

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590141

研究課題名(和文)核内受容体の作用分離を指向したレチノイン酸アナログの開発

研究課題名(英文)Development of retinoic acid analog exhibiting a separated function of the heterodimeric-nuclear receptors

研究代表者

和田 昭盛(WADA, Akimori)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80158683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：レチノイドX受容体は、他の核内受容体とヘテロダイマーを形成し生理機能を発現することより、脂質代謝異常症や糖尿病など様々な疾患とも関連することが知られている。そこで、RXRのリガンドである9-cis-レチノイン酸のアナログ化合物を合成し、ヘテロダイマーの作用分離が可能なリガンド分子の開発を検討した。

その結果、レチノイン酸の疎水性ユニットであるシクロヘキセン部と続く二重結合を(-)-メントンとベンゼン環で縮環した誘導体MentPhMe及びMentPhEtにおいて、それぞれヘテロダイマーであるPPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  およびRLXR/RXR $\alpha$  に対する選択性を示す化合物を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Retinoid X receptor (RXR) agonists are interesting candidates for the treatment of metabolic syndrome. 9-Cis-retinoic acid (9cRA) is a natural RXR agonist, that also works as a retinoic acid receptor (RAR) agonist. In the study of the structure-activity relationship of RXR agonists, we prepared the analogs, in which the cyclohexene ring of 9cRA is replaced with bulkier hydrophobic moieties.

As the first candidates, the analogs having various cyclic terpenoid moieties were synthesized and evaluated their RXR and RAR agonistic activities. The results of transcriptional assay showed that the compound (MentViMe), which possess a menthane skeleton, exhibited RXR-selective agonistic activity. In next, the analogs a menthone-benzene fused bicyclic system as the lipophilic domain (MentPhMe and MentPhEt) were synthesized. The methyl congener (MentPhMe) showed PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -agonistic activity, on the other side, the ethyl congener (MentPhEt) showed LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ -agonistic activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：9cis-レチノイン酸 ヘテロダイマー クロスカップリング テルペン誘導体 ビニルトリフラート スズオレフィン RXR

## 1. 研究開始当初の背景

RAR (レチノイン酸レセプター) および RXR (レチノイド X レセプター) は、核内受容体スーパーファミリーに属し天然リガンドとしてそれぞれ *all-trans*- 及び *9-cis*-レチノイン酸を有するレチノイドタンパク質である。*All-trans*-レチノイン酸は、前骨髄急性白血病 (APL) に著効を示すこと、また、非環式レチノイドは、レチノイン酸の 1-6 結合を切断し、ひとつの二重結合を水素化した構造を持っており、肝臓癌に有効で近年臨床試験が行われ、薬としての承認を間近にした化合物である。これらはいずれも核内受容体を介した作用であることが明らかにされている。核内受容体の多くは RXR を共通としたヘテロダイマーとなり、リガンド依存的に遺伝子の転写発現を制御しているが、多くの疾患とも密接に関与していることが明らかとなっている。これらのヘテロダイマーのなかには、RXR の相手となる受容体のシグナル分子だけでなく RXR アゴニストによっても活性化するものがあり (permissive heterodimer)、極最近になり RXR-PPAR ヘテロダイマーを活性化できるレチノイン酸アナログが報告された。*9-cis*-レチノイン酸は、RXR の天然のリガンド分子であるが、RAR にも同様な結合親和性を示すことが知られている。従って、生体内において様々な作用を発現する核内受容体の生体内作用を分離できるようリガンド分子を開発できれば、関連する難治性疾患の治療薬の創製も可能と考え本研究を行った。

## 2. 研究の目的

著者は、これまでレチノイン酸の生理作用に着目し、その立体選択的合成法や短工程で効率の良い合成法を確立するとともに、その方法を利用して種々のアナログ化合物を合成し生理活性の検討を行ってきた。これまでの誘導体については、レチノイン酸の脂溶性の軽減を目的として実施してきたが、レチノイン酸に比べて顕著な生理活性を示す化合物の発見には至らなかった。これは、疎水性部分が平面構造をしているため核内受容体の疎水性ポケットにおけるアミノ酸残基とリガンド分子との相互作用が十分に誘起されていないためと考えられた。

これまで報告されている RXR アゴニストは、いずれも疎水性ユニット部分に立体的に嵩高い置換基を持っており、その作用の発現にはリガンド分子中における L 字型コンホメーションの形成が重要なことが示されており、レチノイン酸リガンドを含む核内受容体の X 線構造解析からも明らかとなっている。リガンド分子の L 字型コンホメーションの立体配座を保持あるいは固定することを目的として、実際にはシクロプロパン環 (化合物 1) や疎水性部分にアルキル基を導入した例 (化合物 2) が知られている (図 1)。

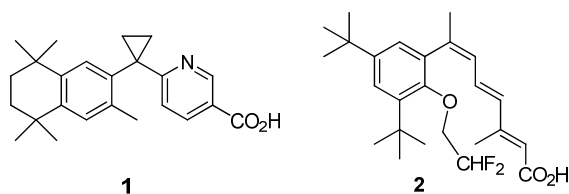


図 1

これらの知見をもとに疎水性ユニットとして脂肪族環式構造を用いること、あるいは立体的に嵩高い置換基を導入した複素環を用いた誘導体を設計すればリガンド分子の L 字型コンホメーションを維持し、かつ受容体とリガンド分子との相互作用を誘起できるものと考えられる。また、立体的な嵩高さの度合いにより RAR や RXR への結合選択性が異なり、この選択性を引き出すことにより生理作用の分離も可能となること、さらには複素芳香環を用いることにより、副作用の軽減効果を比較検討できるものと考察した。

脂肪環化合物としては、市販品で入手容易なテルペノイドを原料に用いることとした。複素環化合物としては、著者が開発したヨード環化反応を利用して嵩高い置換基を導入した化合物を用いることにした。合成したアナログ化合物は、転写活性を測定し RAR あるいは RXR の選択性について評価する。RXR 選択性の強いものについて RXR アゴニストでも活性を示す各種ヘテロダイマー (RRXR-PPAR や RXR-SXR など) についてその転写活性で選択性があるかどうかについて検討する。

## 3. 研究の方法

著者は、これまでレチノイン酸を母核としてその誘導体の合成を行い、RAR や RXR に対する生物活性を検討してきた。しかし、これまでの合成法は、異性体の分離することが不可欠なこと、側鎖の延長で工程数が多くなることなどの難点を抱えており、より短工程で効率のよい合成法が必要であった。幸い、この課題を克服できる方法として *9Z*-レチノイン酸 (6) の最も短工程かつ高収率の合成法を開発することができた (図 2)。今回のアナログ合成にあたっては、本手法を適用することにした。

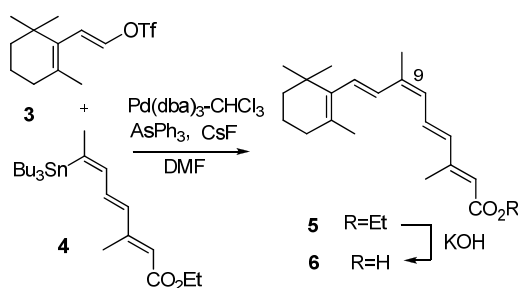


図 2

脂環式アナログ化合物としては、出発物質として入手容易なテルペノイドを用いることとした。更に、二重結合の一個伸びたスズオレフィンとケトン体から直接誘導したトリフラート体とのカップリングを検討し、シクロヘキセン部分をテルペノイド由来の脂環式化合物としたアナログを合成する。

複素環化合物としては、フェノール誘導体を用いヨード環化反応とトリフラート化を行い、嵩高い置換基の導入とレチノイン酸側鎖部分の二か所のカップリング反応を選択的に実施し、アナログ化合物へと誘導する(図3)。

上記において得られた化合物は、既に確立されているアッセイ法にかけて細胞周期解析による細胞増殖抑制作用、CD11b(顆粒球・

マクロファージ系)および CD14(単球系)抗体を用いた分化誘導作用、DNA の断片化によるアポトーシス誘導作用を測定し RAR および RXR の選択性について検討する。続いて、RXR-LXR 等のヘテロダイマーの転写活性を測定し、生理活性を検討する。

得られた結果より、構造活性相関を検討し、よりよい活性を有するリード化合物を創製していく。具体的には、より詳細な情報を得るため核内受容体とのタンパク質との結合状態について検討し、化合物の最適化を実施していく。そのための一助として活性化化合物については受容体タンパク質のX線結晶構造のデータをもとにコンピューターを用いたドッキングシミュレーションを行い、天然リガンド分子との相違点を明らかにする。

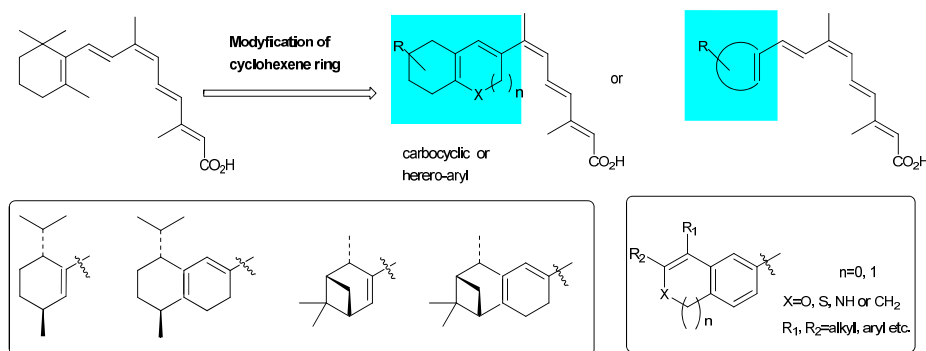


図3

これらの考察を基に、化合物の脂溶性部分の嵩高さを検討し、より大きな活性が期待されるアナログ化合物を設計・合成する。候補となる化合物については、実際の合成を行い抗癌活性・分化誘導作用ならびにヘテロダイマーへの転写活性を測定し、作用分離の程度を明らかにしていく。

#### 4. 研究成果

まず、シクロヘキセン環をテルペノイド由来の環構造をとる 9-シス-レチノイン酸アナログの合成をおこなった。テルペノイド由来のアルコールを酸化してケトン体(7)としたのちトリフラート体(8)へと誘導した。つづいて、文献記載の方法で合成したテトラエニルスズエステル(9)とのカップリング反応を、我々の開発したフッ化セシウムを用いた条件で行ったところ収率よく目的化合物(10)を得ることができた。最後にアルカリ加水分解を行い、9-シス-レチノイン酸アナログ(11)へと誘導することができた(図4)。

今回合成したアナログ化合物について、RAR および RXR への転写活性を測定した。その結果、メントン由来およびその類似化合物(11b~f)では、RXR 選択性が高くなっていることが判明した(表1)。

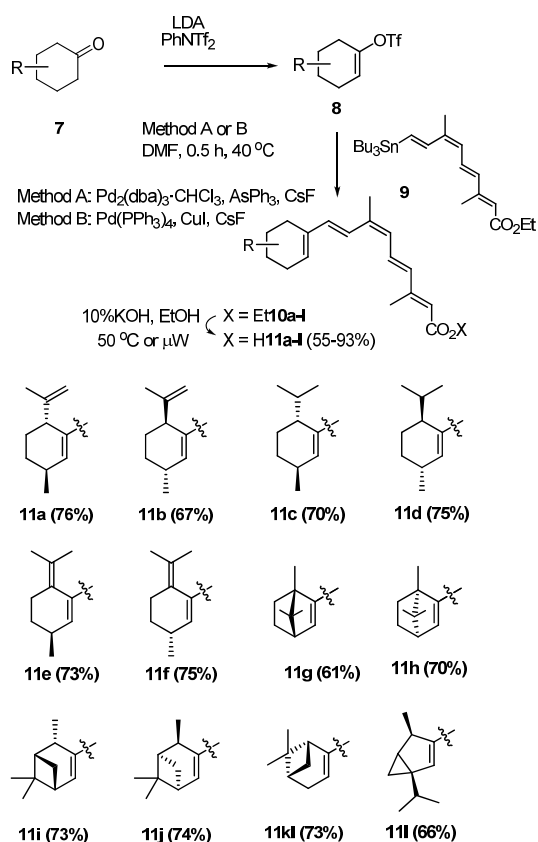


図4

表1 アナログ化合物の転写活性

Com- pounds	RXRE <sup>a</sup>	RARE <sup>b</sup>	RXR selectivity ratio <sup>c</sup>
<b>6</b>	1.00	1.00	1.00
<b>11a</b>	1.76	1.33	1.33
<b>11b</b>	1.07	0.35	3.06
<b>11c</b>	1.37	0.38	3.64
<b>11d</b>	1.12	0.25	4.44
<b>11e</b>	2.06	0.32	6.37
<b>11f</b>	1.50	0.50	3.00
<b>11g</b>	2.34	1.36	1.70
<b>11h</b>	0.66	1.99	0.33
<b>11i</b>	0.52	1.48	0.35
<b>11j</b>	1.30	0.89	1.45
<b>11k</b>	2.42	1.92	1.26
<b>11l</b>	2.52	1.03	2.45

<sup>a</sup> Transcriptional potency of **11** ( $10^{-6}$  M) on rat CRABP2-RXRE (transcriptional efficacy of **6** at 1  $\mu$ M was defined as 1.0).

<sup>b</sup> Transcriptional potency of **11** ( $10^{-6}$  M) on human RAR $\beta$ -RARE (transcriptional efficacy of **6** at 1  $\mu$ M was defined as 1.0).

<sup>c</sup> RXR selectivity ratio was defined as the ratio of (transcriptional efficacy on RXRE)/(transcriptional efficacy on RARE) at the concentration of  $10^{-6}$  M.

環状モノテルペノイドの中でも、(-)-メントンを組み込んだ誘導体 MentViM (**11d**) に強力な RXR アゴニスト活性が見られたことから、更なる活性の増強と物理的安定性の向上を目指し、(-)-メントンとベンゼン環が縮環した二環性ハイブリッド誘導体 MentPhMe (**14**) 及び MentPhEt (**15**) を新規 RXR アゴニストとしてデザインし、その合成法の確立と生物活性の評価を行った。

(-)-メントンから4工程で脂溶性部位に相当するトリフラート体 (**12**) を、プロバルギルアルコールから3工程で共役スズエステルを調製し、我々が見出した CsF によって促進される Stille カップリング条件で連結した後、最後に加水分解することで目的とする 9-cis-レチノイン酸誘導体 MentPhMe (**14**) 及び MentPhEt (**15**) の合成を達成することができた (図5)。

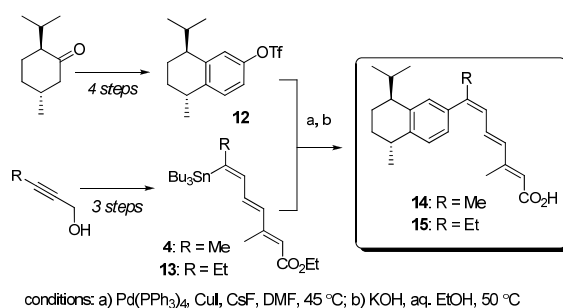


図5

MentPhMe (**14**) について RXR 及び RAR 転写活性をレポーター遺伝子アッセイにて測定した結果、RXR 及び RAR 活性化能がいずれのアイソタイプ ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) においても EC<sub>50</sub> 値が 3 ~ 20 nM と非常に強力なアゴニスト活性を有し、MentViM (**11d**) に比較して活性が増強されることを見出した。

更に、MentPhMe (**14**) は、ヘテロダイマーの LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  よりも PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  に対するアゴニスト活性が強いのに対して、MentPhEt (**15**) は、PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  よりも LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  に対するアゴニスト活性が強いことが判明した (図6)。

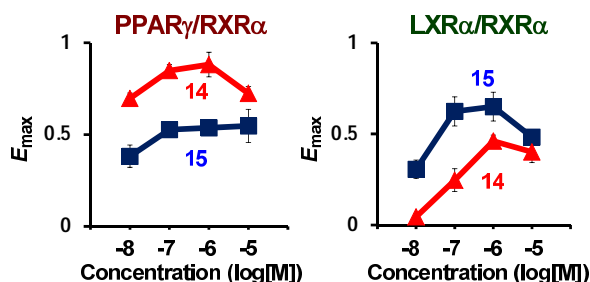


図6 ヘテロダイマーに対する転写活性

コンピューターソフト MOE を用いた RXR に対するドッキングシミュレーションでは、側鎖のメチル基をエチル基に変えることにより、MentPhEt (**15**) のメントン骨格が MentPhMe (**14**) の場合と比べて6-7単結合で回転した逆方向になっていることが判明した (図7)。

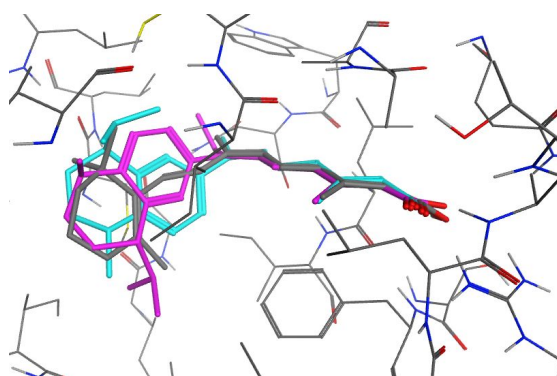


図7 ドッキングシミュレーション  
gray **6**, blue **14**, pink **15**

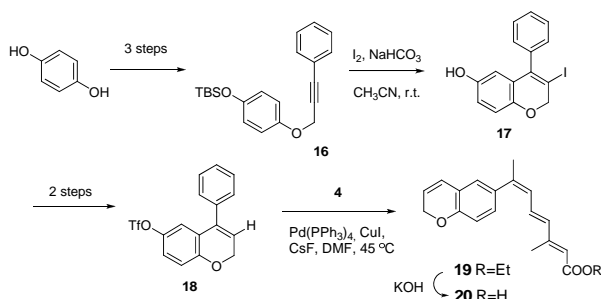


図8

最後に、ヘテロ環とベンゼン環が縮合した化合物については、図8の経路で合成できた

ので、今後多様なアナログ化合物を合成し生理活性を測定していく予定である

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19件)

Large Spectral Change due to Amido Modes of a  $\beta$ -Sheet upon the Formation of an Early Photointermediate of Middle Rhodopsin  
Y. Furutani, T. Okitsu, L. Reissig, M. Misuno, M. Homma, A. Wada, Y. Mizutani, Y. Sudo

*J. Phys. Chem. B*, **117**, 3449-3458 (2013).

査読有、DOI: 10.1021/jp308765t

Solid state NMR spectroscopy structure determination of a lipid-embedded heptahelical membrane protein

S. Wang, R. A. Munro, L. Shi, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, S.-Y. Kim, K.-W.

Jung, L. Brown, V. Ladizhansky

*Nature Method*, **10**, 1007-1012 (2013).

査読有、DOI: 10.1038/NMETH.2635

Menadione (Vitamin K3) Is a Catabolic Product of Oral Phylloquinone (Vitamin K1) in the Intestine and a Circulating Precursor of Tissue Menaquinone-4 (Vitamin K2) in Rats

Y. Hirota, N. Tugawa, K. Nakagawa, Y. Suhara, K. Tanaka, Y. Uchino, A. Takeuchi, N. Sawada, M. Kamao, A. Wada, T. Okitsu, T. Okano

*J. Biol. Chem.*, **288**, 33071-33080 (2013).

査読有、DOI: 10.1074/jbc.M113.477356

Substrate Specificity and Subcellular Localization of the Aldehyde-Alcohol Redox-coupling Reaction in Carp Cones

S. Sato, T. Fukagawa, S. Tachibanaki, Y. Yamano, A. Wada, S. Kawamura

*J. Biol. Chem.*, **288**, 36589-36597 (2013).

査読有、DOI: 10.1074/jbc.M113.521153

Tandem Migration-Carboalkoxylation of o-isocyanophenyl Acetals Leading to Benzoxazoles

T. Okitsu, K. Nagase, N. Nishio, A. Wada

*Org. Lett.*, **14**, 708-711 (2012). 査読有、

DOI: 10.1021/ol207175a

Structure-Activity Relationship of Novel Menaquinone-4 Analogues: Modification of the Side Chain Affects their Biological Activities

Y. Suhara, N. Honda, T. Okitsu, M. Sakai, M. Watanabe, K. Nakagawa, A. Wada, K.

Takeda, K. Takahashi, H. Tokiwa, T. Okano

*J. Med. Chem.*, **55**, 1553-1558 (2012).

査読有、DOI: 10.1021/jm2013166

Correlation between nuptial colors and visual sensitivities tuned by opsins leads to species richness in sympatric Lake Victoria cichlid fishes

R. Miyagi, Y. Terai, M. Aibara, T. Sugawara, H. Imai, H. Tachida, S. I. Mzighani, T.

Okitsu, A. Wada, N. Okada

*Mol. Biol. Evol.* **2012**, 29(11), 3281-3296.

査読有、DOI:10.1093/molbev/mss139

Replacement of the hydrophobic part of 9-cis-retinoic acid with cyclic terpenoid moiety results in RXR-selective agonistic activity

T. Okitsu, K. Sato, K. Iwatsuka, N. Sawada, K. Nakagawa, T. Okano, S. Yamada, H. Kakuta, A. Wada

*Bioorg. Med. Chem.*, **19** (9), 2939-2949

(2011). 査読有、

DOI:10.1016/j.bmc.2011.03.033

Iodocyclization of Hydroxylamine Derivatives Based on the Control of Oxidative Aromatization Leading to

2,5-Dihydroisoxazoles and Isoxazoles

T. Okitsu, K. Sato, T. M. Potewar, A. Wada

*J. Org. Chem.*, **76**(8), 3438-3449 (2011).

査読有、DOI: 10.1021/jo200407b

Synthesis of Novel Vitamin K<sub>2</sub> Analogues with Modification at the  $\omega$ -Terminal

Position and their Biological Evaluation as Potent Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) Agonists

Y. Suhara, M. Watanabe, K. Nakagawa, A. Wada, Y. Ito, K. Takeda, K. Takahashi, T. Okano

*J. Med. Chem.*, **54**(12), 4269-4273 (2011).

査読有、DOI: 10.1021/jm200025f

UV-Sensitive Photoreceptor Protein OPN5 in Humans and Mice

D. Kojima, S. Mori, M. Torii, A. Wada, R. Morishita, Y. Fukada

*PLoS One*, **6**, e26388 (2011). (on-line

journal). 査読有、DOI: 10.1371/journal.

Pone.0026388

[学会発表](計 42件)

和田 昭盛、藤岡 直子、伊藤 允好、

今井 啓雄、七田 芳則

9位置換11Z-レチナールアナログを用いたロドプシンアナログのコンホメーション解析

第57回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会(2013.10.06 さいたま)

沖津 貴志、山田 翔也、加来田 博貴、

和田 昭盛

メントン由来二環性骨格を有する9-cis-レチノイン酸誘導体の合成とRXRアゴニスト活性

日本レチノイド研究会第24回学術集会(2013.08.30 東京)

山野 由美子、笠原 奈那子、脇本 友絵、

和田 昭盛

7-オキソレチノイン酸誘導体の合成と構造特性

日本ビタミン学会第65回大会

(2013.05.18 東京)  
近野 沙織、辻本 麻里、和田 昭盛  
11, 12 位を 7 員環で固定した全-トランス-  
レチナールの合成  
日本ビタミン学会第 65 回大会  
(2013.05.18 東京)  
辻本 麻里、近野 沙織、沖津 貴志、  
松浦 直美、中川 公恵、岡野 登志夫、  
和田 昭盛  
11-シス-デメチルレチノイン酸類の効率的  
合成とその生物活性  
日本ビタミン学会第 65 回大会  
(2013.05.18 東京)  
山野 由美子、脇本 友絵、笠原 奈那子、  
和田 昭盛  
合成化学的アプローチによる新規レチノイ  
ン酸アナログ、7-ヒロドキシレチノイン酸  
の構造確認  
日本薬学会第 133 年会 (2013.03.30 横浜)  
沖津 貴志、山田 翔也、加来田 博貴、  
和田 昭盛  
メントン由来の二環性骨格を有する 9-*cis*-  
レチノイン酸誘導体型 RXR アゴニストの  
創製  
第 30 回メディシナルケミストリーシンポ  
ジウム (2012.11.28 東京)  
沖津 貴志、村井 ちはる、和田 昭盛  
遠隔不斉誘起型ヨード環化反応の - 光学  
活性なスピロ化合物の合成  
第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会  
(2012.10.20 西宮)  
和田 昭盛、守行 美郷、山野 由美子  
9-シス-3-アミノレチノールの合成  
日本ビタミン学会第 64 回大会  
(2012.06.22 岐阜)  
沖津 貴志、島 浩一、山田 翔也、  
加来田 博貴、和田 昭盛  
メントン由来の二環性骨格を有する 9-*cis*-  
レチノイン酸誘導体の合成  
日本薬学会第 132 年会 (2012.03.30 札幌)  
和田 昭盛、松浦 直美、中川 公恵、  
岡野 登志夫  
シクロヘキセン環を修飾したレチノイン  
酸類の生物活性  
第 2 回近畿地区ビタミン懇話会  
(2011.11.27 神戸)  
沖津 貴志、弓立 沙希、佐藤 可奈、  
和田 昭盛  
ヨウ素試薬のリガンド効果による酸化的  
芳香化の制御  
第 37 回反応と合成の進歩シンポジウム  
(2011.11.07 徳島)  
和田 昭盛、沖津 貴志、町谷 友紀奈、  
中川 公恵、岡野 登志夫  
ゲラニルゲラノイン酸類似体の合成と生  
物活性  
日本ビタミン学会第 63 回大会  
(2011.06.05 広島)

〔図書〕(計 2 件)  
和田 昭盛、廣川書店、基礎から学ぶス  
ペクトル解析、2012、143。  
和田 昭盛 他、廣川書店、NEW 薬学  
機器分析、第 2 版、2011、pp112-146、  
pp275-297。

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)  
名称：テルペノイド由来二環性骨格を有す  
るレチノイド化合物  
発明者：和田 昭盛、沖津 貴志、加来田  
博貴  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2012-043411  
出願年月日：24 年 2 月 29 日  
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
神戸薬科大学生命有機化学研究室；  
<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~ocls/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
和田 昭盛 (WADA, Akimori)  
神戸薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：80158683

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
岡野 登志夫 (OKANO, Toshio)  
神戸薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：20131542