

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08378

研究課題名(和文)新規抗がん剤を目指した経口/点滴投与で有効なPCA-1阻害剤探索研究

研究課題名(英文) Investigation of novel oral/ intravenous PCA-1 inhibitors of for cancer

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シード化合物であるHUH015よりin vitro酵素阻害活性およびDU145細胞増殖抑制活性が10倍程度強い化合物を見出し、ラット肝ミクロゾームであるS9mixを用いた代謝安定性の検討、経口吸収性も測定し、HUHS015より10倍程度強い化合物を見出した。さらにxenograftモデルでの評価を行い、10、32 mg/kg皮下投与により有意に腫瘍体積増加抑制が認められる化合物を見出した。またホルモン非依存性前立腺がんの第一選択薬であるドセタキセル(2.5 mg/kg, s.c., once/week)との経口或いは皮下投与により、ドセタキセルよりもやや強力な腫瘍体積増加抑制作用が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、前立腺がんは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。辻川らは前立腺がんの予後に強く相関する臨床予後因子としてDNA/RNAの脱メチル化酵素PCA-1を発見した。我々はその阻害薬の創出に成功し、有効性を報告してきたが、さらに代謝安定性も視野に入れた創薬研究を行い、経口投与でも有効な選択的PCA-1阻害剤を創出し、アカデミア発創薬実現を目指した。これらの化合物は前立腺がん、肺がん、すい臓がんなど広範な癌治療への効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：Some compounds which were superior to HUH015, a seed compound were found in inhibition of PCA-1 activity and DU145 cell proliferation. Then, we investigated metabolism of the compounds by S9 mix, and oral absorption. Next, the compounds of 10, 32 mg/kg were subcutaneously administered to mice xenograft model, and suppressed the growth of tumor with statistical significance. Furthermore, oral treatment combined with Docetaxel (2.5 mg/kg, s.c., once/week), first-choice drug for hormone independent prostate cancer, were more effective than Docetaxel alone.

研究分野：創薬化学

キーワード：前立腺がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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、前立腺がんは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は有効な薬物開発が求められている。辻川らは前立腺がんの予後に強く関連する臨床予後因子として DNA/RNA の脱メチル化酵素 PCA-1 を発見することに成功し、様々な実験により当該疾患での新アプローチを提案している。我々は上述のとおり既に 1-(1H-5-methyl-benzimidazol-2-yl)-4-benzyl-3-methyl-1H-pyrazol-5-ol (HUHS015) 等の創出に成功し、その有効性を報告している(図 1)。HUHS015 は Xenograft マウスの実験 (DU145 細胞使用、以下同じ) で、観測範囲における副作用及び毒性がなく、腫瘍増殖の有意な抑制が確認されている。ただし、HUHS015 の有効投与量が現在のところ 32 mg/kg(皮下投与)と弱く、その in vivo 薬効増強が課題として求められていた。我々は、HUHS015 に関するプロファイル検討を行ったところ、1) HUHS015 は疎水性の増加に伴い経口吸収性が低くなり、一般的な CLOGP=3~5 辺りにおける局大値を示さなかったこと(図 2)、2) ラット肝ミクロソーム由来代謝酵素 (S9mix) 処理により急速に分解し、推定被代謝部位のベンジル基の変換より当該安定性が向上すること(図 3) が明らかとなっている。これらの結果から、当該誘導体は疎水性向上に伴い、肝などでの代謝を受けやすくなり、in vivo 活性の低下が懸念されることから、in vitro 活性のみでなく、代謝的安定性も視野に入れた創薬検討を行ってきた。

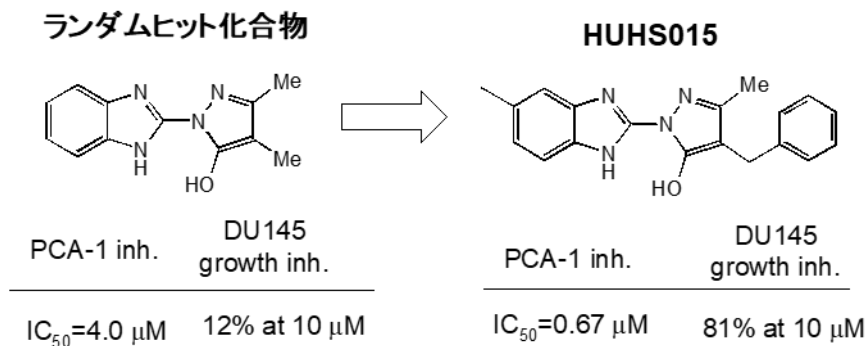


図 1 新規 PCA-1 阻害薬 HUHS015 創出

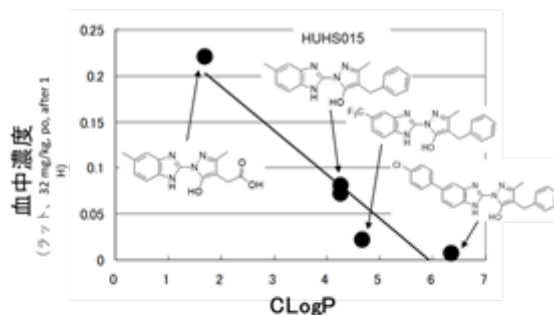


図 2 CLogPと血中濃度の関係

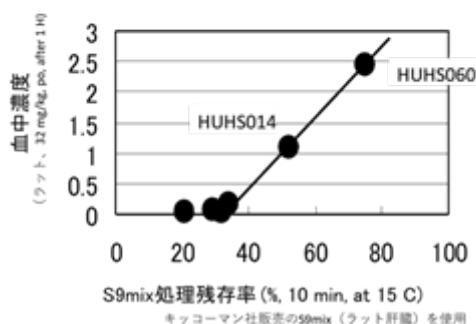


図 3 HUHS015誘導体のラット経口吸収性と S9mix中での安定性の相関

## 2. 研究の目的

本研究では前立腺がん、肺がん、すい臓がんなど広範な癌治療への効果が期待され、創薬研究が進む 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った。我々はこれまで連携研究者で、かつ PCA-1 発見者の辻川らと共同し、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、構造変換によって世界で初めて細胞系でも有効な選択的 PCA-1 阻害剤 HUHS015(IC50=0.67  $\mu$ M) 創出に成功し、その in vivo モデル(sc 投与、連投)における有効性と、副作用が認められない結果を報告してきた。その後の検討から HUHS015 の代謝的安定性向上のデザインによって、in vivo 有効性が改善されることも突き止めてきた。本提案では、先行する強みを活かし、誘導体合成を継続し経口投与でも有効な選択的 PCA-1 阻害剤を創出し、アカデミア発創薬実現を目指して最適化検討を行った。

## 3. 研究の方法

本研究計画は、主に以下の3つのパートから構成させ、リスクヘッジを意識した。

1) 先行する化合物に突然問題が生じることは創薬研究においてしばしば起こりうるため、構造 diversity を充実させてきた。すなわち、先行する最適化検討と並行し、意識的に新たなシード(候補)化合物の探索も行ってきた。なお、新たなシード探索研究も、図2、図3から得られてきた代謝に関する要素を積極的に取り入れたデザインを行った。

### 2) 最適化検討

これまでの検討で HUHS015 をシードと複数の母核構築を行い、最終目標である臨床に進める化合物取得を目指し、最適化検討に集中してきた。なお、化合物評価は、1次スクリーニングとして PCA-1 酵素阻害、1.5次スクリーニングとして前立腺癌由来細胞 DU145 細胞の増殖阻害活性を行なった。さらに、2次スクリーニングとしてラット経口吸収性試験を行うとともに、ラット S9 mixture を用いて化合物の代謝安定性を検討し、最終選別評価に当たる高次評価としては Xenograft モデル(DU145 細胞、経口投与、連投)を実施した。なお、1次および1.5次の評価については連携研究者・辻川に評価を依頼した。これまで HUHS015 およびその類似誘導体はすべてナトリウム塩にすることにより、点滴投与可能な溶解性が担保されてきたが、1.5次評価を通過する化合物については、溶解度についての確認を行った。また、経口吸収性については、高い血中濃度を示す化合物は一般的な CLOGP 値が3から5の範囲にあることが明らかとなっていることから、CLOGP 値などの疎水性パラメーターなども新規デザインおよび最適化検討に導入し、より効率的な最適化検討を行った。毒性、副作用については、Xenograft モデルにおいて約1ヶ月間連投を行い、マウスの状態観察、体重経時変化、および最終日における肝・腎重量の測定、血中 GOP、GPT、BUN、creatinine 濃度等の基礎的血液学的パラメーターを測定した。また、研究協力者・馬淵博士は長年製薬企業の薬理研究所で勤務していた経験を活かし、目視による臓器および全体症状チェックも行い、安全性についても細心の注意を払い研究を進めた。

### 3) Xenograft モデルにおける臨床メリットの明確化

現在ホルモン非依存性に悪性化した前立腺がんの薬物治療にはドセタキセルが使用されている。一方、PCA-1 阻害剤の抗がん剤領域の発展のためには、モデル動物や in vitro データの蓄積のみではなく、臨床的有效性を示すデータ創出が肝要である。臨床試験をスムーズに進めるためには、臨床現行薬ドセタキセルとの併用効果の証明が重要視される。そのため、Xenograft モデルにおけるドセタキセルとの併用効果を検討した。

## 4. 研究成果

いくつかの化合物で 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である 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((表1)構造式は秘密保持のため未公開)。また、ラット肝ミクロゾームである S9mix を用いた代謝安定性の検討も行った(表2)。その結果、HUHS015 より10倍程度強い化合物を見出した。

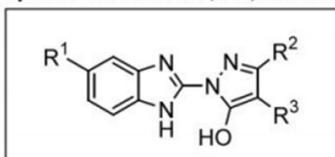
これらの化合物について xenograft モデルでの評価を行ったところ、HUHS119 は10、32 mg/kg 皮下投与により有意に腫瘍体積増加抑制が認められた。さらにホルモン非依存性前立腺がんの第一選択薬であるドセタキセル(2.5 mg/kg、s.c.、once/week)との10及び32 mg/kg の経口或いは皮下投与により、ドセタキセルよりもやや強力な腫瘍体積増加抑制作用が認められた。また、このとき体重、肝臓、腎臓重量にも変化はなく、肝・腎機能の血中パラメーターである GOT、GPT、Creatinine、BUN 値は明らかな変化が認められなかった。以上より、臨床薬との併用効果を示し、毒性がない新規前立腺がん治療薬を創製する目的をほぼ達成することができた。

表1 経口吸収性スクリーニング

	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	10	3.3	1	IC50	10	3.3	1	10 mg/kg		32 mg/kg	
										30 min	60 min	30 min	60 min
HUHS015	4.87	0.67	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	0.406	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 (7.9)	76 (54)	35 (35)	(31)	<1	78	65		0.631	0.178		
HUHS119	4.13	(1.0)	39 (75)	(49)	(50)	<1	77	63		1.02	0.73		
HUHS115	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 (5.4)	75 (65)	66 (38)	57 (27)	<10	79			0.056	0		
HUHS112	3.35	<10 (3.5)	60 (68)	(49)	(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		

表2 S9 mix を用いた代謝安定性評価

Optimization of R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, and R<sup>3</sup>



Compound	Structure <sup>a</sup>			PCA-1 inhibition, IC <sub>50</sub> (μM)	DU145 cell growth inhibition (%)		Remainder after reaction with S9 mixture	Concentration in serum (μg/ml)
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>		At 1 μM	At 10 μM		
<b>7a</b>	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Ph	4.5	24	36	81%	0.15
<b>7b</b>	CF <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Ph	5.9	34	47	72%	0.02
<b>7c</b>	4-CH <sub>3</sub> -Ph	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Ph	12.0	78	61	64%	ND <sup>b</sup>
<b>7d</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Ph	9.7	NT <sup>c</sup>	32	74%	2.45
<b>7e</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COOH	>10 (37% at 10 mM)	-20	-11	87%	0.22
<b>7f</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH(Ph) <sub>2</sub>	7.2	52	72	85%	0.17
<b>7g</b>	Cl	Ph	Ph	6.9	31	38	76%	1.03
<b>7h</b>	CH <sub>3</sub>	Ph	Ph	>10 (49% at 10 mM)	12	19	98%	0.31
<b>7i</b>	CH <sub>3</sub>	Ph	CH <sub>3</sub>	>10 (6% at 10 mM)	-6	27	35%	0.33

a:1,1-carbonyldiimidazole. ND<sup>b</sup>: Not detected. NT<sup>c</sup>: Not tested.

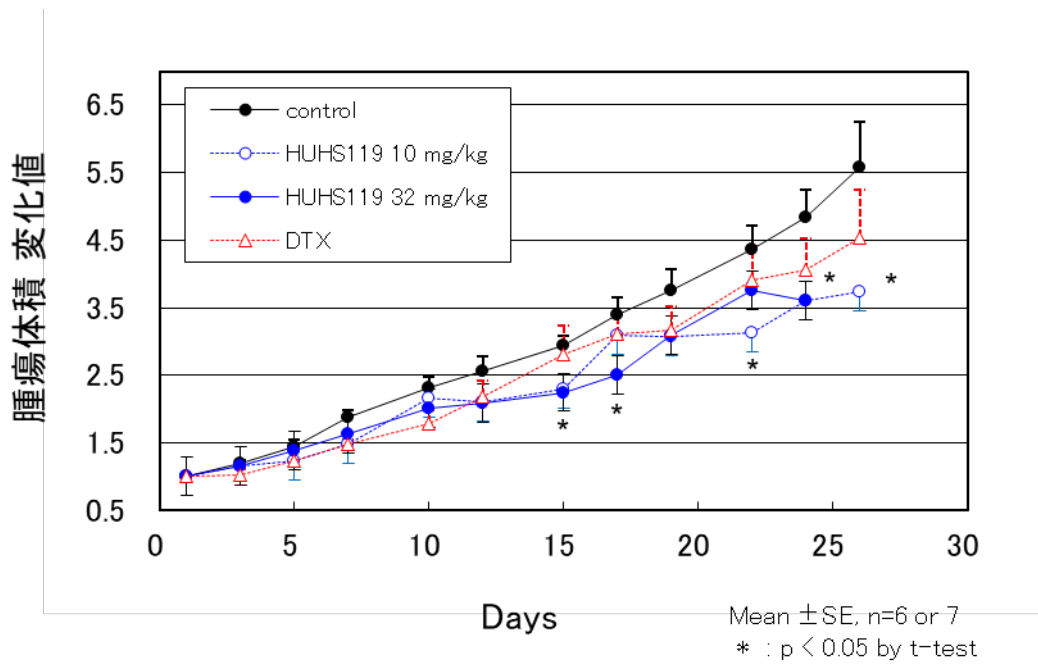


図 4 DU145 Xenograft モデルにおける HUHS119 単独皮下投与による抗腫瘍作用

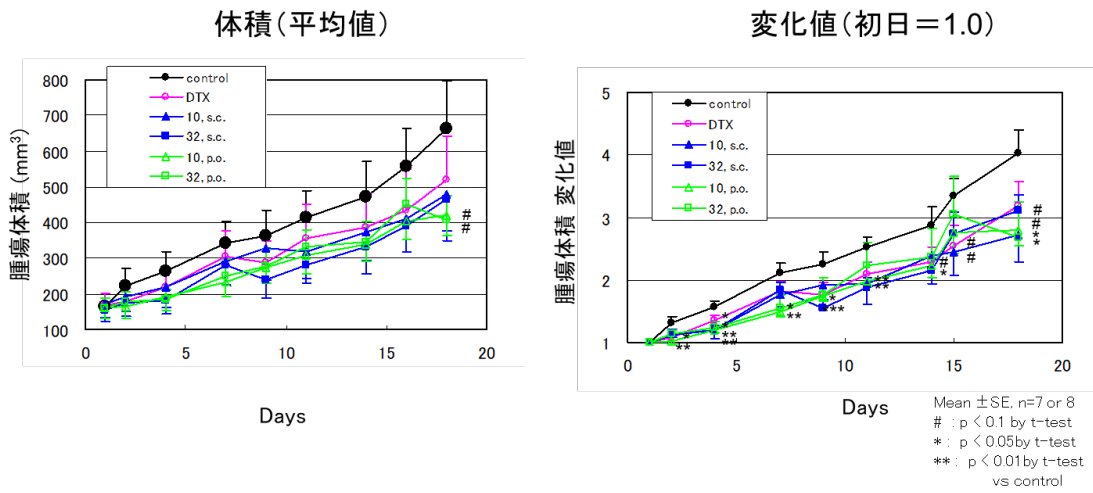


図 5 DU145 Xenograft モデルにおける HUHS119 のドセタキセルとの併用作用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masahiro Ueda, Tadashi Shimizu, Miyuki Mabuchi, Kota Horiike, Kaori Kitae, Hiroaki Hase, Yuko Ueda, Kazutake Tsujikawa, Akito Tanaka	4. 巻 38
2. 論文標題 Novel Metabolically Stable PCA-1/ALKBH3 Inhibitor Has Potent Antiproliferative Effects on DU145 Cells In Vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 211-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12210.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	所(馬淵) 美雪 (TOKORO MIYUKI) (60714897)		
研究協力者	辻川 和丈 (TSUJIKAWA KAZUTAKE) (10207376)		
研究協力者	井上 豪 (INOUE TAKESHI)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------