

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2022

課題番号：16K07186

研究課題名(和文) ナフトピジルを基盤とした新規悪性中皮腫治療薬の創製と作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Discovery of a novel naftopidil-based therapeutic agent for malignant mesothelioma and mechanism of action

研究代表者

清水 忠 (Tadashi, Shimizu)

兵庫医科大学・薬学部・教授

研究者番号：40509022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナフトピジルを基盤とした抗がん作用を有する新規誘導体の探索合成または代謝物の新規抗がん作用を研究を展開したが、悪性中皮腫に対して顕著な抗がん作用を有する誘導体の創出はできなかった。しかし、研究を進める中でナフトピジルの代謝物の1つであるHUHS190が、膀胱がんに対して細胞レベルで有効な作用を有することを見出し、in vivo実験に用いるための大量合成ルートを確立した。さらに、薬物動態プロファイルの検討およびマウスin vivoモデルにおける有効性を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、当初に目的としていた中皮腫の治療薬創製はできなかったが、ナフトピジル代謝物が膀胱がんにも有効であることを薬物動態および薬理学的な動物モデルで示すことができた。ナフトピジル代謝物は臨床での安全性が明らかとなっている化合物であることから、本化合物をドラッグリポジショニングすることにより、新たな膀胱がん治療薬として開発できる可能性がある。さらに、本研究により医薬品代謝物に焦点を当てた新規治療薬を創製できる研究展開を示すことが出来たと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed research on the discovery and synthesis of new derivatives with anticancer activity based on naftopidil or new anticancer activity of its metabolites, but were unable to create a derivative with significant anticancer activity against malignant mesothelioma. However, in the course of our research, we found that HUHS190, one of the metabolites of naftopidil, has an effective action against bladder cancer at the cellular level, and established a route for mass synthesis for use in in vivo experiments. In addition, we investigated the pharmacokinetic profile of HUHS190 and its efficacy in a mouse in vivo model of bladder cancer.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：ナフトピジル 中皮腫 探索合成 代謝物 膀胱がん 薬物動態 in vivo評価

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は、胸腔内に発生する悪性腫瘍の一つであり、アスベスト吸引が主な原因とされている。アスベスト使用は2005年までには事実上の使用禁止となったものの、国内では建材などに広く使われていたことから、潜在的な発症リスク患者は多い。さらに、曝露から発症までには数十年を有することから、2030年頃が発症のピークとなるものと見積もられており、その対策が急がれている。悪性胸膜中皮腫は、診断が難しいこともあり、発見時には既に進行している症例が多い。しかも、NCCNの2014年のガイドラインにおいて、シスプラチンとペメトレキセドを使用する多剤併用が唯一の適用となっていることから分かるように、有効な治療薬開拓が強く求められている。

ナフトピジルは我が国において前立腺肥大患者に多用されるα遮断薬の一つであるが、山田(東大医)らの疫学調査の結果、他のα遮断薬服用患者では一定確率で前立腺肥大から前立腺癌に進行する中、唯一ナフトピジル服用患者での前立腺がん発症確率が低いことが発表され注目されている医薬品である(J. Urol. 2013, 20, 1220)。また、ナフトピジルの培養細胞レベルの抗がん活性は2008年に三重大大学の杉村らにより確認され、ナフトピジルにそのものに抗がん活性があることも報告されている(Int. J. Cancer 2008, 122, 444.)。

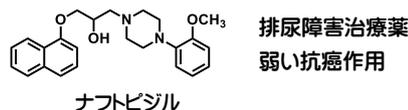


図1: ナフトピジルの構造

申請者らは、ナフトピジルが、100 μM程度で悪性中皮腫細胞増殖においても増殖阻害活性を有していることを見出していた。さらに、オリジナルシード化合物 HUHS1015 が、30 μM程度で増殖抑制活性を示し、ナフトピジル以上の癌細胞増殖抑制効果を有することを見出していた(Pharmacology 2013, 91, 339)。HUHS1015は、ナフトピジルのピペラジン構造を開環したシンプルな誘導体であるが、構造的な問題点として化学的に不安定で分解しやすい問題が生じていた。化学的に不安定な点は、臨床応用を目指す上で必要となる *in vivo* での薬物動態や安全性の検討を行う上で大きな障壁となることが懸念された。

2. 研究の目的

そこで本研究では、化学的に安定なピペラジン構造を残したままで、抗がん活性を有する化合物の探索合成を行い、*in vitro* 抗癌活性を測定し、強力な悪性中皮腫の増殖抑制活性をもつ新規抗がん剤を見出すために下記の4点について検討を行うこととした。

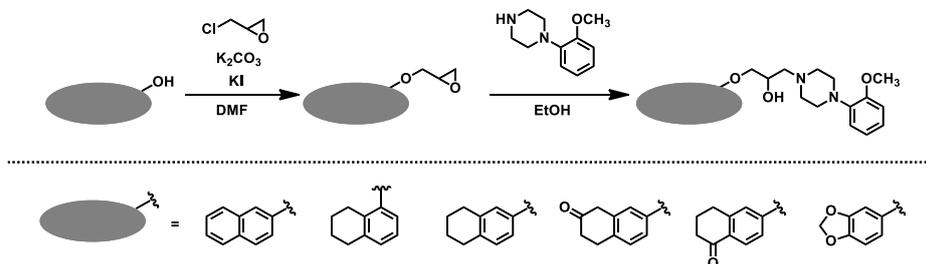


図2: 合成した2環性部位変換体

1) ナフトピジル誘導体に関する抗悪性中皮腫作用に関する探索合成

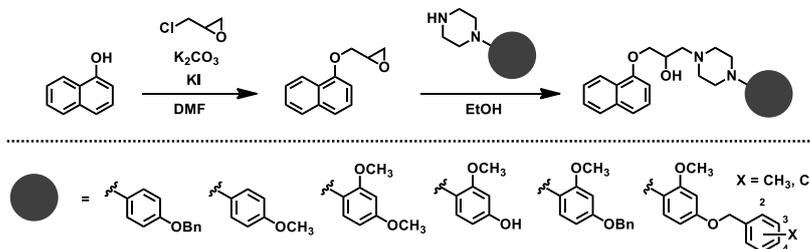


図3: 合成したベンゼン環部位変換体

2) *in vivo* 評価に必要な高純度サンプル合成ルート

を確立する(～数十gスケール)。

3) 高活性化合物に関する網羅的な薬物動態試験を行い、経口吸収性、体内安定性などを評価する。このとき、必要に応じ塩検討も行う。

4) マウスを *Xenograft* モデルによる *in vivo* における抗癌活性評価を行う。

3. 研究の方法

1) ナフトピジル誘導体に関する抗悪性中皮腫作用を有する誘導体の探索合成

予備検討で構築済みであることから確立した合成ルートに従い、二環性部位およびベンゼン環部位を種々変換した誘導体を合成した(図2,3)

2) 細胞評価

各がん細胞は、10%FBS を添加した RPMI1640 または D-MEM 中で培養した。細胞は、5%の CO₂ を含む加湿雰囲気中、37°C で培養した。細胞は、96 ウェルプレートに 1000 細胞/ウェルで播種した。化合物は DMF で最終濃度 5~50 μM になるように添加した (0.1 % DMF)。48 時間後、MTT 法を用いて、各化合物の阻害率および 50%阻害濃度を算出した。

3) 高活性誘導体の大量合成ルートの確立

探索合成を行った誘導体のうち、ナフトピジル既知代謝物 (HUHS190) に着目し、高次評価用の大量合成ルートの確立を行った。

4) ナフトピジル既知代謝物の血中濃度測定

雄性 SD ラットを薬剤の経口投与前に 18 時間絶食させた。0.5%メチルセルロース (MC) 中に HUHS190 またはナフトピジルを 32mg/kg 投与後、15 分、30 分、1 時間、2 時間または 6 時間後に、麻酔下で腹部静脈からヘパリンで血液を採取した。その後、4°C で遠心分離により血清を分離し、分析まで -35°C で保存した。各サンプルの濃度は、HPLC により測定した。

5) ナフトピジル既知代謝物の in vivo モデル評価

雌 C57BL/6 マウスの in vivo がんモデルを確立した。その後、生理食塩水 100 μL、2.025 mg/mL BCG、1 mg/mL ピラルビシン、または 50 mg/mL HUHS190 を 10%DMSO 入り生理食塩水でサーフロ F&F 24G x3/4 カテーテルにて膀胱内注入し 2 時間維持した。化合物投与後のマウスの腹部は縫合した。マウスを化合物で 2 時間処理した後、カテーテルを外し、0.75mg/kg の atipamezole を皮下注射し、マウスを覚醒させた。マウスは健康状態を注意深く観察した。手術後 5 日以内に死亡したマウスは、麻酔、傷、感染症で死亡したと考えられるため除外した。実験終了後、マウスの剖検を行い、膀胱癌の検証を行った。

4. 研究成果

1) ナフトピジル誘導体に関する悪性中皮腫作用に関する探索合成と細胞評価

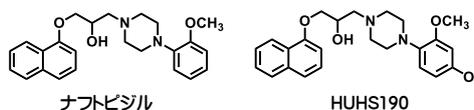
図 2,3 に示す合成誘導体の細胞増殖抑制活性評価を行った。しかしながら、ほとんどの誘導体は、有効な活性を示さなかった

(IC₅₀ > 50 μM)。しかしながら、合成した誘導体を他のがん細胞に適用したところ、膠芽腫細胞に新規誘導体 HUHS1022 と 2009 (IC₅₀ < 20 μM) が効果を示した。さらに、フェニルの 4 位にヒドロキシルを導入した既知代謝物 (HUHS190) が、前立腺がんおよび膀胱がん細胞の増殖に対してより強力な阻害作用を示し、

IC₅₀ 値は 11~24 μM となった。一方、正常細胞に対してはほとんど阻害作用を示さず、ナフトピジルに比べて毒性回避の観点から選択性が優れていると考えられた。(表 1)。さらに、HUHS190 はナフトピジルよりも親水性が高く、生理食塩水で 100 μM 以上の高濃度溶液を調製することが示された。この性質を考慮すると膀胱内注入薬として適切であるものと考えられた。

表1:細胞評価結果

NO.	Normal cells (IC ₅₀)		Cancer cells (IC ₅₀)				
	HEK293	PNT1A	PC3	DU145	KK47	T24	786-O
Naftopidil	47 μM	27 μM	31 μM	21 μM	19 μM	19 μM	13 μM
HUHS190	>50 μM	>50 μM	24 μM	17 μM	12 μM	11 μM	11 μM



2) HUHS190 の大量合成ルートの確立

1) の結果を踏まえて、高次評価を行うための化合物供給を可能とする HUHS190 の大量合成ルートの確立を行った。

基本的には探索合成ルートと踏襲し、各ステップの再検討を行った。最終的には、探索合成ルートの全工程で行っていたカラム精製を、大量合成ルートでは 1 回のみとした

ルートを確認し、目的物を 19.1 g 得た (図 4)。

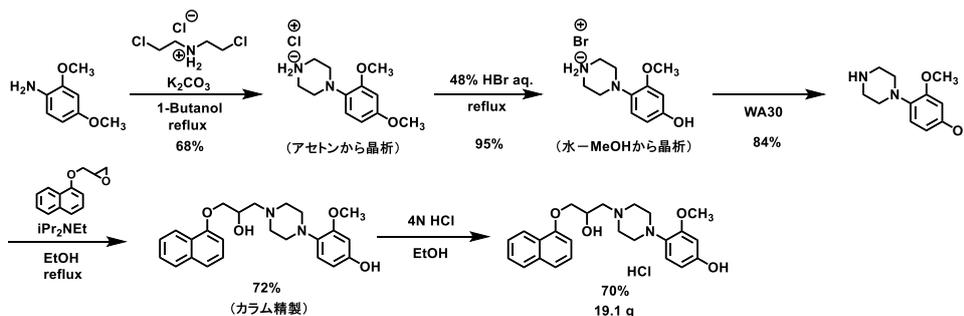


図4: 確立した大量合成ルート

3) ナフトピジルおよび HUHS190 の薬物動態試験

ラットに 32 mg/kg を経口投与した後の HUHS190 の血中濃度を経口薬として臨床で用いられているナフトピジルと比較した。その結果、両化合物とも速やかに吸収され、経口投与 15 分後の最高血中濃度 (C_{max}) が、397 ng/mL (HUHS190), 110 ng/mL (ナフトピジル) となった。また、6 時間後の AUC 値 (AUC_{0-6}) もほぼ同じであり、HUHS190 は経口薬としてだけでなく、膀胱内注入薬としても利用可能であることが示された (図 5)。

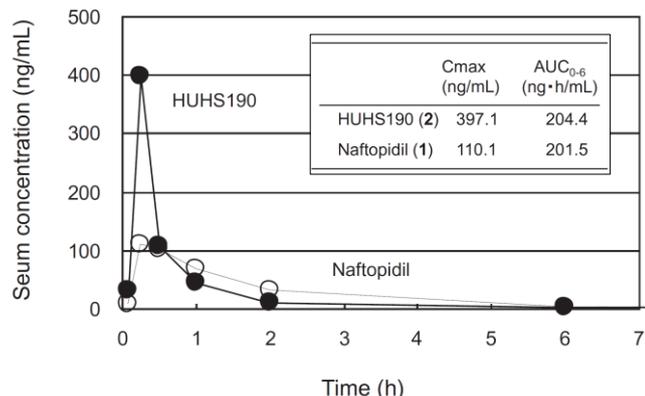


図5: ナフトピジルおよびHUHS190の薬物動態試験

4) HUHS190 の in vivo における効果

C57BL/6 マウス由来の MB49 細胞を開腹後、注射針で C57BL/6 マウスの膀胱平滑筋層に少量ずつ注入する同種膀胱癌モデルを最終的に構築した。臨床薬である BCG (2 mg/mL) とピラルビシン (1 mg/mL) を比較対象として、HUHS190 (50 mg/mL) の in vivo での効果を測定した。各化合物を静脈内投与し、2 時間維持した。生理食塩水またはピラルビシンを投与したマウスは、徐々に死亡し、28 日後には 70~80% が死亡した。BCG を投与したマウスは、25 日以内はコントロールマウスより生存率が高かったが、その後はほぼ同じ割合で死亡した。BCG を投与したマウスは、25 日までは生理食塩水群よりも生存率が高かったが、その後は生理食塩水とほぼ同じ割合で死亡した。一方、HUHS190 で処理したマウスは、死亡率が緩やかで、最終日 (28 日) においても 30% しか死亡しなかった。HUHS190 の投与量は、BCG やピラルビシンに比べて多いものの、明確な毒性が示されなかったことから、臨床薬として開発できる可能性を示した (図 6)。

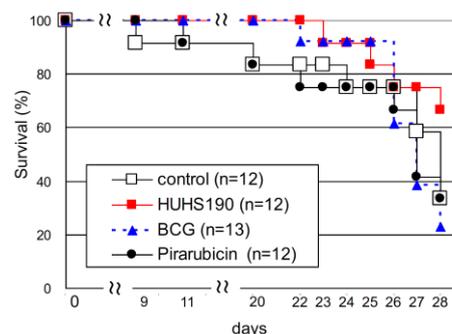


図6: HUHS190のin vivoにおける効果

5) 合成誘導体の中皮腫細胞に対する臨床薬との相乗効果

中皮腫に対する戦略として、単剤でのアプローチではなく臨床薬との併用効果について検討を行うこととした。これまでに合成した誘導体から、単剤では効果が弱いものの臨床薬の作用を増強する相乗効果を有する化合物の探索も進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 K. Dodo, E*. Kuboki*, T Shimizu* (*equally contributed first author), R. Imamura, M. Magarisawa, M. Takahashi, T. Tokuhiko, S. Yasumoto, K. Asano, S. Nakao, N. Terayama, T.Suda, M. Tanaka, M. Sodeoka.	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a Water-Soluble Indolylmaleimide Derivative IM-93 Showing Dual Inhibition of Ferroptosis and NETosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 1272-1278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.9b00142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 T. Shimizu, K. Yamaguchi, M Yamamoto, R. Kurioka, Y. Kino, W. Matsunaga, S. Nakao, H.Fukuhara, A. Tanaka, A. Gotoh, M. Mabuchi	4. 巻 30
2. 論文標題 Identification of HUHS190, a human naftopidil metabolite, as a novel anti-bladder cancer drug	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 126744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.126744.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mabuchi M, Ueda M, Yoshida Y, Horiike K, Yamaoka K, Nakao S, Shimizu T, Ueda Y, Tsujikawa K, Tanaka A	4. 巻 37
2. 論文標題 Systematic Trial for Evaluating Docetaxel in a Human Prostate Cancer Cell DU145 Xenograft Model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1665-1676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.11496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakao S, Mabuchi M, Wang S, Kogure Y, Shimizu T, Noguchi K, Tanaka A, Dai Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Synthesis of resveratrol derivatives as new analgesic drugs through desensitization of the TRPA1 receptor.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 3167-3172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2017.05.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda M, Shimizu T, Mabuchi M, Horiike K, Kitae K, Hase H, Ueda Y, Tsujikawa K, Tanaka A	4. 巻 38
2. 論文標題 Novel Metabolically Stable PCA-1/ALKBH3 Inhibitor Has Potent Antiproliferative Effects on DU145 Cells In Vivo.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 211-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dodo K, Shimizu T, Sasamori J, Aihara K, Terayama N, Nakao S, Iuchi K, Takahashi M, Sodeoka M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Indolylmaleimide Derivative IM-17 Shows Cardioprotective Effects in Ischemia-Reperfusion Injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 182-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.7b00454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Nishizaki, A. Gotoh, T. Shimizu, A. Tanaka	4. 巻 6
2. 論文標題 The phosphatidylethanolamine derivative diDCP-LA-PE mimics intracellular insulin signaling.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 e27267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep27267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 K. Dodo, K. Hayamizu, T. Shimizu, M. Sodeoka	4. 巻 64
2. 論文標題 Structure-Activity Relationship Study of 3-Amino-2-indolyl lactam Derivatives: Development of Inhibitors of Oxidative Stress-Induced Necrosis.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 886-898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c16-00259.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 忠
2. 発表標題 「臨床応用」を志向した創薬研究～大学発の創薬を目指して～
3. 学会等名 第2回近畿薬学シンポジウム・化学系の若い力（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔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	長屋 寿雄 (NAGAYA HISAO) (60464343)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	削除：2017年3月7日
研究分担者	大野 喜也 (OHNO YOSHIYZ) (40509155)	兵庫医科大学・薬学部・准教授 (34519)	追加：2017年3月7日

	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
連携研究者	所 美雪 (TOKORO MIYUKI) (60714897)	兵庫医科大学・薬学部・助教 (34519)	
連携研究者	中尾 周平 (NAKAO SHUHEI) (90868605)	兵庫医科大学・薬学部・助教 (34519)	

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
---------	---------