

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460164

研究課題名(和文) ホルモン非依存性前立腺がんにも有効な新規PCA-1阻害剤の探索合成

研究課題名(英文) Design and synthesis of novel PCA-1 inhibitor for clinical anticancer drug

研究代表者

田中 明人 (TANAKA, AKITO)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：30454789

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)：我々はホルモン非依存性の難治性前立腺癌治療薬の開拓を目指し、連携研究者・辻川らが疫学的に同定したPCA-1の阻害剤に関する探索合成検討を行った。その結果、経口吸収性も備えるHUHS015など、Xenograftモデル等のin vivoでも有効な化合物創出に成功し、PCA-1阻害剤の抗がん治療薬としての有効性を示唆するデータ取得に成功した。また、構造展開を実施し、HUHS199やHUHS_KNC-7など5種類以上のdiversityに富む誘導体創製にも成功した。現時点での最適化検討では、10 mg/kg (po投与、bid)で有効なHUHS_KNC-7などが有望視されている。

研究成果の概要(英文)：We designed and synthesized novel PCA-1 inhibitors to obtain clinical effective novel anticancer drugs. Oral administration of HUHS015, a representative compound, showed the effectiveness in a DU145 Xenograft model without side effects, which demonstrated the effectiveness of PCA-1 inhibitor as anti-cancer drugs.

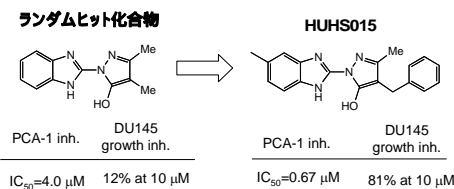
研究分野：創薬

キーワード：抗がん剤 PCA-1

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化に伴い、前立腺がんは我が国においても重要な社会問題となりつつある。特に、当該がん疾患が、疾患の進行に伴いホルモン非依存性に変化するとその予後が著しく悪化することから、ホルモン非依存性前立腺がんにも有効な薬物開発が求められている。連携研究者の辻川らはこれらのことを背景とし、臨床予後に強く関連する因子として DNA/RNA の脱メチル化酵素 PCA-1 を発見することに成功し、新たな当該疾患でのアプローチを提案し、注目を集めている。我々は辻川らが行った市販化合物ライブラリーを中心としたランダム評価の結果得られた図 1 に示す 1-(1H-benzimidazol-2-yl)-5-hydroxy-1H-pyrazole を含む複数のヒット化合物に注目し、辻川らと共同し探索合成を行ってきた。その結果、ヒット化合物では弱かった細胞での増殖抑制作用も改善された 1-(1H-5-methyl-benzimidazol-2-yl)-4-benzyl-3-methyl-1H-pyrazol-5-ol (HUHS015、 $IC_{50}=0.67 \mu M$) 等の誘導体創出に成功した(図 1a)。HUHS015 は図 1b に示すように、Xenograft マウスの実験で、観測範囲における副作用及び毒性がなく、がん細胞の増殖を有意に抑制し、その有効性が確認されている。ただし、HUHS015 の有効投与量が現在のところ 10-32 mg/kg(sc)と弱く、その薬効増強が課題として強く求められている。

a. これまでの合成展開(ヒット化合物からHUHS015)



b. HUHS015腫瘍体積増加抑制作用(32 mg/kg, sc)

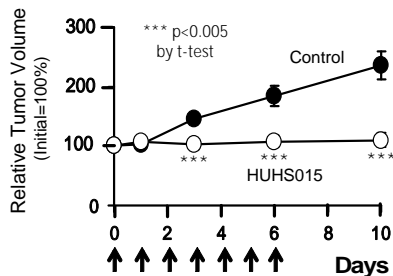


図1 新規PCA-1阻害剤HUHS015創出の経緯と抗がん活性

2. 研究の目的

本研究では、連携研究者の辻川等によって臨床的に前立腺がんの予後に関与する因子として同定された DNA/RNA の脱メチル化酵素 PCA-1(別名 ALKBH3)の阻害剤探索合成研究を行う。既に、我々は市販化

合物ライブラリーを用いたランダムスクリーニングから、独自ヒット化合物を取得し、その構造変換によって、1-(1H-5-methyl-benzimidazol-2-yl)-4-benzyl-3-methyl-1H-pyrazol-5-ol (HUHS015、 $IC_{50}=0.67 \mu M$) の創出に成功している。HUHS015 は、siRNA 等による効果と同様に、*in vitro* および *in vivo* において、ホルモン非依存性の前立腺がん由来細胞 DU145 を含めた各種のがん細胞増殖を抑制し、現在大阪大学と共同し臨床に向けた検討を進めている。本研究では HUHS015 の臨床試験に向けた体内動態改善等を含む基礎検討、および新たな後継化合物開拓を進める計画である。また、研究最終ステージにおいて、HUHS015 あるいは本提案で創出する後継化合物を用い、難治性のホルモン非依存性前立腺がん治療への貢献を視野に、臨床に向けた具体的な検討も行う計画である。PCA-1 は、ノックアウトマウスの検討から健康人における副作用懸念が確認されていないこと、多くの臨床がん細胞で発現亢進が見られること等から、今後その適応は広がるものと期待されている。

3. 研究の方法

本研究は主に下に示す主に3つの項目に計画立て実施してきた。まず、(1)HUHS015 より強力な新規 PCA-1 阻害剤創出については、PCA-1 酵素単体結晶は研究協力者・井上等によって既に取得済であるが、現時点において目的とする低分子 PCA-1 阻害剤との複合体構造は得られていない。今後、本検討を継続し、低分子阻害剤/PCA-1 複合体構造が判明次第、速やかに実行する計画である。また、(2)HUHS015 の経口吸収性向上を目指した探索合成においては、*in vitro* 阻害活性のみに固執することなく、創薬シード創出を念頭に、経口吸収性等の *in vivo* 薬効極大化も念頭に置き、探索合成研究を実施する。最後の(3)臨床を目指した *in vivo* 有効性データの取得においては、製薬企業出身グループの特徴を活用し、臨床の医師や患者様への有効性の取得を念頭に置き、臨床応用を志向した *in vivo* データの取得に注力する。以下、各項目について詳細に記載する。

(1)HUHS015 より強力な新規 PCA-1 阻害剤創出

これまでランダム・ヒット化合物から HUHS015 を初めとする新規 pyrazole 誘導体を創出してきたが、*in vitro* における PCA-1 阻害活性は $IC_{50}=0.67 \mu M$ と一応満足レベルにはあるものの、さらに強力な PCA-1 阻害活性を有する化合物創出が望まれている。本目標のために、ターゲット蛋白質と阻害剤の複合体構造を活用した SBDD(Structure based drug design)は有力な手法と考えられる。なお、研究代表者は製薬企業時代に SBDD を用いた検討により臨床開発化合物 FK633 開発に成功

している。既に、別グループによって、本研究ターゲット蛋白質 PCA-1 (別名 ABH3) は結晶構造が報告されており (図 2, PDB-NO. 2IUW)。当該構造を用いたデザインを試みてきた。しかし、報告されている構造では、結合ポケットに基質物質 2-oxoglutaric acid があるが、これまでの研究では HUHS015 をこの部位に上手く置き換えたモデルが構築できず、PCA-1 構造が 2-oxoglutaric acid 結合時と HUHS015 結合時と異なっている可能性が示唆されている。

a. 報告されているPCA-1構造 (PDB #2IUW) b. 共同研究先によるHUHS015/PCA-1複合体構造(現在、精密化作業中)

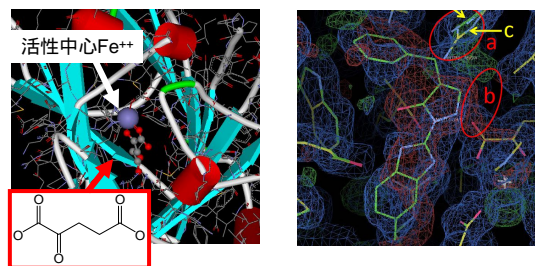


図2 SBDDに向けたPCA-1構造解析の現状

実際、2-oxoglutaric acid は活性中心の鉄イオンに配位した構造を有しているが、HUHS015 は塩基性も弱く (塩酸塩も形成しない) 2-oxoglutaric acid と同様な鉄イオンとの配位構造を形成しているとは思えず、HUHS015 - PCA-1 複合体構造モデル構築は困難な状況にある。そこで、我々は研究協力者・井上(阪大・工)と連携し、HUHS015/PCA-1 共結晶の取得およびその構造解析を進めている (図 2 b)。当該結晶構造が得られ次第、SBDD 研究を積極的に取り入れ、より強い PCA-1 阻害活性を有する化合物の創出を目指す計画である。また、結晶構造が得られない場合も想定し、これまでの構造活性相関をベースにした探索合成を継続する。その際、(2) で述べる、経口吸収性なども含めた総合的な創薬研究を行う計画である。すでに、図 3 に示すように一定の diversity を有するシード/リード化合物群を取得している。

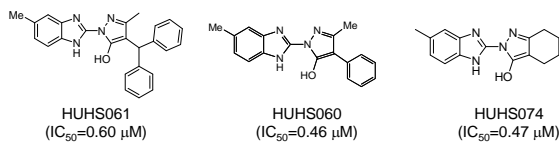


図3 これまでに見いだされたHUHS015後継化合物候補例

(2) HUHS015 の経口吸収性向上を目指した探索合成

HUHS015 は予備的な経口吸収性の検討から、ラットにおける bioavailability (BA) は 7.2% であることが判明している。この BA 値は HUHS015 誘導体が一定の経口吸収性を有しているが、経口剤として開発するには不十分であることを示している。そのため、我々は予

備試験として、HUHS015 の経口吸収性および体内安定性の問題点抽出を行ってきた。一般に低分子化合物は、経口吸収性に関する至適な疎水性 (CLOGP 値などで表現) を有する 경우가多いが、HUHS015 関連誘導体の経口吸収性を測定した結果、図 4 に示されるような負の相関関係が得られた。一般的な受動拡散による細胞膜透過性に関する至適な CLOGP が 3 から 4 くらいと考えても、この結果は HUHS015 誘導体の経口吸収性は単純な受動拡散による細胞膜透過性以外の要素にも強く支配されていることを示唆していると考えられる。そこで、我々は HUHS015 が小腸での吸収後に肝臓で代謝を受けていると考え、HUHS015 の被代謝候補部位をマスクした誘導体合成を行い、ラット肝臓代謝酵素混合物 S9 mix との反応における安定性と経口吸収性の相関関係を検討した。その結果、図 5 に示されるように、両者に正の相関関係があることが明らかとなった。そこで、本研究では、経口吸収性向上を目指し、被代謝候補部位の消去を考慮したドラッグデザインを行う計画である。すでに図 3 に示される新しい誘導体の創出に成功しており、今後これらの誘導体を中心とした創薬合成を遂行する計画である。本研究では、研究代表者が長年製薬企業の創薬現場にいた経験を活用し、代謝実験をはじめとした、総合的なドラッグデザインを遂行することによって、本研究目標達成を目指す。

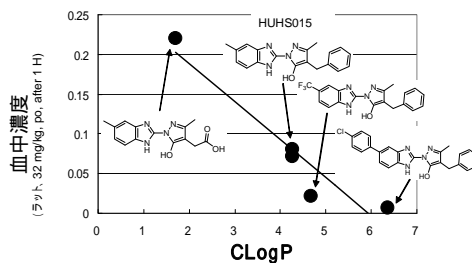


図4 CLogPと血中濃度の関係

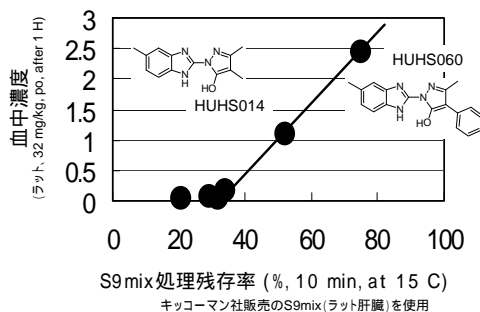


図5 HUHS015誘導体のラット経口吸収性とS9mix中での安定性の相関

(3) 臨床を目指した in vivo 有効性データの取得

PCA-1 は、臨床的に前立腺がん患者の予後に相関することから同定された酵素であり、当該癌をはじめほとんどの臨床癌において

PCA-1 が高発現しており、広い臨床癌において重要な新創薬ターゲットであることが期待されている。本研究後半では Xenograft モデルを用いた in vivo 実験などを用い、現在臨床においてホルモン非依存前立腺がんの化学療法において第一選択薬として用いられているドセタキセルとの併用効果等を早期に明らかにし、PCA-1 阻害剤の臨床応用の有効性をより明確にする。

4. 研究成果

幾つかの化合物で in vitro 酵素阻害活性および DU145 細胞増殖抑制活性が、シード化合物 HUHS015 より 10 倍程度強い化合物を複数のシリーズ誘導体で見出し、易経口吸収性も測定した。その結果、経口吸収性においても、HUHS015 より 10 倍程度強い化合物をいくつかの誘導体で見出した (表 1)。

表 1 経口吸収性スクリーニング結果例

	Structure	CLOGP	PCA-1 inh. (at uM) (カッコ内はNa塩)				DU145 inh. (at uM)				ラット血中濃度 ug/mL, po投与			
			IC50				IC50				10 mg/kg		32 mg/kg	
			10	3.3	1		10	3.3	1		30 min	60 min	30 min	60 min
HUHS015		4.87	0.87	76	60	2	75	56	12	0.055	0.049	0.054	0.14	
HUHS014		3.27	<3.3	65	60	<10	65			0.30	0.00		1.08	
HUHS_KNC-17		5.91	1.1	82	80	46	1	84	65	50	0.134	0.118		
HUHS_KNC-3		3.8	<1	39 (81)	(75)	(60)	<1	83	74	63	0.408	0.068		
HUHS157		5.1	>10	10			<1	82	71	55	0.0	0.0		
HUHS_KNC-5		4.97	>10	29			<1	84	74	59	0.06	0		
HUHS113		4.89	1.6	49 (79)	(70)	(38)	<1	78	60		1.00	0.03		
HUHS117		3.84	5.0	76 (7.9)	35 (54)	(35)	(31)	<1	77	65	0.631	0.178		
HUHS115		4.13	(1.0)	39 (75)	(49)	(50)	<1	77	63		1.02	0.73		
HUHS119		6.46	8.3	57 (63)	15 (62)	(34)	<1	80	60		0.099	0.200		
HUHS120		5.78	<1	64 (72)	38 (54)	(53)	<1	77	62	0.11	0.04			
HUHS106		3.06	<1	75 (5.4)	66 (65)	57 (27)	<10	79			0.056	0		
HUHS112		3.35	<10	60 (3.5)	60 (88)	(41)	<1	79	56		0.044	0.005		
HUHS_KNC-18		4.71	4.9	59	45	32	<1	78	68	57	0.067	0.073		

	Structure	CLOGP	PCA-1 inh. (at uM) (カッコ内はNa塩)				DU145 inh. (at uM)				ラット血中濃度 ug/mL, po投与			
			IC50				IC50				10 mg/kg		32 mg/kg	
			10	3.3	1		10	3.3	1		30 min	60 min	30 min	60 min
HUHS129		6.26	8.0	58 (5.9)	19 (61)	(24)	<1	86	54		0	0		
HUHS147		5.7	7.4	56	34		1.5	80	44		0	0		
HUHS_KNC-7 (HUHS191)		3.98	3.1	67 (82)	51 (42)	(26)	<10	75 (7.1)	57 (57)	(34)	(3)	2.01	0.1	
HUHS168		2.98	2.6	81	54	33	2.6	63	49	4	0.172	0.082		
HUHS211		0.8	4.2	75	43	20	2.3	63	55	39	0.02	0		
HUHS214		2.37	2.6	90	56	28	4.2	62	47	7	0.091	0.077		
HUHS215		3.05	1.7	89	77	29	2.8	75	55	18	0.132	0.071		
HUHS150		4.47	2.8	75 (4.3)	57 (70)	(19)	1.0	71	NT	50	0.017	0.013		
HUHS_KNC-20		NA	5.4	70	34	39	<1	86	61	52	0	0		
HUHS_KNC-9		3.97	1.5	65 (77)	61 (64)	(42)	3.6	76	48	43	0.26	0.11		
HUHS_KNC-10		4.39	<1	73	65	55	3.4	74	49	46	0.11	0.040		
HUHS_KNC-16		4.83	1.5	81	68	40	8.3	56	20	12	0.074	0		

(次頁に続く)

表 1 経口吸収性スクリーニング結果例 (続き)

	Structure	CLOGP	PCA-1 inh. (at uM) (カッコ内はNa塩)				DU145 inh. (at uM)				ラット血中濃度 ug/mL, po投与			
			IC50				IC50				10 mg/kg		32 mg/kg	
			10	3.3	1		10	3.3	1		30 min	60 min	30 min	60 min
HUHS158		3.9	>10	34			1.4	83	57	47	0.021	0.025		
HUHS_KNC-4		3.77	>10	9 (40)	(37)	(26)	1.4	84	64	45	0.011	0.011		
HUHS169		3.2	<1	82	78	72	1.3	83	67	46	0.47	0		
HUHS199			<1	83	78	70	<1	78	61	51	0.15	0		
HUHS131		4.86	4.2	69 (5.4)	45 (54)	(2)	<1	88	80		0.46	0.13		
HUHS132		5.42	<10	54 (5.5)	(62)	(40)	(26)	<1	88	80	0.002	0.226		
HUHS130		5.35	>10	12 (46)	(20)	(35)	<1	88	81		0.145	0.298		
HUHS137		5.78	>10	8 (10)	(50)	(23)	(21)	<1	88	84	0.091	0.183		
HUHS146		3.53	1.9	74	68	30	<1	87	51		1.04	0.47		
HUHS148		3.53	1.9	76	71	24	1.5	88	42		1.11	0.3		
HUHS134		5.28	>10	41 (2.7)	(73)	(52)	(40)	<1	87	79	0.15	0.12		
HUHS139		5.77	>10	43 (4.7)	(65)	(43)	(42)	<1	75	62	0.14	0.05		
HUHS140		5.84	>10	40 (7.4)	(58)	(29)	(33)	<1	77	59	0	0		
HUHS210		3.62	4	82	43	17	2.6	78	56	27	0.123	0.041		

これらの化合物について xenograft モデルを行った結果、幾つかの化合物では (HUHS199, HUHS_KNC-7 など、現在特許出願準備中、論文発表準備中) 10 mg/kg の経口投与において、ホルモン非依存性前立腺がん治療の第一選択薬ドセタキセルとの併用 (2.5 mg/kg, sc, once/week) で夫々の単剤投与に比べ、併用群において有意差付きで抑制効果を示した (図 6)。また、このとき体重、肝臓、腎臓重量にも変化無く、GOP・GPT・BUN・creatinine などの血液パラメータにも異常が認められず (図 7-8) 臨床薬との顕著な併用効果を示し、毒性が無い新規前立腺がん治療剤を創製する目標をほぼ達成することが出来た。今後、さらに最適化を進め、企業との連携を目指している。

Mean ± SE, n=7

vs. DTX (単独)
*, **, *** : p < 0.1, 0.05, 0.01 by t-test

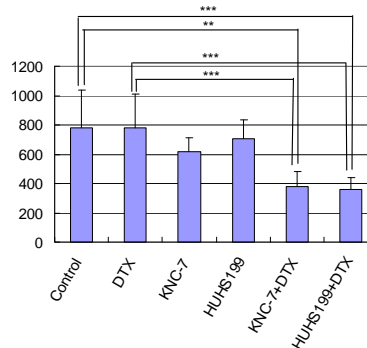
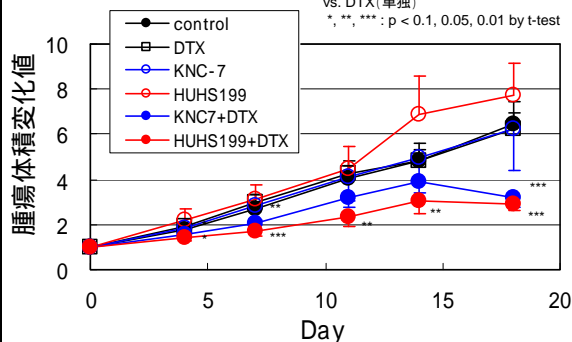


図 6 Xenograft モデル結果 (本文参照) 上段 経時変化、下段最終日 (体重、血液パラメータは図 8、9 に提示)

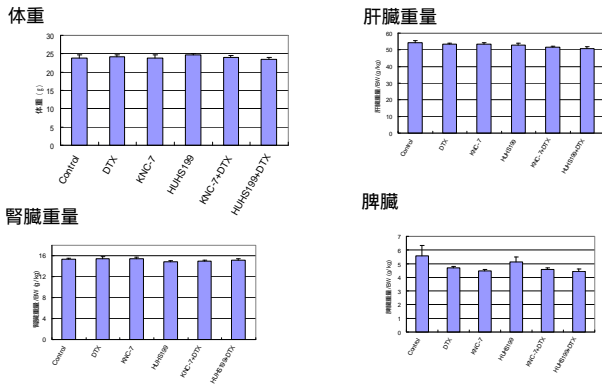


図7 Xenograft モデル最終日における体重、肝臓・腎臓・脾臓の変化（対コントロール比較）

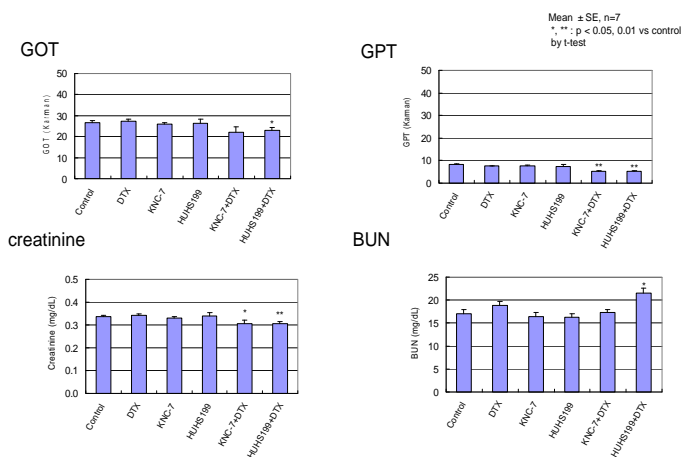


図8 Xenograft モデル最終日における血液パラメータの変化（対コントロール比較）

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2件)
Miyuki Mabuchi, Masahiro Ueda, Yuri Yoshida, Kota Horiike, Kenta Yamaoka, Syuhei Nakao, Tadashi Shimizu, Yuko Ueda, Kazutake Tsujikawa, Akito Tanaka. "Systematic Trial for Evaluating Docetaxel in a Human Prostate Cancer Cell DU145 Xenograft Model", *Anticancer Res* **37** (4) 1665-1676 (2017) doi:10.21873/anticancer.11496. (査読有)

Mabuchi M, Shimizu T, Ueda M, Sasakawa Y, Nakao S, Ueda Y, Kawamura A, Tsujikawa K, Tanaka A. "Improving the Bioavailability and Anticancer Effect of the PCA-1/ALKBH3 Inhibitor HUHS015 Using Sodium Salt", *In Vivo*, **29**(1), 39-43 (2015). (査読有)

〔その他〕
ホームページ:
<http://www2.huhs.ac.jp/~h070016a/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
田中 明人 (TANAKA, AKITO)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号：30454789
(2)連携研究者
辻川 和丈 (TSUJIKAWA, KAZUTAKE)
大阪大学・薬学研究科・教授
研究者番号：10207376

- (3)研究協力者
所(馬淵) 美雪 (TOKORO-MABUCHI, MIYUKI)
兵庫医療大学・薬学部・研究員
研究者番号：60714897

井上 豪 (INOUE, TAKASHI)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号：20263204