

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 安全性の高い薬剤の創製には、薬剤の適切な構造修飾法を確立し、構造修飾体の遺伝子発現変化を解析する事が重要である。本研究では乳がん治療薬タモキシフェンをとりあげ、タモキシフェン誘導体によるヒト肝培養細胞暴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的とする。今年度は平成14年度に開発したタモキシフェンの簡易合成法を利用してオレフィンに結合したエチル基をプロトン、メチル、アリル、ベンジルに置換した化合物を合成した。また、タモキシフェンの活性本体と予測されている4-ヒドロキシタモキシフェンについても同様の置換体を合成した。合成した化合物の酸化的DNA損傷能およびBHK細胞増殖阻害活性はタモキシフェンおよび4-ヒドロキシ体とほぼ同程度であることがわかった。

A. 研究目的

本研究事業では薬剤暴露時の遺伝子発現パターンの解析を行い、毒性発現に関わる遺伝子群の同定と構造修飾に伴う遺伝子発現パターンの変化から、より安全性の高い薬剤を設計するための知見を得ることを目的としている。

分担研究者奥田は乳がんに対する化学療法第1選択薬として用いられているタモキシフェンをとりあげ、毒性と遺伝子発現との構造活性相関の検討に資するデータベースを構築する為に、タモキシフェン誘導体の合成を行う。

タモキシフェンは非ステロイド系抗エストロゲン剤としてタンパク質の転写を阻害し、また、成長抑制因子の

生合成を促進するという乳がん細胞の成長に対する二重の阻害機構によって抗ガン作用を示す。しかし、長期投与によって子宮内膜がんの発生頻度が有意に増加を示し、乳がん細胞が耐性を獲得して活性が著しく低下する。また、ラットに対して肝がんを誘発し、p53の変異を高頻度で惹起することが報告されている。

タモキシフェンの代謝経路としてはオレフィンに結合したエチル基の水酸化による α -ヒドロキシタモキシフェンの生成とそれに引き続いて起こる硫酸抱合体の生成、また、芳香環の水酸化による4-ヒドロキシタモキシフェンの生成、酸化的脱N-メチル化体の

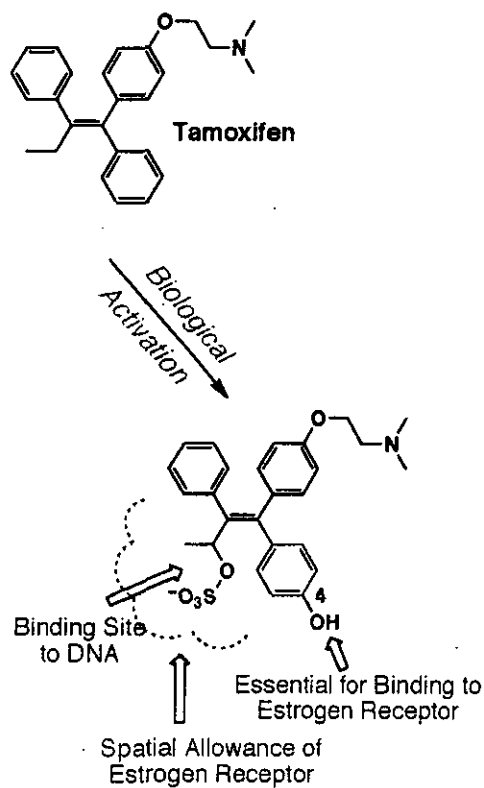


図 1. タモキシフェンの代謝活性化

生成等が報告されている。このうち、4-ヒドロキシ体はタモキシフェンに較べて100倍以上強い抗エストロゲン作用を示すことから、タモキシフェンの抗エストロゲン作用の活性本体と考えられている。一方、硫酸抱合体はグアニン塩基の環外アミノ基と反応して共有結合体を生成することから、エチル基の水酸化はタモキシフェンの肝癌誘発性に関与していると考えられている。なお、タモキシフェンとエストロゲンレセプターとの複合体の構造解析結果から、本レセプターはタモキシフェンのエチル基が占める部位には空間的余裕があることが報告されている(図1)。これはタモキシフェンのエチル基の部分の構造展開しても、抗エストロゲン活性には影響を与え

ないことを示唆している。そこで本研究では、毒性に深く関与していると推定される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を合成し、構造と遺伝子発現パターンの変動を解析することによって、より安全性の高い薬剤の開発に資する基礎的データを得る為に、平成14年度はタモキシフェン誘導体の簡便な方法を開発した。今年度は本方法を用いてタモキシフェンと4-ヒドロキシタモキシフェンについてエチル基を各種置換基に変換した誘導体の合成と、DNA切断活性および細胞増殖試験を行った。

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暴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と確立された培養細胞を用いた実験であるため、倫理面で配慮すべき事項はない。

1. 試薬・測定機器

Benzyl-4-hydroxyphenylketone (1) 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。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは Silica Gel 60 (spherical, 63-200 μm , MERCK) および Chomatorex NH (100-200 μm , 富士シリシア化学株式会社) を用いて行った。すべての反応は薄層クロマトグラフィー (Silica Gel F₂₅₄, 0.25 mm, Merck および TLC プレート NH, 富士シリシア化学株式会社) を用いて反応を追跡した。実験に使用した機器は、NMR

スペクトル: VXR-400S (Varian)、質量
スペクトル: Waters 2695 Separations
Module, Waters 2487 Dual λ Absorbance
Detector, Waters micromass ZQ (ESI
Positive and Negative) である。

2. タモキシフェン誘導体および 4-
ヒドロキシタモキシフェン誘導体の合
成

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-
phenylethane-1-one (2) の合成

Benzyl-4-hydroxyphenylketone (1,
5.00 g, 23.6 mmol) および 2-クロロエ
チル-*N,N*-ジメチルアンモニウム=ク
ロリド (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
層を分取し、さらに水層にジクロロメ
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
リウムで乾燥後、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 2
(6.62 g, 収率 99.2%) を得た。¹H NMR
(CDCl₃) δ 2.34 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.75 (t,
2H, *J* = 5.6 Hz, -CH₂NMe₂), 4.12 (t, 2H, -
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⁺).

以下の化合物は、方法 A~D に従って
合成した。

方法 A: アルゴン雰囲気下で、化合物
2 (1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]

-2-phenylethane-1-one, 1 eq.) を THF に
溶解し、水素化ナトリウム (3 eq.) を
加え、15 分間攪拌した。その後、ハ
ロゲン化アルキル (1 eq.) を加え 30
分間攪拌した。氷片を加え水素化ナト
リウムを処理し、反応溶液に純水を加
えジクロロメタンを用いて生成物の抽
出を行った。水層を再度ジクロロメタ
ンで抽出し、ジクロロメタン層を合一
後、飽和食塩水で洗浄した。有機層を
無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下
で溶媒を留去した。

方法 B: 0 °C、アルゴン雰囲気下で、
ケトン (1 eq.) を乾燥ジエチルエーテ
ルに溶解し、3.0 M フェニルマグネシ
ウムブロミド (2.5 eq.) を加えた後、
徐々に室温まで昇温し、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
し反応を終了した。反応液に純水 100
mL を加え有機層を分取した。水層に
ジエチルエーテル 100 mL を加え生成
物の再抽出を行った。有機層を合一後、
有機層を飽和食塩水 200 mL で洗浄し、
無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下
で溶媒を留去した。

方法 C: 0 °C、アルゴン雰囲気下で、
ケトン (1 eq.) を乾燥ジエチルエーテ
ルに溶解し、0.5 M 4-(2-tetrahydro-2H-
pyranoxy) phenylmagnesium bromide
(2.5 eq.) を加えた後、徐々に室温まで
昇温し、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反応を終了し
た。反応液に純水 100 mL を加え有機
層を分取した。水層にジエチルエーテ

ル 100 mL を加え生成物の再抽出を行った。有機層を合一後、有機層を飽和食塩水 200 mL で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。

方法 D: メタノール: 36% 塩酸 (20: 1) にカルビノール誘導体を溶解し、終夜攪拌した。その後、1 M 水酸化ナトリウム水溶液加え反応を停止し、ジクロロメタンを加え生成物の抽出を行った。水層を再度ジクロロメタンで抽出し、ジクロロメタン層を合一後、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenylpropane-1-one (3) の合成

方法 A に従い、化合物 2 (1.00 g, 3.53 mmol) とヨウ化メチル (0.22 mL, 3.53 mmol) を用いて化合物 3 の合成を行った。得られた化合物をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン / 酢酸エチル=1 / 2) により精製し、化合物 3 (0.45 g, 収率 42.9%) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 1.50 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH₃CHCO-), 2.29 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.68 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, -CH₂NMe₂), 4.04 (t, 2H, -OCH₂-), 4.63 (q, 1H, CH₃CHCO-), 6.86 (m, 2H, Aromatic H), 7.14-7.30 (m, 5H, Aromatic H), 7.93 (m, 2H, Aromatic H), MS: 298 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenylbutan-1-one (4) の合成

方法 A に従い、化合物 2 (0.21 g, 0.71 mmol) とヨウ化エチル (0.22 mL,

2.12 mmol) を用いて化合物 4 の合成を行った。得られた化合物を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 4 (87.7 mg, 収率 37.5%) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 0.89 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH₃CH₂-), 1.84 (qdd, 1H, $J_{\text{Ha, CH3}} = 21.2$ Hz, $J_{\text{Ha, Hb}} = J_{\text{Ha, PhCH-}} = 6.8$ Hz, CH₃CH₂-), 2.19 (qdd, 1H, $J_{\text{Hb, CH3}} = 21.2$ Hz, $J_{\text{Hb, PhCH-}} = 6.8$ Hz, CH₃CH₂-), 2.30 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.70 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, -CH₂NMe₂), 4.06 (t, 2H, -OCH₂-), 4.40 (dd, 1H, PhCHCO-), 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-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2,3-diphenylpropane-1-one (5) の合成

方法 A に従い、化合物 2 (0.50 g, 1.77 mmol) と臭化ベンジル (0.21 mL, 1.77 mmol) を用いて化合物 5 の合成を行った。得られた化合物を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=5 / 1) により精製し、化合物 7 (0.46 g, 収率 69.8%) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 2.30 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.71 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, -CH₂NMe₂), 3.04 (dd, 1H, $J_{\text{Ha, Hb}} = 13.6$ Hz, $J_{\text{Ha, PhCH-}} = 7.2$ Hz, PhCH₂-), 3.55 (dd, 1H, $J_{\text{Hb, PhCH-}} = 7.2$ Hz, PhCH₂-), 4.04 (t, 2H, -OCH₂-), 4.76 (t, 1H, PhCH₂CO-), 6.81 (m, 2H, Aromatic H), 7.06-7.35 (m, 10H, Aromatic H), 7.88 (m, 2H, Aromatic H), MS: 374 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenyl-4-pentene-1-one (6) の合成

方法 A に従い、化合物 **2** (0.49 g, 1.73 mmol) と臭化アリル (0.15 mL, 1.73 mmol) を用いて化合物 **6** の合成を行った。得られた化合物を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 = 5 / 1) により精製し、化合物 **6** (0.43 g, 収率 77.2 %) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 2.30 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.69 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz, -CH₂NMe₂), 4.05 (t, 2H, -OCH₂-), 4.58 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, PhCH₂CO-), 4.95 (ddd, 1H, *J*_{Ha, Hb} = 3.2 Hz, *J*_{Ha, CH₂CH=CH-} = 11.2 Hz, *J*_{Ha, CH₂CH=CH₂-} = 1.2 Hz, CH₂CH-, cis), 5.03 (ddd, 1H, *J*_{Hb, CH₂CH=CH-} = 17.2 Hz, *J*_{Hb, CH₂CH=CH₂-} = 1.4 Hz, CH₂CH-, trans), 5.74 (dddd, 1H, CH₂CH-), 6.87 (m, 2H, Aromatic H), 7.15-7.32 (m, 5H, Aromatic H), 7.94 (m, 2H, Aromatic H), MS: 324 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-1, 2-diphenylethan-1-ol (**7**) の合成

方法 B に従い、ケトンとして化合物 **2** (0.49 g, 1.73 mmol) を用いて化合物 **7** の合成を行った。得られた化合物を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 = 20 / 1) により精製し、化合物 **8** (0.29 g, 収率 44.6%) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 2.33 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.72 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz, -CH₂NMe₂), 3.61 (d, 2H, *J* = 1.6 Hz, PhCH₂-), 4.04 (t, 2H, -OCH₂-), 6.84-6.90 (m, 4H, Aromatic H), 7.14-7.41 (m, 10H, Aromatic H), MS: 362 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-1, 2-diphenylpropan-1-ol (**8**) の合成

方法 B に従い、ケトンとして化合物 **3** (0.31 g, 1.05 mmol) を用いて化合物 **8** の合成を行った。得られた化合物を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 = 15 / 1) により精製し、化合物 **8** (0.28 g, 収率 71.0 %) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 1.30 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃CH-), 2.26 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.63 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz, -CH₂NMe₂), 3.91 (t, 2H, -OCH₂-), 3.92 (q, 1H, CH₃CH-), 6.65 (m, 2H, Aromatic H), 7.07-7.35 (m, 10H, Aromatic H), 7.57 (m, 2H, Aromatic H), MS: 376 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-1, 2-diphenylbutan-1-ol (**9**) の合成

方法 B に従い、ケトンとして化合物 **4** (0.30 g, 0.96 mmol) を用いて化合物 **9** の合成を行った。得られた化合物を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 **9** (0.24 g, 収率 65.0 %) を得た。Major diastereomer (79%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.73 (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* = 5.8 Hz, -CH₂NMe₂), 3.56 (dd, 1H, PhCH-), 3.94 (t, 2H, -OCH₂-), 6.64-7.55 (m, 14H, Aromatic H), Minor diastereomer (21%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.89 (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, PhCH-), 4.07 (t, 2H, -OCH₂-), 6.64-7.55 (m, 14H, Aromatic H), MS: 390 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-1,2,3-triphenylbutan-1-ol (**10**) の合成

方法 B に従い、ケトンとして化合物 **5** (73 mg, 0.20 mmol) を用いて化合物 **10** の合成を行った。得られた化合物を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 = 15 / 1) により精製し、化合物 **13** (77.3 mg, 収率 87.3 %) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 2.27 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.63 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz, -CH₂NMe₂), 3.09 (m, 2H, PhCH₂-), 3.91 (t, 2H, -OCH₂-), 3.97 (dd, 1H, *J* = 4.4 and 9.2 Hz, PhCH-), 6.63 (m, 2H, Aromatic H), 6.86 (m, 2H, Aromatic H), 7.01-7.42 (m, 13H, Aromatic H), 7.68 (m, 2H, Aromatic H), MS: 452 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-1,2-diphenylbutan-1,4-pentadien-1-ol (**11**) の合成

方法 B に従い、ケトンとして化合物 **6** (0.20 g, 0.61 mmol) を用いて化合物 **11** の合成を行った。得られた化合物を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 = 15 / 1) により精製し、化合物 **11** (0.19 g, 収率 77.8 %) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 2.27 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.47-2.52 (m, 1H, CH₂CH=CH₂-), 2.57-2.63 (m, 1H, CH₂CH=CH₂-), 2.63 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz, -CH₂NMe₂), 3.77 (dd, 1H, *J*_{PhCH, CH₂CH=CH₂} = 3.0 and 11.4 Hz, PhCH-), 3.91 (t, 2H, -OCH₂-), 4.81 (ddd, 1H, *J*_{Ha-Hb} = 2.9 Hz, *J*_{Ha, CH₂CH=} = 10.0 Hz, *J*_{Ha, CH₂CH=CH₂} = 1.0 Hz, CH₂CH-, cis), 4.88 (ddd, 1H, *J*_{Hb, CH₂CH=} = 17.2 Hz, *J*_{Hb, CH₂CH=CH₂} = 1.6 Hz, CH₂CH-

trans), 5.53 (dddd, 1H, CH₂CH-), 6.64 (m, 2H, Aromatic H), 7.07-7.37 (m, 10H, Aromatic H), 7.56 (m, 2H, Aromatic H), MS: 402 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenyl-1-[4-(tetrahydropyran-2-yloxy)phenyl]-ethan-1-ol (**12**) の合成

方法 C に従い、ケトンとして化合物 **2** (0.51 g 1.77 mmol) を用いて化合物 **12** の合成を行った。得られた化合物を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** (0.63 g, 収率 76.3 %) を得た。MS: 461 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenyl-1-[4-(tetrahydropyran-2-yloxy)phenyl]-propan-1-ol (**13**) の合成

方法 C に従い、ケトンとして化合物 **3** (0.17 g 0.58 mmol) を用いて化合物 **13** の合成を行った。得られた化合物を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) を行い、目的化合物を含む画分を濃縮し、再度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 = 3 / 1) により精製し、化合物 **13** (0.25 g, 収率 92.1 %) を得た。MS: 476 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenyl-1-[4-(tetrahydropyran-2-yloxy)phenyl]-butane-1-ol (**14**) の合成

方法 C に従い、ケトンとして化合物 **4** (0.20 g 0.65 mmol) を用いて化合物 **14** の合成を行った。得られた化

化合物を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=5 / 1）を行い、目的化合物を含む画分を濃縮し、再度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 **14** (0.29 g, 収率 92.4 %) を得た。MS: 490 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2,3-diphenylbutan-1-[4-(tetrahydropyran-2-yloxy)phenyl]-1-ol (**15**) の合成

方法 C に従い、ケトンとして化合物 **5** (0.20 g 0.54 mmol) を用いて化合物 **15** の合成を行った。得られた化合物を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=5 / 1）を行い、目的化合物を含む画分を濃縮し、再度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 **15** (0.29 g, 収率 98.4 %) を得た。MS: 552 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenyl-1-[4-(tetrahydropyran-2-yloxy)phenyl]-4-pentadien-1-ol (**16**) の合成

方法 C に従い、ケトンとして化合物 **6** (0.24 g 0.73 mmol) を用いて化合物 **16** の合成を行った。得られた化合物を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=5 / 1）を行い、目的化合物を含む画分を濃縮し、再度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 **16** (0.25 g, 収率

69.3 %) を得た。MS: 502 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-1-diphenyl-1-ethylene (**17**) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 **7** (0.29 g, 0.79 mmol) を用いて化合物 **15** の合成を行った。得られた化合物を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=20 / 1）により精製し、化合物 **17** (65.4 mg, 収率 18.7 %) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 2.34 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.74 (t, 2H, J = 5.8 Hz, -CH₂NMe₂), 4.08 (t, 2H, -OCH₂-), 6.85-7.37 (m, 15H, Aromatic H and PhCH=), MS: 344 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-1,2-diphenyl-1-propene (**18**) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 **8** (0.14 g, 0.38 mmol) を用いて化合物 **18** の合成を行った。得られた化合物を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=20 / 1）により精製し、化合物 **18** (0.13 g, 収率 96.0 %) を得た。Major isomer (67%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.11 (s, 3H, CH₃C=), 2.29 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.65 (t, 2H, J = 6.0 Hz, -CH₂NMe₂), 3.93 (t, 2H, -OCH₂-), 6.56-7.36 (m, 14H, Aromatic H), MS: 358 (MH⁺), Minor isomer (33%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.15 (s, 3H, CH₃C=), 2.35 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.74 (t, 2H, J = 5.8 Hz, -CH₂NMe₂), 4.08 (t, 2H, -OCH₂-), 6.56-7.36 (m, 14H, Aromatic H), MS: 358 (MH⁺).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-
1,2-diphenyl-1-butene (**19**) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 **9** (45 mg, 0.12 mmol) を用いて化合物 **19** の合成を行った。得られた化合物をアミノシリカゲル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 **19** (39.4 mg, 収率 91.5%) を得た。Major isomer (65%): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0.92 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.28 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.45 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.64 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz $-\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})_2$), 3.92 (t, 2H, $J = 5.3$ Hz $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 6.56-7.23 (m, 14H, Aromatic H), MS: 372 (MH^+), Minor isomer (35%): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0.94 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.35 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.50 (q, 2H, $J = 7.2$ 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 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 6.56-7.23 (m, 14H, Aromatic H), MS: 372 (MH^+).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-1,
2,3-triphenyl-1-propene (**21**) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 **10** (77.3 mg, 0.17 mmol) を用いて化合物 **21** の合成を行った。得られた化合物を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 = 15 / 1) により精製し、化合物 **21** (56.3 mg, 収率 88.5%) を得た。Major isomer (77%): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.29 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.65 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NMe}_2$), 3.87 (s, 2H, PhCH_2-), 3.94 (t, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 6.57-7.35 (m, 19H,

Aromatic H), MS: 434 (MH^+), Minor isomer (23%): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.33 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.73 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NMe}_2$), 3.92 (s, 2H, PhCH_2-), 4.05 (t, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 6.57-7.35 (m, 19H, Aromatic H), MS: 434 (MH^+).

1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-1,
2-diphenyl-1,4-pentadiene (**22**) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 **11** (80.6 mg, 0.20 mmol) を用いて化合物 **22** の合成を行った。得られた化合物を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 = 15 / 1) により精製し、化合物 **22** (71.2 mg, 収率 92.5%) を得た。Major isomer (73%): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ (73%), 2.28 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.64 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NMe}_2$), 3.23 (dt, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}-, \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2} = 1.6$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{CH}-, \text{CH}_2\text{CH}} = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.93 (t, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 4.92-5.00 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2-$), 5.70-5.76 (tt, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}-$), 6.56-7.35 (m, 14H, Aromatic H), MS: 384 (MH^+), Minor isomer (27%): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.35 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.74 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NMe}_2$), 3.29 (dt, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}-, \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2} = 1.6$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{CH}-, \text{CH}_2\text{CH}} = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}-$), 4.08 (t, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 4.92-5.00 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2-$), 5.70-5.76 (tt, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}-$), 6.56-7.35 (m, 14H, Aromatic H), MS: 384 (MH^+).

4-{1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-
2-phenyl-1-ethyl}phenol (**23**) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 **12** (0.29 g, 0.63

mmol) を用いて化合物 **23** の合成を行った。得られた化合物をエタノールとヘキサンを用い再結晶を行い、化合物 **23** (0.16 g, 収率 68.3 %) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 2.39 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.80 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz -CH₂N(Me)₂), 4.07 (t, 2H, -CH₂CH₂N(Me)₂), 6.68-7.22 (m, 14H, Aromatic H and PhCH=), MS: 360 (MH⁺).

4-{1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenyl-1-propyl}phenol (**24**) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 **13** (0.26 g, 0.53 mmol) を用いて化合物 **24** の合成を行った。得られた化合物を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 = 5 / 1) により精製し、化合物 **24** (0.13 g, 収率 64.3 %) を得た。Major isomer (55.2%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.12 (s, 3H, -CH₃), 2.47 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.90 (t, 2H, *J* = 5.2 Hz -CH₂N(Me)₂), 4.13 (t, 2H, -CH₂CH₂N(CH₃)₂), 6.37-7.17 (m, 13H, Aromatic H), MS: 374 (MH⁺), Miner isomer (44.8%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.13 (s, 3H, -CH₃), 2.41 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.81 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz -CH₂N(Me)₂), 3.97 (t, 2H, -CH₂CH₂N(Me)₂), 6.37-7.17 (m, 13H, Aromatic H), MS: 374 (MH⁺).

4-{1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenyl-1-butyl}phenol (**25**) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 **14** (0.12 g, 0.24 mmol) を用いて化合物 **25** の合成を行った。得られた化合物をシリカゲル

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 = 7 / 1) により精製し、化合物 **25** (97.7 mg, 収率 100 %) を得た。Major isomer (88 %): ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.91 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, -CH₂CH₃), 2.34 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.49 (q, 2H, -CH₂CH₃), 2.72 (t, 2H, *J* = 5.4 Hz -CH₂N(Me)₂), 3.90 (t, 2H, -CH₂CH₂N(CH₃)₂), 6.30-7.18 (m, 13H, Aromatic H), Miner isomer (12 %): ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.93 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, -CH₂CH₃), 2.39 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.49 (q, 2H, -CH₂CH₃), 2.80 (t, 2H, *J* = 5.4 Hz -CH₂N(Me)₂), 4.07 (t, 2H, -CH₂CH₂N(CH₃)₂), 6.30-7.18 (m, 13H, Aromatic H), MS: 388 (MH⁺).

4-{1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2,3-phenyl-1-butyl}phenol (**26**) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 **15** (0.18 g, 0.33 mmol) を用いて化合物 **26** の合成を行った。得られた化合物を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 = 7 / 1) により精製し、化合物 **26** (0.14 g, 収率 93.7 %) を得た。Major isomer (65 %): ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.36 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.76 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz, -CH₂N(Me)₂), 3.90 (s, 2H, -CH₂Ph), 3.92 (t, 2H, -CH₂CH₂N(Me)₂), 6.47-7.19 (m, 18H, Aromatic H), MS: 450 (MH⁺), Miner isomer (35 %): ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.32 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.70 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz, -CH₂N(Me)₂), 3.91 (s, 2H, -CH₂Ph), 4.04 (t, 2H, -CH₂CH₂N(Me)₂), 6.39-7.19 (m, 18H, Aromatic H), MS: 450 (MH⁺).

4-{1-[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]-2-phenyl-1,4-pentadiyl}phenol (27) の合成

方法 D に従い、カルビノール誘導体として化合物 16 (0.13 g, 0.26 mmol) を用いて化合物 27 の合成を行った。得られた化合物を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 = 7 / 1) により精製し、化合物 27 (98.0 mg, 収率 94.4 %) を得た。Major isomer (51 %): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.39 (s, 6H, - $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.80 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, - $\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})_2$), 3.25-3.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ -), 3.90 (t, 2H, - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})_2$), 4.90-5.01 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ -), 5.68-5.78 (tt, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ -), MS: 400 (MH^+), Minor isomer (49 %): $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2.33 (s, 6H, - $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.71 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, - $\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})_2$), 3.25-3.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ -), 4.06 (t, 2H, - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})_2$), 4.90-5.01 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ -), 5.68-5.78 (tt, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ -), MS: 400 (MH^+).

3. DNA 切断活性

20 mM 化合物 DMF 溶液 5 μL 、0.5 mM FeCl_3 または CuCl_2 水溶液 10 μL 、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 80 μL および pBR 322 Plasmid DNA 水溶液 5 μL を反応容器に加え転倒攪拌にて混和、スピンドアウンを行った。37°C で 40 時間インキュベート後、エタノール沈殿を行い 1 % アガロース電気泳動に供した。エチジウムブロミド染色後、UV トランスイルミネーターによって DNA バンドを解

析した。

4. BHK (Baby-hamster kidney) 細胞増殖阻害活性

10 % 子牛血清含有イーグル基礎培地により BHK 細胞をコンフルエントとなるまで単層培養した。培養容器中へサンプル化合物の DMSO 溶液を加え、化合物の終濃度を 0.24, 0.49, 0.98, 2.0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, and 500 μM とし、炭酸ガス 5 %, 37 度、12 時間インキュベートを行った。その後、細胞生存性が半分となる化合物濃度 (IC_{50} μM) を求めた。

C. 研究結果

1) タモキシフェン誘導体の合成

昨年度開発したタモキシフェンの簡易合成法では、オレフィンに結合しているエチル基をベンジルフェニルケトン誘導体にヨウ化エチルを反応させて導入した。そこでヨウ化エチルの代わりにさまざまなアルキルハライドを用いてタモキシフェン誘導体の合成を試みた (図 2)。まず、ベンジル-4-ヒドロキシフェニルケトン 1 に、2-クロロエチレン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、ベンジルフェニルケトン誘導体 2 を合成した。次いで 2 とヨウ化メチルを水素化ナトリウム存在下、反応させて、カルボニル炭素のアルファ位にメチル基を導入した。さらに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、得られた化合物 8 を塩酸酸性で処理して二重結合を導入してタモキシフェンのエチル

基のメチル置換体 **18** を得ることに成功した。エチル基のベンジル置換体 **21**、およびアリル置換体 **22** は、化合物 **2** に臭化ベンジル、臭化アリルをそれぞれ反応させて合成した。エチル

基が欠損したプロトン置換体 **17** は **2** に直接フェニルマグネシウムブロミド反応させて合成した。

なお、化合物 **19** は昨年度合成を報告したタモキシフェンの *E,Z* 混合物で

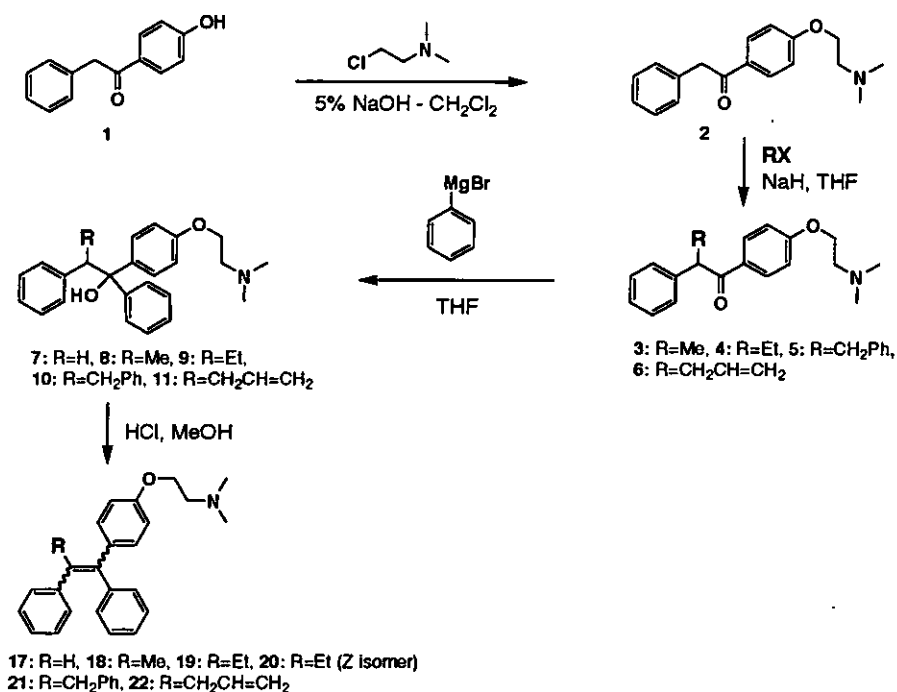


図 2. タモキシフェン誘導体の合成

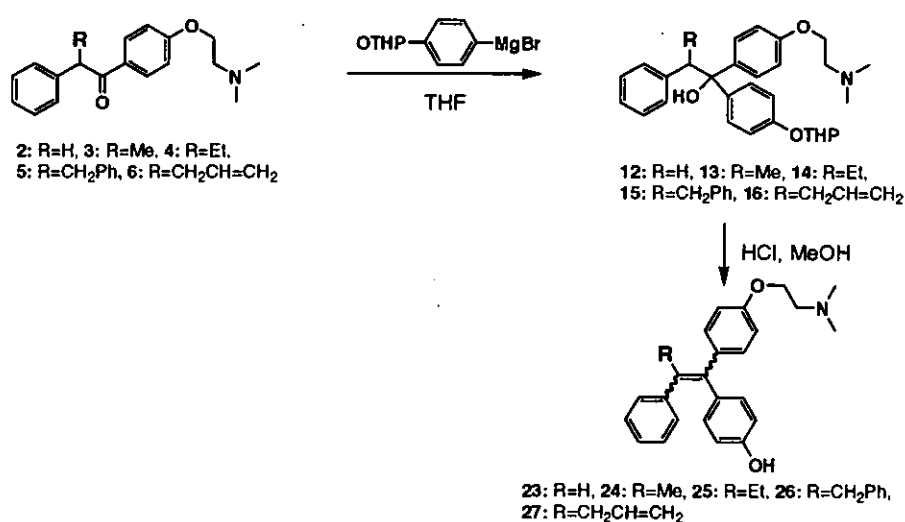
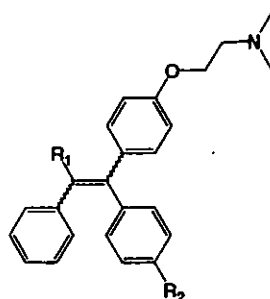


図 3. 4-ヒドロキシタモキシフェン誘導体の合成

あり、化合物 20 が化合物 19 を精製して得られる臨床で用いられているタモキシフェン (Z 体) である。

2) 4-ヒドロキシタモキシフェン誘導体の合成

様々な置換基を導入した化合物 2~6 に、フェニルマグネシウムブロミドに代わって、水酸基が THP (2-テトラヒドロ-2H-ピラノキシ) で保護された 4-ヒドロキシフェニルマグネシウムブロミドを反応させて化合物 12~16 を得た。さらに塩酸酸性で処理して二重結合を導入して 4-ヒドロキシタモキシフェンのエチル基の置換体 23~27 を合成することに成功した (図 3)。

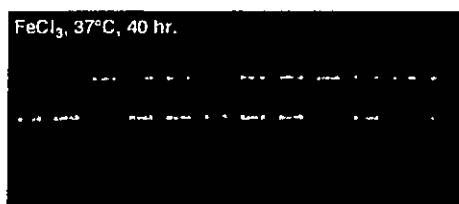


- | | |
|--|---|
| 17: R ₁ =R ₂ =H | 23: R ₁ =H, R ₂ =OH |
| 18: R ₁ =Me, R ₂ =H | 24: R ₁ =Me, R ₂ =OH |
| 19: R ₁ =Et, R ₂ =H | 25: R ₁ =Et, R ₂ =OH |
| 21: R=CH ₂ Ph, R ₂ =H | 26: R=CH ₂ Ph, R ₂ =OH |
| 22: R=CH ₂ CH=CH ₂ , R ₂ =H | 27: R=CH ₂ CH=CH ₂ , R ₂ =OH |

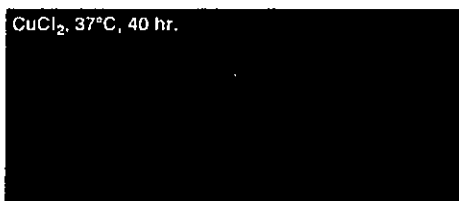
3) タモキシフェンおよび 4-ヒドロキシタモキシフェンとその誘導体の DNA 切断活性

pBR322DNA を用いて合成した化合物の DNA 切断活性を Fe³⁺ および Cu²⁺ 存在下で検討した。PBR322 は損傷の程度により、Form I (スーパーコイル、未損傷) から Form II (開環状 DNA)、さらに Form III (直鎖状 DNA) へと高次構造が変化する。アガロースゲル電気泳動により分離した各 Form に由来する電気泳動バンドの検出・定量を行い、Form I の残存率から DNA 切断活性を求めた。

その結果、タモキシフェン 19 及び



A B 17 18 19 22 21 23 24 25 27 26
A: DMF + FeCl₃, B: DMF + Buffer



A B 17 18 19 22 21 23 24 25 27 26
A: DMF + CuCl₂, B: DMF + Buffer

電気泳動による解析結果

Form I 残存率

	Form I (%)										
	A	17	18	19	22	21	23	24	25	27	26
FeCl ₃	100	12.7	100	94.1	100	87.1	89.0	69.6	93.8	51.0	81.3
CuCl ₂	100	30.2	92.0	91.1	85.5	77.8	86.8	56.7	92.0	41.6	72.4

図 4. タモキシフェンとその誘導体の DNA 切断実験結果

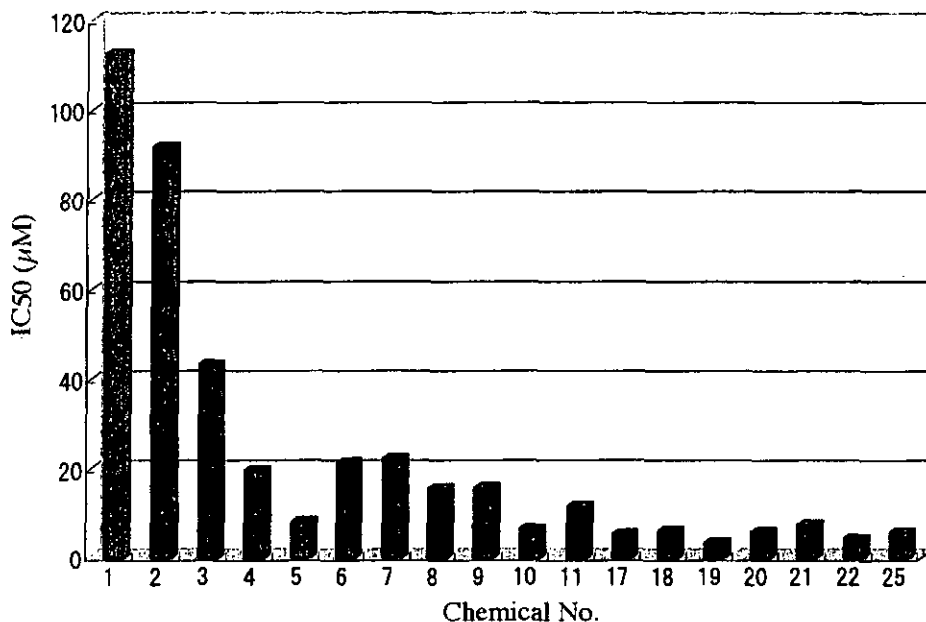


図 5. タモキシフェンとその誘導体の BHK 細胞増殖阻害活性

4-ヒドロキシタモキシフェン **25** は金属として FeCl_3 または CuCl_2 の存在下、DNA を切断したが、その活性は非常に弱かった。一方、化合物 **17**、**24** および **27** に有意な DNA 切断活性が認められ、特に **17** は両金属イオン存在下、強力に DNA を切断した。その他の化合物については顕著な DNA 切断活性は認められず、タモキシフェンと同程度の DNA 損傷能であった。また、構造と活性に明確な相関は認められなかった (図 4)。

4) タモキシフェンおよび4-ヒドロキシタモキシフェンとその誘導体の BHK 細胞増殖阻害活性

タモキシフェンのエチル基の置換体、およびこれらの化合物の合成中間体と4-ヒドロキシタモキシフェンについて BHK 細胞に対する細胞増殖阻害活性を検討した。被検物質を BHK 細胞に添加してインキュベートした時、細胞生存性が半分になる濃度を細胞増殖

阻害活性として求めた (図 5)。

その結果 IC_{50} は、ケトン体 **1**: $112.6 \mu\text{M}$, **2**: $91.7 \mu\text{M}$, **3**: $43.1 \mu\text{M}$, **4**: $19.5 \mu\text{M}$, **5**: $7.89 \mu\text{M}$, **6**: $21.1 \mu\text{M}$, カルビノール誘導体 **7**: $22.1 \mu\text{M}$, **8**: $15.4 \mu\text{M}$, **9**: $15.6 \mu\text{M}$, **10**: $6.35 \mu\text{M}$, **11**: $11.5 \mu\text{M}$, タモキシフェン誘導体 **17**: $5.14 \mu\text{M}$, **18**: $5.86 \mu\text{M}$, **19**: $3.15 \mu\text{M}$, **20**: $5.66 \mu\text{M}$, **21**: $7.23 \mu\text{M}$, **22**: $4.12 \mu\text{M}$, 4-ヒドロキシタモキシフェン **25**: $5.51 \mu\text{M}$ となった。以上の結果より、合成中間体のケトン体は細胞増殖阻害活性が最も低く、一方タモキシフェン骨格は細胞増殖阻害活性が比較的高いことがわかった。またタモキシフェンのエチル基を他の置換基に変えても細胞増殖阻害効果は大きく変化しないことがわかった。

D. 考察

薬剤を構造修飾して、その遺伝子発現パターンの変化からより安全性の高い薬剤の開発する為には、薬剤の主作

用を軽減することなく構造修飾を行うことが必要である。本研究で取り上げたタモキシフェンはエチル基の部分が代謝活性化されることによって毒性を発現する一方、エストロジェン受容体との複合体の解析研究ではオレフィンからエチル基にかけて空間的余裕があることから、抗エストロジェン活性を維持しつつ毒性を低減させるためにはエチル基部分を構造修飾することが有効と考えられる。従って、エチル基部分の構造修飾体について遺伝子発現パターンの特徴を明らかにすれば、遺伝子レベルで安全性の保証された薬剤の開発が可能となる。そこで、昨年度開発したタモキシフェンの簡易合成法を用いて合成中間体 **2** に各種アルキルハライドを反応させることにより、タモキシフェンの構造修飾体を合成した。また、抗エストロジェン作用の発現過程における毒性との関わりを明らかにする目的で、抗エストロジェン作用の活性本体と予測される4-ヒドロキシ体についてもエチル基部分の構造修飾体を合成した。合成した化合物は全て *E, Z* 異性体として得られた。このうちタモキシフェンの構造修飾体 **18**~**22** は分離可能であり、生物試験等必要に応じて精製する。一方、4-ヒドロキシタモキシフェンの構造修飾体 **27**~**30** については各異性体を精製しても容易に異性化が進行するため、異性体混合物のまま生物試験に供する。なお、今回行った DNA 切断活性と細胞増殖阻害活性については全て異性体混合物を用いた。

活性酸素は生体高分子を修飾して細胞に対して障害性を持つとともに、遺

伝子発現や細胞増殖においても生理的機能を持つ。すなわち、細胞内のオキシダントレベルが上昇したり細胞外からの刺激によって活性酸素は細胞内のシグナル伝達系の活性化を起し、最終的には核における遺伝子発現の変化に繋がる。タモキシフェンは代謝活性化を受けると活性酸素を発生することが報告されていることから、遺伝子発現パターンへの活性酸素の影響も示唆される。そこで今回合成した化合物の DNA に対する酸化的損傷を明らかにすることによって活性酸素生成能の検討を行った。その結果、タモキシフェンとその4-ヒドロキシ体は銅イオン (Cu^{2+}) 及び鉄イオン (Fe^{3+}) 存在下、DNA の酸化的損傷能は非常に弱いことが明らかとなった。この結果は、タモキシフェンからの活性酸素の生成は、4位が水酸化後、さらに酸化が進行した代謝物に由来することを示唆している。タモキシフェンのエチル基の置換体の中では化合物 **17** に顕著な DNA 切断活性がみられたが、他の構造修飾はタモキシフェンとほぼ同程度の弱い DNA 切断能を有していることがわかった。この結果はタモキシフェンの構造類似体の生体内での活性酸素生成能はタモキシフェンと同様に弱いことを示しており、活性酸素に由来する遺伝子発現パターンの変化はエチル基部分を構造修飾しても大きな変化はないことが予測された。

タモキシフェンとその構造修飾体の毒性予測に資する指標を得ることを目的として BHK 細胞増殖阻害活性を検討した。その結果、タモキシフェンとその構造修飾体は、合成中間体のカル

ビノール誘導体よりも増殖阻害活性が強いことから、オレフィン構造は細胞増殖阻害効果に必須であることが明らかとなった。また、タモキシフェンとその構造修飾体の細胞増殖阻害活性がほぼ同程度であることから、エチル基を構造修飾してもタモキシフェンの毒性には影響しないことが示唆される。さらに、タモキシフェンの4位は水酸化代謝を受けて抗エストロゲン活性を発現するが、タモキシフェンと4-ヒドロキシ体の阻害活性が同程度であることから、細胞増殖阻害活性に抗エストロゲン作用は影響を与えないことが示唆された。

現在、これらの化合物の生物作用と毒性（ER 結合活性、細胞毒性、細胞増殖阻害、タンパク質合成阻害、核酸合成系阻害、糖タンパク質細胞内輸送阻害）について詳細な解析を行い、有効性と安全性を分子レベルで検討を行っている。特に優れた化合物及び強い毒性が予測される化合物については遺伝子発現パターンを解析して毒性発現に関わる遺伝子群を同定し、安全性の高い医薬品を創製するための基礎的知見を遺伝子レベルで明らかにする予定である。

E. 結論

昨年度、開発したタモキシフェンの簡易合成法を利用してオレフィンに結合したエチル基をプロトン、メチル、アリル、ベンジルに置換した化合物を合成した。また、タモキシフェンの活性本体と予測されている4-ヒドロキシタモキシフェンについても同様の置換体を合成した。合成した化合物につ

いて金属イオン（ Cu^{2+} 及び Fe^{3+} ）存在下、DNA に対する酸化的損傷能を検討したところ、化合物 17 を除いては DNA 切断活性は弱く、タモキシフェンとその4-ヒドロキシ体も切断能は弱いことがわかった。BHK 細胞を用いた増殖阻害活性は、タモキシフェン構造を有する全ての化合物に比較的強い細胞増殖阻害効果が認められた。なお、エチル基を他の置換基に変えても増殖阻害効果に変化はみられなかった。これらの結果より、タモキシフェンの毒性発現に関わるエチル基を他の置換基に変えたタモキシフェン類似体は、タモキシフェンと同様の生物活性が予測される。従って、これらのタモキシフェン誘導体は、より安全性の高い薬剤開発に資する遺伝子発現パターンの解析研究の為の候補化合物として適用可能である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara, A Planar Catechin Analogue Having a More Negative Oxidation Potential than (+)-Catechin as an Electron-Transfer Antioxidant against a Peroxyl Radical, *Chem. Res. Toxicol.*, 17, 26-31(2004).
- 2) I. Nakanishi, K. Miyazaki, T. Shimada, K. Inami, M. Mochizuki, S. Urano, H. Okuda, T. Ozawa, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K.

Fukuhara, Kinetic Study on the Electron-Transfer Oxidation of the Phenolate Anion of a Vitamin E Model by Molecular Oxygen Generating Superoxide Anion in an Aprotic Medium, *Org. Biomol. Chem.*, 1, 4085-4088 (2003).

- 3) I. Nakanishi, Y. Uto, K. Ohkubo, K. Miyazaki, H. Yakumaru, S. Urano, H. Okuda, J. Ueda, T. Ozawa, K. Fukuhara, S. Fukuzumi, H. Nagasawa, H. Hori, N. Ikota, Efficient radical scavenging ability of artemisinin, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism, *Org. Biomol. Chem.*, 1, 1452-1454(2003).

2. 学会発表

- 1) 福原 潔、袴田 航、中西郁夫、中村友里子、清水健彦、樋口 創、増田 雄、奥 忠武、浦野四朗、齋藤慎一、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、脂溶性平面型カテキン誘導体の合成と抗酸化活性、日本薬学会第 124 年会、大阪、(2004, 3)
- 2) 中西郁夫、内藤有紀、佐藤由紀子、宮田直樹、奥田晴宏、小澤俊彦、伊古田暢夫、福原 潔、キノンによる酸化的 DNA 損傷の化学的解析、日本薬学会第 124 年会、大阪、(2004, 3)
- 3) 中西郁夫、福原 潔、大久保 敬、西澤千穂、竹下啓蔵、鈴木和夫、丹野雅幸、末吉祥子、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、ピリジン *N*-オキシド類の光還元によるヒドロキシルラジカル生成機構、日本薬学会第 124 年会、大阪、(2004, 3)
- 4) 中西郁夫、清水健彦、大久保 敬、上田順市、薬丸晴子、浦野四郎、奥田晴宏、福住俊一、福原 潔、伊古田暢夫、小澤俊彦、天然抗酸化剤のラジカル消去能および一電子酸化電位に対する溶媒効果、日本薬学会第 124 年会、大阪、(2004, 3)
- 5) 中西郁夫、福原 潔、大久保 敬、西澤千穂、竹下啓蔵、鈴木和夫、丹野雅幸、末吉祥子、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、ピリジン *N*-オキシド誘導体による活性酸素生成、日本化学会第 84 春季年会、西宮、(2004, 3)
- 6) 中西郁夫、福原 潔、大久保 敬、清水健彦、浦野四郎、袴田 航、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、フェノール性抗酸化剤のラジカル消去反応に対する溶媒効果、日本化学会第 84 春季年会、西宮、(2004, 3)
- 7) 中西郁夫、福原 潔、大久保 敬、薬丸晴子、上田順市、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、フラボノイド系抗酸化剤および対応するアニオン種の一電子酸化電位、日本化学会第 84 春季年会、西宮、(2004, 3)
- 8) 福原 潔、袴田 航、中西郁夫、小澤俊彦、伊古田暢夫、奥田晴宏、天然抗酸化剤を利用した創薬化学：平面型カテキンの合成と抗酸化能、第 1 回日本カテキン学会、横浜、(2004, 1)
- 9) 福原 潔、袴田 航、中西郁夫、中村友里子、清水健彦、樋口 創、増田 雄、奥 忠武、浦野四朗、齋藤慎一、小澤俊彦、伊古田暢夫、奥田晴宏、平面型カテキン誘導体の開発 - 生活習慣病の予防及び治療薬を目指して、日本フリーラジカル学会関東部会、東京、(2003, 12)
- 10) 袴田 航、山本恵美子、中村友里子、室井 誠、齋藤慎一、望月正隆、奥田晴宏、福原 潔、活性酸素および小胞体ストレスによるアポトーシス誘導薬の開発、日本フリーラジカル学会関東部会、東京、

- (2003, 12)
- 11) 福原 潔、中西郁夫、袴田 航、中村友里子、清水健彦、樋口 創、増田 雄、奥 忠武、浦野四朗、齋藤慎一、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、活性酸素毒性の予防を目的とした平面型カテキン誘導体の開発、日本環境変異原学会第32回大会、津、(2003, 11)
 - 12) 袴田 航、山本恵美子、室井 誠、望月正隆、奥田晴宏、小胞体ストレス誘起能と DNA 損傷能を有する化合物の開発、日本環境変異原学会第32回大会、津、(2003, 11)
 - 13) I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara, A Planar Catechin Analogue Having a More Negative Oxidation Potential than (+)-Catechin as an Electron-Transfer Antioxidant against a Peroxyl Radical, Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research, Asia (SFRR-Asia), Seoul National University, (2003, 11)
 - 14) I. Nakanishi, K. Miyazaki, K. Ohkubo, S. Urano, J. Ueda, W. Hakamata, H. Okuda, T. Ozawa, S. Fukuzumi, K. Fukuhara, and N. Ikota, Oxidation Potentials of Antioxidative Flavonoids and the Radical-Scavenging Abilities, 10th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), Seattle, Washington USA, (2003, 11)
 - 15) 中西郁夫、宮崎健太郎、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、福原 潔、フラボノイド系抗酸化剤アニオン種の酸化反応挙動、第36回酸化反応討論会、東京、(2003, 10)
 - 16) 中西郁夫、清水健彦、大久保 敬、袴田 航、宮崎健太郎、浦野四郎、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、福原 潔フラボノイド系抗酸化剤の酸化における溶媒効果、第36回酸化反応討論会、東京、(2003, 10)
 - 17) 中西郁夫、西澤千穂、大久保 敬、竹下啓蔵、鈴木和夫、奥田晴宏、小澤俊彦、丹野雅幸、末吉祥子、福住俊一、伊古田暢夫、福原 潔、ピリジン N-オキシドの還元による活性酸素生成、第36回酸化反応討論会、東京、(2003, 10)
 - 18) 中西郁夫、宮崎健太郎、大久保 敬、浦野四郎、上田順一、奥田晴宏、小澤俊彦、福住俊一、福原 潔、伊古田暢夫、フラボノイド類の酸化還元挙動、第18回生体機能関連化学部会・第7回バイオテクノロジー部会、熊本、(2003, 10)
 - 19) K. Fukuhara, I. Nakanishi, W. Hakamata, K. Ohkubo, K. Miyazaki, S. Urano, N. Miyata, T. Ozawa, S. Fukuzumi, N. Ikota, H. Okuda, Planar Catechin Analogue as a New Type of Synthetic Antioxidant, 5th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, Kyoto, (2003, 10).
 - 20) I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, S. Urano, H. Okuda, T. Ozawa, S. Fukuzumi, K. Fukuhara, N. Ikota, Mechanisms of Radical-Scavenging Reactions of Antioxidative Polyphenolic Flavones, 5th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, Kyoto, (2003, 10).
 - 21) 福原 潔、奥田晴宏、がん予防を目的とした新型カテキン誘導体の開発、第62

- 回日本癌学会総会、名古屋、(2003,9)
- 22) 袴田 航、室井 誠、中村友里子。斎藤慎一、奥田晴宏、福原 潔、カテキンのコンフォメーション制御によるグルコシダーゼ阻害活性の増強、第 52 回日本応用糖質科学会、仙台、(2003,9)
- 23) 中西郁夫、福原 潔、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、伊古田暢夫、フラボノイド系抗酸化剤のラジカル消去反応における金属イオンの加速効果、第 13 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、千葉、(2003,6)
- 24) 福原 潔、中西郁夫、袴田 航、大久保 敬、島田知一、宮崎健太郎、浦野四郎、宮田直樹、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、奥田晴宏、平面型カテキン誘導体の合成と抗酸化作用、第 25 回日本フリーラジカル学会、東京、(2003,6)
- 25) 袴田 航、山本恵美子、福原 潔、望月正隆、奥田晴宏、酵素反応をトリガーとした活性酸素種発生化合物の開発、第 25 回日本フリーラジカル学会、東京、(2003,6)
- 26) 中西郁夫、大久保 敬、宮崎健太郎、袴田 航、浦野四郎、奥田晴宏、宮田直樹、上田順市、小澤俊彦、福住俊一、福原 潔、伊古田暢夫、フラボノイド系抗酸化剤のラジカル消去機構、第 25 回日本フリーラジカル学会、東京、(2003,6)
- 27) 福原 潔、中西郁夫、宮崎健太郎、袴田 航、大久保 敬、小澤俊彦、浦野四郎、福住俊一、伊古田暢夫、奥田晴宏、平面型カテキン誘導体の抗酸化機構の解析、第 10 回日本がん予防研究会、札幌、(2003,6)
- 28) 中西郁夫、福原 潔、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、伊古田暢夫、フラボノイド系抗酸化剤のラジカル消去反応における金属イオンの加速効果、第 13 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、千葉、(2003,6)

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：実験動物データのヒトへの外挿を目指した
基本手法の確立・プロテオーム解析への応用

分担研究者 鈴木 孝昌
国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

Affymetrix 社製 GeneChip を用いて、遺伝子傷害性物質およびグリタゾン系糖尿病治療薬にてヒト培養細胞およびマウスを処理した際の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。遺伝子傷害性物質に関する検討では、11種類の遺伝子傷害性物質、および4種の非遺伝子傷害性物質についてデータを取得し、特徴的な遺伝子発現変化に関して検討を行うと共に、メカニズムに基づいた化合物間の相関性に関して考察した。また、GeneChip データの信頼性に関して、変化の見られた数種の遺伝子を指標に定量的 RT-PCR 法にて確認を行った結果、両者の間に良い相関が得られた。グリタゾン系化合物をマウスに投与した際の発現解析では、PPAR γ リセプターへの作用と関連して、既知の変化を含め脂肪酸（糖）代謝に関わる遺伝子群に変化が見られたほか、MAP キナーゼパスウェイに關与する遺伝子にも変化が見られた。3種の薬剤の間では、反応に時間的な変化が見られたが、共通する変化も多かった。各化合物に特異的な変化もいくつか見られたことから、毒性の差を反映する指標となる可能性も示唆された。In vitro でのヒト初代培養肝細胞での結果との間の相関について調べたところ、比較的共通性は低かった。これが種差によるものか、vitro と vivo の差によるものかは今後さらに検討が必要である。現在、ヒトとマウスのデータの比較のために、Unigene のデータベースを利用してそれぞれのホモログを対応させるためのシステムを構築している。今後、得られたデータのデータベース化と共に、相互の相関性の可視化をはかりたい。

また、タンパク質発現の変化という観点からも検討を加え、遺伝子発現変化検討データとの比較を行うため、ジエチルニトロソアミン処理した肝臓でのタンパク質発現変化を2次元電気泳動を用いて解析を行い、発現の変化したスポットに関して、MALDI-TOF/TOF 型質量分析計を用いて、該当するタンパク質の同定を行った。現在、多次元液クロを用いてさらに高感度に網羅的解析を行うための実験系を開発中である。

A. 研究目的

遺伝子発現解析手法を用いて毒性の予測を行うトキシコジェノミクスは、従来のクラシカルな毒性試験にて予測できなかった臨床試験等における実際のヒトでの毒性の予測に大きく貢献することが期待されている。本研究班では、ヒトでの毒性を予測する系として、よりヒトに近い実験材料としてプライマリーヒト肝・腎細胞を用いて、*in vitro*における曝露による発現の変化を検討している。プライマリー細胞においては、ある程度の代謝酵素活性を維持するなど、通常の株化細胞に比べるとより生体内に近い状況で試験をすることが可能であるが、*in vitro*の実験であるが故の限界も有ると予想される。*In vitro*と*in vivo*における作用の違いを検討する上でも、*in vivo*での動物を使ったデータを蓄積し、両者を比較することは重要である。そこで、グリタゾン系糖尿病治療薬に関して、マウス個体を使って肝臓における遺伝子発現解析を行い、*in vitro*でのヒトプライマリー肝細胞を使った結果との比較を行った。これにより、ヒトとマウスの種差および*in vitro*と*in vivo*の比較に関して考察を行った。なお、発現の解析には、比較的信頼性の高いデータが得られるAffymetrix社製のGeneChipを使用した。また、遺伝子傷害性物質に関しては、昨年度にマウス個体を使った検討を行ったが、今年度は、*in vitro*の試験系として、ヒトリンパ腫細胞TK6を用いて、多くの遺伝子傷害性物質に関して網羅的に解析を行い、遺伝子傷害性に共通して起因する遺伝子発現変化を調べると共に、化合物ごとの作用機序に特徴的な遺伝子変化を検

索することを目的とした。

一方、遺伝子発現データの解釈の上で、直接の生体機能性分子であるタンパク質の発現変化をとらえることは、非常に重要である。遺伝子発現に関しては、既に各種のマイクロアレイを使った網羅的かつ簡便な解析法が確立されているが、タンパク質の発現に関しては、まだそれらと同等な解析技術は確立されていない。遺伝子発現データの解釈をさらに進める上でも、タンパク質の発現に関するデータをある程度網羅的に解析する手法を確立することが急務とされている。そこで、本研究では、2次元電気泳動や液体クロマトグラフィーと質量分析法を組み合わせた試験法、さらには多次元LCとタンデム型質量分析計を組み合わせた手法の開発により、ハイスループットなタンパク発現解析をめざす。今年度は、昨年度に行ったマウス肝臓のホモジネートより2次元電気泳動法により発現差の認められたタンパク質を分離し、MALDI-TOF/TOF型タンデム質量分析計によりペプチドフラグメントの解析を行い、タンパク質を同定した。

一方、クロマトフォーカシング法と逆送クロマトグラムによる2次元液体クロマトグラフィーによるタンパク質溶液の分離システムに関しても、検討を開始した。

B. 研究方法

1. 遺伝子発現変化の解析

- 1-1 マウスに対するグリタゾン系化合物の処理および肝臓と腎臓RNA試料の調製