

論文の内容の要旨

論文題目 新規骨格を有する選択的エストロゲン受容体モジュレーター
—カルボランの疎水性ファーマコフォアとしての応用—

氏 名 吉見 友弘

カルボラン (dicarba-*closo*-dodecaborane) は炭素原子 2 個、ホウ素原子 10 個からなる二十面体クラスター構造を有し、26 個の骨格電子の非局在化により水素化ホウ素化合物としては例外的な熱的、化学的安定性を示す (Fig. 1)。また、カルボラン環上には位置選択的に様々な置換基を導入することができるため、多彩な分子設計が可能である。医薬化学の分野では、カルボランの安定性と高いホウ素含量を利用して、癌の中性子捕捉療法への応用が検討されているが、我々はその高い疎水性と球状の形状に着目して、核内受容体リガンドをはじめとする生物活性物質の疎水性ファーマコフォアとしての応用を行ってきた。なかでもエストロゲンにおいては、内因性リガンドである 17 β -estradiol (E2) を上回る高活性を持つアゴニスト **BE120** を既に見出している (Fig. 2)。

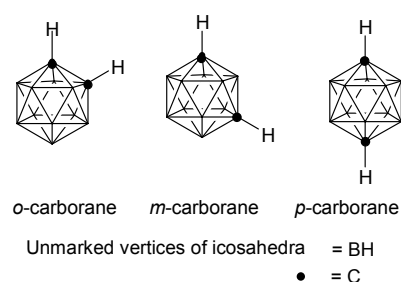


Fig. 1 Dicarba-*closo*-dodecaboranes

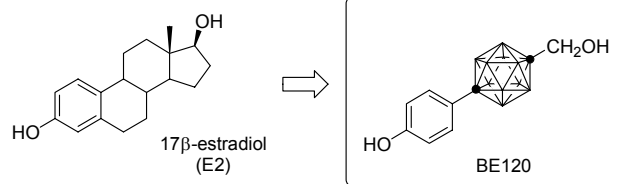


Fig. 2 Potent Estrogen Agonist Bearing Carborane

しかし、エストロゲンの医薬としての応用を考えた場合、アゴニストは骨粗鬆症等の治療薬としての可能性を持つが、同時にホルモン依存性の乳がんや子宮がんのリスクを高めるという欠点を持っている。そのため、エストロゲンの持つ骨、生殖器等に対する多様な作用を分離し、組織選択的に活性を発現する化合物が求められており、このような特性をもつエストロゲン受容体 (ER) リガンドは、選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) と呼ばれている。そこで私は、アゴニストでみられたカルボランの ER への高い親和性を利用して、従来の化合物とは活性挙動、体内動態の異なる選択的 ER リガンドの創製を目的に、新規カルボラン含有 ER リガンドの設計と合成を行い、その活性について検討した。

カルボラン含有 ER リガンドのデザイン

組織選択性を示す代表的な ER リガンドとしてはタモキシフェンやラロキシフェンが知られている。これらの化合物は、*in vitro* の系でエストロゲンアンタゴニストとして見出された

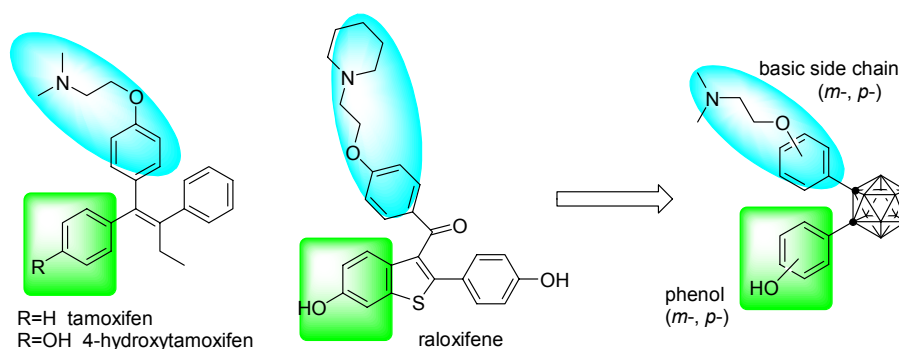


Fig. 3 Design of Selective Estrogen Receptor Modulators Bearing Carborane

ものだが、*in vivo* では骨などに対してアゴニスト、乳腺組織などに対してアンタゴニストというように選択的な作用を示す。タモキシフェンやラロキシフェンに共通した構造上の特徴としては、ステロイド骨格に相当する疎水性領域をはさんで、適切な方向にフェノール環と長い塩基性側鎖部分をもつことが挙げられる。フェノール性水酸基は ER との水素結合形成に必須であり、塩基性側鎖は ER-リガンド複合体の構造変化をアンタゴニスト活性発現の方向に導くものと考えられている。そこで、これらの構造要素をもとに疎水性領域をカルボランに置き換え、水素結合性官能基が適切な配置となるように分子設計を行った (Fig. 3)。

生物活性評価

化合物の生物活性は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによってエストロゲン受容体 α (ER α) 依存的な転写活性化能を調べることにより評価した。はじめに、フェノール性水酸基及び塩基性側鎖の置換位置を固定し、カルボラン骨格を *o*-、*m*-カルボランと変化させたところ、Fig. 4 に示す化合物の中で *o*-カルボラン骨格を持つ **BE362** がより強いアンタゴニスト活性を示した。

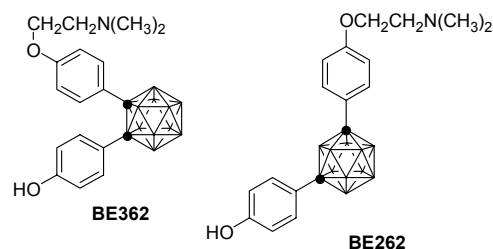


Fig. 4

化合物の中で *o*-カルボラン骨格を持つ **BE362** がより強いアンタゴニスト活性を示した。4-ヒドロキシタモキシフェンとヒト ER α リガンド結合領域との複合体の X 線結晶構造解析を基にしたドッキングシミュレーションを行ったところ、**BE362** の方が受容体のキャビティーにフィットしており、*o*-カルボラン誘導体の方が ER-リガンド複合体のアンタゴニストコンフォメーション形成に適切な構造をとっていると考えられた。そこで次に、カルボラン骨格を高い活性が見られた *o*-カルボランに固定し、フェノール性水酸基及び塩基性側鎖の置換位置、塩基性側鎖の構造を変化させた一連の化合物を合成し、構造の最適化を図った。

ヒト乳癌由来細胞 MCF-7 を用いた転写活性化試験の結果を Fig. 5 に示す。アゴニスト活性は、試験化合物を単独で添加したときの転写活性化により評価しており、化合物非添加での転写活性化能を 1 としたときの比活性で表した。この評価系では、エストラジオール (E2) の EC₅₀ は 10⁻¹¹M 程度であり、10⁻¹⁰M での比活性が約 10 となっている。また、アンタゴニスト活性は 10⁻¹⁰M の E2 単独での転写活性化能を 100% として、そこに試験化合物を共存させたときの転写活性化の阻害により評価した。塩基性側鎖を持つ化合物は、いずれも単独ではアゴニスト活性は持たず (Fig. 5-C)、

E2 (10^{-10} M) の存在下でアンタゴニスト活性を示した (Fig. 5-A)。それらの中でも最も活性の強い **BE362** は対照としたタモキシフェンと同程度の活性であった。また、塩基性側鎖を持たないビスフェノール型の化合物においても、フェノール性水酸基が *p*-位置換 (**BE360**) の場合 10^{-6} M でアンタゴニスト活性を示し (Fig. 5-B)、塩基性側鎖はアンタゴニスト活性発現のために必須ではないことを見出した。**BE360** は単独ではパーシャルアゴニスト的な活性を示し、フェノール性水酸基が *m*-位置換の **BE370** ではアゴニスト活性が強くなる傾向がみられた (Fig. 5-D)。さらに、ER α への $[^3\text{H}]$ -E2 との競合結合試験により、これらの化合物は E2 の受容体への結合を競合的に阻害することが確認され、なかでも、**BE362** と **BE360** が比較的強い結合能を示した (Fig. 6)。また、グラフには示さないが、塩基性側鎖の長さを伸ばした **BE353**、**BE354** は 10^{-8} M で弱いアゴニスト活性がみられるものの、 10^{-7} M 以上ではアゴニスト活性は持たず **BE362** と同程度のアンタゴニスト活性を示した。

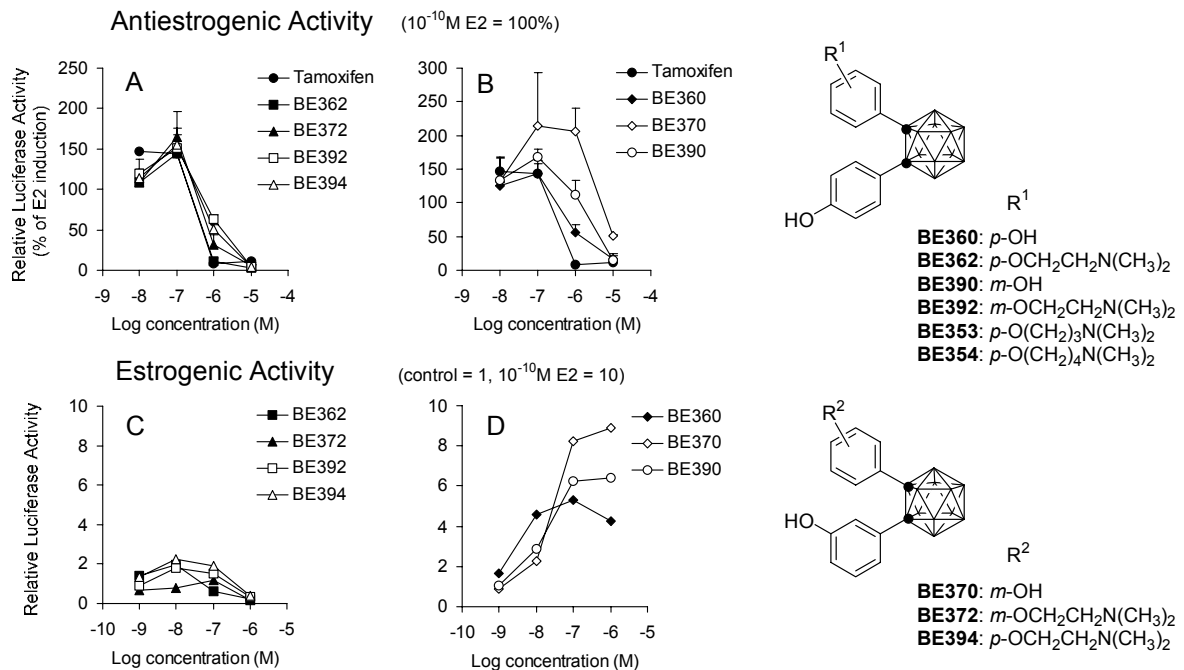


Fig. 5 Transcriptional Activation by the Test Compounds

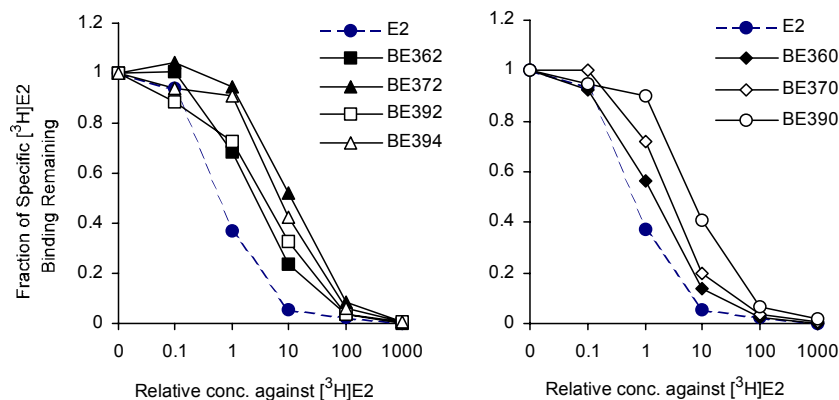


Fig. 6 Inhibition of Specific [³H]estradiol Binding with hER α ([³H]estradiol = 4nM)

カルボランの炭化水素骨格へのフィードバック

カルボランを疎水性骨格構造として用いた ER リガンドのなかで、**BE360** がパーシャルアゴニストとして興味深い活性を示した。この活性がカルボラン骨格特有であるかどうかを検証するために、**BE360** のカルボラン部分を球状炭化水素骨格に変換した化合物をデザイン、合成し、その生物活性を比較することとした (Fig. 7)。生物活性を測定した結果、これらの化合物はいずれもアンタゴニスト活性が消失し、アゴニストとなった。特にビスクロオクテン骨格を持つ **BE1060** は、分子の形状が **BE360** と類似しているにも関わらず MCF-7 を用いた転写活性化試験では非常に強いアゴニスト活性を示した。

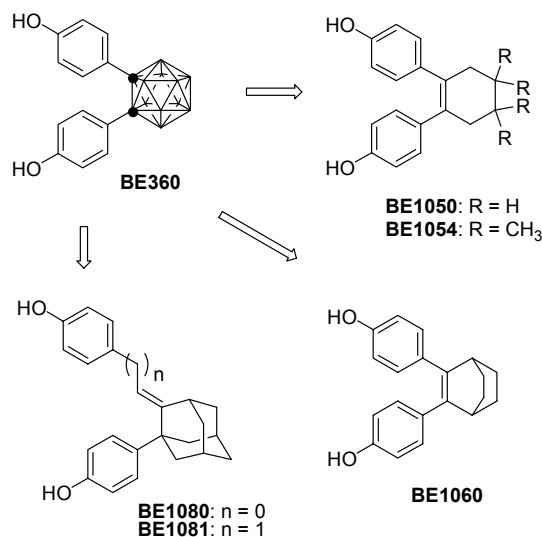


Fig. 7 Conversion of Carborane to Spherical Hydrocarbon Skeleton

卵巣摘出マウスに対する **BE360** の効果

合成化合物の中から、組織選択的な ER リガンドの候補化合物として、パーシャルアゴニストであり単純な構造を持つ **BE360** を選び、卵巣摘出 (OVX) マウスに 4 週間投与して骨密度及び子宮重量に対する効果を調べた (Fig. 8)。OVX マウスでは内因性エストロゲンの欠如により骨密度、子宮重量ともに正常なマウスに比べて著しく減少しているが、E2 の投与によりこれらは濃度依存的に回復する。一方で **BE360** を投与したところ骨密度は 30-100 $\mu\text{g/day/head}$ の投与量で正常マウス (sham-operated) と同程度まで回復するものの (Fig. 8-A)、子宮重量はほとんど変化しない (Fig. 8-B)。この結果から **BE360** は、子宮に対するアゴニスト作用を引き起こさずに骨にのみアゴニスト作用を示し、骨粗鬆症の治療薬として優れた性質を持つ ER リガンドであるといえる。

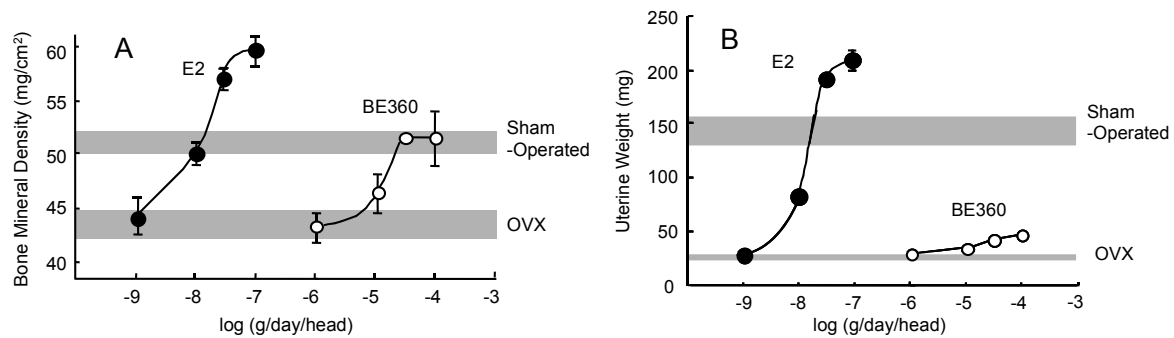


Fig. 8 Effects of BE360 on the Uterine Weight and Bone Mineral Density of Femurs in OVX Mice

総括

本研究により私は、組織選択的なエストロゲン受容体モジュレーターを目指した新規カルボラン含有 ER リガンドの設計と合成を行い、その構造活性相関を明らかにした。合成化合物の中で、**BE362** は *in vitro* でタモキシフェンと同程度のアンタゴニスト活性を示した。また、**BE360** は、*in vitro* ではパーシャルアゴニスト作用を示し、*in vivo* では骨に対するアゴニスト作用を示す一方で子宮に対する作用は示さず、骨粗鬆症薬として優れた組織選択性を有する ER リガンドとして注目される化合物である。組織選択性は、ER-リガンド複合体に結合する転写共役因子の違いなどによって現れると考えられているが、詳細な解明には至っておらず、**BE360** のように従来にない骨格構造を持つ化合物の創製は、その作用機構解明にも役立つものと考えられる。また、新規骨格を用いることにより従来のリガンドとは異なる体内動態、組織選択性を示す可能性もあり、医薬への応用に向けた更なる展開が期待される。