

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11151

研究課題名(和文) 臨床応用を目指したマルチターゲット型去勢抵抗性前立腺癌治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a multi-targeted castration-resistant prostate cancer drug for clinical application

研究代表者

遠藤 智史 (Endo, Satoshi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60433207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)の治療の改善を目指し、前立腺癌の新規標的であるAKR1C3の強力かつ特異的阻害剤を創製した。また、酵素-補酵素-阻害剤の三者複合体のX線結晶構造解析にも成功し、阻害機構を解明した。また、AKR1C3阻害剤は既存のCRPC治療薬の抗癌活性の増強効果や耐性克服効果を示したことから、抗癌剤耐性前立腺癌の耐性克服への有効な新規アジュバント薬になると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌は10年生存率が95%を超える比較的予後の良い癌として知られるが、世界的に罹患率の高い癌であり、一般的には欧米人に多いとされてきたが、本邦でも高齢化、食の欧米化などを背景に急速に患者数が増加し、最新がん統計では胃癌に次いで2番目に高いがん罹患率を示す。また、内分泌療法の長期継続によって治療が困難な去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)へと移行することが問題である。本研究成果は、CRPC患者における生活の質の向上を目指し、既存治療薬の効果の最大化に向けた有益な知見を与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To improve the treatment of castration-resistant prostate cancer (CRPC), we developed potent and specific inhibitors of AKR1C3, a novel target of prostate cancer. We also succeeded in X-ray crystallographic analysis of the enzyme-coenzyme-inhibitor tertiary complex and clarified the binding mode of the inhibitors with AKR1C3. In addition, the AKR1C3 inhibitors exhibited potentiating effects on the anticancer activity of the existing CRPC agents and overcoming effects against the resistance, suggesting that the novel AKR1C3 inhibitors may be an effective novel adjuvant drugs for overcoming the resistance in CRPC agents-resistant prostate cancer.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 AKR1C3 抗癌剤耐性克服

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌治療の第一選択にはホルモン療法が用いられるが、5年以内に半数以上でホルモン療法が効かない CRPC (STATE 2-4) へと移行する。最近、CRPC 治療薬として CYP17A1 阻害剤 abiraterone とアンドロゲン受容体 (AR) アンタゴニスト enzalutamide が上市された。しかし、両薬剤が有効な症例 (STATE 2) が全 CRPC 症例の約 40% にすぎないことや、継続投与による両薬剤間での交叉耐性も報告されている。STATE 3、4 では微小管阻害剤 cabazitaxel を用いた化学療法が実施されるが、ほぼ確実に骨髄抑制を引き起こすなど厳しい副作用を避けることができない。このように前立腺癌治療における満足度は未だ高いとは言えない。既存の抗癌剤の効果を最大化することを目指す本研究は、投与量の減少も可能にし、抗癌剤耐性化の抑制や新規標的の提唱によって、少しでも多くの患者さんに広く、長く治療機会を提供することに貢献できると考える。

Abiraterone は CYP17A1 阻害の副作用としてグルココルチコイドの生合成を阻害するため、AST、ALT 増加や低カリウム血症などの副作用があり、プレドニゾロンの併用が必須である。また、劇症肝炎や肝不全といった重大な副作用も知られる。AR のリガンドである testosterone や 5 α -DHT を直接合成する AKR1C3 は CYP17A1 の下流に位置するため、グルココルチコイドの生合成を阻害せず、これらの副作用を考慮する必要がない。前述の通り、abiraterone や enzalutamide といった画期的な CRPC 治療薬が開発されたが、半年程での前立腺特異抗原 (PSA) レベルの回復や、交叉耐性も多数見受けられ、代替治療の確立は依然として重要な課題である。

申請者は AKR1C3 の阻害剤探索・創製研究を行い、プロポリス含有成分 baccharin が強力な阻害剤であることを見出した。Baccharin をリード化合物とし、阻害強度や選択性を向上させた桂皮酸誘導体 BA43 の創製に成功したが、BA43 はアンドロゲン依存的/非依存的に前立腺癌細胞増殖を抑制したものの、分子内にエステル結合を有することによる細胞内安定性の不安などの問題点も見受けられた。現在はこの問題点を解消し、さらに AKR1C3 阻害活性に加えて AR アンタゴニスト活性を併せ持つ化合物の創製に成功した。また、本酵素がプロスタノイドやイソプレノイド代謝を介した細胞増殖に関与することや、酸化ストレス時に生成する反応性アルデヒド (4-hydroxy-2-nonenal や 4-oxo-2-nonenal) の解毒代謝によって抗癌剤耐性に寄与することも見出している。従って、現在見出している AKR1C3 阻害剤は AKR1C3 と AR の共阻害に加えて、アンドロゲン非依存的シグナルも阻害可能なこれまでにないマルチターゲット型 CRPC 治療薬になると考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) を標的とした新規抗癌剤の創製である。前立腺癌治療において、有効な抗癌剤が相次いで上市されたが、効果の個人差や容易な耐性獲得が問題となり、その根治は依然として難しいままである。前立腺癌は比較的進行が遅いが、それだけ治療期間が長くなるため、患者さんの生活の質 (QOL) の向上に向けて、長期的に適切な治療機会を提供することが重要である。申請者は、前立腺癌細胞の増殖と生存を複数の作用点で阻害するマルチターゲット型 AKR1C3 阻害剤を最近見出した。臨床応用を目指したマルチターゲット型去勢抵抗性前立腺癌治療薬の開発を目指し、既知の AKR1C3 阻害剤から得られた構造情報をもとに、新規阻害剤を設計、合成し、CRPC 治療薬としての有効性、既存 CRPC 治療薬に対する耐性克服薬としての有効性を評価する。

3. 研究の方法

申請者はこれまでに前立腺癌の新規標的として AKR1C3 の癌増殖、抗癌剤耐性化との関連性や AKR1C3 阻害剤の探索・創製研究を行ってきた。国内外のアカデミアや製薬企業で活発に研究が進められているが、in vivo での有効性と臨床試験での活性不十分の間には明らかな『死の谷』が存在する。この『死の谷』を乗り越えるために「既存の AKR1C3 阻害剤のウィークポイントの改善」と「抗癌剤耐性 CRPC における AKR1C3 阻害剤の有効性の実証」に注力した研究を実施した。

(1) 既知阻害剤との優位性の検証

・現在見出している AKR1C3 阻害剤は AR アンタゴニスト活性も有する点でこれまでの阻害剤と異なる。AR アンタゴニスト活性に必要な構造的要因を明らかにするために、誘導体の構造活性相関とレポーターアッセイを行った。

・AKR1C3 はアンドロゲンシグナルだけでなく、プロスタノイドやイソプレノイドの代謝を介したアンドロゲン非依存的細胞増殖にも関与する。そのため、アンドロゲン非依存的前立腺癌 PC3 細胞株に加えて、アンドロゲン感受性 LNCaP 細胞から単離したアンドロゲン低感受性細胞株を用いて細胞増殖、転移浸潤に及ぼす影響を検証した。

・前述の AKR1C3 阻害剤 ASP9521 はヒトでの安全性がすでに確立されているため、新規 AKR1C3 阻害剤の開発においては ASP9521 との優位性を確保する必要がある。そこで、ASP9521 の合成を行い、in vitro での前立腺癌細胞増殖に対する阻害効果を比較検討した。

・新規 AKR1C3 阻害剤による分子認識機構を明らかにするために、in silico での分子モデリングに加えて、AKR1C3-補酵素-阻害剤の三者複合体の X 線結晶構造解析を行った。

・AKR1C3 阻害剤のアンドロゲン依存性増殖と非アンドロゲン依存性増殖に対する抑制効果を in vivo で評価した。具体的には免疫不全マウス (Balb/c-nu) の下腹部に前立腺癌 CWR22Rv1 細胞

胞の懸濁液 (1×10^7 cells) を皮下移植し、体重および腫瘍径 (長径、短径) を計測し、約 2~3 週間後に腫瘍体積が $250 \sim 500 \text{ mm}^3$ に達したマウスを実験に用いた。腫瘍体積は近似値として、(長径)² x 短径/2 の式で算出した。1 週間に 1 回、AKR1C3 阻害剤を腹腔内、皮下あるいは局所投与し、経時的に腫瘍サイズを計測し抗腫瘍効果を確認した。また腫瘍および肝、腎などの臓器を摘出し病理組織学的変化、臓器障害の有無を確認した。

(2) 抗癌剤耐性克服効果の検証

・CRPC 治療薬カバジタキセルとアパルタミドを継続的に添加することで、それぞれの薬剤に対する感受性が低下したカバジタキセル耐性細胞株 (22Rv1/Cab-R) とアパルタミド耐性細胞株 (22Rv1/Apa-R) を樹立した。これら細胞を用いて、その性状を親細胞と比較解析するとともに、AKR1C3 阻害剤による抗癌剤耐性克服効果をアポトーシスシグナルや生存・増殖シグナルを中心にした解析によって評価した。二剤併用による効果は CompuSyn プログラムを用いて評価した。

4. 研究成果

(1) AKR1C3 阻害剤の去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) における有効性の検証

これまでに見出していた AKR1C3 阻害活性を有するクロメン骨格を有する化合物をリードとし、構造最適化を行った。構造活性相関からクロメン環の 8 位水酸基が強力な AKR1C3 阻害活性に必須であることが明らかとなったため、8-ヒドロキシクロメン誘導体を新たに 24 種合成した。これらの中で最も強力な阻害活性を示した化合物は IC₅₀ が 25 nM と強力な阻害活性を示した。新規 AKR1C3 阻害剤はアンドロゲン依存性前立腺癌 22Rv1 細胞におけるアンドロゲンシグナルの抑制、アンドロゲン非依存性前立腺癌 PC3 細胞におけるプロスタグランジン関連シグナルの抑制を介して増殖抑制効果を示した。また新規 AKR1C3 阻害剤は強力な AKR1C3 阻害活性に加えて、ヒドロキシフルタミドほどではないものの AR アンタゴニスト活性を併せ持ち、前立腺癌細胞増殖を複数のステップで阻害できる化合物の初めての例である。さらに、既存の CRPC 治療薬 (アピラテロン、エンザルタミド) との併用によって顕著にアポトーシスを誘導し、既存 CRPC 治療薬の作用増強が可能になることが示唆された。また、前立腺癌 22Rv1 細胞をヌードマウス皮下に移植したゼノグラフトモデルを作製し、AKR1C3 阻害剤を腹腔内投与したところ顕著な抗腫瘍効果が認められた。病理解析によって腫瘍組織では約 40% の細胞がネクローシスを起こしていた一方で、肺、肝臓、腎臓ではこのような変化は認められなかった。このことから、新規 AKR1C3 阻害剤は比較的安全性の高い化合物であると考えられる。

(2) AKR1C3 阻害剤の抗癌剤耐性克服効果の検証

22Rv1 細胞に添加するカバジタキセル濃度を 2-3 継代ごとに上昇させることによって、カバジタキセルに対して親細胞株よりも低感受性の 22Rv1/Cab-R を樹立した。また、同様の方法によって 22Rv1/Apa-R を樹立した。22Rv1/Cab 細胞では、22Rv1 細胞と比べて NF-E2 related factor 2 (Nrf2) / Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) 経路によって発現が制御される heme oxygenase 1 や NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 などの抗酸化酵素発現量の顕著な増加が認められた。22Rv1/Cab 細胞では核内 Nrf2 量が増加しており、恒常的な Nrf2 シグナルの活性化が考えられた。同時に Nrf2 の上流に存在する p62 の Ser349 のリン酸化レベルの亢進も認められたため、恒常的な Nrf2 シグナルの活性化には p62 リン酸化状態の変化が関わりと推察された。22Rv1/Cab 細胞の Cab 感受性は Nrf2 siRNA を用いたノックダウンによって増強され、22Rv1 細胞の Cab 感受性は Nrf2 活性化剤 sulforaphane や dimethyl fumarate の添加によって低下したため、Cab 耐性克服に Nrf2 シグナルの制御が有効であると考えられた。また、22Rv1/Apa-R 細胞においても AKR1C3 を含めた Nrf2 下流シグナルの亢進が認められた。最近、halofuginone (HF) が Nrf2 合成阻害剤として同定された。22Rv1/Cab 細胞への HF 処理は核と細胞質両方の Nrf2 タンパク質量の減少を介して Nrf2 シグナルを抑制し、Cab 感受性を有意に回復させた。22Rv1/Apa-R 細胞ではその他の CRPC 治療薬 enzalutamide、abiraterone、cabazitaxel に対しても交叉耐性を示し、このことは AKR1C3 を含めた Nrf2 下流シグナルの亢進によると示唆された。22Rv1 細胞におけるアパルタミド処理による活性酸素種の亢進とアポトーシスシグナルの活性化は AKR1C3 阻害剤の併用によって有意に増強された。この併用効果は 22Rv1/Apa-R 細胞でも確認された。併用効果が相加的か相乗的かについて CompuSyn プログラムを用いて検証した。50、100 μ M アパルタミドと 5、10 μ M AKR1C3 阻害剤の併用時の 22Rv1 細胞における combination index (CI) が 0.37-0.88 であった一方、22Rv1/Apa-R 細胞の CI は 0.007-0.205 であった。そのため、AKR1C3 阻害剤は 22Rv1/Apa-R 細胞においてより効果的に相乗効果を示すことが明らかとなった。

(3) AKR1C3 阻害剤の阻害様式の解明：

AKR1C3 阻害剤の強力かつ選択的な AKR1C3 阻害活性の構造的要因を明らかにすべく、AKR1C3-NADP⁺ 複合体へのドッキングモデルを作成した。クロメン環の 8 位水酸基が、触媒反応において重要なアミノ酸残基である Tyr55 や His117 と水素結合を形成可能であることが示唆された。また、阻害剤から 4.0 Å 以内に上記触媒残基に加えて、Tyr24、Leu54、Trp86、Met120、Asn167、Trp227、Phe306、Ser308、Phe311、Tyr317、Tyr319 が存在し、ベンゼン環の R2 位と Phe306

との間での π - π スタッキング相互作用も確認され、これら残基との疎水性相互作用が結合に関与していることが示唆された。しかし、このモデルでは、一部の阻害剤の構造活性相関について理解しにくい点が見られた。そこで、AKR1C3-NADP⁺-阻害剤の共結晶構造解析を行った。N 末端に His タグを付加したままの AKR1C3 リコンビナントタンパクを用いて結晶化を試みたところ結晶が得られなかったため、His タグを切断するためのトロンピン切断サイトを導入し、Ni sepharose カラムにて単一に精製後に His タグを切断し、ゲルろ過を行ったところ高純度の native AKR1C3 を得た。このリコンビナントタンパクを用いて AKR1C3-NADP⁺-阻害剤の共結晶構造解析に成功した。結晶構造解析の結果、構造活性相関で推定された阻害に不可欠な酵素触媒残基との相互作用は分子モデリングと結晶構造解析の間でほぼ同一のものが確認された。一方で、阻害剤は分子モデリングでは推定が不可能である水分子を介した水素結合ネットワークを介して、過去の分子モデリングとは異なる配向を示すことが分かり、一部の誘導体の中で理由がつかなかった構造活性相関を理解することが可能となった。

以上、CRPC の治療の改善を目指し、前立腺癌の新規標的である AKR1C3 の強力かつ特異的阻害剤を創製した。また、酵素-補酵素-阻害剤の三者複合体の X 線結晶構造解析にも成功し、阻害機構を解明した。また、AKR1C3 阻害剤は既存の CRPC 治療薬の抗癌活性の増強効果や耐性克服効果を示したことから、抗癌剤耐性前立腺癌の耐性克服への有効な新規アジュバント薬になると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Endo Satoshi, Morikawa Yoshifumi, Kudo Yudai, Suenami Koichi, Matsunaga Toshiyuki, Ikari Akira, Hara Akira	4. 巻 199
2. 論文標題 Human dehydrogenase/reductase SDR family member 11 (DHRS11) and aldo-keto reductase 1C isoforms in comparison: Substrate and reaction specificity in the reduction of 11-keto-C19-steroids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 105586 ~ 105586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2020.105586	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 Endo Satoshi, Miyagi Namiki, Matsunaga Toshiyuki, Ikari Akira	4. 巻 305
2. 論文標題 Rabbit dehydrogenase/reductase SDR family member 11 (DHRS11): Its identity with acetoheamide reductase with broad substrate specificity and inhibitor sensitivity, different from human DHRS11	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemico-Biological Interactions	6. 最初と最後の頁 12 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbi.2019.03.026	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 工藤 優大、松永 俊之、遠藤 智史
2. 発表標題 11-ケト-C19-ステロイドの還元代謝酵素の同定
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬川 仁、星 真奈美、河合 弥菜、藤田 芽衣、豊岡 尚樹、藤本 直浩、松永 俊之、五十里 彰、遠藤 智史
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺がんの新規治療薬アパルタミドの治療効果の最大化を目指した併用薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河合 弥菜、星 真奈美、瀬川 仁、藤田 芽衣、松川 卓生、藤本 直浩、松永 俊之、五十里 彰、遠藤 智史
2. 発表標題 Nrf2シグナルを標的としたカバジタキセル耐性前立腺癌に対する治療戦略の開発
3. 学会等名 第29回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤 智史、瀬川 仁、小栗 弘成、夏 爽、胡 大イ、入江 克雅、藤井 晋也、合田 浩明、松川 卓生、藤本 直浩、中山 敏幸、豊岡 尚樹、松永 俊之、五十里 彰
2. 発表標題 アンドロゲン合成酵素を標的とした新規去勢抵抗性前立腺がん治療薬の開発
3. 学会等名 第47回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤 智史、宮城 菜未希、松永 俊之、五十里 彰
2. 発表標題 新規3(17) -ヒドロキシステロイド脱水素酵素DHRS11の性状解析とウサギアイソザイムとの相違点
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合 弥菜、遠藤 智史、星 真奈美、瀬川 仁、藤田 芽衣、松川 卓生、藤本 直浩、松永 俊之、五十里 彰
2. 発表標題 前立腺癌細胞のカバジタキセル耐性克服に向けたNrf2シグナル制御の意義
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤 智史
2. 発表標題 マルチターゲット型去勢抵抗性前立腺癌治療薬の創製研究
3. 学会等名 サラマンカ大学・岐阜薬科大学・岐阜大学 三大学連携学術シンポジウム がん研究の最前線 ~がん克服に向けて(対がん)~ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Endo, Namiki Miyagi, Toshiyuki Matsunaga, Akira Ikari
2. 発表標題 Rabbit DHRS11: Identity with acetohexamide reductase, different from human DHRS11
3. 学会等名 19th International Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤 智史、小栗 弘成、藤本 直浩、豊岡 尚樹、松永 俊之、五十里 彰
2. 発表標題 前立腺癌治療薬の開発を指向したアンドロゲン合成酵素阻害剤の創製研究
3. 学会等名 日病薬東海ブロック・薬学会東海支部合同学術大会2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤 智史
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌治療薬を指向した新規AKR1C3阻害剤の創製
3. 学会等名 第3回名大医薬系3部局交流シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤 智史、河合 弥菜、瀬川 仁、小栗 弘成、藤本 直浩、豊岡 尚樹、松永 俊之、五十里 彰
2. 発表標題 アルドケト還元酵素1C3を標的とした去勢抵抗性前立腺癌治療薬の創製研究
3. 学会等名 第28回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naohiro Fujimoto, Ikko Tomisaki, Satoshi Endo, Hiroaki Oguri, Naoki Toyooka, Toshiyuki Matsunaga, Akira Ikari and Toshiyuki Nakayama
2. 発表標題 Development and characterization of novel AKR1C3 inhibitors; therapeutic potential for castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 20th International EAUN Meeting EAU19 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 友里江、早川 大地、遠藤 智史、合田 浩明
2. 発表標題 分子動力学計算を用いたアルドケト還元酵素AKR1C3のC154Y及びL159V変異体の溶液構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会 (金沢)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 工藤 優大、遠藤 智史
2. 発表標題 アンドロゲン作用を示す11-ケトアンドロゲンの還元酵素の同定
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬川 仁、星 真奈美、河合 弥菜、藤田 芽衣、豊岡 尚樹、藤本 直浩、五十里 彰、遠藤 智史
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌治療薬アパルタミドの耐性克服に向けた新規治療戦略の開発
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 AKR1C3選択的阻害剤及びその用途	発明者 遠藤智史、松永俊之、五十里彰、豊岡尚樹、藤本直浩	権利者 岐阜市、富山大学、産業医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2018-055182	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室ホームページ http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/seika/
--

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
連携研究者	豊岡 尚樹 (Toyooka Naoki) (10217565)	富山大学・生命融合科学教育部・教授 (13201)	
連携研究者	藤本 直浩 (Fujimoto Naohiro) (30209100)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

