

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：72801  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K15716  
研究課題名(和文) ミトコンドリアを標的とした安全性に優れた新規抗がん剤のリード創製  
  
研究課題名(英文) Depelopment of a new anticancer drug as targeting mitochondria  
  
研究代表者  
阿部 光 (Abe, Hikaru)  
  
公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員  
  
研究者番号：10462269  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は安全性に優れた新規抗がん剤のリード創製を目的に、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I(complex I)を分子標的としたインターベノリン(以下ITV)の構造を基盤に医薬開発研究を展開した。その結果、約150種の類縁体から、リードであるITVよりもin vivoでより効果的な治療効果を示し、加えて代謝安定性にも優れた化合物を見出すことに成功した。また作用機序解析からITVは間質細胞内のcomplex Iに作用し、乳酸分泌の促進による細胞内外の酸性化誘導によってがん細胞の増殖抑制していることが明らかとなった。この結果から、complex Iが抗がん剤の分子標的として妥当であることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで間質細胞が新たな抗がん剤開発の標的として有望視されてきたものの、in vivoで明確かつ新規作用機序で治療効果を示す化合物の報告例は皆無であった。本研究はその初の実施例であり、その妥当性検証に大きく貢献したものと考えられる。また同様にミトコンドリア呼吸鎖関連酵素の一つcomplex Iも分子標的とし適切であることを示唆する結果を得た。本研究結果は、従来の抗がん剤とは異なるアプローチで奏功する新薬開発だけでなく、正常細胞の遺伝子に鑑み、薬剤耐性を克服し得る可能性を秘めた画期的抗がん剤開発に応用される。

研究成果の概要(英文)：In order to develop new anticancer drugs with excellent safety profiles, research and structure-based development of intervenolin (ITV), which acts on respiratory chain complex I, was conducted. From about 150 analogues, we succeeded in producing a compound that showed a more effective therapeutic effect in vivo than ITV, and it also had excellent metabolic stability. In addition, it was clarified from analyzing the mechanism of action that ITV acts on complex I in stromal cells and suppresses the growth of cancer cells by inducing acidification inside and outside the cells by promoting lactate secretion. This result suggests that complex I is a valid molecular target for anticancer drugs

研究分野：有機化学

キーワード：がん-間質相互作用 構造活性相関 complex I 抗がん剤 間質細胞 ミトコンドリア呼吸鎖関連酵素

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の2人に1人ががん罹患し、3人に1人が死亡する現代社会において抗がん剤は今もなお社会的要請度の高い医薬品の一つに数えられている。

近年の治療オプションの増加や早期診断技術の発展により、多くのがん種で5年生存率が飛躍的に向上したものの、アンメットメディカルニーズに代表されるような膵がんでは以前9%未満と改善の余地が残されている。現状治療が困難ながん種に対して奏功する新薬には、従来の抗がん剤とは異なる新規作用機序が求められる。

がん細胞の増殖、悪性化、転移等には、がん細胞自身のシグナルに加え、細胞外基質やサイトカイン、プロテアーゼ等の分泌因子を介した正常細胞由来の線維芽細胞（間質細胞とも呼ぶ）との相互作用（図1 がん-間質相互作用）も重要視され、新たな抗がん剤探索研究の対象として認知されている。また近年ミトコンドリアにおける電子伝達系酵素が生命維持に重要な役割を担う一方で、腫瘍形成から悪性化、薬剤耐性にも関与していることから、がん治療薬の標的の一つとしても注目されるようになった。しかしながら、これら二つの重要因子を標的とした医薬品の上市例はこれまでなく、抗がん剤探索研究における分子標的としての妥当性を証明できずにいた。

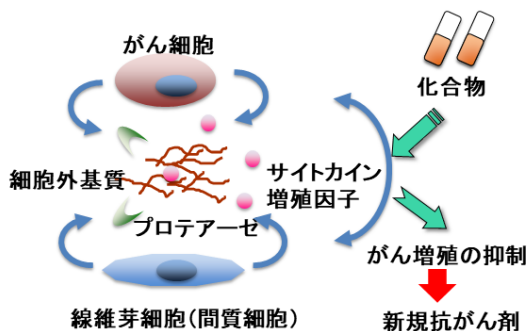


図1 がん-間質相互作用

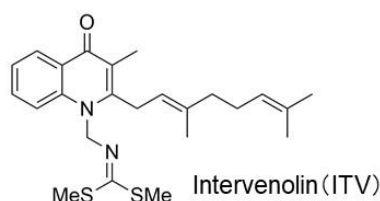
このような背景においてがん細胞と間質細胞間の相互作用に干渉することでがん細胞の増殖を阻害する天然物資源探索研究を行う中で、当研究所の川田は新規キノロン骨格を有する天然物インターベノリン（以下ITV；intervenolin）<sup>2)</sup>を見出した。

ITVはヒト胃由来の間質細胞Hs738共存下における胃がん細胞MKN-74の増殖を、単独培養時と比較しより強力に阻害した。一方で、培養中から得られるサンプル量は微量であることから、*in vivo*での評価が困難な状況にあった。そこで申請者は、当該天然物のケミカルバイオロジー研究に応用可能なITVの有機化学的合成を確立<sup>3)</sup>させることで、ITV関連化合物の*in vivo*動物試験を実施するに至った。その結果ITVは重篤な毒性を示すことなく、マウスxenograftモデルで顕著な*in vivo*抗腫瘍活性を示し、さらにその分子標的が間質細胞内のミトコンドリア呼吸鎖複合体I（complex I）であることを明らかとした。

これらの経緯のもと、ITV関連化合物の医薬開発研究からは、従来のがん細胞自身を標的とした抗がん剤とは異なる、全く新しいタイプの新薬が創製できるものと期待した。また間質細胞およびcomplex Iそれぞれの、抗がん剤探索研究における分子標的としての妥当性検証に貢献することも本研究を遂行する動機として挙げられた。

### 2. 研究の目的

本研究は線維芽細胞内のミトコンドリア呼吸鎖複合体I（complex I）を阻害し、マウスxenograftモデルで顕著な*in vivo*抗腫瘍活性を示すITVをリード化合物とした構造活性相関研究から、安全性に優れたcomplex I阻害剤のリード創製、ならびに間質、complex Iのがん標的分子としての妥当性を示すことを目的とした。



正常細胞由来の間質の遺伝子の安定性を鑑み、線維芽細胞に作用する化合物は原理的に薬剤耐性を獲得し難いことが予想されることから画期的新薬になりうる。また豊富な間質のがん細胞を取り巻く環境下にある膵がんに対して、ITV関連化合物は最適ナリードであり、本研究を通じ当該がん種の治療オプション拡充に貢献することも狙いとされた。

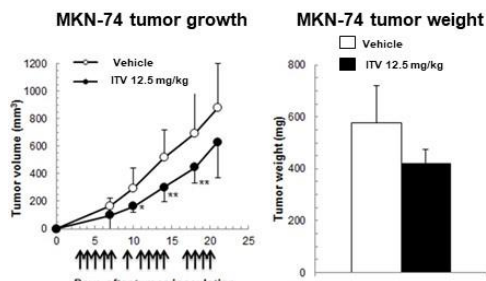


図2 インターベノリンの*in vivo*抗腫瘍活性

### 3. 研究の方法

リード化合物ITVの構造を基盤とし、まずは構造の最適化を図る。

具体的には、

- (1) 急性毒性回避に重要な窒素原子上官能基はイミノジチオカルバメートおよびジチオカルバメート構造に固定
- (2) キノロン骨格2および3位の脂肪鎖の改変
- (3) 芳香環上の官能基化（ハロゲン類、水素結合授与性、供与性官能基等）

上記3点について検討することとした。合成の際は申請者らが確立したITV合成法およびこれまでの構造活性相関で活用したルートを利用することとした。

次に合成した類縁体を *in vitro* 系で評価した後、ITVよりも30倍以上強力ながん細胞増殖阻害活性および complex I 阻害活性を示す類縁体についてマウス急性毒性を調査し、最大投与量 (MTD:mg/kg) を算出する。

低い急性毒性を示した類縁体に関しマウス xenograft モデルによる *in vivo* 抗腫瘍活性を調査する。調査対象とするがん種も胃がんだけでなく、膵がんや乳がん、前立腺がん等に拡大する。それと並行して、既知 complex I 阻害剤との生物活性、代謝安定性の比較検討も行う。

*In vivo* で顕著な抗腫瘍活性が認められた類縁体に関し、代謝安定性や薬物動態解析を進め、これらの情報を反映させた類縁体の構造最適化を再度行い、リード創製を目指すこととした。

#### 4. 研究成果

まず助成を受けた期間内で150種ほどのITV類縁体の合成を達成しており、当初目標に設定した「100種合成」をクリアした。研究開始当初、まずキノロン骨格2位上の側鎖改変を検討した。この箇所には以前のSARから、芳香環類はその立体的な嵩高さから活性の低下を招くことが示唆されていたため、長鎖型飽和脂肪側鎖や不飽和含有の脂肪側鎖の導入を主とした。

次いで3位上には本来のメチル基を塩素、臭素、フッ素、ヨウ素基あるいはベンゼン環に置き換えた類縁体を調製し、先に合成した2位側鎖改変体群も合わせ、*in vitro* における間質細胞共存下での胃がん細胞MKN-74に対するがん細胞増殖阻害活性を調査した。その結果、2位上の側鎖においては活性発現に適した側鎖長があることが判明し、メチレン鎖  $n=12$  の類縁体が最も高活性で、それ以上の伸長は活性の低下を招いた。さらに側鎖内の飽和結合配置箇所も重要で、キノロン核と共役する場合は活性が損なわれることが判明した。3位メチル基のハロゲン原子への置換は活性を劇的に大きく変化させることはないものの、興味深いことにITVよりも共培養選択的ながん細胞増殖阻害活性を示す傾向にあった。その一方で、この位置へのベンゼン環の導入は2位側鎖改変時同様、阻害活性を低下させることから不適切であると判断した。

この時点における一連の類縁体の生物活性を評価する中で、類縁体X (構造非開示) が示すがん細胞増殖阻害活性が、ITVの約80倍であることが判明した。また今回合成したITV類縁体および過去に合成したものを含め、complex I 阻害活性を測定したところ、共培養下でのがん細胞増殖阻害活性の強度に概ね比例する傾向にあり、双方の活性には相関性があるものと示唆した。

次に申請者は、ITVよりも強力ながん細胞増殖阻害を示した類縁体Xをリードとし、新たな類縁体合成およびその生物活性評価を行った。

合成した新規類縁体群は高い水準でがん細胞阻害活性を発揮したものの、マウス急性毒性が強くなる類縁体も幾つかあったが、その要因が構造に起因しているものかどうかは現時点では不明である。

次いで、類縁体Xおよび高活性かつ低毒性を示した類縁体群に関して、IP投与によるマウス xenograft モデルでの *in vivo* 抗腫瘍活性試験を実施したところ、図3に示すように類縁体X-42 (構造非開示) に、ITVおよびこれまでの類縁体の中では特に秀でた治療効果が認められた。

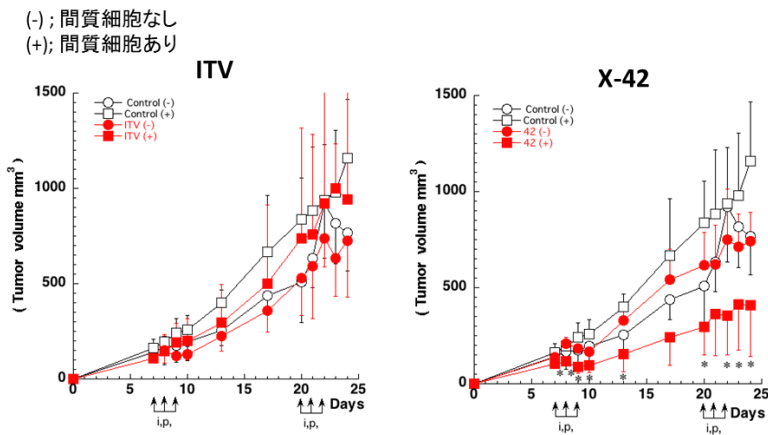


図3 ITVおよびX-42の*in vivo*抗腫瘍活性の比較

しかし並行して実施した代謝安定性試験において、図4が示すように現在臨床開発中の既知 complex I 阻害剤 ASP4132 と X-42 を比較した場合、安定性の差は歴然としており、改善が求められる結果が得られた。

そこで、代謝物の構造解析から、代謝を受けやすい構造部位を特定し、官能基化等による構造修飾を施すことで代謝の改善を図った。

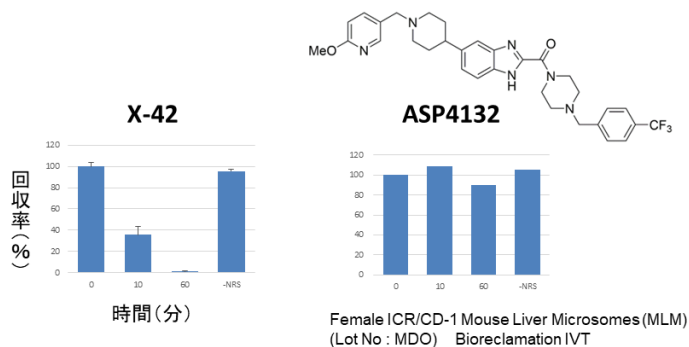


図4 X-42およびASP4132の代謝安定性の比較

その結果として図 5 に示すように、X-42 の *in vivo* 抗腫瘍活性強度を維持し、代謝安定性を大幅に改善させた類縁体 X-42-1（構造未開示）の合成に成功した。

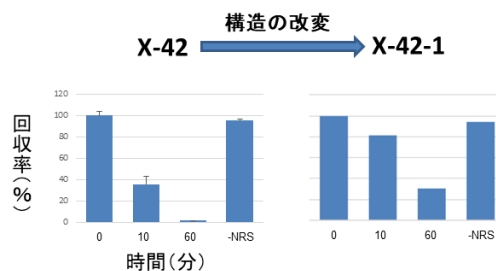


図 5 X-42およびX-42-1の代謝安定性の比較

上記 SAR を進める一方で、共同研究者らによって、ITV 関連化合物が示す共培養選択的がん細胞増殖阻害活性の詳細なメカニズム解析についての検討も行った。その結果 ITV 処理した間質細胞培養上清成分の分析から、化合物阻害による代謝シフトが生じることで乳酸の分泌が促進され、これによる細胞内外の酸性化誘導によるものと分かった。また膀胱がん PDX モデルにて ITV の抗ガン活性を評価したところ、顕著な治療効果が認められた<sup>4)</sup>。

以上、ITV 関連化合物に関する SAR 研究を通じ、正常細胞由来の間質細胞および complex I ががん分子標的の一つとして妥当性を有しており、それを標的とした化合物は医薬リードになり得ることが本研究結果から強く示唆された。加えて、これらを標的としたシードあるいはリード化合物は将来的に膀胱がんの治療薬にも応用できる可能性を示すに至った。

今後はより *in vivo* で高い治療効果を示す化合物の創製を目指すべく、引き続き類縁体の分子設計および合成を展開していく予定である。また新規機序である利点を生かし、膀胱がんに対して従来使用されている薬剤との併用療法や、転移モデル、同所移植モデルでの抗がん活性についても検討する。

#### 〈引用文献〉

- (1) Iommarini, L. *et al.*, *Genes*. **2018**, *9*, 243.
- (2) Iommarini, L. *et al.*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 47.
- (3) Kawada, M. *et al.*, *J Antibiot.*, **2013**, *15*, 543.
- (4) Abe, H. *et al. Org. Lett.* **2013**, *15*, 2124., Abe, H. *et al. Tetrahedron* **2013**, *69*, 7608.
- (5) Yoshida, J. *et al. iScience*, **2021**, *24*, 103497.

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 J. Yoshida, T. Ohishi, H. Abe, S. Ohba, H. Inoue, I. Usami, M. Amemiya, R. Oriez, C. Sakashita, S. Dan, M. Sugawara, T. Kawaguchi, J. Ueno, Y. Asano, A. Ikeda, M. Takamatsu, G. Amori, Y. Kondoh, K. Honda, H. Osada, T. Noda, T. Watanabe, T. Shimizu, M. Shibasaki and M. Kawada	4. 巻 24
2. 論文標題 Mitochondrial complex I inhibitors suppress tumor growth through concomitant acidification of the intra- and extracellular environment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103497.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阿部 光、大石智一、坂下千春、Uzama Saqib、Mirzza S. Baig、大庭俊一、井上裕幸、渡辺 匠、川田 学、柴崎 正勝
2. 発表標題 がん - 間質相互作用に干渉するLeucinoastatin A類縁体のがん細胞増殖阻害機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hikaru Abe, Manabu Kawada, Tomokazu Ohishi, Chiharu Sakashita, Uzma Saqib, Mirza S. Baig, Shun-ichi Ohba, Hiroyuki Inoue, Takumi Watanabe, Masakatsu Shibasaki
2. 発表標題 Chemical biology of leucinoastatin A and its analogs, modulators of tumor-stroma interaction
3. 学会等名 13th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 微生物化学研究会 微生物化学研究所  
<https://www.bikaken.or.jp/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------