

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（総括・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）

業務主任者 松野 研司 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究要旨

PARG阻害剤として見出しているM02282誘導体の構造最適化により、開発候補化合物M02455を同定した。本化合物は、強力なPAR集積作用および細胞障害活性に加え、ヒトxenograftヌードマウスモデルで有意な抗腫瘍効果を示した。また、本化合物の肝ミクロソームin vitroクリアランス値は比較的小さく、CYP阻害なども認められなかった。現在、in vivo毒性試験（2週間連投@ラット）が進行中であるが、現時点では、高用量（5 mg/kg/day）において、一般行動での異常、体重および摂餌量の減少は認められていない。医薬品候補化合物としての確度が高いと考えられる。次年度以降に世界初となるPARG阻害剤の治験開始（phase 0/1）を目指す。

分担研究者

益谷美都子 国立がん研究センター研究所
創薬臨床研究分野 分野長
（平成26年4月～平成27年1月31日）、
国立がん研究センター研究所・客員
研究員/長崎大学大学院医歯薬学総
合研究科・教授（平成27年2月1日～
平成27年3月31日）

下山 達 都立駒込病院 化学療法科 医長

井上 謙吾 公益財団法人静岡産業
振興財団ファルマバレーセンター
名誉所長

入江 徹美 熊本大学 大学院生命科学研究部
教授

大川原 正 熊本大学大学院 生命科学研究部
客員教授

高村 岳樹 神奈川工科大学 工学部
応用化学科 教授

石川 吉伸 静岡県立大学 大学院 薬学研究院
准教授

A．研究目的

難治性固形がんにおいては化学療法及び放射線療法抵抗性のがん幹細胞が治療抵抗性及び再発の要因と考えられている。新規薬剤の開発により、化学療法及び放射線療法の有効性をがん幹細胞について飛躍的に向上させることは、がん幹細胞のシグナル伝達系を標的とする多くの分子標的薬の開発と同等に重要である。がん幹細胞は、他のがん細胞に比較してDNA修復応答系が異なることがDNA損傷に対して抵抗性の要因となることが示されている。これはDNA修復応答経路を標的とした治療法が開発が、がん幹細胞をより選択的に阻害する可能性を示唆している。

DNA修復応答に関わるポリ(ADP-リボース)の主な分解酵素ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ(PARG)の機能阻害がES細胞やがん幹細胞マーカー陽性がん細胞株において化学療法剤の致死作用を増強するなどがん幹細胞においてPARG阻害による化学療法・放射線療法の効果増強機序の知見が既に集積している。PARGは抗がん剤標的候補として国外で注目されつつあるが、臨床応用に有効な阻害剤は開発されていない。また、PARG阻害剤は抗がん剤としての創薬開発は本邦では皆無であり、化学療法及び放射線療法の増感剤としての実用化の研究開発の必要性が高い。そこで本研究班では、PARG阻害剤の化学療法及び放射線療法の増感剤としての実用化に向けて、分子設計の手法を用いて臨床開発候補化合物の開発と薬力学的マーカー、効果予測（薬効）マーカーを平行して検討し、有効ながん種の特定を行ってきた。さらに、H23-25年度の厚労科研費「がん幹細胞を標的とした化学療法及び放射線療法のPARG阻害剤による効果増強法の実用化研究」によりPARG阻害剤の開発

研究を行ってきた。独自のスクリーニング系による探索の結果、構造の異なる4種類のリード化合物を得た。このうち、最も有望なMO2282の構造最適化を分子設計の手法を駆使して進め、in vivo xenograftモデルにおいて有意な抗腫瘍効果を示す化合物を取得している。また臨床応用可能な薬効予測マーカー候補(BRCA1等)を数種同定している。

本研究事業においては、今後3年間の研究期間において、世界初となるPARG阻害剤の治験開始(phase 0/1)を目指す。すなわち、臨床試験候補化合物の選定に向けた開発研究を実施(H26年度)後、治験移行を目的とした非臨床試験(GLP)および原薬スケールアップ製造研究(CMC)を実施する(H27年度)。併せて、薬力学的マーカーおよび効果予測マーカーの同定により有効ながん種を特定し(H26年度)、各マーカーを臨床試験において測定する系を確立する(H27年度)。臨床試験を効率的に進める段階に到達した後、特定のがん種を対象としたphase 0/1試験を開始する(H28年度)。

B. 研究方法

プロジェクトの総合推進

プロジェクトを効率よく滞りなく推進するため、月に1回の頻度でFace to Face meeting又はWEB会議を催した。また研究進捗の確認では、PDCA管理を導入し、月毎にPDCA管理票への入力を各研究者に求め、タイムリーな情報共有を図った。

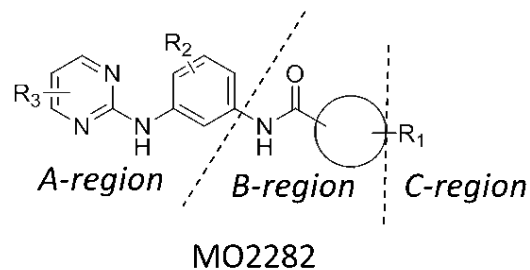
PARG 阻害剤の構造最適化による臨床開発化合物の取得

a. リード化合物の最適化とCMC研究

すでに我々が見出している4種類のリード化合物のうち、ヒトxenograftヌードマウスモデルで有意な抗腫瘍効果が認められたMO2282誘導体から臨床開発化合物候補の取得を目指し、MO2282の各部分(A~C部分)を変換した化合物を合成し、PAR集積作用(cell-based assay)、細胞障害活性、ヒトxenograftヌードマウスモデルで評価した。開発候補化合物として位置づけたMO2455は、肝ミクロソームin vitroクリアランス、CYP阻害評価を実施した。現在、in vivo毒性試験(2週間連投@ラット)が進行中である。

また、GLP(&信頼性基準)準拠の非臨床試験(毒性&薬理試験)およびcGMP原薬合成に向けたMO2455のCMC研究を実施した。

さらにMO2455は、比較的難溶性の化合物であるため、静脈注射投与可能な製剤処方を検討した。平行して、溶解性向上を目的とした誘導体設計・合成を実施した。



平行して、MO2282誘導体に対するヒト癌細胞株の感受性スペクトラムを確認した。

b. バックアップ化合物の探索研究

MO2282以外の3種類のリード化合物からの合成展開に加え、我々が確立したPAR集積を指標とするhigh throughputのcell-based assay系を用いた探索研究により、バックアップ化合物の探索研究も平行して実施した。

薬力学的マーカーの最適化および薬効予測マーカーの同定

a. 薬力学的マーカーの最適化研究

これまでの検討から、PAR集積と細胞障害活性には強い相関が認められている。PAR集積は、PARG阻害剤の暴露後に起こるため、predictive markerとして用いることは難しいが、薬力学的マーカーとしては活用可能である。そこで、PARG阻害剤の暴露後に起こるPAR集積や代謝物を薬力学的マーカーとして活用を検討した。がん細胞株、末梢血リンパ球及び血漿、尿などの検体を用いたPAR定量系(ELISA, 細胞免疫組織, 質量分析法)構築を検討した。

b. 薬効予測マーカーの同定

合成致死仮説に基づく手法で特定の遺伝子発現を抑制し、PARG阻害剤の感受性を規定する分子を探索した。これまでに薬効予測マーカー候補として同定した因子と新たな探索系により薬効予測マーカー候補を単離し、ノックダウン系などを用いてPARG阻害剤の効果との関連、詳細なメカニズム解析を実施し、複数の候補因子を単離し、検証を進めた。

薬物動態評価

PARG阻害剤のHPLC-MSにおける定量分析条件を導き出し、分析条件の最適化をおこなった。また、PARの分解産物の定量的方法を開発した。現在進行中の薬効試験および毒性試験(2週間連投@ラット)の血清サンプルを分析し、薬物動態パラメーターを取得する。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については、各分担機関における「動物実験に関する指針」を遵守した。遺伝子組換え実験については、各分担機関における遺伝子組換え実験安全委員会において研究計画に対する審査を受け、承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

プロジェクトの総合推進

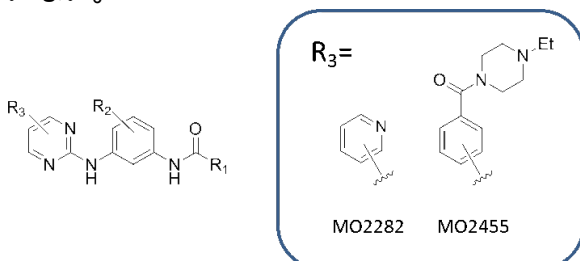
プロジェクトを効率よく滞りなく推進するため、月に1回の頻度でFace to Face meeting又はWEB会議を催し、研究代表者及び他の分担研究者の情報を共有するとともに、方向性と手段について頻回に打ち合わせを行った。会議においては、各研究者の研究進捗の確認、データの検証、今後の方針について助言を行った。さらに、不定期に電話会議やメールで各研究者と連絡を密にとり、研究班における研究調整を行った。

また研究進捗の確認では、PDCA管理を導入し、毎月PDCA管理票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。

PARG 阻害剤の構造最適化による臨床開発化合物の取得

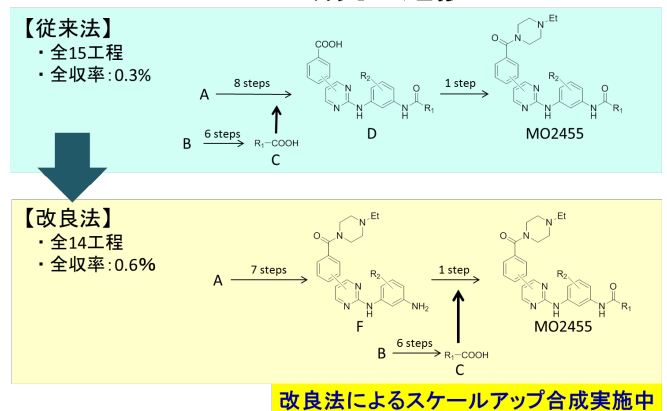
a. リード化合物の最適化とCMC研究

すでに我々が見出している4種類のリード化合物のうち、ヒトxenograftヌードマウスモデルで有意な抗腫瘍効果が認められたMO2282誘導体から臨床開発化合物候補の取得を目指した。すなわちMO2282の各部分を変換した化合物を合成し、PAR集積作用 (cell-based assay) および細胞障害活性を評価した。その結果、強力なPAR集積作用および細胞障害活性を示すMO2455を見出した。本化合物は、ヒトxenograftヌードマウスモデルで有意な抗腫瘍効果が認められ、肝ミクロソームin vitroクリアランス値も比較的小さく、CYP阻害なども認められなかったことから、開発候補化合物として位置づけた。現在、in vivo毒性試験 (2週間連投 @ラットiv) が進行中であるが、現時点では、高用量 (5 mg/kg/day) において、一般行動での異常 (中毒症状等)、体重及び摂餌量の減少は認められていない。

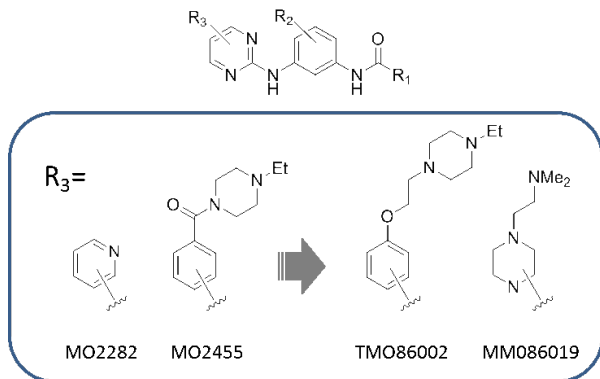


次に、次年度に予定しているGLP (&信頼性基準) 準拠の非臨床試験 (毒性 & 薬理試験) およびcGMP原薬合成に向けたMO2455のCMC研究を実施した。その結果、現行のメイプルルートは、スケールアップ合成には適していないことが判明したため、別合成ルートを開拓した。新合成ルート (14工程) は、旧来法と比べてステップ数が1工程短く、また総収率 (0.6%) を2倍向上させることに成功した。これらの成果をもとに、外注によるスケールアップ製造を実施し、50gスケールでMO2455を取得することに成功した。本スケールアップ製造研究において、MO2455に結晶多形が存在することが明らかとなったが、精製法および塩形の検討により品質をコントロールする方向性を見出した。

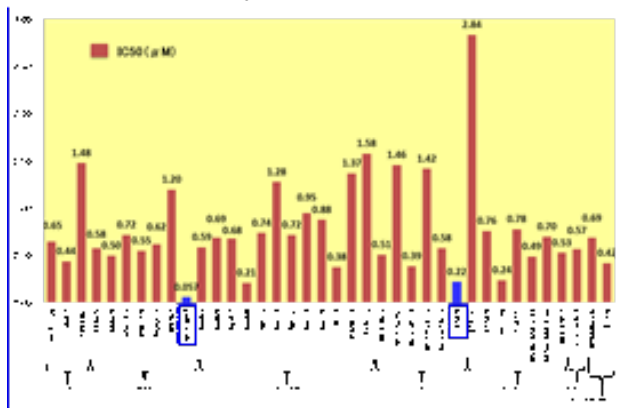
MO2455のCMC研究の進捗



またMO2455は、比較的難溶性の化合物であるため、静脈注射投与可能な製剤処方を検討した。その結果、シクロデキストリン共存下で>1mg/mLの水溶性を確保することに成功した。本製剤処方は、今後のin vivo評価を容易にする手段として極めて有効であると考えられる。平行して、溶解性向上を目的とした誘導体設計・合成を実施した。まず、親水性置換基を導入した化合物 (25化合物合成) による物性改善を図ったところ、溶解度は明らかに向上したものの、強いPARG阻害活性を有する化合物は見出されなかった。一方、リード化合物のプロドラッグ化に関しては、リン酸や各種アミノ酸を導入した化合物の合成に成功し、これらの化合物の溶解度は向上していた。



ヒト癌細胞株のMO2282誘導体に対する感受性スペクトラムが確認され、高感受性を示す数種のがん細胞株(A549細胞株等)が同定された。その中でも、胃癌細胞株であるNCI-N87は他の細胞株に比べて非常に高い感受性($IC_{50}=0.057 \mu M$)を示したことから、本細胞株を用いたxenograftヌードマウスモデルを作成した。



b. バックアップ化合物の探索研究

MO2282以外の3種類のリード化合物からの合成展開に加え、我々が確立したPAR集積を指標とするhigh throughputのcell-based assay系を用いた探索研究により、バックアップ化合物の探索研究も平行して実施した。このうちTM86004は単独では細胞障害活性をもたないものの、細胞にあらかじめDNAダメージを付加することにより、PAR集積を増強させることが見出された。この化合物は、放射線及び細胞障害性抗がん剤の増感剤としての役割が期待される。また、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、バックアップ化合物の探索に活用した。次年度以降も継続してバックアップ化合物を探索する。

薬力学的マーカーの最適化および薬効予測マーカーの同定

a. 薬力学的マーカーの最適化研究

これまでの検討から、PAR集積と細胞障害活性に

は強い相関が認められている。PAR集積は、PARG阻害剤の暴露後に起こるため、predictive markerとして用いることは難しいが、薬力学的マーカーとしては活用可能である。そこで、PARG阻害剤の暴露後に起こるPAR集積や代謝物を薬力学的マーカーとして活用を検討した。がん細胞株、末梢血リンパ球及び血漿、尿などの検体を用いたPAR定量系(ELISA, 細胞免疫組織, 質量分析法)構築を検討した。

b. 薬効予測マーカーの同定

合成致死仮説に基づく手法で特定の遺伝子発現を抑制し、PARG阻害剤の感受性を規定する分子を探索した。これまでに薬効予測マーカー候補として同定した因子と新たな探索系により薬効予測マーカー候補を単離し、ロックダウン系などを用いてPARG阻害剤の効果との関連、詳細なメカニズム解析を実施し、複数の候補因子を単離し、検証を進めた。

また、TUNEL染色を用いたアポトーシス細胞の検出実験において、MO2455-mesylate($1 \mu M$ および $2 \mu M$)添加4時間、および24時間後に、A549細胞でアポトーシスが確認された。アポトーシスを示す細胞数は、薬剤添加24時間後よりも4時間後のほうが多く見られた。この結果は、ウエスタンブロットでのcleaved caspase-3やcleaved PARPの発現量と一致する。化合物のアポトーシス誘導能にKRAS遺伝子変異のstatusが影響するかを、KRAS mutant株 HCT-116と、そのsublineであるKRAS WT株 Hkh2を用いて比較検討した。結果、HCT-116とHkh2の間に顕著な違いは認められず、KRAS遺伝子変異が薬効予測マーカーとなる可能性は示唆されなかった。

薬物動態評価

PARG阻害剤のHPLC-MSにおける定量分析条件を導き出し、分析条件の最適化をおこなった。また、PARの分解産物の定量的方法を開発した。現在進行中の薬効試験および毒性試験(2週間連投@ラット)の血清サンプルを分析し、薬物動態パラメーターを取得する。

D. 考察

難治性固形がんに対しては、これまで多くの抗がん剤が開発されてきた。既存の抗がん剤は、初期は有効であることが多いが、生き残ったがん細胞が抵抗性を示すようになり、最終的には治療に反応しなくなることが多い。これらの治療不応性の原因としては、がん幹細胞が深く関与している

と考えられている。その中でPARGの阻害は、DNA修復応答系が異なるがん幹細胞の治療として有望な新規標的と考えられ、既存の抗がん剤との併用等、難治性固形がんの有効な治療法となる可能性が高い。

本研究では、独自のスクリーニング系による探索により見出した4種類のケモタイプのリード化合物から、最も有望なM02282の構造最適化を推進した。すなわち、M02282の各部分を変換した化合物をin silico分子設計の手法を交えながら合成し、PAR集積作用 (cell-based assay) および細胞障害活性を評価した。その結果、強力なPAR集積作用、細胞障害活性およびヒトxenograftヌードマウスモデルで有意な抗腫瘍効果を示すM02455を見出した。本化合物は、肝ミクロソームin vitroクリアランス値も比較的小さく、CYP阻害なども認められなかったことから、開発候補化合物として位置づけた。現在、in vivo毒性試験 (2週間連投@ラット) が進行中であるが、現時点では、高用量 (5 mg/kg/day) において、一般行動での異常 (中毒症状等)、体重及び摂餌量の減少は認められておらず、医薬品候補化合物としての確度が高いと考えられる。今後は、世界初となるPARG阻害剤の治験開始 (phase 0/1) を目指す。すなわち、治験移行を目的とした非臨床試験 (GLP) および原薬スケールアップ製造研究 (CMC) を実施する。併せて、薬力学的マーカーおよび効果予測マーカーの同定により有効ながん種を特定し、各マーカーを臨床試験において測定する系を確立する。臨床試験を効率的に進める段階に到達した後、特定のがん種を対象としたphase 0/1試験を開始する予定である。

E . 結論

PARG阻害剤として見出しているM02282誘導体の構造最適化により開発候補化合物M02455を同定した。本化合物は、強力なPAR集積作用および細胞障害活性に加え、ヒトxenograftヌードマウスモデルで有意な抗腫瘍効果を示した。また、本化合物の肝ミクロソームin vitroクリアランス値は比較的小さく、CYP阻害なども認められなかった。現在、in vivo毒性試験 (2週間連投@ラット) が進行中であるが、現時点では、高用量 (5 mg/kg/day) において、一般行動での異常 (中毒症状等)、体重及び摂餌量の減少は認められておらず、医薬品候補化合物としての確度が高いと考えられる。次年度以降に世界初となるPARG阻害剤の治験開始 (phase 0/1) を目指す。

F . 健康危険情報 なし

G . 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) 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.

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

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)。

2) 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)

3) 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)

4) 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）

5) 石塚洋一

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
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）

6) 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）

7) 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）