

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 21 年度～平成 22 年度

課題番号：21790108

研究課題名(和文) 多次元同時阻害作用を有する核内受容体機能阻害薬の創製研究

研究課題名(英文) Discovery of inhibitors for nuclear receptor functions with multiple mechanisms

研究代表者

石川 稔 (ISHIKAWA MINORU)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：70526839

研究成果の概要(和文)：

様々な疾患に関わっている核内受容体はリガンド依存的な転写因子であり、活性化にはコアクチベータータンパク質の結合も必要である。既知の核内受容体モジュレーターは、構造的に内因性リガンド由来の骨格が多く、また他の核内受容体にも作用することによる副作用が治療満足度を低くしている。更に一部の核内受容体モジュレーターについては、薬剤耐性細胞の出現が問題となっている。そこで本研究では、核内受容体の機能を多次元的に阻害することにより、これらの問題点の解決を目指した。最初に、内因性リガンドと異なる骨格を有する核内受容体モジュレーターを5種創出した。次に、核内受容体の1種であるビタミンD受容体(VDR)とコアクチベーターの結合を阻害する低分子を創製した。これは、VDR コアクチベーター阻害作用を有する初めての低分子である。現在、コアクチベーター阻害物質と核内受容体モジュレーターを連結させた化合物の合成を検討している。一方このアプローチとは別に、低分子を利用して標的タンパク質を特異的に分解する手法を開発した。この手法を用いて、核内受容体拮抗作用と核内受容体分解誘導作用を併せ持つ化合物を創出した。

研究成果の概要(英文)：

Nuclear receptors (NRs) are ligand-dependent transcription factors which regulate the expression of responsive genes and thereby affect diverse diseases. Once an agonist activates the NR, recruitment of additional coactivator proteins is essential for transcription. NRs modulators often possess issues, including cross reactivity with other NRs, and existence of drug-resistant cancers. To overcome these issues, I aimed multiple inhibitions of NRs functions. First, five kinds of NRs modulators with different skeletons from physiological ligands were generated. Second, non-peptide coactivator mimetics for a NR were generated. Now, hybrid molecules consisting of modulators for NRs linked to coactivator mimetics are being prepared. On the other hand, we developed a method that induces selective degradation of target proteins by small molecules (protein knockdown). Utilizing this method, a compound that inhibits a NR function with multiple mechanisms (antagonism and decrease of the NR) was generated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	2000000	600000	2600000
2010 年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総 計	3200000	960000	4160000

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：核内受容体、リガンド、コアクチベーター阻害

1. 研究開始当初の背景

リガンド依存的転写因子である核内受容体は、癌、骨粗鬆症、糖尿病、動脈硬化など様々な疾患の発症と治療に関わっている。これまで、核内受容体と内因性リガンドの相互作用を標的とした作動薬や拮抗薬が創製されてきた。しかしこれらモジュレーターは内因性リガンド由来の骨格が多く、他の核内受容体にも作用することによる副作用が治療満足度を低くしている。更に一部の核内受容体モジュレーターについては、長期間投与により薬剤耐性細胞の出現が問題となっている。

ところで近年の解析によれば、核内受容体の転写活性化は、内因性リガンドの結合に続くコアクチベータータンパク質の結合が必須であり、後者がより直接的な転写活性化の鍵を握っている。様々な核内受容体はコアクチベーターと結合する際に、コアクチベーター上のロイシン (L) を含む共通したペプチド配列 (LXXLL) (X は任意のアミノ酸) を認識する。そして、エストロゲン受容体(ER)  $\alpha$  とコアクチベーターの結合を阻害するペプチドが、作動薬により誘導される ER  $\alpha$  の転写を抑制した報告がある。他の核内受容体とコアクチベーターの結合を阻害するペプチドも、幾つか報

告されている。更に、医薬品におけるペプチドの問題点を解決すべく、ER とコアクチベーターの結合を阻害する非ペプチド性物質が2つのグループから報告された。しかしながら、ER 以外の非ペプチド性コアクチベーター結合阻害薬は、研究開始当初は知られていなかった。

2. 研究の目的

先に述べた核内受容体モジュレーターの問題点に対して、複数の解決策を提案することを目指した。即ち、[1] 内因性リガンド骨格から脱却した核内受容体リガンドを創製すること、[2] 核内受容体に対する非ペプチド性コアクチベーター結合阻害薬を創製すること、を目的とした。更に、[3] リガンドとコアクチベーターの結合を同時に阻害する核内受容体機能阻害薬を創製することも目指した。

3. 研究の方法

[1]申請者の研究グループはこれまでに、フォールディング制御に立脚し、内因性リガンド骨格から脱却したアンドロゲン受容体(AR)、プロゲステロン受容体、ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR)、フ

アルネソイドX受容体に対する拮抗薬を創製し、またこの研究の過程で、内因性リガンドであるステロイド骨格の代替として、ジフェニルペンタン骨格が有用であることを示してきた。この知見を活かし、フォールディング制御に立脚し、ジフェニルペンタン骨格などに注目して内因性骨格から脱却したAR拮抗薬、PPAR部分作動薬・拮抗薬、肝臓X受容体(LXR)拮抗薬の創製を試みた。

[2] 幾つかの核内受容体とコアクチベーターの相互作用は、X線結晶構造により解析されている。その特徴として、①コアクチベーターLXXLL上の3つのロイシン側鎖と核内受容体上のポケットの疎水性相互作用、②charge clampと呼ばれる2箇所の静電的相互作用が重要であることが明らかになっている。そこで、この情報を詳細に解析してペプチド等価体を設計・合成した。活性評価に関しては、LXXLL配列を含むコアクチベーター由来の標識ペプチドとの競合実験により、合成した化合物のコアクチベーター結合阻害能を評価した。

[3] 核内受容体とコアクチベーター由来ペプチドおよび内因性リガンドの複合体X線結晶構造によれば、コアクチベーターと内因性リガンドは、近傍に位置している。なお、この両者の間に位置するヘリックス12は、内因性リガンドポケットの蓋のような働きをしており、拮抗薬が結合すると蓋が開放したままになることが明らかになっている。以上の情報を参考にして、核内受容体拮抗薬とコアクチベーター阻害薬の適切な部位を適切なリンカーで結合すれば、多次元同時阻害が可能と考えた。合成した化合物はレポータージーンアッセイにより評価することを計画した。拮抗薬とコアクチベーター阻害薬をリンカーで結合した化

合物が、それぞれ単一の阻害作用よりも強い活性を有してれば、多次元同時阻害作用を有する核内受容体機能阻害薬が創製されたことになる。この研究においてリンカーが活性に大きく影響を与える可能性が大きい。必要に応じて、リンカーを種々変換した化合物を合成することを計画した。

#### 4. 研究成果

[1] 内因性骨格から脱却した核内受容体リガンドの創製に関しては、内因性リガンドと大きく異なる骨格を有する核内受容体モジュレーターを5種創出した。まず、ビタミンD受容体(VDR)作動活性とAR拮抗作用の両方を併せ持ち、ジフェニルペンタン骨格を有する化合物を起点とし、非ステロイド骨格を有する選択的AR拮抗薬を創出した。更に、所属する研究室が提唱しているマルチテンプレート手法(フォールド構造が類似しているタンパク質に対して効率的に低分子リガンドを創出する方法)を利用して、LXR拮抗作用とグルコシダーゼ阻害作用の両方を併せ持つ化合物を起点としてLXR選択的拮抗薬を創出した。次にこのLXR拮抗物質を起点とし、LXRとPPARのフォールド類似性に着目して、PPAR部分作動薬を創出した。一方、ヘリックス12のフォールディングに着目して、前述とは別骨格を有するPPAR部分作動薬と拮抗薬も創出した。最後に、既存リガンドを環化させる分子設計によりLXR拮抗作用を有する特徴ある化合物を創製した。内因性リガンドと異なる構造を有するこれら5種類の核内受容体モジュレーターについて、論文および学会にて発表した。

[2] コアクチベーター結合阻害化合物に関しては、最初に分子設計を実施した。既知の複合体X線結晶構造を解析した結果、

LXXLL 配列の分子内水素結合を中員環で模倣すれば、この中員環上にファーマコフォアを配置できると考え、ベンゾジアゼピン系化合物を設計した。設計化合物を合成・評価したところ、これらの化合物は期待通り VDR とコアクチベーターの結合を阻害していることが示唆された。また、細胞評価系でも VDR の転写活性を抑制することが明らかになった。報告者の知る限り、これは初めての非ペプチド性の VDR-コアクチベーター結合阻害化合物である。本研究成果を論文および学会にて発表した。次に、コアクチベーター結合阻害能の活性増強を目指し、10種類以上の類縁体を合成して活性を評価した結果、これまでと同等の阻害活性を有する化合物を複数創出することができた。また、各核内受容体に対する阻害活性選択性についても評価した。本化合物は、既存核内受容体拮抗薬の問題点（副作用、選択性、薬剤耐性化）を解決するだけでなく、核内受容体の機能解析、特にコアクチベーターの未知機能の解析に役立つと期待される。

[3] 上記 [1] および [2] で得られた各種核内受容体リガンドとコアクチベーター結合阻害物質を連結した化合物の合成を現在検討している。なお、リンカー連結部位については、複合体の X 線結晶構造解析の情報を参考にした。

一方このアプローチとは別に、低分子を利用して標的タンパク質の特異的に分解する手法を本研究期間中に開発した。即ち、標的のタンパク質とユビキチンリガーゼ (E3) からなる複合体を生理的な条件下で人工的に形成できれば、標的タンパク質に特異的にユビキチンを付与し、標的タンパク質を分解できると考えた。そして、E3 と標的タンパク質の複合体を形成させる為、

E3 の一種 cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) の低分子リガンド (メチルベスタチン) と標的タンパク質のリガンドを連結させた低分子を設計・合成した。そしてこの低分子が、生細胞中で標的タンパク質を期待通り特異的に減少させることを学会および論文にて報告した。そこで次にこの手法を用いて、核内受容体機能の多次元同時阻害を試みた。そして、核内受容体拮抗薬とメチルベスタチンを連結した化合物が、核内受容体拮抗作用と核内受容体分解誘導作用を併せ持つことを見出した。よって、低分子による核内受容体の多次元同時阻害作用を達成できたと考えている。

#### 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9件)

- ① Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Risa Kitaguchi, Shinichi Sato, Mikihiko Naito, Yuichi Hashimoto, Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3229-3241. (査読有)
- ② Kazunori Motoshima, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Kazuyuki Sugita, Peroxisome proliferator-activated receptor agonists with phenethylphenylphthalimide skeleton derived from thalidomide-related liver X receptor antagonists: relationship between absolute configuration and subtype selectivity, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3156-3172. (査読有)
- ③ Kazunori Motoshima, Tomomi Noguchi-Yachide, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Kazuyuki Sugita, Further Application of the Multi-Template Approach for Creation of Biological

- Response Modifiers: Discovery of a New Class of Multifunctional Anti-Diabetic Agents, *Heterocycles*, **2011**, *82*, 1083-1101. (査読有)
- ④ 三田裕介、橋本祐一、石川稔、ビタミン D 受容体-コアクチベーター相互作用阻害物質の創製、*ビタミン*, **2011**, *85*, 25-26. (査読無)
- ⑤ Keisuke Maruyama, Tomomi Noguchi-Yachide, Kazuyuki Sugita, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa, Novel Selective Anti-androgens with a Diphenylpentane Skeleton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6661-6666. (査読有)
- ⑥ Jun-ichi Kasuga, Minoru Ishikawa, Mitsuhiro Yonehara, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, Hiroyuki Miyachi, Improvement of water-solubility of biarylcarboxylic acid peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\delta$ -selective partial agonists by disruption of molecular planarity/symmetry, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7164-7173. (査読有)
- ⑦ Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Mikihiko Naito, Yuichi Hashimoto, Protein Knockdown Using Methyl Bestatin-ligand Hybrid Molecules: Design and Synthesis of Inducers of Ubiquitination-mediated Degradation of Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820-5826. (査読有)
- ⑧ Yusuke Mita, Kosuke Dodo, Tomomi Noguchi-Yachide, Hiroyuki Miyachi, Makoto Makishima, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa, LXXLL peptide mimetics as inhibitors of the interaction of vitamin D receptor with coactivators, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1712-1717. (査読有)
- ⑨ Kazunori Motoshima, Tomomi Noguchi-Yachide, kazuyuki Sugita, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa, Separation of  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory and liver X receptor-antagonistic activities of phenethylphenyl phthalimide analogs and generation of LXR $\alpha$ -selective antagonists, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5001-5014. (査読有)
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 丸山慶輔、谷内出友美、杉田和幸、橋本祐一、石川稔、ジフェニルペンタン骨格を有する選択的抗アンドロゲン物質の創製研究、日本薬学会 第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月 31 日
- ② 青山惇、遠藤香織、谷内出友美、青山洋史、石川稔、榎島誠、宮地弘幸、橋本祐一、LXR 依存的な Transrepression 作用選択的リガンドの創製、日本薬学会 第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月 31 日
- ③ 北口梨沙、伊藤幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、プロテインノックダウン法を利用した核内受容体分解誘導低分子の創製、日本薬学会 第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月 29 日
- ④ Yusuke Mita, Kosuke Dodo, Tomomi Noguchi-Yachide, Hiroyuki Miyachi, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa, LXXLL peptide mimetics as inhibitors of the interaction of vitamin D receptor with coactivators. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 19, 2010 (Hawaii)
- ⑤ Atsushi Aoyama, Tomomi Yachide, Hiroshi Aoyama, Minoru Ishikawa, Makoto Makishima, Hiroyuki Miyachi, Yuichi Hashimoto, Design, synthesis and evaluation

- of transrepression-selective ligands, bearing anti-inflammatory activity mediated by LXR. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 19, 2010 (Hawaii)
- ⑥ Keisuke Maruyama, Minoru Ishikawa, Tomomi Noguchi-Yachide, Yuichi Hashimoto, Selective anti-androgens with a 3,3-diphenylpentane skeleton. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 19, 2010 (Hawaii)
- ⑦ Yukihiko Itoh, Minoru Ishikawa, Mikihiko Naito, Yuichi Hashimoto, Protein knockdown using ubiquitination activity of cIAP1: Discovery of CRABP degradation inducers, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 19, 2010 (Hawaii)
- ⑧ 北口梨沙、伊藤幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、プロテインノックダウン法を利用した AR 分解誘導剤の創製、第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム (京都) 2010 年 11 月 18 日
- ⑨ 三田裕介、どど孝介、谷内出友美、宮地弘幸、橋本祐一、石川稔、LXXLL 配列を模倣したビタミン D 受容体-コアクチベーター相互作用阻害物質の創製、第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム (京都) 2010 年 11 月 18 日
- ⑩ 石川稔、春日淳一、米原光弘、槇島誠、橋本祐一、宮地弘幸、分子の非平面化・非対称化による PPAR  $\delta$  部分作動薬の水溶性向上、第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム (京都) 2010 年 11 月 17 日
- ⑪ 石川稔、伊藤幸裕、内藤幹彦、橋本祐一、細胞内レチノイド結合タンパク質の分解を誘導するレチノイン酸連結化合物の創製、日本ビタミン学会第 62 大会 (盛岡) 2010 年 6 月 12 日
- ⑫ 伊藤 幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、細胞内レチノイド結合タンパク質の分解を誘導する低分子の創製、第 59 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (東京) 2010 年 5 月 22 日
- ⑬ 伊藤 幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、プロテインノックダウン法の開発～低分子 CRABP 分解誘導剤の創製～、第 8 回次世代を担う有機化学シンポジウム (東京) 2010 年 5 月 13 日
- ⑭ 青山惇、谷内出友美、青山洋史、石川稔、槇島誠、宮地弘幸、橋本祐一、LXR を介した抗炎症作用を有する選択的リガンドの創製、日本薬学会 第 130 年会 (岡山) 2010 年 3 月 29 日
- ⑮ 伊藤幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、低分子化合物を用いたプロテインノックアウト法の開発: CRABP 分解誘導剤の創製、日本薬学会 第 130 年会 (岡山) 2010 年 3 月 29 日
- ⑯ 三田裕介、どど孝介、谷内出友美、宮地弘幸、橋本祐一、石川稔、LXXLL 配列を模倣した核内受容体-コアクチベーター相互作用阻害物質の創製、日本薬学会 第 130 年会 (岡山) 2010 年 3 月 28 日
- ⑰ 本島和典、石川稔、谷内出友美、杉田和幸、橋本祐一、サリドマイド誘導体における  $\alpha$ -glucosidase と LXR 活性の作用分離、および glycogen phosphorylase 阻害活性、第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム (東京) 2009 年 11 月 26 日
- ⑱ 伊藤幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、プロテインノックアウト法による CRABP 分解誘導剤の創製、第 28 回メ

ディシナルケミストリーシンポジウム  
(東京) 2009年11月26日

- ⑱ 伊藤幸裕、石川稔、内藤幹彦、橋本祐一、  
CRABP 分解誘導剤の創製、日本レイチ  
ノイド研究会第20回学術集会 (東京)  
2009年11月21日
- ⑳ 本島和典、石川稔、青山惇、谷内出友美、  
青山洋史、橋本祐一、サリドマイド誘導  
体における $\alpha$ -glucosidase と LXR 活性の  
作用分離、第129年会 日本薬学会(京  
都) 2009年3月28日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chem/IMCB-8ken-HP/Index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 稔 (ISHIKAWA MINORU)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：70526839

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし