

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 28日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21650108

研究課題名（和文） がんの超早期発見・早期治療を可能にする複合機能化 MRI 造影剤・
抗がん剤の基礎研究研究課題名（英文） Fundamental Research on Hybrids of MRI Contrast Agents and Antitumor
Agents to Innovate in Diagnosis and Curing Cancers Efficiently at the
Very Early Stage

研究代表者

山下 光司 (YAMASHITA MITSUJI)

静岡大学・創造科学技術大学院・特任教授

研究者番号：60110748

研究成果の概要（和文）：

当該研究課題では、がんの罹病率及び死亡率を激減させる為の高機能性医用材料開発の課題として、(1)～(3)の課題を行い、約80%の進捗度を達成した。(1)糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体 MRI 造影剤 DEN-OH 及びその改良型の Gd-DTPA 錯体誘導体の開発では、現在臨床使用されている Gd-DTPA ($r1 = 3.5 [\text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$) の約8倍 ($r1 = 31 [\text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$) の造影効果があり、血管造影や幹細胞がんを鮮明に画像できる DEN-OH を開発した。(2)リン糖抗がん剤の開発では、現在臨床使用されている抗がん剤の Gleevec との比較に於いて U937 細胞に対して約1000倍の抗腫瘍活性を持つ「多標的型分子標的抗腫瘍剤」の TBMPP を開発した。この新規な抗腫瘍剤は様々な種類のがんの細胞周期に共通な Cdc25B の発現を抑制するので、単剤に依る様々な種類の抗腫瘍剤として期待される。(3)の研究課題（非開示）では新規な薬剤の創製と評価を行った。

研究成果の概要（英文）：

The project contained three sub-research thema (1) – (3) and the progress of the research was 80% completion. (1) R & D of sugar dendritic Gd-DTAP complex for MRI contrast agents DEN-OH and the modification was 80% successful to develop novel blood pool MRI contrast agents and DEN-OH (prepared via hydrolysis route) drew clear blood vessels and liver cancers. The $r1$ value for DEN-OH and modified sugar Dendritic Gd-DTPA complexes were 20 – 31 [$\text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$], which are superior to clinically used Gd-DTPA ($r1 = 3.5 [\text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$) by 10 times. (2) Phospha sugar antitumor agents were developed. Among them, TBMPP and DBMPP were most active and the analogs showed 10-1000 times more active than Gleevec (clinically used drug). TBMPP suppressed the expression of Cdc25B, which is a common factor of cell cycle for various kinds of cancer cells. Therefore, phospha sugars must most probably be developed as new “Multiple Type Molecular Targeted Antitumor Agents” and the drug may cure various types of cancer patients by the single drug. (3) The application of the results (1) and (2) provided new drugs for diagnosing and curing cancers in the sub-research thema, whose results will not be disclosed at the present stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：がん早期発見・がん早期治療・MRI 造影剤・リン糖抗がん剤・複合機能化

1. 研究開始当初の背景

現在死因第1位の病気である「がん」を撲滅する為には、「がんの早期発見・早期治療」が最も有効で最も重要な課題である。現在使われている画像診断法としては、核磁気共鳴画像診断法(MRI)があり、普及している画像診断法の中で最も安全な方法である。MRI の有効性を高める為に、現在最も広く臨床使用されている造影剤の中で、Gd-DTPA(商品名:マグネvist)(図1)を基本として、マグネvistの弱点を改良することにより、現在普及型の MRI 装置のパフォーマンスを最大限に発揮する MRI 造影剤の開発が最良の研究開発の一つであると思われる。マグネvistは分子サイズが小さく血管漏出型の造影剤である故に、MRI による血管造影(MRA)が難しく Imaging-window を広くする必要があり、また、腎臓疾患患者には副作用 NSF の問題があり、マグネvistの血管貯留(Blood Pool)性を高めると同時に造影剤の分子運動を制限して顕著に造影効果を高める(マグネvistの10倍)分子設計・合成方法の開発をすることによって、造影効果及び血管貯留性を革新する必要がある。また、がんの罹病率の激減(「第3次対がん10か年計戦略」の目標)を達成する為の次の研究開発の課題として、抗がん剤の送達の可視化、がんの早期発見と同時に治療の開始、がん治療の可視化を実現する研究を達成する必要がある。

当研究室(当研究組織)の研究成果として、現在実用化されているMRI造影剤Gd-DTPAをコア部として、分子認識機能を持つ生体関連物質の糖を外殻に配置したシュガーボールデンドリマー型MRI造影剤(ここでは、DEN-OHと表記)を調製し、*in vivo* 評価により、ラットの血管造影や肝細胞がんの鮮明な描出に成功した(図2)。また、擬似糖の一種のリン糖が、(1)抗がん活性の高さ、(2)スペクトルの広さ、(3)がん細胞に対する選択性・特異性において優れており、白血病の治療薬であるGleevec (Imatinib mesylate)を凌ぐことを明らかにした。

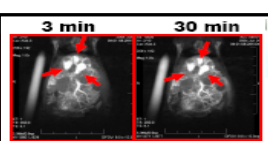
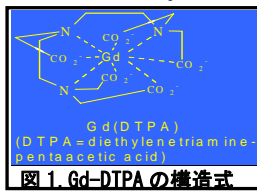


図2. DEN-OHによるラットの肝臓細胞がんの描出

これらの研究成果を基にして、当該研究では、極低濃度(マグネvistの10倍程度)でがんを描出できるMRI造影剤DEN-OH(その改良版のSuper DEN-OH)をリン糖抗がん剤でハイブリッドしてHybrid DEN-OHを開発する。当該造影剤では、リン糖部分が、がんを標的として認識する機能を備えており、複合機能化によりがんを選択的・特異的に集積しDEN-OHのMRI造影効果を更に高めるので、「がんの早期発見・早期治療」を実現するがん治療に最も効果的な創薬を実現することが期待できる。また、抗がん剤の送達の可視化及びがん治療の可視化も実現可能である。

2. 研究の目的

当該研究課題では、現在最も良く使用されているGd-DTPA錯体(マグネvist)の欠点を解決して、更に安全・安心して使用できるシュガーボールデンドリマー(糖デンドリマー)型の

DEN-OH(改良版DEN-OH)を開発する。当研究の最終ゴールは、がんの超早期発見をすると同時に治療ができるリン糖誘導体ybdiid DEN-OHを開発することであり、その為の挑戦的な研究である。

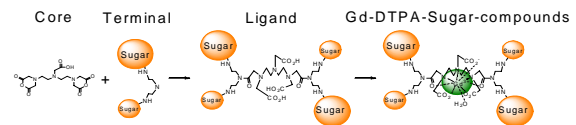
3. 研究の方法

①研究課題(1)糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体の開発

①-1糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体の調製

本研究では糖が有する組織に対する分子認識機能に着目し、Gd-DTPAをコア骨格とし、Gd-DTPAを単糖であるグルコースによりMRI造影剤分子の外殻を化学修飾した糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体の調製を行う(スキーム1)。

当該研究では、スキーム1の手法に従って、デンドリマー分子は、末端(Terminal)部及びコア(Core)部に分割したデンドリマーパーツをそれぞれ別途に合成し、コンバージョン法を用いて糖デンドリマー型DTPA配位子を合成、配位子の中心のDTPAへのガドリニウムのキレーションを行い、「糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体」を調製する。加水分解ルートでは、先ず、糖化学の基本操作として糖のOH基を酢酸エステルにより保護(OAc)した配位子のパーツを合成し、次にアセチル保護されたGd-DTPA-DETA-D2-4-Glc(OAc)(2)を調製する。アセチル体をより緩和率の高いGd-DTPA錯体誘導体とする為に、パーアセタート錯体2を加水分解して遊離のOH基とした新規なMRI造影剤として糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体(Gd-DTPA-DETA-D2-4-Glc(OH): DEN-OH(3)と略記)の合成を「加水分解ルート」により達成する(スキーム2)。また、保護/脱保護を必要としない非加水分解ルートも開発する。



スキーム1. 糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体の合成

①-2糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体の精製

錯体を形成していない未反応あるいは過剰の遊離のガドリニウムを除去するために、合成した全ての糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体を、その水溶液のpHを7.0に調整後、Chelex®100 Resinを加え6時間攪拌する。その後、キシレノールオレンジによる遊離のGd(III)イオンの呈色試験による色の変化により遊離のGd(III)イオンの除去を確認する。

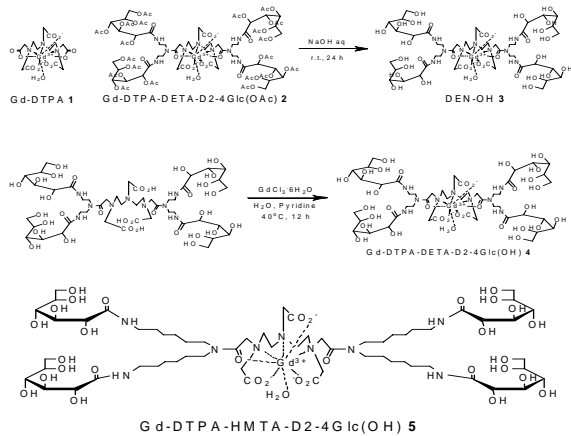
①-3合成したGd錯体の*in vitro*評価

①-3-1縦緩和時間(T_1)の測定

合成したGd(III)錯体を超純水に溶解させ、*in vitro* 評価として、卓上核磁気共鳴装置 Minispec (TD-NMR) (緩和時間測定装置)を用いて水のプロトンの T_1 を測定する。緩和時間は温度依存性が大きく、温度が上昇するほど緩和時間は長くなることが知られている。また、造影剤は体内に投与されることを考慮に入れ水溶液の温度を37°Cに固定して測定を行なう。測定誤差が極小になるよう一つのGd錯体につき5回の測定を行ない、得られた値の平均値を縦緩和時間(T_1)とする。

①-3-2Gd濃度の測定

緩和時間は造影剤のGd(III)濃度に依存しているため、ICP発光分光分析装置を用いて緩和時間の測定に使用した試料水溶液のGd濃度を測定する。また、各水溶液のGd濃度を測定する際に基準



スキーム 2. Gd-DTPA 錯体 (Magnevist (1))、加水分解ルートによる糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体 (Gd-DTPA-DETA-D2-4-Glc(OH) (3)) の調製、及び非加水分解ルートによる糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体 (Gd-DTPA-DETA-D2-4-Glc(OH) (4)、並びに遊離の OH 基の糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体 (3~5)) の構造式

となる検量線は、一定濃度に調整した 3 種類の Gd 水溶液を用いて作成する。

① -3-3 縦緩和率 (r_1) の測定

造影剤の Gd(III) に配位した水の強調されたプロトンの緩和時間を測定することにより得られる緩和特性 (緩和率) は、造影剤としての性能を示す重要なパラメータとなる。しかし、緩和時間は造影剤の Gd 濃度に依存するため緩和時間を Gd 濃度で割った緩和率が指標として用いられている。縦緩和率 (r_1) は以下の式 (式 (1)) から求めることが出来る。

$$r_1 = \frac{1}{T_1} \times 1000 - r_1^{H_2O} \quad (1)$$

r_1 ; 縦緩和率 [$s^{-1} \cdot mM^{-1}$]

T_1 ; 縦緩和時間 [ms]

$r_1^{H_2O}$; 水の縦緩和率 [$s^{-1} \cdot mM^{-1}$]

[Gd(III)] ; Gd(III) 濃度 [mM]

① -3-4 合成した Gd 錯体の *in vivo* 評価

合成した Gd 錯体の実用性を評価するためにラットを用いた *in vivo* 評価を行なう。超伝導磁気共鳴画像撮影装置 (Signa 3.0 T) を用いて MRI 画像を撮像する。

① -3-5 ドッキングシミュレーション

アルブミンのポケットとの相互作用や安定性を計算によりシミュレートする方法として統合計算化学システム MOE (Molecular Operating Environment) のドッキングシミュレーションを用い、生体内における糖デンドリマー型 Gd-DTPA とアルブミンとの相互作用に付いて検討する。

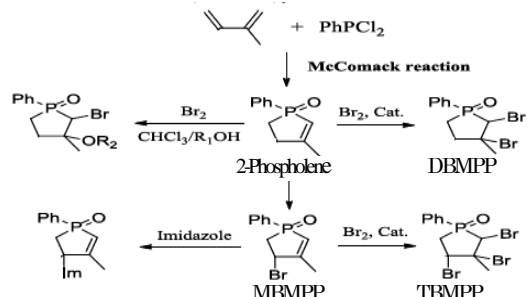
② 研究課題 (2) リン糖抗がん剤の開発

② -1 リン糖抗がん剤の創製

リン糖誘導体合成の原料として 2-ホスホレン 1-オキド類を三価リン化合物と 1,3-ジエン類との McComack 反応により合成した。例えば、3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキドは、イソプレン (2-Methyl-1,3-butadiene) とフェニル亜ホスホン酸ジクロリドとの McComack 反応により合成中間体として生成する塩化 3-メチル-1-フェニル-3-ホスホレンニウムの加水分解で得る。3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキドを原料として、4 位のブロモ化反応、2,3 位のジブロモ化反応、2,3-位のエポキシ化反応、2-ブロモ-3-ヒドロキシ化反応等のホスホレンの多様な反応活性点に対する置換反応や付加反応等により様々な種類のリン糖誘導体を調製する。更には、更なる置換反応や環化反応等によ

りに、分岐糖、デオキシハロリン糖、リン糖スクレオシド、リン糖イノスクレオシド、アンヒドロリン糖等の様々なリン糖類似体を創製する。例えば、分岐デオキシブロモリン糖 MBMPP、DBMPP や TBMPP などの合成ルートをスキーム 3 に示す。

② -2 リン糖抗がん剤の *in vitro* 評価



スキーム 3. 数種類の置換リン糖誘導体 (ジブロモ体 DMPP、トリブロモ体 TMPP、等) の合成

リン糖誘導体を白血病細胞 (K562 細胞 (ヒト慢性白血病細胞) や U937 細胞 (ヒト急性白血病細胞) など) に対して MTT 法による *in vitro* 評価を行う。

③ 研究課題 (3) (非開示)

4. 研究成果

① 研究課題 (1) の研究成果のまとめ

In vitro において、試料水溶液の水のプロトンの T_1 を測定することにより合成した糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体の造影剤としての性能評価を行った。 T_1 および [Gd(III)] の測定結果から式 (1) を用いて求めた各 Gd 錯体の r_1 を表にして示す (表 1)。

表 1. 水中における各 Gd 錯体の縦緩和率 (r_1)

Entry	Compound	r_1 [$s^{-1} \cdot mM^{-1}$] (37 °C)
1	Gd-DTPA (Magnevist)	3.5
2	Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	6.4
3	DEN-OH	31.0
4	Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	6.3
5	Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)	8.1

本研究で調製した全てのデンドリマー型 Gd-DTPA 錯体は Gd-DTPA(1) と比較して高い r_1 を示した。中でも DEN-OH (3) は r_1 が $31 [s^{-1} \cdot mM^{-1}]$ と Gd-DTPA と比較して 8 倍以上であった。これは、DEN-OH は臨床において、Gd-DTPA (通常・の使用濃度: 0.1 mM/Kg) よりも 1/10 程度の低濃度での使用が可能であることを示唆している。欧米では、血管造影 (MRA) において、長時間に亘って鮮明な画像を得るために Gd-DTPA を 2 回~3 回投与 (double or triple dose) することがあり、遊離の Gd(III) による「腎性全身性線維症 ((Nephrogenic systemic fibrosis (NSF))) が Gd-DTPA 錯体の副作用として、近年になり報告されるようになってきた。それ故、MRI 造影剤は、MRA においては低濃度で鮮明な画像を 1~2 時間程度与えられることが臨床の現場で求められている条件の一つであり DEN-OH (3) はその条件を満たした新規 MRI 造影剤となるポテンシャルを有している。しかし、非加水分解ルートの Entry 5 の Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (5) の r_1 は DEN-OH (3) と比較して 1/5 であった。Gd 錯体の加水分解条件に影響されるのではないかと考えられる。

In vitro 評価において、合成した糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体は現在臨床に用いられている Gd-DTPA 錯体 (Magnevist) よりも MRI 造影剤として高機能であることが示唆された。合成した Gd 錯

体の実用性を評価するためにラットを用いた *in vivo* 評価を行なった。スキーム 1 の MRI 造影剤 1 及び 3, 5 の各種 Gd 錯体の *in vivo* 評価を、それぞれ図 3~図 6 に示す。

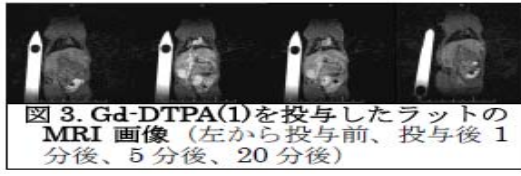


図 3. Gd-DTPA(1)を投与したラットの MRI 画像 (左から投与前、投与後 1 分後、5 分後、20 分後)



図 4. DEN-OH(3)を投与したラットの MRI 画像 (左から投与前、投与後 1 分後、5 分後、20 分後)

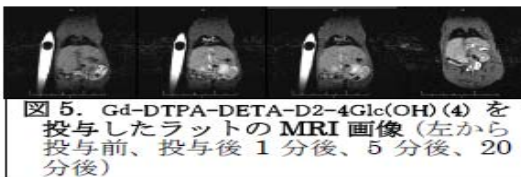


図 5. Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (4) を投与したラットの MRI 画像 (左から投与前、投与後 1 分後、5 分後、20 分後)



図 6. Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) (5) を投与したラットの MRI 画像 (左から投与前、投与後 1 分後、5 分後、20 分後)

DEN-OH によるラットの血管造影及び肝細胞がんの造影の *in vivo* 評価を Gd-DTPA 錯体と比較した結果を図 7 及び図 8 に示す。図 7 では DEN-OH は通常の半分の濃度の 0.05 mM/Kg の尾静脈から単回投与により 3 分~1 時間以上に亘って血管の鮮明な画像を与えているのに対して、Gd-DTPA 錯体は投与後 3 分程度 (~5 分程度) では血管が描出されているが、30 分では血管造影が出来ていない。

血管造影(MRA) *in vivo* 評価(ラットの血管造影)

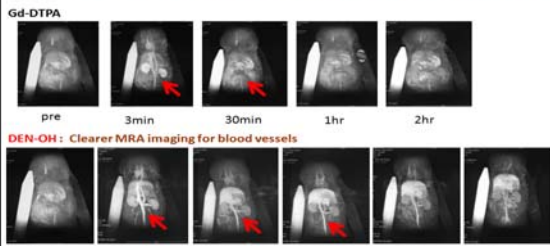


図 7. DEN-OH の血管造影の *in vivo* 評価(マグネビストとの比較) DEN-OH は血管貯留性に優れ、長時間にわたって明瞭な MRA を描出、広い Imaging Window を持つ (NSF 腎性全身性線維症問題の解消)

また、図 8 は、ラットの肝細胞がんの造影を、DEN-OH を用いた場合と Gd-DTPA 錯体を用いた場合の MRI の *in vivo* 評価の比較である。DEN-OH では造影剤投与後の 3 分以降に肝細胞がんを鮮明に画像化しているが、Gd-DTPA では画像診断が難しい。

DEN-OH は血管貯留性に優れ、血液成分と相互作用を有するので、体内での出血(例えば、腹腔内出血)の画像化にも成功した。DEN-OH は MRI 造影剤として、腹腔鏡下手技等低侵襲性の QOL の高い治療では、視野の狭い腹腔鏡下で見落とす可能性のある出血を画像化出来るので、医療過誤を防止する有効な画像診断技術を提供する。

以上の結果から、本研究で創製した糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体は、Blood Pool Agents として優れた特徴を示し、新規 MRI 造影剤として、持続性のある高画質の画像を与え、がん造影、血管造影、腹腔内出血描出等において優れたポテン

がん(ラットの肝細胞がん)の MRI 画像

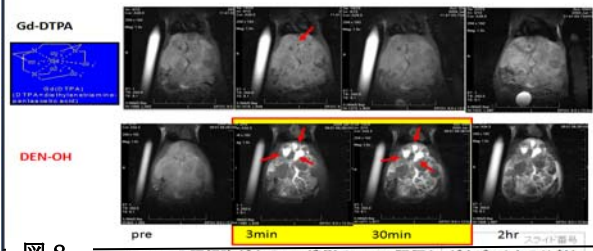


図 8. DEN-OH の肝細胞がんの MRI 造影の *in vivo* 評価(マグネビストとの比較)

シャルを有している。これらの MRI 造影剤の糖デンドリマー型分子構造は MRI 画像診断法の更なる性能向上のための分子設計の指標になると考えられる。糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体の DEN-OH は、血管内貯留性の Gd-DTPA 錯体であり、現在臨床使用されている Gd-DTPA 錯体 (Magnevist) との比較において、血管造影 (MRA) 及び初期の肝細胞がんの造影等に非常に優れた造影効果を示した。また、血液成分との相互作用が強いので、腹腔内出血も鮮明に画像化できた。それ故、当該の研究開発の成果は、現状の MRI 画像診断技術を革新する低侵襲性医療技術を提供し、普及型の MRI 装置によって、従来品の Gd-DTPA 錯体の 1/10 程度の低濃度の造影剤により質の高い安全・安心・QOL の高い画像診断技術を提供する。また、QOL の高い内視鏡や腹腔鏡の手技の際の腹腔内等の微量の出血に対する優れた可視化技術も提供でき、医療技術の革新を齎す研究成果を得た。それ故、当該技術が、臨床研究を経て実用化できれば、国産による新規な優れた MRI 造影剤を商品化できる。(糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体関係特許 7 件)

② 研究課題(2)の研究結果のまとめ

リン糖誘導体を白血病細胞 (K562 細胞(ヒト慢性白血病細胞)や U937 細胞(ヒト急性白血病細胞)など) に対して MTT 法により *in vitro* 評価を行うと、アンヒドロ糖あるいはデオキシ糖が抗腫瘍活性を示した。また、健全な細胞に対しては作用しない(健全細胞は死なない)特徴を示した。リン糖誘導体の中でも、デオキシハロリン糖誘導体の DBMPP や TBMPP 等は高い抗腫瘍活性を示した。図 9 に DBMPP や TBMPP の U937 細胞に対する抗腫瘍活性評価結果を Gleevec® (Imatinib mesylate) (Gleevec は現在臨床使用されているチロシンキナーゼ活性阻害による優れた分子標的薬剤) と比較して示す。更に、構造-活性相関等の研究結果を基に、抗腫瘍活性の高い分子を設計して新規なリン糖を調製し K562 細胞及び U937 細胞に対して *in vitro* 評価したところ、Gleevec の活性よりも更に 1~2 桁程活性の高いリン

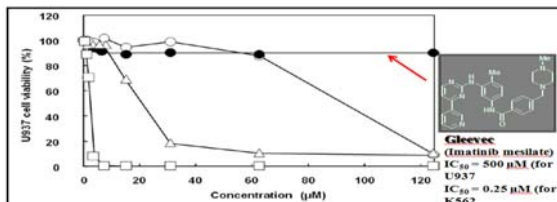


図 9. リン糖類の白血病細胞(U937(当該の図及び K562))に対する DBMPP (○)、DBMPP (△)、TBMPP (□) の効果 (Gleevec® (●) との比較に於いてリン糖類は高い抗腫瘍活性を示す。)

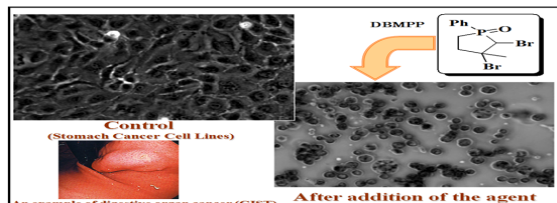


図 10. 固形がん(胃がん細胞 NKH-45)に対するリン糖の抗腫瘍活性評価(浜松医科大学 藤江三三男博士)

糖誘導体)を得た(構造式、図及びデータ非開示)。また、リン糖誘導体は、血液がんの白血病のがん細胞の U937 細胞や K562 細胞の他に、様々な白血病細胞に対しても、高い抗腫瘍活性を示した。更に、肺がん、胃がん、皮膚がん等の固形がんに対しても高い活性を示した(図 10)。

リン糖誘導体 DBMPP あるいは TBMPP 等は、Gleevec との比較において、(a) 高い抗腫瘍活性、(b) 血液がん細胞(白血病細胞)に対する広いスペクトル(白血病等の血液がんの K562 細胞、U937 細胞の他に様々な種類の白血病細胞(がん化白血球)に抗腫瘍活性)を示し、(c) 肺がん等の固形がんに対しても活性を示した。それ故、リン糖には、様々な種類のがん細胞に有効な抗腫瘍活性が期待される。MTT 法によれば、健康な白血球はリン糖によるダメージを受けず、がん化白血球と健康な白血球の混合物に対してはがん化白血球の割合に比例して細胞死が認められ、リン糖は(d) がん細胞に対して特異的・選択的に作用する特徴を持つことが示された。

「リン糖」の白血病細胞に対する抗腫瘍活性は、細胞周期解析の結果、Gleevec と同様に(e) アポトーシスを誘起する作用機序(図 11)であり、Western Blotting 解析の結果、リン糖類が、(f) 複数のがん化促進因子の発現を抑制し、複数のがん抑制因子の発現を促進することを明らかにした(図 12)。また、リン糖 TBMPP は、様々ながん細胞の細胞周期に共通なタンパクの Cdc25B の発現を抑制することが最近の研究により明らかとなった(図 13 及び新聞記事(図 14))。それ故、「リン糖抗腫瘍剤」は、従来にないタイプの新規な「多標的型分子標的抗腫瘍剤」となり得る。

従って、現在のがん治療は「多剤併用」治療を基本とするが、「リン糖抗腫瘍剤」によれば、「単剤」により、変異がん、耐性がん、後期がんなどの現在の医療技術では治療が難しいがんに対する治療に効果を発揮できる可能性があり、「夢の抗腫瘍剤」の開発が期待され、患者の QOL の飛躍的改善を図ることが出来る。更に、治療費の軽減等も達成できる画期的な「分子標的療法薬剤」となり得る。現在、「リン糖誘導体」のリポソーム、ツイーン、シクロデキストリン等による水溶化を達成して、*in vivo* 評価を行っている。今後、トランスレーショナルリサーチを経て、企業等との連携による実用化を行う研究開発段階に達したと言える。(リン糖関係特許 16 件)

本研究課題では、新たに合成した低分子化合物の「リン糖」誘導体に、白血病細胞を含めた様々な種類(広いスペクトル)のがん細胞種に対して、特異的・選択的に作用し、がん細胞の増殖を抑制する効果があることを発見し、論文で報告した。また、構造-活性相関を基にして、抗腫瘍活性の高いデオキシハロリン糖誘導体を創製し、それらの抗腫瘍活性及び作用機序等を解析した。

リン糖の抗腫瘍活性は、Gleevec との比較において、(a) 高い活性、(b) 広いスペクトルを示し、(c) がん細胞に対して選択的・特異的に作用した。また、細胞周期解析により、リン糖は、(d) Gleevec と同様にがん細胞に対してアポトーシスを誘起することによってがん細胞を死滅させる。Western Blotting 解析により、リン糖は、(e) 複数のがん化促進因子及び複数のがん抑制因子に影響を与え、がん化促進因子の発現を抑制し、がん化抑制因子の発現を亢進する「多標的型分子標的抗腫瘍剤」としての特徴を示した。更に、最近、リン糖の TBMPP がどのようにして白血病細胞の増殖を阻害しているのかを明らかにし、論文やメディアで発表した(図 13 及び 14)。

細胞の増殖は細胞周期といわれる染色体の複製、分配により、細胞が分裂を繰り返すことに

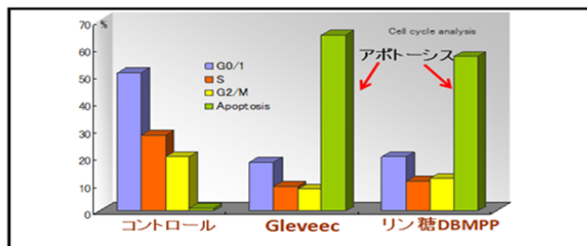


図 11. リン糖 DBMPP の白血病細胞の細胞周期に対する効果(細胞周期解析のコントロールと Gleevec(アポトーシス誘起)、DBMPP との比較【DBMPP は Gleevec 同様にアポトーシスを誘起】)

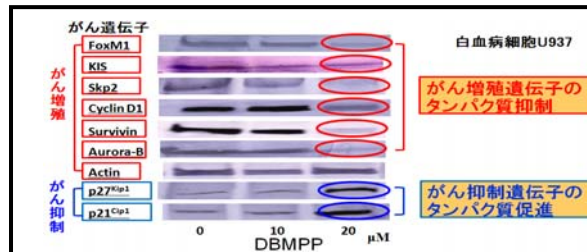


図 12. Western Blotting 解析(U937 細胞に対する DBMPP により影響を受ける因子の解析)【リン糖は複数のがん化促進因子を抑制し、複数のがん抑制因子を亢進する。】

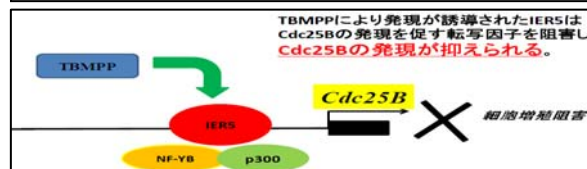


図 13. リン糖 TBMPP は白血病細胞に対して IER5 の発現を抑制更新する。その結果、様々な種類のがん細胞の細胞周期に共通な Cdc25B の発現を抑制し、がん細胞にアポトーシスを誘起して、がん細胞を死滅させる。

「リン糖」利用し増殖実験 がん増殖抑制効果

2011年11月25日 | 中日新聞 | 朝刊 | その他

治療薬開発に期待

浜松医科大学血液内科の中村博己(とどろき)助教(44)と静岡大工学部の山下光司名誉教授(67)らによる共同研究グループは24日、低分子化合物「リン糖」を利用した増殖実験で、がんの増殖を抑える効果が検証できたと発表した。がんの遺伝子「Cdc25B」を直接抑え込む効果があり、新規抗がん剤の開発に期待がかかる。今後、動物実験に入り、実用化を目指す。

リン糖は、糖を構成する4つの分子の1つ「フルクトース」に、リンと酸素を結合させた化合物。除癌剤の研究を進めていた山下名誉教授が5年前、合成に成功した。雑草を駆除する効果があり、人のがん細胞を死滅させられないかと中村助教に検証を依頼した。

がんは、染色体の複製や分配を一定の周期で繰り返す細胞分裂によって増殖する。中村助教は2年がかりで、リン糖ががん抑制遺伝子「IER5」を増やすことを新たに突き止めた。結果的にCdc25Bが抑えられるのではないかと考えた。

実験はヒトの白血病と肝臓がんの細胞を使った。培養液にリン糖を一定量溶かしたところ、18時間から24時間でCdc25Bの活動を抑え、細胞分裂が止まったことが確認できた。

今回の研究は、がんの増殖や転移を抑える分子標的治療薬開発の基礎研究で、中村助教は「Cdc25Bを標的とした薬剤は、さまざまな種類のがんに共通して利用できる抗がん剤の開発につながる」と話している。

山下光司名誉教授 | 中村とどろき助教

図 14. PLoS ONE 誌掲載論文の中日新聞記事(2012年11月25日朝刊)「「リン糖」は、Cdc25B の発現を抑制するので様々な種類のがんの治療が可能」つなごう医療(中日メディカルサイト)

よりもたらされる。がん細胞はこの細胞周期の速度が速く、細胞の複製が無秩序に起こる。化学療法によりがん細胞の増殖を抑え、がん細胞の細胞周期を制御することが有効であり、治療に結びつく。合成した「リン糖」誘導体には細胞周期を止め、白血病細胞の増殖を抑えることが明らかになった。その作用機序として、細胞周期の速度を促進させる Cdc25B という様々な種類のがん細胞に共通の蛋白質の発現を直接抑え込むことができることが明らかとなった。つまり、(f) 合成されたリン糖誘導体は、この蛋白質の発現を抑え込むことにより、様々な種類の白血病細胞の増殖を止めることができることが示され、Cdc25B を標的とする分子標的治療薬としての可能性を持つことが明らかになった。また、これまでの分子標的治療薬は標的のスペクトルが狭いために、がんの種類毎に異なった抗がん剤を臨床使用しているが、様々な種類のがん細胞の細胞

周期に共通の Cdc25B を標的とするこの薬剤は、様々な種類のがんに共通して用いることができる抗がん剤の開発につながる可能性があり、単剤による治療・次世代のがん治療に有効な化合物であると考えられる極めて新規で画期的な新しい研究成果を上げる事が出来た。

③ 研究課題(3)の研究成果のまとめ

研究課題(3)は特許等の関係で非開示とする。尚、研究課題(3)は研究課題(1)及び(2)の応用であり、「がんの早期発見・早期治療」の革新の為に真に画期的な研究課題である。研究課題(3)により、がんの罹病率及び死亡率の激減を図ることができる薬剤の開発が期待される研究成果を得た。

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)

[学術雑誌論文] (計 15 件)

- (1) Mayumi Yamaoka, Mitsui Yamashita, Manabu Yamada, Michio Fujie, Keita Kiyofuji, Nobuhisa Ozaki, Kazuhide Asai, Taishi Niimi, Takuya Suyama, Junko Yamashita, Akiho Sawada, Reiko Makita, Masaki Sugiyama, Mitsuo Toda, Satoki Nakamura, and Kazunori Ohnishi, "Synthesis and evaluation of novel phosphosugar anticancer agents", *Pure and Applied Chemistry*, (2012), **84** (1), 37-48. 査読有
- (2) Satoki Nakamura, Yasuyuki Nagata, Lin Tan, Tomonari Takemura, Kiyoshi Shibata, Michio Fujie, Shinya Fujisawa, Yasutaka Tanaka, Mitsuo Toda, Reiko Makita, Kenji Tsunekawa, Manabu Yamada, Mayumi Yamaoka, Junko Yamashita, Kazunori Ohnishi, and Mitsui Yamashita, "Transcriptional repression of Cdc25B by IER5 inhibits the proliferation of leukemic progenitor cells through NF-YB and p300 in acute myeloid leukemia", *PLoS One*, (2011), **6**(11), e28011. 査読有
- (3) Keita Kiyofuji, Kenji Tsunekawa, Mitsui Yamashita, Junko Yamashita, Michio Fujie, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Satoru Ito, Valluru Krishna Reddy, Manabu Yamada, Keisuke Ogawa, Nobuhisa Ozaki, Masaki Sugiyama, Mayumi Yamaoka, Reiko Makita, Satoki Nakamura, Takashi Aoki, Gang Yu, Kengo Aoshima, Nao Kamikage, Yasuo Takehara, Harumi Sakahara, Hisao Takayanagi, Sophie Laurent, Carmen Burtea, Luce Vander Elst, and Robert N. Muller, "Preparation and evaluation of novel sugar dendritic Gd-DTPA complexes for MRI contrast agents and phospho sugars for anti-tumour agents", *Advanced Materials Research (Dunten-Zurich, Switzerland)*, (2011), **222**, 217-220. 査読有
- (4) Kenji Tsunekawa, Mitsui Yamashita, Michio Fujie, Taishi Niimi, Takuya Suyama, Kazuhide Asai, Satoru Ito, Junko Yamashita, Manabu Yamada, Nobuhisa Ozaki, and Satoki Nakamura, "Preparation of phospho sugar analogs and their evaluation as novel anticancer agents", *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, (2011), **186**(4), 936-944. 査読有
- (5) Manabu Yamada, Kazuhide Asai, Junko Yamashita, Takuya Suyama, Taishi Niimi, Kasthuraiah Maddali, Michio Fujie, Satoki Nakamura, and Mitsui Yamashita, "Preparation and Characterization of Phospho Sugar Analogs, 2,3-Dibromo-3-methyl-1-phenylphospholane 1-Oxide Derivatives, as Novel Anticancer Agents.", *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, (2010), **185**(11), 2286-2291. 査読有
- (6) Manabu Yamada, Mitsui Yamashita, Takuya Suyama, Junko Yamashita, Kazuhide Asai, Taishi Niimi, Nobuhisa Ozaki, Michio Fujie, Kasthuraiah Maddali, Satoki Nakamura, and Kazunori Ohnishi, "Preparation and characterization of novel 4-bromo-3,4-dimethyl-1-phenyl-2-phospholene 1-oxide and the analogous phosphorus heterocycles or phospho sugars.", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2010), **20**(19), 5943-5946. 査読有
- (7) Satoki Nakamura, Mitsui Yamashita, Daisuke Yokota, Isao Hirano, Takaaki Ono, Michio Fujie, Kiyoshi Shibata, Taishi Niimi, Takuya Suyama, Kasthuraiah Maddali, Kazuhide Asai, Junko Yamashita, Yukiko Iguchi, and Kazunori Ohnishi, "Development and pharmacologic characterization of deoxybromophospho sugar derivatives with antileukemic activity.", *Investigational New Drugs*, (2010), **28**(4), 381-391. 査読有
- (8) Nobuhisa Ozaki, Angara Uma Ravi Sankar, Mitsui Yamashita, Takashi Aoki, Yasutaka Tanaka, Motohiko Kimura, Mitsuo Toda, Michio Fujie, Yasuo Takehara, and Harumi Sakahara, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2010), **20**(3), 932-934. 査読有
- (9) Manabu Yamada, Kazuhide Asai, Junko Yamashita, Takuya

Suyama, Taishi Niimi, Kasthuraiah Maddali, Michio Fujie, Satoki Nakamura, Motohiko Kimura, Yasutaka Tanaka, Mitsuo Toda, and Mitsui Yamashita, "Synthesis of some 1-aryl-2,3-dibromophospholanes as novel anti-cancer agents.", *Heterocyclic Communications*, (2010), **16**(2-3), 173-180. 査読有

- (10) Junko Yamashita, Takuya Suyama, Kazuhide Asai, Manabu Yamada, Taishi Niimi, Michio Fujie, Satoki Nakamura, Kazunori Ohnishi, and Mitsui Yamashita, "Research and development of phospho sugar anti-cancer agents with anti-leukemic activity.", *Heterocyclic Communications*, (2010), **16**(2-3), 89-97. 査読有 【その他5件】
[学会発表] (計 52 件)

- (1) M. Yamashita, et al., "Research and Development of Medicinal Materials for Diagnosing and Curing Cancer (3) — Synthesis and Evaluation of Novel Phospho Sugar Anti-cancer Agents", Inter-Academia 2011 (10th International Conference on Global Research and Education; IA2011), September 26-29, 2011, Alexandru Ioan Cuza University (Sucevita, Romania).

- (2) Mitsui Yamashita, et al., "Medicinal Materials for Diagnostic Imaging and Curing Tumors: Syntheses and Evaluation of Sugar-Ball-Dendritic MRI Contrast Agents and Phospho Sugars", 21st International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO 21), August 21-26, 2011, University of Vienna (Vienna, Austria).

- (3) Mayumi Yamaoka, Mitsui Yamashita, et al., "Preparation and Evaluation of Novel Phospho Sugars or Phospholanes for Anti-cancer Agents", 23rd International Congress on Heterocyclic Chemistry (IHC2011), July 31-August 4, 2011, Glasgow Science Centre (Glasgow, Scotland, UK). 【その他49件】

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

名称: 基材の親水化処理方法および親水性基材

発明者: 山下光司、小坂友護

権利者: 山下光司

種類: 特許

番号: 特許登録第 4703954 号

取得年月日: 平成 23 年 3 月 18 日

国内外の別: 国内

名称: エポキシ誘導体の製造方法

発明者: 山下光司

権利者: 山下光司

種類: 特許

番号: 特許登録第 4417616 号

取得年月日: 平成 21 年 12 月 4 日

国内外の別: 国内

【その他】

ホームページ等

<http://shizuoka-6m.web.infoseek.co.jp/yama/yama.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 光司 (YAMASHITA MITSUJI)

静岡大学・創造科学技術大学院・特任教授

研究者番号: 60110748

(2) 研究分担者

阪原 春海 (SAKAHARA HARUMI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10187031

竹原 康雄 (TAKEHARA YASUO)

浜松医科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 70188217

中村 悟己 (NAKAMURA SATOKI)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20377740

岡野 孝 (OKANO TAKASHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90194373

藤江 三千男 (FUJIE MICHIO)

浜松医科大学・技術部・技術専門員

研究者番号: 90397373

(3) 連携研究者

MULLER Robert, Nicolas, Henry

University of Mons, Belgium・School of Medicine

and Pharmacy・教授 (学部長)

研究者番号: なし

Wiemer, F. David

University of Iowa, USA・Department of

Medicine・教授 (学部長)

研究者番号: なし

György Keglevich

Budapest University of Technology and Economics, Hungary・

Dept. of Organic Chemistry and Technology・教授 (学部長)

研究者番号: なし

C. Suresh Reddy

Sri Venkateswara University, India・Dept. of Chemistry・准教授

研究者番号: なし