

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430164

研究課題名(和文) 乳癌治療を指向したエストロゲン受容体分解誘導剤の開発と細胞死誘導分子機構の解明

研究課題名(英文) Development of estrogen receptor degrader and analysis of drug-induced cell death mechanism for breast cancer therapy

研究代表者

奥平 桂一郎 (OKUHIRA, Keiichiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：10425671

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)：近年我々はユビキチン-プロテアソーム系を利用したエストロゲン受容体分解誘導剤SNIPER(ER)の開発を進めている。本研究において、SNIPER(ER)が乳癌細胞のエストロゲン受容体を分解後に活性酸素種(ROS)を発生させ、ネクロシス様の細胞死を誘導することを明らかにした。この結果は、SNIPER(ER)がER陽性乳癌の治療のためのリード化合物となりうることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have developed a hybrid small molecule named SNIPER(ER) (Specific and Non-genetic IAP-dependent Protein Eraser for Estrogen Receptor) that induces degradation of estrogen receptor alpha (ERα) proteins via ubiquitin-proteasome system. In this study, we revealed that SNIPER(ER) induces ROS production after the ERα degradation and caused necrotic cell death of MCF-7 cells, implying a therapeutic potential of SNIPER(ER) as a lead for the treatment of ERα-positive breast cancers.

研究分野：細胞生物学

キーワード：乳癌 エストロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性の罹患率が最も高いがんである。女性に多く見られるが、まれに男性も罹患することがあり、我が国における罹患率・死亡率は、ともに年々増加傾向にある。乳癌の約7割が女性ホルモンであるエストロゲンの影響を受けて増殖するタイプであり、多くの場合、乳癌組織においてエストロゲン受容体(ER)の発現上昇が認められる。エストロゲンのERに対する結合を競合的に阻害する薬剤タモキシフェン(Tamoxifen, TAM)は、乳癌の進展を抑制するため、乳癌の治療、さらには発がんリスクの高い患者の予防薬として、これまで広く使われてきた。しかし一方で、子宮などの組織においては、タモキシフェンはERと結合してエストロゲン様作用を発揮することから、子宮内膜癌のリスクを上昇させることが知られている。また、中性脂肪の増加による脂肪肝の発症や、鬱症状などの副作用のため、投薬を途中で中止せざるを得ないケースも多い。長期服用により乳癌がタモキシフェンに対する耐性を獲得して、より悪性度の高い二次癌発症リスクを上昇させることから、通常は5年以内の服用に限られるなど、解決すべき課題が多く残されている。

申請者はこれまで、低分子化合物によって細胞内に発現する様々なタンパク質を選択的に分解誘導することのできる「プロテインノックダウン法」の開発に携わってきた。この技術は、ユビキチンリガーゼ cIAP1 に結合する小分子ペスタチン (BS) と標的タンパク質に結合するリガンド (X) とのハイブリッド化合物 (BS-X) で両タンパク質を架橋し、標的タンパク質を特異的にユビキチン化してプロテアソームによる分解を誘導するという独創的な作用機序に基づいている (図1)。原理的には、リガンド (X) を置換することにより様々なタンパク質の特異的分解に応用できる極めて汎用性の高い技術であり、以前に、レチノイン酸結合タンパク質 CRABP-II を選択的に分解する薬剤の開発に成功している (FEBS Lett 2011; Bioorg Med Chem Lett 2012)。そこで申請者らは、タモキシフェンの問題を克服するために、プロテインノックダウン法を利用して、ER を標的とした ER 選択的分解誘導剤を作製した。この ER 選択的分解誘導剤は、BS とタモキシフェン (TAM) のハイブリッド化合物 (BS-TAM) であり (図1)、申請者らは、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 において、BS-TAM が内因性の ER α タンパク質の分解を誘導することを証明した (図2) (Bioorg Med Chem Lett 2012; 特願 2011-195081 号)。

さらに興味深いことに、ER 分解誘導剤 BS-TAM は、ER α の分解とともに、癌細胞に強力な細胞死を惹起することが明らかとなった。この ER 分解誘導剤による細胞死は、ER の発現レベルが低い細胞では誘導されず、ま

た、プロテインノックダウン反応を阻害するプロテアソーム阻害剤の処理によって抑制された。これらの実験結果は、この細胞死が非特異的な細胞毒性に起因するのではなく、ER 分解誘導剤による細胞内 ER の減少が細胞死の直接の引き金となっていることを示唆している。これまでの知見から予想された結果は、ER の発現減少による癌細胞の増殖抑制であって、細胞死の誘導は予想外であり、これを分子レベルで説明するモデルは、現在のところ明らかでない。癌細胞の増殖を抑制するのではなく、積極的に細胞死を誘導するこの分子は、タモキシフェンよりも強力な選択的な抗癌作用を持つ新規薬剤のリード化合物となる可能性があると考えられる。

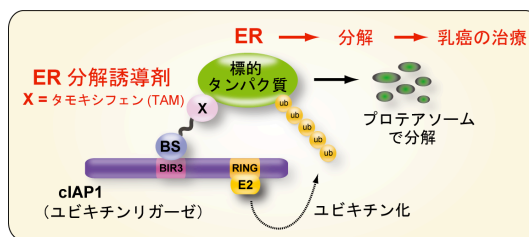


図1 プロテインノックダウン法

2. 研究の目的

以上の背景より、申請者らが開発した ER 分解誘導剤が、乳癌細胞に細胞死を誘導する分子機構を明らかにし、ER 分解能、細胞死誘導能において、ER 分解誘導剤の分子構造の最適化を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

エストロゲン依存性の増殖をする乳癌細胞において、タモキシフェン等で ER の機能を阻害すると、ER によって駆動される細胞増殖に重要な遺伝子群の転写が抑制され、細胞周期が停止し、最終的には細胞死に至る。しかし、ER 分解誘導剤による細胞死は、タモキシフェンで引き起こされる細胞増殖停止から細胞死に至るまでの時間と比較して、比較的短時間で誘導される (3-6 時間) ことから、ER 分解誘導剤が積極的に細胞死のシグナルを起動している可能性が高い。また、タモキシフェンによる細胞死には高濃度の薬剤が必要であり、細胞死を誘導する ER 分解誘導剤と同濃度のタモキシフェンでは細胞死はおこさないことから、それぞれが誘導する細胞死の機序にはかなり違いがあると考えられる。

そこでまず、ER 分解誘導剤依存型細胞死について、細胞死の種類 (アポトーシス・ネクロトーシス・オートファジー) を同定するために、細胞の形態観察を行い、さらに、各種細胞死阻害剤等により、細胞死誘導反応が阻害されるかを検討した。

さらに、細胞死を誘導するメカニズムについて検討した。細胞死の種類に基づいて、既

知の情報から、その上流の因子、シグナル伝達経路について調べ、メカニズムを考察した。

4. 研究成果

細胞死の種類を同定するために、ER 分解誘導剤で処理した MCF-7 細胞をギムザ液で染色して細胞の形態観察を行った。無処理の細胞と比較して薬剤処理された群においては、細胞の核画分のみが染色され細胞質がほとんど染まらない細胞の存在が認められた (図 2) さらに、アポトーシスを引き起こすスタ

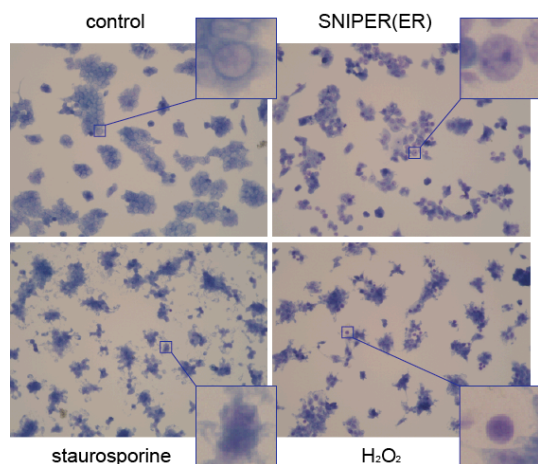


図 2 ギムザ染色

ウロスポリンで処理した細胞、又はネクローシスを引き起こす過酸化水素で処理した細胞と比較したところ、薬剤処理した細胞は過酸化水素で処理した細胞の形態に近いことが分かった。ネクローシスにおいてはクロマチン結合タンパク質である HMGB1 が細胞外に放出されることが知られているため、培養液中にある HMGB1 を測定したところ、ER 分解誘導剤及び過酸化水素によって細胞死を起こした細胞の培地中に HMGB1 が存在することを確認した (図 3) さらに、各種細胞死阻害剤 (アポトーシス: z-VAD-FMK, ネクローシス: Necrostatin, オートファジー: 3-MA) による ER 分解誘導剤による細胞死に対する影響を観察したが、どの化合物でも有意な

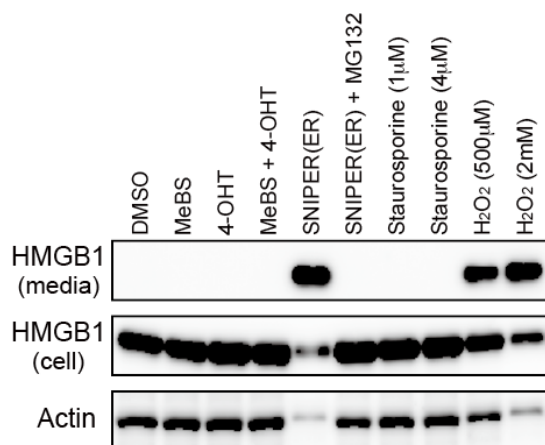


図 3 HMGB1 の放出

細胞死抑制効果は認められなかった。阻害剤は効果がなかったが、ギムザ染色による細胞形態観察と HMGB1 の放出の結果から、ER 分解誘導剤は乳癌細胞である MCF-7 に、ネクローシス様細胞死を誘導することが強く示唆された。

薬剤処理した MCF-7 細胞は、ネクローシス細胞を染色する Propidium Iodide により染色された。ネクローシスは活性酸素 (ROS) の過剰産生が引き金になって起こることが多いため、薬剤による細胞内の ROS の量について調べた。ROS によって酸化され蛍光を発する色素 CellRox Green を用いて細胞内 ROS の量を評価したところ、ER 分解誘導剤処理により細胞内 ROS の量は増加し、その効果はプロテアソーム阻害剤の存在下で抑制された。さらに、ROS のスカベンジャーである NAC で細胞を前処理しておくこと、ROS の産生が抑えられ、細胞死が抑制された (図 4)。以上の結果は、ER 分解誘導剤によって ER 分解依存的に ROS が産生され、それによりネクローシスが誘導されていることを示唆している。

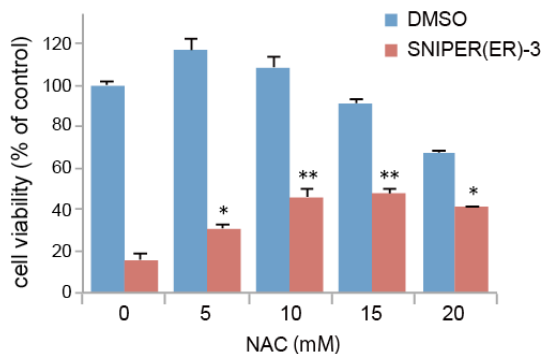


図 4 NAC 処理による細胞死抑制

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Kariyazono H, Nadai R, Miyajima R, Takechi-Haraya Y, Baba T, Shigenaga A, Okuhira K, Otaka A, Saito H. Formation of stable nanodiscs by bihelical apolipoprotein A-I mimetic peptide. *J Pept Sci.* 2016;22(2):116-122 doi: 10.1002/psc.2847 (査読有)
2. Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Kurihara M, Naito M. Molecular design, synthesis and evaluation of SNIPER(ER) that induces proteasomal degradation of ER α . *Methods Mol Biol.* 2016; 1366, 549-60 doi: 10.1007/978-1-4939-3127-9_42 (査読有)

3. Demizu Y, Misawa T, Nagakubo T, Kanda Y, Okuhira K, Sekino Y, Naito M, Kurihara M. Structural development of stabilized helical peptides as inhibitors of estrogen receptor (ER)-mediated transcription. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(15):4132-4138
doi: 10.1016/j.bmc.2015.06.067
(査読有)
 4. Mizuguchi C, Ogata F, Mikawa S, Tsuji K, Baba T, Shigenaga A, Shimanouchi T, Okuhira K, Otaka A, Saito H. Amyloidogenic Mutation Promotes Fibril Formation of the N-terminal Apolipoprotein A-I on Lipid Membranes. *J Biol Chem.* 2015;290(34):20947-20959
doi: 10.1074/jbc.M115.664227
(査読有)
 5. Shoda T, Kato M, Harada R, Fujisato T, Okuhira K, Demizu Y, Inoue H, Naito M, Kurihara M. Synthesis and evaluation of tamoxifen derivatives with a long alkyl side chain as selective estrogen receptor down-regulators. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(13):3091-3096.
doi: 10.1016/j.bmc.2015.05.002
(査読有)
 6. Handa D, Kimura H, Oka T, Takechi Y, Okuhira K, Phillips MC, Saito H. Kinetic and thermodynamic analyses of spontaneous exchange between high-density lipoprotein-bound and lipid-free apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 2015;54(4):1123-1131.
doi: 10.1021/bi501345j
(査読有)
 7. Ohoka N, Nagai K, Hattori T, Okuhira K, Shibata N, Cho N, Naito M. Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1513.
doi: 10.1038/cddis.2014.471
(査読有)
 8. Nagakubo T, Demizu Y, Kanda Y, Misawa T, Shoda T, Okuhira K, Sekino Y, Naito M, Kurihara M. Development of cell-penetrating R7 fragment-conjugated helical peptides as inhibitors of estrogen receptor-mediated transcription. *Bioconjug Chem.* 2014;25(11):1921-1924.
doi: 10.1021/bc500480e
(査読有)
 9. Mizuguchi C, Hata M, Dhanasekaran P, Nickel M, Okuhira K, Phillips MC, Lund-Katz S, Saito H. Fluorescence study of domain structure and lipid interaction of human apolipoproteins E3 and E4. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(12):1716-1724.
doi: 10.1016/j.bbali.2014.09.019
(査読有)
 10. Cui H, Wu W, Okuhira K, Miyazawa K, Hattori T, Sai K, Naito M, Suzuki K, Nishimura T, Sakamoto Y, Ogata A, Maeno T, Inomata A, Nakae D, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers as well as long needle-like multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce NLRP3-mediated IL-1 β secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452(3):593-599.
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.118
(査読有)
 11. Shoda T*, Okuhira K* (*equal contribution), Kato M, Demizu Y, Inoue H, Naito M, Kurihara M. Design and synthesis of tamoxifen derivatives as a selective estrogen receptor down-regulator. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(1):87-89
doi: 10.1016/j.bmcl.2013.11.078
(査読有)
 12. Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Nishimaki-Mogami T, Okuda H, Kurihara M, Naito M. Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor-alpha and necrotic cell death in breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2013; 104(11):1492-1498
doi: 10.1111/cas.12272
(査読有)
- [学会発表] (計 18 件)
1. 服部 隆行, 正田 卓司, 奥平 桂一郎, 柴田 識人, 大岡 伸通, 伊藤 進, 栗原 正明, 内藤 幹彦: 網羅的人工ユビキチン修飾システムの構築, 日本薬学会第 136 年会 (2016. 3. 29) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 2. 大岡 伸通, 伊東 昌宏, 奥平 桂一郎, 永井 克典, 柴田 識人, 服部 隆行, 長 展生, 内藤 幹彦: ユビキチン・プロテアソーム経路を利用したプロテインノックダウン化合物の開発, 日本薬学会第 136 年会 (2016. 3. 29) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 3. 正田 卓司, 加藤 雅士, 藤里 卓磨, 原田 麟太郎, 奥平 桂一郎, 井上 英史, 内藤 幹彦, 栗原 正明: タモキシフェン骨格を有する分解誘導剤のアルキル鎖長および末端構造の最適化, 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3. 28) 神戸学院大学 (兵庫県神戸市)
 4. 大岡 伸通, 永井 克典, 服部 隆行, 奥

- 平 桂一郎, 柴田 識人, 長 展生, 内藤 幹彦 : ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤の開発と抗がん活性評価, 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3. 28) 神戸学院大学 (兵庫県神戸市)
5. 出水 庸介, 長久保 貴哉, 三澤 隆史, 諫田 泰成, 奥平 桂一郎, 関野 祐子, 内藤 幹彦, 栗原 正明 : エストロゲン受容体転写活性化阻害ペプチドの創製, 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3. 28) 神戸学院大学 (兵庫県神戸市)
 6. Ohoka N, Nagai K, Okuhira K, Shibata N, Hattori T, Cho N, Naito M: SNIPER(TACC3) degrades TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway and induces apoptosis in cancer cells expressing a large amount of TACC3. 26th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (2014. 11. 19) Barcelona (Spain)
 7. 大岡伸通, 永井克典, 奥平桂一郎, 柴田 識人, 服部隆行, 長展生, 内藤幹彦 : ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤による癌細胞死の誘導. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014. 11. 26) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 8. 加藤雅士, 正田卓司, 奥平桂一郎, 井上 英史, 内藤幹彦, 栗原正明 : アルキル基の長さに着目したエストロゲン受容体分解誘導剤の構造最適化研究. 第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2014. 11. 27) 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
 9. 出水庸介, 長久保貴哉, 三澤隆史, 佐藤由紀子, 諫田泰成, 奥平桂一郎, 関野祐子, 内藤幹彦, 栗原正明 : エストロゲン受容体転写阻害ペプチドの開発. 第 40 回反応と合成の進歩シンポジウム (2014. 11. 10) 東北大学 川内萩ホール (宮城県仙台市)
 10. 加藤雅士, 正田卓司, 奥平桂一郎, 井上 英史, 内藤幹彦, 栗原正明 : タモキシフェン骨格を有するエストロゲン受容体分解誘導剤の構造活性最適化研究. 第 58 回日本薬学会関東支部大会 (2014. 10. 4) 昭和薬科大学 (東京都町田市)
 11. 長久保貴哉, 出水庸介, 三澤隆史, 佐藤由紀子, 諫田泰成, 奥平桂一郎, 関野祐子, 内藤幹彦, 栗原正明 : エストロゲン受容体転写阻害能を有するペプチドの創製. 第 58 回日本薬学会関東支部大会 (2014. 10. 4) 昭和薬科大学 (東京都町田市)
 12. 大岡伸通, 奥平桂一郎, 柴田識人, 服部隆行, 内藤幹彦 : ユビキチン・プロテアソームシステムを利用した TACC3 分解誘導剤によるがん細胞死の誘導. 第 73 回日本癌学会学術集会 (2014. 9. 26) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 13. 奥平桂一郎, 出水庸介, 服部隆行, 大岡伸通, 柴田識人, 最上 (西巻) 知子, 栗原正明, 奥田晴宏, 内藤幹彦 : エストロゲン受容体分解誘導剤による乳癌の細胞死誘導分子機構 日本薬学会第 134 年会 (2014. 3. 28) 熊本市総合体育館 (熊本県熊本市)
 14. Okuhira K, Demizu Y, Ohoka N, Shibata N, Hattori T, Nishimaki-Mogami T, Kurihara M, Okuda H, Naito M: Bestatin/tamoxifen hybrid molecule induces proteasomal degradation of estrogen receptor α and necrotic cell death in breast cancer cells. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, The Ubiquitin System: From Basic Science to Drug Discovery (2014. 1. 9) Big Sky (USA)
 15. 加藤雅士, 正田卓司, 奥平桂一郎, 井上 英史, 内藤幹彦, 栗原正明 : エンドキシフェン骨格を持つ新規エストロゲン受容体分解誘導剤の開発 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2013. 11. 21) アステールプラザ (広島県広島市)
 16. Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Nishimaki-Mogami, T, Okuda H, Kurihara M, Naito M: Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor- α and necrotic cell death in breast cancer cells. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (2013. 10. 20) Boston (USA)
 17. Okuhira K, Demizu Y, Ohoka N, Shibata N, Hattori T, Nishimaki-Mogami T, Kurihara M, Okuda H, Naito M: SNIPER induces ubiquitylation and proteasomal degradation of estrogen receptor followed by rapid cell death in breast cancer cells. The 35th Naito Conference; The Ubiquitin-Proteasome System (2013. 7. 10) シャトラーゼキングダムサッポロ (北海道札幌市)
 18. 奥平桂一郎, 大岡伸通, 最上 (西巻) 知子, 伊藤幸裕, 石川稔, 橋本祐一, 内藤 幹彦 : 細胞内に局在するタンパク質を標的としたプロテインノックダウン効果の検討 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (2013. 6. 13) 国立京都国際会館 (京都府京都市)

〔その他〕

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部
<http://www.nihs.go.jp/mtgt/index.html>
徳島大学大学院医歯薬学研究部 製剤分子
設計学分野
[http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty
/labo/szi/](http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/lab/szi/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥平 桂一郎 (OKUHIRA, Keiichiro)
徳島大学大学院医歯薬学研究部 准教授
研究者番号：10425671

(3) 連携研究者

出水 庸介 (DEMIZU, Yosuke)
国立医薬品食品研究所 有機化学部 室長
研究者番号：90389180