

## 目次

緒論 .....	1
本論	
第1章 TAK-700によるアンドロゲン合成の阻害 .....	5
実験方法 .....	6
実験結果	
1 TAK-700による17,20-lyase, 17-hydroxylase及び11-hydroxylase活性 の阻害 .....	10
2 培養細胞及び浮遊細胞のステロイド産生に対する TAK-700による阻害 .....	12
2.1 ラット精巣及び副腎浮遊細胞のステロイド産生に対する TAK-700による阻害 .....	12
2.2 カニクイザル副腎浮遊細胞のステロイド産生に対する TAK-700による阻害 .....	15
2.3 NCI-H295R細胞のステロイド産生に対する TAK-700による可逆的阻害 .....	18
3 雄ラットの血清ステロイド濃度に対する作用 .....	27
3.1 未処置正常雄性ラットの血清testosterone濃度に対するTAK-700の効果 .....	27
3.2 下垂体摘出雄性ラットにおけるアンドロゲン及びコルチコイド産生に対する TAK-700の作用 .....	28
4 雄性ラットのアンドロゲン依存性臓器重量に対するTAK-700の影響 .....	31
5 雄性カニクイザルの血清ステロイドホルモン濃度に対する TAK-700の作用 .....	32
5.1 正常雄性カニクイザルの血清ステロイドホルモン濃度に対する 単回投与TAK-700の効果 .....	32
5.2 正常雄性カニクイザルの血清ステロイドホルモン濃度に対する TAK-700の1週間反復経口投与の影響 .....	34
5.3 去勢雄性カニクイザルの血清ステロイドホルモン濃度に対する TAK-700の1週間反復経口投与の影響 .....	36
考察 .....	38
第2章 TAK-700によるエストロゲン合成の阻害 .....	41
実験方法 .....	41
実験結果	
1. JEG-3細胞を用いたaromataseに対するTAK-700の阻害効果の評価 .....	43
2. 雌性ラットの血清ステロイドホルモン濃度に対する TAK-700の作用 .....	46

3. 雌性カニクイザルの血清エストラジオール濃度の TAK-700 による低下作用 .....	50
考察 .....	54
総括 .....	57
謝辞 .....	59
引用文献 .....	60

## 緒 論

前立腺癌とホルモン受容体陽性乳癌はその増殖と生存を性ステロイドホルモンに依存するという特徴を有している。前立腺癌は欧米において最も発症例数の多い固形癌であり、米国の癌死要因の第2位に位置している (Siegel 2016)。去勢によるアンドロゲンの除去に治療効果が認められたことから、前立腺癌のホルモン依存性は50年以上前に確立されている (Huggins 1941)。それ以来、ホルモン療法は前立腺全摘後の再発前立腺癌、手術が選択肢とならない局所進行癌や転移癌に対する薬物療法の中心として用いられてきた。循環血中のアンドロゲンの多くは精巣由来なので、ほとんどの前立腺癌は治療初期においては去勢療法によく反応する。去勢の方法としては、外科手術による精巣摘出とゴナドトロピン放出ホルモン (gonadotropin releasing hormone; GnRH) アナログ投与がある。しかしながら、治療開始後12から33ヶ月以内に前立腺特異抗原 (prostate specific antigen; PSA) の再上昇で感知される去勢療法に対する抵抗性が出現する (Hellerstedt 2002)。このステージの前立腺癌は去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer; CRPC) と呼ばれる。臨床症状を伴う CRPC の予後は不良であり (Auclerc 2000, Small 2004)、従来、このような患者に対して全生存率を延長する唯一の化学療法薬としてドセタキセルが用いられてきた (Tannock 2004)。しかしながらその効果は限定的であり、貧血、好中球数低下、下痢、感覚神経障害などの重度かつ高頻度の有害事象を伴う (Tannock 2004)。そのため CRPCに対する新たな治療選択肢が望まれている。

現在まで前立腺癌における去勢抵抗性のメカニズムについて多くの議論がなされてきたが、最近の研究でアンドロゲン受容体 (androgen receptor; AR) のシグナルの重要性が示された (Scher 2005)。以下に示すいくつかのメカニズムが密接に関連しあって去勢抵抗性を獲得することが想定されている。(A) 副腎アンドロゲンから変換された testosteroneあるいは腫瘍内で de novo合成されたアンドロゲンによりARが活性化する (Stanbrough 2006, Montgomery 2008)。(B) AR蛋白質の高発現あるいはコファクターの発現レベルの変化によりARの感受性が亢進する (Chen 2004, Hara 2003a)。(C) ARの変異により種々のリガンドでARが活性化されるようになる (Hara 2003b, Schuurmans 1990, Yoshida 2005, Elo 1995, Tan 1997)。(D) リガンド結合領域を欠損することでARがリガンド非存在下で転写活性を持つようになる (Bergerat 2009, Dehm 2008, Guo 2009, Hu 2009)。これらのメカニズムのうち、(A) の副腎アンドロゲンから変換されたテストステロンあるいは腫瘍内で de novo合成されたアンドロゲンによるARの活性化が低分子化合物により最もターゲットしやすい。GnRHアナログは GnRHシグナルの脱感作による黄体ホルモン (Luteinizing hormone; LH) の分泌抑制により精巣からのアンドロゲン産生を抑制する。副腎アンドロゲン産生はLHの支配下にないため (Wierman 1986)、去勢後も副腎アンドロゲンは維持され、腫瘍内でより高活性のアンドロゲンに変換される。副腎アンドロゲンを含むアンドロゲンはコレステロールから何段階かの酵素反応を受けて精巣および副腎で合成される (Fig.1)。

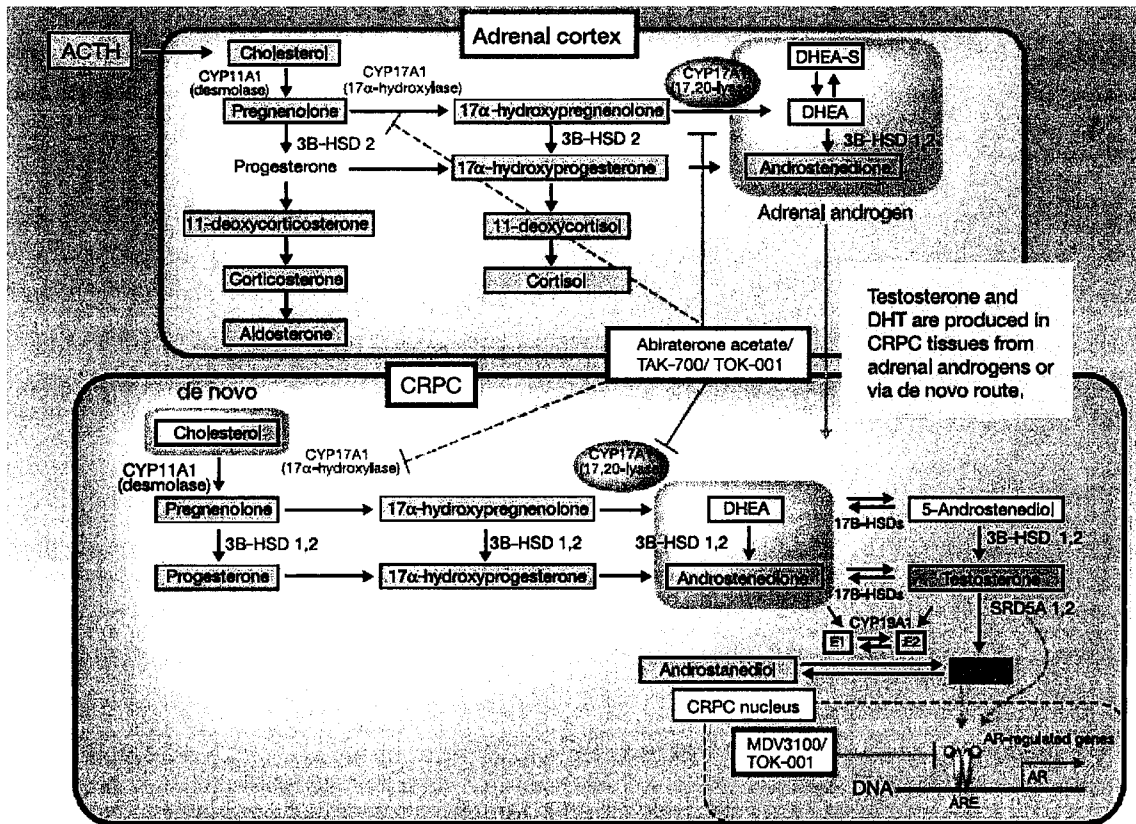


Fig. 1

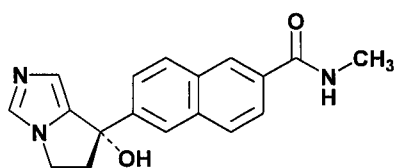
アンドロゲン合成に必須の酵素は CYP17A1が持つ17,20-lyase活性である (Vasaitis 2011, Payne 2004)。この酵素反応を阻害すれば、すべてのアンドロゲンおよびその下流に存在するステロイド(エストロゲンなど)の合成を阻害することができる。したがって、この酵素活性の特異的な阻害薬は新しい前立腺癌治療薬となることが期待される。

乳癌は女性で最も罹患率の高い悪性腫瘍であり (Siegel 2016)、50-80%の乳癌がエストロゲン受容体を発現しており、閉経後の患者において乳癌細胞の増殖と生存を副腎アンドロゲンから変換されたエストロゲンに依存している (Nielsen 2004, Sainsbury 2004, Clark 1984)。最近まで抗エストロゲン薬であるタモキシフェンによるエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) の阻害を含む内分泌療法が閉経後ホルモン受容体陽性乳癌に対する効果的な治療であった (Baum 1990, Early Breast Cancer Trialists' Group 1998)。現在では estradiol合成を阻害する anastrozoleを含む aromatase阻害薬が閉経後ホルモン受容体陽性進行性乳癌に対するファーストライン療法として推奨されている (Burstin 2010)。エストロゲンはアンドロゲンから合成されるため、アンドロゲン合成を阻害する薬剤も同様に乳癌治療薬となる可能性がある。さらに血中の dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) 濃度を測定することにより、aromatase阻害薬投与で実現される低エストロゲン状態での病状の進展を予測でき、また、病状進展後の aminoglutethimide療法や副腎摘出による血中 DHEA-S濃度の低下により病状を安定化できるという臨床報告がなされている (Morris 2001)。さらに副腎アンドロゲンとその代謝物が *in vitro*で直接 ERを活性化するという報告がある (Maggiolini 1999)。したがって副腎性アンドロゲン産生を抑制する 17, 20-lyase阻害薬は、aromatase阻害薬に抵抗性となった乳癌の治療薬とな

る可能性があると考えられる。

17, 20-lyase活性は、副腎皮質に存在する薬物代謝酵素であるCYP17A1が担っており、この酵素は17, 20-lyase活性とともにグルココルチコイド産生に必須である17-hydroxylase活性も有していることが知られている (Auchus 2001)。また、17, 20-lyase 活性発現には電子供給ではないメカニズム (Auchus 1998, Kok 2010) で、cytochrome b5の共存が必要であり (Akhtar 2005)、17,20-lyase活性のみを先天的に欠損した症例が報告されている (Geller 1997)。このcytochrome b5は副腎アンドロゲンが産生される霊長類の副腎皮質網状層にのみ高発現しており (Mapes 1999)、cytochrome b5変異を先天的に有するとメトヘモグロビン血症と仮性半陰陽となることが報告されている (Giordano 1994)。これらの報告から 17, 20-lyase活性発現に必須なCYP17A1の立体構造が存在することが推定され、17,20-lyase阻害と17-hydroxylase阻害の間に選択性を持たすことができる可能性が考えられた。

CYP17A1はCYPファミリーに属し、このファミリーには多くの薬物代謝酵素やステロイド合成酵素が含まれており、これらを阻害による副作用や薬物相互作用の発現が懸念される。そこで17,20-lyase活性と阻害活性とともに十分な特異性を持つ化合物を探索し、TAK-700 (orteronel)を見出した (Fig.2, Kaku 2011)。



**Fig. 2. Chemical structure of TAK-700 (orteronel)**

本論文では、新規 17,20-lyase阻害剤 TAK-700のステロイド合成に対する作用を酵素レベル、細胞レベル、個体レベルで検討し、去勢抵抗性前立腺癌及び乳癌の治療薬としての有用性を明らかにすることを目的とした。

Abbreviations:

ACTH, adrenocorticotrophic hormone

ATCC, American Type Culture Collection

CI, confidence interval

CRPC, castration-resistant prostate cancer

DHEA, dehydroepiandrosterone

DHEA-S, dehydroepiandrosterone sulfate

D-MEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium

D-MEM/F-12, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

hCG, human chorionic gonadotropin

hSG, human serum gonadotropin

MEM, Minimum Essential Medium

PC, prostate cancer

RIA, radioimmunoassay

SCC, side chain cleavage

TLC, thin-layer chromatography

## 本 論

### 第1章 TAK-700によるアンドロゲン合成の阻害

緒論で述べたように CYP17A1は17, 20-lyase活性と17-hydroxylase活性を有し、アンドロゲン合成に必須の酵素である (Auchus 2001)。両活性はそれぞれ17-hydroxypregnenoloneを DHEAに、pregnenoloneを17-hydroxypregnenoloneに変換する (Fig. 1)。アンドロゲン合成に参与する酵素のうち、CYP17A1は CRPC転移巣において非常に高発現していることが報告されている (Montgomery 2008)。さらに DHEAは、アンドロゲン感受性の細胞株MDA PCa 2bから我々が新たに樹立した CRPCモデル細胞ではアゴニスト作用を示すとともに増殖を促進し (Hara 2003a)、細胞株 CWR22 及び LNCaP が有する変異 AR (それぞれH874Y, T877A; Tan 1997) の転写活性を促進する。したがって、すべてのアンドロゲンの合成を抑制する 17, 20-lyaseの阻害は、リガンドで活性化される ARをブロックするのに最適な戦略であると考えられる。多くのステロイド合成酵素と薬物代謝酵素はCYP17A1と同じく活性中心にヘム鉄を有する CYPファミリーに属している。したがって副作用と薬物相互作用を避けるためには 17, 20-lyase阻害薬は高い選択性を持つ必要がある。17, 20-lyase阻害活性を持つ ketoconazole (Loose 1983) は、かつて臨床で CRPC治療に用いられたことがある。しかしながら ketoconazoleの17, 20-lyaseに対する選択性が低いことに起因する毒性のため、多くの症例において、治療継続ができなかった (Small 2004)。したがって選択性の高い17, 20-lyase阻害薬を見出すことが出来れば臨床において治療効果が期待できる。

17, 20-lyaseの好適な基質は動物種によって異なることが知られている。ヒトでは  $\Delta^5$  ステロイドである 17-hydroxypregnenoloneが  $\Delta^4$  ステロイドである 17-hydroxyprogesteroneより50倍好適な基質となるが、ラットの場合は 17-hydroxyprogesteroneが好適な基質となる (Auchus 2001, Miller 1997)。そこで、本実験では、ラット、サル、ヒトにおけるアンドロゲン合成に対する新規17, 20-lyase阻害薬 TAK-700の阻害作用について、酵素レベル、細胞レベル、個体レベルで ketoconazole 及び転移の有るCRPC治療に用いられている abiraterone と比較検討した。

## 実験方法

### 1) 化合物

TAK-700, 6-[(7S)-7-hydroxy-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[1.2-c]imidazol-7-yl]-N-methyl-2-naphthamideはKakuらの方法 (Kaku 2011) により武田薬品工業株式会社で合成された。ピカルタミドはカソデックス錠として販売されているものを購入し、テトラヒドロフランを用いて抽出し、NMR、元素分析、融点で確認した。Abiraterone はPotterらの方法 (Potter 1995) により武田薬品株式会社で合成され、化学構造を元素分析と融点で確認した。その他の化合物は試薬レベルのものを購入した。<sup>3</sup>H標識した 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone、17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone及び progesteroneはAmersham社から、pregnenolone及び11-deoxycortisolはNEN社から購入した。

### 2) 細胞

NCI-H295R細胞は ATCCから購入し、2.5% Nu-Serum I及び1% ITS-plusを添加したDMEM/ F-12培地で培養を行った。

### 3) 動物

雄性 CD(SD)IGSラットはチャールズリバー社から購入した。25℃に温度管理され、14時間の明期と10時間の暗期の明暗サイクル (5時点灯) に設定された飼育室で飼育した。餌と水を自由摂取させた。

去勢していない雄性カニクイザルは5-7歳の個体を複数のソースから購入した。26 $\pm$ 2℃に温度管理され、12時間の明期と12時間の暗期の明暗サイクル (6時点灯) に設定された飼育室で飼育した。去勢した雄性カニクイザルは6-12歳の個体をケアリ社から購入した。23 $\pm$ 2℃に温度管理され、12時間の明期と12時間の暗期の明暗サイクル (7時点灯) に設定された飼育室で飼育した。すべての動物試験は武田薬品工業株式会社の動物倫理規定に基づき承認を受けて実施した。

### 4) 17, 20-lyase 活性の測定

組換ヒト CYP17A1/ ヒト NADPH cytochrome c reductase/ cytochrome b5のmixture、5歳齢カニクイザル副腎あるいは11週齢雄性CD(SD)IGSラット精巣から調製したマイクロゾーム分画を活性測定に使用した。ヒト及びサル酵素反応の基質として<sup>3</sup>Hでラベルした 5 $\mu$ M 17 $\alpha$ -hydroxypregnenoloneを用い、ラット酵素反応の基質として<sup>3</sup>Hで標識した 5 $\mu$ M 17 $\alpha$ -hydroxyprogesteroneを用いた。ヒト酵素、サル酵素およびラット酵素に対する反応時間は 37℃でそれぞれ 60、120及び 40分とした。酵素反応後酢酸エチルで抽出した基質及び反応生成物を薄層クロマトグラフィーで分離した。BAS2000 II バイオイメージアナライザーを使用し薄層プレート上の基質及び反応生成物のスポットの検出と相対放射活性値 (PSL 値として表示) の測定を行った。

### 5) 17-hydroxylase 活性の測定

組換ヒト CYP17A1/ ヒト NADPH cytochrome c reductase/ cytochrome b5のmixture、5歳齢カニクイザル副腎あるいは11週齢雄性 CD(SD)IGラット精巣から調製したマイクロゾーム分画を活性測定に使用した。ヒト及びサル酵素反応の基質として<sup>3</sup>Hでラベルした 5 $\mu$ M pregnenoloneを用い、ラット酵素



反応の基質として<sup>3</sup>Hで標識した5 μM progesteroneを用いた。ヒト酵素、サル酵素およびラット酵素に対する反応時間は 37℃でそれぞれ120、5及び 120分とした。酵素反応後酢酸エチルで抽出した基質及び反応生成物を薄層クロマトグラフィーで分離した。BAS2000 II バイオイメージアナライザーを使用し薄層プレート上の基質及び反応生成物のスポットの検出と相対放射活性値（PSL 値として表示）の測定を行った。

#### 6) 11-hydroxylase 活性の測定

5歳齢カニクイザル副腎及び11週齢雄性 CD(SD)IGラット副腎からミトコンドリア分画を調製し酵素活性測定に使用した。酵素反応の基質として <sup>3</sup>Hで標識した2 μM 11-deoxy- cortisolを用いた。カニクイザル酵素及びラット酵素に対する反応時間は 37℃でそれぞれ120 及び180分とした。酵素反応後酢酸エチルで抽出した基質及び反応生成物を薄層クロマトグラフィーで分離した。BAS2000 II バイオイメージアナライザーを使用し薄層プレート上の基質及び反応生成物のスポットの検出と相対放射活性値（PSL値として表示）の測定を行った。

#### 7) ラット精巣浮遊細胞におけるステロイド産生の測定

ラット精巣をコラゲナーゼ処理して調製した浮遊細胞を500,000 細胞/1 mL/ウェルの割合で48 ウェルプレートに分注した。培地として 0.5%仔牛血清を含む D-MEM を使用した。TAK-700 (3 - 200,000 nM) 添加10分後にHuman chorionic gonadotropin (hCG; 0.01 IU/mL) 添加し、37℃で 5 時間インキュベートした。その後、細胞を60℃で30分間処理してステロイド産生を停止した後、上清を回収し、ラジオイムノアッセイ（RIA）により各種ステロイド濃度を測定した。

#### 8) ラット副腎浮遊細胞におけるステロイド産生の測定

ラット副腎をコラゲナーゼ処理して調製した浮遊細胞を 100,000細胞/1 mL/ウェルの割合で48 ウェルプレートに分注した。培地として D-MEM を使用した。TAK-700 (3 - 200,000 nM)添加10 分後に adrenocorticotrophic hormone (ACTH ; 10 nM) を添加し、37℃で 3時間インキュベートした。その後、細胞を 60℃で 30分間処理してステロイド産生を停止した後、上清を回収し、RIAにより各種ステロイド濃度を測定した。

#### 9) カニクイザル副腎浮遊細胞におけるステロイド産生の測定

7歳齢カニクイザルの副腎をコラゲナーゼ処理して調製した浮遊細胞を100,000 細胞/1 mL/ウェルの割合で 48ウェルプレートに分注した。培地として D-MEM を使用した。TAK-700 (0.1 - 100,000 nM) あるいは ketoconazole (0.1 - 100,000 nM)添加 10分後に ACTH (10 nM) を添加し、37℃ で 3 時間インキュベートした。その後、細胞を60℃ で30分間処理してステロイド産生を停止した後、上清を回収し、RIAにより各種ステロイド濃度を測定した。

#### 10) NCI-H295R 細胞（ヒト副腎腫瘍細胞）におけるステロイド産生の測定

H295R細胞を 50,000 細胞/ウェルの密度で 24穴プレートに播き、3日後に20 μM forskolin, 2.5% Nu-Serum 1および 1% ITS-plusを含む D-MEM/F-12培地に交換した。さらに2日後に細胞を 1%

ITS-plus補充 D-MEM/F-12培地で2回洗い、20  $\mu$ M forskolin及び種々濃度の TAK-700, abirateroneあるいは ketoconazoleを含む1% ITS-plus補充 D-MEM/F-12培地を添加した。24 時間後に培地を回収し、RIAにより各種ステロイド濃度を測定した。

また、TAK-700によるステロイド産生阻害の可逆性についての実験は、TAK-700 (3 – 3000 nM) あるいは abiraterone (0.3 – 300 nM) を含む 1% ITS-plus補充 D-MEM/F-12培地を添加して2時間後に 1% ITS-plus補充 D-MEM/F-12培地で2回洗い、同じ濃度の化合物含む培地を添加するか、化合物を含まない培地を添加した。Wash-out後3時間、6時間、24 時間後に培地を回収し、RIAにより各種ステロイド濃度を測定した。

#### 1 1) 雄性ラットの血清ステロイド濃度の測定

9週齢 CD(SD)IGS の雄性ラットを1 群が 7匹となるように vehicle (0.5% methylcellulose) 投与群、TAK-700、30 mg/kg 投与群、100 mg/kg 投与群及び 300 mg/kg 投与群の4群に分けた。採血後経口投与を行ない、投与 2、4、8 及び24 時間後に採血を行なった。血清 testosterone濃度は RIA により測定した。なお投与量はラット酵素阻害活性及びラット浮遊精巣細胞の testosterone産生阻害活性がサル、ヒトの場合より弱いことから高めに設定した。

#### 1 2) 下垂体摘出雄性ラットの血清アンドロゲン及びコルチコイド濃度の測定

下垂体を摘出した6週齢CD(SD)IGS ラットを 1群が 7匹となるようにvehicle (0.5% methylcellulose) 投与群、TAK-700 30 mg/kg 投与群、100 mg/kg 投与群及び300 mg/kg 投与群の4群に分けた。アンドロゲン産生系に対する影響を調べる試験ではTAK-700の経口投与2 時間後にhCG (50 IU/kg) を静脈内投与し、さらに2時間後に採血した。コルチコイド産生系に対する影響を調べる試験では TAK-700 の経口投与3時間後にACTH (200 ng/kg) を静脈内投与し、さらに1時間後に採血した。血清testosterone、androstenedione、corticosterone及びaldosteroneの濃度はRIAにより測定した。なお投与量はラット酵素阻害活性及びラット浮遊精巣細胞のtestosterone産生阻害活性がサル、ヒトの場合より弱いことから高めに設定した。

#### 1 3) 雄性ラットのアンドロゲン依存性臓器の重量測定

8週齢雄性CD(SD)IGS を1群が7匹となるようにvehicle (0.5% methylcellulose) 投与群、去勢vehicle 投与群、TAK-700の112.5 mg/kg/day (37.5 mg/kg/回, 1 日3回) 投与群、450 mg/kg/day (150 mg/kg/回, 1 日3 回) 投与群、1800 mg/kg/day (600 mg/kg/回, 1日3回) 投与群及び bicalutamide 50 mg/kg/day (1日1 回) の6群に分けた。TAK-700及びbicalutamideを4日間連日経口投与した翌日、前立腺及び精囊腺重量を測定した。なおTAK-700のラット酵素阻害活性及びラット浮遊精巣細胞のtestosterone産生阻害活性がサル細胞及びヒト細胞株の場合より弱いことから投与量を高く設定した。

#### 1 4) 正常雄性カニクイザル単回経口投与試験

4 – 7歳雄性カニクイザルを1群が4匹となるようにvehicle (0.5% methylcellulose) 投与群、TAK-700 の0.3 mg/kg投与群、1 mg/kg投与群、3 mg/kg投与群及び10 mg/kg投与群の5群に分けた。TAK-700は経口で単回投与した。TAK-700投与48時間前、24時間前、投与直前、投与2、5、10、24及び48時間後に採血を行なった。血清DHEA、cortisol及び testosterone濃度はRIA により測定した。

#### 1 5) 正常雄性カニクイザル 1週間反復経口投与試験

5-7歳雄性カニクイザルを1群が5匹となるようにvehicle (0.5% methylcellulose) 投与群、TAK-700の3 mg/kg/回投与群、7.5 mg/kg/回投与群及び15 mg/kg/回投与群の4群に分けた。TAK-700を1日2回(午前10時及び午後10時、最終日は午前10時のみ) 1週間反復経口投与した。採血は1日2回(午後2時及び7時) 投与3日前から最終投与日の午後7時まで行った。血清 DHEA、cortisol及びtestosterone濃度はRIAにより測定した。

#### 1 6) 去勢雄性カニクイザル 1週間反復経口投与試験

6-12歳去勢雄性カニクイザルを1群が3匹となるようにTAK-700の7.5 mg/kg/回投与群及び15 mg/kg/回投与群の2群に分けた。TAK-700を1日2回(午前8時及び午後8時、最終日は午前8時のみ) 1週間反復経口投与した。採血は1日2回(午後12時及び5時) 投与3日前から最終投与日の午後7時まで行なった。投与終了約1ヶ月後1頭を除く(健康状態悪化のため除外) 全てのサルにvehicle (0.5% methylcellulose)を投与し、同じスケジュールで採血を行なった。血清 DHEA、cortisol及びtestosterone濃度はRIAにより測定した。

#### 1 7) 統計処理

In vitro実験においては、testosterone、androstenedione、DHEA、cortisol、corticosteroneあるいはaldosteroneに対するTAK-700の $IC_{50} \pm 95\%$ 信頼区間(confidence interval; CI)は、log変換した用量反応曲線の直線的に下降している部分について線形回帰分析することで算出した。カニクイザルにおいては血清ステロイド濃度は個体間の差が大きく、日内変動やストレスの影響を受けるので、単回経口投与試験においては投与前の濃度の平均値(投与48時間前、24時間前、直前)に対する%で表した。非去勢のカニクイザルを用いた反復経口投与試験においては、最終投与日の午後2時における対照群(溶媒投与群)とTAK-700投与群の統計学的有意差はDunnett's test(等分散の場合)あるいはSteel's test(不等分散の場合)で分析した。P値が0.05以下の場合に統計学的に有意とした。

雄性ラットを用いたin vivo試験においては、対照群とTAK-700投与群の統計学的有意差はDunnett's testあるいはSteel's testで検定した。対照群とbicalutamide投与群あるいは対照群と去勢群の統計学的有意差はunpaired Student's t-testで検定した。P値が0.05以下の場合に統計学的に有意とした。

雌性ラットを用いたin vivo試験においては、対照群とTAK-700投与群の統計学的有意差はDunnett's testあるいはSteel's testで検定した。対照群とanastrozole投与群の統計学的有意差はunpaired Student's t-testで検定した。P値が0.05以下の場合に統計学的に有意とした。

## 実験結果

### 1. TAK-700による17, 20-lyase, 17-hydroxylase 及び 11-hydroxylase 活性の阻害

TAK-700 はサル 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase 活性をそれぞれ 27 (95% CI: 24 – 32) nM 及び 38 (95% CI: 30 – 48) nM の IC<sub>50</sub> 値で阻害した (Table 1)。一方、同じアッセイ系での abiraterone の IC<sub>50</sub> 値は、16 (95% CI: 14 – 18) nM 及び 25 (95% CI: 23 – 28) nM であった。副腎アンドロゲンを下下させるために臨床において適用外使用で使用されてきた (Small 2004) ketoconazole の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 750 (95% CI: 560 – 1,100) nM および > 10,000 nM であった。これらの結果は、TAK-700 と abiraterone は 17, 20-lyase and 17-hydroxylase の両方にほぼ同等の阻害活性を有し、それらの阻害活性は ketoconazole より強いことを示している。Corticosterone 及び cortisol の生合成に必須であるサルの 11-hydroxylase に対して TAK-700 の阻害は 10,000 nM まで 50%に達しなかった (Table 1)。一方、abiraterone と ketoconazole の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 600 (95% CI: 480 – 760) nM 及び 270 (95% CI: 190 – 380) nM であった。

TAK-700 は、ヒト 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase 活性をそれぞれ 140 (95% CI: 120 – 170) nM 及び 760 (95% CI: 640 – 910) nM の IC<sub>50</sub> 値 で阻害した (Table 1)。Abiraterone の IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 27 (95% CI: 24 – 30) nM 及び 30 (95% CI: 27 – 34) nM であった。Ketoconazole の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 110 (95% CI: 88 – 130) nM 及び 580 (95% CI: 530 – 640) nM であった。Abiraterone がヒト 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase に対して最も強い阻害作用を示したが、TAK-700 は abiraterone と比較してヒト 17, 20-lyase をより選択的に阻害した。Ketoconazole はサル 17, 20-lyase と比較してヒト 17, 20-lyase をより強く阻害し、17-hydroxylase と比較して 17, 20-lyase に選択性が高かったが、サル 11-hydroxylase 活性も強く阻害した (Table 1)。

TAK-700 のラット 17, 20-lyase、17-hydroxylase 及び 11-hydroxylase 活性に対する IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 1,200 (95% CI: 1,100 – 1,300) nM, > 10,000 nM 及び > 10,000 nM であった (Table 1)。他の酵素より 17, 20-lyase により強い阻害活性を示した。一方、abiraterone は 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase の両酵素活性をほぼ同等の強度で阻害した (Table 1)。Abiraterone は 3つの化合物の中で 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase 活性を最も強力に阻害したが、11-hydroxylase に対しても阻害活性を示した (Table 1)。Ketoconazole による阻害は 17,20-lyase に選択性を示したが、11-hydroxylase を最も強く阻害した (Table 1)。Abiraterone 及び ketoconazole についての結果は、これまでに報告されている相対的な抑制活性 (Haidar 2003, Rowlands 1995) とほぼ一致していた。

以上、TAK-700 はターゲット酵素であるヒト 17,20-lyase を高い選択性を持って阻害したが、abiraterone 及び ketoconazole は TAK-700 と比較して 11-hydroxylase を強く阻害した。

**Table 1. Inhibition of 17,20-lyase, 17-hydroxylase, and 11-hydroxylase in different species by the 17,20-lyase inhibitors TAK-700, abiraterone, and ketoconazole.**

Species	Enzyme	IC <sub>50</sub> (95% CI), nM		
		TAK-700	Abiraterone	Ketoconazole
Human	17,20-lyase	140 (120-170)	27 (24-30)	110 (88-130)
	17-hydroxylase	760 (640-910)	30 (27-34)	580 (530-640)
Monkey	17,20-lyase	27 (24-32)	16 (14-18)	750 (560-1,100)
	17-hydroxylase	38 (30-48)	25 (23-28)	>10,000
	11-hydroxylase	>10,000	600 (480-760)	270 (190-380)
Rat	17,20-lyase	1,200 (1,100-1,300)	6.2 (4.7-7.9)	2,300 (1,900-3,100)
	17-hydroxylase	>10,000	9.2 (7.9-11)	>10,000
	11-hydroxylase	>10,000	550 (390-700)	69 (52-87)

## 2. 培養細胞及び浮遊細胞のステロイド産生に対するTAK-700による阻害

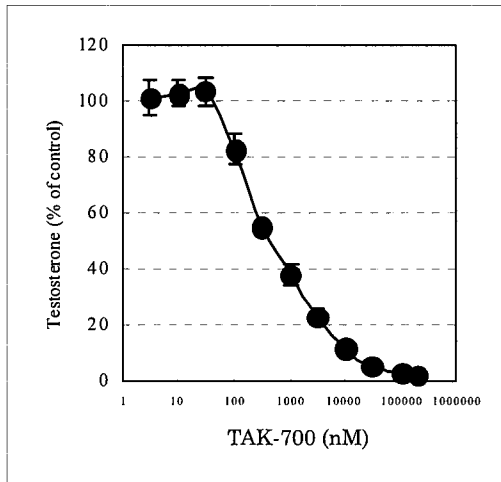
### 2.1 ラット精巣及び副腎浮遊細胞のステロイド産生に対するTAK-700による阻害

ラット精巣浮遊細胞の testosterone 及び androstenedione の産生は TAK-700 によりそれぞれ 640 (95% CI: 510 – 810 nM) nM および 210 (95% CI: 140 – 310 nM) nM の  $IC_{50}$  値で抑制された (Fig. 3A, B)。17-hydroxyprogesterone の産生に対して、TAK-700 は 1,000 nM まで増加作用を示したが、それ以上の濃度では増加作用は濃度依存的に減弱した (Fig. 3C)。Progesterone の産生に対して TAK-700 は、100,000 nM まで濃度依存的に増加作用を示した (Fig. 3D)。これらの結果から、TAK-700 は、低濃度では 17,20-lyase 活性のみを阻害し、高濃度では 17-hydroxylase も阻害することが示唆された。

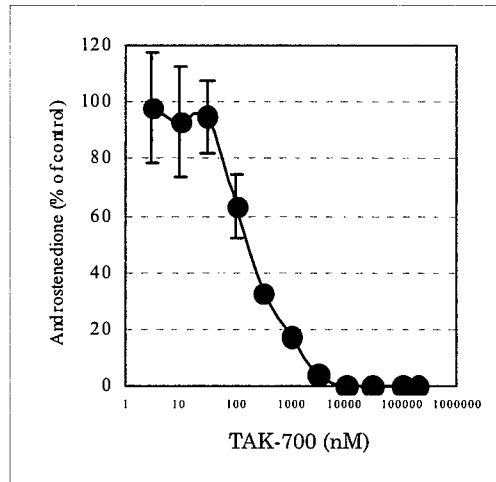
TAK-700 の 17,20-lyase に対する高い選択性は、ラット副腎浮遊細胞において corticosterone 産生に対する  $IC_{50}$  値が > 200,000 nM であり (Fig. 4A)、aldosterone 産生に対する  $IC_{50}$  値が 35,000 (95% CI: 31–40) nM (Fig. 4B) であることから支持された。低濃度においては、TAK-700 は corticosterone 及び aldosterone 濃度にほとんど影響を与えなかった。ラット副腎浮遊細胞における progesterone 産生に対して、TAK-700 は 30,000 nM 以上の濃度でのみ増加させる傾向が認められた (Fig. 4C)。

以上、TAK-700 がラット 17, 20-lyase 活性に対して選択性の高い阻害活性を有しており、アンドロゲン産生を抑制する濃度では corticosterone あるいは aldosterone 産生にはほとんど影響しないことが示された。

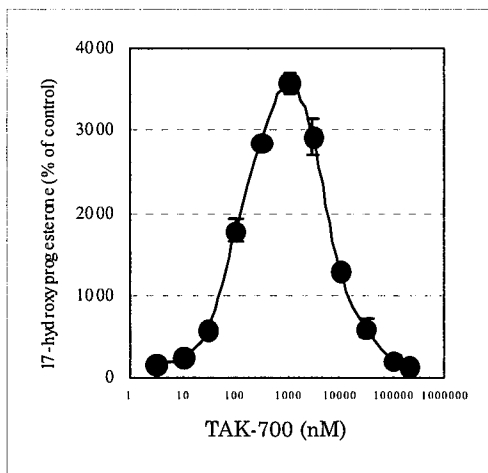
A



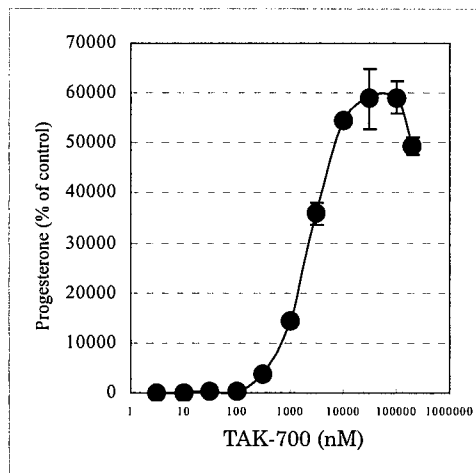
B



C

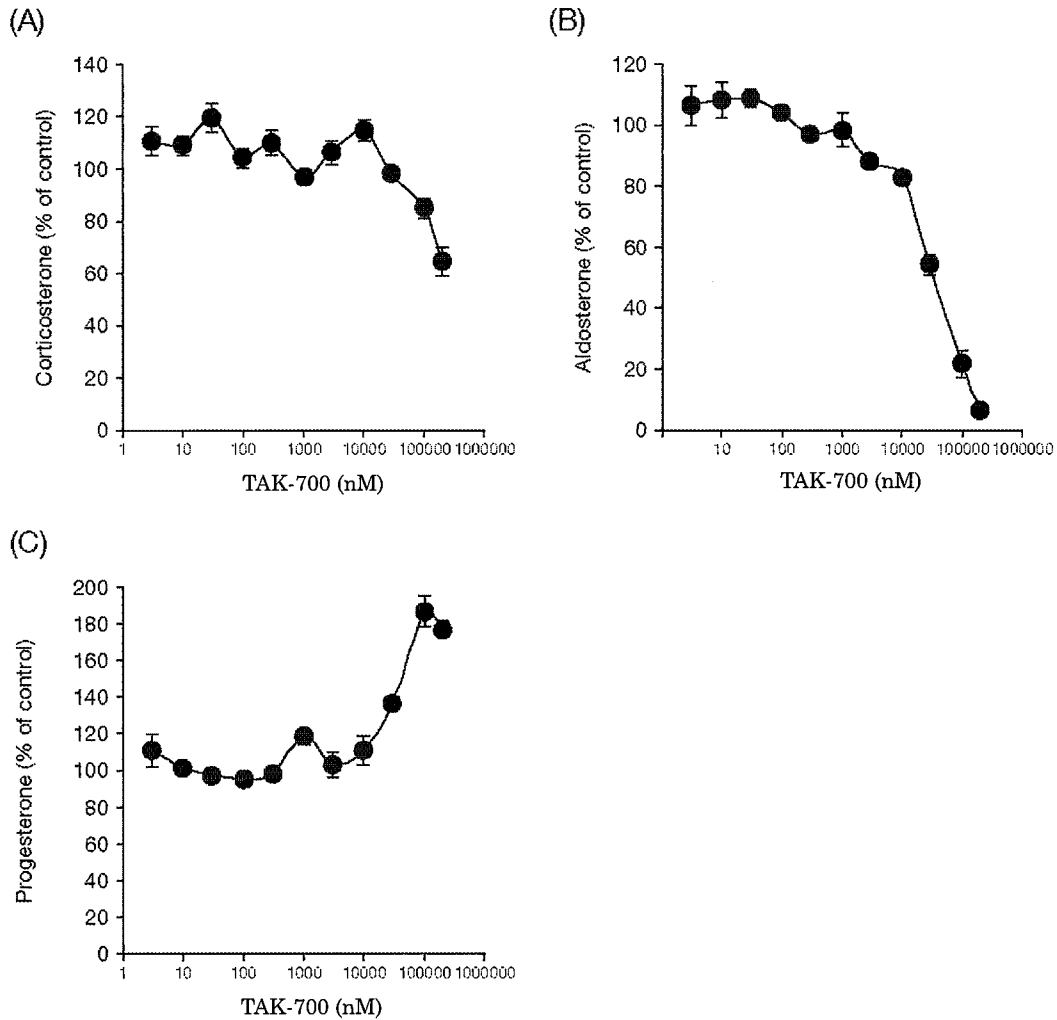


D



**Fig. 3. Effect of TAK-700 on hCG-stimulated production of steroid hormones in rat testicular cells.**

TAK-700 was added 10 min before hCG stimulation. The concentrations of (A) testosterone, (B) androstenedione, (C) 17-hydroxyprogesterone, and (D) progesterone in conditioned media 5 h after hCG stimulation were determined by RIA. Mean  $\pm$  SEM, n=3.



**Fig. 4. Effect of TAK-700 on ACTH-stimulated production of steroid hormones in rat adrenal cells.**

TAK-700 was added 10 min before ACTH stimulation. The concentrations of (A) corticosterone, (B) aldosterone, and (C) progesterone in conditioned media 3 h after ACTH stimulation were determined by RIA. Mean  $\pm$  SEM, n=3.

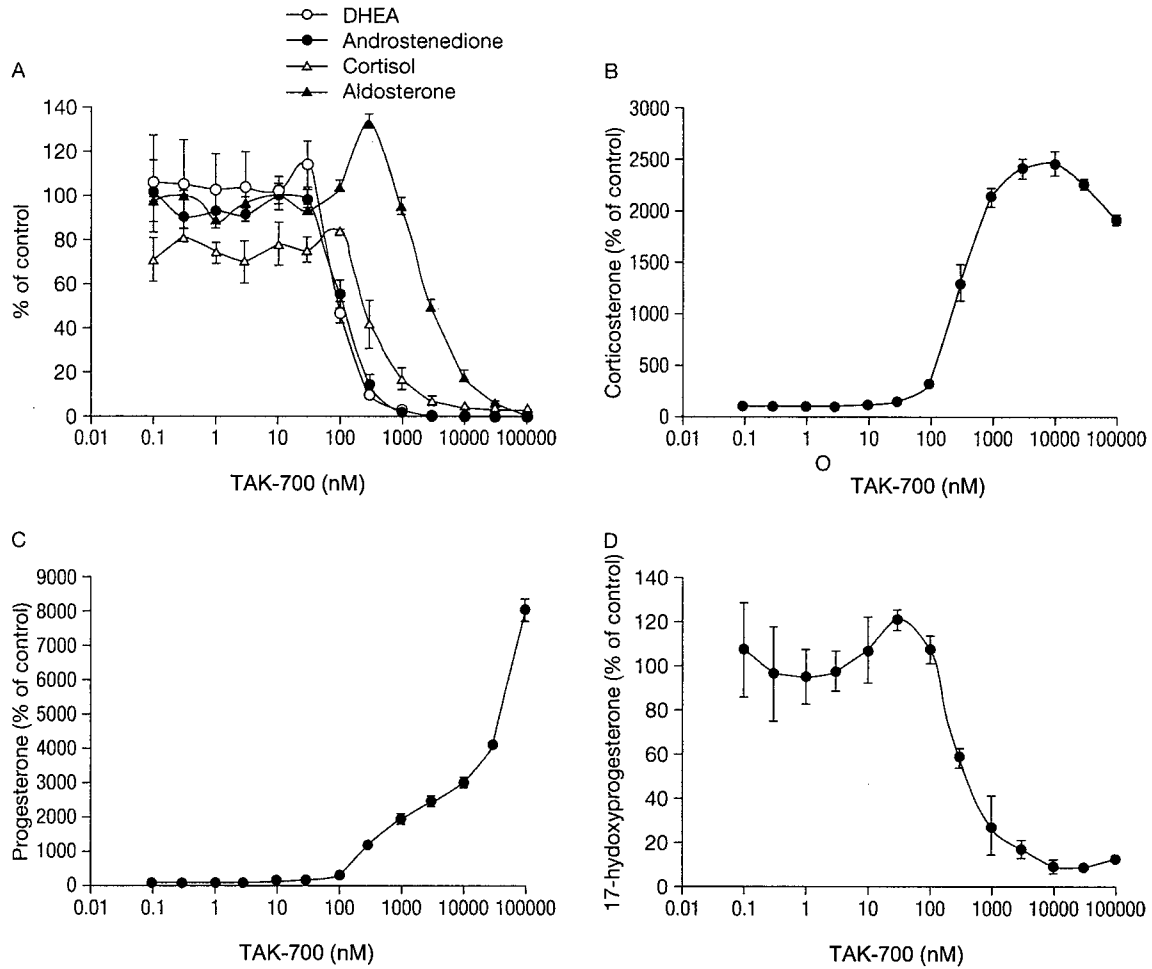


## 2.2 カニクイザル副腎浮遊細胞のステロイド産生に対するTAK-700による阻害

カニクイザル副腎浮遊細胞において、TAK-700による前処置は ACTH刺激によるDHEA及び androstenedione産生をそれぞれ 110 (95% CI: 90 – 140) nM 及び 130 (95% CI: 96 – 170) nMの IC<sub>50</sub>値で阻害した (Fig. 5A)。Cortisol 及び aldosteroneの産生も TAK-700によりそれぞれ 310 (95% CI: 190 – 450) nM 及び 4,400 (95% CI: 3,600 – 5,500) nMの IC<sub>50</sub>値で抑制された (Fig. 5A)。TAK-700は corticosterone 及び progesteroneの産生を濃度依存的に増加させた (Fig. 5B, C)が、10,000 nM以上の濃度では corticosterone濃度は減少した。TAK-700は 17-hydroxyprogesterone濃度を30 nMでわずかに上昇させたが、100 nM以上の濃度では抑制した (Fig. 5D)。これらの結果は TAK-700が 17,20-lyase活性を 11-hydroxylase及びaldosterone synthase活性より強く阻害することを示している。

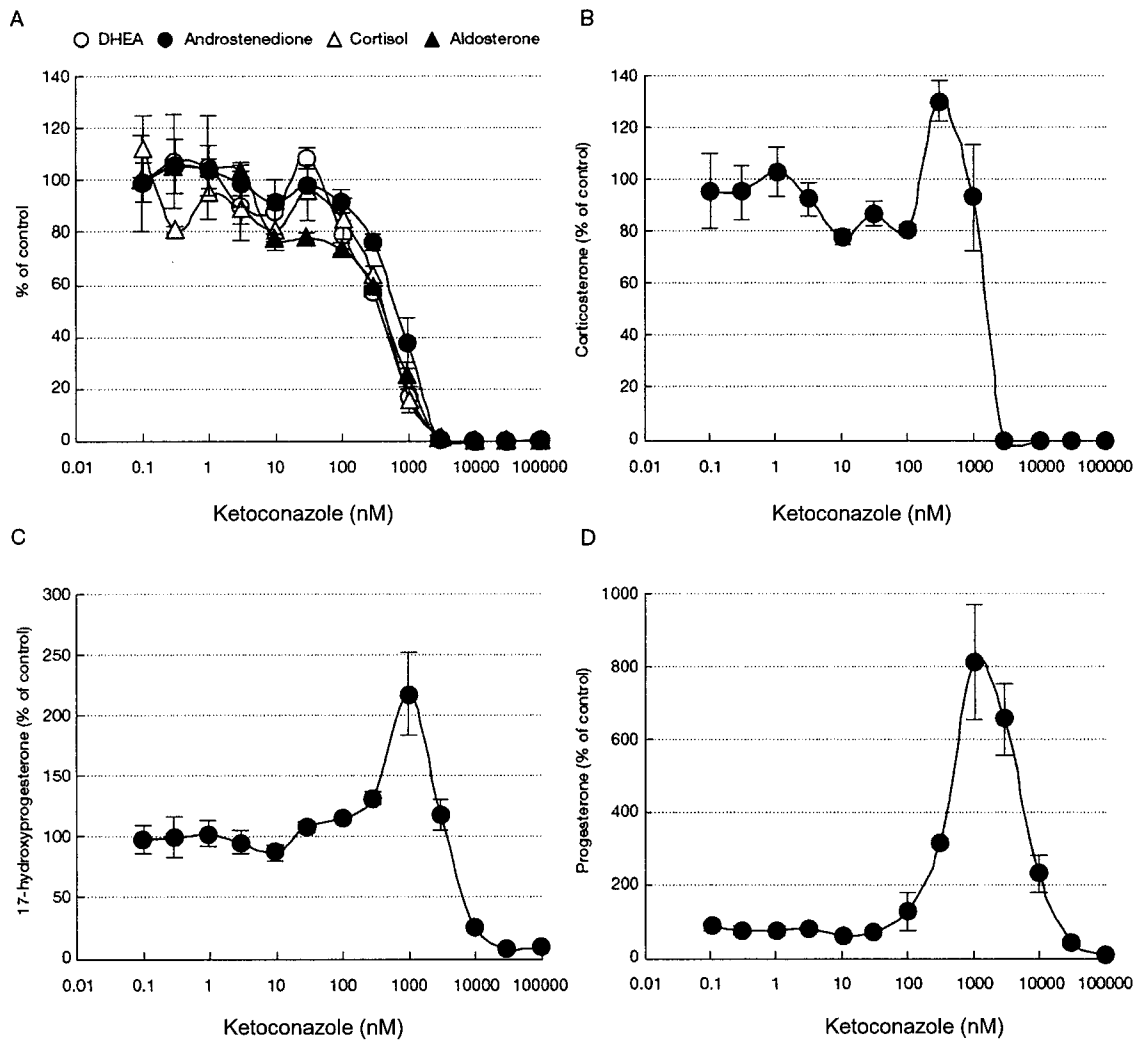
同様の方法でketoconazoleの作用を検討した。Ketoconazoleは、DHEA、androstenedione、cortisol 及び aldosteroneの産生をそれぞれ 340 (95% CI: 290 – 400) nM, 580 (95% CI: 450 – 750) nM, 340 (95% CI: 240 – 480) nM 及び 350 (95% CI: 290 – 410) nMの IC<sub>50</sub>値で抑制した (Fig. 6A)。Corticosterone産生も ketoconazoleにより 1,500 (95% CI: 1,000 – 2,600; Fig. 6B) nMの IC<sub>50</sub>値で抑制された。17-hydroxyprogesteroneの産生は 1,000 nMの ketoconazole濃度でのみ顕著に増加したが、3,000–10,000 nMの間では濃度依存的に抑制された (Fig. 6C)。Progesteroneの産生は 1,000 nMまで ketoconazoleにより増加したが、より高い濃度では減少した (Fig. 6D)。これらの結果から、ketoconazoleはサル 17,20-lyase活性の阻害に加えて、11-あるいは 21-hydroxylase及び side chain cleavage enzyme (SCC)などの酵素も高濃度で阻害することが示唆された。

以上、TAK-700は、ketoconazoleと比較して、より強い17,20-lyase阻害作用を有するとともに、より高い選択性を持つことが示された。



**Fig. 5. Effects of TAK-700 on ACTH-stimulated production of steroid hormones in monkey adrenal cells.**

TAK-700 was added 10 min before adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation. The concentrations of dehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione, cortisol, and aldosterone (A), corticosterone (B), progesterone (C), and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17-OHP) (D) in conditioned media 3 h after ACTH stimulation were determined by radioimmunoassay (RIA). Mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM [n=3]).



**Fig. 6. Effects of ketoconazole on ACTH-stimulated production of steroid hormones in monkey adrenal cells.**

Ketoconazole was added 10 min before adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation. The concentrations of dehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione, cortisol, and aldosterone (A), corticosterone (B), 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17-OHP) (C), and progesterone (D) in conditioned media 3 h after ACTH stimulation were determined by radioimmunoassay (RIA). Mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM [n=3]).

## 2.3 NCI-H295R 細胞のステロイド産生に対するTAK-700による可逆的阻害

ヒト副腎皮質腫瘍細胞株 NCI-H295R 細胞は、ミネラルコルチコイド、グルココルチコイド及び副腎アンドロゲンを生産する (Cobb 1996)。TAK-700 は NCI-H295R 細胞による DHEA 産生を 37 (95% CI: 31 – 42) nM の IC<sub>50</sub> 値で強く抑制した (Fig. 7A)。この値は *in vitro* での 17, 20-lyase 阻害の IC<sub>50</sub> 値と同レベルであった (Table 1)。TAK-700 は cortisol 産生を 990 (95% CI: 720 – 1,400) nM の IC<sub>50</sub> 値で抑制した。この結果から DHEA 産生阻害の強度は cortisol 産生阻害の強度より 約 27 倍強いことが示された。CYP17A が 17, 20-lyase 活性及び 17-hydroxylase 活性の両方を有している (Nakajin 1981a, Nakajin 1981b) が、TAK-700 がセルフリー酵素活性アッセイ系では 17, 20-lyase 活性を 17-hydroxylase 活性より 5.4 倍低い IC<sub>50</sub> 値で阻害したことで部分的には説明できるかもしれない。17, 20-lyase 活性のみを欠損する先天性欠損症の存在 (Auchus 2002) と 17, 20-lyase 活性のみ、電子伝達によらないメカニズムによって cytochrome b5 の存在が必要である (Auchus 1998) ことから、17-hydroxylase 活性と 17,20-lyase 活性発現に必要なコンフォメーションの違いがある可能性が考えられる。この選択性は 17-hydroxylase 活性と 17,20-lyase 活性発現に必要なコンフォメーションの違いを反映しているのかもしれない。

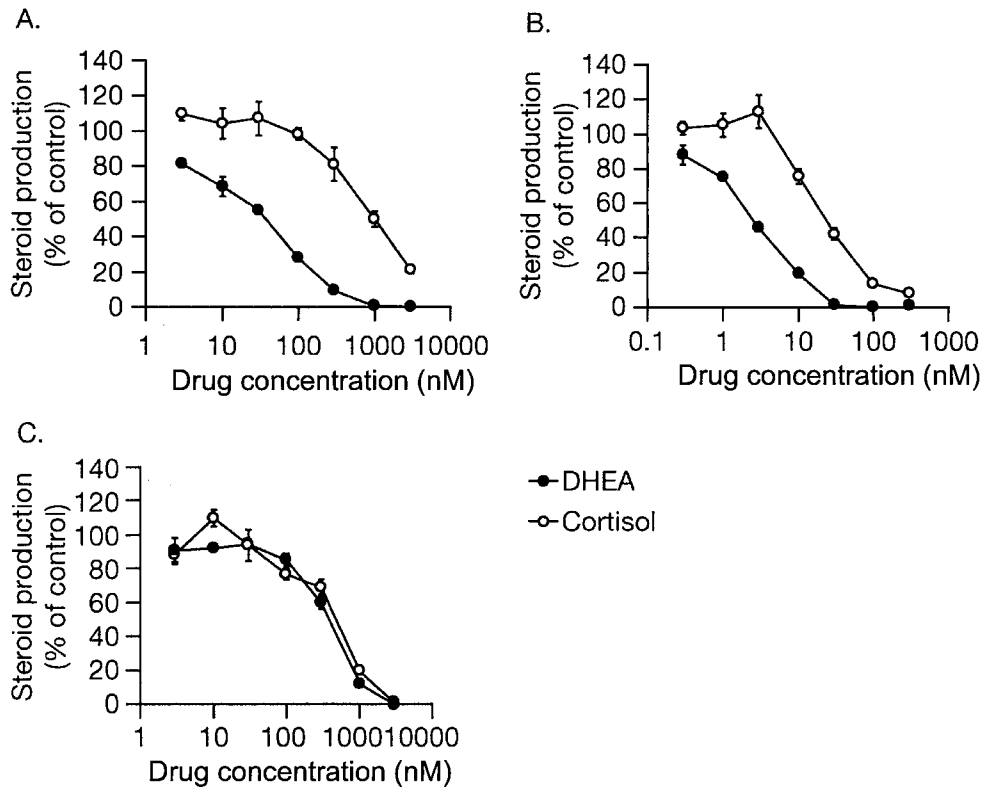
また、TAK-700 は他の副腎アンドロゲンである androstenedione の産生を 54 (95% CI: 48 – 61) nM の IC<sub>50</sub> 値で濃度依存的に抑制した (Fig. 8A)。濃度反応曲線は DHEA の濃度反応曲線に類似していた。TAK-700 は 17-hydroxyprogesterone の産生を 1,700 (95% CI: 1,100 – 4,000) nM の IC<sub>50</sub> 値で抑制した (Fig. 8A)。TAK-700 は 10nM で 17-hydroxyprogesterone の産生を増加させる傾向がみられた。この結果は 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase 活性阻害の間に一定の選択性が存在することを示唆している。

さらに progesterone の産生は TAK-700 の添加により濃度依存的に増加した (Fig. 9A)。これは 17-hydroxylase 活性の阻害によるものと考えられる。Aldosterone の産生も TAK-700 の添加で濃度依存的に増加したが、3,000 nM 以上の濃度でわずかに減少する傾向がみられた (Fig. 9A)。Progesterone の蓄積が aldosterone の産生増加に関与している可能性が考えられる。Aldosterone、cortisol 及び DHEA の産生は副腎皮質の異なった層で起こるため、aldosterone 産生増加が *in vivo* でおこる可能性は低いものと想定される。球状層は主に aldosterone を産生し、17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase の活性は、束状層や網状層より低いことが報告されている (Mapes 1999)。本実験に用いた NCI-H295R 細胞は、これら 3 種類のステロイドホルモンをすべて産生することができる。TAK-700 添加で生じるステロイドホルモン産生の変化はすべて 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase 活性阻害で説明することができる。

Abiraterone は DHEA 及び cortisol の産生をそれぞれ 2.7 (95% CI: 2.5 – 2.9) nM 及び 23 (95% CI: 17 – 37) nM の IC<sub>50</sub> 値で抑制した (Fig. 7B)。Abiraterone が DHEA 産生を阻害する活性は TAK-700 より強いが、DHEA 及び cortisol 産生阻害の IC<sub>50</sub> 値の比は TAK-700 よりわずかに低かった (8.5 vs 27)。Abiraterone は androstenedione の産生を DHEA 産生阻害と同様に 2.9 nM の IC<sub>50</sub> 値で濃度依存的に抑制した (95% CI: 2.7 – 3.1) (Fig. 8B)。17-hydroxyprogesterone の産生も 68 (95% CI: 46–110) nM の IC<sub>50</sub> 値で濃度依存的に阻害した。この阻害曲線は cortisol 産生阻害の曲線に類似していた (Fig. 8B)。Abiraterone は 17-hydroxylase 活性を阻害することにより、progesterone 産生を濃度依存的に増加させたと考えられる (Fig. 9B)。Aldosterone 産生も TAK-700 の添加により濃度依存的に増加し、100 nM 以

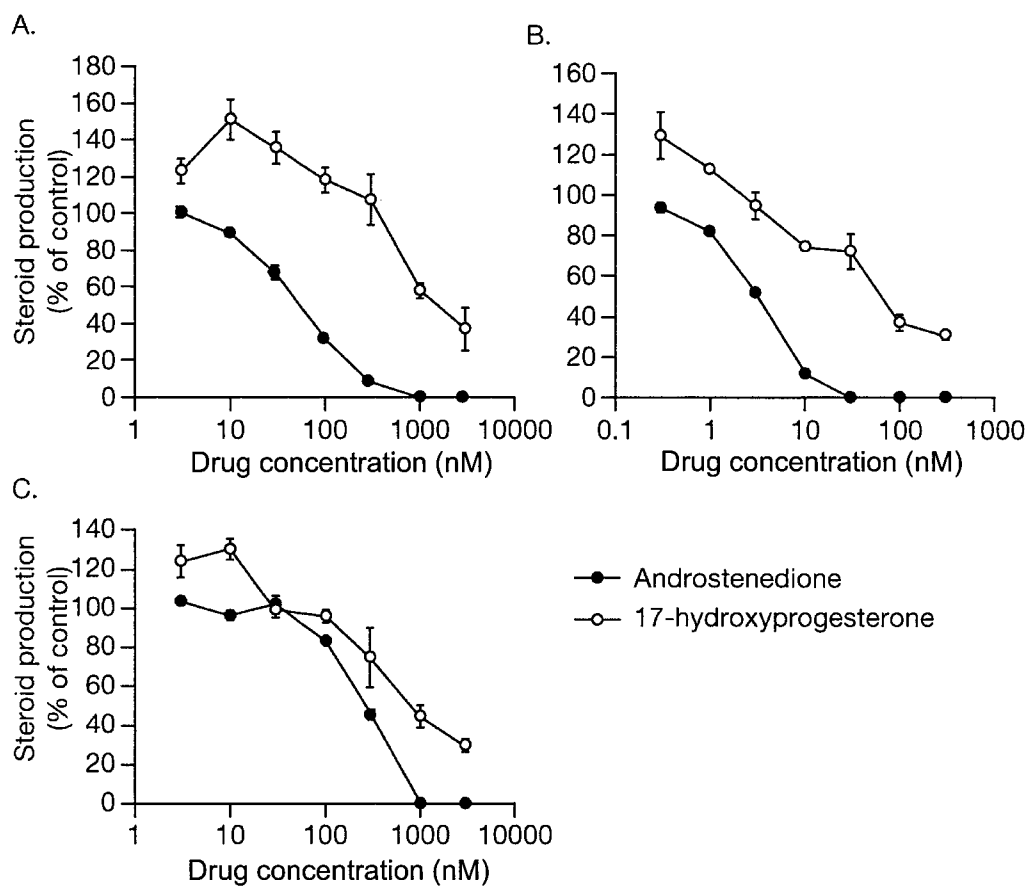
上で若干の低下傾向を示したが、aldosterone 産生は 300 nM でも対照群の値より高値であった (Fig. 9B)。

Ketoconazoleは、DHEA 及び cortisolの産生をそれぞれ 330 (95% CI: 280 – 400) nM 及び 490 (95% CI: 350–630) nMの IC<sub>50</sub>値で阻害した (Fig. 7C)。実験に用いた 17, 20-lyase阻害薬のうちで、ketoconazoleの DHEA産生阻害の活性が最も低いとともに、DHEA及び cortisol産生阻害の選択性 (IC<sub>50</sub> ratio: 1.5)も最も低かった。Ketoconazoleは androstenedioneの産生を 250 nM (95% CI: 240–270nM)のIC<sub>50</sub>値で濃度依存的に阻害した (Fig. 8C)。この値は DHEA産生阻害の値とほぼ同様であった。Ketoconazoleは 17-hydroxyprogesterone産生も 820 (95% CI: 460 – 3,800) nMの IC<sub>50</sub>値で濃度依存的に阻害した(Fig. 8C)。これは cortisol産生の阻害曲線に類似していた。一方、progesterone産生に対する ketoconazoleの濃度反応曲線は他の化合物とは異なっていた (Fig. 9C)。これは ketoconazoleの選択性が低いことに起因していると考えられる (Loose 1983)。さらに ketoconazoleは 3,000 nMの濃度で aldosteroneの産生を完全に阻害した (Fig. 9C)、この値は DHEA産生阻害の IC<sub>50</sub>値より約9倍高かった。



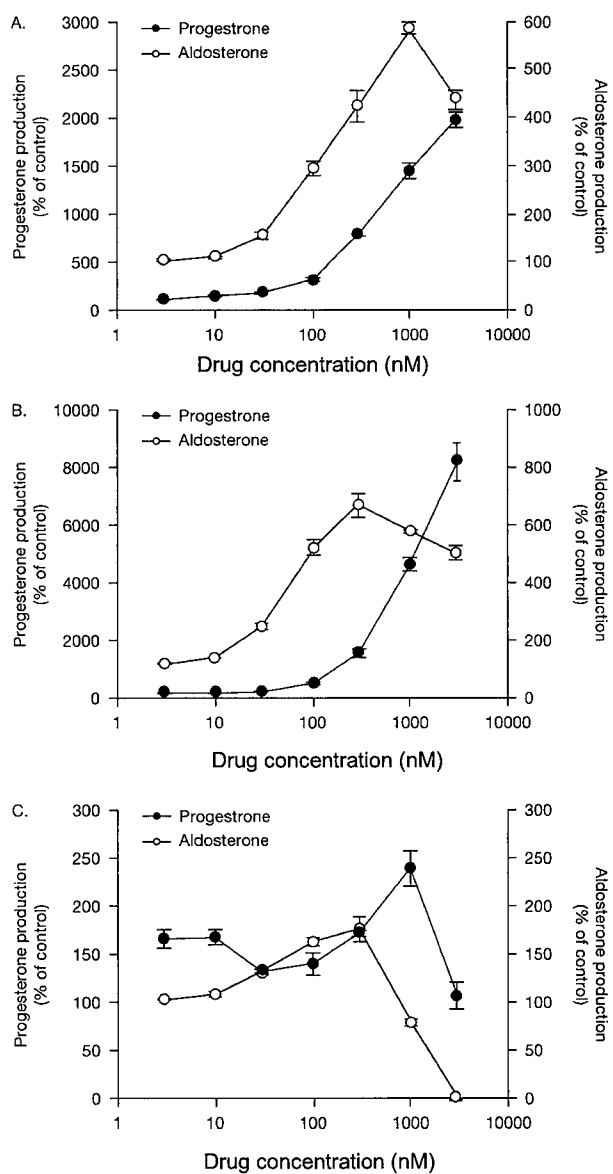
**Fig. 7. Impact of TAK-700 on DHEA and cortisol production in human tumor cells**

Inhibition of DHEA and cortisol production in NCI-H295R cells by the 17,20-lyase inhibitors (A) TAK-700, (B) abiraterone, and (C) ketoconazole. Steroid production expressed as percentage of mean control (no drug added) value. Each point represents mean  $\pm$  SEM, n=3.



**Fig. 8. Impact of TAK-700 on androstenedione and 17-hydroxyprogesterone production in human tumor cells**

Inhibition of androstenedione and 17-hydroxyprogesterone production in NCI-H295R cells by the 17,20-lyase inhibitors (A) TAK-700, (B) abiraterone, and (C) ketoconazole. Steroid production expressed as percentage of mean control (no drug added) value. Each point represents mean  $\pm$  SEM, n=3.

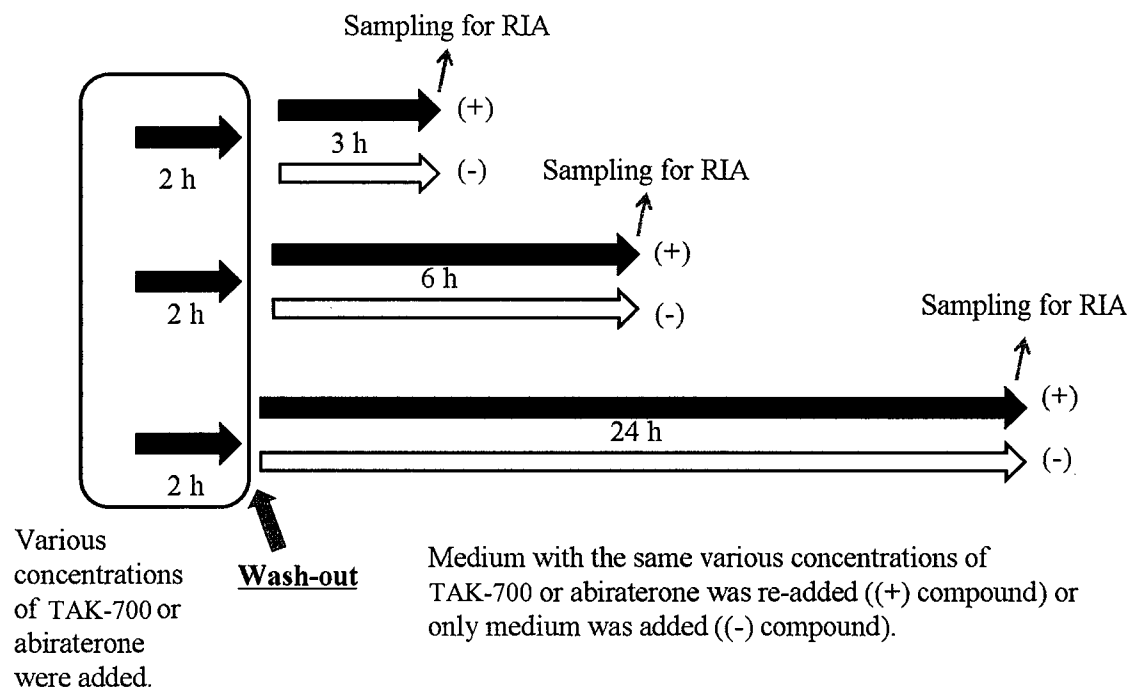


**Fig 9. Impact of TAK-700 on progesterone and aldosterone production in human tumor cells**

Inhibition of progesterone and aldosterone production in NCI-H295R cells by the 17,20-lyase inhibitors (A) TAK-700, (B) abiraterone, and (C) ketoconazole. Steroid production expressed as percentage of mean control (no drug added) value. Each point represents mean  $\pm$  SEM, n=3.



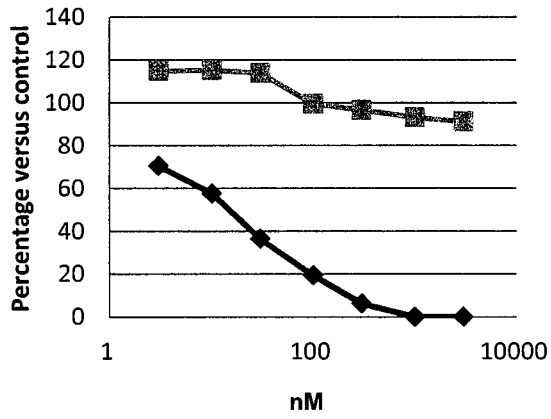
TAK-700のターゲット蛋白質に対する結合の可逆性は、TAK-700の化学構造 (Kaku 2011) から予想されることに加え、abiraterone非可逆的な結合に必要とされる 16および17位間の二重結合 (Jarman 1998) に相当する構造的特徴も有していない。TAK-700の阻害の可逆性をヒト副腎皮質腫瘍株である NCI-H295Rを用いて検討した。Fig. 10に実験のプロトコールを示した。Abirateroneは H295R細胞による DHEA産生を wash-outの3時間後よりは弱くなっているものの 24時間後においても強く抑制した (Fig. 11A , B, C)。この結果は abirateroneの阻害の非可逆性を示した報告 (Jarman 1998) と一致するものである。一方、TAK-700による DHEA産生阻害は wash-outの3時間後には消失していた。この結果は TAK-700の阻害が可逆的であることを強く示唆している。TAK-700は経口投与することを意図して選ばれた化合物であり、経口投与した場合、一般に血漿中濃度は一過性に高い濃度 ( $C_{max}$ )に達し、その後、低下していくという推移をたどる。 $C_{max}$ が 17-hydroxylase活性の阻害濃度を上回っている場合、定常濃度では 17, 20-lyase活性阻害と 17-hydroxylase活性阻害濃度の間に特異性があったとしても、非可逆的に結合すると in vivoで DHEA濃度の低下と cortisol濃度低下の間の特異性を期待することができなくなる。可逆性が示されたことにより、本細胞系で示された DHEA産生阻害と cortisol産生阻害の選択性をin vivoでも期待できると考えられる。



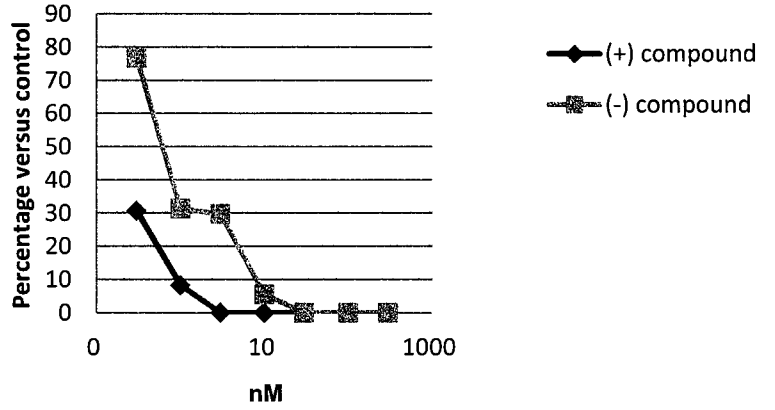
**Fig. 10. Experimental design: impact of wash-out on inhibitory activity of TAK-700 and abiraterone on DHEA production in H295R cells**

A)

TAK-700 3 h

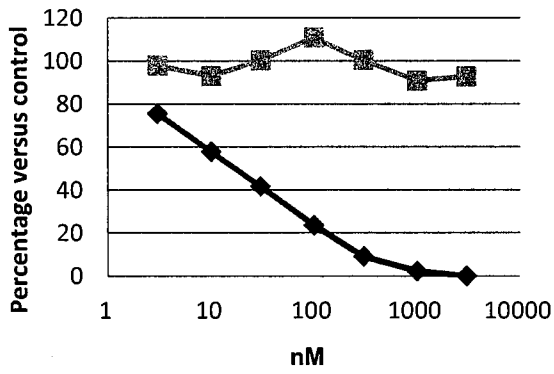


Abiraterone 3 h

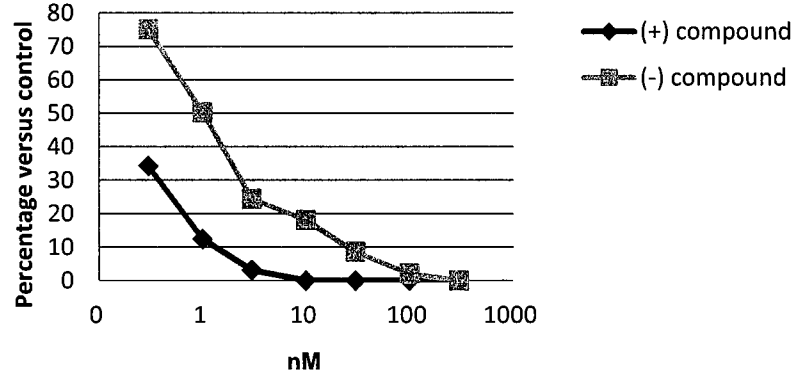


B)

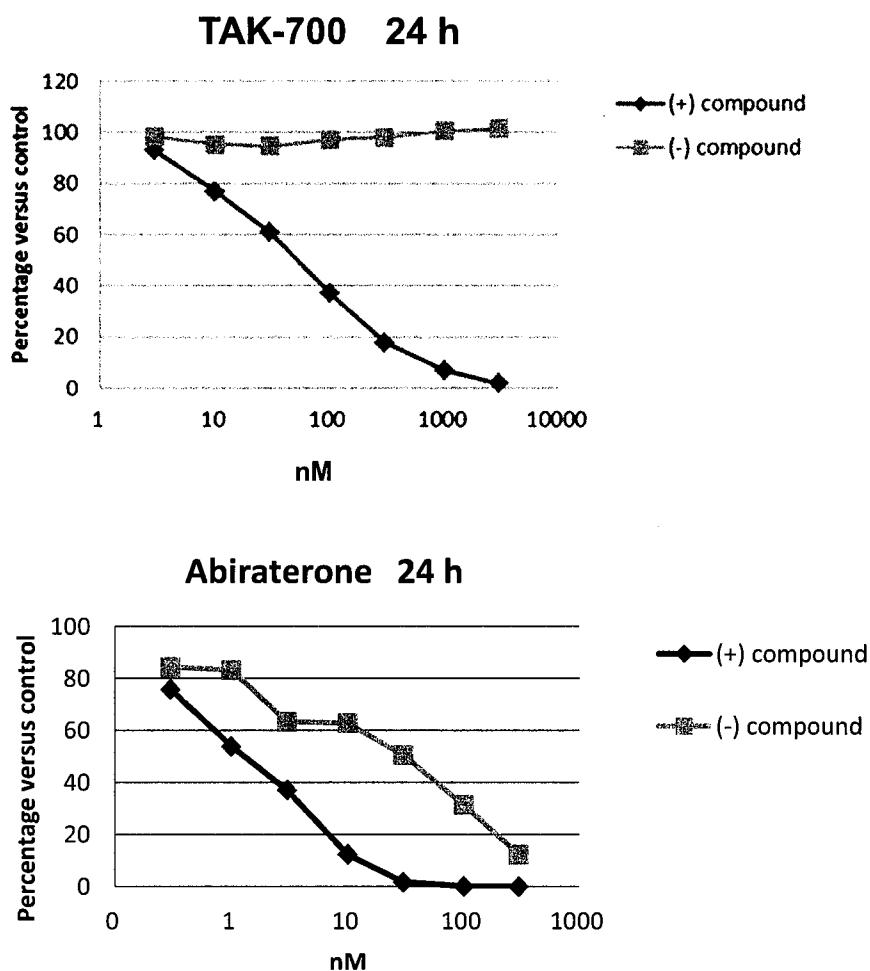
TAK-700 6 h



Abiraterone 6 h



(C)



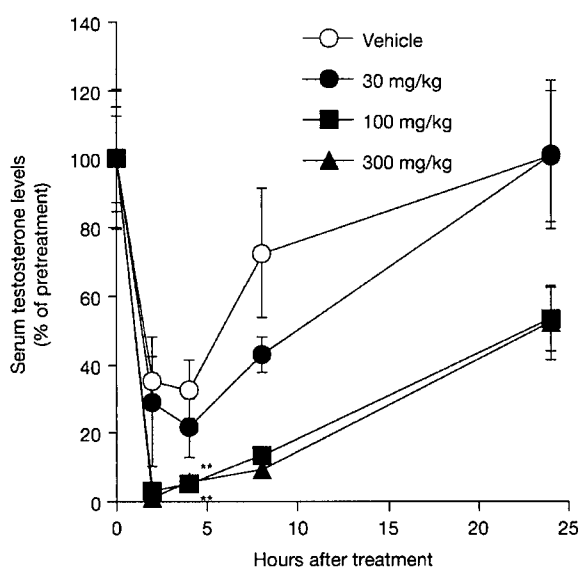
**Fig. 11. The effect of washout on inhibition of TAK-700 or abiraterone on DHEA production in a human adrenocortical tumor cell line at 24 hours post wash-out.**

NCI-H295R cells were seeded in 24-well plates at a density of 50,000 cells/0.5 mL D-MEM/F-12 medium supplemented with 2.5% Nu-Serum I and 1% ITS-plus per well on Day 0. On Day 3, the medium was changed to a new D-MEM/F-12 medium supplemented with 2.5% Nu-Serum I, 1% ITS plus, and 20  $\mu\text{mol/L}$  forskolin. On Day 5, the cells were washed twice with 500  $\mu\text{L}$  of the new medium and 500  $\mu\text{L}$  of D-MEM/F-12 medium containing 1% ITS-plus and 20  $\mu\text{mol/L}$  forskolin, and varying concentrations of the compounds were added to the cells. Two h after incubation with the compounds, cells were washed twice with 500  $\mu\text{L}$  of the new medium and the same varying concentrations of the compounds in 500  $\mu\text{L}$  of D-MEM/F-12 medium containing 1% ITS-plus and 20  $\mu\text{mol/L}$  forskolin were re-added ((+) compound) or just the medium was added to the cells ((-) compound). The medium was collected 3(A), 6(B), and 24(c) h after wash-out and stored at  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  until assayed by RIA. Concentrations of DHEA were assayed with a specific RIA.

### 3. 雄性ラットの血清ステロイド濃度に対する作用

#### 3.1 未処置正常雄性ラットの血清 testosterone濃度に対するTAK-700の効果

雄性ラットの血清 testosterone濃度は、TAK-700 の100 及び300 mg/kgの投与量で投与4時間後に有意に低下し ( $p \leq 0.01$ )、投与 8時間後までその作用は持続した(Fig. 12)。しかし、投与 24時間後には、30 mg/kg 投与群では血清中 testosterone濃度は完全に回復し、100 mg/kgあるいは 300 mg/kg 投与群では回復傾向にあった (Fig. 12)。In vitroの実験系における酵素阻害が in vivo に反映されたものと考えられる。



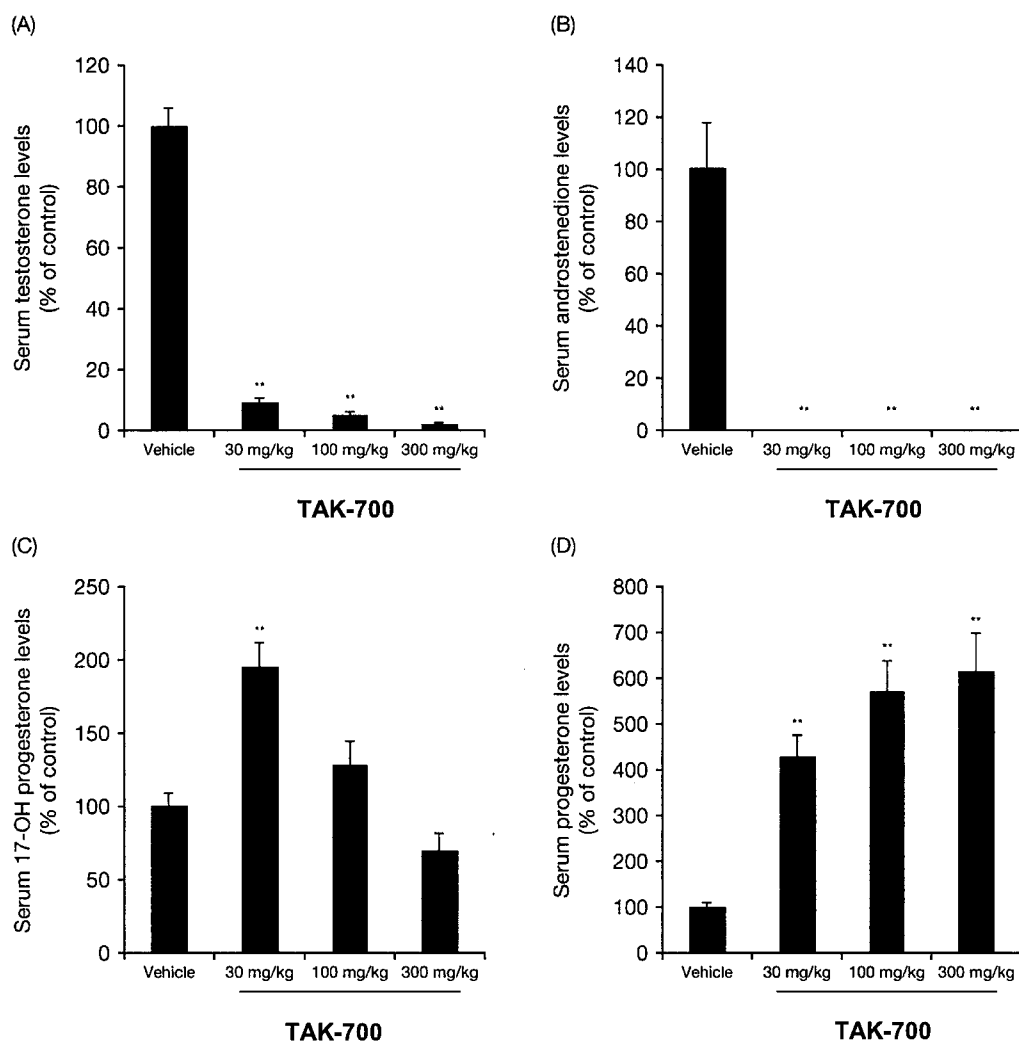
**Fig. 12. Suppression of serum testosterone levels by TAK-700 in intact male rats.**

Male rats were treated orally with TAK-700 and the blood sample was obtained before and 2, 4, 8, and 24 h after dosing to measure the serum testosterone levels. The pretreatment values of the vehicle, 30 mg/kg TAK-700, 100 mg/kg TAK-700, and 300 mg/kg TAK-700 groups were  $4.10 \pm 0.514$  ng/mL,  $3.59 \pm 0.737$  ng/mL,  $7.11 \pm 1.43$  ng/mL, and  $4.94 \pm 0.751$  ng/mL, respectively. Mean  $\pm$  SEM,  $n=7$ . Statistical analysis was performed on the time point of 4 h considering that the  $C_{max}$  of TAK-700 is 2 to 3 h and the metabolic half-life of testosterone is approximately 1 h. \*\* $P \leq 0.01$  versus vehicle-control by Steel's test.

### 3.2 下垂体摘出雄性ラットにおけるアンドロゲン及びコルチコイド産生に対するTAK-700の作用

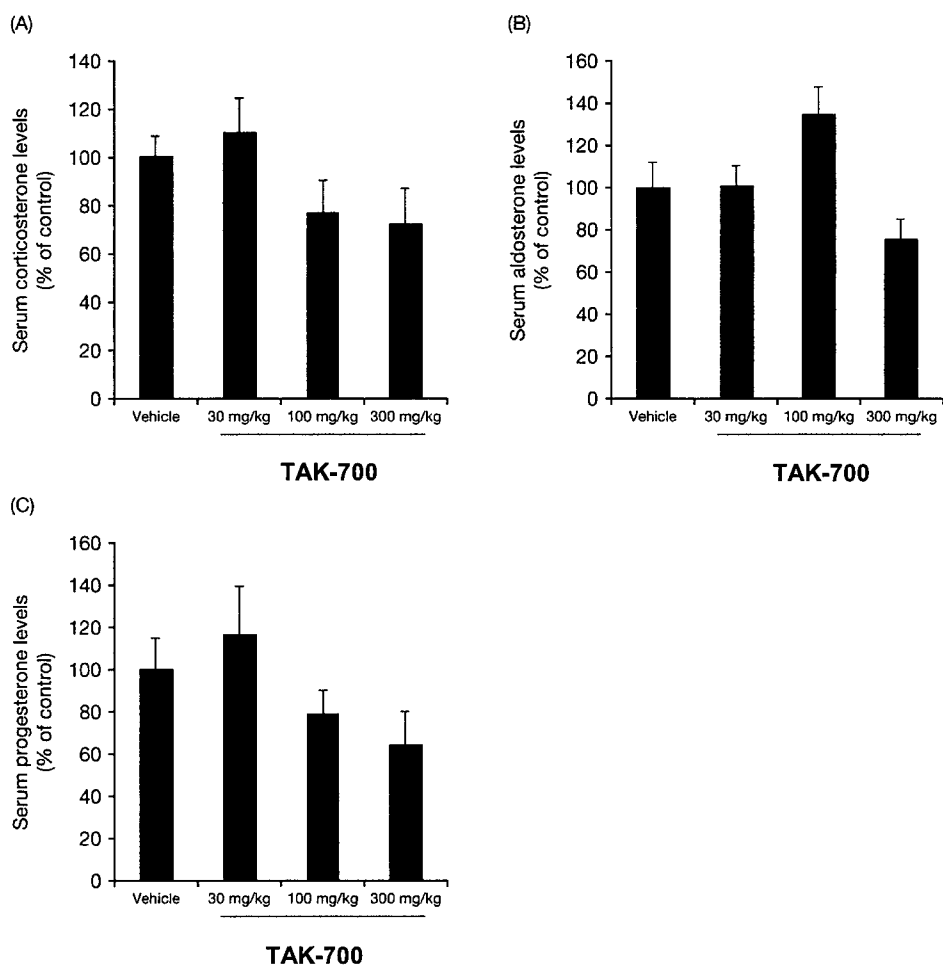
TAK-700の *in vivo*における作用と選択性を評価する目的で、下垂体摘出雄性ラットのアンドロゲン及びコルチコイド産生系に対するTAK-700を経口で 30, 100 及び 300 mg/kgを投与して検討した。血清ステロイドホルモン、特に実験によるストレスにより特にコルチコイドで起こりうる血清中濃度の変動や日内変動を最小限にするため下垂体摘出ラットを用いた。細胞において得られた結果と一致して、hCGを静脈内投与した下垂体摘出ラットにおいて血清 testosterone 及び androstenedione濃度はすべての投与量において溶媒対照群と比較して有意に低下した (すべて  $p \leq 0.01$ ) (Fig. 13A, B)。さらに17-hydroxyprogesterone濃度の増加は 30 mg/kgの投与量で最大であった ( $p \leq 0.01$ ) (Fig. 13C)。一方、TAK-700は progesteroneの濃度を用量依存的に上昇させた (Fig. 13D)。これらの結果は、TAK-700が低用量では 17, 20-lyase活性を選択的に抑制し、高用量では 17-hydroxylase活性にも影響を与えていることを示唆している。臨床においてもTAK-700の投与で血中progesterone濃度が上昇することが考えられるがprogesteroneの重篤な副作用は知られておらず、5 alpha-reductase阻害によりアンドロゲン活性を低下させることを示唆する報告がある (Cassidenti 1991)。これはTAK-700の治療効果に影響を与えない。ラット精巣細胞では、1-3  $\mu\text{M}$ の TAK-700が testosterone産生を対照群の 20-40%に抑制し、一方、17-hydroxyprogesteroneの産生は対照群以上であった (Fig. 3)。したがって、用量を慎重に決定すれば、臨床において 17-hydroxylaseに対する作用を最小限にできると考えられる。対照的にACTHを注射した下垂体摘出ラットにおいて血清中 aldosterone, corticosterone 及び progesterone濃度は TAK-700のいずれの投与量においても大きな変動はみられなかった (Fig. 14A, B, and C)。

ヒトと異なり、ラットの副腎には、CYP17Aは発現されておらず、cortisolではなく corticosteroneが主要なグルココルチコイドであることが知られている (van Weerden 1992)。また、Aldosterone及び corticosteroneの産生には 17-hydroxylationステップを必要としない。したがって、17-hydroxylaseの阻害はこれらのステロイドの産生に影響を与えない。これらの知見及び本実験の *in vitro*の実験系における 酵素阻害の結果と細胞及び *in vivo*でのステロイド産生に対する影響の結果から、TAK-700は *in vivo*でミネラルコルチコイドの産生につながるステロイド合成系に影響を与えずに 17, 20-lyase活性を抑制できることが示された。



**Fig. 13. The effect of TAK-700 on androgen-synthesis pathway in hCG-injected hypophysectomized male rats.**

hCG was injected 2 h after the administration of TAK-700 and blood was withdrawn 2 h after the hCG injection to measure (A) serum testosterone, (B) androstenedione, (C) 17-hydroxyprogesterone, and (D) progesterone levels. The serum testosterone, androstenedione, 17-hydroxyprogesterone, and progesterone levels in the vehicle-control group were  $4.8 \pm 0.29$  ng/mL,  $0.47 \pm 0.083$  ng/mL,  $0.91 \pm 0.085$  pg/mL, and  $0.60 \pm 0.046$  ng/mL, respectively. Mean  $\pm$  SEM,  $n=7$ . \*\* $P \leq 0.01$  versus the vehicle control group by Dunnett's or Steel's test.



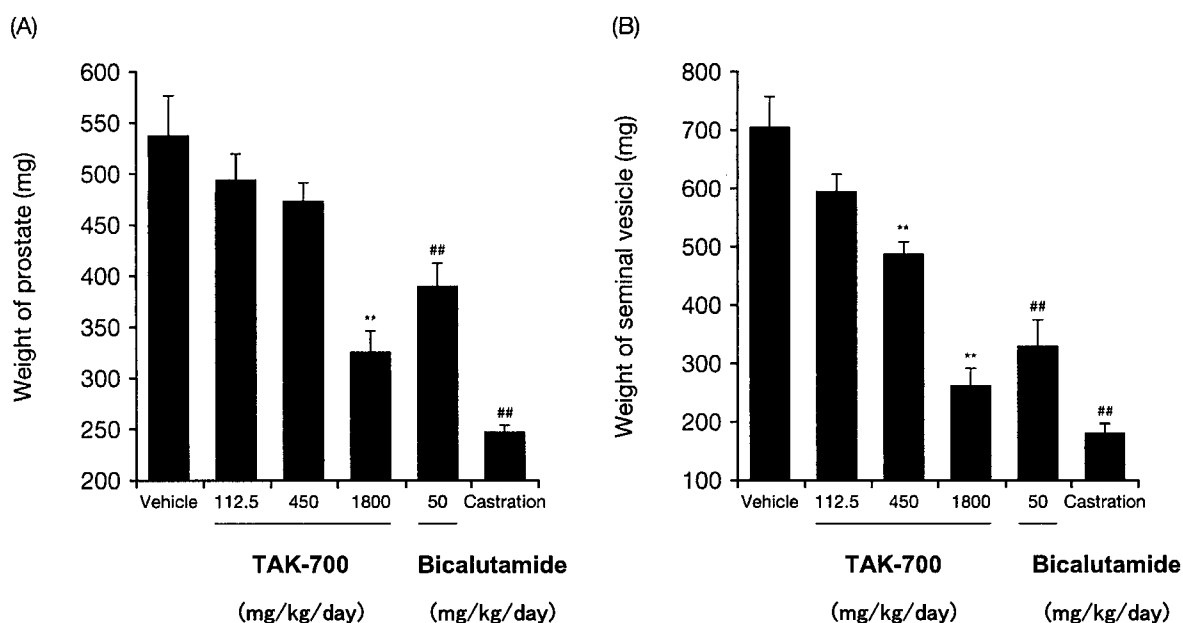
**Fig. 14. The effect of TAK-700 on corticoid-synthesis pathway in ACTH-injected hypophysectomized male rats.**

ACTH was injected 3 h after the administration of TAK-700, and blood was withdrawn 1 h after the ACTH injection to measure the (A) serum corticosterone, (B) aldosterone, and (C) progesterone levels. The serum corticosterone, aldosterone and progesterone levels in the vehicle-control group were  $320 \pm 29$  ng/mL,  $140 \pm 17$  ng/mL, and  $9.9 \pm 1.5$  ng/mL, respectively. Mean  $\pm$  SEM,  $n=7$ . No significant differences were observed between the vehicle control and the treatment groups in any steroid hormone by Dunnett's test.



#### 4. 雄性ラットのアンドロゲン依存性臓器重量に対する TAK-700 の影響

次に反復経口投与した TAK-700 (37.5, 150及び600 mg/kg/dose 1日3回)の非去勢雄ラットの前立腺及び精嚢重量に対する効果を検討した。TAK-700は前立腺及び精嚢重量を用量依存的に抑制した (Fig. 15A, B)。この結果は TAK-700の反復投与が正常雄性ラットのアンドロゲン合成を持続的に抑制したことを示唆している。1,800 mg/kg/dayのTAK-700はアンドロゲン依存性臓器重量を 50 mg/kg/day の bicalutamide 投与のレベルまで低下させた (Fig. 15A)。この時の血清 bicalutamide 濃度は bicalutamide 治療を受けている前立腺癌患者における濃度とほぼ同じである。この結果は臨床において TAK-700は bicalutamide と同等あるいはそれ以上の強度で前立腺癌の増殖を抑制する可能性を示唆している。TAK-700はラット 17, 20-lyase阻害活性と比較して、ヒト 17, 20-lyase阻害活性が約17倍強力であることから、ヒトにおける投与量がより低くなることが想定された。



**Fig. 15. Suppression of the weight of androgen-dependent organs by TAK-700 in intact male rats.**

Male rats were treated orally with TAK-700 or bicalutamide for the consecutive 4 days and the (A) weight of prostate and (B) seminal vesicles was measured on the next day of the last treatment. Mean  $\pm$  SEM, n=7. \*\*P $\leq$ 0.01 versus the vehicle-control by Dunnett's test. ##P $\leq$ 0.01 versus the vehicle-control by unpaired Student's t test.

## 5. 雄性カニクイザルの血清ステロイドホルモン濃度に対するTAK-700の作用

### 5.1 正常雄性カニクイザルの血清ステロイドホルモン濃度に対する単回投与 TAK-700の効果

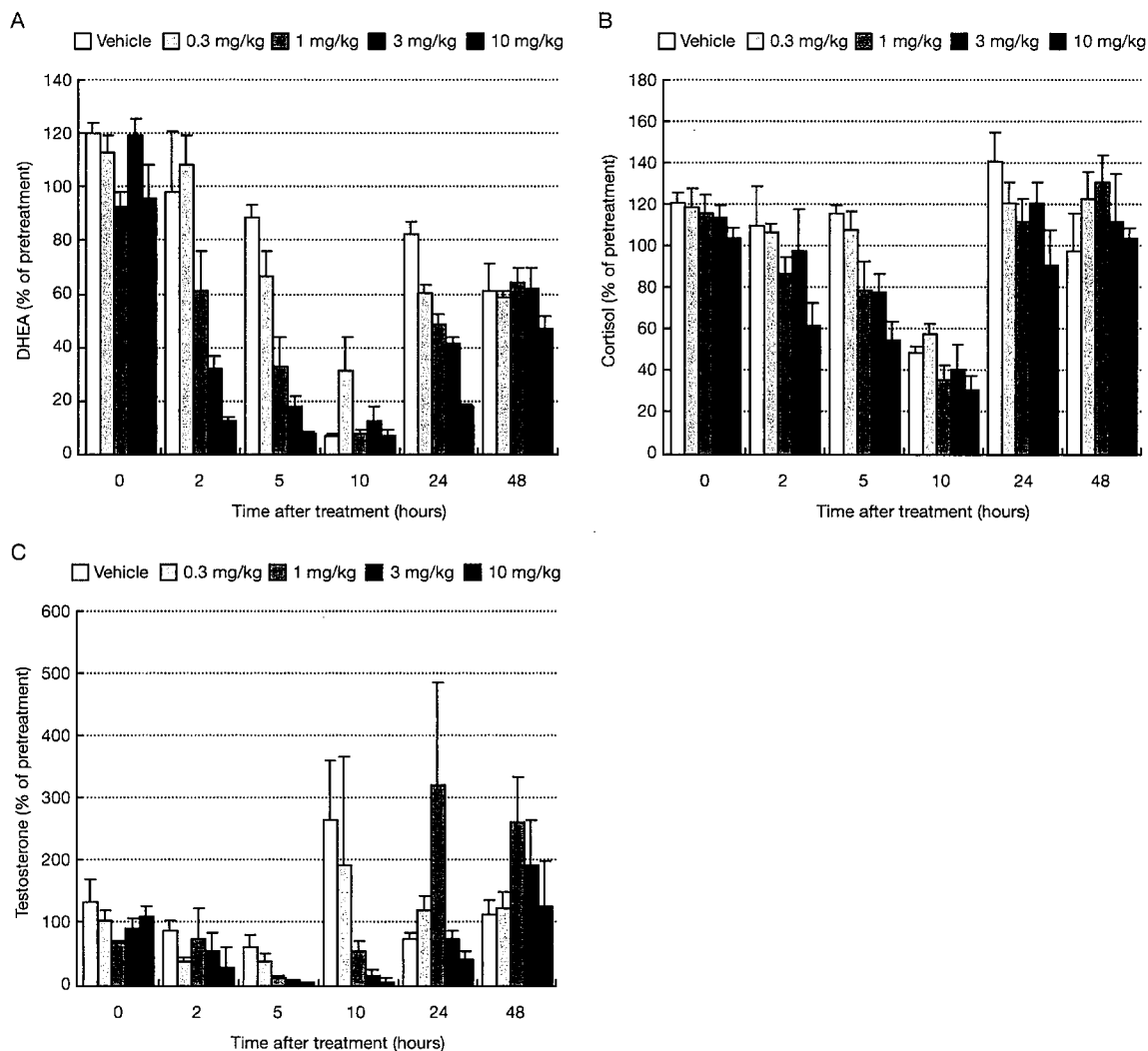
対照群（溶媒投与）カニクイザルにおいて、血清 DHEA 濃度は、10 a.m.（投与直前）の血液採取以降持続的に低下し、8 p.m.頃（投与 10 時間）に最低値に達し、その後上昇するパターンを示した。これは内因性の日内変動を反映しているものと考えられる (Fig. 16A; Rosenfeld 1975)。TAK-700 単回経口投与 (0.3–10.0 mg/kg) 後、血清中 DHEA 濃度は投与後 10 時間まで速やかにかつ用量依存的に低下し、投与後 24 時間でも対照群と比較して低値を示した (Fig. 16A)。TAK-700 のすべての投与群において血清中 DHEA 濃度は投与後 48 時間までに対照群のレベルまで回復した (Fig. 16A)。

対照群において血清 cortisol 濃度は DHEA でみられたものと同様の日内変動のパターンを示した (Fig. 16A, B; Krieger 1971)。TAK-700 を単回経口投与 (0.3–10.0 mg/kg) 後、血清 cortisol 濃度も投与後 10 時間まで速やかにかつ用量依存的に低下した (Fig. 16B)。しかし、cortisol の低下の程度は DHEA の場合ほど大きくなく、すべての投与群において血清 cortisol 濃度は、投与後 24 時間には投与前のレベルまで回復していた (Fig. 16B)。

血清 testosteroneの日内変動のパターンは、DHEAあるいは cortisolのパターンとは異なっていた (Fig. 16A–C)。おそらく異なった下垂体ホルモン、すなわちACTHあるいは luteinizing hormone (LH) が、それぞれ DHEA/cortisolあるいは testosteroneの分泌パターンを決定しているからと思われる

(Rosenfeld 1975, Gallagher 1973)。対照群において、午後 8 時ころ（投与10時間後）に血清 testosterone濃度は最高値となった (Fig. 16C)。TAK-700単回経口投与 (0.3–10.0 mg/kg)後、血清 testosterone濃度は急速に低下し、投与後 10時間（溶媒対照投与群で最も高い血清 testosterone濃度を示す時間）で最小値になる（3及び10 mg/kg投与群）か溶媒対照群より低値を示した（1 mg/kg投与群）(Fig. 16C)。

以上、TAK-700 は単回経口投与で血清 DHEA 及び testosterone濃度を低下させる傾向を示した。TAK-700による血清 cortisol濃度の低下作用はより軽度であった。



**Fig. 16. Impact of single oral dosing of TAK-700 in male monkeys.**

Impact of TAK-700 on serum dehydroepiandrosterone (DHEA) (A), cortisol (B), and testosterone (C) levels. Serum steroid levels were determined by radioimmunoassay (RIA) and were expressed as percentages of the mean pretreatment values. Each value represents mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM [n=4]).

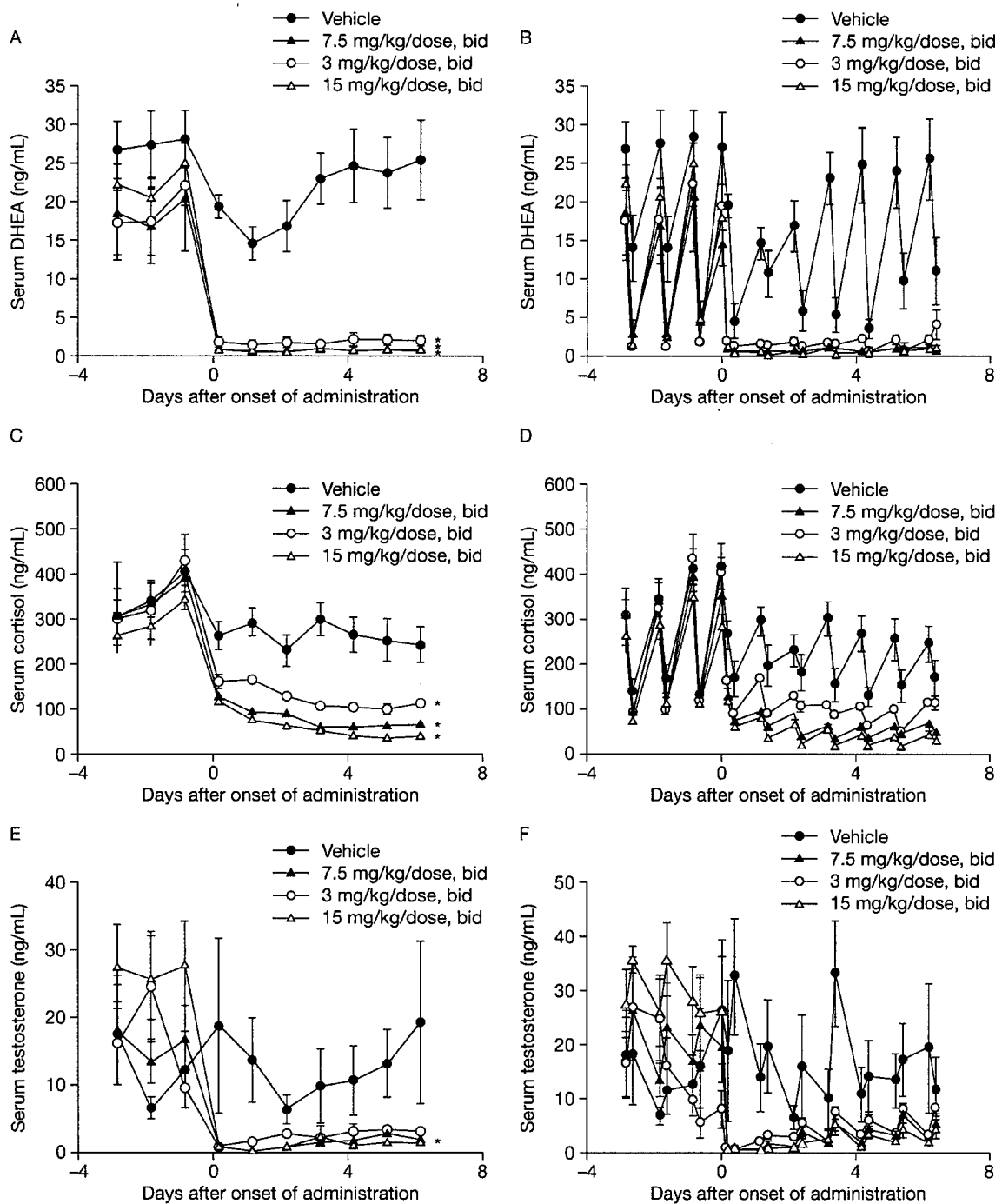
## 5.2 正常雄性カニクイザルの血清ステロイドホルモン濃度に対するTAK-700の1週間 反復経口投与の影響

単回投与試験でも観察されたように、対照群における血清 DHEA 濃度は投与前と投与期間中明らかな日内変動を示した (Fig. 17B)。しかし、TAK-700 の 1 日 2 回、1 週間の反復投与では日内変動は明らかに低下し、投与期間中低いレベルに維持された (Fig. 17A, B)。1 日 2 回 3, 7.5 及び 15 mg/kg 投与群における投与期間中の平均血清中 DHEA 濃度は投与前の平均血清中濃度のそれぞれ 17.0%, 8.1% 及び 6.5% であり (Fig. 17B)、この低下は投与期間中は維持されていた (Fig. 17A, B)。対照群と各 TAK-700 投与群の間の DHEA 濃度の差は、最終投与日の午後 2 時において有意であった (Fig. 17A)。また、対照群においても若干の血清 DHEA 濃度の低下が観察された。

対照群において血清 cortisol 濃度も投与前および投与期間中日内変動を示した (Fig. 17D)。TAK-700 経口投与群 (3, 7.5 あるいは 15 mg/kg 1 日 2 回) における血清 cortisol 濃度は、投与前及び投与期間中、同様な日内変動を示したが、cortisol 濃度の絶対値と日内変動の大きさは投与によって減少し、投与期間中、低値を維持した (Fig. 17C および D)。3, 7.5 及び 15 mg/kg の TAK-700 を 1 日 2 回投与した群における平均血清中 cortisol 濃度は、投与前の平均血清 cortisol 濃度のそれぞれ 46.5%, 28.1% 及び 23.6% であり、本実験で血清 DHEA 濃度でみれた低下よりも軽度であった (Fig. 17A, C)。対照群と各 TAK-700 投与群の間の cortisol 濃度の差は、最終投与日の午後 2 時において有意であった (Fig. 5C)。対照群の血清 cortisol 濃度も DHEA 濃度と同様にわずかな低下が観察された。

対照群における血清 testosterone 濃度も同様に日内変動を示した (Fig. 17F; Okamoto 1971)。しかし、血清中 DHEA 濃度の日内変動と比べて顕著なものではなかった (Fig. 17B)。単回経口投与試験の成績と一致して、TAK-700 は投与初日(day 0) にはすべての投与量で血清中 testosterone 濃度を強く低下させた (Fig. 5E)。しかし、血清中 DHEA 濃度と異なり、testosterone 濃度低下作用は投与期間中徐々に減弱していった (Fig. 17E)。これは本実験において視床下部-下垂体-性腺におけるフィードバック機構が活性化されたことを反映しているものと考えられる (Fig. 17E, F; Davidson 1973, Freeman 1989)。対照群と TAK-700 の 7.5 mg/kg 投与群の間でのみ最終投与日の午後 2 時の testosterone 濃度に有意差がみられた (Fig. 17E)。

以上、TAK-700 は、反復経口投与期間中、血清 DHEA 濃度、血清 cortisol濃度及び血清 testosterone 濃度を低値に保った。その低下作用は血清 DHEA 濃度において最も顕著であった。カニクイザル副腎浮遊細胞における DHEA 及び cortisol 産生阻害の間には約 2.8 倍の選択性しか存在しないが、この程度の選択性でも血清 DHEA 濃度低下の程度は血清 cortisol 濃度低下の程度より大きかった。ヒトの細胞系においてはさらに高い選択性が認められているので、臨床においてはカニクイザル以上の血清 DHEA 濃度及び血清 cortisol 濃度低下作用の選択性が期待できる。



**Fig. 17. Impact of multiple oral dosing of TAK-700 in male cynomolgus monkeys .**

Impact of TAK-700 on serum levels of dehydroepiandrosterone (DHEA) (A, B), cortisol (C, D), and testosterone (E, F). Dosing and sampling is described in Materials and Methods. Serum levels of DHEA, cortisol, and testosterone were determined by specific radioimmunoassay (RIA). Only the steroid levels at 2 pm are shown in A, C and E. Each value represents mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM [n=5]). bid = twice daily, \*P $\leq$  0.05 vs. the vehicle control group by Steel's test.

### 5.3 去勢雄性カニクイザルの血清ステロイドホルモン濃度に対するTAK-700の1 週間 反復経口投与の影響

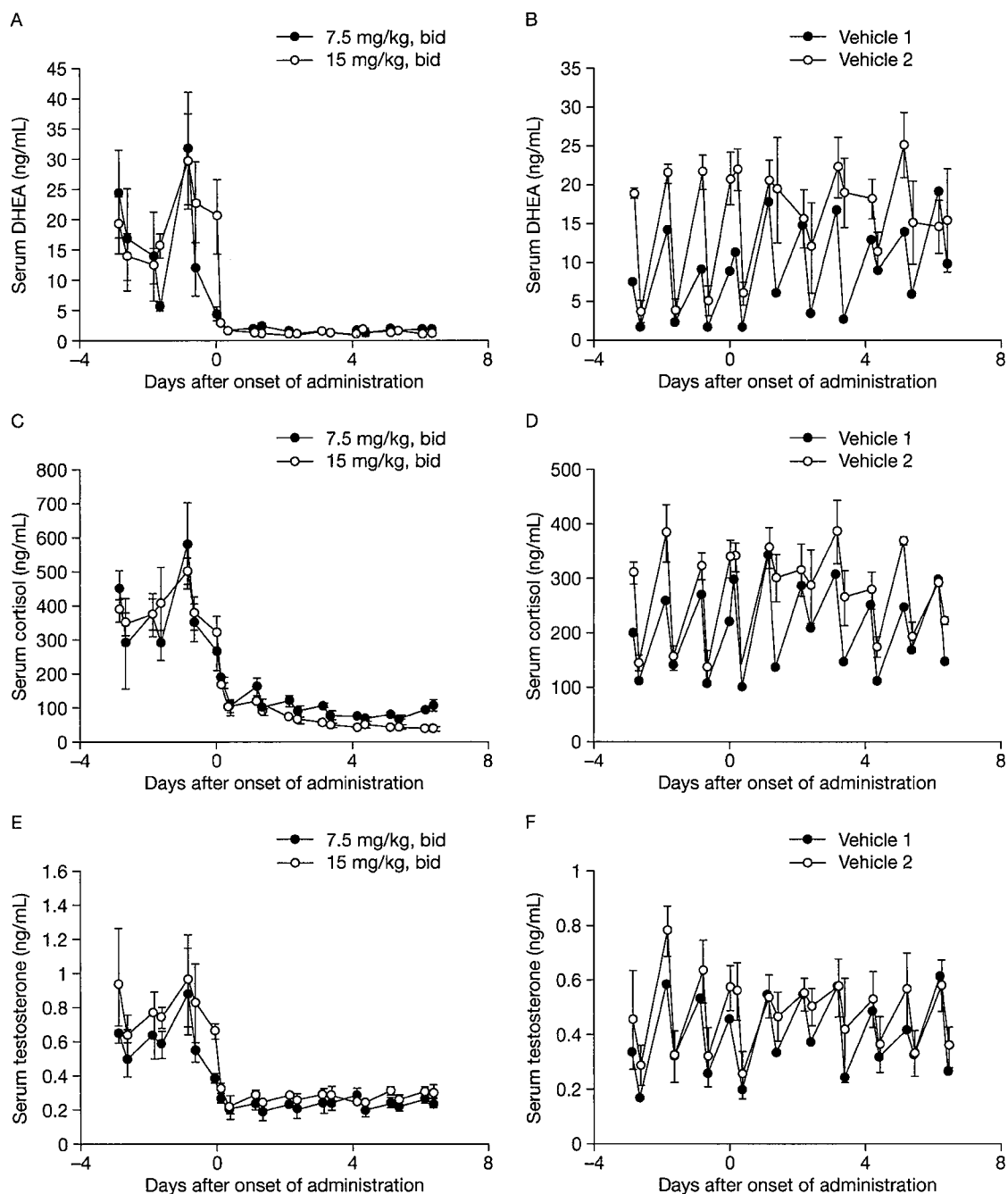
去勢は精巣由来の testosterone を除去することができるが DHEA 及び cortisol 濃度には影響を与えない。CYP17A1 の 17,20-lyase 活性により産生される DHEA は副腎外で testosterone に変換される。したがって去勢は性腺外で産生される testosterone 産生を変化させることができない。17, 20-lyase 活性を阻害することにより、TAK-700 は効果的に DHEA の濃度を低下させ、性腺外における testosterone の産生を停止させることが期待される。この可能性を評価するために去勢した雄性カニクイザルの血清ステロイドホルモン濃度に対する TAK-700 の影響を検討した。このモデルは外科的に、あるいは薬物により去勢した CRPC 患者のホルモン環境をよく模倣していると考えられる。

去勢カニクイザルに TAK-700 の 7.5 及び 15 mg/kg、1 日 2 回、7 日間反復経口投与すると、血清 DHEA 濃度はそれぞれ投与前の DHEA 濃度から 91.0%及び 93.1%抑制された。さらに去勢カニクイザルにおいて、この DHEA 濃度の低下は投与期間中維持された (Fig. 18A)。同じサルに TAK-700 投与後に溶媒を投与すると血清 DHEA 濃度は、非去勢雄カニクイザルで溶媒投与前、投与期間中観察された日内変動と同様のパターンの日内変動が観察された (Fig. 17B 及び 18A)。

本モデルにおいて、血清 cortisol濃度も 7.5及び15 mg/kg (1日2回) の TAK-700の投与開始後に低下した。7.5及び 15 mg/kg、1日2回の TAK-700を7日間投与した群の平均血清 cortisol濃度は、投与開始前の平均血清中 cortisol濃度からそれぞれ 74.0% 及び 82.7%低下し、この低値は投与期間中維持された (Fig. 18C)。溶媒を投与されたサルでは、予想通り、非去勢カニクイザルを用いた反復投与試験で観察されたものと同様の cortisol濃度の日内変動が観察された (Fig. 17D, 18C)。

去勢レベルの血清 testosteroneは TAK-700の7.5あるいは 15mg/kg、1日2回、7日間の投与によりさらに低下し、この非常に低い testosterone濃度 (0.2–0.3 ng/mL) は非去勢カニクイザルの場合と異なり投与期間中維持された (Fig. 18E)。この条件で効果が持続したことは非去勢カニクイザルの場合と異なり、血清 testosteroneは性腺由来ではなく、視床下部-下垂体-性腺経路による調節機構の支配下にもないことを反映していると考えられる。この去勢カニクイザルにその後溶媒を投与すると血清 testosterone濃度は 0.2と 0.8 ng/mL (Fig. 18F)の間で変動し、投与前及び期間中に DHEA濃度で見られた日内変動に類似した日内変動が観察された (Fig. 18B)。

以上、TAK-700 は去勢雄カニクイザルにおいて反復経口投与期間中血清 DHEA 濃度、血清 cortisol濃度及び血清 testosterone濃度を低値に保った。その低下作用は血清 cortisol濃度よりも血清 DHEA濃度に対してより強力であった。去勢雄性カニクイザルにおいて血清中の testosteroneは DHEAに由来するものと考えられるが、血清 testosterone濃度も血清 DHEA濃度の低下を反映して強く抑制された。TAK-700 と去勢との併用療法は去勢単独療法より強く血中 testosterone濃度を低下させることが示され、前立腺癌に対し顕著な効果を発揮することが期待できる。



**Fig. 18. Impact of multiple oral dosing of TAK-700 in castrated male cynomolgus monkeys.**

Impact of TAK-700 on serum dehydroepiandrosterone (DHEA) (A), cortisol (C), and testosterone (E) levels. Serum DHEA (B), cortisol (D), and testosterone (F) levels in castrated male cynomolgus monkeys treated with vehicle following multiple oral dosing of TAK-700. Serum levels of DHEA, cortisol, and testosterone were determined by specific radioimmunoassay (RIA). The monkeys in the vehicle 1 group had been previously treated with TAK-700 7.5 mg/kg twice daily (bid). The monkeys in the vehicle 2 group had previously received 15 mg/kg bid. Each value represents mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM [n=3]), except vehicle 1 group (mean, n=2); one monkey was omitted from the vehicle treatment experiment due to poor health.

## 考 察

多くの前立腺癌の増殖、生存及び浸潤は、去勢療法開始時においてはアンドロゲンに依存していることから去勢療法が標準療法となっている。去勢療法抵抗性癌へと進展した後も循環血中の副腎アンドロゲンあるいは cholesterol から de novo 合成されたアンドロゲン (Labrie 1995, Mostaghel 2007, Mostaghel 2008, Yamaoka 2010b) が前立腺癌の増殖と生存に重要な役割を担っていると考えられている。Montgomery らは、最近、ホルモン療法抵抗性前立腺癌の転移巣において 17, 20-lyase 発現の亢進が起こっており、それが癌組織中でのアンドロゲン合成を可能とし、ホルモン療法抵抗性癌が生存し続けるに必要なアンドロゲンを供給している可能性を報告している (Montgomery 2008)。さらに DHEA 投与がアンドロゲン療法抵抗性前立腺癌 xenograft のヌードマウスにおける増殖を促進するという報告 (Hara 2003a) もある。したがって副腎あるいは癌組織におけるアンドロゲンの産生を阻害する治療薬は単剤あるいは去勢療法と組み合わせることで去勢療法抵抗性癌に効果を示す可能性が想定される。アンドロゲン生合成の必須酵素は 17, 20-lyase である。

TAK-700 は新規の非ステロイドの低分子化合物であり、CYP17A1 の 17, 20-lyase 活性を選択的に阻害するようにデザインされたものである (Kaku 2011)。この化合物の評価と開発の一環として TAK-700 の生化学的評価とともにカニクイザルとヒト副腎腫瘍細胞の系で *in vitro* 及び *in vivo* 薬理効果の評価を行った。酵素アッセイにおいて TAK-700 はカニクイザル副腎の 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase 活性に対して abiraterone に匹敵する強い阻害活性を示した。カニクイザル 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase 活性阻害強度がほぼ同じであることから、カニクイザルにおいて DHEA 及び cortisol 産生における選択性が低い可能性が予想される。TAK-700 によるカニクイザル 17, 20-lyase 及びカニクイザル 17-hydroxylase 活性の IC<sub>50</sub> 値の比は 27 nM : 38 nM (約 1 : 1.4) であるのに対してヒト酵素に対しては 140 nM : 760 nM (約 1 : 5.4) の IC<sub>50</sub> 値の比であり、さらに細胞系では、サル副腎浮遊細胞の DHEA 産生及び cortisol 産生の IC<sub>50</sub> 値が、それぞれ 110 nM 及び 310 nM であったのに対して、ヒト副腎腫瘍細胞では DHEA 産生及び cortisol 産生の IC<sub>50</sub> 値が、それぞれ 37 nM 及び 990 nM であった。したがって、サルに比較してヒトにおいては 17-hydroxylase に対する阻害が弱く、血中 cortisol 濃度に対する影響が小さいことが期待できる。一方、abiraterone はヒト 17, 20-lyase と 17-hydroxylase に対する阻害の IC<sub>50</sub> 値の比は 27 nM : 30 nM (約 1 : 1.1) であることから、TAK-700 に比較して選択性が低く、17-hydroxylase 活性に対する影響が大きいことが予想される。さらに abiraterone は cortisol 産生を 23 nM の IC<sub>50</sub> 値で強力に抑制し、その阻害は非可逆的であることが示されている。以上の結果と一致して、臨床第 1/2 試験の成績では、TAK-700 の単剤投与は testosterone の低下作用が認められる用量 (300 mg、1 日 2 回) で临床上意味のある cortisol の濃度低下は認められていない (Dreicer 2010)。一方、abiraterone を単剤で投与すると血清中 cortisol 濃度は半分に低下することが報告されている (Folkerd 2009, Ryan 2010)。しかしながら TAK-700 の 17, 20 lyase 活性及び 17-hydroxylase 活性の阻害の差が临床上意味を持つことを明確に示すには更なる検討が必要であ



と思われる。一般にグルココルチコイド活性が低下すると副腎不全という症状を惹起する。低血糖、脱水、体重減少や見当識障害などの症状が現われ、ストレス対応が十分でなくなることが知られている。17-hydroxylase が阻害されると血中の cortisol 濃度が低下するが、feedback 機構が働き、cortisol 産生を促進するために ACTH が分泌される。その状態で 17-hydroxylase を阻害する状態が続くと progesterone が蓄積し、それから変換された dehydrocorticosterone や corticosterone の濃度が上昇する。corticosterone はグルココルチコイド活性を有しているため corticosterone によりグルココルチコイド活性が部分的に代償される。ちなみに齧歯類では cortisol は産生されず、corticosterone が主用なグルココルチコイドである (Touitou 1990)。一方で dehydrocorticosterone や corticosterone は mineralocorticoid 活性を持っているので血圧上昇と低カリウム血症が発症する。これを防ぐには prednisone を投与してグルココルチコイド活性を補充するか mineralocorticoid 受容体の拮抗薬である eplerenone の投与が必要である。遺伝的に 17,20-lyase/ 17-hydroxylase 活性を欠損した患者が存在するが、この患者は仮性半陰陽と高血圧の症状を示す (Auchus 2001)。しかしながら生存には問題ないので feedback が正常に保たれた患者の場合は副作用の重篤度は低いと考えられる。抗真菌薬である ketoconazole は CYP17A1 を阻害することから CRPC に対してしばしば臨床で使用されてきた (Small 2004) が、酵素阻害に関して選択性ははるかに低い。11-hydroxylase 活性は、cortisol 及び corticosterone 産生に必須であるが testosterone 産生には必要ではない。TAK-700 のこの酵素に対する阻害活性は abiraterone あるいは ketoconazole のそれと比較して明らかに低いことから、TAK-700 が血清中アンドロゲンを低下させる用量でグルココルチコイド産生に与える影響はより小さいことが示唆された。

カニクイザル副腎浮遊細胞を用いた *in vitro* 試験から DHEA 及び androstenedione 産生は cell-free 酵素アッセイ系で得られた IC<sub>50</sub> 値とほぼ同等の IC<sub>50</sub> 値で阻害することが示された。Aldosterone の産生は高濃度の TAK-700 で抑制され、corticosterone 及び progesterone の産生は TAK-700 により増加した。Progesterone 産生の上昇は 17-hydroxylase 活性の阻害による基質の蓄積に起因し、この蓄積によって corticosterone 濃度が上昇したと考えられる。これらの成績は、11-hydroxylase 活性が corticosterone 産生に必要であり、カニクイザルにおいて TAK-700 の 11-hydroxylase 及び aldosterone synthase に対する阻害作用が 17, 20-lyase 阻害作用より弱いことを示唆している。一方、ketoconazole は DHEA、androstenedione、cortisol 及び aldosterone 産生を同等の IC<sub>50</sub> 値で阻害していることから、ketoconazole は 11-hydroxylase、21-hydroxylase 及び側鎖切断 (side chain cleavage; SCC) 酵素の活性も強く阻害していることが考えられる。これらの結果は TAK-700 が ketoconazole に比較して CYP17 活性をより強力かつ選択的に阻害することを示唆している。

予備的な試験で、TAK-700 がヒト 3 $\beta$ -HSD 活性を抑制しないことを確認している。この観察と一致してサル副腎浮遊細胞における DHEA と androstenedione の産生の濃度反応曲線はほぼ同一で、TAK-700 による 3 $\beta$ -HSD 活性阻害はあったとしてもごくわずかであることを示唆している。17 $\beta$ -HSD には多くの isoform があるため 17 $\beta$ -HSD 活性阻害の検討を行っていない。ラット精巣浮遊細胞を用

いた実験において、TAK-700 は androstenedione 合成を testosterone 合成より強く抑制したので、TAK-700 によるこの変換に関わる 17 $\beta$ -HSD 活性の阻害はあったとしてもわずかであると考えられる。

TAK-700 は、経口投与で良好な bioavailability (BA) 値を有することが報告されている。0.3 – 10.0 mg/kg の範囲の用量で単回単剤投与された TAK-700 はカニクイザル血清 DHEA 濃度を低下させた。血清 DHEA 濃度は投与後約 48 時間まで対照群のレベルまで回復しなかった。正常カニクイザルに対する反復投与試験において血清 DHEA 濃度は持続的に抑制されるものの血清 testosterone 濃度の抑制は次第に減弱した。フィードバックによる LH 分泌の亢進が示唆された。TAK-700 の 1 mg/kg、単回投与 24 時間後には testosterone 濃度は投与前の濃度を上回った。これもフィードバックにより LH 分泌量が増加した結果であると考えられる。さらに去勢カニクイザルにおける反復投与試験では DHEA 濃度のみならず DHEA から変換されたと考えられる testosterone 濃度も投与期間中持続的に抑制された。これらの結果から、TAK-700 の効果を最大限に発揮するためには去勢と組み合わせることが望ましいと考えられる。

前立腺全摘術後の再発例において去勢療法が薬物療法の中心となってきたが、前立腺癌がこの療法に抵抗性を獲得することを避けることができないのが現状である。この抵抗性獲得に関していくつかのメカニズムが想定されている (Edwards 2003, Holzbeierlein 2004, Chen 2004, Veldscholte 1990, Schuurmans 1990, Elo 1995, Hara 2003b, Yoshida 2005, Tan 1997, Montgomery 2008, Locke 2008) が、外科的あるいは薬物による去勢療法後の前立腺癌の進展を循環血中のアンドロゲンが支えていることが一般的に支持されている。したがって去勢療法後に残存する testosterone を低下させることは CRPC に対する効果的な治療法となりうると考えられる。現在、残存するアンドロゲンの作用を遮断するために去勢療法に加えて抗アンドロゲン薬の bicalutamide が投与されることがある。しかしながら bicalutamide による治療は、多くの場合 AR あるいは AR cofactor の発現上昇 (Chen 2004, Feng 2009, Fuse 2007)、あるいは AR の変異 (Hara 2003b, Yoshida 2005) により抵抗性発現を招くことが知られている。CYP17A1 の 17, 20-lyase 及び 17-hydroxylase の両活性を阻害するステロイド性化合物である abiraterone acetate の良好な臨床第 1/2 相試験成績から (Ryan 2010, Danila 2010, Reid 2010)、かなりの部分の CRPC の進展は性腺外で産生されたアンドロゲンに依存している可能性が示された (Attard 2009, de Bono 2011, Ang 2009, Shah 2010)。本研究により、TAK-700 がその強い活性と酵素選択性により去勢後に残存するアンドロゲンを低下し、それによって CRPC の進展を抑制する新しい治療戦略になる可能性がある。また TAK-700 は他の CYP 酵素である薬物代謝酵素に対する阻害も非常に低いので、薬物相互作用も低く、使用しやすい薬剤になる可能性がある。

本研究から、TAK-700 は 17, 20-lyase 活性を選択的にかつ可逆的に阻害することで精巣及び副腎からのアンドロゲン産生を阻害し、ラットの実験からアンドロゲン依存的臓器の重量を低下させる一方、副腎におけるステロイド産生に与える影響は非常に小さいことが示された。本研究の結果は TAK-700 がホルモン感受性前立腺癌及び CRPC に対して効果的な治療法となる可能性を示唆している。

## 第2章 TAK-700によるエストロゲン合成の阻害

### 実験方法

#### 1) 化合物

TAK-700及び anastrozoleは武田薬品工業株式会社で合成された。Ketoconazole及び他の化合物は試薬グレードのものを購入した。

#### 2) 細胞

ヒト絨毛膜癌株 JEG-3細胞は ATCCから購入し、1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM 非必須アミノ酸、10% 牛胎児血清を添加したEagle's MEM培地で培養した。JEG-3細胞は progesteroneを産生し、前駆体から estrone及び estradiolを産生することができる (Bahn 1981)

#### 3) 動物

雌性 Wistar-Imamichiラットは 5週齢で動物繁殖研究所から購入した。25℃に温度管理され、14時間の明期と10時間の暗期の明暗サイクル (5時点灯) に設定された飼育室で飼育した。餌と水を自由摂取させた。雌性カニクイザルは 2.6–4.35kgの体重の個体をケアリ社から購入した。23±2℃に温度管理され、12時間の明期と 12時間の暗期の明暗サイクル(7時点灯)に設定された飼育室で飼育した。

#### 4) JEG-3細胞のステロイド産生の測定

JEG-3細胞を 100,000 細胞/ウェルの密度で 2.5% Nu-Serum 1および 1% ITS-plusを含む D-MEM/F-12培地を用いて24穴プレートに播き、翌日 1% ITS-plusを含む D-MEM/F-12培地で2回洗浄後、種々濃度 (TAK-700; 10–10,000 nM, ketoconazole; 10–10,000 nM, anastrozole; 1–1000 nM) と 1% ITS-plusを含む D-MEM/F-12培地に交換した。estradiol産生実験ではさらにtestosteroneを10 nM添加した。24時間後に培地を回収し、estradiolおよびprogesterone濃度をRIAで測定した。

#### 5) 下垂体摘出雌性ラットにおける各種ステロイド産生の測定

下垂体を摘出した 6週齢 Wistar-Imamichi ラットを 1群が 7匹となるように vehicle (0.5% methylcellulose)投与群、TAK-700の3 mg/kg 投与群、30 mg/kg 投与群、300 mg/kg 投与群及び aromatase 阻害薬 anastrozole 0.1 mg/kg 投与群の 5群に分けた。Estradiol産生系に対する影響を調べる試験では、human chorionic gonadotropin (hCG, 50 IU/kg)及び human serum gonadotropin (hSG, 50 IU/kg)を1週間連日皮下投与し、翌日 TAK-700及び anastrozoleの経口投与2 時間後にhCG (50 IU/kg) 及び hSG (50 IU/kg)を静脈内投与し、さらに2 時間後に採血を行った。コルチコイド産生系に対する影響を調べる試験では TAK-700の経口投与 3時間後にACTH (200 ng/kg) を静脈内投与し、さらに 1時間後に採血した。血清 estradiol、testosterone、androstenedione、corticosterone、aldosterone 及び progesterone 濃度は RIAにより測定した。なお TAK-700はラット酵素阻害活性及びラット浮遊精巣細胞の testosterone産生阻害活性がサル、ヒトの場合より弱いことから投与量を高めに設定した。

#### 6) 正常雌性カニクイザルの性周期における estradiolの一過性上昇

TAK-700の投与を開始する前に連続して3 回正常に性周期を示すことを確認した5–6 歳雌カニク

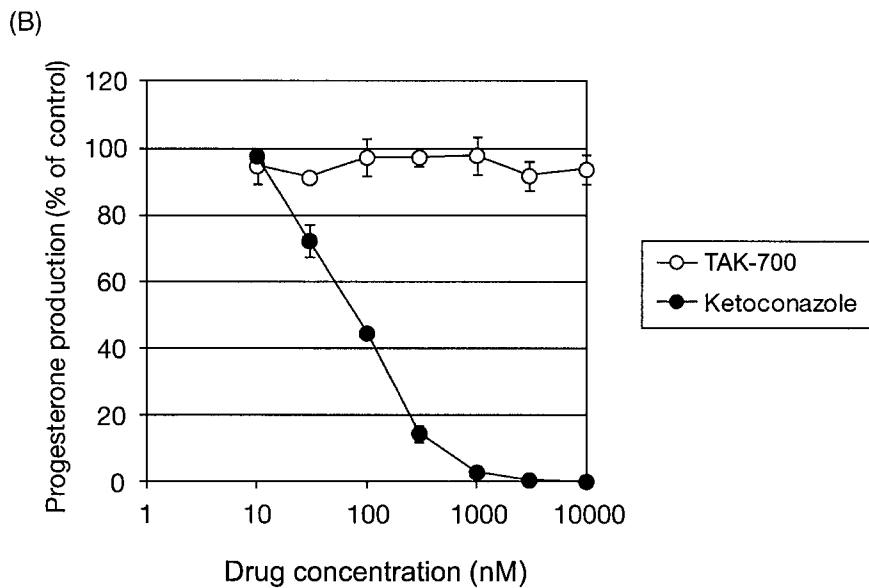
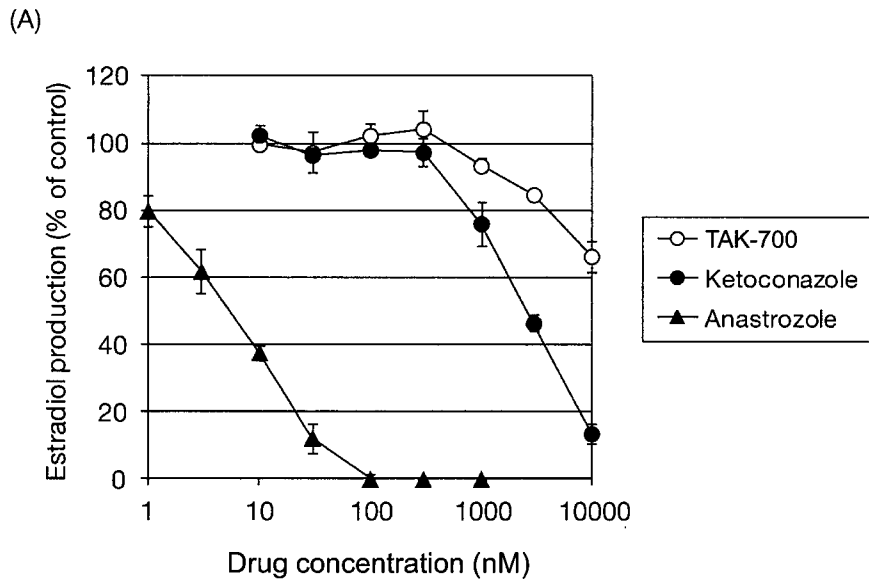
イザルを 1群が 3匹となるように vehicle (0.5% methylcellulose)投与群、TAK-700の7.5 mg/kg/回、1 日 2 回投与群及び anastrozole 0.1 mg/kg/回、1 日2 回投与群の3 群に分けた。黄体期の最初の日にはRIA でモニターしている血清 progesterone濃度が一旦 0.3 ng/mL 以下に低下した後2 回以上続けて 0.5 ng/mL 以上になった最初の日と定義した。投与は黄体期開始10 日後から開始し、投与前3 回の平均性周期の1.5 倍の期間反復経口投与した。採血は週に3 回行い、血清 estradiol及び progesterone濃度をRIA により測定した。

## 実験結果

### 1. JEG-3細胞を用いた aromataseに対する TAK-700の阻害効果の評価

TAK-700がヒト aromataseを直接的に阻害するか否かについて検討した。ヒト絨毛膜癌細胞株の JEG-3細胞は、de novo合成により progesteroneを産生し、aromataseの働きで testosterone から estradiolを産生することができる (Bahn 1981)。

TAK-700は estradiol産生をわずかに抑制したが、そのIC<sub>50</sub>値は 10,000 nM以上であった (Fig. 19A, Table 2)。Ketoconazoleによる estradiol産生抑制は TAK-700による産生抑制よりわずかに強く (Fig. 19A)、その IC<sub>50</sub>値は 2,600 nM (95% CI; 2,500 - 2,800 ; Table 2)であった。一方、aromatase阻害薬である anastrozoleはすでに報告されている通り JEG-3細胞における estradiol産生を 5.3 (CI: 4.7 - 6.0, Fig. 19A ; Table 2) nMの IC<sub>50</sub>値で強力に抑制した (Bhatnagar 2001)。Estradiolは aromataseにより testosteroneから変換されるので TAK-700は非常に高い濃度でのみ aromataseを阻害すると考えられる。TAK-700は 10,000 nMの濃度まで JEG-3細胞の progesterone産生を抑制しなかった。一方、ketoconazoleは progesteroneの産生を 94 nM (CI; 70 - 120)の IC<sub>50</sub>値で抑制した (Fig. 19B, Table 2)。



**Fig. 19. Dose-response of inhibition of estradiol and progesterone by TAK-700, ketoconazole, and anastrozole in JEG-3 cells**

JEG-3 cells were seeded in 24-well plates at a density of 100,000 cells/0.5 mL of D-MEM/F-12 medium supplemented with 2.5% Nu-Serum I and 1% ITS-plus /well at day 0, and cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> /atmosphere. At day 1, the medium was changed to a new D-MEM/F-12 medium supplemented with 2.5% Nu-Serum I, 1% ITS-plus. At day 1, after the cells were washed twice, 500µL of D-MEM/F-12 medium containing 1% ITS-plus and varying concentrations of the compounds was added to the cells. In the estradiol production experiment, 10 nM testosterone was added to the culture. The medium was collected 24 h later and concentrations of estradiol and progesterone were assayed with specific RIA kits. (A) inhibition of estradiol production, (B) inhibition of progesterone production. *N* = 3.

**Table 2. Inhibition of estradiol and progesterone by TAK-700, ketoconazole, and anastrozole in JEG-3 cells**

	IC <sub>50</sub> values (nM) (95% CI)		
	TAK-700	Ketoconazole	Anastrozole
Estradiol	>10,000	2,600 (2,500–2,800)	5.3 (4.7–6.0)
Progesterone	>10,000	94 (70–120)	–

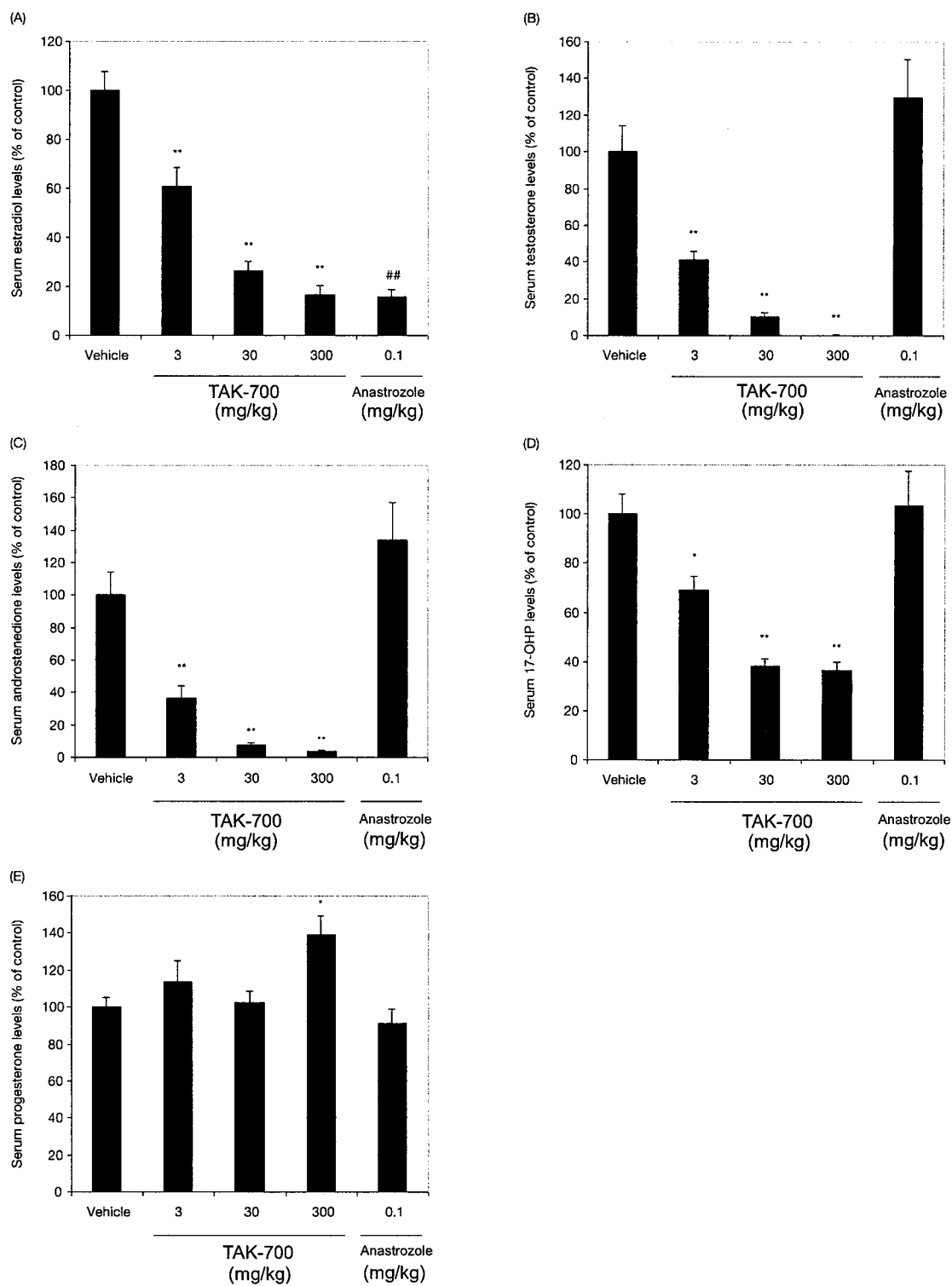
IC<sub>50</sub> and 95% CI were calculated using SAS software over the descending linear portion of the log dose-inhibition curves (the mean control values were taken as 100%). For this calculation, more than three points that included two points in both sides of 50% in the dose-inhibition curve and gave the best r<sup>2</sup> value were selected.

## 2. 雌性ラットの血清ステロイドホルモン濃度に対するTAK-700の作用

hCG及び hSGで刺激した下垂体摘出雌ラットにおいて、TAK-700は 3, 30及び 300 mg/kgの投与量で有意かつ用量依存的に血清 estradiol濃度 (Fig. 20A)、testosterone濃度 (Fig. 3B)、androstenedione濃度 (Fig. 20C)及び17-hydroxyprogesterone濃度 (Fig. 20D)を低下させた。TAK-700は 300 mg/kgの用量で anastrozoleと同程度まで血清 estradiol濃度を抑制した (Fig. 20A)。また TAK-700は 300 mg/kgの用量で progesterone濃度を増加させた (Fig. 20E)。これらの結果は TAK-700が下垂体摘出雌ラット卵巣の CYP17A1活性を抑制したことを示唆している。Anastrozoleは血清 estradiol濃度のみを低下させたことから (Fig. 20A)、雌ラット卵巣の aromatase活性を選択的に阻害したことが示唆された。一方、ACTHで刺激した下垂体摘出雌ラットにおいて血清 aldosterone、corticosterone及び progesterone濃度は、TAK-700のすべての投与群で有意な変化が認められなかった (Fig. 21A-C) が、corticosterone濃度は低下の傾向がみられた (Fig. 21A)。Anastrozoleは、300 mg/kgの TAK-700と同様に血清 corticosterone濃度を有意に抑制した (Fig. 21A)。しかし、corticosterone 濃度低下の程度は TAK-700の場合もanastrozoleの場合も estradiol 濃度低下の程度に比較すると小さいものであった (Fig. 21A)。

以上、TAK-700は、CYP17A1活性を選択的に抑制し、下垂体摘出雌ラットにおいて anastrozoleと同程度まで血清 estradiol濃度を抑制する作用があることが示された。

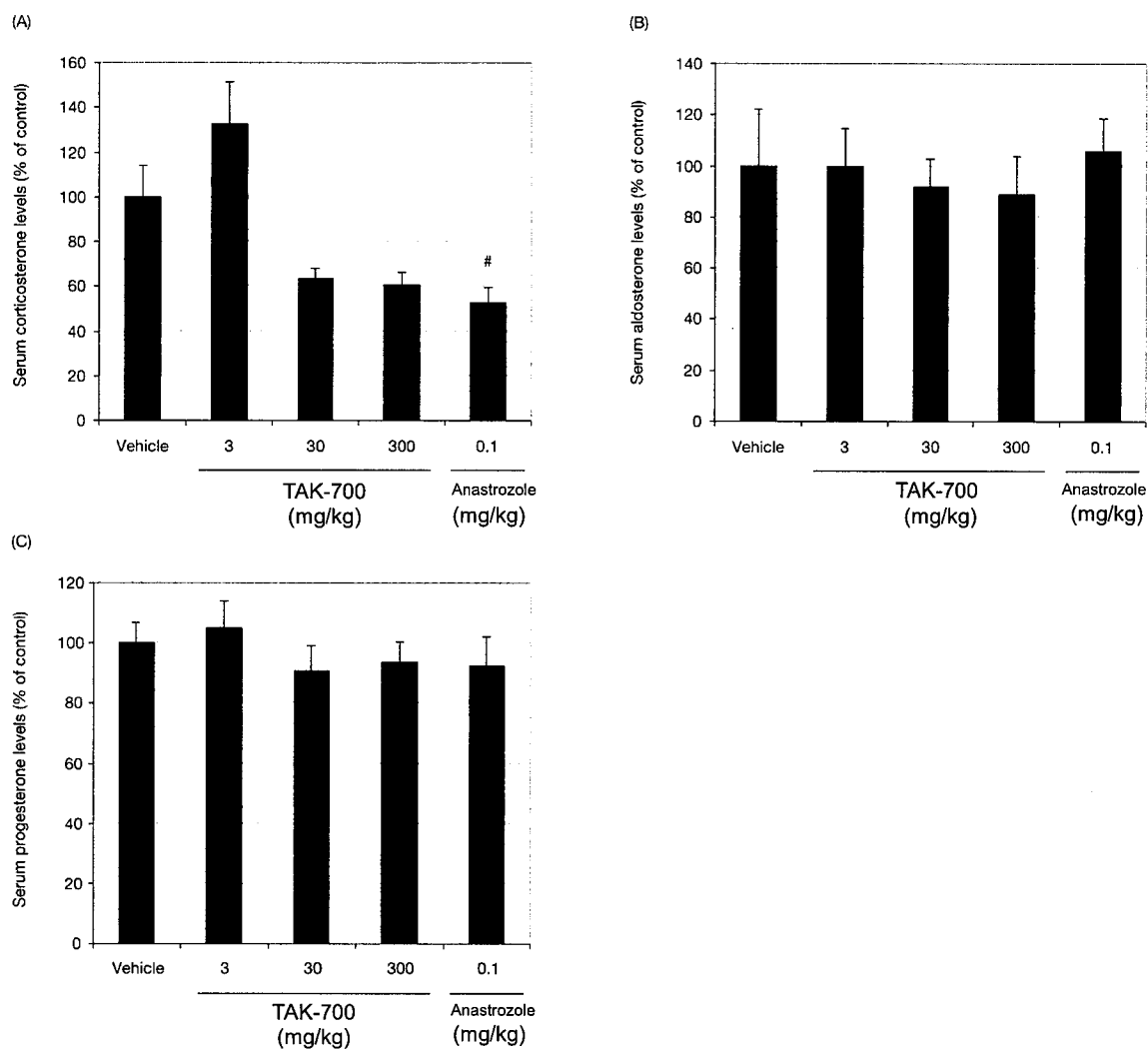




**Fig. 20. The effect of TAK-700 and anastrozole on estrogen-synthesis pathway in hCG and hSG-injected hypophysectomized female rats.**

hCG and hSG was injected 2 h after the administration of TAK-700, and blood was drawn 2 h later to measure

the serum estradiol (A), testosterone (B), androstenedione (C), 17-hydroxyprogesterone (D), and progesterone (E) levels. The serum estradiol, testosterone, androstenedione, 17-hydroxyprogesterone and progesterone levels in the vehicle-control group were  $270 \pm 21$  pg/mL,  $1.1 \pm 0.15$  ng/mL,  $1.3 \pm 0.18$  ng/mL,  $2.5 \pm 0.20$  ng/ml, and  $22 \pm 1.2$  ng/mL, respectively. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 7$ . \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$  versus the vehicle-control by Dunnett's test. ##:  $p \leq 0.01$  versus the vehicle-control by unpaired Student's t-test.



**Fig. 21. The effect of TAK-700 and anastrozole on corticoid-synthesis pathway in ACTH-injected hypophysectomized female rats.**

ACTH was injected 3 h after the administration of TAK-700, and blood was drawn 1 h after the ACTH injection to measure the serum corticosterone (A), aldosterone (B), and progesterone (C) levels. The serum corticosterone, aldosterone and progesterone levels in the vehicle-control group were  $140 \pm 20$  ng/mL,  $230 \pm 50$  pg/mL, and  $45 \pm 3.2$  ng/mL, respectively. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 7$ . No significant differences were observed between the vehicle-control versus the TAK-700-treated groups by Dunnett's or Steel's test. #:  $p \leq 0.05$  versus the vehicle-control by unpaired Student's t-test.

### 3. 雌性カニクイザルの血清エストラジオール濃度のTAK-700による低下作用

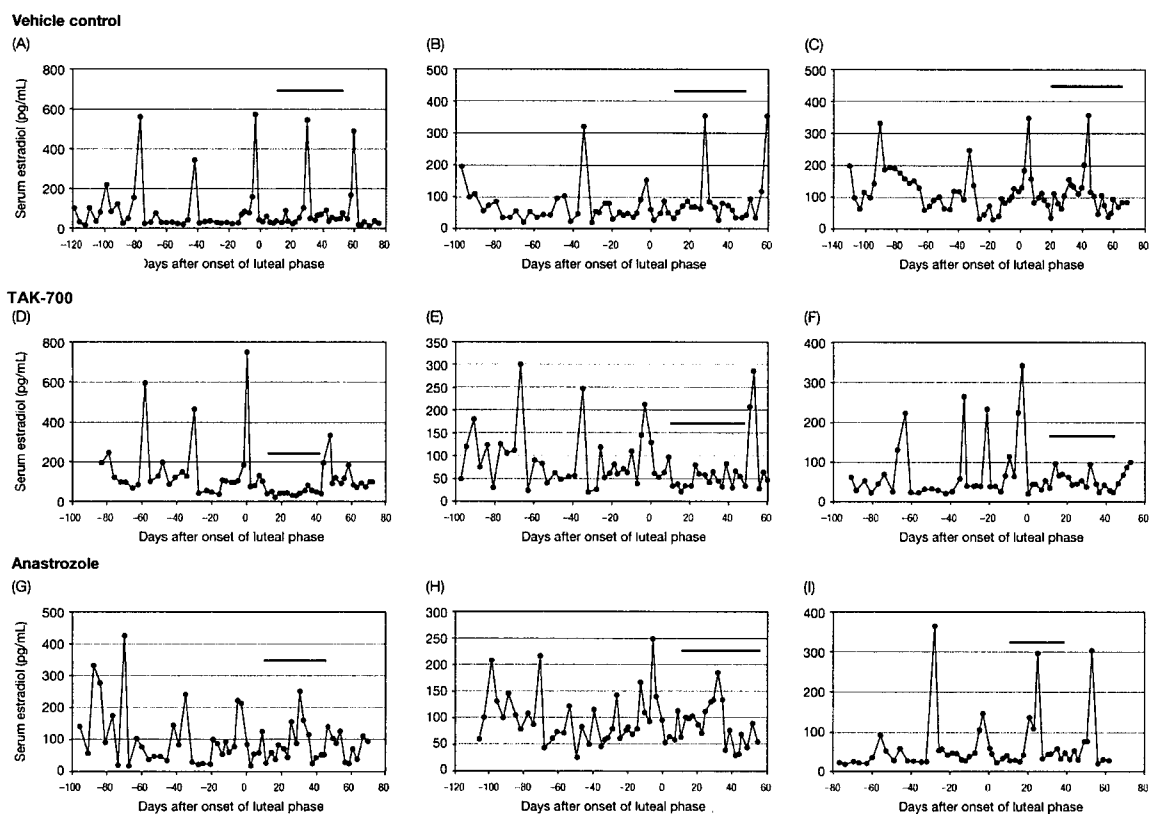
対照群に割り当てられた3頭の雌性カニクイザル (N-1179, N-1065 及び N-867)では正常な月経周期とステロイドホルモンの産生変化が投与期間中観察された。

雌性ザル N-1179 においては、投与前3サイクルにおける最大 estradiol 濃度は 557, 342 及び 573 pg/mL であり、投与期間中の最大 estradiol 濃度は 544 pg/mL であった (Fig. 22A)。投与前3サイクルの継続時間は 45, 35 および 39 日であり、そのうち黄体期はそれぞれ 15, 15 および 12 日であった (Fig. 23A)。投与期間中のサイクル継続時間は 30 日でそのうち黄体期は 15 日であった。対照群の他の2頭の雌性ザルも一般的に同様のステロイドホルモンの変化を示した (Fig. 22B-C, Fig. 23B-C)。

TAK-700 を投与した3頭の雌性ザルにおいて (N-1178, N-776 及び N-1173)、15 mg/kg/day (7.5 mg/kg/treatment, 1日2回)の TAK-700 は性周期の回転を抑制し、投与前の3回の性周期の平均継続時間の1.5倍の投与期間中 estradiol の血中濃度の上昇を抑制した (Fig. 22D-F, Fig. 23D-F)。TAK-700 は投与期間中血清 DHEA 濃度も抑制した (data not shown)。黄体期の開始前の estradiol の一過的な上昇は TAK-700 投与で完全に消失し、一方、血清 progesterone 濃度は、ほぼ黄体期のレベルに等しいレベルで維持された (Fig. 22D-F, Fig. 23D-F)。上昇した progesterone 濃度の一部は副腎由来と考えられる。臨床で流産を予防するために progesterone の筋肉内注射剤や膈用座剤が用いられているが、重篤な副作用の報告はない。したがって乳癌治療の目的であれば progesterone の上昇は許容されると考えられる。投与前3回の性周期の平均期間に基づく予想される estradiol の一過的な上昇の日はそれぞれ 28, 30 および 27 日となる (Fig. 5D-F)。TAK-700 の投与を中止するとただちに血清 estradiol 濃度が上昇するので estradiol 濃度の抑制効果は可逆的であると考えられる (Fig. 22D, F)。雌性ザル N-1178 においては、投与前3サイクルの最大 estradiol 濃度は 236, 587 および 455 pg/mL であり、投与期間中は 64.6 pg/mL であった (Fig. 22D)。他の2頭の TAK-700 投与群の雌性ザルも全体的には同様なステロイドホルモンの変化を示した (Fig. 22E, F; 23E, F)。

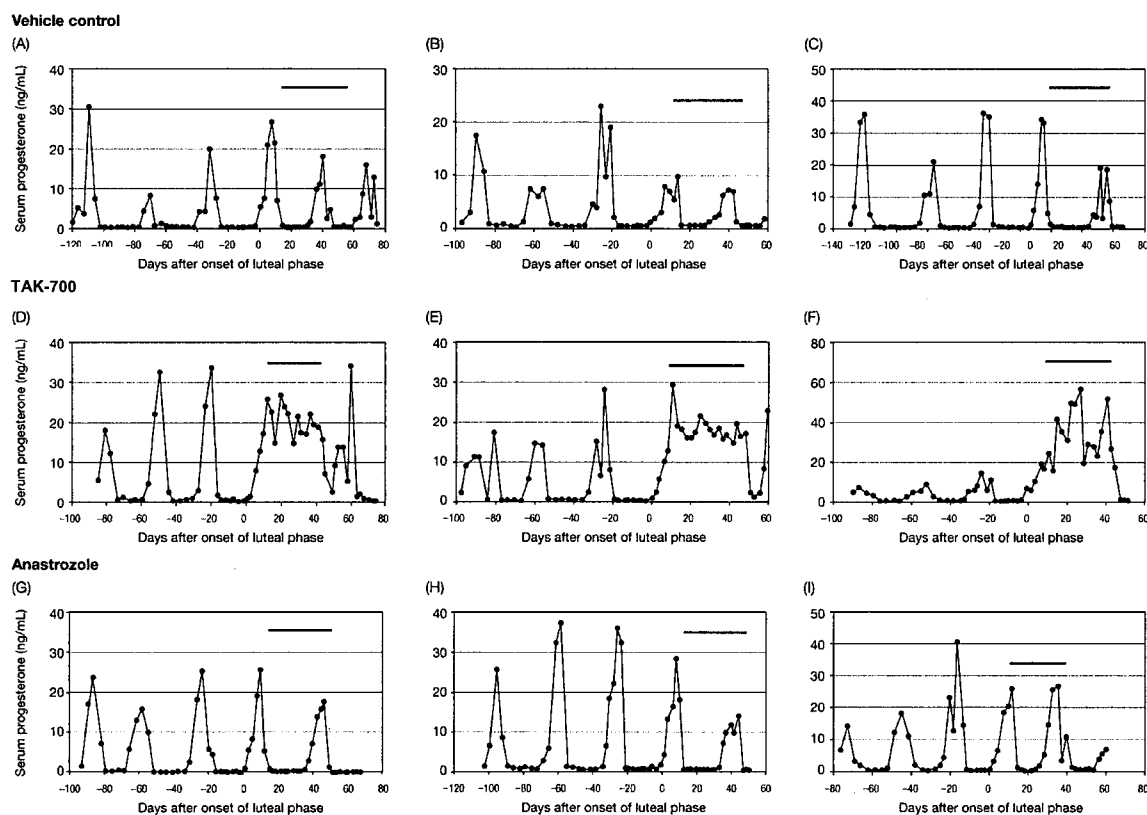
Aromatase 阻害薬である anastrozole の 0.2 mg/kg/day (0.1 mg/kg/treatment, 1日2回)投与では、性周期の遅延、estradiol の一過的な上昇の抑制は認められなかった (Fig. 22G-I)。以前の報告でこの投与量の anastrozole で未成熟雌ラットと雄ブタオザルのモデルで最大効果を示すことが報告されている (Dukes 1996)。しかしながら雌性ザルを用いた報告がなく、臨床においても閉経前乳癌が適応疾患になっていないことから estradiol の一過的な上昇を抑制するためにはさらに高い用量が必要なのかもしれない。雌性ザル N-770 において、投与前3サイクルの最大 estradiol 濃度は 417, 239 及び 219 pg/mL であり、anastrozole 投与期間中の最大 estradiol 濃度は 249 pg/mL であった (Fig. 22G)。投与前3サイクルの継続時間は 28, 35 及び 32 日で、そのうち黄体期はそれぞれ 12, 12 および 14 日であった (Fig. 22G 及び 23G)。投与期間中のサイクルの継続時間は 35 日で、そのうち黄体期は 15 日であった (Fig. 22G, 23G)。Anastrozole 投与群の他の2頭の雌性ザル (N-1060 及び N-1144)も全体的には同様なステロイドホルモンの変化を示した (Fig. 22H, I; 23H, I)。

以上、15 mg/kg/day (7.5 mg/kg/treatment、1日2回) の TAK-700 は、投与期間中黄体期開始に先立つ estradiol の一過的な上昇を抑制した。



**Fig. 22. Effect of TAK-700 and anastrozole on the serum estradiol levels in female cynomolgus monkeys.**

The serum estradiol levels in individual cynomolgus monkeys before, during, and after the treatment with vehicle (A, B, C), TAK-700 at 15 mg/kg/day (D, E, F) or anastrozole 0.2 mg/kg/day (G, H, I) were measured with a specific RIA kit. A: animal No. N-1179, B: animal No. N-1065, C: animal No. N-867, D: animal No. N-1178, E: animal No. N-776, F: animal No. N-1173, G: animal No. N-770, H: animal No. N-1060, I: animal No. 1144. The drug administration was initiated 10 days after the beginning of the luteal phase and continued for 1.5-fold length of the average durations of three consecutive menstrual cycles prior to the administration. The duration of the treatment is indicated with a horizontal bar.



**Fig. 23. Effect of TAK-700 and anastrozole on the serum progesterone levels in female cynomolgus monkeys.**

The serum progesterone levels in individual cynomolgus monkeys before, during, and after the treatment with vehicle (A, B, C), TAK-700 at 15 mg/kg/day (D, E, F) or anastrozole 0.2 mg/kg/day (G, H, I) were measured with a specific RIA kit. A: animal No. N-1179, B: animal No. N-1065, C: animal No. N-867, D: animal No. N-1178, E: animal No. N-776, F: animal No. N-1173, G: animal No. N-770, H: animal No. N-1060, I: animal No. 1144. The drug administration was initiated 10 days after the beginning of the luteal phase and continued for 1.5-fold length of the average durations of three consecutive menstrual cycles prior to the administration. The duration of the treatment is indicated with a horizontal bar.

## 考 察

乳癌は女性における癌死の最大の原因であり、乳癌に対する新たな治療薬の開発は重要な課題である。乳癌のうち 50 – 80%はその増殖と生存を ER シグナルに依存しているため、アンドロゲンの合成を抑制することによりエストロゲン合成を抑制するような薬剤は新たな治療薬となる可能性があると考えられる。第 1 章において TAK-700 が選択的にヒト CYP17A1、特にその 17, 20-lyase 活性を阻害することを明らかにしたので、第 2 章では TAK-700 のラットの血清中 estradiol 濃度に与える影響と雌性カニクイザルの血清 estradiol 濃度に与える影響を検討した。

JEG-3 細胞による estradiol 合成に対する TAK-700 の IC<sub>50</sub> 値は 10,000 nM 以上であり、一方、TAK-700 は NCI-H295R 細胞の DHEA 産生を 17,20-lyase 活性阻害により 37 nM の IC<sub>50</sub> 値で阻害した。TAK-700 の 17, 20-lyase 活性と aromatase 活性の阻害の間には約 25 倍の酵素特異性が存在すると考えられる。したがって TAK-700 が直接的に aromatase 活性を阻害して estradiol 産生を抑制する可能性は低いものと考えられた。本実験では TAK-700 は 10 μM まで progesterone の産生を阻害しなかった。これらの結果は、TAK-700 の 17, 20-lyase に対する選択性を裏付けるものである。

下垂体摘出雌ラットにおいて TAK-700 は血清 estradiol 濃度を anastrozole に匹敵する強度で抑制した。TAK-700 は血清 testosterone 及び androstenedione 濃度も用量依存的に低下させたが、progesterone 濃度は上昇させた。300 mg/kg の投与量は過剰なように見えるが、TAK-700 のラット 17, 20-lyase 活性に対する阻害は比較的弱く（ラット 17, 20-lyase 活性に対する TAK-700 の IC<sub>50</sub> 値は 1200 nM であり、ラット精巣浮遊細胞の testosterone 産生に対する IC<sub>50</sub> 値は 640 nM である）、またラットのモデルで CYP17A1 活性を完全に抑制するためには 30 mg/kg を超える投与量が必要であるという結果が本研究で得られている。これらのことからラットにはかなりの高用量が必要であると考えられた。TAK-700 がラットモデルでアンドロゲン産生を抑制した結果とは対照的に anastrozole は血清 estradiol 濃度のみを低下させた。ACTH で刺激した下垂体摘出ラットにおいて、いずれの投与量においても TAK-700 は血清 aldosterone、corticosterone 及び progesterone 濃度を有意に低下させなかった。しかし、有意ではないものの corticosterone 濃度の若干の低下が観察された。TAK-700 は 11-hydroxylase 活性を 10 μM の濃度まで抑制しないので、corticosterone 濃度の低下は 21-hydroxylase あるいは 11β-HSD 活性の軽度の抑制に基づくものかもしれない。しかしながら anastrozole も corticosterone 濃度を低下させるので corticosterone 濃度低下には未知のメカニズムが関与しているのかもしれない。齧歯類は副腎に CYP17A1 を発現していないので、この結果を臨床へ外挿することは困難であり、上述の結果は in vivo での酵素特異性を検証することに用いた。ラット副腎浮遊細胞では aldosterone 産生が corticosterone 産生よりも強く抑制されるデータが得られている。したがって corticosterone から aldosterone の変換に関わる酵素も高濃度の TAK-700 により阻害されている可能性がある。この雌性ラットのモデルでは、3 mg/kg の投与量でも 17-hydroxyprogesterone 濃度の有意な低下が認められ



ている。一方、基質である progesterone の蓄積は 300 mg/kg の投与で初めて認められた。

雌性ラットにおいて 300 mg/kg の TAK-700 を投与した時、testosterone 及び androstenedione の産生が estradiol の産生より強く抑制されたことは、長い半減期を持つ estradiol 前駆体が TAK-700 あるいは anastrozole 投与でも残存している estradiol 濃度維持に寄与しているのかもしれない。あるいは単に estradiol RIA の感受性に起因している可能性も否定できない。

以上の結果は、TAK-700 が下垂体摘出ラットの卵巣において CYP17A1 の活性を選択的に阻害していることを示唆している。

正常な性周期とステロイドホルモンの変動を持つ雌カニクイザルにおいて TAK-700 は投与前の性周期の 1.5 倍の期間黄体期に先立つ estradiol の一過性上昇を持続的に抑制した。Estradiol 濃度は投与終了後速やかに上昇したので、estradiol 濃度の抑制は可逆的である可能性が考えられる。雌性ザルの性周期に対する anastrozole の評価はこれまで行われていない。雄性ブタオザルにおいて anastrozole が estradiol 濃度を低下させることが報告されている (Dukes 1996) が、雌性カニクイザルを用いた本実験では estradiol の一過性上昇の抑制や性周期の変化は認められなかった。

2つの動物モデルで TAK-700 の効果が異なったのは、雌性ラットは下垂体除去を行っていたのでフィードバックの存在・非存在の違いに基づいているのかもしれない。霊長類とラットステロイド合成の経路は 17, 20-lyase の性質により異なっているので、サルにおける estradiol 産生の阻害がより臨床を反映していると考えられる。すなわち霊長類においては 17-hydroxyprogesterone から DHEA へ、さらに estrogen への変換が主要な経路であるのに対し、ラットでは 17-hydroxyprogesterone を介する経路が優勢であり (Miller 2011)、さらに齧歯類は副腎に CYP17A1 を発現していないことが知られている。

ER 陽性、AR 陽性乳癌に対するアンドロゲンの作用に関して多くの報告がなされているが、統一した見解が得られていない。アンドロゲンは ER が仲介する転写と ER 陽性乳癌細胞の増殖を抑制することが報告されており (Macedo 2006, Peters 2009)、AR の発現が良好な予後と相関するとされている (Peters 2009, Park 2011)。一方で、ER シグナルが遮断された場合乳癌細胞はその生存を AR シグナルに依存することが示唆されている (De Amicis 2010)。さらに副腎アンドロゲンとその代謝物が *in vitro* で直接 ER を活性化するという報告がある (Maggiolini 1999)。したがって現段階ですべての ER 陽性乳癌を対象とするのは適切ではないと考えられる。本研究において血清 progesterone 濃度が TAK-700 で上昇することが示された。同様に ER 陽性乳癌における progesterone の役割についても多くの報告がなされている。Progesterone の欠如が一部の女性において乳癌のリスク因子となっているとのエビデンスがある (Gambrell Jr 1987)。一方、いくつかの研究において、特に progesterone A 受容体を高発現している乳癌において細胞の増殖を促進し、細胞死を抑制することにより、progesterone が乳癌細胞数を増加することが示唆されている (Moore 2004, Lanari 2012)。17, 20-lyase 阻害薬による

治療により恩恵を受ける患者を選択するバイオマーカーの発見と臨床応用が必要であると考えられる。最近 ER 陰性かつ AR 陽性の乳癌のサブポピュレーションが腫瘍増殖をアンドロゲンシグナルに依存している可能性が報告された (Farmer 2005, Ni 2011)。このサブポピュレーションは “molecular apocrine” 乳癌と名づけられており、かなりの部分 PAM50 遺伝子発現シグニチャーで分類された Her-2 ポピュレーションと重なるということである (Ni 2011, Perou 2000, Sørlie 2001)。17, 20-lyase 阻害薬はこのサブポピュレーションの乳癌に対して効果を示す可能性がある。しかしながらこのサブポピュレーションに分類される細胞株は非常に限られているので、そのような細胞株を樹立して、その細胞株を用いて 17, 20-lyase 阻害薬の前臨床の評価をすることが喫緊の課題であると考えられる。

## 総 括

前立腺癌の大部分と乳癌の半分以上は、その増殖と生存をそれぞれアンドロゲンとエストロゲンに依存している。このため性ステロイドホルモンの作用を遮断するホルモン療法が薬物治療の中心に位置づけられてきた。しかしながらホルモン療法に対する耐性の出現を避けることができないことから別の治療選択肢が求められている。

前立腺癌の抵抗性のメカニズムとして、副腎アンドロゲンからの testosterone への変換、腫瘍における de novo 合成による testosterone 産生、AR 変異により副腎アンドロゲンの転写促進活性が上昇することなどがある。また乳癌の抵抗性のメカニズムとして、副腎アンドロゲン及びその下流のステロイドが ER に作用することや乳癌が AR を発現してアンドロゲンが増殖を促進するようになることなどがある。これらのメカニズムに対しては、精巣外でのアンドロゲン合成を阻害することが治療戦略になると考えられる。エストロゲンはアンドロゲンから合成されるので薬物のターゲット酵素としてアンドロゲン合成に必須の 17, 20-lyase が最適と考えられた。17, 20-lyase 活性は CYP17A1 が担っている。CYP17A1 は cortisol 合成に必須な 17-hydroxylase 活性も担っている。いくつかの報告から 17, 20-lyase 活性と 17-hydroxylase 活性に必要なコンフォーメーションに差があることが想定されたため、この両活性を区別できる化合物を探索した。加えてステロイド合成に関わる酵素や薬物代謝酵素の多くは CYP ファミリーに属するのでこれらに対する選択性もアッセイ系に加えて探索した。臨床候補として選択されたのが TAK-700(orteronel)である (Kaku 2011)。

TAK-700 は、in vitro 酵素アッセイ系でヒト 17, 20-lyase に高い選択性を示し、CYP ファミリーに属する薬物代謝酵素もほとんど阻害しなかった (Kaku 2011)。すべてのステロイド合成酵素に対する選択性を酵素アッセイで検討することは困難なので、本研究では、細胞レベル、個体レベルでステロイド合成酵素に対する選択性を薬効とともに検討した。得られた結果は、TAK-700 が 17, 20-lyase を in vitro 及び in vivo で 17, 20-lyase を選択的に阻害することが明らかとなった。ラット、サルモデルにおいても TAK-700 は血中アンドロゲンや estradiol 濃度を低下させた。霊長類のみが副腎アンドロゲンを産生するが、前臨床で副腎アンドロゲンを選択的 17,20-lyase 阻害薬が低下させるという報告はなく、選択的 17, 20-lyase 阻害薬が estradiol の産生を阻害するという報告もなく、世界で最初の報告である。抗癌薬としての臨床応用を目的としているので、本来は抗腫瘍試験も実施することが望まれるが以下の理由で困難であった。

- 1) TAK-700 はマウス 17, 20-lyase を阻害しない (Yamaoka 2010a) ため xenograft 試験が困難であった。
- 2) 臨床の前立腺癌、乳癌の特徴を保持した細胞株がほとんど存在しない。
- 3) サルで抗腫瘍試験は困難である。したがってホルモンに対する効果のみを検討した。

Enzalutamide の治療で比較的早期に抵抗性が発現し、in vitro でそのような細胞に対して abiraterone

が感受性を有することが報告されている (Hoefler 2016)。もしこれが CYP17A1 阻害に基づくものならば enzalutamide failure の患者をターゲットとする TAK-700 の臨床試験は可能であろう。Abiraterone は AR に親和性を持つが TAK-700 は親和性を持たないことをわれわれは見出している (未発表データ) ので abiraterone が enzalutamide 抵抗性細胞に効果を示すメカニズムが AR 拮抗作用である可能性がある。歴史的に抗アンドロゲン薬は、flutamide/nilutamide から bicalutamide、そして enzalutamide へと進化してきたが、そのすべてでは抗アンドロゲン薬がアゴニスト化する変異が報告されてきた。Flutamide/nilutamide では T877A 変異 (Veldscholte 1992, Fenton 1997)、bicalutamide では W741C/W741L 変異 (Hara 2003b, Yoshida 2005)、そして enzalutamide では F877L 変異 (Coleman 2016) がそれぞれの抗アンドロゲン薬がアゴニスト化する変異として報告されている。Abiraterone が AR に親和性を持つのであれば同様に abiraterone がアゴニスト化する変異が出現する可能性があり、そのような癌細胞に対しては abiraterone がアンドロゲンを低下させても abiraterone 自身が AR を刺激してしまう。このようなメカニズムを持つ abiraterone 抵抗性癌に対して TAK-700 は薬効を示す可能性がある。TAK-700 は abiraterone と比較して cortisol 低下作用が低く、prednisone を併用しない投与方法も可能性がある。Prednisone を投与しない治療の方が臨床では望まれており、患者のメリットは大きいと考えられる。また乳癌に対しても適切なバイオマーカーを見出すことができれば TAK-700 臨床試験を開始できることが期待される。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、摂南大学薬学部薬物治療学研究室教授、前田定秋先生に心より厚く御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、御討論、御指導いただきました武田薬品工業株式会社 日下雅美氏、原隆人氏、加来智弘氏、田坂昭弘氏に深謝いたします。本研究を援助くださった前武田薬品株式会社 宮本政臣氏に感謝いたします。また、実験にご協力くださった武田薬品株式会社 正木恒男氏、篠原寛美氏、秋永由美子氏、荒木秀夫氏、河野仁氏に感謝いたします。サルの試験は、株式会社新日本科学、株式会社ケアリーにご協力いただきました。記して謝意を表します。

## 引用文献

- Akhtar MK, Kelly SL, Kaderbhai MA**, Cytochrome b(5) modulation of 17(alpha) hydroxylase and 17-20 lyase (CYP17) activities in steroidogenesis, *J Endocrinol.* 187 (2005) 267-274.
- Ang JE, Olmos D, de Bono JS**, CYP17 blockade by abiraterone: further evidence for frequent continued hormone-dependence in castration-resistant prostate cancer, *Br J Cancer* 100 (2009) 671–675.
- Attard G, Reid AH, Olmos D, de Bono JS**, Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven, *Cancer Res.* 69 (2009) 4937–4940.
- Auchus RJ, Lee TC, Miller WL**, Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer, *J Biol Chem.* 273 (1998) 3158-3165
- Auchus RJ**, The genetics, pathophysiology, and management of human deficiencies of P450c17, *Endocrinol Metab Clin North Am.* 30 (2001) 101–119.
- Auchus RJ, Gupta MK**, Towards a unifying mechanism for CYP17 mutations that cause isolated 17,20-lyase deficiency, *Endocr Res.* 28 (2002) 443–447.
- Auclerc G, Antoine EC, Cajfinger F, Brunet-Pommeyrol A, Agazia C, Khayat D**, Management of advanced prostate cancer, *Oncologist* 5 (2000) 36-44.
- Bahn RS, Worsham A, Speeg Jr KV, Ascoli M, Rabin D**, Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells, *J Clin Endocrinol Metab.* 52 (1981) 447–450.
- Baum M**, The role of endocrine therapy in primary breast cancer, *J Steroid Biochem.* 36 (1990) 187–189.
- Bergerat JP, Ceraline J**, Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer, *Hum Mutat.* 30 (2009) 145-157.
- Bhatnagar AS, Brodie AM, Long BJ, Evans DB, Miller WR**, Intracellular aromatase and its relevance to the pharmacological efficacy of aromatase inhibitors, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 76 (2001) 199–202.
- Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Malin J, Mamounas EP, Rowden D, Solky AJ, Sowers MR, Stearns V, Winer EP, Somerfield MR, Griggs JJ**, American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline: Update on Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor–Positive Breast, *J Clin Oncol.* 28 (2010) 3784–3796.
- Cassidenti DL, Paulson RJ, Serafini P, Stanczyk FZ, Lobo RA**, Effect of sexsteroids on skin 5 alpha-reductase activity in vitro; *Obstet Gynecol.* 78 (1991) 103-7.
- Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, Sawyers CL**, Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy, *Nat Med.* 10 (2004) 33–9.
- Clark GM, Osborne CK, McGuire WL**, Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer, *J Clin Oncol.* 2 (1984) 1102–1109.
- Cobb VJ, Williams BC, Mason JI, Walker SW**, Forskolin treatment directs steroid production towards the androgen pathway in the NCI-H295R adrenocortical tumour cell line, *Endocr Res.* 22 (1996) 545–550.
- Coleman DJ, Van Hook K, King CJ, Schwartzman J, Lisac R, Urrutia J, Sehrawat A, Woodward J, Wang NJ, Gulati R, Thomas GV, Beer TM, Gleave M, Korkola JE, Gao L, Heiser LM, Alumkal JJ**, Cellular androgen content influences enzalutamide agonism of F877L mutant androgen receptor, *Oncotarget*

doi; 10.18632/oncotarget, 9816[Epub ahead of print] (2016)

**Danila DC, Morris MJ, de Bono JS, Ryan CJ, Denmeade SR, Smith MR, Taplin ME, Bubley GJ, Kheoh T, Hagg C, Molina A, Anand A, Koscuizska M, Larson SM, Schwartz LH, Fleisher M, Scher HI**, Phase II multicenter study of abiraterone acetate plus prednisone therapy in patients with docetaxel-treated castration-resistant prostate cancer, *J Clin Oncol.* 28 (2010) 1496–1501.

**Davidson JM, Cheung C, Smith ER, Johnson P**, Feedback regulation of gonadotrophism in the male, *Adv Biosci.* 10 (1973) 63-72.

**De Amicis F, Thirugnansampanthan FJ, Cui Y, Selever J, Beyer A, Parra I, Weigel NL, Herynk MH, Tsimelzon A, Lewis MT, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Andò S, Fuqua SA**, Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells, *Breast Cancer Res Treat.* 121 (2010) 1–11.

**de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman Jr OB, Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Flechon A, Saleh M, Scholtz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Haqq CM, Scher HI**, Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer, *New Engl J Med.* 364 (2011) 1995-2005.

**Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ**, Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance, *Cancer Res.* 68 (2008) 5469–5477.

**Dreicer R, Agus DB, MacVicar GR, Wang J, MacLean D, Stadler WM**, Safety, pharmacokinetics, and efficacy of TAK-700 in metastatic castration-resistant prostate cancer: A phase I/II, open-label study, *J Clin Oncol.* 28 [15s] (2010). Abstract nr 3084.

**Dukes M, Edwards PN, Large M, Smith IK, Boyle T**, The preclinical pharmacology of "Arimidex" (Anastrozole; ZD1033) - a potent, selective aromatase inhibitor, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 58 (1996) 439–445.

**Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group**, Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials, *Lancet* 351 (1998) 1451–1467.

**Edwards J, Krishna NS, Grigor KM, Bartlett JMS**, Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer, *Br J Cancer* 89 (2003) 552–556.

**Elo JO, Kvist L, Leinonen K, Isomaa V, Henttu VP, Lukkarinen O, Vihko P**, Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol, *J Clin Endocrinol Metab.* 80 (1995) 3494-3500.

**Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, Macgrogan, Bergh GJ, Cameron D, Goldstein D, Duss S, Nicoulaz AL, Brisken C, Fiche M, Delorenzi M, Iggo**, Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis, *Oncogene* 24 (2005) 4660–4671.

**Feng S, Tang Q, Sun M, Chun JY, Evans CP, Gao AC**, Interleukin-6 increases prostate cancer cells resistance to bicalutamide via TIF2, *Mol Cancer Ther.* 8 (2009) 665–671.

**Fenton MA, Shuster TD, Fertig AM, Taplin ME, Kolvenbag G, Bubley GJ, Balk SP**, Functional characterization of mutant androgen receptors from androgen-independent prostate cancer, *Clin Cancer Res.* 3

(1997) 1383-1388.

**Folkerd E, Attard G, Dearnaley D, Hunt J, Maier G, Molina A, Olmos D, Oomen N, Parker C, Reid A, Thompson E, de Bono JS, Dowsett M,** Abiraterone acetate: the novel application of a CYP450c17 inhibitor to the treatment of both prostate and breast cancer, *Endocrine Abstracts* 19 (2009) 180.

**Freeman SN, Mainwaring WI, Furr BJ,** A possible explanation for the peripheral selectivity of a novel non-steroidal pure antiandrogen Casodex (ICI176,334), *Br J Cancer* 60 (1989) 664-668.

**Fuse H, Korenaga S, Sakari M, Hiyama T, Ito T, Kimura K, Kato S,** Non-steroidal antiandrogens act as AF-1 agonists under conditions of high androgen-receptor expression, *Prostate* 67 (2007) 630-637.

**Gallagher TF, Yoshida K, Roffwarg HD, Fukushima DK, Weitzman ED, Hellman L,** ACTH and cortisol secretory patterns in man, *J Clin Endocrinol Metab.*36 (1973) 1058-1068.

**Gambrell RD Jr.,** Hormone replacement therapy and breast cancer, *Maturitas* 9 (1987) 123-33.

**Geller DH, Auchus RJ, Mendonca BB, Miller WL,** The genetic and functional basis of isolated 17,20-lyase deficiency. *Nat Genet.* 17 (1997) 201-205.

**Giordano SJ, Kaftory A, Steggle AW,** A splicing mutation in the cytochrome b5 gene from a patient with congenital methemoglobinemia and pseudohermaphroditism, *Hum Genet.* 93 (1994) 568-570.

**Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, Chen H, Kong X, Melamed J, Tepper CG, Kung HJ, Brodie AM, Edwards J, Qiu Y,** A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth, *Cancer Res.* 69 (2009) 2305-2313.

**Haidar S, Ehmer PB, Barassin S, Batzl-Hartmann SC, Hartmann RW,** Effects of novel 17alpha-hydroxylase/C17, 20-lyase (P450 17, CYP 17) inhibitors on androgen biosynthesis in vitro and in vivo, *J Steroid Biochem Mol. Biol* 84 (2003) 555-562.

**Hara T, Nakamura K, Araki H, Kusaka M, Yamaoka M,** Enhanced androgen receptor signaling correlates with the androgen-refractory growth in a newly established MDA PCa 2b-hr human prostate cancer cell subline, *Cancer Res.* 63 (2003a) 5622-5628.

**Hara T, Miyazaki J, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, Miyamoto M,** Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome, *Cancer Res.* 63 (2003b) 149-153.

**Hellerstedt BA, Pienta KJ,** The current state of hormonal therapy for prostate cancer, *CA Cancer J Clin.* 52 (2002) 154-179.

**Hoefler J, Akbor M, Handle F, Ofer P, Pühr M, Parson W, Culig Z, Klocker H, Heidegger I,** Critical role of androgen receptor level in prostate cancer cell resistance to new generation antiandrogen enzalutamide, *Oncotarget* 10.18632/oncotarget, 10926[Epub ahead of print] (2016)

**Holzbeierlein J, Lal P, LaTulippe E, Smith A, Satagopan J, Zhang L, Ryan C, Smith S, Scher H, Scardino P, Reuter V, Gerald WL,** Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance, *Am J Pathol.* 164 (2004) 217-227.

**Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, Han M, Partin AW, Vessella RL, Isaacs WB, Bova GS, Luo J,** Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer, *Cancer Res.* 69 (2009) 16-22



**Huggins C, Hodge CV**, Studies on prostate cancer. I. The effect of castration, estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate, *Cancer Res.* 1 (1941) 293-297.

**Jarman M, Barrie SE, Llera JM**, The 16,17-double bond is needed for irreversible inhibition of human cytochrome p45017 $\alpha$  by abiraterone (17-(3-pyridyl)androsta-5, 16-dien-3 $\beta$ -ol) and related steroidal inhibitors, *J Med Chem.* 41 (1998) 5375-5381.

**Kaku T, Hitaka T, Ojida A, Matsunaga N, Adachi M, Tanaka T, Hara T, Yamaoka M, Kusaka M, Okuda T, Asahi S, Furuya S, Tasaka A**, Discovery of orteronel (TAK-700), a naphthylmethylimidazole derivative, as a highly selective 17,20-lyase inhibitor with potential utility in the treatment of prostate cancer, *Bioorg Med Chem.* 19 (2011) 6383–6399.

**Kok RC, Timmerman MA, Wolffenbuttel KP, Drop SL, de Jong FH**, Isolated 17,20-lyase deficiency due to the cytochrome b5 mutation W27X, *J Clin Endocrinol Metab.* 95 (2010) 994-999.

**Krieger DT, Allen W, Rizzo F, Krieger HP**, Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels, *J Clin Endocrinol Metab.* 32 (1971) 266–284.

**Labrie F**, Endocrine therapy of prostate cancer: optimal form and timing, *J Clin. Endocrinol Metab.* 80 (1995) 1066-1071.

**Lanari C, Wargon V, Rojas P, Molinolo AA**, Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? *Endocr Relat Cancer* 19 (2012) R35–50.

**Locke JA, Guns ES, Lubik AA, Adomat HH, Hendy SC, Wood CA, Ettinger SL, Gleave ME, Nelson CC**, Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer, *Cancer Res.* 68 (2008) 6407–6415.

**Loose DS, Kan PB, Hirst MA, Marcus RA, Feldman D**, Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P450-dependent enzymes, *J Clin Invest.* 71 (1983) 1495-1499.

**Macedo LF, Guo Z, Tilghman SL, Sabnis GJ, Qiu Y, Brodie A**, Role of androgens on MCF-7 breast cancer cell growth and on the inhibitory effect of letrozole, *Cancer Res.* 66 (2006) 7775–7782.

**Maggiolini M, Donze O, Jeannin E, Ando S, Picard D**, Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor  $\alpha$ , *Cancer Res.* 59 (1999) 4864–4869.

**Mapes S, Corbin CJ, Tarantal A, Conley A**, The primate adrenal zona reticularis is defined by expression of cytochrome b5, 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450 (P450c17) and NADPH-cytochrome P450 reductase (reductase) but not 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-4 isomerase (3 $\beta$ -HSD), *J Clin Endocrinol Metab.* 84 (1999) 3382–3385.

**Miller WL, Auchus RJ, Geller DH**, The regulation of 17,20-lyase activity, *Steroids* 62 (1997) 133-142.

**Miller WL, Auchus RJ**, The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders, *Endocr Rev.* 32 (2011) 81–151.

**Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, Hess DL, Kalhorn TF, Higano CS, True LD, Nelson PS**, Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth, *Cancer Res.* 68 (2008) 4447–4454.

**Moore MR**, A rationale for inhibiting progesterone-related pathways to combat breast cancer, *Curr Cancer Drug Targets* 4 (2004) 183–189.

**Morris KT, Toth-Fejel S, Schmidt J, Fletcher WS, Pommier F**, High dehydroepiandrosterone-sulfate

predicts breast cancer progression during new aromatase inhibitor therapy and stimulates breast cancer cell growth in tissue culture: A renewed role for adrenalectomy, *Surgery* 130 (2001) 947–953.

**Mostaghel EA, Page ST, Lin DW, Fazli L, Coleman IM, True LD, Knudsen B, Hess DL, Nelson CC, Matsumoto AM, Bremner WJ, Gleave ME, Nelson PS,** Intraprostatic androgens and androgen-regulated gene expression persist after testosterone suppression: therapeutic implications for castration-resistant prostate cancer, *Cancer Res.* 67 (2007) 5033-5041.

**Mostaghel EA, Nelson PS,** Intracrine androgen metabolism in prostate cancer progression: mechanisms of castration resistance and therapeutic implications, *Best Pract Res. Clin Endocrinol Metab.* 22 (2008) 243-258.

**Nakajin S, Hall PF,** Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis. Purification and properties of A C21 steroid side-chain cleavage system (17 alpha-hydroxylase-C17,20 lyase), *J Biol Chem.* 256 (1981a) 3871–3876.

**Nakajin S, Hall PF, Onda M,** Testicular microsomal cytochrome P-450 for C21 steroid side chain cleavage. Spectral and binding studies, *J Biol Chem.* 256(1981b) 6134-6139.

**Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, Imai Y, Rimm DL, Liu XS, Brown M,** Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer, *Cancer Cell* 20 (2011) 119–131.

**Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM,** Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma, *Clin Cancer Res.* 10 (2004) 5367–5374.

**Okamoto M, Setaishi C, Nakagawa K, Horiuchi Y, Moriya K, Itoh S,** Diurnal variations in the levels of plasma and urinary androgens, *J Clin Endocrinol Metab.* 32 (1971) 846–851.

**Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, Kim SI, Park BW, Lee KS,** Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers, *Ann Oncol.* 22 (2011) 1755–1762.

**Payne AH, Hales DB,** Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, *Endocr Rev.* 25 (2004) 947–970.

**Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D,** Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 406 (2000) 747–752.

**Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Centenera MM, Harris JM, Jindal S, Segara D, Jia L, Moore NL, Henshall SM, Birrell SN, Coetzee GA, Sutherland RL, Butler LM, Tilley WD,** Androgen receptor inhibits estrogen receptor- $\alpha$  activity and is prognostic in breast cancer, *Cancer Res.* 69 (2009) 6131–6140.

**Potter GA, Barrie SE, Jarman M, Rowlands MG,** Novel steroidal inhibitors of human cytochrome p45017 $\alpha$  (17 $\alpha$ -hydroxylase-C17,20-lyase): potential agents for the treatment of prostatic cancer, *J Med Chem.* 38 (1995) 2463–2471.

**Reid AH, Attard G, Danila DC, Oommen NB, Olmos D, Fong PC, Molife LR, Hunt J, Messiou C, Parker C, Dearnaley D, Swennenhuis JF, Terstappen LW, Lee G, Kheoh T, Molina A, Ryan CJ, Small E, Scher HI, de Bono JS,** Significant and sustained antitumor activity in post-docetaxel, castration-resistant prostate

cancer with the CYP17 inhibitor abiraterone acetate, *J Clin Oncol.* 28 (2010) 1489–1495.

**Rosenfeld RS, Rosenberg BJ, Fukushima DK, Hellman L,** 24-hour secretory pattern of dehydroisoandrosterone and dehydroisoandrosterone sulphate, *J Clin Endocrinol Metab.* 40 (1975) 850–855.

**Rowlands MG, Barrie SE, Chan F, Houghton J, Jarman M, McCague R, Potter GA,** Esters of 3-pyridylacetic acid that combine potent inhibition of 17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase (cytochrome P45017 alpha) with resistance to esterase hydrolysis, *J Med Chem.* 38 (1995) 4191–4197.

**Ryan CJ, Smith MR, Fong L, Rosenberg JE, Kantoff P, Raynaud F, Martins V, Lee G, Kheoh T, Kim J, Molina A, Small EJ,** Phase I clinical trial of the CYP17 inhibitor abiraterone acetate demonstrating clinical activity in patients with castration-resistant prostate cancer who received prior ketoconazole therapy, *J Clin Oncol.* 28 (2010) 1481–1488.

**Sainsbury R,** Aromatase inhibition in the treatment of advanced breast cancer: Is there a relationship between potency and clinical efficacy? *Br J Cancer* 90 (2004) 1733–1739.

**Scher HI, Sawyers CL,** Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis, *J Clin Oncol.* 23 (2005) 8253–8261.

**Schuermans AL, Bolt J, Veldscholte J, Mulder E,** Stimulatory effects of antiandrogens on LNCaP human prostate tumor cell growth, EGF-receptor level and acid phosphatase secretion, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 37 (1990) 849–853.

**Shah S, Ryan C,** Abiraterone acetate for castration resistant prostate cancer, *Expert Opin Investig Drugs* 19 (2010) 563–570.

**Siegel RL, Miller KD, Jemal A,** Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 66 (2016) 7–30.

**Small EJ, Halabi S, Dawson NA, Stadler WM, Rini BI, Picus J, Gable P, Torti FM, Kaplan E, Vogelzang NJ,** Antiandrogen withdrawal alone or in combination with ketoconazole in androgen-independent prostate cancer patients; phase III trial (CALBG 9583), *J Clin Oncol.* 22 (2004) 1025–1233.

**Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL,** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc Natl Acad Sci.* 98 (2001) 10869–10874.

**Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM, Febbo PG, Balk SP,** Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer, *Cancer Res.* 66 (2006) 2815–2825.

**Tan J, Sharief Y, Hamil KG, Gregory CW, Zang DY, Sar M, Gumerlock PH, deVere White RW, Pretlow TG, Harris SE, Wilson EM, Mohler JL, French FS,** Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells, *Mol Endocrinol.* 11 (1997) 450–459.

**Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA,** TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer, *N Engl J Med.* 351 (2004) 1502–1512.

**Touitou Y, Auzeby A, Bogdan A,** Cortisol and cortisone production in rat and mouse adrenal incubations, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 37 (1990) 279–284.

**van Weerden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schroder FH**, Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens, *Life Sciences* 50 (1992) 857-861.

**Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, van Rooij HC, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E**, A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens, *Biochem Biophys Res Commun.* 173 (1990) 534–540.

**Veldscholte J, Berrevoets CA, Brinkmann AO, Grootegoed JA, Mulder E**, Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells; differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation, *Biochemistry* 31 (1992) 2393-2399.

**Vasaitis TS, Bruno RD, Njar VC**, CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 125 (2011) 23–31.

**Wierman ME, Beardsworth DE, Crawford JD, Crigler JF Jr, Mansfield MJ, Bode HH, Boepple PA, Kushner DC, Crowley WF Jr**, Adrenarche and skeletal maturation during luteinizing hormone releasing hormone analogue suppression of gonadarche, *J Clin Invest.* 77 (1986) 121-126.

**Yamaoka M, Hara T, Miki H, Hitaka T, Kaku T, Kawaguchi N, Yamasaki H, Takeuchi T, Tasaka A, Kusaka M**, TAK-700: an inhibitor of 17,20-lyase. Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2010 Apr 17–21, Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; 2010a. Abstract nr DD01-3.

**Yamaoka M, Hara T, Kusaka M**, Overcoming persistent dependency on androgen signaling after progression to castration-resistant prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010b) 4319-4324.

**Yoshida T, Kinoshita H, Segawa T, Nakamura E, Inoue T, Shimizu Y, Kamoto T, Ogawa O**, Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgen-dependent prostate cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient, *Cancer Res.* 65 (2005) 9611–9616.