

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460160

研究課題名(和文)新規H3アンタゴニストを用いる抗乳癌剤へのアプローチ

研究課題名(英文) Approach toward anti-breast cancer agents using novel histamine H3 antagonists

研究代表者

春沢 信哉 (Harusawa, Shinya)

大阪薬科大学・薬学部・教授(移行)

研究者番号：90167601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒスタミンH3Rアンタゴニストは、従来中枢疾患の新しい治療薬として期待されてきた。我々は、2015年にH3Rに対して受容体特異性と種特異性を併せ持つ新しいタイプのH3Rアンタゴニスト、OUP-186を発表した。一方、H3Rが癌の発生に関係するという報告が見られることから、OUP-186に癌の増殖抑制作用を期待し、本研究を着手した。その結果、OUP-186とその誘導体が既存のH3Rアンタゴニストに見られない著しい乳癌の増殖抑制作用を持つことを見いだした。これらの成果は、Synthesis誌(2015)及びBioChem. Biophys. Res. Commun.(2016)に速報した。

研究成果の概要(英文)：Histamine H3 antagonists have been expected as useful drugs on the central nervous systems. We reported a new type H3 potent antagonist OUP-186 (2013), which exhibited a receptor sub-type selectivity as well as a species-selective difference in antagonist affinities. On the other hand, as relationships between H3R and cancer proliferation have been reported, we expected an cancer-attenuation of OUP-186 against breast cancer cells. After various investigations, we found the potent inhibitory activities of OUP-186 and its derivatives against the proliferation of human breast cancer cell lines. These successful results were revealed on some journals: Synthesis (2015) and BioChem. Biophys. Res. Commun.(2016) et al.

研究分野：有機合成化学

キーワード：H3R アンタゴニスト イソチオウレア 合成法 乳癌 増殖抑制 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

新しいヒスタミン H3 受容体 (H3R) アンタゴニストの開発研究の中で、我々は、受容体サブタイプ選択性のみならず動物間種選択性という特異な挙動を示す強力な H3R アンタゴニスト OUP-186 (N-[4-(4-chlorophenyl)butyl]S-[3-piperidin-1-ylpropyl]isothioure) を発見した。一方で、H3R が癌の発生と増殖に関係していることを示唆する研究報告もなされていた。私と共同研究者の高岡昌徳教授 (故人) は、以前より乳癌の増殖抑制物質の共同開発を行っていたため、OUP-186 に癌の増殖抑制作用の可能性を期待した。また、H3R アンタゴニストから、抗癌剤を開発しようという試みは他に例がないことから、本研究を精力的に実施することになった。

2. 研究の目的

(1) 標的化合物はイソチオ尿素構造を持つため、合成化学的に効率的合成法の開発を最初に行う。

(2) 開発された効率合成法で作製された化合物群 (H3R アンタゴニスト) から強力な乳癌増殖抑制物質を見いだす。

(3) OUP-186 に見られる乳癌増殖抑制と H3R の関係を明らかとし、その作用機序の解明へと研究を展開する。

3. 研究の方法

(1) 大阪薬科大学、有機薬化学研究室 (春沢研究室) で、イソチオ尿素構造の効率的合成法を開発し、OUP-186 を基盤とした種々の誘導体のデザインと合成を行う。

(2) 同大学の生体機能解析学研究室 (高岡研究室) では、以前から行っていたヒトの乳癌細胞に対する増殖抑制作用の評価法を用いて、OUP-186 より強力な化合物の探索を行う。

(3) 複数のヒトの乳癌細胞を用いて WST-1 法を用いて既存の H3R 及び相同性の高い H4R リガンドと OUP-186 およびその誘導体との比較を行う。

(4) OUP-186 およびその誘導体と臨床で用いられている抗がん剤との比較実験をヒトの乳癌細胞を用いて行う。

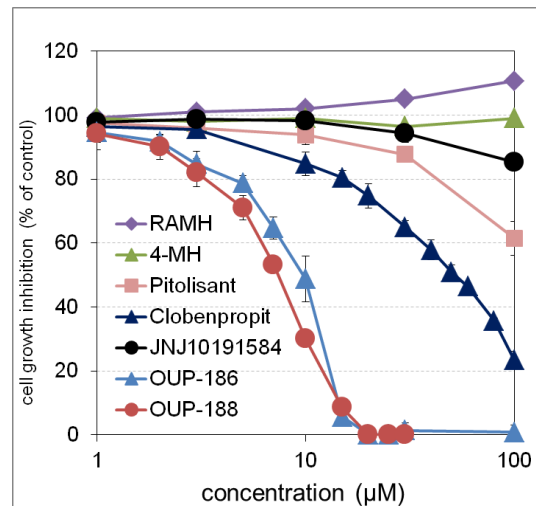
(5) 最終的には、H3R と乳癌増殖抑制作用の関係を明らかとし、その作用機序を解明する。

4. 研究成果

(1) 研究開始当初に OUP-186 が、既存の H3R と H4R リガンドでは見られない著しい乳癌細胞増殖抑制作用をヒトの乳癌細胞で示す事が判明した。Fig. 1 で示すように、MDA-MB-231 細胞では、H3R アゴニスト RAMH, H3R アゴニスト 4-MH, OUP-16, H3R アンタゴニスト pitolisant では、ほとんど乳癌細胞増殖抑制作用は、見られず、H3R アンタゴニスト clobenpropit に緩やかな増殖抑制が見られるに過ぎなかった ($IC_{50} = 50 \mu M$)。一方、OUP-186 (Cl) と OUP-186 の Cl を CF₃ に置換し

た OUP-188 (CF₃) では、それぞれ $IC_{50} = 10$ と $7 \mu M$ と著しいヒトの乳癌細胞増殖抑制作用を示した。さらに $20 \mu M$ では、乳癌細胞はほぼ死滅していることがわかった。

Fig. 1. Effects of H3R and H4R ligands on the proliferation of breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were treated with various concentrations of H3R and H4R ligands for 48 h. Cell proliferation was determined by the WST-1 assay.



(2) この成果に励まされ OUP-186 の基本構造である、イソチオ尿素化合物の合成法を独自の手法で達成した。さらに、関連化合物のデザインと合成により多くの候補化合物の合成を行った。本合成法は、日本薬学会、第 12 回次世代を担う有機化学シンポジウム、第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウムなどで学会発表した後、Synthesis 誌 (2015)、また総説を薬学雑誌に執筆した (2016)。

(3) 多くの合成化合物を 3 種のヒト乳癌細胞 (MDA-MB-231, MCF7, T47D) に対する増殖抑制作用を評価する中で、OUP-186 より強力な乳癌増殖抑制物質のいくつかを見いだすことに成功した。判明している中では、OUP-186 の芳香環に Cl とともにさらに Cl, CF₃, F などの疎水基を導入した化合物群は、いずれの細胞に対しても OUP-186 より 2 倍以上の増殖抑制作用を示した。

(4) 一方、OUP-186 の乳癌増殖抑制作用は、Annexin V 陽性細胞の増加、アポトーシス実行因子である caspase-3/7 の活性化および poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の断片化が認められたことから、アポトーシスによるものであることを明らかとした (Fig. 2, 3)。しかし、この OUP-186 が引き起こす細胞死には、汎カスパーゼ阻害薬

Z-VAD-FMK によって抑制される細胞死だけでなく、RIP1 阻害薬である necrostatin-1 によって抑制される細胞死も含まれており、カスパーゼ非依存的な細胞死も誘導されていることを明らかとした。
この成果は、日本薬学会や第 87 回日本生化学会(2014)で発表した。

Fig. 2 Effects of H3R antagonists on cell apoptosis in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated with OUP-186 (10, 20, 30 μ M) and clobenpropit (50 μ M) for 48 hours. Apoptotic cells were determined by annexin V-FITC/PI staining and FACS analysis.

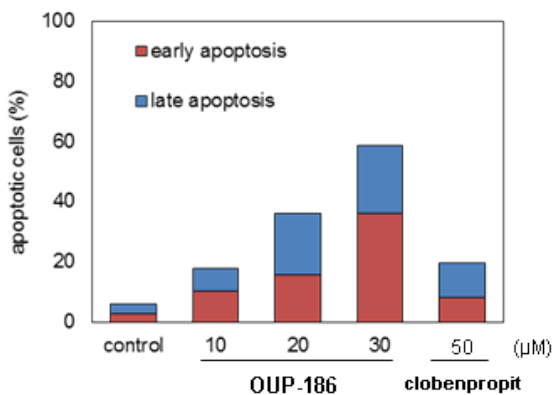
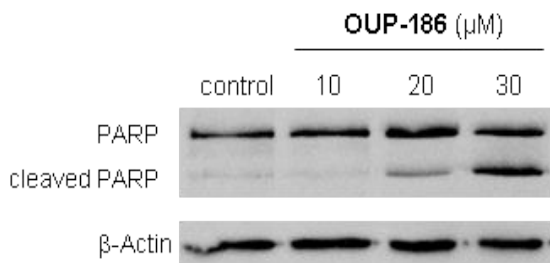
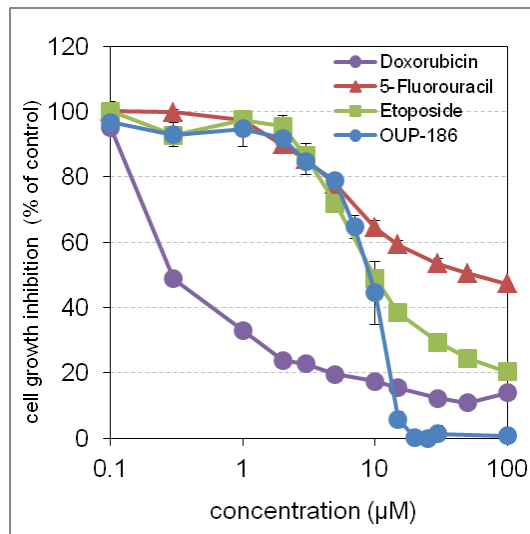


Fig. 3 Effect of OUP-186 on PARP cleavage in breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were treated with the indicated concentrations of OUP-186 for 24 h. PARP was assessed using western blotting.



(5) OUP-186 およびその誘導体と現在臨床で用いられている抗がん剤 (Doxorubicin, 5-Furorouracil, Etoposide) との比較実験をヒトの乳癌細胞 MDA-MB-231 を用いて行った (Fig.4)。この結果、OUP-186 は、Doxorubicin よりは作用は弱いながら、5-Furorouracil, Etoposide と同程度あるいはそれ以上の活性を示した。
これらの成果は、*BioChem. Biophys. Res. Commun.*, (2016) に速報として掲載した。

Fig. 4 Comparison of Three Typical Anticancer Agents and OUP-186 on the proliferation of breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were treated with various concentrations of Anticancer Agents and OUP-186 for 48 h. Cell proliferation was determined by the WST-1 assay.



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 4 件)

- 1) H. Yoneyama, T. Magata, K. Uemura, Y. Usami, S. Tanaka, M. Takaoka, and S. Harusawa
Efficient Synthesis of *N*-[4-(4-Chlorophenyl)butyl]-*S*-(3-piperidinopropyl)-isothiourea (OUP-186) and Its Analogues Using 2-Nitrophenylacetyl Isothiocyanate: Application to Novel Histamine H₃R Antagonists

- Synthesis*, (査読あり) **47**, pp. 1291-1302 (2015).
DOI:
- 2) イソチオウレア合成法の開発と新規ヒスタミン_{H₃}受容体アンタゴニストへの応用
米山弘樹, 山本大助, 大和谷厚, 春沢信哉
薬学雑誌, (査読あり) **136**, pp. 1217-1232 (2016).
DOI:10.1248/yakushi.16-00023
- 3) Histamine H₃ receptor antagonist OUP-186 attenuates the proliferation of cultured human breast cancer cell lines
S. Tanaka, M. Sakaguchi, H. Yoneyama, Y. Usami, S. Harusawa
BioChem. Biophys. Res. Commun., (査読あり) **480**, pp. 479-485 (2016).
DOI:10.1016/j.bbrc.2016.10.077
- 4) Diethyl Phosphorocyanidate (DEPC): a versatile reagent for organic synthesis
S. Harusawa, T. Shioiri
Tetrahedron, (査読あり) **72**, pp. 8125-8200 (2016).
DOI:10.1016/j.tet.2016.09.070

[学会発表](計 8 件)

- 1) ヒスタミン_{H₃}受容体アンタゴニストのための S-アルキル-N-アルキルイソチオウレア誘導体の改良合成法
上村健司、曲田拓司、米山弘樹、宇佐美吉英、春沢信哉
日本薬学会134年会、熊本、2014年3月27-30日、講演要旨集2
- 2) S-アルキル-N-アルキルイソチオウレアの効率的合成法とヒト/ラット選択的ヒスタミン_{H₃}アンタゴニストの創製
米山弘樹, 曲田拓司, 上村健司, 澤田紘一, 宇佐美吉英, 波多野浩太, 山本浩一, 山本大助, 大和谷厚, 春沢信哉
第12回次世代を担う有機化学シンポジウム、東京、長井記念ホール、2014年5月23-24日、講演要旨 p. 52-53 (講演番号2-09)
- 3) 培養ヒト乳がん細胞の増殖に対するヒスタミン_{H₃}受容体拮抗薬の影響
田中 智, 坂口 実, 辻本 和香, 田中 由妃, 吉田 麻理, 米山 弘樹, 宇佐美 吉英, 春沢 信哉, 高岡 昌徳
第87回日本生化学会、京都国際会議場、2014年10月15-18日
- 4) S-アルキル-N-アルキルイソチオウレアの効率的合成とヒト乳がん細胞増殖抑制作用
上村健司、田中 智、的場美香、伊原裕子、米山弘樹、宇佐美吉英、辻元和香、田中由妃、吉田麻理、坂口実、高岡 昌徳、春沢 信哉
第64回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都薬科大、2014年10月11日(講演番号P3-81)
- 5) ヒスタミン_{H₃}受容体アンタゴニストを基盤とした乳がん細胞増殖抑制物質の合成研究
米山弘樹、上村健司、宇佐美吉英、坂口実、高岡 昌徳、春沢 信哉
第18回日本ヒスタミン学会、2014年10月10、11日、尼崎。講演要旨(講演番号0-0-1).
- 6) Effects of histamine H₃ and H₄ receptor antagonists on cell proliferation in cultured human breast cancer cells.
Satoshi Tanaka, Minoru Sakaguchi, Aika Tsujimoto, Yuki Tanaka, Mari Yoshida, Takako Soda, Hiroki Yoneyama, Yoshihide Usami, Shinya Harusawa, Masanori Takaoka
第88回日本薬理学会2015、2015年3月18-20日、名古屋国際会議場
- 7) 新規ヒスタミン_{H₃}受容体アンタゴニストの乳がん細胞増殖抑制作用
米山弘樹、田中智、上村健司、的場美香、村田紫織、曾田貴子、兼安俊尚、嶋野昌以子、田口玲実、坂口実、宇佐美吉英、高岡昌徳、春沢信哉
第33回メディシナルケミストリーシンポジウム、幕張国際研究センター、2015年11月25日~27日(講演番号2P-36)
- 8) 培養ヒト乳がん細胞に及ぼすヒスタミン_{H₃}受容体拮抗薬 OUP-186 の影響
田中 智、北口大毅、米山弘樹、宇佐美吉英、坂口 実、春沢信哉
第66回日本薬学会近畿支部総会・大会、大阪

薬科大、2016年10月15日

〔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

春沢 信哉 (Harusawa, Shinya)
大阪薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：90167601

(2) 研究分担者

高岡 昌徳 (Takaoka, Masanori) (故人)
大阪薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：50140231

(平成 26 年から平成 27 年までの研究分担者)

(3) 研究分担者

坂口 実 (Sakaguchi, Minoru)
大阪薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：90221267
(平成 27 年よりの研究分担者)

(4) 研究協力者

(0)