

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00557

研究課題名(和文) タモキシフェンの新奇な標的受容体が乳ガン細胞内オルガネラ膜に存在する

研究課題名(英文) A novel target receptor of tamoxifen on the breast cancer cell organellar membrane

研究代表者

劉 曉輝 (LIU, XIAOHUI)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：60596849

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)：我々は、色々な細胞においてタモキシフェンが特異的に非常に強く結合する受容物質が小胞体膜、あるいは細胞核膜に存在することを発見した。本研究課題の目的は、乳がん細胞においてこのタモキシフェン受容体を同定し、これに結合しない新規な抗エストロゲン剤を開発することである。検討の結果、オルガネラ膜に存在する受容物質の単離には至らなかったものの、siRNAノックダウンによりタモキシフェンの結合が有意に減衰される候補タンパク質数種の同定に成功した。また、エストロゲン受容体には強く結合するが、タモキシフェン受容体には結合しない新奇な化合物の設計・合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have recently found a novel tamoxifen-specific receptor in the endoplasmic reticulum membrane or nuclear envelope in various cells. The purpose of the present study is to identify this tamoxifen receptor substance in a breast cancer cell and also to develop the new anti-estrogen with its inability to bind to such a tamoxifen-receptor. Despite our efforts, we failed in the isolation of any receptor substances present on endoplasmic reticulum membrane this time. On the other hand, we succeeded in identifying several different kinds of candidate receptor proteins, the siRNA knockdown of which attenuated significantly the maximum binding of tamoxifen. Furthermore, we achieved in the design-synthesis of a novel series of compounds that strongly bind to the estrogen receptor, but not to the tamoxifen receptor.

研究分野：化学物質影響化学、環境生化学、受容体科学

キーワード：タモキシフェン受容体 タモキシフェン 抗エストロゲン作用 オルガネラ膜 乳がん細胞

1. 研究開始当初の背景

乳がんは女性のがん患者において最も死亡率が高いがんであり、日本人女性は罹患する確率は16人に1人である(欧米は8~10人に1人)。さらに、再発率が高く、患者のQuality of Life (QOL)の観点から非常に大きな社会問題となっている。

タモキシフェンが抗乳がん剤として用いられると、乳がん組織に存在するエストロゲン受容体ERにエストロゲン・17β-エストラジオール(E2)と競合的に結合し、抗エストロゲン作用を示してその効果を発揮する。しかし、タモキシフェンの副作用は実に多種多様であり、そして、激しく、重篤なものが多い。

こうしたなか、我々は最近、『タモキシフェンが特異的に強く結合する受容物質が一般的な動物細胞の小胞体膜、あるいは細胞核膜に存在する』ことを発見した。そして、このオルガネラ膜受容物質は乳がん細胞にも存在することが明らかとなった。これは、乳がん細胞でのタモキシフェンの効用を悪化させる第一の要因であり、副作用の主要因であると思われた。そこで、こうしたタモキシフェン受容物質の物質的な解明、乳がん細胞での働き、さらには、副作用無しの抗エストロゲン剤開発が緊要の研究課題となった。

2. 研究の目的

タモキシフェン受容物質は、本来は固有の機能を持つ小胞体膜、あるいは細胞核膜(外膜)のタンパク質と推定され、細胞に一般的に存在する機能性タンパク質である可能性が高い。このため、タモキシフェンの投与、服用は、その元来の機能を阻害・抑制する、あるいは昂進・増進することになり、重篤な副作用を引き起こしている可能性が高い。しかも、乳がん細胞にエストロゲン受容体ERの他に、タモキシフェン受容体を加えて、ターゲットが2つ存在することになる。この不条理は解決されねばならない。本研究課題の最大の目的は、「タモキシフェン受容体タンパク質を同定し、タモキシフェンの乳がん治療における副作用の機序を解明する」ことであり、さらに、「このタモキシフェン受容体に結合しない誘導体を新規な抗エストロゲン剤として開発する」ことである。

3. 研究の方法

(1) タモキシフェン受容体の局在部位の同定

乳がん細胞MCF7、T47DにおいてNBD蛍光性のタモキシフェン誘導体を暴露し、Anti-NBD抗体を用いて、蛍光免疫染色、共焦点レーザー顕微鏡、電子顕微鏡などを利用

して、標的タンパク質の具体的な局在部位を同定する。

(2) アフィニティ精製のためのタモキシフェン導入ガラスビーズの調製

リンカーにタモキシフェンを繋いだガラスビーズを用いて、タモキシフェン受容体の単離・精製を試みる。まず、リンカーにカルボン酸スクシンイミド活性エステルを持つビーズにタモキシフェンを酸アミド結合で繋留した誘導体を化学合成する。このとき、フェノール基を残すか?あるいはジメチルアミノエチルフェノール基を残すか?のいくつかの可能性を検討する。次いで、小胞体膜、あるいは細胞核膜に存在する受容物質に対して十分な結合能力を持っているかを受容体結合試験で検証し、単離の実験に供するビーズを決める。

(3) 小胞体および細胞核の抽出

タモキシフェン受容物質が確認された乳がん細胞MCF7、T47D細胞について、まず、細胞を量的に培養し、市販のキットを用いた分画遠心分離法などにより小胞体と細胞核を別々に単離する。抽出した画分が目的画分であることを確かめるため、小胞体膜、あるいは細胞核膜に存在するそれぞれのマーカータンパク質を利用して、ウェスタンブロットティングを行う。

(4) タモキシフェン受容体の単離・精製

膜調製ののちタモキシフェン繋留のガラスビーズを用いてタモキシフェン受容体の単離を試みる。膜タンパク質を単離するためには可溶化する操作が必要である。可溶化剤として、CHAPS、Triton、Digitonin、Nonidet P-40などを用いて、最適な条件を検討する。その後、穏やかな条件下でガラスビーズと混和して、複合体を形成させる。洗いの操作後、高濃度の塩処理によって解離させ、調製用SDS-電気泳動法を用いて単離・精製する。

(5) トリチウム標識した化合物を用いた受容体結合試験

タモキシフェン受容体の小胞体膜、あるいは細胞核膜に局在を確認するため、各画分に対して、トリチウム標識したタモキシフェン、あるいは4-ヒドロキシタモキシフェンを用いて、飽和結合試験を実施する。一方、エストロゲン受容体ERに対する結合試験は、大腸菌を用いて発現・精製したERα、及びERβ受容体のリガンド結合ドメインタンパク質にトリチウム標識したE2を用いて実施する。

(6) レポーター遺伝子アッセイ

HeLa細胞を用いてエストロゲン受容体 ER を発現させ、化合物を暴露させて受容体に対する転写活性、あるいは転写阻害活性があるかをルシフェラーゼ・レポーター遺伝子アッセイによって調べる。

(7) 細胞増殖アッセイ

乳がん細胞 MCF7、及び T47D 細胞を用いて化合物の暴露によって、化合物の濃度依存的に細胞における増殖作用を細胞増殖アッセイキットで調べる。

(8) タモキシフェン受容体に結合しない抗エストロゲン剤の設計合成

タモキシフェン受容体に結合せず、エストロゲン受容体と選択的に、特異的に結合するタモキシフェン誘導体の設計・合成を行う。例えば、タモキシフェンに存在する3つのベンゼン環に塩素、臭素、ヨウ素のハロゲンを導入し、「ハロゲン結合」を誘起して受容体結合が増強されるようにはかる。分子モデリングソフトウエア MOE を用いた分子設計法も活用する。得られた化合物が他の受容体への結合の可能性を排除するため、手持ちの受容体アッセイ系を網羅的に試験し、確認する。

4. 研究成果

(1) 乳がん細胞におけるタモキシフェン受容物質の局在

本研究の標的であるタモキシフェン受容物質は、HeLa、CV-1、COS-7 などの調べたすべての動物培養細胞においてその存在、局在が確認、精査されている。そこで、まず、MCF7、及び T47D の2種の乳がん細胞において、タモキシフェン受容物質の局在部位を NBD 蛍光性のタモキシフェン誘導体を用いて調べた。その結果、MCF7、T47D とともに、細胞核周辺で染色され、タモキシフェン受容物質は小胞体膜、あるいは細胞核膜に局在していることが明らかとなった(図1)。

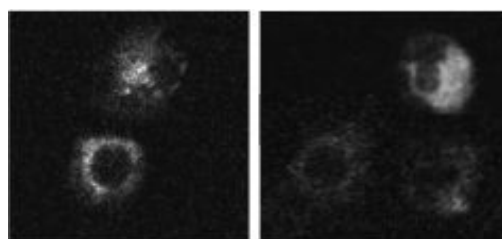


図1 蛍光タモキシフェンの局在を示す乳がん細胞(左:MCF7;右:T47D)
〔小胞体膜あるいは細胞核外膜が染色(上では白色)されている〕

(2) タモキシフェン受容体の単離・精製の試み

標的受容体の単離・精製を行うため、まず、アフィニティビーズを調製した。次いで、乳がん細胞 MCF7 を量的に培養し、市販キットを用いて分画遠心分離法によって小胞体を単離した。さらに、ジギトニン処理によって可溶化した小胞体膜について調製したタモキシフェン繫留のガラスビーズを用いてタモキシフェン受容体の単離を試みた。しかしながら、特異的にタモキシフェンに結合するタンパク質画分同定には至らなかった。膜タンパク質のためか、膜成分を取り出しても結合性を示さなくなり、単離は困難を極めた。また、用いたアフィニティ担体の親和性の不十分さが原因とも考えられたため、リンカー Spacer を長くするなど工夫を施したが、単離には至らなかった。このため、別な担体をデザインする、あるいはタンパク質の結合性を失わないような単離方法に留意しつつ、今後さらに続行の予定である。

一方、小胞体膜、あるいは細胞核膜に存在が知られているタンパク質の検討からタモキシフェン受容体候補を探索することにして、まず約 10 種をリストアップした。そして、これら候補受容体について、目的のタモキシフェン受容体か? を検討した。それぞれの mRNA 遺伝子に対する siRNA を乳がん細胞に導入し、標的タンパク質の発現阻止の条件下に置いて調べた。その結果、タモキシフェンの結合が有意に、顕著に減衰される候補タンパク質数種類が判明した。今後、これらが目的とする当該のタモキシフェン受容体であるかを、発現タンパク質を用いる受容体結合試験等によって引き続き精査する予定である。

(3) タモキシフェン受容体に結合しない抗エストロゲン剤の分子設計と化学合成

タモキシフェンは、エストロゲン受容体にも、タモキシフェン受容体にも結合する。すなわち、両受容体に対して非選択的である。これをどちらかの受容体に対して選択的、そして、結合性の優れた特異的な化合物にするためには、一方の受容体への結合を不都合にする化学修飾が有効である。しかしながら、受容体の構造が不明な状況下では、「タモキシフェン受容体に結合しない」化合物を得るためには、まず、これまでの構造活性相関の総合的な解析が必要である。計算化学的な諸検討から、基本的な骨格構造にテトラフェニルエテンが適当であることが示された。そこで、これを核構造にして誘導体の分子設計に

取り組んだ。その結果、十数種類の化合物が候補として抽出された。ベンゼン環への様々な置換基の搭載を基本的な設計戦略として実施し、実際にその創成に成功した。

本研究では、抗エストロゲン剤の開発を目的とするため、「エストロゲン受容体に選択的に結合し、タモキシフェン受容体には結合しない」、そして、「エストロゲン E2 の活性を抑制する」という2つの要件を満たす化合物の創成が必要である。そこで、候補化合物から、まず可能性の高い4種の化合物について合成し、エストロゲン受容体、及びタモキシフェン受容体に対して結合性を調べた。その結果、4種の化合物について、いずれもエストロゲン受容体に強く結合するものの、タモキシフェン受容体には全く結合しないことが確認された。また、これらの化合物はいずれもエストロゲン受容体におけるエストロゲン E2 の活性に対して阻害的に働き、しかも、乳がん細胞 MCF7、T47D 細胞増殖抑制作用を示すことが分かった。さらに、より高活性な化合物の設計合成にも成就した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

- 1) 劉 曉輝、松島綾美、下東康幸：乳がん細胞における内分泌攪乱物質ビスフェノールのエストロゲン受容体応答細胞。(ニュー・サイエンス社) Vol. 49, No. 7 (通巻652号), 特集「がん治療抵抗性のメカニズム解明に向けた新しいアプローチ」, 47-51 (2017). 査読無
- 2) Torikai, K., Koga, R., Liu, X., Umehara, K., Kitano, T., Watanabe, K., Oishi, T., Noguchi, H., and Shimohigashi, Y.: Design and synthesis of benzoacridines as estrogenic and anti-estrogenic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **25**, 5216 - 5237 (2017). Doi: 10.1016/j.bmc. 2017.07.067. 査読有
- 3) Liu, X., Nishimura, H., Fujiyama, A., Matsushima, A., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y.: α -Helix-peptides composing the human nuclear receptor ERR γ competitively provoke inhibition of functional homomeric dimerization. *Biopolymers – Peptide Science*, **106(4)**, 547 - 554 (2016). Doi: 10.1002/bip.22795. 査読有
- 4) Liu, X., Shimohigashi, M., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: Protein constitutive peptide fragments to inhibit protein-protein interaction: Inhibitory peptides as molecular probe for clarification of human nuclear receptor activation mechanism. *Peptide*

Science 2015, 319 - 320 (2016). 査読有

〔学会発表〕(計14件)

- 1) 劉 曉輝、松山祐昂、杉山真季子、松島綾美、下東美樹、下東康幸：不活性な ER α -AF1 ドメイン欠損体は自発活性化型核内受容体 ERR により活性化される。第90回日本生化学会大会 (BMB2017), 平成29年12月6-9日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
- 2) Liu, X., Nakagawa, H., Sugiyama, M., Matsushima, A., Shimohigashi, M. and Shimohigashi, Y.: Homodimer function of human nuclear receptor ERR α evidenced using α -helix peptides in the dimer interface. 第54回ペプチド討論会, 平成29年11月20-22日, 大阪府立大学 (大阪府堺市).
- 3) 劉 曉輝、松山祐昂、下東美樹、下東康幸：核内受容体 ERRs は不活性 ER α -AF1 ドメイン欠損体とも協働してビスフェノール A 低用量効果を示す。環境ホルモン学会第19回研究発表会, 平成28年12月8-9日, 文部科学省 研究交流センター (茨城県つくば市).
- 4) 劉 曉輝、崎戸沙耶、藤山明菜、西村裕一、松島綾美、下東美樹、下東康幸：エストロゲン受容体 ER およびエストロゲン関連受容体 ERR のホモダイマー機能のダイマー化阻害ペプチドによる証明。平成28年度日本生化学会九州支部例会, 平成28年5月14-15日, 鹿児島大学・稲盛会館 (鹿児島市).
- 5) 劉 曉輝、池田 伸、松島綾美、下東康幸：エストロゲン関係受容体の協働作用によりビスフェノール A の低用量効果が生まれる分子メカニズム。環境ホルモン学会第18回研究発表会, 平成27年12月11-12日, 自治医科大学 地域医療情報研修センター (栃木県下野市).

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
劉 曉輝 (LIU, Xiaohui)
九州大学・理学研究院・助教
研究者番号：60596849
- (2) 研究分担者
該当なし
- (3) 連携研究者
下東 康幸 (SHIMOHIGASHI, Yasuyuki)
九州大学・理学研究院・名誉教授
研究者番号：00211293