

Liver X Receptor (LXR) リガンドの構造展開によるTransrepression作用選択的リガンドの創製

青山 惇

【背景・目的】

Liver X Receptor (LXR) は核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を調節することで脂質代謝や糖代謝において重要な役割を果たしている。肝臓や小腸、マクロファージにおいてLXRが活性化されるとLXR応答配列を上流に有する遺伝子の転写を活性化する(Transactivation作用と呼ばれる)(Fig. 1A)。応答遺伝子としては脂質代謝やコレステロール逆転送系に関わる遺伝子である

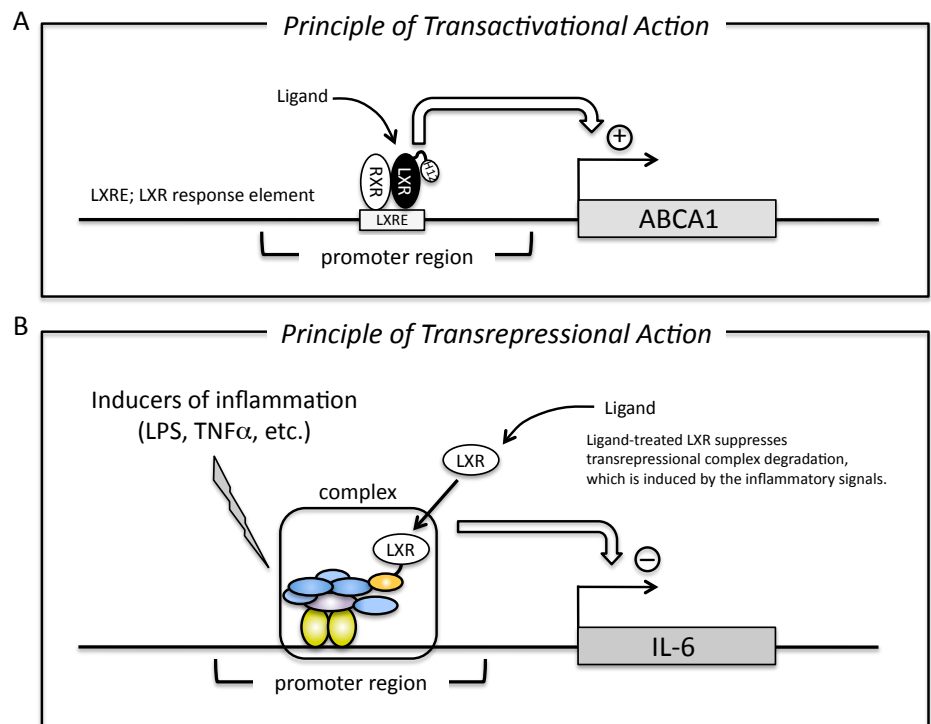


Figure 1. Transactivational action and transrepressional action.

abca1、*abcg1*や*apoe*などに加え、インスリン依存的に細胞膜へ輸送されるグルコーストランスポーターである*glut4*遺伝子が知られており、動脈硬化性疾患等の創薬ターゲットとして考えられている。私もこれまでの研究で、Transactivation活性の向上に着目したLXRリガンド創製を行い、種々の三環系化合物であるAA化合物を得てきた(Fig. 2)。一方、最近になってLXRは上記とは異なるメカニズムでマクロファージにおける炎症の調節機能を発揮することが明らかとされた。具体的には、T1317やGW3965と

いったLXRの合成リガンドが病原性微生物に対するマクロファージの応答を阻害し、*il-6*や*inos*、*mmp9*などLXR応答配列を持たない種々の炎症性遺伝子の誘導を抑制する(Transrepression作用と呼ばれる)ことなどが見出されてきた(Fig. 1B)。

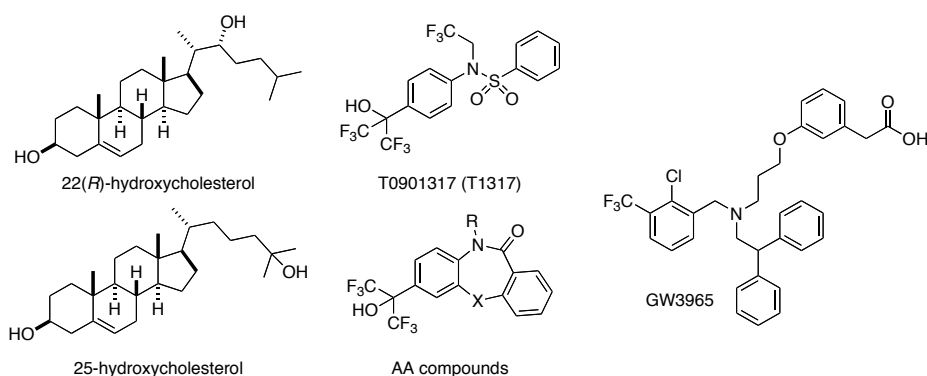


Figure 2. Structures of natural and synthetic LXR ligands.

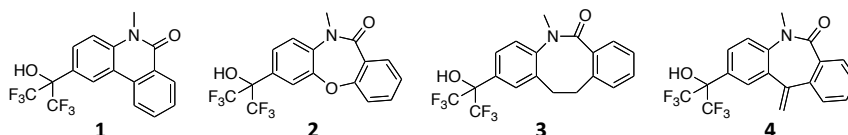
これまでに報告されているLXRリガンドはいずれもTransactivation活性を有している。一方、同様にほとんどのリガンドがTransrepression活性も併せ持つが、内因性リガンドの一つである25-Hydroxycholesterol (25-HC)や27-Hydroxycholesterol (27-HC)にTransactivation作用選択性が見出されている。この事実はLXRのTransactivation作用とTransrepression作用の分離可能性を示唆するものである。Transrepression機構の詳細を明らかにするために、また、病態形成にIL-6などの炎症性サイトカインが関与しているとされる関節リウマチやキャッスルマン病などの免疫関連疾患に対する画期的新薬の創出に貢献するために、Transrepression作用選択的なりガンドの創製を目指すことにした。

【Transrepression作用選択的リガンドの創製】

<IL-6産生抑制活性を指標としたAA化合物のスクリーニングによるリード化合物の獲得>

本研究を進めるにあたり、これまでに創製してきたAA化合物のLPSにより誘導されるIL-6の産生抑制活性(WST-1アッセイにより細胞数の補正を行っている)を指標としたスクリーニングを行い、Transrepression活性の有無を検証した。なお、IL-6は先に挙げた免疫関連疾患の病態形成に深く関わっているとされ、既知のLXRリガンドによる産生抑制作用も認められており、本研究においてもサイトカインの代表として選択した。Transactivation活性はLuciferaseを用いたレポーター

Table 1. Screening of tricyclic AA compounds.



Compd.	Inhibition rate of LPS-induced IL-6 production at 10 μ M (%)	LXR Transcriptional Assay			
		EC ₅₀ (μ M) LXR α	EC ₅₀ (μ M) LXR β	IC ₅₀ (μ M) LXR α	IC ₅₀ (μ M) LXR β
T1317	49%	0.34	0.09	–	–
1	N.A.	N.A.	N.A.	>30 ¹	N.A.
2	54%	4.2	2.7	N.A.	N.A.
3	20%	0.91	0.26	N.A.	N.A.
4	71%	1.6	0.77	N.A.	N.A.

1. Not achieved 50% inhibition at 30 μ M, N.A. No Activity at 10 or 30 μ M

アッセイにおける転写活性を指標としている。AA化合物のスクリーニングの結果を、アミド窒素原子上にメチル基を有するいくつかの化合物を例にまとめた(Table 1)。弱いアンタゴニスト活性を示す化合物**1**にはIL-6産生抑制活性が認められなかったが、アゴニスト活性を示す化合物**2–4**にはIL-6産生抑制活性が認められ、特に化合物**4**に強力なIL-6産生抑制活性を見出した。そこで化合物**4**を新たにリード化合物に選択し、構造展開を進めることにした。

<X線情報に基づく化合物デザイン>

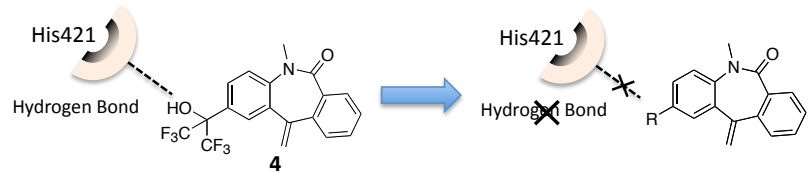
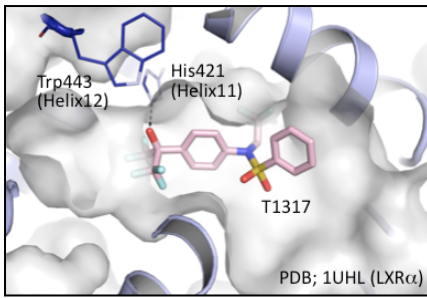


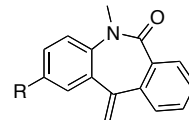
Figure 3. X-ray cocrystallography and design of novel compounds.

化合物デザインにあたり、T1317の構造活性相関研究やLXRとの複合体X線情報を参考にした。Transactivation活性を示すにはLXRのHelix12の適切な折りたたみが重要であるが、T1317の末端水酸基とHelix11上のHis残基が水素結合を形成することでTrp残基を含むHelix12の適切な折りたたみを誘導することが知られている。スクリーニングで得られた化合物 **4** もT1317と同様に水酸基を含むヘキサフルオロプロパノール構造を有している。化合物 **4** がT1317と同じ結合ポケットに取まっていると仮定するとHis残基と水素結合を形成していると推測される。そこで、His残基と水素結合を形成できないような置換基へ変換することで、Transactivation活性の消失(減弱)に伴うTransrepression作用選択性の獲得を期待した化合物デザインを行い、合成、活性評価した(Fig.3)。

<アルキル置換基の長さ・嵩高さの検討>

ヘキサフルオロプロパノール構造を有していない化合物 **5-11** はすべてTransactivation活性を示さなかった。一方、化合物 **5** と **9** を除くいずれの化合物でもIL-6産生抑制活性が認められ、Transrepression作用選択性を見出すことに成功した。化合物 **5-9** の結果から、Rの置換基の長さはC2-C5程度が最適であることが示唆された。また、化合物 **5-7** , **10** , **11** の結果から、嵩高さを増していくと概ねIL-6産生抑制活性が向上することを見出した(Table 2)。さらに、置換基Rにヘテロ原子を導入した化合物をいくつか合成し活性評価を行った。Rがヒドロキシル基である場合に、強力なIL-6産生抑制活性が認められたが、酸素原子を介して置換基を伸ばすと先のアルキル置換基の結果と同様に活性が低下することを見出した。これらの化合物はいずれもTransactivation活性を有しておらず、Transrepression作用選択性を示した。

Table 2. Newly synthesized compounds.



R	Compd.	Inhibition rate of LPS-induced IL-6 production at 10 μ M (%)	Transcriptional Assay EC ₅₀ (μ M)	
			LXR α	LXR β
	T1317	49%	0.34	0.09
	4	73%	1.6	0.77

	5	N.A.	N.A.	N.A.
	6	38%	N.A.	N.A.
	7	51%	N.A.	N.A.
	8	38%	N.A.	N.A.
	9	N.A.	N.A.	N.A.
	10	44%	N.A.	N.A.
	11	61%	N.A.	N.A.

N.A. No Activity at 10 or 30 μ M

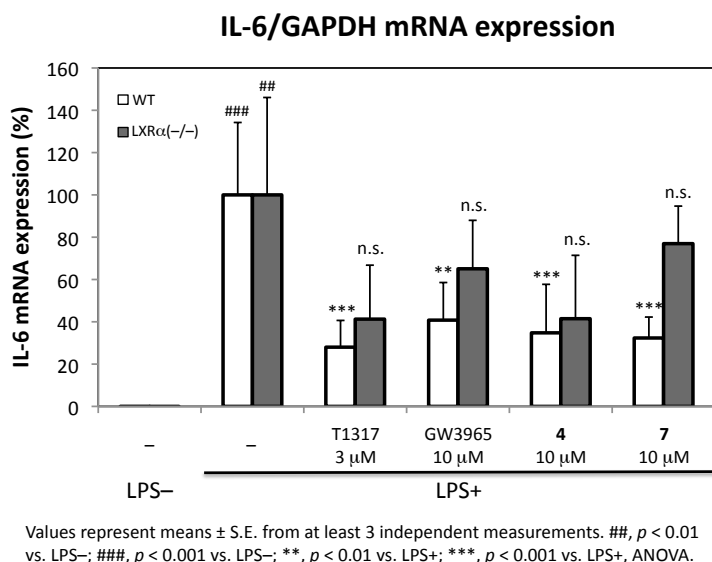


Figure 4. LXR dependency of compound 7.

ことが見出された(Fig. 4)。特に化合物 7 は顕著であり、IL-6産生抑制作用が少なからずLXRα依存性であることが示唆された。LXRのもう一つのサブタイプであり、全身に分布しているLXRβの関与も無視できないはずで、LXRα/β欠損マウス(LXRα(-/-)/β(-/-))を作成し同様の実験(検出したのはmRNAでなくIL-6のタンパク質)を行ったところ、期待通り、化合物によるTransrepression作用がLXR依存性であることを示すことに成功した。

<LXRαに対する結合親和性の解析>

本研究で得られた化合物がLXRに結合するのかを検証するために蛍光偏光法を利用することにした。既知の蛍光性LXRリガンドを用い、コントロールタンパク質のGSTタンパク質とGST融合hLXRαタンパク質の濃度を振って共存させた時の蛍光偏光度を測定した。GSTタンパク質を用いた場合には蛍光

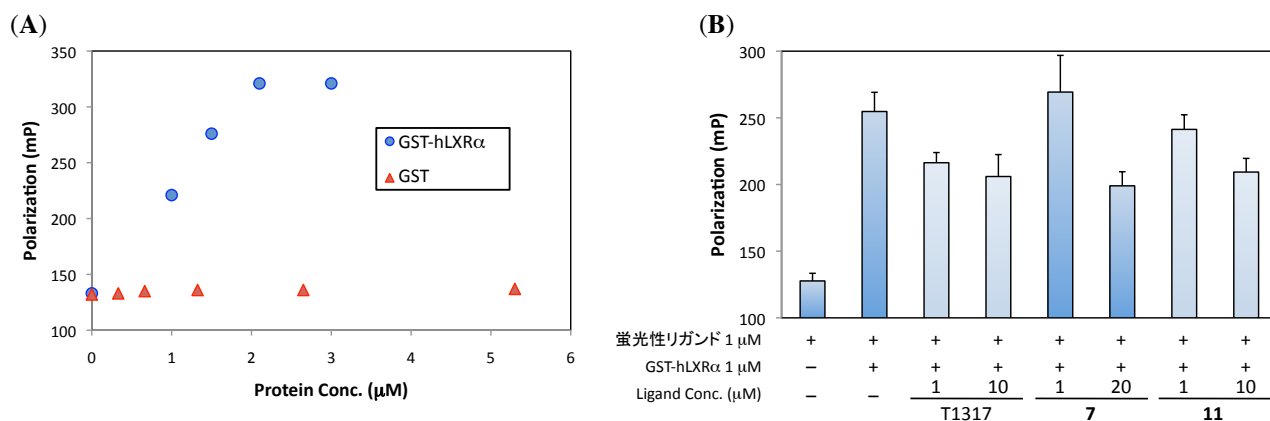


Figure 5. Binding assay by fluorescence polarization.

偏光度の増加は認められなかったが、GST-hLXRαを用いた場合に濃度依存的な蛍光偏光度の増加が認められ、本実験で用いた蛍光性LXRリガンドがhLXRα特異的に結合していることが示唆された(Fig. 5(A))。次にこれまでに得られた化合物の濃度を振って蛍光性リガンド、タンパク質と共存させたときの蛍光偏光度を測定した。結果、ポジティブコントロールのT1317に加え、化合物 7 と 11 もそれぞれ 20 μM、10 μMで蛍光偏光度の減少が認められ、蛍光性リガンドと競合的にhLXRαに結合していることが示唆された(Fig.5(B))。

<LXR依存性の検証>

得られた化合物のTransrepression作用がLXR依存性であることを確認するために、野生型マウス(WT)あるいはLXRα欠損マウス(LXRα(-/-))から腹腔内マクロファージを回収し、LPS添加時における各化合物10 μM (T1317のみ3 μM)添加時のIL-6 mRNA発現量を定量した。なおここでLXRαについて検討したのは、免疫細胞に多く発現していることが明らかになっているからである。結果、WTでは化合物処理するとLPS単独添加時に比べIL-6 mRNAの発現量が低下するのに対し、LXRα(-/-)ではその効果が減弱する

【まとめ】

LXRのTransrepression機構の解明や免疫関連疾患の新たな医薬創出に貢献することを目指し、私はTransrepression作用選択的なLXRリガンドを得ることを目的として研究に着手した。論理的な化合物デザインによる化合物創製によりTransrepression作用選択的化合物を得ることに成功した。また、マウス腹腔内マクロファージを用いた解析により化合物によるIL-6産生抑制活性がLXR依存的事であることを見出した。さらにTransrepression作用選択的化合物がLXRリガンドとして機能しているのかを明らかにするために、LXRに直接結合しているのかを検証した。蛍光偏光法を用いた解析により化合物が直接LXRに結合していることを示唆する結果を得た。以上、Transrepression作用選択的なLXRリガンドの創製に成功した。今後は未だほとんど明らかとされていないTransrepression機構の詳細を解明するケミカルツールとして利用されることが期待される。さらにはこれまでにない小分子リガンドとして免疫疾患への有用性が示されることが期待される。