

## 審査の結果の要旨

氏 名 沼館 慧剛

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、NTD はその長さや配列が受容体間で大きく異なり、相溶性が低いことが知られている。AR の立体構造に関する知見としては、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ことから伺えるように (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。

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い、翻訳後修飾やタンパク質間相互作用を介したその転写調節機構は多岐にわたるが、詳細に関しては未だ不明な点が多いと考えられている。

AR に対する医薬化学的な研究としてはこれまで、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。現在ではさらに、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。一方で、もし NTD に作用する非古典的なモジュレーターがあれば、AR の機能の詳細な解明につながる新規のケミカルツールになりうる。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。このような事実から NTD は、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、1 グループによる数化合物の報告 (EPI-001 (1)、sintokamide、Fig. 2) が研究開始当初にはあったものの、その構造活性相関は不明であった。そこで沼館は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する EPI-001 をリード化合物に設定し構造展開を行い、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の取得を目的に研究に着手した。

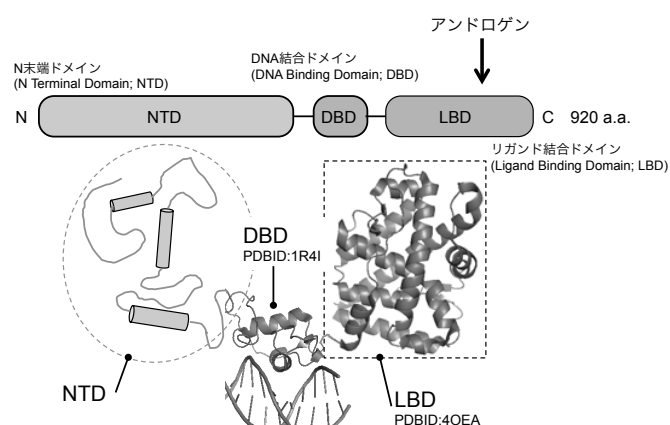


Fig. 1 AR の機能制御に関わるドメイン

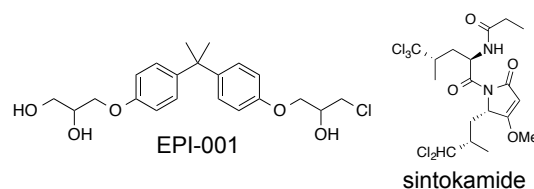


Fig. 2 EPI-001、sintokamide の構造式

第二章においては、活性評価系の構築について記述されている。本研究の目的を達成するための系として、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遺伝子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)。

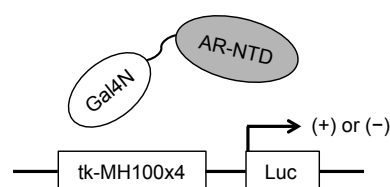


Fig. 3 構築したレポーター遺伝子アッセイ系。酵母の転写因子である GAL4N と AR-NTD を融合させた CMX-GAL4N-hAR-NTD と、GAL4N 結合部位である MH100 と *luc* を融合させた tk-MH100x4-*luc* の 2 種のプラスミドを一過性発現させた HEK293 細胞を用いている。

続いて第三章では、AR-NTD が介在する転写亢進活性の増強と構造活性相関について記述されている。まず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)。

一方、化合物 3 のベンゼン環を連結するリンカー部分の検討の結果、最大活性では化合物 3 と同等であるものの、10  $\mu$ M 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。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。

Table1. 1 誘導体の転写亢進活性

compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	relative RLU (DMSOを100とする)*	
			10 $\mu$ M	30 $\mu$ M
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

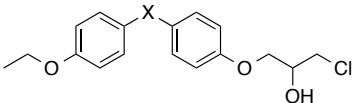
\*Average of multiple examinations

Table2. 求電子性官能基の検討

compound	R <sup>1</sup>	R <sup>3</sup>	relative RLU (DMSOを100とする)*	
			10 $\mu$ M	30 $\mu$ M
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

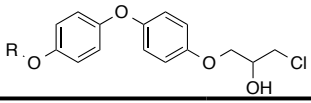
Table3. リンカー部分の検討



compound	X	relative RLU (DMSOを100とする)*	
		10 $\mu$ M	30 $\mu$ M
<b>3</b>		120	169
<b>13</b>		117	135
<b>14</b>		94	91
<b>15</b>		114	135
<b>16</b>		97	95
<b>17</b>		147	163

\*Average of multiple examinations

Table4. アルコキシ基の検討



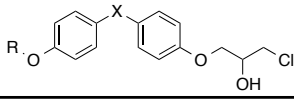
compound	R	relative RLU (DMSOを100とする)*	
		10 $\mu$ M	30 $\mu$ M
<b>17</b>	Et	147	163
<b>18</b>	Me	166	159
<b>19</b>	<i>n</i> -Pr	138	153
<b>20</b>	<i>i</i> -Pr	141	149
<b>21</b>	<i>n</i> -Bu	111	118
<b>22</b>	<i>n</i> -Pent	98	112
<b>23</b>	<i>n</i> -Hex	102	108
<b>24</b>	-CH <sub>2</sub> - <i>c</i>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

\*Average of multiple examinations

第四章では、創製した化合物のプロファイル解析について記述されている。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、<sup>3</sup>H-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)。

また、創製した新規 AR-NTD モジュレーター的全長 AR (AR-FL) に対する機能を検討するため、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)。これらのことから、化合物 **18**、**26** は従来のリガンド結合部位には作用せずに AR の転写を亢進する、非古典的な AR モジュレーターであることが示唆された。

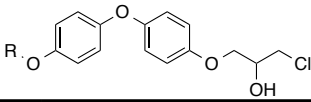
Table5. AR-LBD に対する親和性



compound	X	R	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>1</b>	-	-	16%*
<b>3</b>	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -	Et	8
<b>17</b>	-O-	Et	46%*
<b>18</b>	-O-	Me	29%*
<b>26</b>	-O-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	3%*

\*Inhibition rate at 30  $\mu$ M

Table6. 全長 AR での転写活性



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

\*Maximum activation (%) in the concentration range of 0.1  $\mu$ M to 30  $\mu$ M. Average of multiple examinations.

以上沼館は、本論文に記述した研究において、未だ低分子化合物の標的とされていないAR-NTDに着目し、関連する先行研究から着想を得て、従来の標的部位には作用しない非古典的なARモジュレーターを創製するに至った。研究例が少ない「N末端ドメインを標的とした低分子化合物による核内受容体の機能制御」というテーマに対して、本論文中において高活性とは言えないまでも、新規低分子化合物を創出できた事実は、核内受容体とその転写を制御する低分子化合物の創製研究分野に対して一つの指針をあたえるものになり得ると言える。また本研究で見いだした化合物が特徴あるケミカルツールとしてARの機能解明に応用できるものと期待している。

上述のように、沼館の本博士論文の研究成果は医薬化学研究に大きく貢献するものである。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。