

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590137

研究課題名(和文)ステロイドホルモン受容体機能制御を志向した分子プローブの開発

研究課題名(英文)Development of molecular probes for steroid hormone receptor functions

研究代表者

棚谷 綾(TANATANI, Aya)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授

研究者番号：40361654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイドホルモン受容体の機能を厳密に制御する新規リガンドや機能解析のための蛍光プローブの創製に関して以下の成果を得た。

(1) アンドロゲンアンタゴニストとしてフタラジノン誘導体を見いだした。本化合物は変異ARにもアンタゴニストとして機能した。プロゲステロンについては、疎水性ファーマコフォアとしてカルボランもしくはアダマンタンを有する新規アンタゴニストを創製した。

(2) 蛍光性リガンドとしてクマリンを骨格とするプロゲステロンアンタゴニストを見いだした。本化合物は受容体との結合により蛍光強度が著しく増大する。アンドロゲンについてもアンタゴニスト活性を有するクマリン誘導体を見いだした。

研究成果の概要(英文)：In this study, the specific ligands and fluorescence probes for steroid hormone nuclear receptors were developed.

(1) Phthalazinone derivatives were developed as novel androgen antagonists, and acted as antagonists towards both wild-type and mutated ARs. As progesterone antagonists, compounds bearing a carborane or adamantane as the hydrophobic pharmacophore were developed.

(2) Coumarine derivatives were developed as fluorescent progesterone antagonists, whose fluorescence intensity was strongly increased by binding to progesterone receptor. Coumarine derivatives with androgen antagonistic activity were also developed.

研究分野：医薬化学

キーワード：ステロイドホルモン 核内受容体 アンドロゲン プロゲステロン アンタゴニスト 蛍光性リガンド  
クマリン

### 1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンは、固有の核内受容体を介して特異的遺伝子発現を制御し、個体の成長や恒常性に重要な働きをしている。近年、ステロイドホルモン受容体をはじめとする種々の核内受容体機能の破綻や異常が、がん、自己免疫疾患、生活習慣病、脳機能疾患といった現在社会における様々な難治性疾患の発症や治療と密接に関連していることが明らかにされてきた。既に各種ステロイドホルモン類が医薬品化されているように、ステロイドホルモン受容体を分子標的とした医薬創製研究は確立した分野と思われるが、その多様な機能の十分な理解の欠如から、医薬への応用が困難もしくは制限されている。例えば、前立腺癌のアンドロゲンアンタゴニスト療法では、受容体変異に伴う薬剤耐性もしくは癌の増悪化が臨床上的の問題となっている。また、多様な核内受容体機能に対して、SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) と総称されるエストロゲン誘導体のように、組織選択的な活性を有するリガンドの創製が期待されている。このようなリガンドの生物活性の差異は、リガンド結合によって引き起こされる受容体のダイナミックな構造変化とそれに基づく各種転写因子(コリプレッサーやコアクチベーター)間とのタンパク-タンパク相互作用様式によって決定されるためと考えられる。従って、ステロイドホルモン受容体機能制御は、単にリガンドとの結合親和性や結合様式の解析だけで評価することができない。

更に、最近、エストロゲン受容体をはじめとする核内受容体もしくはその特異的リガンドが核内での転写制御だけでなく、核外で機能しているという報告がされた。しかしながら、その生理的意義や薬理学的な応用性は定かではなく、詳細な解析が必要である。

### 2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究では、本研究者がこれまで行ってきた核内受容体リガンド創製研究を更に発展させ、ステロイドホルモン受容体の機能を厳密に制御する新規モデュレーターや機能解析のための蛍光プローブ等を創製し、ステロイドホルモン受容体を標的とする医薬開発基盤を構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、ステロイドホルモンのうち、アンドロゲンおよびプロゲステロンに焦点をあて、新規骨格を有する合成リガンド、および、核内受容体機能解析のための蛍光性プローブを設計、合成して、その機能を詳細に解析する。

### 4. 研究成果

(1) フタラジノン骨格を有する新規アンドロゲンアンタゴニストの創製

アンドロゲン受容体 AR はテストステロンや 5 $\alpha$ -ジヒドロテストステロン (DHT) 等のアンドロゲン依存的に特異的遺伝子の転写を制御することにより、男性生殖機能の発達や筋・骨量の恒常性維持などの多様な機能を担っている。AR の転写活性化が前立腺癌の発症と進展に深く関与しており、様々な AR アンタゴニストが前立腺がんの治療に用いられている。一方、既存の AR アンタゴニストは、数年の治療継続にともない、耐性化もしくは癌の増悪化を引き起こすという問題を抱えており、新たなアンタゴニストの開発が望まれている。

本研究者は、これまでに新規構造を有する非ステロイド型 AR アンタゴニストとしてイソキサゾロン誘導体 **1** やピロールカルボキサミド **2** 等の化合物を見いだしてきた。化合物 **2** については、誘導体展開の結果、パースルアゴニスト活性を有する化合物を見いだした。さらに、本研究では、化合物 **1**、**2** の構造要素の吟味からフタラジノン骨格を有する化合物 **3-7** を設計した (Fig. 1)。

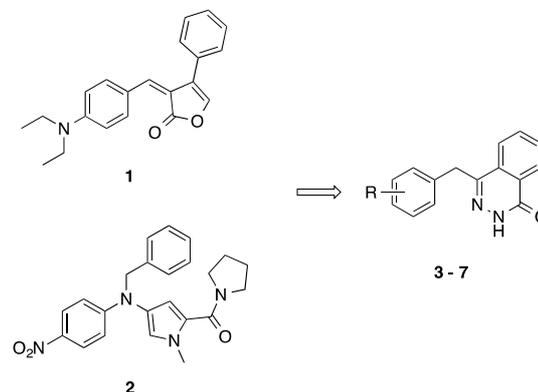


Fig. 1. Design of novel AR antagonists.

設計したフタラジノン誘導体の合成例を Fig. 2 に示した。本方法をもとに、各種置換基 (R) を有する化合物を 30 種合成した。

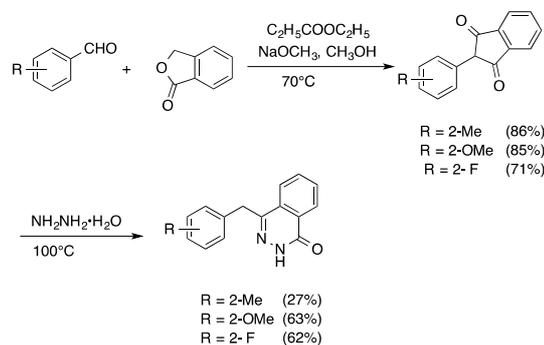


Fig. 2. Synthesis of phthalazinone derivatives

合成した化合物の活性は、まずアンドロゲン依存的に増殖する SC-3 細胞の増殖抑制能で評価した。その結果、置換基 R として、オルト位にニトロ基、アミノ基、ハロゲン等を有する化合物に比較的高い活性が認められた。特に、2,6-ジクロロ体 **7c** (Table 1) が最

も高い活性を示し、ヒドロキシフルタミドと同程度の IC<sub>50</sub> 値を有していた。

Table 1. Biological activities of phthalazinones

Compound	SC-3 assay IC <sub>50</sub> (μM)	wtAR binding IC <sub>50</sub> (μM)	LNCaP assay IC <sub>50</sub> (μM)
Hydroxyflutamide	0.18	7.69	
Bicalutamide			0.85
<b>5a</b> (R =2-NO <sub>2</sub> )	0.53	> 100	1.46
<b>5b</b> (R =2-NH <sub>2</sub> )	0.22	45.2	0.99
<b>6d</b> (R =2-Cl)	1.26	85.4	0.86
<b>7a</b> (R =2,6-Me <sub>2</sub> )	1.38	84.3	3.42
<b>7c</b> (R =2,6-Cl <sub>2</sub> )	0.18	10.9	0.55
<b>7d</b> (R =2,3,6-Cl <sub>3</sub> )	0.92	56.7	0.92

高活性の化合物を選別し、wt AR に対する結合能と、変異 AR を有する LNCaP 細胞に対する活性を評価した (Table 1)。その結果、これらのフタラジノン誘導体は変異 AR を有する LNCaP 細胞に対しても高いアンタゴニスト活性を有していることがわかった。

さらに、化合物 **7c** の AR 結合様式を解明する目的で、**7c** の結晶構造をもとに、AR の ligand binding domain (LBD) とのドッキング計算を行った。その結果、**7c** が AR LBD のポケットに結合し、ヘリックス 12 の活性型立体構造を阻害しうることがわかった。

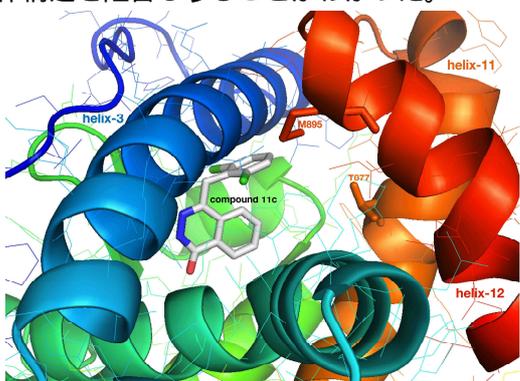


Fig. 3. Docking model of **7c** with hAR LBD

## (2) カルボランを有する新規 PR リガンドの創製

本研究者は、これまでホウ素クラスターであるカルボランを脂溶性ファーマコフォアとして用いた核内受容体リガンドの創製研究 (東京医科歯科大学との共同研究) を行ってきた。本研究では、その知見をもとに、新規 PR アンタゴニストの創製を行った。これまでに、*para*-カルボランを有するシアノベンゼン誘導体に PR アンタゴニスト活性があることがわかっている。そこで、今回、*meta*-カルボランを用いた構造展開することとし、化合物 **8** を設計した。合成は Fig 4 に従った。また、これまで PR アンタゴニスト活性を有するカルボン酸誘導体については、光学活性体の活性評価を行った例はない。そこで、化合物 **8** の光学分割を行った。モデル化合物を用いた各種リパーゼによるアセチル化反応を詳細に検討した結果、lipase TL が最

も適していることがわかった。そこで、化合物 **8** に対して lipase TL を用いたアセチル化を行った結果、*S*-**8** (50%, >99% ee) および *R*-**8** (48%, >99% ee) を得た。*R*-**9** は加水分解により *S*-**8** (28%, >99% ee) へと導いた (Fig. 4)。

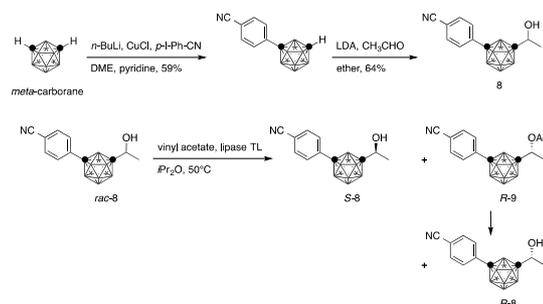


Fig. 4 Synthesis of racemic and optically active **8**

ラセミ体および光学活性な **8** の PR 活性は、T47D 細胞においてプロゲステロン依存的に発現するアルカリフォスファターゼ量に対する効果で評価した。興味深いことに、化合物 **8** は、高濃度では PR アゴニスト活性を示し、低濃度では、共存するプロゲステロンの活性を抑制した。また、アンタゴニスト活性では、ラセミ体および光学活性な **8** の活性はほぼ等しいのに対して、アゴニスト活性では、*S*-**8** の方が *R*-**8** よりも活性が高いことがわかった。リガンドによって誘起される受容体の立体構造の要求性が、アゴニスト活性を示す活性型構造において厳密であるためと考えている。

一方、カルボラン誘導体に関しては、PR アンタゴニストである mifepristone の構造をもとに設計された *C,C'*-ジフェニル-*meta*-カルボラン誘導体が PR 活性を有している。そこで、球状脂溶性分子であるカルボランをアダマンタンに代替したジフェニルアダマンタン誘導体を PR アンタゴニスト候補化合物として分子設計した。

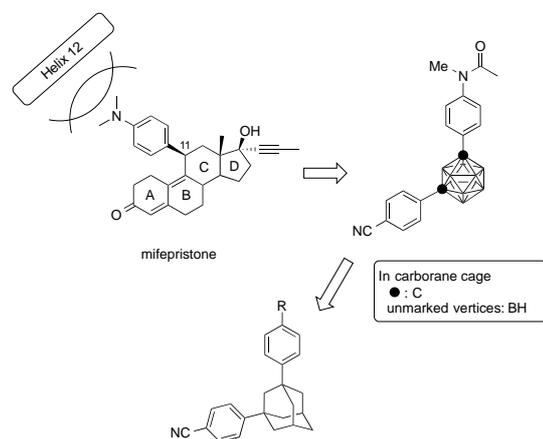
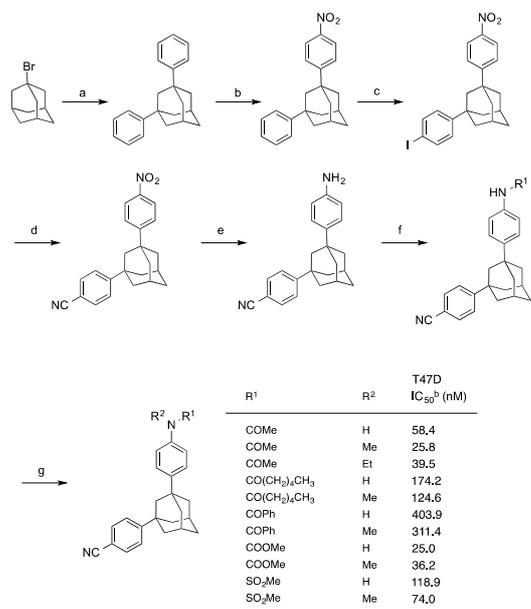


Fig. 5. Design of diphenyladamantanes as PR antagonist

ジフェニルアダマンタン誘導体は Fig. 6 に従い、13 化合物を合成した。T47D 細胞を用

いたアルカリフォスファターゼアッセイにおいて、いずれもアンタゴニストとして機能していた。特に、Rとしてアセトアミド基やメチルカルバメート基を有する化合物に高活性が見られた。



Reagents and conditions: (a) FeCl<sub>3</sub>, benzene, reflux, 14% (b) HNO<sub>3</sub>, Ac<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -10°C to 0°C, 44% (c) I<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AcOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 65°C, 62% (d) CuCN, Pyridine, 130°C, 66% (e) H<sub>2</sub>, Pd/C, AcOEt, rt, 92% (f) R<sup>1</sup>-Cl, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C to rt, 41–96% (g) R<sup>2</sup>-I, NaH, DMF, 0°C to rt, 49–98%.

Fig. 6. Synthesis and Biological activity of diphenyladamantanes

### (3) ステロイドホルモン受容体の蛍光性リガンドの構造展開

本研究者は、これまでに蛍光団であるクマリンを骨格とする PR アンタゴニストを創製してきた。その中で、化合物 **10** (Fig. 7) が PR との結合によって蛍光強度が著しく増大することを示した。従って、化合物 **10** は PR 機能解析の蛍光プローブとして利用しうると考えられるが、この化合物には (1) 蛍光量子収率が低く、また、(2) PR 以外のステロイドホルモン受容体にも結合するという欠点が見られた。そこで、化合物 **10** をリード化合物として、より蛍光プローブとして有用性の高い誘導体の開発を行った。6 位に種々の芳香環を有するクマリン誘導体 40 種を合成し、その PR 活性を評価した。その結果、化合物 **11-13** (Fig. 7) に高い PR アンタゴニスト活性を見いだした。また、これらの化合物は他のステロイドホルモン受容体に対する結合能は認められなかった。

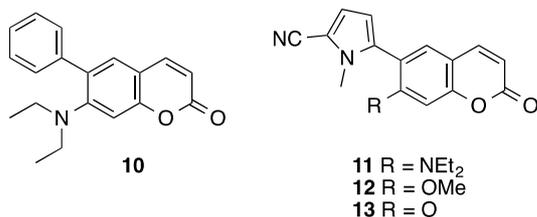


Fig. 7. Coumarins with PR antagonistic activity

化合物 **11-13** について、蛍光特性を解析した結果、化合物 **11** の蛍光強度が強い溶媒依存性を有することを見いだした (Fig. 8)。すなわち、メタノールやバッファーなどの極性溶媒中では蛍光をほとんど持たないが、メチレンクロライド中では強い蛍光を有していた。

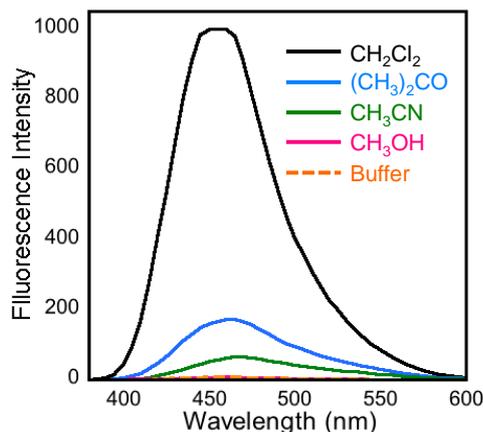


Fig 8. Solvent-dependent fluorescence of **11**

一方、化合物 **12** は、溶媒によって、蛍光波長が変化し、より極性の高い溶媒中で、蛍光極大波長が長波長シフトすることがわかった (Fig. 9)。

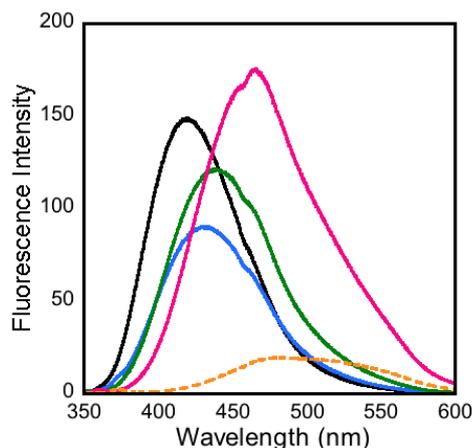


Fig 9. Solvent-dependent fluorescence of **12**

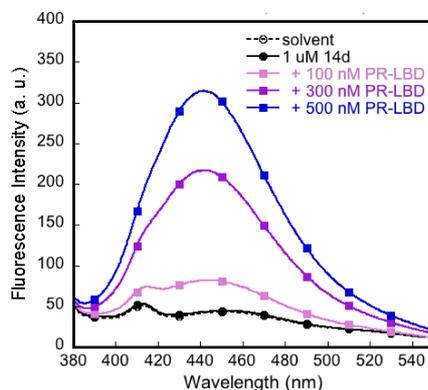


Fig 10. Fluorescence spectra of **12** in the presence of PR LBD

化合物 **11** のバッファー溶液中に PR LBD を

添加したところ、PR LBD の添加量に依存して蛍光の著しい増大が見られた (Fig. 10)。化合物 **11** は化合物 **10** と比べて、活性強度、選択性、蛍光強度の点で優れており、蛍光プローブとして PR 機能解析に用いることができると考えている。

上記、PR アンタゴニスト活性を有するクマリン誘導体研究の過程で、合成した化合物の AR 活性を検討したところ、化合物 **14** が PR アンタゴニスト活性をもたず、AR アンタゴニスト活性を有していることを見いだした。そこで、7 位にアミド結合を有する種々のクマリン誘導体を合成した。その結果、7 位のアミド結合が二級アミドの場合は、AR アンタゴニスト活性がないか、非常に弱く、一方、これらのアミド結合窒素原子上に *N*-メチル基を導入した化合物の幾つかに強い AR アンタゴニスト活性があることがわかった (Fig. 11)。

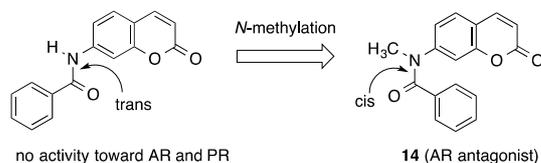


Fig 11. AR antagonistic coumarin derivatives

本研究者は、ベンズアニリド等の芳香族二級アミドが *trans* 型であるのに対して、その *N*-メチル化体は *cis* 型で存在することを見いだしている。この立体特性は、広く一般性を持つとともに、らせんや芳香族層状構造、環状アミドオリゴマーなどユニークな構造をもつ分子の創製に応用できることを示した。Fig. 9 に示したクマリン誘導体についても、結晶構造解析、NMR による溶液構造の解析の結果、活性を持たない二級アミド化合物が *trans* 型で、AR アンタゴニスト活性を有する *N*-メチル化アミド化合物が *cis* 型をとることを示しており、*cis* 型の折れ曲がった分子形状が AR のリガンド結合空間にフィットすると考えている。現在、構造最適化を進めるとともに、蛍光プローブとしての展開も検討している。

以上のように、アンドロゲン、プロゲステロン受容体を標的として、ユニークな構造を有するアンタゴニストや蛍光プローブの開発に成功した。幾つかの化合物において、アミド結合の立体化学がリガンド機能として重要な鍵となることもわかった。今後は、分子の立体特性や蛍光特性をふまえた構造最適化を行うとともに、創製したリガンド分子の基礎及び医薬研究への応用を検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)(すべて査読あり)

1) Mori, S.; Takeuchi, Y.; Tanatani, A.;

Kagechika, H.; Fujii, S. Development of

1,3-diphenyladamantane derivatives as nonsteroidal progesterone receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 803-809. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.12.047.

- 2) Mori, S.; Takagaki, R.; Fujii, S.; Matsumura, M.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Lipase-catalyzed asymmetric acylation of boron cluster-containing secondary alcohols. *Tetrahedron Asymm.* **2014**, *25*, 1505-1512. Doi: 10.1016/j.tetasy.2014.10.009.
- 3) Fujii, S.; Sekine, R.; Kano, A.; Masuno, H.; Songkram, C.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Structural development of *p*-carborane-based potent non-secosteroidal vitamin D analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5891-5901. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.09.020.
- 4) Fujii, S.; Kano, A.; Masuno, H.; Songkram, C.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Design and synthesis of tetraol derivatives of 1,12-dicarba-closedodecaborane as non-secosteroidal vitamin D analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4515-4519. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.07.075.
- 5) Fujii, S.; Kano, A.; Songkram, C.; Masuno, H.; Taoda, Y.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Synthesis and structure-activity relationship of *p*-carborane-based non-secosteroidal vitamin D analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1227-1235. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.01.015.
- 6) Okamoto, I.; Takahashi, Y.; Sawamura, M.; Matsumura, M.; Masu, H.; Katagiri, K.; Azumaya, I.; Nishino, M.; Kohama, Y.; Morita, N.; Tamura, O.; Kagechika, H.; Tanatani, A. Redox-responsive conformational alteration of aromatic amides bearing *N*-quinonyl system. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 5346-5355. DOI: 10.1016/j.tet.2012.04.114.
- 7) Kanai, M.; Hirano, T.; Azumaya, I.; Okamoto, I.; Kagechika, H.; Tanatani, A. Solvent-dependent conformational and fluorescence change of an *N*-phenylbenzohydroxamic acid derivative bearing two pyrene moieties. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 2778-2783. DOI: 10.1016/j.tet.2012.02.012.
- 8) Wongmayura, A.; Fujii, S.; Ito, S.; Kano, A.; Taoda, Y.; Kawachi, E.; Kagechika, H.; Tanatani, A. Novel vitamin D receptor ligands bearing a spherical hydrophobic core structure—Comparison of bicyclic hydrocarbon derivatives with boron cluster derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1756-1760. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.12.137.

〔学会発表〕(計 30 件)

- 1) 森修一、高垣亮平、藤井晋也、松村実生、棚谷綾、影近弘之。カルボラン含有プロゲステロン受容体リガンドのリパーゼによる光学分割。日本薬学会第 135 年会、兵庫県神戸市、2015 年 3 月 26~28 日。
- 2) Mori, S.; Takagaki, R.; Fujii, S.; Matsumura, M.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Lipase-catalyzed asymmetric acylation of boron cluster-containing secondary alcohols. Active Enzyme Molecule 2014, Toyama, Japan, Dec. 17-19, 2014.
- 3) 古賀瞳、木下満里絵、藤井晋也、影近弘之、棚谷綾。クマリン骨格を基盤としたアンドロゲンアンタゴニストの創製研究。第 3 2 回メディシナルケミストリーシンポジウム、兵庫県神戸市、2014 年 11 月 26-28 日。
- 4) Mori, S.; Takagaki, R.; Fujii, S.; Matsumura, M.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Lipase-catalyzed optical resolution and biological activity of boron-cluster-based progesterone receptor ligands. 3<sup>rd</sup> International Congress on Chemical Biology, San Francisco, USA, Nov. 17-20, 2014.
- 5) 古賀瞳、木下満里絵、藤井晋也、影近弘之、棚谷綾。新規 7-アミドクマリン誘導体のアンドロゲンアンタゴニスト活性。日本レチノイド研究会第 25 回学術集会、秋田県秋田市、2014 年 10 月 11-12 日。
- 6) Misae, K.; Maurizot, V.; Masu, H.; Tanatani, A.; Huc, I. Crystal structure of the aromatic helical molecule with hydrogen bond ability on the surface. Joint Congress of ACTS-2014 and CGOM11, Nara, Japan, June 17-20, 2014.
- 7) Tanatani, A.; Kanda, M.; Fujii, S.; Matsumura, M.; Katagiri, K.; Masu, H.; Azumaya, I.; Kagechika, H. Formation of Helical Structures of *N,N'*-Bis(ortho-substituted phenyl)squaramides in the Crystals. Joint Congress of ACTS-2014 and CGOM11, Nara, Japan, June 17-20, 2014.
- 8) 古賀瞳、木下満里絵、藤井晋也、影近弘之、棚谷綾。クマリン骨格を基盤とした新規アンドロゲン受容体アンタゴニストの創製。日本薬学会第 134 年会、熊本・熊本市、2014 年 3 月 27~30 日。
- 9) 数井優子、山田歩、藤井晋也、影近弘之、棚谷綾。アンドロゲン受容体アンタゴニスト活性を有する新規フェノキシフェノール誘導体の構造活性相関。第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム、広島県広島市、2013 年 11 月 20~22 日。
- 10) Tanatani, A.; Azumaya, I.; Kagechika, H. Cis Conformational Preference of *N*-Alkylated Aromatic Amide and Urea Bonds: Construction of Aromatic Foldamers with Unique Structures. ACS National meeting, Indianapolis, USA, Sep. 8-10, 2013.
- 11) Kanda, M.; Fujii, S.; Matsumura, M.; Katagiri, K.; Masu, H.; Azumaya, I.; Kagechika, H.; Tanatani, A. Formation of Chiral Helical Chain Structures of *N,N'*-bis(ortho-substituted phenyl)squaramides in the Crystals. ISMSC-8, Arlington, USA, July 7-11, 2013.
- 12) Kanai, M.; Hirano, T.; Azumaya, I.; Okamoto, I.; Kagechika, H.; Tanatani, A. The conformational and fluorescence change of an *N*-phenylbenzohydroxamic acid derivative depending on the solvent properties. ISMSC-8, Arlington, USA, July 7-11, 2013.
- 13) Tanatani, A.; Kudo, M.; Matsumura, M.; Tojo, Y.; Nishiyama, S.; Kaneko, T.; Nishiyama, S.; Masu, H.; Azumaya, I.; Kagechika, H. Aromatic Foldamers Based on the Cis Conformational Preference of *N*-Alkylated Aromatic Amide and Urea Bonds. Paris 2013 SYMPOSIUM ON FOLDAMERS, Paris, France, April 10, 2013.
- 14) 竹内由起、中野英一、森修一、藤井晋也、棚谷綾、影近弘之。疎水性球状分子を骨格とする新規 PR アンタゴニストの創製。日本薬学会第 133 年会、神奈川県横浜市、2013 年 3 月 27~30 日。
- 15) 木下満里絵、酒井悠、森修一、平野智也、棚谷綾。新規 6-アリールクマリン誘導体のプロゲステロンアンタゴニスト活性と蛍光特性。第 3 0 回メディシナルケミストリーシンポジウム、東京都船堀、2012 年 11 月 28~30 日。
- 16) 藤井晋也、増野弘幸、河内恵美子、中林誠、清水正人、伊藤暢聡、棚谷綾、影近弘之。カルボラン含有 VDR リガンドの構造活性相関と結合様式。Molecular Chirality Asia 2012、福岡県福岡市、2012 年 5 月 17~18 日。

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.sci.ocha.ac.jp/chemHP/labos/tanataniHP/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

棚谷 綾 (TANATANI, Aya)

お茶の水女子大学大学院人間文化創成  
科学研究科・准教授

研究者番号：40361654

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし