

## 論文の内容の要旨

論文題目      合成レチノイドの抗癌剤への開発——  
TAC-101 の抗癌作用の発見とその作用機序に関する基礎的研究

氏 名      柴 田 治 郎

### 【序】

癌は日本人の死亡原因の最上位にあり、年々、罹患率・死亡率とも上昇している。2015 年には死亡者数が 40 万人を超えると予想され、その制圧は日本人の健康上の最重要課題である。現在の癌の治療は外科的、放射線および内科的治療に分類され、何れも癌の完治を狙うものである。しかしながら、外科的な完全治癒切除は困難であり、数年後に転移あるいは再発を引き起こすことも多い。抗癌剤による内科的治療は外科切除後の補助療法としても使用され、一部の癌では転移の抑制効果等を示し、患者の予後を改善する。近年、血管新生阻害、転移抑制等の新たな内科的治療法が開発され、癌の完全な除去を目的とするのではなく、癌との共存を可能とする、いわゆる” Tumor dormancy” の概念が提唱され、癌患者の実質的な生存に寄与する事が期待されている。

レチノイドとは生物の発生や分化の過程に必須なビタミン A 酸、およびその類縁化合物もしくはその生理活性を有する化合物の総称である。1988 年に all-trans-retinoic acid (ATRA)が急性前骨髄性白血病の患者に対して 90%以上の奏効率を示すことが報告され、レチノイドの抗癌剤としての有用性が初めて示された。また、近年のレチノイド及び RAR  $\alpha$ に関する分子作用機構研究の急速な進歩は、合成レチノイドが抗癌剤として開発可能であることを示唆しており、基礎的にはレチノイドが効果を示す固形癌が認められている。

こうした背景をふまえ、癌治療に貢献する有効なレチノイドを開発すべく研究を開始した。

## 【化合物の選択】

ATRA を始めすべてのレチノイドは RAR (retinoic acid receptor) に結合して作用を発揮する。RAR はリガンド依存的な転写調節因子であり、核内レセプタースーパーファミリーの一員である。RAR は、同じく核内レセプタースーパーファミリーの一員であり 9-cis-retinoic acid をリガンドとする RXR (retinoid X receptor) とヘテロダイマーを形成して機能するが、その転写調節能の発揮には、リガンド依存的なコリプレッサーの解離とそれに引き続くコアクチベーターの結合が必須であることがわかっている。

以上のことを鑑み、多数知られている合成レチノイドの中から、脂溶性官能基部分が特徴的なレチノイドである TAC-101、Am55S 及び Re80 を選択し、癌に対する抗転移効果ならびに安全性を評価し、RAR  $\alpha$  に選択的かつ高い親和性を有するレチノ安息香酸、TAC-101 (4-[[[3, 5-bis(trimethylsilyl)phenyl]carbonyl]amino]benzoic acid) をとりあげた。TAC-101 は脂溶性官能基として2つのトリメチルシリル基を持つ点で構造が特異的であり、RAR $\alpha$  から離脱するコリプレッサーならびに結合するコアクチベーターの選別において ATRA とは異なる特徴を発揮する可能性があると考えた。

## 【病態モデルの構築と活性評価】

癌が悪性である理由は癌細胞の無秩序な増殖能とともにその転移能にある。なかでも肝臓は消化器癌、肺癌の転移先となり易い臓器である。加えて、肝臓はビタミン A の貯蔵臓器でありレチノイドが分布しやすいと考えられる。そこで、TAC-101 の抗癌剤への開発戦略に当たり、TAC-101 の消化器癌及び肺癌の肝転移癌に対する抗癌効果を検討すべきと考えた。まず標的とする活性を評価す

るための新たな実験的な肝転移モデルを作製した。この病態モデルは転移の過程を一部再現していることから、薬剤の臨床での効果を反映できるものと考えられた。本病態モデルでは、癌細胞を移植した動物の肝臓に無数の転移結節が認められ、動物は約 40 日で死亡した。

ヒト肺癌細胞株 A549 の実験肝転移モデルにおいて、TAC-101 は有意な延命効果を示した。一方 ATRA 及び肺癌の標準的な治療薬である CDDP (シスプラチン) の延命効果は低いものであった。ヒト胃癌細胞株 TMK-1 を移植した実験肝転移モデルにおいては、TAC-101 では有意な延命効果が認められたが、ATRA、胃癌の治療のために臨床で使用されている 5-フルオロウラシル投与群は対照群に対して有意差を認めなかった(表)。

また、肺癌は古くからビタミン A の摂取量との関連が指摘されていた癌の 1 つで、レチノイドによる治療効果が期待されている。実際、TAC-101 は肺癌細胞株 A549 の肝転移に効果を示した。そこで、TAC-101 の肺癌原発巣に対する効果を検討するために肺癌モデルを作製し、検討した。

実験肝転移に対するTAC-101の延命効果

A549	Dose (mg/kg)	Administration schedule	T/C (%)
TAC-101	4	(qdx5)x3	215 **
ATRA	4	(qdx5)x3	115
CDDP	7	qdx1	155 **

TMK-1	Dose (mg/kg)	Administration schedule	T/C (%)
TAC-101	2	(qdx5)x3	201 **
	8	(qdx5)x3	162 **
ATRA	8	(qdx5)x3	141
5-FU	19	qdx5	112

\*;p<0.05, \*\*;p< 0.01

本病態モデルにおいて、TAC-101 は有意な延命効果を示した。一方、ATRA 及び CDDP では有意な効果は認められなかった。

以上から、TAC-101 は癌の肝転移に対して既存の抗癌剤では得られない優れた肝転移抑制効果を示し、肺癌原発に対しても延命効果を発揮し得ることが示唆された。

#### 【作用機序に関する基礎的研究】

TAC-101 が実験肝転移モデルにおいて優れた抗転移効果を示したことから、*in vitro* での癌細胞の浸潤抑制作用を検討した。実験に使用した濃度では TAC-101 及び ATRA はヒト肺癌細胞の *viability* に無影響であった。しかし、TAC-101 は  $1\mu\text{M}$  以上で有意にこれらの細胞の浸潤を抑制した。

癌が転移巣を形成するためには転移先での増殖のために新生血管を誘導する必要がある。そこで、TAC-101 の転移抑制における血管新生阻害の関与を Dorsal Air Sac 法を用いて検討した。TAC-101 投与群で用量依存的な強力な血管新生抑制効果が認められた。また、皮下に AZ521 を移植したヌードマウスに、TAC-101 及び ATRA  $8\text{mg/kg}$  を連日投与した後、腫瘍内の血管数を計測したところ、TAC-101 で明らかに血管数が抑制されていた。

癌細胞の転移浸潤には uPA (urokinase type plasminogen activator) や uPAR (urokinase type plasminogen activator receptor) 等、血管新生には VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) や b-FGF (basic-Fibroblast Growth Factor) 等の様々な因子の関与が考えられている。これらの因子の発現は転写因子である AP-1 に制御されるとの報告があることから、AP-1 に対する TAC-101 の作用を、ゲルシフトアッセイにより検討した。TAC-101 は TMK-1 の核抽出蛋白と AP-1 結合配列を含むオリゴヌクレオチドとの複合体の形成を  $3\sim 30\mu\text{M}$  の範囲で濃度依存的に阻害した。即ち、TAC-101 の浸潤抑制作用、血管新生阻害作用の一部は、AP-1 を介した転写調節の阻害にあると考えられた。

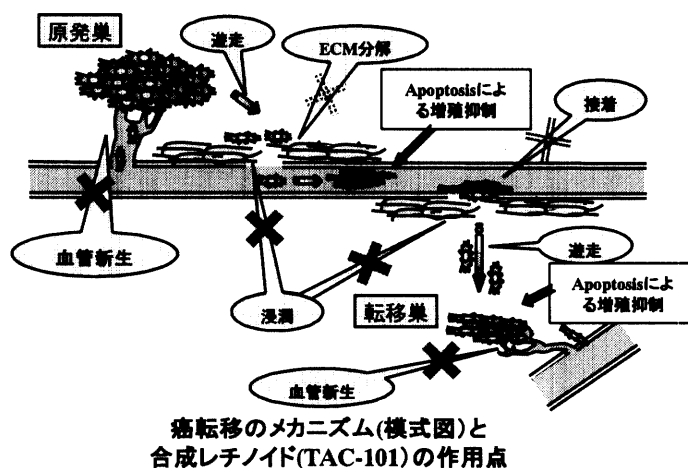
また、レチノイドは *in vitro* においてアポトーシスを誘導することが知られている。そこで TAC-101 のアポトーシス誘導能を検討した。TMK-1 に対して TAC-101 では  $10\mu\text{M}$  からすでに DNA の断片化が検出された。ATRA では  $40\mu\text{M}$  でのみ、DNA の断片化が認められた。TAC-101 の誘導するアポトーシスはカスパーゼ阻害剤によって阻害されたため、TAC-101 によるアポトーシス誘導はカスパーゼの活性化に関与している可能性が示唆された。

以上の *in vitro* で認められた現象が *in vivo* においても成立しうることを確認すべく、TAC-101 の薬効用量における血中動態を検討した。TAC-101 の  $8\text{mg/kg}$  をヌードマウスに単回投与し、経時的に採血して血中濃度を HPLC にて測定した。TAC-101 の血中最高到達濃度は約  $20\mu\text{M}$  に達し、8 時間以上にわたり  $3\mu\text{M}$  以上の濃度が維持された。この結果は、TAC-101 はアポトーシス誘導に必要な  $10\mu\text{M}$ 、浸潤阻害に必要な  $3\mu\text{M}$  の濃度を *in vivo* においても十分に達成できることを示唆する。

以上の結果から、TAC-101 の抗癌剤としての有効性が期待でき、現在、米国において臨床試験を進めている。第(I)相試験において肺癌の肺縦隔リンパ節転移の患者で完全寛解（CR）が1例認められた。肺癌の転移巣で CR が認められたことならびに基礎研究の結果から、肺癌及び肝転移癌を対象に第(II)相試験を計画している。

### 【総括】

レチノイドを抗癌剤として開発すべく研究を遂行し、TAC-101 の抗癌作用、特に転移癌に対する効果を見出すことに成功した。加えてその作用機序の一端を解明した。癌が転移するためには、原発巣からの癌細胞の離脱、組織間移動、血流への進入および脱出、浸潤、転移性癌の形成、その増殖に必要な栄養



供給するための血管新生が必要である。本研究で構築した実験肝転移モデルにおいては、転移過程の内、癌細胞の血流外への脱出、浸潤ならびに再増殖、腫瘍への血管誘導が再現されている。その過程の中で、TAC-101 が浸潤および血管新生を抑制することを示した。浸潤には uPA、uPAR 等、血管新生には VEGF や b-FGF などの関与が示唆されている。これらの遺伝子のプロモーター領域には TPA 応答配列(TRE)が存在し、癌やその周辺組織での過剰発現も報告されている。TRE には AP-1 が結合して遺伝子発現を調節しているが、TAC-101 は AP-1 の TRE への結合を阻害して遺伝子発現を抑制し、浸潤や血管新生を阻害していると考えられる。また、TAC-101 は癌細胞に対しアポトーシスを誘導することを見いだした。故に、原発巣から離脱した癌細胞が血流中で TAC-101 によりアポトーシスが誘導され、血流内での増殖や転移腫瘍の形成が抑制される可能性も考えられる(図)。

癌は発生部位で増殖し、さらに多くの場合、転移して遠隔部位で再び癌を形成することにより患者を死に至らしめる。この転移の複数の段階には AP-1 に制御される遺伝子群の発現が関与するが、その発現を TAC-101 は RAR を介して特異的に抑制する。RAR を介したシグナルを制御する TAC-101 をはじめとするレチノイドに、ヒトの死亡原因として増加しつつある癌の新たな治療薬となる可能性がある。

本研究成果は、TAC-101 をはじめとするレチノイドをさらに改良することで、副作用の強い既存の抗癌剤とは異なる、患者の生活の質を低下させることなく癌を治療する抗癌剤の開発が可能であることを示唆するとともに、合成レチノイドの開発戦略に対して一つの解答例を与えたものであると考える。