

論文の内容の要旨

論文題目 新規 VEGFR-2 チロシンキナーゼ阻害剤 KRN633 の抗腫瘍効果と機序の解明、
および KRN633 固体分散体による *in vivo* 抗腫瘍効果の改善に関する研究

氏名 中村 一 英

【序論】

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管新生において中心的な役割を担っている。VEGF が血管内皮細胞に発現する VEGF receptor-2 (VEGFR-2) と結合すると、VEGFR-2 は自己リン酸化を起こし細胞内のシグナル伝達系が活性化して血管内皮細胞の基底膜消化・遊走・増殖がおこり、その結果、血管新生が誘導される。

血管新生は固形がんが持続的に増殖するために必須の過程であると考えられている。VEGF は多くの固形がんで高発現しており、臨床において、がんの悪性度や不良な予後と相関することが報告されている。また、VEGF は腫瘍に豊富な血管を誘導することで、血行性転移にも関与していると考えられている。従って、がんの治療を考えた場合、VEGF/VEGFR-2 のシステムは魅力的な標的の 1 つである。特に VEGF シグナリングのトリガーである VEGFR-2 の自己リン酸化は VEGFR 自身のチロシンキナーゼによって触媒されており、キナーゼ阻害剤による制御が可能であると考えられる。

我々は KRN633 と名付けた新規キナゾリンウレア化合物が VEGFR-2 自己リン酸化を強く阻害することを見出した。そこで、KRN633 のキナーゼ阻害活性、血管新生阻害作用、および抗腫瘍作用について詳細な特徴づけを行った。さらに固体分散法による *in vivo* の活性向上に取り組み、新規抗腫瘍薬としての可能性について検討した。

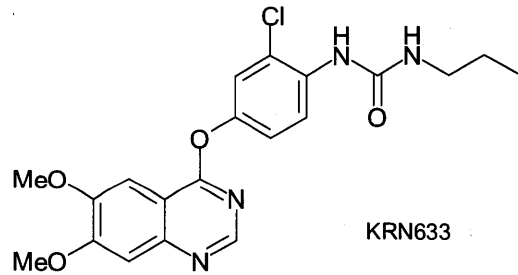
第1部：新規 VEGFR-2 チロシンキナーゼ阻害剤 KRN633 の抗腫瘍効果と機序の解明

【背景】

VEGFR-2 の自己リン酸化を阻害する物質についてスクリーニングを実施し、KRN633 と名付けた新規キナゾリンウレア化合物が nM オーダーの強い活性を示すことを見出した。そこで、KRN633 が VEGFR-2 チロシンキナーゼの選択的阻害剤であるか否か、また、血管新生を阻害して抗腫瘍効果を示すか否か、について検討した。

【結果】

＜KRN633 のキナーゼ阻害活性＞KRN633 は VEGFR-1, -2, -3 の組換え蛋白質のキナーゼ活性に対し、それぞれ、 $IC_{50} = 170, 160, 125$ nM の阻害活性を示した。また、PDGFR- α , - β , c-Kit に対しても、 $IC_{50} = 1 \sim 4 \mu M$ の阻害活性を示したが、その他の受容体型チロシンキナーゼ、非受容体型チロシンキナーゼ、あるいはセリンスレオニンキナーゼに対しては顕著な阻害活性を示さなかった。



さらに KRN633 は血管内皮細胞における VEGF 依存的な VEGFR-2 自己リン酸化を強力に阻害した ($IC_{50} = 1.16$ nM : 表参照)。また、c-Kit および PDGFR- α の自己リン酸化も阻害した。しかしながら、FGFR-1, EGFR, c-Met に対しては阻害活性を示さなかった。

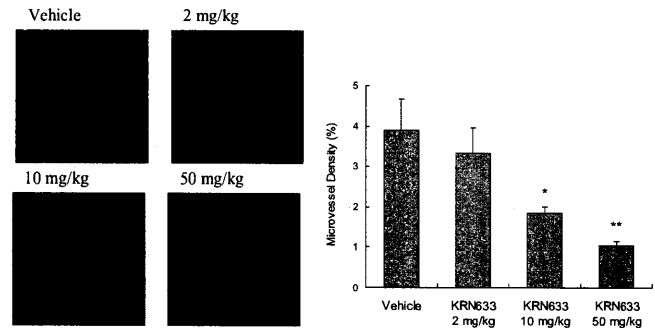
RTK	Cell	IC_{50} (nM)	95% confidence interval (nM)	Fold selectivity
VEGFR-2	HUVEC	1.16	0.88-1.53	1.00
VEGFR-1	NIH3T3-Flt-1	11.7	6.7-20.4	10.1
c-Kit	KU812F	8.01	6.3-10.3	6.90
PDGFR- α	NHDF	130	103-164	112
FGFR-1	NHDF	>10,000		>8,600
EGFR	A431	>10,000		>8,600
c-Met	A431	>10,000		>8,600

＜KRN633 の VEGF シグナリングに対する作用＞KRN633 は血管内皮細胞における VEGF 依存的な MAPK の活性化および細胞増殖を抑制したが ($IC_{50} = 3.5 \sim 15$ nM)、bFGF 依存的な MAPK 活性化および細胞増殖をほとんど抑制しなかった ($IC_{50} > 3000$ nM)。また、KRN633 は VEGF 依存的な血管内皮細胞の管腔形成作用を濃度依存的に阻害した。

＜KRN633 の抗腫瘍活性＞KRN633 は 20 mg/kg あるいは 100 mg/kg を 1 日 1 回あるいは 2 回経口投与することによって、ヌードマウス皮下移植モデルにおける A549 (ヒト肺癌株)、HT29 (ヒト大腸癌株)、DU145 (ヒト前立腺株) 等の腫瘍増殖を有意に抑制し、一

部の腫瘍に対しては退縮効果を示した。KRN633 はヌードラット皮下移植モデルでも優れた効果を示した。A549 を皮下移植したラットモデルにおいて、分割投与の効果について検討したところ、20 mg/kg、1 日 1 回投与時の腫瘍増殖抑制率が 47.1%（統計学的有意差無し）であったのに対し、10 mg/kg、1 日 2 回投与時の TGI% は 87.2% ($p < 0.001$) となり、分割投与のほうが高い効果を示した。

＜KRN633 の腫瘍血管新生阻害作用＞
A549 を皮下移植したヌードラットモデルにおいて、KRN633 は 2, 10, 50 mg/kg の用量で経口投与することにより、媒体投与と比較して腫瘍微小血管密度をそれぞれ 15, 53, 76% 減少させた（右図参照）。



【考察】

新規キナゾリンウレア化合物 KRN633 は強力かつ選択的な VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤であり、血管内皮細胞において VEGF 依存的な VEGFR-2 自己リン酸化とシグナル伝達を阻害した。さらに *in vivo* において血管新生阻害活性と幅広い抗腫瘍スペクトルを示した。KRN633 は VEGF-2 阻害活性にもとづいて血管新生を阻害し、*in vivo* において腫瘍増殖抑制活性を発揮するメカニズムが考えられる。

第 2 部：KRN633 固体分散体による *in vivo* 抗腫瘍効果の改善に関する研究

【背景】

KRN633 は強力かつ選択的な VEGFR 阻害剤であり、*in vivo* において血管新生を阻害し抗腫瘍活性を示す。しかしながら、KRN633 が十分な *in vivo* 活性を発揮するには、比較的高用量（～100 mg/kg）や頻回投与（1 日 2 回投与）が必要であり、KRN633 の低い *in vivo* 活性は抗腫瘍薬として開発する上で問題となる可能性が指摘された。PK 解析の結果、KRN633 の低い *in vivo* 活性は低吸収性に起因していることが示唆された。

KRN633 は難溶解性であり、吸収性を改善するためには溶解性の向上が必要であると考えられた。そこで、KRN633 の優れた *in vitro* 特性に影響することなく、溶解性を改善し *in vivo* の吸収性を向上させるため、固体分散法による非晶質化を試みた。

【結果】

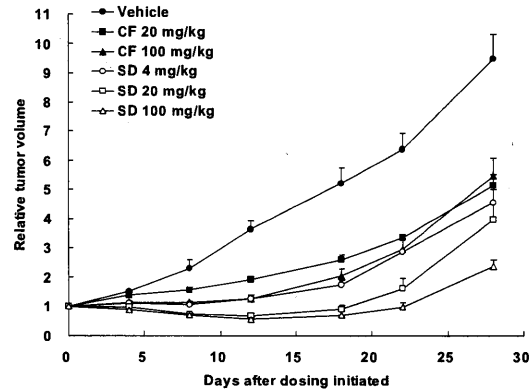
＜KRN633 固体分散体の調製と物理化学的特性＞ KRN633 固体分散体は polyvinylpyrrolidone を担体として調製した。X 線回折分析、示差走査熱量分析、および走査電子顕微鏡分析の結果、固体分散体は非晶質化していることが示された。JP 1st に対する溶解性について検討したところ、固体分散体は KRN633 原薬（結晶形）と比較して顕著な溶

解性の向上が明らかとなった。

〈KRN633 固体分散体の PK 解析〉経口単回投与後のラットにおける血中動態について解析した結果、固体分散体投与群では C_{max} 及び生物学的利用率 (BA) が結晶形投与群と比較してそれぞれ 8.5 倍、7.5 倍と増加した。

〈KRN633 固体分散体の抗腫瘍効果〉

A549 ノードマウス皮下移植モデルにおいて、4 mg/kg の固体分散体投与 (右図 SD) は 25 倍量の結晶形投与 (CF) とほぼ同等の腫瘍増殖抑制効果を示した (右図参照)。さらに、固体分散体の用量を 20 mg/kg、100 mg/kg とした場合、腫瘍はそれぞれ 31.4%、45% の退縮を示した。固体分散体は DU145 および PC3 腫瘍に対しても低用量からの強い抗腫瘍効果を示した。



〈KRN633 の安全域に関する検討〉A549 ノードラット皮下移植モデルにおいて、1 mg/kg の固体分散体投与は 10~50 倍量の結晶形投与と同程度の抗腫瘍効果を示した。30 mg/kg あるいは 100 mg/kg の固体分散体を投与したラットでは、著しい腫瘍退縮効果が認められるものの、投与前と比較して体重減少 (10-20%) や有意な尿タンパクの上昇も認められた。しかしながら 10 mg/kg 以下の固体分散体ではこれらの毒性は認められなかった。

【考察】

KRN633 固体分散体は非晶質化しており、結晶形と比較して溶解性が改善し、経口投与後の C_{max} および BA の向上がみられた。 T_{max} および半減期が変わらなかったことから、固体分散体では吸収性が向上していることが示唆される。固体分散体は結晶形と比較して *in vivo* における血管新生阻害活性および抗腫瘍活性が顕著に向上した (マウスにおいて 25 倍以上)。従って、KRN633 固体分散体は優れた *in vitro* 特性を損なうことなく吸収性の向上によって *in vivo* 活性を劇的に改善したものと考えられる。固体分散体の高い BA を利用して、ノードラットモデルにおける KRN633 の腫瘍増殖抑制効果と毒性 (指標として体重変化および尿タンパクを観察) との間の安全域について検討した結果、KRN633 は毒性指標で影響を認めない用量の、さらに 10 分の 1 の用量で有意な抗腫瘍効果を示した。以上より、KRN633 固体分散体は非常に低用量から強い抗腫瘍効果を発揮し、かつ、十分な安全域を有す新規抗腫瘍薬となることが期待される。