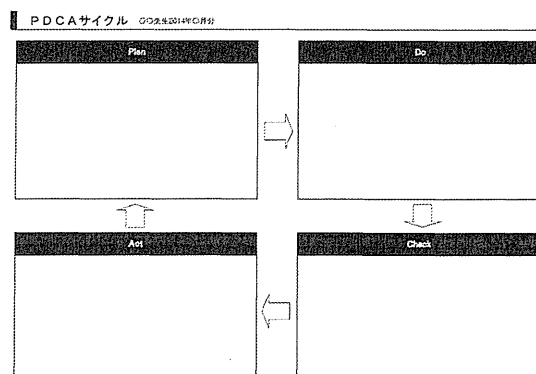


また、研究進捗の確認では、PDCA 管理を導入し、月毎に PDCA 管理票(図 1)への入力を各研究者に求めた。PDCA 管理 WEB システムを構築し、タイムリーな情報共有を図った。

さらに、バックアップ化合物の探索のため、アッセイ担当者に化合物ライブラリーを提供した。

図 1 PDCA サイクル票



D. 考察

円滑で効率的な研究の推進には、分担研究者間で濃厚なコミュニケーションをとり、情報を共有すること及び研究の進捗を管理し、タイムリーに問題点を洗い出し、その解決方法を検討し、研究の方向性を再構築することが重要であると考ええる。

しかしながら、分担研究者の所在地が遠隔地に分散している場合などにはコミュニケーションが希薄になることも考えられる。

我々は、分担研究者間のコミュニケーションを重要視し、1 か月に 1 回、会議を開催した。隔月で Face to Face meeting を開催し、研究者が顔を合わせて深い議論を行った。さらに、隔月の WEB 会議、電話会議やメールでも様々な課題解決の

ために研究者間でコミュニケーションをとることで、会議の効率性についても配慮した。

次に、研究において、課題がどこにあるかを認識すること、それを解決するための具体的な方策を策定すること、さらに、研究の進み具合を振り返ることが重要である。そこで、我々は、PDCA 管理の手法を研究進捗の管理に導入し、進捗の見える化を行うことで、効率的、効果的に研究を推進した。

また、研究の進捗管理では、研究者と研究調整者間でタイムリーな進捗状況の把握が重要であると考えられる。そこで、PDCA 管理 WEB システムを構築することで、いつでも研究者が進捗状況を報告することができ、いつでも研究調整者がその内容を確認することができる体制となった。

E. 結論

Face to Face meeting、WEB 会議、電話会議、メール等で研究者間のコミュニケーションを密にすることで、研究班において円滑に研究を推進することができた。

さらに、研究の進捗管理において、PDCA 管理の手法を導入することで、研究者の月毎の目標、課題が明確になり、研究の現状把握及び翌月の課題把握が容易となったことから、研究を効率的、効果的に進めることができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Islam R, Koizumi F, Koder Y,

Inoue K, Okawara T, Masutani M. Design and synthesis of phenolic hydrazide hydrazones as potent poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 24(16):3802-6, 2014.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

新規抗がん剤 (特許出願予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

難治性固形がんの有効な PARG 阻害剤の実用化研究(新規 PARG 阻害剤の開発) 発)：PARG 阻害剤溶解補助剤としてのシクロデキストリン有用性評価

研究分担者 入江徹美 熊本大学 大学院生命科学研究部 薬剤情報分析学分野 教授

研究要旨

難治性固形がんの有用な治療薬候補として期待されるポリ(ADP-リボース)分解酵素 (PARG) 阻害剤 MO2282 誘導体はいずれも溶解性が低く、製剤化・臨床応用を目指す上で化合物の難溶性がボトルネックとなっている。本研究では *in vivo* で投与可能な 1mg/mL まで改善することを目標に溶解補助剤としてのシクロデキストリンの有用性評価を行った。その結果、現在上市されている医薬品においても溶解補助剤として使用されている 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) を用いることで、MO2282 誘導体である MO2455 の溶解性を 7mg/mL 程度まで改善できることを見出した。また、HPBCD を用いて作成した MO2455 溶液は日数が経過しても化学的に安定かつ細胞傷害活性を保持した状態で、溶解性も低下しない可能性が示唆された。本研究により、HPBCD を用いることで当初の目標であった 1 mg/mL を大きく上回る濃度の PARG 阻害剤溶液を作成することに成功し、PARG 阻害剤の製剤化にあたり、重要な知見が得られた。

A.研究目的

DNA 修復応答に重要なポリ(ADP-リボース)分解酵素 (PARG) の阻害が、がん幹細胞マーカー陽性細胞株に対し DNA 修復応答の阻害を中心とする作用点から細胞死を誘導する。従って PARG は、がん治療、特に難治性固形がんの標的分子として大きな期待がもたれる。これまでに申請者らは PARG 阻害剤スクリーニング系を構築し、構造の異なる 4 種類のヒット化合物を得、その構造最適化を実施した。その中で MO2282 誘導体は、PARG 阻害のみならず cell-based 評価系において強い PAR 集積、アポトーシスを誘導し、*in vivo* xenograft モデルにおいても、有意な抗腫瘍活性を示した。しかしながら、MO2282 誘導体はいずれも溶解性が低く、製剤化・臨床応用を目指す上で化合物の難溶性がボトルネックとなっている。

環状オリゴ糖シクロデキストリン (CD) は、分子内に疎水性の空洞を有する単分子的ホスト分子である。CD の空洞にゲスト分子が取り込まれて包接複合体を形成すると、ゲスト分子の物理化学的性質

は様々に変化する。この分子カプセルと呼ばれる CD の超分子的な包接現象は、特に医薬品開発においては、製剤特性の改善や drug delivery system の構築などに広く応用されてきた。

そこで本研究では、各種 MO2282 誘導体の溶解性を *in vivo* で投与可能な 1mg/mL まで改善することを目標に溶解補助剤としての CD の有用性評価を行った。

B.研究方法

MO2282 誘導体 (MO2282, MO2455-mesylate, MO2455 の各種条件下における溶解度を吸光度法により評価した。

C.研究結果

1) MO2282 の溶解性に対する酸・塩基の影響

現在上市されている医薬品においても溶解補助剤として使用されている 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPBCD) を用い、酸性溶液または塩基性溶液における MO2282 の溶解性を比較した結果、

酸性溶液に対し、MO2282 はよく溶解した。各種酸性溶液（酢酸、酒石酸、クエン酸）に対する溶解度を測定したところ、ギ酸（0.5M HPBCD）に対する溶解度が最も大きく、最大濃度は 0.864 mg/mL であった。

2) MO2455-mesylate の溶解性に対する HPBCD の影響

MO2455-mesylate を各濃度（0–0.1 M）の HPBCD 水溶液を用いて溶解した。その結果、HPBCD は濃度依存的に MO2455-mesylate の溶解度を増大させた（図 1）。0.1 M HPBCD 水溶液に対する MO2455-mesylate の溶解度は 1.41 mg/mL であった。また、このときの溶液の pH は 3 付近であり、NaOH により pH を中性に近づけたところ、白色の沈殿物が生じた。

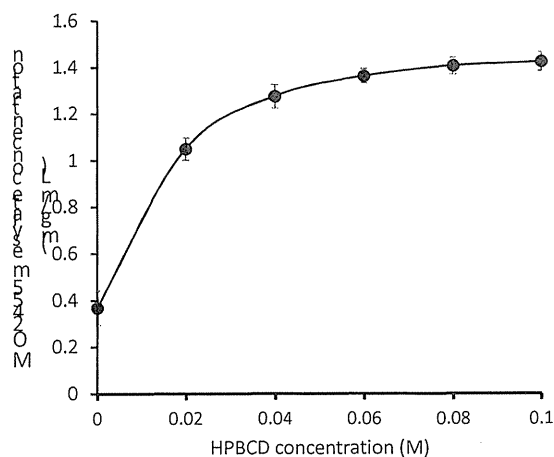


図 1 HPBCD による MO2455-mesylate 溶解度改善効果

3) MO2455 の溶解性に対する HPBCD の影響

MO2455 を各濃度（0–0.3 M）の HPBCD 溶液を用いて溶解した。0.1 M, 0.2 M, および 0.3 M HPBCD 溶液に対する MO2455 の溶解度はそれぞれ 4.21, 6.73, および 7.22 mg/mL となり、HPBCD は濃度依存的に MO2455 の溶解度を増大させた。

4) MO2455 溶液保存時の溶解度変化

MO2455 10mg に対して 0.3 MHPBCD を 1 mL で溶解し、作成した溶液を冷所(4℃)にて保存した。

18 日経過後の溶液の MO2455 濃度は 6.65 mg/mL であった。また LC/MS/MS による測定および MTT assay による細胞傷害活性測定を実施し、MO2455 が分解していないことおよび細胞傷害活性が保持されていることを確認した。

D.考察

本研究では、各種 MO2282 誘導体の溶解性を *in vivo* で投与可能な 1mg/mL まで改善することを目指し、各種条件下での検討を実施した。

MO2282 はギ酸（0.5M HPBCD）を用いることで、0.864 mg/mL まで溶解性が改善したが、目標である 1 mg/mL は達成できなかった。

そこで次に MO2455-mesylate を用いて実験を行った。その結果、0.1 M HPBCD を用いることで MO2455-mesylate の溶解度を 1.41 mg/mL まで改善することが可能であった。しかし、このときの pH が 3 付近であったため、生体への投与可能な製剤の調製を想定し、pH を中性に調整したところ、白色の沈殿物が生じた。したがって、MO2455-mesylate 溶液の製剤化は困難であると考えられた。

そこで次に MO2455 を用いた検討を実施した。その結果、MO2455 は 0.3 M HPBCD を用いることで溶解度を 7.22 mg/mL まで増大させることが可能であった。さらに、この溶液は作成後 18 日目までは目標以上の濃度および活性を保持していることが明らかとなった。以上の結果より、は HPBCD を用いることで *in vivo* 評価系で投与可能な MO2455 溶液を作成可能であることが示唆された。

E.結論

本研究により、HPBCD を用いることで当初の目標であった 1 mg/mL を大きく上回る濃度の MO2282 誘導体である MO2455 溶液を作成することに成功し、PARG 阻害剤の製剤化にあたり、重要な知見が得られた。今後、HPBCD 以外の CD 誘導体を中心に、より生体適合性が高い、PARG 阻害剤の溶解補助剤として最適な化合物の探索を継続する予定である。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Matsuo M, Shraishi K, Irie T et al.
Effects of intracerebroventricular
administration of
2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in a patient
with Niemann-Pick Type C disease, *Mol
Genet Metab Rep.*, 2014, 87, 26-41.

Umezaki Y, Irie T, Hirayama F et al.
Preparation of hydrophilic
C60(OH)10/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin
nanoparticles for the treatment of a liver
injury induced by an overdose of
acetaminophen, *Biomaterials*, 2015, 45,
115-123

Soga M, Irie T, Era T et al.
Preparation of hydrophilic HPGCD
Outperforms HPBCD as A Potential
Treatment for Niemann-Pick Disease Type
C During disease Modeling with iPS Cells,
Stem Cells, in press

Maeda Y, Irie T, Arima H et al.
Effects of Cyclodextrins on
GM1-gangliosides in Fibroblasts from
GM1-gangliosidosis Patients, *J Pharm
Pharmacol.*, in press

Tanaka Y, Yamada Y, Irie T et al.
Efficacy of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin
in Niemann-Pick disease type C model
mice and its pharmacokinetic analysis in a
patient with the disease, *Biol Pharm Bull.*,
in press

2. 学会発表

石塚洋一、田中雄太、入江徹美 他
Niemann-Pick 病 C 型治療薬

2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin の病態モデ
ルにおける安全性評価

第 9 回 トランスポーター研究会年会 (名古屋,
6/14-15, 2014)

近藤悠希、石塚洋一、入江徹美 他
Niemann-Pick 病 C 型治療薬

2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin の有効性に
関する Translational Research

第 9 回 トランスポーター研究会年会 (名古屋,
6/14-15, 2014)

深浦まど香、近藤悠希、入江徹美 他

Niemann-Pick 病モデルマウスを用いた
HPBCD 脳室内投与の有効性・安全性評価、
第 56 回日本先天代謝異常学会総会 (仙台,
11/13-15, 2014)

石塚洋一

有効性・安全性に優れる新規 Niemann-Pick 病
C 型治療薬の開発を目指した TR-rTR
第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウ
ム (熊本, 11/15-16, 2014)

白石広葵、石塚洋一、入江徹美 他

Niemann-Pick 病 C 型患児と病態モデルマウス
における 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin の
体内動態解析

第 31 回 日本薬学会九州支部大会 (福岡, 12/6-7,
2014)

徳丸博子、近藤悠希、入江徹美 他

Niemann-Pick 病 C 型に対する各種
Cyclodextrin 誘導体の有効性・安全性 In Vitro
評価

第 31 回 日本薬学会九州支部大会 (福岡, 12/6-7,
2014)

H. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

難治性固形がんの有効なPARG阻害剤の実用化研究（新規PARG阻害剤の開発）：PARG阻害剤の
合成研究

担当責任者 大川原 正 熊本大学 大学院生命科学研究部 客員教授

研究要旨 PARG阻害剤 M02455 の合成経路の検討

A. 研究目的

PARG 阻害剤の構造最適化による臨床開発
化合物の取得

B. 研究方法

MO2455 製剤化用（シクロデキストリン包
接）のサンプル提供、NMR スペクトル、
物性、合成経路の検討を行った。

（倫理面への配慮）

なし

C. 研究結果

現行ルートでのスケールアップ合成の検討
を行ったが、最終生成物の純度が向上せず、
精製がうまく行かなかった。

D. 考察

合成経路 15 工程の中で最後の 2 工程の精
製がうまく行かず、不純物を除去すること
が出来なかった。

E. 結論

岡山大学での成果と同様に、現行の合成法
がスケールアップ困難であることを再確認
した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Islam R, Koizumi F, Kodera Y, Inoue K,
Okawara T, Masutani M. Design and synthesis
of phenolic hydrazide hydrazones as potent
poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)
inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 24(16):
3802-6, 2014.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

新規抗がん剤 （特許出願予定）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

難治性固形がんに有効なPARG阻害剤の実用化研究(新規PARG阻害剤の開発):PARG阻害剤の構造最適化による臨床開発化合物の取得（b. バックアップ化合物の探索研究）に関する研究
ならびに薬物動態評価に関する研究

担当責任者 高村 岳樹 神奈川工科大学 工学部 応用化学科 教授

要旨

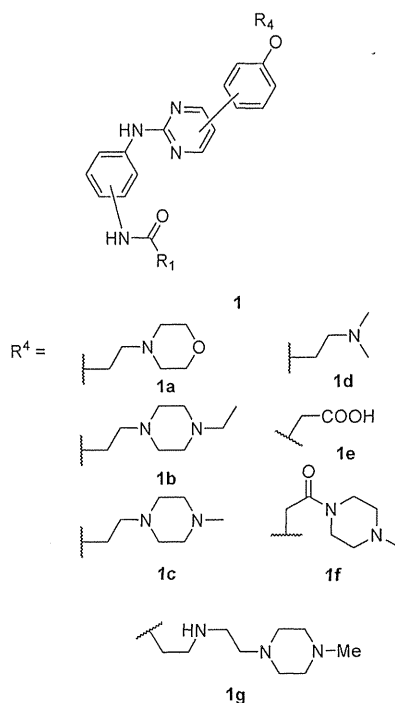
これまでの PARG 阻害剤候補化合物の化学物質 MO2282 の類縁体としていくつかの化合物の合成を試みた。キーとなる methoxyacetophenone 誘導体の合成には光延反応および単純な求核置換反応により合成を行うことが可能であり，そこから定法により阻害剤候補化合物 6 種類を合成することができた。合成品に関しては， $^1\text{H-NMR}$ および TOF-MS の測定により，目的の化合物であることを確認した。得られた化合物のうちカルボン酸のものはその溶媒への溶解性の低さから，単離精製を行うことが困難であった。またジメチルアミノ体においては，各合成ステップでの副生成物が多く，そのため収率の低下が問題となった。しかしながらいずれも今後の生物試験に供与できる量は確保した。得られた化合物のうち一部は小核試験を実施した。

A. 研究目的

既存のPARG阻害剤MO2282はその細胞障害活性が高くがん治療薬として期待されている。しかしながら，この化合物は極めて水に溶けにくく製剤化が困難であることがこれまでの研究から明らかとなっている。そのため，MO2282との生物活性の比較を行うことを目的とし，より水溶性の高い化合物の合成を試みた。

B. 研究方法

これまでに明らかにされてきたMO2282の類縁化合物であるPARG阻害剤について，いくつかの官能基を置換することで，活性の増減についての確認を行った。すなわち化合物1について1aから1gまでの化合物について合成の検討を行った。これらの置換は従来型のPARG阻害剤であるMO2455の水溶性を向上することが目的である。

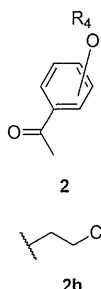


（倫理面への配慮）

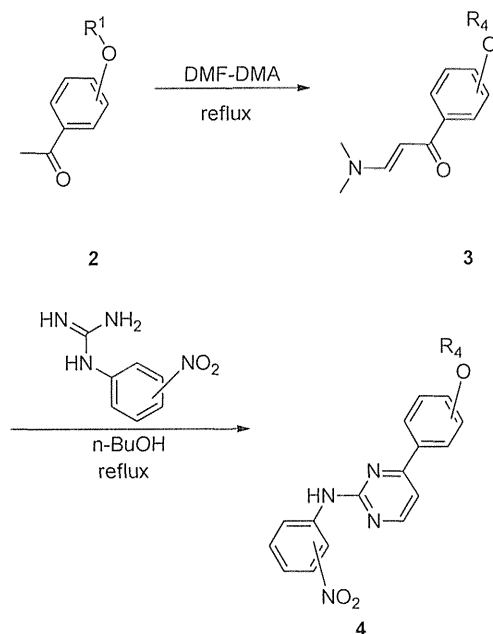
化合物の合成については，環境に負荷とならないよう，3次洗浄水までを廃液として処理した。その他，動物実験，遺伝子組み換え実験等は行っていない。

C. 研究結果

化合物1の合成にあたり、アセトフェノン誘導体2から合成を行った。この化合物は一般的にhydroxyacetophenoneと対応するハロゲン化アルキルの求核反応から得られるが、反応条件がきつくなることが予想されるため、光延反応により合成することとした。化合物1aの場合は、hydroxyacetophenoneと2等量の2-morpholinoethanolをTHFへ溶解させ、その溶液にさらにtriphenylphosphineおよびdiethyl azodicarboxylateを2等量ずつ加え、反応させた。TLCで原料の消失を確認後、目的物をカラムクロマトグラフィーにより単離した。約60%の収率で化合物2aを得ることができた。また2b, 2cは直接、合成せず、クロロエタノールで光延反応後に得られるクロロエチル体2hを後続反応させ、その後ピペラジン置換体を得る方法を選択した。化合物2dは、光延反応では合成は難しく、またTLC上で複数のスポットが確認された。上述の反応条件では収率は70%程度であった。一方、化合物2eの場合は光延反応ではなく求核置換反応により、methyl bromoacetateを用いて炭酸カリ存在下、ニートで反応させメチルエステル体として次の反応に用いた。原料とカラムによる分離が困難なため、カラムクロマトグラフィーにより反応物を含むフラクションを集め、これを次の反応に用いることとした。化合物1gは先の2hを経由する方法で、また1fは2eを合成する途中過程で置換基を導入した。すなわち、2hと2-(4-methyl-1-piperazino)ethylamineを炭

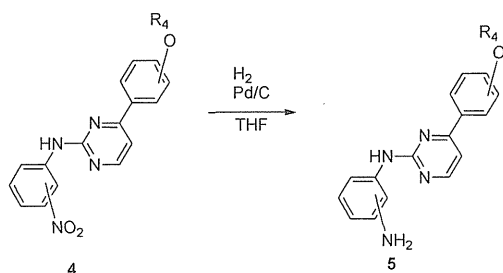


酸カリ存在下ニートで反応させ2gを得た。得られた化合物2はさらに、DMF・DMAを用いてジメチルアミノメチレン化させ、さらにグアニジン誘導体と反応させた。化合物2から3への反応はほぼ定量的に進行したが、化合物2dの場合は反応の進行とともに反応液が褐色化し、目的とする化合物は15%程度しか得ることはできなかった。また、グアニジン誘導体4への変換は置換基の種類によって収率が異なる結果となった。化合物3hの場合、収率は20%程度であったが、目的化合物が反応液から固体となって単離されるため、純度がよく、そのため、特段の反応の最適化は行わなかった。その他の場合の目的化合物の収率は60%前後であった。また化合物3dの場合は、アルゴン雰囲気下で反応させることにより、液の褐色化が若干減少した。化合物4hはエチルピペラジン、メチルピペラジンとそれぞれ炭酸カリ存在下、ニートで反応させ、目的とする4b, 4cを得ることができた。この場合の収率はほぼ定量的であった。またこの反応で得られる化合物4eのブチルエステル体は水酸化ナトリウム水溶液/MeOHで加水分解させ、得られたカルボン酸をDMT・MMを用いてメチルピペラジンと反応させ、アミド体4fを得た。



得られた化合物 4 は Pd/C を用いて水素添加した。TLC 上ではヒドロキシアミンの生成が確認され、反応時間は2日間必要であった。化合物 4e のブチルエステル体は溶解性が悪く、溶媒として DMF を用いたが、反応後のパラジウム触媒の除去がフィルター過だけでは困難であり、カラムにより生成を行った。また化合物 4 f の場合はイソプロパノール・水の混合溶媒で反応させ、目的物を得た。

得られた化合物 5 はさらにペプチド結合させ、目的物 1 またはそのエステルを得ることができる。この時のカップリング剤とし



て、DMF 溶媒中, DIPEA/HATU 存在下, HATU, TBTU, COMU, DMT-MM と試したが、いずれも収率は 30~50% であった。得られた化合物は、メタノールからの再結晶および、カラムクロマトグラフィーにより、単離を行った。ブチルエステル体は水酸化リチウムを用いて加水分解し目的とするカルボン酸 1e を得ることができた。得られた化合物は 1H -NMR および TOF-MS で目的化合物であることを確認した。

得られた化合物のうち 1b を用いて溶解度の確認を行った。この化合物の溶解度は 20% DMSO に対して 0.1 mg/ml, リン酸塩緩衝液 (20 % DMSO, pH3) で 0.3 mg/ml 程度であった。メタンスルホン酸を 2 等量添加すること 3 mg/ml (10% DMSO) の濃度まで溶解することが可能であることが分かった。

一方、シクロデキストリンに溶解させた MO2455 のメシル塩の保存安定性を確認するための LC-PDA 定量分析および MS による定性分析を行った。各機関で調整された MO2455 のシクロデキストリン溶液について定量したところ、クロマトグラム上に若干の不純物は見られるものの、保存期間が長くなるにつれて増加するピークの内容は確認できなかった。一部のサンプルを除いて、おおむね秤量値と測定値が一致した。測定値が低くなっているものについては、沈殿の析出が多量にあり、その影響が大きいと考えられた。また MO2455 のフリー体についても同様の結果であった。

さらに化合物 1a を用い、Chinese Hamster Lung (CHL) の細胞株を用いた小核試験を実施した。Parg の活性を阻害することで、DNA 切断の修復において、修復遅延または修復後の正常な細胞周期への移

行へ何等かの影響が生じることが考えられる。そのため、DNA切断から生じる小核の発生への影響を調べた。MTT試験を行った結果、この細胞に対する1aのIC50は約2.5 μ Mであった。また小核試験では、薬剤処理により、若干の誘発された小核の数の減少が見られた。Pargの阻害によってDNA修復処理に何等かの影響が生じている可能性がある。しかしながら、同条件では細胞の生存率が約20%と低く、また得られた結果の誤差が大きいことから、より詳細な実験の検討が必要となる。

試料	濃度 mg/ml	測定値 mg/mL
A	1.1	0.95
B	2.4	1.44
C	3.9	1.93
E	3.9	3.39
F	3.9	2.21
G	2.5	2.28

表1 MO2455 の秤量値と実測値
HPLC condition, column: cosmosil
C18 AR II 2.0x150 mm,
Flow: 0.3 mL/min, Solvent A: 0.2 %
HCOOH, Solvent B: MeCN, Linear
gradient: 0 min 2% B, 20 min 100%
B, 40 min 100%B, Retention time of
MO2455: 13.5min , Quantification:
UV340 nm
(PDA2998), Injection, 5 μ L

D. 考察

MO2282の類縁体の合成について、1fまでの合成を完了した。1gについてはまだ合成の途中段階であり、2gまでの合成が終了したところである。得られた化合物は水溶性の向上を考え設定されたものであるが、いずれも、水溶性の向上は見られなかった。

ただし化合物2fは水溶液への分散性がよく、シクロデキストリン製剤として可溶する可能性がある。得られた化合物はすべてMO2282のベンゼン環に水酸基を導入したもので、基本骨格は同じである。仮に水酸基を保護することなく反応を完結できれば、R¹=Hの化合物をリード化合物として、ここで示したすべての化合物を得ることができる。そのために、鈴木カップリングやアリルアミネーションを利用した合成反応について現在まで検討を行ってきたが、無保護の状態では現時点では成功していない。

LC-MSの分析では、シクロデキストリンの影響を排除することが重要で、カラムの選定や溶離条件がポイントとなることが分かった。今後生体試料の分析についても同様の条件が使用できると考えている。

E. 結論

MO2282の類縁体の合成に成功した。また一部は小核試験により、DNA損傷性が低下する結果を得ることができた。PARGの阻害剤の効果について、今後LC-MSを用いた

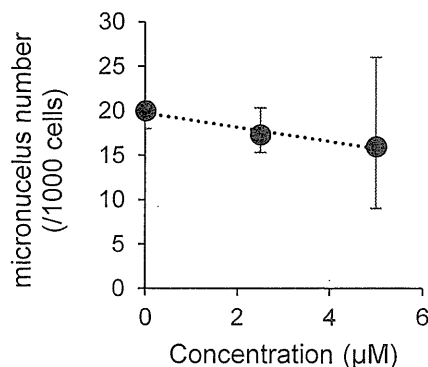


図1 小核試験の結果

PARの定量法について構築していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究に関連するものとしてはなし

2. 学会発表

1) 益谷美都子、藤森浩彰、原田博美、光畑元晴、高村 岳樹 Poly(ADP-ribose)代謝と ribosyladenosine 及び ribosylinosine 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、京都市(2014 年 10 月 16 日)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

難治性固形がんにも有効なPARG阻害剤の実用化研究(新規PARG阻害剤の開発):新規PARG阻害剤の分子設計に関する研究

担当責任者 石川 吉伸 静岡県立大学 大学院薬学研究院 准教授

研究要旨 既知のPARG阻害剤に関して定量的構造活性相関 (QSAR) 解析を試み、QSARモデル式を構築した。このモデル式を用いて、新規化合物のPARG阻害活性の予測を行った。

A. 研究目的

これまでに研究班で見出された 80 種類の MO 化合物の PARG 阻害活性値と、その分子特性を表現する多くの記述子 (descriptor) との関係式を構築する定量的構造活性相関 (QSAR) 解析を試みた。さらに構築したモデル関係式を用いて、研究班で合成された化合物の PARG 阻害活性の予測を行った。

B. 研究方法

PARG 阻害活性既知の MO 化合物 ($-6.0 < \log IC_{50} < -4.0$) の化学構造を描画後、配座発生プログラム Balloon と量子化学計算プログラム MOPAC を用いて三次元構造を生成し配座解析後、最安定構造を決定した。記述子計算プログラム PaDEL-descriptor を用いて安定構造の記述子の計算を行い、それらと MO 化合物の阻害能との間での QSAR モデル式の構築を、QSAR プログラム McQSAR を用いて行った。活性未知化合物についても最安定構造の決定と記述子の計算を行い、構築した QSAR モデル式を

用いて未知化合物の $\log IC_{50}$ 値の予測を行った。

C. 研究結果

上記の方法に基づき QSAR 解析を行ったところ、決定係数 (R^2) = 0.68 の線形モデル式を構築できた。モデル式から計算された 80 種の MO 化合物の $\log IC_{50}$ 値と実験 $\log IC_{50}$ 値との残差は 0.6 以内に収まった。このモデル式を用いて未知化合物の $\log IC_{50}$ 値の予測を行ったところ、その後アッセイにより判明した実験 $\log IC_{50}$ 値との残差は 0.1~1.2 であった。またこのモデル式により予想された PARG 阻害活性能と A549 がん細胞に対する増殖抑制能には正の相関が見られた。

D. 考察

上記プログラムの使用により、良好な QSAR モデル式を構築できた。しかし、新規に合成された化合物の PARG に対する $\log IC_{50}$ 値の予測を行ったが、残差が大きく、あまりよい結果だとはいえないので、

改善の必要があるといえた。興味深いことに、モデル式は A549 に対する阻害能の予測能が高そうであった。このことから、PARG 阻害能と A549 に対する増殖抑制能には関連があることが示唆された。

E. 結論

適切なコンピュータプログラムの使用により、新規 PARG 阻害剤の分子設計に有効な QSAR モデルを構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Islam R, Koizumi F, Kodera Y, Inoue K, Okawara T, Masutani M. Design and synthesis of phenolic hydrazide hydrazones as potent poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 24(16):3802-6, 2014.

2. 学会発表

1) 益谷美都子、藤森浩彰、原田博美、光畑元晴、高村 岳樹 Poly(ADP-ribose)代謝と ribosyladenosine 及び ribosylinosine 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、京都市(2014 年 10 月 16 日)。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

新規抗がん剤 (特許出願予定)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「難治性固形がんに有効なPARG阻害剤の実用化研究（新規PARG阻害剤の開発）」
機関名 熊本大学 大学院生命科学研究部

1. 学会等における口頭・ポスター発表

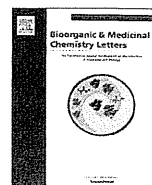
発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Poly(ADP-ribose)代謝とribosyladenosine及びribosylinosine	益谷美都子、藤森浩彰、原田博美、光畑元晴、高村 岳樹	第87回日本生化学会大会 シンポジウム	2014年10月16日	国内
Niemann-Pick病C型治療薬2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrinの病態モデルにおける安全性評価、ポスター発表	石塚洋一、田中雄太、山田侑世、近藤悠希、徳丸博子、白石広葵、内尾有史朗、田口真紀子、山縣美月、廣瀬優美子、武氏志保里、堀越裕佳、竹尾透、中瀬直己、江良沢実、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、入江徹美	第9回 トランスポーター研究会 年会	2014年6月14日 (土)～15日 (日)	国内
Niemann-Pick病C型治療薬2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrinの有効性に関するTranslational Research、ポスター発表	近藤悠希、石塚洋一、田中雄太、山田侑世、徳丸博子、白石広葵、内尾有史朗、田口真紀子、山縣美月、廣瀬優美子、武氏志保里、堀越裕佳、竹尾透、中瀬直己、江良沢実、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、入江徹美	第9回 トランスポーター研究会 年会	2014年6月14日 (土)～15日 (日)	国内
Niemann-Pick病C型治療薬2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrinの病態モデルにおける安全性評価、ポスター発表	入江徹美、石塚洋一、田中雄太、山田侑世、近藤悠希、中瀬直己、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策	第17回日本医薬品情報学会 総会・学術大会	2014年7月12日 (土)～13日 (日)	国内
Niemann-Pick病C型患児と病態モデルマウスにおける2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin体内動態解析、口頭発表	白石広葵、石塚洋一、内尾有史朗、松尾宗明、近藤悠希、和田幸樹、東大志、本山敬一、有馬英俊、竹尾透、中瀬直己、檜垣克美、大野耕策、江良沢実、入江徹美	第39回西日本薬剤学研究会	2014年8月29日 (金)～30日 (土)	国内
Niemann-Pick病モデルマウスを用いたHPBCD脳室内投与の有効性・安全性評価、口頭発表	深浦まど香、近藤悠希、石塚洋一、中瀬直己、江良沢実、有馬英俊、香月博志、松尾宗明、大野耕策、入江徹美	第56回日本先天代謝異常学会総会	2014年11月13日 (木)～15日 (土)	国内
有効性・安全性に優れた新規Niemann-Pick病C型治療薬の開発を目指したTR-rTR、口頭発表	石塚洋一、曾我美南、山田侑世、近藤悠希、松尾宗明、竹尾透、中瀬直己、東大志、本山敬一、有馬英俊、和田幸樹、香月博志、首藤剛、甲斐広文、檜垣克美、大野耕策、江良沢実、入江徹美	第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム	2014年11月15日 (土)～16日 (日)	国内
Niemann-Pick病C型患児と病態モデルマウスにおける2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrinの体内動態解析、口頭発表	白石広葵、石塚洋一、内尾有史朗、松尾宗明、近藤悠希、和田幸樹、東大志、本山敬一、有馬英俊、竹尾透、中瀬直己、檜垣克美、大野耕策、江良沢実、入江徹美	第31回 日本薬学会九州支部大会	2014年12月6日 (土)～7日 (日)	国内
Niemann-Pick病C型に対する各種Cyclodextrin誘導体の有効性・安全性 In Vitro 評価、口頭発表	徳丸博子、近藤悠希、田口真紀子、中島由佳、松本朋子、石塚洋一、岡田安代、西川淳一、市川厚、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、大野耕策、檜垣克美、入江徹美	第31回 日本薬学会九州支部大会	2014年12月6日 (土)～7日 (日)	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Design and synthesis of phenolic hydrazide hydrazones as potent poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) inhibitors	Islam R, Koizumi F, Koder Y, Inoue K, Okawara T, Masutani M.	Bioorg Med Chem Lett.	24, 3802-3806 (2014)	国外
Effects of intracerebroventricular administration of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in a patient with Niemann-Pick Type C disease	Matsuo M, Shraishi K, Wada K, Ishitsuka Y, Doi H, Iimori Y, Mizoguchi T, Eto J, Mochinaga S, Arima H, Irie T	Molecular Genetics and Metabolism Reports	87, 26-41 (2014)	国外
Preparation of hydrophilic C60(OH)10/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanoparticles for the treatment of a liver injury induced by an overdose of acetaminophen	Umezaki Y, Iohara D, Anraku M, Ishitsuka Y, Irie T, Uekama K, Hirayama F	Biomaterials	45, 115-123 (2015)	国外
HPGCD Outperforms HPBCD as A Potential Treatment for Niemann-Pick Disease Type C During disease Modeling with iPS Cells.	Soga M, Ishitsuka Y, Hamasaki M, Yoneda K, Furuya H, Matsuo M, Ihn H, Fusaki N, Nakamura K, Nakagata N, Endo F, Irie T, Era T	Stem Cells	in press	国外
Effects of Cyclodextrins on GM1-gangliosides in Fibroblasts from GM1-gangliosidosis Patients	Maeda Y, Motoyama K, Higashi T, Horikoshi Y, Takeo T, Nakagata N, Kurauchi Y, Katsuki H, Ishitsuka Y, Kondo Y, Irie T, Era T, Arima H	Journal of Pharmacy and Pharmacology	in press	国外
Efficacy of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in Niemann-Pick disease type C model mice and its pharmacokinetic analysis in a patient with the disease	Tanaka Y, Yamada Y, Ishitsuka Y, Matsuo M, Shiraishi K, Wada K, Uchio Y, Kondo Y, Takeo T, Nakagata N, Higashi T, Motoyama K, Arima H, Mochinaga S, Higaki K, Ohno K, Irie T	Biological and Pharmaceutical Bulletin	in press	国外

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。



Design and synthesis of phenolic hydrazide hydrazones as potent poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) inhibitors

Rafiqul Islam^a, Fumiaki Koizumi^b, Yasuo Kodera^b, Kengo Inoue^c, Tadashi Okawara^{a,*}, Mitsuko Masutani^d

^a Department of Medical Technology, Kumamoto Health Science University, 325 Izumi-machi, Kumamoto 861-5598, Japan

^b Sien-Lab, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

^c Pharma Valley Center, 1007 Shimonagakubo, Nagaizumi-machi, Shuntougn, Shizuoka Prefecture 411-4777, Japan

^d Division of Genome Stability Research, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2014

Revised 18 June 2014

Accepted 21 June 2014

Available online 27 June 2014

Keywords:

Synthesis

Hydrazide-hydrazone

PARG

PARP

Inhibitor

Molecular docking

ABSTRACT

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) are enzymes responsible for catalyzing the formation and degradation of poly(ADP-ribose) (PAR) polymers, respectively. Activation of PARP has been shown to be involved in cell death induced by genotoxic stimuli. On the other hand, genetic disruption of PARG also leads to increased level of cell death by accumulation of PAR. Unlike PARP, where significant medicinal effort has been expended to identify potent inhibitors, PARG has been insufficiently investigated as a molecular therapeutic target. In this study, we report the design, synthesis, and biological evaluation of phenolic hydrazide hydrazones as potent PARG inhibitors. Compounds **3d**, **3e**, **5d**, **5e**, **8a**, **8b** and **8c** showed their ability to inhibit the catalytic activity of PARG in vitro with IC₅₀ values of 1.0, 2.1, 3.1, 3.2, 3.1, 2.8 and 1.6 μ M, respectively.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Poly(ADP-ribosyl)ation is a post-translational modification in which an ADP-ribose unit from nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) is transferred to specific amino acids of its target proteins. This modification influences protein–protein interactions and regulates various cellular processes,^{1–4} such as cell division, transcription, DNA repair, and different forms of cell death, ranging from necrosis to apoptosis and autophagy. The synthesis and degradation of poly(ADP-ribose) (PAR) are catalyzed by two types of enzymes: PAR polymerase (PARP) family of proteins and PAR glycohydrolase (PARG), respectively.⁵ PARP1, PARP2 and PARP3 are involved in DNA repair^{3,4} and PARP inhibitors strongly block DNA repair.⁶ Extensive activation of PARP1 by DNA damage has been specifically linked to the release of apoptosis inducing factor (AIF) from mitochondria, resulting in NAD⁺ depletion and cell death.⁷ On the other hand, genetic disruption of PARG can rapidly increase the levels of PAR and cell death, facilitating the release of mitochondrial proteins through signaling pathways.^{8–10} PARG inhibitors do not inhibit PARP1 directly, but instead prevent PARP1-mediated cell death by slowing the turnover of PAR and thus slowing NAD⁺ consumption.^{11,12}

Considering cellular significance, targeting poly(ADP-ribosyl)ation in the treatment of human diseases, especially cancer, has attracted considerable attention over the past several years. For this purpose, PARP inhibitors have been investigated broadly, since a role for PARP-1 in DNA repair response has been well established. To date, chemical inhibitors of PARP enzymes have reached the first level of clinical application in the therapy of cancer.^{13–15} In contrast, due to the lack of significant evidence implicating PARG's role in the regulation of cell death and bioavailable inhibitors, there has been very little progress in identifying small molecule inhibitors of PARGs. Recently the crystal structures of PARG from bacterial, protozoan and mammalian sources have been determined, and the catalytic mechanism of PARG has been proposed.^{16–19} PARG comprises an N-terminal regulatory and targeting domain (A-domain; residues 1–456 in the rat protein), a central mitochondrial targeting sequence (MTS; residues 457–472), and a C-terminal catalytic domain (residues 473–972).¹⁸ The catalytic domain of rat PARG adopts a bean shaped structure with a deep central cleft containing the conserved PARG-signature motif (GGG-X6-8-QEE)^{18,20} and Tyr791 that contributes strongly to PARG catalytic efficiency and inhibitor binding.^{16,21} The glutamate residues in the signature motif are critical for catalysis, and mutation of these residues leads to a complete loss of PARG

* Corresponding author. Tel./fax: +81 96 275 2160.

E-mail address: okawara@kumamoto-hsu.ac.jp (T. Okawara).

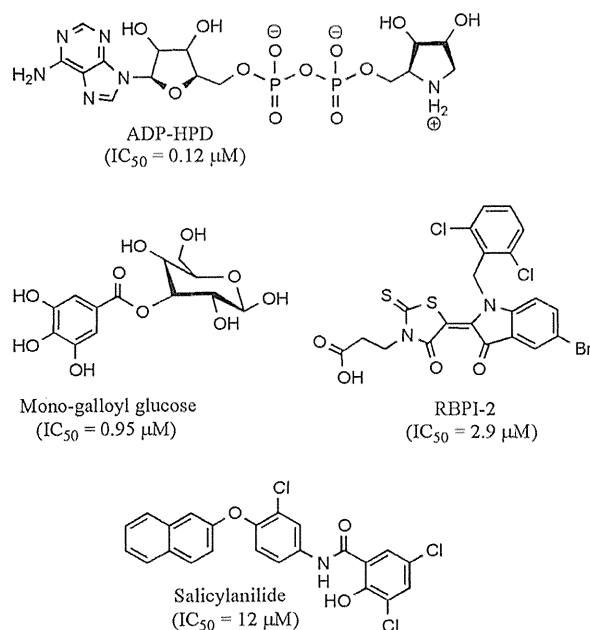
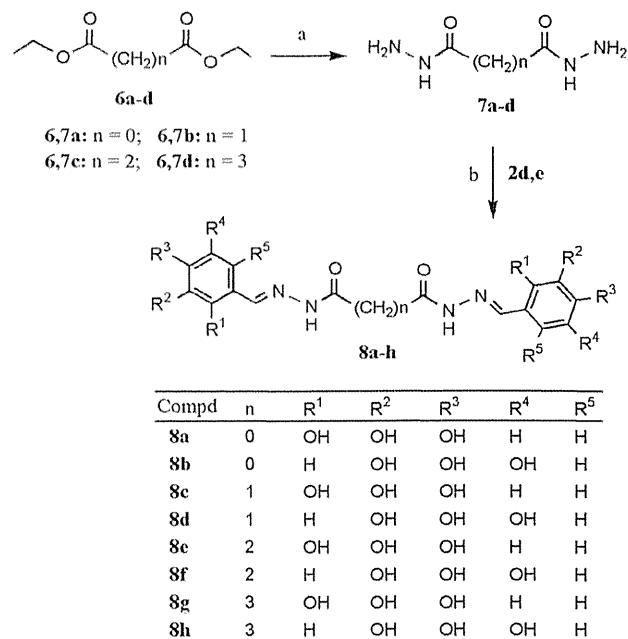


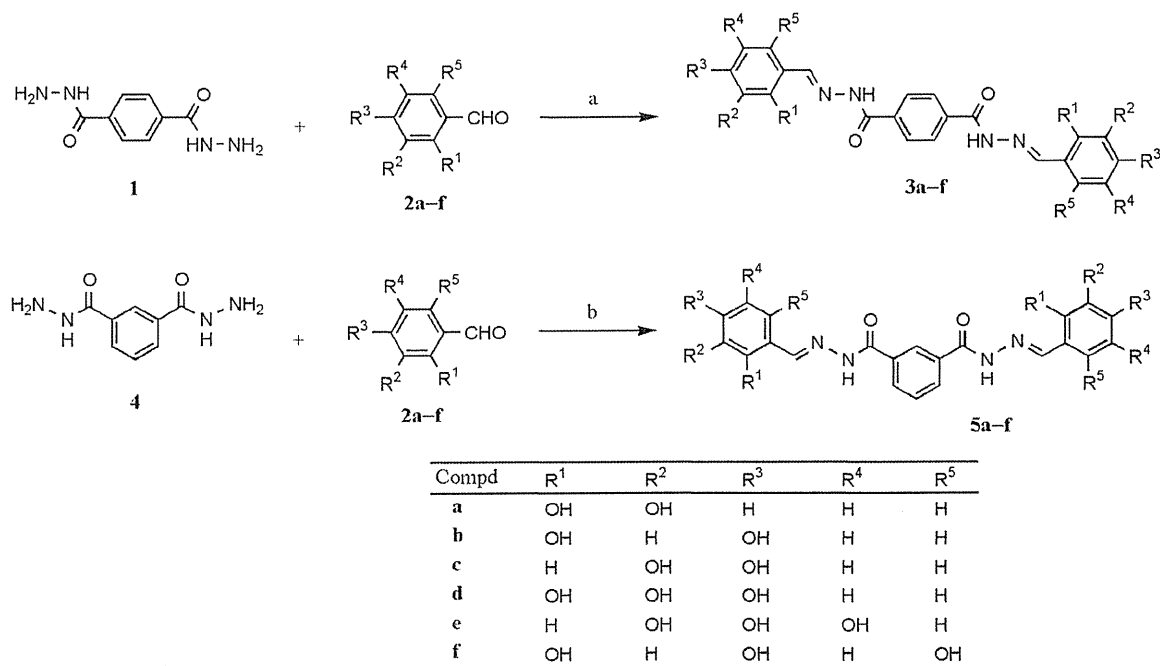
Figure 1. Reported PARG inhibitors.

activity.^{16–18,20} In particular, the Glu752 residue could play an important role in PARG catalytic activity by functioning as a general acid or base to protonate the 2'-OH of the ribose of the leaving group, and subsequently activating a water molecule for nucleophilic attack.¹⁸ It is noteworthy that PARG is encoded by a single gene, and it has low cellular abundance (approximately 2000 molecules per cell).²² Progress in understanding the structure, properties and catalytic mechanism of PARG has created an opportunity for bioorganic medicinal chemists to design new anti-cancer drugs that target PARGs.



Scheme 2. Synthesis of compounds 8a–h. Reagents and conditions: (a) hydrazine hydrate, MeOH, reflux, 5–6 h; (b) AcOH, MeOH, reflux, 6–8 h.

There are several reports of natural and synthetic PARG inhibitors that exhibit PARG suppressing activities.^{11,23–30} However, the usefulness of these agents has been limited due to toxicity, lack of specificity, poor cell permeability and high molecular weights.^{30–32} Nevertheless, adenosine diphosphate (hydroxymethyl)pyrrolidine-diol (ADP-HPD),^{25,26} mono-galloyl glucose,²⁷ RBPI-2²⁸ and salicylanilide²⁹ inhibit PARG specifically and help to understand their role within a wider biological context (Fig. 1). ADP-HPD has been widely used in the study of PAR in spite of its high cost and lengthy synthetic



Scheme 1. Synthesis of compounds 3a–f and 5a–f. Reagents and conditions: (a) AcOH, MeOH, reflux, 6–8 h; (b) AcOH, MeOH, reflux, 6–8 h.

Table 1
In vitro PARG inhibitory activity of compounds **3a–f**, **5a–f** and **8a–h**

Compound	PARG inhibitory activity, IC ₅₀ (μM)
3a	>75
3b	>75
3c	>75
3d	1.0
3e	2.1
3f	9.9
5a	14.8
5b	40.1
5c	19.2
5d	3.1
5e	3.2
5f	18.8
8a	3.1
8b	2.8
8c	1.6
8d	15.4
8e	9.8
8f	8.2
8g	13.9
8h	27.4
ADP-HPD	0.1

route. Despite these efforts, the design and preparation of potent PARG inhibitors remain very challenging tasks.

Within this context, we have designed and synthesized small molecules, phenolic hydrazide hydrazones, and performed in vitro evaluation of their PARG inhibitory activities. To facilitate the understanding of PARG binding affinity of the synthesized compounds, potential binding modes of selected compounds in the active site of PARG protein were modeled using the X-ray crystal structure of rat PARG (rPARG³⁸⁵, pdb code 3UEK).¹⁸

Synthesis of the title compounds **3a–f**, **5a–f** and **8a–h** was accomplished³³ as outlined in Schemes 1 and 2. Condensation of the appropriate commercially available aryl hydrazides **1** and **4** with the appropriate hydroxybenzaldehydes **2a–f** in the presence of a catalytic amount of acetic acid in methanol under reflux, afforded the corresponding hydrazones **3a–f** and **5a–f** in quantitative yields (Scheme 1). The requisite aliphatic dihydrazides **7a–d** were prepared in moderate yields by the reaction of the appropriate diesters **6a–d** with hydrazine hydrate in methanol at elevated temperatures (Scheme 2). Subsequent reaction of **7a–d** with the appropriate aldehydes **2d,e**, under similar conditions used for the preparation of **3a–f** and **5a–f**, gave the corresponding second series

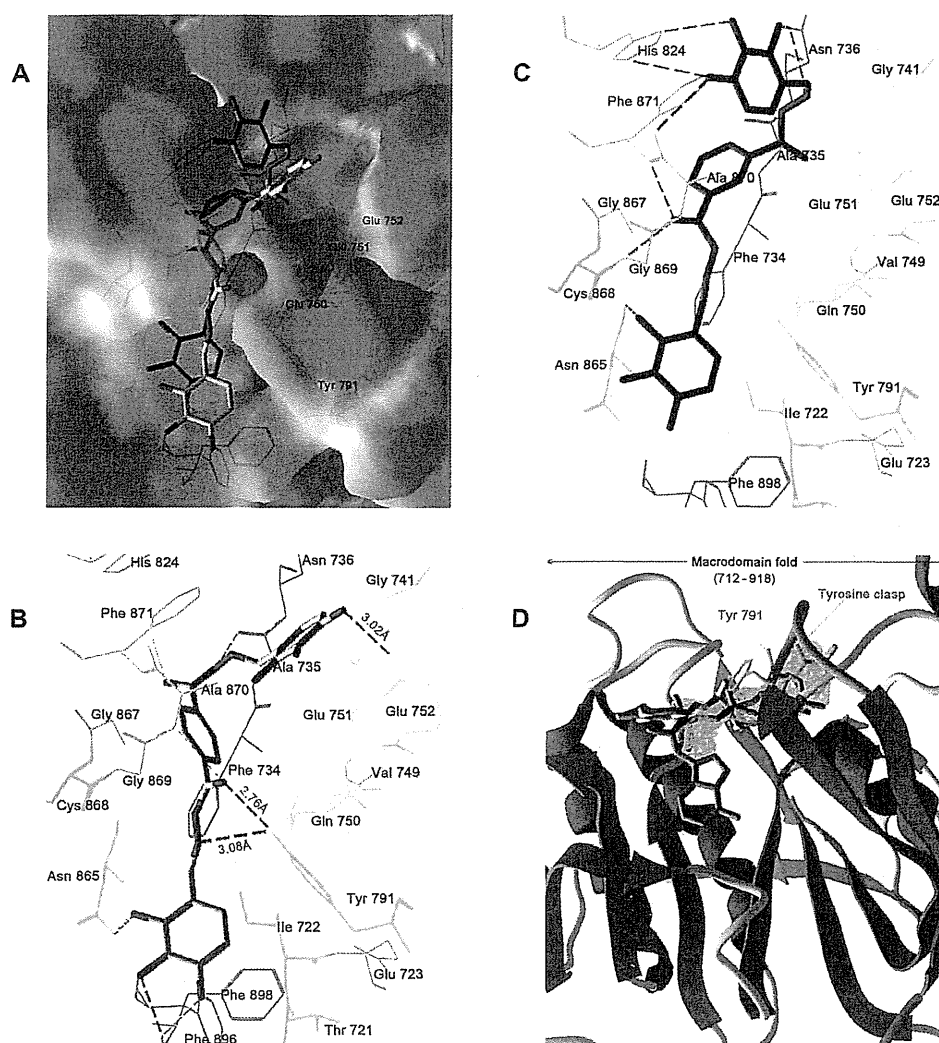


Figure 2. Potential binding modes of compounds **3d**, **5d** and ADP-HPD within the catalytic domain of rPARG. (A) Alignment of **3d** (yellow) and **5d** (deep green) within the active site (electrostatic surface shown). (B) Active site residues showing H-bond interactions (dotted lines) of **3d**. (C) Active site residues showing H-bond interactions (dotted lines) of **5d**. (D) Ribbon structure of the rPARG catalytic macrodomain fold (residues 712–918) showing the docking mode of **3d** (yellow) and ADP-HPD (magenta) in the active pocket (green). The tyrosine clasp and Tyr791 acid residue are shown in maroon and cyan, respectively.