

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）

担当責任者 下山 達 東京都立駒込病院 化学療法科 医長

研究要旨

難治性固形がんにも有効なPARG阻害剤を開発することを目的に、cell-based評価（PAR集積評価）、in vitro、in vivo評価（抗腫瘍効果、簡易毒性）によるスクリーニングを行い、M02282、M02455等の臨床試験候補化合物を取得した。これらの化合物は、明確な細胞内PAR集積作用、および強力な細胞増殖抑制活性(<1 μ M)、アポトーシス誘導能を有し、担癌ヌードマウスを用いた薬効評価において抗腫瘍効果を示したことから、抗がん剤としての効果が期待できる。今回、薬効予測マーカー同定のため、アポトーシス抵抗性因子であるKRAS遺伝子変異について検討を行ったが、遺伝子変異の有無で感受性の変化は認められなかった。38種のがん細胞株を用いて化合物の感受性スペクトラムを検討し、高感受性株を見出した。今後は、本細胞株も併せて用い、マーカーの同定を進める予定である。ラットを用いた簡易毒性試験も現在進行中である。今後、薬効予測マーカーを同定することで有効ながん種を特定し、測定系を確立後、phase 0/I試験の準備を開始する。

A．研究目的

難治性固形がんにも有効なPARG阻害剤を開発することを目的としている。

これまでcell-based評価系（23年度確立済）によりヒット化合物を見出し、さらに構造活性相関解析等により数種のリード化合物を創出した。本分担研究は、リード化合物の構造最適化により得られた臨床試験候補化合物について、cell-based評価、in vivo評価（抗腫瘍効果、簡易毒性）による絞り込みを行い、臨床開発化合物の選定をおこなう。また、phase I試験を効率的に進めるための、薬

力学的マーカー測定系の最適化と、効果予測バイオマーカーの同定を目指す。

B．研究方法

1) PARG阻害剤の構造最適化による臨床開発化合物の選定

a) リード化合物の最適化

溶解性の改善を目的として合成展開されたリード化合物について、Cell-based評価系による選定をおこなう。A549細胞を用いて、細胞増殖阻害効果(IC50)、およびPAR集積作用が十分であると判断された場合、HP CD（シクロデキストリン）

を用いた溶解性の検討を行う。

b) バックアップ化合物の探索

十数個の化合物について、MTTアッセイによる細胞増殖阻害効果(IC₅₀)およびwestern blottingによるPAR集積の確認を行った。

c) がん細胞株の選定

MTTアッセイによるM02282誘導体であるM02455-mesylateの細胞増殖阻害効果(IC₅₀)を38種の細胞株を用いて評価した。

d) 動物モデルでの薬効評価

A549担癌ヌードマウスにM02282の誘導体の1つであるM02455を連日経口投与(25 mg/kg)あるいは静脈内に隔日投与(5 mg/kg)し、経日的腫瘍体積および体重変化を評価した。

(倫理面への配慮)動物実験をおこなう場合は(国立がん研究センター内で実施)、動物実験計画書を動物実験倫理委員会に提出し承認を得る。実施にあたっては関連法規を遵守する。

e) 簡易毒性評価

M02282の誘導体であるM02455のラットを用いた静脈内投与による2週間反復投与毒性試験を実施(株式会社DIMS医学研究所への依頼試験)した。ラットにM02455(高用量:5 mg/kg/day, 中用量:2.5 mg/kg/day, 低用量:1.25 mg/kg/day)を14日間連日静脈内投与し、投与後の一般行動、中毒症状、生死等について観察した。また定期的に体重および摂餌量を測定した。さらに14日間の投与終了後、血液を採取し、血液学的検査および血液生化学的検査を実施した。

2) 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

臨床試験を想定し、血液から分離した末梢血単核球を用いて、PARの評価を行った。

b) 薬効予測マーカーの同定

i) アポトーシス誘導能の確認

M02455をA549細胞に暴露し、暴露4時間後、24時間後のアポトーシス誘導能をTUNEL染色法にて確認した。

ii) 感受性因子の探索

M02282、M02455を暴露した細胞において、western blottingによりアポトーシスのマーカーとして知られるcleaved PARPおよびcleaved caspase-3蛋白の発現が検出され、上記化合物がアポトーシスを誘導することが確認されている。KRAS mutant株HCT-116はそのsublineであるKRAS WT株Hkh2に比べてアポトーシス耐性である[Int J Cancer. 2014 May 1;134(9):2146-55.]ことが確認されている。M02282、M02455-mesylateが示す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、上記2株に対するM02282、M02455の感受性試験(MTT assay)により確認した。

iii) Agilent Arrayを用いた遺伝子発現解析によるマーカー探索

がん細胞株に各々IC₅₀、IC₈₀のM02455を暴露し、暴露4時間後に細胞を回収してRNAを抽出。抽出したRNAを用いて、Agilent Expression Array解析を実施した。

C. 研究結果

1) PARG阻害剤の構造最適化による臨床開発化合物の選定

a) リード化合物の最適化

M02282誘導体合成により、強力なPAR集積活性および細胞障害活性を示すM02455を同定した。

b) バックアップ化合物の探索

検討した化合物のうち、TM086004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。

c) がん細胞株の選定

ヒト癌細胞株のM02282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、特定のがん細胞株が他の細胞株に比べて非常に高い感受性(IC₅₀: 0.057μM)を示した。

d) 動物モデルでの薬効評価

これまでにA549担癌ヌードマウスに対してM02455-mesylate(25 mg/kg)を腹腔内に隔日投与することにより、腫瘍増殖抑制効果が見られることを確認している。今回、M02282の誘導体であるM02455を連日経口投与あるいは静脈内に隔日投与することによって腫瘍増殖抑制が見られるか否かを現在検討中である。またM02282誘導体に対して非常に高い感受性を示したがん細胞株についても移植細胞数等、腫瘍モデル作製条件を検討・確定した。

e) 簡易毒性評価

ラットにM02455を2週間連日静脈内投与したところ、高用量(5 mg/kg/day)においても、一般行動での異常(中毒症状等)は見られなかった。また体重および摂餌量の減少も認められなかった。現在、血液学的検査および血液生化学的検査について解析中である。

2) 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

血液から分離した末梢血単核球において、PAR集積がWBにより評価可能なことを確認した。

b) 薬効予測マーカーの同定

i) アポトーシス誘導能の確認

M02455-mesylate(1 μMおよび2 μM)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(図1)。

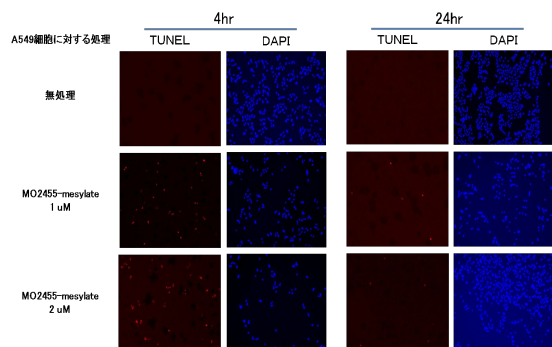


図1 TUNEL染色によるM02282誘導体のアポトーシス誘導の確認

ii) 感受性因子の探索

KRAS mutant株 HCT-116とそのsublineであるKRAS WT株 Hkh2に対するM02282, M02455-mesylateの感受性試験(MTT assay)を実施したところ、いずれの化合

物においても、2株間に顕著な違いは認めなかった。

iii) Agilent Array 発現解析によるマーカー探索

現在、化合物の暴露用量依存的に遺伝子発現が変化し、機能的に説明が可能である遺伝子を中心に選定作業を行っている。

D . 考察

今回、溶解性の改善を目的として合成展開されたリード化合物について、非常に強い細胞障害活性を示す化合物は存在したが、PAR 集積を誘導せず、新たな化合物の獲得には至らなかった。今後さらに合成展開を進め、上記2つの条件(強い細胞障害活性の保持とPAR集積の誘導)を持つ化合物を選定し、これまでのリード化合物よりも溶解性について改善された化合物を獲得する予定である。

バックアップ化合物として選定されたTM086004は、単独での細胞障害活性、およびPAR集積作用がなく、細胞にあらかじめDNAダメージを付加することにより、PAR集積が増強することから、この化合物は、特異的にPARG阻害活性を有することが示唆された。今後、放射線および細胞障害性抗がん剤とTM086004を併用することにより、細胞障害活性の増強が認められるか検討し、増感剤としての可能性を探る。

これまでに本研究によって見出されたヒット化合物であるM02282およびM02282誘導体(M02455, M02455-mesylate)は明確

な細胞内PAR集積作用および強力な細胞増殖抑制活性(<1 μ M)、アポトーシス誘導能を有し、担癌ヌードマウスを用いた薬効評価において抗腫瘍効果を示したことから、抗がん剤としての効果が期待できると考えられた。これらの化合物はアポトーシス誘導能を示すことから、今回、効果予測マーカーの同定として、アポトーシス誘導能にKRAS遺伝子変異のstatusが影響するかを検討したが、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。化合物が短時間でPAR集積と顕著なカスパーゼ依存性アポトーシス誘導することから、カスパーゼ経路分子がpredictive markerとして想定され、さらなる検討を進めていく予定である。今後、現在検討中のA549細胞株を用いた検討に加えて、高感受性がん細胞株を用いて薬効予測マーカーの同定し、臨床試験における各マーカーの測定系を確立していきたい。

E . 結論

本研究によって見出されたヒット化合物およびその誘導体は明確な細胞内PAR集積作用および強力な細胞増殖抑制活性(<1 μ M)、アポトーシス誘導能を有し、担癌ヌードマウスを用いた薬効評価において抗腫瘍効果を示したことから、抗がん剤としての効果が期待できる。今後、薬効予測マーカーを同定し、phase 0/I試験の準備を開始する予定である。

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

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

