

—総説—

ハイポキシアを標的とする新規癌治療薬の開発

永澤 秀子

要約：近年、腫瘍の微小環境が、癌の治療成果のみならず、癌細胞の増殖・分化、転移などを制御する重要な要因と考えられている。中でも低酸素微小環境（ハイポキシア）は癌の基本的な環境であり、これまで放射線や化学療法に対して抵抗性を示し、完治を妨げる要因として問題視されてきた。低酸素誘導因子（HIF-1 α ）の発見に端を発し、ハイポキシアの分子機構に関する研究が急速に進展し、細胞の低酸素ストレス応答に関わる様々な分子が明らかになってきた。その結果、新たな創薬ターゲット探索の場として、ハイポキシア研究に期待が集まっている。本総説では、低酸素微小環境を標的とする癌治療法の進歩を含む、ハイポキシア研究の最近の成果を紹介し、筆者の行った多機能性低酸素細胞放射線増感剤の開発、低酸素微小環境を標的とする hypoxic cytotoxin の分子設計、及びハイポキシア指向性ハイブリッド型ボロンキャリアの分子設計における研究成果を概説する。この研究で我々の開発した、2-nitroimidazole 系放射線増感剤や heterocycle-N-oxide 誘導体に、血管新生阻害作用や転移抑制効果があることを見いだした。これらの作用は HIF-1 α を中心とするハイポキシア応答シグナルの阻害を介して起こるものと考えられた。このような効果は、従来の化学療法剤にみられる DNA 障害性の cytotoxic 作用とは異なる cytostatic な効果である。このような薬剤は、放射線による cytotoxic 作用を補い、予後の改善と QOL の向上をもたらす、ひいては癌治療効果を増強するものと期待される。

索引用語：ハイポキシア、血管新生阻害剤、低酸素誘導因子 (HIF) - 1 α 阻害剤、低酸素細胞放射線増感剤、ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)

Molecular Design of Hypoxia-Targeting Chemotherapy agent

Hideko NAGASAWA

Abstract: The tumor microenvironment is now recognized as a major factor that influences not only the response to conventional anti-cancer therapies, but also helps define the potential for malignant progression and metastasis. In particular, hypoxia is now considered a fundamentally important characteristic of the tumor microenvironment. Furthermore, discovery of the hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) has led to a rapidly increasing understanding of the molecular mechanisms involved in tumor hypoxia. This in turn has led to the current extensive interest in the signal molecules related to tumor hypoxia as potential molecular targets for cancer therapeutics. In this paper we give an overview of recent advances in hypoxia research, including cancer treatments that target tumor hypoxia. Progress in the development of hypoxia-targeting drugs are discussed, including anti-angiogenic hypoxic cell radiosensitizers, hypoxic cytotoxins and hypoxia targeting boron carriers. We have found that certain 2-nitroimidazole radiosensitizers and heterocycle-N-oxide hypoxic cytotoxins we developed have antiangiogenic activity and antimetastatic activity. We propose that these activities are based on the inhibition of signal transduction mediated by HIF-1 α . The anti-tumor activities of preventing hypoxia response are considered to be cytostatic effects, in contrast to cytotoxic DNA damaging effects. The combination of these cytostatic effects that are related to radiosensitization with the cytotoxic effects of radiation should improve the prognosis and QOL of patients receiving radiation and lead to an overall response to treatment.

Keyphrases: hypoxia, angiogenesis inhibitor, HIF-1 α inhibitor, hypoxic cell radiosensitizer; boron neutron cancer therapy

岐阜薬科大学薬化学研究室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5-6-1)

Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University
(5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

1. 緒言

生物は、自然環境の変化を認識し、適応することによって、生存・進化している。環境因子が及ぼす影響に対する生物の適応反応を環境ストレス応答と言う。今日では、このような生体反応に関して、細胞レベルでの解明が進んでおり、新しい創薬ターゲットを探索する上で非常に注目される。種々の環境因子の中でも酸素は、地球上に生存する生物にとって、最も重要な因子であり、好気性生物は低酸素下（ハイポキシア）でのサバイバルをかけて、様々な適応反応を起こす。このような細胞の低酸素ストレス応答反応として、解糖系の昂進や、血管新生の誘導などが知られており、これらの変化は、腫瘍の微小環境にみられる特徴とよく一致している。最近、このような腫瘍の低酸素微小環境に関する分子機構の解明が進んだことから、放射線治療医・奥山らが1990年に指摘した『癌の基本的環境は低酸素である』¹⁾という先験的な癌認識が改めてクローズアップされている。実際、成体動物の体内でみられるハイポキシアは、腫瘍組織を除くと、一時的（acute）または慢性的（chronic）な血流障害や肺の疾患によるものに限られている。癌組織において、異常な増殖により血管破壊され孤立した癌細胞は、十分に酸素も栄養分も届かないにも関わらず生存している（Fig. 1）。この低酸素細胞は放射線感受性が低く化学療法の送達に劣るため、癌の完治を妨げ、再発を招く原因の一つとして問題になっている。

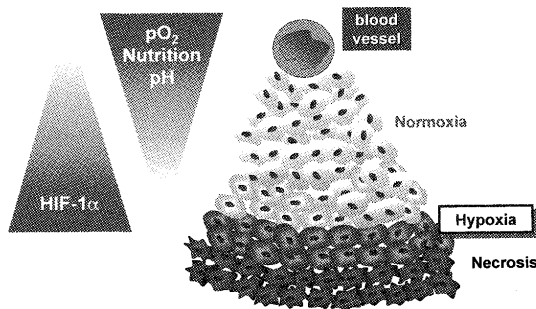


Fig. 1 hypoxia in solid tumors.

このような低酸素癌細胞を標的とした最初の取り組みは、放射線感受性の増大を目的とした、低酸素細胞放射線増感剤の開発研究である。酸素が細胞のX線感受性を2.5～3倍に高める現象は酸素効果と呼ばれ、放射線生物学において古くから注目されてきた。この原理を利用して、化学的に酸素と類似の反応性を示す物質（oxygen mimics）が低酸素細胞増感剤として数多く開発された。しかし残念ながら、nimorazole^{2, 3)}がデンマークでのみ臨床適用⁴⁾されている以外は、未だ臨床用薬剤の上市に至っていない。近年、低酸素微小環境での癌細胞のサバイバル戦略⁵⁾について

急速に解明されてきた結果、ハイポキシアを標的とする抗癌剤開発に注目が集まっている⁶⁾。これらの知見を分子設計に取り入れることによって、“酸素効果”を超える放射線生物学のブレークスルーが期待できるであろう。筆者は酸素類似物質としての“古典的な”低酸素細胞放射線増感剤から、ハイポキシア応答シグナル分子を分子標的とする化学修飾剤（chemical modifier）の設計へとパラダイムシフトして研究を進めてきた。この総説においては、最近特に制癌におけるキーワードとして注目されてきた“ハイポキシア”を標的とする薬剤として、血管新生阻害および転移抑制、生体還元活性化修飾物質、Biological response modifier (BRM) の分子設計に絞って筆者の創薬研究結果を紹介したい。

2. 血管新生阻害活性及び転移抑制作用を有する多機能性低酸素細胞放射線増感剤の分子設計

低酸素細胞放射線増感剤において、必須の構成構造であるニトロ芳香環は親電子性が高く、低酸素下で oxygen mimic として作用し、電離放射線の障害を酸化反応により固定すると考えられている⁷⁾。一方この構造はハイポキシアマーカーとしての機能も有し、この場合には、生体還元反応によってヒドロキシルアミンに活性化され、親電子剤として細胞内求核分子と反応して低酸素細胞内に結合すると考えられている⁷⁻⁹⁾（Fig. 2）。この様な生体還元活

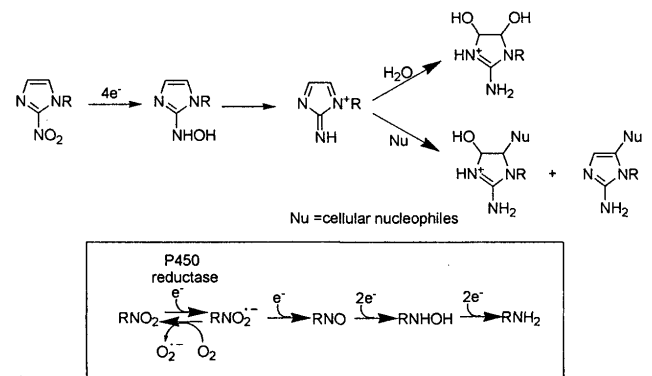


Fig.2 Proposed mechanisms of bioreductive activation and reaction of 2-nitroimidazole with cellular nucleophiles under hypoxic condition.

性化による低酸素親和性に着目して、フッ素化 misonidazole などの低酸素マーカーが PET イメージング剤として開発された¹⁰⁾。最近、生体還元を利用したより集積性の高い低酸素マーカーとして、銅錯体の Cu(II)-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)(Cu-ATSM) が注目されている^{11, 12)}。

ニトロ芳香化合物の以上のような特性を利用して、多くの電子親和性ニトロアゾール類が低酸素細胞放射線増感剤として開発された。この経緯の詳細は成書^{7, 13)}にゆずることとして、現在、臨床応用または臨床試験が実施されて

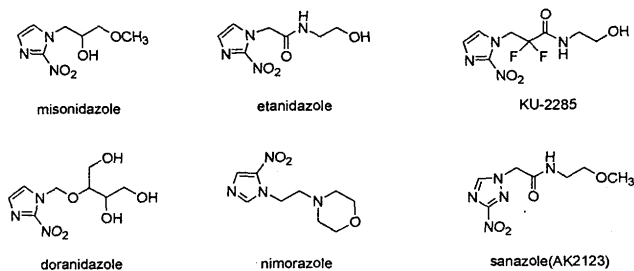


Fig. 3 Representative hypoxic cell radiosensitizers under clinical trials or clinical use.

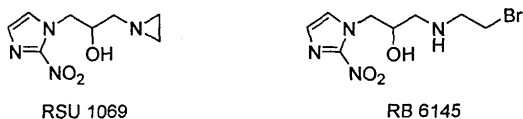
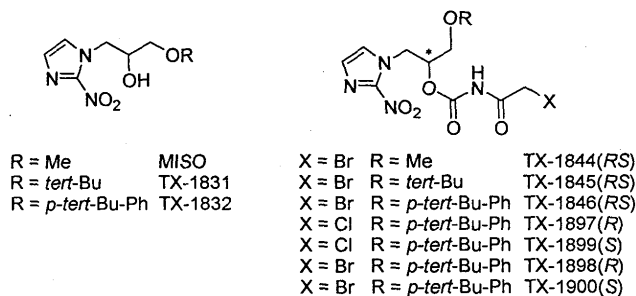


Fig. 4 Bifunctional hypoxic cell radiosensitizers having an alkylating moiety and their precursors or prodrugs.

いる化合物としては、2-nitroimidazole 誘導体の KU-2285、doranidazole¹⁴⁾、5-nitroimidazole 誘導体の nimorazole¹⁵⁾ と nitrotriazole 誘導体である sanazole^{3, 16)}がある (Fig. 3)。これらのうち nimorazole を除く 3 種までがわが国で開発された化合物であることは特筆に値する^{17, 18)}。残念ながら、初期に実施された misonidazole (MISO) と etanidazole の臨床応用が成功しなかったことから、低酸素放射線増感剤の効果について確たる評価が得られないまま今日にいたっているが、上記の臨床試験の結果に期待したい。

ニトロ芳香環は低酸素標的化ユニットとも考えられることから、我々は 2-nitroimidazole に、メルカプト基及びアミノ基などの生体内求核基のアクセプターである haloacetylcarbamoyl 基を導入した TX-1845、TX-1846 を分子設計した^{19, 20)} (Fig. 4)。これらは、低酸素条件下でニトロ芳香環が還元活性化されると、DNA や酵素にクロスリンクする bifunctional 増感剤と考えられる。このような bifunctional 化合物としては、側鎖に aziridine 基を導入した、RSU 1069 及びそのプロドラッグである RB 6145 が知られており、このようなアルキル化ユニットと連結することで放射線増感効果だけでなく、低酸素細胞毒性が増強されることが報告されている^{21, 22)}。haloacetylcarbamoyl 誘導体の生物活性を検討したところ、MISO の 100 倍以上の強い低酸素放射線増感効果及び低酸素細胞毒性の増強に加えて、鶏卵漿尿膜 (CAM) 法において血管新生阻害作用を示すことを見出した (Table 1)。これらの合成前駆体で

Table 1 Radiosensitizing effects and angiogenesis inhibition of bifunctional radiosensitizers

Radiosensitizer	Radiosensitization		Angiogenesis Inhibition (%)	
	$C_{1.6}$ (μ M) ^a		$(\mu$ g/CAM)	
TX-1844	20	80	(100)	50 (10)
TX-1845	7	100	(100)	80 (10)
TX-1846	3	100	(100)	60 (10)
MISO	1000	0	(100)	
TX-1831	700	20	(100)	
TX-1832	650	20	(100)	

a) Drug concentration required to achieve an enhancement ratio of 1.6.

Table 2 Angiogenesis inhibition and inhibition of porcine pancreatic elastase by chiral radiosensitizers

Chiral Radiosensitizer	Elastase Inhibition ^a		Angiogenesis Inhibition (%)	
	K_i (μ M) ^b		$(\mu$ g/CAM)	
TX-1987 (R)	30	64	(10)	
TX-1899 (S)	56	58	(10)	
TX-1898 (R)	9	93	(5)	
TX-1900 (S)	14	82	(5)	

a) Inhibition on porcine pancreatic elastase. b) Substrate: succinyl-Ala-Ala-Ala-pNA.

ある TX-1831、TX-1832 や MISO では低酸素放射線増感効果はみられるものの、血管新生阻害作用はほとんど見られなかったことから、haloacetylcarbamoyl 基と血管新生阻害作用との関連が示唆された。これらの化合物は不斉炭素を有することから、エナンチオマーで比較したところ、R 体の TX-1897 及び 1898 は、それぞれ対応する S 体の TX-1899 及び 1900 よりも強い血管新生阻害作用とエラストラーゼ阻害作用を示すことが明らかになった (Table 2)。血管新生阻害作用の詳細な機構は明らかではないが、MMP などのプロテアーゼ阻害を介している可能性が考えられる²⁰⁾。

側鎖に acetamide 基を有する KIN-806 に転移抑制及び免疫賦活作用が認められたことから、種々の acetamide 誘導体を合成したところ、KIN-806 より強い転移抑制効果と血管新生阻害効果及びマクロファージ浸潤促進効果など BRM としての作用を有する TX-1877 が得られた^{23, 24)} (Fig. 5)。興味深いことに、上記の BRM 作用との関連は不明であるが、TX-1877 は放射線と併用せずに単独でも *in vivo* 抗腫瘍作用を示した。一般的に低酸素細胞放射線増感剤の分子設計において、放射線増感ユニットである 2-nitroimidazole に対してその側鎖は、体内動態および毒性のコントロールを担うユニットと考えられる。我々は、低酸素標的化ユニットである 2-nitroimidazole の側鎖の

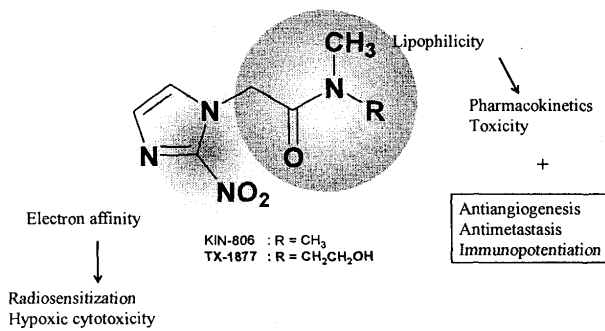


Fig. 5 Molecular design of cytostatic bifunctional radiosensitizer, TX-1877.

官能基化によって、腫瘍の低酸素ストレス応答反応に対する修飾機能（血管新生阻害作用、転移抑制作用）を付加し得ることを TX-1845、TX-1846 及び TX-1877 の開発によって示した。この様な効果は従来の DNA 障害性の cytotoxic 作用とは異なる、cytostatic 効果といえる。これは放射線による cytotoxic 作用を補い、予後の改善と QOL の向上をもたらし、ひいては癌治療効果を増強するものと期待される。

3. 癌の低酸素微小環境を標的とする hypoxic cytotoxin の分子設計

3.1. 癌の低酸素微小環境の特性とハイポキシアを標的とする癌治療法 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)は低酸素ストレスに応答して活性化される転写因子である。近年 HIF-1 を中心とする低酸素ストレス応答系の分子機構の解明が急速に進展している。HIF-1 は低酸素で誘導される α サブユニットと構成的に発現している β サブユニット (ARNT) からなるヘテロ二量体蛋白で、それぞれのサブユニットには basic-helix-loop-helix (bHLH) ドメインと PAS ドメインが存在する。HIF-1 の制御には prolyl hydroxylase (PHD) ^{25, 26)} によるプロリン水酸化が重要な役割を果たしている。PHD が酸素センサーとして酸素濃度の低下を認識して HIF-1 シグナル系に伝達するしくみが、近年明らかにされたことによって、酸素ホメオスタシスに関する研究は新たな潮流を迎えている²⁷⁾ (Fig. 6)。HIF-1 α は通常の酸素濃度下でも発現しているが、PHD によって酸素依存性分解 (ODD) ドメインにある特定のプロリン残基が水酸化されると、Von Hippel-Lindau (pVHL) タンパク質と結合し、ユビキチン化されてプロテアソーム分解系に導かれる。このためその寿命は 5 ~ 15 分程度と非常に代謝回転が速い。PHD は 2 価の鉄イオンを含む酵素で分子状の酸素を基質とするため実質的には細胞の酸素センサーのひとつ

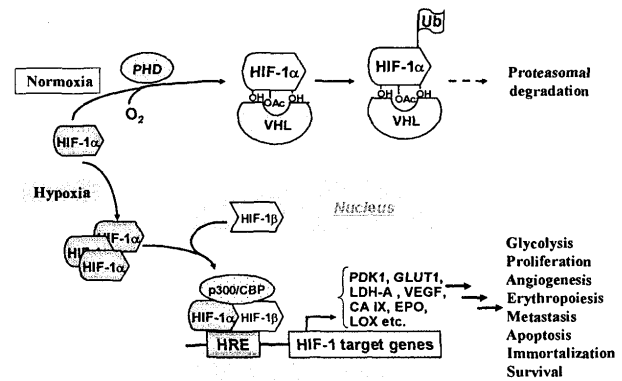


Fig. 6 Hypoxia mediated HIF-1 α regulation by proline hydroxylation. HIF-1 α is hydroxylated by prolyl hydroxylase (PHD) in the presence of O₂ and Fe²⁺, allowing it to be recognized by a protein-ubiquitin ligase complex containing von Hippel-Lindau tumour suppressor protein (pVHL), and leading to polyubiquitinated HIF-1 α degradation by the proteasome. In hypoxia, the activity of PHD is low because of O₂ depletion, which leads to HIF-1 α accumulation and translocation to the nucleus. There, HIF-1 α interacts with HIF-1 β to make a heterodimer complex that binds to hypoxia-response elements (HREs) within the promoters of target genes and recruits transcriptional co-activators such as p300/CBP for full transcriptional activity. The activation of the downstream hypoxia stress response genes completes the hypoxia adaptation.

つと考えられている。低酸素下では、PHD が不活化する結果、HIF-1 α が蓄積して核移行し、HIF-1 β とヘテロダイマーを形成して下流遺伝子のプロモーター領域に存在するハイポキシア応答エレメント (HRE) に結合する。さらに、コアクティベーターとして p300/CBP が結合し、下流の低酸素ストレス応答遺伝子群の転写活性化が起こる²⁸⁾。この際、PHD と同じく酸素を基質として働く FIH というアスパラギン水酸化酵素に、p300/CBP との結合領域のアスパラギン残基が水酸化されると結合が損なわれ、転写活性化が阻害されることも明らかになっている²⁹⁾。以上のように HIF-1 α は多くの翻訳後修飾を受けることで、その安定性や転写活性が制御されている。ハイポキシアで HIF-1 α によって誘導される遺伝子には、細胞増殖、血管新生、解糖系、エネルギー代謝、アポトーシス、不死化、転移などの多様な生物反応を制御するものが知られており、これらのハイポキシア応答蛋白質群の働きによって低酸素環境への適応が成立する。腫瘍細胞においては、これらのハイポキシア応答反応のうち生存に向かう応答（増殖、不死化、血管新生、転移など）が促進され、死に向かう応答（アポトーシスなど）は抑制されており、その結果腫瘍特異的な微小環境が構築されるものと考えられる^{6, 30)}。

冒頭に述べたように生体におけるハイポキシアは通常成体動物においては、固形腫瘍にのみ存在する特異的な環境と考えられる。今日の腫瘍特異性を志向した治療法開発の流れの中で、細胞のハイポキシア応答に関わるシグナル分子が癌治療の新たな標的分子として脚光を浴びている

31, 32)。そこで、これまで放射線及び化学療法剤による癌治療法の障害として問題視されてきた低酸素癌細胞の特性を逆に利用することで、腫瘍選択性の高い癌治療法を確立しようという発想の転換がなされた³³⁾。ハイポキシアを標的とする治療法としては、1)腫瘍の酸素分圧を高めて放射線療法と組み合わせる方法と、2)低酸素微小環境の特性(低酸素、低 pH、低グルコース、微小循環系の異常など)を利用するか、ハイポキシア応答系のシグナル分子を標的とする方法がある。前者には放射線治療における低酸素細胞克服のための研究成果として、既に臨床試験が検討・実施されているものも多い³⁴⁾。例えば高圧酸素療法³⁵⁾やこれに nicotinamide を併用する ARCON (accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide)³⁶⁾及び oxygen mimic として低酸素細胞増感剤を用いる方法¹³⁾などである。後者には、低酸素環境で生体還元を受けて活性化される prodrug (bioreductive drug) の開発とその自殺遺伝子治療 (gene-directed enzyme-prodrug therapy: GDEPT)^{37, 38)}への応用³⁹⁾、温熱療法、血管新生阻害療法、HIF-1 及び関連タンパク質の阻害、HRE 転写制御配列を利用する遺伝子治療などがある。

3.2. ハイポキシア応答系を阻害する hypoxic cytotoxin の分子設計
ハイポキシアを標的とする特異的癌治療薬の開発を行うためには、前節で述べたように低酸素、低栄養、低 pH という特徴を有する腫瘍の微小環境に到達し、そこで繰り返し広げられているハイポキシア応答反応を特異的に阻害する薬剤を分子設計する必要がある。この観点から、筆者は低酸素細胞放射線増感剤や hypoxic cytotoxin を有用なリードととらえ、これらの低酸素標的化分子に、ハイポキシアにおける生物応答修飾機能を付加することによって cytostatic な特異的癌治療薬を分子設計しようと試みた。

ニトロ芳香環が生体還元を受けると活性化して、hypoxic cytotoxin として働く機構について Fig. 2 に示したが、このように生体還元で活性化されるプロドラッグには、このほか quinone 及びヘテロ芳香族 N-oxide 類がよく知られている⁴⁰⁻⁴²⁾。ニトロ芳香環の還元を利用したプロドラッグに関しては、Denny らによって多くの試みがなされている^{37, 43)}。抗腫瘍物質として *Streptomyces lavendulae* から発見された mitomycin は quinone 構造と aziridine 基を持ち、2 電子還元されると活性種になって、DNA クロスリンカーとして作用する⁴⁴⁾。mitomycin は天然の生み出した生体還元活性化プロドラッグのプロトタイプであり、この発見以降、このような分子の開発が盛んに行われるようになった。また、quinone やニトロ芳香環 (trigger) とリンカーを介して細胞毒性ユニット (effector) を結合させたハイブリッド分子を設計し、低酸素環境で trigger が還元されることによって effector 分子として cyclophosphamide など

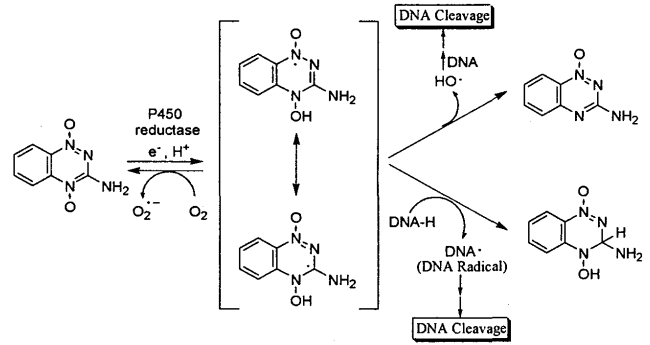


Fig. 7 Bioreductive activation of TPZ to damage DNA under hypoxic condition selectively.

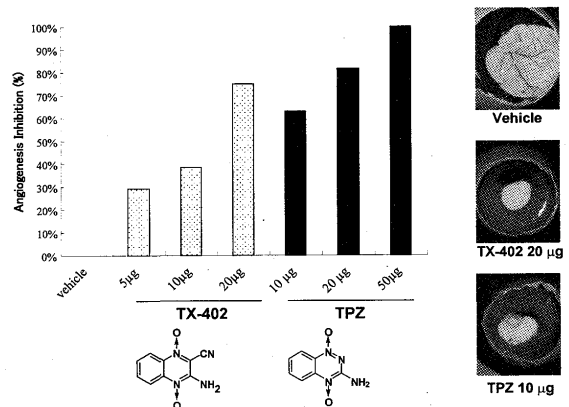


Fig. 8 Angiogenesis inhibition of hypoxic cytotoxins in CAM assay.

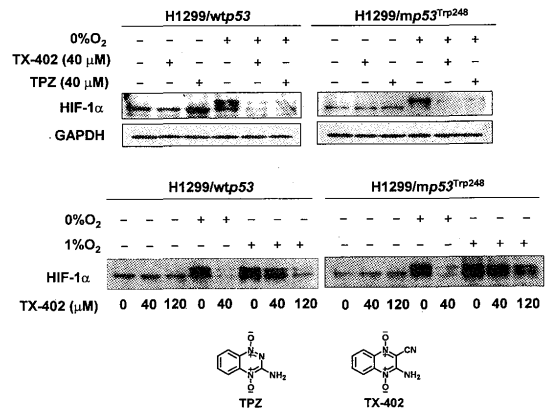


Fig. 9 Effects of TX-402 and TPZ on HIF-1α protein expression in H1299/wtp53 and H1299/mp53Trp248 cells under normoxic and hypoxic conditions. At 24 h after inoculation in glass petri dishes TX-402 and TPZ were added at a dose of 40 µM, and then hypoxic conditions were maintained with mixed gas (1 % or 0 % O₂, 5 % CO₂, and a balance of N₂) for 5 h.

の強いアルキル化剤を放出する低酸素標的化プロドラッグも多く開発されている^{45, 46)}。

現在、hypoxic cytotoxin のリーディング化合物は、N-oxide 構造を有する tirapazamine (TPZ)で、上記のニトロ芳香環類や quinone 類に比べて、低酸素選択性が格段に高

く、現在臨床試験が推進されている^{47, 48)}。TPZ は NADH-cytochrome P450 還元酵素による一電子還元で活性化され、ヒドロキシラジカルを発生して DNA 障害を与える (Fig.7)。酸素存在下に比べて低酸素下では 50-300 倍強い細胞毒性を発揮することが報告されている⁴⁹⁾。筆者らは、TPZ は低酸素及び常酸素下で有効濃度の違いはあるものの、いずれの条件でもアポトーシスを誘導し、この誘導は低酸素下では p53 非依存的、酸素条件では一部 p53 依存的であることを見出した。これに対して quinoxaline N-oxide である TX-402 は、このような常酸素条件下の細胞毒性がほとんどみられず、低酸素毒性は TPZ よりも強いことから、より優れた hypoxic cytotoxin であると考えられた⁵⁰⁾。さらに、これらのヘテロ芳香環 hypoxic cytotoxin 類は、低酸素条件下で HIF-1 α 抑制によるハイポキシアシグナル伝達経路を阻害し、CAM 法において 5 μ g/CAM の投与量で強い血管新生阻害作用を示した (Fig. 8)。TX-402 と TPZ は Fig. 9 に示すように、HIF-1 α タンパク質の発現を用量依存的に抑制し、Glut-1、Glut-3、VEGF の mRNA の誘導を抑制した⁵¹⁾。その強力な血管新生阻害効果は、HIF-1 α 経路の阻害による、VEGF の抑制に基づくものと予想された。そこで、現在 TX-402 をリード化合物として HIF-1 α 阻害活性に焦点をあてた分子設計を検討している。我々の目標は、低酸素特異的な細胞増殖抑制効果に加えて、血管新生阻害や転移抑制作用等の cytostatic 生物効果を備えた、新しい hypoxic cytotoxin を生み出すことである。

新しいプロドラッグアプローチとして、これらの hypoxic cytotoxin を自殺遺伝子と組み合わせた GDEPT 法が注目されている^{38, 52)}。この手法を用いれば、プロドラッグの活性化に必要な還元酵素遺伝子を低酸素条件下で選択的に強発現させることによって、不均一な腫瘍微小環境に於いても、生体還元活性化プロドラッグを効率的に殺細胞活性種に変換して、その濃度を安定的に高く保つことが可能である。低酸素環境で選択的に高い遺伝子発現を達成するために、HRE 配列を含む低酸素応答プロモーターの下流に目的蛋白質の遺伝子を融合させたベクターを設計することにより、HIF-1 経路を利用して遺伝子発現を制御する試みも行われている^{53, 54)}。

4. ハイポキシア指向性ハイブリッド型ボロンキャリアの分子設計

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は、¹⁰B 原子と熱中性子の原子核反応を直接利用した放射線治療法で、主として癌の中でも最も難治性な癌のひとつといわれる悪性脳腫瘍に用いられてきた。その原理は、あらかじめホウ素の安定同位体元素 ¹⁰B を取り込ませた腫瘍細胞にエネルギーの低い熱中性子を照射すると、核反応 ¹⁰B(n, α)⁷Li により細胞内で高 LET 放射線である α 粒子とリチウム核が発生する。

これらの粒子は、細胞の殺傷能力が非常に高く、しかも飛程が短い。(α 線、Li 核の飛程は各々約 9 μ m、4 μ m で、ほぼ細胞の大きさに等しい。) 従って、癌細胞に特異的に ¹⁰B を集積させられれば、周囲の正常組織をほとんど傷つけることなく、腫瘍細胞のみを選択的に破壊することが可能な理想的な癌治療法となる⁵⁵⁾。BNCT の臨床的有用性を高めるためには癌組織に選択的に取り込まれるボロンキャリアの開発が不可欠である。しかし現在臨床で使用されているボロンキャリアの sodium borocaptate (BSH)⁵⁶⁾ は親水性が非常に高いために、腫瘍への取り込み、中でも腫瘍内低酸素領域への取り込みが低いと考えられ、十分に BNCT の優位性が発揮されていない。

そこでこの問題を克服するために、筆者らはハイポキシア指向性ハイブリッド型ボロンキャリアを分子設計した。すなわち、ハイポキシア標的化のために上記の還元活性化ユニットを導入した。これらの分子は腫瘍の低酸素領域に送達され、X線や γ 線といった低 LET 放射線の増感効果もたらす。低酸素放射線増感剤の分子設計で述べたように、親電子性のニトロアゾール類は低酸素領域で oxygen mimic として作用し、酸化反応により放射線の障害を固定する。さらに還元代謝をうけると親電子反応剤となり、生体内の求核剤と結合して細胞障害を与え、かつ低酸素マーカーとなる。一方 hypoxic cytotoxin は低酸素領域で一電子還元によってヒドロキシラジカル等の活性種を発生し、低酸素細胞特異的に細胞障害を与える。両者はいずれも低酸素指向性の分子であるがその機構が異なっている。これらを haloacetylcarbamoyl 化して、ボロンクラスターである BSH と結合させて、種々の 2-nitroimidazole-BSH あるは hypoxic cytotoxin-BSH ハイブリッドを合成した。このように疎水性リンカーを介して親水性ボロンクラスターと低酸素標的化ユニットを結合させることで、腫瘍への取り込みを向上させるとともに、低酸素特異的な細胞毒性効果も併せ持つことが期待される (Fig. 10)。

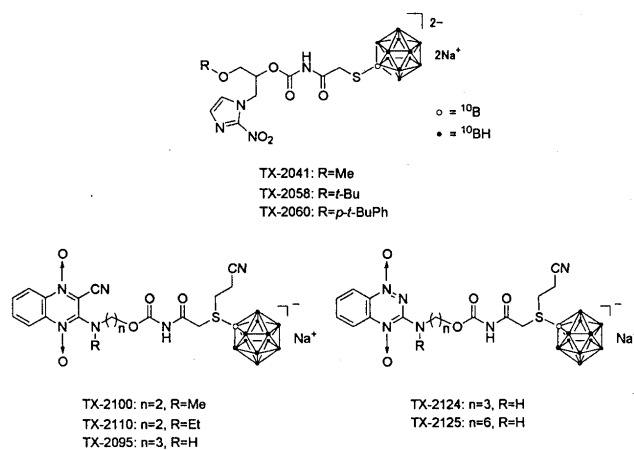


Fig. 10 Structures of hypoxia-targeting hybrid-type boron carriers.

体内動態について検討するため、担癌マウスモデルに各種ボロンキャリア化合物を腹腔内投与し、腫瘍、筋肉、肝臓及び血中の ^{10}B 濃度を測定した。各種 2-nitroimidazole-BSH 誘導体のうち TX-2060 は、腫瘍内 ^{10}B 濃度が最も高かった。また、BSH が投与 30 分後から腫瘍内濃度が低下し続けるのに対して、ハイブリッド体はいずれも徐々に濃度が増加し、TX-2060 は 120 分後でも 10 ppm 以上の腫瘍内濃度を維持していた。そこでこの化合物を投与したマウスに中性子線及び γ 線を照射して、*in vivo* 増感効果を調べたところ、 γ 線に対しては BSH では全く増感効果は認められないが、TX-2060 では強い増感効果が認められた (Fig. 11)。中性子線においては BSH とほぼ同等の増感効果を示した。このとき、増永らが開発した固形腫瘍内の休止期 (Q) 細胞と増殖期 (P) 細胞の放射線感受性を選択的に検出する方法⁵⁷⁾を用いて解析したところ、TX-2060 の中性子線増感率は全細胞分画のみならず、Q 細胞において BSH よりも有意に高かった。このことは、ハイブリッド型ボロンキャリア TX-2060 が、Q 細胞が多く存在すると予想される低酸素領域にも BSH より効率的に送達されていることを示唆する⁵⁸⁾。次に hypoxic cytotoxin-BSH 誘導体について同様の検討を行った。各種誘導体のうち TX-2100 が最も優れた体内動態を示した。すなわち腫瘍内 ^{10}B 濃度は投与後 120 分まで徐々に増加し、20 ppm 以上を維持した。BSH (29 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$) では投与後約 30 分、TX-2100 (15 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$) では約 60 分後に腫瘍内濃度が約 30 ppm になるタイミングで中性子線を照射して比較したところ、同じ ^{10}B 濃度でも TX-2100 の方が有意に高い増感効果を示した。このことは、TX-2100 が BSH では送達しづらい低酸素領域にも分布していることを示唆する。実際 γ 線増感を比較すると、TX-2100 は Q 細胞に対して、強い増感効果を示したことから、低酸素領域に送達されていることが示唆された⁵⁹⁾。以上の結果から、低酸素指向性ハイブリッド型ボロンキャリアは、低酸素腫瘍細胞への有効な送達を達成し、中性子線増感作用を発揮することが明らかになった。今後さらにこの分子設計戦略に基づいて、臨床適用可能なボロンキャリアの創製を目指したい。

5. 結論

1955 年に Thomlinson と Gray によって、固形腫瘍内に低酸素細胞の存在が示唆されてから半世紀以上の歳月を数える⁶⁰⁾。この間、低酸素細胞なるものに関する研究は、放射線感受性と酸素効果の観点から精力的に行われてきたものの、遺伝子レベルでの成果は 1995 年に Semenza と Wang による HIF-1 α の発見を待たねばならなかった⁶¹⁾。この成果が腫瘍学にもたらしたインパクトは非常に大きい。現在、ハイポキシアは、癌の増殖・分化を制御する主要な因子として注目され、一部紹介したように、その分子機構

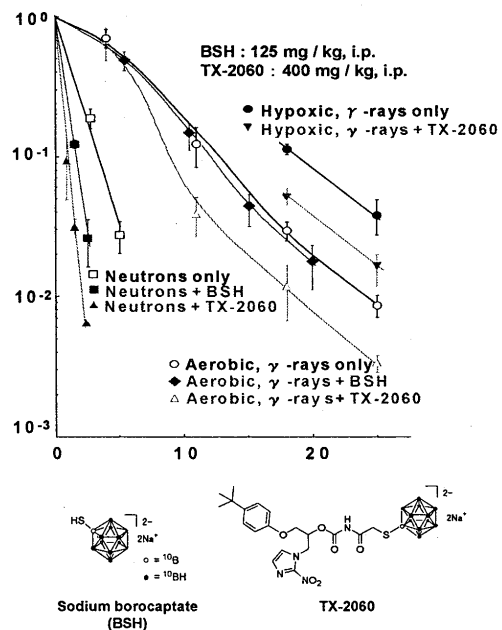


Fig. 11 *In vivo* radiosensitizing effects of TX-2060 and BSH with neutron or γ -ray irradiation under aerobic or hypoxic conditions.

に関する研究成果が次々と報告されて、細胞の低酸素ストレス応答機構の解明が、急速に進展している。今後も、これらの研究から新たな創薬ターゲットが明らかにされると予想されることから、非常に注目される。

本総説では、近年のハイポキシア研究における成果の紹介を交えながら、我々の低酸素細胞放射線増感剤および hypoxic cytotoxin の分子設計を中心に、ハイポキシアを標的とする癌治療薬開発の可能性について論述した。残念ながら低酸素細胞放射線増感剤に関しては、非常に多くの科学者の研究努力にもかかわらず、現在もなお臨床応用には至っていない。しかし、世界に目を向けると、先に紹介した 5-nitroimidazole 誘導体である nimorazole が現在、デンマークにおける頭頸部腫瘍患者に対する標準的治療法に組み入れられていることが Lambin たちの 2002 年の総説⁶²⁾で紹介されている。この臨床応用⁴⁾はオーフス大学病院 (Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark) の腫瘍学者 Jens Overgaard 博士らの長年にわたる努力の賜物である。さらに冒頭でも述べたように、ハイポキシアに関する研究は、今日では、放射線生物学・放射線医学の領域を超えて、癌研究者のみならず科学の様々な分野から取り込まれている。今後はこれらの成果が結集され、酸素センシングという地球上の生命体の基本命題が解き明かされていくことであろう。筆者も創薬化学者の立場から、新たな機能性分子を創製して、その一隅を照らし出すような研究を目指していきたい。

6. 謝 辞

本研究は徳島大学工学部生物工学科堀 均研究室に於いて行われました。終始変わらぬご指導ご鞭撻を賜った堀均教授と努力を惜しまず実験した学生諸君に心より感謝いたします。HIF-1 α の解析実験、細胞工学実験のご指導を賜った Johns Hopkins 大学医学部 Gregg Semenza 博士、放射線増感に関する実験を実施していただいた共同研究者の京都大学原子炉実験所 増永慎一郎博士に深謝いたします。尚、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金 (No. 1437058, No. 14580611, No. 15790671, No. 16659031) によって行われました。

7. 参考文献

- Okuyama, S.; Mishina, H., In *Evolution of Cancer*; University of Tokyo Press: Tokyo, 1990; Vol. Section I Chap. 6, pp. 88.
- Masunaga, S.; Uto, Y.; Nagasawa, H.; Hori, H.; Nagata, K.; Suzuki, M.; Kinashi, Y.; Ono, K., *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 1261.
- Sugie, C.; Shibamoto, Y.; Ito, M.; Ogino, H.; Suzuki, H.; Uto, Y.; Nagasawa, H.; Hori, H., *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **2005**, *46*, 453.
- Overgaard, J.; Eriksen, J. G.; Nordmark, M.; Alsner, J.; Horsman, M. R., *Lancet Oncol.* **2005**, *6*, 757.
- Hockel, M.; Vaupel, P., *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 266.
- Cairns, R.; Papandreou, I.; Denko, N., *Mol. Cancer Res.* **2006**, *4*, 61.
- Hori, H.; Nagasawa, H.; Terada, H., In *Environmental Oxidants*; Nriagu, O., Simmons, M. S., Eds.; John Wiley & Sons, Inc: New York, 1994, pp. 425.
- Bolton, J. L.; McClelland, R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8172.
- Hodgkiss, R. J., *Anticancer Drug Des.* **1998**, *13*, 687.
- Padhani, A., *Cancer Imaging* **2006**, *6*, S117.
- Fujibayashi, Y.; Taniuchi, H.; Yonekura, Y.; Ohtani, H.; Konishi, J.; Yokoyama, A., *J. Nucl. Med.* **1997**, *38*, 1155.
- Matsumoto, K.; Szajek, L.; Krishna, M. C.; Cook, J. A.; Seidel, J.; Grimes, K.; Carson, J.; Sowers, A. L.; English, S.; Green, M. V.; Bacharach, S. L.; Eckelman, W. C.; Mitchell, J. B., *Int. J. Oncol.* **2007**, *30*, 873.
- Weinmann, M.; Welz, S.; Bamberg, M., *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2003**, *3*, 364.
- Shibamoto, Y.; Oya, N.; Kokubo, M.; Hiraoka, M.; Doi, R.; Tsujitani, M., *Progress in Radio-Oncology VII, Proceedings of the International Meeting on Progress in Radio-Oncology, 7th, Salzburg, Austria, 15-19 May 2002*; pp. 333.
- Overgaard, J.; Alsner, J.; Eriksen, J.; Horsman, M. R.; Grau, C., *Rays* **2000**, *25*, 313.
- Dobrowsky, W.; Huigol, N. G.; Jayatilake, R. S.; Kizilbash, N. I.; Okkan, S.; Kagiya, V. T.; Tatsuzaki, H., *Radiother Oncol.* **2007**, *82*, 24.
- 芝本雄太, *癌と化学療法* **1998**, *26*, 1242.
- Shibamoto, Y.; Sugie, C.; Ito, M.; Ogino, H., *Expert Opin. Pharmacother* **2004**, *5*, 2459.
- Hori, H.; Jin, C. Z.; Kiyono, M.; Kasai, S.; Shimamura, M.; Inayama, S., *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 591.
- Jin, C. Z.; Nagasawa, H.; Shimamura, M.; Uto, Y.; Inayama, S.; Takeuchi, Y.; Kirk, K. L.; Hori, H., *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4917.
- Adams, G. E.; Ahmed, I.; Sheldon, P. W.; Stratford, I. J., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1984**, *10*, 1653.
- Bremner, J. C., *Cancer Metastasis Rev.* **1993**, *12*, 177.
- Kasai, S.; Nagasawa, H.; Kuwasaka, H.; Oshodani, T.; Nishioka, A.; Ogawa, Y.; Yoshida, S.; Inayama, S.; Inomata, T.; Hori, H., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1998**, *42*, 799.
- Kasai, S.; Nagasawa, H.; Yamashita, M.; Masui, M.; Kuwasaka, H.; Oshodani, T.; Uto, Y.; Inomata, T.; Oka, S.; Inayama, S.; Hori, H., *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 453.
- Zhu, H.; Bunn, H. F., *Science* **2001**, *292*, 449.
- Bruick, R. K.; McKnight, S. L., *Science* **2002**, *295*, 807.
- Dayan, F.; Roux, D.; Brahimi-Horn, M. C.; Pouyssegur, J.; Mazure, N. M., *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3688.
- Semenza, G. L., *Physiology (Bethesda)* **2004**, *19*, 176.
- Lando, D.; Peet, D. J.; Whelan, D. A.; Gorman, J. J.; Whitelaw, M. L., *Science* **2002**, *295*, 858.
- Harris, A. L., *Nature Rev. Cancer* **2002**, *2*, 38.
- Welsh, S. J.; Koh, M. Y.; Powis, G., *Semin. Oncol.* **2006**, *33*, 486.
- Semenza, G. L., *Expert Opin. Ther. Targets* **2006**, *10*, 267.
- Brown, J. M., *Mol. Med. Today* **2000**, *6*, 157.
- Corry, J.; Rischin, D., *Semin. Oncol.* **2004**, *31*, 802.
- Daruwalla, J.; Christophi, C., *World J. Surg.* **2006**, *30*, 2112.
- Kaanders, J. H.; Bussink, J.; van der Kogel, A. J., *Semin. Radiat. Oncol.* **2004**, *14*, 233.
- Atwell, G. J.; Yang, S.; Pruijn, F. B.; Pullen, S. M.; Hogg, A.; Patterson, A. V.; Wilson, W. R.; Denny, W. A., *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1197.
- Portsmouth, D.; Hlavaty, J.; Renner, M., *Mol. Aspects Med.* **2007**, *28*, 4.
- Horsman, M. R.; Bohm, L.; Margison, G. P.; Milas, L.; Rosier, J. F.; Safrany, G.; Selzer, E.; Verheij, M.; Hendry, J. H., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2006**, *64*, 551.
- Ceretto, H.; Gonzalez, M., *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 219.
- Denny, W. A., *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 577.
- Denny, W. A., *Cancer Invest.* **2004**, *22*, 604.
- Hay, M. P.; Wilson, W. R.; Denny, W. A., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 4043.
- Cummings, J.; Spanswick, V. J.; Tomasz, M.; Smyth, J. F., *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 405.
- Naughton, D. P., *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, *53*, 229.
- Jaffar, M.; Abou-Zeid, N.; Bai, L.; Mrema, I.; Robinson, I.; Tanner, R.; Stratford, I. J., *Curr. Drug Deliv.* **2004**, *1*, 345.
- Cohen, E. E.; Rosine, D.; Haraf, D. J.; Loh, E.; Shen, L.; Lusinch, A.; Vokes, E. E.; Bourhis, J., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2007**, *67*, 678.
- Bayes, M.; Rabasseda, X.; Prous, J. R., *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2007**, *29*, 53.
- Zeman, E. M.; Baker, M. A.; Lemmon, M. J.; Pearson, C. I.; Adams, J. A.; Brown, J. M.; Lee, W. W.; Tracy, M., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1989**, *16*, 977.
- Nagasawa, H.; Yamashita, M.; Mikamo, N.; Shimamura, M.; Oka, S.; Uto, Y.; Hori, H., *Comp. Biochem. Physiol. A.Mol. Integr. Physiol.* **2002**, *132*, 33.
- Nagasawa, H.; Mikamo, N.; Nakajima, Y.; Matsumoto, H.; Uto, Y.; Hori, H., *Anticancer Res.* **2003**, *23*, 4427.
- Yakkundi, A.; McErlane, V.; Murray, M.; McCarthy, H. O.; Ward, C.; Hughes, C. M.; Patterson, L. H.; Hirst, D. G.; McKeown, S. R.; Robson, T., *Cancer Gene. Ther.* **2006**, *13*, 598.

-
- 53) Patterson, A. V.; Williams, K. J.; Cowen, R. L.; Jaffar, M.; Telfer, B. A.; Saunders, M.; Airley, R.; Honess, D.; Van Der Kogel, A. J.; Wolf, C. R.; Stratford, I. J., *Gene Ther.* **2002**, *9*, 946.
 - 54) Cowen, R. L.; Williams, K. J.; Chinje, E. C.; Jaffar, M.; Sheppard, F. C.; Telfer, B. A.; Wind, N. S.; Stratford, I. J., *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1396.
 - 55) Coderre, J. A.; Morris, G. M., *Radiat. Res.* **1999**, *151*, 1.
 - 56) Soloway, A. H.; Hatanaka, H.; Davis, M. A., *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 714.
 - 57) Masunaga, S.; Ono, K., *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **2002**, *43*, 11.
 - 58) Masunaga, S.; Nagasawa, H.; Hiraoka, M.; Sakurai, Y.; Uto, Y.; Hori, H.; Nagata, K.; Suzuki, M.; Maruhashi, A.; Kinashi, Y.; Ono, K., *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 2975.
 - 59) Masunaga, S.; Nagasawa, H.; Gotoh, K.; Sakurai, Y.; Uto, Y.; Hori, H.; Nagata, K.; Suzuki, M.; Maruhashi, A.; Kinashi, Y.; Ono, K., *Radiat. Med.* **2006**, *24*, 98.
 - 60) Thomlinson, R. H.; Gray, L. H., *Br. J. Cancer* **1955**, *9*, 539.
 - 61) Wang, G. L.; Jiang, B.-H.; Rue, E. A.; Semenza, G. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5510.
 - 62) Wouters, B. G.; Wepler, S. A.; Koritzinsky, M.; Landuyt, W.; Nuyts, S.; Theys, J.; Chiu, R. K.; Lambin, P., *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 240.