

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：PI3K 阻害剤のプロドラッグ化による新規肉腫治療薬開発に関する研究

Development of novel sarcoma therapeutics through prodrug strategies targeting PI3K

研究開発実施期間：令和 3 年 10 月 20 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：旦 慎吾

Shingo Dan

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 分子薬理部 部長

Chief, Division of Molecular Pharmacology, Cancer Chemotherapy Center, Japanese Foundation for Cancer Research

II 研究開発の概要

肉腫は非上皮組織である骨や軟部組織に発生する希少がんであり、治療薬、とりわけ分子標的薬の開発が遅れており、そのアンメットニーズの充足は急務である。本研究では、「肉腫を適応とする新たな分子標的薬を開発し、肉腫治療のアンメットニーズを充足する」ことを“ミッション”に掲げ、独自に開発した PI3K 阻害剤 ZSTK474（開発コード：OP-11、以下 OP-11 と表記）の臨床試験から得た知見をもとに進めるリバーストランスレーショナルリサーチ（rTR）を展開する。具体的には、OP-11 の活性代謝物である OR-778 を活性本体とする新規プロドラッグを、肉腫治療のアンメットニーズに応える新たな分子標的薬として開発することを目標とし、以下の研究を推進した。

① 肉腫に対する PI3K 阻害剤の効果に関する基盤的基礎研究

本項目では、PI3K を標的とした肉腫治療の概念実証（POC）をより強固なものとするための基盤的な基礎研究を展開した。

①-1 肉腫各病型の増殖・生存シグナルにおける PI3K アイソフォームの機能解析

染色体転座陽性肉腫細胞株の増殖・生存シグナルを司る PI3K アイソフォーム（ $\alpha \cdot \beta \cdot \delta$ ）を明らかにするために、アイソフォーム特異的 siRNA や阻害剤および CRISPR-Cas9 を用いた各 PI3K アイソフォームのノックアウト細胞を用いて検討を行った。その結果、ユーイング肉腫、滑膜肉腫、胞巣型横紋筋肉腫由来細胞株において、PI3K α 阻害時のみ弱い抗腫瘍効果が認められ、PI3K $\beta \cdot \delta$ 阻害のみではほとんど効果が認められなかった。一方、 α 阻害剤に $\beta \cdot \delta$ 阻害剤を併用した際に、細胞死を伴う抗腫瘍効果が大幅に増強されることが分かった。

PI3K α 単独阻害時に比べて PI3K アイソフォームをすべて阻害した際に高い抗腫瘍効果が得られるメカニズムを明らかにする目的で、滑膜肉腫細胞株における PI3K α 阻害時と PI3K アイソフォームをすべて阻害した際のリン酸化プロテオーム解析を実施した。パスウェイ解析の結果、PI3K α 単独阻害時に比べて PI3K アイソフォーム

をすべて阻害した際に PI3K/mTOR シグナルがより強く抑制されていることが示唆された。PI3K アイソフォーム阻害剤を併用して検証したところ、PI3K α に加えて PI3K β 、 δ を阻害することにより、PI3K シグナルが強く抑制されていることが確認された。また、PIK3CB/PIK3CD ノックアウト細胞では α 阻害剤単独でもアポトーシスが誘導され、PI3K シグナルが強く抑制された。以上のことから、染色体転座陽性肉腫細胞では PI3K シグナルの伝達とそれによる細胞生存に PI3K α アイソフォームが主要な機能を果たし、 β と δ はその α の機能を補完する機能を有すること、それらすべてを阻害することにより顕著なアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

肉腫以外のがんにおいて機能している PI3K アイソフォームを明らかにする目的で、アイソフォーム特異的阻害剤を肺がんや胃がん、大腸がんなどの上皮性がんと脳腫瘍を含む合計 31 細胞株に処理しハイコンテンツ画像解析により生細胞数と死細胞数の経時変化を測定した。その結果、一部の PIK3CA 遺伝子に変異がある細胞株を除いて、ほとんどのがん細胞株では PI3K 阻害による細胞死は認められなかった。細胞死が認められた PIK3CA 変異陽性がん細胞株では、PI3K α の阻害によって強い細胞死が誘導され、PI3K β や δ 阻害による効果の増強は認められなかった。一方、染色体転座陽性の肉腫では、PI3K α の阻害によって細胞死が誘導されるが PI3K β 、 δ の阻害によって効果の顕著な増強が認められた。以上のことから、細胞生存における PI3K アイソフォームの協調的な機能は染色体転座陽性肉腫に特徴的に認められ、染色体転座陽性肉腫に対しては PI3K アイソフォーム特異的な阻害剤よりも OP-11 のような複数のアイソフォームを同時に阻害できる pan-PI3K 阻害剤が有効であると考えられた。

肉腫細胞における PI3K シグナルの活性化機構について検討するために、肉腫 23 細胞株について、全エクソンシーケンス解析 (WES) および RNA シークエンス解析 (RNA-seq) を実施し、PI3K シグナル関連遺伝子について解析した。WES 解析の結果、いくつかの細胞株で PIK3CA や PIK3CD、BRAF、KRAS、NRAS 遺伝子のホットスポット変異が認められたが、染色体転座陽性肉腫で共通した遺伝子変異は認められなかった。RNA-seq 解析の結果、PIK3CA、PIK3CB、PIK3CD はすべての肉腫細胞株で発現が認められたが、PIK3CG はほとんどの細胞株で発現が認められなかった。PTEN は大半の肉腫細胞株で発現が認められた。PI3K 上流の受容体型チロシンキナーゼについては、EGFR、ERBB2、INSR、IGF1R、MET は幅広い肉腫細胞株で発現が認められた。一方、ERBB3 は胞巣型横紋筋肉腫、ERBB4、KIT はユーイング肉腫、VEGFR は胞巣状軟部肉腫、PDGFR は滑膜肉腫細胞株で高発現の傾向を認め、これらの受容体型チロシンキナーゼシグナルが PI3K の活性化に寄与しているものと考えられた。

①-2 新規 PI3K 阻害剤の効果予測バイオマーカーの同定と抗がんメカニズム解析

様々な染色体転座陽性の肉腫組織型に対する OP-11・OR-778 の有効性、細胞死誘導能を細胞株、PDC を用いて検討した。その結果、滑膜肉腫 (8/8)、ユーイング肉腫 (3/3)、胞巣型横紋筋肉腫 (1/1)、明細胞肉腫 (1/1) および粘液型脂肪肉腫 (3/3) においてアポトーシス誘導が認められた。また、染色体転座は認められないものの上記の肉腫と同様に BAF (Brg1/Brm-associated factor) クロマチン制御複合体に異常のある (BAF47 欠損) 類上皮肉腫 (1/2) やラブドイド腫瘍 (2/3) についても検討したところ、一部の細胞株や PDC でアポトーシス誘導が認められた。一方、胞巣状軟部肉腫 (0/3)、CIC 遺伝子再構成肉腫 (0/1) および隆起性皮膚線維肉腫 (0/2) ではアポトーシスは認められなかった。また、染色体転座 (TMPRSS2::ERG) を有する前立腺がんにおいても同様な検討を行ったところ、染色体転座をもたない前立腺がん細胞株ではアポトーシス誘導は認められなかった一方、染色体転座陽性の前立腺がんでは顕著なアポトーシス誘導を起こすことがわかった。以上のことから、OP-11・OR-778 は、滑膜肉腫、ユーイング肉腫、胞巣型横紋筋肉腫、粘液型脂肪肉腫、明細胞肉腫、類上皮肉腫、ラブドイド腫瘍および TMPRSS2::ERG 陽性前立腺がんにも有効と考えられた。

shRNA ライブラリーを用いた感受性規定遺伝子のスクリーニングから、滑膜肉腫 SYO-1 細胞株において BAF クロマチン制御複合体を構成する SMARCC1/2 を標的とする shRNA が PI3K 阻害剤によるアポトーシス誘導を抑制するものとして得られた。このことから、BAF 複合体がアポトーシス誘導に寄与している可能性を見出した。さらに、上記の PI3K 阻害剤によるアポトーシス誘導が認められた肉腫や前立腺がんでは、それぞれが持つ融合遺伝

子が BAF 複合体と相互作用することが報告されており、滑膜肉腫、ユーイング肉腫、粘液型脂肪肉腫および TMPRSS2::ERG 陽性前立腺がんではそれにより BAF 複合体の活性が変化し発がんに至ることが報告されている。このことから、PI3K 阻害剤が細胞選択的にアポトーシスを誘導するメカニズムとして、OP-11 による BAF 複合体のクロマチンリモデリング活性への作用があるものと考えられた。そこで、OP-11 による BAF 複合体への作用を調べるため、OP-11 処理/非処理の滑膜肉腫細胞株で BAF 複合体を免疫沈降により回収し、質量分析計を用いて BAF 複合体の構成因子の網羅的な解析を行った。その結果、OP-11 処理により BAF 複合体と相互作用が減少しているタンパク質を複数同定した。その中の一部のタンパク質は、共免疫沈降/ウェスタンブロットや近接ライゲーションアッセイにより、PI3K 阻害剤処理後に BAF 複合体との相互作用が減少することを確認した。以上のことから、染色体転座陽性肉腫における PI3K 阻害剤のアポトーシス誘導に BAF 複合体が寄与しており、PI3K 阻害により BAF 複合体と相互作用するタンパク質が変化することで BAF 複合体の活性が変化し、アポトーシスに至っているものと考えられた。

①-3 OP-11 の細胞運動や転移への作用の解明

肉腫の細胞運動能における OP-11 の効果を *in vitro* で検討するため、ハイコンテンツ画像解析を行った。その結果、OP-11 は滑膜肉腫細胞株の細胞運動能を抑制することが示唆された。また、Luc2 遺伝子を導入したマウスのユーイング肉腫モデル細胞（後述）をマウス尾静脈より移入した *in vivo* 転移モデルを用い、がんの生着・増殖に対する OP-11・OR-778 の効果を検討した。その結果、OP-11 または OR-778 プロドラッグ投与群では、コントロール群と比較して抗腫瘍効果が認められた。このことから、OP-11、OR-778 プロドラッグは血行性転移の成立・進展過程に対して一定の抑制効果を発揮する可能性が期待された。

①-4 染色体転座陽性肉腫の腫瘍内における血管新生に対する OP-11 の作用の検討

染色体転座陽性肉腫の血管新生に対する OP-11 の抑制作用を検討するため、滑膜肉腫細胞株、胞巣型横紋筋肉腫細胞株の皮下移植モデルおよびマウスユーイング肉腫発がんモデル（後述）を用いて、OP-11 を投与した腫瘍内の血管内皮マーカー CD31 の免疫組織化学染色を行った。その結果、OP-11 投与により CD31 陽性細胞の減少が認められ、OP-11 に染色体転座陽性肉腫腫瘍内の血管新生阻害作用があることが示唆された。

①-5 動物モデルを用いた抗がんメカニズムの概念実証（POC）

研究開発分担者の中村らがマウス胎児の間葉系細胞に融合遺伝子を導入して樹立したユーイング肉腫、胞巣状軟部肉腫マウス発がんモデル細胞を用いて、OP-11 の *in vitro* における効果を検討した。その結果、ヒト細胞株の結果と同様に、マウスユーイング肉腫および滑膜肉腫モデル細胞ではアポトーシスが誘導され、胞巣状軟部肉腫モデル細胞ではアポトーシスは認められなかった。また、マウスユーイング肉腫モデル細胞を BALB/c マウスに移植し、OP-11 の *in vivo* 治療実験を行った結果、有意な抗腫瘍効果が認められた。免疫染色を用いた解析により、OP-11 は *in vivo* の腫瘍において cleaved PARP と Caspase 3 の発現を増強させ、腫瘍内の CD31 陽性血管内皮細胞を減少させることが判明した。

研究開発分担者の近藤らは、国立がん研究センター中央病院の肉腫検体を基盤として、患者由来ゼノグラフト（PDX）および患者由来細胞株（PDC）の整備を進めてきた。PDX については、これまでに 15 組織型での樹立に成功している。また、PDC に関しては本研究開始以降、新たに 40 株を樹立した。現在までに合計 91 株の PDC を保有しており、これらを肉腫に対する前臨床評価および治療法開発の基盤として活用した。粘液型脂肪肉腫（MLPS）の PDX を用いて、OP-11 の *in vivo* における薬効試験を実施した結果、有意な抗腫瘍効果が認められた。

①-6 腫瘍免疫に与える影響の解析

研究開発分担者の小山らは、前述したマウスユーイング肉腫細胞およびマウス滑膜肉腫細胞のシンジェニックモデルを用いて、OP-11 と抗 PD-1 抗体の併用試験を実施した。腫瘍増殖の推移とサクリファイス時の腫瘍重量を測定したところ、ユーイング肉腫と滑膜肉腫どちらの細胞株においても抗 PD-1 抗体と OP-11 の併用時に最も高

い治療効果が認められた。そこで、滑膜肉腫を用いた腫瘍組織の免疫解析を実施した。制御性 T 細胞の細胞数および活性化の低下に加えて、CD8 陽性 T 細胞の増加、樹状細胞の成熟促進が確認された。以上の結果から、2 つの肉腫モデルを用いて、OP-11 の抗 PD-1 抗体との併用効果を確認するとともに、作用機序として Treg の抑制作用を示すことが分かった。

② 活性代謝物 (OR-778) の血中動態をコントロール可能な新規プロドラッグの開発

OR-778 は OP-11 の治験で認められた活性代謝物だがそれ自体は極めて経口吸収性に乏しいことから、経口吸収性が高く、かつ、血中で OR-778 を遊離するプロドラッグ化合物を創出することを目標として 228 化合物をデザイン・合成した。合成したプロドラッグ化合物をヌードマウスに経口投与して血中動態試験を実施した結果、合成展開により得られた複数のプロドラッグ化合物では、活性本体である OR-778 としてヌードマウス移植腫瘍に対して効果を示す可能性がある血中濃度 (数百 ng/mL) を示した。これらの化合物はヌードマウス移植腫瘍に対して抗腫瘍効果を示し、さらに、PK/PD 試験を実施したところ、OR-778 の濃度が数百 ng/mL で数時間保持されると抗腫瘍効果が期待できるものと考えられた。本化合物についてサルの経口投与試験を実施した結果、マウスと同様にヌードマウス移植腫瘍に対して効果を示す可能性がある血中濃度 (数百 ng/mL) を維持することが確認された。ヒト・サル・ラット・マウスの初代培養肝細胞を用いた活性本体 OR-778 の代謝プロファイルの検討を実施したところ、ヒトでのクリアランスは中程度のクリアランスであることが示唆された。また、主要な 10 代謝物の構造推定では動物種における代謝物プロファイルに明らかな差は見られなかった。

本研究を通じて、OR-778 を活性本体とするプロドラッグとして経口投与可能で活性本体を持続的に放出する開発候補化合物の創出を達成した。

Sarcomas are rare cancers of bone and soft tissue with a critical unmet need for molecular-targeted therapies. With the mission of developing novel targeted treatments for sarcoma, we conducted reverse translational research (rTR) based on clinical trial insights from our PI3K inhibitor OP-11, with the aim of developing a novel prodrug of OR-778, the active metabolite of OP-11, as a breakthrough PI3K inhibitor.

① Preclinical study establishing proof-of-concept for PI3K-targeted sarcoma therapy

① -1 Roles of PI3K isoforms in sarcoma cell survival and proliferation

Using isoform-specific siRNA, inhibitors, and CRISPR-Cas9 knockout cells, we investigated PI3K isoform roles in translocation-related sarcoma (TRS) cells. PI3K α inhibition alone moderately induced apoptosis, while PI3K β or PI3K δ inhibition alone had no effect; however, combined inhibition of all three isoforms significantly enhanced apoptosis. This cooperative isoform function was not observed in carcinoma cell lines, where only PIK3CA-mutated lines responded to PI3K inhibition, driven solely by PI3K α . Mechanistically, PI3K β and PI3K δ compensate for PI3K α -mediated Akt/mTOR signaling when PI3K α is inhibited, suggesting that cooperative activities among PI3K isoform in cell survival are characteristic features of TRSs.

①-2 Predictive biomarkers and anticancer mechanisms of PI3K inhibitors in TRSs

OP-11/OR-778 induced apoptosis across multiple TRSs: synovial sarcoma (8/8), Ewing sarcoma (3/3), alveolar rhabdomyosarcoma (1/1), clear cell sarcoma (1/1), and myxoid liposarcoma (3/3), with additional responses in some BAF-deficient epithelioid sarcoma (1/2) and rhabdoid tumor (2/3). TMRSS2::ERG fusion-positive prostate cancers also showed marked apoptosis, suggesting broad efficacy against translocation-positive cancers.

An shRNA library screen in synovial sarcoma cells identified SMARCC1/2, core BAF complex components, as suppressors of PI3K inhibitor-induced apoptosis. Mass spectrometry of immunoprecipitated BAF complexes from OP-11-treated and untreated cells revealed multiple proteins with reduced BAF complex interaction upon treatment, validated by co-immunoprecipitation and proximity ligation assay. These findings suggest that PI3K inhibition remodels the BAF complex interactome, altering chromatin remodeling activity and triggering apoptosis in TRS cells.

①-3 The effects of PI3K inhibitors on cell migration, metastasis, and angiogenesis

In a tail vein injection metastasis model using Luc2-expressing murine Ewing sarcoma cells, both OP-11 and the OR-778 prodrug demonstrated antitumor activity compared to controls, suggesting their potential to inhibit the establishment and progression of hematogenous metastasis.

①-4 Antiangiogenic effects of PI3K inhibitors

Immunohistochemical staining for CD31 in subcutaneous xenograft models of synovial sarcoma, alveolar rhabdomyosarcoma, and a murine Ewing sarcoma model revealed a reduction in CD31-positive cells following OP-11 treatment, suggesting antiangiogenic activity in TRSs.

①-5 Antitumor efficacy of PI3K inhibitors in mouse cancer models and PDX models

In vivo murine Ewing sarcoma experiments demonstrated significant antitumor efficacy of OP-11. Immunohistochemical analysis showed enhanced cleavage of PARP and Caspase-3, along with reduced CD31-positive vascular endothelial cells within tumors.

Furthermore, *in vivo* patient-derived xenograft (PDX) model of myxoid liposarcoma (MLPS) also demonstrated significant antitumor activity of OP-11.

①-6 Effects of PI3K Inhibitors on tumor immunity

In syngeneic Ewing sarcoma and synovial sarcoma models, combination treatment with OP-11 and anti-PD-1 antibody produced greater therapeutic efficacy than either agent alone. Immune profiling of synovial sarcoma tumors revealed reduced Treg numbers and suppressive activity, increased CD8⁺ T cells, and promoted dendritic cell maturation, identifying Treg suppression as a key mechanism underlying the enhanced antitumor activity of this combination.

② Development of a novel prodrug with controllable pharmacokinetics of the active metabolite (OR-778)

OR-778 is an active metabolite identified during clinical trials of OP-11; however, its oral bioavailability is extremely low. To develop an orally available prodrug of OR-778, we designed and synthesized 228 compounds and evaluated their pharmacokinetic (PK) profiles after oral administration in nude mice. Several compounds achieved the concentrations of OR-778 in the range of several hundred ng/mL, levels considered potentially effective against xenograft tumors in nude mice. Furthermore, oral administration studies in monkeys confirmed that this lead compound achieved plasma concentrations of OR-778 considered potentially effective based on nude mouse xenograft studies.

Through this research, we successfully developed a novel orally available prodrug of OR-778 that gradually releases the active moiety and identified it as a promising development candidate.