

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550040

研究課題名(和文)「小胞体膜受容体」内分泌攪乱物質・タモキシフェンの新奇標的に迫る

研究課題名(英文) Approach to the novel molecular target of endocrine disrupter tamoxifen  
"endoplasmic reticulum membrane receptor"

研究代表者

下東 康幸 (Shimohigashi, Yasuyuki)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00211293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、乳がんに対する抗がん剤・タモキシフェンの新奇な標的を一般的な細胞の小胞体膜に同定し、これに結合しない誘導体を新規な抗乳がん剤として開発することである。まず、小胞体膜に存在する受容体の単離・精製には至らなかったものの、候補タンパク質の絞り込みに成就した。さらに、エストロゲン受容体には結合するが、小胞体膜タモキシフェン受容体には結合しない化合物の合成に成功した。さらに、これらが抗エストロゲン作用を示し、また、乳がん細胞増殖抑制作用を示すことを明らかにした。このように、新規な抗エストロゲン剤の創成に成功した。

研究成果の概要(英文)：The principal objective of this project is to identify a novel endoplasmic reticulum membrane receptor protein, to which tamoxifen, an anti-breast cancer drug, binds specifically, and also to develop a novel series of drug derivatives that do not bind to this tamoxifen receptor. We succeeded in narrowing down the candidate proteins, but with no isolation and purification. This tamoxifen receptor is present generally in mammalian cells. We further succeeded in the synthesis of compounds that bind to the estrogen receptor, but not to the tamoxifen receptor present in the endoplasmic reticulum membrane. These compounds were found to function as antiestrogen drugs, exhibiting the suppression action for breast cancer cell multiplication.

研究分野：環境生化学、化学物質影響科学、受容体科学

キーワード：有害化学物質 内分泌かく乱物質 タモキシフェン 乳がん 小胞体膜受容体

### 1. 研究開始当初の背景

最新のがん統計によると、日本人女性の場合、乳がんで死亡する人数は5番目に多く、生涯で乳がんに罹患する確率は16人に1人(欧米は8~10人に1人)である。タモキシフェンは、乳がん組織に存在するエストロゲン受容体 ER に、女性ホルモン・E2 と競合的に結合し、抗エストロゲン作用を示すことによって抗腫瘍効果を発揮する。タモキシフェンは抗乳がん剤として現在最もよく使用されている薬剤の一つであるが、一方、その副作用は実に多種多様であり、激しく、重篤なものが多い。しかも、乳がんの場合、再発率が高く、患者の QOL の観点から非常に大きな問題となっている。

我々は、ごく最近、女性ホルモン 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) の細胞膜受容体 GPCR を探索する研究中に、偶然に、タモキシフェンが特異的に結合する受容体を発見した。まず、トリチウム標識 4-ヒドロキシタモキシフェンが  $K_d = 50$  nM で強く結合した。タモキシフェンは  $IC_{50} = 30$  nM でさらに強く結合した。一方、E2 は全く結合しなかった。しかも、ER に結合するほとんどの化合物は、この受容体に結合しないことが明らかとなった。蛍光性タモキシフェン誘導体で調べたところ、このタモキシフェン受容体は COS-7 を始めとして、調べたすべての細胞に存在し、しかも、細胞膜ではなく、小胞体膜に存在することが判明した。初めての発見である。

### 2. 研究の目的

小胞体膜に存在するタモキシフェン受容体は、本来、固有の何らかの機能を持つ膜タンパク質であり、細胞に一般的に存在する受容体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強い。本研究では、まず、① このタモキシフェン受容体を精製し、構造を決定し、何の受容体か? の同定を試みる。次いで、② このタモキシフェン受容体タンパク質の本来の機能を精査し、副作用とどのように関連しているかを明らかにする。このような研究事例は全く無く、学術的にも意義深い。本研究のもう一つの大きな目的は、③ この同定されたタモキシフェン受容体に結合しない ER アンタゴニストを新規な抗エストロゲン剤として設計・合成することである。このような抗エストロゲン剤の分子設計戦略はこれまでに例が無く、これが抗乳がん剤の「くすり」としての開発に繋がれば、社会的にも学術的にも、きわめて意義深い。

### 3. 研究の方法

(1) 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、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? 等の、いくつかの可能性を検討する。次いで、小胞体膜受容体に対して十分な結合能力を持っているビーズを用いて精製を進める。

(2) タモキシフェン受容体の単離・精製: タモキシフェン受容体が確認された細胞のうち受容体濃度の高かった細胞を量的に培養し、分画遠心分離法により小胞体を単離する(市販のキットを用いて実施)。膜調製のう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。穏やかな条件で膜可溶化を実施し、ガラスビーズと混和、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。

(3) タモキシフェン受容体結合試験: タモキシフェン受容体タンパク質は、細胞の膜調製品に含まれる。この膜調製品には、細胞膜のみならず、細胞内部のゴルジ体、小胞体、リゾソーム、ペルオキシソーム、液胞のように膜構造を持つものすべての膜が含まれる。この膜調製品に対して、放射性トレーサーとしてトリチウム標識した 4-ヒドロキシタモキシフェン ( $[^3H]4-OHT$ ) を用いて、競合結合試験を実施する。標準化合物として 4-OHT、およびタモキシフェン (OHT) を用いる。エストロゲン受容体 ER に対する結合試験は、発見・精製した  $\alpha$  型および  $\beta$  型受容体のリガンド結合ドメインタンパク質に  $[^3H]17\beta$ -エストラジオール ( $[^3H]E2$ ) を用いて実施する。

(4) エストロゲン受容体転写活性化試験: HeLa 細胞を用いて、エストロゲン受容体 ER に対する化合物の転写活性、さらには転写阻害活性をルシフェラーゼ・レポーター遺伝子アッセイで調べる。標準化合物には、アゴニストとして E2 を、アンタゴニストとして 4-OHT を用いる。

(5) 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: 小胞体膜タモキシフェン受容体 TR に結合せず、エストロゲン受容体 ER と選択的に、特異的に結合するタ

モキシフェン誘導体を設計・合成する。例えば、タモキシフェンに存在する3つのベンゼン環にハロゲンを導入し、「ハロゲン結合」を誘起して受容体結合が増強されるような分子設計をはかる。分子モデリングソフトウェア MOE を用いた分子設計も活用する。また、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試験する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 小胞体膜タモキシフェン受容体の単離・精製の試み

小胞体膜タモキシフェン受容体 TR は、COS-7、HEK293、HeLa 等、調べたすべての動物培養細胞にその存在が確認された(図1)。また、MCF-7 等の乳がん細胞にも確認された。単離・精製について、まず、小胞体単離の方法から種々に試みた。受容体濃度が最も高かった COS-7 細胞を量的に培養し、分画遠心分離法により小胞体を単離した。次いで、調製したタモキシフェン繫留のガラスビーズを用いて、ジギトニン処理によって可溶化した小胞体膜につ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、該

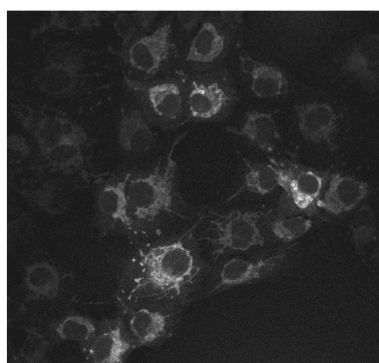


図1 蛍光タモキシフェンの局在を示す COS-7 細胞[小胞体に該当する細胞核の周りが染色(上では白色)]

当の受容体タンパク質は見当たらなかった。用いたアフィニティ担体の親和性の不十分さが第一の要因として考えられ(図2)、スペーサーを長くする等の工夫を施したが、適切なアフィニティ担体の調製に成就せず、小胞体単離の方法は断念した。このため、細胞核と小胞体を一体として、あるいは細胞膜を除外して単離・精製する方法に転換し、さらに別途な担体をデザインし、継続的に試行している。現時点では未だ成就していないが、さらに続行の予定である。一方、細胞核の外膜(小胞体の一部)に存在する受容体の検討から思いがけず候補タンパク質として約10種をリストアップすることができた。これら

について、siRNA を用いた発現阻止条件下で影響、すなわちタモキシフェン結合を減衰させる数種に絞り込むことに成就した。これらが目的のタモキシフェン受容体 TR か、引き続き精査する。

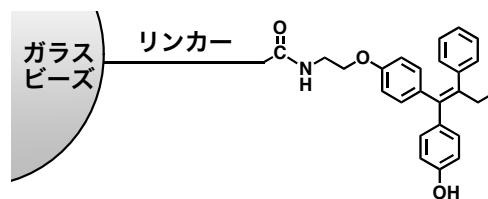


図2 タモキシフェン繫留のガラスビーズの一例 [ガラスボースは市販品。誘導体は化学合成]

##### (2) 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

① 抗エストロゲン剤の分子設計: タモキシフェン(図3)は、エストロゲン受容体 ER にも、小胞体膜タモキシフェン受容体 TR にも結合する。すなわち、両方の受容体に関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、「TR に結合しない」化合物を得るために、TR の構造が不明な状況では試行錯誤の分子設計に頼らざるを得ない。これまでの構造活性相関の総合的な解析から、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計算化学的に示され、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、10 数種類の化合物が候補として抽出された。ベンゼン環へのさまざまな基の搭載を基本的な設計戦略として実施した。

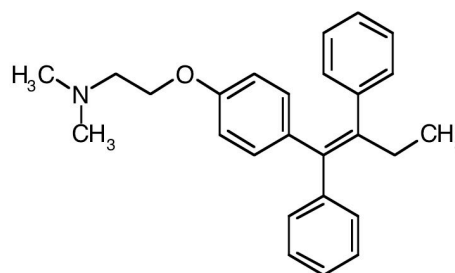


図3 タモキシフェンの化学構造

② 抗エストロゲン剤の開発: 目的の抗エストロゲン剤は、「エストロゲン受容体 ER に結合し、小胞体膜タモキシフェン受容体 TR に結合しない」および「エストロゲンの活性を抑制する」の2つの要件を満たす化合物である必要がある。実施した分子設計による候補化合物から、可能性の高い4種の化合物に

ついて化学合成し、ER および TR に対して活性を調べた。その結果、4種のいずれも ER には結合するものの、TR には結合しない化合物であり、目的の化合物の創成に成功した。これらはいずれも調べた他の受容体へは全く結合性を示さなかった。また、いずれも ER におけるエストロゲン E2 に対して阻害的に働き、しかも、乳がん細胞 MCF-7 に対して増殖抑制作用を示すことが分かった。また、さらに高活性な化合物の設計合成に成就した。

こうして、小胞体膜タモキシフェン受容体の単離・精製については期間内に成就することが叶わなかった。しかし、細胞核の外膜に候補タンパク質を見出し、その同定・確認作業を継続しており、近い将来にタモキシフェン受容体を確定できる可能性が高い。一方、抗乳がん剤、すなわち、抗エストロゲン剤の開発については研究計画を達成することができた。これらについては、細胞毒性もなく、受容体が同定後は産業財産権について直ちに申請予定である。なお、直接の研究成果については雑誌論文、学会発表はまったく実施しておらず、下記に掲載したものについては、本研究の契機をなり、背景をなす一連の学術成果に関する発表である。

## 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1件)

(1) 劉 曉輝・松島綾美・下東康幸：乳がん細胞におけるビスフェノールのエストロゲン様活性. *BIO Clinica*, 査読無, **30**(10), 2015, 1010-1015

[学会発表] (計6件)

(1) 西村裕一・下東美樹・劉 曉輝・松島綾美・松山祐昂・中川裕之・Tommaso Costa・下東康幸：先天的遺伝病・細胞膜受容体コンホメーション病：ミスフォールドした受容体タンパク質は小胞体膜にトラップ・貯留される，「統合分析・生物化学研究特区」公開講演会-メンブレンサイエンス研究の新潮流-，2015年3月20日，九州大学理学部（福岡市）

(2) 崎戸沙耶・藤山明菜・劉 曉輝・松島綾美・下東康幸：エストロゲン受容体の受容体活性化におけるホモダイマー化の

構造要因，第88回日本生化学会大会，2015年12月1-4日，神戸ポートアイランド（神戸市）

(3) 佐藤俊介・劉 曉輝・松島綾美・下東康幸：自発活性化型核内受容体SF1が介在するエストロゲン受容体転写活性の増強，第88回日本生化学会大会，2015年12月1-4日，神戸ポートアイランド（神戸市）

(4) 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，2015年12月10-11日，自治医科大学 地域医療情報研修センター（下野市）

(5) 松山祐昂・西村裕一・劉 曉輝・松島綾美・下東康幸：内分泌攪乱化学物質が標的とするヒト核内受容体48種におけるリガンド結合ドメイン二次構造解析，環境ホルモン学会第18回研究発表会，2015年12月10-11日，自治医科大学 地域医療情報研修センター（下野市）

(6) 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，2016年5月14-15日，鹿児島大学稲盛会館（鹿児島市）

[その他]

研究室ホームページ

<http://lsfb.scc.kyushu-u.ac.jp/index3.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下東 康幸 (SHIMOHIGASHI, Yasuyuki)  
九州大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：00211293

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

巢山 慶太郎 (SUYAMA, Keitaro)  
九州大学・基幹教育院・助教  
研究者番号：60707222