

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

(委託業務題目) 難治性固形がんに有効なPARP阻害剤の実用化研究(新規PARP阻害剤の開発)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 松野 研司

平成27(2015)年 3月

目 次

I . 委託業務成果報告 (総括)	
難治性固形がん to 有効なPARG阻害剤の实用化研究 (新規PARG阻害剤の開発) -----	1
松野 研司	
II . 委託業務成果報告 (業務項目)	
1 . PARG阻害剤の最適化とCMC研究およびバックアップ化合物の探索研究 -----	7
松野 研司	
2 . PARG阻害剤活性評価と標的解析研究 -----	10
益谷 美都子	
3 . 難治性固形がん to 有効なPARG阻害剤の实用化研究 (新規PARG阻害剤の開発) ---	13
下山 達	
4 . グループ間の研究調整 -----	18
井上 謙吾	
5 . 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究 -----	21
入江 徹美	
6 . PARG阻害剤の合成研究 -----	25
大川原 正	
7 . 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 -----	26
高村 岳樹	
8 . 新規PARG阻害剤の分子設計に関する研究 -----	31
石川 吉伸	
III . 学会等発表実績 -----	33
IV . 研究成果の刊行物・別刷 -----	35

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。

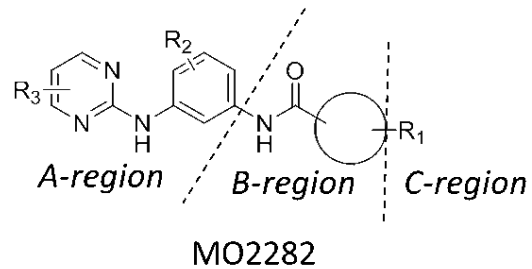
PARG 阻害剤の構造最適化による臨床開発化合物の取得

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

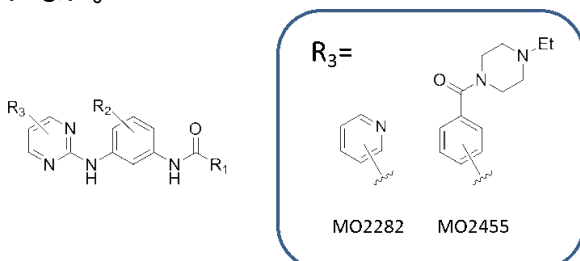
プロジェクトを効率よく滞りなく推進するため、月に1回の頻度でFace to Face meeting又はWEB会議を催し、研究代表者及び他の分担研究者の情報を共有するとともに、方向性と手段について頻回に打ち合わせを行った。会議においては、各研究者の研究進捗の確認、データの検証、今後の方針について助言を行った。さらに、不定期に電話会議やメールで各研究者と連絡を密にとり、研究班における研究調整を行った。

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

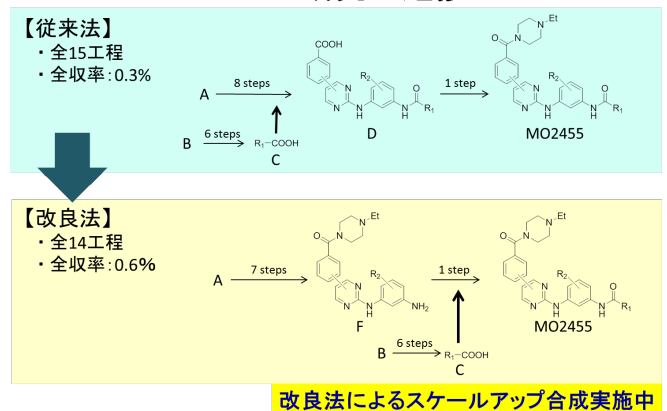
a. リード化合物の最適化とCMC研究

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。

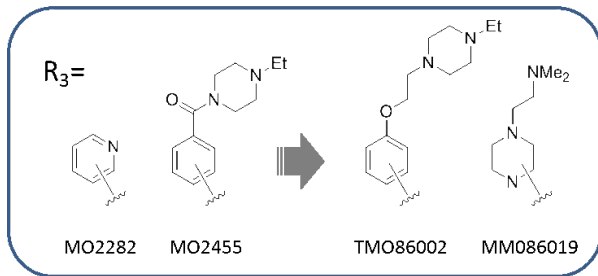
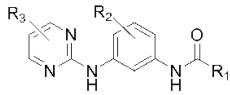


次に、次年度に予定しているGLP (&信頼性基準) 準拠の非臨床試験 (毒性 & 薬理試験) およびcGMP原薬合成に向けたMO2455のCMC研究を実施した。その結果、現行のメイプルミストルートは、スケールアップ合成には適していないことが判明したため、別合成ルートを開拓した。新合成ルート (14工程) は、旧来法と比べてステップ数が1工程短く、また総収率 (0.6%) を2倍向上させることに成功した。これらの成果をもとに、外注によるスケールアップ製造を実施し、50gスケールでMO2455を取得することに成功した。本スケールアップ製造研究において、MO2455に結晶多形が存在することが明らかと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

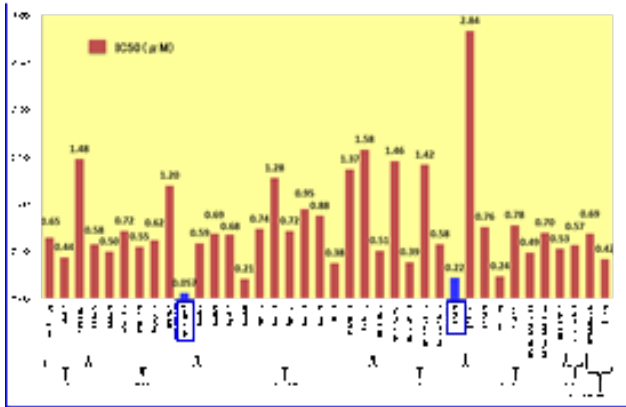
MO2455のCMC研究の進捗



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(IC₅₀=0.057 μM)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 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。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）

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)：PARG阻害剤の最適化とCMC研究
およびバックアップ化合物の探索

担当責任者 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

リード化合物MO2282誘導体から臨床開発化合物の取得を目指した。MO2282誘導体が難溶性化合物であるため、溶解性向上を目的とした誘導体設計・合成を実施した（リード化合物のプロドラッグ化および親水性置換基導入など）。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@マウス）が進行中である。

また、MO2455のCMC研究を実施した。よりスケールアップ合成に適した新合成ルートを開拓し、総収率を2倍向上させることに成功した。本方法により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。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。

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の開発が、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、有効ながん種を特定を行ってきた。さらに、H23-25年度の厚労科研究費「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

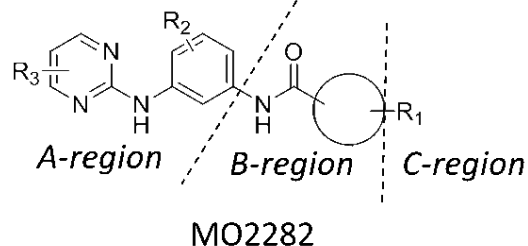
a．リード化合物の最適化とCMC研究

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。



C. 研究結果

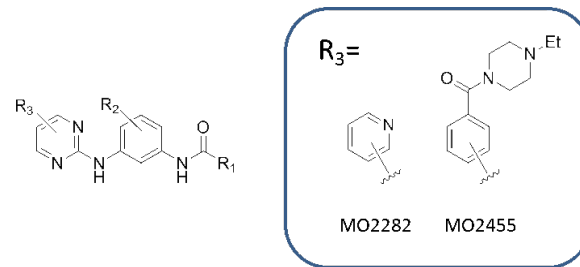
プロジェクトの総合推進

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協議した。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。

PARG 阻害剤の構造最適化による臨床開発化合物の取得

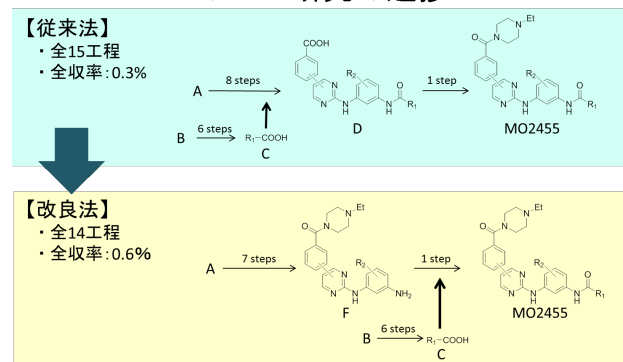
a. リード化合物の最適化とCMC研究

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）が進行中である。



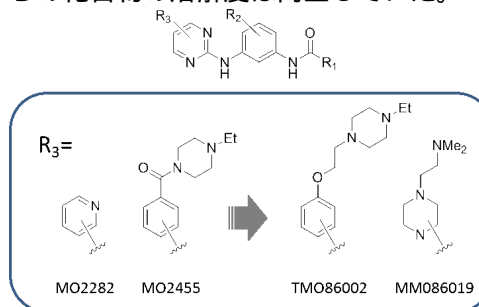
次に、次年度に予定しているGLP（&信頼性基準）準拠の非臨床試験（毒性&薬理試験）およびcGMP原薬合成に向けたMO2455のCMC研究を実施した。その結果、現行のケイ酸塩誘導体ルートは、スケールアップ合成には適していないことが判明したため、別合成ルートを開拓した。新合成ルート（14工程）は、旧来法と比べてステップ数が1工程短く、また総収率（0.6%）を2倍向上させることに成功した。これらの成果をもとに、外注によるスケールアップ製造を実施し、50gスケールでMO2455を取得することに成功した。本スケールアップ製造研究において、MO2455に結晶多形が存在することが明らかとなったが、精製法およ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



改良法によるスケールアップ合成実施中

またMO2455は、比較的難溶性の化合物であるため、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強い細胞増殖阻害活性を示したものの、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。



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。次年度以降も継続してバックアップ化合物を探索する。

(倫理面への配慮)

本研究は生体由来成分を使用しないため、本研究の遂行に人権保護に係る法令上の問題はない。

D. 考察

MO2282誘導体が難溶性化合物であるため、溶解性向上を目的とした誘導体設計・合成を実施したが、活性と物性の両立が困難な中、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ことから、医薬品としての開発可能性が高いと考えられる。

また、MO2455のCMC研究によりスケールアップ合成に適した新合成ルートを開拓した。総収率を2倍向上させ、安定的にスケールアップ製造が可能であることを実証したが、純度向上の影響のためかMO2455に結晶多形が出現した。結晶多形の問題は、開発研究においていずれは直面する課題ではあるが、一般的に結晶多形をコントロールするには、長期間の試行錯誤による検討が必要となる。今回、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早期に見出したことは、本プロジェクトの進展に大きく寄与できたと考えられる。

E. 結論

リード化合物MO2282誘導体から臨床開発化合物の取得を目指した。MO2282誘導体が難溶性化合物であるため、溶解性向上を目的とした誘導体設計・合成を実施した(リード化合物のプロドラッグ化および親水性置換基導入など)。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@マウス)が進行中である。また、MO2455のCMC研究を実施した。よりスケールアップ合成に適した新合成ルートを開拓し、総収率を2倍向上させることに成功した。本方法により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。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。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
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

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）：PARG阻害剤活性評価と標的解析

担当責任者 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）

研究要旨 本研究では難治性固形がんにも有効なポリ(ADP-リボース)分解酵素である(PARG)阻害剤の単剤及び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、他の機関と共に物性の改善と溶解性の向上の点から、臨床開発候補化合物の絞り込みと評価を進めることができた。バックアップ化合物候補の探索研究として、MO2282以外の3種類のリード化合物からの合成展開に加え、分子ドッキング、分子動力学シミュレーションによるSBDDにより得られた化合物とその誘導体について実施し、候補化合物の評価を行った。また、合成致死性法による包括的探索系により効果予測(薬効)マーカーの新規候補を得て、その意義について多角的な検討を進めた。また、薬力学的マーカーの測定系の最適化を行った。これらの研究の知見は臨床試験で有効性を検証していくための基盤となると考えられる。

A. 研究目的

本研究では難治性固形がんにも有効なポリ(ADP-リボース)分解酵素である(PARG)阻害剤の単剤及び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、臨床開発化合物の開発と薬力学的マーカー、効果予測(薬効)マーカーを検討し、臨床試験で有効性を検証するための基盤とする。

B. 研究方法

1) これまでに見出された4種類のリード化合物のうち、ヒト xenograft ノードマウスモデルで有意な抗腫瘍効果が認められた

MO2282の誘導体を他の分担機関が合成し、これらの化合物のPARG阻害活性をリコンビナントPARGを用いて評価した。バックアップ化合物の探索研究により得られた新規化合物についてもPARG阻害活性をリコンビナントPARGを用いて評価した。

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

複数のレンチウイルス shRNA ライブラリー等を用いてPARG阻害剤と合成致死性を示す遺伝子の検索を行い、得られた標的遺伝子について機構解析を行った。

3) 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その動態を測定するための検討を行った。

4) 薬物動態評価

本研究事業における開発候補化合物を投与後の生体試料(尿や血清など)をLC/MS等で分析し、薬物動態パラメーターを取得できるようにMO2282誘導体である開発候補化合物をヌードマウスモデルで投与後の薬物動態の検討を進めた。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については、国立がん研究センターの「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、国立がん研究センターにおいて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

1) 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

これまでに見出された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の取得のため、溶解性向上を目的とした誘導体設計により合成された化合物の溶解性、PARG阻害活性・細胞毒性などの評価を他の機関と共に実施した。溶解性を大幅に改善させる条件の確立が行えた。

b. バックアップ化合物の探索研究
バックアップ化合物候補の探索研究として、MO2282以外の3種類のリード化合物からの合成展開に加え、分子ドッキング、分子動力学シミュレーションによるSBDDにより得られた化合物とその誘導体について他の機関と共に実施し、候補化合物を得られた。

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研究

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定量系として免疫学的手法と質量分析法の至適化が行えた。

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包括的に探索した。これまでに薬効予測マーカー候補として同定したがんでは異常が報告されているシグナル伝達系の因子の検証から効果規定因子となる機序に関する知見を集積できた。また、新たな包括的遺伝子探索系により薬効予測マーカー候補を単離した。これらの新たな候補についてもノックダウン系などを用いてPARG阻害剤の効果との関連、メカニズム解析を実施し、検証を進めた。

3) 薬物動態評価

本研究事業における開発候補化合物を投与後の生体試料(尿や血清など)をLC/MS等で分析し、薬物動態パラメーターを取得する系を他の機関と検討した。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誘導体である開発候補化合物をヌードマウスモデルで投与後の薬物動態の解析を進めた。

D. 考察

これまでに見出された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誘導体を中心に溶解性の向上が達成

され、さらに誘導体合成展開で得られた化合物の中にバックアップ化合物候補も見出された。

合成致死仮説に基づく手法で薬効予測マーカー候補が複数単離された。今後、臨床的意義の高いマーカー候補についてさらに絞り込みを進める。薬力学的マーカーの測定系と薬物動態の測定系についても動物モデルでの最適化を進める必要がある。

E . 結論

本研究では難治性固形がんにも有効なポリ(ADP-リボース)分解酵素である(PARG)阻害剤の単剤及び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、物性の改善と溶解性の向上の点から、臨床開発候補化合物の絞り込みと評価を進めることができた。また、薬力学的マーカーの測定系の最適化と効果予測(薬効)マーカーの候補について多角的な検討を進めた。有効ながん種の特異性と特定がん種に対するPhase IまたはPhase 0試験の計画の立案を進めるためにこれらの研究の知見は基盤となると考えられる。

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

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

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)。

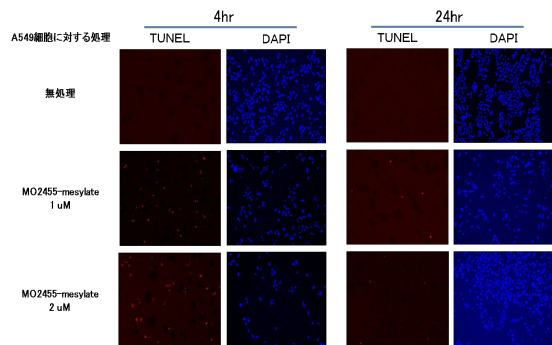


図1 TUNEL染色によるM02282誘導体のアポトーシス誘導の確認

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

厚生労働省科学研究委託費（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 PARC 阻害剤の実用化研究(新規 PARC 阻害剤の開発)：

グループ間の研究調整

担当責任者 井上 謙吾 公益財団法人静岡県産業振興財団

ファルマバレーセンター名誉所長

研究要旨 PARC 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ため、医薬品候補としての PARC 阻害剤の早期開発を目指す。具体的には、PARC 阻害剤の早期開発を達成するために、PARC 阻害剤合成担当グループと共同して新規化合物の骨格検討、分子設計手法を利用した化合物検討、assay 担当グループと共同したバイオマーカー探索における助言、研究班の研究調整を担当し、効果的・効率的な創薬サイクルの構築を達成する。

A.研究目的

PARC 阻害作用を有する化合物として我々が過去に見出したリード化合物を基として、抗がん剤の臨床試験を目指す。合成、化合物評価、薬力学的マーカーの探索等の各分担研究者間の研究調整、助言を行う。

B.研究方法

研究代表者と共同で研究の進捗管理、研究方針の策定に参与する。

具体的には、偶数月に分担研究者による Face to Face meeting を、奇数月には WEB 会議を開催し、各研究者の研究進捗の確認、データの検証、研究方針の助言を行う。

また、バックアップ化合物の探索のため、化合物ライブラリーを研究班に供給する。

(倫理面への配慮)

分担内容が研究調整、助言、化合物供給であり、動物や人由来の検体を使用して

いないことから、倫理面で問題はない。

C.研究結果

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研究の進捗及び情報の共有を図った(表 1)。

表 1 meeting、会議 実施リスト

PARC研究班 2014 Face to Face meeting			
回数	開催日時	場所	内容
第1回 (合成期)	2014/7/27(月) 18:00~19:30	富士がん研究センター 第一研修室	合成グループの今後の展開方法、研究分指を打ち合わせ、①MO化合物の水溶性誘導体の候補について、②効率的合成ルートの実現について、③インドへの外注について。
第1回 (実体)	2014/7/28(火) 13:30~16:30	富士産業センター 1015会議室	①過去の研究進捗の説明、②研究の方針説明、③各分指者から研究の状況・方針説明、④WEB会議及びFace to Face meetingについて、⑤PDCA管理について、⑥守備範囲に基く調整への署名。
第2回	2014/9/19(金) 9:45~13:00	富士産業センター 1015会議室	①研究進捗状況の報告・研究方針検討、②サンプルの外部提供について、③厚労省との契約について、④WEB会議システム導入について。
第3回	2014/11/21(金) 10:00~13:00	富士産業センター 1015会議室	①研究進捗状況の報告・研究方針検討、②特許の出願費用について。
第4回	2015/1/20(金) 13:00~15:30	がん・細胞センター 1015会議室	①研究進捗状況の報告・研究方針検討、②厚生労働省大臣官房厚生科学部 事務連絡について、③異議について。

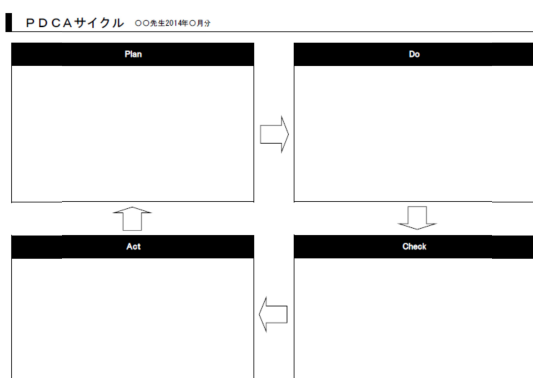
PARC研究班 2014 WEB会議		
回数	開催日時	内容
第1回	2014/6/24(火) 10:00~11:15	①過去3年間の研究の経緯及び成果の説明、②本邦の研究分指及び分配金について、③本邦のスケジュール及び目標、④研究費の経理上の注意点について。
第2回	2014/7/29(月) 17:00~18:30	①研究進捗状況の報告・研究方針検討、②研究費について、③PDCAサイクル案について。
第3回	2014/10/27(月) 18:00~19:15	①研究進捗状況の報告・研究方針検討、②契約の進捗について、③その他、化合物ライブラリーの購入について。
第4回	2014/12/11(火) 9:30~11:15	①研究進捗状況の報告・研究方針検討、②科研費(AMED)の継続について。

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、その他にも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、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, 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

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)：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-mesylyate の溶解性に対する HPBCD の影響

MO2455-mesylyate 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-mesylyate の溶解度を増大させた（図 1）。0.1 M HPBCD 水溶液に対する MO2455-mesylyate 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。

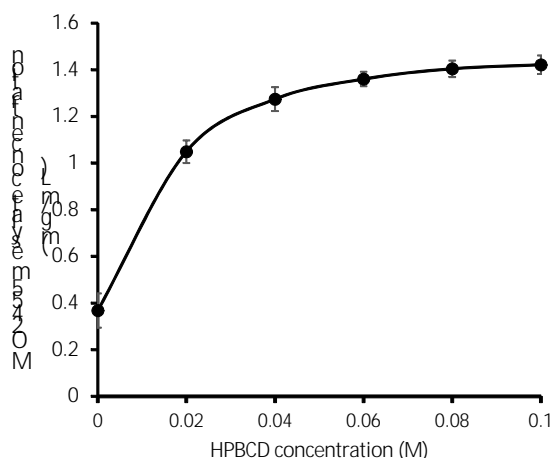


図 1 HPBCD による MO2455-mesylyate 溶解度改善効果

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-mesylyate 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-mesylyate 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-mesylyate 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)

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
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

M02455 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

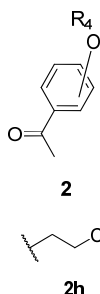
なし

3.その他

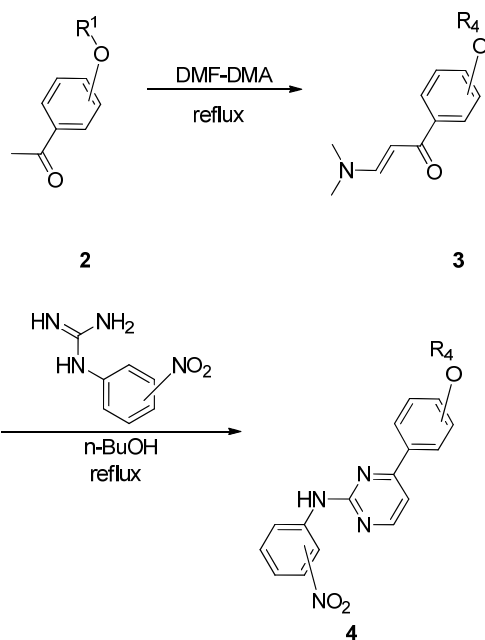
なし

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

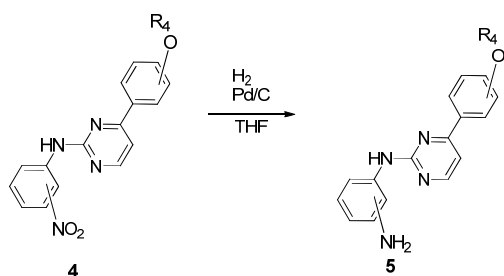


酸カリ存在下ニートで反応させ **2g** を得た。得られた化合物 **2** はさらに, DMF-DMA を用いてジメチルアミノメチレン化させ, さらにグアニジン誘導体と反応させた。化合物 **2** から **3** への反応はほぼ定量的に進行したが, 化合物 **2d** の場合は反応の進行とともに反応液が褐色化し, 目的とする化合物は 15% 程度しか得ることはできなかった。また, グアニジン誘導体 **4** への変換は置換基の種類によって収率が異なる結果となった。化合物 **3h** の場合, 収率は 20% 程度であったが, 目的化合物が反応液から固体となって単離されるため, 純度がよく, 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**4f**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0.1mg/ml、リン酸塩緩衝液(20%DMSO, pH3)で0.3mg/ml程度であった。メタンサルホン酸を2等量添加すること3mg/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存在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 C18AR 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ノ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

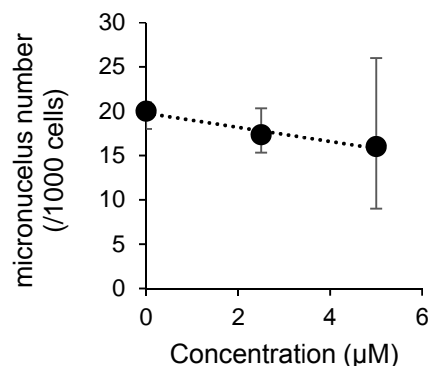


図1 小核試験の結果

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

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「難治性固形がんにも有効な PAR G 阻害剤の実用化研究（新規 PAR G 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、中瀧直己、江良折実、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 会年会	2014 年 6 月 14 日（土）～ 15 日（日）	国内

<p>Niemann-Pick 病 C 型治療薬 2-Hydroxypropyl- -cyclodextrin の有効性に関する Translational Research、ポスター発表</p>	<p>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、中瀧直己、江良択実、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</p>	<p>第 9 回 トランスポーター研究会 年会</p>	<p>2014 年 6 月 14 日 (土) ~ 15 日 (日)</p>	<p>国内</p>
<p>Niemann-Pick 病 C 型治療薬 2-Hydroxypropyl- -cyclodextrin の病態モデルにおける安全性 評価、ポスター発表</p>	<p>入江徹美、石塚洋一、田中雄太、山田侑世、近藤悠希、中瀧直己、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策</p>	<p>第 17 回日本医薬品情報 学会 総会・学術大会</p>	<p>2014 年 7 月 12 日 (土) ~ 13 日 (日)</p>	<p>国内</p>
<p>Niemann-Pick 病 C 型患 児と病態モデルマウス における 2-Hydroxypropyl- -Cyclodextrin 体内動態 解析、口頭発表</p>	<p>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、中瀧直己、檜垣克美、大野耕策、江良択実、入江徹美</p>	<p>第 39 回西日本薬剤学研 究会</p>	<p>2014 年 8 月 29 日 (金) ~ 30 日 (土)</p>	<p>国内</p>
<p>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</p>	<p>深浦まど香、近藤悠希、石塚洋一、中瀧直己、江良拓実、有馬英俊、香月博志、松尾宗明、大野耕策、入江徹美</p>	<p>第 56 回日本先天代謝異 常学会総会</p>	<p>2014 年 11 月 13 日 (木) ~ 15 日 (土)</p>	<p>国内</p>

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、中瀧直己、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、江良折実、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 型患儿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、中瀧直己、檜垣克美、大野耕策、江良折実、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 hydrazone 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, Imori 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。