

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591842

研究課題名(和文)腫瘍移植鶏卵モデルによる低酸素腫瘍の解糖系亢進を標的とした新規放射線増感剤の創製

研究課題名(英文)Design of radiosensitizers targeting for glycolysis of hypoxic tumor based on tumor implanted chick embryo

研究代表者

宇都 義浩(UTO, Yoshihiro)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20304553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、低酸素がん細胞が解糖系に依存していることに着目し、解糖系の基質となるグルコースに放射線増感活性基を付与した「ニトロアゾール修飾グルコース型放射線増感剤」の創製である。実施内容として、アセチルグルコース修飾2-ニトロイミダゾール体TX-2244およびその誘導体5種類を分子設計・合成し、腫瘍細胞や腫瘍移植鶏卵モデルを用いて放射線増感活性やその作用機序の解析を行った。得られた成果として、TX-2244はグルコースの細胞内取り込み阻害、細胞内NADH量の低下、放射線由来DNA損傷の増強を介して高い放射線増感活性を発揮することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is the development of the "nitroazole-modified glucose type radiosensitizers" which gave the radiosensitizing active group to glucose used as the substrate of a glycolytic system paying attention to the hypoxic cancer cell being dependent on a glycolytic system. As contents of the research, the design and synthesis of acetylglucose-modified 2-nitroimidazole TX-2244 and its five derivatives were done, and analysis of radiosensitizing activity and its enhancing mechanism was conducted using tumor cells and a tumor-implanted chicken egg model. It was shown clearly that TX-2244 demonstrates high radiosensitizing activity as an obtained result through the prevention of intracellular uptake of glucose, the decrease of the level of intracellular NADH(s), and increase of DNA damage by radiation.

研究分野：医歯薬学

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：放射線腫瘍学 低酸素細胞放射線増感剤 腫瘍移植鶏卵 解糖系酵素

1. 研究開始当初の背景

低酸素がん細胞は、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、低酸素誘導因子 HIF を介して細胞増殖・血管新生・糖代謝・浸潤・転移などががん細胞特性に深く関わっている細胞で、最近ではがん幹細胞ではないとも言われている、治療上重要な細胞である。この低酸素がん細胞に対する放射線治療効果を増強する低酸素細胞放射線増感剤の開発が国内外の多くの研究者によって試みられてきたが、現在までの成功例はデンマークにおいて頭頸部癌の治療薬として臨床適用されているニモラゾールのみである。一方、芝本らとの共同研究での担癌マウスを用いたニモラゾールの再評価では、ニモラゾールは 2-ニトロイミダゾール系増感剤 KU-2285 やトリアゾール系増感剤サナゾールよりも弱い *in vivo* 抗がん活性を示したことから、薬物分子自体の物性により薬物動態をコントロールするような古典的な放射線増感剤は生体内ではあまり有効性が期待できない。これに対して、近年、放射線に化学療法剤を併用によって治療効果向上が明らかとなり、化学放射線療法が多く試みられてきている。しかし化学放射線療法で使用される抗癌剤の多くは 5-FU やゲムシタピン、プラチナ系薬剤、アルキル化剤といった細胞毒性を発揮する抗癌剤であり、治療効果増強と引き換えに副作用も強くなるといった弊害がある。また、これらの薬剤は増殖性細胞に対しては高い抗がん効果を示すが、低 LET 放射線に抵抗性を有する低酸素がん細胞に対して非選択的で低い抗がん活性のため、低酸素細胞の放射線抵抗性の問題を克服することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞、特に低酸素がん細胞での、ミトコンドリア ROS 経路アポトーシスの回避のための亢進した解糖系に着目し、解糖系の基質となる単糖、特にグルコースに放射線増感活性基を付与した「ニトロアゾール修飾グルコース型放射線増感剤」の創製が目的である。

3. 研究の方法

第一に、「ニトロアゾール修飾グルコース型放射線増感剤」を分子設計・合成する。そのリード分子としては、グルコースの 2 位のヒドロキシル基を 18F に置換した F-18 fluorodeoxyglucose (FDG) やヒドロキシル基を除去した DG、また、最近では 2 位に蛍光剤を導入した 2-NBDG がグルコース取り込みのイメージング剤として注目されていることから、グルコースの 2 位がニトロアゾール基の導入箇所として挙げられる。また、既知のアルキル化剤とグルコースが 1- 結合したグルフォスファミドも、グルコースと同様にグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれることが示唆されている。こ

れらの知見を元に定量的構造活性相関 (QSAR) を行い、「ニトロアゾール修飾グルコース型放射線増感剤」を創出する。第二に、得られた「ニトロアゾール修飾グルコース型放射線増感剤」の薬物動態解析を行う。実験系としては、低酸素環境で GLUT を発現している癌細胞を用いる *in vitro* 系と腫瘍移植鶏卵を用いた *in vivo* 系を用いることで、細胞内取り込みだけでなく ADME/Tox (吸収・分布・代謝・排泄/毒性) も評価する。第三に、「ニトロアゾール修飾グルコース型放射線増感剤」の放射線増感活性を評価する。低酸素環境下で培養した癌細胞に対するコロニー形成試験および腫瘍移植鶏卵の腫瘍成長遅延実験を行い、*in vitro* 活性と *in vivo* 活性の相関について検討し、リード候補化合物を選出する。第四に、リード候補化合物について放射線増感・抗がん作用機序を明らかにする。その方法として、細胞系で各低酸素マーカーの量的変化をウェスタンブロットで観察すること、また、低酸素環境下で特異的に蛍光を発現する細胞を移植した腫瘍移植鶏卵を用いた形態観察により評価する。第五に、得られたすべての結果について QSAR を行い、最適な「ニトロアゾール修飾グルコース型放射線増感剤」を 1 つ以上創出して本研究を完了する。

4. 研究成果

初年度は、グルコースの 6 位ヒドロキシル基を 2-ニトロイミダゾール基に置換した UTX-86 およびそのアセチル化体である UTX-87 を分子設計・合成した。放射線増感活性の指標として MOPAC03 を用いて電子親和性 (EA) を求めたところ、UTX-86 が EA=0.7713eV、UTX-87 が EA=0.7677eV となり、リード化合物の TX-2244 (EA=0.9661) と比較してやや低い電子親和性を示した (図 1)。

Synthesis and molecular orbital of UTX-86 and UTX-87

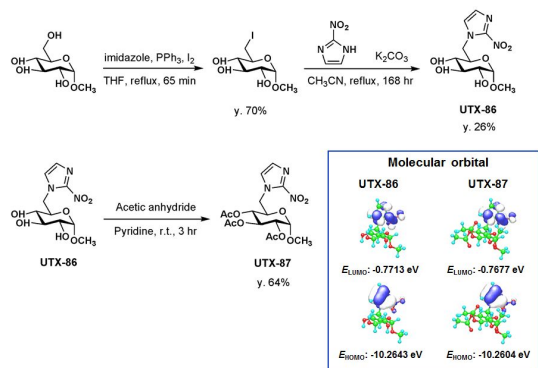


図 1. UTX-86 と UTX-87 の電子親和性

また、薬物動態の指標として Pallas 3.0 を用いて疎水性パラメータを算出したところ、UTX-86 が P=0.023、UTX-87 が P=0.87 であり、UTX-86 は TX-2244 (P=0.105) よりも低い疎水性を示した。マウス乳癌由来 EMT6/KU 細胞に対する *in vitro* 低酸素細胞放射線増感活性は、UTX-86 が ER=1.37 (1.0mM),

UTX-87 が ER=1.01 (1.0mM) であり, TX-2244 (ER=2.30、1.0mM) と比べて大きく活性が低下した(図2)。

In vitro radiosensitizing activity of UTX-86 and UTX-87

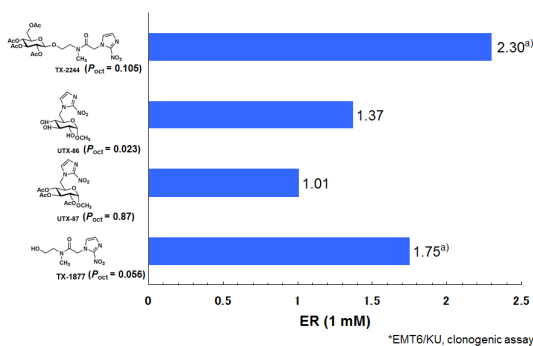


図2. 各化合物の低酸素細胞放射線増感活性

両化合物の細胞内取り込みについて細胞抽出液を逆相 HPLC で評価したところ, UTX-86 が 0.67%、UTX-87 が 1.39% であり, 疎水性に比例した取り込み率を示した。また, グルコースの取り込み阻害活性を 2-NBDG 法で調べたところ, UTX-87 (1mM) はグルコーストランスポーター (GLUT) の阻害剤であるサイトカラシン B (10uM) と同程度の阻害活性を示したが, UTX-86 は全く阻害活性を示さなかった(図3)。

Inhibitory activity on glucose uptake by UTX-86 and UTX-87

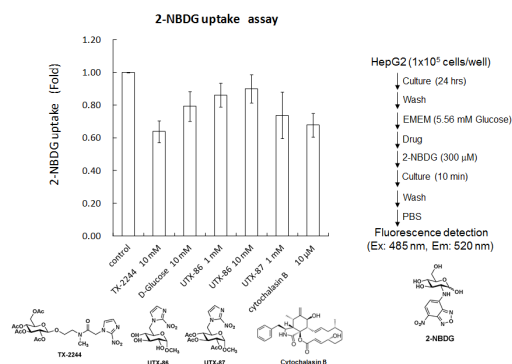


図3. 各化合物のグルコース取り込み阻害活性

以上の結果より, GLUT に対する阻害活性は放射線増感活性に寄与しない事, グルコースの6位ヒドロキシル基の2-ニトロイミダゾール基による置換は放射線増感活性に不利に働くことが示唆された。

次年度は, TX-2244 の *in vivo* 放射線増感活性を評価するために, 低酸素誘導因子 HIF-1 の発現に連動して GFP を発現する EMT6/5HRE-GFP 細胞を作製し, この細胞を用いて発育鶏卵に移植・形成させた固形腫瘍中の低酸素領域の解析を試みた。受精鶏卵は, 37℃, 高湿度下で1時間毎に1回転卵して発育させ, 発育開始 11 日目に漿尿膜上の太い血管の分岐部分にテフロンリングを置き, リング内に EMT6/KU 細胞もしくは EMT6/5HRE-GFP 細胞懸濁液を添加した。発育開始 15, 16, 17, 18 日目にヘキスト 33342 を静注して1分後に腫瘍を摘出し, OCT コン

パウンドで包埋した。クライオスタットで腫瘍切片を作製し, H&E 染色と蛍光観察を行った(図4)。

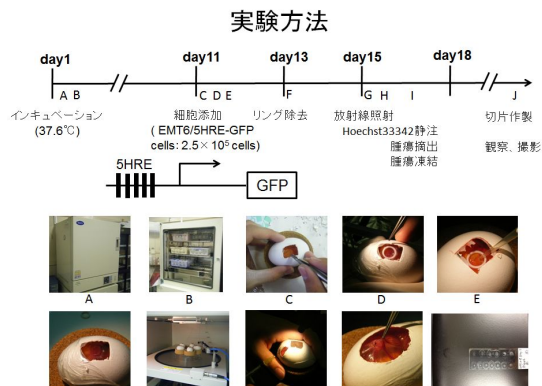


図4. 固形腫瘍中の低酸素領域の解析法

結果として, 18 日目の腫瘍切片の蛍光画像より, マウスと同様, 鶏卵に形成させた固形腫瘍内にも HIF-1 陽性細胞が存在していることから, 低酸素領域の存在が示唆された。しかしながら, マウスに形成した固形腫瘍と異なり, 腫瘍内部の血管が少なく, また, 血管形成が不十分であった(図5)。

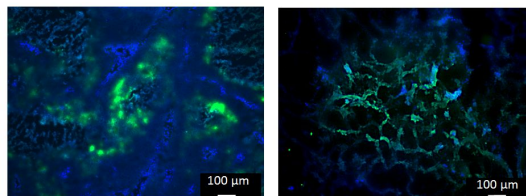


図5. マウス腫瘍と鶏卵腫瘍の低酸素領域

さらに, 15~18 日目に単離した腫瘍を比較したところ, 15 日目において最も強い GFP 由来の緑色蛍光が確認され, その後減少していることが示された(図6)。

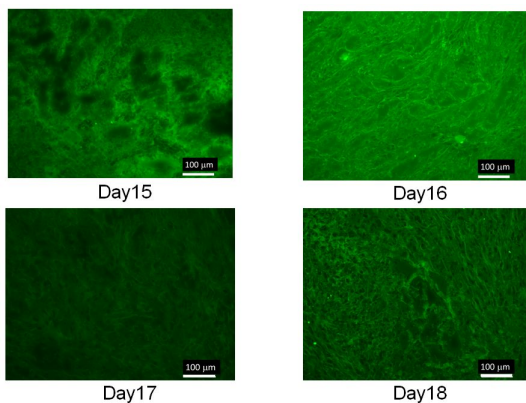


図6. 鶏卵腫瘍の蛍光像の経日変化

そこで, 15 日目の腫瘍移植鶏卵に対して 8 Gy の X 線を照射したところ, 2 時間後の腫瘍切片において HIF-1 陽性細胞の減少が観察された(図7)。

以上の結果より, 腫瘍内血管形成の違いによってマウスの腫瘍と異なる低酸素領域とその変化を示したことが示唆された。

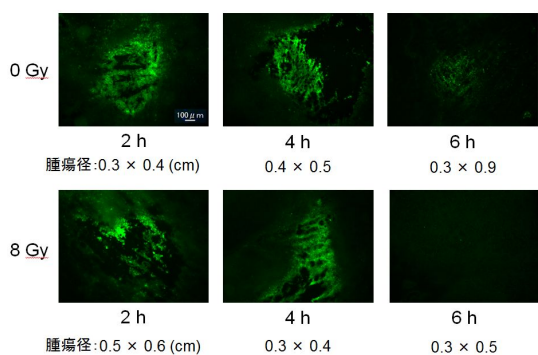


図7. X線照射した鶏卵腫瘍の蛍光像の変化

最終年度は、TX-2244の更なる作用機序の解明を目指してグルコースの6位に2-ニトロイミダゾール基を導入した UTX-90 および 4-ニトロイミダゾール基に改変した UTX-98 を合成し、*in vitro*放射線増感活性を評価した。また、TX-2244の解糖系酵素に与える影響についてウェスタン解析を行った。その結果、UTX-90 および UTX-98 の *in vitro*放射線増感活性は、それぞれ ER=1.42, 1.11 (1 mM) であり、TX-2244 (ER=2.30) と比べてかなり低い活性を示した。よって、高い放射線増感活性の発現にはグルコースの1位に2-ニトロイミダゾール基を修飾することが必須であることが示唆された。

また、低酸素条件下で EMT6/KU 細胞を TX-2244 (600 μM) と X 線 (2 Gy) で処理すると Pyruvate Dehydrogenase の発現量が減少した (図8)。よって、TX-2244 は Pyruvate Dehydrogenase の阻害を介して NAD⁺ から NADH への還元を抑制し、細胞内 NADH 量を低下させることが示唆された。

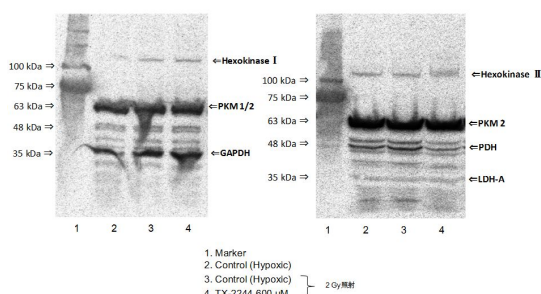


図8. TX-2244 + X線の解糖系酵素の変動

以上の結果より、TX-2244 はグルコース取り込み阻害、細胞内 NADH 量の低下、放射線由来 DNA 損傷の増強により高い放射線増感活性を発揮することを明らかにした。

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)

[雑誌論文](計 4 件)

1) Abe C, Uto Y, Kawasaki A, Noguchi C, Tanaka R, Yoshitomi T, Nagasaki Y, Endo Y, Hori H, Evaluation of the *in vivo* antioxidative activity of redox

nanoparticles by using a developing chicken egg as an alternative animal model, J Control Release, 182, 67-72, 2014, 査読有, 10.1016/j.jconrel.2014.03.015.

2) Miyake K, Nishioka M, Imura S, Batmunkh E, Uto Y, Nagasawa H, Hori H, Shimada M, The novel hypoxic cytotoxin, TX-2098 has antitumor effect in pancreatic cancer; possible mechanism through inhibiting VEGF and hypoxia inducible factor-1 targeted gene expression, Exp Cell Res. 318, 1554-63, 2012, 査読有, 10.1016/j.yexcr.2012.03.013.

3) Abe C, Uto Y, Nakae T, Shinmoto Y, Sano K, Nakata H, Teraoka M, Endo Y, Maezawa H, Masunaga S, Nakata E, Hori H, Evaluation of the *In vivo* Radiosensitizing Activity of Etanidazole Using Tumor-bearing Chick Embryo, J Radiat Res, 52, 208-14, 2011, 査読有.

4) 安部千秋, 宇都義浩, 遠藤良夫, 堀均: 発育鶏卵を利用した創薬研究と将来展望, 放射線生物研究, 46, 221~233 頁, 2011, 査読無.

[学会発表](計 11 件)

1) 島千尋, 宇都義浩, 玉谷大, 水木佑輔, 遠藤良夫, 大久保敬, 中西郁夫, 石塚昌宏, 田中徹, 口池大輔, 久保健太郎, 乾利夫, 堀均, 超音波による癌治療に対する 5-aminolevulinic acid の増感作用の検討, 第 16 回癌治療増感研究シンポジウム, 2014 年 2 月 7-8 日, 奈良県文化会館 (奈良県).

2) 宇都義浩, 竹内亮太, 中川美典, 廣田慶司, 寺田弘, 鬼塚伸也, 久保健太郎, 口池大輔, Mette Marty, 乾利夫, 遠藤良夫, 堀均, Development of Immunomodulatory Cancer Therapy Based on Gc protein-derived Macrophage Activating Factor (GcMAF), 第 7 回ナノメディシン国際シンポジウム, 2013 年 11 月 7-9 日, 九州工業大学 (福岡県).

3) 宇都義浩, 遠藤良夫, 佐藤博, 堀均, Development of antimetastatic hypoxic cytotoxin TX-2137 targeting for Akt/protein kinase B, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日, パシフィコ横浜 (神奈川県).

4) 原毅弘, 宇都義浩, 中島綾香, 福島孝士朗, 野口智帆, 遠藤良夫, 前澤博, 富永正英, 福本修一, 堀均, 発育鶏卵を用いたオオバギ葉抽出物の放射線防護活性の評価, 第 19 回癌治療増感研究会, 2013 年 6 月 8 日, 東京医科歯科大学 (東京都).

5) 笠井亮平, 島千尋, 宇都義浩, 寺岡瑞絵, 前澤博, 堀均, 低酸素細胞放射線増感剤 TX-2244 のグルコース取り込み阻害と細胞内薬物動態の解析, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県).

6) 宇都義浩, 皆巳和賢, 原田浩, 遠藤良夫,

前澤博, 増永慎一郎, 堀均, 解糖系からみた癌増感のターゲット: 糖修飾放射線増感剤のメディシナルケミストリー, 第 15 回癌治療増感研究シンポジウム, 2013 年 2 月 9-10 日, 猿沢荘 (奈良県).

7) 宇都義浩, 田中大地, 野口智帆, 原田浩, 遠藤良夫, 前澤博, 増永慎一郎, 堀均, HIF-1/GFP 発現系を利用した腫瘍移植鶏卵における低酸素領域の解析と放射線による分布変化の観察, 第 18 回癌治療増感研究会, 2012 年 6 月 9 日, 大阪大学 (大阪府).

8) 田中大地, 宇都義浩, 安部千秋, 遠藤良夫, 前澤博, 原田浩, 増永慎一郎, 堀均, 腫瘍移植鶏卵における低酸素腫瘍の同定と etanidazole の in vivo 放射線増感活性の評価, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29-31 日, 北海道大学 (北海道).

9) 宇都義浩, 発育鶏卵を用いた低酸素細胞放射線増感剤およびラジカル含有ナノ粒子の in vivo 評価法の開発, バイオインダストリー協会 大学発・選り抜きセミナー 徳島大学研究者との集い・第 3 回東京編, 2011 年 12 月 20 日, バイオインダストリー協会 (東京都).

10) 宇都義浩, Development of an in vivo screening system for radiosensitizers and antioxidants using a chick embryo model, 4th Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, 2011 年 10 月 28 日, 九州工業大学 (福岡県).

11) 安部千秋, 宇都義浩, 遠藤良夫, 前澤博, 増永慎一郎, 堀均, Evaluation of the In vivo Radiosensitizing Activity of Etanidazole Using Tumor-bearing Chick Embryo, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3-5 日, 名古屋国際会議場 (愛知県).

〔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〕

ホームページ等

<http://www.bio.tokushima-u.ac.jp/a2group/a2index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇都 義浩 (UTO YOSHIHIRO)

徳島大学・大学院シテック/バイオ研究部・

准教授

研究者番号: 20304553