

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月 31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790108

研究課題名（和文） ステロイド代替薬創出を指向したRXRパーシャルアゴニストの創出と評価

研究課題名（英文） Creation and evaluation of RXR partial agonists for the substitutes of steroidal anti-inflammatory agents

研究代表者

加来田 博貴（KAKUTA HIROKI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80362961

研究成果の概要（和文）：副作用を軽減したステロイド薬に匹敵する抗アレルギー・炎症薬が希求されている実情に鑑み、本研究では、ステロイドとは異なる作用機序によるステロイド代替薬の創出を指向して、所望の効果が期待されたレチノイドX受容体（RXR）パーシャルアゴニストを新規に創出し、その副作用発現、さらには薬効を評価した。申請者らが見出したRXRフルアゴニストNEt-3IB（6-[N-ethyl-N-(3-isobutoxy-4-isopropylphenyl)amino]nicotinic acid）のアルコキシ基の種々の変換、さらに位置異性体の創出の結果、新規なRXRパーシャルアゴニストNEt-4IB（6-[N-ethyl-N-(4-isobutoxy-3-isopropylphenyl)amino]nicotinic acid）がRXRの副作用なく、TPA（12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate）を用いた皮膚炎モデルで有効なことを見出した。

研究成果の概要（英文）： Effective substitutes of steroidal anti-inflammatory agents for the treatment of allergies and inflammation are required. Thus, we aimed to create new non-steroidal anti-inflammatory agents by targeting retinoid x receptors. By structural development of NEt-3IB (6-[N-ethyl-N-(3-isobutoxy-4-isopropylphenyl)amino]nicotinic acid), a potent RXR agonist, several RXR partial agonists were found. Among them, NEt-4IB (6-[N-ethyl-N-(4-isobutoxy-3-isopropylphenyl)amino]nicotinic acid) was found as a new orally available RXR partial agonist. In addition, this compound showed potent anti-inflammatory activity against the TPA induced skin inflammation without significant side effects.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：ステロイド・抗炎症・核内受容体・レチノイド・RXR・パーシャルアゴニスト・皮膚炎モデル

1. 研究開始当初の背景

臨床において、副作用を軽減したステロイド薬に匹敵する抗アレルギー・炎症薬が希求されている。このような実情を鑑み、申請者らはステロイドとは異なる作用機序による「ステロイド薬に替わる新規医薬ターゲットの発掘」を本プロジェクトで展開することで、ステロイド代替薬の創出を迅速化出来ればと考えた。

申請者らが注目している分子標的は、核内受容体の一つであるレチノイドX受容体

(RXR)である。その根拠として、核内受容体PPAR, LXR のアゴニストによりアレルギー性炎症が軽減されるという報告に加え、さらにPPAR, LXR がそれぞれRXR とヘテロダイマーを構築し、これらのヘテロダイマーがRXRアゴニスト単独でも活性化されること

(RXRパーミッシブヘテロダイマー)、RXR-RXRホモダイマーが、PPAR応答領域に結合し、PPAR遺伝子発現を誘導しうること、加えて外因性のみならず内因性のPPAR, LXR, RARアゴニストの活性をRXRアゴニストは増強しうることシナジー効果を有することが挙げられる。PPAR, LXRは異なる経路で抗炎症効果を発揮しうること知られ、PPAR γ アゴニストが、樹状細胞上のレチノイン酸産生酵素であるaldh1a2の発現を上昇しCD4⁺CD25⁺T細胞(naiveT細胞)から制御性T細胞(Treg)分化誘導を促進すること、一方のLXRアゴニストは炎症やアレルギーに関わるIL-17を産生するTh17細胞の機能低下が見られることなどが、これらの抗アレルギー・炎症作用の作用機序の一つとして報告されている。このようにRXRアゴニストは、単独でPPAR-RXR, LXR-RXRの両方の活性化に加え、内因性のPPAR, LXRアゴニストやPPAR-RXR活性化に伴い発現量増加されるレチノイン酸に対する

シナジー効果が期待出来ることから、抗炎症・アレルギー薬候補物質として魅力的に思われた。RXRアゴニストによるTreg誘導、抗炎症・アレルギー効果については未報告であり、そのような中、申請者らは開発RXRアゴニストによるTreg誘導を世界で初めて見出した(論文投稿中)。

RXRを十分活性化しうるRXRフルアゴニストは、ステロイド薬に見られる副腎・胸腺の萎縮を認めないことを申請者らは確認している。しかしながら、連投により体重増加、血中トリグリセリド上昇、甲状腺機能低下が少なからず認められる。そこで注目したのが、RXRパーシャルアゴニストである。フルアゴニストは、受容体の活性過多に由来したホメオスタシスの破綻を起こしかねない。そこで申請者は、フルアゴニストに比べてefficacy (E_{max})が60%前後であるRXRパーシャルアゴニストであれば、適度なRXR-LXR, RXR-PPARの活性化により、極端なTG上昇なく抗炎症効果などが発揮できるのではないかと考えた。

なお、RXRパーシャルアゴニストの文献報告はあるが、in vivoでの評価に関する報告はなく本研究の新規性・独自性は極めて高い。

2. 研究の目的

リウマチをはじめとする炎症性疾患、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患において利用されているステロイド剤は、有用であるもののその副作用のため用途が限られており、その代替薬が希求されている。上記疾患に対する新規医薬として制御性T細胞分化誘導物質(Treg誘導物質)が注目されているが、そのレパートリーは少ない。そのような中、申請者らはレチノイドX受容体(RXR)を標的としたフルアゴニストを開発し、それによ

る Treg 誘導能を世界で初めて示した。しかし, RXR フルアゴニストでも血中トリグリセリド上昇などの副作用を生じうる。そこで本研究では、この回避法として RXR パーシャルアゴニストに注目し、その新規創出とその薬効評価を行った。

3. 研究の方法

(1) RXR パーシャルアゴニストの創出

RXR アゴニストは一般的に酸性部位, 疎水性部位, それらを繋ぐリンカー部位から成る。これまでに申請者らはリンカー部位から酸性部位にかけて閉環した構造を持つ RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (**1**) を見出している。RXR パーシャルアゴニストのバリエーションを増やすため、疎水性部位の変換によってパーシャルアゴニストの創出ができないかと考えた。すなわち、これまでに申請者らは強力な RXR フルアゴニスト NEt-3IB (6-[*N*-ethyl-*N*-(3-isobutoxy-4-isopropylphenyl)amino]nicotinic acid; **2**) を見出しているが、**2** の3位のイソブトキシ基の変換が可能のため、イソブトキシ基の変換により RXR 活性化能が調節できないかと考え、種々のアルコキシ基を持つ化合物を合成し、活性評価を行った。さらに、**2** の3位のイソブトキシ基と4位のイソプロピル基を入れ替えた化合物の創出が可能であることを考え、その化合物について4位のアルコキシ基を種々変換することで新たな RXR パーシャルアゴニストの創出が可能ではないかと考えた。そこで上記の方法により新規の RXR パーシャルアゴニストの創出を行った。

(2) In vivo 試験

① 創出化合物の血中移行性試験

ICR マウスに化合物を 30 mg/kg で経口投与し、0.5、1、3、6 時間後に解剖、採血を行って化合物の血中移行性を調べた。

② RXR パーシャルアゴニストの副作用発現評価

ICR マウスに化合物を 30 mg/kg で一週間経口投与を行い、日々の体重変化を観察し、その後解剖、採血を行うことで評価した。一般的に RXR フルアゴニストの副作用としては体重増加、肝肥大、血中トリグリセリドの上昇があるため、それらを評価項目としてあげ、解剖時に肝臓の重量を測定、血液サンプルについては富士ドライケムを用いて血中トリグリセリド値の測定を行った。

③ RXR パーシャルアゴニストの薬効評価

TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate) をマウスの耳に塗布し、一時間後に化合物のアセトン溶液を塗布した。毎日耳の厚さを測定し、これを4日間繰り返し、最終日には、耳の厚さを測定するとともに、耳を直径6 mm のトレパンでくり抜き、重さを測定した。TPA は塗布により表皮の分化増殖を促進し、尋常性乾癬様の病態を誘発させることが知られており、皮膚の炎症、浮腫が引き起こされ、耳の肥大が見られる。そのため、乾癬に対する有効性や抗炎症作用の評価のために使用される。なお、本実験は実験者にサンプル名を伝えないブラインドで行った。なお、いずれの動物実験は、岡山大学動物実験委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

新規 RXR パーシャルアゴニストの創出を志向し、**2** の3位アルコキシ基の変換及び4位に種々のアルコキシ基を有する化合物の合成を行った。合成した化合物についてレポータージーンアッセイを用いて活性評価を行った結果、3位アルコキシ基を種々のアルコキシ基に変換したところ、*n*-ヘキシルを有

する NEt-3nHex (**5**), また, フェニルペンチルを有する NEt-3PPh (**6**) に 80%程度の RXR パーシャルアゴニスト活性を見出し, 4 位にイソブトキシ基を持つ化合物 (NEt-4IB : **6a**) に $E_{\max} = 59\%$, $EC_{50} = 660 \text{ nM}$ 程度の RXR パーシャルアゴニスト活性を見出した.

血中移行性を調べると, 3 位アルコキシ基を持つ化合物よりも 4 位にイソブトキシ基を持つ **6a** の方が血中移行性が良いことが分かったため, **6a** について *in vivo* 試験を行った. **6a** の副作用発現について見ると, 一週間の経口投与により有意な体重増加, 肝肥大は見られなかったが, 血中トリグリセリド値の上昇が見られ.。しかしながら, 既存の RXR フルアゴニストより比較的緩和なものであり, RXR アゴニストの副作用軽減には成功したと言える.

一方で, 薬効について評価した結果, RXR フルアゴニストである **2**, RXR パーシャルアゴニストである **6a**, いずれにおいても耳の厚さにおいて改善傾向が見られた. さらに, 最終日の耳の重さにおいては, 両者とも有意な改善が見られ, その効果は同程度であった.

以上の結果より, RXR パーシャルアゴニストは RXR フルアゴニストと同等な薬効を持ちながら, フルアゴニストの副作用を軽減することができることが明らかとなった. これまで, RXR フルアゴニストの開発, 薬効評価については広く行われているものの, その副作用により RXR に関する研究が滞っている. そのような中, RXR パーシャルアゴニストによって副作用の軽減が可能となれば, RXR に関する研究が今後ますます発展するものと思われ, その寄与は大きいと考えられる. また, 今回の研究成果は RXR パーシャルアゴニストがステロイド代替薬として魅力的であることが提示され, ステロイド代替薬創出

の迅速化における一翼を担うものと考えられる.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nakayama M, Yamada S, Ohsawa F, Ohta Y, Kawata K, Makishima M, and Kakuta H. Discovery of a Potent Retinoid X Receptor Antagonist Structurally Closely Related to RXR Agonist NEt-3IB, ACS Med Chem Lett, 査読有, 2011, 2, pp 896-900
- ② Ohsawa F, Morishita K, Yamada S, Makishima M, Kakuta H. Modification at the Lipophilic Domain of RXR Agonists Differentially Influences Activation of RXR Heterodimers, ACS Med Chem Lett, 査読有, 2010, 1, pp. 521-525.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 川田浩平, 中山真理子, 森下健一, 大澤史宜, 山田翔也, 大田由衣, 加来田博貴. 「RXR パーシャルアゴニストの創出ならびに乾癬モデルマウスでの有効性・副作用発現の評価」, 日本薬学会第 132 年会, 2012. 03. 29, 札幌
- ② 川田浩平, 中山真理子, 森下健一, 大澤史宜, 山田翔也, 大田由衣, 加来田博貴. 「疎水性部位にアルコキシ基を有する RXR パーシャルアゴニストの創出と評価」, 第 50 回日本薬学会中国四国支部学術大会, 2011. 11. 12, 高松
- ③ 川田浩平, 森下健一, 大澤史宜, 山田翔也, 大田由衣, 中山真理子, 篠崎亮介, 加来田博貴. 「疎水性部位アルコキシ基の変換による新規 RXR パーシャルアゴニストの創出」, 創薬懇話会 2011, 2011. 07. 06, 岡山
- ④ 森下健一, 川田浩平, 大澤史宜, 山田翔

也，大田由衣，中山真理子，深井良祐，
篠崎亮介，加来田博貴「疎水性部位アル
コキシ基の変換による新規 RXR パーシャ
ルアゴニストの創出」，日本薬学会第 131
年会，2011.03.31，静岡

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://pharm.okayama-u.ac.jp/lab/gosei/>

kakuta/kakuta_lab/index/TOP_PAGE.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加来田 博貴 (KAKUTA HIROKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授
研究者番号：80362961

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし