

## 総説 (教授就任記念講演)

### 正常組織の耐容線量を高める放射線防護剤の開発

森田 明典, 氏田 将平

徳島大学大学院医歯薬学研究部医用理工学分野

(平成29年11月30日受付) (平成29年12月18日受理)

#### はじめに

近年の高精度放射線療法の進展は目覚ましく、線量集中性の向上によって高い治療効果が得られるようになった。しかしながら、周辺のリスク臓器に有害事象が生じないようにするため依然として正常組織障害が処方線量の限界、すなわち耐容線量を決めている。放射線応答に関する生命科学的知見が集積しつつある今こそ、分子標的創薬に基づいた放射線感受性修飾による耐容線量向上、あるいは根治線量低減の達成が望まれる。

われわれは、p53分子内の亜鉛結合部位を標的とする8-キノリノール (8-HQ) 誘導体の合成、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。現在注目している5-クロロ-8-キノリノール (5CHQ) は、p53標的遺伝子のうち、細胞死に拮抗するp21の発現を亢進させ、細胞死を促進するPUMAの発現を抑制するp53標的遺伝子発現調節作用を示し、p53依存性細胞死を防ぐ特異な活性を有している<sup>1)</sup>。本化合物の防護活性を示す線量減少率DRF (dose reduction factor) は、骨髄死相当線量のマウス全身照射試験で1.2、腸死相当線量の腹部照射試験で1.3と、医療応用を目指した正常組織防護剤シードとして良好な値を示した。放射線療法への応用が可能な新たな防護剤の創出が期待される。

#### ※ 線量減少率

DRF (dose reduction factor) と略し、放射線防護剤の防護活性の指標として用いる。防護剤を放射線と併用してある生物効果を得るのに必要な線量を、同じ効果を得るのに必要な放射線単独の線量で割ったもので、値が1より大きいときに防護効果があることを意味する。

#### 放射線治療への応用を目指して

粒子線治療を始めとする高精度放射線療法の進展は目覚ましく、線量集中性の向上によって高い治療効果が得られるようになった。従来の前後左右4門照射法 (耐容線量60~66 Gy) に比べ、最新の強度変調放射線治療IMRT (耐容線量~80 Gy) では処方線量が約1.3倍向上した<sup>2)</sup>。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、周辺のリスク臓器に有害事象が生じる場合があり、高精度放射線治療が普及しつつある現在も依然として正常組織障害が処方線量の限界を決めており、物理的な線量集中性の向上は限界に達しつつある。特に、腹部・骨盤領域のがんにおいて、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、放射線腸炎の早期・晩期障害として、下痢や腸管出血、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。また、腸管蠕動、呼吸、嚥下運動等によって腫瘍の位置の変動が伴う場合も正常組織への影響を最小限にする工夫が必要である。このため、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。具体的には、物理的な技術改良によってようやく達成された1.3倍の耐容線量向上を放射線防護剤として達成するため、DRFとして1.3以上を示す正常組織特異的な放射線防護剤を開発することを目標とした。なお、5CHQが達成したDRF1.3は、これまでに開発された放射線防護剤が達成したDRFと比較しても遜色のない、非常に優れた防護活性であることにも言及しておきたい<sup>3)</sup>。

放射線防護上、特に重篤な急性障害は骨髄と腸上皮の放射線障害である。それぞれの組織障害を死因とする個体死は、骨髄死 (造血死)、腸死 (消化管死) と呼ばれ

ており、およそ10 Gy までの被ばくでは骨髄死、10 Gy 以上から50 Gy 程度までの被ばく線量域では腸死が主となることが知られている。これらの急性障害は、両組織の放射線高感受性の幹細胞死に起因する。p53は、どちらの組織の放射線細胞死の進行にも関わるが、その関わり方は両組織で全く異なっており、骨髄では放射線誘発アポトーシスを引き起こすメディエーターとして機能しているのに対し、腸上皮では非アポトーシス性の分裂死 (mitotic death) に対する抵抗性因子として機能する<sup>4)</sup>。このように2つの組織において相反する作用を示す p53 の機能を効果的に制御する必要がある。

### 放射線防護における p53制御の有用性

現在、米国食品医薬品局 FDA に承認された放射線防護剤は、被ばく前投与が必要な抗酸化剤アミフォスチン (別名 WR-2721, 商品名 Ethyol) のみであり、この防護剤には悪心、嘔吐、低血圧等の副作用があることから投与量も制限されている<sup>3,5)</sup>。これらの副作用はチオール基含有化合物に共通して認められる有害事象であり、正常組織への選択性も限定的であることから、アミフォスチンの適用は頭頸部がんの放射線治療における唾液腺障害の予防に限られている。

近年、抗酸化作用に依拠せず、細胞死機構を制御することで放射線耐性を高める防護剤開発が進みつつある。p53制御剤は、正常な p53機能を示す正常組織の DNA 損傷細胞死を選択的に防護し、p53機能を喪失しているがん細胞は防護しないため、放射線被ばく事故での救命への応用だけでなく、放射線治療の線量制限や、抗がん剤の処方量制限を克服する副作用軽減剤としての応用が期待されている (図1)。なお、p53制御による放射線防護のデメリットとして、通常の排除機構を抑制することによる発がん促進の可能性が指摘されることが多いが、DNA 傷害性ストレスに起因する発がん過程では、p53 依存性アポトーシスを抑制しても発がんリスクが増加しないことが、種々の遺伝子改変マウスの研究から既に裏付けられており<sup>6-8)</sup>、一過性の薬理的 p53制御の有用性は明白である。

### 放射線誘発アポトーシスを制御する化合物の探索

細胞死制御による放射線防護剤の開発を目指した取り組みの最初の成果として、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)

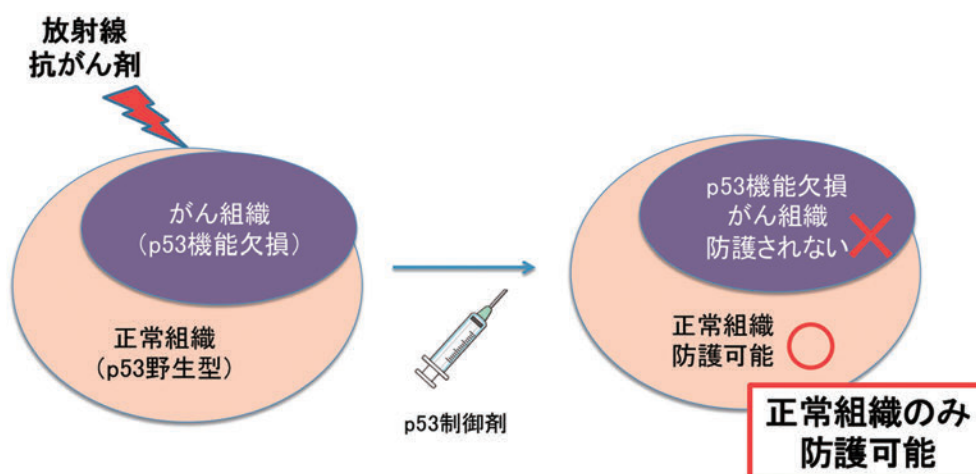


図1：p53制御による正常組織の選択的防護

半数近くのがん細胞では、p53をコードする TP53 遺伝子に変異が認められ、正常組織とがん細胞の生物学的応答が異なる大きな要因となっている。p53制御剤は、正常な p53機能を示す正常組織の DNA 損傷細胞死を選択的に防護し、p53機能を喪失しているがん細胞は防護しないため、正常組織防護剤としての医療応用が期待される。

を見出した<sup>9)</sup>。バナデートは、ヒト T 細胞白血病細胞株 MOLT-4 の放射線誘発アポトーシスに伴って出現する 2 次元電気泳動検出タンパク p41 の誘導阻害剤として見出されており、この研究報告<sup>10)</sup>が本研究の原点である。即ち、p41 を指標として X 線照射直後の MOLT-4 細胞の培養液中に種々の薬剤を加え、p41 誘導阻害効果を検討、チロシンホスファターゼ阻害剤として広く用いられているバナデートを阻害剤として見出していた。

その後、私は、p41 が SET $\beta$  (p42) とよばれる核内タンパク質のカスパーゼ切断産物であることを見出した<sup>11)</sup>。バナデートには直接のカスパーゼ活性阻害作用はなかったが、その後の詳細なカスパーゼ上流のアポトーシス誘導因子解析から、放射線応答の重要な初期過程に関わる転写因子 p53 を阻害し、DNA 損傷後の p53 のリン酸化や蓄積には影響を及ぼさずにその構造を不活性型構造に変化させること、また、不活性化された p53 には DNA 結合能がなく、照射後の p53 応答遺伝子の転写活性化が行えなくなっていることを見出した。さらに p53 遺伝子型の異なる細胞株、および作製した p53 ノックダウン細胞株の比較から、バナデートの抗アポトーシス作用の p53 特異性が明らかとなり、バナデートの標的分子は p53 であると結論付けた<sup>12)</sup>。

研究をさらに進めた結果、先行研究グループによって開発されたピフィスリン  $\alpha$  (PFT $\alpha$ )<sup>13)</sup> や PFT $\mu$ <sup>14)</sup> 等の他の p53 阻害剤よりも優れたバナデートのアポトーシス抑制効果が、p53 の「転写依存性経路」だけでなく、p53 がミトコンドリアの Bcl-2 ファミリーに直接作用する「転写非依存性経路」にも作用することに起因することを発見した。これを裏付けるように、バナデート投与マウスの放射線急性障害抑制効果についても、代表的な p53 阻害剤である PFT $\alpha$  よりも優れた防護効果が得られた。この防護効果は、12 Gy 照射による腸死にも有効であったことから、バナデートは腸死を克服できる初めての p53 阻害剤であることが明らかとなった<sup>9)</sup>。なお、このバナデート投与後の全身照射実験を含め、以降全ての動物実験は実施施設の動物実験に関する指針を遵守して行った。さらに、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<sup>15)</sup>。

これらの成果は、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唆しており、防護剤開発の重要な指針となることが期待されたが、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、むしろ 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<sup>4)</sup>。腸死を防ぐバナデート作用と文献<sup>4)</sup>の矛盾については、未だ結論を下せる段階にはないが、米国で開発され、2008年に報告された p53 拮抗因子 NF- $\kappa$ B を活性化する放射線防護剤 CBLB502 も有効性を示したのは 13 Gy 被ばく迄であり<sup>16)</sup>、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器系症候群と、腸上皮の障害に起因する消化管系症候群が複合的に重なり合う 12-13 Gy 被ばくまでが限界であることを示唆しており、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ストラテジー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にされており、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る<sup>4,17)</sup>。

臨床的に、局所照射主体の放射線治療において、重度の骨髄抑制は骨髄移植を除いて想定されないため、腹部・骨盤領域のがん治療における直腸等のリスク臓器の防護を目的として、腹部照射において生体中の p53 の潜在力を最大限引き出す、バナデート効果を応用した新しい放射線防護剤の探索に取り組むこととした。

#### 亜鉛キレート化剤による p53 制御

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、われわれ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 2) に配位する亜鉛イオンの解離<sup>18)</sup> や他の金属イオンとの置換<sup>19)</sup> によって生じることが知られていた。

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

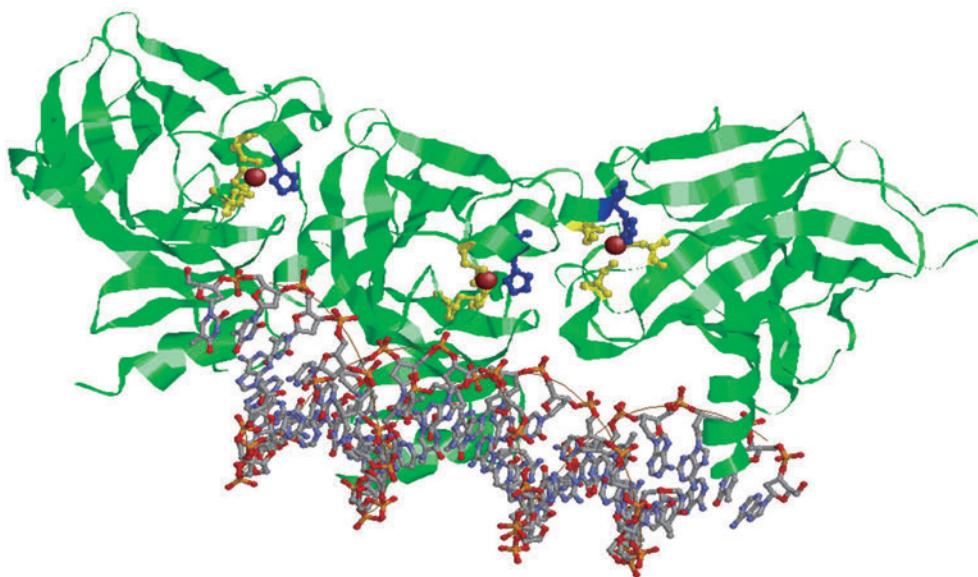


図2：p53の亜鉛結合部位

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 (黄) と1つのヒスチジン (青) から成る Zinc フィンガー様の亜鉛結合部位のアミノ酸側鎖を球棒モデルで図示した。この図では、標的 DNA (stick bond 表示) に対して p53 の DNA 結合ドメイン (緑のリボンモデル表示) が3分子結合しており、亜鉛イオン (赤い球) は DNA 結合面に位置している。

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<sup>20)</sup>。

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。

#### 8-HQ 誘導体による p53制御

そこでわれわれは次に, 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3A)。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, 配座数4でp53に結合している亜鉛イオンを覆うように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。

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合物を発見した<sup>21)</sup>。その内の1つ, AS-2 (5,

7-bis (*N*-methylaminosulfonyl) -8-hydroxyquinaldine) 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3B, C)<sup>22)</sup>。

しかしながら, われわれがこれまでに検討した 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り, 先に述べた文献<sup>4)</sup>の主張を裏付ける, p53阻害による放射線防護の限界と考えられた。

そこで着目したのが, 8-HQ誘導体群の活性評価から見出された5CHQである。5CHQは, p53標的遺伝子のうち, 細胞死に拮抗する p21の発現を亢進させ, 細胞死を促進する PUMA の発現を抑制する p53標的遺伝子発現調節作用を示し, p53依存性細胞死を防ぐ特異な活性を有していた<sup>1)</sup>。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) とよばれる腹部照射法によって、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は1.3を示した(図4)<sup>1)</sup>。

おわりに

放射線防護剤としての5CHQの特徴は、p53を「阻害」

せず、p53の放射線抵抗性機能を引き出すことにある。この活性は、他に類を見ない化合物活性であり、放射線療法や化学療法を支援する新たな防護剤の創出が期待される。また、5CHQのような「p53の一部機能を強化する薬剤」は、発がん促進のリスクから短期の投与が前提となる「p53阻害剤」とは異なり、より長期の服用も可能な放射線防護剤として利用できる可能性もある。今後はその作用機構の全容解明にさらに取り組みと共に、腫瘍モデル実験系で治療効果を向上させる働きがあるかどうか検証を進めて行く予定である。

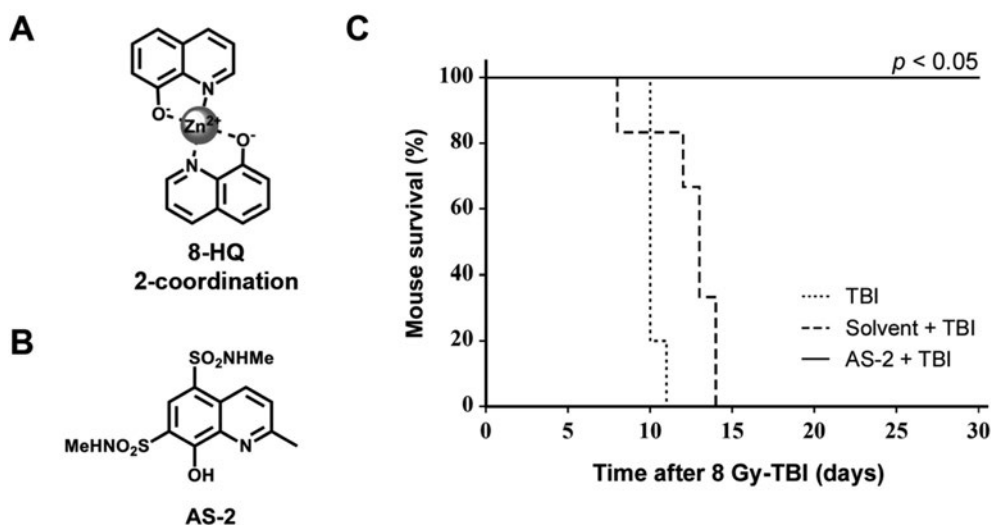


図3：8-HQ 誘導体による p53制御

(A) 8-HQ と亜鉛 (II) イオンの錯体形成様式、(B) AS-2の構造式 (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。文献<sup>2)</sup>等より改編。

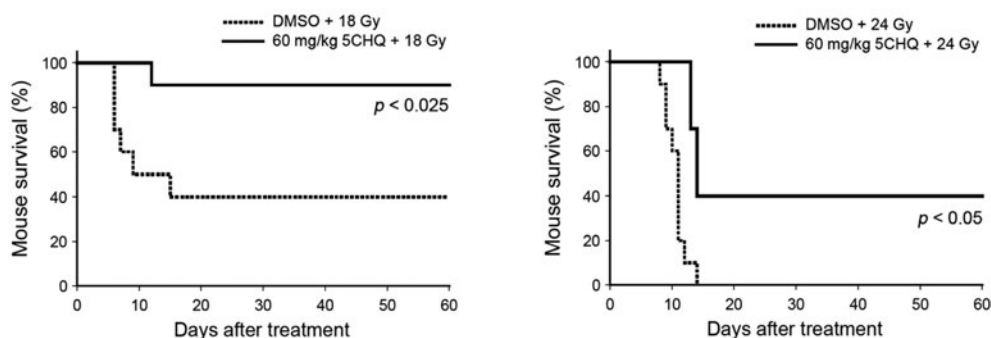


図4：γ線18 Gy および24 Gy 腹部照射マウスに対する5CHQの腸死防護効果

8週齢の雌性ICRマウスを使用した。5CHQは、γ線照射30分前に60 mg/kg 腹腔内投与し、各照射群の30日生存率を検討した。文献<sup>1)</sup>より改編。

## 文 献

- 1) Morita, A., Takahashi, I., Sasatani, M., Aoki, S., *et al.*: A chemical modulator of p53 transactivation that acts as a radioprotective agonist. *Mol. Cancer Ther.*, online publication, 2017
- 2) Zelefsky, M. J., Fuks, Z., Hunt, M., Lee, H. J., *et al.*: High dose radiation delivered by intensity modulated conformal radiotherapy improves the outcome of localized prostate cancer. *J. Urol.*, **166** : 876-881, 2001
- 3) Weiss, J.F.: Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. *Environ. Health Perspect.*, **105** (Suppl. 6) : 1473-1478, 1997
- 4) Kirsch, D. G., Santiago, P. M., di Tomaso, E., Sullivan, J. M., *et al.*: p53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis. *Science*, **327** : 593-596, 2010
- 5) Capizzi, R. L., Oster, W.: Chemoprotective and radioprotective effects of amifostine: an update of clinical trials. *Int. J. Hematol.*, **72** : 425-435, 2000
- 6) Christophorou, M. A., Ringshausen, I., Finch, A. J., Swigart, L. B., *et al.*: The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature*, **443** : 214-217, 2006
- 7) Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., *et al.*: Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell*, **149** : 1269-1283, 2012
- 8) Valente, L. J., Gray, D. H., Michalak, E. M., Pinon-Hofbauer, J., *et al.*: p53 efficiently suppresses tumor development in the complete absence of its cell-cycle inhibitory and proapoptotic effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Rep.*, **3** : 1339-1345, 2013
- 9) Morita, A., Yamamoto, S., Wang, B., Tanaka, K., *et al.*: Sodium orthovanadate inhibits p53-mediated apoptosis. *Cancer Res.*, **70** : 257-265, 2010
- 10) Morimatsu, A., Suzuki, N., Hirano, K., Matsumoto, Y., *et al.*: Identification and characterization of a protein found after X-irradiation in human T cell leukemia. *J. Radiat. Res.*, **37** : 1-11, 1996
- 11) Morita, A., Suzuki, N., Matsumoto, Y., Hirano, K., *et al.*: p41 as a possible marker for cell death is generated by caspase cleavage of p42/SET $\beta$  in irradiated MOLT-4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **278** : 627-632, 2000
- 12) Morita, A., Zhu, J., Suzuki, N., Enomoto, A., *et al.*: Sodium orthovanadate suppresses DNA damage-induced caspase activation and apoptosis by inactivating p53. *Cell Death Differ.*, **13** : 499-511, 2006
- 13) Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., *et al.*: A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*, **285** : 1733-1737, 1999
- 14) Strom, E., Sathe, S., Komarov, P. G., Chernova, O. B., *et al.*: Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat. Chem. Biol.*, **2** : 474-479, 2006
- 15) Wang, B., Tanaka, K., Morita, A., Ninomiya, Y., *et al.*: Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *J. Radiat. Res.*, **54** : 620-9, 2013
- 16) Burdelya, L. G., Krivokrysenko, V. I., Tallant, T. C., Strom, E., *et al.*: An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science*, **320** : 226-230, 2008
- 17) Sullivan, J. M., Jeffords, L. B., Lee, C. L., Rodrigues, R., *et al.*: p21 protects "Super p53" mice from the radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Radiat. Res.*, **177** : 307-310, 2012
- 18) Meplan, C., Richard, M. J., Hainaut, P.: Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene*, **2000** ; **19** : 5227-5236, 2000
- 19) Meplan, C., Mann, K., Hainaut, P.: Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **274** : 31663-31670, 1999
- 20) Morita, A., Ariyasu, S., Ohya, S., Takahashi, I., *et al.*: Evaluation of Zinc (II) chelators for inhibiting p53-mediated apoptosis. *Oncotarget*, **4** : 2439-2450, 2013
- 21) Ariyasu, S., Sawa, A., Morita, A., Hanaya, K., *et al.*: Design and synthesis of 8-hydroxyquinoline-based radioprotective agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **22** : 3891-3905, 2014

- 22) Morita, A., Ariyasu, S., Wang, B., Asanuma, T., *et al.* : 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

## *Development of radioprotectors that selectively protect normal tissues in cancer therapy*

*Akinori Morita and Shohei Ujita*

*Department of Biomedical Science and Technology, Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University, Tokushima, Japan.*

### SUMMARY

The progress of high-precision radiation therapy in recent years has been remarkable, and it has become possible to obtain a high therapeutic effect by improving dose concentration. However, in order to prevent adverse events from occurring in organs at risk, the risks of radiation injury in the normal tissues still determine the limits of the tolerable dose. Now, it is hoped that improvement of tolerable dose by a biological modification of radiation sensitivity using some molecular target drugs. Since nearly half of cancer patients have a mutation in the *TP53* gene that encodes p53, p53 regulatory agents are expected to exert a selective protection of normal tissues in p53-deficient cancer therapy. We proceeded with the exploration of 8-quinolinol (8-HQ) derivatives that target a zinc binding site within the p53 molecule, and found several radioprotectors controlling p53 activity. 5-chloro-8-quinolinol (5CHQ), which is currently in focus, has a unique p53-modulating activity that shifts its transactivation from proapoptotic to protective responses including enhancing p21 induction and suppressing PUMA induction. The dose-reduction factors of 5CHQ in total-body and abdominally irradiated mice were about 1.2 and 1.3, respectively. It is expected to create a new radioprotective agent that can be applied to cancer therapy.

Key words : p53, apoptosis, radioprotector