

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03604

研究課題名(和文) 正常組織を選択的に防護する放射線防護剤の開発

研究課題名(英文) Development of radioprotectors that selectively protect normal tissues

研究代表者

森田 明典(MORITA, Akinori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：90334234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨髄死に有効な「p53阻害剤」としてオルトバナジウム酸ナトリウム(バナデート)、また、腸死に有効な「p53調節剤」として放射線抵抗性に関わるp53標的遺伝子を上方制御する5-クロロ-8-キノリノール(5CHQ)をシード化合物として、その防護活性の詳細な検討や作用機構解析、およびより高活性な誘導体開発を進めた。その結果、5CHQよりも優れたp53依存的防護効果を示す単糖配糖体を見出した。また、バナデートは、5CHQとは異なり、後半照射による腸管障害に有効性を示さなかった一方、X線、炭素線、鉄線全身照射後の骨髄障害を抑制し、骨髄死に対する顕著な防護効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常組織の耐性を高める防護剤の開発および作用機構解明は、がん治療におけるリスク臓器防護剤としての医療応用が期待される。p53制御剤は、放射線高感受性組織の被ばく後の過剰な細胞死の原因となるp53を一過的に制御することで急性障害を軽減する新しいタイプの放射線防護剤である。正常なp53機能をもつ正常組織の放射線細胞死を選択的に防護し、p53機能を喪失しているがん細胞は防護しないため、がんゲノム医療の最適化に資する研究として推進した。

研究成果の概要(英文)：In this study, sodium orthovanadate (vanadate) as a "p53 inhibitor" effective for bone marrow death and 5-chloro-8-quinolinol (5CHQ) as a "p53 modulator" effective for intestinal death, which upregulates p53 target genes involved in radiation resistance, were used as seed compounds. The protective activity of both compounds was examined in detail and the mechanism of action analyzed, and a more potent derivative was searched for. As a result, we found a monosaccharide 5CHQ glycoside that exhibits a p53-dependent protective effect superior to that of 5CHQ. Unlike 5CHQ, vanadate showed no efficacy against intestinal damage caused by posterior-body irradiation, while vanadate suppressed bone marrow damage after total-body irradiation with X-rays, carbon and iron rays, and showed remarkable protective effects against bone marrow death.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線防護剤 細胞死 正常組織防護 p53 分子標的創薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

粒子線治療を始めとする高精度放射線療法の進展は目覚ましく、線量集中性の向上によって高い治療効果が得られるようになった。従来の前左右4門照射法(耐容線量60~66 Gy)に比べ、最新の強度変調放射線治療IMRT(耐容線量~80 Gy)では処方線量が約1.3倍向上した。しかしながら、局所に高線量が照射されることの弊害として、周辺のリスク臓器に有害事象が生じる場合があり、高精度放射線治療が普及しつつある現在も依然として正常組織障害が処方線量の限界を決めており、物理的な線量分布の改善だけでなく、生命科学の知見を応用した正常組織選択的な放射線防護剤の開発が期待される。

正常組織とがん組織を区別する最も大きな特徴は、半数近くのがん細胞ではp53に変異や発現抑制、あるいはウイルス由来因子による不活性化が見られp53機能が抑制されていることである。研究代表者らは、p53分子内の亜鉛結合部位を標的とする化合物の合成、探索を進め、p53依存性細胞死を制御するいくつかの新規放射線防護剤の開発に成功した(図1)。p53制御剤は、放射線高感受性組織の被ばく後の過剰な細胞死の原因となるp53を一時的に制御することで急性障害を軽減する新しいタイプの放射線防護剤である。正常なp53機能をもつ正常組織の放射線細胞死を選択的に防護し、p53機能を喪失しているがん細胞は防護しないため、放射線治療の耐容線量や、抗がん剤の耐用量を向上させる副作用軽減剤としての応用が期待されている。

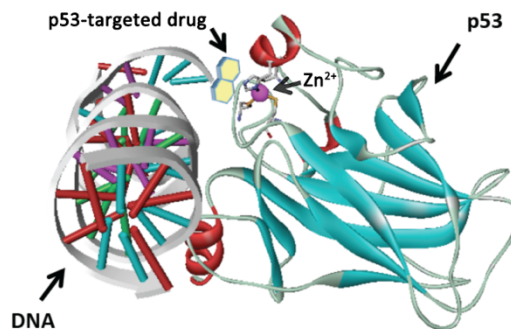


図1 p53分子内の亜鉛イオン-DNA間で相互作用するp53制御剤の推定図

### 2. 研究の目的

放射線防護上、代表的な急性障害は骨髄と腸上皮の放射線障害である。これらの組織の急性障害は、放射線高感受性の両組織の幹細胞死に起因する。p53は、どちらの組織の放射線細胞死の進行にも関わるが、その関わり方は両組織で全く異なっており、骨髄死ではp53はアポトーシスの細胞死を促進する因子として、腸死ではp53は分裂死(mitotic death)を防ぐ抵抗性因子として機能することが知られている。我々は、骨髄死を防ぐ化合物としてp53活性を抑制する「p53阻害剤」オルトバナジン酸ナトリウム(バナデート)を(*Cancer Res.* 70, 257-265, 2010)、腸死を防ぐ化合物としてp53の抗細胞死活性を亢進させるモジュレーター化合物「p53調節剤」5-クロロ-8-キノリノール(5CHQ)を(*Mol. Cancer Ther.* 17, 432-442, 2018)、それぞれの放射線障害に有効な放射線防護剤として既に得ており、この2つの相反するp53の組織応答に対処可能なシード化合物として両剤を提案し、以下の研究によってその有効性をさらに明示することを目指した。また、新たに放射線損傷DNAの修復を促進する防護剤の開発にも取り組み、多角的な視点から正常組織を防護する放射線防護剤の開発を推進した。

#### (1) 腸死に有効な「p53調節剤」の研究開発

~5CHQが護る組織の解明、5CHQ作用の解明、より防護活性の高い5CHQ誘導体の開発

#### (2) 骨髄死に有効な「p53阻害剤」の研究開発

~p53阻害剤バナデートが護る組織の解明

### 3. 研究の方法

#### (1) 5CHQが護る組織の解明、5CHQ作用の解明

腸上皮幹細胞マーカー遺伝子である*Lgr5*等の発現を指標に定量PCR解析を行い、幹細胞の増減を定量する方法を開発した。さらに、*Lgr5*遺伝子座に、GFPおよびタモキシフェン制御性CreERT2が挿入されたノックインマウス(*Lgr5*-EGFPノックインマウス)を導入し、放射線障害後の幹細胞動態の予備的解析を実施した。

また、イムノブロットングによる先行解析では、5CHQ単独処理7時間後のH2AXリン酸化( $\gamma$ H2AX)、p53 Ser15リン酸化、PUMA誘導はごく僅かだが、p21誘導が顕著であった(*Mol. Cancer Ther.* 17, 432-442, 2018)。我々は5CHQが有するこのp53に対するアゴニスト活性に注目した。本活性がDNA損傷に起因するものか定量解析することを目的として、DNA損傷の分子プローブであるEGFP-53BP1をHep G2細胞に導入した安定発現細胞株を作製し、核内のDNA損傷フォーカス数を解析した。

#### (2) より防護活性の高い5CHQ誘導体の開発

我々は、放射線高感受性の増殖性細胞への取込みを高めるプロドラッグとして5CHQの配糖化および活性評価を実施した。

#### (3) p53阻害剤バナデートが護る組織の解明

腎臓などの腸管以外の臓器への被曝を回避しつつ、腸管へ限局した放射線照射が可能な後半照射方法を確立し、これを用いて腸管に対するバナデートの防護効果を検討した。

#### (4) 粒子線に対する防護活性評価

さらに粒子線細胞死に対する防護効果も検討した。85 keV/ $\mu\text{m}$  以上の高 LET 放射線では p53 依存性を示さないことが固形腫瘍由来培養細胞を用いて明らかにされているが、重粒子放射線に対するこれら p53 制御剤の有効性を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 5CHQ が護る組織の解明、5CHQ 作用の解明

幹細胞マーカー遺伝子である *Lgr5* の発現を指標に定量 PCR 解析した結果、本化合物の防護活性を裏付ける幹細胞保護効果が直腸組織より得られた。さらに、*Lgr5*-EGFP ノックインマウスを用い、予備的な組織解析を行った結果、直腸における幹細胞の盛衰との相関も認められた。

DNA 損傷応答 (DNA damage response; DDR) による p53 応答変化では、類縁体の中で p53 標的遺伝子の転写を惹起する高活性化化合物は、マウス放射線防護活性も高いが、DNA 損傷の分子プローブである EGFP-53BP1 を用いたフォーカス解析において低活性化化合物より核内フォーカス数を増加させる傾向が認められた (未発表データ)。至適防護濃度における 5CHQ および 5CHQ 類縁体の核内フォーカス数は、非処理・非照射細胞のフォーカス数の数倍程度であり、フォーカス数の微増による軽微 DDR が p21 誘導を始めとする p53 の防護性応答を惹起しているという斬新な仮説が考えられた。今後は 5CHQ および 5CHQ 類縁体がもたらす DNA 損傷の特徴を明らかにしたい。

#### (2) より防護活性の高い 5CHQ 誘導体の開発

5CHQ の配糖化に取り組み、5CHQ よりも優れた p53 依存的防護効果を示す単糖配糖体を見出した (図 2)。現在、配糖化による放射線防護活性の向上について、組織解析等の詳細な検討を進めているところである。

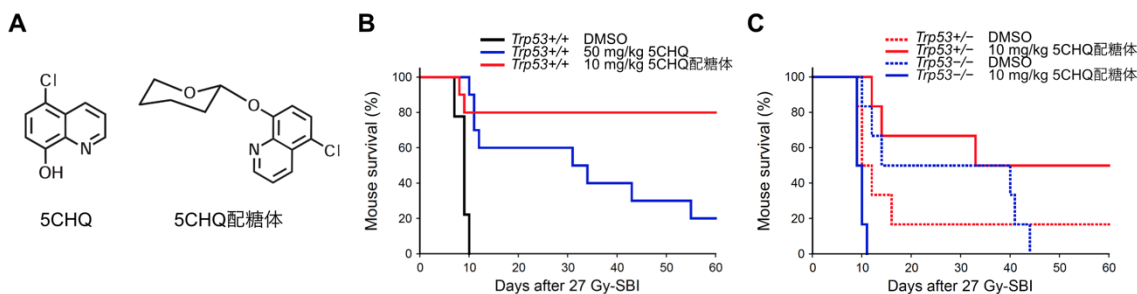


図 2 後半 X 線照射 ICR マウスに対し、5CHQ 配糖体は 5CHQ より優れた放射線防護効果を示す。後半照射 (sub-total-body irradiation; SBI) によって骨髄死を回避し、腸死に対する防護活性評価を行った。(A) 5CHQ および 5CHQ 配糖体の構造 (特許出願予定のため糖構造の詳細非掲載)。(B) 野生型 ICR マウスを用いた至適投与濃度における防護効果の比較。(C) *Trp53*<sup>+/+</sup> および *Trp53*<sup>+/-</sup> マウスによる 5CHQ 配糖体防護活性の p53 特異性の検証。

#### (3) p53 阻害剤バナデートが護る組織の解明

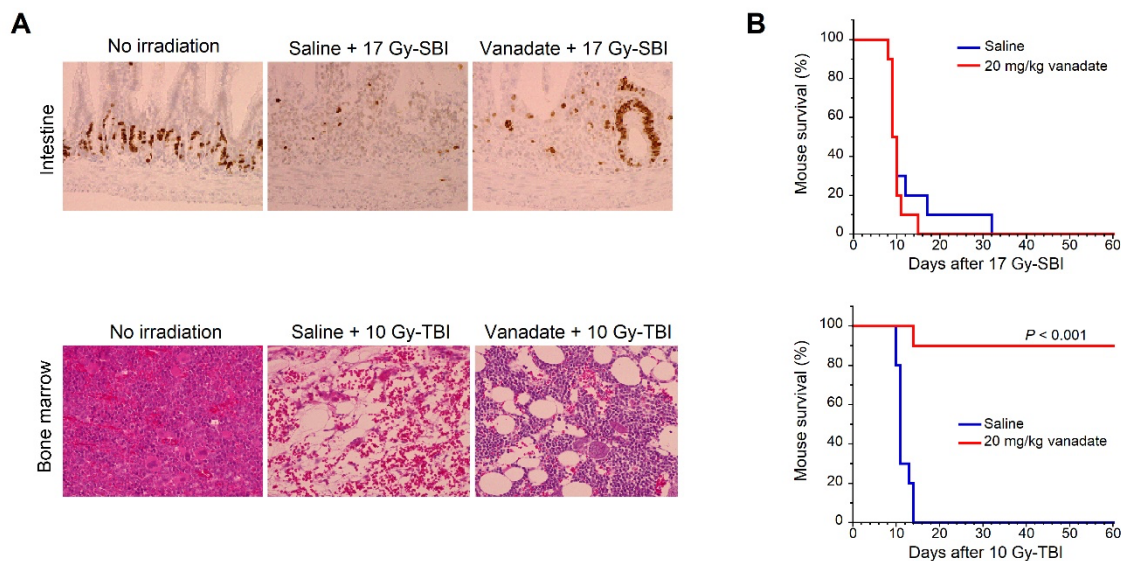


図 3 バナデートは全身照射後の骨髄障害を防ぐが、亜全身照射後の腸管障害は防がない。SBI 後の腸管障害および全身照射 (total-body irradiation; TBI) 後の骨髄障害に対するバナデートの防護効果の違いを検討した。(A) 野生型 ICR マウスにおけるバナデートの腸管組織 (照射 4 日後の BrdU 取込みアッセイ) および骨髄組織 (照射 12 日後の HE 染色像) への保護効果。(B) 野生型 ICR マウスを用いたバナデートの腸死および骨髄死に対する防護効果。

後半身照射法により、腸管に対するバナデートの防護効果を検討した。5CHQとは異なり、バナデートはSBIに対して腸管組織を保護することができず、腸死への防護効果を一切示さなかった。その一方で、バナデートは全身照射後の骨髄障害を抑制し、骨髄死に対する顕著な防護効果を示した。これらより、バナデートは骨髄組織に対して顕著に防護効果を発揮し、腸管障害の抑制を目的とした使用には適さないことが明らかとなった（図3）。

(4) 粒子線に対する防護活性評価

p53阻害剤であるバナデートが、85 keV/μmを超える鉄線によるマウス全身障害においても有効であることを明らかにした。また、5CHQは炭素線腸障害の防護に有効であったが、鉄線腸障害に対する防護効果は得られなかった（表1）（*Front. Public Health* 8, 601124, 2020）。しかしながら、5CHQより強い活性を持ったp53調節剤の発見によって防護効果が改善される可能性もあると考えられたため、5CHQ配糖体の粒子線防護効果を現在検討中である。

表1 粒子線防護効果まとめ

	TBI		ABI	
	C-beam	Fe-beam	C-beam	Fe-beam
vanadate	◎	○	×	-
5CHQ	×	-	○	×

※ - は、炭素線で有効性が認められなかったため実施していない。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Morita Akinori, Wang Bing, Tanaka Kaoru, Katsube Takanori, Murakami Masahiro, Shimokawa Takashi, Nishiyama Yuichi, Ochi Shintaro, Satoh Hidetoshi, Neno Mitsuru, Aoki Shin	4. 巻 8
2. 論文標題 Protective Effects of p53 Regulatory Agents Against High-LET Radiation-Induced Injury in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Public Health	6. 最初と最後の頁 601124 ~ 601124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpubh.2020.601124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ochi Shintaro, Nishiyama Yuichi, Morita Akinori	4. 巻 66
2. 論文標題 Development of p53-targeting drugs that increase radioresistance in normal tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 219 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.66.219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 西山 祐一、森田 明典	4. 巻 54
2. 論文標題 p53制御による放射線感受性修飾にもとづく防護剤開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 237-250
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 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 Nishiyama Yuichi, Morita Akinori, Wang Bing, Sakai Takuma, Ramadhani Dwi, Satoh Hidetoshi, Tanaka Kaoru, Sasatani Megumi, Ochi Shintaro, Tominaga Masahide, Ikushima Hitoshi, Ueno Junji, Neno Mitsuru, Aoki Shin	4. 巻 97
2. 論文標題 Evaluation of sodium orthovanadate as a radioprotective agent under total-body irradiation and partial-body irradiation conditions in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2021.1941377	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 該当する

1. 著者名 Morita Akinori, Ochi Shintaro, Satoh Hidetoshi, Ujita Shohei, Matsushita Yosuke, Tada Kasumi, Toyoda Mihiro, Nishiyama Yuichi, Mizuno Kosuke, Deguchi Yuichi, Suzuki Keiji, Tanaka Yoshimasa, Ueda Hiroshi, Inaba Toshiya, Hosoi Yoshio, Aoki Shin	4. 巻 11
2. 論文標題 A Novel RNA Synthesis Inhibitor, STK160830, Has Negligible DNA-Intercalating Activity for Triggering A p53 Response, and Can Inhibit p53-Dependent Apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1087~1087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11101087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama Yuichi, Morita Akinori, Tatsuta Shogo, Kanamaru Misaki, Sakaue Masahiro, Ueda Kenta, Shono Manami, Fujita Rie, Wang Bing, Hosoi Yoshio, Aoki Shin, Sugai Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Isorhamnetin Promotes 53BP1 Recruitment through the Enhancement of ATM Phosphorylation and Protects Mice from Radiation Gastrointestinal Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1514~1514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12101514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takuma Sakai, Akinori Morita, Akinori Kanai, Bing Wang, Atsushi Enomoto, Shohei Ujita, Shin Aoki, Hidetoshi Sato, Masahiro Sakaue, Yuichi Nishiyama, Toshiya Inaba
2. 発表標題 Expression analysis of genes associated with the radioprotective effect of p53 modulator 5CHQ on acute intestinal radiation injury
3. 学会等名 The 5th International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akinori Morita, Tatsuta Shogo, Sakaue Masahiro, Fujita Ria, Hanaya Kengo, Sugai Takeshi, Yuichi Nishiyama, Ochi Shintaro, Sakai Takuma, Wang Bing and Aoki Shin
2. 発表標題 Evaluation of the radioprotective effects of flavonoids.
3. 学会等名 The 62th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichi Nishiyama, Akinori Morita, Sakai Takuma, Ramadhani Dwi, Satoh Hidetoshi, Kawabata Ryoya, Tanaka Kaoru, Sasatani Megumi, Ochi Shintaro, Neno Mitsuru and Aoki Shin
2. 発表標題 The p53 inhibitor sodium orthovanadate is not effective in relieving acute gastrointestinal syndrome of subtotal-body irradiated mice.
3. 学会等名 The 62th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakai Takuma, Akinori Morita, Kanai Akinori, Wang Bing, Enomoto Atsushi, Ujita Shohei, Aoki Shin, Sato Hidetoshi, Kawabata Junya, Sakaue Masahito, Yuichi Nishiyama and Inaba Toshiya
2. 発表標題 The radioprotector 5CHQ upregulates gene expression of radioprotective humoral factors in acute radiation-injured murine intestinal epithelium.
3. 学会等名 The 62th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ochi Shintaro, Satoh Hidetoshi, Ujita Shohei, Tada kasumi, Yosuke Matsushita, Milzuno Kosuke, Deguchi Yuichi, Suzuki Keiji, Tanaka Yoshimasa, Ueda Hiroshi, Inaba Toshiya, Hosoi Yoshio, Aoki Shin and Akinori Morita
2. 発表標題 Mechanism of action of p53-regulating anti-cell death compound discovered by chemical library screening.
3. 学会等名 he 62th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田 明典, 王 冰, 田中 薫, 勝部 孝則, 村上 正弘, 西山 祐一, 越智 進太郎, 寺岡 達朗, 佐藤 秀哉, 川端 凌矢, 下川 卓志, 根井 充, 青木 伸
2. 発表標題 p53制御による重粒子放射線防護効果
3. 学会等名 第57回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井 卓磨, 西山 祐一, 森田 明典, 王 冰, ラマダニー ドゥウィー, 佐藤 秀哉, 川端 凌矢, 田中 薫, 笹谷 めぐみ, 越智 進太郎, 根井 充, 青木 伸
2. 発表標題 p53阻害剤パナデートは垂全身照射後のマウス腸管障害を促進する
3. 学会等名 第57回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 秀哉, 越智 進太郎, 水野 皓介, 松下 洋輔, 出口 雄一, 鈴木 啓司, 田中 義正, 植田 弘師, 稲葉 俊哉, 細井 義夫, 森田 明典, 青木 伸
2. 発表標題 放射線防護活性を有する 2-Oxopyrrole 類の設計・合成及び活性評価
3. 学会等名 日本薬学会 第139年回
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taiga Tanimoto, Akinori Morita, Yuichi Nishiyama, Takatsugu Murata, Anjyu Sakai, Akinori Kanai, Yuichi Higashi, Taisei Kunii, Takuma Sakai, Ryo Sadatomi, Bing Wang, Takashi Shimokawa, Kenya Nakata, Naoki Takemura, Tatsuya Saitoh, Toshiya Inaba and Isamu Shiina
2. 発表標題 A novel immunomodulatory compound that prevents sub-total body irradiation-induced intestinal death
3. 学会等名 The 64th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 優一, 森田 明典, 西山 祐一, 村田 貴嗣, 酒井 杏樹, 金井 昭教, 谷本 大河, 坂井 卓磨, 中田 健也, 武村 直紀, 齊藤 達哉, 稲葉 俊哉, 椎名 勇
2. 発表標題 抗炎症作用を有する新規化合物の腸炎制御剤としての活性評価
3. 学会等名 第29回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 森田 明典, 王 冰, 田中 薫, 勝部 孝則, 村上 正弘, 下川 卓志, 西山 祐一, 越智 進太郎, 佐藤 秀哉, 根井 充, 青木 伸
2. 発表標題 p53を標的とした放射線防護剤の粒子線治療における役割
3. 学会等名 第58回生物部会学術大会・第49回放射線による制癌シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本 大河, 森田 明典, 西山 祐一, 村田 貴嗣, 酒井 杏樹, 金井 昭教, 東 優一, 越智 進太郎, 國井 大誓, 坂井 卓磨, 貞富 凌, 王 冰, 下川 卓志, 中田 健也, 齊藤 達哉, 稲葉 俊哉, 椎名 勇
2. 発表標題 抗炎症作用を有する新規化合物の放射線防護剤としての活性評価
3. 学会等名 第58回生物部会学術大会・第49回放射線による制癌シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【研究成果報告】正常組織の放射線耐性を高める放射線防護剤の開発  <a href="https://www.tokushima-u.ac.jp/docs/2017100400041/">https://www.tokushima-u.ac.jp/docs/2017100400041/</a></p>
---

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	青木 伸  (AOKI Shin)  (00222472)	東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・教授    (32660)	

6. 研究組織（つづき）

	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	王 冰  (WANG Bing)  (10300914)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・グループリーダー（定常）    (82502)	
研究分担者	下川 卓志  (SHIMOKAWA Takashi)  (20608137)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 物理工学部・研究統括（定常）    (82502)	
研究分担者	椎名 勇  (SHIINA Isamu)  (40246690)	東京理科大学・理学部第一部応用化学科・教授    (32660)	
研究分担者	笹谷 めぐみ（豊島めぐみ）  (SASATANI Megumi)  (80423052)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授    (15401)	
研究分担者	真板 宣夫  (MAITA Nobuo)  (00404046)	徳島大学・先端酵素学研究所（次世代）・准教授    (16101)	

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			
インドネシア	インドネシア原子力庁			