

博士論文

プロテアソーム阻害に基づく  
新規抗癌剤の構造活性相関研究

2018年9月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科

バイオサイエンス専攻

バイオ科学技術研究領域

田中 誠

## 謝辞

本研究は、長浜バイオ大学 バイオサイエンス学科 蛋白質機能解析学研究室、遺伝子科学研究室およびコンピュータバイオサイエンス学科 生物情報解析学研究室、東京理科大学 理学部第一部 応用化学科 椎名研究室によって行われました。この研究成果は、非常に多くの方々の多大なる助力・援助なくしては実現しなかったものであり、遂行にあたり協力して頂いた全ての方々に謹んでお礼申し上げます。

研究室配属後から興味深い研究テーマおよび不自由ない充実した研究環境を与えてくださいました蛋白質機能解析学研究室 長谷川慎教授に厚く御礼申し上げます。また、先生には 6 年間を通して非常に多くの面で熱心なご指導、公私にわたり支持して頂いた御厚恩に拝謝いたします。

博士論文の作成において副査を務めていただき、御精読および貴重なコメントをいただきました、構造生物学研究室 白井剛教授、生物有機化学研究室 河合靖教授にお礼申し上げます。

日々の研究進捗において、遺伝子科学研究室 水上民夫教授、佐々木隆造客員教授には眼識ある多数の指摘・提案や度々のディスカッションによる力添えを頂いたことに心より感謝申し上げます。

研究全体を通して化合物の合成および提供を東京理科大学 椎名勇教授にして頂きました。加えて、RID-F へのペプチドコンジュゲートに用いる新たな RID-F 前駆体化合物の合成とご供与により研究の発展を行えました。誠にありがとうございました。

構造活性相関におけるドッキングシミュレーションは、生物情報解析学研究室 塩生真史准教授にして頂きました。この解析により、薬物の動態に対して洞察を得ることができました。深く御礼申し上げます。

また研究初期において基本的な実験法の指導や細胞実験の技術指導、研究室生活のサポートをしてくださった技術員の土田美江さん、細井美穂さん、井上有香さん、稲垣泰代さん、角谷明枝さん、白井恵美さん、木村七海さん、安田ゆかり先輩、堀川和男先輩に感謝申し上げます

## 略語

AMC, 7-amino-4-methylcoumarin; ATP, adenosine triphosphate; ATP $\gamma$ S, adenosine 5'-O-(3-thio)triphosphate; CPP, cell-penetrating peptide; CT-L, chymotrypsin-like; CyT<sub>50</sub>, half-maximum cytotoxicity concentration; 4,4'-DHBP, 4,4'-dihydroxybenzophenone; DMF, dimethylformamide; DMSO, dimethyl sulfoxide; ER, estrogen receptor; HPLC, high-performance liquid chromatography; HRP, horseradish peroxidase; IC<sub>50</sub>, half-maximum inhibitory concentration; K<sub>i</sub>, inhibition constant; MTT, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PARP, poly-ADP ribose polymerase; PGPH, peptidylglutamyl peptide hydrolase; *p*-TsOH, *p*-toluenesulfonic acid; PI, proteasome inhibitor; R<sub>8</sub>, octa-arginine; RID, ridaifen; RP, regulatory particle; SDS, sodium dodecyl sulfate; TAM, tamoxifen; T-L, trypsin-like; THF, tetrahydrofuran.

# 目次

謝辞

略語

## 第一章：研究背景

- 1-1 多発性骨髄腫の化学療法について
- 1-2 プロテアソームの構造と機能
- 1-3 化学物質ライブラリースクリーニングと薬剤候補の最適化
- 1-4 研究の目的

## 第二章：新規 tamoxifen 誘導体 ridaifen-F は、非ペプチド性の小分子プロテアソーム阻害剤である

- 2-1 概要
- 2-2 結果と考察
  - 2-2.1 RID 類縁体 (A-H) および他の RID-F の D 誘導体(RID-F-S\*X)合成
  - 2-2.2 ridaifen 誘導体によるプロテアソーム活性の阻害
  - 2-2.3 RID-F 誘導体によるプロテアソーム活性の阻害
  - 2-2.4 RID-F 誘導体プロテアソーム阻害の様式
  - 2-2.5 細胞増殖抑制評価
  - 2-2.6 RID-F 誘導体の酵母プロテアソーム サブユニット PRE3 との 3次元結合モデリング
- 2-3 実験手順
  - 2-3.1 RID 類縁体 (A-H) および他の RID-F の D 誘導体(RID-F-S\*X)合成
  - 2-3.2 20S プロテアソーム蛍光基質アッセイ
  - 2-3.3 増殖阻害アッセイ
  - 2-3.4 ビオチン belactosin A 標識試薬を用いた結合実験
  - 2-3.5 ウェスタンブロッティング

### 第三章：細胞透過性ペプチド付加 ridafen-F は、細胞内プロテアソーム活性を 阻害し、薬剤耐性細胞の細胞死を誘導する

#### 3-1 はじめに

#### 3-2 結果

##### 3-2.1 合成

##### 3-2.2 RID-F-CPP 付加体によるプロテアソーム活性の阻害

##### 3-2.3 各種ペプチドを含む RID-F コンジュゲートによるプロテアソーム阻害

##### 3-2.4 RID-F コンジュゲートによる細胞内プロテアソーム阻害と多剤耐性骨 髄腫細胞への細胞傷害効果

##### 3-2.5 ドッキングシミュレーション

#### 3-3 考察

#### 3-4 実験手順

##### 3-4.1 RID-F-COOH および RID-F-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> の合成

##### 3-4.2 RID-F ペプチドコンジュゲートの作成

##### 3-4.3 細胞培養

##### 3-4.4 プロテアソーム蛍光基質アッセイ

##### 3-4.5 細胞生育阻害アッセイ

##### 3-4.6 細胞内プロテアソーム活性の測定

##### 3-4.7 ドッキングシミュレーション

### 結論

### 引用文献

### 発表論文

### 補遺

# 第一章：研究の背景

## 1-1 多発性骨髄腫の化学療法について

多発性骨髄腫（Multiple Myeloma : MM）は、血液細胞の一種である形質細胞が腫瘍化し、複数の箇所で発症するために多発性の名を有する難治性の血液性がんである。形質細胞とは、炎症部位やリンパ節、扁桃、脾臓といったリンパ組織に分布する単核細胞であり、免疫グロブリン産生や分泌に特化した細胞である。その発がんは、骨髄中における腫瘍の増殖を引き起こし、正常な血液細胞の産生が阻害され、貧血や白血球減少、血小板減少が生じる。多発性骨髄腫患者の平均生存期間は3~5年とされ（Anderson, K.C., 2016）、2017年の推定罹患率は人口10万人に対して4.1人で、近年では年間6500~8000人の新規患者が見られる。50歳以降に発症率が急激に増加し高齢者に多いのが特徴とされ、超高齢社会を迎え今後はさらなる患者数の増加が懸念されている（がん情報サービス：全国がん罹患モニタリング集計；Katanoda, K. *et. al.*, 2014）。

多発性骨髄腫では、形質細胞の免疫グロブリン産生に必要な遺伝子に異常が生じ、アミノ酸配列および立体構造に異常を持つMタンパクと呼ばれる、正常抗体としての機能を失われた免疫グロブリンタンパク質が産生され続ける。そのため、正常な免疫グロブリン量が低下し免疫機能不全による感染症リスクが増大、またMタンパク沈着による腎障害を引き起こす。さらに、骨髄腫細胞は破骨細胞を活性化しながら骨芽細胞の分化を抑制する事により、骨折を伴う重篤な骨粗鬆症や、血液中へカルシウムが溶け出して高カルシウム血症を生じる。これらの典型的な症状は、高カルシウム血症（hyper Calcemia）、腎障害（Renal insufficiency）、貧血（Anemia）、骨病変（Bone lesion）の典型症状は「CRAB症状」と総称される。

現在までに多発性骨髄腫の治療には、様々な治療法が開発され発展してきた。かつて、1960年代後半にアルキル化剤 Melphalan と抗炎症薬 Prednisolone を用いた MP 療法の有効性が示され、アルキル化剤などを用いた多剤併用療法が試行錯誤された（Azam, L. *et. al.*, 1974）。しかし、強力な抗悪性腫瘍薬は有効な手段である一方で、その副作用は、重篤な白血球減少や血小板減少が発現するため、骨髄移植による骨髄の再建を必要とした。このような中で MP 療法を凌駕

する優位な生存期間延長効果を獲得することができず、当時の治療は非常に困難なものであった。1970年代以降になると X線 CT を利用した放射線治療の時代が始まった (Itami, J., 2011)。骨の破壊や神経または脊椎の圧迫のような重篤な症状に対して放射線療法は、迅速な疼痛軽減効果が見込め非常に効果的であった。しかしこの方法では、照射範囲内の正常骨髄幹細胞に回復不能なダメージを与えるため、局所的な範囲での使用に限られる。したがって、全身化学療法は、病態の悪化抑制し疾患をコントロールするためには不可欠である。

1990年代になると、この骨髄抑制の対処法として自家末梢血幹細胞移植 (Autologous peripheral blood Stem Cell Transplantation : ASCT) 技術が確立され、これと併用して薬剤の大量化学療法 (High dose therapy : HDT) が可能となった。この療法は、患者自身の造血幹細胞を事前に採取・保存しておき、一時的に大量の薬剤を投薬して骨髄腫細胞を極限まで減らした後に造血幹細胞を体に戻すことで、迅速に正常な血液細胞の回復を行うものである (Palumbo, A. *et. al.*, 2011)。この治療法により予後の改善がもたらされ無増悪生存期間の延長が示された。しかし、ASCT の適応は、HDT が可能な若年症例に限定される。元来 MM 患者には HDT 適応外の高齢者が多く、また処置後 1~3 年の寛解を経ての再発は不可避であった。そのため治療の基本コンセプトは疾患克服よりも病状悪化の抑止に重きをおかれていた。

今世紀になって有望な治療法が初めて現れた。プロテアソーム阻害剤 (PI) Bortezomib (2003年)、免疫調節薬 Lenalidomide (2006年) (Wang, M. *et. al.*, 2008) などの新規薬剤を使う化学療法は、従来では少なかった完全寛解獲得症例が増加し、より高い奏効性を獲得することで長期間の疾患コントロールを目指した治療を志向することができるようになった。Bortezomib は、その高いプロテアソーム選択性により細胞周期、細胞増殖やアポトーシスに関わる分子を制御することで、直接的に骨髄腫細胞へ抗腫瘍活性を発揮するほか、サイトカインの分泌抑制により間接的に抗骨髄腫効果を発揮できる (Shahshahan, M.A. *et. al.*, 2011; Borissenko, L. *et. al.*, 2007)。Bortezomib 開発以前からプロテアソームを標的とした薬剤の開発は行われており、ペプチドアルデヒドは、開発された最初のプロテアソーム阻害剤であった。MG132 や PSI、ALLN のような代表的ペプチドアルデヒド阻害剤は、プロテアソームの活性部位に対して可逆的な結合様式を持って阻害効果を発揮する (Kisselev, A.F. *et. al.*, 2001)。しかし、ペプチドアル

デヒドは、速い解離速度を有しており、細胞により不活性酸へと酸化され細胞外に排出される結果、阻害剤除去によって阻害効果は迅速に逆転される。この特徴からペプチドアルデヒドは、細胞プロセスにおけるプロテアソームの関係を研究する目的で広く用いられるが、治療薬には至らなかった。一方で、**Bortezomib** はペプチドホウ酸化合物であり、可逆的でありながら非常に遅い解離速度を持つため、阻害が長時間持続し事実上不可逆的に阻害効果を発揮できることから治療薬となった。さらに従来の治療法にない大きな特長として、**Bortezomib** によるユビキチンプロテアソーム系の停止は、間葉系幹細胞の前骨芽細胞分化を誘導する転写因子 (**Runx2**) の細胞内濃度を上昇させ、骨形成が亢進するため、最終的に骨病変の改善が見られるという点が挙げられる (Zhao, M. *et. al.*, 2003; Uyama, M. *et. al.*, 2012)。そのため、**Bortezomib** は多くの多剤併用療法が検討され、従来療法に比べ全生存期間が改善される原動力となった (Harousseau, J. *et. al.*, 2010; Shah, J.J. *et. al.*, 2009)。その一方で、**Bortezomib** の不応性・耐性も報告されはじめ、この対応に耐性機序が不明のまま盲目的に各種新規薬剤との併用が検証されるという現状があり、第二世代プロテアソーム阻害薬の開発は喫緊の課題となった。

近年、長年にわたる MM 基礎研究によって病態の解明が進んだ結果、免疫調節薬 Pomalidomide (2013 年)、モノクローナル抗体 Daratumumab (2015 年) Elotuzumab (2015 年)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 Panobinostat (2015 年)、そして第二世代プロテアソーム阻害薬である Carfilzomib (2012 年)、Ixazomib (2015 年) といった多様な薬剤が続けざまに登場した (Lacy, M. Q. *et. al.*, 2010; de Weers, M. *et. al.*, 2011; Afifi, S. *et. al.*, 2016; Cea, M. *et. al.*, 2013; Stewart, A.K. *et. al.*, 2015; Moreau, P. *et. al.*, 2016; Moreau, P. *et. al.*, 2017)。利用可能な薬剤が増したことで、従来耐性や再発に備え薬剤を温存しつつ延命を図る治療戦略は、複数の新規薬剤の併用による積極的な治療で予後の改善を図る方針へ変化してきている。

新たな治療戦略において、奏功がどの程度の深度かを判断するための「微小残存病変 (Minimal Residual Disease : MRD)」が重要な指標となっている。MRD は、骨髄中に存在する異常性を持つ細胞の割合を表し、フローサイトメトリーを使用し  $10^{-5}$  の検出感度まで測定でき、MRD が検出できないほど極めて深い奏功に到達した場合に長期間無増悪生存する可能性があると考えられる (Chim, C.S.

*et. al.*, 2018)。したがって、新しい戦略では、プロテアソーム阻害薬と免疫調節薬を中心に強力な薬剤と組み合わせ、初回に腫瘍細胞の数を極限まで減らした後、再発を待たず **Dratumumab** や **Elotuzumab** といった新規薬剤を組み込んだ多剤併用療法を実施し、病勢のコントロールを図り、**MRD** 陰性を目指すものである。そして、**MRD** 陰性獲得後は、最新の免疫賦活作用のある治療法を用いて患者自身の免疫力によってその状態を維持することが理想とされる。しかしながら、**ASCT** 非適応の患者の場合は、**HDT** が行えないため **MRD** 陰性の達成はいまだ厳しい現状が存在しており、最新薬剤の多剤併用療法により予後の改善を期待する戦略がとられている。そのため、多発性骨髄腫患者に対する最良の長期的結果をもたらさう治療選択肢が依然として必要とされている。

新規骨髄腫治療薬には、**HDT** が望めない患者に対し適応可能な低容量でも高い抗腫瘍効果を持ち、骨病変の改善効果が見込めるプロテアソーム阻害剤が望ましい。また、異なるサブクローンごとの薬剤耐性や感受性の原因を考慮した時、効率的に細胞膜を浸透し薬剤排出ポンプから容易に排除されず細胞内濃度を保持できる能力が必要とされる。そのため従来の阻害剤構造とは異なる新規構造を持つ阻害剤の導出とプロテアソームの機能、構造様式に注目した研究アプローチが重要となる。

## 1-2 : プロテアソームの構造と活性

ユビキチンプロテアソームシステムは、細胞内のタンパク質分解のための主要な経路の一つであり、これは、1988年に **Alfred Goldberg**、**田中啓二**らによりプロテアソーム（プロテアーゼ活性を持った巨大粒子～some）と名づけられた（**Kisselev, A.F. et. al.**, 2001）。ユビキチン-プロテアソーム系は、**8kDa** の小さなタンパク質であるユビキチンの複数の分子修飾を標識と利用して、変異または損傷したタンパク質を選択的に分解することで恒常性維持に貢献している。また、プロテアソームによる分解は、腫瘍抑制因子である **p53** やサイクリン依存キナーゼ阻害タンパク質 **p27kip1**（**Pagano, M. et. al.**, 1995）、転写因子 **NF- $\kappa$ B** の調節タンパクである **I $\kappa$ B** の制御関わるため、免疫応答や細胞周期、遺伝子転写などの生体機能調節の鍵となっている。一般的にがん細胞は、正常細胞と比べ頻繁に分裂を行うためプロテアソームの依存度が高いと。そのため、プロテアソームの選択的な阻害は、分解タンパクの蓄積による小胞ストレスの増大や

細胞周期の破綻によりアポトーシスを誘導することが知られている。そこで、プロテアソームは、抗がん剤開発のための創薬ターゲットとして有望視され、上述のように実際に多発性骨髄腫の治療薬として利用されるようになった。

細胞内に最も普遍的に存在する 26S プロテアソームと呼ばれるタイプは、2.4MDa の巨大な酵素分子複合体である。この構造は、PA700 または 19S RP (Regulation Particle) と呼ばれるキャップ状の調節因子とその間に挟まれた 20S CP (Core Particle) から構成され、これらは互いに円筒形バレルとその蓋のように会合している (Groll, M. *et. al.*, 1997)。20S CP の構造は、七量体  $\alpha$  サブユニット ( $\alpha$  1-7) と七量体  $\beta$  サブユニット ( $\beta$  1-7) が形成する 4 つのリングが、 $\alpha$   $\beta$   $\beta$  配置に積み重なったバレル状構造から成る。ペプチドアルデヒド阻害剤と 20S CP が結合した X 線結晶解析によって、 $\beta$  リングには、3 種の異なるタンパク質分解活性が存在する事が同定されている (Groll, M. *et. al.*, 1997)。これらの活性部位は  $\beta$  リングの内側に面しており、基質が 20S CP 内部に到達する必要がある。しかし、この基質の経路は狭く、折りたたまれた状態のタンパク質は通過できない。この入り口は  $\alpha$  リングの中心に位置した約 13Å の細孔であり 19S RP によって開閉が制御されている。19S RP は、この基質分解のための経路の制御を担い、高い親和性で基質に結合したポリユビキチン鎖を認識して分解し、基質タンパクのアンプォールディングを行うことで 20S CP 内部に基質を輸送している。19S RP の成分の 1 つである AAA-ATPase モジュールを持つヘテロヘキサメリック環は、20S プロテアソームのバレルおよび基質アンプォールディングへの基質転位に重要な役割を果たしている。

このように、プロテアソームの活性は容易に活性中心に基質が接近できる他のプロテアーゼと異なり完全に制御された機構を持っている。さらに、一般的なプロテアーゼが、基質を一度切断した後に 2 つの断片をすぐに放出するのに対して、20S CP は、内部に取り込んだ基質を連続的に分解する事で、長さを 3~20 残基程度の複数のペプチド断片に消化できる。この 20S CP が持つ  $\beta$  リング上の 3 種の活性部位は、それぞれ  $\beta$  5 サブユニットに存在する疎水性残基の後ろを切断する「キモトリプシン様活性」、 $\beta$  2 サブユニットの塩基性アミノ酸の後ろを切断する「トリプシン様活性」、 $\beta$  1 サブユニットの酸性アミノ酸を切断する「PGPH (Peptidyl Glutamyl Peptide Hydrolase) 活性」と呼ばれる (Orlowski, M., 1990)。ただし、PGPH 活性についてはグルタミン酸よりもアスパラギン酸

をより早く分解することが示されたため、最近では「カスパーゼ様活性」と呼ばれることもある (Kisselev, A.F. *et. al.*, 1997) (カスパーゼ(Caspase)はアポトーシスに関係するアスパラギン酸の後を切断するシステインプロテアーゼ)。興味深いことに、これらの触媒活性は、 $\beta$ サブユニット単独では発揮されず、触媒サブユニットと隣接するサブユニットの相互作用により形成される基質結合部位によって活性が示される (Groll, M. *et. al.*, 1997)。つまりプロテアソームは、独立した個々の酵素が集まったものではなく、各サブユニットが不可欠な構成要素として存在する場合に活性を持つ多触媒性酵素である。

### 1-3 化合物ライブラリースクリーニングと候補薬剤の最適化法

従来の医薬品よりも有用な生理活性を示す新規化合物を発見するには、十分に集積された化学ライブラリーの構築と効率的なスクリーニング法の設計が必要である。1997年Pfizer社のLipinskiらが、「化合物の薬らしさ」(Drug Likeness)を定義し、Lipinski's Rule of Fiveと題した創薬の指標を発表した (Lipinski, C.A. *et. al.*, 2001; Lipinski, C.A., 2003)。これは、薬剤の経口投与に適した構造条件を予測したもので、膜透過性や溶解性に優れた化合物は、水素結合ドナー(OH, NH)が5個以下、水素結合アクセプター(N, Oなど)が10個以下、分配係数logPが5以下、そして分子量が500以下であるとした。この論文の影響は大きく、多くの創薬研究者によって医薬品の特性を分析した創薬指標が発表される契機となった (Veber, D.F. *et. al.*, 2002; Lovering, F. *et. al.*, 2009)。2000年代初頭ヒトゲノムプロジェクトのドラフト成果が発表されてから、アメリカでは、標的分子および低分子化合物ライブラリーの整備が進められた。この運動の実例の1つとして、2004年からNIH Chemical Genomics Centerによって実施されたPub Chemがある (Pub Chem Project., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。日本では、2006年に東京大学に「生物機能を制御するための化合物ライブラリー機構」(現:創薬機構 Drug Discovery Initiative)が成立され、20万化合物を超える公共化合物ライブラリーが公開された (東京大学創薬機構, <https://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/>)。その他にも、理化学研究所化合物バンク [NPDepo, <http://www.cbcr.riken.jp/npd/>]や産業技術総合研究所天然化合物ライブラリー (バイオ産業情報化コンソーシアム (JBIC) 天然化合物ライブラリー <http://www.jbic.or.jp/enterprise/result/002.html>) が運用され、産学に関わらず創薬研究に活用されるよ

うになっている。

薬物開発の成功には、薬物活性、溶解性、吸収性、代謝安定性等の向上を含めたリード化合物の最適化が求められている。その手段として薬効を担う化学構造とその活性強度との相関を分析する構造活性相関 (SAR) 研究が用いられる。SAR の実施は、迅速に活性と構造の相関性に影響を与える要因を絞り込むことができ薬効に寄与する化学構造の探索を効率化できる。こうして、現在の創薬研究は、化合物ライブラリーなどに蓄積された化学構造情報を活用し、薬に適した候補化合物の SAR を実行し *in vitro* や *in silico* 実験を併用し進められる事が主流である。こうして、開発コストを抑えながら迅速で効率的な有望なリード化合物の導出を行うことで、難治性疾患に対する治療薬の開発が行われている。

#### 1-4 研究の目的

ここまでに多発性骨髄腫という難治性疾患の存在と治療法、薬効標的としてのプロテアソームの優位性、そして創薬のための候補化合物の探索と最適化戦略について概論した。そこで本項では、本研究の目的について説明する。

本論文の研究背景には、生体制御に重要な役割を担っているプロテアソームが、その阻害によって細胞のアポトーシス誘導をするという機序に基づいて抗がん剤としての有望な薬剤標的であるという考えを始まりにしている。2010年より、文部科学省がん特定領域研究・統合がん化学療法基盤情報支援班が発足し、この一翼として私の所属する研究グループは、プロテアソーム阻害評価系を運用してきた。この活動を通して、東京理科大学の椎名勇教授が開発した一群の新規 tamoxifen (TAM) 誘導体化合物である ridaifen のプロテアソーム阻害活性評価を実施した。第 2 章に先立って ridaifen の特徴について少し触れると、この化合物は TAM と共通する中心骨格から対称性の側鎖を持った非ペプチド性の小分子化合物である (図 1-1)。

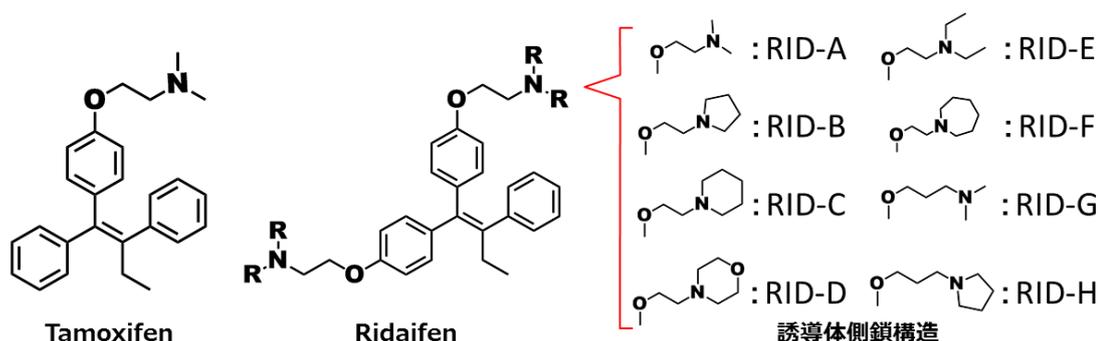


図 1-1.tamoxifen と ridaifen 化合物の構造

この ridaifen の構造は、従来のプロテアソーム阻害剤と異なり、酵素の活性中心と共有結合を形成するような反応性の官能基を持たず、異なる様式により薬効を発揮することが予想される。また、非ペプチド性の構造は、生体内においても安定であり、また多様な誘導体展開を行える柔軟性があるという点で、既存のプロテアソーム阻害剤がとるような基質を模した構造には無い堅牢性と独自の作用機序を発揮する新規構造の探索が行えるという点で期待された。実際に精製 20S プロテアソームを用いた阻害活性評価により、ridaifen 類縁体の中にプロテアソーム阻害活性を示す化合物を見出された。こうして、研究初期において TAM 誘導体化合物に新規なプロテアソーム阻害活性が見出されたため、この化合物 RID-F のプロテアソーム阻害剤としての新規性を追及することが可能となった。そこで、この特徴的な新規構造がどのようにプロテアソーム阻害活性を発揮しているのか、また構造活性相関に基づき構造の最適化を図った場合に、その阻害活性はどの程度発揮されるかという点で、既存のペプチド性阻害剤からは得られない新規な情報を取得できると期待できる。したがって、本研究目的は、新規プロテアソーム阻害剤 RID-F の構造活性相関に基づいた手法によって、阻害様式ならびに作用モデルを予測し、薬効増強として細胞膜透過ペプチドの付加も併用した非共有結合性のプロテアソーム阻害剤の利用可能性を検討することである。

## 第二章：新規 tamoxifen 誘導体 ridaifen-F は、非ペプチド性の小分子プロテアソーム阻害剤である

### 2-1 概要

Bortezomib および Carfilzomib を含む代表的なプロテアソーム阻害剤のほとんどは、基質を模倣した短いペプチド骨格であり、その C 末端に結合したファーマコフォアが、20S CP の活性中心の Thr<sup>1</sup> に共有結合する。しかしながら、ペプチド結合は内因性プロテアーゼによって容易に分解され、反応性ファーマコフォアは、他の生体分子からの求核攻撃の影響を受けやすく、生体内での構造安定性に問題がある。したがって、非ペプチド性かつ非共有結合性プロテアソーム阻害剤には、従来のプロテアソーム阻害剤にはない利点が存在する。より最近では、共有結合性の阻害剤に関する欠点を克服するために、ペプチド性であるが非共有性である阻害剤の開発に焦点が当てられている (Genin, E. *et al.*, 2010)。これらの化合物には、ritonavir (Schmidtke, G. *et al.*, 1999)、Aminobenzylstatine (Furet, P. *et al.*, 2004)、3,4,5-trimethoxy-L-phenylalanine 誘導体 (Furet, P. *et al.*, 2002)、5-methoxy-1-indanone dipeptide benzamides (Lum, R. T. *et al.*, 1998)、リポペプチド (Basse, N. *et al.*, 2006)、S-homo-phenylalanine 由来の -C' ないし -N' キャップ化されたジペプチド (Blackburn, C. *et al.*, 2010; Lin, G. *et al.*, 2013) や TMC-95A (Koguchi, Y. *et al.*, 2000; Groll, M. *et al.*, 2009) と、その構造を模倣した誘導体 (Basse, N. *et al.*, 2007; Desvergne, A. *et al.*, 2013) などがある。しかしながら、非共有結合性と非ペプチド性の両方を有する阻害剤はほんの少数しか報告されていない (Basse, N. *et al.*, 2010)。

プロテアソーム個々の触媒部位の活性を試験するためには、それぞれの活性部位特異的な基質を使う必要がある。そのため、いくつかの蛍光ペプチド基質が、簡便でかつ単純な系で各酵素活性を測定するために用いられている。蛍光基質は、もともとシステインプロテアーゼであるプロテイナーゼを標的とした研究などが報告されており (Kunoh, T. *et al.*, 2010)、プロテアソームを対象とした実験には、2-ナフタルチアミン(NA : naphthylamine)や 4-メトキシ-2-ナフチ

ルアミン (MNA : methoxy naphthylamine)、7-アミド-4-メチルクマリン (AMC : amido methylcoumarin) などの蛍光基の利用が報告されている (Jennifer Rivett, A. *et. al.*, 1994)。1999 年には Rock、Goldberg らのグループが、グリセロール存在下でウサギの筋肉細胞より単離した 20S CP を用いたタンパクの分解パターンを検証した研究により、SDS 存在下で活性化された 20S CP と 26S プロテアソームが生成する全体的なペプチドサイズ分布の類似性などを報告し、蛍光基質および精製プロテアソームを用いる実験系が確立された (Kisselev, A.F. *et. al.*, 1999)。この研究は、20S CP および 26S プロテアソームによって消化された全体のペプチドサイズの分布が、蛍光基質および精製プロテアソームが使用された場合と同様であることを報告した。彼らの実験プロトコールは、その後に行われた他の研究の標準となっている。本研究では、この実験プロトコールに基づいてプロテアソーム阻害剤の阻害活性評価を行った。

新たな非共有結合性の非ペプチド性プロテアソーム阻害剤を見出すために、本研究では、一連の tamoxifen(TAM)誘導体 ridaiifen を阻害活性評価の対象とした。TAM は内因性成長ホルモンである  $17\beta$ -エストラジオールの代わりにエストロゲン受容体 (ER) に結合し、ER 陽性乳がん細胞の増殖を抑制し、アポトーシスの誘導をさせる (Mandlekar, S. *et. al.*, 2001)。しかしながら、TAM は ER 非依存的な経路を介して、アポトーシスを引き起こすことも報告されている (Ferlini, C., 1999; Kang, Y. *et. al.*, 1996)。実際に、TAM はミトコンドリア膜電位の変動を介して ER 陰性細胞のアポトーシスを誘導する (Nagahara, Y. *et. al.*, 2008)。TAM 誘導体である ridaiifen-B (RID-B、表 2-1 参照) は、同じ経路を介して TAM より高い活性でアポトーシスを誘導することが報告されている (Nagahara, Y. *et. al.*, 2008)。一方、意外なことに既知の作用にはないプロテアソーム阻害活性が ridaiifen 類縁体にある事が見出された。本章では、精製 20S CP を用いた *in vitro* プロテアソーム阻害実験により、中心構造を同じくしながら両端の側鎖構造が互いに異なる RID-A、-B、-D、および-F が阻害活性を示すことを述べる。そして、それら誘導体化合物の中でも RID-F は、プロテアソームの酵素活性を最も強力に阻害したため、RID-F 誘導体による構造活性相関を実施し、阻害活性を發揮する最小の化学構造を明らかとした。

## 2-2 結果と考察

### 2-2.1 RID 類縁体 (A-H) および他の RID-F の D 誘導体(RID-F-S\*X)合成

化合物群は、東京理科大学・椎名勇教授により提供を受けた。ridaifens (RIDs)の類縁体 A-H (化合物 1~8) の合成は、椎名教授によって開発された 3 成分カップリング法に従い合成された。新規化合物 6 および 8~29 を製造するための合成経路は、補足スキーム 2-1~2-11 に示されている。その詳細は、発表論文 Hasegawa, M. et al. Eur. J. Med. Chem., 71, 290 (2014)) に記載されているが、ここでは、例として 3 つの合成物について短く合成手順を述べる。

補足スキーム 2-1 は、1,1-bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-ene のフェノール部分の、RID-F (6) および RID-H (8) の対応するアミノエチルエーテルへの変換を示す。溶媒はジメチルホルムアミド (DMF) を使用し、HfCl<sub>4</sub> の存在下で、芳香族アルデヒド、cinnamyltrimethylsilane および anisole の 3 成分カップリング反応を用いて、1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-ene を合成した (Shiina, I. et. al., 2007; Shiina, I. et. al., 2008)。

RID-F-S\*3 (24)、1,1-bis{4-[2-(azepan-1-yl)ethoxy]phenyl}ethene は、4,4'-dihydroxybenzophenone (4,4'-DHBP)を補足スキーム 2-2 に示すように、O-アルキル化、C1 セグメント導入、および酸媒介脱水を含む化学的アプローチを介して実施した。まず、4,4'-DHBP のフェノール部分を N-(2-chloroethyl)hexahydro-1H-azepine HCl を用いた O-アルキル化によって対応するアミノエチルエーテルに 85%の収率で変換し、メチルグリニャール試薬を用いて RID-F-S\*5 (23) 中のカルボニル基の連続アルキル化をテトラヒドロフラン (THF) 中で行い、1,1-diphenylethanol 誘導体 RID-F-S\*6 (28) を収率 88%で得た。最後に、ベンゼン中で第 3 級アルコールの *p*-TsOHd で処理し、簡易な脱水プロセスにより 84%の収率で目的物の合成に成功した。

RID-F-S\*13 (9) の合成では、補足スキーム 2-3 に記載されたように、まず 1,1-bis{4-[2-(azepan-1-yl)ethoxy]phenyl}-2-cyclohexyl-2-phenylethene を向山還元カップリング反応を用いて合成した。最初に、cyclohexyl phenyl ketone を、THF 中の亜鉛粉末と共に塩化チタン (IV) から生成した低価のチタン種の存在下で過剰の 4,4'-DHBP で処理して、目的の olefin であるビス 1,1-bis(4-hydroxyphenyl)-2-cyclohexyl-2-phenylethene を収率 65%で得た。次

に、クロスカップリング生成物のフェノール部分を DMF 中で O-アルキル化により対応するアミノエチルエーテルに変換し、83%の収率で得た。従って、化合物 **9** の効率的な製造方法は、市販の 4,4'-DHBP からの 2 つの工程で確立された。RID-F-S\*17 (**17**) および RID-F-S\*24 (**16**) もまた、向山還元カップリング反応を用いて、4,4'-DHBP から 6-undecanone または 7-tridecanone と合成された。

その他の化合物、RID-F-S\*1 (**13**)、RID-F-S\*2 (**22**)、RID-F-S\*4 (**25**)、RID-F-S\*5 (**23**)、RID-F-S\*9 (**21**)、RID-F-S\*10 (**20**)、RID-F-S\*11 (**12**)、RID-F-S\*12 (**11**)、RID-F-S\*14 (**10**)、RID-F-S\*15 (**15**)、RID-F-S\*16 (**14**)、RID-F-S\*22 (**19**)、RID-F-S\*23 (**18**)、RID-F-S\*101 (**26**)、RID-F-S\*102(**27**)、RID-F-S\*103 (**29**)、は、対応する合成経路により市販のビスフェノールを原料として用いて合成した。すべての RID 合成物の物性値 (Mp、IR、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR および HR-MS) の結果は、(Hasegawa, M. *et. al.*, *Eur. J. Med. Chem.* 71, 290 (2014)) に示されている。

## 2-2.2 ridaiifen 類縁体によるプロテアソーム活性の阻害

新規プロテアソーム阻害剤の探索のために、*In vitro* 20S CP 阻害アッセイを用いて、RID-F から RID-H を評価した結果を示す。化合物の阻害活性は、精製ヒト 20S CP のキモトリプシン様 (CT-L)、トリプシン様 (T-L)、および PGPH 活性の各酵素活性を 50%阻害するに必要な濃度 IC<sub>50</sub> を求めた。MG132 は CT-L、T-L および PGPH 活性について 0.011 μM, 2.1 μM および 0.12 μM の IC<sub>50</sub> 値を示した。RID-A、-B および -D は CT-L および PGPH 活性の有意な阻害を示したが、T-L 活性を阻害しなかった (表 2-1)。表中の化合物図の R 位置に 2 つのホモピペリジン部分を有する RID-F は、プロテアソームの 3 つの活性の全てを阻害し、調べた ridaiifen 化合物の中で最も強力であった。全ての ridaiifen 類縁体は、>10 μM の濃度でカルパインまたはカテプシンを阻害しなかった (データは省略する)。これは、これらがプロテアソームの活性に特異的な阻害剤であることを示している。また、ridaiifen の母体である tamoxifen はプロテアソームの 3 つの酵素活性をいずれも阻害しなかった。

表 2-1. ridaiifen によるヒト 20S プロテアソーム活性の阻害

Compound number		IC <sub>50</sub> (μM)*			
		CT-L	T-L	PGPH	
1	RID-A	R =	3.36±0.86	>10	2.99±0.41
2	RID-B	R =	6.56±0.14	>10	6.37±0.28
3	RID-C	R =	>10	>10	7.50±0.18
4	RID-D	R =	7.19±0.28	>10	7.26±0.27
5	RID-E	R =	>10	>10	>10
6	RID-F	R =	0.64±0.14	0.34±0.12	0.43±0.08
7	RID-G	R =	>10	NT	NT
8	RID-H	R =	>10	NT	NT
-	tamoxifen		145±10	112±9	85±37

\* IC<sub>50</sub> 値は、活性の 50%阻害に必要な阻害剤の濃度を示す（実験手順参照）。  
 数値は独立した 3 回の実験の平均値である。CT-L：キモトリプシン様活性，  
 T-L：トリプシン様活性，PGPH：ペプチジルグルタミルペプチド加水分解酵素  
 活性，NT：Not Tested

### 2-2.3 RID-F 誘導体によるプロテアソーム活性の阻害

RID-F はサブマイクロ濃度でプロテアソーム活性を阻害した。そこで、RID-F 誘導体を用いて構造活性相関研究を実施した。RID-F は、その中心部分に (表 2-2 の X)  $sp^2$  炭素原子を持っている。RID-F 誘導体は、この中心部位を X として、中心構造に異なる芳香族環で置換した。SAR の実施において、中心構造別に誘導体を分類し評価を行った。表 2-2 に、これらの RID-F 誘導体の構造および阻害活性を示している。CT-L 活性に対する 50%阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) を比較すると、RID-F (6)、RID-F-S\*11 (12) および RID-F-S\*1 (13) が最も強力な化合物であることが示された。また、中心のビニルベンゼン構造の容量と CT-L、T-L、および PGPH 活性の  $IC_{50}$  は、3 化合物すべてにおいて同等であったことは注目すべき点である。

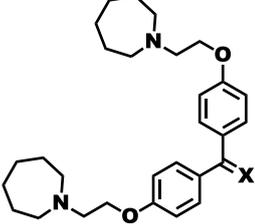
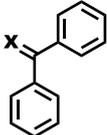
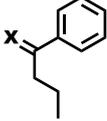
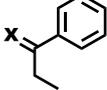
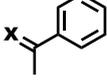
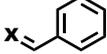
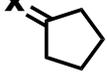
阻害活性に対する RID-F 誘導体の中心構造の寄与を調べるために、誘導体の容量をプロテアソーム活性部位のポケット体積と比較した。この計算機シミュレーションは塩生真史准教授 (長浜バイオ大学) に検討していただいた。Chem3D ソフトウェア (PerkinElmer Inc.) によるエネルギー最小化および分子動力学を用いて、モデルを構築した。Chem3D ソフトウェアで Connolly のプログラム (Connolly, M.L., 1993) を用いて計算した RID-F (6)、RID-F-S\*11 (12)、および RID-F-S\*1 (13) の中心構造の溶媒排除体積は、それぞれ 119、102 および  $84\text{\AA}^3$  であった。これらの値は、LIGSITE アルゴリズム (Hendlich, M.*et.al.*, 1997) に基づく Pocket-Finder を用いて計算した酵母 20S CP  $\beta$  1 の PGPH 活性部位のポケット体積 ( $117\text{\AA}^3$ ) に近い値であった。中心構造がビニルベンゼンよりも大きい (RID-F-S\*13 (9) および RID-F-S\*14 (10)) または、小さい (RID-F-S\*16 (14) および RID-F-S\*15) では、その阻害活性は弱かった。これらのデータは、ビニルベンゼンがプロテアソームプロテアーゼ活性を阻害するために適したサイズの中心構造であることを示唆している。

次に、X 位置を異なる長さの脂肪族鎖で中心構造を置換した。表 2-3 は、この一連の化合物の構造およびプロテアソーム阻害活性をまとめている。RID-F-S\*24 (16)、RID-F-S\*17 (17) および RID-F-S\*23 (18) は長い炭化水素鎖を有する。それらの中心構造の体積は、それぞれ 235、201 および  $167\text{\AA}^3$  と計算された。これらの化合物は、プロテアソーム活性の阻害を示さず、8 炭素原子以上の炭化水素鎖が RID-F 誘導体の阻害活性を妨害したことを表している。

RID-F-S\*10 (20)、RID-F-S\*9 (21)、RID-F-S\*2 (22) および RID-F-S\*5 (23) は、小さい非芳香族の中心構造を有し、その IC<sub>50</sub> 低い傾向にあった。

プロテアソーム阻害に必要な最小限の構造を決定するために、構造の一部が省略された一連の RID 誘導体を評価した (表 2-4)。最小の対称化合物である RID-F-S\*4 (25) が最も高い阻害効力を示したが、RID-F-S\*110 (30) (表 2-5) (Penning, T.D.*et.al.*, 2000) に見られるように、ホモピペリジン環の欠如はプロテアソーム阻害に著しい低下をもたらした。したがって、誘導体 RID-F-S\*4 (25) の構造は、プロテアソーム阻害可能な最小構造であり、2つのホモピペリジン環が、必須であることが示された。以上の結果をまとめたものを図 2-1 として示した。

表 2-2. RID-F 誘導体によるヒト 20S プロテアソーム活性の阻害およびヒト培養細胞 (HEK293 および HL-60) に対する細胞毒性効果。

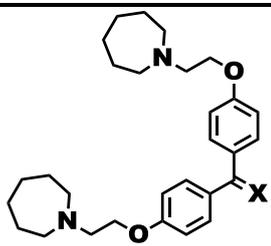
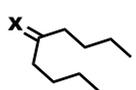
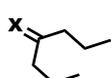
Compound number		X =	IC <sub>50</sub> (μM)*				CyT <sub>50</sub> (μM)**	
			CT-L	T-L	PGPH	HEK293	HL-60	
9	RID-F-S*13	X = 	>10	>10	0.35±0.02	>30	>30	
10	RID-F-S*14	X = 	1.18±0.07	>10	0.37±0.06	23.2±1.1	>30	
11	RID-F-S*12	X = 	1.37±0.27	0.28±0.04	1.05±0.46	26.8±1.0	4.30±0.55	
6	RID-F	X = 	0.64±0.14	0.34±0.12	0.43±0.08	4.38±0.79	3.42±0.33	
12	RID-F-S*11	X = 	0.90±0.10	0.36±0.17	0.87±0.04	18.9±1.2	6.87±1.47	
13	RID-F-S*1	X = 	0.58±0.05	0.69±0.54	0.37±0.19	6.06±0.45	9.73±0.62	
14	RID-F-S*16	X = 	2.19±0.25	2.18±2.03	0.89±0.09	12.5±0.3	11.7±0.4	
15	RID-F-S*15	X = 	2.70±0.10	1.11±0.08	1.67±0.15	26.2±1.9	20.1±0.6	

\* IC<sub>50</sub> 値は、活性の 50% 阻害に必要な阻害剤の濃度を示す (実験手順参照)。

CT-L : キモトリプシン様活性, T-L : トリプシン様活性, PGPH : ペプチジルグルタミルペプチド加水分解酵素活性, NT : Not Tested

\*\* CyT<sub>50</sub> 値は、細胞増殖の 50% 阻害に必要な化合物の濃度を示す (実験手順参照)。数値は 3 つの独立した実験の平均値を表している。

表 2-3. R<sub>2</sub> 位の脂肪族鎖で置換された RID-F 誘導体による 20S プロテアソーム活性の阻害およびヒト培養細胞に対する細胞毒性効果

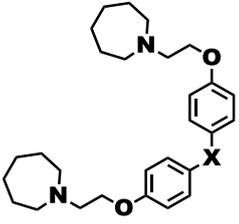
Compound umber		X =	IC <sub>50</sub> (μM)*				CyT <sub>50</sub> (μM)**
			CT-L	T-L	PGPH	HEK293	HL-60
16	RID-F-S*24	X = 	>10	>10	>10	>30	>30
17	RID-F-S*17	X = 	>10	>10	>10	14.5±3.9	>30
18	RID-F-S*23	X = 	>10	>10	>10	>30	25.3±0.6
19	RID-F-S*22	X = 	3.38±0.42	>10	2.51±0.44	>30	>30
20	RID-F-S*10	X = 	1.57±0.70	0.96±0.18	0.84±0.12	6.02±0.14	8.87±1.13
21	RID-F-S*9	X = 	1.66±0.12	>10	1.20±0.19	11.1±0.5	10.7±1.6
22	RID-F-S*2	X = 	1.46±0.14	1.61±0.47	1.03±0.10	26.7±0.8	22.6±0.3
23	RID-F-S*5	X = 	1.65±0.21	8.59±1.75	1.56±0.08	13.9±1.4	>30
24	RID-F-S*3	X = 	1.04±0.22	0.88±0.45	0.91±0.04	9.80±5.53	10.7±0.5

\* IC<sub>50</sub> 値は、活性の 50% 阻害に必要な阻害剤の濃度を示す (実験手順参照)。

CT-L : キモトリプシン様活性, T-L : トリプシン様活性, PGPH : ペプチジルグルタミルペプチド加水分解酵素活性, NT : Not Tested

\*\* CyT<sub>50</sub> 値は、細胞増殖の 50% 阻害に必要な化合物の濃度を示す (実験手順参照)。数値は 3 つの独立した実験の平均値を表している。

表 2-4. 省略された中心構造を持つ RID-F 誘導体による 20S プロテアソーム活性の阻害およびヒト培養細胞への細胞毒性効果

Compound number		IC <sub>50</sub> (μM)*				CyT <sub>50</sub> (μM)**	
		CT-L	T-L	PGPH	HEK293	HL-60	
25	RID-F-S*4	X = CH <sub>2</sub>	0.67±0.04	0.99±0.21	0.63±0.15	10.9±0.6	14.5±0.3
26	RID-F-S*101	X = 	0.80±0.02	>10	0.79±0.02	8.12±0.14	21.4±0.6
27	RID-F-S*102	X = 	0.75±0.01	1.87±0.83	0.77±0.01	7.61±0.05	17.6±1.8
28	RID-F-S*6	X = 	1.66±0.11	2.95±0.40	1.35±0.05	22.7±6.3	7.06±0.48
29	RID-F-S*103	X = 	1.94±0.09	0.20±0.20	1.08±0.16	17.5±0.3	>30

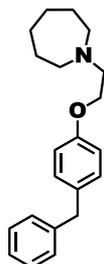
\* IC<sub>50</sub> 値は、活性の 50%阻害に必要な阻害剤の濃度を示す(実験手順参照)。

CT-L : キモトリプシン様活性, T-L : トリプシン様活性, PGPH : ペプチジルグルタミルペプチド加水分解酵素活性, NT : Not Tested

\*\* CyT<sub>50</sub> 値は、細胞増殖の 50%阻害に必要な化合物の濃度を示す (実験手順参照)。数値は 3 つの独立した実験の平均値を表している。

表 2-5. 2つのホモピペリジン環の1つを欠いた RID-F 誘導体による 20S プロテアソーム活性の阻害およびヒト培養細胞に対する細胞傷害効果

Compound number		IC <sub>50</sub> (μM)*			CyT <sub>50</sub> (μM)**	
		CT-L	T-L	PGPH	HEK293	HL-60
30	RID-F-S*110	>10	>10	>10	27.0±3.7	>30



\* IC<sub>50</sub> 値は、活性の 50%阻害に必要な阻害剤の濃度を示す(実験手順参照)。  
 CT-L : キモトリプシン様活性, T-L : トリプシン様活性, PGPH : ペプチジルゲルタミルペプチド加水分解酵素活性, NT : Not Tested

\*\* CyT<sub>50</sub> 値は、細胞増殖の 50%阻害に必要な化合物の濃度を示す(実験手順参照)。数値は 3 つの独立した実験の平均値を表している。

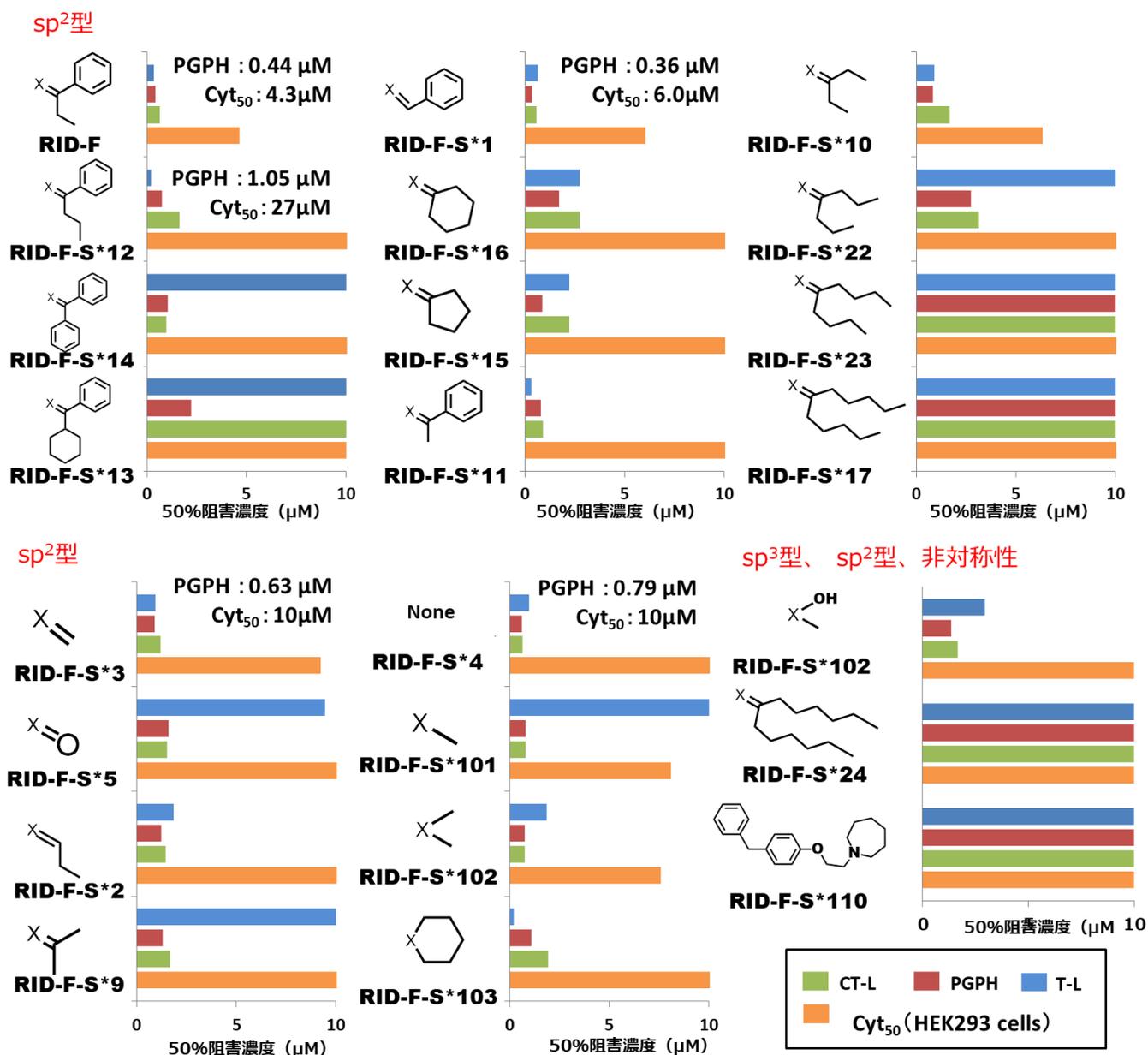


図 2-1. RID-F 誘導体構造活性相関結果一覧

表 2-2、2-3、2-4 および 2-5 の結果をまとめた。横棒は IC<sub>50</sub> を示している。各棒の色は、青：T-L 活性、赤：PGPH 活性、緑：CT-L 活性、橙：Cyt<sub>50</sub>、図中 X は各表 (2-2 ~2-4) で示されている RID-F 中心構造に対応する

## 2-2.4 RID-F 誘導体のプロテアソーム阻害の様式

RID-F (6) の酵素速度論解析を行った。その結果、精製 20S CP に対して、CT-L 活性を  $K_i$  値  $0.58 \pm 0.14 \mu\text{M}$  の非競合型の阻害様式を示し、PGPH 活性は  $K_i$  値  $0.34 \pm 0.22 \mu\text{M}$  の非競合型の阻害様式を示した (図 2-2)。他の RID-F 誘導体は、プロテアソーム CT-L および PGPH 活性に関して同様の阻害様式を示した。RID-F-S\*14 (10) および RID-F-S\*1 (13) は、CT-L 活性を非競合的に阻害し、それぞれ  $K_i$  値が  $1.10 \pm 0.22 \mu\text{M}$  および  $0.87 \pm 0.32 \mu\text{M}$  であるのに対して、PGPH 活性には競合型の阻害様式で  $K_i$  値 それぞれ  $1.02 \pm 0.15 \mu\text{M}$  および  $0.67 \pm 0.29 \mu\text{M}$  であった (データは省略する)。PGPH 活性の基質は CT-L 活性を阻害することが報告されているが、この阻害は CT-L 活性の基質結合部位ではなく、想定上の CT-L 活性の基質非拮抗型の結合によって引き起こされることが示唆されている (Myung, J., 2001)。まとめると、これらのデータから、RID-F およびその誘導体が PGPH 活性の基質部位および想定上の CT-L 活性の非拮抗型阻害部位の両方に結合し、両者の活性の阻害をもたらすものと考えられる。

RID-F 誘導体の化学構造は、プロテアソームへの共有結合が起これないものと考えられる。実際に、ビオチン結合 RID-F 誘導体によるプロテアソームサブユニットの標識は、ビオチン標識タンパク質を生じなかった (データは省略する)。belactosin A は、活性部位の Thr1 原子の O<sup>γ</sup> に共有結合を形成することにより、PGPH (β1 サブユニット) と CT-L (β5 サブユニット) の両方を付加逆的に阻害することが示されている (Heinemeyer, W. *et. al.*, 1991)。ビオチン標識化 belactosin A によって共有結合的に標識された β サブユニットは、ウェスタンブロットティングによって同定することができる。また、速度論解析は、RID-F 誘導体が PGPH 活性を競合的に阻害することを示し、β1 サブユニットの活性部位との直接的な相互作用を示唆した (図 2-2B)。

そこで、相互作用様式をさらに検証するために、RID-F 誘導体とビオチン標識化 belactosin A による標識の競合反応を調べた (Hasegawa, M. *et. al.*, 2008)。以前の報告の通り、ビオチン標識-belactosin A は、主に β1 と β5 に結合する一方で、β2 には非常に低い効率で結合する (図 2-3)。RID-F (6) および RID-F-S\*4 (25) は、ビオチン標識 belactosin A の β1 (PGPH 活性) への結合を添加濃度に応じて阻害した (図 2-3A, 23B)。いずれの化合物も非拮抗的に CT-L 活性を阻害することが酵素反応速度論解析で示されたが (図 2-2A)、予想とに反して、

これら化合物は標識 belactosin A の  $\beta 5$  への結合を競合的に阻害した。しかし、 $\beta 5$  への結合を阻害する効果は  $\beta 1$  の結合に対するよりも低かった。 $10 \mu\text{M}$  の添加濃度において、化合物は belactosin A の  $\beta 1$  への結合をほとんど完全に阻害したが、 $\beta 5$  への結合は  $100 \mu\text{M}$  でも検出可能であった。これらの結果は、RID-F 化合物が  $\beta 5$  に結合する領域が CT-L 活性部位に近接し、部分的に belactosin A の結合領域と重なることを示唆する。RID-F 誘導体の濃度 ( $10 \mu\text{M}$ ) が belactosin A の  $\beta 1$  (PGPH 活性) への結合を阻害するには、速度論解析 (図 2-1A) から決定された  $K_i$  (サブマイクロモル濃度) よりもはるかに高かった。すなわち、

(i) ビオチン標識された belactosin A の親和性は、速度論解析に使用される基質の親和性よりも高い、または (ii) 可逆的阻害剤 RID-F 誘導体が最終的に共有結合阻害剤である belactosin A に置き換えられた。また、これら RID-F 誘導体が belactosin A の  $\beta 2$  サブユニット (T-L 活性) への結合を妨げることも観察された。20S CP への陽性のコントロールとして使用された MG132 は、ビオチン-belactosin A がすべてのサブユニットに共有結合を形成するのを防いだ。一方で、RID-F-S\*110 (30) は belactosin A 結合にほとんど影響を与えなかったが (図 2-3C)、この結果はプロテアソームに対する阻害活性が最小であることと一致している (表 2-5)。

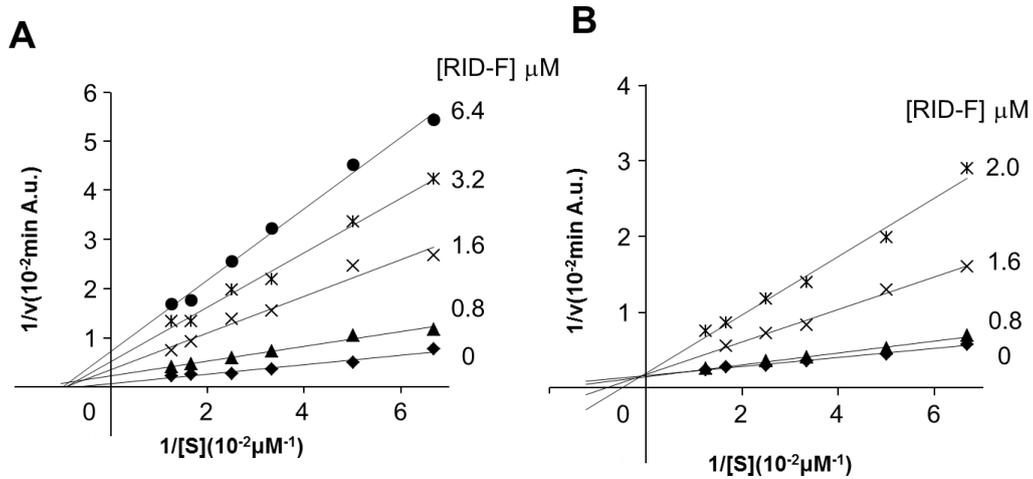


図 2-2. RID-F による 20S CP CT-L および PGPH 活性の阻害の Lineweaver-Burk プロット。A: CT-L 活性の測定。B: PGPH 活性の測定。CT-L および PGPH 活性を、基質濃度と RID-F の濃度を変化させ、蛍光定量アッセイを用いて測定した。A.U.: 蛍光の任意の単位を表す。

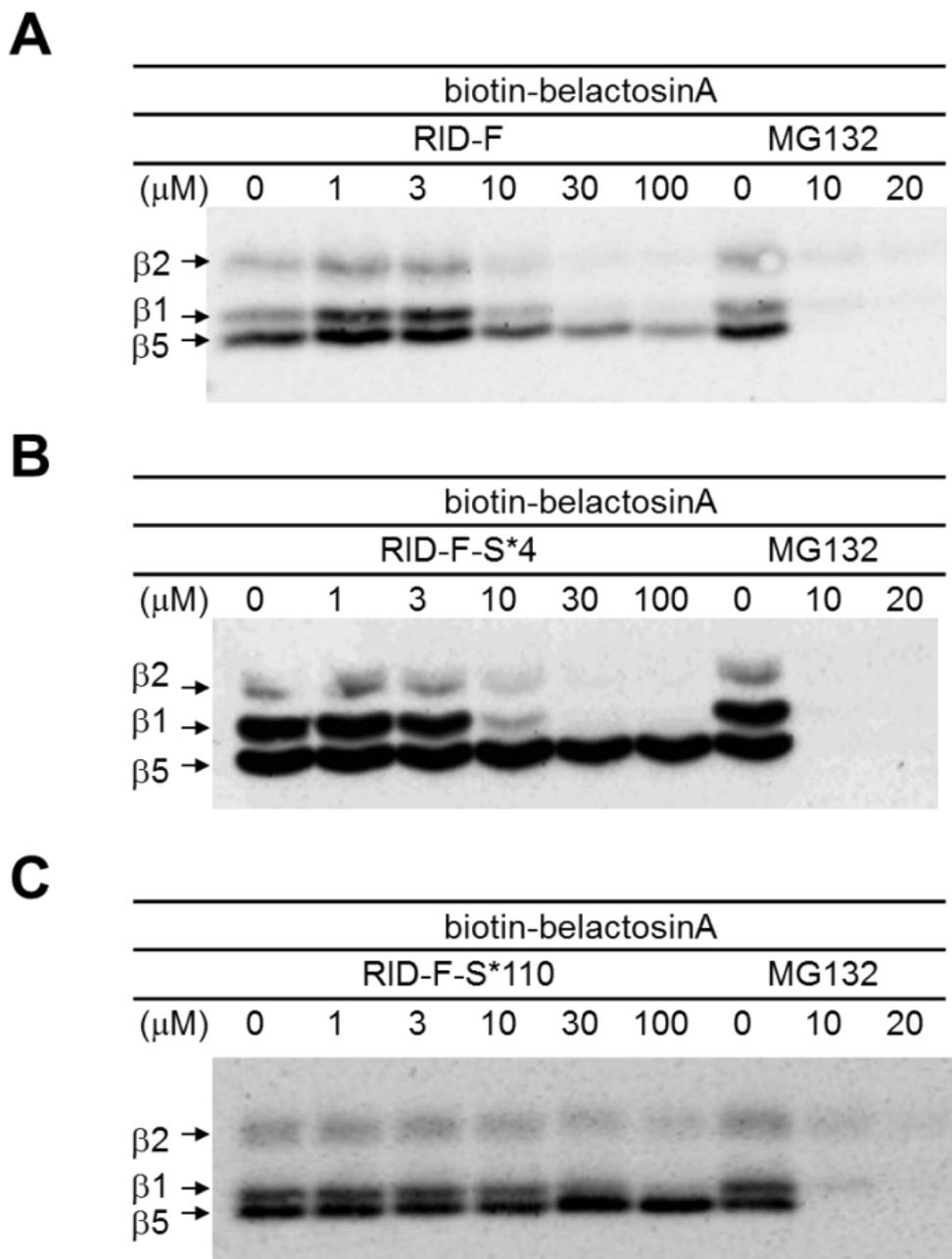


図 2-3. 20S CP へのビオチン標識 belactosin A 結合の RID-F 誘導体による競合阻害。A : RID-F (6), B : RID-F-S\*4 (25), C : RID-F-S\*110 (30) の存在下で、ビオチン belactosin A を処理した。ビオチン標識サブユニット (T-L 活性:  $\beta$ 1, PGPH 活性:  $\beta$ 2、CT-L 活性:  $\beta$ 5) が検出される。MG132 はコントロールとして使用した。

## 2-2.5 細胞増殖抑制評価

プロテアソーム阻害を介して、がん細胞の増殖を抑え、最終的にアポトーシスを誘導することが知られている。この効果を検証するために、以下の実験を行った。ヒト胚性腎由来 293 細胞 (HEK293, ER 陰性) および白血病由来 HL-60 細胞 (ER 陽性) の 2 つのヒト細胞株に対する RID-F 誘導体の増殖抑制効果を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイを用いて評価した。細胞を異なる濃度の各化合物で 48 時間処理した後、MTT アッセイで測定された、生存細胞の数から細胞増殖の 50% 阻害に必要な濃度として定義した  $CyT_{50}$  を求めた。その結果を表 2-2, 2-3, 2-4 および 2-5 にまとめた。*in vitro* での CTL 活性に対する阻害活性が低い化合物 ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) は、効果がなく、RID-F-S\*22 (19) は CTL 活性を有意に阻害したが、例外的にも細胞増殖抑制効果は示さなかった。その他のほとんどの阻害性化合物は、細胞増殖抑制効果を両方の細胞型に対して同程度に示した。例外として、RID-F-S\*12 (11)、RID-F-S\*11 (12)、RID-F-S\*6 (28) は、HEK293 よりも HL60 に対してより細胞増殖抑制効果が高かった。そして、逆に 2 種の化合物 (RID-F-S\*5 (23) および RID-F-S\*103 (29)) は、HEK293 細胞に対してより細胞増殖抑制効果を示した。

次に、RID-F 誘導体が培養細胞において、プロテアソームの機能を阻害しているかを調べた。HeLa 細胞を RID-F (6)、RID-F-S\*4 (25)、または RID-F-S\*110 (30) と共にインキュベートし、ユビキチン化タンパク質の蓄積をウェスタンブロッティングによって調べた。RID-F (6) および RID-F-S\*4 (25) (図 2-4、レーン 3 および 4) で処理した細胞は、高分子量ユビキチン化タンパク質の多数のバンドの有意な蓄積が観察された。このようなタンパク質の蓄積は、非常に阻害活性が弱い (表 2-5) RID-F-S\*110 (30) で処理した細胞では最小限であった。ユビキチン化タンパク質の蓄積は、既知のプロテアソーム阻害剤である MG132 (図 2-4、レーン 2) で処理した細胞においても観察された。これらのデータは、RID-F 誘導体が細胞においてプロテアソーム活性を阻害することを示している。

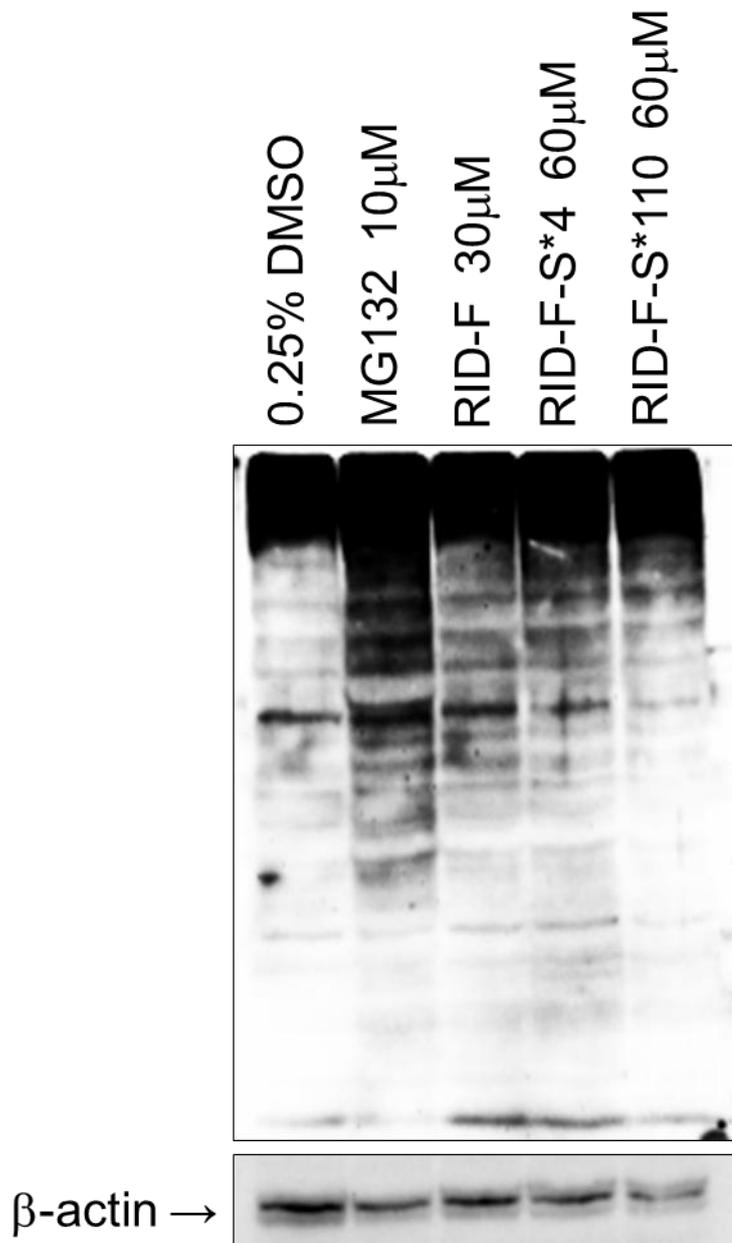


図 2-4. RID-F (6)、RID-F-S\*4 (25)、および RID-F-S\*110 (30) 処理によるユビキチン化タンパク質の蓄積。HeLa 細胞を、0.25%DMSO (コントロール)、MG132 (10  $\mu$ M)、RID-F (30  $\mu$ M)、RID-F-S\*4 (60  $\mu$ M)、または RID-F-S\*110 (60  $\mu$ M) で 24 時間処理。全細胞溶解物を抗ユビキチン抗体でイムノブロットした。  $\beta$  Actin をローディングコントロールとして使用した。

プロテアソーム活性の阻害から生じるタンパク質の異常な蓄積は、アポトーシスの誘導を含む細胞に対する増殖抑制効果を発揮する。したがって、RID-F 誘導体がアポトーシスをもたらすかどうかを調べた。3つ全てのサブユニットに結合する代表的なプロテアソーム阻害剤である MG132 をコントロール化合物として使用した。poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) の切断は、アポトーシスの特徴の1つである。RID-F (6) (図 2-5A) および RID-F-S\*4 (25) (図 2-5B) は、PARP 切断を用量依存的に引き起こしたが、RID-F-S\*110 (30) (図 2-5C) で処理した細胞では PARP 切断はほとんど検出できなかった。この化合物による結果は、プロテアソーム活性の非常に低い阻害効果と一致している (表 2-5)。RID-F が誘発するアポトーシスは、カスパーゼ 3 の切断 (補図 2-1) およびフローサイトメトリー (補図 2-2) によって決定されるサブ G1 画分の細胞の割合を増加させる事によって確認された。これらの結果は、RID-F 誘導体の細胞傷害性が、少なくとも部分的にアポトーシスを生じ得ることを示している。

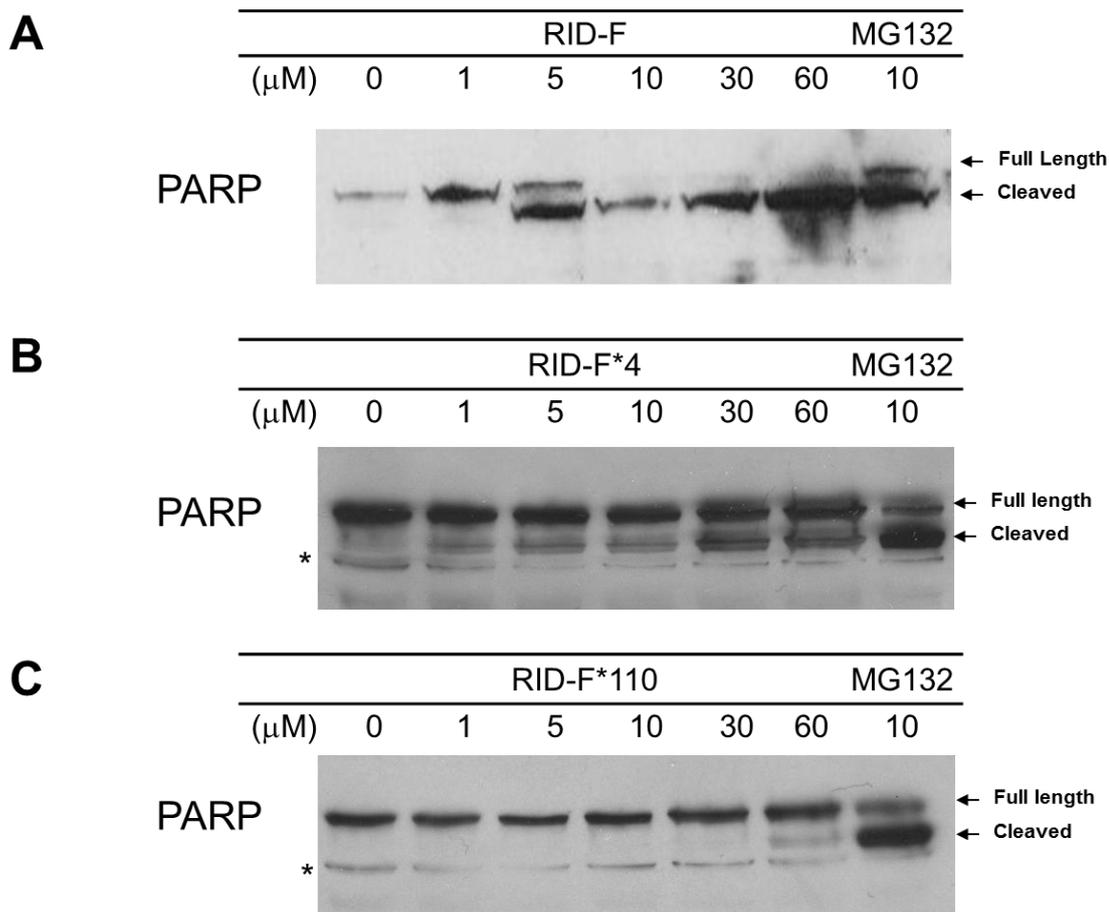


図 2-5. RID-F 誘導体によって誘導されるアポトーシス。HeLa 細胞を示される濃度で化合物とともにインキュベート後、PARP の切断をウェスタンブロッティングにより決定した。A: RID-F (6)、B: RID-F-S\*4 (25)、C: RID-F-S\*110 (30) および、プロテアソーム阻害剤である MG132 をコントロールとして使用し、アポトーシスの特徴である PARP 切断を検出した。\* = 非特異的なバンド。

## 2-2.6 RID-F 誘導体の酵母プロテアソーム サブユニット PRE3 との 3 次元結合モデリング

RID-F 誘導体は、どのようにプロテアソームに結合し、阻害効果を発揮しているのかを調査するために、計算機によるドッキングシミュレーションを実施した。この計算機シミュレーションは塩生真史准教授（長浜バイオ大学）に検討していただいた。この結合シミュレーションを実施した当時は、実験によってヒト 20S CP の立体構造の決定は、まだ報告されていなかったが、酵母プロテアソームのいくつかの立体構造は既にいくつか報告されていた。酵母とヒトプロテアソームのリガンド結合ポケットのアミノ酸配列は高度に保存されている (Tanaka, K.*et.al.*, 1992; Tanaka, K., 1998)。さらに、RID-F は酵母プロテアソーム CT-L 活性を阻害し、IC<sub>50</sub> は 1.8 μM であり、これはヒト 20S CP について決定されたもの (IC<sub>50</sub> : 0.65 μM) と同様であった (表 2-1)。これは、RID-F 誘導体の酵母およびヒトプロテアソームへの結合様式が類似していることから、RID-F 誘導体のドッキングシミュレーションに酵母プロテアソームの構造を用いた。

まず、ドッキングシミュレーションのために fellutamide B (PDB ID : 3d29) と複合体を形成した酵母 20S CP の構造データを使用した。PRE3 サブユニット (chain N) は、ヒト 20S CP β1 サブユニットに対する酵母の対応物であり、PGPH 活性を示す。このサブユニットは、β環の PUP1 サブユニット (chain H) と PRE4 サブユニット (chain M) とに挟まれており、これらの 3 つのサブユニットによって PRE3 サブユニットのリガンド結合溝が形成されている。したがって、chain H、N、および M の三量体構造をドッキングシミュレーションに使用した。Molecular Operating Environment ソフトウェア、バージョン 2010.10 (MOE 2010.10、Chemical Computing Group Inc.) を使用して、エネルギーを最小化された水素原子を有する三量体構造を、デフォルトパラメータを用いて準備した。三量体構造中のリガンドの結合可能な部位は、MOE 2010.10 の Site Finder アプリケーションを用いて検出され、Connection Distance のパラメータは、1.9Å に設定された。次いで、RID-F 誘導体および三量体構造を含むドッキングシミュレーションを ASEDock (Goto, J. *et. al.*, 2008) を用いて標準的な手順により実施した。

活性中心 Thr<sup>1</sup> 残基の近くに最も適合した阻害剤は、化合物 **6** (RID-F)、**9**、

10、 11、 12、 13、 14、 15、 20、 22、 23 からなる化合物であり、一方で（化合物 19、 21、 24、 25 (RID-F-S\*4)）は配置が異なるが、それぞれの化合物群で、同様の結合様式を示した。図 2-6 (A および B) は、RID-F と PRE3 触媒部位との間の分子相互作用を示し、ドッキングされた RID-F (6) の最高ランクの結合様式を示した。RID-F とプロテアソームとの間の相互作用における重要な点の 1 つは、S1 ポケットの Thr<sup>1</sup> 周辺の接触領域であると思われる。RID-F の中心構造中のビニルベンゼン基は、S1 ポケットと接触しており、Thr<sup>21</sup> との CH- $\pi$  相互作用を有する。接触した残基は、Thr<sup>1</sup> が底部に位置する 120Å<sup>3</sup> で結合ポケットサイズにより限界を定められている。これらのドッキングシミュレーション結果は、RID-F 誘導体中心構造のサイズが触媒部位への結合に重要であることを示す実験結果と一致している。

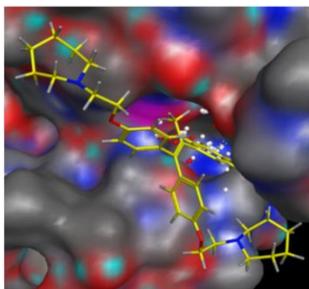
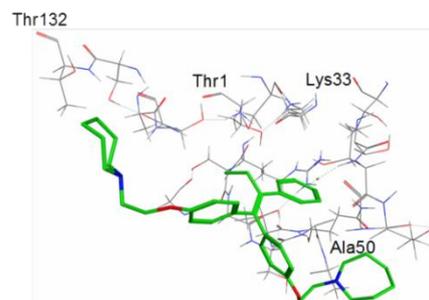
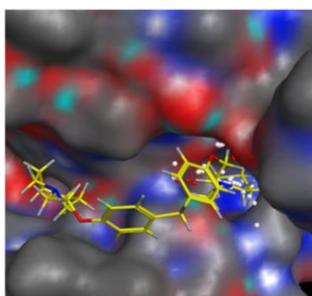
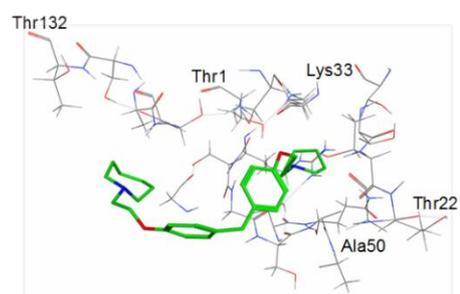
**A****B****C****D**

図 2-6. RID-F (6) (A、B) または RID-F-S\*4 (25) (C、D) とのプロテアソーム相互作用の模式図。画像 (A および C) は、最も可能性の高い結合モードを表している。結合ポケットは、炭素原子を灰色に着色し、N 原子を青色に着色し、O 原子が赤色に着色した固体表面として描画されている。B および D は結合モードの骨格モデルを示している。

例外的なケースとして、化合物 **19**, **21**, **24**、および **25** (RID-F-S\*4) を含むドッキングシミュレーションは、1つのホモピペリジン環が S1 ポケットと接触することを示した。R<sub>2</sub> 位にあるそれらの中心構造は、大きすぎるか小さすぎている。高い阻害効力を有する RID-F-S\*4 (**25**) は、中心構造が存在しないにもかかわらず、図 2-6 に示すように、異なる様式で結合をしていた。RID-F-S\*4 (**25**) の1つのホモピペリジン部分は、RID-F (**6**) のビニルベンゼン基とは対照的に、S1 ポケットの結合溝に入っていた。これらの結果は、RID-F 誘導体が触媒部位への2つの結合様式を有することを意味している。興味深いことに、化合物 **19**, **21**, **24**、および **25** (RID-F-S\*4) を含むドッキングシミュレーションの結果は、それらが化合物 **6** (RID-F) の R<sub>2</sub> 位のビニルベンゼンを介して活性部位に結合するものと異なる様式で活性部位に接触することを示唆している。代表として RID-F-S\*4 (**25**) の図 2-6 (C、D) に示すように、これらの RID-F 誘導体はホモピペリジン環の1つを介して S1 ポケットと相互作用することができる。これらの4つの化合物の R<sub>2</sub> 位の中心構造は、最適なビニルベンゼンのサイズと比較して大きすぎるか小さすぎた。したがって、2つのホモピペリジン環の存在だけではなく、R<sub>2</sub> 位の中心構造が RID-F 誘導体のプロテアソーム阻害活性を発揮するには重要であり、この構造活性相関の実験結果の正当性を強く示唆している。

## 2-3 実験手順

### 2-3.1 RID 類縁体 (A-H) および他の RID-F の D 誘導体(RID-F-S\*X)合成

これら化合物の合成は、東京理科大学・椎名勇教授により行われた。合成の法の詳細は、Hasegawa M. *et. al.*, *Eur. J. Med. Chem.* 71. 290 (2014) を参照のこと。

### 2-3.2 20S プロテアソーム蛍光基質アッセイ

各蛍光基質 Suc-LLVY-AMC、Z-LLE-AMC、および Boc-LRR-AMC の分解速度を測定することにより、CT-L、PGPH および T-L プロテアソーム活性を決定した。様々な濃度の阻害化合物 (0.01~10  $\mu\text{M}$ ) の存在下で、精製ヒト 20S CP (0.1  $\mu\text{g}$ ) を 50  $\mu\text{M}$  (CT-L) または 20  $\mu\text{M}$  (PGPH および T-L) 蛍光基質とともにインキュベートした。T-L 活性アッセイでは、SDS をアッセイ緩衝液から除外している (Tanaka, K., 1989)。反応は、AMC 生成物の生成 ( $\lambda_{\text{ex}}=380\text{nm}$ ,  $\text{em}=460\text{nm}$ ) により、37°C でアッセイ緩衝液 (25mM HEPES、0.5mM EDTA、0.03%SDS) 100  $\mu\text{l}$  中で 1 時間モニターした。プロテアソーム活性の 50% 阻害に必要な化合物濃度として定義される  $\text{IC}_{50}$  を、阻害曲線から各化合物について決定した。

### 2-3.3 増殖阻害アッセイ

HEK293 細胞 (ER 陰性) を、10% ウシ胎児血清、100 units/mL のペニシリン および 0.1 mg/mL のストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium で培養した。HL-60 細胞 (ER 陽性) を、10% ウシ胎児血清、100 units/mL のペニシリン および 0.1 mg/mL のストレプトマイシンを含有する Iscove's Modified Dulbecco's Medium で培養した。細胞を 96 ウェルプレートに  $5 \times 10^3$  cells/well の密度で播種し、培地単独または異なる濃度 RID-F 誘導体 (0.1~20  $\mu\text{M}$ ) を含む培地で 48 時間培養した。細胞生存率および増殖は、ミトコンドリアデヒドロゲナーゼによる MTT 減少の定量によって評価した。製造業者のプロトコール (Promega Corporation, Madison) に従い HCl / 2-プロパノール抽出後の 560/750nm の吸光度比を測定することにより、ホルマザン色素生成を測定した。細胞増殖の 50% 阻害に必要な化合物濃度として定義された  $\text{CyT}_{50}$  を、それぞれの阻害曲線から各化合物について決定した。

### 2-3.4 ビオチン belactosin A 標識試薬を用いた結合実験

精製ヒト 20S CP を、様々な濃度の RID-F 誘導体または MG132 と共に 37°C で 1 時間インキュベートし、次いでビオチン belactosin A を 1  $\mu$ M で添加した。さらに 1 時間のインキュベーション後、タンパク質を SDS-PAGE によって分離し、ポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜 (Millipore Canada Ltd, Etobicoke) に転写した。PVDF 膜を 5% スキムミルク溶液でブロッキングした後、ストレプトアビジン-HRP 試薬および ECL plus 検出試薬 (GENERAL ELECTRIC COMPANY, Fairfield) を用いて、ビオチン標識タンパク質を可視化した。

### 2-3.5 ウェスタンブロッティング

HeLa 細胞 ( $4 \times 10^5$  cells/well) を 12 ウェルプレートに播種し、様々な濃度の RID-F 誘導体と共に 24 時間インキュベートした。そして、細胞を溶解液 (62.5mM Tris-HCl、2% SDS、10% グリセロール、phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1mg / ml と、ロイペプチンの 10 $\mu$ g/ mL で、ペプスタチン A の 1 $\mu$ g/ mL ホスファターゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク株式会社, 京都) で溶解した。等量のタンパク質 (30  $\mu$ g) を SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜上に転写し、一次および二次抗体で標識した。抗ユビキチン抗体 (1 : 200 希釈; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas)、抗アクチン抗体 (1 : 10000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas)、および HRP 結合抗マウスまたは抗ウサギ抗体 (1 : 2,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas) を用いて検出した。

RID-F 誘導体によって誘導されるアポトーシスを HeLa 細胞で調べた。細胞 ( $4 \times 10^5$  cells/well) を 12 ウェルプレートに播種し、様々な濃度の RID-F 誘導体と共に 24 時間インキュベートした。アポトーシスの特徴である PARP の切断は、上述のウェスタンブロッティングによって検出した (Kunoh, T. *et. al.*, 2010)。

## 第三章：細胞透過性ペプチド付加 RID-F は、細胞内プロテアソームの活性を阻害し、薬剤耐性細胞の細胞死を誘導する

### 3-1 はじめに

抗がん剤として臨床的に使用されているプロテアソーム阻害剤は、これまでに 3 剤承認されている (Goldberg, A.L., 2012; Navon, A. *et al.*, 2009)。ペプチドボロン酸である Bortezomib は、多発性骨髄腫やマントリンパ腫の治療のために 2003 年に米国、2006 年に日本で承認された最初のプロテアソーム阻害に基づく抗がん剤である (Adams, J. *et al.*, 2010)。しかしながら、ファーマコフォアであるボロン酸構造は毒性を有し、深刻な副作用をもたらす。そこで、引き続いて Epoxomicin 類似体であるテトラペプチドエポキシケトン Carfilzomib (Meng, L. *et al.*, 2009; Kuhn, D.J. *et al.*, 2007) が承認された (2012 年米国、2015 年欧州、日本)。さらに、経口投与が可能で、ボロン酸をクエン酸で環状に囲んだジペプチドクエン酸エステル製剤 Ixazomib (Moreau, P. *et al.*, 2016) が再発および難治性の多発性骨髄腫の治療のために承認された (2015 年米国、欧州、2016 年日本)。血液性がんの治療に加えて、プロテアソーム阻害剤は、固形腫瘍や炎症、免疫疾患、虚血性脳卒中および結核などの有望な薬物標的として提案されている (Borissenko, L. *et al.*, 2007)。このような状況から、有効性が改善され、悪影響がより少ない新しいタイプのプロテアソーム阻害剤の開発が進められている (Beck, P. *et al.*, 2012)。

RID-F (6) は、本研究で検討したケミカルライブラリーの中で最も高いプロテアソーム阻害活性を示した。しかし、RID-F を含めてプロテアソーム阻害を示す RID-F 誘導体の細胞に対する細胞増殖阻害活性は 1 桁以上減弱しており、さらに本章で述べるように多剤耐性ヒト多発性骨髄腫細胞 (KMS-11) に対しては効果を示さなかった。薬物耐性を引き起こす要因には、細胞取り込みの低い効率性や能動的な排出、細胞内分解または不活化、特定の細胞成分への薬物の濃縮および標的タンパク質の薬物感受性に影響する変異などによって引き起こされる。個々の細胞で薬剤耐性の原因となる機序は不明であるが、薬剤取り込み

効率や能動的な排出機構は共通する機序に基づくことが多く、取り込み効率の改善は薬効を高めるための共通した戦略になるものと考えられる。

ヒト免疫不全ウイルス-1 (HIV-1) 由来の Tat タンパク質などに代表されるいくつかのタンパク質には、細胞を浸透できる能力を持つことが知られている (Frankel, A.D. *et.al.* 1988)。その能力に必要な最小ドメインは、「細胞透過性ペプチド」(cell-penetrating peptide : CPP) と呼ばれる 10~16 アミノ酸の短いペプチド配列として定義されている (Reissmann, S., 2014)。CPP は、ペプチドやタンパク質、リボ核酸、オリゴヌクレオチド模倣体、ナノ粒子など本来は細胞膜を透過できない物質に付加することでこれらを細胞内移行させることができる。CPP は、細胞膜を透過しにくい薬物をも生細胞中に移行させることができるので、ドラッグデリバリーシステムの薬剤輸送担体として活用されている。実際に、Methotrexate (Koczan, G. *et. al.*, 2002)、Doxorubicin (Rousselle, C. *et. al.*, 2009) , (Li, Y. *et. al.*, 2012) , (Zhang, P. *et. al.*, 2013) , (Biswas, S. *et. al.*, 2013) , (Liu, C. *et. al.*, 2017)、および有機金属コンジュゲート (Splith, K.*et. al.*, 2010; Hoyer, J. *et. al.*, 2012) , (Hu, W. *et. al.*, 2012) を含むいくつかの薬物に CPP 付加をした研究が報告されている。例えば、doxorubicin に結合した Tat ペプチドは、薬物感受性細胞株および薬剤耐性細胞株の両方において、薬物の細胞内濃度を有意に増加させた (Zhang, P. *et. al.*, 2013)。天然の Tat ペプチドは、6つのアルギニンと2つのリジン残基を含むいくつかのカチオン性アミノ酸からなるカチオン性ペプチドである。人口配列であるオクタアルギニン (R<sub>8</sub>) は、Tat ペプチドよりも単純な配列であるが、このコンジュゲート化合物は細胞内取り込みの効率が向上させられたことが報告されている (Futaki, S.*et. al.*, 2001; Wright, L.R. *et. al.*, 2013)。

本章では、RID-F とオクタアルギニンを含む様々なペプチドとのコンジュゲートした RID-F 誘導体を調製し、それらの 20S および 26S プロテアソームの阻害活性を評価した。興味深いことに、R<sub>8</sub> を含む RID-F コンジュゲートは、RID-F 単体と比較して、26S プロテアソーム活性に対して強い阻害活性を示した。さらに、これらの RID-F コンジュゲートは、KMS-11 細胞薬剤耐性を克服し、細胞死を誘導した。また、これらのコンジュゲートが、細胞内プロテアソームのタンパク質分解活性を阻害することを確認した。以上の結果は、非ペプチド性プロテアソーム阻害剤と CPP の結合が、腫瘍細胞の薬剤耐性を克服するための有効な戦略であることを示唆している。

## 3-2 結果

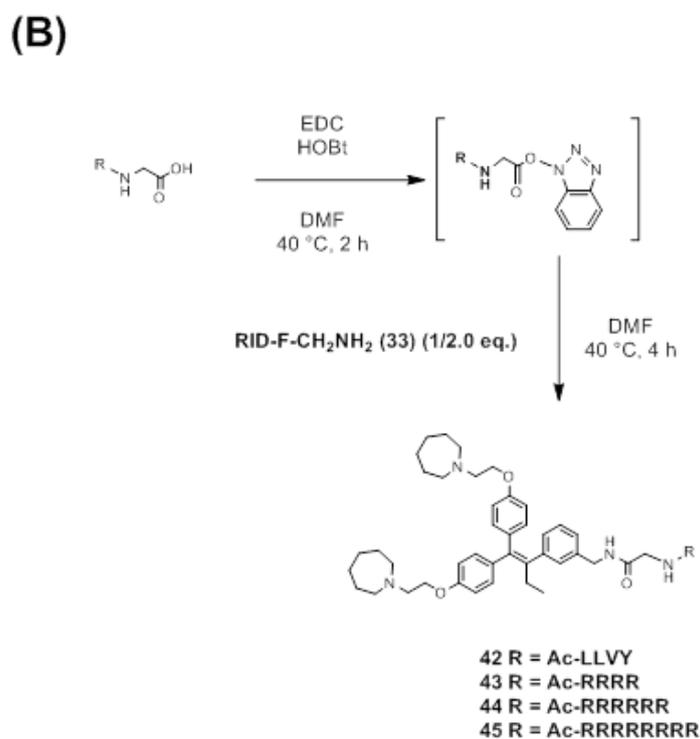
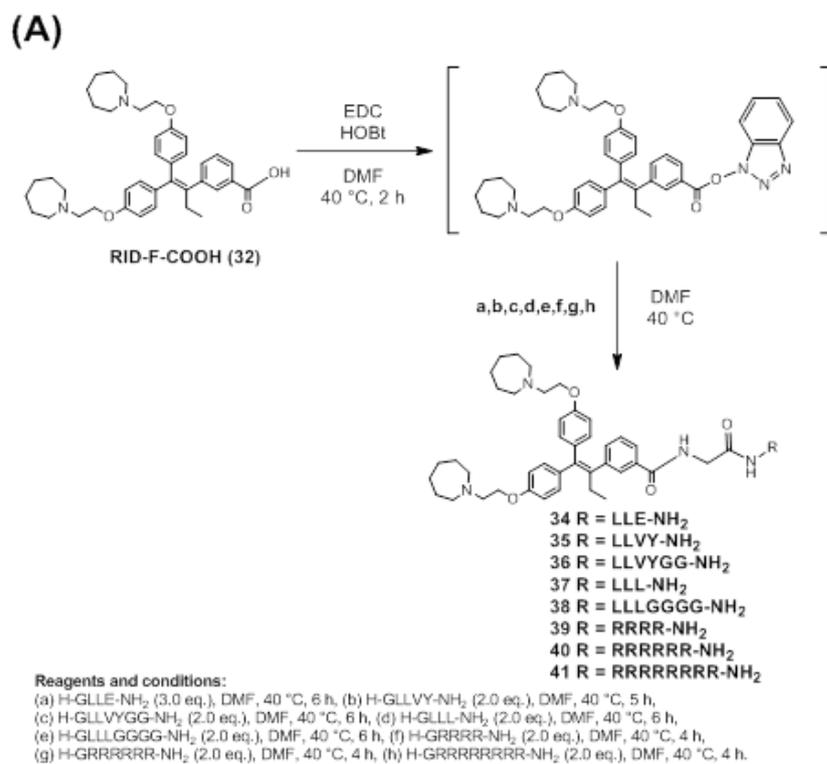
### 3-2.1 合成

ペプチド付加に用いた前駆体化合物は、椎名勇教授（東京理科大学）により提供を受けた。この詳細は、発表論文に示されている（Tanaka, M. *et. al.*, *Eur. J. Med. Chem.* 146, 636 (2018))。以下に短く合成手順を述べる。

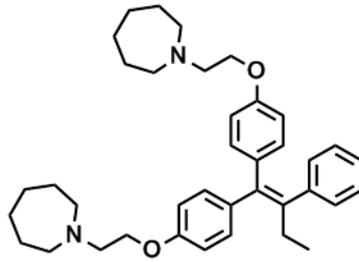
RID-F 誘導体 (RID-F-COOH (**32**) および RID-F-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (**33**)) は、補足スキーム 3-1 および 3-2 に示すように、向山還元カップリング反応によって合成された。1,3-phenylenedimethanol (**2'**) を *p*-メトキシベンジル基で保護し、中間体 **4'** の 2 炭素伸長により 1-(3'-((*p*-methoxybenzyloxy)methyl)phenyl)propan-1-one (**6'**) を得た。次に亜鉛粉末を用いて塩化チタン (IV) から生成した低原子価チタン種の存在下で **6'** を過剰量の 4,4'-dihydroxybenzophenone (**7'**) で処理して目的とするクロスカップリング生成物 **8'** を 52% の収率で得た。**8'** 中のフェノール部分を *tert*-butyldimethylsilyl (TBS) 基として一時的に保護し、最後に **14'** のアルキル化により対応するアミノエチルエーテルへ変換した。そして、四置換オレフィン **14'** 中のベンジル保護基を、アルキル化反応において求核条件下で同時に開裂させて、遊離カルボン酸部分を含んだ RID-F 誘導体 **32'** を合成した。

次に、遊離第一アミン部分を含む RID-F 誘導体 **33'** を、補足スキーム 3-2 に記載されている同様の手順を用いて合成した。アミノエチル基を収率 77% でビスフェノール **17'** に導入し、水素化リチウムアルミニウムを 77% の収率で使用してベンジルオキシム **18'** か遊離第一アミン **33'** を収率よく得た。

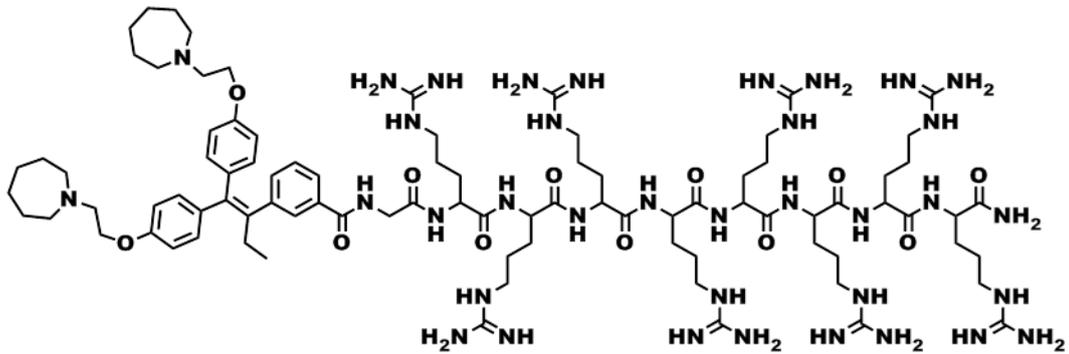
ペプチドおよび RID-F 誘導体は、アミド結合形成によってペプチドの N 末端または C 末端で連結された (スキーム 3-1)。コンジュゲーションに使用したペプチドは、RID-F 誘導体と結合した部位の反対側の末端は、アミド (C 末端) またはアセチル基 (N 末端) による修飾によって反応より保護した。代表的な化合物である RID-F (**6**)、RID-F-GR<sub>8</sub> (**41**)、および R<sub>8</sub>G-RID-F (**45**) の化学構造を図 3-1 に示す。全てのコンジュゲートの純度は、分析逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 分析および飛行時間型マトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (MALDI-TOF) 質量測定法により 95% 以上であることを確認した。また、これらの化合物の *m/z* 値は誤差範囲内で理論値と同一であった。



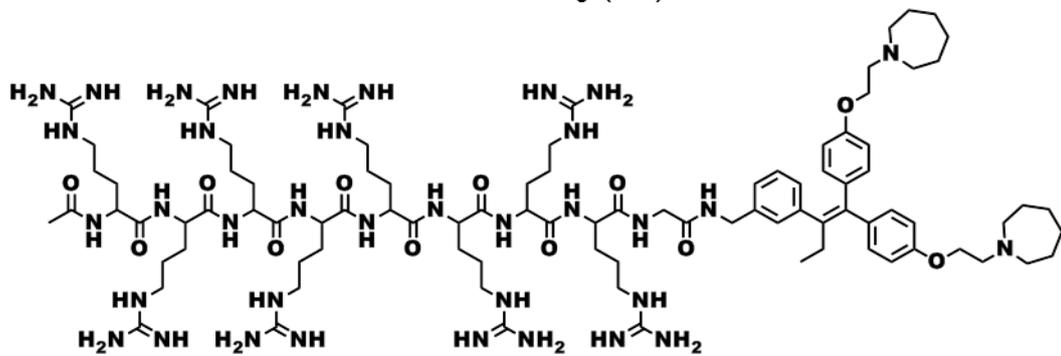
スキーム 3-1. RID-F誘導体のコンジュゲートおよびN末端(A)およびC末端(B)の付加ペプチド



RID-F (6)



RID-F-GR<sub>8</sub> (41)



R<sub>8</sub>G-RID-F (45)

図 3-1. RID-F の構造と CPP 付加体の構造

### 3-2.2 RID-F-CPP 付加体によるプロテアソーム活性の阻害

RID-F (6) およびその CPP コンジュゲート (RID-F-GR<sub>8</sub> (41)、R<sub>8</sub>G-RID-F (45)) のプロテアソーム阻害活性を評価するために、3 種のプロテアソーム活性 (PGPH、TL および CT-L) を、蛍光基質を用いて酵素アッセイにより測定した。各化合物の阻害曲線を補足図 3-1 に示す。それらの IC<sub>50</sub> 値を表 3-1 に要約した。

ペプチドを付加していない RID-F は、26S プロテアソームの CT-L、PGPH、T-L のいずれの活性も阻害しなかった。RID-F が 20S CP の PGPH および CT-L 活性を阻害したが、RID-F-GR<sub>8</sub> (41) および R<sub>8</sub>G-RID-F (45) は、20S CP の T-L 活性を阻害した。これらは 20S CP の CT-L 活性を阻害しなかったが、26S プロテアソームに対して CT-L 活性を強く阻害した。したがって、RID-F コンジュゲートの阻害活性や特異性は、プロテアソームのタイプ (20S および 26S) に依存して変化した。20S CP のゲートは、通常時に基質およびプロテアソーム阻害剤が内部に自由に入ることができないように閉鎖されている (Sledz, P. *et. al.*, 2013)。20S CP アッセイによる SDS の存在は、これらの基質や阻害剤の内部取り込みを可能にする (Tanaka, K. *et. al.*, 1989)。一方で、26S プロテアソームにおける 19S RP の AAA 環は、これらの物質が ATP 依存的に 20S 内部に入れるチャンネルを形成している。プロテアソーム阻害剤の阻害活性および特異性の変化は、2つのタイプのプロテアソームの構造的差異に起因している。事実、このような 20S と 26S での作用濃度の変化は、bortezomib、vinblastine、および lactacystin などの既知の阻害剤にも確認される (表 3-1)。しかし、構造情報だけでは、これらの変化の根底にある分子メカニズムを正確に捉えるには不十分である。メカニズムが不明であるにもかかわらず、R<sub>8</sub>を含む RID-F コンジュゲートによって 26S プロテアソームの CT-L の阻害活性を向上させたことは興味深く、さらなる化合物の評価を進めた。

表 3-1. 20S および 26S プロテアソームに対する RID-F-CPP の IC<sub>50</sub> 値

	20S IC <sub>50</sub> (μM)			26S IC <sub>50</sub> (μM)		
	81 (PGPH)	82 (T-L)	85 (CT-L)	81 (PGPH)	82 (T-L)	85 (CT-L)
RID-F (6)	0.72 ± 0.10	> 100	1.02 ± 0.02	> 100	> 100	> 100
RID-F-GR <sub>8</sub> (41)	> 50	1.2 ± 0.3	> 50	> 50	45 ± 4	5.5 ± 0.2
R <sub>8</sub> G-RID-F (45)	> 40	3.5 ± 0.8	> 40	> 40	> 40	9.4 ± 1.2
H-GR <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	> 8	> 8	> 8	> 40	> 40	> 40
Ac-R <sub>8</sub> G-OH	> 8	> 8	> 8	> 40	> 40	> 40
Bortezomib	0.7 ± 0.08	1.93 ± 0.29	0.0005 0.0004	0.019 0.005	> 40	2.1 ± 0.5
Vinblastine	4.28 ± 0.54	4.90 ± 0.34	4.58 ± 0.43	> 40	14.50 ± 2.29	> 40
Lactacystin	> 8.0	3.25 ± 0.54	0.16 ± 0.01	> 40	> 40	4.96 ± 0.17

略語：IC<sub>50</sub>：50%活性阻害濃度、CT-L：キモトリプシン様活性、T-L：トリプシン様活性、PGPH：ペプチジルグルタミルペプチド加水分解酵素活性。

データは平均±SD (n = 3) として示す。

4~10 個の Arg 残基をもつ基本的なペプチドは、サブマイクロモル濃度で 20S プロテアソームの CT-L および PGPH 活性を阻害することが報告されている (Kloss, A. *et. al.*, 2009)。しかし、本研究で用いた GR<sub>8</sub> (C 末端アミド化) または R<sub>8</sub>G ペプチド (N 末端アセチル化) のみは、20S および 26S プロテアソーム活性を阻害しなかった。このことから、RID-F-CPP コンジュゲートのプロテアソーム阻害が、ペプチドの部分に起因するものではないことが示された。

ATP は、26S プロテアソームをアッセイするために通常添加されている。ATP 加水分解が、ここでアッセイに用いられている 26S プロテアソームによる数残基の小さな基質の分解に必要であるかどうかを調べた。このために、ATP よりはるかに遅い速度で加水分解される難分解性 ATP アナログである ATP  $\gamma$  S を使用した。図 3-2A に示すように、26S プロテアソーム CT-L 活性は、ATP  $\gamma$  S の存在下で ATP 存在下よりも高かったが、20S プロテアソーム CT-L 活性には影響しなかった。したがって、ATP 加水分解は、26S プロテアソームの CT-L 活性による蛍光基質分解には必要ではない。また、当然であるが 19S RP を持たない 20S CP の基質分解には影響しない。

次に、RID-F コンジュゲートの阻害活性に対する ATP  $\gamma$  S の効果を調べた。興味深いことに、ATP  $\gamma$  S の存在下では、RID-F-GR<sub>8</sub> (41) および R<sub>8</sub>G-RID-F (45) の両方が、ATP の存在下よりも強い阻害を示した。26S プロテアソーム CT-L 活性に対する RID-F-GR<sub>8</sub> および R<sub>8</sub>G-RID-F の IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 2.4  $\mu$ M および 6.0  $\mu$ M の低い値に有意にシフトした (図 3-2B および 3-2C)。一方、ペプチド付加されていない RID-F は、ATP  $\gamma$  S または ATP いずれかの存在下でも CT-L 活性を阻害しなかった (図 3-2D)。

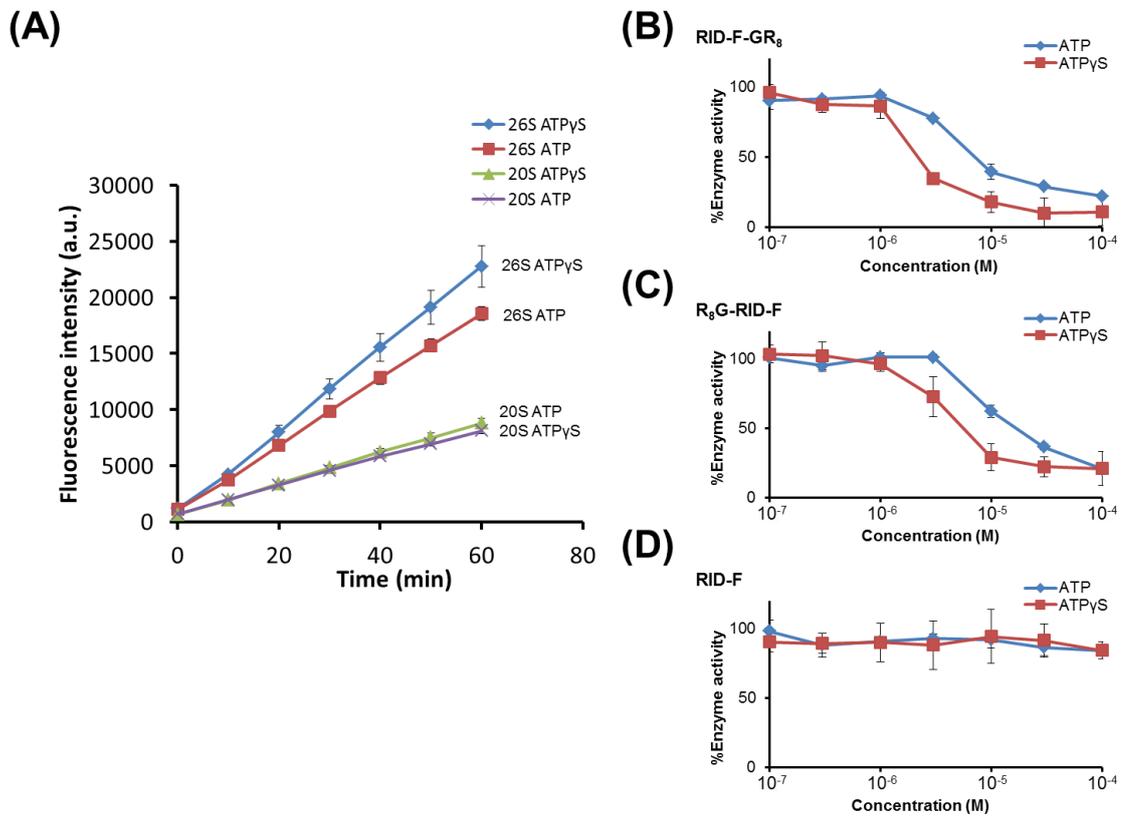


図 3-2. (A) ATP または ATP $\gamma$ S の存在下での蛍光基質分解の比較。値は 3 回の独立した実験の平均 $\pm$ SEM である。(B-D) ATP (青い丸) または ATP $\gamma$ S (赤い四角) の存在下での 26S プロテアソームの阻害。結果は、3 回の独立した実験の平均 $\pm$ SEM である。

### 3-2.3 各種ペプチドを含む RID-F コンジュゲートによるプロテアソーム阻害

RID-F に結合したペプチドの配列および長さが、20S CP と 26S プロテアソームの活性にどのように阻害活性へ影響するかを評価した。塩基性および疎水性残基を含む 9 種類の RID-F-ペプチドコンジュゲートの阻害活性を調べた。阻害曲線は補足図 3-2 にまとめている。各 IC<sub>50</sub> 値の結果は、表 3-2 に示す。また、補足的な検証として付加配列がプロテアソームにより分解されるかを調べた (補足図 3-3)。

20S CP の活性において、RID-F-ペプチドコンジュゲートの長さの異なる Arg 配列による影響を調べたところ、RID-F-GR<sub>4</sub> (39)、RID-F-GR<sub>6</sub> (40)、R<sub>4</sub>G-RID-F (43)、および R<sub>6</sub>G-RID-F (44) は、T-L 活性の有意な阻害を示した。そして、IC<sub>50</sub> の値より、RID-F-GR<sub>4</sub> (39) および RID-F-GR<sub>6</sub> (40) は、C 末端ペプチド結合体である R<sub>4</sub>G-RID-F (43) および R<sub>6</sub>G-RID-F (44) よりも約 10 倍強力であった。3 種の疎水性配列である RID-F-GLLE (34)、RID-F-GLLVY (35) および LLVYG-RID-F (42) は、CT-L および PGPH 活性を強く阻害したが、これらの活性は Arg を含んだ RID-F コンジュゲートよりも活性は弱かった。したがって、RID-F コンジュゲート中に存在するペプチドの化学的性質は 20S CP の阻害特異性に影響を与えている。塩基性ペプチドを含むコンジュゲートは T-L 活性を好ましく阻害し、疎水性ペプチドを含むコンジュゲートは CT-L および PGPH 活性の阻害に寄与している。注目すべきことに、6 個未満のアミノ酸を含むコンジュゲートのすべてが、26S プロテアソームに弱い阻害活性しか示さなかった。しかし、RID-F-GLLVYGG (36) および RID-F-LLLGGGG (38) などのより長いペプチドを有するコンジュゲートは、26S プロテアソームのより強い阻害を示した。RID-F-GR<sub>8</sub> (41) および R<sub>8</sub>G-RID-F (45) の結果と合わせて、26S プロテアソーム活性を強く阻害するためには、7 個以上のアミノ酸残基からなるペプチドの付加が必要であった。重要な点として、詳細は不明であるものの RID-F コンジュゲートのペプチド部分が 26S プロテアソームと相互作用することで、その RID-F の阻害活性向上に寄与していることを示唆している。

表 3-2. ペプチド RID-F コンジュゲートによるヒト 20S と 26S プロテアソームの阻害

	20S IC <sub>50</sub> (μM)			26S IC <sub>50</sub> (μM)		
	B1 (PGPH)	B2 (T-L)	B5 (CT-L)	B1 (PGPH)	B2 (T-L)	B5 (CT-L)
RID-F-GR <sub>4</sub> (39)	> 8	0.35 ± 0.06	> 8	> 40	> 40	> 40
RID-F-GR <sub>6</sub> (40)	> 8	0.20 ± 0.10	> 8	> 40	> 40	> 40
R <sub>4</sub> G-RID-F (43)	> 8	3.7 ± 0.3	> 8	> 40	> 40	> 40
R <sub>6</sub> G-RID-F (44)	3.3 ± 1.0	3.2 ± 0.2	> 8	> 40	> 40	> 40
RID-F-GLLE (34)	4.5 ± 0.3	> 8	6.1 ± 1.1	> 40	> 40	24 ± 1
RID-F-GLLVY (35)	0.89 ± 0.08	8.9 ± 1.2	0.89 ± 0.09	33 ± 9	> 40	26 ± 3
LLVYG-RID-F (42)	0.28 ± 0.01	> 8	0.37 ± 0.14	> 40	> 40	> 40
RID-F-GLLVYGG (36)	0.99 ± 0.04	6.9 ± 0.8	0.89 ± 0.16	22 ± 7	> 40	9.1 ± 1.0
RID-F-GLLLGGGG (38)	0.89 ± 0.08	3.8 ± 0.6	1.1 ± 0.2	17 ± 7	32 ± 3	5.0 ± 0.9

略語：IC<sub>50</sub>：50%活性阻害濃度、CT-L：キモトリプシン様活性、T-L：トリプシン様活性、PGPH：ペプチジルグルタミルペプチド加水分解酵素活性。データは平均±SD (n=3) として示す。20S CP および 26S プロテアソームの阻害を、それぞれ 0.5~8 μM および 0.1~40 μM の濃度範囲で評価した。

### 3-2.4 RID-F コンジュゲートによる細胞内プロテアソーム阻害と多剤耐性骨髄腫細胞への細胞傷害効果

26S プロテアソームの活性に対して、RID-F CPP コンジュゲートは阻害できるが、RID-F のみは阻害できない (表 3-1) ことから、多剤耐性ヒト多発性骨髄腫細胞 (KMS-11) を用いた細胞プロテアソームに対する RID-F-CPP の効果を調べた。Proteasome-Glo<sup>TM</sup> Assay kit (Promega Corporation, Madison) を用いて培養細胞の細胞内プロテアソーム活性を直接測定した。種々の濃度の RID-F (6)、RID-F-GR<sub>8</sub> (41)、および R<sub>8</sub>G-RID-F (45) を用いて、3 種の細胞内プロテアソーム活性の IC<sub>50</sub> 値を阻害曲線より求めた (補足図 3-4)。単独の RID-F は、細胞内プロテアソームの CT-L、PGPH、および T-L 活性を阻害しなかったが、R<sub>8</sub>G-RID-F および RID-F-GR<sub>8</sub> は、IC<sub>50</sub> 値は 2~8 μM であった (表 3-3)。

同様に、細胞内の ATP レベルを定量化することによって細胞生存率を測定し、各コンジュゲートの CyT<sub>50</sub> 値を決定した。表 3-3 に示すように、RID-F-GR<sub>8</sub> および R<sub>8</sub>G-RID-F は、同等の濃度 (Cyt<sub>50</sub> = 4~8 μM) で細胞死をもたらした。注目すべき点として、これら RID-F-CPP は、同等の濃度でプロテアソームおよび細胞生存に阻害効果を発揮した。図 3-4 は、10 μM の各化合物の存在下で培養した KMS-11 細胞の時間依存的死を示している。生存細胞数は、RID-F-GR<sub>8</sub> または R<sub>8</sub>G-RID-F の存在下で 6 時間培養すると顕著に減少したが、遊離 RID-F の効果は検出できなかった。

表 3-3. KMS-11 細胞および RPMI8226 細胞の細胞内プロテアソーム阻害と細胞生育阻害効果

	KMS-11			Cyt <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	RPMI8226			Cyt <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)				IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)			
	CT-L	PGPH	T-L		CT-L	PGPH	T-L	
RID-F (6)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11.0 $\pm$ 0.8	N.D.	N.D.	3.6 $\pm$ 0.6
RID-F-GR <sub>8</sub> (41)	6.3 $\pm$ 1.6	4.8 $\pm$ 0.8	8.0 $\pm$ 1.8	7.2 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 0.2	6.6 $\pm$ 0.2	N.D.	4.3 $\pm$ 0.3
R <sub>8</sub> G-RID-F (45)	2.1 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 1.2	4.1 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.6	3.1 $\pm$ 0.1	N.D.	2.7 $\pm$ 0.4
H-GR <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ac-R <sub>8</sub> G-OH	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
cisplatin	-	-	-	N.D.	-	-	-	1.18 $\pm$ 0.88

略語、N.D. : 検出されない、IC<sub>50</sub> : 50%活性阻害濃度、CT-L : キモトリプシン様活性、T-L : トリプシン様活性、PGPH : ペプチジルグルタミルペプチド加水分解酵素活性。 データは平均 $\pm$ SD (n = 3) として示す。

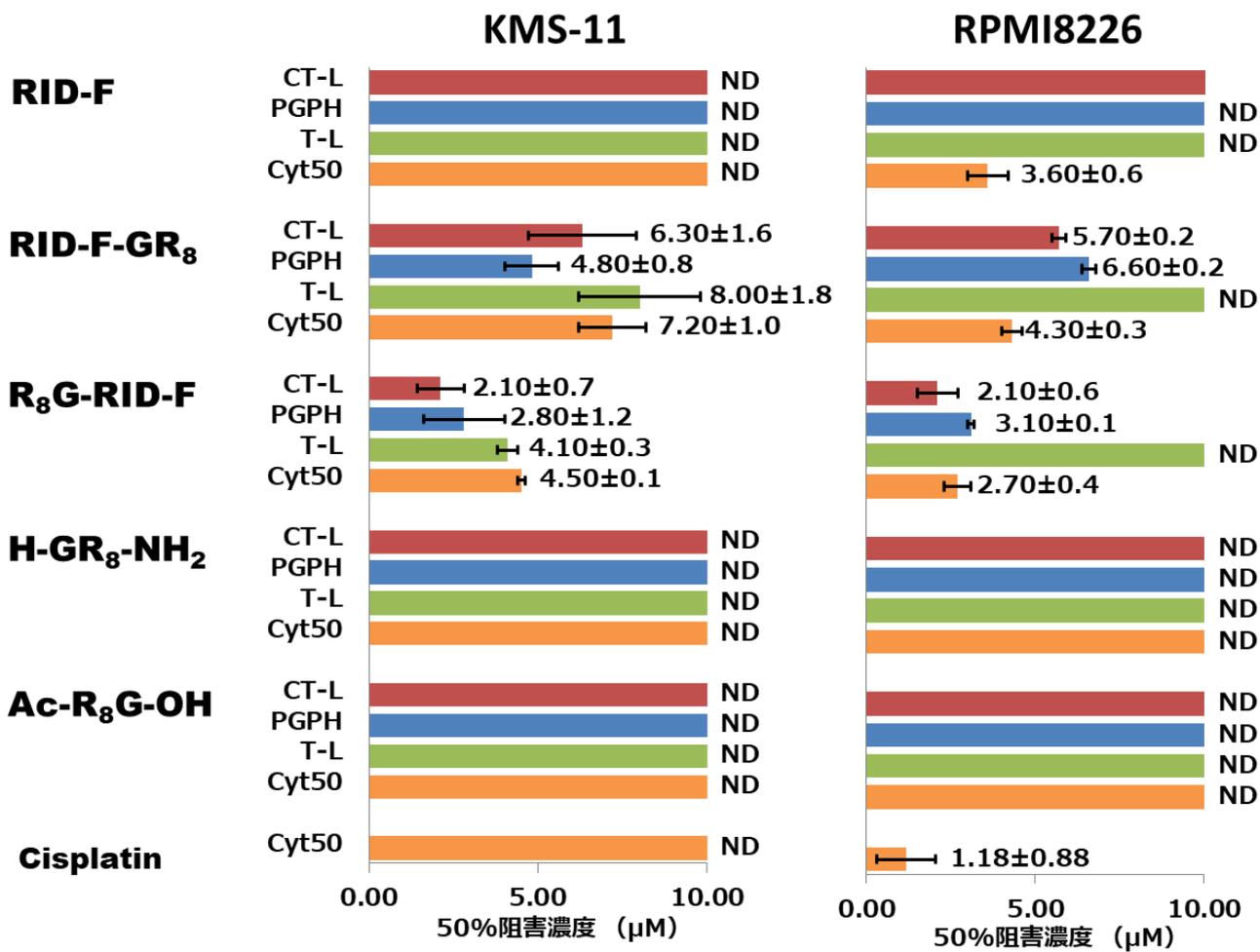


図 3-3. RID-F-CPP による MM 細胞への阻害効果

表 3-3 の結果をまとめた。横棒は IC<sub>50</sub> を示している。各棒の色は、活性、赤：CT-L、青：PGPH 活性、緑：T-L 活性、橙：Cyt<sub>50</sub>

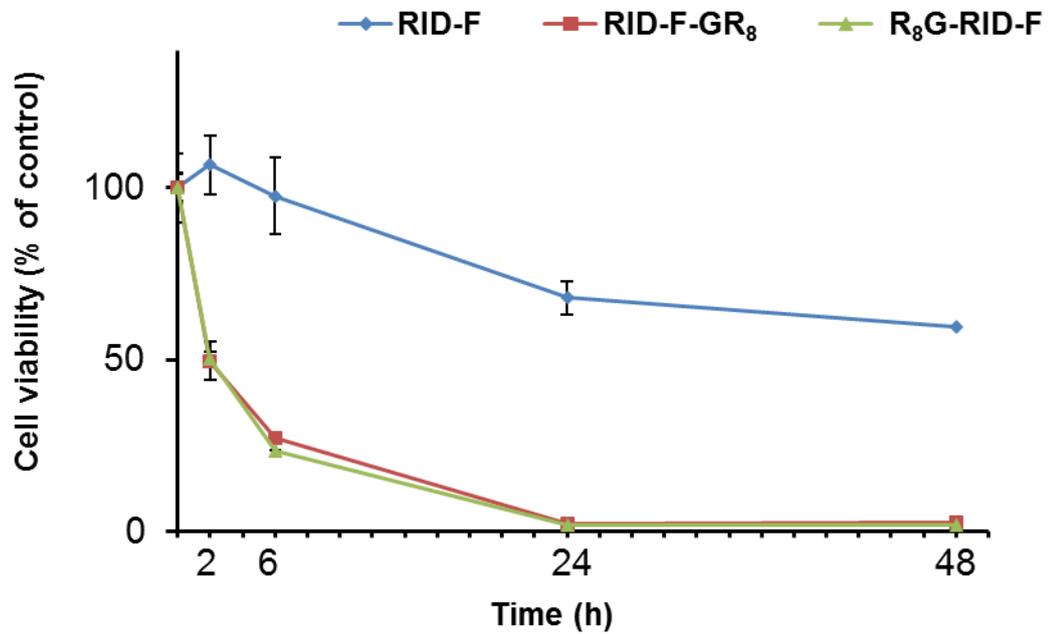
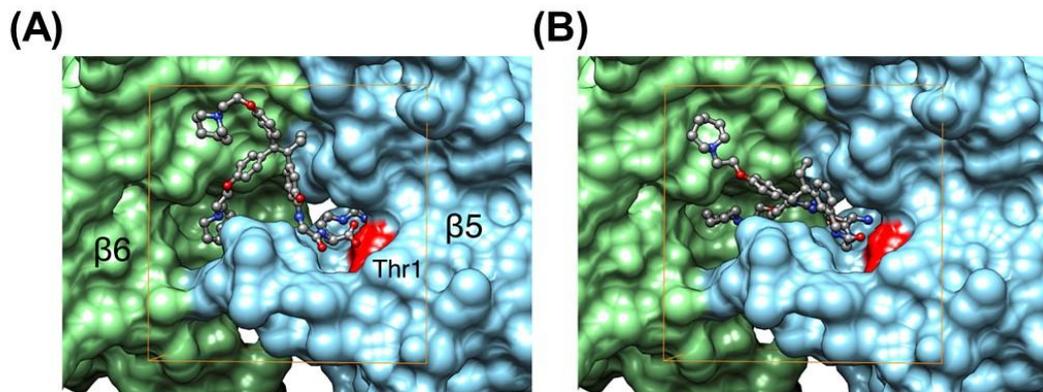


図 3-4. ATP アッセイによる RID-F (青色の円)、RID-F-GR<sub>8</sub> (赤い四角形) および R<sub>8</sub>G-RID-F (緑色の三角形) 添加濃度 10 $\mu$ M での KMS-11 細胞生存率の時間依存性。擬似処理細胞の生存率を標準 (100%) として用いた。結果は、3 回の独立した実験の平均 $\pm$ SEM である。

### 3-2.5. ドッキングシミュレーション

RID-F ペプチドコンジュゲートがどのようにプロテアソームに結合し、その阻害効果を発揮するかを決定するために、AutoDock Vina (Trott, O. *et. al.*, 2010) を計算に用いたドッキングシミュレーションを塩生真史准教授 (長浜バイオ大学) にしていただいた。ヒトプロテアソームのいくつかの立体構造が報告されている。RID-F-GR (図 3-4A) と RG-RID-F (図 3-4A) の結合様式を推定するために、dihydroeponeycin と複合体を形成したヒト 20S プロテアソームの構造データを用いた (Protein Data Bank ID : 5lf1 (Schrader, J. *et. al.*, 2016))。RID-F-GR (図 3-4A) および RG-RID-F (図 3-4B) の推定結合モードは、それぞれ 23 および 26 のドッキングポーズからなるクラスターから得た。RID-F-GR および RG-RID-F の推定結合親和性は、-9.1 (100 ドッキングで 2 番目に高い値) と -9.5 kcal/mol (100 ドッキング中のトップ) であった。RID-F-GR の推定結合様式において、RID-F-GR 中の Arg 残基のグアニジル基は  $\beta 5$  サブユニットの S1 ポケットに入り、2 つのホモピペリジン環は  $\beta 6$  サブユニットと相互作用した (図 3-4A)。RG-RID-F については、2 つのホモピペリジン環もまた  $\beta 6$  サブユニットの RID-F-GR 結合に使用されるものと同様の部位に相互作用したが、Arg の主鎖のアミノ基はグアニジル基の代わりに S1 ポケットに入った (図 3-4B)。

第二章の研究の中で、RID-F のビニルベンゼン基またはいくつかの RID-F 誘導体のホモピペリジン環が  $\beta 1$  サブユニットの S1 ポケットと相互作用するために重要であることを示唆されている (Hasegawa, M. *et. al.*, 2014)。シミュレーションされた RID-F-GR および RG-RID-F の推定結合様式は、ホモピペリジン環使用の異なる様式が CPP 結合 RID-F とプロテアソームとの間の相互作用に重要であることが示唆された。本章での結果から、アミノ酸部分の主鎖方向は RID-F-GR と RG-RID-F で異なっていたが、推定結合様式は類似していた。S1~S5 ポケットからなる基質結合溝は、アミノ酸部分と S1 ポケットおよび RID-F 部分と  $\beta 6$  サブユニットとの相互作用のためにほぼ埋められていた。この結合様式は、基質に対して拮抗的に CPP 結合 RID-F が阻害効果をもたらすことを支持した。



**図 3-4.** ヒトプロテアソームの CT-L 部位との RID-F-GR (A) および RG-RID-F (B) のドッキングシミュレーション。ヒトプロテアソームの  $\beta 5$  および  $\beta 6$  サブユニットは、それぞれシアンおよび緑色で着色された表面モデルとして示されている。 $\beta 5$  サブユニットの Thr1 は赤色に着色されている。ドッキングされた RID-F-GR および RG-RID-F は、炭素、窒素および酸素原子がそれぞれ灰色、青色および赤色のボール・アンド・スティックモデルとして示している。オレンジ色の線は、AutoDock Vina を実行するためのドッキンググリッドボックスの境界線を示す。全ての画像は、UCSF キメラ 1.11.2 (Pettersen, E.F. *et. al.*, 2004) を用いて生成した。

### 3-3 考察

26S プロテアソームに対して、RID-F がそのタンパク質分解活性をほとんど阻害しないことを示した。さらに、RID-F は、多剤耐性ヒト骨髄腫細胞株である KMS-11 細胞にほとんど効果がないことが示された。そこで RID-F のこれらの欠点を克服するために、種々の RID-F ペプチドコンジュゲートを合成した。細胞内プロテアソームの阻害に関して、RID-F-ペプチドコンジュゲート中のペプチド部分に 2 つの機能を期待した。第 1 に、ペプチド部分がプロテアソームによって基質として認識され、それによりコンジュゲートが 20S CP 内部の進入が促進される。第 2 に、RID-F-CPP は、細胞膜透過ペプチドによって細胞への浸透を促進し、それによって RID-F の細胞内濃度をプロテアソーム阻害に十分なレベルまで増加させる。実際に、R<sub>8</sub>を含む RID-F コンジュゲートが、26S プロテアソームだけでなく、KMS-11 細胞内プロテアソームも阻害することを見出した。そして、これらの化合物は細胞死を誘導した。興味深いことに、これらのコンジュゲートは、26S プロテアソーム CT-L 活性のみを阻害したが、KMS-11 細胞において 3 つのタンパク質分解活性の全てを阻害した。その理由は不明であるが、単離された 26S プロテアソームに欠けている未知の細胞内因子を含む可能性がある。

26S プロテアソームに対する RID-F ペプチドコンジュゲートの阻害活性は、ペプチドの長さおよび化学的性質に依存していた。阻害には、少なくとも 7 残基のアミノ酸からなるペプチドが必要であった。注目すべきことに、疎水性ペプチドは、R<sub>8</sub>に匹敵する効力で 26S プロテアソームの CT-L 活性を阻害した。しかし、疎水性ペプチドを含む RID-F コンジュゲートは、細胞の生存に影響を与えなかった（未発表データ）。この結果は、これらのコンジュゲートが効率的に細胞に侵入できないことを示唆している。それにもかかわらず、これは RID-F コンジュゲートのさらなる改善のための有益な知見である。

26S プロテアソームおよび ATP $\gamma$ S を用いた実験結果は、ATP 加水分解は必要ないが、19S RP が CT-L 活性部位への基質侵入にとって重要であることを明らかに示している。また、基質分解の反応速度を比較すると、ATP より ATP $\gamma$ S の存在下で高い CT-L 活性が見られることから、ATP 加水分解は、基質の侵入を防ぐ場合もあるとわかる。ATP 加水分解は、分解前に大きなタンパク質のアンフォールディングのために必要とされており、これは ATP $\gamma$ S の存在下での 26S

プロテアソームの低温電子顕微鏡分析と一致している (Sledz, P. *et. al.*, 2013; Unverdorben, P. *et. al.*, 2013; Schweitzer, A. *et. al.*, 2016; Chen, S. *et. al.*, 2016)。すなわち、ペプチドと折り畳まれていないタンパク質の 26S プロテアソーム分解は、ATP 結合を必要とするが ATP 加水分解は必要としない。ATP の代わりに ATP  $\gamma$  S が存在すると、19S RP を活性コンフォメーションで保持することができ、基質取り込みをするゲートが長時間開いた状態で保持される。

予想外に、RID-F-GR<sub>8</sub> および R<sub>8</sub>G-RID-F は、ATP  $\gamma$  S の存在下で ATP よりも 26S CT-L 活性のより高い阻害を示した。現在のところ、正確な理由は不明であるが、これらの化合物の 20S CP 内部への侵入は、基質と同様に刺激され、何らかの形で、CT-L 活性部位に高効率で接近できる。分子ドッキングシミュレーションにおいて、ギブス自由エネルギー変化は、RID-F-GR および RG-RID-F が、好ましくは CT-L 活性部位に結合することを示した (データは省略する)。

既存の報告により、KMS-11 細胞は、多剤耐性関連タンパク質 MRP2 と相互作用する PDZK1 タンパク質の過剰発現を介していくつかの抗がん剤に対して抵抗性であることが示されている (Kool, M. *et. al.*, 1997; Kocher, O. *et. al.*, 1999)。MRP2 は排出トランスポーターであり、PDZK1 は標的タンパク質の細胞内局在を仲介している (この場合、原形質膜への MRP2 の局在化)。RID-F-GR<sub>8</sub> (41) および R<sub>8</sub>G-RID-F (45) は、KMS-11 細胞におけるプロテアソーム活性を阻害するだけでなく、迅速に細胞死を誘導した。26S プロテアソームの結果と合わせて、RID-F-CPP 中の R<sub>8</sub> ペプチドは、20S CP 内部への薬剤侵入を促し、かつ細胞取り込み効率を向上させる 2 つの機能を持つと考えられる。さらに、R<sub>8</sub> は、CT-L 活性部位の近傍へ薬剤を接触させる効率を増加させることに寄与している。しかしながら、1  $\mu$ M の RID-F コンジュゲートの存在は、KMS-11 細胞に対する細胞傷害性が低く、RID-F コンジュゲートのさらなる構造改善が必要であることを示した。CPP の研究が発展するにつれて、高い選択性で効力を発揮する腫瘍細胞を標的とした CPP を用いたドラッグデリバリーシステムが利用可能になるであろう (Reissmann, S., 2014; Ruoslahti, E., 2017)。

### 3-4 実験手順

#### 3-4.1 RID-F-COOH および RID-F-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> の合成

ペプチドコンジュゲートに用いた RID-F-CPP の前駆体化合物の合成は、東京理科大学・椎名勇教授により行われた。合成法の詳細は、Tanaka, M. *et. al.*, *Eur.J. Med. Chem.* 146, 636 (2018) を参照。

#### 3-4.2 RID-F ペプチドコンジュゲートの作成

ペプチドコンジュゲートを得るために、ペプチドを、100 当量の TEA を含む DMF 中で、カルボキシ基またはアミノ基を持つ等モルの RID-F 誘導体と 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC) および 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) と反応させた。すべてのペプチドは、標準的な方法に従って 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) 化学を用いて合成した。40°C で 6 時間インキュベートした後、逆相カラム (COSMOSIL, <sub>5</sub>C<sub>18</sub>-AR-II, 4.6 × 150 mm, ナカライテスク株式会社, 京都) を備えた HPLC システム (Gilson, Inc., Middleton) によって反応混合物から標的コンジュゲートを精製した。HPLC は、水中の 0.05% トリフルオロ酢酸中の 5-50% アセトニトリルの直線勾配で 1 mL/min の流速で実施した。目的物であるコンジュゲートの純度は、Spiral-TOF JMS-S3000 質量分析計 (日本電子株式会社, 東京) を用いて確認した。

#### 3-4.3 細胞培養

RPMI8226 および KMS-11 細胞株は、RIKEN BRC Cell Bank (千葉) および JCRB Cell Bank、国立生物医学研究所栄養健康研究所 (大阪) から入手した。細胞は、10% ウシ胎仔血清、100 units/mL ペニシリン、および 100 μg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培地 (ナカライテスク株式会社, 京都) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。

#### 3-4.4 プロテアソーム蛍光基質アッセイ

Suc-LLVY-MCA、Z-LLE-MCA および Boc-LRR-MCA の分解速度をそれぞれ測定することにより、CT-L、PGPH および T-L プロテアソーム活性を測定した。精製されたヒト 20S プロテアソーム (0.1  $\mu\text{g}$ , Enzo Life Sciences Inc., NY) を、試験用緩衝液 (25 mM HEPES [pH 8.0], 0.5 mM EDTA, 0.03% SDS) (Tanaka, K. *et. al.*, 1989) 100  $\mu\text{L}$  中で、種々の阻害化合物濃度 (0.1~10  $\mu\text{M}$ ) の存在下で、蛍光基質ペプチド (50  $\mu\text{M}$ ) を添加した。反応混合物中の放出された 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) ( $\lambda_{\text{ex}}= 380\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}= 480\text{nm}$ ) の蛍光を 37°C で 1 時間モニターした。また、精製した 26S プロテアソーム (0.1  $\mu\text{g}$ ) についての化合物 (0.1~40  $\mu\text{M}$ ) の阻害活性は、上記と同様の条件を用いたが、異なる試験用の緩衝液 (50 mM HEPES [pH 7.5], 40 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{g}$  のウシ血清アルブミン、0.5 mM ATP、1 mM のジチオスレイトール) を用いた。プロテアソーム活性の 50% 阻害に必要な化合物濃度として  $\text{IC}_{50}$  値を定義し、それぞれの阻害曲線から各化合物について決定した。

#### 3-4.5 細胞生育阻害アッセイ

RPMI8226 および KMS-11 細胞を、96 ウェルプレートに  $5 \times 10^2$  cells / well の密度で播種し、DMSO に溶解した種々の濃度 (0.1~10  $\mu\text{M}$ ) の阻害化合物と共に 24 または 48 時間インキュベートした。細胞内 ATP の量は、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison) を用い、添付された手順に従って測定した。

#### 3-4.6 細胞内プロテアソーム活性の測定

RPMI8226、KMS-11 (Namba, M. *et. al.*, 1989) 細胞を、96 ウェルプレートに  $5 \times 10^3$  cells/well の密度で播種し、終濃度 0.5% の DMSO に溶解した様々な濃度 (0.1~10  $\mu\text{M}$ ) の阻害剤で 24 または 48 時間インキュベートした。Proteasome-Glo™ Assay (Promega Corporation, Madison) 試薬 (Moravec, R.A. *et. al.*, 2009) を製造元の手順に従って添加した。このアッセイは、アミノルシフェリンに結合したペプチドからなる発光基質が、界面活性剤含有緩衝液と共に添加される段階で直接細胞の溶解がされる。緩衝液含有ルシフェラーゼの基質であるアミノルシフェリン色素生成を、15 分間のインキュベーション後に測定した。

### 3-4.7 ドッキングシミュレーション

AutoDock Vina バージョン 1.1.2 (ADV) (Trott, O. *et. al.*, 2010) を用いて、RID-F-GR および RG-RID-F をヒト 20S プロテアソームの CT-L 部位にドッキングするために、以下のように構造データを調製した。

既知のヒト 20S プロテアソーム構造データから、2.0Å の分解能で決定された dihydroeponemycin (PDB ID : 5lf1 (Schrader, J. *et. al.*, 2016)) との複合構造を選択した。dihydroeponemycin との結合には  $\beta 5$  と  $\beta 6$  サブユニット (chain K と L) が形成されているため、溝は CT-L 部位と考えられ、chain K と L の二量体構造をドッキングに用いた。二量体構造を回転させて、dihydroeponemycin の結合部位を ADV 実験 (図 3-4) のドッキンググリッドボックス (24×24×20Å) に適合させ、MGL Tools バージョン 1.5.6 (Vainio, M.J. *et. al.*, 2007) を用いて PDBQT フォーマットに変換した。ドッキンググリッドボックスの中心座標は、dihydroeponemycin に結合したアミノ酸残基の中心に基づいて決定した。リガンドの一部がプロテアソーム 20S CP の外側に結合するのを防ぐために、ドッキンググリッドボックスの中心座標をわずかに手動で動かした。

ADV 計算における RID-F-GR のジペプチド部分 (Gly-Arg) を適切に扱うために、RID-F-GR の 3次元原子座標を 2段階で生成した。まず、RID-F-G の 3次元原子座標は、Balloon (Pettersen, E.F. *et. al.*, 2004) のデフォルトのパラメータを用いて 2次元表現から生成された。次に、Molecular Operating Environment ソフトウェアバージョン 2015.1001 (MOE 2015.1001) の Protein Builder 機能を使用して、RID-F-G 構造の Gly の C 末端に Arg の 3D 原子座標を加えた。さらに、ドッキングの初期構造を得るために、MOE2015.1001 の LowModeMD を用いた立体構造検索機能を実施した。立体構造検索から得られた最初にランク付けされた構造は、MGL ツールを使用して PDBQT 形式に変換された。同様に、Balloon と MOE 2015.1001 を用いて、ドッキングの初期構造に対する RG-RID-F の 3次元原子座標を生成した。

10 回の ADV 実験は、exhaustiveness (1024) および num\_modes (10) を除いて、デフォルトパラメータを用いて計算した。10 回の ADV 実験から得られた 100 個のドッキングポーズを、各ドッキングポーズの間の Root Mean Square Deviation 下限 (l.b.RMSD) 値を使用し、2.0 l.b. RMSD のカットオフ値でグルー

プ化した完全連鎖クラスタリングによってクラスター化した。最大クラスターからの最高得点ドッキングポーズが、推定結合モードとして選択された。

## 結論

新規な tamoxifen 誘導体 RID-F が、ヒト 20S プロテアソームに対して非拮抗型の阻害様式を持ってサブマイクロレベルでプロテアソームの 3 つのプロテアーゼ活性のすべてを阻害した。RID-F の活性評価の手段として多数の RID-F 誘導体を用いた構造活性相関によって新規化合物 RID-F のプロテアソーム阻害活性を有する最小構造 (RID-F-S\*4 (25)) を明らかにした。また、RID-F とプロテアソーム触媒中心との相互作用が、酵素速度論に基づいた手法および活性サイトに対して不可逆的に結合する標識試薬 (biotin-belactosin A) を使用した競合実験によって示された。この結果に基づき RID-F のプロテアソーム阻害のモデルが計算され、RID-F が従来のプロテアソーム阻害剤には無い非共有的な結合様式によって阻害活性を発揮していることが示唆された。ヒト培養細胞にこれらの化合物を処理すると、ユビキチン化タンパク質の蓄積およびアポトーシスの誘導が起こった。したがって、RID-F 誘導体は、新しいクラスのプロテアソーム阻害剤のための有用なリード化合物になりえる事が分かった。しかし、RID-F は 20S プロテアソームのタンパク質分解活性を強力に阻害するが、26S プロテアソームのタンパク質分解活性をほとんど阻害しなかった。この解決方法として細胞膜透過ペプチドの付加を行うことで薬効の増強を図った。種々のペプチドを付加した RID-F ペプチドコンジュゲートの結果は、付加されたペプチドがプロテアソームの基質様の役割を果たしていることを示唆している。しかしこれは、ドッキングシミュレーションの結果から予測される、RID-F の阻害活性には、活性サイトの容積を丁度よく満たせるサイズが中心構造に必要である事と、付加したペプチドのサイズ上で相反している。そのため、20S CP 中で付加ペプチドが酵素活性により分解され、そのサイズを小さくしていることが予想される。予想される付加ペプチドの基質様の振る舞いは、精製 20S および 26S プロテアソームによる阻害実験の触媒活性選択性に変化を与える結果 (表 3-1) から支持され、図 3-4 のドッキングシミュレーションもプロテアソームの触媒活性によって分解を受けた RID-F-CPP が、活性サイトへ相互作用することを強調している。

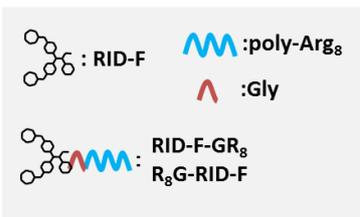
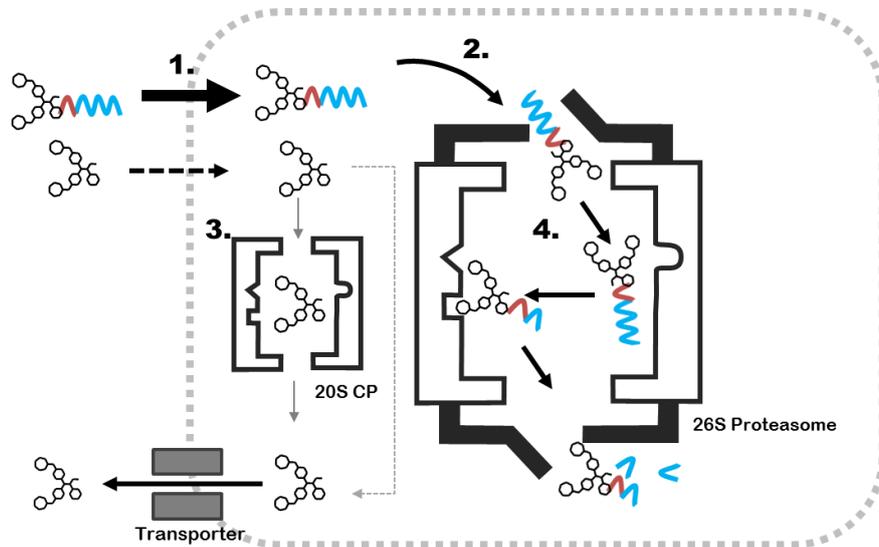
これらの結果を集合的に図 4-1 に提示し、予想されるメカニズムを図示した。RID-F (6) の構造は、疎水的な基本骨格と親水的な側鎖を持つことで細胞膜を効率よく透過できることが示唆される。これは薬剤感受性細胞に対して薬効を

発揮することから分かる。しかし RID-F は、26S プロテアソームに対して選択性を持たないため、19S RP を含まない 20S 形態のプロテアソームに対して作用していると考えられる。そして薬剤耐性株である KMS-11 に対して薬効を発揮しないため、RID-F は薬剤排出ポンプを介した能動的な働きによって容易に排除されてしまうため KMS-11 細胞に対して有効性が無いと考えられる。しかし、RID-F に対して細胞膜透過配列である R<sub>8</sub> を付加した RID-F-GR<sub>8</sub> (41) および R<sub>8</sub>G-RID-F (45) は、CPP の効果によって薬剤透過性が向上している。また、ペプチド付加による全体サイズの増大が薬剤排出ポンプからの排除に抵抗することが報告されている (Zhang, P. et. al., 2013)。その結果、RID-F-CPP の細胞内濃度は RID-F と比較して高く維持され、付加された CPP の構造が、19S RP の通過を容易にするため、付加ペプチドが基質様に振舞い効率的に 20S CP 内部へ取り込まれることが分かる。そして、取り込まれた RID-F-CPP は、ペプチドに含まれるアミノ酸の性質 (疎水性、塩基性、酸性) にしたがって、ペプチドが切断され、1 つまたは 2 つのアミノ酸に結合した RID-F は、切断前のものと比較して塩基性の度合いが低下するため、主に CT-L 部位へ結合し阻害活性を発揮する。

この研究は、新規プロテアソーム阻害剤 RID-F の構造活性相関に基づいた手法によって、阻害様式ならびに作用モデルを予測して非共有結合性のプロテアソーム阻害剤の利用可能性を検討した。実験の結果から RID-F のようなプロテアソームの活性中心に対して、可逆的な非共有結合性の構造であっても、活性中心の S1 ポケットにはまり込むことで阻害活性を発揮できることを提示できた。そして、この活性を発揮するには RID-F においては 2 つのホモピペリジン環があるように、活性サイト近傍に化合物を配置する構造が不可欠であり、また、S1 ポケットの空間に対して過不足ない大きさの構造が必要であった。精製酵素を用いた活性の比較から RID-F はサブマイクロモルの IC<sub>50</sub> を示したが、既存のペプチド性阻害剤の IC<sub>50</sub> がナノモルオーダーであることから、この強度の差は非共有結合性の様式に起因するものと考えられる。これは、RID-F に対してペプチドコンジュゲートによって 26S プロテアソームの薬効増強を示したものでも、IC<sub>50</sub> がマイクロモルの範囲であったことから妥当と思える。また、ATP γS を利用した実験から示唆されるように、RID-F は 19S RP を通過することができないため、活性中心で拮抗するような方式では、細胞内プロテアソームの阻害は

難しい。そのため非ペプチド性の阻害剤の場合、活性サイトに起因しない **19S RP** の結合阻害や **20S CP** の外側から干渉することで阻害活性を発揮するような機序に基づくほうが実現性は高いかもしれない。

一方で、細胞膜透過ペプチドを細胞内移行だけに用いるのではなく、ペプチド性構造を利用して **26S** プロテアソームへの活性向上だけでなく、そこに含まれるアミノ酸種によって触媒活性の選択性を変化させ、基質分解に伴って薬効を発揮するという方法は新規性がある。この方法は、言い換えてしまえば **RID-F** をファーマコフォアとしたペプチド性構造阻害剤を再現したともいえるが、ここでの重要な点として、本実験で阻害作用が確認された **RID-F-CPP** は、**8** 残基の長さを持つものであったことが挙げられる。既知のペプチド性阻害剤は、**3** 残基から **2** 残基の短いペプチド性構造を持ち非常に高いプロテアソーム選択性を持っているが、これらは最小限の構造のためのがん特異的な認識能力は持たない。**RID-F-CPP** が示したような比較的長い **8** 残基または、それ以上の構造可能性は、機能性ペプチドの利用可能性や立体構造化によって抗体様な挙動を行いがん特異的な認識を可能にしうるかもしれない。



1. CPPによる細胞膜透過活性の向上.
2. 19S RPによる20S内部への取り込み効率向上
3. RID-F単体はおそらく20SCP状態のプロテアソームを阻害する.
4. 遊離したRID-Fが主にCT-L活性を阻害する

図 4-1. RID-F-CPP による KMS-11 細胞の多剤耐性を克服機構の概略図。

略語：CP：コア粒子, CPP：細胞浸透性ペプチド,CT-L：キモトリプシン様活性。

## 引用文献

Adams, J.; Elliott, P. J., New agents in cancer clinical trials. *Oncogene* **2000**, *19*(56), 6687-92.

Afifi, S.; Michael, A.; Lesokhin, A., Immunotherapy: A New Approach to Treating Multiple Myeloma with Daratumumab and Elotuzumab. *Ann Pharmacother* **2016**, *50* (7), 555-68.

Anderson, K. C., Progress and Paradigms in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* **2016**, *22* (22), 5419-5427.

Arribas, J.; Castaño, J. G., A comparative study of the chymotrypsin-like activity of the rat liver multicatalytic proteinase and the ClpP from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1993**, *268* (28), 21165-71.

A.Jennifer Rivett, Peter J. Savory, Hakim Djaballah., [24] Multicatalytic endopeptidase complex: Proteasome, *Methods in Enzymology* Volume 244, **1994**, Pages 331-350

Azam, L.; Delamore, I. W., Combination therapy for myelomatosis. *Br Med J* **1974**, *4* (5944), 560-4.

Basse, N.; Montes, M.; Maréchal, X.; Qin, L.; Bouvier-Durand, M.; Genin, E.; Vidal, J.; Villoutreix, B. O.; Reboud-Ravaux, M., Novel organic proteasome inhibitors identified by virtual and in vitro screening. *J Med Chem* **2010**, *53* (1), 509-13.

Basse, N.; Papapostolou, D.; Pagano, M.; Reboud-Ravaux, M.; Bernard, E.; Felten, A. S.; Vanderesse, R., Development of lipopeptides for inhibiting 20S proteasomes. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16* (12), 3277-81.

Basse, N.; Piguel, S.; Papapostolou, D.; Ferrier-Berthelot, A.; Richy, N.; Pagano, M.; Sarthou, P.; Sobczak-Thépot, J.; Reboud-Ravaux, M.; Vidal, J.,

Linear TMC-95-based proteasome inhibitors. *J Med Chem* **2007**, *50* (12), 2842-50.

Beck, P.; Dubiella, C.; Groll, M., Covalent and non-covalent reversible proteasome inhibition. *Biol Chem* **2012**, *393* (10), 1101-20.

Biswas, S.; Deshpande, P. P.; Perche, F.; Dodwadkar, N. S.; Sane, S. D.; Torchilin, V. P., Octa-arginine-modified pegylated liposomal doxorubicin: an effective treatment strategy for non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* **2013**, *335* (1), 191-200.

Blackburn, C.; Gigstad, K. M.; Hales, P.; Garcia, K.; Jones, M.; Bruzzese, F. J.; Barrett, C.; Liu, J. X.; Soucy, T. A.; Sappal, D. S.; Bump, N.; Olhava, E. J.; Fleming, P.; Dick, L. R.; Tsu, C.; Sintchak, M. D.; Blank, J. L., Characterization of a new series of non-covalent proteasome inhibitors with exquisite potency and selectivity for the 20S beta5-subunit. *Biochem J* **2010**, *430* (3), 461-76.

Borissenko, L.; Groll, M., 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev* **2007**, *107* (3), 687-717.

Borissenko, L.; Groll, M., 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev* **2007**, *107* (3), 687-717.

Cea, M.; Cagnetta, A.; Gobbi, M.; Patrone, F.; Richardson, P. G.; Hideshima, T.; Anderson, K. C., New insights into the treatment of multiple myeloma with histone deacetylase inhibitors. *Curr Pharm Des* **2013**, *19* (4), 734-44.

Chen, S.; Wu, J.; Lu, Y.; Ma, Y. B.; Lee, B. H.; Yu, Z.; Ouyang, Q.; Finley, D. J.; Kirschner, M. W.; Mao, Y., Structural basis for dynamic regulation of the human 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113* (46), 12991-12996.

Chim, C. S.; Kumar, S. K.; Orłowski, R. Z.; Cook, G.; Richardson, P. G.; Gertz, M. A.; Giralt, S.; Mateos, M. V.; Leleu, X.; Anderson, K. C., Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. *Leukemia* **2018**, *32* (2), 252-262.

Connolly, M. L., The molecular surface package. *J Mol Graph* **1993**, *11* (2), 139-41.

de Weers, M.; Tai, Y. T.; van der Veer, M. S.; Bakker, J. M.; Vink, T.; Jacobs, D. C.; Oomen, L. A.; Peipp, M.; Valerius, T.; Slootstra, J. W.; Mutis, T.; Bleeker, W. K.; Anderson, K. C.; Lokhorst, H. M.; van de Winkel, J. G.; Parren, P. W., Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol* **2011**, *186* (3), 1840-8.

Desvergne, A.; Genin, E.; Maréchal, X.; Gallastegui, N.; Dufau, L.; Richy, N.; Groll, M.; Vidal, J.; Reboud-Ravaux, M., Dimerized linear mimics of a natural cyclopeptide (TMC-95A) are potent noncovalent inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome. *J Med Chem* **2013**, *56* (8), 3367-78.

Ferlini, C.; Scambia, G.; Marone, M.; Distefano, M.; Gaggini, C.; Ferrandina, G.; Fattorossi, A.; Isola, G.; Benedetti Panici, P.; Mancuso, S., tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. *Br J Cancer* **1999**, *79* (2), 257-63.

Frankel, A. D.; Pabo, C. O., Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **1988**, *55* (6), 1189-93.

Furet, P.; Imbach, P.; Fuerst, P.; Lang, M.; Noorani, M.; Zimmermann, J.; García-Echeverría, C., Structure-based optimisation of 2-aminobenzylstatine derivatives: potent and selective inhibitors of the chymotrypsin-like activity of the human 20S proteasome. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12* (10), 1331-4.

Furet, P.; Imbach, P.; Noorani, M.; Koeppler, J.; Laumen, K.; Lang, M.; Guagnano, V.; Fuerst, P.; Roesel, J.; Zimmermann, J.; García-Echeverría, C., Entry into a new class of potent proteasome inhibitors having high antiproliferative activity by structure-based design. *J Med Chem* **2004**, *47* (20), 4810-3.

Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y., Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* **2001**, *276* (8), 5836-40.

Genin, E.; Reboud-Ravaux, M.; Vidal, J., Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem* **2010**, *10* (3), 232-56.

Goldberg, A. L., Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J Cell Biol* **2012**, *199* (4), 583-8.

Groll, M.; Ditzel, L.; Löwe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D.; Huber, R., Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **1997**, *386* (6624), 463-71.

Groll, M.; Huber, R.; Moroder, L., The persisting challenge of selective and specific proteasome inhibition. *J Pept Sci* **2009**, *15* (2), 58-66.

Gueckel, R.; Enenkel, C.; Wolf, D. H.; Hilt, W., Mutations in the yeast proteasome beta-type subunit Pre3 uncover position-dependent effects on proteasomal peptidase activity and in vivo function. *J Biol Chem* **1998**, *273* (31), 19443-52.

Harousseau, J. L.; Palumbo, A.; Richardson, P. G.; Schlag, R.; Dimopoulos, M. A.; Shpilberg, O.; Kropff, M.; Kentos, A.; Cavo, M.; Golenkov, A.; Komarnicki, M.; Mateos, M. V.; Esseltine, D. L.; Cakana, A.; Liu, K.; Deraedt, W.; van de Velde, H.; San Miguel, J. F., Superior outcomes associated with complete

response in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with nonintensive therapy: analysis of the phase 3 VISTA study of bortezomib plus melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone. *Blood* **2010**, *116* (19), 3743-50.

Hasegawa, M.; Kinoshita, K.; Nishimura, C.; Matsumura, U.; Shionyu, M.; Ikeda, S.; Mizukami, T., Affinity labeling of the proteasome by a belactosin A derived inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (20), 5668-71.

Hasegawa, M.; Yasuda, Y.; Tanaka, M.; Nakata, K.; Umeda, E.; Wang, Y.; Watanabe, C.; Uetake, S.; Kunoh, T.; Shionyu, M.; Sasaki, R.; Shiina, I.; Mizukami, T., A novel tamoxifen derivative, ridaifen-F, is a nonpeptidic small-molecule proteasome inhibitor. *Eur J Med Chem* **2014**, *71*, 290-305.

Heinemeyer, W.; Kleinschmidt, J. A.; Saidowsky, J.; Escher, C.; Wolf, D. H., Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J* **1991**, *10* (3), 555-62.

Hendlich, M.; Rippmann, F.; Barnickel, G., LIGSITE: automatic and efficient detection of potential small molecule-binding sites in proteins. *J Mol Graph Model* **1997**, *15* (6), 359-63, 389.

Hershko, A.; Ciechanover, A., The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **1998**, *67*, 425-79.

Hoyer, J.; Schatzschneider, U.; Schulz-Siegmund, M.; Neundorf, I., Dimerization of a cell-penetrating peptide leads to enhanced cellular uptake and drug delivery. *Beilstein J Org Chem* **2012**, *8*, 1788-97.

Hu, W.; Splith, K.; Neundorf, I.; Merz, K.; Schatzschneider, U., Influence of the metal center and linker on the intracellular distribution and biological activity of organometal-peptide conjugates. *J Biol Inorg Chem* **2012**, *17* (2), 175-85.

Inoue, J.; Otsuki, T.; Hirasawa, A.; Imoto, I.; Matsuo, Y.; Shimizu, S.; Taniwaki, M.; Inazawa, J., Overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma. *Am J Pathol* **2004**, *165*(1), 71-81.

Itami, J., History of Radiation Therapy. *RADIOISOTOPES* **2011**, *60* (9), 385-392.

Kang, Y.; Cortina, R.; Perry, R. R., Role of c-myc in tamoxifen-induced apoptosis estrogen-independent breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* **1996**, *88*(5), 279-84.

Katanoda, K.; Kamo, K.; Saika, K.; Matsuda, T.; Shibata, A.; Matsuda, A.; Nishino, Y.; Hattori, M.; Soda, M.; Ioka, A.; Sobue, T.; Nishimoto, H., Short-term projection of cancer incidence in Japan using an age-period interaction model with spline smoothing. *Jpn J Clin Oncol* **2014**, *44*(1), 36-41.

Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Castillo, V.; Goldberg, A. L., Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* **1999**, *4*(3), 395-402.

Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Woo, K. M.; Goldberg, A. L., The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **1999**, *274*(6), 3363-71.

Kisselev, A. F.; Goldberg, A. L., Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* **2001**, *8*(8), 739-58.

Kloss, A.; Henklein, P.; Siele, D.; Schmolke, M.; Apcher, S.; Kuehn, L.; Sheppard, P. W.; Dahlmann, B., The cell-penetrating peptide octa-arginine is a potent inhibitor of proteasome activities. *Eur J Pharm Biopharm* **2009**, *72*(1), 219-25.

Kocher, O.; Comella, N.; Gilchrist, A.; Pal, R.; Tognazzi, K.; Brown, L. F.; Knoll, J. H., PDZK1, a novel PDZ domain-containing protein up-regulated in carcinomas and mapped to chromosome 1q21, interacts with cMOAT (MRP2), the multidrug resistance-associated protein. *Lab Invest* **1999**, *79*(9), 1161-70.

Kóczán, G.; Ghose, A. C.; Mookerjee, A.; Hudecz, F., Methotrexate conjugate with branched polypeptide influences *Leishmania donovani* infection in vitro and in experimental animals. *Bioconjug Chem* **2002**, *13*(3), 518-24.

Koguchi, Y.; Kohno, J.; Nishio, M.; Takahashi, K.; Okuda, T.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S., TMC-95A, B, C, and D, novel proteasome inhibitors produced by *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. Taxonomy, production, isolation, and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* **2000**, *53*(2), 105-9.

Kool, M.; de Haas, M.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; van Eijk, M. J.; Juijn, J. A.; Baas, F.; Borst, P., Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* **1997**, *57*(16), 3537-47.

Kuhn, D. J.; Chen, Q.; Voorhees, P. M.; Strader, J. S.; Shenk, K. D.; Sun, C. M.; Demo, S. D.; Bennett, M. K.; van Leeuwen, F. W.; Chanan-Khan, A. A.; Orlowski, R. Z., Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* **2007**, *110*(9), 3281-90.

Kunoh, T.; Noda, T.; Koseki, K.; Sekigawa, M.; Takagi, M.; Shin-ya, K.; Goshima, N.; Iemura, S.; Natsume, T.; Wada, S.; Mukai, Y.; Ohta, S.; Sasaki, R.; Mizukami, T., A novel human dynactin-associated protein, dynAP, promotes activation of Akt, and ergosterol-related compounds induce dynAP-dependent apoptosis of human cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9*(11), 2934-42.

Lacy, M. Q.; Rajkumar, S. V., Pomalidomide: a new IMiD with remarkable activity in both multiple myeloma and myelofibrosis. *Am J Hematol* **2010**, *85* (2), 95-6.

Li, Y.; Zheng, X.; Cao, Z.; Xu, W.; Zhang, J.; Gong, M., Self-assembled peptide (CADY-1) improved the clinical application of doxorubicin. *Int J Pharm* **2012**, *434* (1-2), 209-14.

Lin, G.; Chidawanyika, T.; Tsu, C.; Warriar, T.; Vaubourgeix, J.; Blackburn, C.; Gigstad, K.; Sintchak, M.; Dick, L.; Nathan, C., N,C-Capped dipeptides with selectivity for mycobacterial proteasome over human proteasomes: role of S3 and S1 binding pockets. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (27), 9968-71.

Lipinski, C. A., Chris Lipinski discusses life and chemistry after the Rule of Five. *Drug Discov Today* **2003**, *8* (1), 12-6.

Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *46* (1-3), 3-26.

Liu, C.; Liu, X. N.; Wang, G. L.; Hei, Y.; Meng, S.; Yang, L. F.; Yuan, L.; Xie, Y., A dual-mediated liposomal drug delivery system targeting the brain: rational construction, integrity evaluation across the blood-brain barrier, and the transporting mechanism to glioma cells. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 2407-2425.

Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C., Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J Med Chem* **2009**, *52* (21), 6752-6.

Lum, R. T.; Nelson, M. G.; Joly, A.; Horsma, A. G.; Lee, G.; Meyer, S. M.; Wick, M. M.; Schow, S. R., Selective inhibition of the chymotrypsin-like

activity of the 20S proteasome by 5-methoxy-1-indanone dipeptide benzamides. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8* (3), 209-14.

Mandlekar, S.; Kong, A. N., Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* **2001**, *6* (6), 469-77.

Meng, L.; Mohan, R.; Kwok, B. H.; Elofsson, M.; Sin, N.; Crews, C. M., Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (18), 10403-8.

Moravec, R. A.; O'Brien, M. A.; Daily, W. J.; Scurria, M. A.; Bernad, L.; Riss, T. L., Cell-based bioluminescent assays for all three proteasome activities in a homogeneous format. *Anal Biochem* **2009**, *387* (2), 294-302.

Moreau, P.; Masszi, T.; Grzasko, N.; Bahlis, N. J.; Hansson, M.; Pour, L.; Sandhu, I.; Ganly, P.; Baker, B. W.; Jackson, S. R.; Stoppa, A. M.; Simpson, D. R.; Gimsing, P.; Palumbo, A.; Garderet, L.; Cavo, M.; Kumar, S.; Touzeau, C.; Buadi, F. K.; Laubach, J. P.; Berg, D. T.; Lin, J.; Di Bacco, A.; Hui, A. M.; van de Velde, H.; Richardson, P. G.; Group, T.-M. S., Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **2016**, *374* (17), 1621-34.

Moreau, P.; Zamagni, E., MRD in multiple myeloma: more questions than answers? *Blood Cancer J* **2017**, *7* (12), 639.

Myung, J.; Kim, K. B.; Lindsten, K.; Dantuma, N. P.; Crews, C. M., Lack of proteasome active site allostery as revealed by subunit-specific inhibitors. *Mol Cell* **2001**, *7* (2), 411-20.

Myung, J.; Kim, K. B.; Lindsten, K.; Dantuma, N. P.; Crews, C. M., Lack of proteasome active site allostery as revealed by subunit-specific inhibitors. *Mol Cell* **2001**, *7* (2), 411-20.

Nagahara, Y.; Shiina, I.; Nakata, K.; Sasaki, A.; Miyamoto, T.; Ikekita, M., Induction of mitochondria-involved apoptosis in estrogen receptor-negative cells by a novel tamoxifen derivative, ridaifen-B. *Cancer Sci* **2008**, *99*(3), 608-14.

Namba, M.; Ohtsuki, T.; Mori, M.; Togawa, A.; Wada, H.; Sugihara, T.; Yawata, Y.; Kimoto, T., Establishment of five human myeloma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol* **1989**, *25*(8), 723-9.

Navon, A.; Ciechanover, A., The 26 S proteasome: from basic mechanisms to drug targeting. *J Biol Chem* **2009**, *284*(49), 33713-8.

Orlowski, M., The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* **1990**, *29*(45), 10289-97.

Pagano, M.; Tam, S. W.; Theodoras, A. M.; Beer-Romero, P.; Del Sal, G.; Chau, V.; Yew, P. R.; Draetta, G. F.; Rolfe, M., Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **1995**, *269*(5224), 682-5.

Paiva, B.; Corchete, L. A.; Vidriales, M. B.; Puig, N.; Maiso, P.; Rodriguez, I.; Alignani, D.; Burgos, L.; Sanchez, M. L.; Barcena, P.; Echeveste, M. A.; Hernandez, M. T.; García-Sanz, R.; Ocio, E. M.; Oriol, A.; Gironella, M.; Palomera, L.; De Arriba, F.; Gonzalez, Y.; Johnson, S. K.; Epstein, J.; Barlogie, B.; Lahuerta, J. J.; Blade, J.; Orfao, A.; Mateos, M. V.; San Miguel, J. F.; Groups, S. M. G. P. f. t. S. o. M. B. D. T. G. P. C. S., Phenotypic and genomic analysis of multiple myeloma minimal residual disease tumor cells: a new model to understand chemoresistance. *Blood* **2016**, *127*(15), 1896-906.

Palumbo, A.; Attal, M.; Roussel, M., Shifts in the therapeutic paradigm for patients newly diagnosed with multiple myeloma: maintenance therapy and overall survival. *Clin Cancer Res* **2011**, *17*(6), 1253-63.

Penning, T. D.; Chandrakumar, N. S.; Chen, B. B.; Chen, H. Y.; Desai, B. N.; Djuric, S. W.; Docter, S. H.; Gasiiecki, A. F.; Haack, R. A.; Miyashiro, J. M.; Russell, M. A.; Yu, S. S.; Corley, D. G.; Durley, R. C.; Kilpatrick, B. F.; Parnas, B. L.; Askonas, L. J.; Gierse, J. K.; Harding, E. I.; Highkin, M. K.; Kachur, J. F.; Kim, S. H.; Krivi, G. G.; Villani-Price, D.; Pyla, E. Y.; Smith, W. G., Structure-activity relationship studies on 1-[2-(4-Phenylphenoxy)ethyl]pyrrolidine (SC-22716), a potent inhibitor of leukotriene A(4) (LTA(4)) hydrolase. *J Med Chem* **2000**, *43* (4), 721-35.

Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25* (13), 1605-12.

Pub Chem Project. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Raab, M. S.; Podar, K.; Breitkreutz, I.; Richardson, P. G.; Anderson, K. C., Multiple myeloma. *Lancet* **2009**, *374* (9686), 324-39.

Reissmann, S., Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J Pept Sci* **2014**, *20* (10), 760-84.

Rousselle, C.; Clair, P.; Lefauconnier, J. M.; Kaczorek, M.; Scherrmann, J. M.; Tamsamani, J., New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. *Mol Pharmacol* **2000**, *57* (4), 679-86.

Ruoslahti, E., Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2017**, *110-111*, 3-12.

Schmidtke, G.; Holzhütter, H. G.; Bogyo, M.; Kairies, N.; Groll, M.; de Giuli, R.; Emch, S.; Groettrup, M., How an inhibitor of the HIV-I protease modulates proteasome activity. *J Biol Chem* **1999**, *274* (50), 35734-40.

Schrader, J.; Henneberg, F.; Mata, R. A.; Tittmann, K.; Schneider, T. R.; Stark, H.; Bourenkov, G.; Chari, A., The inhibition mechanism of human 20S proteasomes enables next-generation inhibitor design. *Science* **2016**, *353* (6299), 594-8.

Schweitzer, A.; Aufderheide, A.; Rudack, T.; Beck, F.; Pfeifer, G.; Plitzko, J. M.; Sakata, E.; Schulten, K.; Förster, F.; Baumeister, W., Structure of the human 26S proteasome at a resolution of 3.9 Å. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113* (28), 7816-21.

Shah, J. J.; Orłowski, R. Z.; Thomas, S. K., Role of combination bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in the management of relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Ther Clin Risk Manag* **2009**, *5* (1), 151-9.

Shahshahan, M. A.; Beckley, M. N.; Jazirehi, A. R., Potential usage of proteasome inhibitor bortezomib (Velcade, PS-341) in the treatment of metastatic melanoma: basic and clinical aspects. *Am J Cancer Res* **2011**, *1* (7), 913-24.

Shiina, I.; Sano, Y.; Nakata, K.; Kikuchi, T.; Sasaki, A.; Ikekita, M.; Hasome, Y., Synthesis of the new pseudo-symmetrical tamoxifen derivatives and their anti-tumor activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17* (9), 2421-4.

Shiina, I.; Sano, Y.; Nakata, K.; Kikuchi, T.; Sasaki, A.; Ikekita, M.; Nagahara, Y.; Hasome, Y.; Yamori, T.; Yamazaki, K., Synthesis and pharmacological evaluation of the novel pseudo-symmetrical tamoxifen derivatives as anti-tumor agents. *Biochem Pharmacol* **2008**, *75* (5), 1014-26.

Shiina, I.; Sano, Y.; Nakata, K.; Suzuki, M.; Yokoyama, T.; Sasaki, A.; Orikasa, T.; Miyamoto, T.; Ikekita, M.; Nagahara, Y.; Hasome, Y., An expeditious synthesis of tamoxifen, a representative SERM (selective estrogen receptor modulator), via the three-component coupling reaction

among aromatic aldehyde, cinnamyltrimethylsilane, and beta-chlorophenetole. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15* (24), 7599-617.

Śledź, P.; Unverdorben, P.; Beck, F.; Pfeifer, G.; Schweitzer, A.; Förster, F.; Baumeister, W., Structure of the 26S proteasome with ATP-γS bound provides insights into the mechanism of nucleotide-dependent substrate translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (18), 7264-9.

Splith, K.; Hu, W.; Schatzschneider, U.; Gust, R.; Ott, I.; Onambele, L. A.; Prokop, A.; Neundorff, I., Protease-activatable organometal-Peptide bioconjugates with enhanced cytotoxicity on cancer cells. *Bioconjug Chem* **2010**, *21* (7), 1288-96.

Stewart, A. K.; Rajkumar, S. V.; Dimopoulos, M. A.; Masszi, T.; Špička, I.; Oriol, A.; Hájek, R.; Rosiñol, L.; Siegel, D. S.; Mihaylov, G. G.; Goranova-Marinova, V.; Rajnics, P.; Suvorov, A.; Niesvizky, R.; Jakubowiak, A. J.; San-Miguel, J. F.; Ludwig, H.; Wang, M.; Maisnar, V.; Minarik, J.; Bensinger, W. I.; Mateos, M. V.; Ben-Yehuda, D.; Kukreti, V.; Zojwalla, N.; Tonda, M. E.; Yang, X.; Xing, B.; Moreau, P.; Palumbo, A.; Investigators, A., Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* **2015**, *372* (2), 142-52.

Tanaka, K., Molecular biology of the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *247* (3), 537-41.

Tanaka, K.; Tamura, T.; Yoshimura, T.; Ichihara, A., Proteasomes: protein and gene structures. *New Biol* **1992**, *4* (3), 173-87.

Tanaka, K.; Yoshimura, T.; Ichihara, A., Role of substrate in reversible activation of proteasomes (multi-protease complexes) by sodium dodecyl sulfate. *J Biochem* **1989**, *106* (3), 495-500.

Trott, O.; Olson, A. J., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* **2010**, *31* (2), 455-61.

Unverdorben, P.; Beck, F.; Śledź, P.; Schweitzer, A.; Pfeifer, G.; Plitzko, J. M.; Baumeister, W.; Förster, F., Deep classification of a large cryo-EM dataset defines the conformational landscape of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* **2014**, *111* (15), 5544-9.

Uyama, M.; Sato, M. M.; Kawanami, M.; Tamura, M., Regulation of osteoblastic differentiation by the proteasome inhibitor bortezomib. *Genes Cells* **2012**, *17* (7), 548-58.

Vainio, M. J.; Johnson, M. S., Generating conformer ensembles using a multiobjective genetic algorithm. *J Chem Inf Model* **2007**, *47* (6), 2462-74.

Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D., Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **2002**, *45* (12), 2615-23.

Wang, M.; Dimopoulos, M. A.; Chen, C.; Cibeira, M. T.; Attal, M.; Spencer, A.; Rajkumar, S. V.; Yu, Z.; Olesnycky, M.; Zeldis, J. B.; Knight, R. D.; Weber, D. M., Lenalidomide plus dexamethasone is more effective than dexamethasone alone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma regardless of prior thalidomide exposure. *Blood* **2008**, *112* (12), 4445-51.

Wright, L. R.; Rothbard, J. B.; Wender, P. A., Guanidinium rich peptide transporters and drug delivery. *Curr Protein Pept Sci* **2003**, *4* (2), 105-24.

Zhang, P.; Cheetham, A. G.; Lock, L. L.; Cui, H., Cellular uptake and cytotoxicity of drug-peptide conjugates regulated by conjugation site. *Bioconjug Chem* **2013**, *24* (4), 604-13.

Zhao, M.; Qiao, M.; Oyajobi, B. O.; Mundy, G. R.; Chen, D., E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* **2003**, *278* (30), 27939-44.

がん情報サービス：全国がん罹患モニタリング集計.

国立がん研究センターがん対策情報センター.

[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/short\\_pred.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/short_pred.html)

バイオ産業情報化コンソーシアム (JBIC) 天然化合物ライブラリー

<http://www.jbic.or.jp/enterprise/result/002.html>

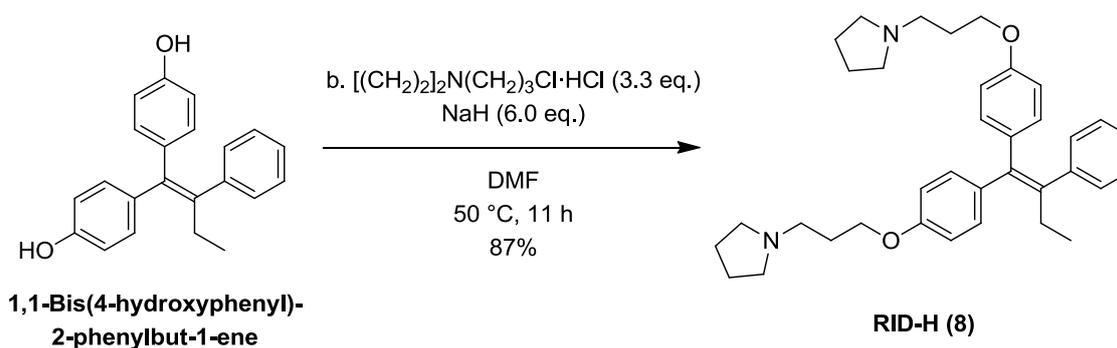
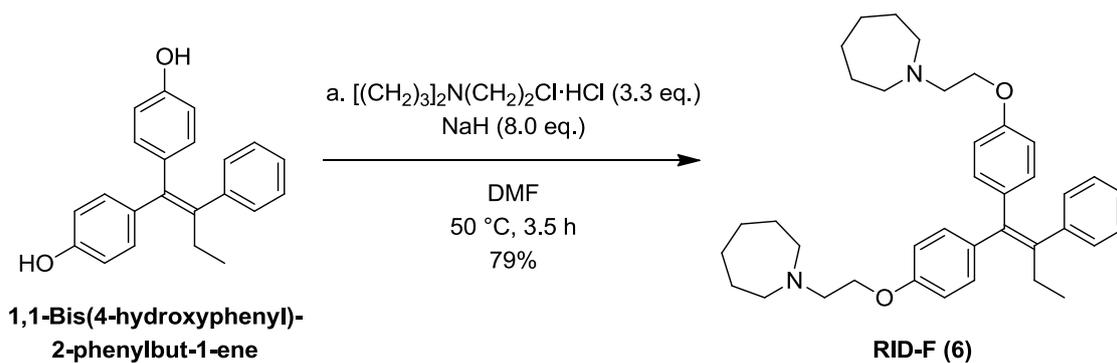
東京大学創薬機構 <https://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/>

理化学研究所 環境資源科学研究センター 天然化合物バンク 「NPDepo」

<http://www.cbrg.riken.jp/npd/>

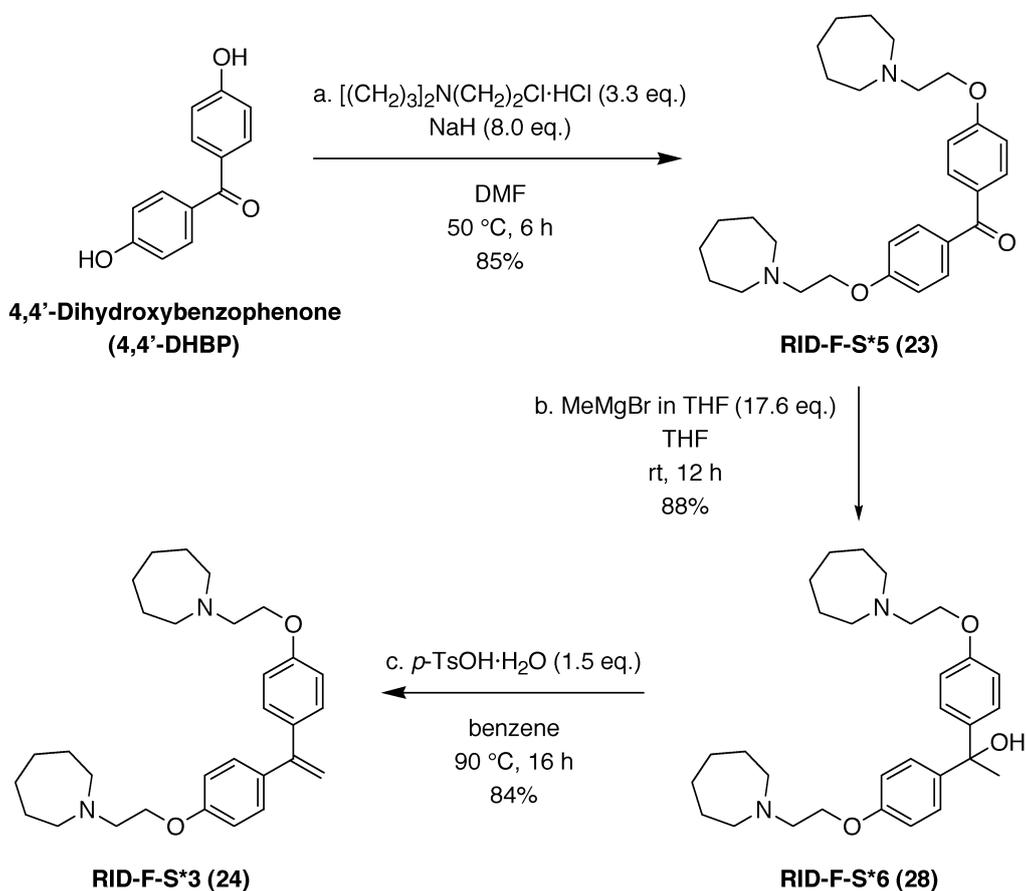
## 補遺

### 補足スキーム 2-1. Synthesis of RID-F (6) and RID-H (8) from 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-ene<sup>a</sup>



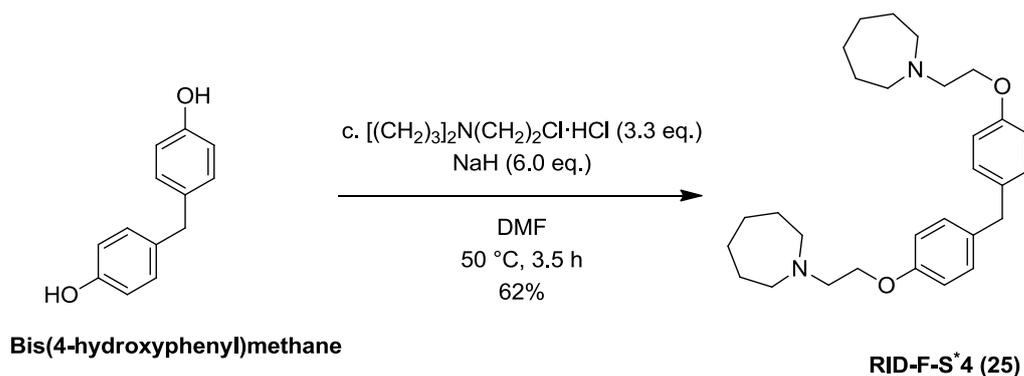
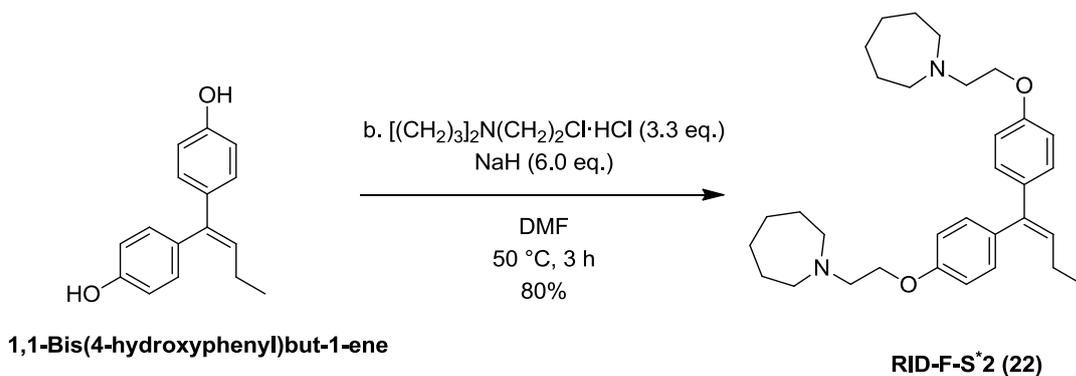
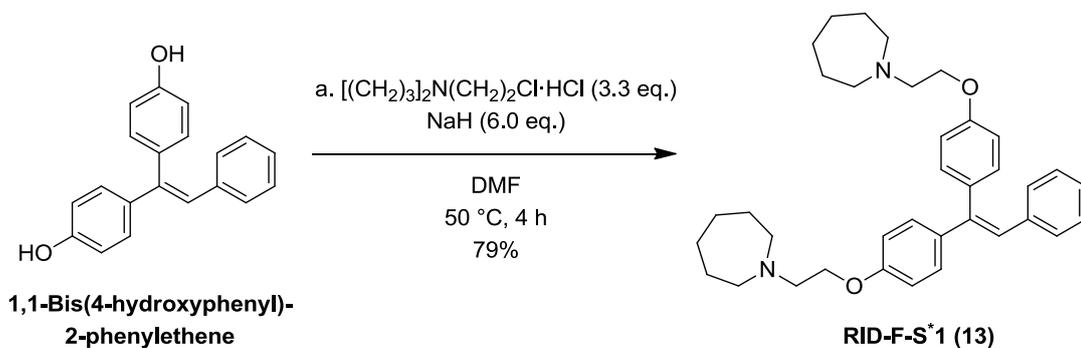
<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 3.5 h, 79%; (b)  $[(\text{CH}_2)_2]_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (6.0 eq.), DMF, 50 °C, 11 h, 87%.

補足スキーム 2-2. Synthesis of RID-F-S\*5 (23), RID-F-S\*6 (28), and RID-F-S\*3 (24) from 4,4'-Dihydroxybenzophenone (4,4'-DHBP)<sup>a</sup>



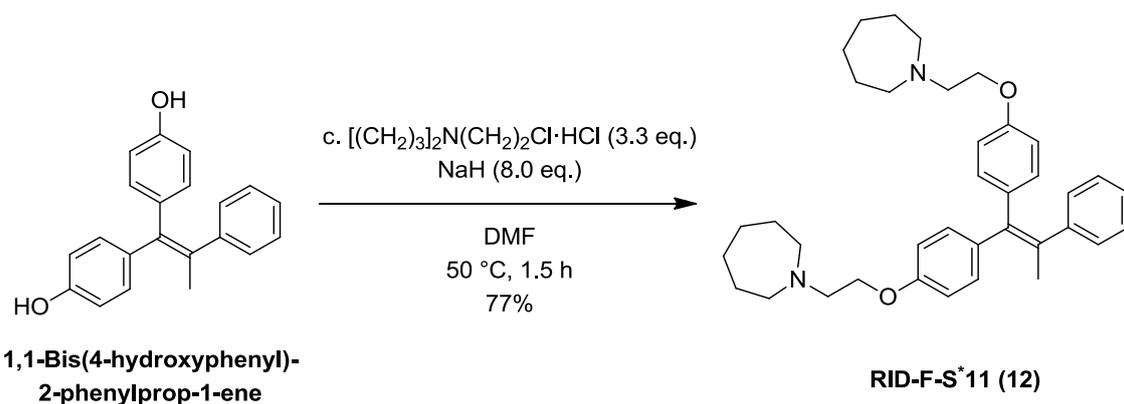
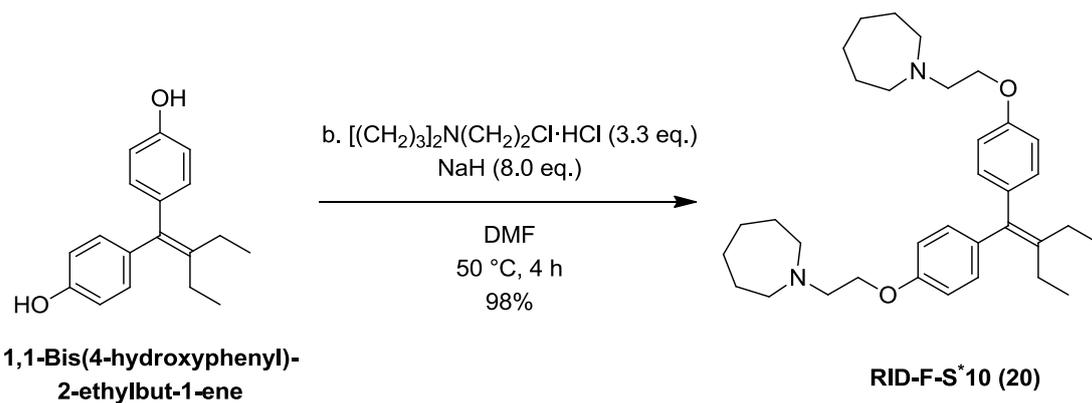
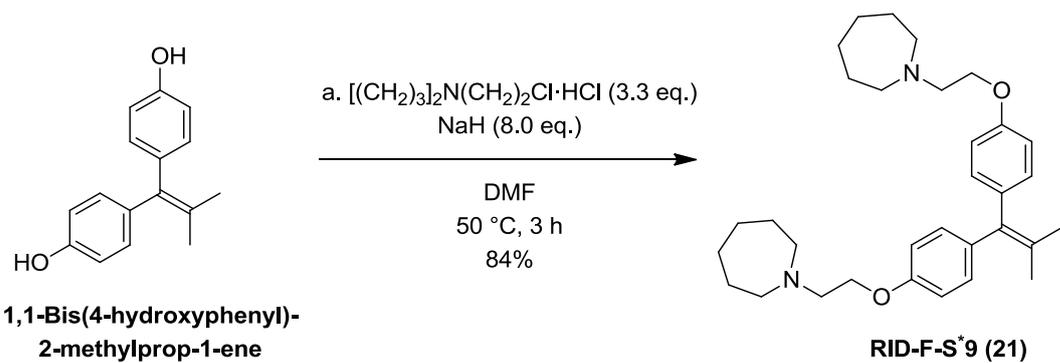
<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)  $[(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}]$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 6 h, 85%; (b) MeMgBr in THF (1.12 M, 17.6 eq.), THF, room temperature, 12 h, 88%; (c) *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O (1.5 eq.), benzene, 90 °C, 16 h, 84%.

補足スキーム 2-3. Synthesis of RID-F-S\* 1 (13), RID-F-S\* 2 (22), and RID-F-S\* 4 (25)  
 from **1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylethene**,  
**1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)but-1-ene**, and **Bis(4-hydroxyphenyl)methane**<sup>a</sup>



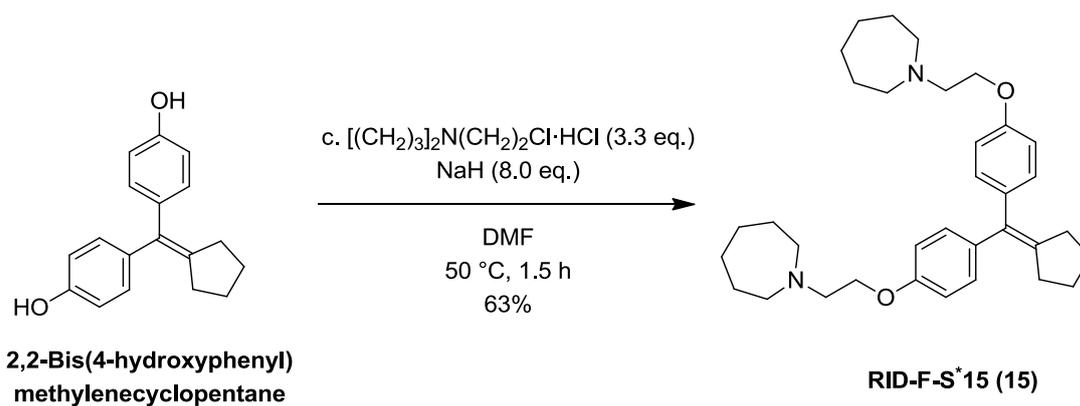
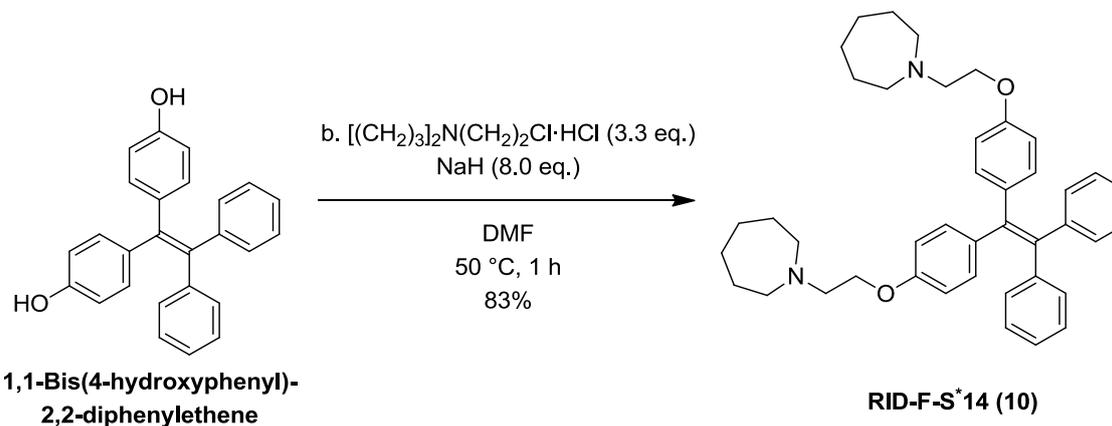
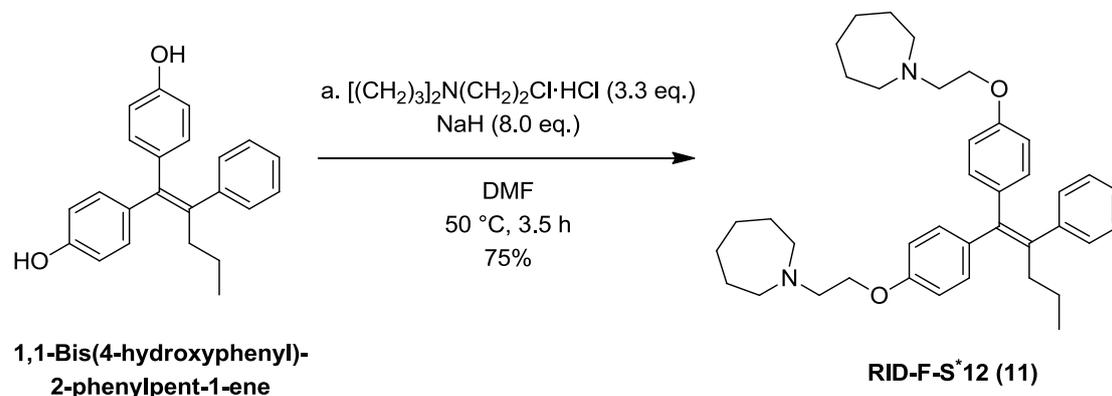
<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (6.0 eq.), DMF, 50 °C, 4 h, 79%; (b)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (6.0 eq.), DMF, 50 °C, 3 h, 80%; (c)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (6.0 eq.), DMF, 50 °C, 3.5 h, 62%.

補足スキーム 2-4. Synthesis of RID-F-S\*9 (21), RID-F-S\*10 (20), and RID-F-S\*11 (12) from 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-methylprop-1-ene, 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-ethylbut-1-ene, and 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylprop-1-ene<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 3 h, 84%; (b)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 4 h, 98%; (c)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 1.5 h, 77%.

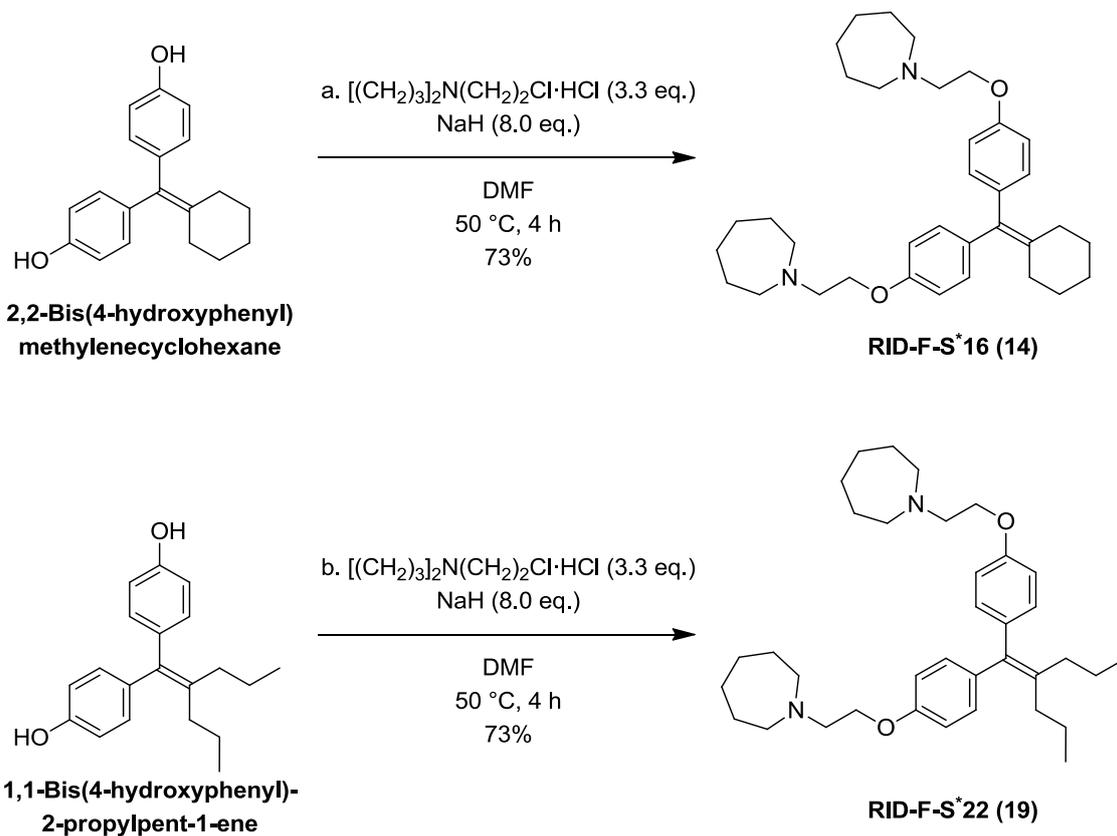
補足スキーム 2-5. Synthesis of RID-F-S\* 12 (11), RID-F-S\* 14 (10), and RID-F-S\* 15 (15) from 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylpent-1-ene, 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2,2-diphenylethene, and 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)methylenecyclopentane<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) [(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cl·HCl (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 3.5 h, 75%; (b) [(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cl·HCl (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C,

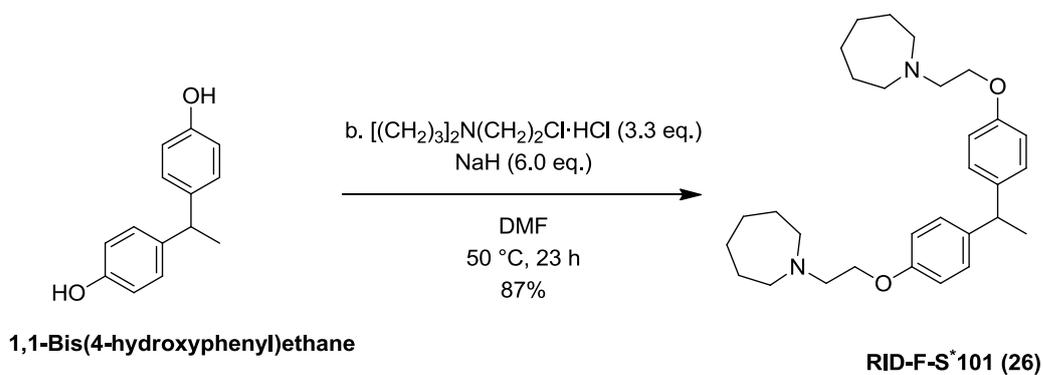
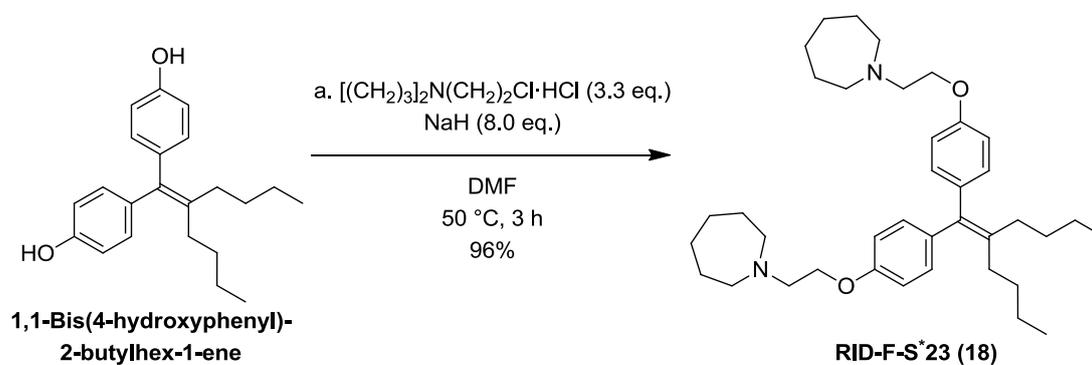
1 h, 83%; (c)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 1.5 h, 63%.

補足スキーム 2-6. Synthesis of RID-F-S\*16 (14) and RID-F-S\*22 (19) from  
2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)methylenecyclohexane and  
1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-propylpent-1-ene<sup>a</sup>



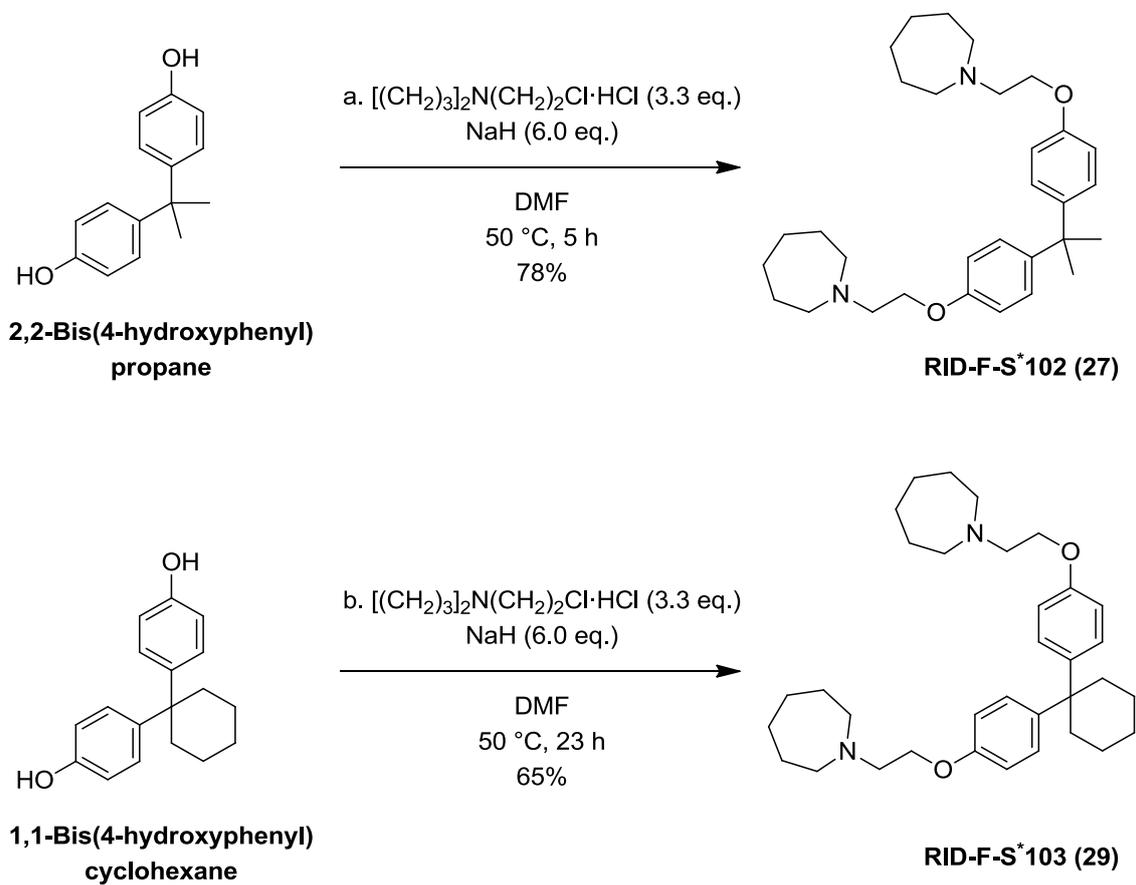
<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 4 h, 73%; (b)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 4 h, 73%.

補足スキーム 2-7. Synthesis of RID-F-S\*23 (18) and RID-F-S\*101 (26) from 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-butylhex-1-ene and 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)ethane<sup>a</sup>



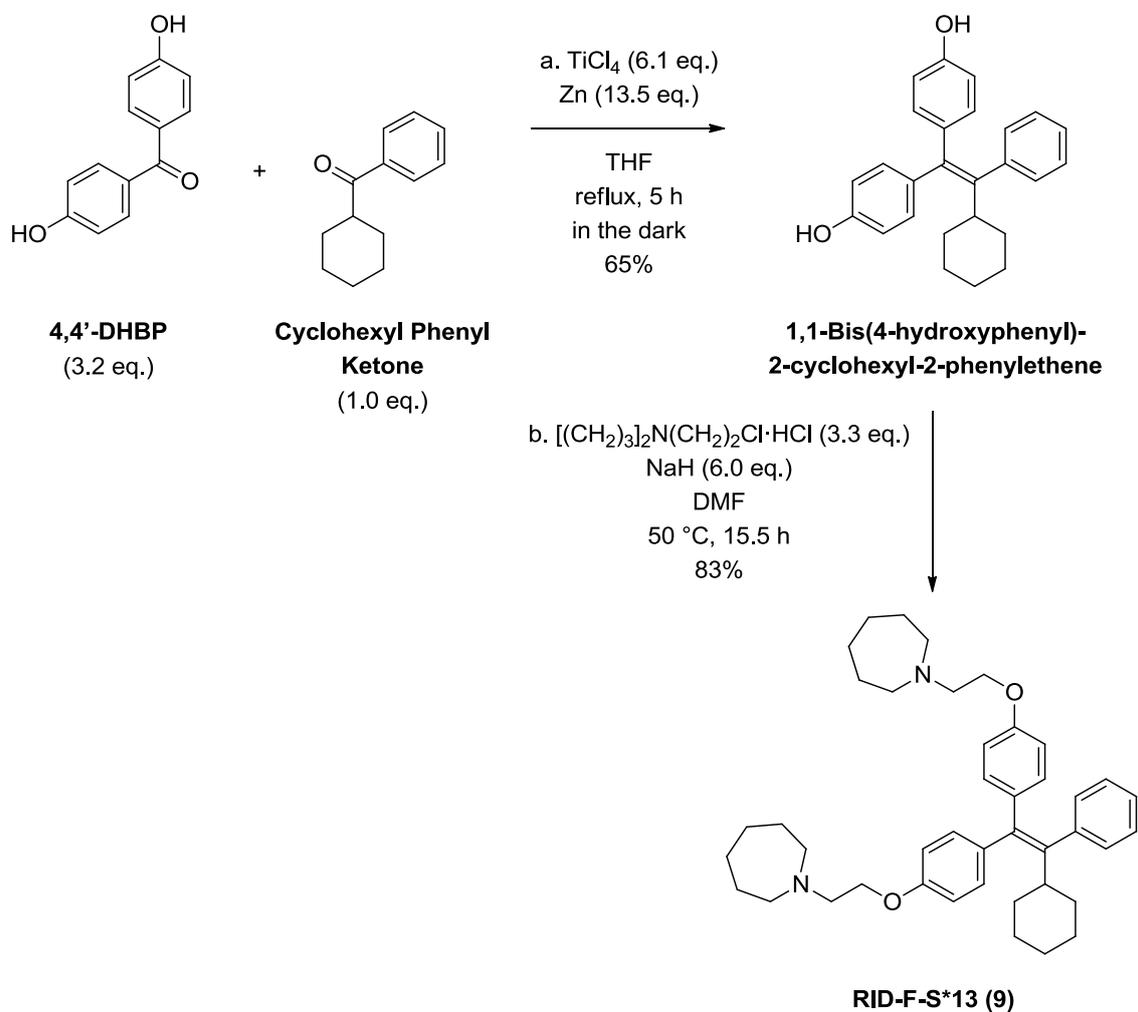
<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 3 h, 96%; (b)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (6.0 eq.), DMF, 50 °C, 23 h, 87%.

補足スキーム 2-8. Synthesis of RID-F-S\*102 (27) and RID-F-S\*103 (29) from 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane and 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (6.0 eq.), DMF, 50 °C, 5 h, 78%; (b)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (6.0 eq.), DMF, 50 °C, 23 h, 65%.

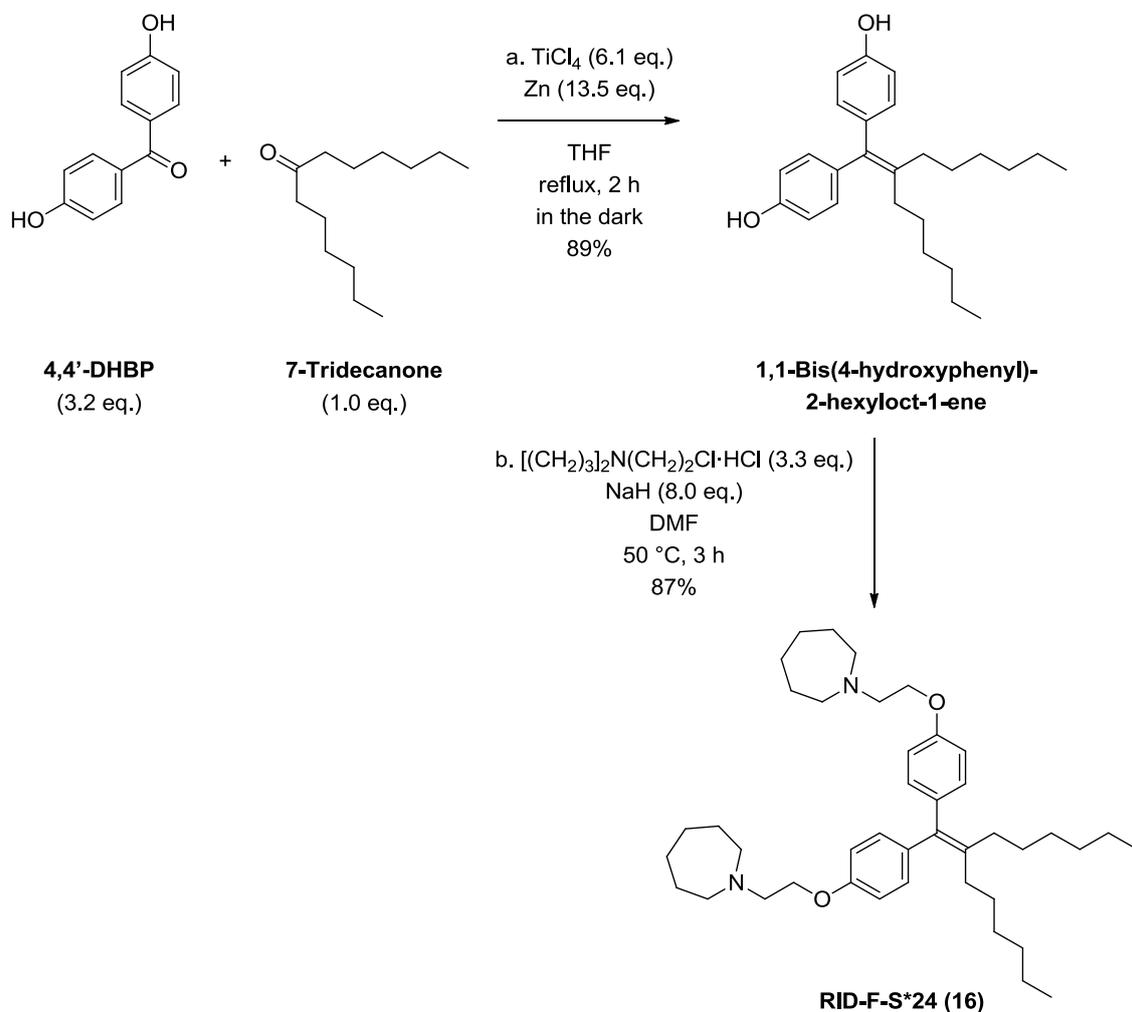
補足スキーム 2-9. Synthesis of RID-F-S\*13 (9) from 4,4'-Dihydroxybenzophenone (4,4'-DHBP) and Cyclohexyl Phenyl Ketone<sup>a</sup>



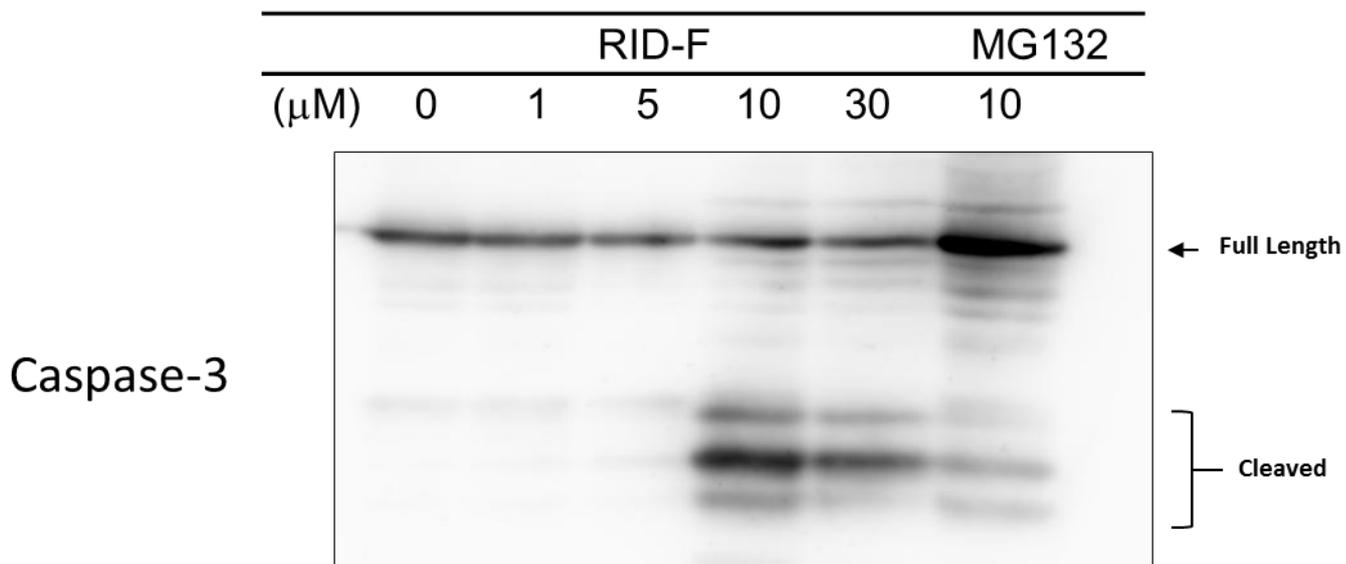
<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)  $\text{TiCl}_4$  (6.1 eq.), Zn (13.5 eq.), THF, reflux, 5 h in the dark, 65%; (b)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (6.0 eq.), DMF, 50 °C, 15.5 h, 83%.



補足スキーム 2-11. Synthesis of RID-F-S\*24 (16) from 4,4'-Dihydroxybenzophenone (4,4'-DHBP) and 7-Tridecanone<sup>a</sup>

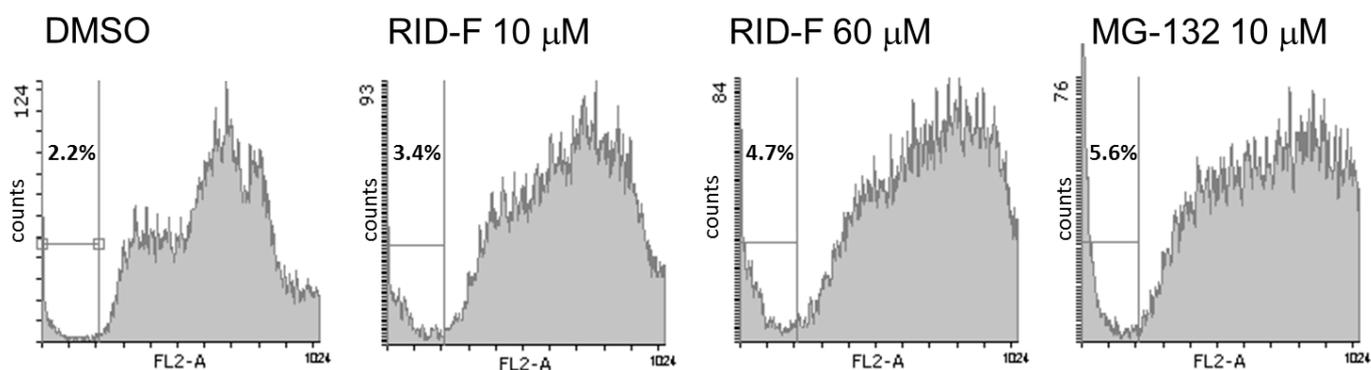


<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a)  $\text{TiCl}_4$  (6.1 eq.), Zn (13.5 eq.), THF, reflux, 2 h in the dark, 89%; (b)  $[(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}\cdot\text{HCl}$  (3.3 eq.), NaH (8.0 eq.), DMF, 50 °C, 3 h, 87%.



**補足図 2-1. RID-F 処理細胞でのカスパーゼ 3 切断**

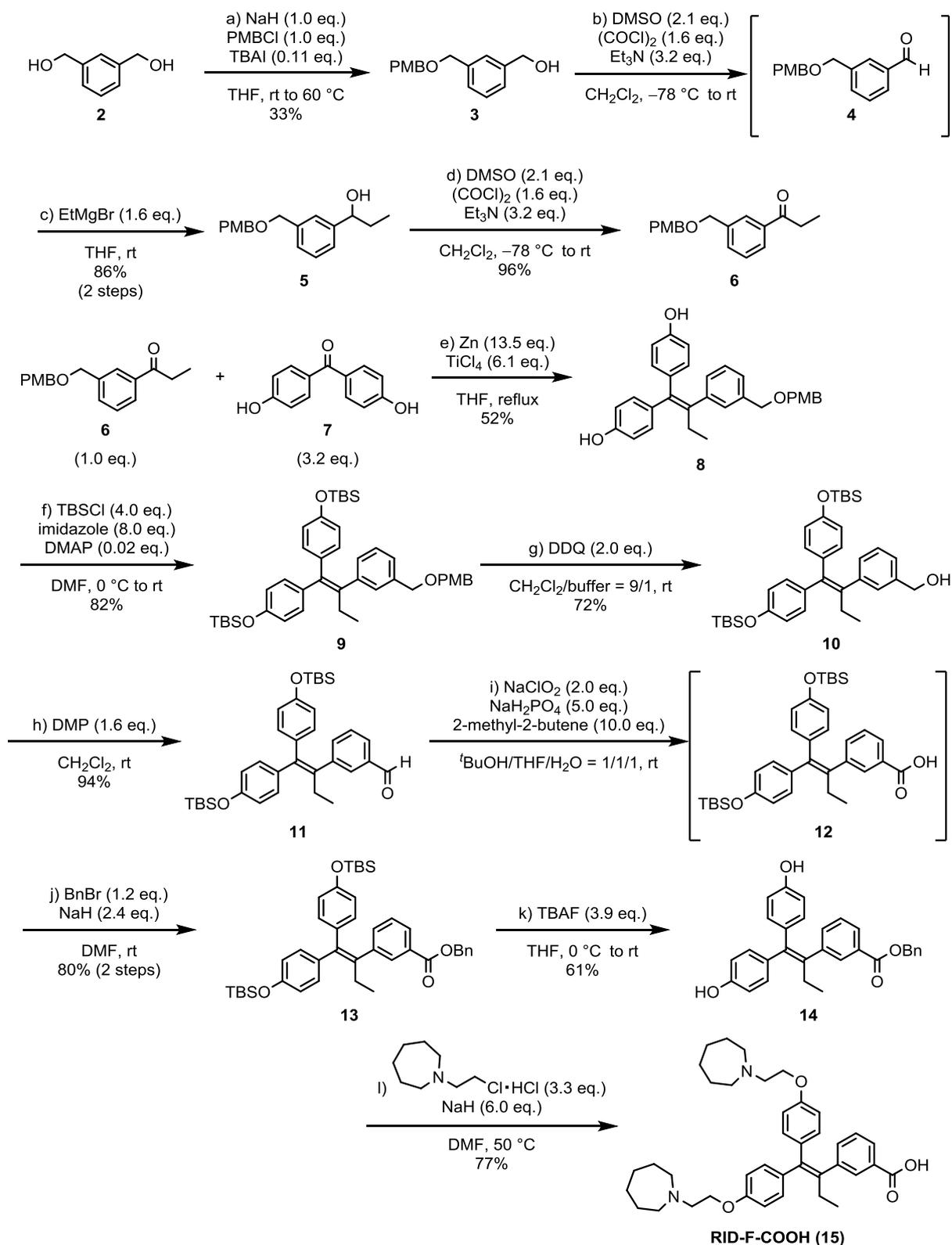
HeLa 細胞が化合物の種々の濃度で 24 時間処理した。プロテアソーム阻害剤である MG132 をカスパーゼ 3 切断の陽性コントロールとして使用した。



### 補足図 2-2. RID-F 処理によるフローサイトメトリー解析

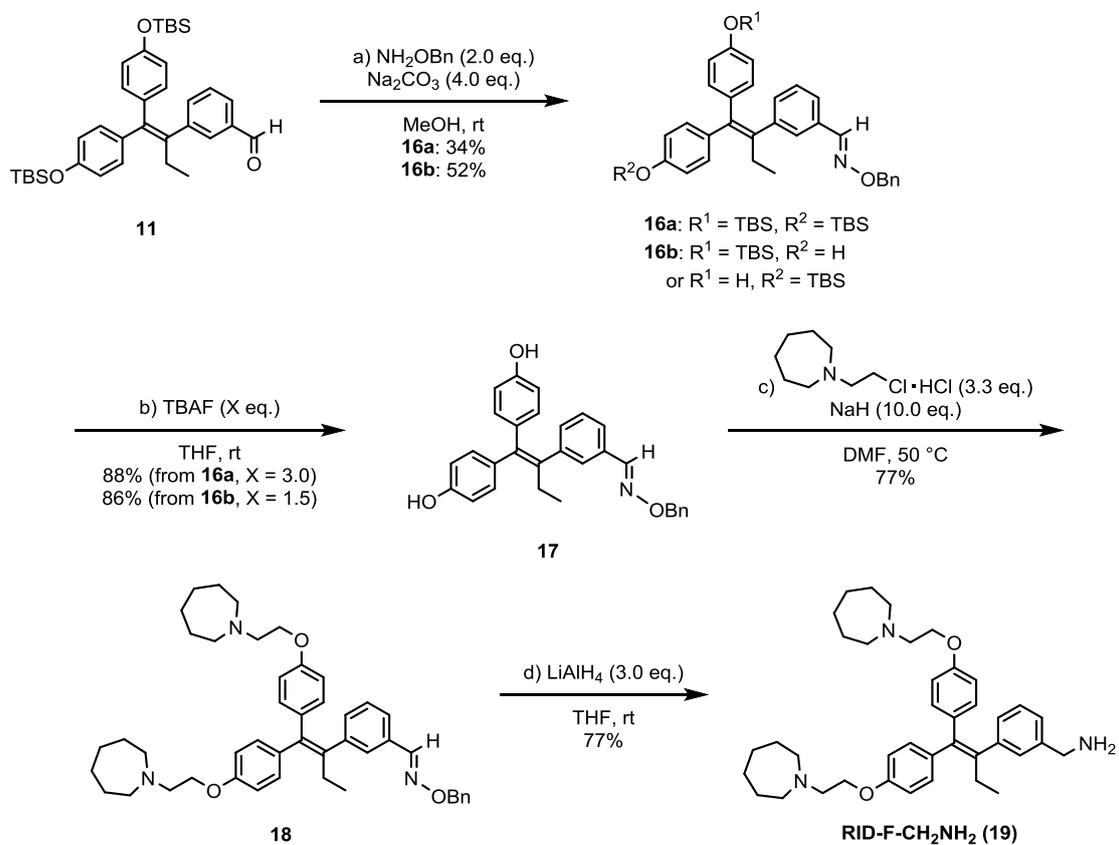
種々の濃度で RID-F を 24 時間処理した HeLa 細胞が、穏やかな条件でトリプシン処理後に遠心分離によって回収した。氷冷された 70%EtOH により細胞を処理した。EtOH を除いた後、2.5μg/ml propidium iodide (PI) および 0.5mg/ml RnaseA (Nacalai Tesque)を含んだ PBS で再懸濁し、JSAN Cell Sorter (Bay Bioscience)を用いて解析した。アポトーシス細胞 (sub-G1 領域) の比率が示された。プロテアソーム阻害剤である MG132 を陽性コントロールとして使用した。

補足スキーム 3-1.



**Reagents and conditions:** a) NaH (1.0 eq.), PMBCl (1.0 eq.), TBAI (0.11 eq.), THF, rt to 60 °C, 33%; b) DMSO (2.1 eq.), (COCl)<sub>2</sub> (1.6 eq.), Et<sub>3</sub>N (3.2 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C to rt; c) EtMgBr (1.6 eq.), THF, rt, 86% (2 steps); d) DMSO (2.1 eq.), (COCl)<sub>2</sub> (1.6 eq.), Et<sub>3</sub>N (3.2 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C to rt, 96%; e) Zn (13.5 eq.), TiCl<sub>4</sub> (6.1 eq.), THF, reflux, 52%; f) TBSCl (4.0 eq.), imidazole (8.0 eq.), DMAP (0.02 eq.), DMF, 0 °C to rt, 82%; g) DDQ (2.0 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/buffer = 9/1, rt, 72%; h) DMP (1.6 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 94%; i) NaClO<sub>2</sub> (2.0 eq.), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5.0 eq.), 2-methyl-2-butene (10.0 eq.), <sup>t</sup>BuOH/THF/H<sub>2</sub>O = 1/1/1, rt; j) BnBr (1.2 eq.), NaH (2.4 eq.), DMF, rt, 80% (2 steps); k) TBAF (3.9 eq.), THF, 0 °C to rt, 61%; l) 1-(2-chloroethyl)azepane hydrochloride (3.3 eq.), NaH (6.0 eq.), DMF, 50 °C, 77%.

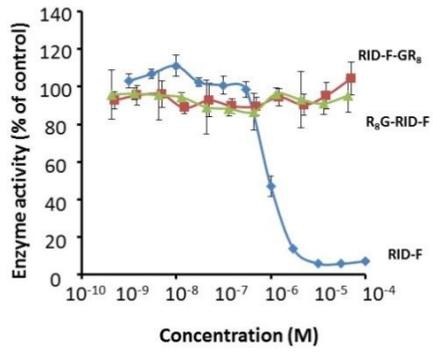
補足スキーム 3-2.



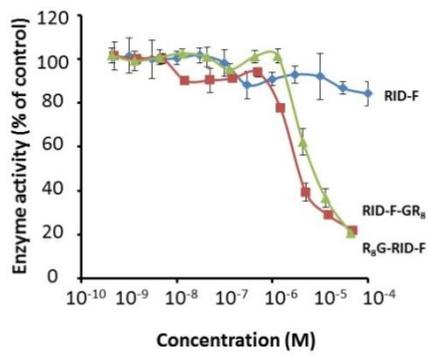
**Reagents and conditions:** a) NH<sub>2</sub>OBn (2.0 eq.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.0 eq.), MeOH, rt, **16a**: 34%, **16b**: 52%; b) TBAF (X eq.), THF, rt, 88% (from **16a**, X = 3.0), 86% (from **16b**, X = 1.5); c) 1-(2-chloroethyl)azepane hydrochloride (3.3 eq.), NaH (10.0 eq.), DMF, 50 °C, 77%; d) LiAlH<sub>4</sub> (3.0 eq.), THF, rt, 77%.

### (A) CT-L

20S Proteasome

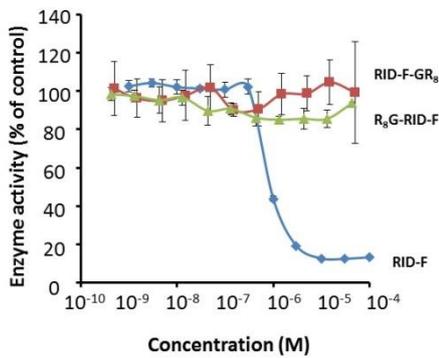


26S Proteasome

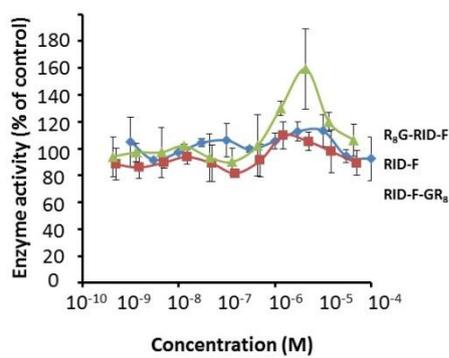


### (B) PGPH

20S Proteasome

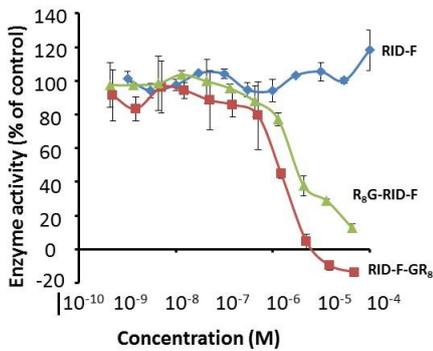


26S Proteasome

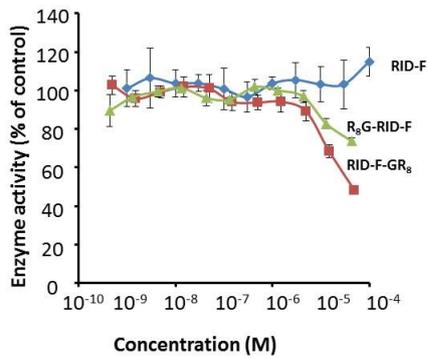


### (C) T-L

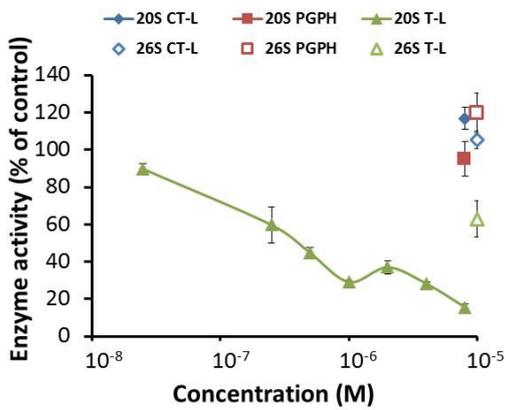
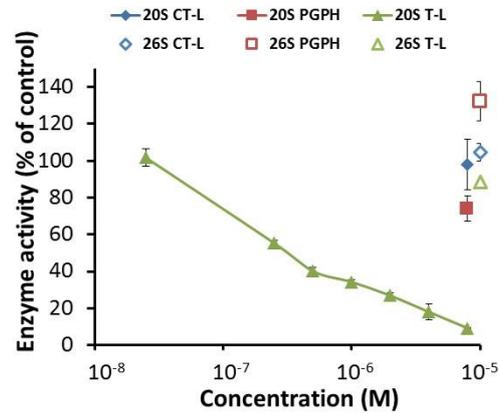
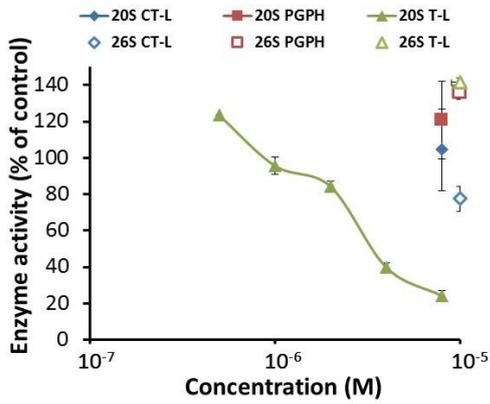
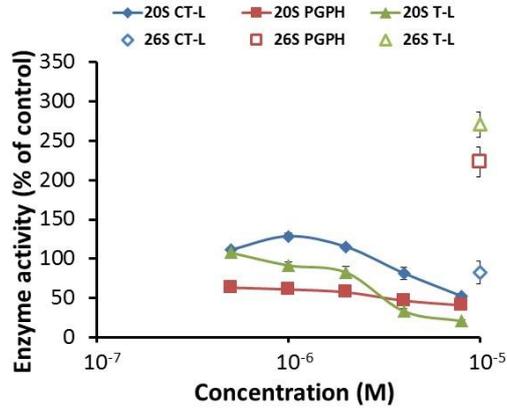
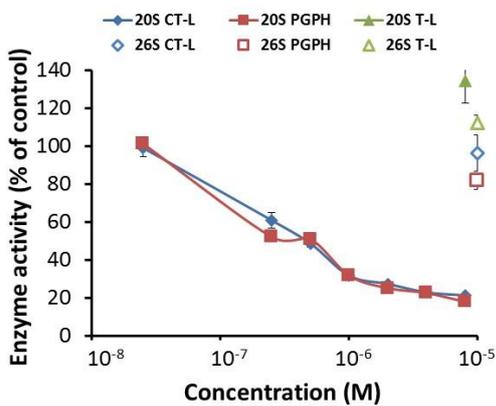
20S Proteasome



26S Proteasome

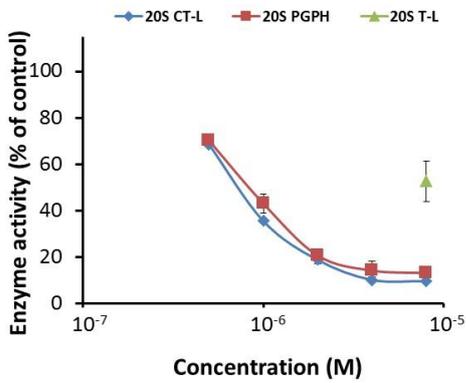


補足図 3-1. 精製 26S 20S CP および 26S プロテアソームへの阻害剤 1h 処理後の蛍光基質を用いた 3 種活性の阻害度測定。阻害剤未処理のものを酵素活性の標準 (100%) として用いた。測定結果は、独立した 3 つの実験の平均値±標準偏差である。青色の曲線が RID-F、赤色の曲線が RID-F-GR<sub>8</sub>、緑色の曲線が R<sub>8</sub>G-RID-F を表す。

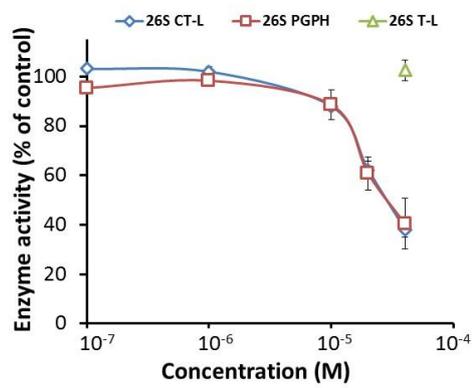
**RID-F-GR<sub>4</sub>****RID-F-GR<sub>6</sub>****R<sub>4</sub>G-RID-F****R<sub>6</sub>G-RID-F****LLVYG-RID-F****補足図 3-2. プロテアソームの阻害**

測定結果は、独立した 3 つの実験の平均値±標準偏差である。RID-F コンジュゲートの種々の濃度での酵素活性は、青色の曲線が CT-L、赤色の曲線が PGPH、緑色の曲線が T-L で示されている。

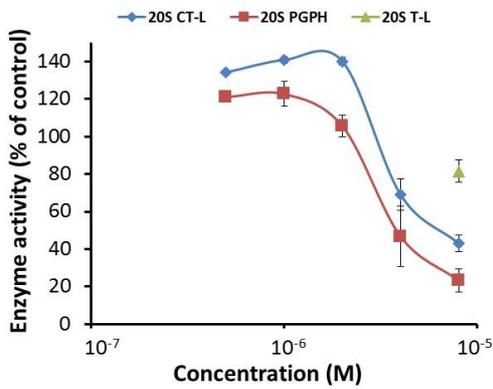
20S Proteasome RID-F-GLLVY



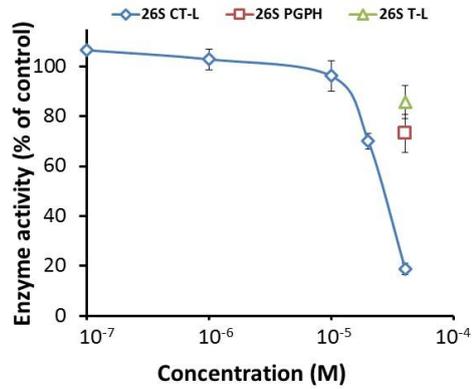
26S Proteasome RID-F-GLLVY



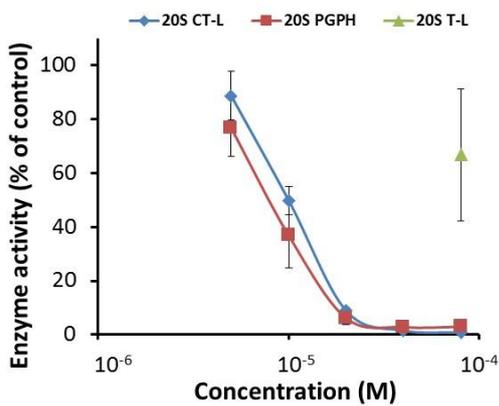
20S Proteasome RID-F-GLLE



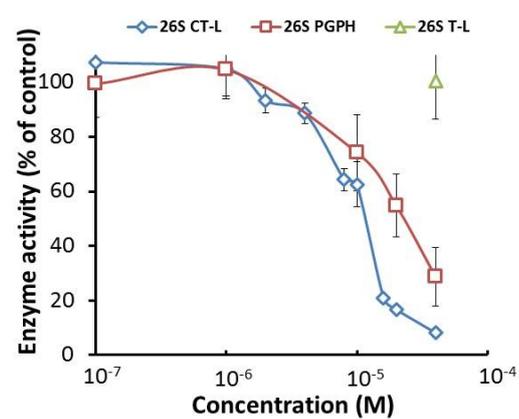
26S Proteasome RID-F-GLLE



20S Proteasome RID-F-GLLVYGG

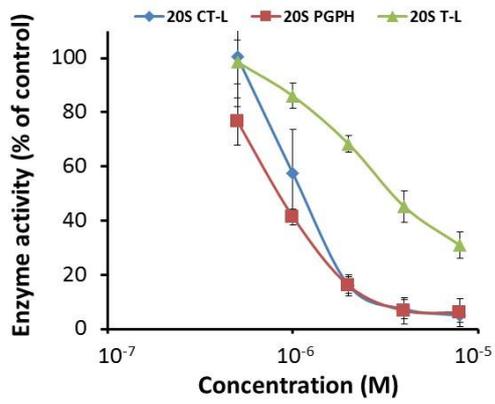


26S Proteasome RID-F-GLLVYGG

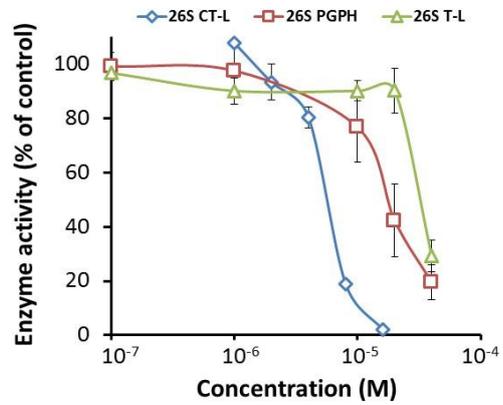


補足図 3- 2. 続き

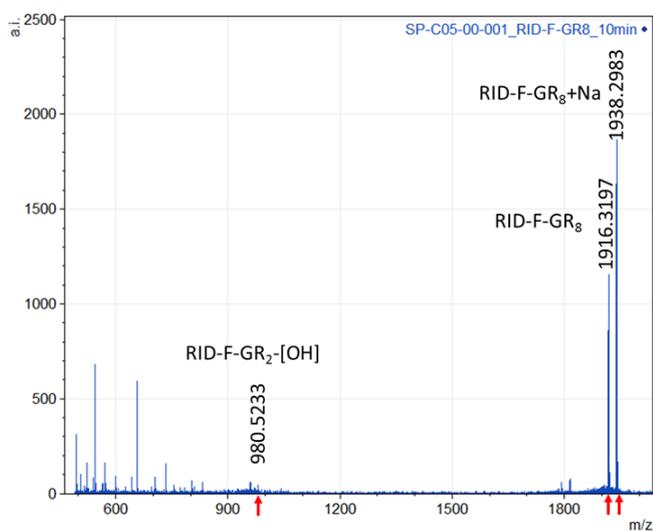
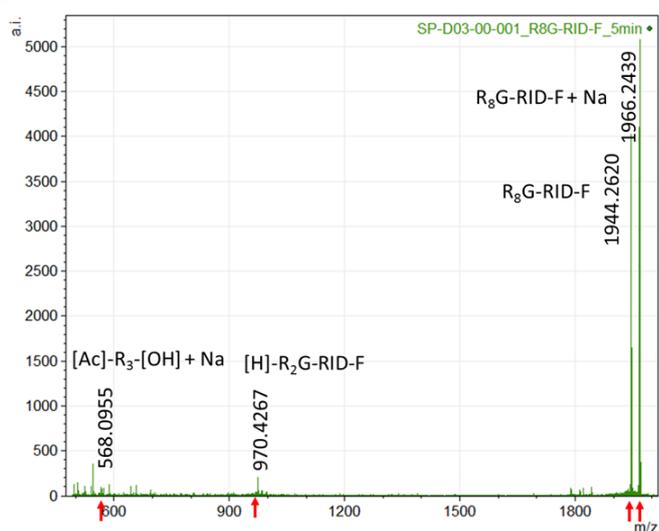
20S Proteasome RID-F-GLLLGGGG



26S Proteasome RID-F-GLLLGGGG



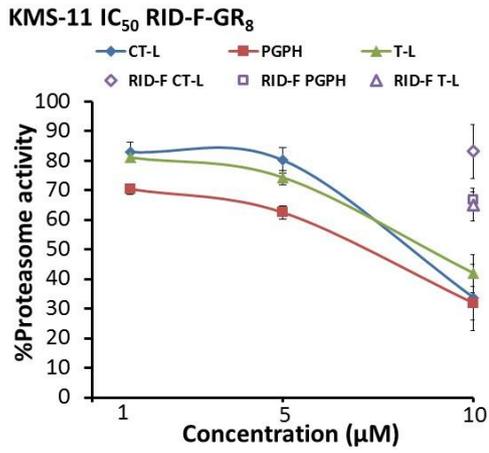
補足図 3- 2. 続き

(A) RID-F-GR<sub>8</sub>(B) R<sub>8</sub>G-RID-F

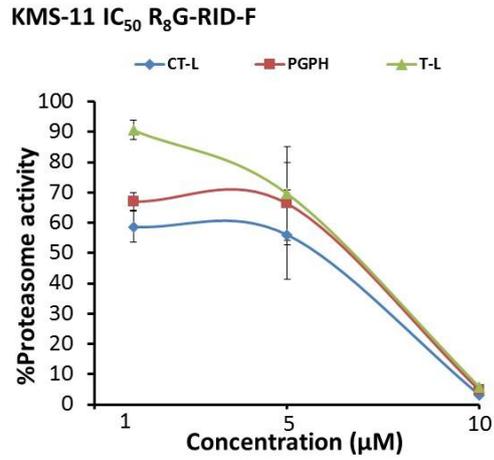
**補足図 3-3.** (A,B) MS による RID-F-CPP に含まれる基質配列のプロテアソーム分解 RID-F にコンジュゲートした配列が基質のようにプロテアソームに分解されているかを 20S CP と各 RID-F-CPP を混合した反応液を MS 解析することによって消化断片の検出を行った。(A) ; RID-F-GR<sub>8</sub> の測定結果では、6 残基が切断された質量に相当する RID-F-GR<sub>2</sub>-[OH]と思われるピークが検出された。(B) : R<sub>8</sub>G-RID-F の場合も同じく 4 残基削れた[H]-R<sub>2</sub>G-RID-F に相当するシグナルが確認できた。また、R<sub>8</sub> 配列中 N 末端側から 3 残基の消化断片も確認された。

以上の側手結果は 20S CP においては RID-F-CPP のペプチド部位が消化されていることを示唆している。

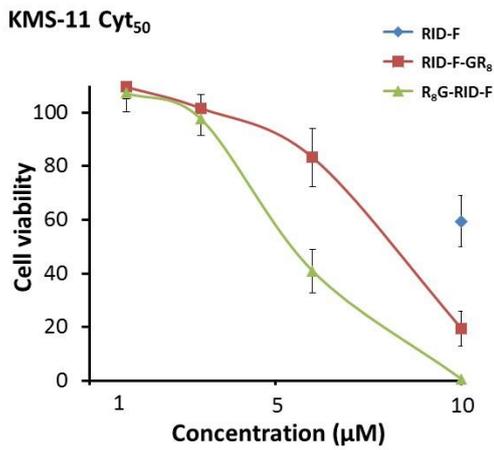
(A)



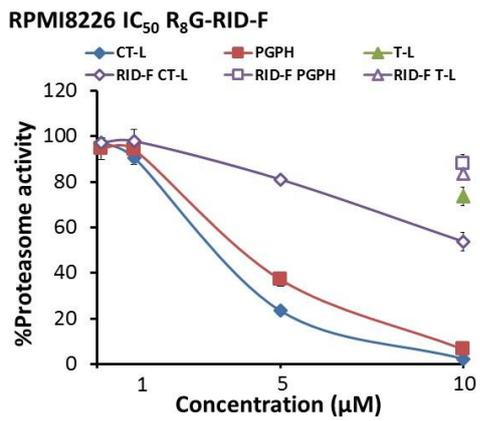
(B)



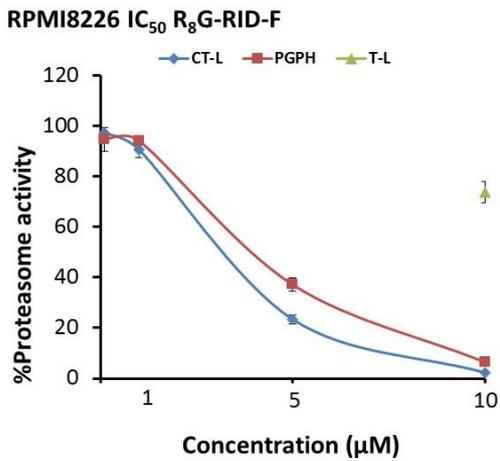
(C)



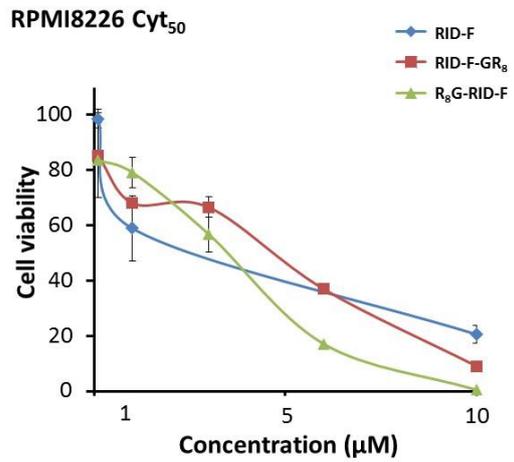
(D)



(E)



(F)



**補足図 3-4** (A, B, D,E) : RID-F コンジュゲートによる細胞内プロテアソーム阻害  
KMS-11 細胞 (A,B) または RPMI 細胞 (D,E) に対する RID-F, RID-F-GR<sub>8</sub> (A, D) および R<sub>8</sub>G-RID-F (B, E)処理の 24 時間処理結果を示す。細胞内プロテアソームの活性は Proteasome-Glo™ Assay (Promega Co.)を用いて測定した。

(C ,F) : RID-F コンジュゲートの細胞毒性。KMS-11 細胞に対して各阻害剤、RID-F (青色) RID-F-GR<sub>8</sub> (赤色) および R<sub>8</sub>G-RID-F (緑色)を 48 時間処理した後、細胞生存率を CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega Co.)を用いて測定した。阻害剤未処理を生存率の標準 (100%) として用い、結果の値は独立した 3 つの実験の平均値±標準偏差として表した。

## 発表論文

1. **Tanaka, M.**; Zhu, Y.; Shionyu, M.; Ota, N.; Shibata, N.; Watanabe, C.; Mizusawa, A.; Sasaki, R.; Mizukami, T.; Shiina, I.; Hasegawa, M., Ridaifen-F conjugated with cell-penetrating peptides inhibits intracellular proteasome activities and induces drug-resistant cell death. *Eur J Med Chem* 2018, 146, 636-650.
2. Hasegawa, M.; Yasuda, Y.; **Tanaka, M.**; Nakata, K.; Umeda, E.; Wang, Y.; Watanabe, C.; Uetake, S.; Kunoh, T.; Shionyu, M.; Sasaki, R.; Shiina, I.; Mizukami, T., A novel tamoxifen derivative, ridaifen-F, is a nonpeptidic small-molecule proteasome inhibitor. *Eur J Med Chem* 2014, 71, 290-305.
3. Hayakawa, Y.; Matsuno, M.; **Tanaka, M.**; Wada, A.; Kitamura, K.; Takei, O.; Sasaki, R.; Mizukami, T.; Hasegawa, M., Complementary DNA display selection of high-affinity peptides binding the vacuolating toxin (VacA) of *Helicobacter pylori*. *J Pept Sci* 2015, 21 (9), 710-6.