

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10480

研究課題名(和文) アセチルグルコース修飾ゲフィチニブの放射線増感機序の解明と新規増感剤の創製

研究課題名(英文) Elucidation of radiosensitization mechanism of acetylglucose-modified gefitinib and development of novel radiosensitizer

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究は、放射線による抗腫瘍効果の増強分子であるアセチルグルコースをEGFR阻害剤ゲフィチニブに修飾し、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。本研究において、EGFR自己リン酸化阻害効果を有し、かつグルコース取込阻害を介して解糖系を阻害することで高い放射線増感効果を発揮するゲフィチニブ誘導体UTX-114の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義として、アセチルグルコースが薬剤の放射線増感活性を修飾できることが明らかとなり、化学放射線療法で使用されている抗癌剤の効果を増強できる可能性を示した点が挙げられる。また、社会的意義として、日本人の3人に1人ががんになり、2人に1人はがんで死亡する現状において、化学放射線療法の重要性は益々高くなっており、より有効な放射線増感剤の開発が癌治療に与える影響は極めて大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we modified the EGFR inhibitor gefitinib with acetylglucose, a molecule that enhances the antitumor effect by radiation, and evaluated its usefulness as a radiosensitizer by using tumor cells and a tumor-transplanted chicken egg model. In this study, we succeeded in the development of gefitinib derivatives UTX-114, which have an EGFR autophosphorylation inhibitory effect and exert a high radiosensitizing effect by inhibiting the glycolytic system via glucose uptake inhibition.

研究分野：創薬化学

キーワード：放射線増感剤 アセチルグルコース ゲフィチニブ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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。

(2) 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、「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¹⁾、「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、申請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、*in vitro* で ER = 2.30、*in vivo* で ER = 2.47 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²⁾。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することで、ゲフィチニブの抗腫瘍活性と放射線増感活性を大きく増強できることを見出した。ゲフィチニブは放射線治療との併用において増感作用が報告されているだけでなく、近年では抗腫瘍免疫の誘導作用も示されており、オプジーボに代表される免疫チェックポイント阻害剤やがん免疫療法との併用効果も期待される。よって、ゲフィチニブの放射線増感剤としての創製は大変重要である。

2. 研究の目的

本研究「アセチルグルコース修飾ゲフィチニブの放射線増感機序の解明と新規増感剤の創製」は、前回採択された「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」の成果で得られた重要な知見である「アセチルグルコース修飾ゲフィチニブ誘導体 UTX-103 はゲフィチニブに比べて 10 倍以上の抗腫瘍活性と約 2 倍の放射線増感活性を有する」を基に、UTX-103 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、より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を目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 抗腫瘍活性の評価

96 well plate にヒト表皮がん A431 細胞を 2×10^3 cells/well 播種し、5%CO₂ で 24 h インキュベートした。培地は RPMI-1640/10%FBS 培地を使用した。24 h 後、培地を除き、そこへ終濃度が 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μM となるように化合物を添加した。Control には 1%DMSO を添加した。24 h インキュベートした後、WST-1 を 100 μL/well 添加し、マイクロプレートリーダーにて 450 nm で吸光度を測定した。添加した WST-1 は WST-1 : 1-MethoxyPMS = 9 : 1 の比率で混合し、さらに RPMI-1640/10% FBS 培地を用いて 10 倍希釈したものである。

(2) 細胞内動態の評価

6 シャ - レに A431 細胞を 2×10^5 cells 播種し、5%CO₂、37 °C で 24 h インキュベートした。培地は RPMI-1640/10%FBS 培地を使用した。24 h 後、培地を除き、化合物を終濃度が 3 μM となるように添加した。Control として、1%DMSO を添加した。24 h 後、培地を除き、PBS で 2 回 wash した。2%トライトンをシャ - レに 400 μL ずつ添加し、セルスクレーパーでシャ - レをこすって細胞を剥離し、細胞懸濁液をエッペンチューブに回収した。これを 28 °C、15,000 rpm、10 min 遠心し、上清を回収し、HPLC を用いて測定した。

(3) EGFR 自己リン酸化阻害活性の評価

コラーゲンコーティングされた 96 well plate に A431 細胞を 3×10^4 cells/well 播種し、5% CO₂、37 °C で一晩インキュベートした。培地は RPMI-1640 無血清培地を用いた。培地を除き、化合物を終濃度が 0.1, 1, 3 μM となるように添加し、5%CO₂、37 °C で 24 h インキュベートした。培地を除き、PBS で 2 回 wash した後、hEGF を終濃度 200 ng/mL となるように 100 μL 添加し、5%CO₂、37 °C で 2 h インキュベートした。1×洗浄バッファー A 200 μL で 3 回洗浄した。定着液を 100 μL を添加し、室温で 20 min インキュベートした。1×洗浄バッファー A 200 μL で 3 回洗浄した。1×クエンチングバッファーを 200 μL 加え、室温で 20 min インキュベートした。1×洗

浄バッファーAで4回洗浄した。1×ブロッキングバッファーを200 μL 加え、37 °C で1 h インキュベートした。1×洗浄バッファーBで3回洗浄した。1×一次抗体 50 μL を添加し、室温で2 h インキュベートした。1×洗浄バッファーBで4回洗浄した。1×HRP 結合二次抗体を 50 μL 添加し、室温で1 h インキュベートした。1×洗浄バッファーBで4回洗浄した。TMB 基質を 100 μL 添加し、室温、暗所で 30 min インキュベートした。停止液を 50 μL 加え、450 nm で吸光を測定した。

(4) 放射線増感活性の評価

6 シャ - レに A431 細胞を 1×10^3 cells 播種し、5%CO₂、37 °C で 24 h インキュベートした。培地は RPMI -1640/10%FBS 培地を使用した。培地を除き、化合物を終濃度が 1 μM となるように添加し、37 °C で 24 h インキュベートした。X 線を照射し、7 日間インキュベートした後、ギムザ染色を行い、コロニー数を計数した。

PE(コロニー形成率)=コロニー数 ÷ 播種した細胞数

SF(生存率)=X 線照射細胞(各 Gy)の PE ÷ X 線未照射細胞(0Gy)の PE

(5) GLUT 阻害活性の評価

96 well plate にヒト肝がん細胞 HepG2 を 2×10^4 cells/well 播種し、5%CO₂ で 24 h インキュベートした。培地はグルコース不含 RPMI -1640 培地を使用した。24 h 後、培地を除き、UTX-114 の終濃度が 10, 30 μM、Cytochalasin B の終濃度が 10 μM、2-NBDG の終濃度が 300 μM となるように添加し、20 min インキュベートした。Control には 2-NBDG を添加した。ice PBS を用いて 4 回 wash した。マイクロプレートリーダーにて蛍光を測定した。(ex=485 nm、 em=520 nm)

4 . 研究成果

(1) UTX-103 をリードとしたゲフィチニブ誘導体の分子設計・合成

まず、ゲフィチニブのメトキシ基にアセチルグルコースを修飾した UTX-103 を設計・合成した。UTX-103 はゲフィチニブよりも高い殺細胞活性および放射線増感活性を示したが、TX-2244 のような O-グリコシド結合の解離は見られず、EGFR 自己リン酸化阻害活性も見られなかった。つまり、UTX-103 はゲフィチニブ本来の効果が消失してしまっていることが明らかとなった。これは、ゲフィチニブとアセチルグルコース間の距離が近すぎるためではないかと我々は予想した。そこで、我々は新たなドラッグデザインとしてゲフィチニブとアセチルグルコースの間にスペーサーとして炭素鎖を導入した UTX-114、UTX-115、UTX-116 を設計・合成した(図1)。

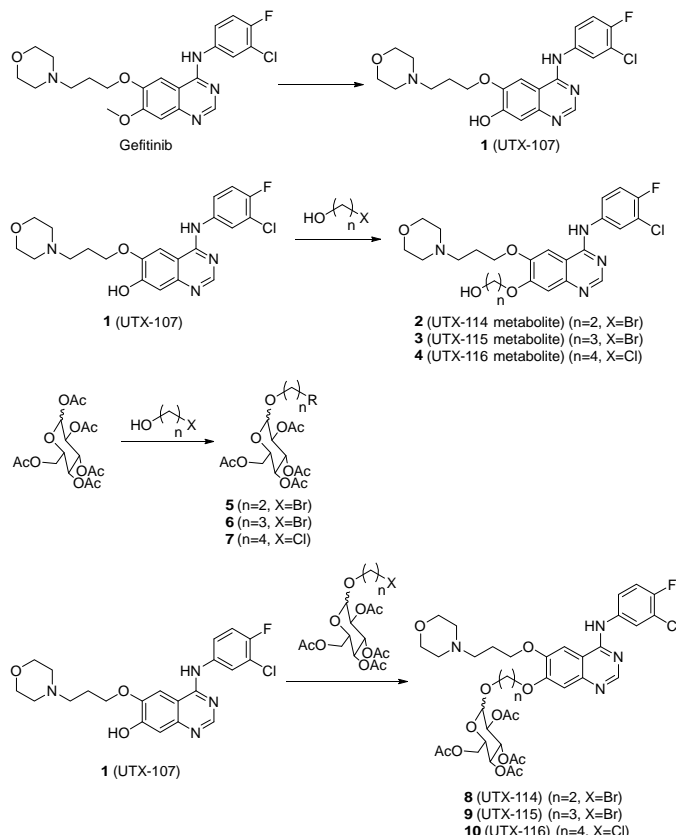


図1 UTX-114、UTX-115、UTX-116 の化学構造と合成方法

(2) ゲフィチニブ誘導体の *in vitro* 抗腫瘍活性

EGFR が過剰に発現している A431 細胞に各化合物を添加して 24 時間インキュベートした後、WST-1 アッセイを用いて UTX-114, 115, 116 の殺細胞活性を評価した。その結果、これら 3 つのゲフィチニブ誘導体の殺細胞活性はゲフィチニブと同程度であった (図 2)。

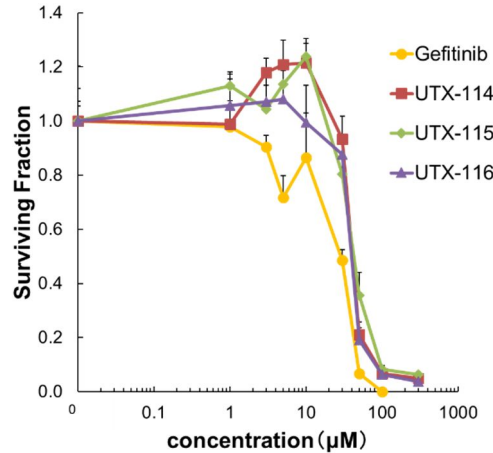


図 2 UTX-114, 115, 116 の殺細胞活性評価

(3) ゲフィチニブ誘導体の細胞内動態

A431 細胞に各化合物を添加してインキュベートした後、UTX-114, 115, 116 の細胞内動態を HPLC により分析した。その結果、UTX-114, 115, 116 のピークは消失し、その代謝物 (化合物 2, 3, 4) のピークが確認されたことから、UTX-114, 115, 116 は細胞内で *O*-グリコシド結合が解離していることが明らかとなった (図 3)。

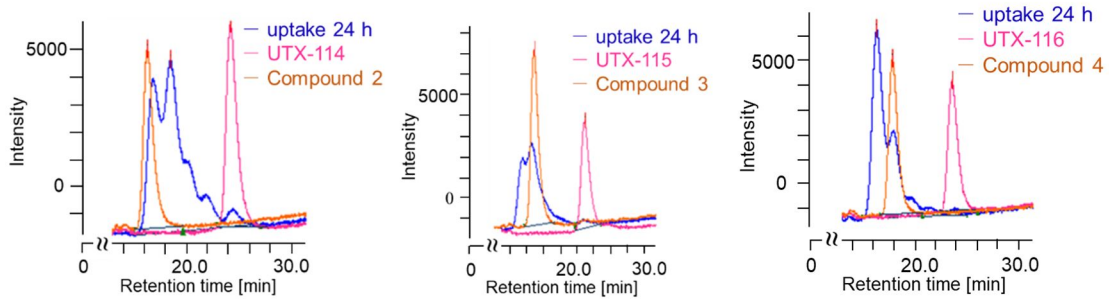


図 3 ゲフィチニブ誘導体の細胞内動態

(4) ゲフィチニブ誘導体の EGFR 自己リン酸化阻害活性

A431 細胞に各化合物を添加して 24 時間インキュベートした後、ELISA 法を用いて pEGFR の発現量を評価した。その結果、すべての誘導体において pEGFR の発現量が減少していた。中でも、UTX-114 は 3μM においてゲフィチニブよりも高い阻害効果を示した (図 4)。

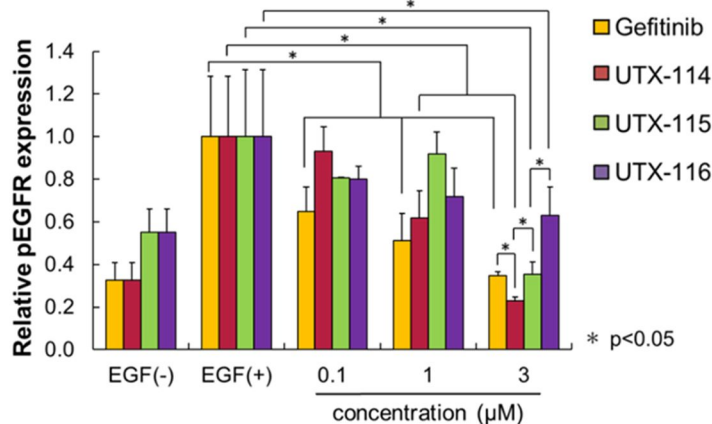


図 4 UTX-114, 115, 116 の EGFR 自己リン酸化阻害活性

(5) ゲフィチニブ誘導体の放射線増感活性

A431 細胞に各化合物を添加して 24 時間インキュベートし、X 線を照射した後、コロニー形成法により UTX-114, 115, 116 の放射線増感活性を評価した。その結果、すべての誘導体において放射線増感活性が確認された。UTX-114 および UTX-116 はゲフィチニブよりも有意に高い放射線増感効果を示し、中でも UTX-114 は最も高い放射線増感活性を示した (図 5)。

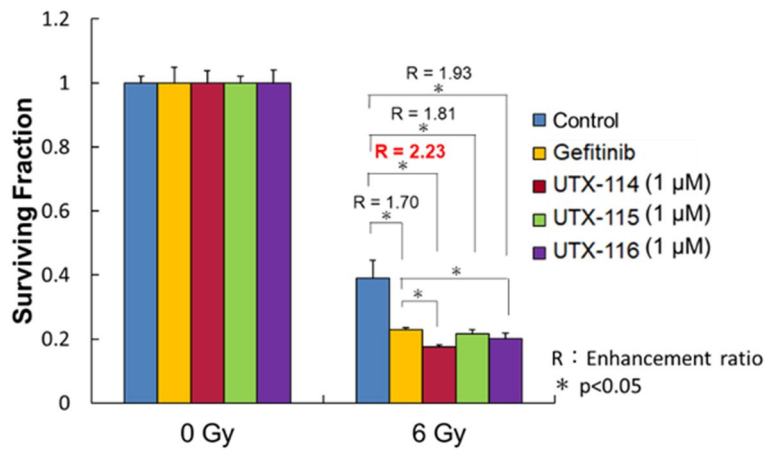


図 5 UTX-114, 115, 116 の放射線増感活性

(6) ゲフィチニブ誘導体のグルコーストランスポーター (GLUT) 阻害活性

EGFR 自己リン酸化阻害活性と放射線増感活性が確認された UTX-114 について、グルコースの取り込み阻害活性を HepG2 細胞を用いて評価した。なお、2-NBDG はグルコースに蛍光物質を結合させたグルコースアナログであり、サイトカラシン B は GLUT 阻害剤である。その結果、UTX-114 は濃度依存的にグルコースの取り込みを阻害し、10 μM でサイトカラシン B と同程度のグルコース取り込み阻害効果を示した (図 6)。

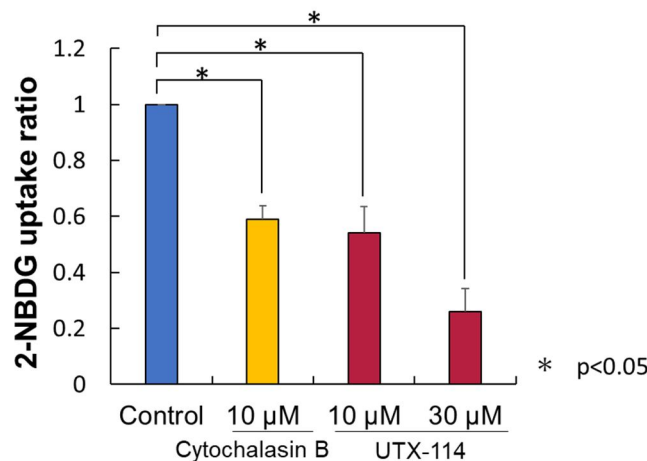


図 6 UTX-114 の GLUT 阻害活性

以上の結果より、EGFR 自己リン酸化阻害効果、放射線増感効果、GLUT 阻害効果を併せ持つ新規放射線増感剤 UTX-114 の開発に成功した。

< 引用文献 >

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(2), 208-14, 2011.
2. Nakae T, Uto Y, Tanaka M, Shibata H, Nakata E, Tominaga M, Maezawa H, Hashimoto T, Kirk KL, Nagasawa H, Hori H, Design, Synthesis, and Radiosensitizing Activities of Sugar-Hybrid Hypoxic Cell Radiosensitizers, Bioorg Med Chem, 16(2), 675-82, 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uto Y, Abe C, Futawaka M, Yamada H, Tominaga M, Endo Y	4. 巻 46
2. 論文標題 In vivo drug screening method of radiosensitizers using tumor-bearing chick embryo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Enzymes	6. 最初と最後の頁 113-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.enz.2019.08.008	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠原侑成, 宇都義浩
2. 発表標題 Development of acetylglucose-modified gefitinib derivatives as a novel radiosensitizer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山花啓梨, 篠原侑成, 羽生紋佳, 田中雄也, 山田久嗣, 宇都義浩
2. 発表標題 Development of a Novel Acetyl Glucose-modified Gefitinib Derivative for Improvement of Radiosensitizing Effect
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇都義浩, 宮本大輔, 上崎里砂, 羽生紋佳, 二若真菜, 山田久嗣
2. 発表標題 放射線増感作用の向上を目指したアセチルグルコース修飾Gefitinib誘導体の創製
3. 学会等名 第20回 菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國枝由香莉、篠原侑成、田中雄也、山花啓梨、藤原由莉、山田久嗣、宇都義浩
2. 発表標題 放射線増感ユニットであるアセチルグルコースを修飾したEGFR阻害剤Erlotinib誘導体の創製
3. 学会等名 第22回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國枝由香莉、篠原侑成、田中雄也、山花啓梨、藤原由莉、山田久嗣、宇都義浩
2. 発表標題 アセチルグルコースを修飾した放射線増感作用を有する抗腫瘍剤の創薬研究
3. 学会等名 2019年日本化学会中四国支部大会
4. 発表年 2019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)・講師 (16101)	
連携 研究者	遠藤 良夫 (ENDO Yoshio) (30211783)	金沢大学・がん進展制御研究所・准教授 (13301)	
連携 研究者	富永 正英 (TOMINAGA Masahide) (90437632)	徳島大学・医歯薬学研究部・講師 (16101)	