

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590110
 研究課題名（和文） DDSを指向したヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の創生
 研究課題名（英文） Synthesis of Histone Deacetylase Inhibitors Toward the Development of DDS
 研究代表者
 長岡 康夫（NAGAOKA YASUO）
 関西大学・化学生命工学部・准教授
 研究者番号：90243039

研究成果の概要：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACI)はエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与し、主に分子標的抗がん剤としての臨床および前臨床開発が盛んにおこなわれている。本研究では、HDACI に細胞内分解性のリンカーを介して脂質を結合したプロドラッグを合成した。本プロドラッグを含む正電荷ナノ粒子ベクターを開発し、ヒトがん細胞に対する外部遺伝子導入効率を従来法の2から4倍上昇させることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：非ウイルスベクター、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、ナノ粒子、遺伝子発現、HDAC

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が、がんの増殖抑制作用や、分化促進作用を有することが明らかにされ、この HDAC 阻害剤が新たな分子標的抗がん剤として注目されるようになった。そこで、我々は独自にバクテリア由来ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 様タンパク質 (HDLP) 並びにヒト由来 HDAC8 の 3 次元 X 線解析構造を基に、新規 HDAC 阻害剤を設計した。その結果、IC₅₀ 39 nM の HDAC 阻害活性を示

し、がん抑制遺伝子 p21/WAF1 の転写、翻訳を強く誘導する新規 HDAC 阻害剤 K-32 を見出した。[参考文献1] 本化合物は、マウス白血病細胞 P388 移植動物モデル試験で顕著な延命効果 (T/C = 185%、5 匹中 1 匹は腫瘍完全消失) を示し、且つ、ヒト結腸がん細胞 HT-29 移植ヌードマウス (Xenograft) 試験で T/C ~65% の腫瘍増殖抑制効果を示した。以上の結果から本 HDAC 阻害剤は in vivo で確かな効力があり、そのデザインは、最適化構造に近づいていることを実感した。しかしながら、K-32 には、溶解性や代謝安定性な

どの物性に問題があった。そこで、K-32 の基本構造は維持し、そのヒドロキサム酸基やアミド基に代わり、代謝安定性向上官能基(2-アミノアニリン基、2-ヒドロキシアニリン基など)や、水溶性向上官能基(ヒドロキシアシルアミノ基)を導入した化合物群をデザインし、構造の最終的最適化を目指した。その結果、K-32 と同等の活性を有したまま、物性が向上した化合物群 K-182 の創生に成功した。[参考文献2]

K-182 は分子内に活性中心であるヒドロキサム酸を含む一連の HDAC 阻害剤の一種であるが、このヒドロキサム酸の血中での代謝安定性や毒性が問題となり、これが障害となり HDAC 阻害剤の適用範囲を狭める結果となっている。そこで本研究では K-182 を DDS 化して、これらの問題を克服することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、この K-182 を中心とする HDAC 阻害剤開発の更なる展開として、本化合物群に DDS を指向したプロドラッグ化を施し、生物学的利用率の向上、動態の改善、体内分布の制御、がん細胞への標的化などを目指すこととする。また、抗がん剤以外の用途においても、HDAC 阻害剤の特性を生かした DDS 製剤化を目指す。

特に、現在、最先端医療としてその発展が期待される遺伝子治療や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)技術の進展において、効率的な外来遺伝子の細胞内導入とその発現法の開発が鍵となっている。この様なニーズのもと、近年、ウイルスベクターに替わる、安全性が高く効率の良い外来遺伝子細胞内導入法の開発研究が活発に行われている。その中で、毒性や抗原性が少ない正電荷コレステロールを主成分とするナノ粒子(NP)を使った方法が注目されており、共同研究者である服部、米谷らも cholesteryl-3'-carboxyamidoethylene-N'-hydroxyethylamine と Tween 80 を構成成分とする正電荷 NP (NP-OH)が高い遺伝子導入効率を示すことを見出している。[参考文献3] 本研究では NP-OH などの正電荷 NP に親和性が高く、その成分として添加することにより、導入遺伝子の発現効率上昇を可能にする、プロドラッグ化ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) を合成し、その効果を調べた。以下にその方法と得られた結果について概説する。

3. 研究の方法

(1) DDS を目指した HDAC 阻害剤を含むナノ粒子製剤化の検討

HDAC 阻害剤のナノ粒子製剤化の試みとして、リボソーム封入と、正電荷ナノ粒子への混合を行い、製剤化を目指した。しかしながら、K-182 の特性上、K-182 そのものを使った製剤化は困難であった。そこで、K-182 を化学修飾し、プロドラッグ化することにより、製剤化可能な分子の創生を試みた。

(2) DDS 製剤化を目指した HDAC 阻害剤プロドラッグの設計と合成

プロドラッグの基質となる HDAC 阻害剤には我々が開発した K-182 を用いた。当初、K-182 と正電荷コレステロールとを直接混合した製剤を調整しようとしたが、K-182 と親和性が低く、安定な製剤ができなかった。そこで、K-182 のアルコール性水酸基もしくはヒドロキサム酸の水酸基にラウリン酸やコレステロール誘導体をエステル結合あるいはジスルフィドカーボネートリンカーを介して結合したプロドラッグ化 K-182 を合成し、DDS 製剤化を試みた。(図1)

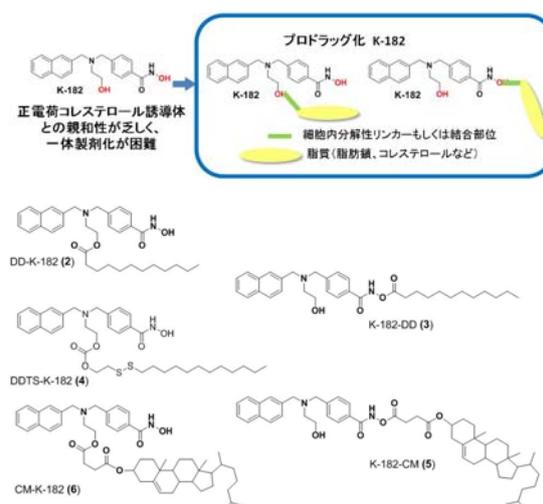


図1. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 K-182 のプロドラッグ化

K-182 は2つのヒドロキシル(OH)基が存在し、そこに他の官能基をエステル結合を介して結合することができる。無保護の K-182 に縮合剤として DCC-DMAP の存在下、ラウリン酸を作用させると、酸性度の高いヒドロキサム酸に選択的にラウリン酸がエステル結合した、モノエステル K-182-DD が得られた。(図2)

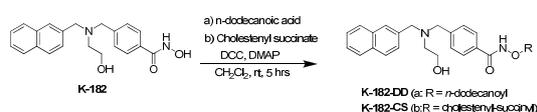


図2. K-182-DD の合成経路

一方、もう一方のヒドロキシエチル基への縮合はヒドロキサム酸を THP で保護した化合物を基質として合成し、DD-K-182 を得た。

(図 3)

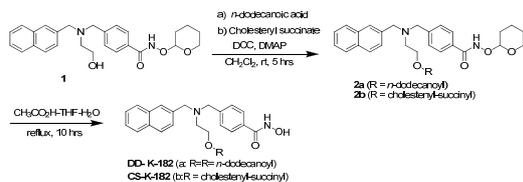


図 3. DD-K-182 の合成経路

同様の方法で 2 種類のコレステリルエステル、K-182-CM と CM-K-182 を合成した。

(図 2, 3)

さらに、図 4 に示す反応により、細胞内で生分解されるよう設計された、プロドラッグ DDTS-K-182 を合成した。すなわち、化合物 1 と triphosgene を反応させて生成する酸塩化物中間体に 2-(2-pyridinyldithio)ethanol を反応させて化合物 3 を得て、これに dodecanethiol を縮合した後、THP を脱保護して DDTS-K-182 を得た。

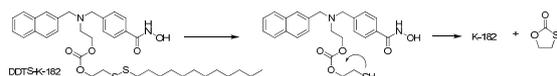


図 4. ジスルフィドカーボネートリンカーの生分解過程

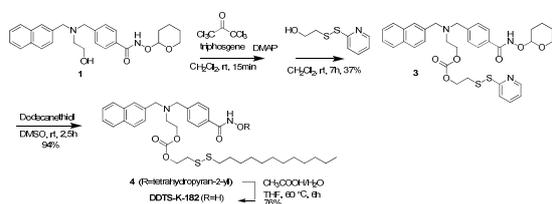


図 5. DDTS-K-182 の合成経路

以上の合成反応により、5 種類の K-182 プロドラッグの合成に成功した。

以下に、詳しい実験項を示す。

①DD-K-182 の合成

2-[4-[(hydroxyamino)carbonyl]benzyl] (2-naphthylmethyl)amino]ethyl laurate (DD-K182)

2-[(2-naphthylmethyl) (4-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)amino]carbonyl)benzyl] amino]ethyl laurate (16.5 mg, 26.8 μmol) に酢酸 (2.0 ml)、THF (1.0 ml)、 H_2O (0.5 ml) の混合溶液を加え 60°C で 10 時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮後、得られた濃縮混合物を SiO_2 TLC (展開溶媒: EtOAc/hexane=1/2) で精製し、目的の褐色油状化合物 DD-K-182

(11.5 mg, 21.6 μmol , 収率 80.6%) を得た。HR-FAB-MS m/z: 533.3373 (calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_4$, 533.3301).

②CM-K-182 の合成

1-cholest-5-en-3-yl 4-[2-[[4-[(hydroxyamino)carbonyl]benzyl] (2-naphthylmethyl)amino]ethyl] succinate (CM-K182)

1-cholest-5-en-3-yl 4-[2-[(2-naphthylmethyl) (4-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)amino]carbonyl)benzyl] amino]ethyl] succinate (3) (33.0 mg, 36.6 μmol) に酢酸 (2.0 ml)、THF (1.0 ml)、 H_2O (0.5 ml) の混合溶液を加え 60°C で 7 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、得られた混合物を SiO_2 TLC (展開溶媒: EtOAc/hexane=2/3) で精製し、目的の褐色油状化合物 DD-K-182 (18.4 mg, 22.5 μmol , 収率 61.5%) を得た。

HR-FAB-MS m/z: 819.5304 (calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_2\text{O}_6$, 819.5234).

③K-182-CMの合成

cholest-5-en-3-yl 4-[[[4-[(2-hydroxyethyl) (2-naphthylmethyl)amino]methyl]benzoyl]amino]oxy]-4-oxobutanoate (K-182-CM)

K-182 (21.2 mg, 60.5 μmol) の CH_2Cl_2 (2.0 ml) 溶液に、Cholesteryl succinate (29.5 mg, 60.5 μmol)、DCC (12.5 mg, 60.5 μmol)、DMAP (7.4 mg, 60.5 μmol) を加え、室温で 6 時間攪拌した。反応液から沈殿物を濾過して除いた後、濾液を減圧濃縮し、得られた混合物を SiO_2 TLC (EtOAc/hexane=4/5) で精製し、目的の無色油状化合物 K-182-CM (10.5 mg, 12.8 μmol , 収率 21.2%) を得た。

HR-FAB-MS m/z: 819.5320 (calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_2\text{O}_6$, 819.5234).

④K-182-DDの合成

N-(dodecanoyloxy)-4-[[[2-(hydroxyethyl) (2-naphthylmethyl)amino]methyl]benzamide (K-182-DD)

K-182 (33.2 mg, 94.6 μmol) の CH_2Cl_2 (4.0 ml) 溶液に、Lauric acid (19.0 mg, 94.6 μmol)、DCC (19.5 mg, 94.6 μmol)、DMAP (11.56 mg, 94.6 μmol) を加え、室温で 5 時間攪拌した。反応液から沈殿物を濾過して除いた後、濾液を減圧濃縮し、得られた混合物を SiO_2 TLC (EtOAc/hexane=1/1) で精製し、目的の無色油状化合物 K-182-DD (12.23 mg, 22.96 μmol , 収率 24.3%) を得た。

HR-FAB-MS m/z: 533.3370 (calcd for

C₃₃H₄₅N₂O₄, 533.3301).

⑤DDTS-K182の合成

2-(dodecylsulfanyl)ethyl
2-[[4-[(hydroxyamino)carbonyl]benzyl}(2-naphthylmethyl) amino]ethyl carbonate (DDTSK-182)

2-(dodecylsulfanyl)ethyl
2-[(2-naphthylmethyl) (4-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy) amino]carbonyl)benzyl]amino]ethyl carbonate (5)^{ref 1} (29.0 mg, 39.0 · mol) の THF/ H₂O (2/1) (0.60 ml) 溶液に酢酸 (0.80 ml) を加え、60°C で 6 時間攪拌した。その後、反応液を減圧濃縮し、油状の残渣を得た。これを分取 SiO₂ TLC (展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン = 1/2) にて精製することにより、目的の無色油状化合物 DDTSK-182 (19.0 mg, 収率 76.0%) を得た。

¹H NMR (399.65 MHz, CDCl₃) δ: 1.254 (23H, m, SSCH₂-(CH₂)₁₀CH₃), 2.694 (2H, t, J = 10.6 Hz, SS-CH₂-CH₂), 2.814 (2H, m, N-CH₂-CH₂), 2.898 (2H, m, OCOOCH₂-CH₂-SS), 3.726 (2H, s, N-CH₂-Ar), 3.800 (2H, s, Ar-CH₂-N), 4.242 (2H, m, N-CH₂-Ar), 3.796 (2H, s, Ar-CH₂-N), 4.247 (2H, m, OCOO-CH₂-CH₂), 4.340 (2H, m, CH₂-CH₂-OCO), 7.465-7.807 (11H, m, Ar-H). IR (neat) cm⁻¹: 3300, 3026, 2928, 2855, 1730, 1653, 705. HR-FAB-MS m/z: 654.3243 (calcd for C₃₆H₅₁N₂O₅S₂ [M+H⁺], 655.3239).

(3) ナノパーティクル製剤生成の最適化

K-182 プロドラッグを含むナノ粒子製剤の作成にあたり、K-182 プロドラッグの濃度とナノ粒子製剤の濃度について最適化を行った。この最適化にあたり、プロドラッグとしては K-182-DD を用いた。ナノ粒子は正電荷コレステロールをベースとする正電荷ナノ粒子とし、改良エタノール注入法で作成した。表 1 にナノ粒子製剤の構成成分比を示す。

このナノ粒子はオリジナルの NP-OH に 5 から 20% の K-182-DD を加えたものを作成し、それぞれのナノ粒子を NP-5K, NP-10K, NP-20K とした。このそれぞれのナノ粒子に対して 3/1 の電荷比になるように正電荷ナノ粒子と DNA を混合し、nanoplex を形成し、ルシフェラーゼ安定発現前立腺がん細胞株 PC-3-Gluc 細胞に作用させて、その遺伝子発現を観測した。その結果を図 6 に示す。図 6 に示す結果から、20 または 10 μM の NP の濃度の際、K-182-DD の含有率が高い NP ほど高い遺伝子発現効率を示した。しかしながら、20 μM NP-20K の製剤の細胞毒性 (cell viability: 19.6% of total cells) はコント

ロールの NP-OH や NP-10K のそれ (それぞれの cell viability: 49.4% and 34.3%) に比較して顕著であったため、今後の実験では、10 μM NP-10K の条件でナノプレックスを細胞に作用させることにした。K-182-DD 以外のプロドラッグ化 K-182 についても、それぞれナノ粒子化に成功した。表 2 にそれぞれの平均粒子径を示す。

Table 1. Formulae of cationic NPs

NP -formulation	Components (mol%)		
	OH-Chol	Tween 80	K-182-DD
NP-OH	95	5	0
NP-5K	90	5	5
NP-10K	85	5	10
NP-20K	75	5	20

^a Nanoparticles were prepared with a cationic cholesterol (OH-Chol), tween 80 and K-182-DD using modified ethanol injection method as 1 mg/ml suspension in water. NP-OH is consist of 95 mol% OH-Chol and 5 mol% Tween 80 without K-182-DD.

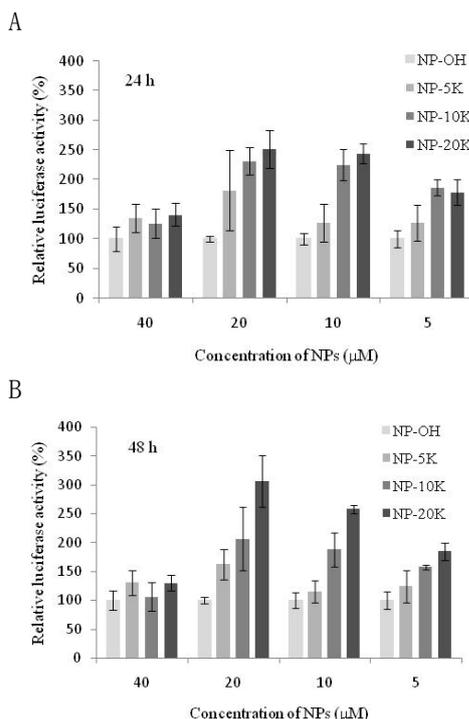


図 6. NP-OH, NP-5K, NP-10K および NP-20K の PC-3-Gluc 細胞に対する遺伝子発現増強効果。それぞれの NP と DNA とを電荷比 1/3 で混合して作成したナノプレックスを細胞に 5-40 μM の濃度で混合し、24 時間 (A) もしくは 48 時間 (B) 培養した。

Table 2. The average particle sizes of nanoparticles.

Compounds	Average particle size of NPs (nm)
NP (Cont)	165.3
K-182-DD	158.1
DD-K-182	176.7
CM-K-182	137.9
K-182-CM	140.4
DDTS-K-182	146.3

3. 研究結果

(1) HDAC 阻害剤プロドラッグの創生

プロドラッグの基質となる HDAC 阻害剤には我々が開発した K-182 を用いた。当初、K-182 と正電荷コレステロールとを直接混合した製剤を調整しようとしたが、K-182 と親和性が低く、安定な製剤ができなかった。そこで、K-182 のアルコール性水酸基もしくはヒドロキサム酸の水酸基にラウリン酸やコレステロール誘導体をエステル結合あるいはジスルフィドカーボネートリンカーを介して結合したプロドラッグ化 K-182

(K-182-DD, DD-K-182, CM-K-182, K-182-CM, DDTS-K-182) を合成し、研究方法で記述した方法によりナノ粒子製剤化を試みた。このプロドラッグ化 K-182 を構成成分として 10 mol% 含む NP-OH を調製したところ、粒径が 100 ~ 150 nm の安定なナノ粒子を形成することができた。

(2) DNA-ナノ粒子複合体ベクター (ナノプレックス) の形成とその遺伝子導入効率

K-182 プロドラッグを含むナノ粒子の懸濁液 (約 10 µg NP) に DNA (pGluc プラスミド, 2 µg) を加え、緩やかに攪拌したのち、室温で 10 分間放置した。これにより、DNA-ナノ粒子複合体ベクター (ナノプレックス) を形成した。この複合体混合液を培地に希釈し 1 ml として、これを培養細胞に加えて 24 時間培養した。今回は培養細胞としてヒト前立腺がん細胞 PC-3 とヒト乳がん細胞 Sk-Br-3 を用いて導入された pGluc プラスミドの発現効率をルシフェラーゼアッセイ法で調べ、評価した。

上記方法による遺伝子導入とその発現効率を調べた結果、DD-K-182, K-182-DD, DDTS-K-182 を含むナノ粒子 (NP-DD-K182, NP-K182-DD, NP-DDTS-K182) は対照のナノ粒子 (NP) に比べて、両細胞において 2 から 4 倍の遺伝子発現増強効果を示した。一方、PC-3 細胞においてコレステリル基を有する

CM-K-182, K-182-CM を含むナノ粒子 (NP-CM-K-182, NP-K-182-CM) は有意な遺伝子発現増強を示さなかった。細胞培養液に修飾していない K-182 を混合した系では、NP と比較して顕著な遺伝子発現増強作用が見られなかったことから、K-182 のプロドラッグ化が効果の発現に重要であることが示唆された。(図 7)

ここで、HDAC 阻害剤は細胞内ヒストンタンパク質のアセチル化亢進作用により、転写活性化を引き起こされることが知られている。2 µM 相当の DD-K-182, K-182-DD, DDTS-K-182 を含むナノ粒子と遺伝子の複合体とを PC-3 細胞に添加した時にも、K-182 のみを細胞に添加した時と同様にヒストンタンパク質のアセチル化を亢進することが western blotting 法を用いた実験で明らかになった。

(図 8)

以上の結果から、プロドラッグ化 K-182 を含むナノ粒子はヒトがん細胞に対する、有効な遺伝子導入・発現増強剤であり、従来のナノ粒子のみの導入法に比べて、PC-3 細胞と Sk-Br-3 細胞においては、2 から 4 倍の遺伝子発現効率を示すことが明らかになった。この発現増強作用が細胞核内のヒストンタンパク質のアセチル化亢進に起因することが示唆された。

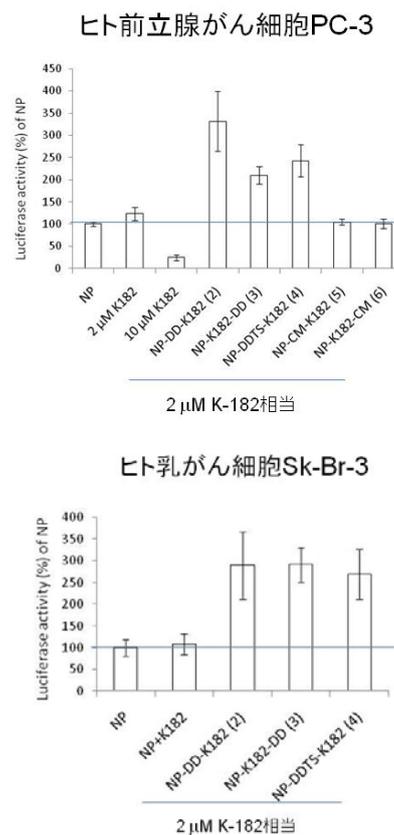


図 7. ヒト前立腺がん PC-3 細胞および乳がん Sk-Br-3 細胞に対する導入遺伝子の発現増強作用

参考文献

- (1) 上里新一、長岡康夫、矢守隆夫：N-ヒドロキシカルボキサミド誘導体 PCT/JP03/01681 (2003)
- (2) Y. Nagaoka, T. Maeda, Y. Kawai, T. Nakashima, T. Oikawa, K. Shimoke, T. Ikeuchi, H. Kuwajima, S. Uesato, Eur. J. Med. Chem. 41 697-708 (2006)
- (3) Y. Hattori, W. Ding, Y. Maitani, J. Control. Release, 120, 122-130 (2007)

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)

- ① Yasuo Nagaoka, Kota Otsuki, Tetsuro Fujita, Shinichi Uesato, Effects of Phosphorylation of Immunomodulatory Agent FTY720 (Fingolimod) on Antiproliferative Activity against Breast and Colon Cancer Cells, Biol Pharm. Bull. 31(6), 1177-1181 (2008). 査読有
- ② Yasuo Nagaoka, Lijun Shang, Arijit Banerjee, Hagan Bayley, and Stephen J. Tucker. Peptide Backbone Mutagenesis of Putative Gating Hinges in a Potassium Ion Channel ChemBioChem 9, 1725-1728 (2008). 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 石井佑太、山田敏晴、濱本和隆、田中菜津子、上里新一、長岡康夫、服部喜之、米谷芳枝、非ウイルスベクターによる外部導入遺伝子の発現を増強するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤プロドラッグの開発、日本薬学会第129年会(国立京都国際会館) 要旨集4 P.215、2009年3月26-28日
- ② 清川真吾、長岡康夫、上里新一、硫黄原子を有する新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の創生、日本薬学会第129年会(国立京都国際会館)要旨集2 P.151、2009年3月26-28日
- ③ 上里新一、清川真吾、平田佳之、長岡康夫、芝野真喜雄、谷口雅彦、安田正秀、馬場きみ江、新規経口ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤K-197の抗腫瘍効果について、日本薬学会第129年会(国立京都国際会館) 要旨集2 P.151、2009年3月26-28日

- ④ 長岡康夫、山田敏晴、石井佑太、濱本和隆、田中菜津子、上里新一、服部喜之、米谷芳枝、正電荷ナノ粒子ベクターによる外部導入遺伝子の発現を増強するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤プロドラッグの開発、第27回メディシナルケミストリーシンポジウム(メルパルク大阪) 要旨集p.330-332、2008年11月26-28日

- ⑤ 清川真吾、前田泰司、平田佳之、長岡康夫、上里新一(大阪薬大) 芝野真喜雄、谷口雅彦、安田正秀、馬場きみ江、経口性ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤K-197の開発、第27回メディシナルケミストリーシンポジウム(大阪) 要旨集p.142-143、2008年11月26-28日

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

(国内特許)

発明者：長岡康夫、服部喜之、上里新一、米谷芳枝

出願人：学校法人関西大学、遺伝子発現増強剤およびそれを用いた遺伝子発現増強方法特願2008-189946

出願日：平成20年7月23日

[その他]

ホームページ

<http://pharm.life-bio.kansai-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 康夫 (NAGAOKA YASUO)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：90243039

(2) 研究分担者

服部 喜之 (HATTORI YOSHIYUKI)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90350222

(3) 連携研究者

上里 新一 (UESATO SHINICHI)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：50111969