

## 【博士論文名】

Research for Discovery of Novel PCA-1 Inhibitor for Hormone-Refractory Prostate Cancers ~ Structure-Metabolic Stability Relationship Study on a Known PCA-1 Inhibitor HUHS015 and its Derivatives~ (臨床で有効なホルモン非依存性前立腺がん治療薬の創製研究~体内安定性を考慮した評価系構築と新規 PCA-1 阻害薬創製~)

## 【博士論文の基盤となる論文及び雑誌名】

Novel Metabolically Stable PCA-1/ALKBH3 Inhibitor Has Potent Antiproliferative Effects on DU145 Cells *In Vivo*

ANTICANCER RESEARCH (2018, *in press*)

## 【氏名】

兵庫医療大学大学院薬学研究科 医療薬学専攻  
上田 昌宏

## 【指導教官氏名】

田中 明人 (創薬化学)

## 【背景】

近年増加傾向にあるホルモン非依存性に悪化した前立腺がんは難治性で、ホルモン剤以外の抗がん剤治療（ドセタキセル、DTX）が主たる薬剤であるが、有効性および副作用の問題から患者ニーズが満たされない状況にある。

辻川（阪大薬）らは、臨床サンプルに関する研究から前立腺がん患者において高発現する prostate cancer antigen (PCA)-1 が当該がんの予後因子として有力であることを見出した<sup>1)2)</sup>。PCA-1 は DNA/RNA 塩基の脱メチル化酵素の一つであり、その後の研究により膵臓、非小細胞肺癌等のがん組織においても高発現し、siRNA による PCA-1 発現抑制により *in vitro*、*in vivo* においてがん細胞の増殖を抑制することを明らかとしている<sup>3)~6)</sup>。さらに PCA-1 knock out マウスで明らかなフェノタイプ異常が認められず<sup>7)</sup>、メカニズム由来の副作用の懸念が小さいことも期待されており、選択的 PCA-1 阻害薬の開発に注目が集まっている。

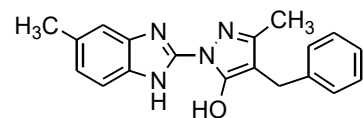


図1 HUHS015

HUHS015 (図1) は、研究指導者・田中教授らにより創出された世界初の低分子 PCA-1 阻害薬で、*xenograft* モデルにおいて毒性や副作用が観測されること無く腫瘍増殖を有意に抑制することが見出されている<sup>8)</sup>。しかし、申請者の検討から *xenograft* モデルの評価を4週間まで期間を延長すると、腫瘍増殖抑制効果が control と比較して有意な差が認められないことが明らかとなった。申請者は、この HUHS015 の *in vivo* での低活性の要因を検討し、新たにラット肝ミクロソーム混合物 S9mix 中を用いた代謝安定性試験およびラット経口投与後の血中濃度測定を新たに評価系に組み入れ、体内安定性に優れた新規 PCA-1 阻害薬の創製を目指し、探索研究を開始した。

## 【方法】

### ・各化合物の合成

本研究で評価した化合物 **7a-7p** は、既報<sup>8)</sup>の合成法を参考とし、図2のルートに従い合成した。

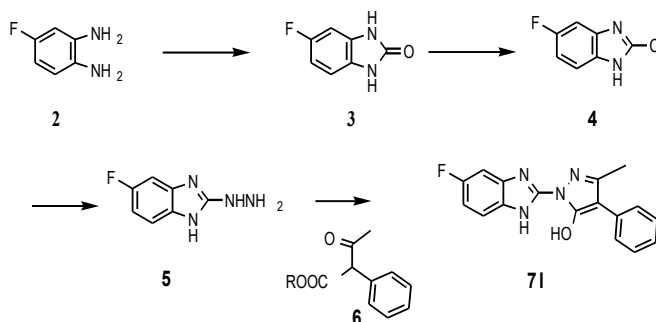


図2. 代表的な合成ルート (化合物 **7l**)

化合物 **7a-7p** の <sup>1</sup>H-NMR、IR、質量分析スペクトルデータ、融点、および HPLC 純度を表1に示す。

表1. 本研究で評価した化合物の <sup>1</sup>H-NMR、IR、質量分析、融点、および HPLC 純度結果

Compound	<sup>1</sup> H-NMR	IR	ESI-HRMS	m.p.	HPLC	
					retention time (min)	purity (%)
<b>1</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.15 (3H, s), 2.39 (3H, s), 3.59 (2H, s), 6.96-7.00 (1H, m), 7.13-7.20 (1H, m), 7.23-7.29 (4H, m), 7.31 (1H, br s), 7.39 (1H, d, J=8.2Hz)	IR (KBr): 3312, 3024, 2936, 2915, 1653, 1553 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (positive ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O ([M+H] <sup>+</sup> ) 319.1559; found 319.1588	198-200	11.2	99.4
<b>7a</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.17 (3H, s), 3.59 (2H, s), 7.13-7.21 (2H, m), 7.24-7.30 (4H, m), 7.52 (1H, d, J=8.7Hz), 7.55 (1H, d, J=2.3Hz)	IR (KBr): 3263, 3031, 2914, 2842, 1654, 1623, 1556 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (positive ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> O ([M+H] <sup>+</sup> ) 339.1007; found 339.0978	101-104	13.1	98.9
<b>7b</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.19 (3H, s), 3.60 (2H, s), 7.14-7.21 (1H, m), 7.24-7.31 (4H, m), 7.46-7.52 (1H, m), 7.70 (1H, d, J=8.2Hz), 7.84 (1H, s)	IR (KBr): 3033, 2935, 2901, 1637, 1551 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (positive ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O ([M+H] <sup>+</sup> ) 373.1271; found 373.1271	216-218	13.6	98.8
<b>7c</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.17 (3H, s), 2.35 (3H, s), 3.60 (2H, s), 7.13-7.21 (1H, m), 7.23-7.31 (6H, m), 7.43 (1H, dd, J=1.8, 8.2Hz), 7.51-7.59 (3H, m), 7.72 (1H, br s)	IR (KBr): 3446, 3027, 2962, 2873, 1632, 1556 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (positive ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O ([M+H] <sup>+</sup> ) 395.1866; found 395.1852	120-124	13.6	98.0
<b>7d</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.39 (3H, s), 2.41 (3H, s), 7.07 (1H, dd, J=0.9 and 8.2Hz), 7.12-7.17 (1H, m), 7.32-7.38 (3H, m), 7.44 (1H, d, J=8.2Hz), 7.64-7.69 (2H, m)	IR (KBr): 3060, 1660, 1596, 1514 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (positive ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O ([M+H] <sup>+</sup> ) 305.1397; found 305.1402	130-134	11.8	98.6
<b>7e</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.14 (3H, s), 2.38 (3H, s), 3.21 (2H, s), 6.98 (1H, d, J=7.5 Hz), 7.31 (1H, s), 7.39 (1H, d, J=7.5 Hz)	IR (KBr): 3175, 3034, 1679, 1651, 1635, 1605, 1559, 1507 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (negative ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ([M-H] <sup>-</sup> ) 285.0993; found 285.0983	246-248	7.9	94.8
<b>7f</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.08 (3H, s), 5.28 (1H, s), 7.13-7.24 (4H, m), 7.26-7.33 (8H, m), 7.48-7.53 (2H, m)	IR (KBr): 3229, 3025, 1656, 1559 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (positive ion, sodium formate) calcd for C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O ([M+H] <sup>+</sup> ) 381.1710; found 381.1707	165-167	13.0	98.0
<b>7g</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 7.14 (1H, t, J=7.3 Hz), 7.20-7.30 (3H, m), 7.33 (2H, d, J=7.3 Hz), 7.37-7.45 (3H, m), 7.45-7.55 (2H, m), 7.58 (1H, d, J=8.7 Hz), 7.62 (1H, br s)	IR (KBr): 3101, 3073, 3059, 1651, 1596, 1572, 1555, 1510, 1466 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (negative ion, sodium formate) calcd for C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>2</sub> O ([M-H] <sup>-</sup> ) 385.0856; found 385.0870	111-117	14.7	99.1
<b>7h</b>	NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ): 2.39 (3H, s), 7.04 (2H, d, J=7.8Hz), 7.05-7.50 (12H, m)	IR (KBr): 3419, 3059, 2974, 1641, 1615, 1600, 1565, 1513, 1469 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (negative ion, sodium formate) calcd for C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O ([M-H] <sup>-</sup> ) 365.1402; found 365.1416	NT	11.8	99.8
<b>7i</b>	NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ): 2.00 (3H, s), 2.44 (3H, br s), 7.06 (1H, br s), 7.15-7.50 (7H, m), 8.43 (2H, br s)	IR (KBr): 3173, 3026, 2923, 1662, 1652, 1634, 1617, 1558, 1508, 1473 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (negative ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O ([M-H] <sup>-</sup> ) 303.1246; found 303.1269	118-123	10.4	96.4
<b>7j</b>	NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ): 2.37 (3H, s), 7.32 (1H, t, J=7.2Hz), 7.40-7.50 (2H, broad), 7.45 (1H, t, J=7.2 Hz), 7.61 (2H, d, J=7.2 Hz), 7.90-7.78 (1H, broad)	IR (KBr): 3435, 2922, 2854, 1637, 1553, 1437, 1389, 1329, 1250, 1220, 1164, 1051 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (negative ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O ([M-H] <sup>-</sup> ) 357.0969; found 357.0977	117-120	12.9	98.2
<b>7k</b>	NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ): 2.35 (3H, s), 3.66 (3H, s), 6.81 (1H, dd, J=9.0 and 2.4Hz), 6.80-6.93 (1H, broad), 7.15-7.30 (1H, broad), 7.26 (1H, t, J=7.2 Hz), 7.41 (2H, t, J=7.2 Hz), 7.67 (2H, d, J=7.2 Hz)	IR (KBr): 3464, 3055, 2948, 2832, 1656, 1597, 1551, 1512, 1435, 1401, 1367, 1317, 1278, 1197, 1157, 1073,	ESI-HRMS (positive ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ([M+H] <sup>+</sup> ) 321.1346; found 321.1336	127-132	10.4	94.2
<b>7l</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.40 (3H, s), 7.65 (1H, ddd, J=9.0 (H-F), 8.4 and 2.0 Hz), 7.21 (1H, t, J=8.4 Hz), 7.35 (1H, dd, J=9.0 (H-F) and 2.0 Hz), 7.40 (2H, t, J=8.4 Hz), 7.54 (1H, dd, J=8.4 and 4.8 (H-F) Hz), 7.65 (2H, d, J=8.4 Hz)	IR (KBr): 3463, 3066, 2922, 2857, 1665, 1556, 1512, 1491, 1432, 1374, 1307, 1272, 1247, 1137, 1105, 1007	ESI-HRMS (positive ion, sodium formate) calcd for C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>2</sub> ONa ([M+Na] <sup>+</sup> ) 331.0966; found 331.0968	115-119	11.5	98.7
<b>7m</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.38 (3H, s), 2.41 (3H, s), 7.10 (1H, dd, J=8.4 and 1.8 Hz), 7.36 (1H, d, J=1.8 Hz), 7.36 (2H, d, J=8.4 Hz), 7.45 (1H, d, J=8.4 Hz), 7.73 (2H, d, J=8.4 Hz)	IR (KBr): 3029, 2954, 2903, 1669, 1638, 1591, 1513, 1434, 1396, 1229, 1206, 1182, 1132, 1093 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (negative ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> O ([M-H] <sup>-</sup> ) 337.0862; found 337.0847	250 (decomp)	11.9	95.4
<b>7n</b>	NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , δ): 2.43 (3H, s), 2.48 (3H, s), 7.18 (1H, dd, J=8.4 and 0.9 Hz), 7.39 (1H, br s), 7.48 (1H, d, J=8.4 Hz), 8.06 (2H, d, J=9.6 Hz), 8.13 (2H, d, J=9.6 Hz)	IR (KBr): 2426, 1680, 1618, 1594, 1520, 1490, 1436, 1377, 1240, 1204, 1111, 1034 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (negative ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ([M-H] <sup>-</sup> ) 348.1102; found 348.1098	143-147	11.7	96.7
<b>7o</b>	NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ): 2.30 (3H, s), 2.36 (3H, s), 3.83 (3H, s), 6.97 (1H, d, J=7.8 Hz), 6.99 (2H, d, J=7.8 Hz), 7.12 (1H, br s), 7.20 (1H, d, J=7.8 Hz), 7.58 (2H, d, J=7.8 Hz)	IR (KBr): 3046, 2998, 2948, 2907, 2834, 1655, 1522, 1440, 1374, 1245, 1132, 1091, 1022, 1004 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (positive ion, sodium formate) calcd for C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ([M+H] <sup>+</sup> ) 335.1502; found 335.1491	120-124	10.6	96.3
<b>7p</b>	NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ): 2.39 (3H, s), 2.41 (3H, s), 7.04 (1H, d, J=8.4Hz), 7.10-7.35 (2H, broad), 7.35 (1H, t, J=7.6 Hz), 7.45 (2H, dd, J=8.0 and 7.6 Hz), 7.63 (2H, d, J=8.0 Hz), 7.66 (2H, d, J=7.6 Hz), 7.76 (2H, d, J=7.6 Hz)	IR (KBr): 3027, 2952, 2910, 2867, 1738, 1659, 1529, 1490, 1431, 1303, 1239, 1031, 1007 cm <sup>-1</sup>	ESI-HRMS (negative ion, sodium formate) calcd for C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O ([M-H] <sup>-</sup> ) 379.1564; found 379.1572	139-145	12.7	96.3

<sup>a)</sup> HPLC conditions

HPLC system (Tosho Co., Ltd.)

Autoinjector: AS-8020

Couln oven: CO-8020

liquid mixer: CO-8020

Pump: SD-8022 \* 2

UV detector: UV-8020

Column: YMC-Pack Pro C18 (150 x 4.6 mm ID, S-5 um, 12 nm)

Gradient program A

0 3 13 15 15.1 20 min

10 10 95 95 10 stop %acetonitrile in 0.1% TFA aq.

flow: 1 ml/min

detection: 254 nm

NT: not tested

### ・PCA-1 酵素阻害活性、および前立腺がん由来細胞 DU145 の増殖阻害活性の評価

化合物の PCA-1 酵素阻害活性は共同研究者・辻川教授に依頼した。なお、測定方法の詳細は参考論文<sup>8)</sup>に述べる。

・経口吸収性の評価

18 時間絶食下の雄性 SD ラットに化合物を 10 mg/kg または 32 mg/kg で経口投与し、30 或いは 60 分後の血中化合物濃度を HPLC で測定した。なお測定方法の詳細は参考文献<sup>9)</sup>に述べる。

・化合物の S9mix<sup>10)</sup> 安定性試験

S9mix は市販品（家田化学、#S9mix）を購入し、測定はプロトコールに従い実施した。

・Xenograft モデルでの腫瘍抑制効果の評価

BALB/c 雄のヌードマウス皮下に DU145 細胞を埋め込み、HUHS015、化合物 7I 或いは DTX を投与し、報告済みの方法<sup>9)</sup>により腫瘍抑制効果を検討した。薬物はそれぞれ HUHS015（投与量 32 mg/kg、1 日 1 回）、化合物 7I（投与量 10 mg/kg、1 日 1 回）あるいは DTX（投与量 2.5 mg/kg、週 1 回）を皮下投与した。腫瘍サイズの測定方法の詳細は参考文献<sup>9)</sup>に述べる方法で測定した。

## 【結果】

### (1) S9mix 評価系の構築についての検討

ラット肝ミクロソーム画分 S9mix を用い、シード化合物 HUHS015 を標準条件の 37 °C で行ったところ、10 分後の残存率はわずか 1%であった（図 3）。このことから HUHS015 は肝臓における代謝反応が早く in vivo 効果発現に負の要素となっていることが示唆された。そこで、本研究では S9mix 処理系をスクリーニング系に組み込み in vivo 活性の向上を目指すこととした。なお、本反応の温度依存性の検討結果から、反応温度を 15°C とした。

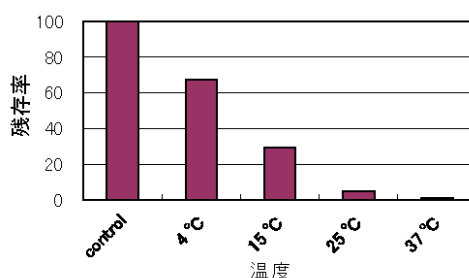


図 3. 温度別 HUHS015 残存率  
S9 mix 中、各温度で 10 分間処理した後のサンプル残存率を表す

### (2) 誘導体のデザインと薬理・薬物動態評価

前項の結果から、HUHS015 は投与後、肝臓における代謝および早期の体内からの消失が推定されたため、体内安定性改善を目指し誘導体合成を行った。具体的には、HUHS015 の主な被代謝部位を、①ベンズイミダゾール環の 5 位メチル基、②ピラゾール環の 4 位ベンジル基、③ピラゾール環の 5 位メチル基と推定し誘導体合成を行った（図 4）。薬効評価は、HUHS015 創製時と同様に PCA-1 酵素の阻害活性及び PCA-1 を高発現前立腺由来 DU145 細胞の増殖抑制率を採用した。さらに、①で述べた 15 °C に

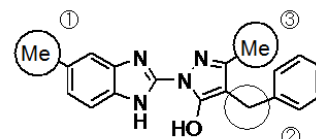


図4. HUHS015の構造と本研究で対象とした部分構造 本研究で肝臓での被代謝部位と推定した部位を○で示す

における S9mix 中残存率、及びラット経口投与後 30 或いは 60 分後の血しょう濃度をスクリーニングに加えた (表 2、表 3)。

図 4①のメチル基を代謝を受け難いと推定される塩素に変換した化合物 **7a** の S9mix 残存率は 81%と向上し、ラット血中濃度 0.15 µg/mL と HUHS015 に比べ約 2 倍向上した。一方、PCA-1 阻害活性は若干低下した。それに加え、被代謝を受けにくいトリフルオロメチル基 (**7b**) や 4-メチルフェニル基 (**7c**) に変換した誘導体の S9mix 残存率はそれぞれ 72%、64%と改善したが、ラット血中濃度はそれぞれ 0.02 µg/mL (**7b**)、0 µg/mL (未検出、**7c**) と低下した。この予想外の低い血中濃度は、これら誘導体の低い溶解度(消化管内での沈殿)に要因があると思われる。

表 2. 2-(5-Substituted-benzimidazol-2-yl)-4,5-substituted 3-hydroxypyrazoles の PCA-1 阻害活性、DU145 細胞増殖抑制率、S9mix 残存率及び経口投与後の血中濃度

NO	Structure			PCA-1 inhibition IC <sub>50</sub> (µM)	DU145 cells growth inhibition (%)		Remains after reaction by S9 mix for 10 min at 15 °C n=1	Blood concentration (µg/mL) 60 min after oral administration (32 mg/kg) n=1
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>		at 1 µM	at 10 µM		
HUHS015	Me	Me	CH <sub>2</sub> Ph	0.7	35	54	42%	0.08
<b>7a</b>	Cl	Me	CH <sub>2</sub> Ph	4.5	24	36	81%	0.15
<b>7b</b>	CF <sub>3</sub>	Me	CH <sub>2</sub> Ph	5.9	34	47	72%	0.02
<b>7c</b>	4-Me-Ph-	Me	CH <sub>2</sub> Ph	12.0	78	61	64%	ND
<b>7d</b>	Me	Me	Ph	9.7	NT	32	74%	2.45
<b>7e</b>	Me	Me	COOH	>10 (37% inh. at 10 µM)	-20	-11	87%	0.22
<b>7f</b>	Me	Me	CH(Ph) <sub>2</sub>	7.2	52	72	85%	0.17
<b>7g</b>	Cl	Ph	Ph	6.9	31	38	76%	1.03
<b>7h</b>	Me	Ph	Ph	>10 (49% inh. at 10 µM)	12	19	98%	0.31
<b>7i</b>	Me	Ph	Me	>10 (6% inh. at 10 µM)	-6	27	35%	0.33

NT: not tested                      ND: not detected

次に図 4②のベンジル基を水溶性向上が期待できるカルボキシシル基 (**7e**) に変換を試みた結果、S9mix 残存率が 87%、血中濃度は 0.22 µg/mL と HUHS015 に比較して向上した。しかし、PCA-1 阻害活性は大幅に低下した。また、ベンジル基の最も被代謝が懸念されるメチレンを除いた化合物 **7d** や 1 個フェニル基を追加し立体障害により被代謝速度低減を目指した化合物 (**7f**) は、S9mix 残存率はそれぞれ 74%と 85%、血中濃度は 2.45 µg/mL (**7d**)、0.17 µg/mL (**7f**) と期待通り改善した。

化合物 **7d** のピラゾール環のメチル基をフェニル基に変換した誘導体 **7h** は S9 残存率 98%、血中濃度 0.31 µg/mL と改善したが、PCA-1 阻害活性は IC<sub>50</sub>>10 µM と活性消失した。また、化合物 **7h** のベンズイミダゾール環の 5 位メチル基を塩素原子 (**7g**) に変換すると、S9 残存率 76%、血中濃度 1.03 µg/mL と良好な結果を示したが、PCA-1 阻害活性は IC<sub>50</sub>=6.9 µM、DU145 細胞増殖抑制率 (10 µM) は 38%となった。化合物 **7d** のピラゾール環の 4 位と 5 位のメチル基とフェニル基を入れ替えた誘導体 **7i** は S9mix 残存率 35%、血中

濃度が 0.33  $\mu\text{g/mL}$ 、PCA-1 阻害活性は  $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ 、DU145 細胞増殖抑制率 27%と PCA-1 阻害活性は HUHS015 に比べ低くなった。

以上の誘導体の中から、申請者は **7d** の高い S9mix 安定性 (74%) と経口吸収性 (2.45  $\mu\text{g/mL}$ ) に注目し、**7d** の更なる誘導体検討を行った (表 3)。化合物 **7d** のベンズイミダゾール環上のメチル基 (①に相当、図 4) を代謝的に安定であることが期待できるトリフルオロメチル基 (**7j**)、メトキシ基 (**7k**)、フッ素原子 (**7l**) に変換した結果、10 mg/kg でのラットへの経口投与後の血中濃度は、60 分後においてそれぞれ 0.33  $\mu\text{g/mL}$  (**7j**)、0.18  $\mu\text{g/mL}$  (**7k**)、0.73  $\mu\text{g/mL}$  (**7l**) と期待通り高い値が得られた。最後に、フェニル環 4 位への修飾 (**7m-7p**) を行ったが、いずれも PCA-1 阻害活性を喪失したため、検討を打ち切った。

以上の検討から、化合物 **7l** は HUHS015 に比べ、PCA-1 阻害活性が  $\text{IC}_{50} = 2.9 \mu\text{M}$  と低下するものの、DU145 細胞増殖抑制率が 77%と上昇し、かつ血中濃度が 0.73  $\mu\text{g/mL}$  と改善したことから、PCA-1 阻害活性を維持しながら高い in vivo 効果が期待できると考え、マウス xenograft モデルでの評価を行うこととした。

表 3. 2-(5-Substituted-benzimidazol-2-yl)-4-substituted-3-hydroxy-5-methyl-pyrazoles の PCA-1 阻害活性、DU145 細胞増殖抑制率、S9mix 残存率及び経口投与後の血中濃度

NO	Structure			PCA-1 inhibition $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	DU145 cells growth inhibition (%)		Remains after reaction by S9 mix for 10 min at 15 °C n=1	Blood concentration after oral administration (10 mg/kg) ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>		at 1 $\mu\text{M}$	at 10 $\mu\text{M}$		30 min	60 min
<b>7j</b>	CF <sub>3</sub>	Me	Ph	1.6	60	78	NT	1.00	0.33
<b>7k</b>	MeO	Me	Ph	1.0	65	78	NT	0.63	0.18
<b>7l</b>	F	Me	Ph	2.9	63	77	71%	1.02	0.73
<b>7m</b>	Me	Me	(4-Cl)Ph	>10 (33% inh. at 10 $\mu\text{M}$ )	NT		NT		NT
<b>7n</b>	Me	Me	(4-NO <sub>2</sub> )Ph	>10 (39% inh. at 10 $\mu\text{M}$ )	NT		NT		NT
<b>7o</b>	Me	Me	(4-OMe)Ph	>10 (18% inh. at 10 $\mu\text{M}$ )	NT		NT		NT
<b>7p</b>	Me	Me	(4-Ph)Ph	>10 (11% inh. at 10 $\mu\text{M}$ )	NT		NT		NT

NT: not tested

### (3) in vivo での腫瘍増殖抑制効果および副作用の評価

最初に、HUHS015 の長期抑制効果 (29 日間、u.i.d、s.c.投与)の検討を行った (図 5)。その結果、HUHS015 は、辻川等の実験どおり<sup>8)</sup>当初 1 週間は強い抑制効果を示したが、長期連投での低活性が明らかとなった。

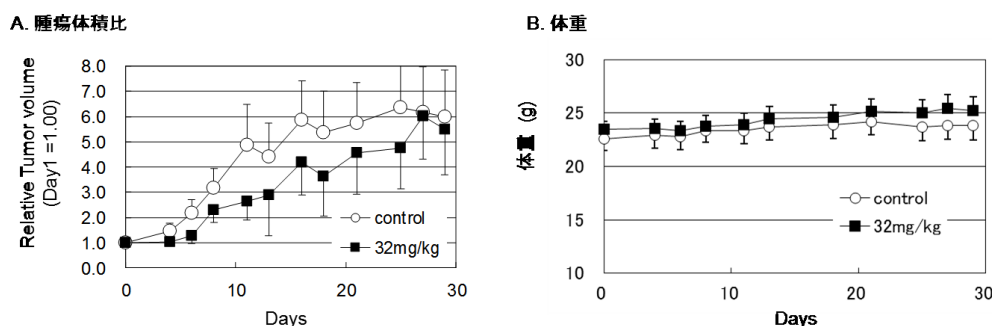


図 5. Xenograft モデルにおける HUHS015 の腫瘍体積変化値及び体重に対する作用

次に、前項までの検討で最も高い *in vivo* 効果が期待された化合物 **71** と、臨床標準治療薬 DTX の腫瘍増加抑制効果を同様に xenograft モデルで行った(29 日、図 6)。その結果、化合物 **71** はコントロール、DTX に比べ腫瘍の増殖を抑制した(図 6 A, B)。なお、本試験で採用した DTX の投与量 2.5 mg/kg はほぼ臨床使用量相当である<sup>11)</sup>。また、化合物 **71** および DTX の投与による体重に対する変化は認められなかった(図 6.C)。また、最終日に肝機能や腎機能の指標となる GOT、GPT、Creatinine 及び BUN の 4 項目においても、3 群の副作用発現に統計学的な有意差は認められなかった(図 7)。

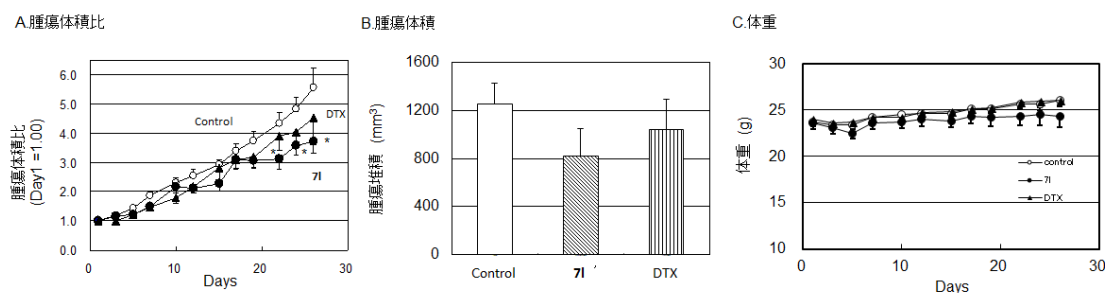


図 6. Xenograft モデルにおける化合物 **71**、DTX の腫瘍体積及び体重に対する作用

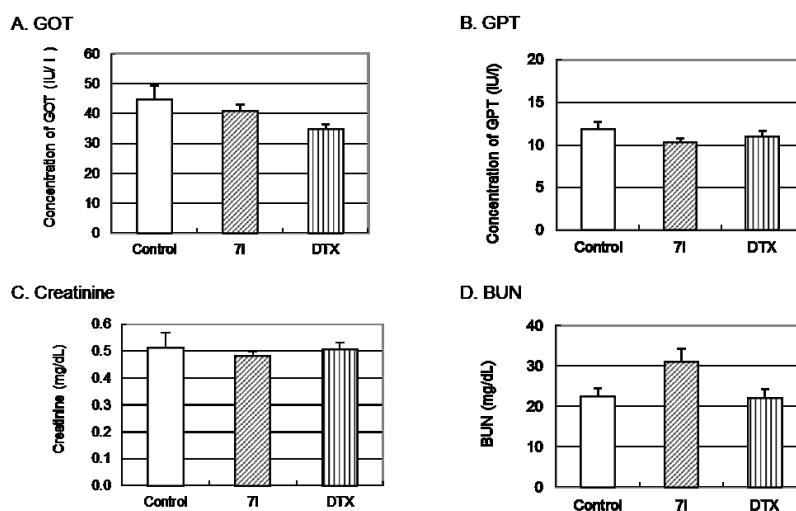


図 7. Xenograft マウスにおける化合物 **71** または DTX 投与による血中 GOT、GPT、Creatinine、及び BUN に対する作用

### 【考察】

HUHS015 は、今回の検討から *in vivo* では投与後、比較的速やかに肝臓で代謝を受け消失することが推定された。そこで、HUHS015 をシード化合物とし、被代謝構造を推定し(図 4)、構造変換を行った結果(表 2、3)、HUHS015 のベンジル基(図 4②)のメチレン構造の改変が有効であることが明らかとなった。特に、被代謝懸念のあるメチル基(図 4①)をさらにフッ素原子に置換した化合物 **71** は HUHS015 に比べ、PCA-1 阻害活性が  $IC_{50}=2.9 \mu M$  と若干低下するものの、細胞を用いた系では、DU145 細胞増殖抑制率が 77%と上昇し、PCA-1 阻害活性を維持しながら高い *in vivo* 効果が期待できた。また、S9mix 安定性も

71%と改善しており、ラット経口投与後1時間の血中濃度が0.73 µg/mLと約10倍改善したことから、マウス xenograft モデルでの評価を行った。

HUHS015は、マウス xenograft モデルにおいて、投与開始後7日間までは、辻川等の結果同様<sup>8)</sup>増殖を抑制していたものの、最終日近くではほぼ無効であった(図5)。一方、化合物71は10 mg/kg(u.i.d., s.c.投与)において、臨床使用薬 DTX の臨床使用量(2.5 mg/kgを毎週1回, s.c.)に比較し、有意差は付かなかったが、やや強い抑制効果を示した。また、コントロールに対しては有意に抑制した(図6.A,B)。なお、DTXは2.5 mg/kg相当量以上では、臨床上浮腫等の好ましくない作用が問題となることが知られている<sup>11)</sup>。また、化合物71を含め全ての群において体重減少は認められなかった(図6.C)。最終日に、肝・腎重量を測定したが、全群に差は認められなかった。また、GOT、GPT、Creatinine、BUNの測定も行ったが、いずれのパラメータにおいてもcontrolに比較して明らかな差は認められなかった(図7)。これらの結果から、化合物71は副作用の懸念が少ない用量設定で、標準治療薬 DTX よりも腫瘍体積増加抑制効果に優れる化合物である可能性が示唆された。

#### 【結論】

世界初の低分子 PCA-1 阻害薬 HUHS015 をリード化合物とし研究を行った。HUHS015 が S9mix 処置により早期に消失することから、肝臓における代謝反応を加味し構造展開研究を行い、HUHS015 のベンジル基(②、図4)をフェニル基に、メチル基(①、図4)をフッ素原子に置換した化合物71を得ることができた。化合物71はHUHS015に比べ、経口投与後60分の血中濃度がHUHS015に比較し、0.08 µg/mLから0.73 µg/mLと約10倍改善し、化合物濃度10 µMにおけるDU145細胞増殖抑制率が54%から77%と良好な値を示した。また、xenograftモデルの検討から、化合物71はホルモン非依存性前立腺がんに対する臨床使用薬 DTX と同等、あるいは若干有効な腫瘍抑制効果が観測された。また、最終日に測定したGOT、GPT、Creatinine、BUNなどの結果から肝・腎機能の指標に対して悪影響が少ないことも示唆された。

以上のことから、化合物71は前立腺がんに対し、有効な治療薬になりうることが示唆された。

#### 【引用文献】

1. N. Konishi, M. Nakamura, E. Ishida, et al. High Expression of a New Marker PCA-1 in Human Prostate Carcinoma, *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 5090-5097
2. K. Shimada, M. Nakamura, E. Ishida, et al., Prostate cancer antigen-1 contributes to cell survival and invasion through discoidin receptor 1 in human prostate cancer, *Cancer Sci.*, 2008, 99, 39-45.
3. I. Yamato, M. Sho, K. Shimada, et al., PCA-1/ALKBH3 Contributes to Pancreatic Cancer by Supporting Apoptotic Resistance and Angiogenesis, *Cancer Res.*, 2012, 72, 4829-4839.
4. M. Tasaki, K. Shimada, H. Kimura, et al., ALKBH3, a human AlkB homologue, contributes to cell survival in human non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2011 Feb 15;104(4):700-6. 2011
5. K. Koike, Y. Ueda, H. Hase, et al., anti-tumor effect of AlkB homolog 3 knockdown in hormone-independent prostate cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets*. 12(7):847-56. 2012

6. S. Dango, N. Mosammaparast, ME. Sowa, et al., DNA unwinding by ASCC3 helicase is coupled to ALKBH3-dependent DNA alkylation repair and cancer cell proliferation. *Mol Cell.* 44(3):373-84. 2011
7. J. Ringvoll, LM. Nordstrand, CB. Vågbo, et al., Repair deficient mice reveal mABH2 as the primary oxidative demethylase for repairing 1meA and 3meC lesions in DNA. *EMBO J.* 17;25(10):2189-98. 2006
8. S. Nakao, M. Mabuchi, T. Shimizu, et al. Design and synthesis of prostate cancer antigen-1 (PCA-1/ALKBH3) inhibitors as anti-prostate cancer drugs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24, 1071–1074
9. M. Ueda, T. Shimizu, M. Mabuchi, et al. Novel Metabolically Stable PCA-1/ALKBH3 Inhibitor Has Potent Antiproliferative Effects on DU145 Cells In Vivo, *ANTICANCER RESEARCH*, 2017 accepted
10. A Japanese website for S9 mixture (<http://www.ieda.co.jp/boeki/products/detail381.html>), 2017, 08, 10
11. M. Mabuchi, T. Shimizu, M. Ueda, et al. Systematic Trial for Evaluating Docetaxel in a Human Prostate Cancer Cell DU145 Xenograft Model, *ANTICANCER RESARCH*, 2017, 37, 1665-1676