

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430160

研究課題名(和文) 膜輸送系を標的とする光線力学的治療の効果増強剤の新薬シーズ開発

研究課題名(英文) Development of novel Schiff base derivative for enhancing the anticancer potential of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy

研究代表者

遠藤 良夫 (Endo, Yoshio)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：30211783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：5-アミノレブリン酸(ALA)は従来の光線力学的治療で用いられてきたポルフィリン関連化合物とは異なり、がん細胞内でプロトポルフィリンIXに変換され、光感受性物質として活性化し、殺細胞効果を発揮する。本研究ではALAとの同時処理により細胞内PpIX量を増加させてPDT効果を増強する低分子化合物TX-816の誘導体開発を実施し、TX-816のアルキルベンゼン型誘導体が有用なリード化合物になることを見出した。

研究成果の概要(英文)：5-Aminolevulinic acid (ALA) is now widely used for photodynamic diagnosis and photodynamic therapy (ALA-PDT) of various cancers. In the heme biosynthesis pathway, ALA is converted to protoporphyrin IX (PpIX). Following excitation with blue light (405 nm), the accumulated PpIX emits a red fluorescence (635 nm). Thus, cancer tissue can be effectively visualized by the PpIX fluorescence. Furthermore, absorption of light beyond 630 nm by PpIX leads to the production of reactive oxygen species that can induce cell death in various cancer cells. Previously, we found that the Schiff base derivative TX-816 can significantly increase the effect of ALA-PDT by accelerating the intracellular PpIX accumulation. In this study, we synthesized TX-816 derivatives in which 2-chloro-4-nitroaniline was substituted with 4-alkyl aniline. These derivatives were chemically more stable than TX-816 was. The derivatives may become a potent lead compounds for the development of prodrug-type ALA-PDT sensitizers.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：光線力学的治療 5-アミノレブリン酸 効果増強

1. 研究開始当初の背景

光感受性物質を投与後にがん局所にレーザー光線を照射して治療を行う光線力学的治療 (photodynamic therapy; PDT) は、元来、治療効果が高く、低侵襲性で、機能温存も可能であるなどの特徴を有する優れた治療法である。しかし、治療効果が期待できるのは殺細胞性の発揮に十分な光線が到達できる表在性で早期のがん (深さ: 約 3 mm) に限られることから、治療法としての認知度や普及率は未だ低いのが現状である。

5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid, 以下 ALA、図 1) はヘムタンパクの構成分子であるポルフィリンやプロトヘムの生合成の出発原料で、アミノ酸の一種である。細胞内に取り込まれた ALA はヘム生合成系酵素により段階的に protoporphyrin IX (PpIX) に変換される。PpIX が蓄積したがん細胞に赤色励起光 (630 nm) を照射すると一重項酸素による細胞死が誘導される (ALA-PDT)。また、PpIX は青色光 (405-410 nm) の照射を受けると赤色蛍光を発することから、がん組織の診断が可能となる (ALA-PDD)。ALA は欧州では悪性グリオーマの診断および摘出手術の補助に用いられ、米国では光線性角化症に対する治療に使用されている。最近、本邦でも、悪性グリオーマの摘出手術における腫瘍の可視化用診断薬として ALA の使用が承認された。ALA を用いる場合、従来のポルフィリン関連化合物と異なり、腫瘍内で活性化されることから、光過敏症などの副作用は軽度且つ一過性であり、光線の波長を変えることで、診断と治療の使い分けができるなど大きなメリットを有している。我々は、がん細胞における ALA-PDT 感受性は ALA の膜輸送トランスポーターである PEPT1 と PpIX 排出装置である ABCG2 の発現のバランスが決定することを明らかにしてきた。従って、がん細胞内への ALA の取り込みや PpIX の排出に関与する膜輸送系を機能修飾することで、細胞内 PpIX を増加させる薬剤の開発は ALA を用いるがんの診断や治療の有益性を一層高めるものと考えた。我々は、平成 23~25 年度の基盤研究 (C) の研究において連携研究者が所有する化合物ライブラリーを用い、新規 ALA-PDT 効果増強剤のスクリーニングを実施した結果、細胞内 PpIX を増加させ、ALA-PDT 感受性を飛躍的に増強できる N-3',5'-ジクロロ-2'-ヒドロキシベンジリデン-2-クロロ-4-ニトロアニリン (TX-816、図 1) を見出した (特許権取得; 名称 PDT 効果増強剤: 特許登録: 2016 年 5 月 20 日: 特許番号 第 5936213 号)。これまでの研究で TX-816 は溶液中で 3,5-ジクロロサリチルアルデヒド (DCSA) と 2-クロロ-4-ニトロアニリン (CNA) に分解することが明らかになっている。これら 2 化合物について

ALA-PDT 効果増強活性を評価した結果、TX-816 による効果増強作用の活性本体は DCSA であることが判明した。本研究では連携研究者と共同して、DCSA の置換基を種々変化させた化合物の効果増強作用を詳細に比較検討し、構造活性相関を明らかにするとともに、TX-816 の ALA-PDT 効果増強作用を示さない分解産物である CNA 部位を修飾した誘導体の分子設計を行い、それらの ALA-PDT 効果増強作用について検討した。

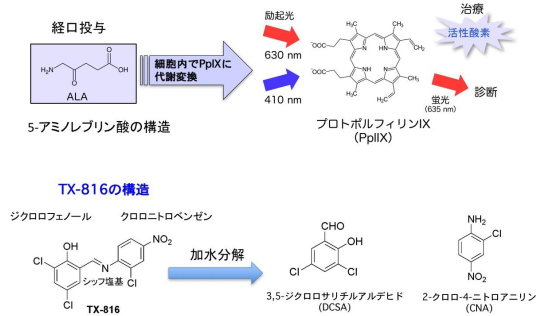


図 1. 5-アミノレブリン酸、プロトポルフィリン IX および効果増強剤 TX-816 の構造

2. 研究の目的

ALA は従来の PDT で用いられてきたポルフィリン関連化合物とは異なり、がん細胞内でヘム生合成経路の酵素群により PpIX に代謝され、光感受性物質として活性化され、殺細胞効果を発揮するという特徴を有する。PpIX は励起光を変えることにより蛍光によるがん組織の可視化と診断にも応用可能であり、がん治療における有用性は極めて大きい。最近、申請者らは ALA との同時処理により細胞内 PpIX 量を増加させて PDT 効果を増強する低分子化合物 TX-816 を見出した。本研究では、TX-816 をリード化合物とし、多様ながん腫の診断や治療に広く応用可能な ALA-PDT 効果増強剤の新薬シーズを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトがん細胞を用いて DCSA の置換基を種々変化させた化合物の ALA-PDT 効果増強作用を調べ、構造活性相関を検討した結果を基に、誘導体を合成し、ALA-PDT 効果増強作用、細胞内 PpIX 蓄積に与える影響、化学的安定性について検討した。ALA-PDT に対する増強作用が認められた候補化合物についてはヒト胃がん細胞 MKN-45 より樹立した獲得耐性細胞を用い、ALA-PDT に対する耐性の克服作用についても検討した。

ヒトがん細胞としては、主に以下の細胞を使用した: 胃がん細胞 MKN-45 (PEPT1 高発現、ABCG2 低発現) KKLS (PEPT1 低発現、ABCG2 低発現) NUGC-4 および Nakajima (PEPT1 中程度発現、ABCG2 中程度発現) および線維肉腫 HT-1080 細胞 (PEPT1 低発現、ABCG2 高発現) PEPT1-EGFP 融合タンパク発現ベクター

を導入した KKLS および HT-1080 の安定株。尚、*in vitro* 感受性試験法では 5-ALA を添加 4-5 時間後に 96 ウェル治療用 LED 光照射システム (図 2) を用いて 630 nm の治療光を照射し、その 48 または 72 時間後に WST-8 を用いた MTT 法により生細胞数の定量を行った。また、候補化合物の細胞内 PpIX 蓄積に与える影響については、SEC2000-UV/VIS 蛍光解析システムを用いて解析した。

図 2 . 96-well 用治療光照射装置



4. 研究成果

(1) 誘導体展開のための予備研究として、DCSAの類縁化合物であるジクロロサリチル酸、ジクロロベンズアルデヒド、クロロサリチルアルデヒド、クロロヒドロキシベンズアミドなど、アルデヒド基がカルボキシル基やアミド基に置換された化合物の効果増強における構造活性相関を検討したところ、アルデヒド基を有するものにDCSAに匹敵する増強作用が認められた。一方、アルデヒド基がカルボキシル基、アミド基に置換されたでは活性がないことからアルデヒド基がALA-PDTの効果増強発現に重要であることが明らかになってきた。平成26年度はこれらの知見を基に、ベンジルオキシベンズアルデヒドやメトキシベンズアルデヒド、分解によりベンズアルデヒドを生成するシッフ塩基など、7つの化合物のALA-PDT効果増強作用を検討した。その結果、TX-816やDCSAに匹敵する増強作用を有するシッフ塩基(HMB: N-(4-メトキシ-2-ヒドロキシベンジリデン)-4-ブチルアニリン)を新たに見出すことができた(図3)。

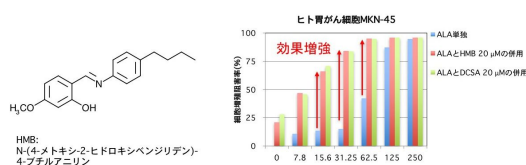


図3 . HMBの構造とALA-PDT効果増強作用

このHMBはDCSAと同様にMKN-45のALA-PDT獲得耐性株のPDT感受性を回復させることも確認できた。興味深いことにHMBの予想分解物である2-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒドの効果増強作用は非常に弱くHMBの活性を反映していなかった。おそらくHMBはTX-816よりも安定性が高く、細胞内で加水分解を受けている可能性が考えられ、より有用なリード化合物となることが期待された。

(2) TX-816は溶液中で加水分解を受け、DCSA

とCNAに分解し、DCSAが活性本体としてALA-PDT増強作用を示すのであるが、TX-816の未変性体が増強活性を示すか否かについては確認されていなかった。そこで、平成27年度には、まずTX-816の炭素-窒素二重結合を還元した還元的アミノ化誘導体を合成し、MKN-45細胞に対するALA-PDT効果増強作用を検討した。その結果、加水分解を受けない誘導体には増強活性がないことを確認した。

(3) 26年度の研究で見出されたHMBの構造をヒントにTX-816のクロロニトロベンゼン部位をブチルベンゼンに置換した4-ブチルアニリン誘導体、さらにアルキル鎖長を変えた誘導体を合成し、効果増強活性の評価を行った。その結果、ペンチル基およびヘキシル基を導入した誘導体により強いALA-PDT効果増強作用を示すことが明らかになり、疎水性置換基を導入することで膜透過性を高めた誘導体の分子設計が可能であることが示された。

(4) 平成28年度はHMBのブチル基(C=4)を長さの違うアルキル基(C=2, C=3, C=5, C=6)に置換した誘導体を新たに合成し、ALA-PDT増強作用や細胞内PpIX蓄積量、溶液中での安定性についてTX-816およびその4-アルキルアニリン誘導体(C=2からC=6)との比較検討を行った。その結果、PDT増強作用については新たに合成したHMB誘導体でもペンチル基およびヘキシル基を導入した誘導体により強い増強作用を示し、それらの効果はTX-816の誘導体にほぼ匹敵するものであった。また、細胞内PpIX蓄積量においても同様の結果が得られた。一方、溶液中での安定性を解析した結果、HMB誘導体よりもTX-816の誘導体の方がより安定であることが明らかになった。以上の結果から、TX-816の4-アルキルアニリン導入型誘導体はがん細胞内で活性化される有用なリード化合物となることが明らかになり、プロドラッグ型ALA-PDT効果増強剤としてさらなる発展が期待される。

(5) ALA-PDT耐性細胞3株における遺伝子発現プロファイルデータを精査した結果、耐性株ではferrochelatase, heme oxygenase, cytochrome b reductase, STEAPおよびABCC3はすべての耐性細胞で発現が上昇し、3株中2株ではABCC2とceruloplasminの発現も著しく亢進していることが明らかになった。さらに、ferrochelatase阻害剤はALA-PDT感受性を上昇させる一方で、ホロトランスフェリンはALA-PDTの効果減少させた。以上の結果から、ALAやPpIXの膜輸送系に加え、ヘム分解系および鉄イオンの酸化還元系はALA-PDTにおける重要な感受性規定因子であるとともに、耐性化の分子標的となることが明らかになった。今後、鉄代謝をコントロールすることでALA-PDTの効果を増強したり、

副作用を軽減させることも可能になると考える。さらに、TX-816 誘導体を鉄キレート剤や ferrochelatase 阻害剤と併用することによりさらなる効果増強が期待される。

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)

[学会発表](計7件)

1. 遠藤良夫, 宇都義浩, 安部千秋, 小倉俊一郎, 米村豊: 5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法に対する耐性化機構日本薬学会第137年会 2017年3月24日(金)~27日(月)(3月27日)(仙台、仙台国際センター)
2. Yoshio Endo, Uto Yoshihiro, Chiaki Abe, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura: Mechanism of acquired resistance to photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid. 日本癌学会第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6日(木)-8日(土)(10月8日)(横浜、パシフィコ横浜)
3. 遠藤良夫, 宇都義浩, 安部千秋, 芝一休, 小倉俊一郎, 米村豊: 5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法におけるシッフ塩基化合物による効果増強作用 日本薬学会第136年会 2016年3月26日-29日(3月27日)(横浜、パシフィコ横浜)
4. Yoshio Endo, Uto Yoshihiro, Chiaki Abe, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura, Masashi Kimura: Schiff base derivative TX-816 enhances the effect of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid. 日本癌学会第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日(木)-10日(土)(10月8日)(名古屋、名古屋国際会議場)
5. Yutaka Yonemura, Shun-ichiro Ogura, Yoshio Endo, Akiyoshi Mizumoto, Haruaki Ishibashi, Kazuyoshi Takeshita: Detection of peritoneal metastasis by photodynamic diagnosis using aminolevulinic acid. 日本癌学会第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日(木)-10日(土)(10月8日)(名古屋、名古屋国際会議場)
6. 遠藤良夫, 宇都義浩, 安部千秋, 芝一休, 小倉俊一郎, 米村豊: シッフ塩基化合物 TX-816 による 5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法の効果増強. 日本薬学会第135年会 2015年3月25日-28日(3月27日)(神戸、デ

ザイン・クリエイティブセンター神戸)

7. Yoshio Endo, Uto Yoshihiro, Yutaka Yonemura, Shun-ichiro Ogura, Chiaki Abe, Masashi Kimura: Enhancing efficacy of ALA-PDT by using the Schiff base derivative TX-816 日本癌学会 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日(木)-27日(土)(9月27日)(横浜、パシフィコ横浜)

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤良夫 (ENDO YOSHIO)
金沢大学・がん進展制御研究所・准教授
研究者番号: 30211783

(2)連携研究者

宇都義浩 (UTO YOSHIHIRO)
徳島大学・工学部・准教授
研究者番号: 20304553