

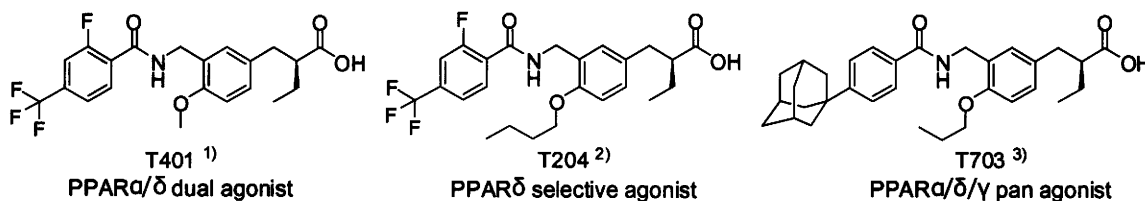
論文の内容の要旨

論文題目 新規 PPAR δ 選択的リガンドの創製研究

氏名 春日 淳一

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド応答性の転写因子であり、 α 、 δ 、 γ の3種類のサブタイプが同定されている。PPAR は生体内において脂肪酸やその代謝物を内因性リガンドとし、脂質や糖のホメオスタシスに関わる遺伝子の発現を制御している。PPAR を標的とした医薬創製研究は PPAR α と PPAR γ がそれぞれ高脂血症治療薬フィブラート類および抗糖尿病薬グリタゾン類の分子標的であることが判明したため急速に進展した。一方で PPAR δ はその全身に広がる分布からは機能を推測することが難しく、生理的機能に関しては未解明であった。しかし近年遺伝子改変マウスを用いた研究により PPAR δ も血糖・中性脂肪制御やコレステロール逆転送過程に深く関与していることが解明されつつある。しかし未だ不明な点の多いサブタイプである。

これまで、PPAR δ の機能解明を指向したケミカルツールおよび医薬品創製を目指して、PPAR δ 活性を軸とした PPAR リガンドの開発を行ってきた。その結果、PPAR α/δ デュアルアゴニスト T401、PPAR δ 選択的アゴニスト T204、PPAR $\alpha/\delta/\gamma$ パンアゴニスト T703 等の創製に成功した。



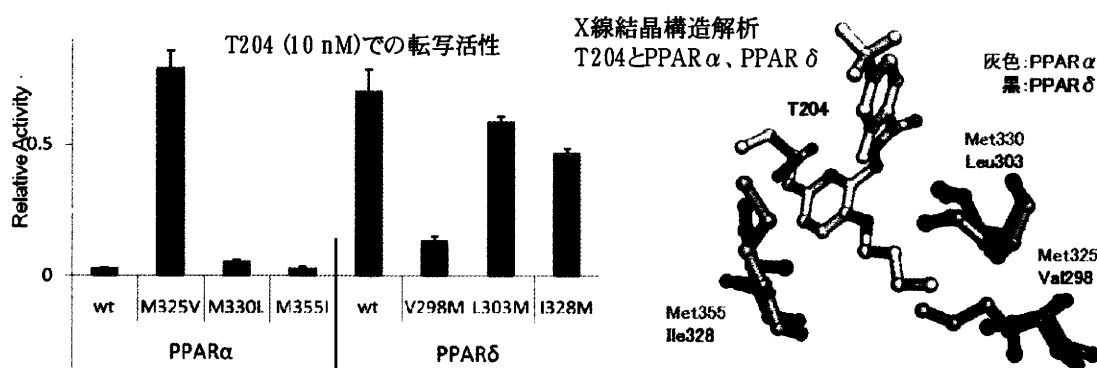
PPAR δ 選択的アゴニスト T204 のサブタイプ選択性発現機構の解明⁴⁾

PPAR δ 選択的アゴニスト T204 は T401 の構造展開にて得た化合物である。当該構造展開により PPAR δ 活性の大きな向上 (EC₅₀ 値: 12 nM \rightarrow 0.91 nM) と同時に PPAR α 活性の大きな低下 (EC₅₀ 値: 10 nM \rightarrow 250 nM) を達成した。この劇的な変化は T204 と T401 の構造上の差が中央のベンゼン環置換基がメキシ基かプトキシ基かの違いのみであることを考慮すれば驚くべきことである。

このサブタイプ選択性の発現機構を解明することは今後の PPAR サブタイプ選択的リガンド創製研究に有用である。まず、コンピュータモデル解析によりアルコキシ基が相互作用する PPAR 側のポケットの構成アミノ酸 (PPAR α : Met325, Met330, Met355, 対応する PPAR δ : Val298, Leu303, Ile328) が異なることを確認した。この 3 アミノ酸の中にサブタイプ選択性を規定するアミノ酸が存在すると予想し、各アミノ酸を入れ替えた点変異体 PPAR を作成し、T204 10nM での転写活性を調べた。

結果、PPAR α の対 T204 感受性は Met325 を Val に置換することで大きく上昇が認められた。また逆に PPAR δ において対応するアミノ酸の Val298 を Met に置換することで感受性低下が認められた。このことから PPAR α の Met325 (PPAR δ では Val298) がサブタイプ選択性規定に重要である可能性が示された。

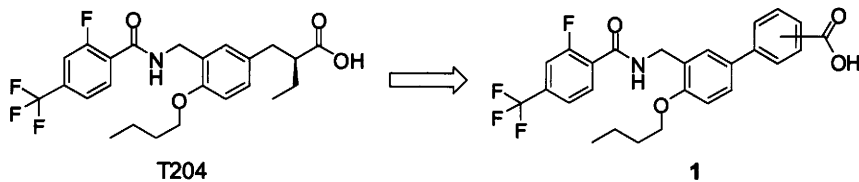
さらに PPAR δ 選択性発現の構造的要因を詳細に検討するため、T204 と PPAR δ の共結晶 X 線結晶構造解析を行った。その結果、T204 のプトキシ基が先述のコンピュータモデルで予測されたのと同じポケットに入り込み、プトキシ基の先端がポケット底部の Val298 側鎖と疎水性相互作用していることが判明した。一方、PPAR α では対応するアミノ酸が Val より嵩高い Met であるため T204 との間で立体反発が起こり、T204 の PPAR α 活性が下がり、その結果、高い PPAR δ 選択性を示したと推測できる。



PPAR δ パーシャルアゴニスト/アンタゴニストの創製⁵⁾

一般に、核内受容体の活性化には C 末端 α ヘリックス(H12)の適切な折りたたみが必須である。一方、アンタゴニストでは H12 の適切な折りたたみが阻害されていることが報告されている。演者は

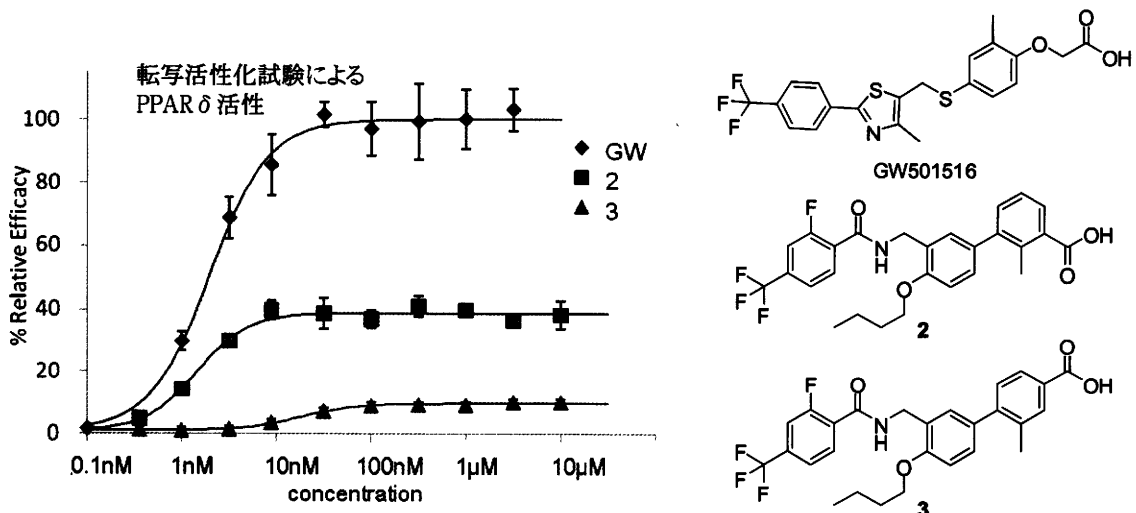
これまでの研究より、PPAR δ 選択的アゴニスト T204 の適切な構造展開により PPAR δ アンタゴニストが創製できると考えた。即ち、PPAR δ のポケットにはまり込む T204 のブトキシ基で PPAR δ リガンド結合領域内における中央ベンゼン環の位置を固定し、X線結晶構造解析から確認された H12 と相互作用するカルボキシル基の位置をより剛直に固定するように α エチルプロピオン酸部位をフェニルカルボン酸誘導体と変換した化合物 1 をデザインし合成した。合成は還元的アミドアルキル化により下記構造式の左側部位を合成し、最後に鈴木カップリング反応によりビフェニルカルボン酸誘導体とした。



活性評価は HEK293 細胞を用いた転写活性化試験を行い、①化合物固有の最大活性の 50% の濃度を EC_{50} 値として求め、あわせて②化合物の示す最大活性 (PPAR δ フルアゴニスト GW501516 の活性を 100% とした相対比) を測定した。最大活性が 50% 程度の化合物がパーシャルアゴニストであり、アンタゴニストは最大活性が 0 に近い化合物である。

化合物 1 について、アゴニスト活性について調べたところ、カルボキシル基がパラ置換・メタ置換の化合物において最大活性が GW501516 に比べ 50% 以下となるパーシャルアゴニストであることが確認できた。さらに複素環化や置換基導入等の構造展開を重ね、メチル基を有する化合物 2、3 にパーシャルアゴニスト活性を維持したまま低用量で最大活性を示す高活性パーシャルアゴニストを見出した。

また、GW501516 共存下でその PPAR δ 転写活性を化合物 2、3 が用量依存的に抑制し、PPAR δ アンタゴニスト活性を示すことを確認した。今後パーシャル/アンタゴニスト活性発現の機序の解析に役立つものと期待する。

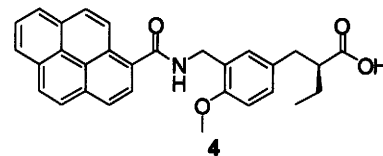


PPAR δ リガンド結合実験系の構築

ルシフェラーゼアッセイ等の転写活性化試験ではリガンドとPPAR δ タンパク質の直接の結合活性は評価できない。代表的な結合実験系として放射ラベル体を用いた系があるが、欠点として放射ラベル体の入手の困難さやタンパク質結合放射ラベルリガンド(B)とフリーのリガンド(F)の分離(B/F分離)の必要があげられる。

そこで、蛍光性 PPAR δ リガンドである **4** を利用して PPAR δ 結合実験系の構築を目指した。ピレンは溶媒の極性に応じて量子収率が変化することが知られていた。また、**4** のピレン部位は PPAR δ の疎水性ポケットに入ると予想されたことから、溶媒中の **4** と PPAR δ に結合した **4** で量子収率が変わると考えた。そこで化合物 **4** と PPAR δ タンパク質の結合に伴う蛍光変化を調べたところ、400nm 付近の蛍光強度が低下していくことが分かった。この現象を利用して PPAR δ の結合実験系が構築できると考えた。

PPAR δ タンパク質濃度と蛍光強度変化から解離定数 K_d 値を求めた。ここで得られた K_d 値:50 nM はルシフェラーゼアッセイで得た EC_{50} 値:40 nM と矛盾ない値である。また、T204 を競合させることで、濃度依存的な蛍光強度の回復が観測された。このデータを解析することで T204 (ルシフェラーゼアッセイでは EC_{50} :0.91 nM)の IC_{50} 値を 0.58 μ M、 K_i 値を 0.95 nM と求めることができた。今後、実験例数を増やし本結合実験系の有用性を示していきたいと考えている。



[公表論文] 1) J Kasuga et al, *Bioorg Med Chem*, 2006, 14 (24), 8405-14. 2) J Kasuga et al, *Bioorg Med Chem*, 2007, 15 (15), 5177-90. 3) (a) J Kasuga et al, *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18 (3), 1110-5. (b) J Kasuga et al, *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18 (16), 4525-8. 4) (a) J Kasuga et al, *ChemMedChem*, 2008, 3 (11), 1662-6. (b) T Oyama et al, *Acta Cryst*, 2009, D65, 786–95. 5) J Kasuga et al, *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19 (23), 6595-9