

2013.07015A

201307015A

複数の作用メカニズムを同時に発現する 革新的抗がん剤の開発

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

H23 - 政策探索 - 一般 - 003

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表 椎名 勇

平成 26 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬探索研究事業）

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 椎名 勇

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発 椎名 勇	-----	1
II. 分担研究報告		
1. リダイフェンの大量合成法と抗腫瘍性活性評価に関する研究 中田健也	-----	7
2. 新規タモキシフェン類縁体 RID-G の細胞死誘導機構に関する研究 池北雅彦	--	10
3. 新規タモキシフェン類縁体 RID-G のリソソーム機能抑制に関する研究 吉見陽児	-	14
4. タモキシフェン類縁体リダイフェンの放射線防護効果に関する研究 森田明典	--	17
5. 抗がん剤リダイフェン-B の細胞死誘導機構に関する研究 長原礼宗	-----	25
6. がん細胞パネルによる新規物質の抗がん効果判定に関する研究 且 慎吾	-----	29
7. リダイフェンの細胞内作用解析に関する研究 水上民夫	-----	34
8. リダイフェン相互作用タンパク質同定解析に関する研究 長谷川 慎	-----	38
9. 抗C型肝炎ウイルス活性評価に関する研究 深澤秀輔	-----	42
10. フェージディスプレイ法によるリダイフェン B に関する研究 菅原二三男	-----	45
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	53

平成25年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (政策創薬探索研究事業))
総括研究報告書

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発

研究代表者：椎名 勇 (東京理科大学理学部教授)

研究要旨：本事業は5年間にわたる研究であり、東京理科大学椎名研究室が有する有機合成技術を活用して様々な「リダイフェン」類を供給し、これらの構造薬理活性相関の調査を通じて新薬のリード化合物を探索する計画である。さらに、薬理活性を発現した新規人工抗がん剤のビオチン化を順次行ない、これらを分子プローブとして会合タンパクの同定を行なうことによって生体内での隠された作用メカニズムを解明し、革新的な分子標的型治療法の開発を最終的な目標としている。研究体制として、類縁体の供給を担当する島根大学総合理工学部の中田健也は新しい「リダイフェン」類の合成に従事した。また、東京理科大学理工学部の池北雅彦は「リダイフェン」類の細胞死誘導機構に関する研究、吉見陽児は「リダイフェン」類のオートファジー誘導に関する研究を行った。さらに、共同研究者である徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部の森田明典は「リダイフェン」類の放射線防護効果に関する研究、東京電機大学理工学部の長原礼宗は「リダイフェン」類の細胞死誘導機構に関する研究、がん研究会がん化学療法センター分子薬理部の且 慎吾は「リダイフェン」類の抗がん効果判定に関する研究、長浜バイオ大学バイオサイエンス学部的水上民夫は「リダイフェン」類のプロテアソーム阻害活性評価に関する研究、長谷川 慎は「リダイフェン」類の相互作用タンパク質同定解析に関する研究、国立感染症研究所生物活性物質部の深澤秀輔は「リダイフェン」類の抗C型肝炎ウイルス活性評価に関する研究、東京理科大学理工学部の菅原二三男はフェージディスプレイ法を用いた「リダイフェン」類の結合タンパク同定に関する研究をそれぞれ行い、抗がん活性発現の機序を分子生物学的な側面から探究した。

研究分担者 (所属機関名及び職名)

1. 中田健也
(島根大学総合理工学部准教授)
2. 池北雅彦
(東京理科大学理工学部教授)
3. 吉見陽児
(東京理科大学理工学部助教)
4. 森田明典
(徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部准教授)

5. 長原礼宗
(東京電機大学理工学部准教授)
6. 且 慎吾
(がん研究会がん化学療法センター分子薬理部副部長)
7. 水上民夫
(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部教授)
8. 長谷川 慎
(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部准教授)
9. 深澤秀輔
(国立感染症研究所真菌部室長)

10. 菅原二三男

(東京理科大学理工学部教授)

A. 研究目的

天然ステロイド型ホルモンを模倣したオリゴアレーン化合物はエストロゲン拮抗剤 (SERMs) として働き、乳がんや骨粗鬆症の治療薬として注目を浴びている。ごく最近我々の研究室では複数の反応点を一挙に連結し、その位置ならびに立体選択性を制御する新手段を確立することで多種多様な化合物群を簡便に生産する手段を確立した。特に、我々が創案した「リダイフェン」類はエストロゲンレセプター (ER) の有無に関わらず抗腫瘍性を発現し、ER ネガティブ細胞のみならず ER ポジティブ細胞でもタモキシフェンよりも強い抗腫瘍活性を示すことが分かっている。本研究では、(1) 我々が有する独自の有機合成技術を活用して様々な「リダイフェン」類を供給し、(2) これらの構造薬理活性相関の調査を通じて新薬のリード化合物を探索する。さらに最近では分子細胞学的な研究を通じて、がん細胞のアポトーシスが促されるとともにがん種によってはオートファジーが誘起されることを解明している。以上の関連研究を背景とし、本申請は、東京理科大学が保有する基本技術を活用して、既知の機序に加え新規作用メカニズムを合わせ持つ革新的な抗がん剤を世に送り出し、世界中の多くのがん患者を救う目的で立案された企画である。ここでは新規薬剤の開発を行なうとともにその権利化を推進し、広範な市場と産業の開拓を図る。計画が成功裏に進めば、厚生労働行政の施策下で革新的な新薬

が開発されることとなり、世界的にみても強烈なインパクトを与える事業になると期待できる。

B. 研究方法

研究代表者である東京理科大学の椎名勇は3成分連結反応あるいは2成分カップリングを用いて多種多様な「リダイフェン」類の合成を行う。特に、本年度 (平成25年度) は「リダイフェン G」の新しい類縁体である完全対称型リダイフェン類 (「リダイフェン HG (RID-HG)」シリーズ) (第三世代リダイフェン) の調製に取り組み、芳香族アルデヒド、アリル型求核剤および芳香族求核剤を組み合わせ用いる3成分連結反応、あるいは芳香族化合物と炭素求核剤の2成分カップリングを用いてこれを実現する。また、入手した化合物の浮遊性がん細胞株を用いた抗腫瘍活性試験、39系統固形がん細胞を用いた抗腫瘍活性試験、エストロゲン非保有白血病細胞を用いた抗腫瘍活性試験、放射線防護効果試験、オートファジー活性試験、プロテアソーム阻害活性試験、抗 C 型肝炎ウイルス活性試験、抗がん剤候補化合物の細胞内標的分子の探索を並列して実施する。

(倫理面への配慮)

改変型タンパク質の作製に関しては、遺伝子組換え実験実施の申請を行ない、大学の当該委員会の承認を得ている。遺伝子組換え生物使用等の規制による生物多様性の確保に関わる法律に準じて研究を実施している。代謝ラベル化実験に関しては、RI施設の利用に必要な教育訓練を受講し、放射線業務従事者として登録を行なった。利

用に際しては放射線取扱に関わる法令を遵守して研究を実施している。

C. 研究結果

本年度（平成25年度）は当初の予定通り研究が進展し、「リダイフェン G」の新しい類縁体である完全対称型リダイフェン類（「リダイフェン HG (RID-HG)」シリーズ）を大量に製造することに成功した。本合成研究では芳香族アルデヒド、アリル型求核剤および芳香族求核剤を組み合わせ用いる3成分連結反応、あるいは芳香族化合物と炭素求核剤の2成分カップリングを活用した。また、「リダイフェン HG」に加え、天然ステロイドの構造により近い「R-COP型リダイフェン」シリーズの創製を図ったところ、効率的な閉環反応の開発により様々な類縁化合物を得る手法を確立することが出来た。さらに、合成検討と同時に（a）浮遊性がん細胞活性試験、（b）固形がん細胞活性試験、（c）白血病細胞活性試験、（d）結合タンパクの解明を進め作用メカニズムの解明に繋がる様々な検討を実施した。

学術論文上での報告としては、*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**, 311-320 (2013)にてリダイフェン B が結合するタンパク質が GIGYF2 (GYF プロテイン 2 に作用する Grb10 タンパク質) であることを示し、次いで、*Journal of Medicinal Chemistry*, **56**, 150-159 (2013)において新型リダイフェン R-COP シリーズ、*Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 1017-1023 (2013)において構造改変型リダイフェンである RID-SB8 および RID-SG24 の抗腫瘍性を報

告した。また、*Biochemical Pharmacology*, **86**, 1272-1284 (2013)では RID-SB8 のアポトーシス誘導メカニズムを明らかとし、*Biochemical and Biophysical Research Communications*, **435**, 657-663 (2013)においては ER (エストロゲンレセプター) を含まないがん種における RID-B のオートファジー誘導能を発見した経緯について述べた。さらにごく最近の成果として *Eur. J. Med. Chem.*, **71**, 290-305 (2014)では、リダイフェン F および RID-SF 類のプロテアソーム阻害活性能について調べた。

D. 考察

これまでの検討結果より従来最も活性の高かったリダイフェン B を越える作用を示す分子を発見することができたので平成25年4月30日に PCT 特許出願を実施し当該化合物およびその製造法の権利の強化を図った。また最近になって抗腫瘍性発現の鍵となる作用メカニズムの解明に関し飛躍的な進展が見られた。すなわち、リダイフェン B が結合するタンパク質が GIGYF2 (GYF プロテイン 2 に作用する Grb10 タンパク質) であることが分かり、アミノ酸配列の 745-1030 残基部分との間で複合体が形成されることを突き止めた。この上流の作用が最終的に PI3K/Akt シグナル系に影響を与え、リン酸化を阻害することでがん細胞のアポトーシスを誘導していると考えられる。この研究は平成24年10月16日に米国特許仮出願を実施し、さらに学術論文として *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**, 311-320 (2013)にて報告した。一方、*Journal of Medicinal Chemistry*, **56**,

150-159 (2013)においては新型リダイフェン R-COP シリーズ、*Biochemical Pharmacology*, **86**, 1272-1284 (2013)ではRID-SB8のアポトーシス誘導メカニズムを明らかとした。特筆すべき事項として、*Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 1017-1023 (2013)においてRID-SB8およびRID-SG24の抗腫瘍性を報告したところ、これが日本薬学会より注目の論文として選定され、リダイフェン類が既存抗がん剤よりも強い効果を発揮し、特異なメカニズムを有する新たな治療薬となる可能性が示されたものとして、その科学・医療分野への貢献度が高く評価された。

E. 結論

今回我々は新規3成分連結反応、あるいは2成分カップリングによって「リダイフェン G」の新しい類縁体である完全対称型リダイフェン類（「リダイフェン HG (RID-HG)」シリーズ）の調製に成功し、これらを大量に供給する手段を確立した。本研究の内、研究代表者である椎名 勇と島根大学総合理工学部の中田健也は新しい「リダイフェン」類の合成に従事した。一方、入手した化合物の浮遊性ががん細胞株を用いた抗腫瘍活性試験、39 系統固形がん細胞を用いた抗腫瘍活性試験、およびエストロゲン非保有白血病細胞を用いた抗腫瘍活性試験を実施した。さらに作用メカニズムの解明に向け、共同研究者である東京理科大学理工学部の池北雅彦は「リダイフェン」類の細胞死誘導機構に関する研究、吉見陽児は「リダイフェン」類のオートファジー誘導に関する研究を行った。また、徳

島大学ヘルスバイオサイエンス研究部の森田明典は「リダイフェン」類の放射線防護効果作用に関する研究、東京電機大学理工学部の長原礼宗は「リダイフェン」類の細胞死誘導機構に関する研究、がん研究会がん化学療法センター分子薬理部の旦 慎吾は「リダイフェン」類の抗がん効果判定に関する研究、長浜バイオ大学バイオサイエンス学部の水上民夫は「リダイフェン」類のプロテアソーム阻害活性評価に関する研究、長谷川 慎は「リダイフェン」類の相互作用タンパク質同定解析に関する研究、国立感染症研究所生物活性物質部の深澤秀輔は「リダイフェン」類の抗C型肝炎ウイルス活性評価に関する研究、さらに東京理科大学理工学部の菅原二三男はフェージディスプレイ法を用いた「リダイフェン」類の結合タンパク同定に関する研究をそれぞれ行い、抗がん活性発現の機序を分子生物学的な側面から探究した。以上の共同研究の詳細は、各々の分担研究報告書に詳細が記述されているので参照されたい。

F. 健康危険情報

現状では本研究を遂行するにあたって健康上の危険は見当たらず、また共同研究者からも健康危険情報は特に入っていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Senko Tsukuda, Tomoe Kusayanagi, Eri Umeda, Chihiro Watanabe, Yu-ta Tosaki, Shinji Kamisuki, Toshifumi Takeuchi, Yoichi Takakusagi, Isamu Shiina, Fumio Sugawara, Ridaiifen B, a Tamoxifen Derivative, Directly

- Binds to Grb10 Interacting GYF Protein 2, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**, 311-320 (2013).
- (2) Isamu Shiina, Yuma Umezaki, Yoshimi Ohashi, Yuta Yamazaki, Shingo Dan, Takao Yamori, Total Synthesis of AMF-26, an Antitumor Agent for Inhibition of the Golgi System, Targeting ADP-Ribosylation Factor 1, *Journal of Medicinal Chemistry*, **56**, 150-159 (2013).
- (3) Yukitoshi Nagahara, Midori Takeyoshi, Seiya Sakemoto, Isamu Shiina, Kenya Nakata, Keiko Fujimori, Yanwen Wang, Eri Umeda, Chihiro Watanabe, Shoko Uetake, Takao Yamori, Shingo Dan, Yoji Yoshimi, Takahisa Shinomiya, Masahiko Ikekita, Novel Tamoxifen Derivative Ridaifen-B Induces Bcl-2 Independent Autophagy without Estrogen Receptor Involvement, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **435**, 657-663 (2013).
- (4) Wen-zhi Guo, Yanwen Wang, Eri Umeda, Isamu Shiina, Shingo Dan, Takao Yamori, Search for Novel Anti-tumor Agents from Ridaifens Using JFCR39, a Panel of Human Cancer Cell Lines, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 1008-1016 (2013).
- (5) Wen-zhi Guo, Isamu Shiina, Yanwen Wang, Eri Umeda, Chihiro Watanabe, Shoko Uetake, Yoshimi Ohashi, Takao Yamori, Shingo Dan, Ridaifen-SB8, a Novel Tamoxifen Derivative, Induces Apoptosis via Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling Pathway, *Biochemical Pharmacology*, **86**, 1272-1284 (2013).
- (6) Makoto Hasegawa, Yukari Yasuda, Makoto Tanaka, Kenya Nakata, Eri Umeda, Yanwen Wang, Chihiro Watanabe, Shoko Uetake, Tatsuki Kunoh, Masafumi Shionyu, Ryuzo Sasaki, Isamu Shiina, Tamio Mizukami, A Novel Tamoxifen Derivative, Ridaifen-F, Is a Nonpeptidic Small-molecule Proteasome Inhibitor, *Eur. J. Med. Chem.*, **71**, 290-305 (2014).
- (7) Isamu Shiina, Asymmetric Mukaiyama Aldol Reactions Using Chiral Diamine-Coordinated Sn(II) Triflate: Development and Application to Natural Product Synthesis, *The Chemical Record*, **14**, 144-183 (2014).
- (8) Isamu Shiina, An Adventurous Synthetic Journey with MNBA from Its Reaction Chemistry to the Total Synthesis of Natural Products, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **87**, 196-233 (2014).
- ## 2. 学会発表
- (1) 池田健太郎・紙透伸治・草柳友恵・九十田千子・椎名 勇・菅原二三男；T7 フェージディスプレイ法によるリダイフェン G 標的タンパク質の探索 (PA-030)；日本ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会；東京医科歯科大学 湯島キャンパス (2013 年 6 月 19 日)
- (2) 長谷川 慎・田中 誠・安田ゆかり・塩生真史・佐々木隆造・水上民夫・中田健也・梅田絵梨・王 エンブン・渡邊千尋・植竹祥子・椎名 勇；新規タモキシフェン誘導体リダイフェン-Fに見出されたプロテアソーム阻害作用の構造活性相関研究 (PB-004)；日本ケミカルバイオロジー学

会第8回年会；東京医科歯科大学 湯島キャンパス（2013年6月19日）

(3) 酒本聖也・長原礼宗・梅田絵梨・渡邊千尋・植竹祥子・吉見陽児・四宮貴久・池北雅彦・椎名 勇；新規タモキシフェン類縁体リダイフェン-Bによるオートファジー誘導とBcl-2の関係（3P-284）；第86回日本生化学会大会；パシフィコ横浜（2013年9月11日）

(4) 林 もゆる・須田佳弥子・比留間啓太・金田容子・椎名 勇・下仲基之；新規タモキシフェン類縁体，リダイフェン-B，による肝がん細胞増殖抑制作用の機構の解明（3P-380）；第86回日本生化学会大会；パシフィコ横浜（2013年9月11日）

(5) 椎名 勇；抗腫瘍活性化合物リダイフェン-合成・創薬展開からメカニズム解析まで；BioJapan 2013 World Business Forum；パシフィコ横浜（2013年10月9日）

(6) 渡邊千尋・植竹 祥子・水澤 彰人・椎名 勇；2,2,3-trimethyl-2-silapent-4-eneを求核剤として用いる三成分連結反応および二重結合異性化反応による抗腫瘍性化合物の短工程合成；日本化学会第94春季年会；名古屋大学 東山キャンパス（2014年3月27日）

(7) 池田健太郎、紙透伸治、草柳友恵、九十田千子、渡邊千尋、植竹祥子、椎名勇、菅原二三男；T7 フェージディスプレイ法によるリダイフェン G 標的タンパク質の探索；日本農芸化学会 2014 年度（平成 26 年度）大会；明治大学 駿河台キャンパス（2014年3月29日）

H. 知的財産の出願・登録状況

（予定も含む。）

1. 特許取得

(1) 産業財産権の名称：新規化合物及びその製造方法並びに抗がん剤

発明者：東京理科大 椎名勇／がん研究会 矢守隆夫

権利者：東京理科大学(70%)、がん研究会(30%)

産業財産権の種類、番号：PCT/JP2013/060487

出願年月日：2013年4月5日

国内・国外の別：国外

(2) 産業財産権の名称：新規化合物及びその製造方法並びに抗がん剤

発明者：東京理科大 椎名勇、中田健也／東京電機大学 長原礼宗／がん研究会 矢守隆夫

権利者：東京理科大学(50%)、東京電機大学(30%)、がん研究会(20%)

産業財産権の種類、番号：PCT/JP2013/062667

出願年月日：2013年4月30日

国内・国外の別：国外

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成25年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業(政策創薬探索研究事業))
分担研究報告書

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発
研究代表者：椎名 勇 (東京理科大学理学部教授)

分担研究課題名：リダイフェンの大量合成法と抗腫瘍性活性評価に関する研究
研究分担者：中田健也 (島根大学大学院総合理工学研究科准教授)

研究要旨

乳がん治療薬であるタモキシフェンは抗エストロゲン作用により乳がん細胞の異常増幅を阻害する有効な第一候補薬剤として世界的に広く使用されている。しかし、タモキシフェンには幾何異性体が存在し、実際に薬剤として用いられているのは(Z)体のみである。そのため幾何異性体の分離が合成上の課題となっていた。一方、これまでに本研究者らは異性体の存在しない疑似対称型タモキシフェン、すなわちリダイフェン (RID-X) を設計合成し、その薬理活性試験を行ったところ、これらは(Z)-タモキシフェンよりも強い抗腫瘍活性を示すことを明らかとした。今回、従来の疑似対称型トリアリール型分子に加えて完全対称型ジアリール型リダイフェン類縁体を調製し、それらの抗腫瘍性能を Jurkat 細胞に対する増殖阻害活性について評価した。その結果、二重結合部位のアルキル鎖の炭素数による構造活性相関を体系的に明らかとするとともに、いくつかのリダイフェンでは(Z)-タモキシフェンよりも強い増殖阻害活性を示すことがわかった。さらに、これらは既存の SERMs とは異なる新規作用メカニズムを発現している可能性が示唆された。

A. 研究目的

(Z)-タモキシフェンは選択的エストロゲン受容体調整剤(SERMs)の一つであり、抗エストロゲン作用により乳がん細胞の異常増幅を阻害する第一選択薬として広く利用され、現在この構造を改良した SERM 関連化合物が世界的に汎用されるに至っている。しかし、タモキシフェンには幾何異性体が存在し、異性体の分離が製造上の課題となっている。このような背景のもと、本研究者らは独自に開発した多成分連結反応を用いるタモキシフェンの短工程合成法を明らかとしており、より高活性で合成上有利な疑似対称型リダイフェンの調製法の開発に

取り組んでいる。今回、従来の疑似対称型トリアリール型分子に加えて、二重結合部位のアルキル鎖の炭素数が異なる種々の完全対称型ジアリール型リダイフェン誘導体 (RID-X) を合成し、その抗腫瘍性能を Jurkat 細胞に対する増殖阻害活性について評価し、二重結合部位のアルキル鎖の炭素数の違いによる構造活性相関を体系的に明らかとすることで新規な抗がん剤の創出を目的とした。

B. 研究方法

近年、本研究者らはルイス酸触媒の存在下で、芳香族アルデヒド、アリルトリメチルシラン、ならびに芳香族求核剤の三種の

化合物を連続的に反応させる三成分連結反応を開発し、この手法を用いてタモキシフェンの短工程調製法を確立している。本課題ではアリル型シリル反応剤としてホモクロチルシランを適用し、得られた成績体に塩基を作用させて二重結合の転移を行い、基本骨格である 4,4-ジアリール-1-ブテンを構築した後、アミノ基側鎖を導入して、完全対称型タモキシフェン類を調製した。また別法として、4,4-ジヒドロキシベンゾフェノンと対称ケトンとの向山カップリング反応により同様の基本骨格の構築を行った。さらに、その構造活性相関を調査することで特徴ある抗腫瘍活性化合物の創製を図った。

(倫理面への配慮)

本研究者は有機合成化学を基盤として目的化合物の設計、合成を主な研究分担としているため該当しない。

C. 研究結果

上記手法を用いてアルキル基の炭素数を 3~12 まで変化させて反応を行ったところ、いずれも良好な収率で目的物を得ることができた。これらの分子を鍵中間体として、実験計画に従い側鎖を導入して完全対称型タモキシフェン類を高収率で調製した。次いで、本研究協力者らによってこれらを用いた Jurkat 細胞に対する増殖阻害活性の評価が実施されたところ、炭素数が 1 の場合は顕著な細胞傷害性を示さないが、炭素数 2~5 のときは強い細胞傷害性が観察された。しかし、炭素数が 6 以上になると、徐々に細胞傷害性が低下することが明らかとなった。いくつかのリダイフェンでは(Z)-タモキシフェンよりも強い増殖阻害活性を示すこ

とがわかり、炭素数が 2~5 の完全対称型リダイフェンでは、RID-B と同程度の細胞傷害性を有することがわかった。さらに、既存の SERMs とは異なる新規作用メカニズムを発現している可能性が示唆された。

D. 考察

薬理活性試験の結果から、本実験計画で創製した完全対称型ジアリール四置換オレフィン類の構造活性相関を明らかとすることができた。したがって、さらに異なる側鎖を導入し構造変換を施すことにより、より綿密な構造活性相関研究へと展開されることが期待できる。

E. 結論

本研究者らが見いだした三成分連結反応にホモクロチルシランを反応剤として適用することで、完全対称型タモキシフェン誘導体の迅速合成反応が可能となり、これにより新規 SERM 類の簡便な合成設計が実現できた。また、異なる手法として 4,4-ジヒドロキシベンゾフェノンと対称ケトンとの向山カップリング反応も応用できることを明らかとした。調製した化合物の抗腫瘍活性評価より二重結合部位のアルキル鎖の長さによる構造活性相関を解明することに成功し、新規な作用機序の発現が見いだされた。この方法により微細構造の異なる種々の疑似ホルモン剤が短工程で得られるため、多彩な乳がん治療薬の調製が容易に行えるものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Novel tamoxifen derivative Ridaifen-B induces Bcl-2 independent autophagy without estrogen receptor involvement; Y.

Nagahara, M. Takeyoshi, S. Sakemoto, I. Shiina, K. Nakata, K. Fujimori, Y. Wang, E. Umeda, C. Watanabe, S. Uetake, T. Yamori, S. Dan, Y. Yoshimi, T. Shiomiya, M. Ikekita; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013, 435, 657–663.

(2) A novel tamoxifen derivatives, ridaifen-F, is a nonpeptidic small-molecular inhibitor; M. Hasegawa, Y. Yasuda, M. Tanaka, K. Nakata, E. Umeda, Y. Wang, C. Watanabe, S. Uetake, T. Kunoh, M. Shionyu, R. Sasaki, I. Shiina, T. Mizukami; *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014, 70, 290–305.

2. 学会発表

(1) 酒本聖也・岩澤卓弥・渡邊千尋・植竹祥子・中田健也・椎名 勇・長原礼宗；新規タモキシフェン類縁体リダイフェン-Bは標準的なオートファジーを誘導する (30Z-am 02)；第 134 年会日本薬学会，熊本 (2014 年 3 月)

(2) 岩澤卓弥・酒本聖也・渡邊千尋・植竹祥子・中田健也・椎名 勇・長原礼宗；新規抗癌剤のリソソーム形成能解析 (30Z-am 03)；第 134 年会日本薬学会，熊本 (2014 年 3 月)

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

平成25年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業(政策創薬探索研究事業))
分担研究報告書

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発
研究代表者：椎名 勇(東京理科大学理学部教授)

分担研究課題名：新規タモキシフェン類縁体 RID-G の細胞死誘導機構に関する研究
研究分担者：池北雅彦(東京理科大学工学部教授)

研究要旨

新規に合成されたタモキシフェン類縁体のうち、特に RID-G と命名された化合物に見出された強い細胞死誘導の分子機構の解明は新しい抗がん剤の開発のブレイクスルーとなると期待される。本研究では RID-G による細胞死の作用メカニズムに関する手がかりを集める目的で RID-G による核の断片化、AIF の核移行、ROS の産生ならびに細胞内カルシウムの流入について解析を行った。RID-G が誘導する細胞死は核の断片化、AIF の核移行がおこらないアポトーシスとは異なる細胞死であることが再確認されたほか、RID-G が細胞内へのカルシウムの流入を引き起こすことが新たに明らかとなった。

A. 研究目的

新規に合成されたタモキシフェン類縁体のうち、特に RID-G と命名された化合物に強い細胞死誘導活性が見出された。RID-G による細胞死誘導は、1)ミトコンドリアの膜電位を低下させるが、2)カスパーゼの阻害剤により抑制されない、3)抗アポトーシス分子 Bcl-2 の過剰発現によっても抑制されないという既知の作用機序とは異なる興味深い特徴を示す。そのため RID-G の細胞死誘導の分子機構の解明は新しい抗がん剤の開発に寄与するものと期待される。本研究では RID-G による細胞死がアポトーシスの特徴をどの程度有するのか核の断片化および AIF (Apoptosis Inducing Factor) の核移行について追求するとともに、その細胞死の作用メカニズムに関する新たな手がかりを集める目的で RID-G による細胞内

ROS の産生ならびに細胞内カルシウムの流入の二つの指標についての解析を行った。

B. 研究方法

核の断片化は RID-G 処理をした U937 細胞を DAPI 染色し蛍光顕微鏡を用いて核の断片化を観察し RID-G 処理をしていない細胞およびアポトーシスを誘導した細胞と比較した。AIF の核移行は細胞分画により分画した核、細胞質、ミトコンドリアの各画分中の AIF 量をウエスタンブロットを用い RID-G 処理前後で比較した。細胞内 ROS の産生と細胞内へのカルシウムの流入は ROS と反応して蛍光を発する蛍光プローブおよびカルシウムと反応すると蛍光を発するインジケータを用い、RID-G 処理前後のそれぞれの蛍光量を FACS で解析することにより行った。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたって、相手方の同意・協力を必要とする研究、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究、生命倫理・安全対策に対する取り組みを必要とする研究など法令等に基づく手続きが必要な研究は含まれない。また、改変型タンパク質の作製に関しては、遺伝子組換え実験実施の申請を行ない、大学の当該委員会の承認を得て、遺伝子組換え生物使用等の規制による生物多様性の確保に関わる法律に準じて研究を実施した。

C. 研究結果

RID-G が誘導する U937 細胞の細胞死では核の断片化はアクチノマイシンによって誘導されるアポトーシスで見られる核の断片化の 1/6 以下の頻度でしかおこらないこと、AIF の核への移行がおこらないことが明らかとなった。これにより RID-G による細胞死はアポトーシスとは異なる細胞死であることが再確認された。RID-G による細胞内 ROS の産生はほとんど観察されなかった。一方で RID-G は濃度依存的に細胞内カルシウム量を増加させることが認められた。これにより RID-G が細胞内へのカルシウムの流入を引き起こすことが新たに明らかとなった。なお、細胞死誘導能が低い RID-D ではカルシウムの流入は観察されなかった。

D. 考察

RID-G によって誘導される細胞死は典型的なアポトーシスとは異なることが再確認された。しかしながら、アポトーシスの比較的初期段階でおこる反応は RID-G による細胞死でも共通して誘導されている可能性は否定できない。細胞質におけるカルシ

ウム濃度の増加は小胞体などの細胞内カルシウムプールからの細胞質への放出あるいは細胞外からの流入に起因すると考えられる。今回、RID-G による細胞内カルシウム濃度の増加が細胞をカルシウムを含まない溶液中においた場合では見られない現象であったことから、カルシウムは細胞外から流入している可能性が高いと考えられる。カルシウム流入がイオンチャネルを介するものであるのか、あるいは細胞膜の不全によるものなのか追求することで、RID-G の作用メカニズムの解明の更なる手がかりが得られると考えられる。

E. 結論

これまで得られてきた知見を総合すると、RID-G が誘導する細胞死において観察される現象のうちアポトーシスにも認められるものは、1)ミトコンドリアの膜電位の低下ならびに、2)アネキシン V の露出の 2 点である。カスパーゼの活性化および核の崩壊に関しては RID-G では観察されないことが改めて確認された。また、RID-G により細胞内カルシウムが増加することが新たに確認されたが、そのメカニズムと細胞死との関連について詳細な解析が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

A Novel Tamoxifen Derivative Ridaifen-G is a Lysosomotropic Agent which Accumulates in Lysosomes and Inhibits the Lysosomal Proteolytic Activity in HeLa Cells (執筆中) 2. 学会発表

○第 36 回日本分子生物学会年会
山本卓, 吉見陽児, 四宮貴久, 羽鳥麻奈美, 長原礼宗, 植竹祥子, 渡邊千尋, 椎名勇, 中

田一弥, 池北雅彦「新規細胞死誘導剤リダイフェン-G のリソソームへの局在と機能阻害の検出」

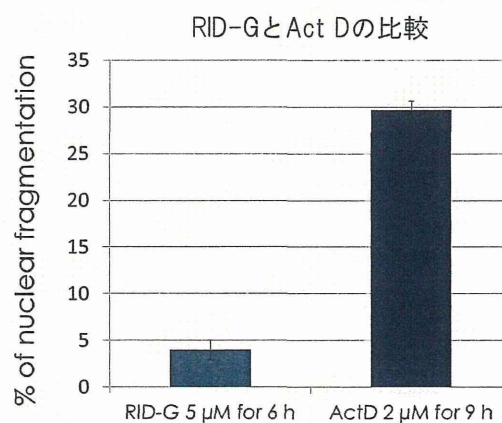
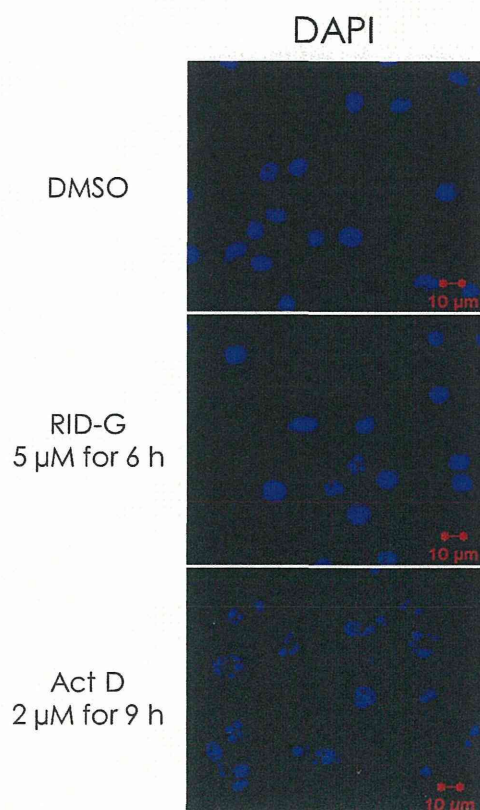
○第 36 回日本分子生物学会年会
友光裕子, 吉見陽児, 四宮貴久, 羽鳥麻奈美, 渡邊千尋, 植竹祥子, 椎名勇, 中田一弥, 池北雅彦「RID-G による細胞死誘導とミトコンドリアの関連」

○第 36 回日本分子生物学会年会
森田学, 羽鳥真奈美, 吉見陽児, 四宮貴久, 渡邊千尋, 植竹祥子, 椎名勇, 中田一弥, 池北雅彦「新規細胞死誘導剤 Ridafen - G の細胞死誘導メカニズムの解析」

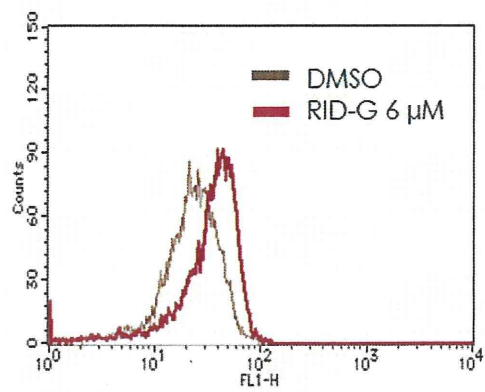
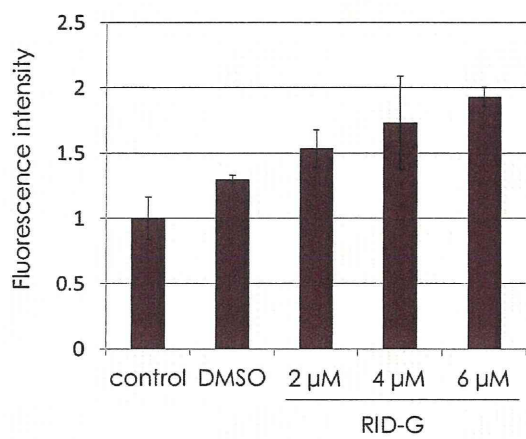
H. 知的財産の出願・登録状況
(予定も含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

Figures



細胞内Ca²⁺の測定



平成25年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業(政策創薬探索研究事業))
分担研究報告書

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発

研究代表者：椎名 勇(東京理科大学理学部教授)

分担研究課題名：新規タモキシフェン類縁体 RID-G のリソソーム機能抑制に関する研究

研究分担者：吉見陽児(東京理科大学理工学部助教)

研究要旨

新規に合成されたタモキシフェン類縁体のうち、特に RID-G と命名された化合物に見出された強い細胞死誘導の分子機構の解明は新しい抗がん剤の開発のブレイクスルーとなると期待される。本研究では RID-G による細胞死を特に細胞内小器官の関与という切り口で解析を行い、RID-G がリソソームに蓄積すること、およびオートファジーを誘導する可能性を示してきた。ここでは蓄積した RID-G がリソソーム機能に与える影響について解析を行うとともに、RID-G のオートファジー誘導能について再検討を与えた。解析の結果、リソソームに蓄積した RID-G はリソソームの pH を変化させることでリソソーム内の酵素の活性を抑制すること、およびリソソームでの分解が滞ることによりオートファジー関連マーカートンパク質量が相対的に上昇することが明らかとなった。本研究により RID-G は強力な Lysosomotropic agent であり、リソソーム酵素の抑制剤となることが示された。

A. 研究目的

新規に合成されたタモキシフェン類縁体のうち、特に RID-G と命名された化合物に強い細胞死誘導活性が見出された。RID-G による細胞死誘導は、1)ミトコンドリアの膜電位を低下させるが、2)カスパーゼの阻害剤により抑制されない、3)抗アポトーシス分子 Bcl-2 の過剰発現によっても抑制されないという既知の作用機序とは異なる興味深い特徴を示す。そのため RID-G の細胞死誘導の分子機構の解明は新しい抗がん剤の開発に寄与するものと期待される。その後の研究により細胞内に取り込まれた RID-G はリソソームに蓄積しオートファジー関連マーカートンパク質の増加を促すこ

とが明らかとなり、RID-G の作用点をしてリソソームが有力な候補として浮上した。本研究では RID-G による細胞死を典型的なアポトーシス(Type I 細胞死)とは異なる細胞死が誘導されていると考えられることから、RID-G によりオートファジーと伴う細胞死(Type II 細胞死)が惹起されている可能性についてより詳細に調査を行うこととした。

B. 研究方法

細胞内酸性小胞を染色する pH 依存性蛍光色素をプローブとし、HeLa 細胞に RID-G を作用させた後の蛍光取り込み量を FACS を用いて測定することによりリソソームの pH 変化を間接的に解析した。さら

に、リソソームプロテアーゼにより分解されると蛍光を発する色素を RID-G のある場合とない場合とでそれぞれ細胞に作用させ蛍光値を比較することで、リソソームプロテアーゼの活性変化を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたって、相手方の同意・協力を必要とする研究、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究、生命倫理・安全対策に対する取り組みを必要とする研究など法令等に基づく手続きが必要な研究は含まれない。また、改変型タンパク質の作製に関しては、遺伝子組換え実験実施の申請を行ない、大学の当該委員会の承認を得て、遺伝子組換え生物使用等の規制による生物多様性の確保に関わる法律に準じて研究を実施した。

C. 研究結果

RID-G はリソソームの pH を中性化する Bafilomycin より強力に pH 感受性色素のリソソームへの集積を抑制し、有効にリソソーム内部の pH を中性化した。また同時に、リソソーム酵素の活性も 1 μM で抑制されはじめ、3 μM では完全に抑制された。なお、リソソームプロテアーゼに RID-G を直接作用させても活性は阻害されないことを確認している。一方で、RID-G によるオートファジー関連タンパク質の増加はオートファジーの阻害剤との併用では阻害できなかった。

D. 考察

これまでの経緯から RID-G にオートファジー誘導能があることが示唆されていたが、オートファジー誘導のほかに、リソソームの機能阻害によっても結果の説明が

く。今回得られた結果を総合的に考慮すると、(1)オートファジーの阻害剤によって RID-G の効果が阻害されないこと、(2)RID-G がリソソームの pH を中性化することで間接的にリソソームプロテアーゼの活性を抑制していること、から RID-G によって引き起こされているのは、オートファジーの誘導促進ではなくリソソーム機能の阻害である可能性が高いと考えられる。

E. 結論

弱塩基物質である RID-G は Lysosomotropic agent としてリソソームに取り込まれ、リソソームの pH を上昇させることでリソソームのプロテアーゼの活性を抑制していることが示唆された。これにより本来リソソームで分解されるオートファジー関連タンパク質の分解も抑制されこれらタンパク質量が相対的に増加することから、見かけ上オートファジーが促進されるように観察されるものと思われる。今後はリソソーム酵素の阻害が細胞死とどのように関連しているのかを明らかにすることが重要課題となると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

A Novel Tamoxifen Derivative Ridafen-G is a Lysosomotropic Agent which Accumulates in Lysosomes and Inhibits the Lysosomal Proteolytic Activity in HeLa Cells (執筆中)

2. 学会発表

○第 36 回日本分子生物学会年会
山本卓, 吉見陽児, 四宮貴久, 羽鳥麻奈美, 長原礼宗, 植竹祥子, 渡邊千尋, 椎名勇, 中田一弥, 池北雅彦「新規細胞死誘導剤リダifen-G のリソソームへの局在と機能

阻害の検出」

○第 36 回日本分子生物学会年会

友光裕子, 吉見陽児, 四宮貴久, 羽鳥麻奈美, 渡邊千尋, 植竹祥子, 椎名勇, 中田一弥, 池北雅彦「RID-G による細胞死誘導とミトコンドリアの関連」

○第 36 回日本分子生物学会年会

森田学, 羽鳥真奈美, 吉見陽児, 四宮貴久, 渡邊千尋, 植竹祥子, 椎名勇, 中田一弥, 池北雅彦「新規細胞死誘導剤 Ridaifen - G の細胞死誘導メカニズムの解析」

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

Figures

