

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07567

研究課題名(和文) アセチルグルコース修飾ダサチニブの分子設計・合成と放射線増感作用の評価

研究課題名(英文) Design and synthesis of acetylglucose-modified dasatinib and evaluation of radiosensitizing effect

研究代表者

宇都 義浩 (UTO, Yoshihiro)

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

研究者番号：20304553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、抗癌剤のダサチニブにアセチルグルコースを修飾した誘導体を分子設計・合成し、その抗腫瘍活性や放射線増感活性を明らかにし、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。研究成果の概要として、アセチルグルコースを修飾したダサチニブ誘導体UTX-136の分子設計・合成に成功し、ダサチニブより有意に高い放射線増感効果を有すること、細胞内外で分解されてダサチニブを生成すること、ダサチニブより高いグルコース取込み阻害能を有すること、腫瘍移植鶏卵モデルで腫瘍内に取り込まれる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

国内外の放射線増感剤の開発については、国内では過酸化水素(オキシドール)を主成分とした放射線治療用増感剤KORTUC、国外ではニモゾールが成功例として挙げられるが、対象疾患が限定されるため新たな放射線増感剤の開発が急務である。本研究は、承認済の分子標的薬にアセチルグルコースを導入することで放射線増感活性を付与し、分子標的薬そのものの薬物動態や抗癌活性への影響を最小限にして臨床利用が可能な放射線増感剤を創出するものであり、承認済の薬剤を利用するため製薬企業による放射線増感剤の開発を容易にするとともに、臨床の現場で抗癌剤と同様に利用できることが期待できるため学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we designed and synthesized a derivative of the anticancer drug dasatinib modified with acetyl glucose, clarified its antitumor activity and radiosensitizing activity, and demonstrated its usefulness as a radiosensitizer using a tumor-implanted chicken egg model. As a summary of the research results, we succeeded in molecular design and synthesis of dasatinib derivative UTX-136 modified with acetyl glucose, which has significantly higher radiosensitizing effect than dasatinib, and which is degraded inside and outside tumor cells to produce dasatinib. It was revealed that it has a higher glucose uptake inhibitory ability than dasatinib, and that it is taken up into tumors in a tumor-implanted chicken egg model.

研究分野：創薬化学

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・転移などが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低い *in vivo* 抗がん活性を示したことから、化合物の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 *in vivo* での有効性は期待できないことが示唆された (Journal of Radiation Research, 46(4), 453-9, 2005)。

これまでに研究代表者は、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、「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), H21-22」の研究を通して、腫瘍移植鶏卵を用いて簡便かつ迅速に放射線増感剤のスクリーニングが可能な *in vivo* 評価系の構築に成功し、「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), H23-25」において、研究代表者らが開発した放射線増感剤 TX-1877 にアセチルグルコースを修飾した TX-2244 は、ER = 2.30 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、「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, 基盤研究(C), H26-28」の成果より、上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼを選択的に阻害する分子標的薬剤ゲフィチニブにアセチルグルコースを修飾した UTX-114 は、ゲフィチニブの放射線増感活性を有意に増強できることを見出している。しかしながら、ゲフィチニブと放射線療法の併用に関しては、効果面でのエビデンスが乏しく間質性肺炎の報告もあるため、臨床試験での使用以外は推奨されていない。

そこで研究代表者は、放射線療法との組み合わせで急性リンパ芽球性白血病に対して有効な臨床症例が報告されている EGFR チロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブに着目した。もし、ダサチニブがゲフィチニブと同様にアセチルグルコースを修飾することで抗腫瘍活性と放射線増感活性を増強できるとしたら、急性リンパ芽球性白血病に対する化学放射線療法剤および局所再発予防としての有効性が期待できる。また、アセチルグルコースが抗癌剤の放射線増感活性を増強するユニットであることを証明できるため、学術的な価値は高いと言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アセチルグルコース修飾ダサチニブの抗腫瘍活性や放射線増感活性の詳細な機序を明らかにし、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て最適なリード化合物を設計・合成し、臨床利用が可能な放射線増感剤の創出を行うことである。従来の低酸素細胞放射線増感剤は、低酸素領域で亢進している還元系に依存しており、薬物輸送は拡散吸収が主であるため高濃度での投与が必要となり、その結果、神経毒性等の副作用で開発を断念したものも多い。近年注目されている分子標的薬剤に関しても同様に、標的とする腫瘍細胞までの輸送に関してはほとんど考慮されていない。薬剤の腫瘍までの輸送に関する研究としてリポソームを用いたドラッグデリバリーシステム (DDS) が広く検討されているが、腫瘍組織の高い血管透過性と未発達なリンパ系排出の差に依存した、いわゆる受動的集積 (EPR 効果) であり、高分子化合物に限られる現象である。抗体をラベルして腫瘍特異性を持たせる工夫も試みられているが、薬剤の安定性に欠け、標的となる抗原の発現量に左右される。これに対し、本研究のがん細胞、特に低酸素がん細胞において解糖系が亢進していることを利用して、グルコースに分子標的薬剤を導入して選択的に取り込ませるというアイデアは、他にあまり例が無く学術的独自性が高い。また、評価系として安価かつ個体差が小さく種々の倫理的問題を含まない腫瘍移植鶏卵を用いることは全く独創的であり、薬剤開発にかかる時間や経費の問題を大幅に改善でき、担癌マウスによる動物実験にもスムーズに移行できるという利点がある。また、評価にかかる時間と経費の大幅な削減、動物実験施設を持たない研究施設等での *in vivo* 実験の遂行、高価な血清等に頼らないがん細胞の増殖及びそれを用いる種々の実験の遂行が予想でき、研究費削減や倫理的問題のある現代の生物実験や薬剤開発に対して本研究の意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) 合成

2,3,4,6-Tetra-*o*-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide (500 mg, 1.22 mmol) を Acetone (1 mL) とイオン交換水 (20 μ L) に溶解させ、氷冷下で Ag₂CO₃ (570 mg, 2.07 mmol, 1.7 eq.) を 15 min かけて加え、室温で 30 min 攪拌した。反応終了後、反応液を 60 まで温め、吸引ろ過によ

り固体を除去し、Acetone で洗浄を行った。ろ液を減圧留去し、残渣に少量のエーテルを加え、氷冷下でゆっくりと n-Hexane を加えることで再沈殿を行った。固体を吸引ろ過により回収し、(2R,3R,4S,5R)-2-hydroxy-6-oxohexane-1,3,4,5-tetrayl tetraacetate (YKN2-43)(382 mg, 1.10 mmol, y=90.1%)を得た。次に、(2R,3R,4S,5R)-2-hydroxy-6-oxohexane-1,3,4,5-tetrayl tetraacetate (YKN2-43)(177 mg, 508 μ mol)を Pyridine(4 mL)に溶解させ、氷冷下で無水コハク酸(103 mg, 1.02 mmol, 2.0 eq.)と DMAP(31 mg, 254 μ mol, 0.50 eq.)を加え、室温で 1.5 h 攪拌した。反応終了後、Pyridine を除去するために n-Hexane を加え、再沈殿を行った。固体を吸引ろ過により回収し、残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-Hexane : EtOAc = 1 : 1 - EtOAc : MeOH = 5 : 1)により精製を行い 4-oxo-4-(((3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)butanoic acid(YKN2-44)(200 mg, 410 μ mol, y=80.7%)を得た。最後に、4-oxo-4-(((3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)butanoic acid(YKN2-44)(100 mg, 223 μ mol, 3.3 eq.)を DMF(1 mL)に溶解させ、氷冷下で Dasatinib(33 mg, 68 μ mol)と EDC·HCl(40 mg, 207 μ mol, 3.1 eq.)と HOBt(32 mg, 207 μ mol, 3.1 eq.)と 4-メチルモルホリン(23 μ L, 205 μ mol, 3.0 eq.)を加え、0 で 1 h 攪拌後、室温で 22 h 攪拌した。その後、反応液にイオン交換水(5 mL)を加えクエンチを行い、EtOAc で 3 回抽出を行った。有機層を 5% NaHCO₃ aq., イオン交換水, Brine で 1 回ずつ wash を行った。有機層に MgSO₄ を加え脱水後、ろ過し、ろ液を減圧留去した。残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1 - CH₂Cl₂ : MeOH = 5 : 1)により精製を行い、UTX-136(YKN2-48)(36 mg, 39.2 μ mol, y=57.6%)を得た。

(2) 殺細胞活性

A431 細胞および HepG2 細胞が subconfluent に達していることを顕微鏡で確認後、古い培地をアスピレーターで全量取り除き、1×PBS で 1 回洗浄した。1×PBS を除去し、1×トリプシン液を加えて CO₂ インキュベーター内で培養後、細胞に物理的衝撃を与えて完全に剥がした。細胞懸濁液に培地を加えて懸濁し、遠心して上清を除去した。これを段階希釈で 3.0×10⁴ cells/mL まで希釈し、96 穴プレートに播種して CO₂ インキュベーターで一晩培養した。96 穴プレートの培地を除去して化合物含有培地を添加し、CO₂ インキュベーター内で培養した。化合物含有培地をアスピレーターにより除去し、1×PBS で 2 回洗浄した。WST-1 溶液を添加し、CO₂ インキュベーターで培養後、マイクロプレートリーダーにより 450 nm の吸光度を測定した。

(3) 放射線増感活性

A431 細胞が subconfluent に達していることを顕微鏡で確認後、古い培地をアスピレーターで全量取り除き、1×PBS で 1 回洗浄した。1×PBS を除去し、1×トリプシン液を加えて CO₂ インキュベーターで培養後、細胞に物理的衝撃を与えて完全に剥がした。細胞懸濁液に培地を加えて懸濁し、遠心して上清を除去した。これを段階希釈で 1.0×10³ cells/mL まで希釈し、6 シャーレに播種し、CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。6 シャーレの培地を捨て、化合物含有培地を添加し、CO₂ インキュベーター内で培養した。化合物含有培地をアスピレーターにより除去し、1×PBS で 2 回洗浄後、培地を添加した。円の中心にシャーレの底面が来るように円形に 6 シャーレを 3 枚並べ、X 線照射を行い、CO₂ インキュベーター内で 10 日間培養した。コロニーが形成されていることを確認後、培地を除去した。1×PBS で 2 回洗浄後、MeOH を加えて静置した。MeOH を除去し、ギムザ染色液を加え、2 h 以上静置し、コロニーを染色した。ギムザ染色液を除去し、流水で穏やかに洗浄を行い、乾燥させてコロニー数をカウントした。

(4) 細胞動態

A431 細胞が subconfluent に達していることを顕微鏡で確認後、古い培地をアスピレーターで全量取り除き、1×PBS で 1 回洗浄した。1×PBS を除去し、1×トリプシン液を加えて CO₂ インキュベーターで培養後、細胞に物理的衝撃を与えて完全に剥がした。細胞懸濁液に培地を加えて懸濁し、遠心して上清を除去した。2.0×10⁶ cells/mL で 10 シャーレに播種し、CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。6 シャーレの培地を捨て、化合物含有培地を添加し、CO₂ インキュベーター内で培養した。化合物含有培地をアスピレーターにより除去し、1×PBS で 2 回洗浄後、培地を添加した。化合物含有培地をアスピレーターにより除去し、1×PBS で 2 回洗浄後、1×トリプシン液を加えて CO₂ インキュベーターで培養後、細胞に物理的衝撃を与えて完全に剥がした。細胞懸濁液に培地を加えて懸濁し、遠心して上清を除去し、培地に懸濁後、細胞懸濁液全量を 1.5 mL エッペンチューブに移した。エッペンチューブを遠心して培地を除去後、2×10⁶ cells/mL になるよう、2% Triton X-100 in メイロンを加え、よくピペティングして懸濁した。細胞懸濁液を遠心して上清を回収後、HPLC 分析(カラム: TSKgel® ODS-120H (粒子径: 5 μ m, サイズ: 4.6 mm×15 cm), 流速: 1 mL, 検出波長: 330 nm)を行った。

(5) GLUT 阻害活性

HepG2 細胞を 3 代目まで継代して細胞表面を洗浄後、トリプシン処理して細胞を回収した。グルコース不含培地で細胞懸濁液を調製し、段階希釈により 4.0×10⁴ cells/mL まで希釈し、96 穴 black プレートに播種して、各化合物含有培地を添加した。1 日間培養後、Ice PBS を添加して反応を終了させた。化合物含有培地を除去してマイクロプレートリーダーで蛍光を測定した。

(Excitation : 485 nm, Emission : 520 nm) .

4 . 研究成果

(1) UTX-136 の合成

2,3,4,6-Tetra-*o*-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide を出発原料とし、炭酸銀を用いてアセチルグルコースの開環を行い、化合物 1 を 90.1%の収率で得た。次に無水コハク酸により、グルコースの 1 位にコハク酸を導入した化合物 2 を 80.7%の収率で得た。最後に Dasatinib と化合物 2 を縮合することにより目的物である UTX-136 を 57.6%の収率で得た。

(2) UTX-136 の殺細胞活性

A431 細胞に対する UTX-136 の殺細胞活性を評価したところ、10 μ M 以下では強い毒性は確認されなかった。また、HepG2 細胞については 30 μ M 以下では強い毒性は確認されなかった。

(3) UTX-136 の放射線増感活性

A431 細胞を用いてコロニー形成法により UTX-136 の放射線増感効果を評価した。その結果、UTX-136 の放射線増感比は 2 Gy = 1.67 (Dasatinib = 1.36), 4 Gy = 1.42 (Dasatinib = 1.21), 6 Gy = 1.93 (Dasatinib = 1.51) となり、すべての線量において Dasatinib よりも有意に高い放射線増感効果を示した。

(4) UTX-136 の細胞動態

A431 を用いて UTX-136 の細胞内動態を評価した結果、6 時間後および 12 時間後ともに Dasatinib と UTX-136 のピークが確認された。これにより UTX-136 は細胞内で加水分解を受け、Dasatinib とアセチルグルコースに解離していることが示された。

続いて、細胞内の Dasatinib および UTX-136 含有量を HPLC のピーク面積を用いて評価した。その結果、細胞内の UTX-136 に経時的な変化は確認されなかった。よって、UTX-136 は細胞内に取り込まれた後に Dasatinib に解離している可能性と、UTX-136 が細胞外で Dasatinib に分解された後に Dasatinib として取り込まれている可能性が示された。

そこで、UTX-136 の細胞外動態を評価したところ、UTX-136 は細胞外で経時的に Dasatinib に分解していることが明らかとなった。これにより UTX-136 は細胞外で加水分解されて Dasatinib として細胞内に取り込まれていることが示唆された。

UTX-136 の取り込み様式をさらに詳しく解明するために、細胞の有無における UTX-136 のピーク変化を調べた。その結果、細胞が無い場合は UTX-136 添加 1 時間で UTX-136 の分解 (39.4%) が確認された。また、細胞がある場合は細胞が無い場合に比べて 32.4%の UTX-136 のピークが減少していたため、UTX-136 が細胞内へ取り込まれたと考えられる。以上の結果より、UTX-136 添加 1 時間後では 39.4%の UTX-136 が細胞外で Dasatinib へと分解し、32.4%の UTX-136 が細胞内に取り込まれ、細胞内で速やかに Dasatinib へ解離していることが明らかとなった。

(5) UTX-136 の GLUT 阻害活性

UTX-136 の放射線効果増感の作用機序を解明するため、HepG2 細胞を用いて GLUT 阻害能を評価した。その結果、UTX-136 は 67.1%のグルコース取り込みを阻害し、Dasatinib より 1.7 倍有意に高い GLUT 阻害能を示した。

本研究のまとめとして、Dasatinib にコハク酸を介してアセチルグルコースを修飾した UTX-136 の合成に成功し、A431 細胞における放射線増感試験では Dasatinib より有意に高い放射線増感効果を示し、アセチルグルコース修飾による放射線増感効果向上のコンセプトの立証に成功した。また、UTX-136 は加水分解を受けて Dasatinib に解離していることが確認され、Linker Unit としてコハク酸を導入することで Dasatinib とアセチルグルコースが解離する化合物の設計に成功した。さらに、UTX-136 は Dasatinib よりも有意に強く HepG2 細胞の GLUT 阻害活性を示した。

以上の結果より、UTX-136 の作用機序として、UTX-136 が細胞内に取り込まれたのち、速やかに Dasatinib とアセチルグルコースに解離し、Dasatinib は c-*Src* 阻害によるアポトーシス誘導を、アセチルグルコースは GLUT 阻害による放射線増感効果を示すことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎原 誉, 合田 萌々花, 宇都 義浩, 山田 久嗣
2. 発表標題 アセチルグルコース修飾Ceritinibの放射線増感としての創薬研究
3. 学会等名 2022年日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中内洸希, 宇都義浩
2. 発表標題 Drug discovery of acetyl-glucose-modified Dasatinib as a radiosensitizer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇都義浩, 合田 萌々花, 松本光太郎, 富永正英, 玉野井冬彦
2. 発表標題 Iodine-Hoechst33258の放射線増感効果と作用機序の解析
3. 学会等名 第24回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2024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	山田 久嗣 (YAMADA Hisatsugu) (80512764)	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)・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
---------	---------