

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07009

研究課題名（和文）選択的核内受容体分解誘導剤の開発

研究課題名（英文）Development of selective nuclear receptor downregulator

研究代表者

正田 卓司（Shoda, Takuji）

国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・室長

研究者番号：60435708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：近年、ER α がトリプルネガティブ乳がん（TNBC）の増殖に関与している可能性が示唆されたことから、ER α 選択的アンタゴニストは、TNBCの分子標的になると考えた。ER α のリガンドであるWAY-202196に長鎖アルキル基を導入したWC10をデザインし、7ステップで合成した。WC10はWAY-202196と同様にER α に対する高い選択性を示した。また強制発現系においてER α 選択的なアンタゴニスト活性を示した。さらにMDA-MB-231細胞に対する細胞増殖抑制効果を示した。WC10はER α 選択的アンタゴニストとして、TNBCに対する分子標的治療薬になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプルネガティブ乳がん（TNBC）は予後不良で知られる乳がんであり、治療に有効な分子標的の探索が精力的に行われています。近年、ER α が分子標的になりうるということが報告されたことから、我々の知見を基に、新規のER α アンタゴニストの開発を行いました。本研究でデザイン合成したWC10はTNBCの細胞に対し細胞増殖抑制効果を示したことから、TNBCの治療薬になる可能性が得られました。

研究成果の概要（英文）：Recently, it was suggested that ER α may be involved in the growth of triple-negative breast cancer (TNBC), and therefore, ER α -selective antagonists were considered to be molecular targets for TNBC. We designed and synthesized WC10, a long-chain alkyl group attached to WAY-202196, a ligand for ER α , in seven steps. WC10 showed high selectivity for ER α as well as WAY-202196. WC10 also showed ER α -selective antagonist activity in the forced expression system. Furthermore, WC10 showed an inhibitory effect on cell proliferation of MDA-MB-231 cells. These results suggest that WC10 is an ER α -selective antagonist and may be a potential molecular targeted drug for TNBC.

研究分野：創薬化学

キーワード：アンタゴニスト TNBC

1. 研究開始当初の背景

エストロゲン受容体(ER)は女性ホルモンであるエストロゲンが結合する核内受容体であり, ER と ER の2つのアイソフォームが存在している. 全乳がんのおよそ70%で ER が過剰発現しており, ER 陽性乳がんに分類される. ER は転写因子であり, エストロゲンが ER に結合すると ER は活性化を受けて DNA への結合が促進され遺伝子の転写が促進される. ER 陽性乳がんの細胞ではエストロゲン依存的に細胞増殖が促進されるため, ER アンタゴニストが有効な治療薬として知られている. 一方, ER は ER に比べて, 転写活性化作用が低いことが知られており, ER と二量体形成した場合には ER の活性を抑制する作用があるとされている. しかしながら近年, ER が乳がん以外のがんにおいてがん増殖を促進する働きが報告されており, ER が新たな創薬ターゲットとして注目されている.

2. 研究の目的

申請者は, ER をターゲットとした創薬研究を展開しており, これまでに ER に結合して機能を抑えるだけでなく, ER の分解を誘導する選択的エストロゲン受容体分解薬 (Selective Estrogen Receptor Down-regulator, SERD) の開発研究を行ってきた. 本研究ではその成果を踏まえ ER に対する SERD の開発を行う.

3. 研究の方法

申請者が行ってきた ER に対する SERD デザイン方法を応用して ER に対する SERD のデザイン・合成を行う. ER のリガンド結合領域(LBD)にリガンドが結合すると, C 末端側に位置するヘリックス 12(H12)が折りたたまれる. ER アンタゴニストであるタモキシフェン(Figure 1A)は, ジメチルアミンなどの嵩高い構造があり, この部分が H12 の正常な折りたたみを阻害することでアンタゴニスト効果を発揮する(Figure 1B). そこで申請者らはそこに長鎖アルキル基を導入することで H12 の折りたたみ構造が阻害され, さらにタンパク質の構造不安定化を引き起こし, プロテアーム等により分解されることを期待し(Figure 1C), リガンド部分をタモキシフェンとし, 長鎖アルキル基をシンプルなアルキル基とした一連の化合物をデザイン・合成し, その活性を評価した. その結果, アミノ基が二級でありかつドデシル基を有する化合物 C12 に ER 分解作用および転写抑制作用があることを見出した(Shoda, T., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24, 87). 引き続き化合物の構造展開を行い, 炭素鎖 10 かつ末端に F 基を有する化合物 C10F に, より強い ER 分解活性があることを見出し(Figure 2), SERD の構造的特徴を明らかにした. さらに, 本化合物の ER 分解作用のメカニズムを考察するため, コンピューターシミュレーションを行ったところ, ER 表面の疎水性アミノ酸で形成される疎水性領域に C10F のアルキル鎖が相互作用し(Figure 3), H12 およびコアクチベーターの相互作用を阻害していることが示唆された(Figure 4). 以上のことから, ER の疎水性領域は“急所”のような部位であり, その急所に相互作用する分子をデザインすることで新規 SERD を開発できることを示した(Shoda, T., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23, 3091, Shoda, T., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24, 2914). また, タモキシフェンだけでなく, その他の ER リガンドにも応用可能であることを示した(Misawa, T., *et al.*, *MedChemCommun*, 2017, 8, 239, Shoda, T., *et al.*, *Med. Chem.*, 2017, 13, 206). そこで本研究ではこれらの知見を ER のリガンドへ応用することを考えた. ER と ER の LBD は 59%の相同性を有しているが, “急所”にあたる疎水性領域はよく保存されている. そこで ER

のリガンドに長鎖アルキル基を導入した化合物が SERD になるのではないかと考えた。

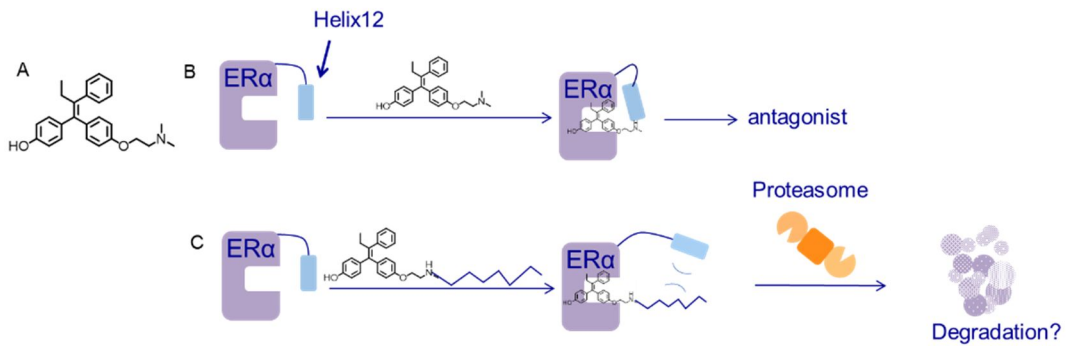


Figure 1. (A) タモキシフェンの構造, (B) タモキシフェンと H12, (C) 長鎖アルキル基を導入したタモキシフェン誘導体

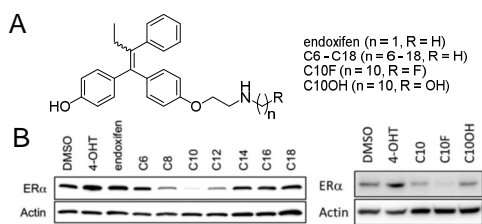


Figure 2. (A) 合成した長鎖アルキル基を有するタモキシフェン誘導体の構造, (B) ウェスタンブロットニングによる ER 分解活性の評価

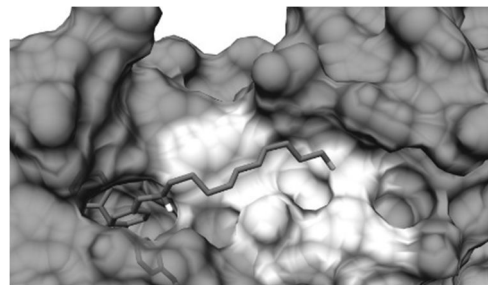


Figure 3. C10F と ER の結合モデル(疎水性領域として Leu354, Met357, Ile358, Leu379, Trp358 を白で示した)

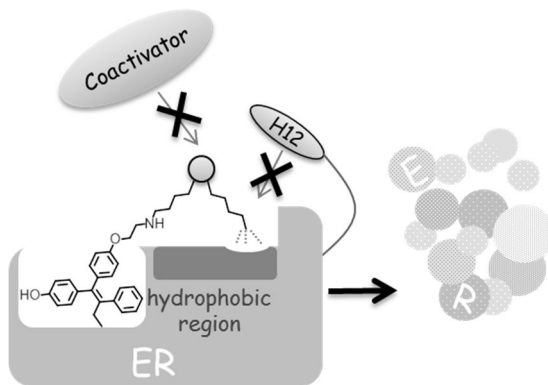


Figure 4. ER 表面の疎水性領域が急所に当たると考えられる。

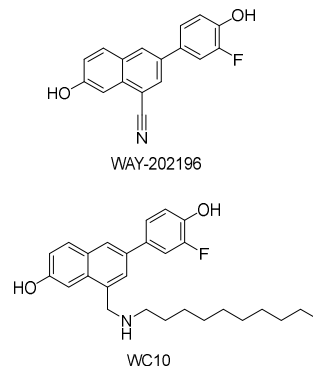


Figure 5. WAY-202196 および WC10 の構造

具体的には Figure 5 に示した ER のリガンドである WAY-202196 のシアノ基アルキル基を導入した WC10 をデザインし, 全7ステップで合成した. その結合親和性を Polar Screen ER Competitor Assay Kit を用いて評価した. 検出には蛍光偏光法を用い, IC₅₀ を算出した. 計算化学ソフト MOE のドッキングシミュレーションを用いて WC10 と ERβ の結合様式を予測した. また各種細胞を用いて, アンタゴニスト活性を検討した.

4. 研究成果

合成した WC10 の結合親和性を Polar Screen ER Competitor Assay Kit を用いて評価した結果, WC10 の ERβ に対する IC₅₀ は 7.4nM であり, ERα に対しては 100nM であった. E2 に対する IC₅₀ を用いて ERα および ERβ の Relative Binding Affinity (RBA) を算出したところ, WC10

は 9.4 であり, WAY-202196 は 78 であった. WC10 はその親化合物である WAY-202196 同様に ER β に対する選択性を有していた.

続いて MOE のドッキングシミュレーションを行った. rat ER β と ICI の結晶構造をテンプレートとして WC10 の結合構造を予測したところ, ICI と同様にあるきさがりガンド結合領域 (LBD) から外に向かって伸びていた. また WAY-202196 と ER β の結晶構造と WC10 の構造を重ね合わせたところ, 水素結合を形成する OH 基は WAY-202196 とほぼ同じ位置にあったが, ナフタレン環は反転していた.

次に細胞を用いてアンタゴニスト活性を検討した. Hela 細胞に全長の ER α または ER β を強制発現したアッセイ系を構築し, E2 および WC10 を投与した際の pS2 量の変化を RT - PCR で測定した. その結果, WC10 は ER β 依存的な pS2 の発現を阻害した. また MDA-MB-231 細胞を DPN あるいは way-202196 で ER β 選択的に刺激したところ WC10 は濃度依存的な増殖抑制効果を示した. WC10 は ER β 選択的なアンタゴニスト作用を有していることが示された. 以上のことから WC10 は TNBC に対する分子標的薬になる可能性が示唆された.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kaiho-Soma Ai, Akizuki Yoshino, Igarashi Katsuhide, Endo Akinori, Shoda Takuji, Kawase Yasuko, Demizu Yosuke, Naito Mikihiro, Saeki Yasushi, Tanaka Keiji, Ohtake Fumiaki	4. 巻 81
2. 論文標題 TRIP12 promotes small-molecule-induced degradation through K29/K48-branched ubiquitin chains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1411 ~ 1424.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2021.01.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishimoto Hayato, Kano Manabu, Sugiyama Hirokazu, Takeuchi Hirofumi, Terada Katsuhide, Aoyama Atsushi, Shoda Takuji, Demizu Yosuke, Shimamura Jinen, Yokoyama Reiji, Miyamoto Yuji, Hasegawa Koji, Serizawa Masaru, Unosawa Kazuomi, Osaki Kazuo, Asai Naohika, Matsuda Yoshihiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Approach to Establishment of Control Strategy for Oral Solid Dosage Forms Using Continuous Manufacturing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 211 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00824	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamano Koji, Kikuchi Reika, Kojima Waka, Hayashida Ryota, Koyano Fumika, Kawawaki Junko, Shoda Takuji, Demizu Yosuke, Naito Mikihiro, Tanaka Keiji, Matsuda Noriyuki	4. 巻 219
2. 論文標題 Critical role of mitochondrial ubiquitination and the OPTN?ATG9A axis in mitophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e201912144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201912144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shoda Takuji, Ohoka Nobumichi, Tsuji Genichiro, Fujisato Takuma, Inoue Hideshi, Demizu Yosuke, Naito Mikihiro, Kurihara Masaaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Targeted Protein Degradation by Chimeric Compounds using Hydrophobic E3 Ligands and Adamantane Moiety	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ph13030034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohoka Nobumichi, Tsuji Genichiro, Shoda Takuji, Fujisato Takuma, Kurihara Masaaki, Demizu Yosuke, Naito Mikihiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of Small Molecule Chimeras That Recruit AhR E3 Ligase to Target Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2822-2832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.9b00704	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 正田卓司, 津田萌菜, 平田尚也, 諫田泰成, 井上英史, 出水庸介
2. 発表標題 長鎖アルキル基を有するエストロゲン受容体 選択的アンタゴニストの開発
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津田萌菜, 正田卓司, 平田尚也, 諫田泰成, 井上英史, 出水庸介
2. 発表標題 長鎖アルキル基を有する選択的エストロゲン受容体分解誘導剤の開発
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田萌菜, 正田卓司, 平田尚也, 諫田泰成, 井上英史, 出水庸介
2. 発表標題 長鎖アルキル基を有するエストロゲン受容体 選択的分解誘導剤の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 正田卓司, 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志, 出水庸介
2. 発表標題 LSD類縁体MiPLAの合成とその性状解析
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年~2021年

1. 発表者名 津田 萌菜, 正田 卓司, 井上 英史, 出水 庸介
2. 発表標題 長鎖アルキル基を有するエストロゲン受容体分解誘導剤のERサブタイプ選択性に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 正田 卓司, 大岡 伸通, 辻 巖一郎, 井上 英史, 内藤 幹彦, 出水 庸介
2. 発表標題 疎水性タグを利用した標的タンパク質分解誘導剤によるE3リガーゼ依存/非依存タンパク質分解に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 分析用標品確保のためのフェンタニル構造類似化合物の合成研究
2. 発表標題 辻 巖一郎, 三澤 隆史, 正田 卓司, 河村 麻衣子, 花尻-木倉 瑠理, 袴塚 高志, 出水 庸介
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------