

2-2-1 **N-hydroxy-N-phenyloctanediamide**
 (Suberoylanilide hydroxamic acid : SAHA) の合成

活性評価を行なう際にポジティブコントロールが必要であり、*N*-hydroxy-*N*-phenyloctanediamide (Suberoylanilide hydroxamic acid : SAHA) の合成をおこなった。合成方法は J. C. Stowell らの方法を参考にし改良した。

まず、出発物質にはジカルボン酸である octanedioic acid (suberic acid) (1a) を用い、アニリンと縮合しモノカルボン酸である 8-anilino-8-

ozoctanoic acid (2a) を得た。次に、カルボン酸 2a をクロロ蟻酸メチルと反応させた後、メタノール中に濃硫酸を滴下してメチルエステルである Methyl 8-anilino-8-oxooctanoate (3a) を得た。メチルエステル化の部分は J. C. Stowell らの方法とは異なる。最後にメチルエステル体 (3a) にヒドロキシルアミン塩酸塩を付加させて、目的物である SAHA : *N*-hydroxy-*N*-phenyloctanediamide (4a) を得た (図 19) 。

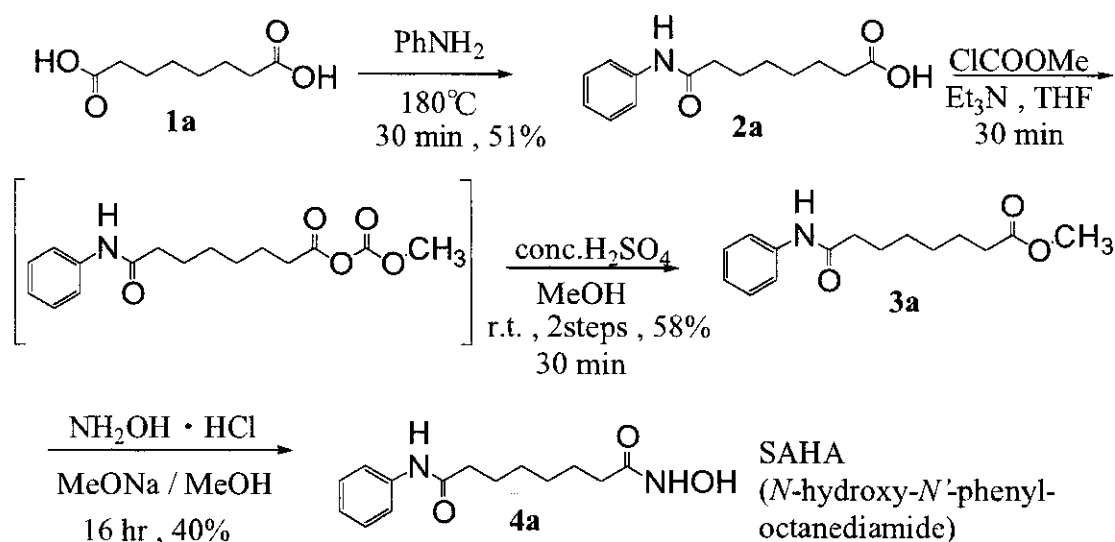


図 19 SAHA の合成

2-2-2 SAHA 誘導体の合成

2-2-2-1 アミン中間体を経る合成

合成にあたり図 20 のような計画を立てた。モノカルボン酸 2 は前述の 2a の合成方法と同様にジカルボン酸 1 にアニリンを縮合させた。この時、アニリンの二付加体も生成するが、後処理の段階で酸・塩基や水に対する溶解度の違いを利用して容易に精製することが可能である。

カルバメート体 6, 7 はモノカルボン酸 2 を出発物質として T. Shioiri らの方法を参考に、ジフェニルリン酸アジド (DPPA) を用いた Curtius 転移によって得た。メチルカルバメート体 6、エチルカルバメート体 7 の合成では溶媒にアルコール類は使用せず、イソシアネート 5 になったところにメタノール、エタノールを加えた。しかし、目的のカルバメートが得られたのは $n=6$ のカルバメート 6a, 7a だけであった。そこで、カルバメート体 6b, 6c, 7b, 7c については図 21 のようにベンジルカルバメート体 12 を経てアミンを得た後に合成する事にした。

アミン 9 の合成はモノカルボン酸 2 を出発物質とし、ベンゼン中でジフェニルリン酸アジド (DPPA) を用いた Curtius 転移を行なってイソシアネート 5 とした後、ベンジルアルコールによってベンジルカルバメート 8 とした。8 を 5% パラジウム炭素を用いて接触還元し、アミン 9 を得た。

次に、9 からクロロ蟻酸メチルを用いてメチルカルバメート 6a, 6b を、クロロ蟻酸エチルを用いてエチルカルバメート 7a, 7b を得た。

この他にもアミン 9 を出発物質とし、トリフルオロ酢酸無水物を用いて 10 を、トリクロロ酢酸無水物を用いて 11 を、臭化プロモアセチルを用いて 18 を合成した。

ウレア体 6 は DPPA を用いた Curtius 転移を行なう際にベンゼンを溶媒として用い、アンモニア水で処理して得た。これと同様の方法で、アンモニア水の代わりにヒドラジン一水和物で処理することでヒドラジン 17 を得ることができた(図 22)。

さらに、アミン 9 を出発物質として図 23 の化合物を合成した。3-ブromo-1-プロピンに 9 を付加させて、カラムによって精製することで一付加体 15 と二付加体 16 を得た。15 は塩酸塩とすることで固体として得ることができた。

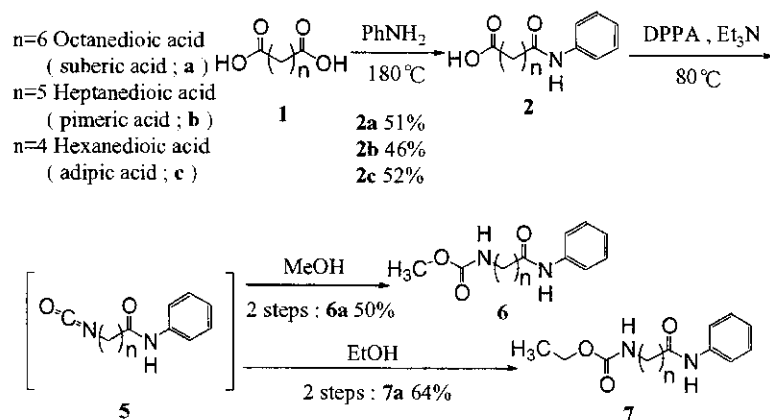


図 20 6a, 7a の合成

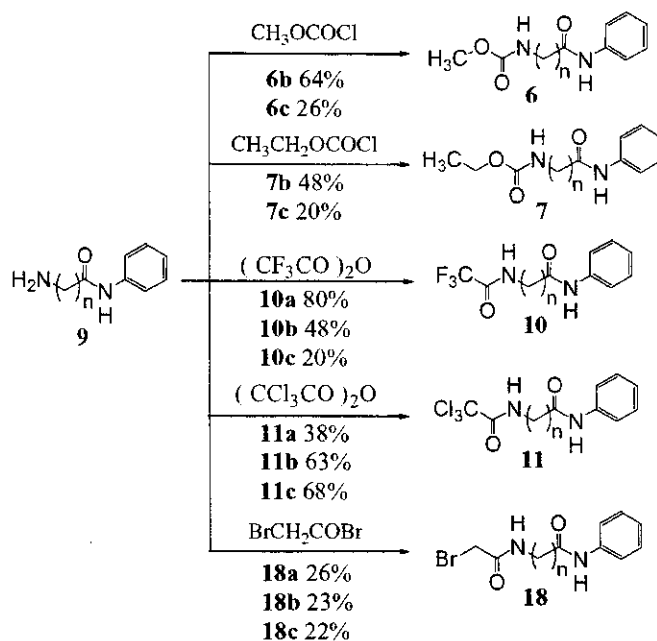
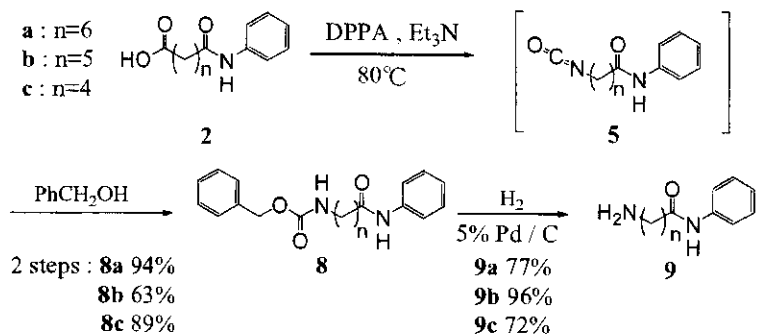


図 21 6b,c、7b,c、10a-c、11a-c、18a-c の合成

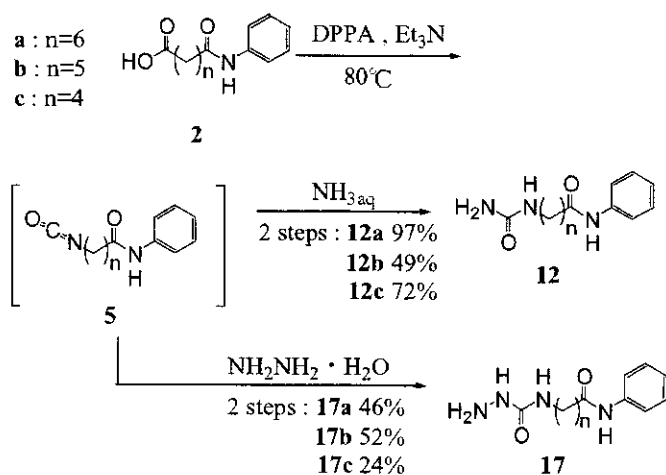


図 22 12a-c、17a-c の合成

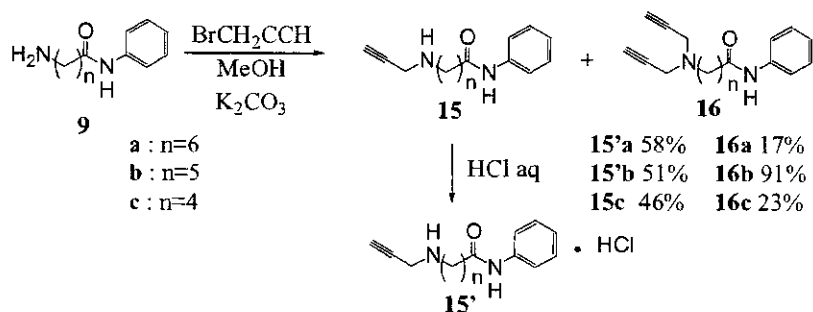


図 23 15、16 の合成

2-2-2-2 カルボン酸中間体を経る合成

ジカルボン酸 2 を出発物質とした新規の化合物については、a (n = 6) の化合物についてのみ合成法が確立した (図 2 4)。

モノカルボン酸 2a をクロロ酢酸メチルで処理した後、溶媒留去を行ない、溶媒としてエチレングリコールを加えてから少量の濃硫酸を滴下したところ 19a を得ることができた。また、同様の反応でエチレング

リコールのかわりにモノエタノールアミンを用いることで 20a を得ることができた。このとき、カルボン酸とエステル結合をして末端がアミンのものは得られなかった。さらに、エチレンジアミンでも同様の反応を用いて行ってみたが、目的物の 21a は得られなかった。そこで方法を変更して、EDC・HCl を用いて縮合させる方法を用いたところ、目的物 21a を得ることができた。

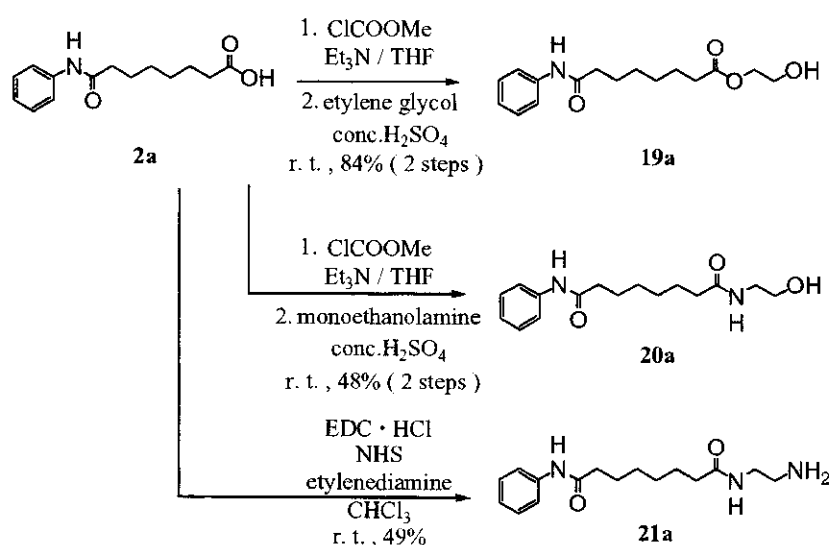


図 24 19a、20a、21a の合成

2-3 生物活性

2-3-1 HDAC 阻害活性の評価

Histone deacetylase (HDAC) の脱アセチル化能の活性を評価する方法として、蛍光を持つアセチルリシンアナログを基質とし、これと脱アセチル化された化合物を HPLC で解析することによって、HDAC の脱アセチル化反応を測定できる、ということが報告された。この方法はこれまでの [³H] を検出する方法に比べて、より簡便に HDAC 活性を評価することができるため非常に有用であると考えられる。蛍光を測定することで HDAC の酵素活性を測定する方法として、キット化されたものが数点市販されるようになった。今回、HDAC 阻害活性の評価は、そのうちの 1 つである Histone Deacetylase Fluorescent Activity Assay / Drug Discovery Kit (BIOMOL[®]) を用いることにした。このキットの測定原理は図 25 のよ

うになっている。

蛍光標識されたアセチルリシンアナログである基質に対して HDAC が作用すると、基質の脱アセチル化がおこる。この脱アセチル化された蛍光基質に対して DEVELOPER と呼ばれるものを加えると、蛍光が検出可能となる。この方法では、脱アセチル化を受けた基質の蛍光を検出するため、コントロール (酵素に対して何も阻害剤を加えない場合) の蛍光強度を 100 % とし、酵素に対してサンプルを加えた場合の蛍光強度を、コントロールに対する割合で評価する。

ポジティブコントロールとして用いる Trychostatin A (TSA) と Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) の HDAC 阻害活性を、キットを用いて評価したところ、IC₅₀ は TSA が 30 nM、SAHA が 300 nM であり、TSA と SAHA では HDAC 阻

害濃度は一桁異なることがわかった。

合成した化合物について、キットを用いてスクリーニングを行なった。サンプル濃度や基質濃度、反応温度等を検討した結果、サンプル濃度を100 μ M となるように調製してスクリーニングを行なった結果、ヒドラジンを有する 17b とプロモアセチル体である 18b (図26)は、1 μ M の SAHA と同程度の HDAC 阻害活性を有することが明らかになった。現在、IC50 値などを明らかにするための実験を行っている。

析実験を開始した。被験物質としては、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA)、*N*-Hydroxy-*N*-phenyloctanediamide (SAHA) (10 μ M)、および、新規に合成した Methyl 6-anilino-6-oxohexylcarbamate (P-Me) と 6-[(aminocarbonyl)amino]-*N*-phenylhexanamide (P-Urea)を用いた。実際の実験は、分担研究者である第一化学が行った。実験方法・結果・考察は、分担研究者である第一化学薬品須藤の報告書に記載した。

2-3-2 Gene Chip を用いた網羅的遺伝子発現解析

今年度合成した化合物は、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞である Lot100 を用いて網羅的遺伝子発現解

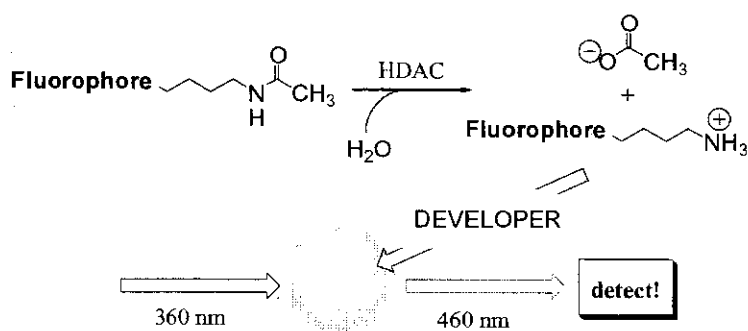


図 25 測定原理

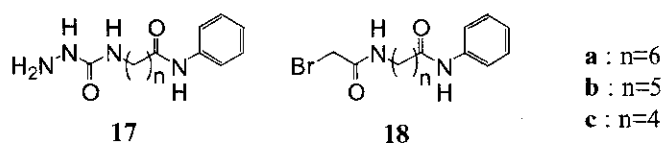


図 26 遺伝子発現解析実験に用いた化合物

C. 結論、考察

本研究事業では、新規技術による長期培養可能なプライマリーヒト肝・腎細胞および株化ヒト培養細胞を用いて、薬剤曝露時の網羅的遺伝子発現解析を行い、毒性発現に関わる遺伝子群の同定、ならびに、遺伝子発現パターンのデータベース構築を行う。さらに、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす効果の解析を行い、より安全性の高い薬剤を設計するための知見を得る。また、ヒトでの安全性の高い薬剤開発を可能にする目的で、実験動物から得られた遺伝子発現解析のデータをヒトへ外挿するための基本手法の開発を行い、薬剤の副作用を回避あるいは軽減する評価法を確立する。

今年度、分担研究者 宮田は、肝毒性が報告されている薬剤としてインスリン非依存型糖尿病治療薬 troglitazone の類縁体の合成に着手し、チアゾリジンジオン骨格を持たない PPAR- γ アゴニスト候補化合物として、24 化合物を合成した。さらに、これらの化合物の生物活性を調べるために脂肪細胞を用いるスクリーニング法を導入した。その結果、新規に合成した化合物のうちの幾つかが、脂肪細胞の分化誘導を促進し、細胞内に脂肪滴の蓄積を誘導することを見いだした。現在、中性脂肪定量試薬を用いて、分化誘導能の定量化実験を行っている。また、分担研究者で

ある第一化学薬品 須藤に依頼して、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析を開始した。今回新規合成された YH-1 および YH-16 はチアゾジン骨格を持たない薬剤であるが、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、Troglitazone あるいは Rosiglitazone のどちらの薬剤に似た遺伝子発現変化を起こすかが興味をもたれるところであった。そこで YH-1 および YH-16 で誘導される遺伝子発現変動が Troglitazone あるいは Rosiglitazone で誘導される遺伝子発現変動のどちらと共通しているかを解析した。その結果は共通する遺伝子の総数では YH-1、YH-16 ともに Troglitazone の遺伝子発現変動に近いことがわかる。ただしそれほど大きな違いは観察されておらず、今後の解析が必要と考えられる。

また、遺伝子発現を制御し新しいタイプの抗がん剤になることが期待されているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤については、既知の阻害剤である SAHA をモデルにして、HDAC の活性部位の構造と触媒反応機構に着目した新規阻害剤の設計を行い、30 種類以上の新規化合物を合成した。これらについて、HDAC 阻害活性を調べた結果、幾つかの化合物が HDAC 阻害活性を有することが確認できた。IC₅₀ 値は、現在精査中である。分担研究者である第一化学薬品 須藤に依頼して開始した、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析

実験では、1 時間処理ではそれほど多くの発現変動は見受けられなかったが、4 時間処理では TSA、SAHA および新規合成化合物において非常に多くの遺伝子の発現変動が観察された。発現変動した遺伝子の中には、発現抑制される遺伝子が多かった。TSA 処理と SAHA 処理で共通した遺伝子が増動しており、これらの薬剤がヒストン脱アセチル化酵素を阻害する効果によって起こる遺伝子発現変化が似ていることを示す。また、新規合成化合物、TSA、あるいは、SAHA 処理で、発現変動する遺伝子が共通していること、新規合成化合物が新たなヒストン脱アセチル化酵素阻害剤となる可能性を示唆しており、今後の抗がん活性評価に興味を持たれる。HDAC 阻害剤による遺伝子発現制御の結果は、非常に顕著であり、これまで、このように遺伝子発現を変化させた薬剤はなく大変興味を持たれる結果である。今後の更なる解析によって遺伝子発現制御に関わる遺伝子の同定ならびに抗がん活性に関わる遺伝子を同定することも期待できる。

薬剤の構造修飾が遺伝子発現パターンに及ぼす影響の解析は、毒性が少なくより有効な医薬品の創製にも有用な知見を与えることが期待できる分野である。本研究で得られた遺伝子発現解析のデータと実験動物を用いた遺伝子発現解析のデータを比較し、ヒトへの外挿を行うための基本手法の開発を行うことにより、プ

ロテオーム解析による安全性・有効性評価のための新たな診断マーカーを見つけることも期待できる。

本研究を遂行することにより、ゲノム創薬の根幹となる薬剤の毒性発現に係わるヒトでの遺伝子発現情報が収集できるようになることが期待される。医薬品候補化合物等について迅速・効率的にヒトでの安全性の予測が可能になれば、安全性が高い薬剤の開発するためのトキシコゲノミックスの基盤技術開発に資することができるかと確信している。

D. 健康危険情報

なし。

E. 研究発表

上記の研究内容は、2003 年度に投稿予定である。以下に関連した論文および学会発表を記載する。

1. 論文発表

- 1) A Planar Catechin Analogue as a Promising Antioxidant with Reduced Prooxidant Activity, K. Fukuhara, I. Nakanishi, T. Shimada, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, N. Miyata, N. Ikota, and S. Fukuzumi, *Chem. Res. Toxicol.*, **16** (1), 81-86 (2003).
- 2) DNA Cleavage via Superoxide Anion Formed in Photoinduced Electron Transfer from NADH to gamma-

- Cyclodextrin-Bicapped C60 in an Oxygen-Saturated Aqueous Solution, Ikuo Nakanishi, Shunichi Fukuzumi, Toshifumi Konishi, Kei Ohkubo, Mamoru Fujitsuka, Osamu Ito and Naoki Miyata, *J. Phys. Chem. B*, **106**(9), 2372-2380 (2002).
- 3) Enhanced Radical-Scavenging Activity of a Planar Catechin Analogue, Kiyoshi Fukuhara, Ikuo Nakanishi, Hisao Kansui, Etsuko Sugiyama, Mitsuhiro Kimura, Tomokazu Shimada, Shiro Urano, Kentaro Yamaguchi, and Naoki Miyata, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(21), 5952-5953 (2002).
- 4) Effects of Magnesium Ion on Kinetic Stability and Spin Distribution of Phenoxy Radical Derived from a Vitamin E Analogue: Mechanistic Insight into Antioxidative Hydrogen Transfer Reaction of Vitamin E, Ikuo Nakanishi, Kiyoshi Fukuhara, Tomokazu Shimada, Kei Ohkubo, Yuko Iizuka, Keiko Inami, Masataka Mochizuki, Shiro Urano, Shinobu Itoh, Naoki Miyata, and Shunichi Fukuzumi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002** (9), 1520-1524 (2002).
- 5) Direct Detection of Superoxide Anion Generated in C60-Photosensitized Oxidation of NADH and an Analogue by Molecular Oxygen, Ikuo Nakanishi, Kei Ohkubo, Shunsuke Fujita, Shunichi Fukuzumi, Toshifumi Konishi, Mamoru Fujitsuka, Osamu Ito, and Naoki Miyata, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002** (11), 1829-1833 (2002).
- 6) Miyata, Naoki; Nakano, Tatsuya. International harmonization of names, structures and chemical names of drugs listed in the Japanese pharmacopoeia. *Iyakuhin Kenkyu*, **33**(12), 770-774 (2002).
- 7) Matsuoka, Atsuko; Takeshita, Kenji; Furuta, Ayumi; Ozaki, Masayasu; Fukuhara, Kiyoshi; Miyata, Naoki. The 4'-hydroxy group is responsible for the in vitro cytogenetic activity of resveratrol. *Mutation Research*, **521**(1-2), 29-35 (2002).
- 8) Kurihara, Masaaki; Tanaka, Masakazu; Oba, Makoto; Suemune, Hiroshi; Miyata, Naoki. Conformation of oligopeptides containing chiral α,α -disubstituted amino acids: computational study. *Peptide Science*, **2002**(38), 287-288(2002).
2. 関連する主要な学会発表
- 1) 新規 Histone deacetylase inhibitor の創製、長野友紀、小原有弘、須藤哲司、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)。
- 2) チアゾリジン骨格を持たない新規 PPAR γ リガンドの創製、服部義史、小原有弘、須藤哲司、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)。
- 3) 質量分析によるタンパク質の変動解析のための N 末端修飾試薬の開

- 発、津元裕樹、田口良、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)。
- 4) 水溶性 C60 誘導体の合成と活性酸素種発生能の評価、藤井清、中西郁夫、宮田直樹、日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)。
- 5) NO 放出化合物としてのニトロベンゼン誘導体の合成、長江修、福原潔、宮田直樹、日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)。
- 6) 水溶性フラーレンによる神経細胞保護作用、藤澤祐樹、遠田淳、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)。
- 7) N-置換フレロピロリジンおよびフレロアジリジン誘導体における C60 骨格が置換基の 1H-NMR に及ぼす影響の解析、松本光司、宮田直樹、日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)。
- 8) Fe(II)存在下における活性酸素によるテレフタル酸の水酸化反応について、李林花、阿部芳廣、宮田直樹、日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)。
- 9) 平面型カテキン誘導体の合成とラジカル消去能、福原 潔、中西郁夫、袴田 航、寒水壽郎、島田知一、宮崎健太郎、大久保 敬、山口健太郎、浦野四郎、小澤俊彦、福住俊一、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)。
- 10) 平面型カテキン類縁体のペルオキシラジカル消去能、宮崎健太郎、中西郁夫、大久保 敬、袴田 航、浦野四郎、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、宮田直樹、福原 潔、日本化学会第 83 春季年会、東京、(2003, 3)。
- 11) 芳香族ニトロ化合物の光分解：NO の生成を伴う酸化的 DNA 鎖損傷反応、福原 潔、中西郁夫、伊古田暢夫、奥田晴宏、宮田直樹、日本化学会第 83 春季年会、東京、(2003, 3)。
- 12) Influence of C60-skeleton on 1H-NMR spectra of fullerene derivatives, Koji Matsumoto, Naoki Miyata, The 24th fullerene Nanotube General Symposium, Okazaki (2003.1).
- 13) Synthesis of water-soluble fullerenes and estimation of their reactive oxygen species (ROS) generating activity, Kiyoshi Fujii, Ikuo Nakanishi, Naoki Miyata, The 24th fullerene Nanotube General Symposium, Okazaki (2003.1).
- 14) 光照射によるニトロベンゼン誘導体からの一酸化窒素 (NO) の発生、長江修、福原潔、宮田直樹、平成 14 年度日本薬学会東海支部例会 (2002.12) .
- 15) フェノール性化合物による酸化的 DNA 損傷、福原 潔、中西郁夫、奥田晴宏、宮田直樹、第 17 回日本フリーラジカル学会関東支部研究会、東京、(2002.12)。
- 16) フェノール性抗酸化剤からの活性酸素生成、福原 潔、中西郁夫、宮崎健太郎、島田知一、袴田 航、

- 大久保敬、浦野四郎、福住俊一、伊古田暢夫、小澤俊彦、宮田直樹、奥田晴宏、環境変異原学会第 31 回大会、東京、(2002,11)。
- 17) 平面型カテキンのラジカル消去能とプロオキシダント効果、福原潔、中西郁夫、島田知一、大久保敬、宮崎健太郎、袴田航、浦野四郎、奥田晴宏、伊古田暢夫、小沢俊彦、宮田直樹、福住俊一、第 35 回酸化反応討論会、京都 (2002, 11)。
- 18) スチルベン骨格を有する化合物の DNA 切断活性、小山裕孝、袴田航、福原潔、永川真希、望月正隆、宮田直樹、奥田晴宏、第 46 回日本薬学会関東支部大会、東京、(2002, 10)。
- 19) フラボノイド系抗酸化剤のラジカル消去能とプロオキシダント効果、福原潔、中西郁夫、宮崎健太郎、島田知一、袴田航、大久保敬、浦野四郎、福住俊一、伊古田暢夫、小沢俊彦、宮田直樹、奥田晴宏、第 46 回日本薬学会関東支部大会、東京、(2002, 10)。
- 20) 平面型カテキンの抗酸化作用の評価、福原潔、奥田晴宏、宮田直樹、日本癌学会第 61 回総会、東京、(2002,10)。
- 21) フラーレン内包 β -および γ -シクロデキストリン錯体の光 DNA 切断活性、中西郁夫、福原 潔、宮崎健太郎、田草川光子、浦野四郎、大久保 敬、小西利史、藤塚 守、伊藤 攻、福住俊一、宮田直樹、伊古田暢夫、小澤俊彦、第 23 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、ホテル松島大観荘、2002 年、7 月。
- 22) 抗酸化作用の増強を目的とした平面型カテキンの開発、福原 潔、中西郁夫、袴田 航、宮崎健太郎、寒水壽郎、島田知一、木村光宏、山口健太郎、浦野四郎、宮田直樹、奥田晴宏、第 9 回日本がん予防研究会、熊本、2002 年、7 月。
- 24) 塩基性条件下におけるフェノール性化合物からの活性酸素生成、宮崎健太郎、中西郁夫、島田知一、大久保 敬、浦野四郎、福住俊一、宮田直樹、福原 潔、第 24 回日本フリーラジカル学会、大阪市立大学、2002 年、5 月。
- 25) シクロデキストリン-フラーレン錯体による光 DNA 切断機構、中西郁夫、大久保 敬、小西利史、藤塚 守、伊藤 攻、福住俊一、宮田直樹、第 24 回日本フリーラジカル学会、大阪市立大学、2002 年、5 月。
- 26) 平面型カテキン誘導体のラジカル消去能の評価、福原 潔、中西郁夫、島田知一、木村光宏、杉山悦子、寒水壽朗、山口健太郎、浦野四郎、宮田直樹、第 24 回日本フリーラジカル学会、大阪市立大学、2002 年、5 月。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
登録および登録予定共になし。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：構造修飾した薬剤の合成・薬剤の構造と
遺伝子発現パターンの相関の解析

分担研究者：奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

研究要旨 非ステロイド系抗エストロジェン剤タモキシフェンは、乳ガンに対する化学療法の第一選択薬であり、また乳ガンのハイリスクを有する女性に投与することにより乳ガン発生率を減少させることが報告されている。一方、本剤の長期投与により子宮体癌の発生頻度が増大し、ラットに対して肝癌を誘発することが知られている。

本研究はタモキシフェン誘導体によるヒト肝培養細胞曝露時の遺伝子発現パターンの変動を検討することによりタモキシフェンの構造と毒性発現の関係を明らかにすることを目標とする。本目標を達成するため、平成14年度においてはタモキシフェン誘導体の簡易合成法の開発を行い、市販の化合物を出発原料とし4工程でタモキシフェンを合成した。

A. 研究目的

タモキシフェン **1** は非ステロイド系の抗エストロジェン剤であり、乳ガンに対する化学療法の第一選択薬として世界中で広く使用されている。また、乳ガンに対してハイリスクを有する女性に投与することにより乳ガン発生率を減少させることが報告されている。

一方、本剤の長期投与により子宮体癌の発生頻度が増大することが報告されている。また、ラットに対して肝癌を誘発し、p53 遺伝子の変異を高頻度で惹起する。タモキシフェンの発癌性は、とくに本剤を健常な女

性に対して乳ガンの予防投与する上での重大な障害となる。

タモキシフェンの肝癌誘発性には薬物代謝酵素による活性化とそれに引き続いて生じる DNA 損傷が関与していると考えられている。即ち、CYP3A4 により α -ヒドロキシタモキシフェン **2** が生成し、さらにスルホトランスフェラーゼにより究極代謝活性体である硫酸抱合体が生成する。この硫酸抱合体は硫酸基の脱離を伴い、グアニン塩基の環外アミノ基と共有結合することが報告されている。

α -ヒドロキシ体 **2** 以外に4-ヒ

ドロキシ体 **3**、*N*-脱メチル体 **4**、*N*-オキシド体 **5**、及びそのエポキシド誘導体 **6** 等が代謝物として知られ、活性と構造との関係が調べられている (図 1)。興味深いことに (*Z*)-4-ヒドロキシ体はタモキシフェンに比べて 100 倍以上強い抗エストロゲン作用を示すが、(*E*)-4-ヒドロキシ体の抗エストロゲン作用は極めて弱い。

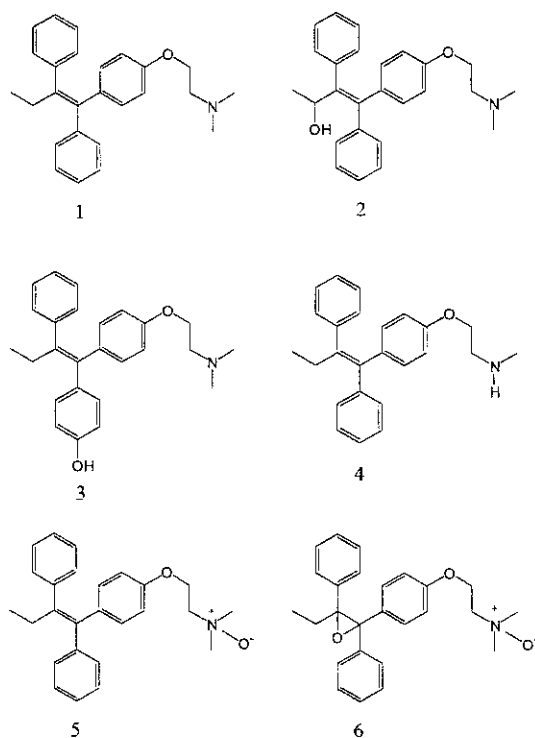
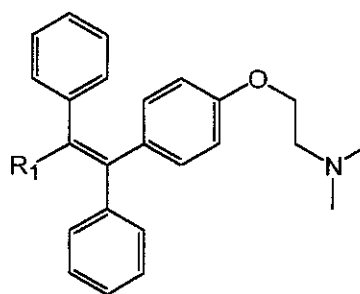


図 1. タモキシフェン及び代謝物の構造

上述したように、オレフィンに結合したエチル基が発ガン性に深く関与していると推定されていることから、エチル基を各種の置換基に変換した一連のタモキシフェン誘導体 (図 2) の構造と遺伝子発現パターンの

変動には興味を持たれる。

本分担研究では、これら誘導体 **7** ~ **10** の簡便な合成法を開発することを目的とし、タモキシフェン合成に関する検討を行った。その結果、市販品であるベンジル-4-ヒドロキシフェニルケトン **11** を出発原料とし、



R1:H

1-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]-phenyl}-1,2-diphenylethylene **7**

R1:CH₃

1-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]-phenyl}-1,2-diphenyl-1-propene **8**

R1:C₂H₅

1-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]phenyl}-1,2-diphenyl-1-butene **1**

R1:CH₂=CHCH₃

1-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]-phenyl}-1,2-diphenyl-1,4-pentadiene **9**

R1:C₆H₅CH₂

1-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]phenyl}-1,2,3-triphenyl-1-butene **10**

図 2 タモキシフェン誘導体の構造

4工程でタモキシフェンを *Z,E* の混合物として合成することに成功した。合成ルートを **図 3** に示す。

また、代謝物による遺伝子発現パターンを検索するため、タモキシフェン *N*-オキシド **5** 及びそのエポキシド誘導体 **6** を合成した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮) 本研究の最終的な目標はヒト肝培養細胞を用いて、タモキシフェン誘導体曝露時の遺伝子発現を検討することであるが、本年度研究は誘導体の化学合成であるため、倫理面に配慮すべき事項はない。

1. 試薬・測定機器

ベンジル-4-ヒドロキシフェニルケトン は Aldrich 社より購入した。他の試薬溶媒はすべて、試薬一級あるいは特級を使用した。また NMR および質量分析は、それぞれ VXR-400S または AS400 (Varian) および JOEL JMS SX102 (日本電子) を用いて測定した。

2. タモキシフェンの合成

1-[4-(2-ジメチルアミノエトキシ)フェニル]-2-フェニルエタン-1-オン **12** の合成

ベンジル-4-ヒドロキシフェニルケトン (5.00 g, 23.6 mmol) **11** および 2-クロロエチルジメチルアミン塩酸塩 (6.85 g, 47.1 mmol) をジクロロメタン 300 mL に溶解し 5% 水酸化ナトリウム水溶液 200 mL を加え、終夜攪拌した。その後、ジクロロメタン層

を分取および水層にジクロロメタン 200 mL を加え生成物を抽出した。ジクロロメタン層を合一後、飽和食塩水 500 mL で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: ジクロロメタン / メタノール = 10 / 1) により精製し、化合物 **12** (6.62 g, 収率 99.2%) を得た。¹H NMR δ 2.34 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.75 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz, -CH₂NMe₂), 4.12 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz, -OCH₂-), 4.23 (s, 2H, PhCH₂CO-), 6.95 (m, 2H, Aromatic H), 7.26-7.32 (m, 5H, Aromatic H), 7.99 (m, 2H, Aromatic H), MS: 284 (MH⁺).

1-[4-(2-ジメチルアミノエトキシ)フェニル]-2-フェニルブタン-1-オン **13** の合成

アルゴン雰囲気下で、化合物 **12** (0.213 g, 0.706 mmol) を THF 5 mL に溶解し、水素化ナトリウム (0.0390 g, 1.06 mmol) を加え、15 分間攪拌した。その後、ヨウ化エチル (0.20 mL, 2.12 mmol) を加え、4 時間攪拌した。氷片を加え水素化ナトリウムを処理し、ジエチルエーテルおよび純水を各 100 mL ずつ加え生成物の抽出を行った。水層を再度ジエチルエーテル 50 mL で抽出し、ジエチルエーテル層を合一後、飽和食塩水 150 mL で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: トルエン / トリエチルアミン = 9 / 1) により精製し、化合物 **13** (0.0877 g,

収率 37.5 %) を得た。¹H NMR (CDCl₃)
δ 0.890 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH₃CH₂-),
1.84 (qdd, 1H, *J*_{Ha-CH₃} = 21.2 Hz, *J*_{Ha-Hb} =
*J*_{Ha-PhCH} = 6.8 Hz, CH₃CH₂-), 2.19 (qdd,
1H, *J*_{Hb-CH₃} = 21.2 Hz, *J*_{Hb-PhCH} = 6.8 Hz,
CH₃CH₂-), 2.30 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.70 (t,
2H, *J* = 5.6 Hz, -CH₂NMe₂), 4.06 (t, 2H, *J*
= 5.8 Hz, -OCH₂-), 4.40 (dd, 1H, *J* = 7.2
Hz, PhCH₂CO-), 6.87 (m, 2H, Aromatic
H), 7.17-7.31 (m, 5H, Aromatic H), 7.95
(m, 2H, Aromatic H), MS: 312 (MH⁺).

1-[4-(2-ジメチルアミノエトキシ)フェ ニル]-1,2-ジフェニルブタン-1-オール **14** の合成

0° C、アルゴン雰囲気下で、化合
物 **13** (0.301 g, 0.963 mmol) を THF 25
mL に溶解し、3.0 M フェニルマグネ
シウムブロミド (0.8 mL, 2.41 mmol)
を加え室温で 3 時間攪拌した。その
後、反応溶液が透明になるまで飽和
塩化アンモニウム水溶液を滴下し、
ジクロロメタンおよび純水を各 100
mL ずつ加え、生成物の抽出を行った。
水層を再度ジクロロメタン 100 mL で
抽出し、ジクロロメタン層を合一後、
飽和食塩水 200 mL で洗浄した。無水
硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で
溶媒を留去し、シリカゲルカラムク
ロマトグラフィー (展開溶媒: ジク
ロロメタン / メタノール = 20 / 1) に
より精製し、化合物 **14** (0.244 g, 収
率 65.0 %) を得た。¹H NMR (CDCl₃):
major diastereomer (79%), δ 0.727 (dd,
3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃CH₂-), 1.69-1.89 (m,
2H, CH₃CH₂-), 2.29 (s, 6H, -N(CH₃)₂),

2.65 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, -CH₂NMe₂), 3.56
(dd, 1H, PhCH₂CO-), 3.94 (t, 2H, *J* = 5.6
Hz, OCH₂-), 6.64-7.55 (m, 14H,
Aromatic H), minor diastereomer (21%),
δ 0.892 (dd, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃CH₂-),
1.69-1.89 (m, 2H, CH₃CH₂-), 2.72 (t, 2H,
J = 6.0 Hz, -CH₂NMe₂), 3.68-3.72 (m, 1H,
PhCH₂CO-), 4.07 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz, -
OCH₂-), 6.64-7.55 (m, 14H, Aromatic H),
MS: 390 (MH⁺).

タモキシフェン **1** の合成

化合物 **14** (45.1 mg, 0.12 mmol) を
メタノール 5 mL に溶解し、36% 塩
酸水溶液 0.5 mL 加え室温で 2 時間
攪拌した。その後、ジクロロメタン
および 1 M NaOH を各 100 mL ずつ
加え、生成物の抽出を行った。水層
を再度ジクロロメタン 100 mL で抽出
し、ジクロロメタン層を合一後、飽
和食塩水 100 mL で洗浄した。無水硫
酸ナトリウムで有機相を乾燥し、減
圧下で溶媒を留去した。アミノプロ
ピルシリカゲルカラムクロマトグラ
フィー (展開溶媒: ヘキサン / 酢酸
エチル = 2 / 1) により精製し、化合物
1 (39.4 mg, 収率 91.5 %) を得た。

¹H NMR (CDCl₃): (*Z*)-Tamoxifen
(64.9 %) δ 0.92 (dd, 3H, *J* = 7.4 Hz, -
CH₂CH₃), 2.28 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.45 (q,
2H, *J* = 7.5 Hz -CH₂CH₃), 2.64 (t, 2H, *J* =
5.8 Hz -CH₂N(Me)₂), 3.92 (t, 2H, *J* = 5.8
Hz -CH₂CH₂N(CH₃)₂), 6.56 (m, 2H,
Aromatic H), 6.76 (m, 2H, Aromatic H),
7.12-7.36 (m, 10H, Aromatic H), (*E*)-
Tamoxifen (35.1 %) δ 0.94 (dd, 3H, *J* =

7.2 Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.35 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.51 (q, 2H, $J=7.6$ Hz $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.74 (t, 2H, $J=5.8$ Hz $-\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})_2$), 4.08 (t, 2H, $J=5.8$ Hz $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 6.88 (m, 2H, Aromatic H), 6.99 (m, 2H, Aromatic H), 7.07-7.36 (m, 10H, Aromatic H). ^{13}C -NMR: (100 MHz, CDCl_3), (*Z*)-Tamoxifen: δ 13.6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29.0 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 45.9 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 58.3 ($-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 65.6 ($-\text{OCH}_2-$), 113.3, 126.0, 126.5, 127.8, 128.1, 129.4, 129.7, 131.8, 135.5, 138.2, 141.3, 142.4, 143.8, 156.7 ($-\text{C}=\text{C}-$ and Aromatic C), (*E*)-Tamoxifen: δ 13.6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29.0 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 45.9 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 58.3 ($-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 65.8 ($-\text{OCH}_2-$), 114.0, 125.6, 127.2, 127.5, 127.7, 130.5, 130.8, 131.8, 136.0, 138.3, 141.8, 143.3, 144.7, 157.5 ($-\text{C}=\text{C}-$ and Aromatic C).

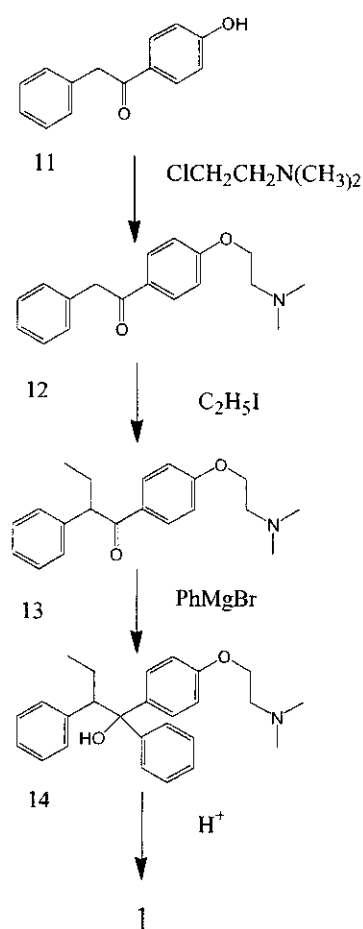


図3, タモキシフェン合成経路

C. 研究結果

1. タモキシフェンの合成

化合物 **12** はアルキルハライドと塩基を用いた反応では水酸基およびカルボニルのアルファ炭素の2カ所においてアルキル化が進行する。これを避けるため、ベンジル-4-ヒドロキシフェニルケトン **11** と 2-クロロエチルジメチルアミン塩酸塩をジクロロメタンと 5%-水酸化ナトリウム水溶液との二相条件下反応を行い、**12** を高収率で合成した。

次いで **12** とヨウ化エチルを水素化ナトリウム存在下、反応させ、カルボニル炭素のアルファ位にアルキル基を導入した **13** を収率 37.5% で得た。

得られた **13** をフェニルマグネシウムブロミドを用いてカルボニル炭素にフェニル基を導入し、**14** を収率 65% で合成した。得られた **14** を塩酸性で処理し、二重結合を導入し、タモキシフェン **1** を収率 92% (*Z*:*E*=65:35) で得ることに成功した。

2. タモキシフェン代謝物の合成

N-オキシド体 **5** およびそのエポキシド誘導体 **6** を既報(Raymond et al., *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 827 (1986)) に従い、タモキシフェンを 3-クロロ過安息香酸で酸化することにより合成

した。

D. 考察

市販品であるベンジル-4-ヒドロキシフェニルケトンを出発原料として4工程のタモキシフェン簡易合成法を開発した。この出発原料のフェノール性水酸基を直接アミノアルキル化することにより、フェノール性水酸基の保護・脱保護の過程を省略することを可能とした。Z,E 異性体はArmstrong らの方法(Armstrong DW *et al.*, *Anal. Chem.*, **57** 234 (1985))により分離可能であり、必要に応じて精製し、生物活性の測定に供する。

合成中間体 **12** を各種アルキルまたはアリルハライドと反応させることにより、側鎖の異なるタモキシフェン誘導体を合成することが可能である。実際、予備的な検討では、側鎖の異なる置換基が導入できることを確認しており、次年度に合成する。

近年、4位ヒドロキシ基のタモキシフェン活性発現における役割の重要性が、エストロゲン受容体と4-ヒドロキシタモキシフェンとの複合体のX線結晶解析の結果から明らかにされた (Andrew K.S., *et al.*, *Cell*, **95** 927 (1998), Shiau A.K., *et al.*, *Nature Structure Biology* **9**, 359 (2002))。このフェノール性水酸基は17 β エストラジオールのA環水酸基と同様に、受容体タンパク質中のArg394とGlu353と相互作用している。なお、タモキシフェンのフェニル基に結合したジメチルアミノエトキシ側鎖は抗エス

トロジェン作用発現を担っている置換基であり、受容体タンパク質中のAsp351と緩やかに結合していることが報告されている。一方、タモキシフェンの二重結合の近傍には比較的空間があることが報告されている。

これらのX線結晶解析の結果から化合物**7-10**も抗エストロジェン活性を有すると推測される。

3段階目のフェニルマグネシウムブロミドを用いたGrignard反応を改良することにより、次年度計画で合成予定のタモキシフェン誘導体についてもその4-ヒドロキシ化は可能と考えており、これら誘導体も次年度研究において合成し、遺伝子発現に及ぼす効果を検討する予定である。

E. 結論

タモキシフェン誘導体の簡易合成法の開発を行い、市販の化合物を出発原料とし4工程でタモキシフェンを合成した。本法は、タモキシフェン合成において使用したヨウ化エチルの代わりに各種アルキルまたはアリルハライドを用いることにより、側鎖の異なるタモキシフェン誘導体の合成に適用可能である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

上記の研究内容は、2003年度に投稿予定である。以下に関連した論文および学会発表を記載する。

1. 論文発表

- 1) K. Fukuhara, I. Nakanishi, T. Shimada, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, N. Miyata, N. Ikota, and S. Fukuzumi, A Planar Catechin Analogue as a Promising Antioxidant with Reduced Prooxidant Activity, *Chem. Res. Toxicol.*, **16** (1), 81-86 (2003).

2. 学会発表

- 1) 袴田 航、福原 潔、奥田晴宏、グリコシド結合開裂をトリガーとした活性酸素種発生阻害剤の開発、日本農芸化学会 2003 年度大会、(2003, 3)
- 2) 小山裕孝、袴田 航、福原 潔、望月正隆、奥田晴宏。スチルベン骨格を有する化合物 (タモキシフェンおよびそれらの誘導体) の DNA 切断活性、日本薬学会第 123 年会、(2003, 3)
- 3) 袴田 航、福原 潔、奥田晴宏、合成低分子プローブを用いたグリコシダーゼの基質認識機構の解析と阻害剤設計への応用、日本薬学会第 123 年会、(2003, 3)
- 4) 中西郁夫、宇都義浩、薬丸晴子、宮崎健太郎、大久保 敬、浦野四郎、奥田晴宏、小澤俊彦、福原 潔、福住俊一、伊古田暢夫、永沢秀子、堀 均、アルテピリンCのラジカル消去反応に及ぼす金属イオンの効果、日本薬学会第 123 年会、(2003, 3)
- 5) 中西郁夫、宮崎健太郎、大久保敬、浦野四郎、奥田晴宏、小澤俊彦、福原 潔、福住俊一、伊古田暢夫、電子移動を経由する(+)-カテキンのラジカル消去反応機構、日本薬学会第 123 年会、(2003, 3)
- 6) 福原 潔、中西郁夫、袴田 航、寒水壽郎、島田知一、宮崎健太郎、大久保 敬、山口健太郎、浦野四郎、小澤俊彦、福住俊一、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、平面型カテキン誘導体の合成とラジカル消去能、日本薬学会第 123 年会、(2003, 3)
- 7) 宮崎健太郎、中西郁夫、大久保敬、浦野四郎、奥田晴宏、小澤俊彦、伊古田暢夫、福住俊一、福原 潔、Quercetin とその誘導体の Peroxyl radical 消去に対する構造活性相関、日本薬学会第 123 年会、(2003, 3)
- 8) 宮崎健太郎、中西郁夫、大久保敬、袴田 航、浦野四郎、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、宮田直樹、福原 潔、平面型カテキン類縁体のペルオキシラジカル消去能、日本化学会第 83 春季年会、東京、(2003, 3)
- 9) 中西郁夫、宇都義浩、薬丸晴子、宮崎健太郎、大久保 敬、浦野四郎、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、福原 潔、伊古田暢夫、永沢秀子、堀 均、4-ヒドロキシケイ皮酸誘導体のラジカル消去機構、日本化学会第 83 春季年会、東京、(2003, 3)

- 10) 宮崎健太郎、中西郁夫、大久保 敬、浦野四郎、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、福原 潔、塩基性条件下におけるフラボノイド系抗酸化剤による活性酸素生成、日本化学会第 83 春季年会、東京、(2003, 3)
- 11) 中西郁夫、宮崎健太郎、大久保 敬、浦野四郎、奥田晴宏、小澤俊彦、福原 潔、上田順市、福住俊一、伊古田暢夫、フラボノイド系抗酸化剤の酸化還元挙動、日本化学会第 83 春季年会、東京、(2003, 3)
- 12) 中西郁夫・宮崎健太郎・大久保 敬・飯塚優子・稲見圭子・浦野四郎・奥田 晴宏・望月正隆・福住俊一・福原 潔・小澤俊彦・伊古田暢夫、ビタミンE類縁体の金属イオン存在下におけるラジカル消去反応、第 14 回ビタミン E 研究会、名古屋、(2003, 1)
- 13) 宮崎健太郎・中西郁夫・大久保 敬・袴田 航・浦野四郎・奥田晴宏・福住 俊一・福原 潔・小澤俊彦・伊古田暢夫、ビタミン E 類縁体アニオンの酸化反応挙動、第 14 回ビタミン E 研究会、名古屋、(2003, 1)
- 14) 福原 潔、中西郁夫、奥田晴宏、宮田直樹、フェノール性化合物による酸化的 DNA 損傷、第 17 回日本フリーラジカル学会関東支部研究会、東京、(2002,12)
- 15) 福原 潔、中西郁夫、宮崎健太郎、島田知一、袴田 航、大久保敬、浦野四郎、福住俊一、伊古田暢夫、小澤俊彦、宮田直樹、奥田晴宏、フェノール性抗酸化剤からの活性酸素生成、環境変異原学会第 31 回大会、東京、(2002,11)
- 16) 福原 潔、袴田 航、奥田晴宏、ムスク系香料の光照射による活性酸素生成、環境変異原学会第 31 回大会、東京、(2002,11)
- 17) 宮崎健太郎、中西郁夫、大久保 敬、袴田 航、浦野四郎、福住俊一、伊古田暢夫、小澤俊彦、奥田晴宏、福原 潔、ビタミン E 類縁体アニオンの酸化反応機構、第 35 回酸化反応討論会、京都、(2002,11)
- 18) 福原潔、中西郁夫、宮崎健太郎、袴田航、島田知一、大久保敬、浦野四郎、福住俊一、伊古田暢夫、小澤俊彦、奥田晴宏、平面型カテキンのラジカル消去能とプロオキシダント効果、第 35 回酸化反応討論会、京都、(2002,11)
- 19) 中西郁夫、宇都義浩、宮崎健太郎、福原 潔、奥田晴宏、浦野四郎、田草川光子、伊古田暢夫、小澤俊彦、永沢秀子、堀 均、アルテピリン C の抗酸化反応機構、第 35 回酸化反応討論会、京都、(2002,11)
- 20) 中西郁夫・宮崎健太郎・島田知一・大久保 敬・袴田 航・浦野四郎・奥田晴宏・福住俊一・福原 潔・伊古田暢夫・小澤俊彦、抗酸化剤ラジカル中間体のスピン分布、第 41 回 ESR 討論会・第 7

回 In vivo ESR 研究会連合討論会、
東京、(2002, 10)

- 21) 宮崎健太郎・中西郁夫・島田知一・大久保 敬・浦野四郎・奥田晴宏・福住俊一・福原 潔・伊古田暢夫・小澤俊彦、カテキンのラジカル消去機構、第41回 ESR 討論会・第7回 In vivo ESR 研究会連合討論会、東京、(2002, 10)
- 22) 小山裕孝、袴田航、福原潔、永川真希、望月正隆、宮田直樹、奥田晴宏、スチルベン骨格を有する化合物の DNA 切断活性、第46回日本薬学会関東支部大会、東京、(2002, 10)
- 23) 福原潔、中西郁夫、宮崎健太郎、島田知一、袴田航、大久保敬、浦野四郎、福住俊一、伊古田暢夫、小沢俊彦、宮田直樹、奥田晴宏、フラボノイド系抗酸化剤のラジカル消去能とプロオキシダント効果、第46回日本薬学会関東支部大会、東京、(2002, 10)
- 24) 福原潔、奥田晴宏、宮田直樹、平面型カテキンの抗酸化作用の評価、日本癌学会第61回総会、東京、(2002,10)

H. 知的財産権の出願・登録状況
登録および登録予定共になし。