

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461891

研究課題名(和文) アセチル化グルコース修飾による制癌剤・分子標的薬剤の放射線増感剤としての創出

研究課題名(英文) Development of radiosensitizers based on antitumor/molecular targeted drugs modified by acetylglucose

研究代表者

宇都 義浩 (Uto, Yoshihiro)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・教授

研究者番号：20304553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究は、アセチルグルコースを放射線による抗腫瘍効果の増強分子として種々の制癌剤や分子標的薬剤に修飾し、腫瘍細胞および腫瘍移植鶏卵モデルを用いて放射線増感剤としての有用性を評価し、臨床利用が可能な放射線増感剤の創出を行うものである。本申請研究において、上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼを選択的に阻害する抗がん剤のゲフィチニブにアセチルグルコースを修飾した新規放射線増感剤UTX-103の創出に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is that development of clinical usage radiosensitizers based on acetylglucose-modified antitumor and molecular targeted drug using a tumor cell and a tumor-bearing chicken egg model. In this study, we succeeded in develop of new radiosensitizer UTX-103 which modified acetylglucose to the Gefitinib as an antitumor agent which inhibited the tyrosine kinase of the epidermal growth factor receptor selectively.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線増感剤

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・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・転移などのがん細胞特性に深く関わっている細胞で、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、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による担癌マウスを用いた再評価では、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、物理的特性により薬物動態をコントロールする古典的な放射線増感剤では生体内における有効性は期待できないことが示された。そこで、本申請者は、腫瘍環境や癌の代謝・耐性を標的としたより有効な低酸素細胞放射線増感剤の分子設計を試みており、「腫瘍移植鶏卵モデルによる *in vivo* 活性を指標とした多機能性放射線増感剤の創製，若手研究(B)」の研究を通して、発育鶏卵に腫瘍を移植した、簡便かつ迅速に多検体放射線増感剤スクリーニングが可能な *in vivo* モデル系を構築することに成功し、「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，基盤研究(C)」において、申請者らが過去に開発した低酸素細胞放射線増感剤 TX-1877 にアセチルグルコースを修飾した TX-2244 は、*in vitro* で ER = 2.30 (EMT6/KU 細胞)、*in vivo* で ER = 2.47 (A549 細胞, BALB/c nude) という高い放射線増感活性に加えて、強い抗転移・抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。また、TX-2244 の誘導体を種々分子設計・合成して構造活性相関を行ったところ、アセチルグルコース基の細胞内での脱離が高い放射線増感活性の発現に必須であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TX-2244 の放射線増感作用における詳細な機序の解明を行うとともに、臨床レベルで放射線修飾作用が報告されている既知の制癌剤や分子標的薬剤にアセチルグルコース基を修飾して、元の薬剤の放射線増感活性・抗腫瘍活性を増強できるかについて評価し、臨床利用が可能な放射線増感剤の創出を試みることである。

3. 研究の方法

第一に、TX-2244 のより詳細な作用機序の解明である。腫瘍移植鶏卵を用いた TX-2244 の薬物動態解析より、腫瘍細胞内でのアセチルグルコース基の解離が確認されており、増感活性基である TX-1877 を効率よく腫瘍細胞内に輸送するとともに、脱離したアセチルグ

ルコース基が解糖系を阻害している可能性が示唆された。それで、解糖系酵素の発現量の変化をウェスタンブロットで観察し、またそれらの酵素活性についても評価する。第二に、「アセチルグルコース修飾制癌剤・分子標的薬剤」を分子設計・合成する。制癌剤・分子標的薬剤としては、臨床の現場で放射線治療との併用で用いられている制癌剤 5-フルオロウラシル (5-FU) やプラチナ系アルキル化剤、放射線との併用効果が報告されている分子標的薬剤ゲフィチニブやエルロチニブをリードとして、薬剤活性を阻害せず腫瘍組織や細胞内で脱離するようにアセチル化グルコースを導入した分子を設計する。第三に、得られた「アセチルグルコース修飾制癌剤・分子標的薬剤」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。第四に、「アセチルグルコース修飾制癌剤・分子標的薬剤」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* と *in vivo* 活性の相関について検討し、候補化合物を選出する。第五に、得られたすべての結果について定量的構造活性相関 (QSAR) を行い、最適な「アセチルグルコース修飾制癌剤・分子標的薬剤」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、アセチルグルコース修飾放射線増感剤 TX-2244 の詳細な作用機序の解明およびアセチルグルコース修飾制癌剤・分子標的薬剤の分子設計・合成を実施した。得られた結果として、TX-2244 は解糖系の酵素の1つであるピルビン酸脱水素酵素の阻害を介して 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された。また、新規のアセチルグルコース修飾 5-FU 誘導体である化合物 3 種類の合成に成功した(図 1)。

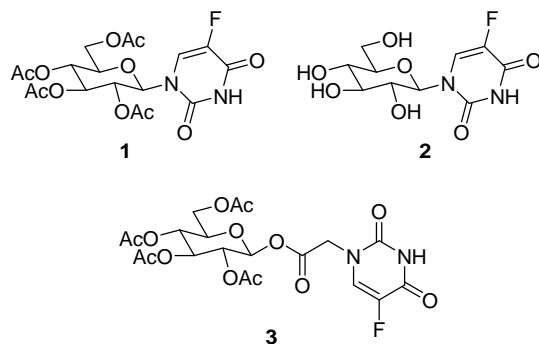


図 1. アセチルグルコース修飾 5-FU 誘導体

次に、化合物の細胞への取り込み試験の結果より、化合物 1 は細胞内に取り込まれた後速やかに化合物 2 に変換されたことが示唆さ

れた。化合物 1 および 2 は *in vitro* 抗腫瘍活性を示さず、化合物 3 は 5-FU に比べてやや弱いながらも *in vitro* 抗腫瘍活性を示したことから (図 2), アセチルグルコース基が脱離しやすいことが抗腫瘍活性の発現に重要であることが示唆された。

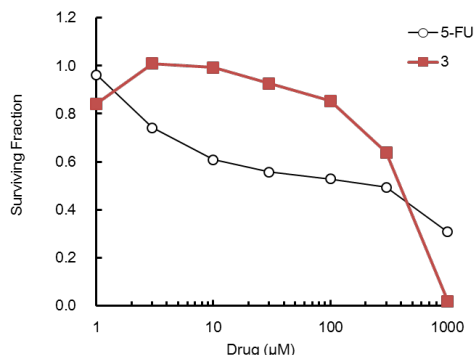


図 2 . 化合物 3 の *in vitro* 抗腫瘍活性

さらに放射線増感活性試験の結果より、化合物 1 と 2 において Etanidazole と同程度の放射線増感活性を有することが示された (図 3)。

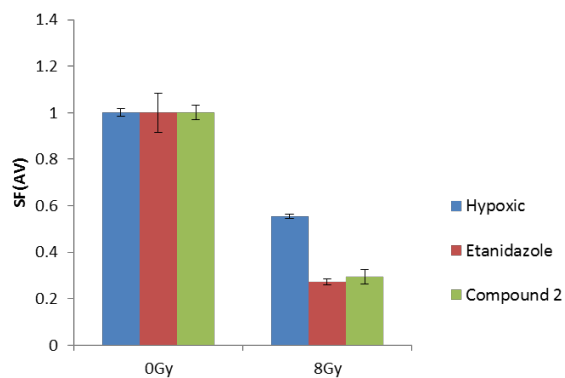
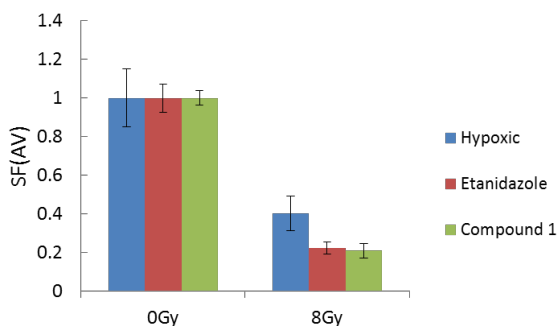


図 3 . 化合物 1 と 2 の放射線増感活性

次年度は、放射線修飾作用が報告されている既知の制癌剤である Gefitinib を選択し、Gefitinib のメトキシ基を介してアセチルグルコース基を修飾した UTX-103 を分子設計した。次に、Gefitinib をピリジン塩酸塩で処理してメトキシ基をヒドロキシル基に変換し、次いで塩基触媒下でアセトプロモ-D-グルコースと縮合反応させ、総収率 21%でアセ

チルグルコース修飾 Gefitinib 誘導体 UTX-103 の合成に成功した (図 4)。

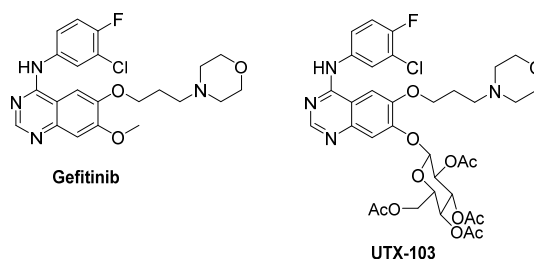


図 4 . Gefitinib と UTX-103 の化学構造

Gefitinib および UTX-103 のヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 に対する抗腫瘍活性は、UTX-103 ($IC_{50} = 3.12 \mu M$) が Gefitinib ($IC_{50} = 35.1 \mu M$) よりも 10 倍以上強い活性を示した。また、2 Gy の X 線との併用において、UTX-103 は Gefitinib に比べて 2 倍程度の放射線増感効果を示した (図 5)。

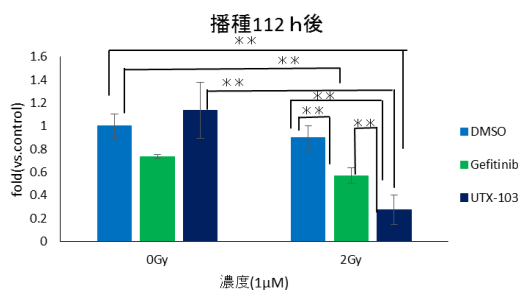


図 5 . UTX-103 の放射線増感活性

最終年度は、UTX-103 の EGFR に対する阻害活性を評価した。EGFR 発現量の異なる 3 種のヒト乳癌細胞 (MDA-MB-231 (高発現), Hs578T (中発現), BT549 (低発現)) に対する 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を評価したところ、Gefitinib は MDA-MB-231 に対してのみ阻害活性 ($IC_{50} = 13.9 \mu M$) を示したが、UTX-103 はすべての細胞に対して強い阻害活性 ($IC_{50} = 9 \sim 20 \mu M$) を示した。一方、UTX-103 のアセチル基を除去した UTX-108 および UTX-108 のグルコース基を除去した UTX-107 は MDA-MB-231 に対してのみ弱い阻害活性 ($IC_{50} = 67.2 \mu M$ および $70.1 \mu M$) を示したことから、UTX-103 はアセチル基の影響により EGFR 非依存的に抗腫瘍活性を発揮していることが示唆された。さらに、UTX-107 は全く放射線増感活性を示さず、UTX-108 も UTX-103 に比べて弱い放射線増感活性であったことから (図 6), UTX-103 のアセチルグルコース基が放射線増感活性に必須であることが示された。

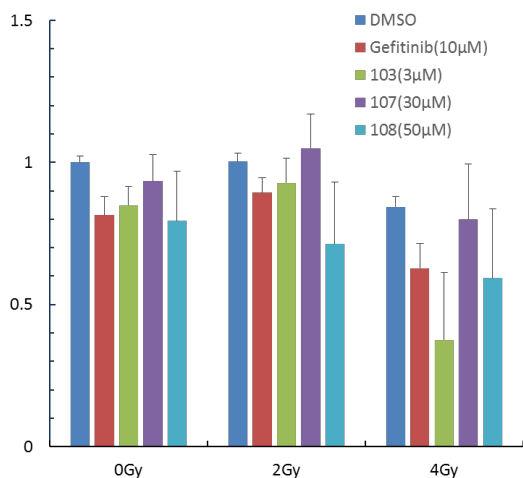


図6 . UTX-103, 107, 108 の放射線増感活性

以上の結果より, アセチルグルコース修飾制癌剤・分子標的薬剤として Gefitinib 誘導体 UTX-103 の創製に成功した.

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 1件)

1) Oita M, Uto Y, Tominaga M, Sasaki M, Hara Y, Kishi T, Hori H, Radiosensitivity uncertainty evaluation for the in vitro biophysical modeling of EMT6 cells, J Anticancer Res., 34, 4621-6, 2014, 査読有.

[学会発表](計 4件)

1) 宮本大輔, 篠原侑成, 八重和憲, 上崎里砂, 羽生紋佳, 山田久嗣, 富永正英, 宇都義造, Development of Sugar-modified Radiosensitizer (TX-2244) Targeting the Glycolytic Metabolism of Tumors, 日本化学会第 97 春季年会, 2017 年 3 月 16-19 日, 慶應義塾大学 日吉キャンパス(神奈川県横浜市).

2) 宇都義造, 伊藤亮輔, 八重和憲, 宮本大輔, 上崎里砂, 山田久嗣, 富永正英, 放射線増感ユニットとしてのアセチルグルコースの有用性: アセチルグルコース修飾 Gefitinib 誘導体の分子設計および放射線増感効果について, 第 22 回癌治療増感研究会, 2016 年 7 月 2 日, 沖縄県市町村自治会館(沖縄県那覇市).

3) 宇都義造, 遠藤秀彰, 八重和憲, 山田久嗣, 原毅弘, 富永正英, TrueBeam を用いた低 LET 放射線の線量率と生物効果の相関について, 第 18 回癌治療増感研究シンポジウム, 2016 年 2 月 5-6 日, 奈良県文化会館(奈良県奈良市).

4) 原毅弘, 富永正英, 遠藤秀彰, 宇都義造, The effect of dose rate on radiation-induced *in vitro* antitumor

activity by low-LET radiation, 15th International congress of radiation research, 2015 年 5 月 25-29 日, 京都国際会議場(京都府京都市).

[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]

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・大学院生物資源産業学研究部・教授

研究者番号: 20304553

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

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

富永 正英(TOMINAGA MASAhide)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 90437632