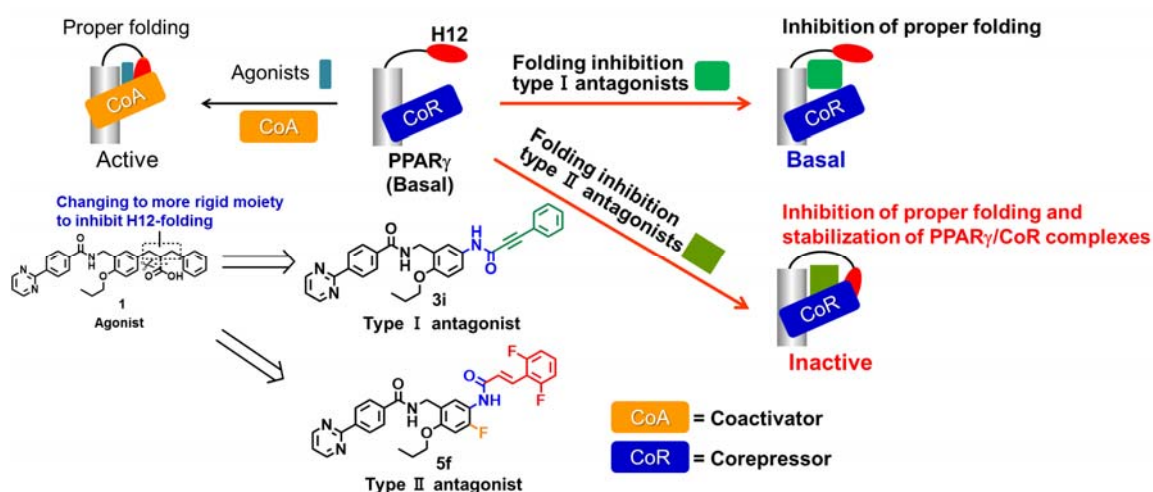


氏 名	大橋 雅生
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	薬 科 学
学位記授与番号	博甲第 5138 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科 薬科学専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)
学位論文の題目	構造情報に基づく核内受容体 PPAR γ 選択的 リガンドの創製に関する研究

学位論文の要約

【グラフィックアブストラクト】



【背景・目的】

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) は核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子である。PPAR は核内で多様な標的遺伝子の転写を調節する作用を有し、糖、脂質恒常性制御に重要な役割を担っている。そのため、これまで PPAR 各サブタイプ(α , δ , γ) は代謝性疾患の分子標的として期待されてきた。実際、グリタゾン系 PPAR γ 選択的アゴニストは 2 型糖尿病治療薬として臨床で用いられており、これまでも膨大な数の PPAR γ アゴニストの創製研究が展開されてきた。一方で PPAR γ アンタゴニストにも医薬応用の可能性が示唆されている。PPAR γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、活性化すると間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を促進し脂肪量を増加させる一方で骨芽細胞への分化を抑制し骨量を低下させることが報告されている。従って、PPAR γ 活性を抑制する PPAR γ アンタゴニストは肥満や骨粗鬆症の治療薬になり得る。さらに近年、興味深いことに PPAR γ アゴニストによる抗糖尿病作用は PPAR γ の活性化に依存していないことが示唆された。実際に PPAR γ の活性化に起因した体重増加等の副作用を回避しつつ強力な抗糖尿病作用を有する新規 PPAR γ アンタゴニストが報告されたことから PPAR γ アンタゴニストの創出は PPAR γ の機能全容解明ひいては様々な疾患に対する医薬候補物質の創出に繋がると期待されている。しかし現在、PPAR γ アンタゴニストを創製するための化合物設計指針は皆無であるため PPAR γ アンタゴニストの同定には膨大な数の化合物のランダムスクリーニングに依存せざるを得ないのが現状である。そこで著者は PPAR γ アンタゴニストを効率的に創出するための方法論の提案とその妥当性を実証するための研究に着手した。

【実験方法・結果・考察】

【1】 H12 フォールディング阻害に基づく PPAR γ アゴニストからアンタゴニストへの転換¹

核内受容体が活性化されるためには核内受容体にアゴニストが結合し核内受容体の部分構造である helix12 (H12) が適切に折りたたまれる (フォールディング) 必要がある。なぜなら、H12 が適切に折りたたまれることで

核内受容体から NCoR などのコリプレッサー (CoR) が解離し DRIP205 などのコアクチベーター (CoA) との複合体形成が可能となり、転写が開始されるためである。この活性化メカニズムに基づく、核内受容体に結合し H12 の適切な折りたたみを阻害する化合物はアンタゴニストになると考えられる (概念 1)。

この概念に基づき著者は PPAR γ アンタゴニストを創製するための化合物設計指針として PPAR γ アゴニスト構造中の、PPAR γ H12 が適切に折りたたまれるために重要な部分構造を逆にその折りたたみを阻害する構造に変換することを考案した。具体的には既に PPAR γ リガンド結合領域 (LBD) との複合体 X 線結晶構造が解かれている、著者が創製した PPAR γ アゴニスト **1** をリード化合物とし、H12 の適切な折りたたみ阻害を指向して **1** のカルボキシ基の除去および剛直化修飾した化合物をデザインし合成を行った (Figure 1)。

転写活性化試験の結果 (Table 1)、アミド誘導体 (**2a-c**) と逆アミド誘導体 (**3a-c**) 共に末端構造の剛直性に逆比例し最大反応性 ($E_{\max}$) が減少する傾向が観察された。そこで、 $E_{\max}$ の完全消失を狙って末端構造を剛直でより嵩高い構造に変換した化合物群 (**3d-i**) を合成した。その結果、強力な PPAR γ アンタゴニスト活性を示すフェニルエチニル体 **3i** の創出に成功した。2-ナフチル体 **3f** や 4-ビフェニル体 **3g** にほとんど PPAR γ アンタゴニスト活性発現が認められなかったことから末端構造の剛直性のみならず適度な嵩高さが PPAR γ アンタゴニスト活性発現に重要であることが示唆された。

次に **3i** は非常に弱いながら PPAR γ アゴニスト活性を内在していたためその活性の完全消失を狙い、末端ベンゼン環の構造修飾を行った (Figure 2)。その結果、内在的な PPAR γ アゴニスト活性の完全消失と強力なフルアンタゴニスト活性を示す 2-Cl 体 **4g** の創出に成功した。創出したフルアンタゴニスト **4g** がデザインコンセプト通り PPAR γ H12 の適切な折りたたみを阻害しているかどうか検討するために、mammalian two-hybrid assay によりコファクターリクルート能を評価した。PPAR γ アゴニストである pioglitazone (pio) は CoA のリクルート活性を促進したのに対し **4g** はその活性を全く示さないことが明らかとなった (Figure 4A)。一

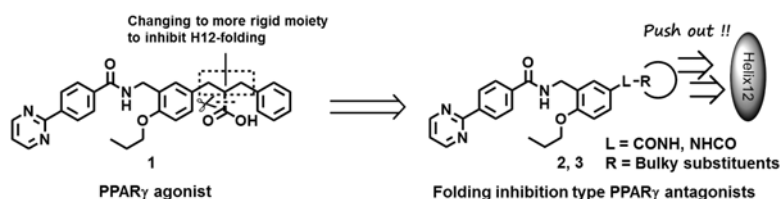


Figure 1. Molecular design strategy for H12-folding inhibition type PPAR γ antagonists.

Table 1. PPAR γ transactivation activities of the compounds^a.

Compd.	L	R	GAL4PPAR γ		
			EC ₅₀ (μ M) ^b	E _{max} (%) ^c	IC ₅₀ (μ M) ^d
2a	CONH	Phenyl	0.75 $\pm$ 0.12	24 $\pm$ 2.5	NT
2b	CONH	Benzyl	0.31 $\pm$ 0.05	30 $\pm$ 2.2	NT
2c	CONH	Phenethyl	1.87 $\pm$ 0.10	51 $\pm$ 4.0	NT
3a	NHCO	Phenyl	0.29 $\pm$ 0.04	19 $\pm$ 1.5	NT
3b	NHCO	Benzyl	0.71 $\pm$ 0.09	65 $\pm$ 11	NT
3c	NHCO	Phenethyl	0.57 $\pm$ 0.16	73 $\pm$ 11	NT
3d	NHCO	4-Ethynylphenyl	0.14 $\pm$ 0.02	18 $\pm$ 0.0	NT
3e	NHCO	1-Naphthyl	0.04 $\pm$ 0.02	16 $\pm$ 3.5	NT
3f	NHCO	2-Naphthyl	ND	<10	>50
3g	NHCO	4-Biphenyl	ND	<10	>50
3h	NHCO	Styryl	NA	—	4.7 $\pm$ 1.3
3i	NHCO	Phenylethynyl	ND	<10	0.17 $\pm$ 0.02
1			0.08 $\pm$ 0.009	80 $\pm$ 3.1	NT
pioglitazone			4.2 $\pm$ 0.86	100	NT

^a All values are expressed as the mean $\pm$ SEM of at least two independent experiments performed in triplicate. ^b EC₅₀ is the concentration giving 50% of the maximal activity observed for a given compound. ^c E_{max} is given as a relative value compared to the maximal activity of pioglitazone. ^d IC₅₀ is the concentration of test compound that affords a 50% decrease in the maximal activity of pioglitazone (30 μ M). ND means not determined. NA means no activity at 10 μ M. NT means not tested.

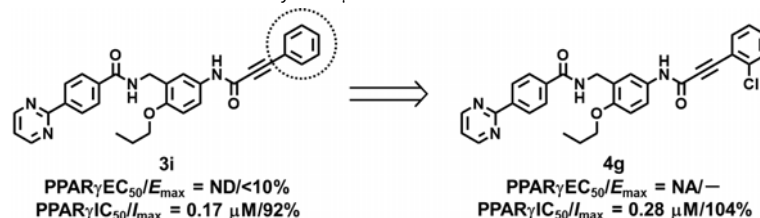


Figure 2. Modification of the distal benzene ring of **3i**.

方で CoR リクルート活性に関しては pioglitazone がその活性を強く抑制したのに対し **4g** は強く促進することが明らかになった (Figure 4B). 以上のことから, **4g** はデザインコンセプト通り PPAR γ H12 の適切な折りたたみを阻害し, さらに H12 を CoR と相互作用しやすい位置に再誘導するため PPAR γ フルアンタゴニスト活性を示したと考えられる.

以上のことから著者は H12 フォールディング阻害に基づく PPAR γ アゴニストからアンタゴニストの転換に成功した. 本戦略は新規 PPAR γ アンタゴニストを創出するための有用なアプローチであると考えられる.

【2】強力な PPAR γ /CoR 複合体安定化能を有する PPAR γ 選択的アンタゴニストの創製

H12 フォールディング阻害型アンタゴニストは核内受容体/CoR 複合体の安定化に寄与しないもの (type I) と 寄与するもの (type II) の 2 群に大別できることを著者らは提案している(概念 2: Kainuma *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007). この機能の違いはアンタゴニストが誘導する核内受容体の H12 の位置の違いに起因すると考えられる. PPAR γ /CoR 複合体を安定化させるアンタゴニストは PPAR γ /CoR 複合体の機能全容解明のためのケミカルツールになるのみならずその強力な PPAR γ に対する不活性化作用により肥満や骨粗鬆症など様々な疾患に対する治療薬になり得る. そこで著者は H12 フォールディング阻害型 PPAR γ アンタゴニストの創製概念 (概念 2) に基づき強力な PPAR γ /CoR 複合体安定化能を有する PPAR γ アンタゴニストの創製に着手した.

まず PPAR γ /CoR 複合体安定化能を有する PPAR γ アンタゴニストのリード化合物を選択するためにこれまで創出してきた H12 フォールディング阻害型 PPAR γ アンタゴニストであるアルケニルアミド体 **3h** とアルキニルアミド体 **3i** の CoR リクルート活性を mammalian two-hybrid assay で評価した. その結果, **3h** の方が **3i** よりも強く PPAR γ /CoR 複合体を安定化させることが明らかになった (Figure 4). そこで **3h** をリード化合物として選択し, H12 のフォールディング (H12 の位置) に影響を与える末端構造を中心に構造修飾を行った.

3h の末端ベンゼン環の構造修飾を行った結果, 2 位への立体の小さい電子求引基の導入により CoR リクルート活性強度が増大する傾向が観察された. 特に 2-F 体 **5b** は既存 PPAR γ 選択的アンタゴニスト T0070907 (T907) よりも強力な CoR リクルート活性強度を有することが明らかになった (Figure 5).

末端ベンゼン環の相互作用が CoR リクルート活性に大きな影響を及ぼすことを考えると **5b** の末端側のアミドの配座制御により CoR リクルート活性が増大する可能性が高いと考えられる. そこで, 分子内水素結合形成によるアミドの配座制御を狙い **5b** の中央ベンゼン環のアミドのオルト位にフッ素を導入した化合物 **5d** を合成した. アミド水素と F 原子間の分子内水素結合の形成の有無は ^1H NMR によりアミド水素のケミカルシフトが低磁場シフトしたことで確認した. **5d** は **5b** よりも CoR リクルート活性および

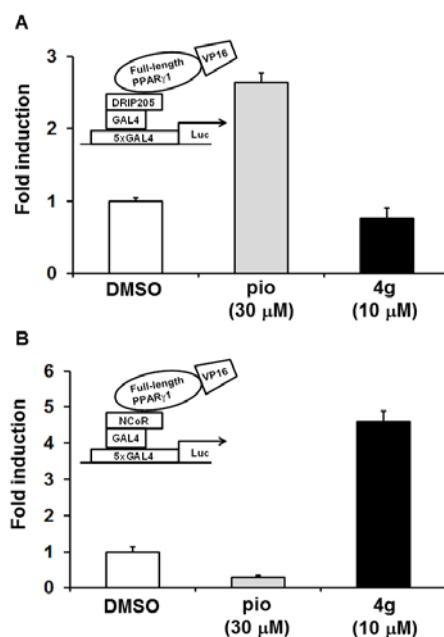


Figure 3. (A) PPAR γ -CoA (DRIP205) two-hybrid assay. (B) PPAR γ -CoR (NCoR) two-hybrid assay.

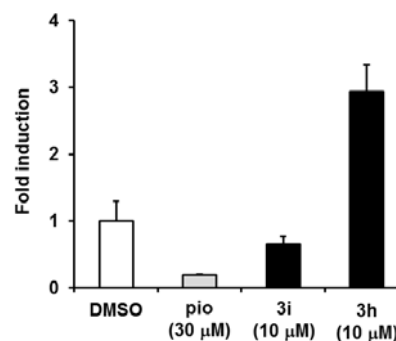


Figure 4. PPAR γ -CoR (NCoR) two-hybrid assay.

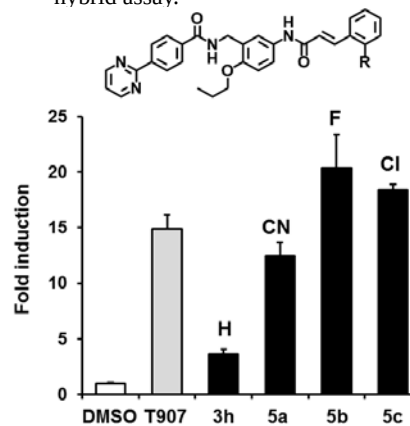
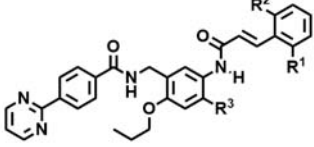


Figure 5. PPAR γ -CoR (NCoR) two-hybrid assay. Test compounds were used at 10 μM .

強度, さらに PPAR γ アンタゴニスト活性が共に向上したことからアミドの配座制御が効果的であることが示唆された (Table 2, Figure 6). この検討の間, **5b** の末端ベンゼン環の 6 位に F を導入した化合物 **5e** が **5b** よりも強い CoR リクルート活性および強度を示すことが判明したため, CoR リクルート活性の相乗的増大を期待し **5d** の末端ベンゼン環 6 位に F を導入した化合物 **5f** を合成した. 活性評価の結果, **5f** は非常に強力な CoR リクルート活性および PPAR γ アンタゴニスト活性を示した (Table 2, Figure 6). さらに, **5f** は T0070907 よりも非常に強力なピオグリタゾン誘導性ならびにホルモン誘導性脂肪細胞分化抑制活性 (Figure 7) を示した. **5f** は著者の知る限りこれまで報告されてきた PPAR γ アンタゴニストの中で最も強力な PPAR γ /CoR 複合体安定化能を有し, 脂肪細胞中においても効果的に機能することから抗肥満薬としての医薬応用と共に PPAR γ および PPAR γ /CoR 複合体の機能全容解明のためのケミカルツールとしての応用が期待される.

Table 2. PPAR γ antagonist profiles of the compounds^a.

					
Compd.	R ¹	R ²	R ³	PPAR γ IC ₅₀ (μ M) ^b	NCoR EC ₅₀ (μ M) ^c
3h	H	H	H	4.7 $\pm$ 1.3	3.8 $\pm$ 0.47
5b	F	H	H	0.84 $\pm$ 0.17	1.5 $\pm$ 0.04
5d	F	H	F	0.58 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.02
5e	F	F	H	0.75 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.08
5f	F	F	F	0.19 $\pm$ 0.004	0.22 $\pm$ 0.01

^a All values are expressed as the mean $\pm$ SEM of at least two independent experiments performed in triplicate. ^b IC₅₀ is the concentration of test compound that affords a 50% decrease in the maximal activity of pioglitazone (30 μ M). ^c EC₅₀ is the concentration giving 50% of the maximal activity observed for a given compound.

【結論】

著者は新規 PPAR γ アンタゴニストを創出するための方法論として, H12 フォールディング阻害 (概念 1) に基づく PPAR γ アゴニストからアンタゴニストの転換を考案した. 具体的に高活性 PPAR γ アンタゴニストを複数創製することでその概念の有用性を示した. さらに著者らが提唱する H12 フォールディング阻害型 PPAR γ アンタゴニストの創製概念 (概念 2) に基づき, PPAR γ アンタゴニスト構造中の H12 のフォールディングに大きな影響を与える部分構造をピンポイントで変換することで強力な PPAR γ /CoR 複合体安定化能を有する **5f** の創出に成功した.

以上のことから, 著者らが考案した概念 1, 概念 2 を基盤とした H12 フォールディング阻害戦略は PPAR γ アゴニストから新規 PPAR γ アンタゴニストを創出するための簡便で有用なアプローチであり, 創出した H12 フォールディング阻害型 PPAR γ アンタゴニストの PPAR γ /CoR 複合体安定化能を制御するための化合物設計指針が研究過程で得られるため様々な不活性化能を有する PPAR γ アンタゴニストの創出にも応用可能である.

3 参考文献

- (1) M. Ohashi, K. Gamo, Y. Tanaka, M. Waki, Y. Beniyama, K. Matsuno, J. Wada, M. Tenta, J. Eguchi, M. Makishima, N. Matsuura, T. Oyama, H. Miyachi. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 90, 53-67 (IF 3.432).
- (2) M. Ohashi, T. Oyama, E. W. Putranto, T. Waku, H. Nobusada, K. Kataoka, K. Matsuno, M. Yashiro, K. Morikawa, N. Huh, H. Miyachi. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 2319-2332 (IF 2.951).
- (3) M. Ohashi, I. Nakagome, J. Kasuga, H. Nobusada, K. Matsuno, M. Makishima, S. Hirono, Y. Hashimoto, H. Miyachi. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 6375-6383 (IF 2.951).
- (4) M. Ohashi, T. Oyama, I. Nakagome, M. Satoh, Y. Nishio, H. Nobusada, S. Hirono, K. Morikawa, Y. Hashimoto, H. Miyachi. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 331-341 (IF 5.480).

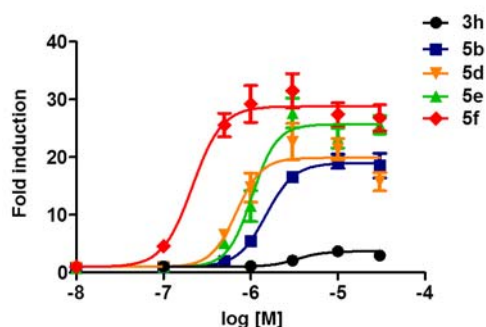


Figure 6. Concentration-dependent effects of antagonists on CoR (NCoR) recruitment to PPAR γ .

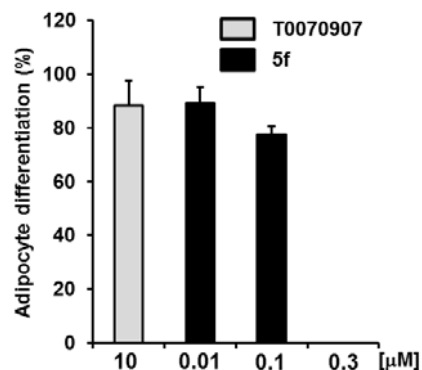


Figure 7. Effects of antagonists on hormone-induced adipocyte differentiation.