

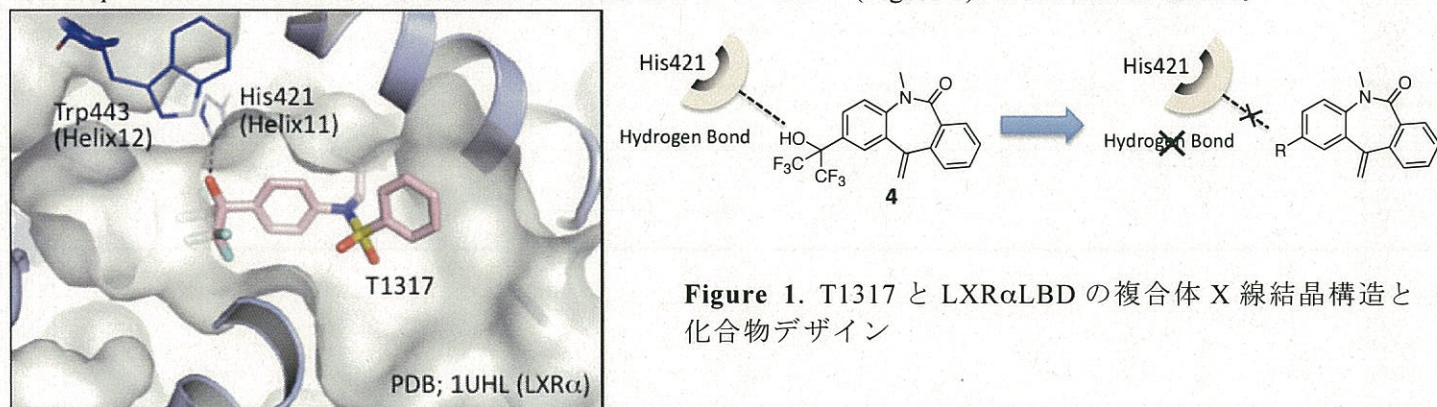
審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 青 山 惇

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)。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 *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。青山惇は修士課程に於ける研究で、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。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誘発性遺伝子の誘導を抑制する(Transrepression 作用と呼ばれる)ことなどである。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 活性も併せ持っている。青山は 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 LXR リガンドの創製を目指した。

1. Transrepression 選択性を有する化合物の創製

青山は修士課程に於いて創製していた AA 化合物の中から、IL-6 産生抑制活性を指標としたスクリーニングによって Transrepression 活性の強力な化合物 **4** を見出した。さらに化合物 **4** を新たなリード化合物に選択し構造展開を進めた。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に着目した。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収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(Figure 1)、合成、活性評価した。



置換基 R の長さや高高さ、極性基導入の可能性、さらには置換基導入位置の検討を行った結果、青山が期待した通り、化合物 30 μM 処理時においても Transactivation 活性はすべての化合物で認められないことを見出した。一方、IL-6 産生抑制活性に認められる Transrepression 活性はほとんどの化合物で認められることが判明し、置換基 R が高いほど活性が向上することや長過ぎると活性が低下することなどを見出し、リガンド結合ポケット内において芳香環近傍にはある程度化合物が収まる空間が存在するが、奥行きはあまりないことなどが示唆された。また、置換基導入位置



の検討の結果、メタ位への置換基導入により活性が向上することからメタ位近傍にもある程度化合物が収まる空間が存在していることが示唆された。以上のように、Transrepression 作用選択的な化合物を得ると同時に、リガンド結合ポケットに関する新たな知見を得ることに成功している。

## 2. Transrepression 活性発現機構の解析

この段階で得られた Transrepression 作用選択的な化合物の中から化合物 **7** や **11** を用いて Transrepression 活性発現機構の詳細を検討した。まず、Transrepression 活性の指標としていた IL-6 産生抑制活性が LXR 依存的に生じているのかをマウスの腹腔内マクロファージを用いて解析した。具体的には WT マウスと各種 LXR ノックアウトマウスを用い、WT では認められる化合物による IL-6 産生抑制作用がノックアウトの場合にどう変化するかを検証した。結果、ノックアウトマウス由来の腹腔内マクロファージを用いた場合に、化合物による IL-6 産生抑制活性がある程度キャンセルされることを見出し、IL-6 産生抑制活性が LXR 依存的であることを明らかにした。さらに、Transrepression 作用選択的な化合物が LXR に直接結合しているのかを検証した。これは、Transrepression 作用選択的な化合物が LXR リガンドとして機能しているのかを明らかにするものである。本研究に於いて、これまでに報告がない「蛍光偏光法による LXR 結合実験系」を構築することに成功し、化合物 **7** や **11** を用いた解析により、直接 LXR に結合していることを示唆する結果を得た(Figure 2)。

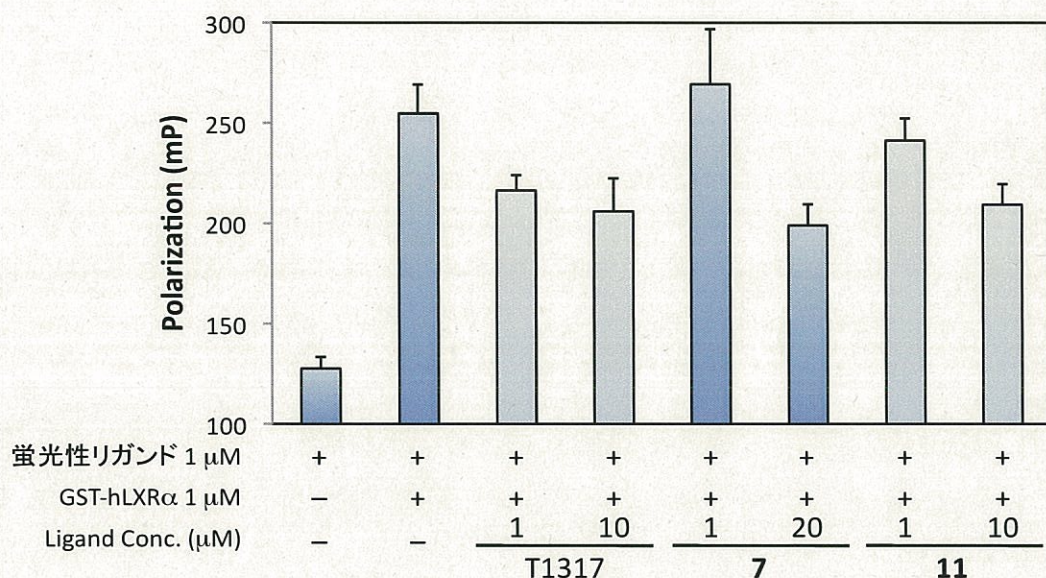


Figure 2. T1317、化合物 **7** と **11** を用いた蛍光偏光法による hLXRα との結合親和性解析

以上に加えて青山は、得られた Transrepression 作用選択的な LXR リガンドの医薬上の有用性を検討した。これまでに報告されている多くの LXR リガンドはそれ自身の Transactivation 作用から、血中 TG 量の増加という重篤な副作用を起こしうる標的遺伝子の転写を活性化するが、本研究で得られた Transrepression 作用選択的なリガンドはこの作用を示さないことを見出した。また、本研究で得た Transrepression 作用選択的なリガンドによる IL-6 産生抑制作用は、上でのべたとおり、LXR との結合を介した新規なメカニズムであると考えられ、既知の IL-6 産生抑制剤のそれとは異なる。よって、創製した Transrepression 作用選択的なリガンドには、十分に医薬的な意義があるものと考えられる。

以上、青山はこれまでにほとんど研究が進んでいない LXR の Transrepression 機能に着目し、新たなケミカルツール、医薬応用が期待される小分子リガンドの創製研究を行った。結果、期待通り、Transrepression 作用選択的な化合物を見出した。さらに Transrepression 活性発現機構の詳細を検討し、得られた化合物が LXR に結合すること、LXR 依存的な Transrepression 作用を示すことを明らかにした。この過程で、新たな結合実験系を構築することにも成功している。この成果は LXR の包括的な機能解明を助けることにつながると考えられ、また医薬的な応用可能性も示唆されることから、医薬化学の発展に有意に貢献するものであり、博士(薬学)の学位を授与するに値すると判断した。