核内受容体を標的とするケミカル バイオロジー研究

影近 弘之

要約：核内受容体は、ステロイドホルモンや活性型脂溶性ビタミン A, D などの生理作用を担う受容体であり、リガンド依存的転写因子として、特異的な遺伝子の発現を厳密に制御している。核内受容体とその特異的リガンドの機能は、がん、自己免疫疾患、生活習慣病の発症や治療と密接に関連していることから、これらを制御する小分子の創製とそれを用いたケミカルバイオロジー研究は、創薬への応用が期待され、活発に行われている。筆者らは、レチノイドの医薬化学研究を行い、all-*trans*-レチノイン酸 (ATRA) をリード化合物として構造展開することにより、レチノイドの2種類の核内受容体 RAR, RXR の特異的な合成アゴニスト、アンタゴニストを創製してきた。更に、核内受容体のリガンド結合部位の結晶構造をもとにバーチャルライブラリーや市販品データベースを用いた *in silico* リガンド探索法により、ユニークな骨格を持つリガンドを種々見いだしてきた。一方、ホウ素クラスターであるカルボランを疎水性ファーマコフォアとして用いることにより、レチノイドだけでなく様々な核内受容体リガンドを創製した。これらのカルボラン含有核内受容体リガンドは核内受容体を分子標的とした中性子捕獲療法への応用も期待できる。以上の合成リガンドは核内受容体の新たな機能を解明するケミカルツールとして有用であるばかりでなく、合成レチノイド Am80 が急性前骨髄球性白血病治療薬として認可され、実際に臨床の場で用いられるに至った。Am80 を用いた基礎研究および動物実験から、レチノイドの新たな機能が発見され、それを元に、自己免疫疾患や血管病変等に対する新たなレチノイド療法が検討されている。

はじめに

化学は、物質を対象として、分子、原子レベルでそ

の性質を理解し、制御する学問分野であり、そのため、化学を基盤とした様々な研究分野との複合領域研究が注目されている。ナノテクノロジー分野においては、分子から組み上げることにより高次機能を発現させる「ボトムアップ型アプローチ」の重要性が認識されている。一方、生命科学分野では、化学（人工化合物）を起点とする生物学と化学との融合領域としてケミカルバイオロジーが注目され、理学、工学、薬学、医学など様々な分野に広がりつつある。ケミカルバイオロジー研究は、基礎学問と捉えることもできる一方、その成果として創薬開発を念頭においた研究展開も重要である。本稿では、創薬を志向したケミカルバイオロジー研究の一例として、核内受容体の医薬化学、特にレチノイドの創薬展開について紹介する。

1. 核内受容体

ステロイドホルモンや甲状腺ホルモンなどの脂溶性ホルモンが個体や細胞の分化、発生、代謝、ホメオスタシスといった重要な生物作用を担っていることは古くから知られていた。これらのホルモン作用として、個々の核内ホルモン受容体リガンド依存的転写因子として特異的な遺伝子発現を制御するという作用機作が明らかにされた。その後、ビタミン A やビタミン D₃ などの脂溶性ビタミンが、体内で活性本体（それぞれレチノイン酸と 1 α , 25-ジヒドロキシビタミン D₃）となり、やはり特定の核内受容体を介して同様の作用を発揮することが示され、核内受容体を中心とした転写制御研究は急速な展開を見せてきた(1)。

一般に、転写因子は、基本転写因子、転写制御因子、転写共役因子に大別される。基本転写因子は、遺伝子プロモーターを介した転写に共通した必須因子であり、いわばハウスキーピング的な役割を持っている。一方、

遺伝子発現の質と量の特異的に制御しているのが転写制御因子である。転写共役因子は転写制御因子から基本転写因子へのシグナルを伝えるメディエーターとしての役割を果たしており、転写を抑制するコリプレッサーと活性化するコアクチベーターがあり、いずれも種々のタンパク質の巨大複合体として機能している。核内受容体は、転写制御因子の一種であり、固有の小分子（リガンド）と結合する部位（リガンド結合領域）と遺伝子上の特定の塩基配列に結合する部位（DNA結合領域）をもち、リガンドの結合をスイッチとして特定の遺伝子発現のオン・オフを行うというユニークな機能を持っている。すなわち、非常に多くのタンパク質間相互作用（巨大複合体）によって制御されている遺伝子転写を小分子によって制御しようとする場合には、核内受容体が最も重要な分子標的である。特に、核内受容体で制御されている遺伝子群は、細胞分化・増殖、代謝、恒常性など非常に重要な個体生理と関わっている上に、その機能はがん、自己免疫疾患、骨疾患、生活習慣病など様々な難治性疾患の発症もしくは治療と密接に関連していることから、その重要性は高い。

2. レチノイドとレチノイド核内受容体

レチノイドはレチノイン酸（活性型ビタミンA、図1）の誘導体の総称であり、細胞分化、増殖、アポトーシス、形態形成などの特異的制御因子である(2)。

その作用は、RAR (Retinoic acid receptor) と RXR (Retinoid X receptor) という2種類の核内受容体のヘテロダイマーが担っている。RAR, RXRはいずれも3種のサブタイプ (α , β , γ) が存在し、それぞれ内因性リガンドとして *all-trans*-レチノイン酸 (ATRA), 9-*cis*-レチノイン酸 (9cRA) が同定されたが、9cRAはRARに対してもRXRと同程度の高い親和性を持つため、6種類の核内受容体の pan-agonist として捉えるべきである。

筆者らは、このレチノイド核内受容体が発見される以前に、レチノイドの特異的な細胞分化誘導活性に着目し、レチノイド作用が核内イベントであることを仮想して、合成レチノイドの探索研究を行ってきた(3)。標的分子が未知であるため、有機化学的立場から、既存の化合物が持つ化学的、生物学的な性質を吟味し、その欠点（例えば、ATRAであれば化学的不安定性や高い脂溶性など）を排除し、望みの性質や機能を他の新しい骨格に転換した。その結果、ヒト白血病細胞 HL-60 の分化誘導活性において、ATRA よりも強力な活性を持つ化合物として Am80 や Ch55 などの芳香族化合物を見いだした (図2)(4)。とりわけ、Am80は、研究の初期に合成した化合物であるが、高活性であるうえに、物性面でも優れており、医薬へと展開する以外に、レチノイド研究のケミカルツールとしても有用である。筆者らは、Am80の高比活性な ^3H ラベル体を合成して、HL-60細胞を用いて特異的結合タンパ

図1 レチノイドの作用機構

図2 合成 RAR, RXR リガンド

クを探索したところ、脂溶性の高い $[^3\text{H}]$ -ATRA を用いた実験では、結合するタンパクが複数存在していたが、 $[^3\text{H}]$ -Am80 を用いた場合は、より特異的な結合タンパクだけを捉えるができた。このタンパクを見つけたときに、レチノイドの核内受容体 RAR の遺伝子が報告されたが、直ちに、その遺伝子産物と筆者らが見いだしたタンパクが同じものであることを示し、また、その受容体が二量体として機能していることも明らかとした(5)。

RAR に続いて、RXR が発見されたが、9cRA は RAR, RXR 両受容体のアゴニストであり、そのため、RXR リガンドの機能を理解するツールとして用いることはできない。レチノイド受容体研究の進展と並行するように、RAR, RXR に対する選択的な合成リガンドが創製され、レチノイド作用におけるそれぞれの役割が明らかにされてきた(1, 2, 6)。図2には筆者らが見いだした RAR, RXR の合成リガンドを示した。HL-60 分化誘導活性を指標に見いだした Am80 や Ch55 は RAR 選択的アゴニストであり、様々な系で ATRA と同様の活性を示す。一方、RXR 選択的アゴニストである HX630 や PA024 は単独では HL-60 を分化誘導しない。しかし、10% 程度の細胞に分化を引き起こすような、低濃度の Am80 が共存すると、HX630 や PA024 は、その濃度依存的に分化誘導活性を示す。すなわち、RXR-RAR ヘテロダイマーにおいて、RAR 側にアゴニストが結合することによってレチノイド作用が引き起こされ、RAR がホロ型である場合にだけ

RXR アゴニスト応答性(レチノイドシナジスト作用)になる。RXR アゴニストのレチノイドシナジスト作用は、レチノイド(RAR アゴニスト)の有効濃度を非常に低くすることができるので、両者を併用することにより、しばしば副作用が問題となるレチノイド療法に新たな展開が開けると期待できる。

核内受容体のなかでも、RXR は特異な役割を果たしている。上記の RAR-RXR ヘテロダイマーに加えて、RXR は様々な核内受容体とヘテロダイマーを形成して、これらの機能に関与している(1)。RXR とダイマーを形成する核内受容体には RAR, RXR (ホモダイマー)、ビタミン D 受容体 VDR、甲状腺ホルモン受容体 TR などのホルモン受容体、そしてパーオキシゾーム増殖剤応答性受容体 PPAR、オキシステロール受容体 LXR、胆汁酸受容体 FXR などの脂質、糖質、コレステロール代謝を制御している核内受容体が含まれる。これらの受容体のうち、PPAR, LXR, FXR と RXR のヘテロダイマーの場合には、RXR アゴニスト自身も単独でヘテロダイマーを活性化することができるので、ヘテロダイマーパートナー受容体と同等の生物作用を発揮すると期待される。例えば、RXR アゴニストは PPAR γ のアゴニストであるチアゾリジンジオン系抗糖尿病薬であるピオグリタゾンと同様、脂肪細胞の分化を誘導し、糖尿病モデル動物において抗糖尿病効果を示す(7)。PPAR γ -RXR ヘテロダイマーの場合、作用機構は異なるものの、適度な抑制効果を持つ RXR アンタゴニスト HX531 (図2) でも抗糖尿病効果に加

えて抗肥満効果を発揮することも知られている(8,9). 核内受容体リガンドによる代謝制御に関しては, どのような生物特性を持つリガンドが望ましいかは今後の課題ではあるが, その機能に関わる RXR を標的とした創薬展開も興味深い.

3. レチノイドの構造展開

レチノイドとその核内受容体 RAR, RXR の新しい機能が解明され, 疾患との関わりが明らかとされてきた. 次章で述べるように, 既にレチノイドが治療薬として使われている, がんや皮膚疾患以外にも, 自己免疫疾患, 生活習慣病等に対する治療薬開発への検討が行われている(6). 一方で, 様々な疾患に対するレチノイド療法を実現するために, 特徴的な生物活性や体内動態を示す新規化合物の創製研究も進んでいる.

近年, 種々の核内受容体のリガンド結合領域の結晶構造が解明され(10), リガンドと受容体の相互作用を分子, 原子レベルで理解できるようになった. 既存のリガンドと受容体との相互作用を解析することにより, リガンド構造のどの部位にどのような官能基を入れると受容体結合親和性が強くなるかということを予想し, 新規化合物をデザインすることができる. さらに, 短時間で網羅的に解析できるという計算化学の利点を活

かして, 仮想ライブラリーや市販品カタログなどのデータベースを用いる方法により, 全く新規の骨格を持ったリガンド構造を探索することもできる. このような手法は *in silico* 法とかバーチャルスクリーニングと呼ばれており, 時としてユニークな構造を提示してくれる. このリガンド探索法(図3)では, 結晶構造が未知の受容体の場合でも, 類似の構造を持つ受容体(リガンド結合領域)の結晶構造を鋳型にして三次元構造を組み立て, その受容体構造に対して, データベース中の化合物の結合親和性をエネルギー的に評価する. 化合物の立体構造は最安定構造だけではなく, ある程度可能な立体構造を網羅する必要がある. 得られたリガンド候補化合物群を合成, もしくは購入して, 実際に生物試験を行うことにより, 新たな活性化合物を同定することができる. 図3には, RXR の内因性リガンドである 9cRA のカルボン酸をチアゾリジンジオン環で置き換えると仮定したバーチャルライブラリーの構築例と市販品データベースからの RAR リガンドの探索例を示した. 前者においては, 2つのベンゼン環とチアゾリジンジオンからなる構造を設定して, 置換基 ($R_1 \sim R_5$) やリンカー (X) に多様性を持たせることにより約 30 万分子からなるバーチャルライブラリーを構築したところ, そのうち, 約 600 分子の化

図3 *In Silico* によるリガンド探索法

化合物が RXR のリガンド結合領域に安定に存在するという計算結果を得た。実際に合成した化合物 TZ335 は強力な RXR アゴニストとして、HL-60 細胞の分化誘導試験においてレチノイドシナジスト効果を発揮した。同様にして市販品データベースから得られた RAR リガンド候補化合物 MAY0256 を購入して、その生物活性を検討したところ、弱い RAR アンタゴニストであることがわかった。ベンゾフロキササンというユニークな構造が既存のレチノイドの安息香酸を代替しうると考え、両者のハイブリッド型化合物 Bfx80 を合成した。その結果、Bfx80 は RAR アゴニストとして、HL-60 細胞を単独で分化誘導することが示された。以上のように、チアゾリジンジオンやベンゾフロキササンはカルボキシル基もしくは安息香酸の新しい生物学的等価性基 (Bioisostere) であり、レチノイド以外の生理活性物質の構造にも応用できると考えられる。一方、計算化学を用いたリガンド探索は論理的もしくは効率的であるものの、得られたリガンド候補化合物が空振りにおわったり、MAY0256 のようにアゴニストとして予測した化合物が実際にはアンタゴニストであったりという結果もしばしば起こる。核内受容体の場合には、リガンド結合に伴う受容体の構造変化がダイナミックであり (10)、また、リガンド依存的な核内受容体の構造転換に基づく転写共役因子との相互作用様式が活性発現の鍵であることから、生物活性を予測することが難しいという面も考慮して本手法を活用すると良いだろう。

レチノイドの構造のうち、カルボキシル基と同様に重要であるのが、疎水性部位 (図 2 の化合物の構造のアルキル置換芳香環部位) である。最近、筆者らは、遠藤泰之教授 (東北薬大) との共同研究により、新た

な疎水性ファーマコフォアとしてカルボラン (dicarba-closo-dodecaborane; $C_2B_{10}H_{12}$) を導入したレチノイドを創製した。カルボランは正二十面体に近い構造を持つホウ素クラスターであり、2 個の炭素の位置によって、オルト、メタ、パラの 3 種類の異性体が存在する (図 4a)。カルボランは、医薬化学の分野では、がんの中性子捕獲療法 (Boron Neutron-Capture Therapy) への応用が試みられているが、これまで合成されてきたカルボラン誘導体の多くは、生理活性物質の活性発現に影響を与えない構造部位に適当なリンカーを介してカルボランを結合させた化合物であり、単にホウ素キャリアーとして捉えられているに過ぎなかった。筆者らは、カルボランが持つ「高い脂溶性」に着目し、その化学的性質を積極的に活性構造に組み込んだレチノイドの分子設計を行った。RAR アゴニストである Am80 が疎水性部位として持つ環状アルキル基をカルボランで代替し、構造最適化をおこなったところ、化合物 BR403 (図 4b) が ATRA と同等の RAR アゴニスト活性を示した (11)。

核内受容体のリガンドは一般に、脂溶性小分子であることから、疎水性ファーマコフォアとしてのカルボランの導入がレチノイド以外の核内受容体リガンドにも応用できると考えられる。実際、エストロゲンやアンドロゲンなどのステロイドホルモンのアゴニストもしくはアンタゴニスト活性を示すカルボラン誘導体が創製された (図 4c) (12, 13)。この場合、カルボランはステロイド骨格の CD 環を代替している。同様に、*seco*-ステロイド骨格をもつビタミン D₃ にもカルボランの導入は有効である。カルボランは化学的に安定だけでなく、代謝によって分解されず、また、それ自身は毒性を示さないと報告されている。合成的には、

図 4 カルボラン (a)、カルボラン含有レチノイド BR403 (b)、カルボラン含有各種核内受容体リガンド (c) の構造

カルボランの炭素上だけでなく、ホウ素原子上にも選択的に置換基を入れることが比較的容易であり、3種類の異性体と置換位置を変えることによって、空間的に様々な位置関係、方向性をもった官能基の導入が可能である。カルボラン含有核内受容体リガンド、核内受容体のスイッチとして機能するだけでなく、核内受容体を分子標的とした BNCT への応用という新しい治療法を提供すると考えている。

4. レチノイドの医薬品化と将来展望

上述したように、Am80 はヒト白血病細胞 HL-60 に対して強い細胞分化誘導活性を持つ化合物として見いだされた化合物であるが、その後、レチノイドおよび核内受容体研究が進展するに連れ、Am80 が ATRA と異なる特性を持つことがわかってきた(6)。まず、レチノイドの直接的な分子標的である RAR については、Am80 は α と β サブタイプに結合、活性化するが、 γ サブタイプには実質的に結合しないというサブタイプ選択性を持っている。Am80 が結合しない RAR γ は上皮組織に多く発現しており、皮膚刺激性等の要因とも考えられているが、Am80 の皮膚刺激性は ATRA に比べて遙かに弱い。次に、Am80 は、もう一つのレチノイドの核内受容体である RXR に結合せず、また、ATRA と 9cRA 間の化学変換のような RXR に結合親和性を持つ化合物への変換も考えにくい。更に、Am80 は細胞質のレチノイン酸結合タンパク CRABP (Cellular Retinoic Acid Binding Protein, 図 1) に対する結合親和性も非常に弱い。この特性は、CRABP レベルの上昇がレチノイド耐性の要因となるような場合には、Am80 が有効である可能性を示唆している。このような標的タンパクの選択性以外にも、Am80 は化学的な安定性、低い急性毒性をもつことから、臨床応用が検討された(14)。

1980 年代に *in vitro* の系で示唆されたレチノイドによる癌の分化誘導療法は、1988 年、中国において APL の患者 24 例中、23 例の完全寛解という非常に高い治療効果が報告されて以来、各国で検証され、いずれも 90% 以上の治療効果が確認されて、ATRA による APL の分化誘導療法が確立した。しかし、その後、ATRA により寛解後しばらくして再発した APL に対しては ATRA の有効率が 20% 以下であるという問題点が明らかになった。ATRA 耐性の機構としては、ATRA の血中濃度の低下、細胞内レチノイン酸結合タンパク CRABP の増加、遺伝子変異などが考えられる。Am80 が生体内物質である ATRA と体内挙動が異なること、また、CRABP にほとんど結合性を持たないこ

とからその有効性が期待され、Am80 を用いた再発 APL の臨床試験(大野龍三ら)が行われた。その結果、Am80 は 60% という高い寛解率を示し、その副作用は ATRA 療法に比べて軽かった(15)。この結果をもとに、オーファンドラッグとしての Am80 の治験(第 II 相試験)が行われた後、2005 年、難治性および再発の APL 治療薬として Am80 (タミバロテン：東光薬品工業株式会社)が我が国で認可された。

筆者らはレチノイドの特異的な作用は、より幅広い疾患に有効であると考えており、Am80 およびその誘導体を用いた応用研究を進めている。まず、レチノイドが免疫機能の特異的に制御することから、自己免疫疾患に対する治療効果を期待している。Am80 は乾癬、多発性骨髄腫、リウマチなどの疾患の発症と密接に関連しているサイトカイン IL-6 の産生を強力に抑制する(16)。動物モデル実験において、Am80 は、コラーゲン誘発の実験的関節炎、実験的アレルギー性脳脊髄膜炎を抑制した。また、Am80 は T 細胞の RAR に直接作用して、Th1 分化を抑制し、Th2 分化を促進する(17)。この結果は、Th1 細胞の活性化に基づく免疫疾患に Am80 などのレチノイドが有効であることを示唆している。一方、筆者らは、岩田誠教授(徳島文理大学)との共同研究により、レチノイドが T 細胞の小腸へのホーミング特異性を担う生体内分子であることを同定した(18)。レチノイドはホーミング制御因子として初めて同定された化合物であり、その生理的意義は大きい。ただし、レチノイドによるリンパ球のホーミング作用が臨床的にはどのような意味があるのか、どのような制御が自己免疫疾患に有効であるのかは今後の課題である。

一方、レチノイドが RAR を介して様々な転写因子の機能を制御することが明らかになってきた。例えば、発癌プロモーターの標的転写因子として知られている AP-1 の機能はレチノイドにより抑制される。筆者らは永井良三教授(東京大学)との共同研究により、心血管リモデリングや臓器線維化などにおいて重要な役割を担う転写因子 KLF5 の機能を Am80 が抑制することを見いだした(19)。Am80 は、カフ障害による動脈硬化やアンジオテンシン II 負荷による心肥大、再狭窄などのモデル動物において有効性を示し、これらの心血管系疾患に対する臨床応用が検討されている(20)。

5. 結語

レチノイド研究においては、その構造展開に加え、転写因子や免疫機能に関連した基礎ならびに応用研究の進展につれ、様々な医療分野において、特に、現在

社会がかかえる種々の難病に対するレチノイド療法の可能性が具体的に示唆されてきた。一方、48種類あるとされているヒトの核内受容体の中には、いまだにスイッチとなるリガンドが未知の核内受容体（オーファン受容体と呼ぶ）も多数知られている。これらのオーファン受容体の機能を解明するためには、生体内リガンドを特定するか、もしくは人工リガンドを創製する必要がある。このように、小分子を鍵として、特定の遺伝子の機能を制御する核内受容体はまさしく創薬を志向したケミカルバイオロジーの格好の研究対象であり、レチノイドの臨床応用とともに、核内受容体の医薬化学における更なる展開が期待される。

文 献

- 1) Laudet V, et al. The Nuclear Receptor Factsbook. Academic Press; 2001.
- 2) Sporn MB, et al. The Retinoids. Raven Press; 1994.
- 3) Sporn MB, et al. J Amer Acad Derm. 1986;15:756-764.
- 4) Kagechika H. Curr Med Chem. 2002;9:591-608.
- 5) Hashimoto Y, et al. Mol Endocrinol. 1989;3:1046-1052.
- 6) Kagechika H, et al. J Med Chem. 2005;48:5875-5883.
- 7) Mukherjee R, et al. Nature. 1997;386:407-410.
- 8) Yamauchi T, et al. Nature Med. 2001;7:941-946.
- 9) Yamauchi T, et al. J Clin Invest. 2001;108:1001-1013.
- 10) Bourguet W, et al. Nature. 1998;393:392-396.
- 11) Endo Y, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2001;11:1307-1311.
- 12) Endo Y, et al. Chem Biol. 2001;8:341-355.
- 13) Fujii S, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2005;15:227-230.
- 14) Miwako I, et al. Drugs Today. 2007;43:563-568.
- 15) Tobita T, et al. Blood. 1997;90:967-973.
- 16) Kagechika H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1997;231:243-248.
- 17) Iwata M, et al. Int Immunol. 2003;15:1017-1025.
- 18) Iwata M, et al. Immunity. 2004;21:527-538.
- 19) Shindo T, et al. Nature Med. 2002;8:856-863.
- 20) Fujii K, et al. Circulation Res. 2005;97:1132-1141.

著者プロフィール

影近 弘之（かげちか ひろゆき）

東京医科歯科大学 大学院疾患生命科学部、教授、薬学博士。

◇1983年3月 東京大学薬学部製薬化学科卒業、'85年3月 東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了、'86年9月 東京大学薬学部助手、'99年11月 東京大学大学院薬学系研究科助教授、'04年5月 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部教授、現在に至る。◇研究テーマ：レチノイドの医薬化学、核内受容体・遺伝子転写制御のケミカルバイオロジー、芳香族アミド類の有機物理化学。◇趣味：野球、卓球、水泳など。