

論文の内容の要旨

論文題目

新規創薬テンプレートによる生理活性物質の創製研究 ～抗 HCV 薬および核内受容体 ROR リガンドの創製～

氏名 中村 政彦

【序章】

当研究室では、生理活性物質の創製手法として、創薬マルチテンプレート手法を提唱し、サリドマイドをテンプレートに設定した実例を示してきた。この手法は、ヒト蛋白質が約 5 万から 7 万種類存在するものの、それらのドメイン三次構造に着目すると、そのフォールド構造は 1000 種ほどの立体構造に制限されるという考え方に立脚しており、フォールド構造が生体内に平均的に分布していると仮定すると、ある 1 つのフォールド構造に適合する骨格を共通母核 (テンプレート) に設定すれば、1 つのテンプレートの構造を元にして 50-70 種の蛋白質に対して親和性を持つ化合物が創製できるという考えである。

従前において、サリドマイドのマルチターゲット性に着目して、その骨格をテンプレートとして活用してきた。次に、新たなテンプレートへの拡張を図り、この手法の汎用性を実証することを考えた。そこで、本研究室で利用してきた急性前骨髄球性白血病 (Acute Promyelocytic Leukemia, APL) 治療薬 tamibarotene と、肝臓 X 受容体 (Liver X Receptor, LXR) 合成リガンド T0901317 の構造を参考に、新たに 1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (TMN) 骨格、および phenanthridinone 骨格の着想を得て、それぞれを基本骨格に持つ各種生理活性物質の創製に着手した。

既に、TMN 骨格を有するウイルス性白血病 (成人 T 細胞白血病, Adult T-cell Leukemia, ATL) 細胞増殖抑制薬や、phenanthridinone 骨格を持つ C 型肝炎ウイルス増殖抑制薬について研究業績を上げてきた。本論文では、phenanthridinone 骨格を有する 抗 HCV 化合物のさらなる成果と、新たに標的として設定した核内受容体 ROR に関する成果を論述する。

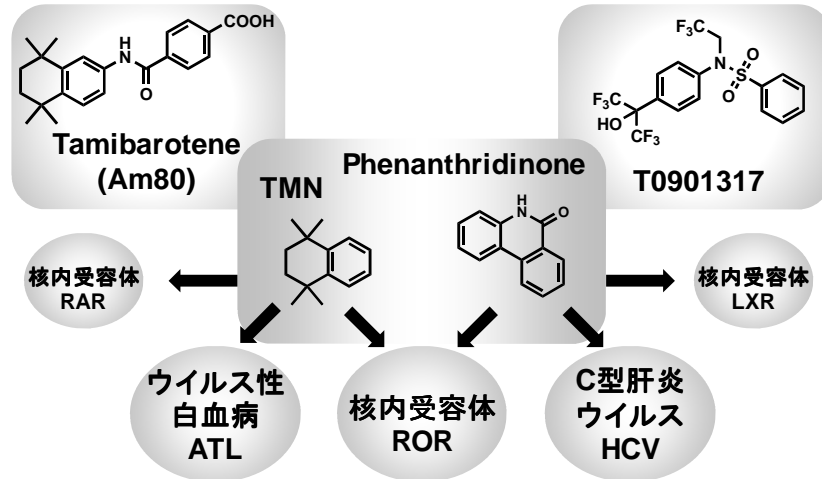


Fig.1 The conceptual diagram of lead skeletons

【第 1 章 C 型肝炎ウイルス増殖抑制活性を持つ化合物】

C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus, HCV) の感染者は日本に約 200 万人、世界には 1 億 7 千万人いると考えられている。日本では C 型肝炎に起因する肝細胞癌で年間 3 万人以上が亡くなっており、創薬研究において重要な疾患である。現在の治療にはインターフェロンとリバビリンが主に用いられているが、重篤な副作用や HCV の遺伝子型によっては低い奏効率、高額な医療費などが課題である。また、現在進められているウイルス由来蛋白質 (酵素など) を標的とした創薬研究は、副作用、ならびに変異による作用効果の大きな減弱が問題となっており、C 型肝炎は新しい作用機序の新薬が期待される疾患である。

我々は、鹿児島大学馬場研究室との共同研究により、HCV モデルウイルスである牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) を用いた探索研究、および HCV replicon assay 系を用いた探索研究を行い、phenanthridinone 骨格化合物の抗 HCV 活性を見出してきた。新たに、HCV replicon 複製を luciferase 活性に置き換える活性評価系を導入し、研究を推し進めた。

当研究室において LXR ligand として保有していた phenanthridinone 骨格化合物の抗 HCV 活性を評価することにより、*N*-butyl 体 **1** を選び出した。さらに、電子求引性基・供与性基の影響を調べるために、芳香環上にフッ素や methyl 基、methoxy 基を導入した誘導体を合成し、methoxy 基が活性の面で好都合であることを見出した。その後、monomethoxy 基を持つ誘導体群の評価から、3、4、8 位への導入が活性や選択性に優位であることが分かった。また、dimethoxy 体、trimethoxy 体などから、より詳細な構造活性相関を得た。

最終的に、化合物の平面性が重要であるという過去の構造活性相関や、隣接する3位と4位の methoxy による大きな立体反発などを考慮し、3位と4位にまたがるジオキソラン構造、さらに、8位に methoxy 基を導入した。この構造修飾により、phenanthridinone 骨格を有する高活性かつ高選択的な抗 HCV 化合物 **2** を手に入れることに成功した。**2** は、濃度依存的に HCV replicon を抑制し (Fig.2 左グラフ、◆:Luc sub genome assay、◇:RT-PCR)、また、Huh-7 細胞を用いた細胞生存試験においては、毒性 (40 μ M まで) をほとんど示さなかった (Fig.2 右グラフ、■)。

また、**2** は、LXR 活性をほとんど示さず、現在、標的分子は不明であり、共同研究先とともに、標的分子の同定を図っていきたいと考えている。

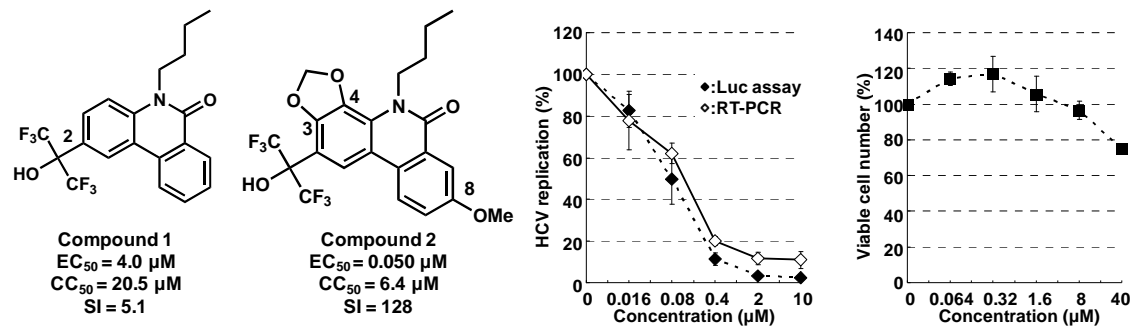


Fig.2 Anti HCV compounds and the inhibition activity of **2**

【第2章 核内受容体 ROR インバーサゴニスト活性を持つ化合物】

Retinoic acid receptor related orphan receptor (ROR) は、核内受容体ファミリーに属する受容体群であり、 α 、 β 、 γ の3種類のサブタイプが存在する。ROR は、その応答配列である RORE を介して、概日リズムや、T_H17 細胞に関係する免疫応答、糖・脂質の代謝などを制御しているとされるが、詳細な機能などは、不明な部分が多い。既に報告されているリガンドとしては、all-trans retinoic acid (ATRA) や合成 LXR アゴニスト T0901317 が挙げられる。

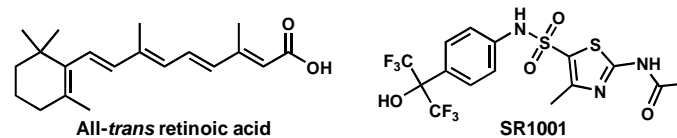
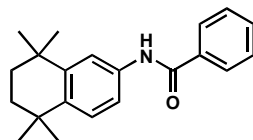


Fig.3 ROR inverse agonists

ROR γ は、未分化 T 細胞から T_H17 細胞への分化において重要であるとの報告があり、自己免疫疾患 (多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデスなど) との関連が示唆されている。さらには、ROR α/γ に対する合成リガンド SR1001 が、T_H17 細胞の IL-17 を始めとするサイトカイン類の産生を抑制することを示した報告がなされ、ROR が自己免疫疾患の治療標的となり得ることが示された。

我々は、合成レチノイド tamibarotene や、T0901317 を由来とした骨格を利用し、生理活性物質の創製を行ってきた。そこで、上記の骨格を有する化合物群について、ROR 活性評価を行った。活性評価は、reporter gene assay を用い、転写活性化能の変化を luciferase 発現量に置換して、化合物の作用を観測する方法で行った。

まず、ATRA の analogue である tamibarotene をリードとした TMN 骨格化合物について、活性評価を行った。Tamibarotene には ROR 活性は見られなかったものの、そのカルボン酸部位を除去した化合物 **3** に、ROR inverse agonist 活性が観察された。また、その他の誘導体にも、full または partial の inverse agonist 活性が見られた。これらの化合物に ROR サブタイプ選択性は見られず、**3** については、ATRA や tamibarotene と異なり RAR 活性は見られなかった。



Compound 3
ROR α , IC₅₀ = 5.0 μ M
ROR β , IC₅₀ = 5.8 μ M
ROR γ , IC₅₀ = 7.5 μ M

Fig.4 ROR inverse agonist with TMN skeleton

また、phenanthridinone 骨格化合物においても、ROR inverse agonist 活性を持つ化合物を見出すことに成功した。その中でも、特徴的な化合物として9位に methoxy 基を持つ化合物 **4** が挙げられる。この **4** には、T0901317 よりも強い ROR γ selective inverse agonist 活性を示す一方、LXR agonist 活性は示さないという選択性が見られた。

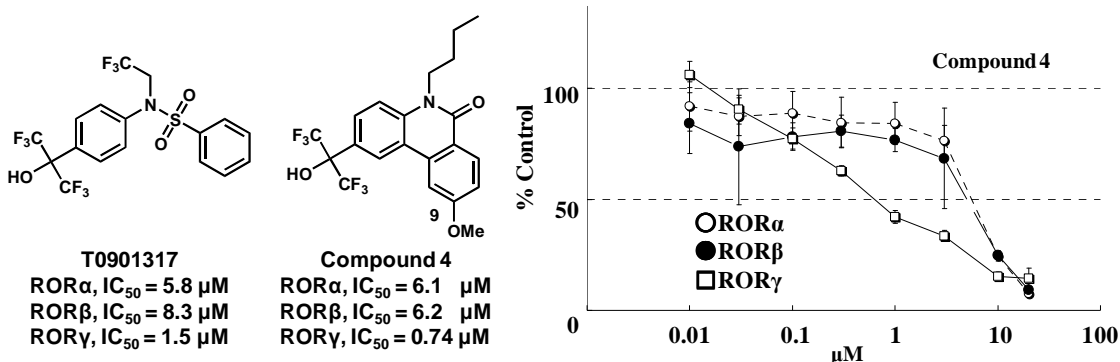


Fig.5 ROR inverse agonistic activities of T0901317 and compound 4

【終章】

Tamibarotene ならびに T0901317 から着想を得ることで、phenanthridinone 骨格を持つ化合物群に抗 HCV 活性、また、TMN 骨格ならびに phenanthridinone 骨格を持つ化合物群に核内受容体 ROR inverse agonist 活性を見出すことに成功した。今後、抗 ATL 活性や抗 HCV 活性の本体である標的分子が明らかになり、そのフォールド構造を LXR や ROR のそれと比較することによって、創薬マルチテンプレート手法の有用性の根拠が立証されるものと考えられる。

また、当研究室での活性評価により phenanthridinone 骨格は、cholesterol 類をリガンドとする NPC1 (Niemann-Pick 病 C 型の原因タンパク質) や NPC1L1 (NPC1 Like 1) に対して結合することが示唆された。Cholesterol 類をリガンドとする LXR や ROR にも同様に作用することから、phenanthridinone 骨格が cholesterol 骨格の代替となる可能性が考えられ、また、抗 HCV 作用についても、cholesterol の制御に関連するものではないかと考えられる。