Osaka University Knowledge Archive

Title	Novel benzimidazole derivatives selectively inhibit endothelial cell growth and suppress angiogenesis in vitro and in vivo
Author(s)	堀, 晃
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46045
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏　　名　堀（ほり）　晃（あきら）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学　位　記　番　号　第　19056　号

学位授与年月日　平成16年10月21日

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学　位　論　文　名　Novel benzimidazole derivatives selectively inhibit endothelial cell growth and suppress angiogenesis in vitro and in vivo
（in vitroおよびin vivoで血管内皮細胞増殖を特異的に阻害し、血管新生を抑制する新規ベンジミダゾール系化合物）

論　文　審　査　委　員　（主査）
教　授　谷口　直之

（副査）
教　授　門田　守人　　教　授　中村　敏一

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

固形腫瘍が一定以上の大きさに増殖するためには、周囲より新生血管を誘導し、栄養源や酸素を獲得する必要がある。我々は塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）に対する中和モノクローナル抗体や発酵生産物、fumagillin の類縁体であるTNP-470（AGM-1470）の血管新生阻害作用および抗腫瘍活性を見出し、固形腫瘍の増殖が血管新生に依存することを示してきた。TNP-470は臨床試験では著明な効果を示さず、原因として血管内皮細胞以外の細胞に対する増殖阻害効果および経口投与での血中動態が不良であることが考えられたため、これらの問題点を克服する別構造の低分子血管内皮細胞特異的増殖阻害物質を探索した。

【方法ならびに成績】

1) スクリーニング：臍帯静脈由来血管内皮細胞（HUVEC）を播種、翌日VEGFおよび検体を添加し、5日後の細胞数を測定した。増殖阻害活性を示した化合物をさらに正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する増殖阻害試験を行い、特異性のある化合物を探索した結果、benzimidazole系化合物、compound. 1（4-amino-N-[2-[4-[(4-aminobenzoyl) amino]phenyl]-1H-benzimidazol-5-yl]benzamide）が血管内皮細胞の増殖を強く阻害する（IC50＝54 nM）一方、線維芽細胞に対しては270μMまで増殖を阻害しないことを発見した。

2) 各種ヒト細胞に対するcomp. 1の増殖阻害効果の検討：血管内皮細胞他2種（毛細血管および動脈由来）、線維芽細胞他1種（肺由来）、癌細胞5種（SW620大腸癌細胞、DLD1大腸癌細胞、DU145前立腺癌細胞、HL60白血病細胞およびU937リンパ腫）に対する増殖阻害活性を比較検討した。血管内皮細胞に対する増殖阻害活性はIC50＝29、43 nMであった。線維芽細胞および癌細胞に対する増殖阻害活性は若干DU145に対して影響した（IC50＞90μM）場合を除き認められなかった。また、bFGFにより誘導されたHUVECの増殖に対してもcomp. 1は同様に阻害した（IC50＝79 nM）。

3) Comp. 1の*ex vivo*血管新生阻害作用の検討：ラット由来大動脈片を薬物を含むフィブリンゲル中で培養し、8日後大動脈片より形成される新生血管およびプレート下層に増殖する線維芽細胞を観察した。Comp. 1は500 nMで新生血管形成を完全に抑制した。一方、下層に増殖する線維芽細胞増殖に対して15μMまで影響しなかった。

4) Comp. 1の構造変換：Comp. 1は経口投与で血中に入らないため、血管内皮細胞増殖に特異性があり、かつ血中動態が良好な化合物を探索した結果、comp. 8が血管内皮細胞増殖に対してIC50＝0.3 nMの増殖阻害活性、線維芽細胞に対してIC50＝520 nM増殖阻害活性を示すことを見出した。また、血中動態もcomp. 1と比較して改善された。

5) Comp. 1およびcomp. 8の血管新生阻害活性：マウスに1.5μg bFGFを含むヘパリンをはさんだスポンジ片を皮下に埋め込み、化合物を1日2回連続5日間経口投与、摘出したスポンジのヘモグロビン測定により血管新生阻害活性を測定した。結果、comp. 1を46 mg/kgを投与した場合は血管新生阻害活性を認めなかったが、comp. 8を15 mg/kgおよび30 mg/kgを投与した場合には濃度依存的に血管新生阻害活性を示した（15 mg/kgで約70%の阻害）。

6) 作用機序：Comp. 1およびcomp. 8を40時間処理後、血管内皮細胞のVEGFおよびFGF受容体の減少が認められ、この作用が血管内皮細胞特異的阻害と結びついているものと推定された。

【総括】

TNP-470より選択的な血管内皮細胞増殖阻害活性を示し、*ex vivo*で強い血管新生阻害活性を示すcomp. 1を見出した。Comp. 1自体は血中動態が悪かったが、構造変換することにより血中動態が改善されたcomp. 8を見出した。Comp. 8は*in vivo*モデルにおいて経口投与で強い血管新生阻害活性を示しTNP-470の問題点が改善された。今後、抗腫瘍活性を検討することにより臨床応用への可能性を検討する予定である。

論文審査の結果の要旨

腫瘍血管新生を抑制することは、新しい癌の治療法として注目されており、抗VEGFモノクローナル中和抗体など様々な血管新生阻害物質が開発されている。本研究は、臨床試験が行なわれていた血管新生阻害薬、TNP－470〈AGM－1470〉の課題であった血管内皮細胞特異性および経口吸収性を克服できるような新規骨格の血管新生阻害物質を探索するために開始したものである。その結果、血管内皮細胞に非常に特異的に増殖を強く阻害し、in vitro modelでの血管新生阻害作用を示すペンジミダゾール系化合物、compound. 1を見出した。さらにその経口吸収性を改善するために最適化合成を行い、経口投与でin vivo血管新生阻害作用を示すcompound. 8に至り、TNP－470の課題をかなり克服することができた。さらに血管内皮細胞特異的な増殖阻害作用の機序として、VEGFおよびFGF受容体の蛋白量低下作用があることを示唆した。

本研究は、経口投与可能な新規血管新生阻害物質を見出し、さらにその機序についても考察したものであり、学位に値するものと考える。