

論文の内容の要旨

論文題目

非古典的なアンドロゲン受容体モジュレーターの創製研究

氏名 沼館 慧剛

研究背景および目的（第一章）

アンドロゲン受容体（AR）は、ジヒドロテストステロン（DHT）に代表されるアンドロゲンを内因性リガンドとする核内受容体であり、標的遺伝子の転写制御により、男性の二次性徴、筋肉や骨の形成といった重要な機能を担っている。AR の機能に深く関わるドメインとして、DNA 結合ドメイン（DNA Binding Domain; DBD）のほか、リガンド結合ポケットを有しリガンド依存的な転写活性化を担うリガンド結合ドメイン（Ligand Binding Domain; LBD）と、アンドロゲン非依存的な転写活性化を担う N 末端ドメイン（N Terminal Domain; NTD）が知られており、転写活性化においては NTD と LBD は協調的に機能すると考えられている（Fig. 1）。

LBD や DBD は AR を含む核内受容体間で相溶性が高い一方で、NTD はその長さや配列が受容体間で大きく異なり、相溶性が低い。AR の構造については程度の差はあるが、ドメイン毎に調べられている。AR の LBD や DBD の部分結晶構造が取られている一方で、NTD の結晶構造が未だ明らかになっていない事からも伺えるように（Fig. 1）、AR-NTD は決まった 3 次元構造を取らない、立体構造的に不安定な領域であることが知られている。

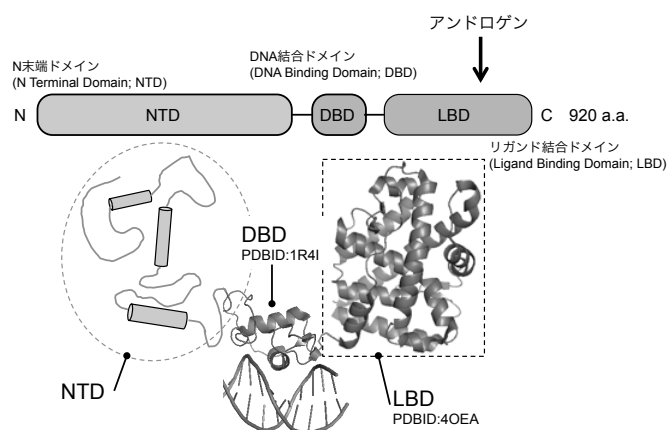


Fig. 1 AR の機能制御に関わるドメイン

機能的には AR は LBD を介したリガンド依存的な転写活性化を担う一方で、NTD を介したリガンド非依存的な転写活性化を担うことが知られている。例えば、キナーゼ経路によるシグナル伝達を介したリン酸化を含む翻訳後修飾や、タンパク質間相互作用を介した転写調節を担っており、その機構は多岐にわたる。

AR に対する医薬化学的な研究としてはこれまで、AR-LBD のリガンド結合ポケットに作用する古典的な AR 転写調節化合物が数多く創製されてきた。一方で現在では、従来のリガンド結合ポケットとは異なる部位に作用することを期待した非古典的 AR 転写調節低分子化合物の創製研究もなされつつある。しかしながら NTD に至っては、

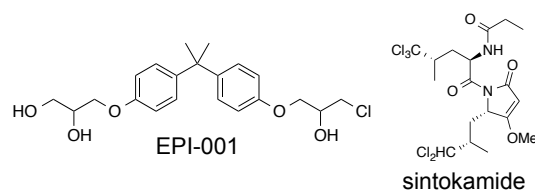


Fig. 2 EPI-001、sintokamide の構造式

これまで低分子化合物による転写制御の標的にはされてきておらず、本研究開始当初には 1 グループによる数化合物の報告 (EPI-001 (**1**), sintokamide, Fig. 2) がなされているのみであった。

AR の機能をより詳細に解明するためのケミカルツールとしては、従来のリガンド結合部位に作用する古典的モジュレーターのみでは限界があるため、AR の NTD に作用する非古典的なモジュレーターが求められる。しかしながら AR-NTD は、その構造不確定性に起因する立体構造情報の少なさから、合理的な化合物デザインによるリードの創出は難しいと考えられる。そこで私は EPI-001 をリード化合物に設定した。本化合物はより系統的な構造展開が容易と考えられるジフェニルメタン構造を有しており、構造展開による高活性化が容易であると考えたためである。しかしながら先行研究においては構造活性相関については精査されていなかった。これらのことから私は、EPI-001 をリードとした構造展開を行い、NTD に焦点を当てた新規作用部位を有する AR モジュレーターの創製および構造活性相関研究に着手した。

評価系の構築と構造活性相関 (第二章、第三章)

活性評価系として、AR-NTD が介在する転写活性化を、ルシフェラーゼ (luc) の発現に置き換えて評価するレポータージーンアッセイ系を構築した (Fig. 3)。そして本評価系で EPI-001 (**1**) およびその誘導体を評価したところ、化合物 **3** および **5** 等が転写亢進活性を示すことを見出した (Table 1)。続いて、活性に重要と考えられる求電子官能基について検討した。単純エポキシ体 **7**、**8** では有意な活性は見られなかったが、置換クロロヒドリン **12** のほか、3 置換エポキシド **10** にも **3** と同等の活性が認められた (Table 2)。

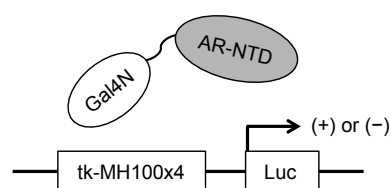


Fig. 3 構築したレポータージーンアッセイ系。酵母の転写因子である GAL4N と AR-NTD を融合させた CMX-GAL4N-hAR-NTD と、GAL4N 結合部位である MH100 と luc を融合させた tk-MH100x4-luc の 2 種のプラスミドを一過性発現させた HEK293 細胞を用いている。

Table 1. 1 誘導体の転写亢進活性

compound	R ¹	R ²	relative RLU (DMSOを100とする)*	
			10 μM	30 μM
EPI-001(1)		Cl	97	106
2		Cl	104	111
3		Cl	120	169
4		Cl	107	127
5		Cl	116	148
6		OH	93	93

*Average of multiple examinations

Table 2. 求電子性官能基の検討

compound	R ¹	R ³	relative RLU (DMSOを100とする)*	
			10 μM	30 μM
5	H		116	148
3	OEt		120	169
7	H		93	93
8	OEt		97	104
9	H		121	130
10	OEt		126	163
11	H		108	131
12	OEt		117	163

*Average of multiple examinations

次に、化合物 **3** のベンゼン環を連結するリンカー部分を検討した。その結果、最大活性では化合物 **3** と同等であるものの、10 μM における活性が化合物 **3** よりも強いジフェニルエーテル誘導体 **17** を得た。一方でアミド誘導体 (**13**、**15**) および *N*メチルアミド誘導体 (**14**、**16**) では強い活性は認められなかった (Table 3)。

続いて、高活性を示したジフェニルエーテル誘導体におけるアルコキシ基の再検討を行った。その結果、転写亢進活性はメトキシ基を有する化合物 **18** で最も強く、炭素数が増えるに従ってその活性が減弱した。また、ヒドロキシエチル体 **26** にも化合物 **17** と同等の活性が認められた (Table 4)。

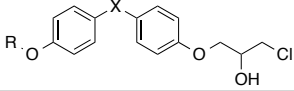
以上、化合物 **18** をはじめ、AR-NTD に対して有意な転写亢進活性を有する化合物群を創製し、それらの構造活性相関に関する情報を取得することが出来た。

非古典的な AR モジューレーターの新規創製(第四章)

創製した化合物群は、核内受容体リガンドのマルチテンプレートとなり得るジフェニルX構造を基盤とすることから、LBD へも作用する可能性が考えられた。そこで NTD/LBD 選択性を評価するために、³H-DHT を用いて化合物の AR-LBD との結合実験を行った。その結果、ジフェニルメタン誘導体 **3** は有意な LBD 結合親和性を示したが、ジフェニルエーテル誘導体 **17**、**18**、**26** の LBD に対する親和性は低く、化合物 **26** は LBD 親和性をほとんど示さなかった (Table 5)。

創製した新規 AR-NTD モジューレーターが全長 AR (AR-FL) に対してどのように機能するか検討するため、全長 AR を用いたレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、化合物 **17**、**18** および **26** は全長 AR においても AR-NTD 評価系で示した転写活性と同程度の転写活性を有していることが示された (Table 6)。

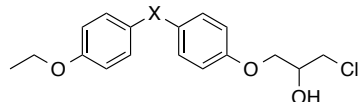
Table 5. AR-LBD に対する親和性



compound	X	R	IC ₅₀ (μM)
1	-	-	16%*
3	-C(CH ₃) ₂ -	Et	8
17	-O-	Et	46%*
18	-O-	Me	29%*
26	-O-	-CH ₂ CH ₂ OH	3%*

*Inhibition rate at 30 μM

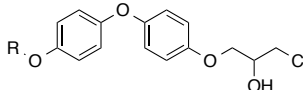
Table 3. リンカー部分の検討



compound	X	relative RLU (DMSOを100とする)*	
		10 μM	30 μM
3		120	169
13		117	135
14		94	91
15		114	135
16		97	95
17		147	163

*Average of multiple examinations

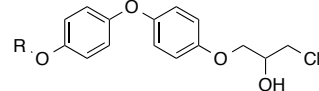
Table 4. アルコキシ基の検討



compound	R	relative RLU (DMSOを100とする)*	
		10 μM	30 μM
17	Et	147	163
18	Me	166	159
19	<i>n</i> -Pr	138	153
20	<i>i</i> -Pr	141	149
21	<i>n</i> -Bu	111	118
22	<i>n</i> -Pent	98	112
23	<i>n</i> -Hex	102	108
24	-CH ₂ - <i>c</i> -Hex	105	120
25	-CH ₂ CH ₂ OMe	111	125
26	-CH ₂ CH ₂ OH	142	159
27	-CH ₂ COCH ₃	119	134

*Average of multiple examinations

Table 6. 全長 AR での転写活性



compound	R	AR-FL activation activity (%)*
17	Et	144
18	Me	159
26	-CH ₂ CH ₂ OH	151

*Maximum activation (%) in the concentration range of 0.1 μM to 30 μM. Average of multiple examinations.

結論

本研究では、AR-NTD のみのコンストラクトを用いたレポータージーンアッセイ系により、AR-NTD に焦点を当てた新規 AR モジュレーターの新規創製研究を行った。その結果、AR-NTD に対して有意に転写を亢進する化合物群の発見と高活性化に成功した。そしてこの化合物が AR-LBD には作用せずに全長 AR の転写活性を調節することを見出した。

現在でも核内受容体 AR の転写調節化合物の新規創製研究は盛んになされているが、その標的部位として想定されているのは、従来の標的部位である LBD のリガンド結合ポケット周辺である。それに対して本研究で創製した化合物は LBD には作用しない非古典的な AR 転写調節化合物であることが示唆された。それ故に、AR-NTD も低分子化合物による AR 転写制御の標的部位になりうるという新たな選択肢を提示できたと考えている。これまで、AR-NTD の機能解明研究は生物学的手法によるものが主であったため、本研究により AR-NTD に化学の目が向けられればよいと考えている。

現在まで、低分子化合物による核内受容体の機能制御研究は AR に限らず非常に多くなされてきた。しかしながら、その例の少なさから、N 末端ドメインという領域に対して化合物が作用する可能性を想定した研究はほぼないことが窺い知れる。本研究は「核内受容体とその転写を制御する低分子化合物」の研究分野に一石を投じたものと考えている。