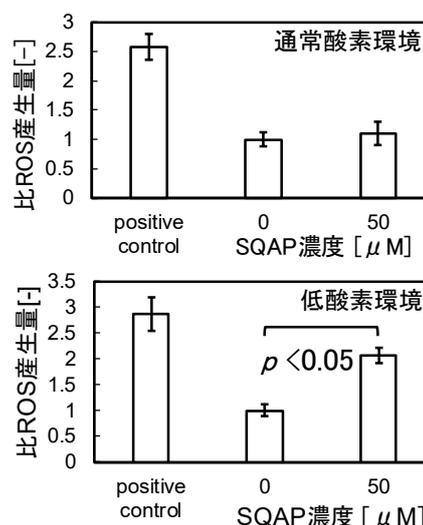


Fig.10 SQAPによるSUIT-2のROS産生量変化 (通常酸素環境/低酸素環境)

<引用文献>

- [1] Radiobiology for the Radiologist (Fourth Edition)、Eric J. Hall 他、J.B. Lippincott Company
- [2] K Ohta, *et. al.*, Biochem Biophys Res Commun. 2001 Nov 9;288(4):893-900. doi: 10.1006/bbrc.2001.5852.
- [3] T Ruike, *et. al.*, Xenobiotica. 2019 Mar;49(3):346-362. doi: 10.1080/00498254.2018.1448949.
- [4] K Ohta, *et. al.*, Anticancer Res. 2010 Nov;30(11):4397-4404.
- [5] Y Takakusagi, *et. al.*, Cancer Res. 2018 Dec 15;78(24):6828-6837. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1654.
- [6] K Kutara, *et. al.*, Vet Sci. 2020 Dec 14;7(4):203. doi: 10.3390/vetsci7040203.
- [7] M Oshige, *et. al.*, Bioorg Med Chem Lett. 2021 Nov 15;52:128391. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.128391.
- [8] J Korbecki, *et. al.*, Int J Mol Sci. 2021 Oct; 22(19): 10701. doi: 10.3390/ijms221910701

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oshige Masahiko, Kano Koki, Shinada Shunsuke, Kawaguchi Akifumi, Uchida Takato, Ishii Nozomi, Horiuchi Hiroaki, Sugawara Fumio, Sakaguchi Kengo, Matsuo Ichiro, Katsura Shinji	4. 巻 52
2. 論文標題 Synthesis of 3-octadecanoxypopyl 6-deoxy-6-sulfo- -d-glucopyranoside (ODSG) as a lipase-resistant SQAP derivative	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128391 ~ 128391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.128391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大重真彦、桂進司、菅原二三男、坂口謙吾	4. 巻 48
2. 論文標題 放射線増感剤「レプリチン」の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 56 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西川昂汰、堀内宏明、大重真彦、松尾一郎、菅原二三男、坂口謙吾、桂進司、吉原利志、飛田成史、奥津哲夫
2. 発表標題 光線力学療法への応用を目指したシリルポルフィリン-含硫糖複合体の開発
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川昂汰、堀内宏明、大重真彦、松尾一郎、菅原二三男、坂口謙吾、桂進司、吉原利志、飛田成史、奥津哲夫
2. 発表標題 光線力学療法への応用を目指したシリルポルフィリン-含硫糖複合体の開発
3. 学会等名 2020年web光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 品田駿輔、狩野航輝、川口晃史、内田堯斗、石井希実、堀内宏明、菅原二三男、坂口謙吾、松尾一郎、大重真彦、桂進司
2. 発表標題 リパーゼにより分解されないISQAP誘導体の合成
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤要、品田俊輔、狩野航輝、石井希実、堀内宏明、菅原二三男、坂口謙吾、松尾一郎、大重真彦、桂進司
2. 発表標題 培養細胞を用いたSQAPとその類縁体の生理活性評価
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 兵藤大貴、有村柁平、吉田圭秀、菅原二三男、坂口謙吾、大重真彦、桂進司
2. 発表標題 含硫糖脂質SQAPが影響を与える遺伝子およびタンパク質の探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

〔取得〕 計4件

産業財産権の名称 化合物又はその塩、がん治療薬、光増感剤、及び蛍光プローブ組成物	発明者 堀内宏明、大重真彦、松尾一郎、奥津哲夫、桂進司、その	権利者 株式会社エム・ティー・スリー、国立大学
産業財産権の種類、番号 特許、第6886578号	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 化合物又はその塩、及び放射性増感剤	発明者 大重真彦、松尾一郎、堀内宏明、桂進司、菅原二三男、坂	権利者 株式会社エム・ティー・スリー、国立大学
産業財産権の種類、番号 特許、第6903273号	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 COMPOUND OR SALT THEREOF	発明者 OSHIGE MASAHIKO et al.	権利者 M.T.3, INC., GUNMA UNIVERSITY
産業財産権の種類、番号 特許、US11267840	取得年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 COMPOUND OR SALT THEREOF, AND METHOD	発明者 HORIUCHI H., OSHIGE M., et al.	権利者 M.T.3, INC., GUNMA UNIVERSITY
産業財産権の種類、番号 特許、US11643430	取得年 2023年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

桂・大重研究室 https://oshige.wixsite.com/katsura-oshige
--

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
研究分担者	堀内 宏明 (Horiuchi Hiroaki) (00334136)	群馬大学・大学院理工学府・准教授 (12301)	
研究分担者	吉原 利忠 (Yoshihara Toshitada) (10375561)	群馬大学・大学院理工学府・准教授 (12301)	
研究分担者	松尾 一郎 (Matsuo Ichiro) (40342852)	群馬大学・大学院理工学府・教授 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------