様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ２０ 日現在

機関番号：３２６６５
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2024
課題番号：２０Ｋ０８０５９

研究課題名（和文）PIポリアミドによる低酸素細胞に対する放射線増感剤の開発

研究課題名（英文）Development of radiosensitizers for hypoxic cells by PI polyamide

研究代表者
石橋　直也（ISHIBASHI, Naoya）

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：４０６４９３３１

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）：まず、シスプラチンに核集積性及び腫瘍集積性を持たせるために抗生物質デスタマイシンをモチーフにしたピロールイミダゾールポリアミド（PIP）を付加させた新規化合物Py3-Oxoの合成を行った。この化合物の薬効及び放射線増感効果を検討するためにHeLa細胞に対しCisplatin及びPy3-Oxoを10μM投与しX線照射後24時間後にIC50を測定した。HeLa細胞を6cm dishに播種し、24時間後Cisplatin 10μL及びPy3-Oxoを0.1μM, 0.3μM, 1.0μM, 3.0μM, 10μM, 30μM投与しＸ線照射を行った。その結果、有意なX線増感効果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今回の結果より、Py3-Oxoはピロールの3量体と短く、核集積能が低くシスプラチンへの核集積が想定よりも低い可能性が示唆された。そこで長鎖のPIPによる核内集積に加え、放射線耐性遺伝子であることが報告されているHIF1a遺伝子及びUCHL遺伝子配列に結合するよう設計された8塩基認識のPIPにOxoplatinを縮合したHIF1a-UCHL-Oxoを合成した。HIF1a-UCHL-OxoのX線増感効果を調べるために、HeLa細胞を播種し、24時間後HIF1a-UCHL-Oxoを投与しＸ線照射を行ったが、有意な放射線増感効果は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：First, we synthesized a new compound, Py3-Oxo, by adding pyrrole-imidazole polyamide (PIP) based on the antibiotic destamycin to cisplatin to give it nuclear and tumor accumulation. To examine the efficacy and radiosensitization of this compound, we administered 10μM of cisplatin and Py3-Oxo to HeLa cells and measured the IC50 24 hours after X-ray irradiation. HeLa cells were seeded on a 6cm dish, and 24 hours later, 10μL of cisplatin and 0.1μM, 0.3μM, 1.0μM, 3.0μM, 10μM, and 30μM of Py3-Oxo were administered and X-ray irradiation was performed. As a result, no significant X-ray sensitization effect was obtained.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線増感剤　低酸素細胞　PIポリアミド

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

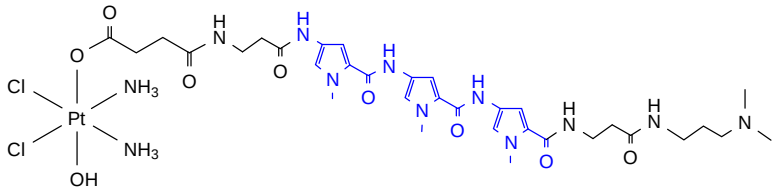
放射線治療は様々な腫瘍に効果的であるが一方で放射線抵抗性の腫瘍が存在することが知られている。その代表が腫瘍細胞の低酸素状態での放射線抵抗性であり、これが放射線治療における課題である。低酸素状態下で腫瘍細胞は hypoxia inducible factor 1(HIF-1)を活性化して増殖や血管新生を調節する。

２．研究の目的

本研究では、核 DNA に配列特異的に結合する性質を持つ PI ポリアミド(PIP)分子を用い、HIF-1 の制御機構をターゲットにした放射線抵抗因子の発現を抑制する新たな放射線増感剤の開発を試みる。

３．研究の方法

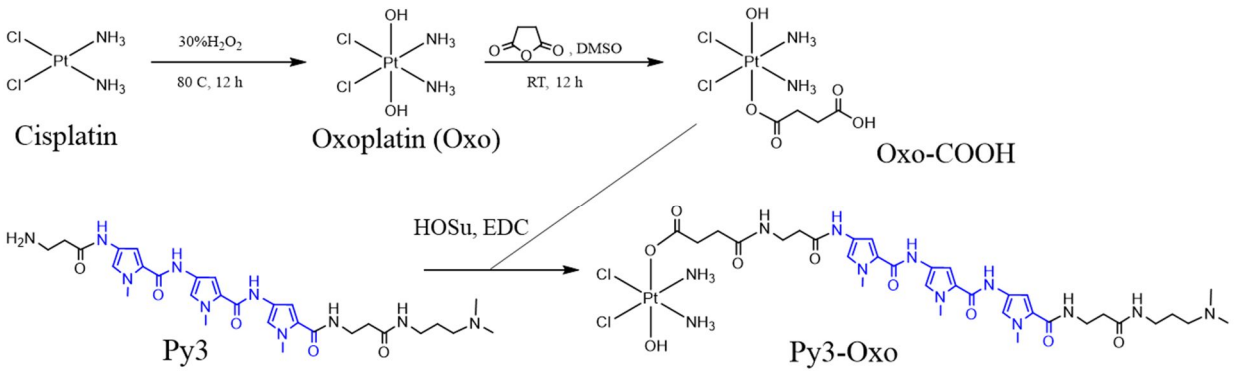
まず、シスプラチンに核集積性及び腫瘍集積性を持たせるために抗生物質デスタマイシンをモチーフにしたピロールイミダゾールポリアミド（PIP）を付加させた新規化合物 Py3-Oxo（Figure 1）の合成を行った。



Chemical Formula: $C_{33}H_{52}Cl_2N_{12}O_9Pt$
Exact Mass: 1025.30

Figure 1. Py3-Oxo の構造式

合成は下記の scheme 1 に従い行った。まずシスプラチンを過酸化水素水で酸化させ、その後酸無水物を付加させることでカルボン酸を付加した Oxo-COOH を合成した。更にペプチド合成機で合成したピロールのトリマーPy3 を縮合させることで目的の Py3-Oxo を合成した。



Scheme1. Py3-Oxo の合成

合成した化合物を HPLC で精製し、LCMS にて同定することで目的化合物を得た。（Figure 2）

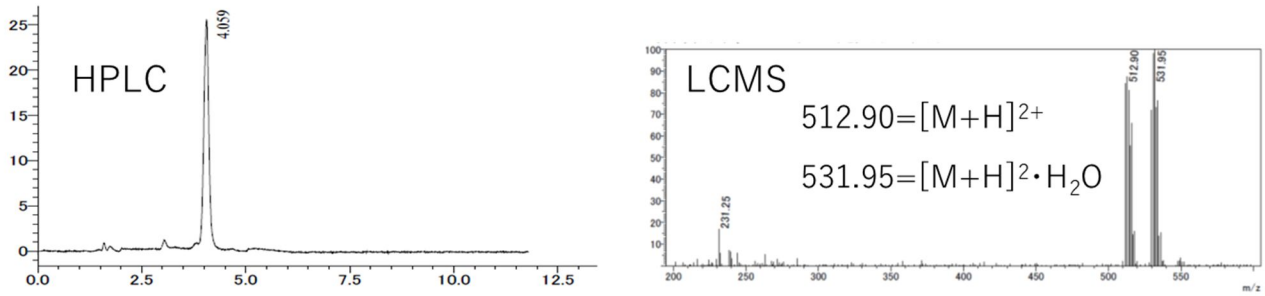


Figure 2. Py3-Oxo の HPLC 及び LCMS 解析

次にこの化合物の薬効及び放射線増感効果を検討するために HeLa 細胞に対し Cisplatin 及び Py3-Oxo を 10μM ずつ投与し X 線照射後 24 時間後に IC50 を測定し比較を行った。

HeLa 細胞を 6cm dish に 1 ×10^6cells/well 播種し、24 時間後 Cisplatin 10 μL 及び Py3-Oxo を 0.1 μM, 0.3 μM, 1.0 μM, 3.0 μM, 10 μM, 30 μM ずつ投与しX線照射を行った。X 線照射は MX-80Labo により管電圧 80kv、管電流 1.25mA、照射距離 110mm の条件で 5 Gy 及び 10Gy の照射を行った。照射後 48 時間培養し、WST アッセイにより IC50 を測定した。

その結果、X 線照射無しにおける IC50 は Cisplatin＝6.8 μM 及び Py3-Oxo=2.5 μM と Py3-Oxo の毒性は高かったが、5Gy 照射後 48 時間における IC50 は Cisplatin＝3.8 μM 及び Py3-Oxo=3.4 μM と有意な X 線増感効果は見られず、10Gy 照射後 48 時間における IC50 は Cisplatin＝１.6 μM 及び Py3-Oxo=1.7 μM とこちらも有意な増感効果を得られなかった。（Figure 3）

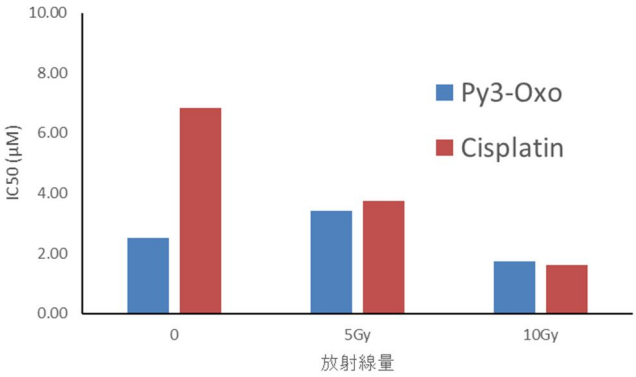
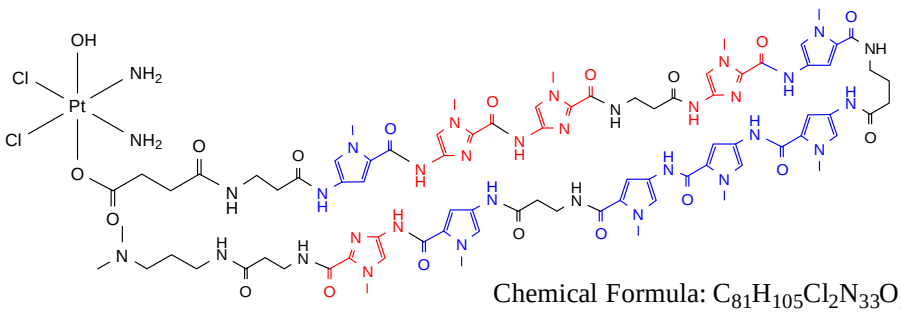


Figure 3. HeLa 細胞に対する IC50

この結果より、Py3-Oxo はピロールの 3 量体と短く、核集積能が低くシスプラチンへの核集積が想定よりも低い可能性が示唆された。

そこで長鎖の PIP による核内集積に加え、放射線耐性遺伝子であることが報告されている HIF1a 遺伝子及び UCHL 遺伝子配列に結合するよう設計された 8 塩基認識の PIP に Oxoplatin を縮合した HIF1a-UCHL-Oxo(Figure 4)を合成し、化合物の分析を HPLC 及び LCMS にて目的化合物の合成を確認した(Figure 5: Exact Mass: $[M+H]^{+}$=2108.73, Calculation: $[M+H]^{2+}$=1057.37, $[M+H]^{3+}$=704.91 , $[M+H]^{4+}$=529.18, Found: $[M+H]^{2+}$=1057.75, $[M+H]^{3+}$=705.05 , $[M+H]^{4+}$=529.00)。



Chemical Formula: $C_{81}H_{105}Cl_2N_{33}O_{19}Pt$
Exact Mass: 2108.73

Figure 4. HIF1a-UCHL-Oxo の構造式

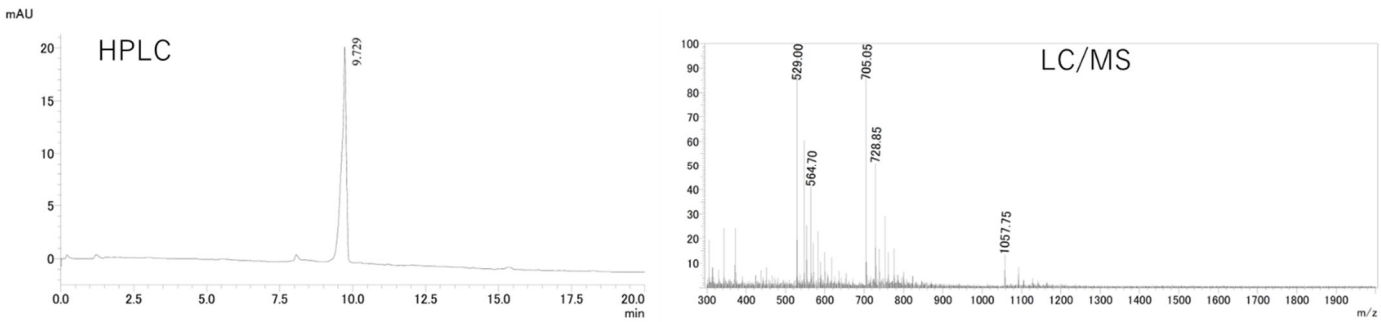


Figure 5. HIF1a-UCHL-Oxo の HPLC 及び LCMS 解析

次にこの合成した HIF1a-UCHL-Oxo の X 線増感効果を調べるために、HeLa 細胞を 6cm dish に 1 ×10^6 cells/well 播種し、24 時間後 HIF1a-UCHL-Oxo をそれぞれ 0.1 μM, 0.3 μM, 1.0 μM, 3.0 μM, 10 μM, 30 μM ずつ投与しX線照射を行った。X 線照射は MX-80Labo により管電圧 80kv、管電流 1.25mA、照射距離 110mm の条件で 5 Gy 及び 10Gy の照射を行った。照射後 48 時間培養し、WST アッセイにより IC50 を測定した。

その結果、X 線照射無しにおける IC50 は 5.91、5Gy 照射後 48 時間における IC50 は 3.35、10Gy 照射後 48 時間における IC50 は 2.46 であった。いずれの結果も細胞毒性は検出されたが、X 線照射の有無で有意な放射線増感効果は見られなかった。

更に Cisplatin 及び Py3-Oxo との IC50 の比較を行った所、Figure 6 に示す通り、放射線を当てない細胞毒性では Py3-Oxo が最も毒性が高く、次いで HIF-UCHL-Oxo、Cisplatin の順で毒性を示したが、5Gy 及び 10Gy の放射線を当てた場合はいずれの場合も殆ど有意差は得られなかった。

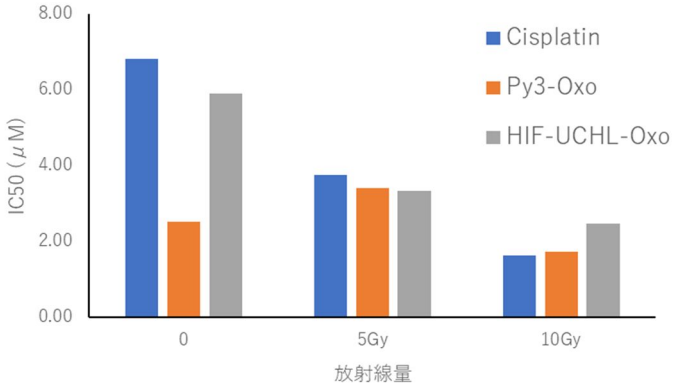


Figure 6. HeLa 細胞に対する Cisplatin,Py-3,HIF-UCHL-Oxo の IC50 の比較

４．研究成果

次に Py3-Oxo 及び HIF-UCHL-Oxo の Cisplatin との X 線増感効果の比較を受精鶏卵の漿尿膜（CAM）を用いた動物実験により検証した。

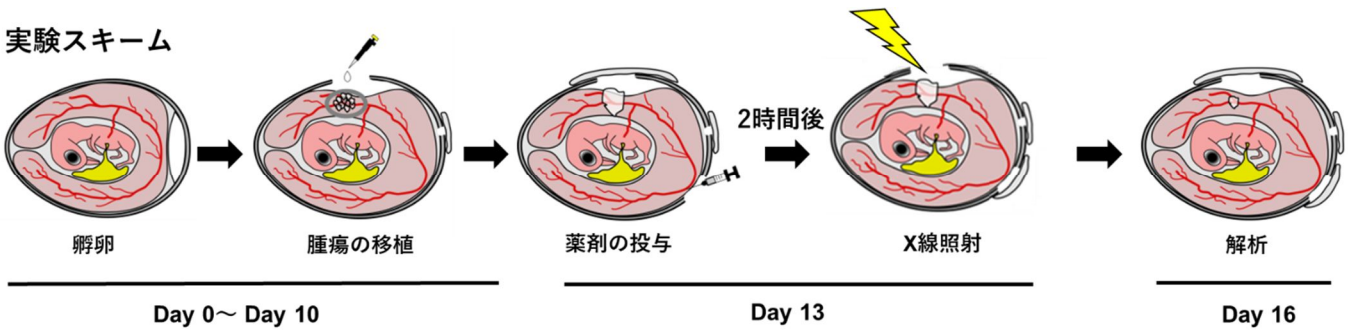
この CAM アッセイは scheme2 に従い行った。

(1)孵卵：受精鶏卵（白色ジュリアライト）を孵卵器に入れ、温度 37℃、湿度 65%、転卵回数 11 回/時間の条件で 10 日間培養する。

(2)腫瘍の移植：ダイヤモンドカッターを用いて気室孔と移植用の窓を開け、CAM を露出させる。CAM 上の血管に移植用のテフロンリングを乗せ、GFP の発現ベクターを組み込んだ HeLa 細胞を 2x10^6 cells/20 μL 滴下しテガタームで気室孔と移植窓を塞ぎ 3 日間培養する。

(3)ドラッグの投与と X 線照射:3 日後、蛍光実体顕微鏡で移植した細胞の生着を確認し、静脈注射の小窓を開け DMSO 及び PBS で 0.34 μM の濃度に希釈した Cisplatin、Py3-Oxo,及び HIF-UCHL-Oxo を静脈注射により投与した。投与後 2 時間後に腫瘍に対し MX-80Labo により管電圧 80kv、管電流 1.25mA、照射距離 110mm の条件で 10 Gy の X 線照射を行い、テガタームで再度封をしたのち培養を継続した。

(4)解析：照射後 72 時間培養した後、蛍光実体顕微鏡で腫瘍の形態を観測し、その後腫瘍を摘出し重さ測定した。



Scheme2. CAM アッセイの実験方法

その結果、CAM アッセイ後の腫瘍を蛍光実体顕微鏡で明視野と GFP フィルターで蛍光観察したところ、コントロールの DMSO 投与郡では Day13 の薬剤投与前の腫瘍に比べ 72 時間後の腫瘍では縮小は見られなかったのに対し、Cisplatin、Py3-Oxo、HIF-UCHL-Oxo の投与群ではいずれにおいても X 線照射後 72 時間で腫瘍の縮小が観測された(Figure 7)。

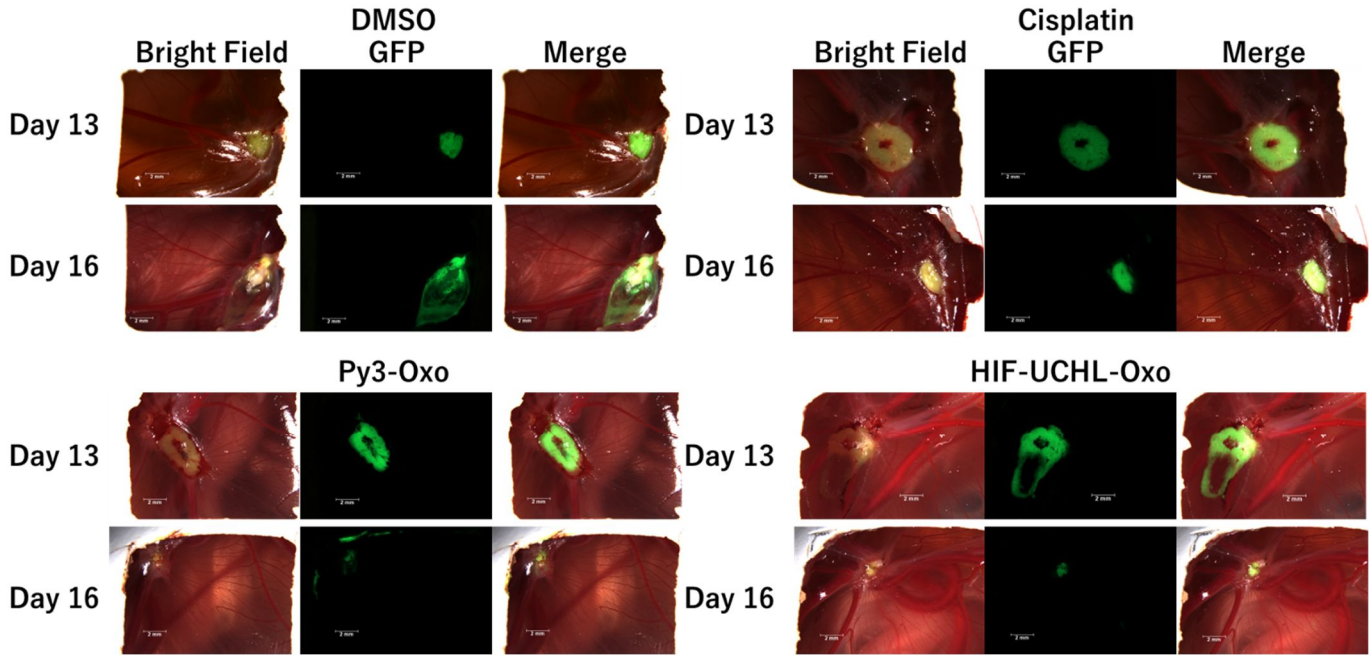


Figure 7. CAM アッセイにおける蛍光実体顕微鏡図

次に腫瘍を CAM から切除し、DMSO 投与群、Cisplatin 投与群、Py3-Oxo 投与群及び HIF-UCHL-Oxo 投与群の重さをそれぞれ測定したところ、 DMSO 投与群では 24.09±2.52 mg、Cisplatin 投与群では 16.18±0.80 mg、Py3-Oxo 投与群では 12.24±1.86 mg HIF-UCHL-Oxo 投与群では 13.70±2.02 mg であった。また Cisplatin 投与群対 Py3-Oxo 投与群、Cisplatin 投与群対 HIF-UCHL-Oxo、Py3-Oxo 投与群対 HIF-UCHL-Oxo 投与群のいずれの組み合わせにおいても有意差は認められなかった(Figure 8)。

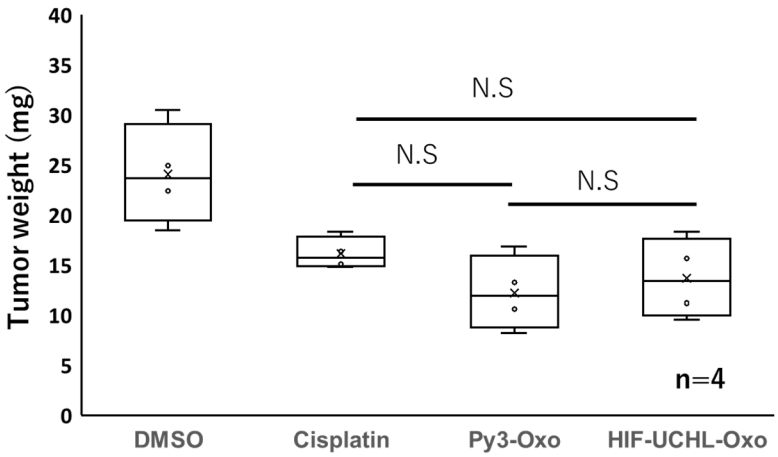


Figure 8. CAM アッセイにおける各種投与群の腫瘍重量の比較

以上の結果より、インビボ実験及びインビトロ実験において Py3-Oxo、HIF-UCHL-Oxo ともに有意な放射線増感効果は得られなかった。

今後は腫瘍集積性が高いことが報告されている PIP とのコンジュゲートや Oxoplatin ではない Cisplatin 誘導体を合成し、PIP と縮合させ、より強い放射線増感効果が得られる化合物の探索を行う予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔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	藤原　恭子 (FUJIWARA Kyoko) (40595708)	日本大学・歯学部・准教授 (32665)	
研究分担者	渡部　隆義 (WATANABE Takayoshi) (60526060)	千葉県がんセンター（研究所）・がん研究開発グループ・研究員 (82504)	
研究分担者	篠崎　喜脩 (SHINOZAKI Yoshinao) (00766553)	立命館大学・総合科学技術研究機構・研究員 (34315)	
研究分担者	西巻　はるな (NISHIMAKI Haruna) (00834152)	日本大学・医学部・助教 (32665)	
研究分担者	前林　俊也 (MAEBAYASHI Toshiya) (20409006)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	前林　亜紀 (MAEBAYASHI Aki) (90451369)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

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