

令和元年6月12日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08318

研究課題名(和文)ステロイドホルモン受容体特異的モデュレーターの新製と医薬展開

研究課題名(英文)Development of steroid hormone receptor modulators and their clinical application

研究代表者

棚谷 綾 (Tanatani, Aya)

お茶の水女子大学・基幹研究院・准教授

研究者番号：40361654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイドホルモン類は標的タンパク質(受容体)に結合して、個体の成長や恒常性に重要な働きをしている。ステロイドホルモンは、がん、自己免疫疾患、生活習慣病、神経変性疾患などの様々な難治性疾患の発症や治療と密接に関与しており、これら疾患治療薬開発を目的に、ステロイドホルモン活性を持つ化合物(誘導体)が種々創製されてきた。本研究では、これまでに創製された化合物とは構造の異なる新しいステロイドホルモン誘導体を設計、合成した。特に、アンドロゲンやプロゲステロンの作用を抑制する化合物や高いビタミンD活性を示す化合物の創製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイドホルモンやビタミンDは、様々な疾病に対する特効薬として用いられているものの、その多様な生物活性の理解や制御ができていないため、医薬応用が限られている。本研究では、これまでのステロイドホルモンやビタミンD活性を有する化合物とは構造や物性の異なる化合物を設計、合成し、高い活性を持つ化合物を見いだした。例えば、アンドロゲン抑制剤(アンタゴニスト)は、前立腺癌の治療薬として、ビタミンD誘導体は、がん、骨疾患、自己免疫疾患、生活習慣病などの治療薬への応用が期待される。今後、本研究で得られた知見と化合物をもとに、医薬応用へと展開したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Steroid hormones exhibit various biological functions. A number of steroid hormone derivatives have been synthesized for the purpose of their clinical application towards cancer, autoimmune diseases, metabolic diseases, neurodegenerative diseases and so on. In this study, novel steroid hormone derivatives with unique structures were designed, and synthesized, and their biological activities were examined. Compounds bearing the coumarin moiety elicited the specific inhibitors (antagonists) of androgen or progesterone, depending on the substituents. In these compounds, the conformational properties of amide or sulfonamide bonds on the coumarin ring were significant for the activity and hormone selectivity. Then, the potent derivatives of vitamin D3 were developed, by using lithocholic acid as a lead compound.

研究分野：有機化学、医薬化学

キーワード：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 ビタミンD リトコール酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモン受容体は、リガンド依存的転写因子として個体の成長や恒常性に重要な働きをしている。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は、がん、自己免疫疾患、生活習慣病、脳機能疾患などの様々な難治性疾患の発症や治療と密接に関与しており、これら疾患治療薬開発の重要な分指標的である。既に各種ステロイドホルモン誘導体が医薬品化されている一方で、これまで知られていた機構とは異なる作用機序が報告されるなど、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、エストロゲン受容体(ER)をはじめとする各種ステロイドホルモン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、核外で作用を発揮しているという報告がなされたが、その生理的意義や薬理的な応用性は定かではない。エストロゲンについては、SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) と総称される組織選択的な活性を有するリガンドの創製が行われているが、これら核内外の作用の分離も含めたステロイドホルモン受容体機能の制御が望まれている。また、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の問題となっており、その克服が期待されている。

2. 研究の目的

申請者は、これまで核内受容体とリガンドとの分子、原子レベルでの詳細な相互作用解析に基づき、核内受容体活性制御仮説を提唱し、その仮説を基盤として、従来のリガンド構造とは骨格の異なる新規アンドロゲンアンタゴニストやビタミン D アンタゴニストの創製に成功してきた。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ジュレーターを創製し、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を設計、合成して、その機能を詳細に解析する。また、ステロイドホルモンと同様、コレステロールから生合成され、セコステロイド構造をもつビタミン D についても、ビタミン D 核内受容体の新規リガンドの開発を行った。

4. 研究成果

(1) 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 α -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 の転写活性化は前立腺癌の発症と進展に深く関与しており、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、数年の治療継続に伴い、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、それを克服する、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、以前、蛍光団であるクマリンを骨格とするプロゲステロンアンタゴニスト 1 (図 1) を報告した。一方、クマリン誘導体 1 の構造活性相関研究の過程で、クマリン環の 7 位に N-メチルベンズアミド基をもつ化合物 2 (図 1) がプロゲステロン受容体 PR には作用せず、AR アンタゴニスト活性を持つことを見いだした。そこで、本研究では、化合物 2 をリード化合物として構造展開した。AR に対する活性は、野生型 AR を有し、アンドロゲン依存的に増殖するマウス乳癌細胞 SC-3 細胞を用いた細胞増殖試験により活性を評価した。AR アンタゴニスト活性は、本アッセイで、1 nM DHT により誘導される細胞増殖に対する阻害能により評価した。その結果、高活性で選択的なアンドロゲンアンタゴニスト 3~5 をみいだした。

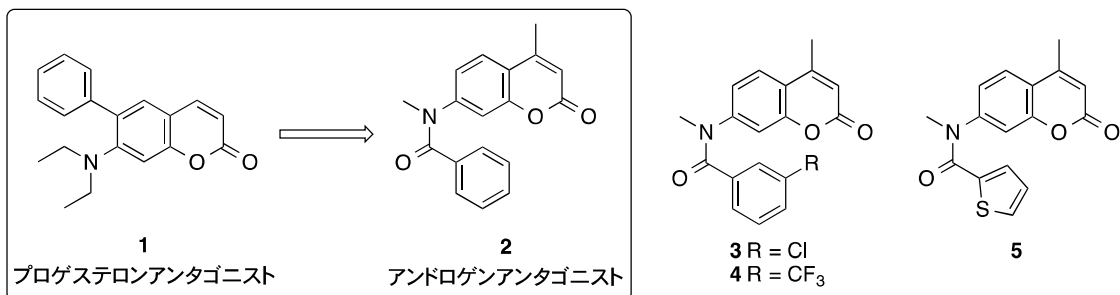


図 1. 新規アンドロゲンアンタゴニストの分子設計と高活性誘導体 3-5

本化合物では、アミド結合窒素原子上のアルキル基を持たない場合には活性がない。本研究者は芳香族アミド類の立体科学研究により、ベンズアニリドのような二級アミドが trans 型で存在するのに対して、そのメチル化体は cis 型で存在することを見いだしている。クマリン誘導体の結晶構造解析の結果、不活性な誘導体 6 は trans 型アミド結合を、AR アンタゴニスト活性

を持つ化合物 2 は cis 型アミド結合を持つことがわかった (図 2)。NMR スペクトルより、これらの化合物は溶液中でも結晶構造と同様の構造で存在する事が示唆された。従って、AR アンタゴニスト活性には cis 型アミドの折れ曲がった構造が重要であると考えられる。

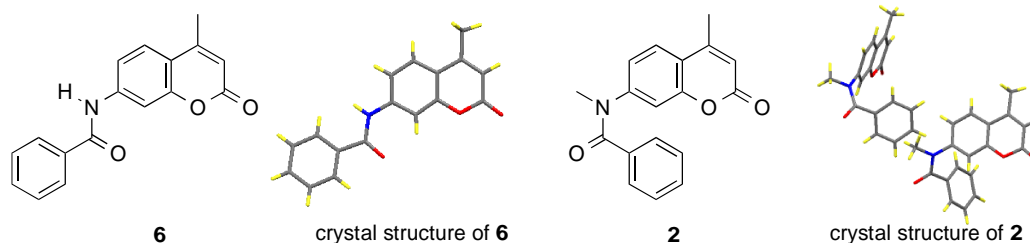


図 2 . クマリン誘導体の結晶構造

ついで、上記クマリン誘導体をリード化合物として、キノロン誘導体へと構造展開した。その結果、キノロン誘導体 7 および 8 (図 3) はクマリン誘導体と比べて 1桁強い AR アンタゴニスト活性を有することがわかった。また、以前、本研究者らが見いだした (ベンゾイルアミノフェノキシ) フェノール骨格を有する AR アンタゴニストをリード化合物として更なる構造展開を行い、高活性な誘導体 9 (図 3) を見いだした。更に、これらの新規 AR アンタゴニストが変異アンドロゲン受容体に対してもアンタゴニストとして機能することを明らかとした。

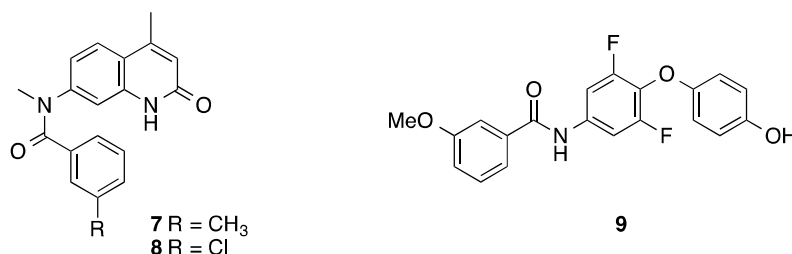


図 3 . 変異 AR にも有効な AR アンタゴニスト

(2) 新規プロゲステロンアンタゴニストの創製

AR アンタゴニスト活性を有する 7-(*N*-メチルベンズアミド)クマリン誘導体 2 の構造活性相関研究の過程で、アミド結合をスルホンアミド結合に変えた化合物を合成したところ、化合物 10 や 11 (図 4) が AR アンタゴニスト活性を持たず、PR アンタゴニスト活性を持つことを見いだした。クマリンスルホンアミド誘導体の立体構造の解析から、スルホンアミドの synclinal 構造が活性に重要であることが示唆された。ついで、本化合物の誘導体として、7位スルホンアミド基の硫黄原子に結合したベンゼン環上の置換基の精査、窒素原子上の置換基の精査に加えて、クマリン環を種々の含窒素複素環に変換した化合物を系統的に合成した。これらの化合物の PR に対する活性を、内因性 PR を発現している T47D 細胞を用いて、プロゲステロンによって誘導されるアルカリフォスファターゼの産生の増加率または阻害率により評価することで、詳細な構造活性相関を明らかとすることができた。結晶構造解析の結果、PR アンタゴニスト活性を持つスルホンアミド誘導体 10 が synclinal 構造をもち、cis 型アミド結合とは異なる折れ曲がり構造となることがわかり、本構造が PR 選択性に重要であることが示唆された。更に、新たにキノロン誘導体を設計し、6 位にベンゼン環や複素芳香環をもつ化合物を種々合成した。その結果、非常に強いプロゲステロンアンタゴニスト活性を有する化合物を見いだすことができた。

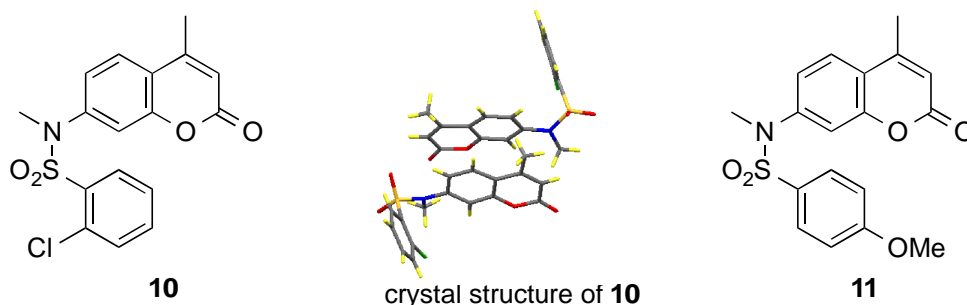


図 4 . 新規 PR アンタゴニストの構造

(3) 新規ビタミン D 受容体アゴニストの創製

ステロイド骨格の B 環が開裂したセコステロイド構造を持つビタミン D もステロイドホルモンと同様の核内受容体を介した遺伝子転写制御を行っている。本研究では、天然リガンドが持

つセコステロイド構造を持たない誘導体の創製を行った。まず、プロゲステロンやアンドロゲン受容体リガンドの骨格として用いたクマリンをセコステロイド骨格の CD 環の代替構造として用いた分子設計を行った。クマリンに活性型ビタミン D の A 環および側鎖構造となる置換基を導入した化合物を数種合成したが、ビタミン D 活性は認められなかった。

次に、ビタミン D 核内受容体 (VDR) の第二の内因性リガンドとして同定されたリトコール酸 (図 5) の構造をもとに、新規非セコステロイド型誘導体の創製を行った。リトコール酸は、活性型ビタミン D₃ と比べると、その活性は数 1000 分の 1 程度であり、これまで高活性な誘導体の報告はなかった。本研究者は、VDR のリガンド結合ドメイン (LDB) とリトコール酸の共結晶の構造解析の結果をもとに、リトコール酸の 3 位水酸基を他の官能基に変えた誘導体 12~14 を設計、合成した (図 5)。ヒト急性前骨髄球性白血病細胞 HL-60 の分化誘導活性を指標に、ビタミン D 活性を評価したところ、化合物 13 がリトコール酸の数千倍で活性型ビタミン D₃ よりも強い活性を有していることがわかった。化合物 13 は、VDR 結合能を有し、VDR を介した転写活性化能も有していた。また、化合物 13 と VDR LBD との共結晶の構造解析にも成功し、結合様式を明らかとすることができた。ついで、3 位置換基の精査を行った結果、更に数倍高く、活性型ビタミン D 以上の活性を持つ化合物を見いだした。化合物 13 の体内動態を解析した結果、血中からの消失が非常に早いことがわかり、体内動態の改善が今後の課題である。

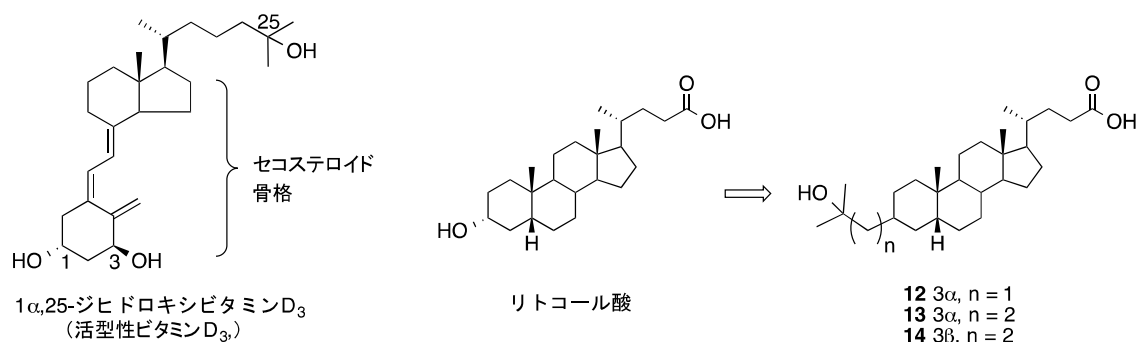


図 5 . 活性型ビタミン D₃、リトコール酸およびその誘導体の構造

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- 1 Urushibara, K.; Masu, H.; Mori, H.; Azumaya, I.; Hirano, T.; Kagechika, H.; Tanatani, A.; Synthesis and Conformational Analysis of Alternately N-Alkylated Aromatic Amide Oligomers. *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 14338-14349.
- 2 Kazui, Y.; Fujii, S.; Yamada, A.; Ishigami-Yuasa, M.; Kagechika, H.; Tanatani, A.; Structure-Activity Relationship of Novel (Benzoylaminophenoxy)phenol Derivatives as anti-Prostate Cancer Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 5118-5127.
- 3 Tojo, Y.; Urushibara, K.; Yamamoto, S.; Mori, H.; Masu, H.; Kudo, M.; Hirano, T.; Azumaya, I.; Kagechika, H.; Tanatani, A.; Conformational Properties of Aromatic Oligoamides Bearing Pyrrole Rings. *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 4606-4617.
- 4 Yamasaki, R.; Iida, M.; Ito, A.; Fukuda, K.; Tanatani, A.; Kagechika, H., Masu, H. Okamoto, I. Crystal Engineering of N, N'-Diphenylurea Compounds Featuring Phenyl-Perfluorophenyl Interaction. *Crystal Growth&Design* **2017**, 17, 5858-5866.
- 5 Mori, S.; Takagaki, R.; Fujii, S.; Urushibara, K.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Novel non-steroidal progesterone receptor ligands based on m-carborane containing a secondary alcohol: effect of chirality on ligand activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, 65, 1051-1057.
- 6 Yamada, A.; Kazui, Y.; Yoshioka, H.; Tanatani, A.; Mori, S.; Kagechika, H.; Fujii, S. Development of N-(4-phenoxyphenyl)benzenesulfonamide Derivatives as Novel Nonsteroidal Progesterone Antagonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016** 7, 1028-1033.
- 7 Kinoshita, M.; Negishi, M.; Sakai, H.; Hirano, T.; Mori, S.; Fujii, S.; Kagechika, H.; Tanatani, A. Development of 6-Arylcoumarins as Nonsteroidal Progesterone Antagonists. Structure-activity Relationships and Fluorescence Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 5602-5610.
- 8 Fujiwara, T.; Ohira, K.; Urushibara, K.; Ito, A.; Yoshida, M.; Kanai, M.; Tanatani, A.; Kagechika, H.; Hirano, T. Cyproheptadine Derivatives as Inhibitor of Histone Methyltransferase, SET7/9. Relationship between Stereochemical Property and Inhibitory Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 4318-4323.

[学会発表](計 24 件)

- 1 吉岡千咲、川崎波留、佐々木晴江、増野弘幸、河内恵美子、伊藤暢聡、影近弘之、棚谷綾 .ビタミン D 活性を有するリトコール酸アミド誘導体の創製 .日本薬学会第 139 年会、

- 千葉、2019年。
- 2 小西史香、森修一、影近弘之、棚谷綾．ミネラルコルチコイドアンタゴニスト活性を有する新規アミドおよびスルホンアミドの創製．日本薬学会第139年会、千葉、2019年。
 - 3 棚谷綾、吉岡千咲、川崎波留、佐々木晴江、藤原葉子、増野弘幸、伊藤暢聡、影近弘之．ビタミンD活性を有するリトコール酸誘導体の構造展開．第361回脂溶性ビタミン総合研究委員会、東京、2019年。
 - 4 Konishi, F.; Mori, S.; Kagechika, H.; Tanatani, A. Development of Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonists. 9th Ewha-JWU-Ochanomizu Joint Symposium, Seoul, Korea, 2018年。
 - 5 吉岡千咲、川崎波留、佐々木晴江、増野弘幸、河内恵美子、伊藤暢聡、影近弘之、棚谷綾．リトコール酸をリード化合物とした新規非セコステロイド型VDRリガンドの創製．日本レチノイド研究会第29回学術集会、熊本市、2018年。
 - 6 小西史香、森修一、影近弘之、棚谷綾．ミネラルコルチコイドアンタゴニスト活性を有する新規ベンゾキサジン-3-オンスルホンアミドの創製．日本レチノイド研究会第29回学術集会、熊本市、2018年。
 - 7 棚谷綾、川崎波留、佐々木晴江、増野弘幸、河内恵美子、伊藤暢聡、影近弘之．リトコール酸をリード化合物とした新規ビタミンD誘導体の構造活性相関．第4回Neo Vitamin D Workshop学術集会、東京、2018年。
 - 8 棚谷綾、工藤まゆみ、漆原紅．芳香族アミド類の特性を活かしたらせんフォルダマーの創製．日本薬学会第138年会、金沢、2018年。
 - 9 Mori, S.; Takagaki, R.; Fujii, S.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Development of novel progesterone receptor ligands bearing *m*-carborane as a hydrophobic pharmacophore. Symposium on Frontier of Genomic Medicine, Tokyo, 2018年。
 - 10 Negishi, M.; Koga, H.; Mori, S.; Kagechika, H.; Tanatani, A. Development of Nitrogen-Containing Heteroaromatic Compounds as Novel Progesterone Antagonists. Symposium on Frontier of Genomic Medicine, Tokyo, 2018年。
 - 11 Kawasaki, H.; Sasaki, H.; Masuno, H.; Kawachi, E.; Ito, N.; Kagechika, H.; Tanatani, A. Development of Lithocholic Acid Derivatives with A 3-Hydroxyalkyl Group as Novel Nonsteroidal Vitamin D Analogs. Symposium on Frontier of Genomic Medicine, Tokyo, 2018年。
 - 12 根岸真生、古賀瞳、森修一、影近弘之、棚谷綾．プロゲステロンアンタゴニスト活性を有する複素芳香族スルホンアミド誘導体の創製．日本レチノイド研究会第28回学術集会、神戸市、2017年。
 - 13 川崎波留、佐々木晴江、増野弘幸、河内恵美子、伊藤暢聡、石田寛明、山本恵子、影近弘之、棚谷綾．リトコール酸をリード化合物とした新規非セコステロイド型ビタミンD誘導体の創製．日本レチノイド研究会第28回学術集会、神戸市、2017年。
 - 14 森修一、高垣亮平、藤井晋也、棚谷綾、影近弘之．*m*-カルボランを疎水性骨格とした新規プロゲステロン受容体リガンドの創製．第35回メディスナルケミストリーシンポジウム、名古屋市、2017年。
 - 15 川崎波留、佐々木晴江、増野弘幸、河内恵美子、伊藤暢聡、石田寛明、山本恵子、平野真梨子、影近弘之、棚谷綾．リトコール酸をリード化合物とした新規非セコステロイド型VDRリガンドの構造展開．第3回Neo Vitamin D Workshop学術集会、東京、2017年。
 - 16 Tanatani, A.; Urushibara, K.; Kudo, M.; Fujii, S.; Masu, H.; Azumaya, I.; Kagechika, H. Helical Foldamers Based on the Conformational Properties of Aromatic Amides, Ureas and Squaramides. Chirality 2017 ISCD-29, Tokyo, 2017年。
 - 17 川崎波留、佐々木晴江、増野弘幸、河内恵美子、影近弘之、棚谷綾．リトコール酸をリード化合物にした新規ビタミンD誘導体の創製．日本ビタミン学会第69回大会、横浜市、2017年。
 - 18 棚谷綾、佐々木晴江、川崎波留、増野弘幸、河内恵美子、伊藤暢聡、石田寛明、山本恵子、平野真梨子、影近弘之．高いビタミンD活性を有するリトコール酸誘導体の創製．日本ビタミン学会第69回大会、横浜市、2017年。
 - 19 根岸真生、古賀瞳、森修一、影近弘之、棚谷綾．PRアンタゴニスト活性を有するスルホンアミド誘導体の創製．日本薬学会第137年会、仙台市、2017年。
 - 20 川崎波留、佐々木晴江、増野弘幸、河内恵美子、石田寛明、山本恵子、影近弘之、棚谷綾．高いビタミンD活性を有するリトコール酸誘導体の創製．日本薬学会第137年会、仙台市、2017年。
 - 21 根岸真生、古賀瞳、森修一、影近弘之、棚谷綾．スルホンアミド結合を有する非ステロイド型PRアンタゴニストの創製．第34回メディスナルケミストリーシンポジウム、つくば市、2016年。
 - 22 川崎波留、佐々木晴江、増野弘幸、影近弘之、棚谷綾．リトコール酸をリード化合物とした非セコステロイド型ビタミンD誘導体の創製．第34回メディスナルケミストリーシンポジウム、つくば市、2016年。
 - 23 Tanatani, A.; Tojo, Y.; Urushibara, K.; Yamamoto, S.; Mori, H.; Masu, H.; Kudo, M.; Hirano, T.;

- Kagechika, H. N-Alkylated Pyrroleamide Oligomers with Folded Cis-Amide Conformation. Symposium on Foldamers 2016, Bordeaux-Pessac, France, 2016 年 .
- 24 棚谷綾、佐々木晴江、増野弘幸、石田寛明、山本恵子、伊藤暢聡、河内恵美子、影近弘之 . リトコール酸の構造を基盤とした新規ビタミン D 受容体(VDR)リガンドの創製 . 第 2 回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会、東京、2016 年 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：ビタミン D 活性を有するリトコール酸誘導体
発明者：棚谷綾、佐々木晴江、川崎波留、影近弘之、増野弘幸
権利者：お茶の水女子大学、東京医科歯科大学
種類：特許
番号：PCT/JP2017/002902
出願年：2017 年
国内外の別： 国内

〔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)研究分担者：なし
(2)研究協力者：なし