

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 20 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860085

研究課題名(和文) エストロゲン受容体分解誘導活性を有する新規乳がん治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-breast cancer drugs that can induce degradation of estrogen receptor

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン受容体は全乳がんのおよそ70%で過剰発現しているタンパク質である。本研究では強力な乳がん治療薬を創成することを目的として、ER陽性に結合してその作用を抑制するだけでなく、ERそのものを分解する化合物を開発することを試みた。我々はタモキシフェンのアミン部位に様々な長さのアルキル基を導入した化合物をデザイン合成し、ER分解活性を評価したところ、炭素鎖10で末端にF基を有する化合物に強いER分解活性があることを見出した。またドッキングスタディにより長鎖アルキル基がERの表面の疎水性領域に相互作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Estrogen receptors (ERs) play a major role in the growth of human breast cancer cells. An antagonist that acts as not only an inhibitor of ligand binding but also an inducer of the down-regulation of ER would be useful for the treatment for ER-positive breast cancer. We designed and synthesized various tamoxifen derivatives that have various lengths and terminal groups of the long alkyl side chain. During the course of our investigation, C10F having a 10-fluorodecyl group on the amine moiety of 4-OHT was shown to be the most potent compound among the tamoxifen derivatives. Moreover, computational docking analysis suggested that the long alkyl chain interacted with the hydrophobic region on the surface of the ER, which is a binding site of helix 12 and coactivator. These results provide useful information to develop promising candidates as SERDs.

研究分野：創薬化学

キーワード：乳がん治療薬 選択的エストロゲン受容体分解薬 タモキシフェン

1. 研究開始当初の背景

現在、乳がんの年次推移は、罹患率、死亡率ともに上昇傾向にあり、女性の最も注意すべきがんの一つとなっており、全乳がんのおよそ70%はエストロゲン受容体 (Estrogen Receptor, ER) が過剰発現していることが遺伝子発現解析により明らかとなっている。ER 陽性乳がん細胞はエストロゲン依存的に増殖するため、エストロゲンの作用を除去することは ER 陽性乳がん治療において重要であり、これまでに様々な ER アンタゴニストの開発が行われてきた。

ER アンタゴニストの一つであるタモキシフェンはエストラジオールの結合部位に拮抗的に作用する非ステロイド性の乳がん治療薬である。一方、フルベストラントはエストラジオールの 7位に長鎖アルキル基を有した構造を持った ER アンタゴニストである。フルベストラントは ER と結合すると ER の分解が速やかに誘導されることが知られており、このような作用により、選択的エストロゲン受容体分解薬 (Selective Estrogen Receptor Down-regulator, SERD) と呼ばれている。現在、タモキシフェンでは効果があらわれない乳がん患者に対する有効な乳がん治療薬として注目を集めている。

2. 研究の目的

以上の背景から SERD は極めて優れた乳がん治療薬になると考えられるが、SERD 活性を持つ化合物の構造要件は明らかとなっていない。そこで、フルベストラントの長鎖アルキル基が、ER の転写活性に重要なヘリックス 12 (H12) のコンホメーションを立体的に阻害し、その結果、ER が不安定化し、分解されると考え、タモキシフェンに長鎖アルキル基を導入した化合物をデザイン合成し、その構造活性相関を検討することとした。

3. 研究の方法

4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT, タモキシフェンの活性代謝物) と ER のリガンド結合部位 (LBD) の X 線結晶構造解析 (PDB ID: 3ERT) に基づくと、タモキシフェンの 3 級アミンは LBD の外側に向かって伸びており、H12 はその上部に覆いかぶさるような構造をとっている。このアミノ基にアルキル基を導入することで、リガンドとしての結合能を保ちつつ、H12 の相互作用を妨げることができると考えた。そこでこの部位を起点に、様々な長さのアルキル基を持つ化合物をデザイン合成した (C6~C18)。また、アルキル基の末端構造が ER 分解能に与える影響を明らかにする目的で、OH 基 (C10OH) および F 基 (C10F) を導入した化合物、さらにフルベストラントと同様のアルキル基を有する化合物やリガンド構造をラロキシフェンとした化合物をデザイン合成した。そして、各化合物を MCF-7 細胞に投与し、ウエスタンブロッティングにて ER 分解能を評価した。さらに蛍光偏光法を使った結合能の評価およびドッキングシミュレーションによる、結合構造予測を行った。

4. 研究成果

C6~C18 を MCF-7 細胞に投与したところ、C10 に強い ER 分解活性があることを確認した。また、C10OH で ER 分解活性が消失し、C10F でより強い ER 分解活性を示したことから、末端官能基が ER 分解活性に影響をあたえることがわかった。フルベストラントと同様の長鎖アルキル基を有する化合物については、アルキル鎖の長さおよびアルキル鎖中間に位置する S 基の酸化数 (S, SO, SO₂) を降った化合物群を評価したが、C10 に相当する化合物においてのみ ER 分解活性がみられた。リガンド構造をラロキシフェンとした RC6~RC18 も C10 のアルキル鎖長に相当する RC10 の ER 分解活性が強かった。蛍光偏光法による ER 結合能を評価したところ、IC₅₀ がサブ nM~数 10nM であり、それぞれの化合物の結合能はリガンド構造のみに依存していることが示唆された。また、ドッキングシミュレーションでは、ER 表面の疎水性アミノ酸で形成される疎水性領域に長鎖アルキル基が相互作用し、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。以上のことから、選択的エストロゲン受容体分解薬の構造要件は、リガンド構造を有すること、炭素鎖 10 の長さのアルキル鎖を有し、その末端が ER 疎水性表面に相互作用することが重要であることが示され、本研究の成果により、SERD の分子設計が可能であることが示唆された。

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 13 件)

1. Takuji Shoda, Masashi Kato, Takuma Fujisato, Yosuke Demizu, Hideshi Inoue, Mikihiko Naito, Masaaki Kurihara, "Tamoxifen and fulvestrant hybrid showed potency as a selective estrogen receptor down-regulator", *Med. Chem.*, 2017, *in press.* (査読有り)
doi: 10.2174/1573406412666160805101408
2. Keiichiro Okuhira, Takuji Shoda, Risa Omura, Nobumichi Ohoka, Takayuki Hattori, Norihito Shibata, Yosuke Demizu, Ryo Sugihara, Asato Ichino, Haruka Kawahara, Yukihiko Itoh, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Masaaki Kurihara, Susumu Itoh, Hiroyuki Saito and Mikihiko Naito, "Targeted degradation of proteins localized in subcellular compartments by hybrid small molecules", *Mol. Pharmacol.*, 91, 159-166, 2017. (査読有り)
doi: 10.1124/mol.116.105569
3. T. Misawa, T. Fujisato, Y. Kanda, N. Ohoka, T. Shoda, M. Yorioka, M. Makishima, Y. Sekino, M. Naito, Y. Demizu, Masaaki Kurihara, "Design and synthesis of novel

- selective estrogen receptor degradation inducers based on diphenylheptane skeleton”, *MedChemComm*, 8, 239-246, 2017. (査読有り)
4. Y. Demizu,[#] N. Shibata,[#] T. Hattori, N. Ohoka, H. Motoi, T. Misawa, T. Shoda, M. Naito, M. Kurihara, “Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26 (20), 4865-4869, 2016. (査読有り)
doi: 10.1016/j.bmcl.2016.09.041
 5. Takuji Shoda, Masashi Kato, Takuma Fujisato, Takashi Misawa, Yosuke Demizu, Hideshi Inoue, Mikihiko Naito, Masaaki Kurihara, “Synthesis and evaluation of raloxifene derivatives as a selective estrogen receptor down-regulator”, *Bioorg. Med. Chem.*, 24, 2914-2919, 2016, (査読有り)
doi: 10.1016/j.bmc.2016.04.068
 6. Samir Gautam, Taehan Kim, Takuji Shoda, Sounok Sen, Deeksha Deep, Ragini Luthra, Maria Teresa Ferreira, Mariana G. Pinho, David A. Spiegel, “An Activity-Based Probe for Studying Crosslinking in Live Bacteria,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54 (36), 10492-10496, 2015. (査読有り)
DOI: 10.1002/anie.201503869
 7. Takuji Shoda, Masashi Kato, Takuma Fujisato, Keiichiro Okuhira, Yosuke Demizu, Hideshi Inoue, Mikihiko Naito, Masaaki Kurihara, “Synthesis and evaluation of tamoxifen derivatives with a long alkyl side chain as selective estrogen receptor down-regulators,” *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 3091-3096, 2015, (査読有り)
doi: 10.1016/j.bmc.2015.05.002
 8. Hiroko Yamashita, Yosuke Demizu, Takashi Misawa, Takuji Shoda, Masaaki Kurihara, “Synthesis of a bis-cationic α,α -disubstituted amino acid (9-amino-bispidine-9-carboxylic acid) and its effects on the conformational properties of peptides,” *Tetrahedron* 71, 2241-2245, 2015, (査読有り)
doi:10.1016/j.tet.2015.02.076
 9. Takaya Nagakubo, Yosuke Demizu, Yasunari Kanda, Takashi Misawa, Takuji Shoda, Keiichiro Okuhira, Yuko Sekino, Mikihiko Naito, and Masaaki Kurihara, “Development of Cell-Penetrating R7 Fragment-Conjugated Helical Peptides as Inhibitors of Estrogen Receptor-Mediated Transcription”, *Bioconjugate Chem.*, 25, 1921-1924, 2014, (査読有り)
doi: 10.1021/bc500480e
 10. Naoya Hirata, Shigeru Yamada, Takuji Shoda, Masaaki Kurihara, Yuko Sekino, and Yasunari Kanda, “Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation”, *Nat. Commun.*, 5:4806, 2014, (査読有り)
doi: 10.1038/ncomms5806
 11. Christopher G. Parker, Markus K. Dahlgren, Don T. Li, Eugene F. Douglass, Takuji Shoda, Navneet Jawanda, Krasimir A. Spasov, Robert A. Domoal, Richard Sutton, Karen S. Anderson, William L. Jorgensen, David A. Spiegel, “Illuminating HIV-1 gp120-Ligand Recognition through Computationally-Driven Optimization of Antibody-Recruiting Molecules”, *Chemical Science*, 5, 2311-2317, 2014, (査読有り)
DOI: 10.1039/c4sc00484a
 12. Hiroko Yamashita, Yosuke Demizu, Takuji Shoda, Yukiko Sato, Makoto Oba, Masakazu Tanaka, Masaaki Kurihara, “Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetration,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22 (8), 2403-2408, 2014, (査読有り)
doi: 10.1016/j.bmc.2014.03.005
 13. Takuji Shoda, Keiichiro Okuhira, Masashi Kato, Yosuke Demizu, Hideshi Inoue, Mikihiko Naito, Masaaki Kurihara, “Design and synthesis of tamoxifen derivatives as a selective estrogen receptor down-regulator”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24 (1), 87-89, 2014, (査読有り)
doi: 10.1016/j.bmcl.2013.11.078
- 〔学会発表〕(計 16件)
1. 正田卓司, 藤里卓磨, 三澤隆史, 出水庸介, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, 選択的エストロゲン受容体分解薬の分子設計, 日本薬学会, 仙台(2017.3.)
 2. 藤里卓磨, 正田卓司, 大岡伸通, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, 芳香族炭化水素受容体を利用したプロテインノックダウン法のメカニズム解析, 日本薬学会, 仙台(2017.3.)
 3. 正田卓司, 藤里卓磨, 三澤隆史, 出水庸介, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, 長鎖アルキル基を有する新規エストロゲン受容体分解誘導剤の合成と評価, 反応と合成のシンポジウム, 静岡(2016.11)
 4. 藤里卓磨, 正田卓司, 大岡伸通, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, 芳香族炭化水素受容体のユビキチンリガーゼ活性を利用した新規標的タンパク質分解誘導剤の開発, 日本薬学会関東支部会, 東京(2016.9)
 5. 正田卓司, 藤里卓磨, 三澤隆史, 出水庸介, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, 長鎖アルキル基を利用した新規エストロゲン受容体分解誘導剤の創製, バイオ関連化学シンポジウム, 金沢(2016.9)
 6. 藤里卓磨, 正田卓司, 大岡伸通, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, 芳香族炭化水素受容体のユビキチンリガーゼ活性を利用した新規プロテインノックダウン分子の創製, バイオ関

- 連化学シンポジウム, 金沢(2016.9)
7. 正田卓司, 奥平桂一郎, 内藤幹彦, 栗原正明, エストロゲン受容体分解誘導剤の分子デザイン, がん分子標的治療薬学会, 大分(2016.5)
 8. 藤里卓磨, 正田卓司, 大岡伸通, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, 芳香族炭化水素受容体のコピキチンリガーゼ活性を利用した新規プロテインノックダウン法の開発, 日本薬学会, 横浜(2016.3)
 9. 正田卓司, 加藤雅士, 藤里卓磨, 三澤隆史, 出水庸介, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, エストロゲン受容体分解活性を有するラロキシフェン誘導体の開発, 日本薬学会, 横浜(2016.3.)
 10. Takuji Shoda, Masashi Kato, Keiichiro Okuhira, Yosuke Demizu, Hideshi Inoue, Mikihiko Naito, Masaaki Kurihara, Design, synthesis and evaluation of tamoxifen derivatives as new selective estrogen receptor down-regulators, PasifiChem2015, Honolulu, Hawaii (2015.12)
 11. 正田卓司, 加藤雅士, 藤里卓磨, 三澤隆史, 出水庸介, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, ラロキシフェン骨格を有する新規エストロゲン受容体分解誘導剤の開発, メディシナルケミストリーシンポジウム, 千葉(2015.11)
 12. 藤里卓磨, 正田卓司, 大岡伸通, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, Naphthoflavone を利用した新規プロテインノックダウン法の開発, メディシナルケミストリーシンポジウム, 千葉(2015.11)
 13. 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, 神戸(2015.3)
 14. 加藤雅士, 正田卓司, 井上英史, 内藤幹彦, 栗原正明, 4,4,5,5,5-ペンタフルオロペンチル基を有するタモキシフェン誘導体のエストロゲン受容体分解誘導活性の評価, 日本薬学会第 135 年会, 神戸(2015.3)
 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, 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, 神戸(2014.11)
 16. 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, 東京(2014.10)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/doc/shoda.html>

6. 研究組織

(1)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