

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24689050

研究課題名(和文) p53制御によって正常組織への副作用を軽減する新規放射線防護剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel kind of radioprotectors that relieve the damage of normal tissues in radiation injury

研究代表者

森田 明典 (MORITA, Akinori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：90334234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射線防護剤の研究開発は、人体への放射線リスクを真に低減する数少ない方法の一つとして極めて重要である。また、放射線治療では正常組織障害が処方できる線量の限界(耐容線量)を決めており、正常組織の耐容線量をも高める放射線防護剤の開発が望まれている。p53制御による放射線防護の有用性として、p53変異がんの治療において正常組織を選択的に防護する働きが期待されている。本研究では、p53分子内の亜鉛結合部位を標的とする化合物の合成、探索を進め、p53活性を制御するいくつかの放射線防護剤を発見した。

研究成果の概要(英文)：Research for developing radioprotectors is extremely important as one of a few methods to reduce a radiation risk. In addition, the damage of normal tissues during radiation therapy produces a dose-limiting toxicity (tolerance dose). Therefore, the development of the radioprotectors that raise the tolerance dose is expected. As radioprotective usefulness by regulating p53, some chemical p53 regulators would be expected to selectively prevent the damage of normal tissues during radiotherapy for p53-deficient tumors. In this study, I attempted to discover compounds that target the zinc-binding site in p53, and found several radioprotectors that regulate p53.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線防護剤 p53制御剤 p53阻害剤 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

放射線防護剤の研究開発は、人体への放射線リスクを真に低減する数少ない方法の一つとして極めて重要である。また、放射線治療では正常組織障害が処方できる線量の限界(耐容線量)を決めており、正常組織の耐容線量を高める放射線防護剤の開発が望まれている。

粒子線治療を始めとする近年の放射線療法法の進展は目覚ましく、照射野の限局によって局所制御率が向上し、高い治療効果が得られるようになった。しかしながら、局所に高線量が照射されることの弊害として、周辺臓器に重篤な遅発性障害が副作用として生じる場合があり、これが正常組織の耐容線量を制限する原因となっている。特に、子宮がん、直腸がん、前立腺がん、肝細胞がん等において、放射線高感受性組織である腸管が照射野に近接してしまう場合には、腸管出血や潰瘍形成、穿孔、腸閉塞、狭窄等の腸管障害が発生することが知られている。腸管の場合、蠕動運動も盛んなため、標的腫瘍体積として物理的に照射野から腸管を外すことが難しい状況が生じ、根治線量の達成を妨げる大きな要因となっている。

以上の理由から、正常組織の被ばくを耐容線量未満に抑える物理的な照射技術の改良にとどまらず、生命科学の知見を応用した新たな耐容線量の増大が求められている。

2. 研究の目的

造血障害や消化管障害など、急性障害で生じる多くの細胞死にはp53が関与しているため、放射線防護効果を得るための創薬標的分子としてp53は極めて重要である。研究代表者、および研究協力者らは、p53分子内の亜鉛結合部位を標的とし、キレート化剤を中心とした化合物の合成、探索を進め、p53活性を制御するいくつかの新規放射線防護剤候補化合物を見出した。

本研究では、マウス腸管の急性障害を防ぎ、培養細胞レベルで優れた防護活性を示す化合物の合成、探索、および作用機構解析を進めると共に、マウスを用いた動物照射モデル実験を実施し、これまでの耐容線量を超える放射線感受性修飾法の提示を目指した。

3. 研究の方法

p53依存性の放射線誘発アポトーシスを引き起こすヒトT細胞性白血病細胞株MOLT-4の放射線細胞死をモデル細胞死として、また、動物照射試験では、8週齢の雌性ICRマウスを用い、候補亜鉛キレート化剤のp53阻害剤としての活性評価を以下の方法で行った。

(1) アポトーシス抑制効果は、色素排除試験、ならびにフローサイトメーターによる解析として、アネキシンV-FITC/PI二重染色法やMitoTracker染色法によるミトコンドリア膜電位の測定を行った。

- (2) p53抑制効果は、p53の標的遺伝子産物であるPUMA、p21の転写活性化をリアルタイムRT-PCR法、ウェスタンブロット法で検討した。
- (3) p53変性効果は、変性したp53に特異的なモノクローナル抗体PAb240を用い、免疫沈降法で検討した。
- (4) 転写非依存性経路に対する阻害効果は、この経路の起点となるp53とBcl-2ファミリー分子との結合について、免疫共沈降法で検討した。
- (5) 培養細胞実験から選抜された新規放射線防護剤候補化合物の有用性を、全身照射、あるいは亜全身照射後の成体マウスの30日生存率や種々の組織解析を指標として、放射線防護剤としての活性評価試験を実施した。この動物実験では、全身照射試験だけでなく、頭部・前腕・前胸部を鉛遮蔽し、特に前脚部の骨髄を遮蔽防護することで骨髄死を回避した腹部を含めた下半身照射(亜全身照射)試験も実施し、腸管等の正常組織における耐容線量向上の指標とした。

4. 研究成果

研究代表者らは、先行研究の成果として、p53の転写依存性・非依存性両経路に作用し、骨髄死から腸死への移行線量域である12 Gyの全身被ばくからマウスを防護する新規放射線防護剤としてオルトバナジン酸ナトリウム(バナデート)を見出していた(*Cancer Res.* 70, 257-265, 2010)。この成果は、薬理的なp53阻害によって放射線防護効果を最大限引き出すためには、p53両経路の遮断が有効であることを示しており、今後の防護剤開発の重要な指針となることが期待された。また、バナデートは防護剤としてだけでなく、被ばく「後」投与でも有効な放射線障害緩和剤としても機能することが後の研究で明らかとなったが(*J. Radiat. Res.* 54, 620-629, 2013)、防護活性が得られる投与量の3倍濃度でマウスの半数致死量に達するという毒性のため、バナデートを医療応用するには化合物毒性の低減が必要であった。また、バナデートは13 Gy以上の、より高線量の被ばくによる腸死からマウスを防護することはなかったことから(*Cancer Res.* 70, 257-265, 2010)、さらなる放射線防護活性向上の必要性に迫られた。このような背景から、バナデート効果を応用した新たな有機化合物の探索に取り組むこととした。

p53阻害剤の中で最も高い放射線防護効果を示すバナデートの強力なp53作用について、研究代表者はバナデートが有するp53変性作用に注目した。このp53の変性・失活作用は、p53分子内の亜鉛イオン結合部位(図1)に配位する亜鉛イオンの解離や他の金属イオンとの置換によって生じることが知られていた。

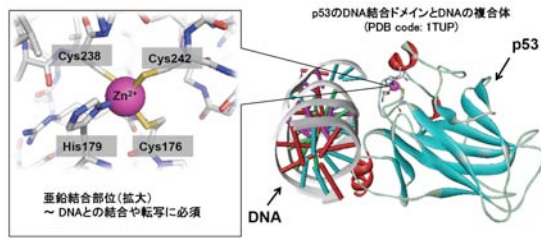


図1 p53の亜鉛結合部位

Protein Data Bank (PDB code: 1TUP; *Science* 265, 346-355, 1994)の構造データを基に作成した。3つのシステインと1つのヒスチジンから成る Zinc フィンガー様の亜鉛結合部位を拡大図示した。亜鉛結合部位はDNA結合面に位置する

亜鉛キレート化剤が第一の候補として考えられたが、これまでの報告では亜鉛キレート化剤ではp53を失活させることはできても、p53依存性アポトーシスを抑制できたとの報告はなく、その幅広いキレート毒性の影響が懸念された。そこでまず始めに、p53依存性アポトーシスを抑制し、細胞毒性が少なく、なおかつp53変性作用を有する亜鉛キレート化剤(3~6座配位子)の探索に取り組み、4座配位子であるBispicenに優れたp53阻害効果、アポトーシス抑制効果を見出した(*Oncotarget* 4, 2439-2450, 2013)。

しかしながら、Bispicenは培養細胞のp53依存性アポトーシスを抑制することができたものの、キレート毒性によるものと考えられる用量制限毒性のため、Bispicenは全身照射マウスに対して防護効果を示さなかった。

そこで次に、1つの亜鉛イオンに対して2つの分子で錯体形成する2座配位性の8-HQに着目した(図2A)。これら2座配位性キレート化剤は一般にキレート活性が低く、細胞や生体に対する毒性が低いこと、また、p53分子中の亜鉛イオンを奪うことなく、配位数4でp53に結合している亜鉛イオンに2座配位することによって、p53とDNAの相互作用に影響を及ぼすことが期待された。

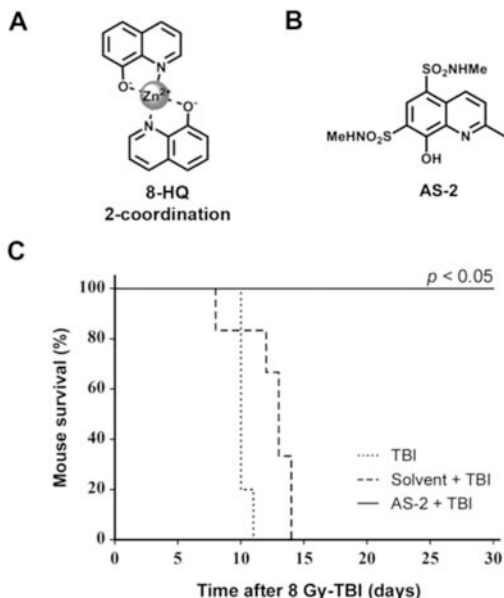


図2 (A) 8-HQと亜鉛(II)イオンの錯体形成様式、(B) AS-2の構造式、および(C)全身照射マウスの30日生存率。8週齢の雌性ICRマウスを使用した。AS-2は、X線全身照射30分前に80 mg/kg腹腔内投与した。*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 1498-1504, 2014等より改編。

合成された数十種の8-HQ誘導体のp53依存性放射線誘発アポトーシス抑制効果を検討したところ、いくつかの高活性化化合物を発見した(*Bioorg. Med. Chem.* 22, 3891-3905, 2014)。その内の1つ、AS-2(5,7-bis(*N*-methylaminosulfonyl)-8-hydroxyquinoline)は転写非依存的にp53依存性アポトーシスを阻害してミトコンドリアの機能不全を防ぎ、骨髄死相当線量である8 Gyの放射線被ばくからマウスを防護した(図2B,C)。

しかしながら、p53阻害による放射線防護は、骨髄死の防護には有効であるが、消化管などの上皮系の組織防護には逆効果であり、アポトーシスを起こしにくい非造血系組織の防護にはp53機能の強化が有効であることが他の研究グループから報告された(*Science* 327, 593-596, 2010)。

これを裏付けるように、これまでに有望化合物として見出されたAS-2を含む8-HQ誘導体のほとんどが、骨髄死には効力を発揮するが腸死には有効性を示さない化合物であった。また、米国で開発され、2008年に報告されたp53拮抗因子NF- κ Bを活性化する放射線防護剤CBLB502(*Science* 320, 226-230, 2008)も有効性を示したのは13 Gy被ばく迄であり、バナデートと同レベルの防護効果にとどまる。これらの結果は、p53活性の抑制によって放射線防護効果が発揮されるのは、骨髄障害に起因する造血系症候群と、腸上皮の障害に起因する消化管系症候群が重なり合う12-13 Gy被ばくまでが限界であることを示しており、それ以上の線量域ではp53が有する抗細胞死活性を高める創薬戦略が妥当と考えられた。実際にp53を1コピー余分に有するsuper p53マウスでは、野生型マウスよりも腹部照射による腸死に抵抗性を示す。また、p21KOマウスが腹部照射による腸死に感受性を示すことも明らかとなり、腸上皮の放射線抵抗性にとってp53-p21経路が非常に重要であることが報告されていた(*Science* 327, 593-596, 2010)。以上の考察から、骨髄死相当線量の防護には「p53阻害」を、腸死相当線量の防護には「p53の抗細胞死活性の亢進」をその後の研究方針とした。この方針では、腸死相当線量における骨髄の回復に、骨髄移植等何らかの有効な手立てを別に講じる必要があるが、現在の医療で克服できない線量域に対抗する手段として、生体に存在するp53の潜在力を最大限引き出す新しい放射線防護剤「p53調節剤」

の開発を推進することとした。

この「p53 調節剤」の有望化合物が、8-HQ 誘導体群の解析から見出された 5-クロロ-8-キノリノール (5CHQ) である。全身照射マウスに対する 5CHQ の防護効果は、7.5 Gy の骨髄死相当線量で半数のマウスを救命する程度の限られた効果であったが、p21 誘導を亢進させるその薬効は、p53 の抗細胞死活性を高めるシード化合物として最適と考えられた。そこで、マウス前脚部の骨髄を鉛で遮蔽防護することによって骨髄死を回避する亜全身照射 (sub-total-body irradiation; SBI) によって、腸管障害に対する放射線防護効果を検討した。その結果、SBI マウス腸死に対し 5CHQ は顕著な防護効果を示し、その DRF (線量減少比) は 1.3 を示した (図 3; 投稿準備中)。

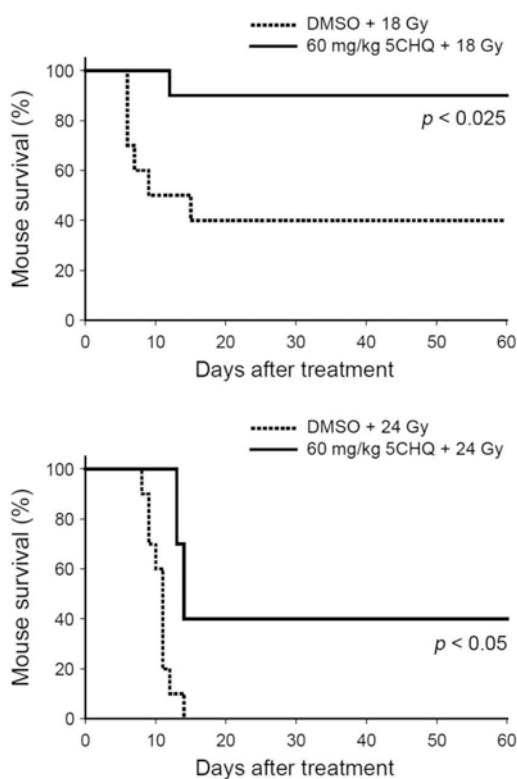


図 3 5CHQ による亜全身照射 (SBI) マウス腸死に対する放射線防護効果

8 週齢の雌性 ICR マウスを使用した。5CHQ は、 γ 線 SBI 30 分前に 60 mg/kg 腹腔内投与し、各照射群 (18 Gy, 24 Gy) の 30 日生存率を検討した。

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 4 件)

- ① A. Morita*, S. Ariyasu, B. Wang, T. Asanuma, T. Onoda, A. Sawa, K. Tanaka, I. Takahashi, S. Togami, M.

Nenoi, T. Inaba and S. Aoki. AS-2, a novel inhibitor of p53-dependent apoptosis, prevents apoptotic mitochondrial dysfunction in a transcription-independent manner and protects mice from a lethal dose of ionizing radiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 1498-1504, 2014, (* Corresponding author). 査読有.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.07.037.

- ② S. Ariyasu, A. Sawa, A. Morita, K. Hanaya, M. Hoshi, I. Takahashi, B. Wang, and S. Aoki. Design and synthesis of 8-hydroxyquinoline-based radioprotective agents. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 3891-3905, 2014. 査読有.
DOI: 10.1016/j.bmc.2014.06.017.
- ③ A. Morita*, S. Ariyasu, S. Ohya, I. Takahashi, B. Wang, K. Tanaka, T. Uchida, H. Okazaki, K. Hanaya, A. Enomoto, M. Nenoi, M. Ikekita, S. Aoki, and Y. Hosoi. Evaluation of Zinc (II) chelators for inhibiting p53-mediated apoptosis. *Oncotarget* 4, 2439-2450, 2013, (* Corresponding author). 査読有.
DOI: 10.18632/oncotarget.1535.
- ④ B. Wang, K. Tanaka, A. Morita, Y. Ninomiya, K. Maruyama, K. Fujita, Y. Hosoi, and M. Nenoi. Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *J. Radiat. Res.* 54, 620-629, 2013. 査読有.
DOI: 10.1093/jrr/rrs140.

[学会発表] (計 17 件)

- ① A. Morita, I. Takahashi, S. Aoki, B. Wang, S. Ariyasu, M. Sasatani, K. Tanaka, T. Yamaguchi, K. Tanimoto, M. Nenoi, K. Kamiya, Y. Nagata, Y. Hosoi, and T. Inaba. A chemical modulator of p53 transactivation that acts as a radioprotective agonist. 4th international postgraduate conference on pharmaceutical sciences (iPoPs 2016). 2016 年 2 月 29 日. 東京理科大学 野田キャンパス (千葉県野田市).
- ② 青木 伸, 森田 明典, 王 冰, 有安 真也, 西 友里恵, 寺岡 達朗, 氏田 将平, 福井 大智, 田中 薫, 田中 智博.

がん放射線治療の副作用低減を目的とする p53 標的放射線防護剤の開発. 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム. 2015 年 9 月 10 日. 熊本大学工学部 黒髪南地区キャンパス (熊本県熊本市).

- ③ A. Morita, I. Takahashi, S. Aoki, B. Wang, S. Ariyasu, M. Sasatani, K. Tanaka, T. Yamaguchi, K. Tanimoto, K. Kamiya, Y. Hosoi, Y. Nagata and T. Inaba. KH-3, a novel chemical modulator of p53, enhances p21 induction and protects mice from gastrointestinal death by abdominal irradiation. 15th International Congress of Radiation Research. 2015 年 5 月 27 日. 京都国際会館 (京都府京都市).
- ④ B. Wang, K. Tanaka, A. Morita and M. Neno. A potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. The 7th National Congress of Radiation Medicine and Protection and The 20th Anniversary Tournament of The Radiological Hygiene Commission, Chinese Society of Preventive Medicine. 2014 年 10 月 15 日. 長城酒店 (中国, 重慶市).
- ⑤ B. Wang, K. Tanaka, A. Morita and M. Neno. A potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. First China International Symposium of Protective Agents Against Injury Induced by Ionizing Radiation. 2014 年 10 月 13 日. 中国医学科学院放射線医学研究所 (中国, 天津市).
- ⑥ 小野田 貴祥, 森田 明典, 浅沼 哲雄, 有安 真也, 澤 晶子, 王 冰, 田中 薫, 根井 充, 青木 伸. 新規放射線防護剤候補化合物の活性評価. 日本放射線影響学会第 57 回大会, 2014 年 10 月 2 日. 鹿児島県民交流センター (鹿児島県鹿児島市).
- ⑦ 浅沼 哲雄, 森田 明典, 小野田 貴祥, 有安 真也, 王 冰, 澤 晶子, 田中 薫, 高橋 一平, 根井 充, 稲葉 俊哉, 青木 伸. 8-キノリノール誘導体 AS-2 の p53 依存性アポトーシス抑制機構. 日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014 年 10 月 2 日. 鹿児島県民交流センター (鹿児島県鹿児島市).
- ⑧ 森田 明典, 高橋 一平, 青木 伸, 王 冰, 有安 真也, 笹谷 めぐみ, 田中 薫, 谷

本 圭司, 神谷 研二, 細井 義夫, 永田 靖, 稲葉 俊哉. 新規アポトーシス抑制剤 KH-3 の放射線防護活性評価. 2014 年 10 月 1 日. 鹿児島県民交流センター (鹿児島県鹿児島市).

- ⑨ I. Takahashi, A. Morita, S. Aoki, B. Wang, M. Sasatani, S. Ariyasu, K. Kenji, Y. Hosoi, Y. Nagata and T. Inaba. KH-3, A Transcriptional Modulator of p53, Protects Mice From Radiation-Induced Gastrointestinal Syndrome. 56th Annual Meeting of American Society for Radiation Oncology. 2014 年 9 月 14 日. Moscone Center (San Francisco, U.S.A.).
- ⑩ 高橋 一平, 森田 明典, 青木 伸, 花屋 賢悟, 有安 真也, 王 冰, 田中 薫, 笹谷 めぐみ, 谷本 圭司, 細井 義夫, 永田 靖, 稲葉 俊哉. 新規アポトーシス抑制剤 KH-3 の作用機構解析. 日本放射線影響学会第 56 回大会. 2013 年 10 月 18 日. ホテルクラウンパレス青森 (青森県青森市).
- ⑪ 有安 真也, 森田 明典, 高橋 一平, 王 冰, 澤 晶子, 星 美里, 内田 孝俊, 大谷 聡一郎, 細井 義夫, 青木 伸. p53 を標的とする放射線防護剤の設計と合成. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 第 7 回 バイオ関連化学シンポジウム. 2013 年 9 月 27 日. 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市).
- ⑫ I. Takahashi, A. Morita, S. Aoki, B. Wang, Y. Hosoi, Y. Kaneyasu, M. Kenjo, T. Kimura, Y. Murakami, and Y. Nagata. The Mechanism of A Novel Radioprotector, 8-Quinolinol Derivative KH-3. 55th Annual Meeting of American Society for Radiation Oncology. 2013 年 9 月 22 日. Georgia World Congress Center (Atlanta, U.S.A.).
- ⑬ 有安 真也, 森田 明典, 高橋 一平, 澤 晶子, 葛岡 朋代, 内田 孝俊, 大谷 聡一郎, 細井 義夫, 青木 伸. p53 を標的とする放射線防護剤の探索と機構解析. 日本化学会第 93 春季年回. 2013 年 3 月 25 日. 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市).
- ⑭ 葛岡 朋代, 森田 明典, 大谷 聡一郎, 花屋 賢悟, 有安 真也, 高橋 一平, 王 冰, 池北 雅彦, 細井 義夫, 青木 伸. 一時的に p53 を選択的に阻害する放射線防護剤の設計及び合成. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 2012 年 10 月 13 日.

昭和大学旗の台キャンパス(東京都品川区).

- ⑮ 森田 明典、花屋 賢悟、大谷 聡一郎、高橋 一平、王 冰、田中 薫、池北 雅彦、永田 靖、青木 伸、細井 義夫. p53 を標的とする新規放射線防護剤の開発. 日本放射線影響学会第 55 回大会. 2012 年 9 月 7 日. 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市).
- ⑯ 高橋 一平、森田 明典、花屋 賢悟、内田 孝俊、王 冰、田中 薫、池北 雅彦、永田 靖、青木 伸、細井 義夫. p53 に作用する 8-キノリノール誘導体 KH-3 の作用機構解析. 日本放射線影響学会第 55 回大会. 2012 年 9 月 7 日. 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市).
- ⑰ 森田 明典、内田 孝俊、大谷 聡一郎、花屋 賢悟、王 冰、田中 薫、細井 義夫、青木 伸、池北 雅彦. p53 転写非依存性アポトーシス誘導経路に作用する 8-キノリノール誘導体 KH-13 の作用機構解析. 第 50 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会. 2012 年 6 月 30 日. 健康文化村カルチャーリゾート フェストーネ (沖縄県宜野湾市).

[その他]

ホームページ等

主宰研究室ホームページ

http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/iyo_rikogaku/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 明典 (MORITA, Akinori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：90334234

(2) 研究協力者

青木 伸 (AOKI, Shin)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：00222472

王 冰 (WANG, Bing)

放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー

研究者番号：10300914