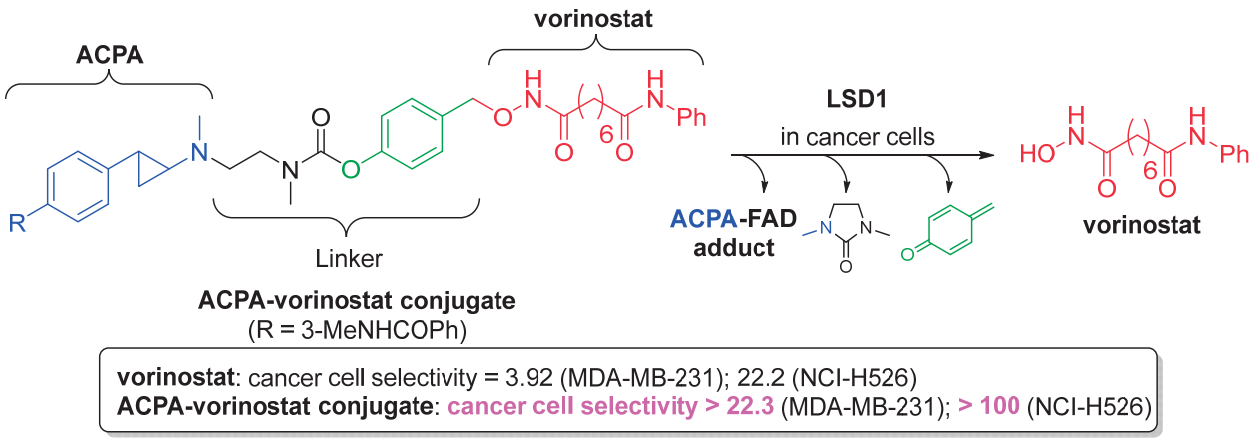
10　副作用低減を目指した新規抗がん剤プロドラッグの創製	鈴木　孝禎

【目的】一般に、抗がん剤は副作用が大きいことから、それらの副作用が低減したブレイクスルーとなる抗がん剤の登場が望まれている。本研究では、悪性がんを標的として、副作用の低減した新規抗がん剤プロドラッグの創製を目指した。これまでに開発された副作用低減のための抗がん剤プロドラッグは、抗体などの高分子構造に基づくものがほとんどである。高分子型抗がん剤プロドラッグの代表例として、抗体ー薬物複合体（antibody-drug conjugate：ADC）が挙げられる。これまでに、国内外問わず数多くの ADC の研究開発が行われ、臨床試験されているものや実際に臨床利用されているものもある。しかし、ADC は分子量の大きな生物製剤であるため製造コスト・品質面における問題や生体内安定性、免疫原性などの副作用の課題が残されている。高分子型がん細胞選択的プロドラッグの問題を解決し得る中分子型プロドラッグとして、小分子ー薬物複合体（small molecule-drug conjugate：SMDC）の開発が進められている。SMDC にはリガンドータンパク質間の選択性の低さや分子量の大きさに由来した投与方法の制限等課題も残されている一方で、SMDC では、化学合成により純粋な SMDC を生産することが可能であり、ADC と比較すると一定品質のものを安定供給出来ることが利点である。今後、SMDC の研究開発が進み、臨床応用されることが期待される。そこで、本研究では、がん細胞に大過剰に発現するリシン脱メチル化酵素（LSD1）に着目し、SMDC の開発を行った。

【方法】フラビン依存性のリシン脱メチル化酵素（LSD1）は、正常細胞には発現せず、乳がん、大腸がん、肺がん、膀胱がん、白血病、脳腫瘍、膵臓がんなどのがん細胞において、大過剰に発現し、がんの増殖に関与するため、がんのバイオマーカーかつ抗がん剤の標的タンパク質として注目を集めている。これまでに、我々は、標的がん細胞に高発現する LSD1 を認識して抗がん剤を放出するがん細胞選択的プロドラッグを創出した（Ota Y., Suzuki T. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 16115–16118. Ota Y., Suzuki T. *et al., Chem. Pharm. Bull.* **2019**, *66*, 192–195.）。本研究では、本プロドラッグシステムを副作用の高い抗がん剤 vorinostat に応用した。具体的には、がん細胞選択的プロドラッグの設計、合成、活性評価を行うことで、がん細胞選択的に抗がん剤 vorinostat を放出するプロドラッグの創製を目指した。

【結果】LSD1 阻害薬である phenylcyclopropylamine（PCPA）の LSD1 阻害機構をもとに、arylcyclopropylamine (ACPA)-vorinostat conjugate を設計した。ACPA-vorinostat conjugate は LSD1 を高発現するがん細胞においては LSD1 阻害に伴い、vorinostat を放出し、抗がん作用を示す一方で、LSD1 をほとんど発現しない正常細胞においては vorinostat が放出されず、vorinostat 由来の副作用の低減が期待された。実際、合成した ACPA-vorinostat conjugate は、正常細胞に影響せず、抗がん効果を示した。

がん細胞選択的に抗がん剤 vorinostat を放出する ACPA-vorinostat conjugate



10. 副作用低減を目指した新規抗がん剤プロドラッグの創製

鈴木　孝禎

大阪大学 産業科学研究所 複合分子化学研究分野

Key words：抗がん剤，プロドラッグ，LSD1，ACPA，副作用

緒　言

これまでに数多くの抗がん剤が開発されてきたが、がんの化学治療では一般に単剤で十分な治療効果が得られるものは少ない。そのため、多くのがんの化学療法では作用機構が異なる複数の抗がん剤の多剤併用療法による治療が行われている。しかし、抗がん剤の多剤併用療法は優れた治療効果が期待できる反面、骨髄抑制や嘔吐等の副作用の問題がある。我々は、複数の分子標的治療薬の薬効をがん細胞に選択的に発現させることができれば、抗がん剤の投与量を抑え、副作用の少ない優れた抗がん剤になり得ると考えた。本研究では、悪性がんを標的として、副作用の低減した新規抗がん剤プロドラッグの創製を目指した。これまでに開発された副作用低減のための抗がん剤プロドラッグは、抗体などの高分子構造に基づくものがほとんどである。高分子型抗がん剤プロドラッグの代表例として、抗体-薬物複合体（antibody-drug conjugate：ADC）が挙げられる。これまでに、国内外問わず数多くの ADC の研究開発が行われ、臨床試験されているものや実際に臨床利用されているものもある。しかし、ADC は分子量の大きな生物製剤であるため製造コスト・品質面における問題や生体内安定性、免疫原性などの副作用の課題が残されている。高分子型がん細胞選択的プロドラッグの問題を解決し得る中分子型プロドラッグとして、小分子ー薬物複合体（small molecule-drug conjugate：SMDC）の開発が進められている。SMDC にはリガンドータンパク質間の選択性の低さや分子量の大きさに由来した投与方法の制限等課題も残されている一方で、SMDC では、化学合成により純粋な SMDC を生産することが可能であり、ADC と比較すると一定品質のものを安定供給出来ることが利点である。今後、SMDC の研究開発が進み、臨床応用されることが期待される。そこで、本研究では、がん細胞に大過剰に発現するリシン脱メチル化酵素（LSD1）に着目し、SMDC の開発を行った。

方法および結果

フラビン依存性のリシン脱メチル化酵素（LSD1）は、正常細胞には発現せず、乳がん、大腸がん、肺がん、膀胱がん、白血病、脳腫瘍、膵臓がんなどのがん細胞において、大過剰に発現し、がんの増殖に関与するため、がんのバイオマーカーかつ抗がん剤の標的タンパク質として注目を集めている。これまでに、我々は、標的がん細胞に高発現する LSD1 を認識して抗がん剤を放出するがん細胞選択的プロドラッグを創出した［1〜3］。図 1a に示すように、PCPA は LSD1 の補酵素である flavin adenine dinucleotide（FAD）と反応し、PCPA-FAD 付加体を形成することで、LSD1 の酵素活性を不可逆的に阻害する［4］。この際、PCPA 由来の窒素原子はアンモニア分子として、酵素活性中心の外に放出される。(1) LSD1 が多くのがん細胞で高発現すること、(2) PCPA の特徴的な LSD1 阻害機構に基づき、我々が開発した新規標的指向型プロドラッグ PCPA-drug conjugate は、LSD1 を高発現するがん細胞内で LSD1 阻害に伴い薬物を選択的に放出する（図 1b）。

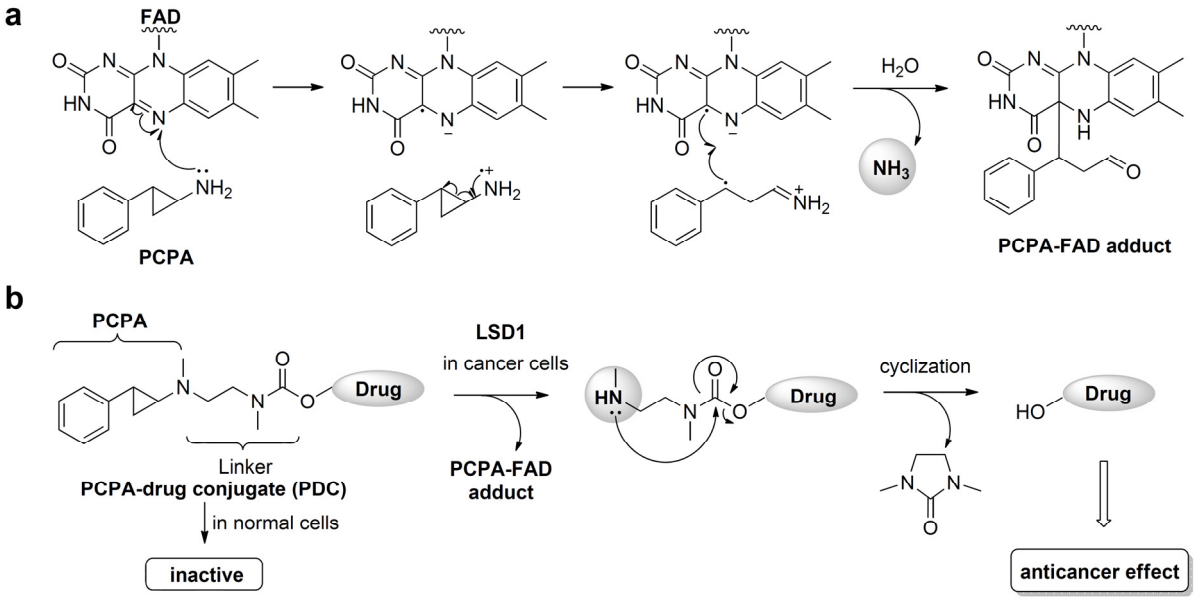


図 1. PCPA-drug conjugate

a）PCPA は、LSD1 の活性中心で補酵素 FAD と反応し、アンモニアを放出する。

b）PCPA-drug conjugate は、LSD1 の活性中心で補酵素 FAD と反応し、抗がん剤を放出する。

本研究では、本プロドラッグシステムを副作用の高い抗がん剤 vorinostat に応用することを試みた。Vorinostat は、皮膚 T 細胞性リンパ腫治療薬として臨床応用されている抗がん剤であるが、血小板減少などの重篤な副作用が報告されている[5]。Vorinostat をがん細胞でだけ放出する分子は、副作用の少ない抗がん剤プロドラッグとして期待できる。これまでに我々が行った LSD1 阻害剤の構造活性相関の知見から［6, 7］、arylcyclopropylamine(ACPA)-vorinostat conjugate を設計した（図 2）。ACPA- vorinostat conjugate は、LSD1 を高発現するがん細胞内でのみ、LSD1 阻害に伴い薬物を選択的に放出すると期待された。

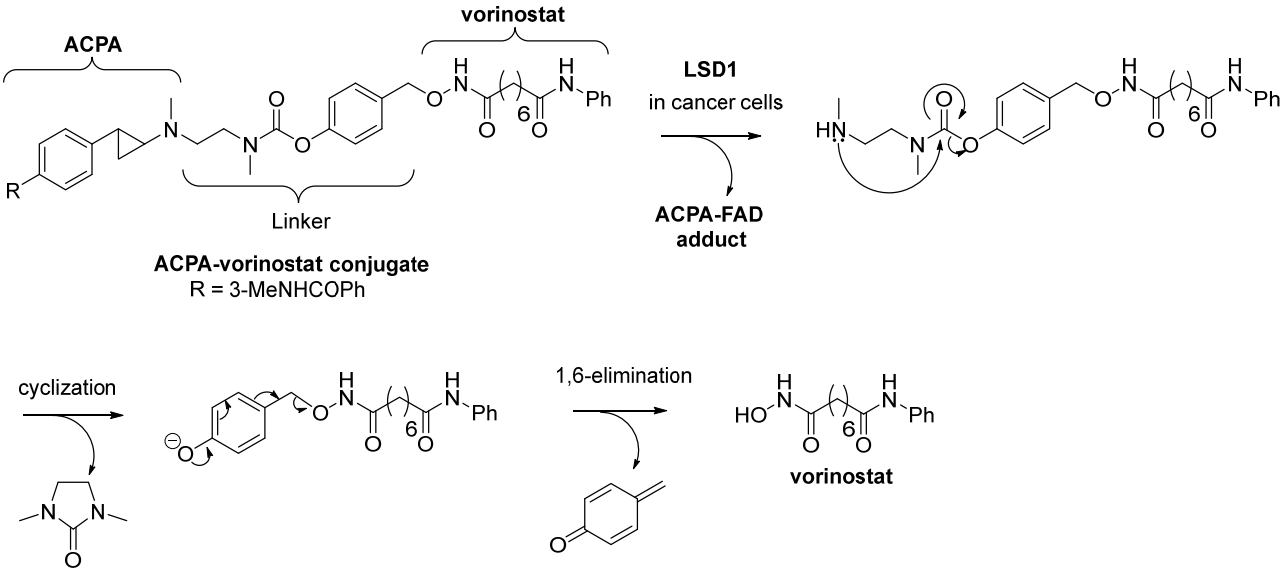


図 2. ACPA-drug conjugate

ACPA-drug conjugate は、がん細胞に発現する LSD1 中の FAD と反応し、
環化反応、1,6-脱離反応を経て、vorinostat を放出する。

まず、合成したACPA-drug conjugateがLSD1中のFADと反応して、vorinostatを放出するかどうかを確かめた。図3に示すように、ACPA-drug conjugate とFADの混合物よりも、ACPA-drug conjugateとLSD1の混合物から、vorinostatがより多く検出された。これらの結果から、ACPA-drug conjugateがLSD1中のFADと反応して、vorinostatを効率良く放出することが示された。

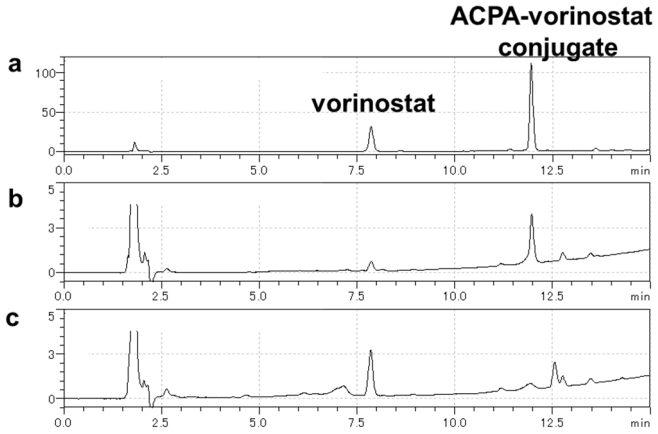


図3. ACPA-vorinostat conjugateから放出されるvorinostatの検出

a) HPLCにおけるvorinostat（7.5 min）とACPA-vorinostat conjugate（12.2 min）の保持時間。

b) ACPA-vorinostat conjugateとFADの混合物。

c) ACPA-vorinostat conjugateとLSD1の混合物。

つぎに、ACPA-drug conjugateのがん細胞、正常細胞に対する増殖阻害活性を調べた（表1）。ACPA-drug conjugateは、乳がんMDA-MB-231細胞、肺がんH526細胞に対しては、vorinostatと同等の増殖抑制活性を示した。一方、vorinostatが正常細胞（HMEC）に対して高い増殖阻害活性を示したのに対し、ACPA-drug conjugateは、正常細胞に対しては影響を与えなかった。このように、ACPA-drug conjugateは、vorinostatに比べ、高いがん細胞選択性を示した。

表1. PCPA、vorinostat、ACPA-drug conjugateのがん細胞（MDA-MB-231, H526）、正常細胞（HMEC）に対する増殖阻害活性

Compound	IC_{50} (mM)	GI_{50} (mM)		IC_{50} (mM)	Selectivity Index	
	LSD1	MDA-MB-231 (breast cancer cells)	H526 (lung cancer cells)	HMEC (normal cells)	IC_{50} (HMEC)/ GI_{50} (MDA-MB-231)	IC_{50} (HMEC)/ GI_{50} (H526)
PCPA	24.8	799	N.D.	1064	1.33	N.D.
vorinostat	N.D.	2.83	0.767	6.88	2.43	8.97
ACPA-drug conjugate	0.126	4.49	1.00	>100	>22.3	>100

Values are the mean of at least three experiments. N.D. = not determined.

考　察

以上のように、我々は、抗がん剤 vorinostat をプロドラッグ化した ACPA-vorinostat conjugate を設計し、高いがん細胞増殖抑制効果と高いがん細胞/正常細胞選択性を示すことを明らかにした［8]。この新たな標的指向型プロドラッグの分子技術は、汎用性があり、他の毒性の高い抗がん剤にも適応することが可能である。具体的には、ACPA と抗がん剤を結ぶ linker として、今回、新たに、1,4-benzyloxy 型 linker を開発したことで、抗がん剤のヒドロキシ基あるいはアミノ基に 1,4-benzyloxy 型 linker を介して ACPA を結合させた ACPA-drug conjugates の創製が可能となった。今後、この標的指向型プロドラッグの分子技術が、がんを標的とした創薬化学の分野で活用され、難治性がんの治療に貢献することが強く期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都府立医科大学大学院医学研究科創薬医学研究室の酒井敏行教授、堀中真野准教授である。

文　献

1) Ota Y, Itoh Y, Kaise A, Ohta K, Endo Y, Masuda M, Sowa Y, Sakai T, Suzuki T. Targeting Cancer with PCPA-Drug Conjugates: LSD1 Inhibition-Triggered Release of 4-Hydroxytamoxifen. Angew Chem Int Ed Engl. 2016 Dec 23;55(52):16115-16118. doi: 10.1002/anie.201608711. Epub 2016 Nov 24. PMID: 27882656

2) Ota Y, Nakamura A, Elboray EE, Itoh Y, Suzuki T. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Conjugate of 5-Fluorouracil and an LSD1 Inhibitor. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2019 Mar 1;67(3):192-195. doi: 10.1248/cpb.c18-00577. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30369513

3) Ota Y, Suzuki T. Drug Design Concepts for LSD1-Selective Inhibitors. Chem Rec. 2018 Dec;18(12):1782-1791. doi: 10.1002/tcr.201810031. Epub 2018 Sep 11. PMID: 30277644

4) Ueda R, Suzuki T, Mino K, Tsumoto H, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N. Identification of cell-active lysine specific demethylase 1-selective inhibitors. J Am Chem Soc. 2009 Dec 9;131(48):17536-7. doi: 10.1021/ja907055q. PMID: 19950987

5) Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Chiao JH, Reilly JF, Ricker JL, Richon VM, Frankel SR. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). Blood. 2007 Jan 1;109(1):31-9. doi: 10.1182/blood-2006-06-025999. Epub 2006 Sep 7. PMID: 16960145

6) Miyamura S, Araki M, Ota Y, Itoh Y, Yasuda S, Masuda M, Taniguchi T, Sowa Y, Sakai T, Suzuki T, Itami K, Yamaguchi J. C-H activation enables a rapid structure-activity relationship study of arylcyclopropyl amines for potent and selective LSD1 inhibitors. Org Biomol Chem. 2016 Sep 28;14(36):8576-85. doi: 10.1039/c6ob01483f. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27548471

7) Ota Y, Miyamura S, Araki M, Itoh Y, Yasuda S, Masuda M, Taniguchi T, Sowa Y, Sakai T, Itami K, Yamaguchi J, Suzuki T. Design, synthesis and evaluation of γ-turn mimetics as LSD1-selective inhibitors. Bioorg Med Chem. 2018 Feb 1;26(3):775-785. doi: 10.1016/j.bmc.2017.12.045. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29331452

8) Ota Y, Itoh Y, Kurohara T, Singh R, Elboray EE, Hu C, Zamani F, Mukherjee A, Takada Y, Yamashita Y, Morita M, Horinaka M, Sowa Y, Masuda M, Sakai T, Suzuki T. Cancer-Cell-Selective Targeting by Arylcyclopropylamine-Vorinostat Conjugates. ACS Med Chem Lett. 2022 Sep 12;13(10):1568-1573. doi: 10.1021/acsmedchemlett.2c00126. eCollection 2022 Oct 13. PMID: 36262394