

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861021

研究課題名(和文)PIポリアミドによる核DNAをターゲットにした新たな放射線増感剤の開発

研究課題名(英文)Development of the new radiosensitizer which targetted nuclear DNA by the PI polyamide

研究代表者

石橋 直也 (ISHIBASHI, Naoya)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：40649331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療において治療効果を高めるために用いられる放射線増感剤には、腫瘍細胞への取り込みの選択性・特異性の低さ、細胞毒性による副作用といった問題点がある。本研究では、配列特異的なDNA結合能を持つPIポリアミド分子にヨード元素等を結合させた。このヨード化PIポリアミドはDNAに選択的に結合しヨード元素のX線吸収により強力なDNA損傷を引き起こす可能性がある。選択性が高く副作用の少ないかつ抗腫瘍効果の高い放射線増感剤の開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：The existent radiosensitizer has a problem such as low of the selectivity and the specificity to the tumor cell and the side effect by cell toxicity. We planned to combine the PI polyamide with an iodine, and this iodine labeled PI polyamide might be a new radiosensitizer which selectivity combined with nuclear DNA and reduce the toxicity.

研究分野：放射線増感剤

キーワード：放射線増感剤 ヨード化PIポリアミド

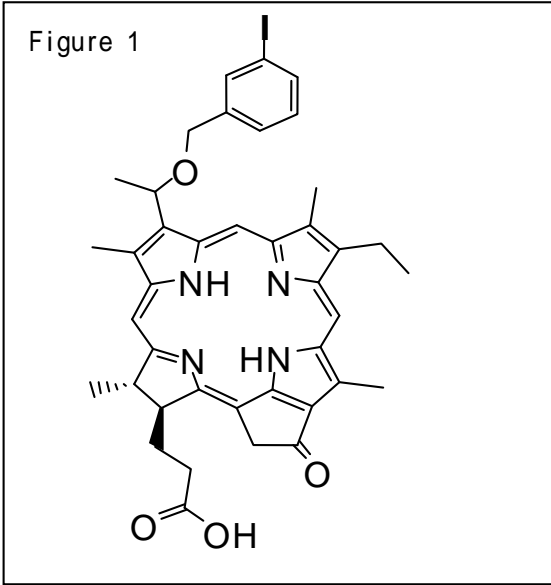
1. 研究開始当初の背景

(1)放射線治療において治療効果を高めるために用いられる放射線増感剤には、腫瘍細胞への取り込みの選択性・特異性の低さ、細胞毒性による副作用といった問題点がある。近年の放射線治療は、強度変調放射線治療 (intensity-modulated radiation therapy; IMRT) や陽子線や炭素線による粒子線治療など飛躍的な物理学的進歩があった。一方で生物学的進歩は非常に遅れている。放射線増感剤の歴史は 1976 年に低酸素性腫瘍細胞に対するミノダゾールによる臨床試験が世界的に行われたが副作用が強く薬剤として許可されるに至らなかった。その後、現在まで実地臨床で広く使われている放射線増感剤は存在しない状況である。

(2)放射線における細胞障害の主要なターゲットは核 DNA と考えられている。放射線による DNA 損傷によって p53 に代表されるような多数の遺伝子、蛋白が関与するシグナル伝達が機能して、アポトーシス誘発を起こすことがすでに明らかにされている。ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドは芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole (Py) および N-methylimidazole (Im) で構成されるポリアミドであり、DNA に配列特異的に結合することが P.B. Dervan らにより報告されている (Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92(22): 10389-10392.). PI ポリアミドと DNA への結合は、DNA 結合蛋白質と DNA の結合に相当する親和性を持ち、Im/Py と Py/Py の組み合わせ次第で、多様な配列の DNA に結合させることができる。細胞の核内への取り込みに特別な Drug Delivery System を要せず、安定性も高いことから、新規の遺伝子発現制御薬として期待されている分子である。

(3) ヨード元素と放射線治療について  
Photon Activation Therapy (PAT) は、核酸類似物質であるヨード化合物や臭素化合物 (5-iododeoxyuridine ; IUdR や 5-bromodeoxyuridine; BUdR) を腫瘍細胞の核内に取り込ませ、その元素の K 吸収端に相当するエネルギーの X 線を照射することにより DNA 近傍から発生する Auger 電子を利用して放射線の増感効果を得る治療法であり、以前から研究されている (Karnas SJ et al. Phys Med Biol. 1999, 44(10): 2537-2549.). K 吸収端とは入射する X 線エネルギーの上昇に伴い急激に X 線吸収の上昇する X 線エネルギー値のことで Computed Tomography (CT) の撮影時に使用されるヨード造影剤はこの K 吸収端を利用し造影コントラストを向上させている。また現在医療の臨床で行われている光線力学療法 (PDT) は、腫瘍親和性のある

光感受性物質を投与した後に腫瘍にレーザー光を照射する治療法である。現在の PDT の問題点としてレーザー光の深達度が浅く深部癌や進行した癌には適応がないこと、光感受性物質の吸収波長のピークが可視光線領域であり、患者は光線過敏症を防ぐために長期間、暗室で管理されなければならないことが挙げられている。そこで我々は X 線を吸収し X 線増感効果の可能性がある新たな腫瘍親和性のある光感受性物質を準備した。この化合物を利用し上記の PXR による光線力学療法を実現し、深部癌や進行癌の新たな光線力学療法の開発を行ってきた。すなわち、今まで PDT の適応外であった深部癌や進行癌に対して X 線を使用して PDT を行うことを可能にするとともに、他の波長の X 線が排除されることで極めて低被曝状態でのがん治療の実現が期待される。具体的には我々はヨード元素をポルフィリン誘導体に結合させた分子が新たな放射線増感剤になる可能性があると考え、PDT の新たな光感受性物質として近年注目されているポルフィリン誘導体 HPPH(3-(1'-hexyloxyethyl)-3-devinylpyropheophorbide-a) にヨード元素を結合させたヨード化ポルフィリン誘導体を作成した (Figure 1)。このヨード化ポルフィリン誘導体をヒト膀胱癌細胞株 T24 に投与し、ヨード元素の K 吸収端に相当する 33keV を実行エネルギーのピークに設定した X 線を照射することにより、in vitro および in vivo において放射線増感作用の可能性があるか検討してきた。このヨード化ポルフィリン誘導体を培養腫瘍細胞に投与し細胞内局在を確認した。具体的には細胞分画キット Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem MERCK) で細胞質、膜・オルガネラ、核、細胞骨格マトリックスを連続して順次分画抽出した。そして各抽出液を高速液体クロマトグラフィ - High performance liquid chromatography (HPLC) で確認した。このヨード化ポルフィリン誘導体は膜・オルガネラ分画に最も多く取り込まれていた。また蛍光顕微鏡の観察においてヨード化ポルフィリン誘導体はミトコンドリアの発光部位に一致していた。このヨード化ポルフィリン誘導体は腫瘍細胞内のミトコンドリアに取り込まれることが知られており、この放射線による細胞障害のターゲットはミトコンドリアと考えられた。



(4) 今回の研究では、配列特異的な DNA 結合能を持つ PI ポリアミド分子にヨード元素等を結合させ、強力に DNA 損傷を引き起こす放射線増感剤の開発を試みた。これによりミトコンドリアをターゲットにしたヨード化ポルフィリン誘導体より強力な放射線増感が期待された。また放射線治療後の細胞死の機序としてアポトーシスがよく知られている。そこで培養腫瘍細胞にヨード化 PI ポリアミドを投与した後に X 線を照射し経時的に培養しその後、Hoechst33258 (Invitrogen) で染色しクロマチンの凝集したアポトーシス小体を蛍光顕微鏡で観察しアポトーシス小体を観察することを計画した。また、培養腫瘍細胞にヨード化 PI ポリアミドを投与した後に活性酸素種と反応する蛍光プローブ試薬 Aminophenyl Fluorescein (APF, SEKISUI MEDICAL) を添加し直後に X 線を照射し蛍光を測定し活性酸素ヒドロキシルラジカル ( $\text{OH}\cdot$ ) 発生を測定することを計画した。さらに、腫瘍でゲノムの増幅が報告されている癌遺伝子の DNA 配列を認識するヨード化 PI ポリアミドを設計し、癌遺伝子増幅細胞株でより強力に放射線増感効果を示すかどうか検討したかった。

## 2. 研究の目的

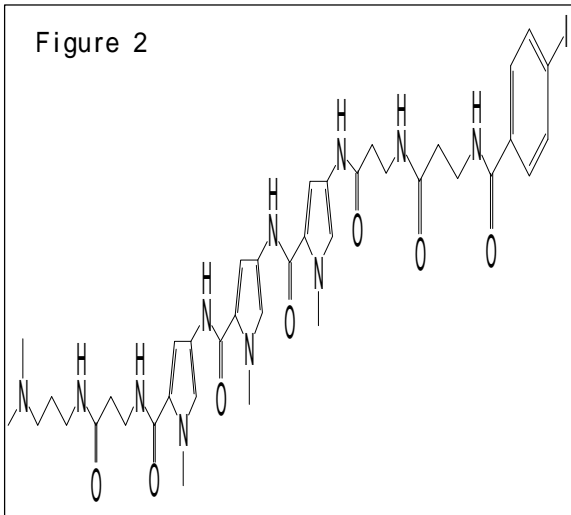
PI ポリアミドにヨード元素や臭素元素を結合させることによりヨード化 PI ポリアミドを合成し、核 DNA での X 線吸収を高め、効率的な DNA 損傷を起こす可能性の検討を試みた。

## 3. 研究の方法

ヨード元素や臭素元素の結合した PI ポリア

ミドを複数作成し培養腫瘍細胞株に投与して in vitro での放射線増感効果を検証した。

(1) ヨード元素および臭素元素を確実に核 DNA へ移行させるために短い配列の分子量の少ない PI ポリアミドにヨード元素を結合させたヨード化 PI ポリアミドを我々は合成した (Figure 2)。その他もヨード化および臭素化 PI ポリアミドを合成した。ヨード化 PI ポリアミドは 99.5% ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解することを確認しストック溶液を作成した。培養細胞に投与する際は目的の終濃度になるようストック溶液を培地で希釈して使用した。



(2) 細胞株は現在医療の現場で一般的に放射線治療が行われているヒト乳癌 MCF7 とヒト膀胱癌 T24 などの腫瘍細胞株を培養した。

## (3) WST assay

96 穴平底マイクロプレートに MCF7 および T24 を 100cells/well から 2000cells/well までの細胞密度を変えて播種し培地が各 well に 100  $\mu$ l になるようにした。培養条件は 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  であった。

24 時間培養後にヨード化 PI ポリアミドを終濃度 0.5  $\mu$ g/ml から 10  $\mu$ g/ml までになるように濃度を変えて投与した。コントロール群には等量の培地および DMSO を培地で希釈しヨード化 PI ポリアミドの終濃度内の DMSO 濃度と同じにした DMSO を投与した。

ヨード化 PI ポリアミド投与 24 時間後に X 線を 1Gy から 10Gy まで照射線量を変えて 1 回照射した。X 線照射は日本大学医学部医学研究支援部門に設置してある日立 X 線照射装置 MBR-1520R-3 (Hitachi Medico) を使用した。X 線の発生条件は管電圧 150Kv、管電流は 20mA で実効エネルギーは 33keV から 65keV まで変

えた。X線の照射条件は距離 30cm、線量率 8.8Gy/minであった。

X線照射直後に培地中のヨード化PIポリアミドを除去するため培地を吸引しヨード化PIポリアミドの投与されていない通常の培地に置換し培養した。あるいはX線照射直前に培地中のヨード化PIポリアミドを除去するため培地を吸引しヨード化PIポリアミドの投与されていない通常の培地に置換し培養した。あるいはX線照射直後に培地を置換せずヨード化PIポリアミドを投与したまま培養した。

X線照射 24 時間後、48 時間後、72 時間後に生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性を利用して吸光度測定により生細胞数を計測する還元発色試薬 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt(WST-8)を添加した。そして非照射群との比色定量による生細胞数の評価を行った。照射群の値を非照射群の値で除しヨード化PIポリアミドを添加していない群を1とした。

#### (4)Colony formation assay

10cm細胞培養dishにMCF7およびT24を100cells/wellから500cells/dishまでの細胞密度を変えて播種し培地が各wellに10000μlになるようにした。培養条件は37℃、5%CO<sub>2</sub>であった。

24時間培養後にヨード化PIポリアミドを終濃度0.5μg/mlから10μg/mlまでになるように濃度を変えて投与した。コントロール群には等量の培地およびDMSOを培地で希釈しヨード化PIポリアミドの終濃度内のDMSO濃度と同じにしたDMSOを投与した。

ヨード化PIポリアミド投与24時間後にX線を1Gyから10Gyまで照射線量を変えて1回照射した。

X線照射直後に培地中のヨード化PIポリアミドを除去するため培地を吸引しヨード化PIポリアミドの投与されていない通常の培地に置換し培養した。あるいはX線照射直前に培地中のヨード化PIポリアミドを除去するため培地を吸引しヨード化PIポリアミドの投与されていない通常の培地に置換し培養した。あるいはX線照射直後に培地を置換せずヨード化PIポリアミドを投与したまま培養した。

X線照射7日後あるいは14日後に形成されたコロニーをディフ・クイック染色(SYSMEX)により固定染色しコロニー数を画像解析ソフト Lumina Vision(MITANI)で計測した。細胞生存率から生存率曲線を作成した。細胞生存率はX線照射後に形成されたコロニー数/(播種した細胞数×コロニー形成率/100)で算出した。

#### 4. 研究成果

(1)まずヨード化PIポリアミド投与のみでX線照射しない場合には細胞毒性を認めなかった。

(2)ヨード化PIポリアミドの投与濃度および照射線量について様々な条件検討を行ったがWST assayの比色定量による生細胞数の評価とColony formation assayによる細胞生存率による生存曲線においてヨード化PIポリアミド非投与X線照射群とヨード化PIポリアミド投与X線照射群で同程度の結果であった。X線照射は1Gyから10Gyまで線量増加を行い放射線による生細胞数の減少は確認されたがヨード化PIポリアミド投与の有無による生細胞数の変化は認めなかった。

(3)今回の条件検討ではヨード化PIポリアミドに期待された放射線増感効果は得られなかった。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石橋 直也 (ISHIBASHI, Naoya)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：40649331

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )