

# 論文の内容の要旨

論文題目      ステロイド骨格の代替となるフェナンスリジノン骨格  
                         を用いた生理活性物質の創製

氏      名      西山   郵子

## 【背景】

現在の創薬において、リード化合物の選定は、化合物ライブラリーからインシリコスクリーニングなどのランダムスクリーニングを通じて多くの場合行われる。リード化合物から医薬品を創出するためには、化合物の標的に対する高い活性や高い選択性の獲得が課題となる。従って、効率的なリード化合物の創出・選定は、とても重要な過程であると考えられる。

当研究室では、生理活性物質を探索・創製する際に有用な化合物ライブラリーの構築法として、マルチテンプレート法を提唱している。この手法は、ヒトの体内にある約 5 万から 7 万種のタンパク質のフォールド構造に着目すると、1000 種ほどの立体構造に限定されるという考え方に基づくものである。従って、あるタンパク質のフォールド構造に注目してこれに適合する小分子骨格（テンプレート）を設定し、様々な化学修飾を施すことで多種多様なタンパク質に対して親和性を持つ化合物が創製できるはずである。当研究室では、これまでにジフェニルペンタン骨格をテンプレートとした構造展開を行っており、その汎用性を実証してきた。

ステロイドホルモン、コレステロールなどは、共通してステロイド骨格を有する生理活性物質である。ステロイド誘導体は、がん、アレルギー疾患、心疾患などの治療薬として用いられており、更に糖尿病、精神疾患など多くの疾患治療薬としても期待されている。しかしステロイド骨格を持つ化合物は、その作用点の多さから副作用が問題となっている。一因として、ステロイド骨格では、置換基の導入位置が限定されるため、選択性の向上が困難なことが挙げられる。

本研究では、ステロイド代替骨格をテンプレートとした生理活性物質の効率的創出の実証を目的とした。一般的に、剛直な構造の方が、各種標的に対して強い活性と高い選択性を示すと言われている。そこで、剛直なフェナンスリジノン骨格が、活性増強や選択性発現に有利となることを期待した。合成したフェナンスリジノン類縁体は、ステロイド誘導体を内因性リガンドとする様々な標的タンパク質に対して生物活性を示す可能性がある。このことから、各標的に対するプロファイリングを解析すれば、選択的もしくは多重薬理作用を示すリード化合物を効率的に創出できると期待した。

## 【結果】

種々のフェナンスリジノン類縁体を合成し、ライブラリーを作成した。これらの化合物について、ステロイド骨格を内因性リガンドとする標的タンパク質とその関連タンパク質（レチノイド関連オーファン受容体; ROR, 肝臓 X 受容体; LXR, プログステロン受容体; PR, アンドロゲン受容体; AR, 糖質コルチコイド受容体; GR, レチノイド X 受容体; RXR, 及び  $\alpha$ -グルコシダーゼ）に対する活性を評価し、各標的に対する活性プロファイルを得た (図 1)。その結果、全ての標的に対して、選択的作用もしくは多重薬理作用を示す化合物を見出した。次に、プロファイリングデータをもとにリード化合物を選定し、各標的分子に強い活性を有する化合物が創出できるか実験的に検証した。

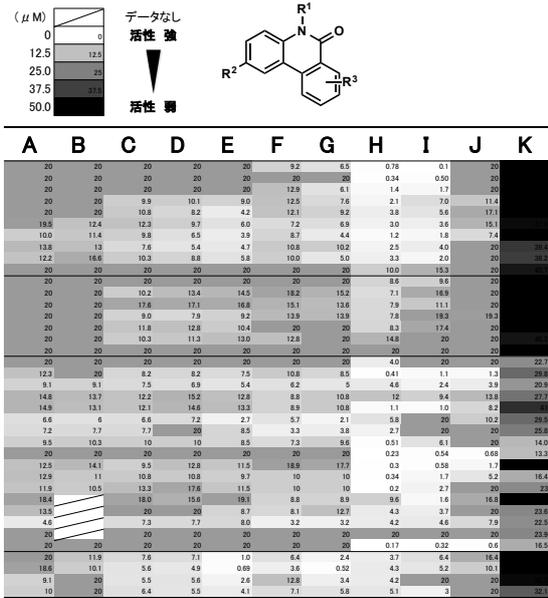


図 1. フェナンスリジノン類縁体の活性プロファイル。(A)RXR $\alpha$ , (B)RXR $\beta$ , (C)ROR $\alpha$ , (D)ROR $\beta$ , (E)ROR $\gamma$ , (F)LXR $\alpha$ , (G)LXR $\beta$ , (H)PR, (I)AR, (J)GR $\alpha$ , (K) $\alpha$ -glucosidase を示す。

## 1. アンドロゲン受容体 (AR) アンタゴニスト 及び プログステロン受容体 (PR) アンタゴニストの創製

AR は、精巣、前立腺、精嚢の他、脳に多く分布し、生殖機能の調節や前立腺がんの発生に関与する遺伝子の発現を調節する。フルタミド (活性本体はヒドロキシフルタミド; HF) など、非ステロイド系 AR アンタゴニストは、主に前立腺がんのホルモン療法剤として用いられるが、薬剤耐性化及びがん増悪化が問題になっている。

PR は、子宮、卵管、乳腺の他、脳に多く分布し、排卵や着床などの生殖現象の調節を行う。PR アンタゴニストであるミフェプリストン (RU486) は、排卵抑制や子宮内膜の増殖を抑制することによる避妊薬として用いられている。しかし、ミフェプリストンはステロイド骨格を有し、他のステロイドホルモン受容体 AR, GR にも作用するため、副作用が報告されている。

プロファイリングデータをもとに、AR アンタゴニスト活性及び PR アンタゴニスト活性を有する化合物 **1** をリードとし、AR 及び PR に対して選択性の高い化合物を創出できるか検証した。

ラクタム窒素上のメチル基 ( $R^1$ ) を取り去った化合物 **2** でも活性は維持され、AR に対しては高活性化、PR に対してはやや低活性化し、結果として PR に対して約 8 倍選択的な AR アンタゴニスト活性を示した。

化合物 **2** をリードに 4 位の置換基について検討した結果、AR に対して 20 倍以上の選択性を持つ強い PR アンタゴニスト **3** を得ることに成功した。

今回見出した化合物 **2** 及び **3** は、これまで報告されている非ステロイド性アンタゴニストの構造とは大きく異なる特長を有している。フェナンスリジノン骨格を基本骨格として用いることで、高い選択性を持つ化合物の創出が可能であることが示唆された。

表 1. AR および PR のアンタゴニスト活性

compd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
			AR	PR
HF	-	-	0.26	-
RU486	-	-	-	0.000057
<b>1</b>	Me	H	0.50	0.34
<b>2</b>	H	H	0.10	0.78
<b>3</b>	H	Me	>20	0.09
<b>4</b>	H	Et	14	0.21
<b>5</b>	H	Pr	5.4	0.37

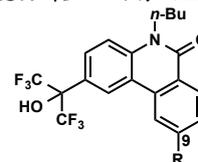
## 2. レチノイド関連オーファン受容体 $\gamma$ (ROR $\gamma$ ) インバーサゴニストの創製

核内受容体の1種であるROR $\gamma$ は、肝臓、脂肪組織、筋組織などに特に多く発現し、炎症や糖代謝の制御を担っているとされている。そのため、ROR $\gamma$  インバーサゴニストは、自己免疫疾患治療薬やインスリン抵抗性改善薬として期待されている。

代表的なLXRアゴニストT0901317 (T1317) がROR インバーサゴニスト活性を示すなどの報告が研究当時であったものの、ROR リガンドの報告は少なく、構造活性相関も不明であった。そこで、フェナンスリジノン類縁体のROR インバーサゴニスト活性を評価し、化合物 **6** の構造展開研究を実施した。

その結果、ラクタム窒素上の *n*-ブチル基、2位のヘキサフルオロプロパノール基が重要であることが示唆された。また、メトキシ基の導入位置を検討したところ、9位に導入することで、ROR $\gamma$  のROR $\alpha$ , ROR $\beta$  に対する選択性が向上した。更に9位にクロル基を導入することで、ROR $\gamma$  に対してより選択性の高い化合物 **8** を得た。この化合物は、LXR $\beta$  アンタゴニスト作用に対する活性分離はできていないものの、構造の類似したT1317よりROR $\gamma$  活性を10倍増強することができた。

表 2. ROR インバーサゴニスト活性



cmpd	R	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)		
		ROR $\alpha$	ROR $\beta$	ROR $\gamma$
T1317	H	>20	NA	6.5
<b>6</b>	H	9.8	6.5	3.9
<b>7</b>	OMe	5.3	7.7	1.1
<b>8</b>	Cl	5.6	4.9	0.69
<b>9</b>	CF <sub>3</sub>	5.5	5.6	2.6
<b>10</b>	OH	6.4	5.5	4.1

## 3. $\alpha$ -グルコシダーゼ選択的阻害薬の創製

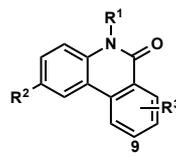
$\alpha$ -グルコシダーゼは、小腸上皮細胞において糖の $\alpha$ -グルコシド結合を加水分解する酵素である。二糖類から単糖類へ分解する作用を持つため、 $\alpha$ -グルコシダーゼの競合的阻害剤は糖尿病治療薬として用いられているが、阻害活性が弱く、副作用が報告されている。

当研究室では過去に、構造が多様なLXRリガンド群が共通して $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性も示すことを見出している。LXRの内因性リガンドはヒドロキシコレステロールであり、またフェナンスリジノン骨格を有するLXRリガンドを見出したことから、フェナンスリジノン骨格をテンプレートとして $\alpha$ -グルコシダーゼ選択的阻害薬が創製できると考え、フェナンスリジノンライブラリーの $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を評価した。

その結果、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を強く示す化合物 **2** を見出した。阻害活性およびLXRに対する選択性向上を目指して構造展開を行ったところ、ラクタム窒素上に *n*-ヘキシル基、2位に *n*-ヘキシル基、9位にヒドロキシ基をそれぞれ導入すると、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性が強くなる傾向が示された。また、2位のヘキサフルオロプロパノール構造は、LXRとの相互作用に重要であることが示されているので、これをアルキル基に変換しLXRアンタゴニスト活性を減弱させた化合物 **12** を得た。次いで、活性の強かった化合物 **11**, **12**, **13** の置換基を組み合わせた化合物 **14** を設計・合成し、更なる活性向上および $\alpha$ -グルコシダーゼに対する選択性向上に成功した。

現在臨床で用いられている  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤は糖等価体の構造を有しており、阻害様式は競合阻害である。強い活性が認められた化合物 **14** は、糖等価体と異なる構造を有していることから、Lineweaver-Burk plot により阻害形式を確認した。その結果、代表的阻害剤デオキシノジリマイシン (DNJ) が競合阻害を示したのに対し、化合物 **14** は非競合阻害であることが明らかとなった。

表 3.  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性



cmpd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)		
				$\alpha$ -glucosidase	LXR $\alpha$	LXR $\beta$
DNJ	-	-	-	130	-	-
<b>2</b>	H	HO(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C	H	59	9.2	6.5
<b>11</b>	<i>n</i> -Hex	HO(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C	H	39	11	11
<b>12</b>	<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -Hex	H	46	13	>20
<b>13</b>	<i>n</i> -Bu	HO(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C	9-OH	32	7.1	5.8
<b>14</b>	<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hex	9-OH	8.5	NA	NA

以上、既存の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬と比較して構造が大きく異なり、強い阻害活性と選択性を有する非競合阻害薬 **14** を創製することができた。

### 【まとめ】

フェナンスリジノン骨格が、ステロイド代替骨格として機能するとの仮説を立て、フェナンスリジノン類縁体を合成し、ライブラリーを作成した。ステロイド類縁体を内因性リガンドとする標的タンパク質に対する生物活性を評価し、各標的に対するプロファイリングを、ヒートマップを利用して解析した。その結果、全ての標的に対して、選択的作用もしくは多重薬理作用を示す化合物の存在が明らかになった。次に、プロファイリングデータをもとにリード化合物を選定し、各標的分子に強い活性を有する化合物が創出できることを実験的に実証した。AR, PR, ROR $\gamma$ ,  $\alpha$ -グルコシダーゼに対して、既存のリガンドと構造的に大きく異なり、強い活性と高い選択性を示す化合物 **2, 3, 8, 14** をそれぞれ創出することができた。特定の疾患に注目した場合、このプロファイリングデータを利用して、必要な標的に多重薬理活性を有するリード化合物を効率的に選定・創製することが可能であると期待している。実際、糖尿病治療薬として期待される標的 (ROR $\gamma$ ,  $\alpha$ -グルコシダーゼ, LXR) に作用する化合物を見出した。今回創出した化合物にはそれぞれ課題がまだ残っているものの、本研究から、基本骨格に対して様々な化学修飾を施すことで、多重薬理作用を示す化合物や標的に対して選択的な化合物が創出できることを実証した。また、これらの結果から、フェナンスリジノン骨格がステロイド骨格の代替骨格として機能することも示唆された。

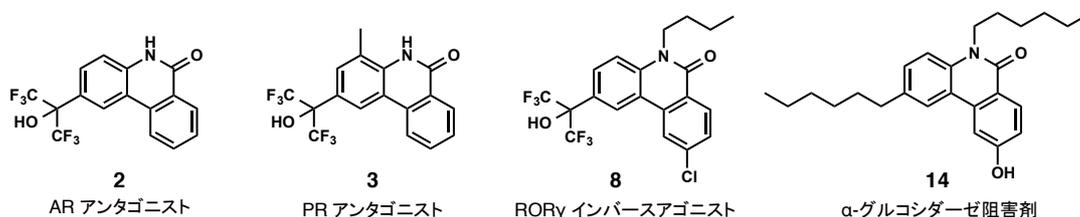


図 2. 本研究により見出されたリガンド