

レチノイド X 受容体リガンド探索への応用を指向した蛍光性リガンドの開発研究

岡山大学院医歯薬¹、日本学術振興会²、日本大学医³、静岡県大環境科学研⁴

○山田翔也^{1,2}、槇島 誠³、内藤博敬⁴、加来田博貴¹

【背景・目的】

レチノイド X 受容体 (RXR) アゴニストである LGD1069 (1; $EC_{50} = 20$ nM, $E_{max} = 100\%$; Figure 1)は皮膚浸潤性 T 細胞リンパ腫治療薬として用いられており、抗がん作用のみならず、2 型糖尿病、アルツハイマー病に対する治療効果が報告されている。これは、RXR が糖・脂質代謝を制御するペルオキシソーム増殖剤応答性受容体や肝 X 受容体などと二量体を形成し、さらにその二量体は RXR アゴニスト単独で活性化されることなどに起因する。しかし、本化合物をはじめこれまでの RXR アゴニストは甲状腺機能低下などの副作用が問題であった。そのような中、演者らは副作用発現が報告されている RXR アゴニストがいずれも RXR を 100%活性化するフルアゴニストであることに注目し、efficacy を抑えた RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (2; $EC_{50} = 143$ nM, $E_{max} = 75\%$)¹ および CBTF-PMN (3; $EC_{50} = 15$ nM, $E_{max} = 67\%$)² (Figure 1) を創出したところ、これらが上記の副作用を回避しつつ、2 型糖尿病モデルマウスで血糖降下作用を示すことを見出している。

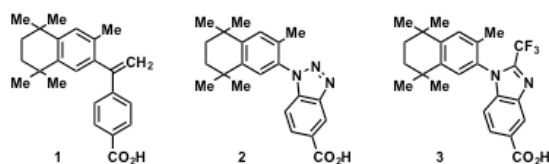


Figure 1. Chemical structures of RXR agonists.

RXR の創薬ターゲットとしての魅力が改めて提示されつつある一方で、RXR リガンドの探索法に目を向けると、細胞を用いた転写活性化試験や、放射性同位体標識リガンドを用いた結合試験などがあるものの、いずれも操作の煩雑さやコスト面が課題と考えられた。そこで、これらの課題解決を目的に本研究に着手した。課題解決の手段として着目したのが、蛍光性リガンドを用いた蛍光偏光法である。蛍光偏光法は、偏光によって励起された蛍光性分子が、その分子運動の大きさに応じた偏光度の蛍光を放出するという現象を利用した方法である。蛍光偏光法を実施するには蛍光性リガンドが必須であることから、蛍光性 RXR リガンドの創出を行い、それらを用いて蛍光偏光法への応用を試みた。

【蛍光性 RXR アゴニストによるアプローチ】

RXR にアゴニストが結合すると、RXR の構造変化を誘導し、アゴニストは RXR に覆われる。RXR のリガンド結合ポケットは、リガンド以外の結合を許せるほどの空間的な余裕が無い。そのため、既存の RXR アゴニストに蛍光団を結合させて蛍光性分子とし、なおかつ RXR アゴニスト活性を維持するのは困難である。そこで、演者らは当グループにて創出した RXR アゴニスト NEt-TMN (4; $EC_{50} = 4$ nM, $E_{max} = 101\%$)の一部を蛍光性分子化した化合物をデザインした (Figure 2)。合成、活性評価を行った結果、carbostyryl 構造を有する 5 に RXR アゴニスト活性 ($EC_{50} = 1.2$ μ M, $E_{max} = 95\%$) が見られ、蛍光性 RXR アゴニストの創出に成功した³。しかし、リガンド探索ツールとしての実用化には RXR アゴニスト活性および蛍光強度が不十分であった。導入した蛍光団の平面性が高すぎるために RXR と安定な結合を生じることが出来なかったと推測される。

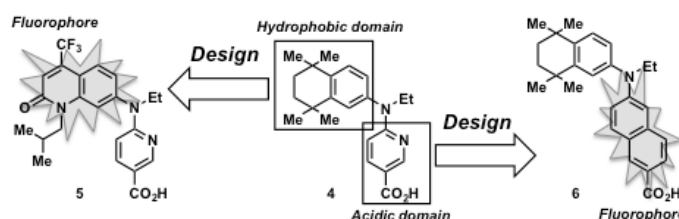


Figure 2. Design strategies of fluorescent RXR agonists.

【蛍光性 RXR アンタゴニストによるアプローチ】

既存の RXR アンタゴニストである PA452 (7; $pA2 = 7.11$)を模倣し、当グループで見出した 3 に側鎖アルコキシ基を導入した 8 を創出したところ、本化合物が 7 に匹敵する RXR アンタゴニスト活性 ($pA2 = 7.00$)を示すことが分かった (Figure 3)。化合物 8 と RXR α リガンド結合ドメインとのドッキングシミュレーションを行ったところ、側鎖末端が受容体の外側に露出していることが示唆された。そこで、8 のアルコキシ基を

介して蛍光団を導入した化合物をデザインした (Figure 4A). 合成した **9** の活性評価を行ったところ、側鎖炭素数が 6 である **9c** に **7** に匹敵する RXR アンタゴニスト活性が見られた ($pA_2 = 7.35$). このように蛍光性 RXR アンタゴニストの創出に成功したことから、**9c** を用いて RXR タンパク質存在下、蛍光偏光測定を行ったところ、RXR 濃度依存的な蛍光偏光度の上昇、RXR アゴニストである **1** による蛍光偏光度の減少が確認された (Figure 4B). そこで、蛍光性 RXR アンタゴニスト **9c** の濃度を 100 nM に、RXR タンパク質濃度を 0.1 mg/mL に固定し、**1** を試験化合物として蛍光偏光法を行ったが、**1** の濃度依存的な蛍光偏光度の減少は見られず、蛍光偏光には適していなかった。

そこで、化合物 **9c** が蛍光偏光法に適していなかった原因を考察すべく、**9c** の RXR に結合した際のコンホメーションについてドッキングシミュレーションしたところ、アルキル鎖が伸びきらず折れたままの構造で RXR に結合していることが示唆された。すなわち、スペーサーとして導入したアルキル鎖の自由度が高すぎるために、RXR に結合した際に十分に蛍光偏光度が上昇していない可能性が考えられる。また、**9c** は脂溶性の指標である cLogP が 11.72 と非常に高く (**1**: cLogP = 8.19), タンパク質との非特異的な結合を生じやすいことが予想された。化合物 **1** によって RXR のリガンド結合ポケットから追い出されても、RXR と非特異的な結合を生じ、蛍光偏光度が減少しなかったのではないかと考えられる。

当グループで見出している RXR アンタゴニスト NEt-SB (**10**)⁴ は高活性な RXR アンタゴニスト ($pA_2 = 8.23$) であり、剛直性の高いスチルベン構造に由来した蛍光性を示し、さらに cLogP = 8.92 と **9c** に比べ脂溶性は 600 倍以上低い (Figure 5A). そこで、**10** を蛍光偏光法へ応用することとした。RXR タンパク質を用いて蛍光偏光測定を行ったところ、**10** の RXR への結合が確認され、さらに RXR アゴニストである **1** と共存させることで、蛍光偏光が減少することから、リガンド結合部位を認識していることが示された。本化合物を用いた蛍光偏光法により RXR アゴニスト **1**, **2** および RXR アンタゴニスト **7** の RXR に対する結合能を評価したところ、試験化合物の濃度に依存した蛍光偏光度の減少が見られた (Figure 5B). また、本結果より算出した結合阻害定数 (K_i 値) に転写活性化試験により求めた EC_{50} 値と相関が見られ、蛍光偏光法による RXR リガンドの結合試験を実施することが出来た。しかし、**10** のリガンド探索ツールとしての実用化には、吸収、蛍光波長が短いことなどに改善の余地が残る。現在はそれら改題の解決を目指した新規蛍光性 RXR リガンドの創出を行っている。

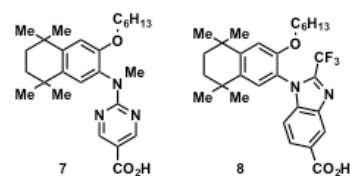


Figure 3. Chemical structures of RXR antagonists.

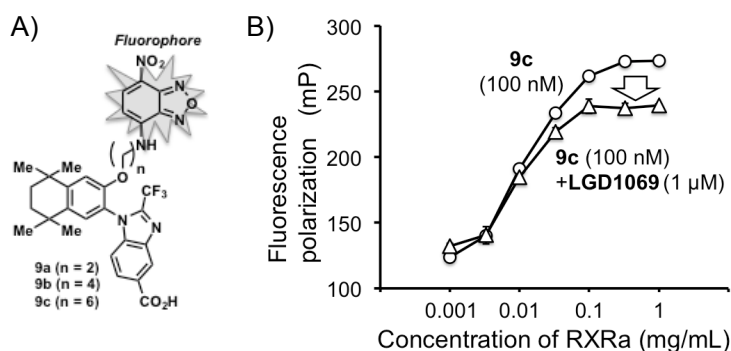


Figure 4. A) Chemical structure of fluorescent RXR antagonist **9**. B) Fluorescence polarization values of **9c** depending on the concentration of RXRα in the absence or presence of non-fluorescent compound **1**.

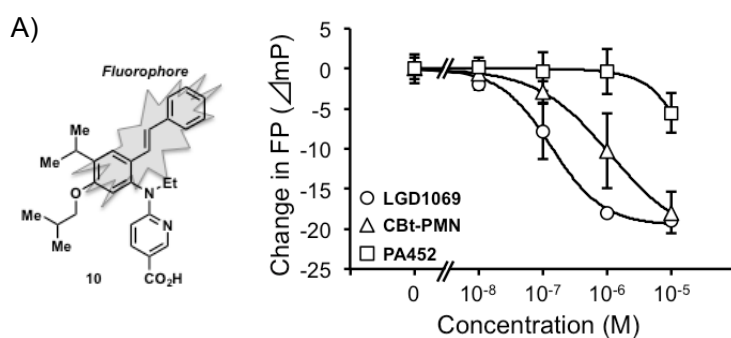


Figure 5. A) Chemical structure of fluorescent RXR antagonist NEt-SB (**10**). B) Fluorescent polarization assays employing **10** (100 nM) with known RXR ligands in the presence of RXRα (0.1 mg/mL). FP stands for fluorescence polarization.

References

- 1) Kakuta *et al.* *ACS Med. Chem. Lett.*, **2012**, 3, 427.
- 2) Ohsawa *et al.* *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 1865.
- 3) Yamada *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 5143.
- 4) Nakayama *et al.* *ACS Med. Chem. Lett.*, **2011**, 2, 896.