

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14359

研究課題名（和文）新規FXRリガンド開発におけるfocused libraryの構築と応用展開

研究課題名（英文）Focused library approach to develop novel type of FXR ligands

研究代表者

山下 ユキコ（Yamashita, Yukiko）

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号：50616745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者は、N置換ベンゾイミダゾールという共通した中心構造を持ちながら、agonistまたはantagonistとして相反する薬理作用を示す化合物群を見出すことに成功した。また、それぞれの薬理作用に必要と思われるFXR-LBDとの相互作用も明らかにしつつあり、“activate swich”の核心に迫る成果を残した。本研究において、FXRリガンドとしてのファーマコフォアとPKプロファイルを明らかにできたことは、治療薬開発を目指したin vivo評価に向けた大きな躍進である。本研究において得られたこれらの成果は、FXR リガンド創製の社会的意義をより高めるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、これまでのリガンド探索において、薬理活性発現に関わる重要な相互作用部位を明らかにするとともに、FXR agonist/antagonist活性の維持において共通するベンゾイミダゾールファーマコフォアを見出すことに成功した。ベンゾイミダゾールファーマコフォアを有するfocused libraryの発展的応用は、agonist/antagonistに固執することのない柔軟な視点でのFXRリガンド開発を可能にするものであり、NAFLD/NASH改善メカニズムをはじめとするメタボリックシンドローム関連治療薬の創製に大きく寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：As a cellular bile acid sensor, farnesoid X receptor (FXR) participates in regulation of bile acid, lipid and glucose homeostasis, and liver protection. To date, therefore, the activation of FXR leads to considerable interest in FXR as potential therapeutic targets.

We explored of novel type of FXR agonists/antagonists focusing on benzimidazole scaffold in the structure. For FXR antagonists, we have revealed the pharmacophore and PK profile adjustable regions required to maintain activity with a comprehensive understanding of structure-activity relationships. In addition, N-substituted benzimidazole, which was a key building block of FXR antagonist, was applied as a part of FXR agonist.

We have succeeded in finding a highly potent and active FXR ligands. In addition, the interaction between FXR-LBD and these ligands, which seems to be necessary for each pharmacological activation, is being clarified, and the core of "activate swich" can be approached.

研究分野：創薬化学

キーワード：FXR

1. 研究開始当初の背景

(1) 胆汁酸をリガンドとする farnesoid X receptor (FXR)は、核内受容体の一種であり、その脂質代謝制御機能が明らかになりつつある。FXRは胆汁酸と結合すると target gene である small heterodimer partner (SHP)を介して cytochromeP450 7A1 (CYP7A1)の発現を抑制し、コレステロールから胆汁酸への異化反応を阻害する。FXRは、SHPを介してタンパク質発現を制御し、胆汁酸合成のみならず細胞内の胆汁酸濃度の調整にも関与しており、胆汁酸センサーとして重要な役割を担っている。またFXRは、胆汁酸/コレステロールホメオスタシス維持のみならず糖代謝にも関与しており、脂質代謝性疾患や糖尿病をはじめとするメタボリックシンドローム関連治療薬の標的分子として注目を集めている。

(2) また、近年、小腸を介した経腸コレステロール排泄 (TICE: transintestinal cholesterol excretion)経路の存在が明らかとなり、肝臓を介さないコレステロール排泄経路として大きな注目を集めている。TICEは、総糞便中性ステロール排泄に大いに貢献すると考えられ、コレステロールホメオスタシスの維持における腸の役割が重要視されるようになってきた。TICEのメカニズムについては未解明な部分が多く詳細は明らかでないが、直近の報文において腸管FXRがTICEの調節に際し重要な役割を担っているという報告がなされた。この知見は大変興味深いものであり、FXRは主な発現部位である肝臓と腸それぞれにおいて全く違う機構でコレステロール排泄に関与していることになる。すなわち、FXRを標的分子とするリガンド合成研究は、スタチン系薬剤をはじめとする既存のコレステロール降下剤治療とは異なる全く新しい治療薬の開発に貢献し得る可能性を十分に秘める。

2. 研究の目的

核内受容体の一種である farnesoid X receptor (FXR)は、メタボリックシンドローム関連治療薬の標的分子として注目されている。申請者は、これまでのリガンド探索において、大変強力な新規 FXR antagonist を見出すことに成功した。さらに興味深い知見として、合成展開を進める中で agonist/antagonist に共通する構造的特徴を掴みつつあり、類似構造を持ちながら相反する薬理作用を示す点に着目した。FXR-LBD (ligand binding domain)との親和性を担保するために必要となる構造上の特性を注視しながら、FXRにおける“activate switch”が何であるのかを明らかにすべく focused library の構築を進め、既存の FXR リガンドとは異なる可能性を秘める全く新しい FXR リガンド開発に取り組むことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 申請者は、*in vitro*における FXR の基本的な評価系として cellular assay (Luciferase reporter assay)ならびに binding assay (TR-FRET 法)を確立しており、本研究課題において得られた化合物群を対象にこれらを実施した。また、これに付随して、胆汁酸生合成の律速酵素であり FXR の下流に位置する CYP7A1 や SHP の mRNA 発現レベルを評価するとともに、その他の核内受容体への作用の有無についても確認し、FXR への選択性についても評価した。

(2) FXR は X 線結晶構造解析によりその構造が解かれている。これを応用し、(1)で評価した化合物のうち nM レベルの強力な活性を有するものについては、FXR とどのような活性コンフォメーションを取り得るのかを計算的手法 (CADD: Computer-aided Drug Design)により可視化した。

(3) 本研究課題において得られた FXR antagonists のうち、(1)と(2)を総合的に評価し選定された候補化合物を対象に、ラットを用いた *in vivo* 試験を行った。ラットに対し、対象化合物を経口または静脈内投与し、得られた生体サンプルについて LC-MS/MS 分析を行い、標的臓器 (肝臓または回腸)への組織移行性や PK パラメーターの解析を行い、薬物動態学的な観点について評価した。

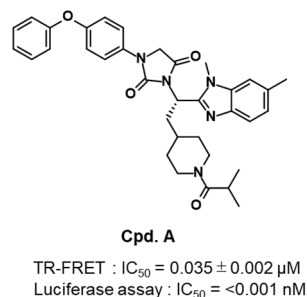
(4) 申請者は、(1)(2)(3)に示した手法による FXR リガンド評価を実施し、得られたデータを相互に十分に精査し、新規合成化合物を多角的に評価した。

4. 研究成果

(1) 二環性複素環骨格とヒダントイン部分をつなぐリンカー領域に着目しながら、多様な chemotype の創造に取り組んだ結果、FXR antagonist 活性において、リンカー領域への N-acetylated piperidine 構造の導入が有用であることを見出した。この構造を部分構造として有する化合物分は、Luciferase reporter assayにおいて高いFXR antagonist 活性を示すことを確

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

認め、最も高いもの (Cpd.A) では IC_{50} 値が nM をはるかに下回る ($IC_{50} < 0.001$ nM) ほど強力な活性を示すと同時に、FXR TR-FRET binding assay においても良好な IC_{50} 値を示した。さらに、CADD (Computer-Aided Drug Design) による FXR の LBD (Ligand Binding Domain) と合成化合物との分子ドッキングシミュレーションにより、N-acylated piperidine が有するカルボニル基が FXR-LBD の His298 と水素結合を形成していることが示唆され、この相互作用が FXR antagonist 活性に関連している可能性が強いことを明らかにした。¹⁾



(2) (1)で見出された Cpd.A をはじめとする非常に強力な FXR antagonists が、*in vivo* 試験においてどのような薬物動態学的挙動と組織分布を示すのかを明らかにするため、FXR antagonist 活性の維持と *in vivo* での PK プロファイルの調整を可能にする領域 (Building block) について構造活性相関の包括的な理解を目指した。その結果、FXR antagonist 活性を維持するために必要となるファーマコフォアを見出すと同時に、PK パラメーターと組織分布の調整に寄与する領域を明らかにした。また、これらの領域のうち Region G に対して modification を行った Cpd.B は、Cpd.A と比較して、ラットへの経口投与時において標的臓器 (肝臓や回腸) への組織移行性を大幅に改善した。昨今、組織特異的な FXR の働きが注目される中、標的臓器への移行性の担保は重要な観点であり、同一 chemotype においてファーマコフォアと薬物動態学的挙動に關する領域を明らかにできたことは今後の研究展開につながる大変興味深い知見である。²⁾

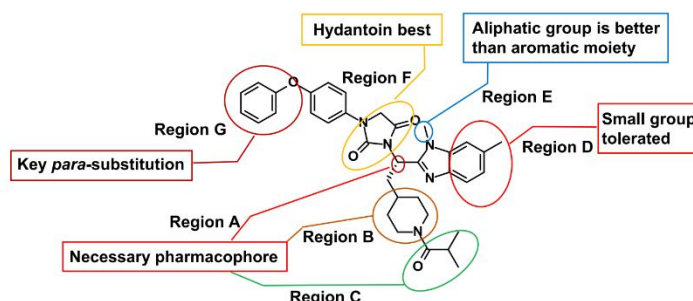


Fig. 1. Brief summary of building blocks necessary for preserving robust potency of Cpd.A.

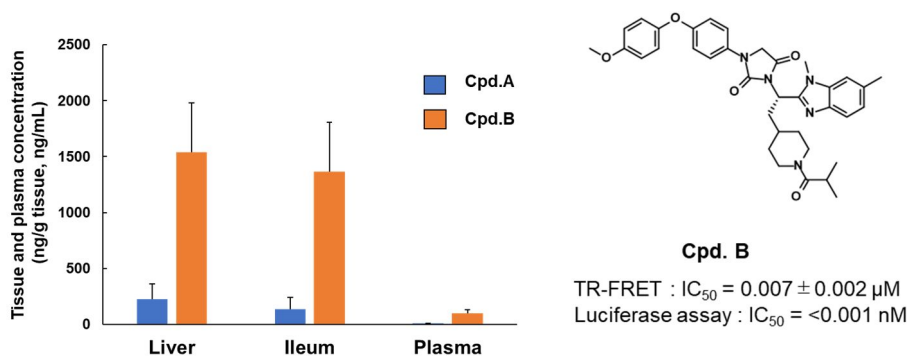
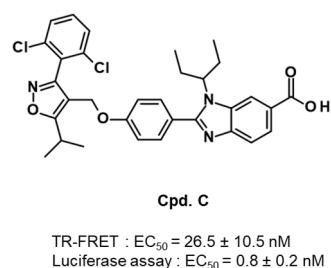


Fig. 2. Tissue distribution of Cpd.A and Cpd.B at 360 min after oral administration (30 mg/kg) in rats. Cpd.A and Cpd.B were dissolved in 40% HP-β-CD. Data are expressed as the mean \pm SEM of five independent experiments.

(3) FXR における “activate switch” が何であるのかを明らかにすべく、(1)および(2)で見出された一連の FXR antagonists に共通する building block である N 置換ベンゾイミダゾールに着目し、この構造が FXR リガンドとしての重要な scaffold になり得るという仮説のもと、FXR agonists の創製に応用展開した。その結果、*in vitro*での活性評価において、nM レベルの EC_{50} を有する高活性 FXR agonist (Cpd.C) を見出すことに成功した。また、CADD による FXR の LBD と Cpd.C との分子ドッキングシミュレーションにより、末端カルボン酸が FXR-LBD の Arg331 と相互作用していることが示唆された。同一 chemotype での構造活性相関において、末端カルボン酸を持たない化合物群では著しい活性低下が認められたこと



から、Arg331 との相互作用が agonist 活性の増減に寄与している可能性も明らかとなった。³⁾

(4) (3)について研究を進める過程で、骨代謝と FXR との関連について興味深いデータを得た。骨形成は、ホルモンなど様々な因子によって調節されているが、特に骨形成タンパク質 (BMP-2) Runx2 のシグナル伝達によって骨形成タンパク質の発現上昇がおこり、骨芽細胞への分化誘導が起こるとされる。骨代謝における FXR の関与は明らかでないが、FXR や SHP 欠損マウスでは骨密度減少が、また、FXR agonist では骨芽細胞への分化増加が報告されている。そこで、Cpd.C について、*in vitro*での間葉系幹細胞 (MSC) から骨芽細胞への分化誘導作用を検討したところ、Cpd.C は FXR を介して骨芽細胞への分化誘導を促進することが示唆された。⁴⁾

(5) (1)～(3)の知見から、N 置換ベンゾイミダゾールという共通した中心構造を持ちながら、agonist または antagonist として相反する薬理作用を示す化合物群を見出すことに成功した。また、それぞれの薬理作用に必要と思われる FXR-LBD との相互作用も明らかにしつつあり、“activate switch”の核心に迫る点において、本研究の発展性が見込まれる。その一方で、現時点において *in vivo*での評価は十分でない。本研究において、FXR リガンドとしてのファーマコフォアと PK プロファイルを明らかにできたことを足掛かりに、代謝安定性等を考慮した候補化合物の選定を行い、適切に *in vivo*評価を行うことが今後の課題である。また、(4)の知見は、当初想定していなかったものであり興味深いデータである。本研究課題において得られたこれらの成果は、FXR リガンド創製の社会的意義をより高めるものであると考える。

<参考文献>

- 1) Teno N. *et al.* *ACS Med Chem Lett.* 2018, 9, 78-83.
- 2) Teno N. *et al.* *Bioorg Med Chem.* 2019, 27, 2220-2227.
- 3) Teno N. *et al.* *Bioorg Med Chem.* 2020, 28, 115512.
- 4) Fujimori, K. *et al.* *Molecules.* 2019, 24, 4155.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoki Teno, Yukiko Yamashita, Arisa Masuda, Yusuke Iguchi, Keisuke Oda, Ko Fujimori, Takie Hiramoto, Tomoko Nishimaki-Mogami, Mizuho Une, and Keigo Gohda.	4. 巻 27
2. 論文標題 Identification of potent farnesoid X receptor (FXR) antagonist showing favorable PK profile and distribution toward target tissues: Comprehensive understanding of structure-activity relationship of FXR antagonists	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 2220, 2227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2019.04.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naoki Teno, Yukiko Yamashita, Yusuke Iguchi, Ko Fujimori, Mizuho Une, Tomoko Nishimaki-Mogami, Takie Hiramoto, and Keigo Gohda.	4. 巻 9
2. 論文標題 Nonacidic Chemotype Possessing N-Acylated Piperidine Moiety as Potent Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonists	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 78, 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmchemlett.7b00363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda Arisa, Gohda Keigo, Iguchi Yusuke, Fujimori Ko, Yamashita Yukiko, Oda Keisuke, Une Mizuho, Teno Naoki	4. 巻 28
2. 論文標題 N1-Substituted benzimidazole scaffold for farnesoid X receptor (FXR) agonists accompanying prominent selectivity against vitamin D receptor (VDR)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115512 ~ 115512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2020.115512	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増田 有沙、山下 ユキコ、井口 裕介、小田 啓祐、藤森 功、合田 圭吾、手納 直規
2. 発表標題 Farnesoid X receptor (FXR) アンタゴニストの構造活性相関研究：薬物動態と標的組織分布の評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田 有沙、山下 ユキコ、井口 裕介、藤森 功、合田 圭吾、手納 直規
2. 発表標題 Hit-to-lead approachから得られたFarnesoid X receptor (FXR)アンタゴニストの創出と、脂肪細胞の分化抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田 有沙、井口 裕介、藤森 功、合田 圭吾、山下 ユキコ、手納 直規
2. 発表標題 N1置換ベンゾイミダゾール骨格を有する farnesoid X receptor (FXR)アゴニストの構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------