

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791198

研究課題名 (和文) 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研究課題名 (英文) Development of multi-functional radiosensitizer based on *in vivo*
radiosensitizing activity using tumor-implant chick embryo

研究代表者

宇都 義浩 (UTO YOSHIHIRO)

徳島大学・大学院リソテカサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20304553

研究成果の概要 (和文) : 現在のマウスやラットを用いた動物実験系に比べて簡便かつ大量の候補薬剤のスクリーニング実験が可能な次世代動物実験系を構築することを目的とし、マウス乳腺がん由来 EMT6/KU 細胞を発育鶏卵の漿尿膜血管に移植し、形成した固形腫瘍に対する放射線増感剤エタニダゾールの放射線増感活性評価系の構築に成功した。また、この腫瘍移植鶏卵を用いてエタニダゾールの薬物動態解析にも成功した。

研究成果の概要 (英文) : Chick embryo have been used as alternative experimental animals in various research fields, including virology, immunology, toxicology, oncology, and embryology. In this research, we developed the screening system of *in vivo* radiosensitizing activity of etanidazole as a radiosensitizer using tumor-bearing chick embryo. Moreover, we succeeded the evaluation of pharmacokinetic property of etanidazole using this model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：放射線腫瘍学

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：発育鶏卵, 放射線増感剤, 固形腫瘍

1. 研究開始当初の背景

本申請研究は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を目的とする。がんの低酸素細胞は、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、近年、血管新生・浸潤・転移・遺伝子不安定性などのがん細胞特性に深く関わっていることが明らかとなってきている。これに対し、この低酸素がん細胞に対する低 LET 放射線の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 (Overgaard, J. et al., *Lancet Oncol.*, 6, 757-764, 2005)。ニモラゾールは第3相臨床試験で有効性が示されなかったエタニダゾールと比較して *in vitro* 系では増感活性が低かったものの、薬物動態的に有利であったため *in vivo* 系において高い増感活性を示したことが開発成功の一因とされている。このことは、低酸素細胞

放射線増感剤の開発には固形腫瘍を形成し、かつ個体中での薬物動態を測定できる *in vivo* 評価系が必須であることを示唆している。しかしながら、従来のマウスを用いた *in vivo* 評価系は、高価で個体差が大きく、倫理的問題を含み、煩雑な実験操作を要し、動物舎等の特別な施設を必要とするため多くの候補薬剤をスクリーニングするには不適である。本申請者はこれまでに、「DNA に作用するスレーディングインターカレタ型低酸素細胞放射線増感剤の開発、奨励研究、代表、2001年4月～2003年3月」、「マクロファージの低酸素指向性を利用した低酸素細胞放射線増感剤の分子設計、基盤研究(B)、分担、2002年4月～2005年3月」、「p53の阻害を介して正常細胞へのダメージを軽減する低酸素細胞放射線増感剤の開発、若手研究(B)、代表、2003年4月～2006年3月」、「マクロファージの低酸素腫瘍移行性を利用した放射線増感剤・p53再活性化剤の開発、若手研究(B)、代表、2006年4月～2009年3月」の研究を通して多くのユニークな低酸素細胞放射線増感剤を開発しており、簡便かつ大量の候補薬剤に対するスクリーニング実験が可能な *in vivo* モデル系を構築しこれまでに開発した低酸素細胞放射線増感剤の活性を評価することで、より臨床応用を目指した低酸素細胞放射線増感剤の創製が可能となる。よって、本申請研究では、安価でジェネティック制御下にあるため個体差が小さく、実験誤差が小さく、倫理的問題の少なく済み、動物舎等の特別な施設を必要としない発育鶏卵を用いた腫瘍移植鶏卵モデルの作成とその *in vivo* 活性を指標とした多機能性放射線増感剤の創製を試みる。

2. 研究の目的

本申請研究「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」は、安価でジェネティック制御下にあるため個体差が小さく、実験誤差が小さく、倫理的問題の少なく済み、動物舎等の特別な施設を必要としない発育鶏卵（発生中の受精鶏卵のこと）を用いて漿尿膜血管上に固形腫瘍を形成させた腫瘍移植鶏卵モデルを作成し、*in vivo* 放射線増感活性を指標として臨床応用を目指した低酸素細胞放射線増感剤の開発を試みるものである。

3. 研究の方法

本研究の目的である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に向けて、その研究計画・方法の要旨を述べる。まず発育鶏卵に対する腫瘍移植条件の検討を行う。次に低酸素細胞放射線増感剤の投与方法および放射線の照射方法を決定し、構築した *in vivo* 評価系を用

いて低酸素細胞放射線増感剤の増感効果を評価する。得られた結果を *in vitro* 系や従来の *in vivo* 系で得られた結果と比較し、臨床応用に最適な多機能性放射線増感剤の創製を達成する。

(1) 発育鶏卵に対する腫瘍移植条件

本申請者はこれまでに、マウス乳腺癌由来 EMT6/KU 細胞の発育鶏卵への移植に成功しているが、より汎用性が高く安定した *in vivo* モデル系を構築するために、多種の腫瘍細胞の移植条件を同定する必要がある。そこで、放射線増感剤の試験によく用いられるいくつかの腫瘍細胞（特に p53 ステータスの異なる腫瘍細胞）について移植条件の検討を行う。また、形成された固形腫瘍の低酸素領域について、ピモニダゾールによる染色および再播種後の増殖曲線から同定する。

(2) 低酸素細胞放射線増感剤の投与方法

低酸素細胞放射線増感剤としては、*in vitro* および *in vivo* データが豊富なミソニダゾール、エタニダゾールおよびニモラゾールを用いて発育鶏卵への薬剤投与方法について検討する。方法としては、漿尿膜血管に対する静脈注射法および腫瘍周辺の漿尿膜血管への局所投与方法を検討する。鶏卵における薬物動態について、腫瘍、血中および鶏胎児の各臓器中の薬剤濃度を HPLC を用いて追跡し、得られた結果を既に報告されている従来のマウス等の動物モデルの結果と比較し、より類似した結果を示した投与方法を採用する。

(3) 放射線の照射方法

照射装置として MBR-1520A-3 (150 kV X 線、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部が現有) を用いる。まず、発育鶏卵に対し X 線を照射し、発育段階の異なる鶏卵の致死線量や耐容線量を決定する。特に、腫瘍成長に必須である漿尿膜血管への影響については各バイオマーカーを用いて詳細に調べる。それらの結果より腫瘍移植鶏卵への照射線量を決定し、各照射線量における固形腫瘍を単離し、サイズと重量の変化より腫瘍成長阻害率を求める。また、その時の低酸素領域の分布変化についても調べる。

(4) 低酸素細胞放射線増感剤の増感効果

先に得られた薬物動態と照射線量の結果から、薬剤投与のタイミングおよび放射線量を決定し、固形腫瘍の成長阻害率から *in vivo* 放射線増感効果を評価する。低酸素細胞放射線増感剤としては、前述のミソニダゾール、エタニダゾールおよびニモラゾールに加えて本申請者がこれまでに分子設計した低酸素細胞放射線増感剤を用いる。

(5) 毒性・副作用

用いた低酸素細胞放射線増感剤の毒性・副作用について、まず、臨床試験で最も障害と

なる心毒性を調べる。手法としては、増感剤を投与後心電計を用いて鶏胎児の心電図を測定し、PR・ST・QT 間隔の変化を調べる。また、各臓器への副作用についてはバイオマーカーを用いて調べる。変異原性・催奇性に関しては、21日目のヒヨコへのふ化時の形態観察により評価する。また、臨床応用が期待できる候補増感剤について毒性や副作用を調べ、構造活性相関より化学構造の最適化を図る。これにより臨床応用可能な低酸素細胞放射線増感剤の創製を完了する。

4. 研究成果

平成 21 年度に実施して得られた成果は、発育鶏卵に対する最適な腫瘍移植条件として、自動転卵した 11 日目の発育鶏卵にマウス乳腺癌由来細胞 EMT6 を 5×10^5 個/鶏卵で移植することにより安定した固形腫瘍の成長と高い鶏胎児の生存率を得ることが可能であることを見出した (図 1)。

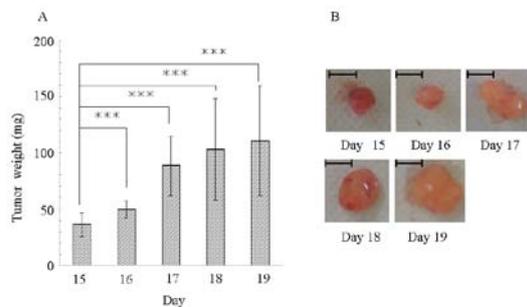


図1 発育鶏卵に移植した固形腫瘍の経時変化

また、低酸素細胞放射線増感剤として臨床試験が実施されたエタニダゾールを 15 日目の発育鶏卵に静脈注射したところ、3 mg までは鶏胎児毒性を示さないことが分かった (図 2)。

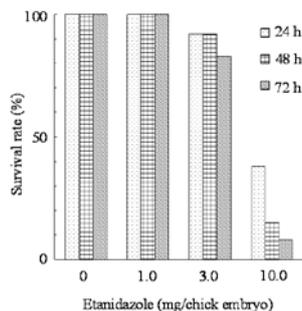


図2 エタニダゾールの鶏胎児毒性

放射線の照射方法については、150 kVの実験用 X 線照射装置と 6 MeV の治療用照射装置を用いて鶏胎児に対する耐線量を調べたところ、両者とも 12 Gy 付近で LD_{50} を示し、8 Gy 以下では目立った毒性を示さないことが分かった (図 3)。

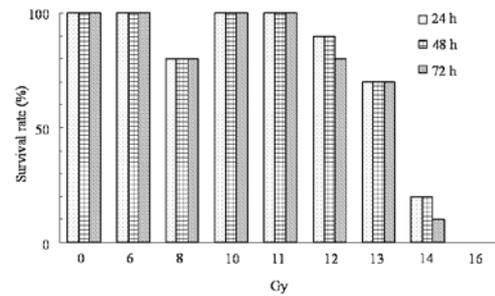


図3 鶏胎児の耐X線量

低酸素細胞放射線増感剤の増感効果を評価する方法として、自動転卵した 15 日目の発育鶏卵 1~3 mg のエタニダゾールを静脈投与し、その 10 分後に 2~8 Gy の X 線を照射後 72 時間後の腫瘍を単離して重量を測定し、コントロール群と比較して得られる固形腫瘍の成長阻害率から *in vivo* 放射線増感効果を求める方法が確立できた。以上の結果より、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についての第一段階の構築が完了した。

平成 22 年度は、平成 21 年度に構築した評価系を用いて我々が分子設計した糖ハイブリッド放射線増感剤 TX-2141 および TX-2244 の *in vivo* 放射線増感活性を評価した。エタニダゾールと 4 Gy 照射の併用群は、コントロールや増感剤単独もしくは放射線照射単独群に比べて有意な腫瘍重量の減少は見られなかった。一方、エタニダゾールと 8 Gy 照射の併用群は、コントロールや増感剤単独群もしくは放射線照射単独群に比べて有意な腫瘍重量の減少が見られ ($p = 0.043$ vs. control; $p = 0.015$ vs. drug; $p = 0.0029$ vs. 8 Gy), コントロール群に対して 35% の腫瘍成長阻害率を示した (図 4)。

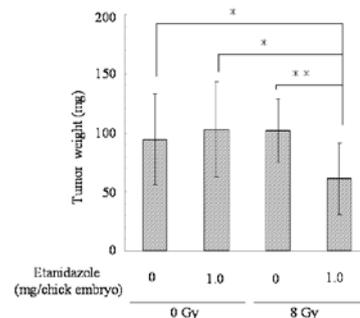


図4 腫瘍移植鶏卵に対するエタニダゾールの放射線増感活性

TX-2141 に関しては、TX-2141 と 8 Gy 照射の併用群においてコントロールに比べて有意な腫瘍重量の減少が見られたが ($p = 0.031$ vs. control), 8 Gy 照射群と同程度の腫瘍成長阻害率 (25%) であり TX-2141 の相加的・

相乗的効果は見られなかった (図5)。

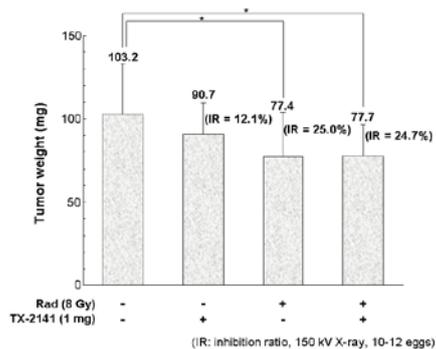


図5 腫瘍移植鶏卵に対するTX-2141の放射線増感活性

TX-2141 は腫瘍移植鶏卵モデルにおいてエタニダゾールと同程度の腫瘍集積性を有するにも関わらず in vivo 放射線増感活性を示さなかったことから、腫瘍中の低酸素がん細胞移行性の差が示唆される。TX-2244 もTX-2141 と同様 in vivo 放射線増感活性を示さなかった (図6)。

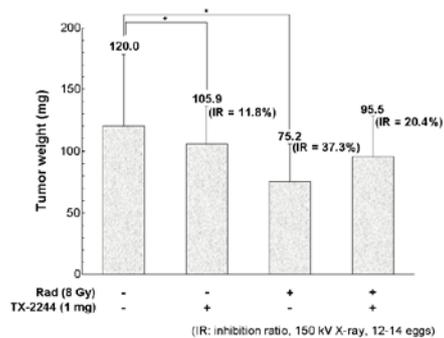


図6 腫瘍移植鶏卵に対するTX-2244の放射線増感活性

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 11 件)

- 1) 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.
- 2) Nakata E, Nazumi Y, Yukimachi Y, Uto Y, Maezawa H, Hashimoto T, Okamoto Y, Hori H, Synthesis and photophysical properties of new SNARF derivatives as dual emission pH sensors, *Bioorg Med Chem Lett*, 21, 1663-6, 2011, 査読有.
- 3) Hori H, Uto Y, Nakata E, Medicinal electronics bricolage design of hypoxia-targeting antineoplastic drugs and invention of boron tracers as

innovative future-architectural drugs, *Anticancer Res*, 30, 3233-42, 2010, 査読有.

4) Nonaka K, Onizuka S, Ishibashi H, Uto Y, Hori H, Nakayama T, Matsuura N, Kanematsu T, Fujioka H, Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor Inhibits HCC in SCID Mice, *J Surg Res*, in press, 2010, 査読有.

5) Nakata E, Yukimachi Y, Nazumi Y, Uto Y, Maezawa H, Hashimoto T, Okamoto Y, Hori H, A newly designed cell-permeable SNARF derivative as an effective intracellular pH indicator, *Chem Commun (Camb)*, 46, 3526-8, 2010, 査読有.

6) Nakashima H, Ikkyu K, Nakashima K, Sano K, Uto Y, Nakata E, Nagasawa H, Sugimoto H, Shiro Y, Nakagawa Y, Hori H, Design of novel hypoxia-targeting IDO hybrid inhibitors conjugated with an unsubstituted L-TRP as an IDO affinity moiety, *Adv Exp Med Biol*, 662, 415-21, 2010, 査読有.

7) Nakata E, Yukimachi Y, Kariyazono H, Im S, Abe C, Uto Y, Maezawa H, Hashimoto T, Okamoto Y, Hori H, Design of a bioreductively-activated fluorescent pH probe for tumor hypoxia imaging, *Bioorg Med Chem*, 17, 6952-8, 2009, 査読有.

8) Uto Y, Koyama D, Otsuki M, Otomo N, Shirai T, Abe C, Nakata E, Nagasawa H, Hori H, A chemical biosynthesis design for an antiatherosclerosis drug by acyclic tocopherol intermediate analogue based on "isoprenomics", *Adv Exp Med Biol*, 645, 109-14, 2009, 査読有.

9) Miyake K, Shimada M, Nishioka M, Sugimoto K, Batmunkh E, Uto Y, Nagasawa H, Hori H, Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator by TX-1877 results in decreased tumor growth and metastasis on xenograft model of rectal cancer, *Cancer Chemother Pharmacol*, 64, 885-92, 2009, 査読有.

10) Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Ohta T, Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis, *Mol Nutr Food Res*, 53, 643-51, 2009, 査読有.

11) 安部千秋, 宇都義浩, 遠藤良夫, 新元優也, 中島宏一郎, 佐野圭一郎, 佐々木有紀, 皆巳和賢, 前澤博, 増永慎一郎, 中田栄司, 堀均: 次世代動物実験系としての腫瘍移植鶏卵の構築と放射線照射による腫瘍成長阻

害活性, 放射線生物研究, 44, 233~241 頁, 2009, 査読無.

〔学会発表〕(計14件)

- 1) Uto Y, Abe C, Yoshitomi T, Nagasaki Y, Endo Y, Nakata E, Hori H, In vivo antioxidative activity of radical-containing-nanoparticle (RNP) in fertilized chicken egg assay, International Conference on Biomaterials Science 2011, 2011年3月16日, つくば市.
- 2) 宇都義浩, 中江崇, 金園剛行, 村井絵美, 佐野圭一郎, 寺岡瑞絵, 富永正英, 前澤博, 堀均, 放射線増感活性における糖要求性からみたアセチル化グルコースハイブリッド放射線増感剤TX-2244 のメディシナルケミストリー, 第13回癌治療増感研究シンポジウム, 2011年2月11日, 奈良市.
- 3) Uto Y, Abe C, Nakae T, Endo Y, Tominaga M, Maezawa H, Nakata E, Hori H, Systems biology-based drug design of sugar-hybrid hypoxic cell radiosensitizers using the tumor-implantable chick embryo model, PACIFICHEM 2010, 2010年12月19日, ホノルル市.
- 4) 宇都義浩, 山本将太, 竹内亮太, 中川美典, 廣田慶司, 寺田弘, 鬼塚伸也, 中田栄司, 堀均, 癌免疫療法の確立を目指したマクロファージ活性化因子(GcMAF)前駆物質GcXの創製, 第14回バイオ治療法研究会学術集会, 2010年12月11日, 福岡市.
- 5) Uto Y, Abe C, Nakata E, Hori H, SAR analysis of electron-rich polyyne analogues of FTY720 based on in vivo chick embryo antiangiogenic assay, 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月22日, 大阪市.
- 6) 宇都義浩, 安部千秋, 吉富徹, 長崎幸夫, 遠藤良夫, 中田栄司, 堀均, ストレス発育鶏卵モデルを用いたラジカル含有ナノ粒子TEMPO-RNPのin vivo抗酸化活性評価, 第63回日本酸化ストレス学会, 2010年6月24日, 横浜市.
- 7) Uto Y, Tanaka R, Ohnaka K, Ohta Y, Yazaki K, Umamoto N, Nakata E, Hori H, Prenylated acylphloroglucinol derivatives: Isoprenomics-based design, syntheses and antioxidative activities, International Society on Oxygen Transport to Tissue 2010, 2010年7月19日, アスコナ(スイス).
- 8) 宇都義浩, 安部千秋, 中江崇, 村井絵美, 遠藤良夫, 富永正英, 前澤博, 増永慎一郎, 中田栄司, 堀均, 腫瘍移植鶏卵モデルによる糖ハイブリッド放射線増感剤のin vivo放射線増感活性の評価, 第16回国際癌治療増感研究会, 2010年6月19日, 岐阜市.
- 9) 宇都義浩, 抗酸化剤と酸化ストレスの新しい評価法, 第7回学際物質戦略イニシアチ

ブ バイオGPワークショップ, 2010年3月13日, つくば市.

- 10) 宇都義浩, 山下洋平, 田中涼, 中田栄司, 堀均, システムバイオロジー構築のためのフィチルキノールの合成と抗酸化活性評価, 第21回ビタミンE研究会, 2010年1月22日, 東京都.
- 11) 中江崇, 宇都義浩, 安部千秋, 金園剛行, 新元優也, 佐野圭一郎, 中田栄司, 遠藤良夫, 富永正英, 前澤博, 橋本敏弘, 増永慎一郎, 堀均, 鶏胚異種移植腫瘍モデルを基盤とした糖ハイブリッド低酸素細胞放射線増感剤の創製, 創薬懇話会 2009, 2009年12月10日, 岐阜市.
- 12) 宇都義浩, 安部千秋, 遠藤良夫, 前澤博, 中田栄司, 堀均, 腫瘍移植鶏卵を用いて薬物動態を考慮した糖ハイブリッド放射線増感剤のドラッグデザイン, 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月1日, 横浜市.
- 13) 宇都義浩, 中江崇, 安部千秋, 新元優也, 佐野圭一郎, 遠藤良夫, 富永正英, 前澤博, 中田栄司, 堀均, 腫瘍移植鶏卵モデルによる糖ハイブリッド放射線増感剤の薬物動態解析, 第15回国際癌治療増感研究会, 2009年6月20日, 京都市.
- 14) 宇都義浩, 安部千秋, 山下洋平, 田中涼, 遠藤良夫, 中田栄司, 堀均, イソプレノキスを基盤としたプレニル化フェニルプロパノイドの分子設計と発育鶏卵を用いたin ovo抗酸化活性の評価, 第62回日本酸化ストレス学会学術集会, 2009年6月11日, 福岡市.

〔図書〕(計1件)

- 1) 堀均, 宇都義浩, 永澤秀子, 中田栄司, 酸素をターゲットとしたがんの治療, 朝倉書店, 東京, 2009年9月, 596頁(466-477頁).

〔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・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・
准教授

研究者番号: 20304553

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: