

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300339

研究課題名(和文)PI3K/HDAC2重阻害作用を有する新規がん分子標的薬の探索と最適化

研究課題名(英文)A search and optimization of the novel cancer molecules target drugs with PI3K/HDAC dual inhibition

研究代表者

石岡 千加史(Ishioka, Chikashi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60241577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：PI3K/HDAC2重阻害剤作用を有する新規FK228類縁体を合成し、最適化のための新規FK228類縁体とPI3K触媒サブユニットp100とのドッキングシミュレーションと、機能・活性相関のためのPI3K阻害活性の評価により、PI3K阻害活性がFK228や類縁体FK-A5より強い新規類縁体FK-A11を合成した。FK-A11は強いアポトーシス誘導能と細胞内シグナル伝達系の阻害作用を有し、前立腺癌や大腸癌(とりわけKRAS変異を有する大腸癌)にも効果があること、in vivoマウスモデルで抗腫瘍効果、in vitroでPan-PI3K阻害薬であること、ATP競合的阻害薬であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Novel FK228 analogs as PI3K/HDAC dual inhibitors were synthesized, and, by docking simulation of a new analog and PI3K catalytic subunit p100, and an evaluation of the PI3K inhibitory activity, we synthesized new analog FK-A11 which was stronger PI3K inhibitory activity than FK228 and its analog FK-A5. We found that the novel FK228 analogs with the strong PI3K inhibitory activity had inhibitory activities on both the apoptotic induction and intracellular signal transduction and strongly suggested that the PI3K inhibitory activity correlated with antitumor effect of the compounds. We also found that the novel FK228 analog was effective against prostate cancer and colorectal cancer, particularly effective in colorectal cancer cells with the KRAS gene mutation refractory to anti-EGFR antibody, a molecular target drug. Also, we found that FK-A11 was a pan-PI3K inhibitor and an ATP-competitive inhibitor.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療薬 PI3K阻害薬 HDAC阻害薬 創薬 がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

がんは日本人の死因の第1位であり、総死亡の約3分の1を占める。がんの薬物療法は、分子標的薬の登場により目覚ましい進歩を遂げているが、未だ克服できない難治性がんは数多く存在し、世界中でより治療効果の高い、新しいがん分子標的薬の開発が期待されている。Phosphatidylinositol 3-kinase (以下 PI3K)/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (以下 AKT) 経路は細胞の生存と増殖に関わる主要なシグナル伝達経路であるが、頻度が高い大腸がんや乳がんを含む様々ながん腫において、その異常な活性化が高頻度に生じていることが報告されており、PI3K はがん治療における有力な標的と考えられている (Kong D & Yamori T. *Curr Med Chem* 16:2839-2854, 2009)。しかし、未だ医薬品化されるに至った PI3K 阻害薬はない。一方、がんの発生と進展にはエピジェネティックな異常が深く関わることが明らかにされており、その中でもヒストンアセチル化はエピジェネティック制御の重要なメカニズムの一つである。そのアセチル化を解除する脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase, 以下 HDAC) の阻害により、遺伝子発現変化が生じそれに伴って細胞分化やアポトーシスが引き起こされる。このことから、HDAC 阻害薬が新しいがん分子標的薬として注目を集め、すでに2つの HDAC 阻害薬 (SAHA と FK228) が皮膚 T 細胞リンパ腫に対する治療薬として米国 FDA の承認を受けている (Mann BS, et al. *Oncologist* 12:1247, 2007; Grant C, et al. *Expert Rev Anticancer Ther* 10:997-1008, 2010)。しかし、頻度の高いがんでの有効性は認められない。換言すれば、多くのがんの場合、HDAC 阻害だけでは殺細胞効果が不十分であることを示唆する。最近、数種のヒトがん細胞株において、PI3K 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用は、殺細胞効果の相乗作用をもたらすことが報告されており (Ozaki K, et al. *BBRC* 391:1610-1615, 2010; Wozniak MB, et al. *Haematologica*.95:613, 2010) PI3K と HDAC をともに阻害する薬剤の開発は、難治性がんの克服に多大な貢献をするものと考えられた。そこで我々は偶然発見した PI3K/HDAC 2重阻害剤について構造活性相関解析などから阻害活性を高め、新規のがん分子標的薬を開発することを目的に研究を開始した。

(2) これまでの研究の経緯

研究代表者・石岡は酵母を用いたがん関連遺伝子機能評価法で多くの実績がある (*Nat Genet* 1993, *PNAS*1997, *PNAS* 2003 ほか)。石岡と同研究室の大学院4年生・西條憲は、酵母 PI3K 機能スクリーニング系を構築し、文科省がん特定・統合がん「化学療法基盤情報支援班」の化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、平成22年度に PI3K/HDAC 2重

阻害剤を偶然に発見した。同支援班に化合物とその寄託者を照会したところ、その化合物は HDAC 阻害薬であるロミデプシン (FK228) と本研究計画の分担研究者 (加藤正・東北薬科大学) らが合成したとその類縁体であった。加藤は、FK228 やその類縁体を効率よく全合成する方法を開発 (*Chem. Eur. J.* 2009, *Heterocycles* 2008, *Chem. Commun.* 2008) している。平成22年度から両者は共同研究に着手し、これらの化合物のヒトがん細胞株における作用メカニズムの解明に取り組んだ。東日本大震災のため研究が約2か月間中断したが、平成23年度科学技術振興機構 (JST) シーズ探索事業に採択され、研究を迅速に再開し、FK228 と加藤らが新たに合成した化合物を加えた FK228 類縁体の PI3K に対する直接阻害活性を確認した。また、東北薬科大学の小田、高橋との共同でドッキングシミュレーションを行ったところ、FK228 は PI3K の触媒サブユニット p110 の ATP 結合部位にドッキングすることが予測された。なお、ここまでの研究成果は、特許出願し (発明者: 西條 憲、石岡千加史、加藤 正 出願者: 国立大学法人東北大学 出願名称: 新規ホスファチジルイノシトール3キナーゼ阻害剤及び医薬組成物 出願日: 平成23年9月30日、出願番号: 特願 2011-217378) その後、論文を英文誌に投稿した。

(3) 本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

作用機序の点で新しいタイプの2分子標的を有するがん分子標的薬剤を、アカデミア発で開発しようとする学術的な特色がある。PI3K 阻害薬の開発は国際的に盛んに行われ、幾つかの薬剤が早期臨床試験に進んでいる。PI3K 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用は、抗腫瘍効果において相乗作用を発揮することから、米国の製薬ベンチャー企業 Curis 社が PI3K 阻害剤と HDAC 阻害剤を結合することによって2重阻害薬 (CUDC-907, 102th AACR 2011) の開発に取り組んでいる (類似研究)。本研究は独自に構築した PI3K 機能スクリーニング系を用いて新規に発見した PI3K/HDAC 2重阻害活性を有する FK228 の類縁体をシーズとして研究発展させるもので、全合成技術を活かして新規類縁体を合成している点で独創性が高い。FK228 は class HDAC に対して選択的かつ強力な阻害活性を有するが、PI3K 阻害作用も有することは新たな発見であり (論文投稿中) その PI3K 阻害活性を高めた低分子化合物を合成できれば、HDAC 阻害薬がすでに臨床利用されている薬剤だけに、新しいタイプのがん分子標的薬の領域を拓げる先導性があると考えられた。この研究で、PI3K/HDAC 2重阻害の抗腫瘍効果のメカニズムを、細胞内シグナル伝達系、抗腫瘍スペクトル、PI3K の触媒サブユニット p110 との物理的結合 (共結晶構造) の視点で明らかにし、シーズ化合物より活性の高い PI3K/HDAC

2重阻害活性を合成できれば、将来、創薬シードとして製薬企業への橋渡しを経て、抗がん薬の臨床開発へ進展する可能性が期待できると考えた。

2. 研究の目的

前述のように、平成22年度に酵母PI3K機能スクリーニング系でPI3K阻害剤を探索したところ、化合物ライブラリーから偶然HDAC阻害剤のロミデプシン(FK228)とその類縁体がヒットし、これらがPI3K/HDAC2重阻害剤であることを発見した。そこでこの研究ではPI3K/HDAC2重阻害剤の創薬を目指し、FK228とその類縁体に関して、次の3項目に取り組んだ。

(1) PI3K/HDAC2重阻害作用による殺細胞効果のメカニズムを明らかにする。

(2) 抗腫瘍スペクトルを明らかにし、耐性因子を探索する。

(3) PI3K阻害活性がより強い新規化合物を新規に合成し、最適化する。

3. 研究の方法

平成24年度

(1) PI3K/HDAC2重阻害作用による殺細胞効果のメカニズム解明に関する研究(分担研究者・西條 憲、東北大学): ロミデプシン(FK228)の新規類縁体(現在、13種類を保有、今後、この研究の最適化研究により化合物を増やす)について

PI3K阻害活性の測定、HDAC阻害作用の評価、アポトーシス誘導能の評価、および細胞内シグナル伝達系の阻害作用の評価を行う。さらに、網羅的遺伝子発現解析により、PI3K/HDAC2重阻害剤とPI3K阻害剤LY294002とHDAC阻害剤の遺伝子発現に及ぼす影響を比較検討する。

(2) 抗腫瘍スペクトルを明らかにし、耐性因子を探索する研究(代表者・石岡、研究協力者・李 仁、東北大学): 各種培養細胞に対する殺細胞効果や細胞増殖抑制効果を評価する。各種培養細胞のPI3K変異(特にexon 9と20)についてDNAシーケンス法で明らかにする。HDAC活性やPI3K/AKT経路の活性化状況は上記(1)およびの方法で調べる。

(3) PI3K/HDAC2重阻害剤の耐性株を樹立する。

3. より阻害活性の高い新規化合物の合成と最適化に関する研究(分担研究者・加藤 正、東北薬科大学)。新規FK228類縁体を合成する。機能・活性相関と最適化: ドッキングシミュレーションにより新規FK228類縁体とp100結合を予測する。PI3K阻害活性の評価により、より阻害活性の強い化合物の探索を行う。その際、標的タンパクと化合物の構造活性相関の解析を行い、その結果に基づき、さらにPI3K阻害活性の強い化合物の設計および合成を行う(最適化)。

平成25年度

(1) PI3K/HDAC2重阻害剤作用による殺細胞効果のメカニズムが有効であるがん細胞側の特徴を明らかにする研究(西條、李) 既合成または新規合成のFK228類縁体について、PI3K/HDAC2重阻害剤作用による殺細胞効果のメカニズムが有効であるがん細胞側の特性を調べる。具体的には各種大腸癌細胞株の分子異常とこれらのFK228類縁体の細胞増殖抑制効果やアポトーシス誘導能を調べて効果が優れるがん細胞側の分子機構を推測する。

(2) 耐性因子を探索する研究(石岡、李) PI3K/AKT経路の遺伝子変異探索: 平成24年度に樹立したFK228類縁体の耐性株の耐性機序を明らかにするために、p110をコードする遺伝子PIC3CAをはじめ、PI3K/AKT経路の変異解析を行う。また、ウェスタンブロット法によりP糖タンパク過剰発現を調べる。

(3) より阻害活性の高い新規化合物の合成と最適化に関する研究(加藤)

平成24年度と同様に、標的タンパクと化合物の構造活性相関の解析により、新規FK228類縁体を合成し、よりPI3K阻害活性の強い化合物を探索する。また、動物実験に必要な量の化合物を合成する。

(4) マウスモデルで抗腫瘍効果と生化学的POCを確認する(西條、李)。

平成26年度

平成25年度に合成のFK228類縁体にうち、これまで*in vitro*の殺細胞効果が強い新規FK228類縁FK-A11に関して、

(1) PI3K/HDAC2重阻害剤作用による殺細胞効果のメカニズムが有効であるがん細胞側の特徴を明らかにする研究(西條、李)。PI3K/HDAC2重阻害剤作用による殺細胞効果のメカニズムが有効であるがん細胞側の特性を調べる。具体的には各種大腸癌細胞株の分子異常とこれらのFK228類縁体の細胞増殖抑制効果やアポトーシス誘導能を調べて効果が優れるがん細胞側の分子機構を推測する。

(2) 耐性因子を探索する研究(石岡、李)。PI3K/AKT経路の遺伝子変異探索: 新規FK228類縁FK-A11の耐性株を作成して耐性機序を明らかにするために、p110をコードする遺伝子PIC3CAをはじめ、PI3K/AKT経路の変異解析を行う。

(3) より阻害活性の高い新規化合物の合成と最適化に関する研究(加藤)。平成25年度と同様に、標的タンパク

と化合物の構造活性相関の解析により、新規FK228類縁体を合成し、よりPI3K阻害活性の強い化合物を探索する。また、動物実験に必要な量の化合物を合成する。

(4) マウスモデルで*in vivo*の抗腫瘍効果と生化学的POCを確認する(西條、李)。新規FK228類縁FK-A11に関して、HDAC阻害に

よるアセチル化ヒストンの発現増強と AKT のリン酸化抑制について免疫組織染色で明らかにする。

4. 研究成果

平成 24 年度

平成 24 年度は、新規 FK228 類縁体を合成し、機能・活性相関と最適化のためのドッキングシミュレーションにより新規 FK228 類縁体と p100 結合を予測し、PI3K 阻害活性の評価により、より阻害活性の強い化合物の探索を行った。その結果、FK228 よりも PI3K 阻害活性の強い複数の化合物の合成に成功した。PI3K/HDAC 2 重阻害剤作用による殺細胞効果のメカニズム解明に関する研究に関しては、これらの強い PI3K 阻害活性を有する FK228 の新規類縁体が強いアポトーシス誘導能と細胞内シグナル伝達系の阻害作用を有することを明らかにし、PI3K 活性と抗腫瘍効果が相関する可能性を強く示唆する知見を得た。現在、PI3K /AKT 経路を含む EGFR シグナル伝達経路に様々な遺伝子変異ステータスを有する大腸癌細胞パネルを用いて抗腫瘍スペクトルを明らかにし、耐性因子を探索する研究を行っている。

平成 25 年度

平成 25 年度は PI3K/HDAC 2 重阻害剤の創薬を目指し、

(1) 既合成または新規合成の FK228 類縁体について、PI3K/HDAC 2 重阻害剤作用による殺細胞効果のメカニズムが有効であるがん細胞側の特徴を明らかにする研究に取り組んだ。その結果、前立腺癌や大腸癌に効果があること、とりわけ市販の分子標的薬が不応の KRAS 変異を有する大腸癌細胞にも効果があることが明らかになった。

(2) 耐性因子を探索する研究として、耐性細胞株の樹立や PI3K/AKT 経路の遺伝子変異探索に取り組んだ。FK228 類縁体の耐性機序を明らかにするために、より耐性度の高い耐性株の作成に取り組んだ。また、耐性機構に關与する可能性がある p110 をコードする遺伝子 PIC3CA をはじめ、PI3K/AKT 経路の変異解析を行った。

(3) より阻害活性の高い新規化合物を合成し創薬に向けての最適化に関する研究に取り組んだ。平成 25 年度と同様に、標的タンパクと化合物の構造活性相関の解析により、PI3K 阻害活性が FK228 や類縁体 FK-A5 より強い新規類縁体 FK-A11 を合成した。また、*in vivo* の抗腫瘍効果をマウスモデルで検証するための FK228 や類縁体 FK-A5 および FK-A11 を合成した。

(4) *in vivo* の抗腫瘍効果をマウスモデル(前立腺癌細胞と大腸癌細胞を移植)で抗腫瘍効果を確認した。(西條、李)

平成 26 年度

平成 26 年度は PI3K/HDAC 2 重阻害剤の創薬

を目指し、

(1) 平成 25 年度に引き続いて、既合成または新規合成の FK228 類縁体について、PI3K/HDAC 2 重阻害剤作用による殺細胞効果のメカニズムが有効であるがん細胞側の特徴を明らかにする研究に取り組んだ。その結果、前立腺癌、大腸癌、肉腫に効果があること、とりわけ市販の分子標的薬が不応の KRAS 変異を有する大腸癌細胞にも効果を明らかにした。

(2) 平成 25 年度に引き続いて、耐性因子を探索する研究として、耐性細胞株の樹立や PI3K/AKT 経路の遺伝子変異探索に取り組んだ。FK228 類縁体の耐性機序を明らかにするために、より耐性度の高い耐性株の作成に取り組んだ。また、耐性機構に關与する可能性がある p110 をコードする遺伝子 PIC3CA をはじめ、PI3K/AKT 経路の変異解析を行った。

(3) 平成 25 年度に合成した PI3K 阻害活性の高い新規化合物 FK-A11 について、*in vivo* の抗腫瘍効果をマウスモデル(前立腺癌細胞と大腸癌細胞を移植)で抗腫瘍効果を確認した。

(4) 新規化合物 FK-A11 は Pan-PI3K 阻害薬であること、ATP 競合的阻害薬であることを明らかにし、英文論文に発表した (Saijo K, et al. Cancer Science 2015)。

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 5 件)

Saijo, K., Katoh, T., Shimodaira, H., Oda, A., Takahashi, O., Ishioka, C. Romidepsin (FK228) and its analogs directly inhibit phosphatidylinositol 3-kinase activity and potently induce apoptosis as histone deacetylase/phosphatidylinositol 3-kinase dual inhibitors. Cancer Sci 103: 1994-2001 (2012) 査読あり

Oda, A., Saijo, K., Ishioka, C., Narita, K., Katoh, T., Watanabe, Y., Fukuyoshi, S., Takahashi, O. Predicting the structures of complexes between phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and romidepsin-related compounds for the drug design of PI3K/histone deacetylase dual inhibitors using computational docking and the ligand-based drug design approach. J Mol Graph Model 54: 46-53 (2014) 査読あり

Saijo, K., Imamura, J., Narita, K., Oda, A., Shimodaira, H., Katoh, T., Ishioka, C. Biochemical, biological and structural properties of romidepsin (FK228) and its analogs as novel HDAC/PI3K dual inhibitors.

Cancer Sci 106: 208-215 (2015) 査読あり
西條憲：新規 HDAC/PI3K 2 重阻害剤としてのロミデプシン(FK228)類縁体の同定 . 明日の新薬 P12-2 : 2012) 査読なし
西條憲：HDAC 阻害薬 . 日本臨牀増刊号 抗がん剤の副作用と支持療法ーより適切な抗がん剤の安全使用をめざしてー 73 巻 : 277-280 (2015) 査読なし

〔学会発表〕(計6件)

西條憲, 加藤正, 石岡千加史：新規 HDAC/PI3K 2 重阻害剤としてのロミデプシン(FK228)類縁体の同定 . 第 16 回がん分子標的治療学会学術集会 (福岡県北九州市) 2012 年 6 月 27 日 . ポスター

李仁, 西條憲, 下平秀樹, 成田紘一, 加藤正, 石岡千加史：HDAC/PI3K dual inhibitor としての Romidepsin(FK228)新規類縁体の開発と最適化 . 第 17 回日本がん分子標的治療学会 (京都府京都市) 2013 年 6 月 13 日 . ポスターセッション
李仁, 西條憲, 下平秀樹, 成田紘一, 加藤正, 石岡千加史：In vitro および in vivo における PI3K/HDAC 2 重阻害剤としての FK228 類縁体の抗腫瘍効果の評価 . 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会(宮城県仙台市)2014 年 6 月 26 日 . ポスター

西條憲, 李仁, 成田紘一, 加藤正, 下平秀樹, 石岡千加史：新規 HDAC/PI3K 2 重阻害剤としてのデプシペプチド類縁体の抗腫瘍活性の検討 . 第 73 回日本癌学会学術総会(神奈川県横浜市)2014 年 9 月 27 日 . ポスター

Saijo, K., Kato, T., Shimodaira, H., Oda, A., Takahashi, O., Ishioka, C.: Identification of romidepsin (FK228) and its analogs as HDAC/PI3K dual inhibitors .The 103 th Annual Meeting of American Association of Cancer Research ,Apr 1, 2012 . (Chicago, USA), Poster

Saijo, K., Kato, T., Jin, L., Shimodaira, H., Oda, A., Takahashi, O., Ishioka, C.: Romidepsin (FK228) and its analogs exhibit potent cytotoxicity through HDAC/PI3K dual inhibition in colorectal cancer cell lines. . AACR/JCA Joint Conference ,Feb 24 ,2013 . (Hawaii, USA),Poster

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石岡千加史 (ISHIOKA, Chikashi)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：60241577

(2)研究分担者

加藤正 (KATO, Tadashi)
東北薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：50382669

西條憲 (SAIJO, Ken)
東北大学・病院・助教
研究者番号：70636729

(2)研究協力者

李仁 (LI, Jin)