

新規抗癌剤アムルピシン (カルセド®)の創製と研究開発

大日本住友製薬(株)*

研究本部

野口 俊弘

花田 充治

山岡 隆

知的財産部

森 貞信也

開発本部

一井 真二

Development of a novel antitumor drug 'amrubicin', a completely synthetic anthracycline

Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.

Drug Research Division

Toshihiro NOGUCHI

Mitsuharu HANADA

Takashi YAMAOKA

Intellectual Property

Shinya MORISADA

Drug Development Division

Shinji ICHI

Amrubicin is a completely synthetic anthracycline derivative. In contrast, however, the anthracyclines used clinically thus far have been produced by fermentation or semisynthesis. Amrubicin is structurally distinguishable from other anthracyclines by the amino group at the 9-position and its unique sugar moiety. In April 2002, Amrubicin was approved in Japan for the treatment of non-small cell lung cancer and small cell lung cancer.

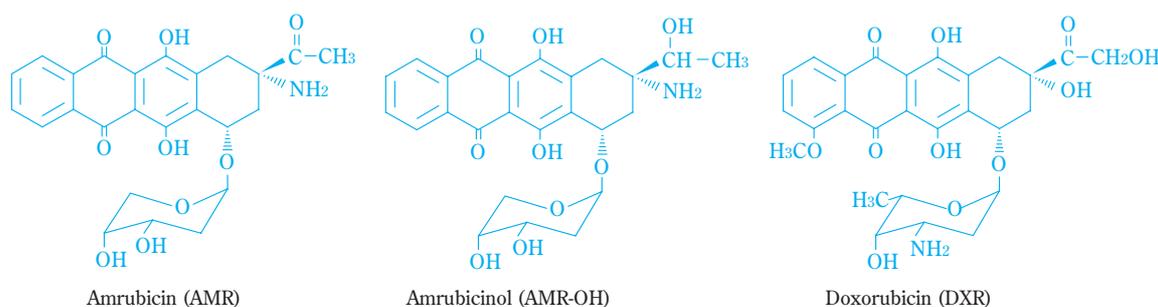
はじめに

ドキシソルピシン(DXR)、ダウノルピシン(DNR)、エビルピシン等のアントラサイクリン誘導体は、様々な種類の癌に対して臨床的に広く用いられている。放線菌からDNRやDXRが発見されて以来、より抗腫瘍効果が強く、より安全な誘導体を見出すため、炭素側鎖の置換、アミノ糖の変換などが数多く行われてきたが¹⁾、DXRよりも優れたプロファイルを示す誘導体は多くは見出されなかった。これらアントラサイクリン誘導体はいずれも天然物あるいは半合成品であるために構造上の制約があるが、さらに強力な誘導体を見出すために、全合成により作成した誘導体をスクリーニングし、塩酸アムルピシン(AMR、Fig.1)を見出した。AMRは、9位に水酸基の代わりに

アミノ基を有し、アミノ糖の代わりにより簡単な糖部分を有することを構造上の特徴とする、世界で初めて化学的に全合成されたアントラサイクリン系抗癌剤である²⁾。AMRはヌードマウスに皮下移植したヒト腫瘍細胞株に対してDXRよりも強い抗腫瘍効果を示したが³⁾、本剤の活性代謝物であるアムルピシノール(AMR-OH、Fig.1)が抗腫瘍効果の発現に重要な役割を果たしていることが見出された⁴⁾。これは、他のアントラサイクリン誘導体には無いAMRの大きな特徴と考えられる。AMRの主な作用機序は、DNAトポイソメラーゼ II (トポ II) を介したクリーパブルコンプレックスの安定化である⁵⁾。

AMRは非小細胞肺癌および小細胞肺癌を適応症として2002年4月に製造承認されている。以下、AMRの薬効薬理作用および臨床試験の成績について示す。

(*)本研究は、旧住友製薬(株)研究本部でなされたものです。



Chemical structures of amrubicin (left), amrubicinol (center) and doxorubicin (right)

Fig. 1 Chemical structures

Table 1 Growth Inhibition of Human Tumor Cells Following 3-Day Continuous Exposure to AMR, Its Metabolites, and DXR^{a)}

Drug	IC ₅₀ (μM) ^{b)}			
	CCRF-CEM	U-937	PC-8	A-549
Amrubicin (AMR)	0.58 ± 0.03	0.48 ± 0.06	0.26 ± 0.16	0.062 ± 0.008
Amrubicinol (AMR-OH)	0.017 ± 0.008	0.0071 ± 0.0011	0.021 ± 0.015	0.0079 ± 0.0022
7-Deoxyamrubicin aglycone	1.1 ± 0.1	13 ± 0	1.3 ± 0.4	0.80 ± 0.21
Amrubicinol aglycone	0.79 ± 0.04	0.76 ± 0.08	0.76 ± 0.27	0.45 ± 0.25
7-Deoxyamrubicinol aglycone	0.73 ± 0.02	0.93 ± 0.00	0.92 ± 0.25	0.77 ± 0.16
9-Deaminoamrubicin	1.2 ± 0.3	2.3 ± 0.2	9.2 ± 5.4	0.70 ± 0.08
Doxorubicin (DXR)	0.034 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.004	0.0057 ± 0.0000

a) Cells were grown in medium containing various concentrations of the drugs for 3 days.

b) The data are the mean IC₅₀ value (μM) ± standard deviation of two experiments. CCRF-CEM and U-937 are hematopoietic cell lines; A549 and PC-8 are lung cancer cell lines.

塩酸アムルビシンの薬効薬理作用

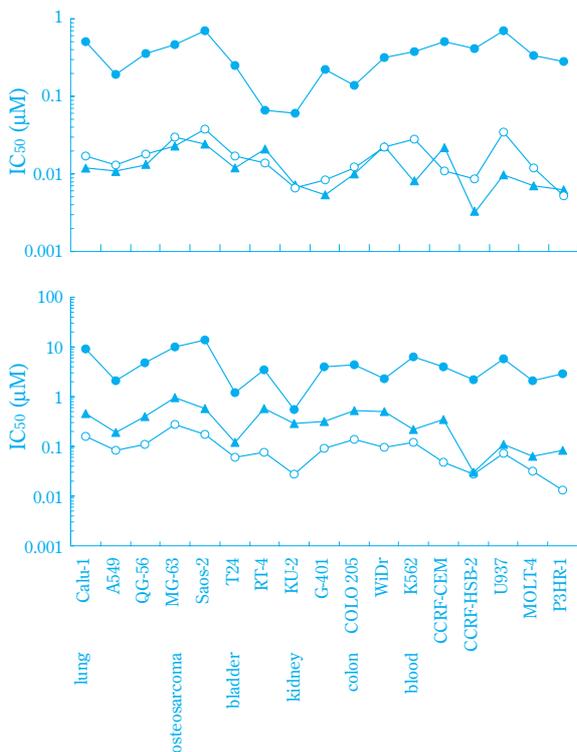
1. *In vitro* 細胞増殖抑制効果

AMRも他のアントラサイクリン系薬剤と同様に、13位ケトン基がアルコール基に還元されたアムルビシノール(AMR-OH)と糖部分が脱離したアグリコン代謝物が生成することが見出されている⁶⁾。これらの代謝物と親化合物であるAMRのヒト腫瘍細胞株4株に対する細胞増殖抑制効果を比較すると、AMRに比べAMR-OHの活性が高く、3種類のすべてのアグリコン及び脱アミノ体は活性が低かった(Table 1)。塩酸イダルビシン(IDR)では13位還元体が母化合物と同等の活性を保持しているが⁷⁾、その他のアントラサイクリン誘導体では、13位が還元された代謝物の活性は、母化合物よりも低下することが報告されている⁸⁾。DXRと構造が類似しているダウノルビシン(DNR)およびIDRはともに白血病の治療薬として市販されているが、DXRの構造では側鎖の14位に水酸基が結合しているのに対して、DAU、IDRおよびAMRではその水酸基が無い。これらの3剤はDXRに比較して13位のケトン基が還元されやすいようであり、この還元には14位の水酸基が関与していると考えられる。また、IDRとAMRの類似点はともに4位にmethoxy

基を持たないことであり、このことが13位還元体の活性に影響を与えているように推察される。同じ13位の代謝によって活性が増強される点は、AMRの大きな特徴であると考えられた。

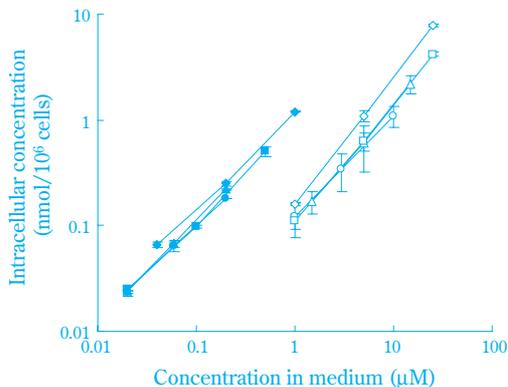
更に、17株のヒト腫瘍細胞株を用いて、AMR、AMR-OHおよびDXRの*in vitro* 細胞増殖抑制効果を検討した⁹⁾。薬剤処理方法は、3日間連続薬剤接触と1時間薬剤接触の方法で検討した。細胞毎に、3剤について細胞増殖が50%抑制される濃度(IC₅₀値)を算出した(Fig.2)。IC₅₀値を指標に活性を比較すると、AMR-OHはAMRよりも5~200倍程度活性が強く、DXRと同程度の活性を示した。これらの細胞株を用いた実験の結果からはDXRのスペクトルとAMRあるいはAMR-OHのスペクトルに大きな違いは認められなかった。

そこで、AMR-OHがAMRより活性が高くなる機序を解明するために、細胞内動態について検討した⁹⁾。4種類のヒト腫瘍細胞株を用いて、AMRあるいはAMR-OHの種々の濃度で1時間接触した後の細胞内薬剤濃度を測定し、培地中薬剤濃度に対する細胞内薬剤濃度をFig.3に示した。その結果、同じ細胞内濃度になるためには、AMR-OHはAMRの約1/10の培地中濃度となり、AMR-OHの方が細胞内への取り込まれやすいことが見いだされた。また、同様の実験で、50%



Growth-inhibitory activities of AMR (○), AMR-OH (●) and DXR (△) on human tumor cells with a 1-h (lower) or 3-day (upper) drug exposure. In the 1-h drug exposure test, cells were incubated for 1 h with drugs, and grown in drug-free medium for 3 days. In the 3-day continuous drug exposure test, cells were grown in the medium containing drugs for 3 days. Results are expressed as mean IC₅₀ value of two or three experiments.

Fig. 2 Growth-inhibitory activities



CCRF-CEM (○, ●), U-937 (△, ▽), QG-56 (◇, ◇) or G-401 cells (□, □) were incubated in medium containing various concentrations of AMR (open symbols) or AMR-OH (closed symbols) in triplicate for 1 h, and the intracellular concentrations were measured by HPLC. Each point represents the mean value ± standard deviation of triplicate wells.

Fig. 3 Cellular incorporation of AMR and AMR-OH

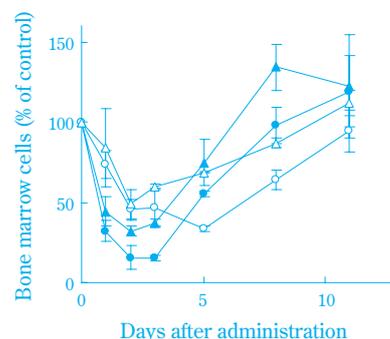
の細胞増殖抑制効果を示す培地中薬剤濃度(IC₅₀値)とその時の細胞内濃度をそれぞれAMRのAMR-OHに対する比率として比較すると、培地中濃度では27 ~ 67

倍であったのが、細胞内濃度では3.0 ~ 7.0倍となり、やはりAMR-OHの方が約10倍程度取り込まれやすいことを示すとともに、取り込みの違いを除いても、AMR-OHの方がAMRより数倍程度は活性が強いことが示唆された。

2. *In vivo* 抗腫瘍効果および骨髄抑制作用

抗がん剤の*in vivo*での抗腫瘍効果は一般的に最大耐量で比較する。そこでAMRの静脈内短回投与での最大耐量を、投与後2週間以内に死亡が認められず、3g(15%)以内の体重減少を示す最大投与量として設定した。BALB/c、ICR、CDF1、BDF1の4系統のマウスについて調べた結果、AMRおよびDXRでは、それぞれ25mg/kg、12.5mg/kgと設定された¹⁰⁾。以下これらを最大耐量として動物実験を行った。

アントラサイクリン系薬剤では骨髄抑制と投与局所の傷害性が毒性として注意すべきものである。そこで、BALB/cマウスを用いて、AMRあるいはDXRの最大耐量およびその1/2量を静脈内に単回投与して、経時的に大腿骨を摘出、骨髄細胞数を測定した¹⁰⁾。Fig.4で示すとおり、AMRの最大耐量の投与により強い骨髄抑制作用が認められ、最大耐量の1/2の投与量ではその程度が減弱するもののDXRの最大耐量と同程度の抑制効果であった。一方骨髄抑制効果の回復時期を見ると、AMRでは8日目で回復していたが、DXRでは8日目では回復せずに11日目で漸く回復が認められた。すなわち、AMRの骨髄抑制効果はDXRに比べて、その程度は強いものの回復が早いことが見いだされた。この骨髄抑制作用を幹細胞であるCFU-GM数についてICRマウスを用いて検討した結果、AMRでは投与後1日目から減少していたが、3日目に

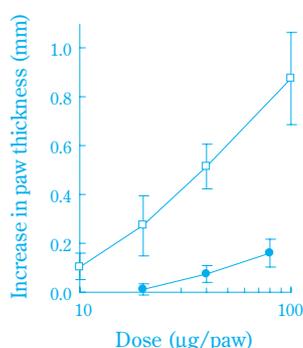


Time-course of the number of bone marrow cells after single i.v. injection of AMR and DXR. Male BALB/c mice were treated with AMR (25mg/kg, ○, or 12.5mg/kg, △) or DXR (12.5mg/kg, □, 6.25mg/kg, ▽). The femurs were removed rapidly at definite intervals, and then bone marrow cells were flushed with 0.85% NaCl. The number of them was counted with a Coulter counter. Results are expressed as mean ± SD of three or four mice.

Fig. 4 Myelosuppression of AMR

は回復が認められた¹¹⁾。一方、DXRでは投与後の減少が10日目まで継続していた。今後の詳細な検討が必要であるが、AMRの作用はCFU-GM以降の分化段階の幹細胞への作用が強いが、DXRではCFU-GMより前の分化段階の幹細胞への作用が強い可能性が推測された。

次に、AMRの投与局所への傷害性をSiegelらがDXRに対して検討した方法を用いて、DXRと比較検討した¹⁰⁾。CDF1マウスの後肢足趾皮下にAMRあるいはDXRの溶液を10 μ l投与し、浮腫量により投与局所の傷害性を評価した。その結果、DXRに比較して、AMRの傷害性が低いことが見いだされた(Fig.5)。DXRでは投与時に血管からの漏出により壊死を生じることが経験されるが、局所毒性の点でAMRでは比較的安全的な薬剤であることが推測された。



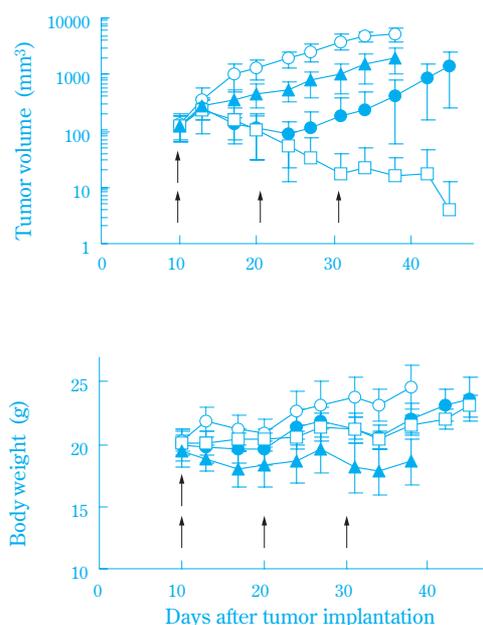
Dose-response relationship for CDF1 mouse hind paw inflammation induced by s.c. injection of AMR and DXR. CDF1 mice were injected s.c. with the indicated doses of AMR () or DXR (). Each point represents the mean \pm SD of 9 or 10 mice.

Fig. 5 Dose-response relationship for inflammation

マウス実験腫瘍を用いてAMRの*in vivo*抗腫瘍効果をDXRと比較検討した³⁾。P388白血病細胞株を腹腔内に移植後、薬剤を静脈内投与して延命効果を測定する実験ではAMRはDXRと同程度の強い延命効果を示した。Ehrlich carcinoma、Sarcoma 180、Lewis lung carcinoma、B16 melanoma、Colon adenocarcinoma 38を筋肉内あるいは皮下移植し、薬剤投与後の腫瘍の増殖抑制効果を比較した実験ではAMRはDXRより2株(Ehrlich carcinoma、Sarcoma 180)では強く、2株(Lewis lung carcinoma、Colon adenocarcinoma 38)で同程度、1株(B16 melanoma)では弱い効果を示した。

ヌードマウスに皮下移植したヒト腫瘍株に対するAMRの抗腫瘍効果について、DXRと比較検討した³⁾。AMRあるいはDXRの最大耐量(それぞれ25mg/kgあるいは12.5mg/kg)の尾静脈内への単回投与では、乳癌株(MX-1)、小細胞肺癌株(LX-1)および胃癌株(SC-6、SC-9および4-1ST)に対して、AMRはDXRよりも強い

抗腫瘍効果を示した。ヒト胃癌株4-1STに対するAMRとDXRの抗腫瘍効果をFig.6に示した。骨髄抑制効果の実験結果から、マウスでの1クールを骨髄抑制が回復する10日間と設定し、ヒト胃癌株4-1STを皮下移植したヌードマウスに最大耐量のAMRを3クール投与すると³⁾、体重減少を指標にした毒性の増悪は無く、6例中5例での腫瘍の消失を含む強い抗腫瘍効果が認められた。DXRの場合は単回投与での最大耐量を10日間で投与すると死亡するマウスが現れ、毒性が強くなった。



The growth of human tumor xenograft 4-1ST and body weight change in tumor-bearing nude mice after i.v. injection of AMR and DXR. Groups of 6 nude mice implanted with tumor were untreated (), given DXR i.v. at a dose of 12.5mg/kg with a single administration (), given AMR i.v. at a dose of 25 mg/kg with a single administration (), or 3 administrations every 10 days ().

Fig. 6 In vivo anti-tumor activity of AMR

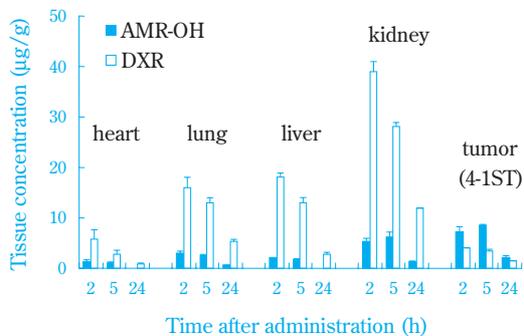
ヌードマウスを用いた同様の薬効評価方法で、投与スケジュールによる薬効の増強効果について検討した¹²⁾。5日間の連日投与の最大耐量は単回投与に比べると、総投与量で1.5倍となり、抗腫瘍効果が増強することが見いだされた。ただし、骨髄抑制効果は、投与期間が延長しているだけ抑制期間が長く、増強される結果となった。臨床においては検討の結果、肺癌に対して3日間連日投与が用法となっている。

3. 活性代謝物の重要性

前項で述べたようにAMRはDXRより強い*in vivo*抗腫瘍効果を示すことが見出されたが、その代謝面から見た機序について検討した結果、AMR-OHが重要

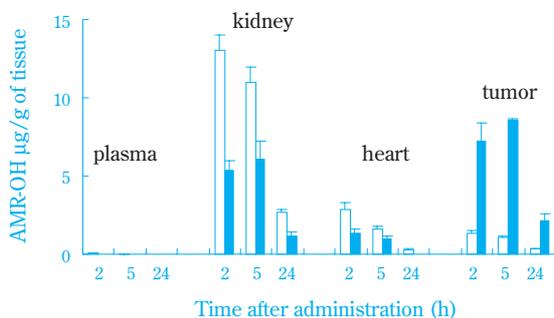
な役割を果たしていることを示唆するデータを得たので以下に紹介する。

ヒト胃癌株4-1STを皮下移植したヌードマウスでの腫瘍組織および正常組織への薬剤分布を比較すると⁴⁾、DXR投与では肺、肝および腎の正常組織に腫瘍組織よりも多くDXRが分布した(Fig.7)。一方、AMR投与では正常組織に比べて腫瘍組織の方がAMR-OH濃度が高かった。また、AMR-OHを直接静脈内投与すると、AMRを投与した場合と異なり、腫瘍よりは正常組織への分布が高くなった(Fig.8)¹³⁾。この結果はAMR-OHの投与では腫瘍選択性が低下しており、むしろDXRに近い動態であることを示していると考えられる。そこで、腫瘍を含む各組織のホモジネートを用いて、AMRからAMR-OHへの変換活性を検討し



Tissue levels are expressed as the mean concentration of AMR-OH (■) after administration of AMR (25mg/kg) and DXR (□) after administration of DXR (12.5mg/kg) from two or three mice. Bars represent SD. At 2, 5 or 24 h after injection of drugs, AMR-OH and DXR were extracted from tissues and analyzed by HPLC.

Fig. 7 Tissue levels of AMR-OH and DXR in tumor-bearing mice.



AMR and AMR-OH were i.v. administered at 25 or 12.5 mg/kg, respectively, to mice bearing 4-1ST human tumor xenografts. After 2, 5 or 24 h, the plasma, kidney, heart and tumor tissue were excised and the levels of AMR-OH were determined. The closed and open columns indicate AMR-OH level after AMR and AMR-OH administration, respectively. Each point represents the mean and standard deviation of data for 3 mice per group.

Fig. 8 Tissue levels of AMR-OH after administration of AMR-OH

たところ、肝臓、腎臓で変換活性があるものの、腫瘍でも高い変換活性を示した(Table 2)。このことを、AMRを静脈内投与したマウスでの体内動態の結果と合わせて考えると、静脈内投与したAMRがAMR-OHへ変換される臓器は肝臓などの正常組織だけでなく、腫瘍組織も大きく寄与していると考えられた。

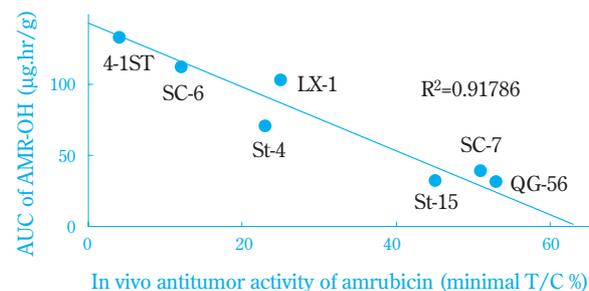
Table 2 *In vitro* Metabolizing Activity of AMR to AMR-OH by Tumor Tissues

	Origin	Enzymatic activity ^{a)}
Human tumor		
MX-1	Mammary	7.7 ± 0.1
LX-1	Lung	3.1 ± 0.0
QG-56		5.1 ± 0.8
SC-6	Stomach	49 ± 18
St-15		1.0 ± 0.6
4-1ST		13 ± 1

a) conversion rate(%) from AMR to AMR-OH /h/mg of protein.

Tissue homogenates were incubated with AMR and NADPH. The concentration of metabolized AMR-OH was determined by HPLC. The converting rate (%) from AMR to AMR-OH was calculated.

さらに、他の腫瘍株も含めて7株に対するAMRの*in vivo*抗腫瘍効果と腫瘍内AMR-OH濃度との間には、腫瘍内AMR-OH濃度が高い程、効果が強いという相関性が認められた(Fig.9)¹³⁾。



The AUC values of AMR-OH and AMR were calculated by summing trapezoids.

The *in vivo* antitumor activity is expressed as the value of minimal T/C%, from the data of ref.3. R is the correlation coefficient.

Fig. 9 Correlation between the *in vivo* activities and tumor levels of AMR-OH

これらのことから、静脈内に投与されたAMRは腫瘍内でAMR-OHに変換されて抗腫瘍効果を発揮し、その変換の程度が抗腫瘍効果の強さに関連することが示唆されるとともに、正常組織あるいは血中でAMR-OHに変換される程度は腫瘍組織に比較して低く、より選択性のある抗腫瘍効果を発揮していると

考えられた。すなわち、AMRの*in vivo*抗腫瘍効果の発現には、活性代謝物AMR-OHの寄与が大きいと考えられた。

4. 作用機序

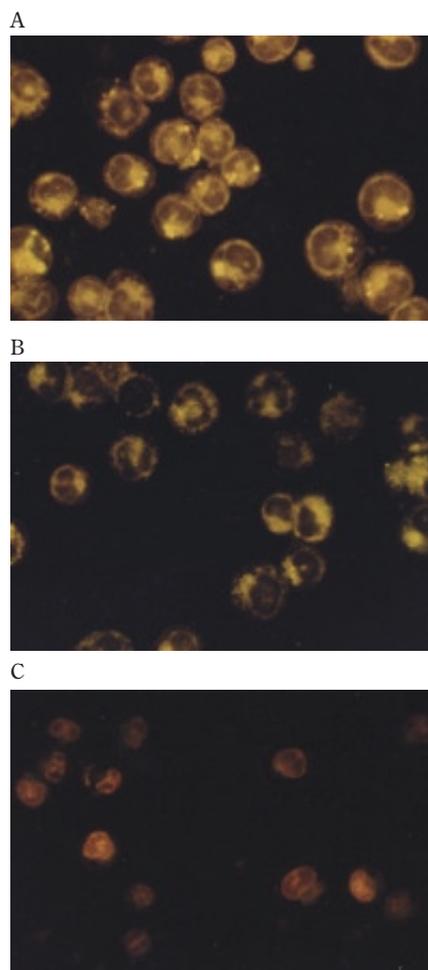
アントラサイクリン系抗癌剤の作用機序として、インターカレーション活性、トポⅡ阻害作用、ラジカル産生作用が報告されていることから以下の実験を行った。

比色滴定法により、AMR、AMR-OHおよびDXRのDNA結合能を調べた結果、DNAに対するAMRおよびAMR-OHの結合定数は、それぞれ 1.4×10^5 および $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ で同程度であったが、DXRの結合定数は $10.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ でAMRやAMR-OHよりも5倍以上高いDNA親和性を示した⁵⁾。

アントラサイクリン系薬剤は蛍光を発することから、蛍光顕微鏡を用いることにより、細胞内のAMR、AMR-OHおよびDXRの分布を直接観察することができる。マウス白血病細胞株P388を用いて、薬剤の細胞内分布を測定した¹⁴⁾。短時間の薬剤接触後に観察すると、Fig.10のようにAMRおよびAMR-OHでは核よりは細胞質の顆粒への分布が多く、他方DXRでは殆ど核へ分布していた。また、同様にP388細胞を処理して、薬剤接触後に細胞全体と分離した核に取り込まれた薬剤量をそれぞれ定量して、細胞質と細胞核への薬剤分布量を比較した(Table 3)。その結果、AMRとAMR-OHでは約20%、DXRでは約80%が核に分布しており、蛍光顕微鏡の観察結果とほぼ一致した結果となった。このことは、前述したDNAへの親和性をよく反映しており、細胞レベルでは細胞内の分布の違いとして薬剤の性質の違いが現れていると考えられた。

アントラサイクリン系薬剤のDNAへの結合の様式は、分子の母核である平面部分がDNAの隣あう平面構造の塩基の間隙に滑り込んだ形となるインターカレーションとして結合すると報告されている。AMRについて、DNAへの結合様式をNMRを用いて測定したところ、確かにDXRと同様にインターカレーションによって結合していることが見いだされている¹⁵⁾。さらにDNA巻き戻し効果を指標にDNAへのインターカレーション活性を調べた結果、AMRおよびAMR-OHはそれぞれ $40 \mu\text{M}$ および $35 \mu\text{M}$ の濃度からインターカレーション活性を示したものの、 $5 \mu\text{M}$ の濃度から活性を示したDXRに比べると約7倍弱かった⁵⁾。したがって、AMRおよびAMR-OHはインターカレーションによりDNAに結合する作用を有するが、これらの作用はDXRよりも弱いことが示された。

トポⅡは、2本鎖DNAの切断、通過および再結合によりDNAの立体構造を調節している核タンパク質



Intracellular localization of AMR (A), AMR-OH (B) and DXR (C) in P388 cells. Cells were treated with $10 \mu\text{g/ml}$ of the drugs for 10 min, and were observed by fluorescence microscopy.

Fig. 10 Intracellular localization

Table 3 Distribution of AMR, AMR-OH and DXR in P388 cells.^{a)}

drug	concentration ($\mu\text{mol}/10^6\text{cells}$) ^{b)}		nuclei/ whole cell
	whole cell	nuclei	
AMR	0.32 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.16
AMR-OH	2.31 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.16
DXR	1.65 ± 0.02	1.30 ± 0.10	0.79

a) Cells were incubated with medium containing $10 \mu\text{g/ml}$ of the drugs for 1 h, and the concentrations of whole cells and nuclei were determined.

b) The data are the mean value \pm standard deviation of triplicate drug treatments.

であり、複製、転写、組み換えあるいは娘染色体の分配等のDNA代謝に重要な因子である¹⁶⁾。哺乳動物由来のトポⅡは、アントラサイクリン、アクリジン、エリブチシンあるいはエビポドフィロトキシン(エトポシドなど)といった薬剤の標的分子であることもよ

く知られている¹⁷⁾。たとえば、螺旋構造をしたDNAの複製過程では、そのままでは複製されたDNA鎖と元のDNA鎖が螺旋状に絡み合うが、トポⅡにより2本鎖を通過させて絡み合いを解消する(Fig.11)。この2本鎖の通過時に、一時的に一方のDNA鎖を切断する必要がある。この過程の中で、切断されたDNAの末端のリン酸基とトポⅡタンパク質が共有結合した反応中間体が生じるが、これはクリーバブルコンプレックスと呼ばれ、このクリーバブルコンプレックスの安定化作用の有無によって、トポⅡ阻害剤は大きく2つに分類される。エトポシドはクリーバブルコンプレックスを安定化する作用を有するトポⅡ阻害剤(topoⅡ poison)であり、トポⅡ機能の不活化というよりもむしろクリーバブルコンプレックスの安定化が細胞傷害性に重要であると一般的に考えられている¹⁸⁾。これは、たとえばエトポシド耐性細胞ではしばしばトポⅡの発現の低下がみられること、すなわち、酵素反応の亢進(トポⅡ発現の上昇)ではなく、クリーバブルコンプレックスの生成の減少により耐性化していることから窺われる。もう一方のタイプはクリーバブルコンプレックスを安定化せずに酵素反応を阻害するトポⅡ阻害剤(topoⅡ catalytic inhibitor)であり、メルバロン、アクラルピシンあるいはスラミンなどが含まれる^{19)~21)}。

キネトプラストDNAを用いたデカテネーション反応は、2本鎖DNAの切断、通過および再結合を必要とすることから、トポⅠでは反応できず、トポⅡに

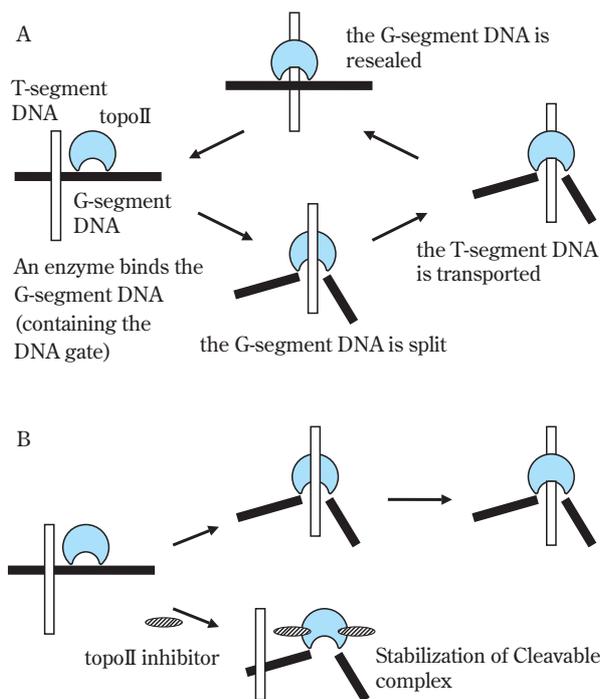


Fig. 11 A molecular model for the catalytic reaction of topoisomerase II

特異的な反応である。このデカテネーション反応をAMR、AMR-OHおよびDXRは25 μM 以上で、エトポシドは125 μM 以上で阻害した⁵⁾。また、直鎖状プラスミドDNAをヒト由来のトポⅡと反応させ、安定化しているクリーバブルコンプレックスをproteinase Kで処理することにより生じる切断されたDNA断片を指標に、トポⅡ阻害によるクリーバブルコンプレックス安定化作用を無細胞系で評価する系においては、トポⅡを介したDNA断片化作用の促進が5 μM 以上のAMRまたはAMR-OH処理で認められた。同じ条件下で、DXRはほとんどDNA断片化作用を示さなかった。以上のことから、AMRおよびAMR-OHは、クリーバブルコンプレックスを安定化する作用を有するトポⅡ阻害剤であることが示唆された。

細胞系でのトポⅡ阻害によるクリーバブルコンプレックス安定化作用は、タンパク質と共有結合したDNAを変性タンパク質として回収するK-SDS沈殿法を用いて、クリーバブルコンプレックス生成により安定化したDNA-タンパク質複合体の量として定量的に測定することができる。さらに、数千キロ塩基対単位のDNA鎖を分離するパルスフィールド電気泳動法を用いた染色体DNAの切断作用としても検出される。テニポシドやm-AMSAを初めとするトポⅡ阻害剤は、細胞レベルではDNA-タンパク質複合体を安定化することが知られている^{22, 23)}。ヒト白血病細胞株CCRF-CEMをAMRあるいはAMR-OHで処理すると、エトポシドと同様に、薬剤処理濃度の増加に伴いDNA-タンパク質複合体の形成量が増加した(Fig.12)⁵⁾。CCRF-CEM株に対するAMR、AMR-OH、DXRおよびエトポシドの細胞増殖抑制効果の IC_{50} 値は、それぞれ3.3、0.060、0.40 (Fig.2) および2.3 μM であったことから、AMR、AMR-OHおよびエトポシドは、それ

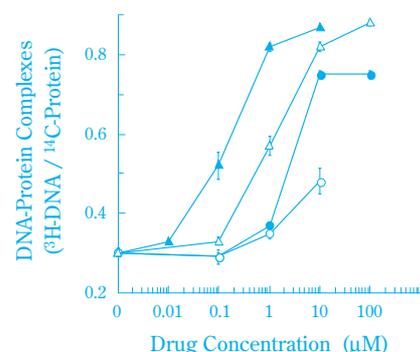
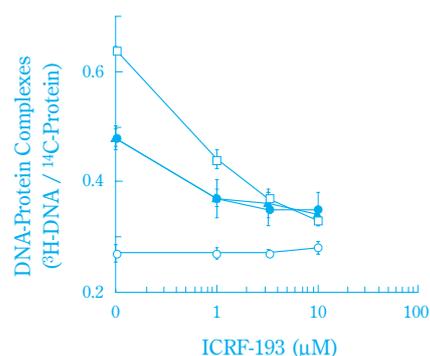


Fig. 12 DNA-protein complex formation in human tumor cells

それぞれの薬剤の細胞増殖抑制効果を発現する濃度でDNA-タンパク質複合体を安定化しているが、DXRでは安定化しないことが示された。さらに、DNA-タンパク質複合体の安定化作用が認められた処理濃度のAMRやAMR-OHによって、染色体DNAが切断されることもパルスフィールド電気泳動法で観察された⁵⁾。RoweらやLongらによって、アクリジン誘導体やエピボドフィロトキシン誘導体の細胞毒性は、DNA-タンパク質複合体の形成量あるいは染色体DNA切断量に相関することが報告されている^{22, 24)}。以上のことから、AMRおよびAMR-OHは、トポ II を介したクリーバブルコンプレックスの安定化作用により細胞毒性を発現していることが示唆された。一方で、DXRのDNA-タンパク質複合体安定化作用および染色体DNA切断作用は、AMRやAMR-OHに比較すると弱いものであった。

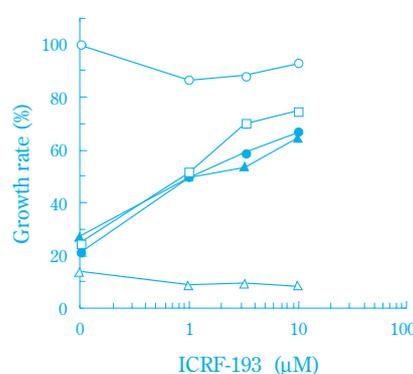
さらに詳しく、AMRの細胞毒性とクリーバブルコンプレックスの安定化作用との関連を検討するために、以下の実験を行った。エトポシド、m-AMSAあるいはDNRの細胞毒性が、アクリラルピシンによって解除されること^{25, 26)}、またエトポシドによるクリーバブルコンプレックスの安定化作用や細胞毒性がジオキソピペラジン誘導体であるICRF-193によって抑制されることが知られている²⁷⁾。アクリラルピシンもICRF-193もtopo II catalytic inhibitorであり、topo II poisonの効果がtopo II catalytic inhibitorによって拮抗されるという性質がある。このような知見から、AMR、AMR-OHおよびエトポシドによるクリーバブルコンプレックスの安定化作用に対するICRF-193の作用を検討した。ヒト白血病細胞株CCRF-CEMに対して、AMR、AMR-OHおよびエトポシドにより安定化されるクリーバブルコンプレックスが、ICRF-193の添加により、用量依存的に拮抗されることが見出された(Fig.13)⁵⁾。さらに同じ条件下でのAMRやDXRによる*in vitro*細胞増殖抑制効果へのICRF-193の影響を検討したところ、5 μ MのAMRではCCRF-CEM株の細胞増殖率が20%まで抑制されるのが、10 μ MのICRF-193を添加することにより、細胞増殖率が70%まで回復した(Fig.14)。AMR-OHやエトポシドの細胞増殖抑制効果も、同様にICRF-193によって拮抗されたが、DXRによる細胞増殖抑制効果は、ICRF-193によって拮抗されなかった。

したがって、AMRやAMR-OHは、主にトポ II を介したクリーバブルコンプレックスの安定化により腫瘍細胞の増殖を抑制することが示された。AMRやAMR-OHに比べて、DXRはクリーバブルコンプレックス安定化作用が弱いことから、DXRの細胞増殖抑制効果は、むしろDNAへのインターカレーション活性による部分が大いと考えられた。



Cells were preincubated with ICRF-193 for 30 min followed by incubation with both ICRF-193 and drugs. After 1 h, the formation of DNA-protein complexes was quantitated. 5 μ M AMR, 0.2 μ M AMR-OH, ICRF-193 alone, 5 μ M etoposide.

Fig. 13 Antagonistic effect of ICRF-193 on DNA-protein complex formation



Cells were treated as described in Fig.13. After 1 h, cells were re-incubated for 3 days in the absence of drugs, and then counted in a Coulter counter. 5 μ M AMR, 0.1 μ M AMR-OH, 1 μ M DXR, 5 μ M etoposide.

Fig. 14 Antagonistic effect of ICRF-193 on cell growth inhibition

臨床試験成績

臨床試験では、AMRは単剤で未治療の進展型小細胞肺癌に対し高い奏効率(76%)を示し、現在の標準併用療法と同程度の効果であった。また、未治療の非小細胞肺癌に対する奏効率は23%であった。主な副作用は骨髄機能抑制で、特にグレード3以上の好中球減少の発現率は77%であった。これらの結果から、小細胞肺癌と非小細胞肺癌に対する治療剤として効能を取得している。現在、小細胞肺癌及び非小細胞肺癌に対する製造販売後臨床試験をそれぞれ計画・実施中であり、さらに今後の併用などの臨床検討により、小細胞肺癌に対して、さらに効果の向上が期待され、AMRが小細胞肺癌治療剤として標準的な薬剤になることが期待される。また、非ホジキンリンパ腫に対する後期第 II 相臨床試験が終了している。

基礎試験ではアントラサイクリン系抗癌剤で問題となっている心毒性が低いことが示されており、臨床でもエビデンスが得られつつあり、その他の癌についてもこの特徴を生かして有用な薬剤になっていくことが期待される。

おわりに

DXRは広く使われるアントラサイクリン系抗癌剤であり、現在の癌治療では無くてはならない薬剤の一つである。アントラサイクリンを全合成することによりDXRより強力な薬剤を設計することを目的に、これまでの発酵法および半合成法では作れなかった構造の化合物を、効果の増強を指標にスクリーニングすることにより得られたAMRは、これまでのアントラサイクリンとは異なる性質を持つ薬剤であった。すなわち、代謝されることにより活性が増強し、また、その代謝および代謝物の分布により腫瘍選択性が向上している化合物であった。残念ながら当初より、このような代謝の性質を持つものを目指したものはなかったが、諸先輩の地道な努力、癌という病気に立ち向かえる薬剤を開発するという強い意気込み、抗癌剤を見分ける眼力などからAMRという特徴ある薬剤が選択されたと確信している。この薬剤は肺癌に対する効能を取得し、さらに非ホジキンリンパ腫に対する効能拡大も予定されている。今後、さらに効能が拡大され、多くの癌患者の役に立てるようになることを期待している。

引用文献

- 1) RB. Weiss, G. Sarosy, K. Clagett-Carr, M. Russo and B. Leyland-Jones, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **18**, 185 (1986).
- 2) K. Ishizumi, N. Ohashi and N. Tanno, *J. Org. Chem.*, **52**, 4477 (1987).
- 3) S. Morisada, Y. Yanagi, T. Noguchi, Y. Kashiwazaki and M. Fukui, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 69 (1989).
- 4) T. Noguchi, S. Ichii, S. Morisada, T. Yamaoka and Y. Yanagi, *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 1061 (1998).
- 5) M. Hanada, S. Mizuno, A. Fukushima, Y. Saito, T. Noguchi and T. Yamaoka, *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 1229 (1998).
- 6) 仲井 俊司, 赤尾 恭子, 伊藤 正樹, 金丸 博, 中塚 巖, *薬物動態*, **13**, 100 (1998).
- 7) M. Limonta, A. Biondi, G. Giudici, G. Specchia, C. Gatapano, G. Masera, T. Barbui and M. D'Incalci, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **26**, 340 (1990).
- 8) MJ. Kuffel, JM. Reid and MM. Ames, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **30**, 51 (1992).
- 9) T. Yamaoka, M. Hanada, S. Ichii, S. Morisada, T. Noguchi and Y. Yanagi, *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 1067 (1998).
- 10) S. Morisada, Y. Yanagi, Y. Kashiwazaki and M. Fukui, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 77 (1989).
- 11) N. Obara, S. Imagawa, Y. Nakano, M. Yamamoto, T. Noguchi and T. Nagasawa, *Cancer Sci.*, **94**, 1104 (2003).
- 12) 野口 俊弘, 一井 真二, 森 貞 信也, 山岡 隆, 柳 義和, *癌と化学療法*, **26**, 1305 (1999).
- 13) T. Noguchi, S. Ichii, S. Morisada, T. Yamaoka and Y. Yanagi, *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 1055 (1998).
- 14) T. Yamaoka, M. Hanada, S. Ichii, S. Morisada, T. Noguchi and Y. Yanagi, *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 685 (1999).
- 15) J. Igarashi and M. Sunagawa, *Bioorg. Medicin. Chem. Letters*, **5**, 2923 (1995).
- 16) JC, Wang, *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 665 (1985).
- 17) P. D'Arpa and LF. Liu, *Biochim. Biophys. Acta*, **989**, 163 (1989).
- 18) LF. Liu, *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 351 (1989).
- 19) FH. Drake, GA. Hofmann, SM. Mong, JO. Bartus, R. Hertzberg, RK. Johnson, MR. Mattern and CK. Mirabelli, *Cancer Res.*, **49**, 2578 (1989).
- 20) BS. Sørensen, J. Sinding, AH. Andersen, J. Alsner, PB. Jensen and O. Westergaard, *J. Mol. Biol.*, **228**, 778 (1992).
- 21) K. Bojanowski, S. Lelievre, J. Markovits, J. Couprie, A. Jacquemin-Sablon and AK. Larsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3025 (1992).
- 22) TC. Rowe, GL. Chen, YH. Hsiang and LF. Liu, *Cancer Res.*, **46**, 2021 (1986).
- 23) JS. Wolverson, MK. Danks, B. Granzen and WT. Beck, *Cancer Res.*, **52**, 4248 (1992).
- 24) BH. Long, ST. Musial and MG. Brattain, *Biochemistry*, **23**, 1183 (1984).
- 25) PB. Jensen, BS. Sørensen, EJF. Demant, M. Sehested, PS. Jensen, L. Vindeløv and HH. Hansen, *Cancer Res.*, **50**, 3311 (1990).
- 26) PB. Jensen, PS. Jensen, EJF. Demant, E. Friche, BS. Sørensen, M. Sehested, K. Wassermann, L. Vindeløv, O. Westergaard and HH. Hansen, *Cancer Res.*, **51**, 5093 (1991).
- 27) R. Ishida, T. Miki, T. Narita, R. Yui, M. Sato, KR. Utsumi, K. Tanabe and T. Andoh, *Cancer Res.*, **51**, 4909 (1991).



野口 俊弘
Toshihiro NOGUCHI
大日本住友製薬株式会社
研究本部 研究統括部
マネージャー職 農学博士



森貞 信也
Shinya MORISADA
大日本住友製薬株式会社
知的財産部
マネージャー職



花田 充治
Mitsuharu HANADA
大日本住友製薬株式会社
研究本部 薬理研究所
主任研究員



一井 真二
Shinji ICHII
大日本住友製薬株式会社
開発本部 臨床開発第2部
マネージャー職 薬学博士



山岡 隆
Takashi YAMAOKA
大日本住友製薬株式会社
研究本部 研究統括部
グループマネージャー 薬学博士