

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07215

研究課題名(和文)多機能性チロシンキナーゼ阻害薬の創出とがん光線力学療法への応用研究

研究課題名(英文)Development of a novel TKI 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):5-アミノレブリン酸(ALA)は、がん細胞内でヘム合成経路の酵素群により光感受性物質であるプロトポルフィリンIX(PpIX)に変換されることから、がんの光線力学療法に応用されている。本研究では、多様ながんの診断や治療に広くALAを利用可能にすべく、ALAとの併用により治療効果を増強する低分子化合物の探索研究を実施した。その結果、ABCG2阻害作用も併せ持つチロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブおよびゲフィチニブに3,5-ジクロロサリチルアルデヒド(DCSA)を導入した新たな Schiff 塩基化合物は、腫瘍細胞内PpIX蓄積量を増加し、高いALA-PDT効果増強活性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、PpIXの排出ポンプとして働くトランスポーターであるABCG2を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤にDCSAを導入した Schiff 塩基は多機能型の光線力学的治療の効果増強剤の開発の有用なリード化合物となることが確認され、これまで有効性が確認されていなかった癌腫に対しても5-アミノレブリン酸による光線力学的治療の応用が期待される。国内外でもALA-PDT効果増強に関する報告は限られており、新規 Schiff 塩基化合物を用いたALA-PDT効果増強剤の開発研究は意義ある研究成果と考える。

研究成果の概要(英文):Photodynamic diagnosis and therapy using 5-aminolevulinic acid (ALA) is a widely accepted non-invasive strategy against various cancers. Our prior research demonstrated that the Schiff base derivative, TX-816, markedly enhances the effect of ALA-based photodynamic therapy (PDT) by facilitating intracellular protoporphyrin IX (PpIX) accumulation. However, the instability of TX-816 in aqueous solutions leads to rapid hydrolysis into 3,5-dichlorosalicylaldehyde and 2-chloro-4-nitroaniline (CNA). In this study, we found that a TX-816 derivative (YS3-35), substituting CNA was substituted with dasatinib, notably enhances the effect on ALA-PDT. Furthermore, we synthesized a novel derivative, YS6-107, replacing CNA of TX-816 with gefitinib. YS6-107 also exhibited superior ALA-PDT-enhancing activity compared to gefitinib. These results suggest that Schiff base derivatives combined with tyrosine kinase inhibitors are effective lead compounds for developing novel ALA-PDT photosensitizers.

研究分野：基礎腫瘍学

キーワード：光線力学的治療 5-アミノレブリン酸 チロシンキナーゼ阻害薬

1. 研究開始当初の背景

低侵襲性のがんの治療法の一つである光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) は、治療薬であるタラポルフィンナトリウムや5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid: ALA) の適応拡大が承認されるなど、その有用性が見直されつつあり、特にがん細胞内で光感受性物質である PpIX に代謝活性化される ALA は新世代の光増感剤として注目を集めてきた。光増感剤を投与後のがん局所にレーザー光線を照射して治療を行う PDT は、元来、治療効果が高く、機能温存も可能であること、他の治療手段に支障をあたえない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、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。

ALA はヘモグロビンやシトクロムなどの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 6 種のヘム生合成系酵素により段階的に PpIX に変換される (図 1)。がん細胞内で PpIX が蓄積した後に、410 nm 付近の青色光を照射すると励起された PpIX は赤色蛍光を発するため、がん組織が可視化され、術中診断が可能となる (photodynamic diagnosis: PDD)。一方、630 nm 付近の赤色励起光を照射すると大量の一重項酸素が生じ、殺細胞効果が発揮される (以後、診断を含めて ALA-PDT と記述する)。ALA を用いる場合、従来のポルフィマーナトリウムやタラポルフィンナトリウムなど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、遮光措置も短期間で済むこと、光線の波長を変えることで、診断

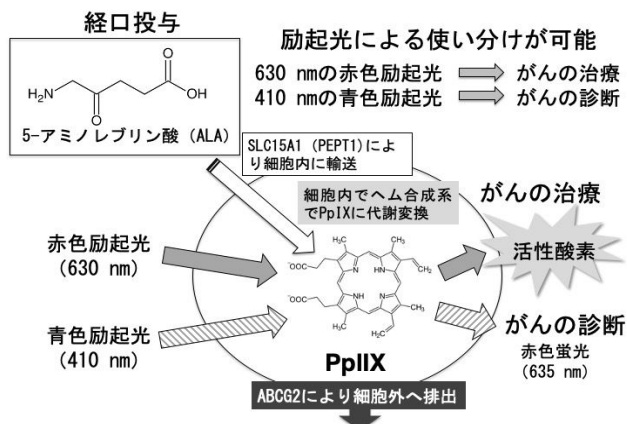


図 1. 5-アミノレブリン酸 (ALA) を用いる光線力学的治療

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。これまでに我々は、PpIX に 2 価鉄イオンをキレートさせて光増感剤として不活性なプロトヘムを生成するフェロキターゼ、ALA の細胞内取り込みに関与するトランスポーターである PEPT1 や PpIX の排出装置 (感受性を低下させる排出ポンプ) で抗がん剤耐性遺伝子の一つの ABCG2 の発現が ALA-PDT 感受性を規定する因子であること

を示してきた。また、研究分担者 (徳島大学・教授 宇都義浩) が所有する化合物ライブラリーを用い、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シッフ塩基化合物 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 2 上段) を見出し、さらに TX-816 の 2-クロロ-4-ニトロアニリン (CNA) を 4-ブチルアニリンに置換することにより化学的に安定で TX-816 に匹敵する効果増強作用を有する誘導体も見出し、報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、TX-816 をリード化合物として CNA 部位にチロシンキナーゼ阻害薬を導入した新たな誘導体を分子設計・合成し、プロドラッグ型多機能性の ALA-PDT 効果増強剤の開発を目指す (図 2 下段)。チロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブやゲフィチニブは ABCG2 を阻害して ALA-PDT 感受性を増加させることが知られる。すなわち、チロシンキナーゼ阻害薬を導入した新規 TX-816 誘導体はがん細胞内で加水分解を受けることにより ABCG2 等の薬剤排出ポンプを阻害

するとともにチロシンキナーゼ阻害などの多様な薬理活性を発揮することにより強力な PDT 効果増強および抗がん活性を発揮することが期待される。TX-816 は DCSA と CNA から合成されたシッフ塩基化合物で、ALA と同時処理することにより相乗的な PDT 効果増強作用を示す。しかしながら TX-816 は水溶液中で加水分解を受け、活性本体である DCSA と CNA に急速に分解してしまう。

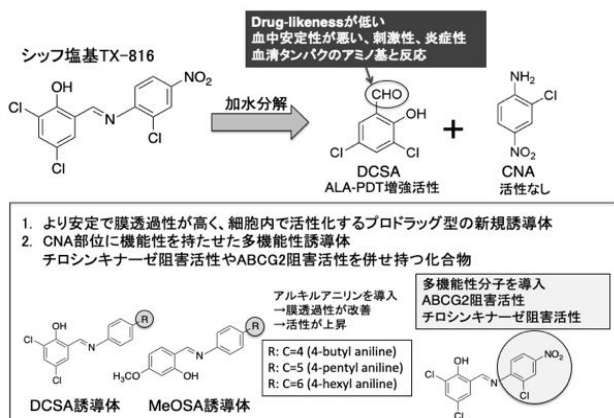


図2. TX-816をリード化合物とする誘導体開発

構造活性相関から DCSA のアルデヒド基が活性に必須であることが明らかになっているが、生体内、特に血中では DCSA のアルデヒド基がタンパクのアミノ基と反応して不活性化される可能性が考えられた。一方、CNA には効果増強活性がないことから、我々は安定な TX-816 誘導体として CNA 部位を 4-アルキルアニリン誘導体に置換した化合物を合成したところ、溶液中での安定性のみならず、細胞内

PpIX の蓄積や ALA-PDT 効果増強作用が向上することを明らかにした。これらの知見は、生体内（血中）でも安定で膜透過性が高く、腫瘍細胞内に取り込まれた後に活性化するプロドラッグ型誘導体の開発の可能性を示すものである。さらに CNA 部位をチロシンキナーゼ阻害剤の構造に変換することにより、ABC トランスポーター阻害による耐性克服やチロシンキナーゼ阻害に基づく分子標的治療、さらに光線力学的療法などががんの集学的治療にも応用可能な多機能性誘導体の開発が期待される。

3. 研究の方法

ABCG2 阻害活性を有するチロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブやゲフィチニブを導入した TX-816 誘導体を合成し（研究分担者：宇都義浩、役割：化合物の分子設計と合成）*in vitro* における ALA-PDF 効果増強活性、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。

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 TMK-1、NUGC-3 (PEPT1 低発現、ABCG2 高発現) 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 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



図3. 96-well用治療光照射装置

96 ウェル治療用 LED 光照射システム（図 3）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。

4. 研究成果

(1) チロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブを導入した TX-816 誘導体の合成

ダサチニブを導入した TX-816 誘導体 (YS3-35) は、ダサチニブのピペラジンのヒドロキシエチル基をアミノエチル基に置換後、DCSA と反応させることで合成した（図 4）。また、加水分解を受けない誘導体として、YS3-35 の炭素-窒素二重結合を還元的アミノ化した YS6-39 を合成し、ALA-PDT 効果増強活性を YS3-35 やダサチニブと比較検討した。

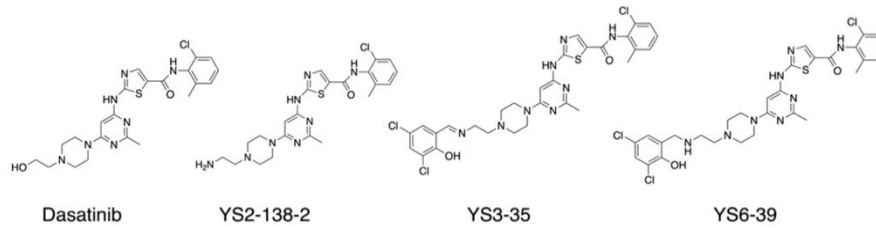


図4. ダサチニブを導入したTX-816誘導体の構造

(2) チロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブを導入したTX-816誘導体の活性評価

ヒト胃がん MKN-45、KKLS、NKPS およびヒト繊維肉腫 HT-1080 に対するダサチニブ、YS3-35 およびその合成中間体 YS2-138-2 の増殖抑制活性を比較した結果、ダサチニブと YS3-35 はほぼ同程度の増殖抑制活性を示し、YS2-138-2 の抑制活性はそれらより弱いものであった(表1)。

Compound	IC ₅₀ (μM)			
	MKN-45	KKLS	NKPS	HT-1080
Dasatinib	10.8	3.4	10.1	0.3
YS2-138-1	13.4	5.0	12.2	0.6
YS3-35	11.1	2.8	9.8	0.2

表1. ダサチニブ、YS3-35およびその合成中間体YS2-138-2の増殖抑制活性を比較

KKLS 細胞の細胞内 c-Src のリン酸化に対するこれらの化合物の作用を調べたところ、ダサチニブと YS3-35 はほぼ同程度の細胞内 c-Src のリン酸化を阻害し、チロシンキナーゼ阻害活性において差は認められなかった。

HT-1080 は、PEPT1 の発現は見られない一方、ABCG2 を高発現している。この HT-1080 にヒト PEPT1 を強制発現させた細胞を用い、ALA-PDT の効果増強作用を比較したところ PEPT1 を強制発現させるだけでは ALA-PDT に低感受性のままであるが、ALA と同時に ABCG2 の特異的阻害剤フミトレモルジン C や非特異的阻害剤であるジピリダモールを処理すると ALA-PDT 感受性を飛躍的に亢進させることができる。この実験系により YS3-35 の効果を調べたところ、ダサチニブや DCSA よりも強い効果増強作用が示された(図5)。さらに、YS3-35 は、ジピリダモールと同程度の増強作用を示し、ABCG2 を効果的に阻害していることが示唆された。

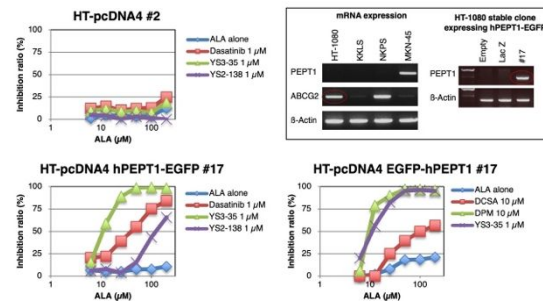


図5. YS3-35のALA-PDT効果増強作用

8種の胃がん細胞(MKN-45, NUGC-4, Nakajima, KKLS, NKPS, TMK-1, NUGC-3, MKN-7)に対するYS3-35の増強作用を試験したところ、IC₅₀値でYS3-35単剤での阻害率が30%以下、ALA単独と併用時のIC₅₀値の差が2倍以上の時、増強効果ありと判定するとNUGC-4、NUGC-3、TMK-1が有効と判定された。さらに、RT-PCRでPEPT1やABCG2の発現を調べたところ、ABCG2の発現が高いTMK-1やNUGC-3細胞で効果増強作用が強く現れる傾向があった。

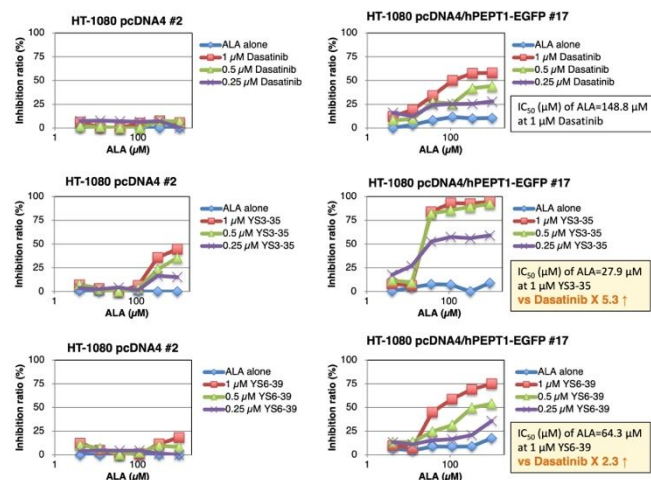


図6. YS3-35とYS6-39のALA-PDT効果増強作用の比較

また、YS3-35の炭素-窒素二重結合を還元的アミノ化したYS6-39を合成し、ヒトPEPT1/SLC15A1を強制発現させたヒト繊維肉腫細胞HT-1080に対するALA-PDTの効果増強活性を比較検討した

結果、YS3-35 は YS6-39 やダサチニブよりも強い ALA-PDT 効果増強活性を示し、これらの化合物と ALA の同時処理後の細胞内 PpIX 蓄積量を調べたところ、YS3-35 と ALA の同時処理における細胞内 PpIX 蓄積量が最も高いことが明らかになった(図 6)。

TX-816 は DMSO に溶解後、エタノールで希釈すると速やかに加水分解されることから、YS3-35 についても、同様に溶液中での安定性を TLC 法により解析したところ、エタノール中でも、24 時間後もシッフ塩基として安定に存在していることが確認され、ALA-PDT 効果増強作用においては、ダサチニブと DCSA がシッフ塩基の構造をとることが有効であることが示唆された。

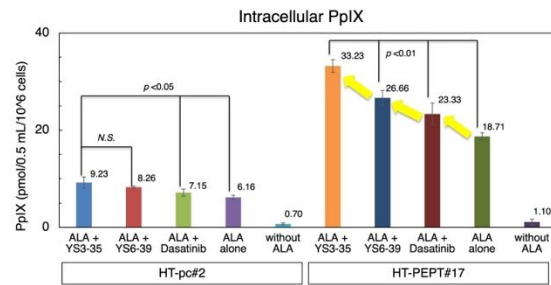


図6. ALA添加5時間後の細胞内PpIXの蓄積量

(3) チロシンキナーゼ阻害薬ゲフィチニブを導入した TX-816 誘導体の合成

ダサチニブは慢性骨髄性白血病に有効な分子標的治療薬であるが、固形がんにも有効で、ABCG2 阻害作用を有するチロシンキナーゼ阻害薬としてゲフィチニブに着目し、ゲフィチニブのキナゾリン骨格の7-メトキシ基に DCSA を導入したシッフ塩基(YS6-107)および還元的アミノ化体(YS6-118)を合成し、ゲフィチニブの ALA-PDT 効果増強活性と比較検討した(図 7)。

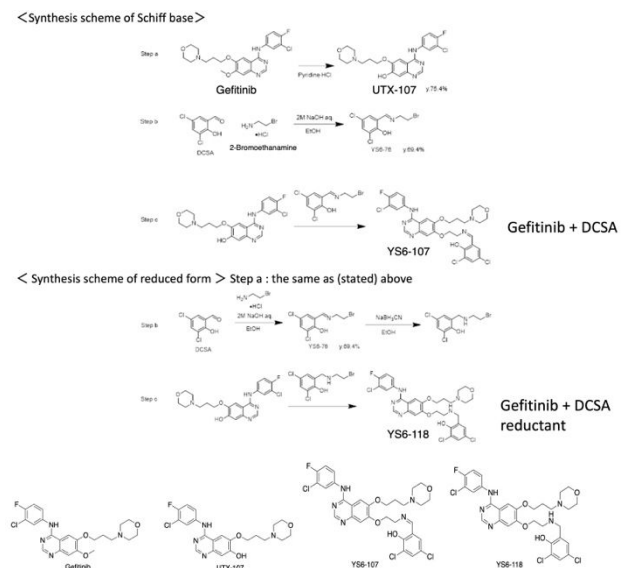


図7. ゲフィチニブを導入したTX-816誘導体の合成

(4) チロシンキナーゼ阻害薬ゲフィチニブを導入した TX-816 誘導体の活性評価

ヒト胃がん細胞 TMK-1 とヒト PEPT1 を強制発現させた HT-1080 細胞を用いて、ゲフィチニブ、YS6-107 および YS6-118、ゲフィチニブの7-メトキシ基を水酸基に置換した中間体(UTX-107)について ALA との同時処理後の細胞内 PpIX 蓄積量を比較したところ、いずれの細胞においてもシッフ塩基化合物である YS6-107 はゲフィチニブや還元的アミノ化体の YS6-118 よりも細胞内 PpIX 蓄積量が増加していた(図 8)。胃がん細胞(MKN-45, NUGC-4, Nakajima, KKLS, NKPS, TMK-1, NUGC-3)に対する ALA-PDT 効果増強作用を試験したところ、ABCG2 を高発現する NKPS および TMK-1 などで YS6-107 がゲフィチニブよりも強い効果増強作用を示した。

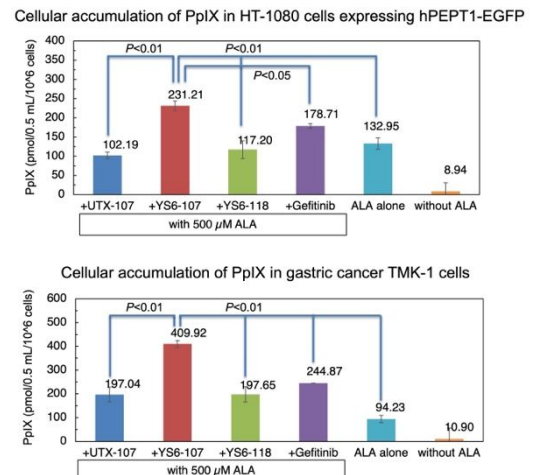


図8. ALA添加5時間後の細胞内PpIX蓄積量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshio Endo, Yoshihiro Uto, Yusei Shinohara, Chiaki Abe, Tohru Obata, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura
2. 発表標題 Development of a novel TKI derivative for enhancing the anticancer potential of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会（横浜、パシフィコ横浜、会議センター・展示ホール）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 遠藤良夫, 宇都 義浩, 篠原 侑成, 安部 千秋, 小幡 徹, 小倉 俊一郎, 米村 豊
2. 発表標題 ABCG2阻害性チロシンキナーゼ阻害剤をリードとする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効果増強剤の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌、北海道大学）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshio Endo, Yoshihiro Uto, Yusei Shinohara, Chiaki Abe, Tohru Obata, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura
2. 発表標題 Enhancing effect of novel Schiff base derivative combined with tyrosine kinase inhibitor on photodynamic therapy using 5-ALA
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（横浜、パシフィコ横浜、会議センター・展示ホール）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤 良夫、宇都 義浩、篠原 侑成、安部 千秋、小幡 徹、小倉 俊一郎、米村 豊
2. 発表標題 チロシンキナーゼ阻害剤を結合させた新規 Schiff 塩基による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
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋、オンライン開催）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	宇都 義浩 (Uto Yoshihiro) (20304553)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・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
---------	---------