

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08036

研究課題名(和文) PCA-1阻害薬の臨床応用に向けた創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery research for clinical application of PCA-1 inhibitors

研究代表者

所 美雪(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

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)：PCA-1阻害薬(HUHS015)と併用効果を示す抗癌薬を探索するにあたり、ニーズが満たされていないとされるホルモン非依存性前立腺癌及び悪性中皮腫を対象とした。疾患由来細胞を用いたin vitro評価系では相乗効果を示す医薬品として前立腺癌ではDocetaxel、シスプラチン、中皮腫ではシスプラチン、イリノテカン、ドキソルビシン、ビンレルビン、ゲムシタピンを見出した。さらにホルモン非依存性前立腺癌の第一選択薬、Docetaxelとの併用効果をin vivoにて検討したところ、Docetaxelの1、2.5mg/kgとHUHS015の32mg/kgの併用により強力な抗がん作用を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We previously developed a novel PCA-1 inhibitor, named HUHS015. We examine anti-cancer effects of HUHS015 in combination with known anti-cancer drugs in our continuous studies. In this study, hormone-independent prostate cancers and malignant mesothelioma were used. We found synergistic effects of HUHS015 in vitro in combination with Docetaxel and Cisplatin, which were often clinically used for hormone-independent prostate cancers treatment. We also found that combinational treatment of HUHS015 with Cisplatin, Irinotecan, Doxorubicin, Vinorelbine and Gemcitabine in malignant mesothelioma synergistically inhibited growth of malignant mesothelioma cells in vitro. Furthermore, additive effects of HUHS015 combinatorial uses with Docetaxel in vivo were demonstrated, that is, administration of 1 and 2.5 mg/kg of Docetaxel with 32 mg/kg of HUHS015 were more potent than that of only Docetaxel administrations.

研究分野：薬理

キーワード：PCA-1 ALKBH3 抗がん剤 前立腺がん Docetaxel 併用効果 悪性中皮腫 MESO-4

1. 研究開始当初の背景

DNA/RNA の脱メチル化酵素 PCA-1 (別名 ALKBH3) は、(1)前立腺癌、非小肺癌、膀胱癌での高発現患者では生存率が有意に低い (2)siRNA による発現抑制によって、*in vitro* および *in vivo* において明確な抗癌活性を有する (3)PCA-1 knock out マウスで明らかな異常が認められずメカニズム由来の副作用の懸念が小さい、ことから新規創薬 (抗癌剤) ターゲットとして注目されている。さらに、我々が創製した経口投与可能な PCA-1 阻害薬 HUHS015 によっても、上記と同様に副作用なく抗癌活性が確認されており、低分子阻害剤による臨床応用が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、PCA-1 が既存の創薬ターゲットと異なるメカニズムを有し、我々が創出した HUHS015 などの選択的阻害薬の臨床応用が未開拓であることから、早期に臨床試験へと繋がられるよう、抗癌活性を網羅的に検討し、臨床試験に入るための併用薬及び適応癌種を明確にする。

3. 研究の方法

(1) 入手可能な既存抗がん剤と PCA-1 阻害薬である HUHS015 とのシナジー効果に関するスクリーニング (*in vitro*) を前立腺癌由来細胞 DU145 を用いて実施した。抗がん剤としてはまず、前立腺癌適応薬剤として 19 種類存在するうち、入手可能でメカニズムの異なる医薬品、ドセタキセル (アルカロイド系)、ピカルタミド (ホルモン製剤)、シスプラチン (白金製剤)、ミトキサントロン (その他)、プレドニゾロン (ステロイド)、イホスアミド (アルキル化剤)、エストラムスチン (エストラジオール + アルキル化剤)、テガフルウルシル (代謝拮抗剤) を用いた。まず、それぞれの化合物及び HUHS015 を DU145 細胞に 3 日間処置し、増殖抑制作用に対する単剤での効果を検討し、IC<sub>50</sub> 値を求めた (表 1)。次にそれぞれの化合物の IC<sub>50</sub> 値付近の用量を 3~4 濃度ぐらいと HUHS015 の 0.1, 1, 2, 3, 4 uM との併用効果を検討した。具体的には、3 日間化合物を処置した後、臨床での用い方を想定して、通常培地に交換し、引き続き 9 日間細胞の様子を観察した (図 1)。

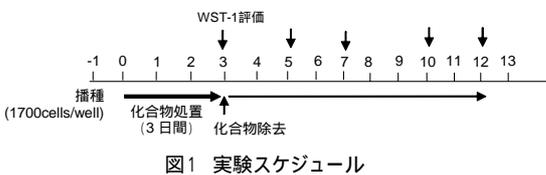


図1 実験スケジュール

他の癌腫への適応の可能性として、有効な医薬品が不足している悪性中皮腫の細胞 MESO-4 を用いて中皮腫適応薬について HUHS015 と相乗的に細胞増殖抑制効果を示すか検討を行った。入手可能であった医薬品は、シスプラチン (白金製剤)、カルボプラチン

(白金製剤)、イリノテカン (トポイソメラーゼ 阻害剤)、ドキシソルピシン (抗生物質抗がん剤)、ピノレルピン (アルカロイド系)、ゲムシタピン (代謝拮抗剤)、ペメトレキセド (チミジル酸合成酵素阻害剤) であった。それぞれの化合物の IC<sub>50</sub> 値付近の 3~4 用量及び HUHS015 の 0.4-2uM について DU145 を用いたときの評価と同様に、単剤及び併用での効果を検討した。

(2) DU145 或いは MESO-4 の細胞を nude mice の横腹皮下に移植し、xenograft model の作成を試みた。MESO-4 では生着が認められなかったが、DU145 細胞については作成することができた。

4. 研究成果

(1) DU145 に HUHS015 を 3 日間処置した時の IC<sub>50</sub> 値は 2.1-2.3 uM であった。その他、各医薬品についても IC<sub>50</sub> 値を求めた。

表1 前立腺癌適応薬 (非ホルモン剤) の DU145 増殖抑制作用 (実測値)

対象医薬品	IC <sub>50</sub> (DU145)	検討対象濃度
HUHS015	2.1 μM	1, 2, 3, 4 μM
Docetaxel	0.9 nM	0.8, 1, 2 nM
Picalutamide	>32 μM	10, 20, 30 μM
Cisplatin	1.4 μM	0.1, 0.2, 0.3, 1 μM
Mitoxantrone	2.8 nM	1, 2, 3, 4, 10 nM
Prednisolone	> 32 μM	10, 20, 30 μM
HUHS015	2.3 μM	1, 2, 3, 4 μM
Docetaxel	1.6 nM	0.8, 1, 2 nM
Ifosfamide	> 30 μM	0.032, 0.1, 1 mM
Estramustine	5.7 μM	2, 3, 4, 5, 10 μM
Tegafur/Uracil	> 30 μM	0.032, 0.1, 1 mM
Dacarbazine	250 uM	0.032, 0.1, 0.32, 1 mM

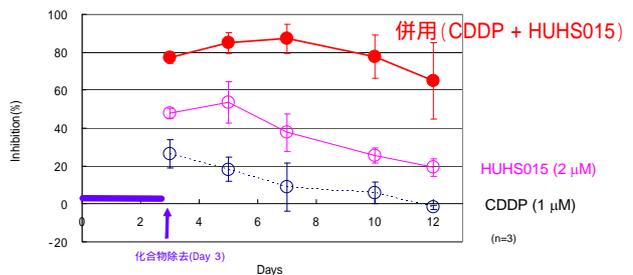


図2 シスプラチン (CDDP) と HUHS015 の併用効果

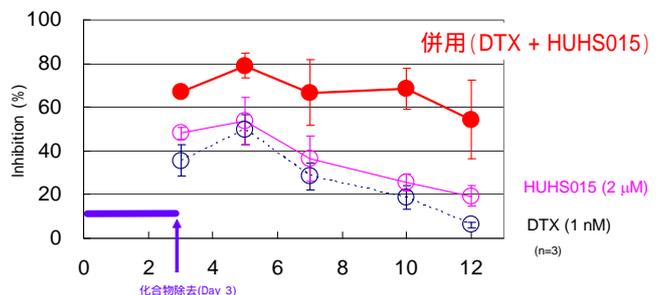


図3 ドセタキセル (DTX) と HUHS015 の併用効果

さらに、HUHS015 と前立腺癌適応薬の併用効果をそれぞれ検討したところ、ドセタキセルとシスプラチンに明らかな併用効果が認められた(図2、3)。また、ミトキサントロン、ピカルタミド、エストラムスチン及びダカルバジンでは化合物添加時は明らかな併用効果が認められなかったが、化合物除去後培養時に併用効果が認められた(図4-7)。一方、プレドニゾロン、イホスアミド、テガ

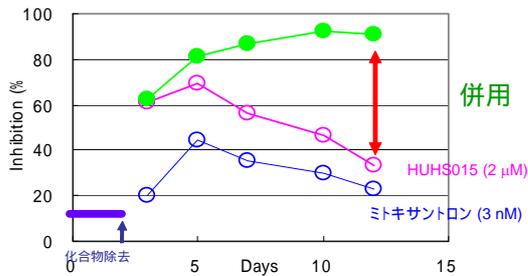


図4 ミトキサントロンとHUHS015の併用効果

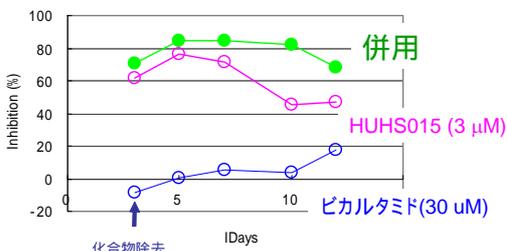


図5 ピカルタミドとHUHS015の併用効果

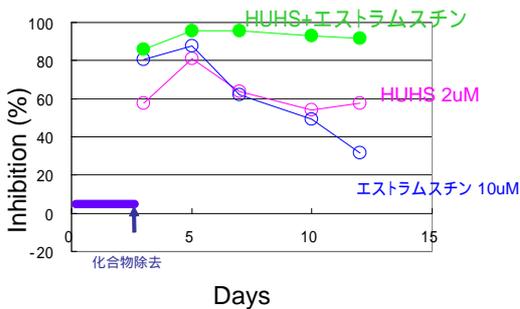


図6 エストラムスチンとHUHS015の併用効果

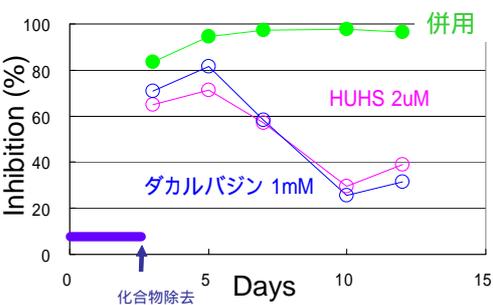


図7 ダカルバジンとHUHS015の併用効果

フルウラシルには明らかな相加相乗効果は認められなかった (data not shown)。

悪性中皮腫細胞 MESO-4 に対する HUHS015 の増殖抑制作用の IC50 値は 0.92μM であった (表 2)。その他の適応医薬品についても IC50 値を求めた。次にそれぞれの中皮腫適応薬の IC50 値付近の用量を 3~4 用量くらいと、

表2  
悪性中皮腫適応薬 のMESO4増殖抑制作用 (実測値)

	IC <sub>50</sub> (μM)(MESO4)
HUHS015	0.92
シスプラチン	4.0
カルボプラチン	42
イリノテカン	7.1
ドキシソルピシン	0.043
ビノレルピン	0.001
HUHS015	1.1
ゲムシタピン	0.031
ベメトレキセド	>1

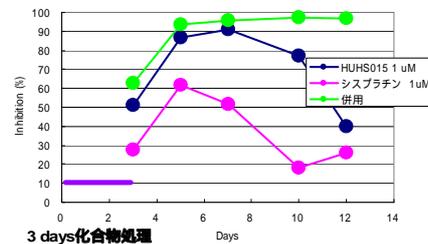


図8 シスプラチンとHUHS015の併用効果

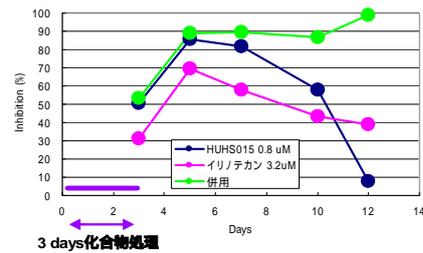


図9 イリノテカンとHUHS015の併用効果

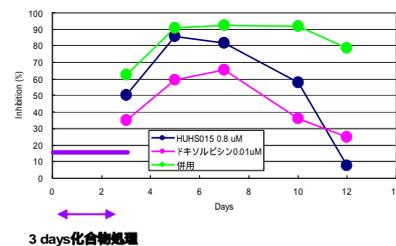


図10 ドキシソルピシンとHUHS015の併用効果 HUHS015 の 0.4-2μM との併用効果を検討した結果、シスプラチン、イリノテカン、ドキシソルピシン、ビノレルピン、ゲムシタピンについて相乗効果が認められた(図8~12)。いずれも化合物除去後の持続が強力であった。一方、カルボプラチン、テガフルウラシル、ベメトレキセドには明らかな相加相乗効果は認められなかった (data not shown)。

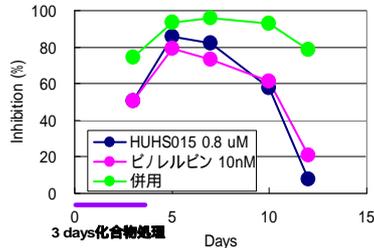


図11 ビノレルピンとHUHS015の併用効果

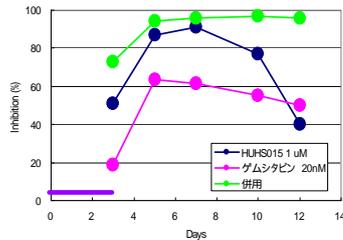


図12 ゲムシタピンとHUHS015の併用効果

(2) Xenograft model の構築を DU145 細胞及び MESO-4 細胞を用いて行った。DU145 については背部皮下への生着及び増殖が認められたので、DU145 xenograft モデルを用いた薬効評価を行った。

HUHS015 の抗腫瘍効果について予備検討を行ったところ 32 mg/kg 皮下投与により control に比較して腫瘍サイズが小さくなることを確認した。さらにホルモン非依存性前立腺癌の第一選択薬であるドセタキセルの 1, 2.5, 5 及び 10mg/kg 皮下投与による検討を行ったところ、臨床用量と同程度とみなされる、2.5 mg/kg 投与において副作用である浮腫が認められはじめ(図 1 3)。一方腫瘍体積については腫瘍内への水分貯留のため全体としては低下作用は認められない、薬の作用が現れ始める最低限の用量であることが示された。これらの用量に HUHS015 の 32mg/kg を

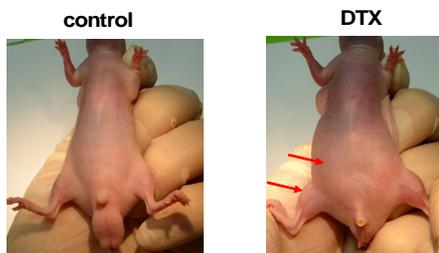


図13 ドセタキセルによる浮腫

併用投与したところ、ドセタキセルの 1, 2.5mg/kg 投与群において腫瘍体積低下作用が認められ、ドセタキセルの 2.5 mg/kg 単独投与群と比較して併用投与では有意差が認められた(図 1 4)。さらに HUHS015 より PCA-1 阻害作用及び in vitro 細胞増殖抑制作用の

強力な化合物を DU145 xenograft モデルにて検討したところ、経口投与によっても併用効果が認められている (data not shown)。これらのことから、PCA-1 阻害薬が前立腺がんへのドセタキセルとの併用薬として有効である可能性が示された。

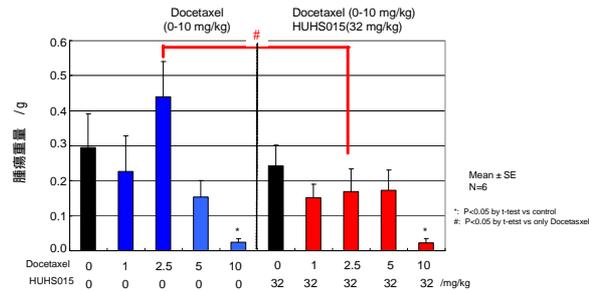


図14 Xenograftモデル(DU145)/Docetaxal-HUHS015併用効果検討

## 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 1件)

Ueda M, Shimizu T, Mabuchi M, Horiiike K, Kitae K, Hase H, Ueda Y, Tsujikawa K, Tanaka A.

Novel Metabolically Stable PCA-1/ALKBH3 Inhibitor Has Potent Antiproliferative Effects on DU145 Cells *In Vivo*. *Anticancer Res.* 38(1), 2018, 211-218. 査読有、DOI:10.21873/anticancer.12210

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

所 美雪 (馬淵 美雪) (TOKORO, Miyuki (MABUCHI, Miyuki))  
兵庫医療大学・薬学部・研究員  
研究者番号: 60714897

### (2)研究分担者

辻川 和丈 (TSUJIKAWA, Kazutake)  
大阪大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 10207376

田中 明人 (TANAKA, Akito)  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号: 30454789