

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590152

研究課題名(和文) 血中安定性の向上とEPR効果を付与したヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の開発と応用

研究課題名(英文) Development of PEGylated Histone Deacetylase Inhibitor Having Prolonged Blood Retention and EPR effect

研究代表者

長岡 康夫 (Nagaoka, Yasuo)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：90243039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドロキサム酸タイプのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDI)は、血中半減期が極めて短く、そのことが広範な固形がん等への適用を妨げている。この欠点を克服するため、ヒドロキサム酸部位をPEG化ペプチドにより保護し、さらにその分子を安定ミセル化したPEG-peptide-SAHAミセル製剤を合成した。この分子を固相法により合成した後にミセル化し、分子間SS結合で安定化し、平均直径40nmのナノ粒子とした。このミセルは高い血中安定性を示すことが示唆された。さらに、ヒト結直腸がん細胞HCT116の増殖抑制活性を有し、48時間後のその効果は、同濃度の未修飾SAHAのそれらに比べて高かった。

研究成果の概要(英文)：Since the hydroxamate type histone deacetylase inhibitor (HDI) like SAHA is readily degraded in physiological conditions, it has low bioavailability and is not applicable to the solid cancer so far. In order to overcome this drawback, we protected hydroxamic acid moiety with a polyethylene glycol (PEG) peptide conjugate and form micelle expecting to provide stealth effect and EPR (enhanced permeability and retention) effect to prolong the blood retention and to enhance the drug accumulation to the cancer tissue. PEG-peptide-SAHA is synthesized with coupling of SAHA with PEG-peptide prepared by solid-phase method. Micelles, whose average diameter is 40 nm, were formed and the molecules in the micelles were linked each other with S-S bonds to stabilize them. Retention of the molecule in blood, as well as anti-proliferative activity of PEG-peptide-SAHA micelle was higher than that of intact SAHA, indicating that PEGylated SAHA can efficiently act as prodrug of HDI.

研究分野：医薬品化学

キーワード：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 HDAC PEG 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

現在開発されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDI) は、酵素の亜鉛に結合する部位の化学構造の違いから、ヒドロキサム酸型、ベンズアミド型、チオール型、脂肪酸型、エポキシケトン型などに分類されている。これらの型の違いが、阻害活性のアイソザイム特異性に関連していることが知られている。これらの HDI のうち、ヒドロキサム酸型の vorinostat が皮膚 T 細胞リンパ腫に対する経口治療薬として、米国食品医薬品局 (FDA) で 2006 年に承認されている。我々も 10 年来、抗がん剤としての HDI 候補化合物の開発研究を進めてきた。それと同時に HDI のエピジェネティックな遺伝子発現制御効果を利用した機能分子の創製にも取り組んできた。最近プロドラッグ化 HDI をリポフェクションエンハンサーとして、商品化に向けた開発も進めている。

今後 HDI を抗がん剤として広く適用拡大していくために求められる改善点は、血中安定性の向上、血中滞留性の向上、固形がんへの集積効果などである。特に、臨床応用が最も進んでいる、ヒドロキサム酸型 HDI の血中半減期が 1 時間以内と極めて短いことから、この点の改善が切実に求められる。

2. 研究の目的

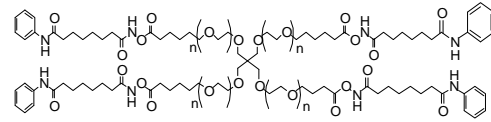
我々は抗がん剤としての HDI 候補化合物の創製と探索を行うと同時に、HDI のエピジェネティックな遺伝子発現制御効果を利用した機能分子の創製に取り組んできた。今後 HDI が固形がんを標的とした抗がん剤として広く適用されるためには、現状の問題点を克服する、新たな展開が必須となる。そこで、本研究では、本剤の弱点である血中安定性の改善と EPA 効果の併授を期待した、高分子キャリア - HDI 複合体を合成し、その効果を評価する。また、その発展型として、HDI のがん細胞特異的な遺伝子発現増強効果を加味した、高分子遺伝子キャリア - HDI 複合体による、がんの遺伝子治療との相乗効果の可能性を探る。

3. 研究の方法

本研究課題の実験は、化合物の有機化学合成、製剤化、生物学的試験からなる。いずれも、当該研究体制においては、今までの研究課題の遂行の過程で十分に確立された方法である。研究開始当初においては、すでに合成が完了している HDI-ポリエチレングリコール (PEG)-脂質をリポソーム製剤化し、それらががん細胞に対する効果や、マウス Xenograft モデルにおける、がん細胞縮退効果を評価する。さらに、各種 PEG 化 HDI を合成し、同様の評価を行い、これらに効果が認められる場合、血中滞留性や EPR 効果の有無について詳しく調べる。その後、PEG 化 HDI のバリエーションをさらに増やし、その効果を基に、構造の最適化を行う。

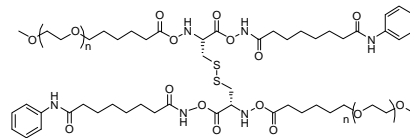
4. 研究成果

当初は 4arm-PEG に vorinostat (SAHA) を縮合した化合物、4arm-PEG-SAHA を合成したが、これは SAHA が外側に結合しているため、血中投与後、瞬時に SAHA 分子が解離してしまい、製剤としての機能を果たせなかった。



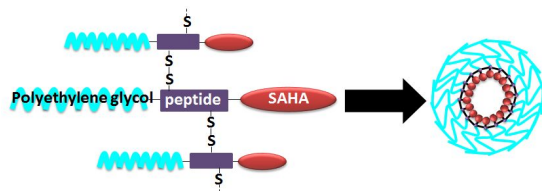
4arm-PEG-SAHA

この結果を受けて、次に、ミセル構造を形成させ SAHA を内側に配置することで、酵素による解離を防ぎ、ジスルフィド結合の導入で希釈によるミセルの崩壊を回避することを期待した化合物、(PEG-Cys-SAHA)₂ を合成した。SAHA の製剤中への内包化とジスルフィド結合の導入によって血中安定性は向上したが、1 分子中の SAHA とジスルフィド結合の数が少なく、優れた効果を発揮するには至らなかった。



(PEG-Cys-SAHA)₂

そこで、これらの結果を踏まえた改善策として、PEG-SAHA の分子間にペプチドを導入することで、複数のジスルフィド結合でミセルを強固にすると共に、SAHA の結合数を増加させることにした。これにより、製剤ミセルとしての血中での安定性と抗腫瘍効果の向上が期待できると考えた。



PEG-peptide-SAHA micelle

(1) PEG-peptide-SAHA の合成

Alko Resin または TrtA-PEG Resin を用いた固相合成により、ヘキサペプチド H-Gly-Cys-Cys-Glu-Glu-Glu-Resin を合成し、最後に PEG を縮合した。TFA/H₂O で樹脂から化合物を切り出し、精製し 67.2% の収率で PEG-peptide を得た。このペプチドの C 末端および Glu 側鎖のカルボキシ基に、SAHA を、縮合剤 DIPCI を用いて縮合した。精製はゲル濾過クロマトグラフィーで行い、目的の化合物 PEG-peptide-SAHA を 64.8% の収率で得た。

(2) PEG-peptide-SAHA のミセル化

PEG-peptide-SAHA に 60 に加温した水を加えて、ミセル化した後、ヨウ素を加えてジスルフィド結合を形成させた、透析膜を用いて精製し、PEG-peptide-SAHA micelle を 37.2%の収率で得た。化合物は、MALDI-TOF-MS と NMR を用いて確認した。

(3) 細胞増殖抑制活性試験

ヒト大腸がん細胞 HCT116 に PEG-peptide-SAHA micelle、PEG-peptide (monomer と micelle)、SAHA を添加し、薬剤添加 24, 48, 72 時間後に WST-8 assay を行って、細胞増殖抑制活性を調べた。

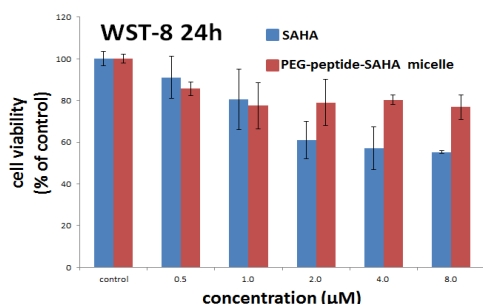


Fig. 1 薬剤添加 24 時間後の細胞生存率

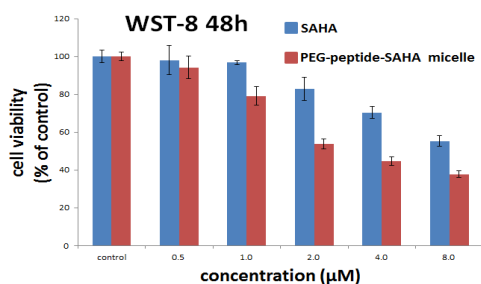


Fig. 2 薬剤添加 48 時間後の細胞生存率

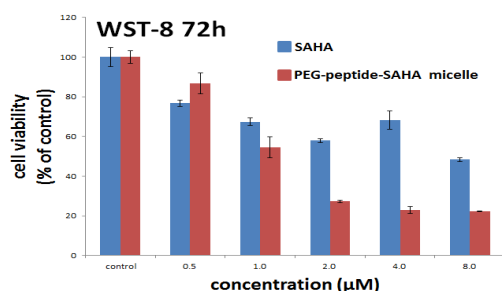


Fig. 3 薬剤添加 72 時間後の細胞生存率

薬剤添加 24 時間後の PEG-peptide-SAHA micelle は SAHA に比べて明らかに活性が低い結果となった (Fig. 1)。しかし薬剤添加 48、72 時間の PEG-peptide-SAHA micelle は SAHA と比べて有意な差を示した (Fig. 2, 3)。また PEG-peptide と PEG-peptide micelle の両薬剤は添加後 72 時間経過しても細胞毒性を示さなかった (Fig. 4)。

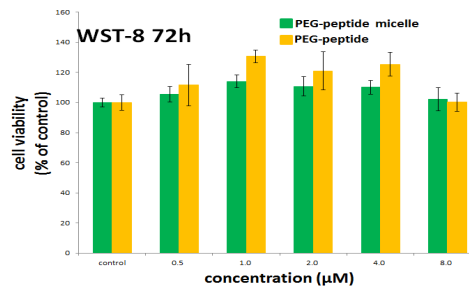


Fig. 4 薬剤添加 72 時間後の細胞生存率

PEG-peptide は固相合成によって合成したが、固相法に用いる樹脂の種類が収率に大きく影響した。Alko Resin の密度は 0.93 mM/g であるのに対して TrtA-PEG Resin は 0.23 mM/g である。密度が低く立体障害が少ない TrtA-PEG-Resin においては、分子量が 2000 以上の嵩高い PEG が樹脂内部にまで入り込みやすくなり、反応性が向上したと考えられる。

PEG-peptide-SAHA micelle は薬剤添加 24 時間後、SAHA に比べて活性は低いが、48、72 時間後に有意な差を示したことから、プロドラッグとして機能し、徐々に SAHA を放出したことが示唆される。また、血清中で 12 時間処理した場合でも、SAHA の遊離が観測されず、血中安定性も向上していることが期待される。また SAHA が結合していない、PEG-peptide の単量体とミセルは薬剤添加 72 時間後も細胞生存率に影響を及ぼすことはなく、このことから PEG-peptide-SAHA micelle の活性本体は SAHA であることが示された。本ミセルの平均粒子径は 40nm でありわずかに不電荷を有することが分かった。従って、血管内壁への付着が起こりにくいこと、また、がん組織への集積性が EPR 効果によってもたらされることが期待できる。現在、本薬剤のマウス Xenograft モデルに対する尾静脈投与を行い、腫瘍縮退効果の評価を行っている。

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 6 件)

Yasuyuki Kawaratani, Takeshi Matsuoka, Yoshiyuki Hirata, Naofumi Fukata, Yasuo Nagaoka, Shinichi Uesato, Influence of the carbamate fungicide benomyl on the gene expression and activity of aromatase in the human breast carcinoma cell line MCF-7, *Enviro. Toxicol. Pharmacol.*, **39**(1), 292-299 (2015) (査読有)

Ayako Kumagai, Akira Fujita, Tomoki Yokoyama, Yuki Nonobe, Yasuhiro Hasaba, Tsutomu Sasaki, Yumi Itoh,

Minako Koura, Osamu Suzuki, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Arihiro Kohara, Lokesh P. Tripathi, Masato Sanosaka, Toshiki Fukushima, Hiroyuki Takahashi, Kazuo Kitagawa, Yasuo Nagaoka, Hidehisa Kawahara, Kenji Mizuguchi, Taisei Nomura, Junichiro Matsuda, Toshihide Tabata, Hiroshi Takemori, Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line, *Genes*, **5**(4), 1095-1114 (2014). (査読有)

Uesato S, Yamashita H, Maeda R, Hirata Y, Yamamoto M, Matsue S, Nagaoka Y, Shibano M, Taniguchi M, Baba K, Ju-Ichi M, Synergistic Antitumor Effect of a Combination of Paclitaxel and Carboplatin with Nobiletin from Citrus depressa on Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines. *Planta Med.*, **80**(6), 452-457 (2014). (査読有)

Ipeei Horibe, Yudai Satoh, Yuki Shiota, Ayako Kumagai, Nanao Horike, Hiroshi Takemori, Shinichi Uesato, Shuji Sugie, Katsuyoshi Obata, Hidehisa Kawahara, Yasuo Nagaoka, Induction of melanogenesis by 4'-O-methylated flavonoids in B16F10 melanoma cells, *J. Nat. Med.* **67**(4), 705-710 (2013). (査読有)

Y. Hirata, M. Hirata, Y. Kawaratani, M. Shibano, M. Taniguchi, M. Yasuda, Y. Ohmomo, Y. Nagaoka, K. Baba, S. Uesato., Anti-tumor activity of new orally bioavailable 2-amino-5-(thiophen-2-yl)benzamide-series histone deacetylase inhibitors, possessing an aqueous soluble functional group as a surface recognition domain., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**(5), 1926-1930 (2012). (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

上條洋士、木村元気、服部善之、住吉孝明、上里新一、長岡康夫、PEG化ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の抗がん活性、日本薬学会第135年会 2015年3月25日 - 28日(神戸学院大学 他)

Hiroto Aihara, Mariko Kobayashi, Hiromi Yoshino, Yoshihisa Hirata, Shinichi Uesato, Takaaki Sumiyoshi, Yasuo Nagaoka, Enhanced Effect of Histone Deacetylase Inhibitors on Expression of Therapeutic shRNA Gene Targeting Proto-Oncogenic Factor, CDC6, 50th International Conference on Medicinal Chemistry (ルーアン、フランス) 2014年7月2日 - 4日。

Hiroto Kamijo, Mariko Kobayashi, Mako Tamano, Yukihiro Yoshimoto, Shinichi Uesato, and Yasuo Nagaoka, Antitumor Effect of PEGylated Histone Deacetylase Inhibitor, 49th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2013) (Nice, France) 2013年7月3日 - 5日。

吉野宏美、小林真里子、上條洋士、水嶋恭子、上里新一、長岡康夫、HDAC阻害剤のがん細胞特異的リポフェクション効率向上効果、日本薬学会第133年会(パシフィコ横浜) 2013年3月27日 - 30日。
Mariko Kobayashi, Hiromi Yoshino, Hiroto Kamijo, Kyoko Mizushima, Saki Matsue, Shinichi Uesato, Yasuo Nagaoka, Enhanced Effect of Histone Deacetylase Inhibitors on the Expression of Lipofected Genes, 48th International Conference on Medicinal Chemistry (Poitiers, France) 2012年7月4日 - 6日。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔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・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・准教授
研究者番号：90350222