核内受容体の動作原理に基づく PPAR γ 選択的アンタゴニストの創製 I大橋 雅生,[†] 宮地 弘幸^{*,††}

Design and Synthesis of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Gamma Antagonists Based on the Principle of Operation of Nuclear Receptor I

Masao Ohashi[†] and Hiroyuki Miyachi^{*,††}*Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University;
1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan.*

(Received February 28, 2017; Accepted April 5, 2017)

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) antagonist is a molecular target to create drug for the treatment of not only type 2 diabetes and obesity, but also cancer. However, few rational drug design strategies and concepts are available. Here, we utilized the nuclear receptor helix12-folding inhibition hypothesis, in combination with structural biology data of our PPAR γ agonist (**5**) complexed with the PPAR γ ligand-binding domain. We found a potent phenylalkynyl amide-type PPAR γ antagonist **18i**, based on pinpoint structural modification of the acidic head part of **5**. Although **18i** exhibited potent PPAR γ antagonistic activity, it retained very weak, but distinct PPAR γ agonistic activity. We then modified the distal benzene ring of **18i**, to delete the residual PPAR γ agonistic activity. Introduction of a chlorine atom at the 2-position of the distal benzene ring afforded **18p**, which exhibited potent, PPAR γ -selective antagonistic activity without any detectable PPAR γ agonistic activity. We realized that **18p** stabilized the corepressor-PPAR γ complex and suppressed basal PPAR γ activity. This compound showed potent anti-adipogenesis activity at the cellular level.

Key words—peroxisome proliferator-activated receptor gamma; antagonist; X-ray; helix12-folding inhibition hypothesis

1. はじめに

核内受容体は発生、分化、代謝など生命維持の根幹に係わる遺伝子発現の制御を行う、主に核内に存在するタンパク質であり、ヒトでは 48 種類の核内受容体が同定されている。¹⁾ 核内受容体は脂溶性低分子リガンドが結合することを端緒として DNA 転写が制御されるリガンド依存性転写因子として認識されている。²⁾

核内受容体の構造は機能モジュールの集合として捉えられる。すなわち各核内受容体間でよく保存されていて、N 末端から、リガンド非依存的転写活性化ドメイン (A/B ドメイン)、核内受容体応答配列に特異結合する DNA 結合ドメイン (C ドメイン)、ヒンジ領域ドメイン (D ドメイン)、リガン

ド依存的転写活性化能を有するリガンド結合ドメイン (E/F ドメイン: ligand binding domain; LBD) の各ドメインから構成される。³⁾

核内受容体リガンドはフルアゴニストとパーシャルアゴニスト、アンタゴニストの 3 群に大別される。フルアゴニストは受容体に対する内因性リガンドの作用と同様に完全強度の活性を発揮する化合物、パーシャルアゴニストは部分強度の活性を示す化合物、アンタゴニストはアゴニストの活性は示さず、アゴニストと受容体との結合を阻害しその活性を抑制する化合物と定義されている。パーシャルアゴニストはフルアゴニストに比べ部分的な活性を示すため、フルアゴニストの受容体への結合と競合し、その活性を抑制するため、パーシャルアンタゴニスト活性を示す。

核内受容体の機能は LBD にリガンドが結合することで制御されることから、核内受容体構造のうち LBD を標的とした創薬研究が精力的に行われてきた。その結果、多くの核内受容体リガンドが様々な疾患に対する治療薬として今日用いられるに至って

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1)

現所属: [†]静岡県立大学薬学部 (〒422-8526 静岡県駿河区谷田 52-1), ^{††}東京大学創薬機構構造展開ユニット (〒113-0032 東京都文京区本郷 7-3-1 薬学部本館)

*e-mail: miyachi_hiroyuki@mol.f.u-tokyo.ac.jp

いる。

2. ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) は 1990 年代初頭の発見当初、血糖や脂質の恒常性制御遺伝子(群)の転写制御因子として見い出された。これまで脂質異常症や 2 型糖尿病を始めとするメタボリックシンドロームの創薬標的として PPAR は注目を集めてきた。⁴⁻⁶⁾ PPAR は PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ の 3 サブタイプが同定されている。PPAR サブタイプ間の LBD の三次元構造は非常に類似しておりそのアミノ酸配列の相同性も 60-70% と高い。PPAR の内因性リガンドとしては長鎖不飽和脂肪酸、エイコサノイドなどが知られている。PPAR はレチノイド X 受容体とヘテロダイマーを形成し、アゴニストが結合すると標的遺伝子のプロモーター上に存在する PPAR 応答配列に結合し標的遺伝子の転写を制御している。

PPAR 各サブタイプは特徴的組織分布を示す。PPAR α は主に肝臓や腎臓、心臓等で高発現しており、PPAR δ は全身に遍在的に発現し、PPAR γ は脂肪組織やマクロファージに高発現している。⁷⁾

PPAR γ は 3 サブタイプの中で最も生理的機能の解明が進んだサブタイプである。PPAR γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、活性化により間葉系幹細胞から小型脂肪細胞への分化を促進させる。⁸⁾ さらにトリグリセライドの蓄積により肥大化した大型脂肪細胞のアポトーシスを誘導することでインスリン感受性を改善すると考えられている。脂肪細胞分化がインスリン抵抗性を改善する機構については、PPAR γ が活性化されることでインスリン抵抗性を惹起させる腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) などの悪玉アディポカインを分泌する大型脂肪細胞がアポトーシスを起こして減少し、一方インスリン感受性を亢進させるレプチンやアディポネクチンなどの善玉アディポカインを分泌する小型脂肪細胞産生が更新するためにインスリン感受性が改善されると考えられている。またアディポネクチンは PPAR γ の標的遺伝子であるため PPAR γ の活性化によりその発現レベルが上昇する。さらに、マクロファージ内において PPAR γ は TNF- α などの炎症性サイトカインの発現を抑制していることもインスリン感受性の改善につながって

いると示唆されている。⁹⁾ PPAR γ の活性化作用に基づき、ピオグリタゾン (1) のようなチアゾリジンジオン (thiazolidine-2,4-dione; TZD) 系 PPAR γ 選択的フルアゴニストが 2 型糖尿病治療薬として臨床で用いられてきた。しかしながら、TZD は優れた血糖降下作用を示す一方で、PPAR γ の過剰な転写活性化に起因した体重増加や浮腫、鬱血性心不全、骨量減少などの副作用発現が臨床上的の問題となっていた。¹⁰⁾ 安全性に関する懸念を克服する観点からこれまで様々な PPAR γ 選択的フルアゴニスト、各種 PPAR デュアルアゴニスト、PPAR パンアゴニストが創製されてきた。しかし臨床試験の報告からは、2 型糖尿病に対する治療効果は大きいものの、当初目的であった安全性の高い 2 型糖尿病治療薬にはなり得ていないと判断されている。明治薬科大学名誉教授、本島博士は、2015 年の本誌に総説“ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) 研究の四半世紀—その盛衰の背景と教訓”を寄稿された。その総説の中で、“こうした薬物 (PPAR フルアゴニスト) の分子設計を論理的に進められるほどには、転写制御の分子機構はわかっていない。それはこの制御系が、特異性を担う分子が 1 つではなく、曖昧な特異性を持つ複数の分子の集合が高い特異性を発揮する系であるからだろう”と述べられている。¹¹⁾ 核内受容体リガンド創製を目指す創薬化学研究者の肝に銘ずべき教訓であると考ええる。

PPAR アゴニストの創製研究が行き詰まる中、Choi らは、PPAR γ アゴニストが示すインスリン抵抗性改善作用は、転写因子としての PPAR γ アゴニスト活性に基づくものではなく、肥満に伴って活性化される cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) による PPAR γ LBD 中のセリン 273 のリン酸化の阻害能に依存する作用であることを報告した。¹²⁾ これは PPAR γ アゴニストが示すインスリン感受性改善作用と転写因子としての PPAR γ アゴニスト活性を分離できる可能性を示唆する極めて重要な報告であった。Choi らは、高脂肪食負荷マウスの脂肪組織では CDK5 が活性化されており、それが PPAR γ セリン 273 のリン酸化を促進させること、このリン酸化は脂肪細胞分化に係わる PPAR γ 標的遺伝子セットには影響を与えないものの、それ以外の、アディポネクチンを含むインスリン感受性改善に係わる PPAR γ 標的遺伝子セットの転写を抑制することを

Fig. 1. Structures of PPAR γ Ligands

Full agonist pioglitazone (1), PPAR γ antagonist GW9662 (2), T0070907 (3) and PD068235 (4), PPAR γ partial agonist (R)-5 and 6.

実証した.¹³⁾ この報告を踏まえれば、PPAR γ に結合はするが転写因子としての PPAR γ アゴニスト活性を示さない化合物、すなわち PPAR γ アンタゴニストでも CDK5 による PPAR γ リン酸化を阻害することが可能であり、インスリン感受性改善作用を示す可能性を想起させる。実際 Choi らは CDK5 による PPAR γ のリン酸化阻害能を有する PPAR γ 選択的アンタゴニスト SR1664 が、2 型糖尿病モデルマウスに対して体重増加や浮腫をきたすことなく、強いインスリン感受性改善作用を示すことを報告している。この報告を機に、新たな 2 型糖尿病治療薬候補として、PPAR γ 選択的リガンドの中でこれまでほとんど創製研究が行われてこなかった PPAR γ 選択的アンタゴニストが注目されるに至っている。

しかしながら、これまで PPAR γ 選択的アンタゴニストの創製研究はほとんど展開されてこなかったため、その創製法には課題があると筆者は考えている。具体的にはこれまで構造機能相関研究がほとんど行われて来なかったため、どのような構造要件が PPAR γ アンタゴニスト活性発現に重要か、PPAR γ アンタゴニストを創製するための化合物設計指針が乏しい。そのため新規構造を有する PPAR γ アンタゴニストを同定するためには既に報告されている PPAR γ アンタゴニスト同様、膨大の数からなる化合物群のランダムスクリーニングに依存せざるを得ないのが実情である [GW9662 (2),¹⁴⁾ T0070907 (3),¹⁵⁾ PD068235 (4) (Fig. 1)].¹⁶⁾ そこで、筆者は効率的に PPAR γ 選択的アンタゴニストを創出するための方法論の提案とその妥当性実証を目的として本研究に着手した。

3. 核内受容体の転写制御機構

PPAR を含め核内受容体の転写活性化機構は、

LBD 中の N 末端部であるヘリックス 12 (helix 12; H12) のフォールディングの構造変化に基づくモデルが提唱されている。¹⁷⁾ アゴニスト非結合時 (又はアンタゴニスト結合時) では H12 の三次元構造は熱力学的に不安定で、様々なフォールディング様式を形成し得るものの、結果的に転写促進因子であるコアクチベーター (co-activator; CoA) よりも転写抑制因子であるコリプレッサー (co-repressor; CoR) の核内受容体認識モチーフが結合し易い LBD 表面構造を形成する。このため核内受容体-CoR 複合体形成が核内受容体-CoA 複合体形成よりも優位となる。したがってアゴニスト非結合時 (又はアンタゴニスト結合時) では核内受容体は転写抑制状態にある。一方、LBD にアゴニストが結合することにより H12 は活性型構造にリフォールディングされ、CoR よりも CoA の核内受容体認識モチーフが結合し易い LBD 表面構造を形成する。このダイナミックな構造変化に伴い、LBD から CoR が解離し、改めて LBD が CoA と複合体を形成することを契機に核内受容体は転写活性化される。

核内受容体アンタゴニストは、核内受容体-CoR 複合体構造の安定化に影響を与えないタイプ (type I アンタゴニスト) の化合物と、核内受容体-CoR 複合体構造を積極的に安定化させるタイプ (type II アンタゴニスト) の化合物の 2 タイプに大別される (Fig. 2)。この機能の違いはアンタゴニストにより誘導される H12 のフォールディングの仕方と構造に依存すると考えられている。近年、type I アンタゴニストは定常状態の核内受容体転写活性には影響を与えないためにニュートラルアンタゴニストと定義され、type II アンタゴニストは定常状態の核内受容体転写活性を抑制するためにインバースアゴニ

Fig. 2. Schematic Representation of Ligand-dependent PPAR γ Activation/Inhibition

ストと定義されるようになっていく。

筆者は、PPAR をモデル核内受容体にして、PPARLBD と、筆者の創製したリガンドとの複合体 X 線結晶構造情報を踏まえた、PPAR α サブタイプ及び PPAR δ サブタイプ選択的 PPAR フルアゴニストや PPAR パーシャルアゴニストの創製に成功してきた。¹⁸⁻²⁰⁾ これらの知見を応用することにより PPAR γ type II アンタゴニストとしての活性を示す化合物を合理的に創製することに成功した。²¹⁾ 本総説ではその経緯を紹介したい。

4. H12 の適切なフォールディング阻害に基づく PPAR γ 選択的アンタゴニストの創製

核内受容体は、LBD にアゴニスト非結合時（又はアンタゴニスト結合時）では、nuclear receptor co-repressor (NCoR) や silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptor (SMRT) などの CoR と複合体を形成し標的遺伝子の転写は抑制状態にある。一方で核内受容体にアゴニストが結合すると LBD の部分構造である H12 が結合ポケットに蓋をするように適切にフォールディングされる。その結果、LBD に結合していた CoR が解離し vitamin D-interacting protein 205 (DRIP205) などの CoA が LBD に新たに結合して核内受容体-CoA 複合体を形成し、標的遺伝子の転写が開始（活性化）される。そこで筆者は、H12 の適切な活性型フォールディングを阻害するアンタゴニスト創製のための化合物設計指針として PPAR γ アゴニストから PPAR γ アンタゴニストへの機能転換を図った。具体的には PPAR γ アゴニスト構造中の、H12 のフォールディングに重要な部分構造を、フォール

ディングを阻害する構造に変換する分子設計を展開した。

筆者は、フェニルプロピオン酸型 PPAR γ 選択的パーシャルアゴニスト (R)-**5** が、構造中の α -ベンジルフェニルプロピオン酸構造が PPAR γ LBD の H12 周辺のアミノ酸残基であるセリン 289、ヒスチジン 323、チロシン 327、チロシン 473 と水素結合を形成して結合していることを、X 線結晶構造解析より明らかにした [Fig. 3(A)].²²⁾ アゴニストと H12 上のチロシン 473 との水素結合形成が PPAR γ H12 の適切なフォールディング、そしてアゴニスト活性発現のキーポイントであることから、²³⁾ 筆者は H12 上のチロシン 473 との水素結合形成を回避する構造転換を検討した。すなわち、(R)-**5** の α -ベンジルフェニルプロピオン酸構造を、bent 構造を形成すると想起されるフェニルアシルスルホンアミド構造に変換した **6** をデザインし合成した。活性評価の結果は予期に反し、**6** ($EC_{50}=1.5\pm0.36\mu M$, $E_{max}=49\pm4.7\%$) は (R)-**5** よりも固有活性 (E_{max}) は抑えられたものの、依然アゴニスト活性を保持するパーシャルアゴニストであった。なぜ **6** がアンタゴニスト活性を示さなかったのか、その理由について詳細に解析するために **6** と PPAR γ LBD との複合体 X 線結晶構造解析を行った [Fig. 3(C)]. その結果、推測通り **6** のフェニルアシルスルホンアミド構造は bent 配座をとり PPAR γ H12 上のチロシン 473 とは全く相互作用していなかったものの、**6** の結合した PPAR γ H12 は、(R)-**5**/PPAR γ LBD 複合体同様適切に折りたたまれていて活性コンフォメーションを形成していることが確認された [Fig. 3(B)]. **6** がチロシン 473 と水素結合を形成していないことが、**6** の固有活性が低下した要因と考えられるが、水素結合形成回避という戦略のみでは PPAR γ H12 の適切な折りたたみを完全には阻害できないことが明らかとなった。

これらのことを踏まえ、筆者は PPAR γ H12 の適切な折りたたみを阻害するアンタゴニスト (H12-フォールディング阻害型 PPAR γ アンタゴニスト) は PPAR γ H12 上のチロシン 473 と水素結合を形成しないだけでなく、H12 を外側に押し出す構造を有する必要があると想起した。その H12-フォールディング阻害型 PPAR γ アンタゴニストのデザインコンセプトを Fig. 3 (D) に示した。ポイ

Fig. 3. Molecular Design Strategy for PPAR γ Antagonist

(A) An overview of the crystal structure of PPAR γ ligand binding domain complexed with (*R*)-5 (PDB code: 3VSO). (B) The superimposed structure of these PPAR γ LBD. (C) An overview of the crystal structure of hPPAR γ ligand binding domain complexed with 6 (PDB code: 3WMH). (D) Schematic representation of the molecular design concept of the present studies to create PPAR γ antagonist.

ントは、

1) PPAR γ H12 上のチロシン 473 との水素結合形成を回避するための (*R*)-5 構造中のカルボキシ基を除去。

2) (*R*)-5 構造中のフェニルプロピル構造を PPAR γ H12 を外側に押し出すための、より剛直かつ嵩高い構造への変換である。

5. デザイン化合物の合成

アミド誘導体、逆アミド誘導体の合成ルートを Chart 1 に示した。アミド誘導体については、出発原料として 2-プロポキシベンズアルデヒド (7) を選択し 5 工程で合成した。7 をヒドロキシルアミンと反応させオキシム化した後、接触還元によりベンジルアミン塩酸塩 8 を 2 工程、89% の収率で得た。8 を 4-(ピリミジン-2-イル) 安息香酸とジエチルホスホニシアニデートを縮合剤として用いて縮合し 9 を 64% の収率で得た。無水四塩化チタンとジクロロメチルメチルエーテルを用いた位置選択的ホルミル化 (10) の後、pinnick 酸化²⁴⁾によりホルミル基をカルボキシ基へと酸化し共通中間体 11 を 2 工程、64% の収率で得た。化合物 11 と各種アミンを、縮合剤として 1-[ビス (ジメチルアミノ) メチレン]-

1*H*-1,2,3-トリアゾロ [4,5-*b*]ピリミジニウム-3-オキソヘキサフルオロフォスフェートを用いて縮合し所望のアミド誘導体 12a-c を 25–50% の収率で得た。

逆アミド誘導体については、出発原料として 5-ニトロサリチルアルデヒド (13) を選択し 5 工程で合成した。13 のフェノール性水酸基を無水炭酸カリウム存在下、*n*-ヨードプロパンと反応させプロピル化し 14 を 80% の収率で得た。14 と *t*-ブチルカルバメートとの還元的アミドアルキル化反応²⁵⁾を行い、4 mol/L 塩酸-酢酸エチル溶液中でブトキシカルボニル基を脱保護しベンジルアミン塩酸塩 15 を 2 工程、90% の収率で得た。15 と 4-(ピリミジン-2-イル) 安息香酸を縮合剤として 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩を用いて縮合し 16 を 88% の収率で得た。接触還元によりニトロ基を還元し共通中間体 17 を 98% の収率で得た。17 と各種カルボン酸誘導体とを縮合し、逆アミド誘導体 18a-v を 25–44% の収率で得た。

6. 合成した化合物群の PPAR γ 転写 (抑制) 活性

レポータージーンアッセイにて測定した PPAR γ 転写 (抑制) 活性を Fig. 4 (A) に示した。EC₅₀ 値は化合物の最大転写活性の 50% のアゴニスト活性

Chart 1. Synthesis of Amide Derivatives **12a-c**/Reversed Amide Derivatives **18a-v**

a) 1) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, pyridine, EtOH, reflux, 12 h. 2) H_2 , 10% Pd/C, c.HCl, EtOH, r.t., 2.5 h, 89% (2 steps). b) 4-(pyrimidine-2-yl) benzoic acid, DEPC, TEA, dry DMF, r.t., overnight, 64%. c) TiCl_4 , $\text{CH}_3\text{OCHCl}_2$, dry DCM, 0°C . to r.t., overnight, 71%. d) NaClO_2 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2-methyl-2-butene, *t*-BuOH/THF/ H_2O , r.t., overnight, 90%. e) amines, HATU, DIEA, dry DMF, r.t., overnight, 25–50%. f) 1) *n*-PrI, K_2CO_3 , DMF, 80°C , 24 h, 80%. g) 1) *t*-BuOCONH₂, TFA, Et_3SiH , MeCN, r.t., 24 h. 2) 4 mol/L HCl in AcOEt, r.t., 3 h, 90% (2 steps). h) 4-(pyrimidine-2-yl) benzoic acid, DEPC, TEA, dry DMF, r.t., overnight, 88%. i) H_2 , 10% Pd/C, MeOH/AcOEt, r.t., 3 h, 98%. j) carboxylic acids, HATU, DIEA, DMF, r.t., overnight, 25–44%.

を示す濃度であり、 E_{max} は、 $30 \mu\text{M}$ の化合物 **1** が示すアゴニスト活性を 100%としたときの相対強度を示す。IC₅₀値は $30 \mu\text{M}$ の化合物 **1** が示すアゴニスト活性を 50%低下させるのに要する化合物濃度である。

推測通り、 α -ベンジルプロピオン酸構造を変換した初期化合物 (**12a-c**, **18a-c**) では PPAR γ アゴニスト活性のポテンシーは減弱傾向が認められた。多分にカルボキシ基の除去の影響と判断された。**12b** や **18a** は (*R*)-**5** と比較して、より低いエフィカシー (E_{max}) を示す PPAR γ パーシャルアゴニストであることが確認された。興味深いことに、アミド誘導体及び逆アミド誘導体ともにエフィカシー (E_{max}) がフェニル体 (**12a**, **18a**) < ベンジル体 (**12b**, **18b**) < フェネチル体 (**12c**, **18c**) の順に増加した。このことより、ベンジル基やフェネチル基のような単結合を有する置換基は、構造の柔軟性が高く、効果的に H12 を外側に押し出すことができない、すなわち H12 の適切なフォールディング阻害には適さない置換基構造と判断した。

最も低い E_{max} を示し強いパーシャルアゴニスト活性を示した **18a** を次なるリード化合物として選択した。末端構造に着目し、**18a** の末端ベンゼン環をその剛直性を保持しつつより嵩高い構造に変換した

18d-i を合成した。PPAR γ 転写活性化試験の結果、4-エチルフェニル基 (**18d**)、1-ナフチル基 (**18e**)、2-ナフチル基 (**18f**)、そして 4-ビフェニル基 (**18g**) の導入により **18a** よりも E_{max} の減弱傾向が確認された。2-ナフチル体 (**18f**)、4-ビフェニル体 (**18g**) には PPAR γ アンタゴニスト活性が確認された。スチリル基 (**18h**) の導入では、PPAR γ アゴニスト活性が完全消失し、一方で PPAR γ アンタゴニスト活性は向上した。これらの誘導体の中ではフェニルエチニル体 (**18i**) が最も強力な PPAR γ アンタゴニスト活性を示すことが確認された。これら一連の結果は、PPAR γ アンタゴニスト活性発現、すなわち PPAR γ H12 の適切な折りたたみの阻害には末端構造の剛直性と嵩高さの双方が重要であることを再度想起させる。

18i が強力な PPAR γ アンタゴニスト活性を示すことは確認できた。しかし一方で、10%程度の PPAR γ アゴニスト活性を内在していたことから、PPAR γ H12 の適切な折りたたみは完全には阻害できてはいないのではないかと推察された。そこで **18i** のアゴニスト活性の完全消失を目指し、**18i** の末端ベンゼン環の構造修飾をさらに実行し、末端ベンゼン環修飾体 **18j-v** を合成し PPAR γ アンタゴニスト活性を評価した。

Fig. 4. *In Vitro* Activities of a Series of Amide and Reversed Amide Derivatives

(A) PPAR γ transactivation/repression activities of amide and reversed amide derivatives. All values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of at least two independent experiments performed in triplicate. EC₅₀ is the concentration giving 50% of the maximal activity observed for a given compound. E_{max} is given as a relative value compared to the maximal activity of **1**. IC₅₀ is the concentration of test compound that affords a 50% decrease in the maximal activity of **1** (30 μ M). ND means not determined. NA means no activity at 10 μ M. NT means not tested. (B), (C) Dose-response relationship of both agonistic and antagonistic activities of **18i** and **18p**. The relative transrepression activity (%) is based on the luciferase activity of 30 μ M **1**, taken as 100%. Data are the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate.

メチル基, メトキシ基, トリフルオロメチル基, ハロゲン原子等様々な置換基を末端ベンゼン環上に導入した結果, 概して **18i** に比べ PPAR γ アンタゴニスト活性は減弱傾向を示したが, 末端ベンゼン環の2位への置換基導入により PPAR γ アゴニスト活性が消失する傾向が認められた. 例えば, 3-メチル誘導体 (**18k**) や 4-メチル誘導体 (**18l**) では **18i** 同様, 非常に弱いながら PPAR γ アゴニスト活性は保持されていた. 一方, 2-メチル誘導体 (**18j**) では PPAR γ アゴニスト活性は完全に消失していた. 興味深いことに, 2-クロロ基 (**18p**) や 2-ブロモ基 (**18q**) を導入した化合物においても PPAR γ アゴニスト活性は完全に消失した. その一方で, **1** (30 μ M) により引き起こされる PPAR γ アゴニスト活性をそれぞれ IC₅₀ 値 0.28 $\pm$ 0.053 μ M, 0.41 $\pm$ 0.085 μ M の強さで完全に阻害するアンタゴニスト活性が

確認された. 2位という置換位置が非常に重要であり, 3-クロロ基誘導体 (**18r**) は **18p** と同じアンタゴニストプロファイルは示さなかった. 他の環状置換基, 例えばシクロペンチル基 (**18s**), 2-チエニル基 (**18t**), 1-ナフチル基 (**18u**), 2-ナフチル基 (**18v**) も非常に弱いながら PPAR γ アゴニスト活性を完全消失させることはできず, PPAR γ アンタゴニスト活性に関しても **18i** に比べて弱い活性であった. これらの結果から, ハロゲン原子の適切な嵩高さとその導入位置が PPAR γ フルアンタゴニスト特性を示すために重要であることが明らかとなった.

Figures 4 (B), (C) には **18i** 及び **18p** の PPAR γ 転写活性化作用の用量反応曲線を示した. **18i** は強力な PPAR γ アンタゴニスト活性を示す一方で, 極めて微弱ながらも PPAR γ アゴニスト活性を内在していることが用量作用関係から示唆された. これに

Fig. 5. Functional Analysis of PPAR γ Ligands with Mammalian Two-hybrid Assay

Data are presented as fold induction, relative to the DMSO control. **1** was used at 30 μ M, and **18i**, **18j** and **18p** were used at 10 μ M. All data points represent averages of triplicates ($\pm$ S.D.). The data represent one representative experiment from at least two independent replicates, each performed in triplicate. (A) PPAR γ -DRIP205 two-hybrid assay with TK-MH100x4-LUC was performed in COS-1 cells. (B) PPAR γ -NcoR two-hybrid assay with TK-MH100x4-LUC was performed in COS-1 cells. (C) Functional analysis of PPAR γ ligands with full-length PPAR γ 1 reporter gene assay. Data are presented as fold induction, relative to the DMSO control. **1** was used at 30 μ M, and both **18i** and **18p** were used at 10 μ M. All data points represent averages of triplicates ($\pm$ S.D.). The data represent one representative experiment from at least two independent replicates. (D) Effect of **18p** on **1**-induced adipogenesis of 3T3-L1 cells. After pretreatment with **1** (1 μ M) and 5 mg/mL insulin, 3T3-L1 cells were incubated with the indicated concentrations of **18p**. Oil red O-stained cells are quantified at the bottom in terms of OD₄₉₀. Data are presented as fold induction, relative to the DMSO control. All data points represent averages of triplicates ($\pm$ S.D.).

対し, **18p** は **18i** とは異なり, PPAR γ アゴニスト活性を全く示さず, **1** (30 μ M) により引き起こされる PPAR γ アゴニスト活性を完全に消失させる, 切れ味の鋭い PPAR γ フルアンタゴニスト活性を示していた。

以上, 筆者は H12 の適切なフォールディング阻害に基づく合理的構造変換により, 既存 PPAR γ 選択的パーシャルアゴニスト (**R**)-**5** から新規 PPAR γ フルアンタゴニスト **18p** の創製に至った (**18p** の PPAR α 及び PPAR δ に対するアンタゴニスト活性はそれらの IC₅₀ から判断して PPAR γ アンタゴニスト活性よりもそれぞれ約 20 倍, 約 10 倍程度弱いことを確認している)。

7. リガンド誘発 PPAR γ H12 フォールディングの相違と PPAR γ アンタゴニストプロファイルの関連

18j や **18p** 等 **18i** の末端ベンゼン環 2 位に置換基を有する化合物はなぜ PPAR γ アゴニスト活性が完全に消失し, 強い PPAR γ アンタゴニスト活性を示したのであろうか, そのメカニズムの詳細は不明で

ある (**18p** と PPAR γ LBD との複合体 X 線結晶構造解析を実施中である)。推論の域を出ないが, **18j** や **18p** が **18i** とは異なり PPAR γ H12 の適切な折りたたみを完全に阻害するのであれば, **18i** と, **18j** や **18p** により誘導される H12 のリクルート位置は微妙に異なるのではないかと推測した。そしてそのリクルート位置の違いは, 転写活性化や転写抑制化に関与する各種コファクターのリクルート活性 (PPAR γ /コファクター複合体の安定化能) の違いを反映していると推測した。実際, H12 のリクルート位置の違いが PPAR を始め各種核内受容体への CoA や CoR のリクルートに大きな影響を与えることが報告されている。そこで筆者の仮説を検証する目的の一環として, mammalian two-hybrid 法により PPAR γ フルアゴニストである **1**, 今回創製した PPAR γ アンタゴニスト **18i**, **18j**, **18p** の PPAR γ に対するコファクターリクルート活性 (PPAR γ /コファクター複合体安定化能) を比較検討した [Figs. 5(A) and (B)]。

PPAR γ フルアゴニストである **1** は H12 の完全か

つ適切な折りたたみを誘導するため、PPAR γ とCoAであるDRIP205間の相互作用を増強させた。一方、3つのPPAR γ アンタゴニスト (**18i**, **18j**, **18p**)はすべて、PPAR γ とCoA相互作用に影響を与えないか、やや相互作用を減弱させた [Fig. 5 (A)]。したがってこれらPPAR γ アンタゴニストはすべてデザインコンセプトに叶う、フルアゴニスト活性発現に必要な、PPAR γ H12の適切な折りたたみを阻害するアンタゴニストであることが示唆された。

また、CoRであるNCoRとの相互作用に関しては、PPAR γ フルアゴニストである**1**はその相互作用を減弱させた。一方**18i**, **18j**, **18p**では、その相互作用様式に相違が認められた。すなわち、**18i**は**1**には及ばないもののPPAR γ とCoR間の相互作用を減弱させたのに対し、**18j**, 特に**18p**ではPPAR γ とCoR間の相互作用を増強させることが明らかになった。特に**18p**で顕著であった。したがって、PPAR γ とCoR間との相互作用に与える効果は**18i**と、**18j**や**18p**間では明確に様相が異なることが判明した。このプロファイルの差は、**18i**と、**18j**や**18p**により誘導されるPPAR γ H12のリクルート位置が微妙に異なる (又はH12のフォールディングに与える影響が異なる) ことを反映するものであると推定している。その実証に向け、更なる研究を展開しているが、筆者は今回創製した**18i**はコファクターリクルート特性から推測するに、²⁶⁾ type I アンタゴニスト、一方**18p**はtype II アンタゴニストに分類される化合物であると考えている。

1. で述べたように、type II アンタゴニストに分類される化合物は定常状態の核内受容体の活性化を抑制するインバースアゴニストとしての特性を示すことが報告されている。²⁷⁻²⁹⁾ そこで、**18i**と**18p**の機能をさらに特徴づけるために、全長PPAR γ 1を用いたレポータージーンアッセイによりインバースアゴニスト活性の有無を解析した [Fig. 5 (C)]。PPAR γ フルアゴニストである**1**は全長PPAR γ 1を30 μ Mの濃度において著しく活性化した。**18i**では10 μ Mの濃度においても全長PPAR γ 1活性に影響を与えることはなかった。これに対し、**18p**は全長PPAR γ 1の活性を10 μ Mの濃度において抑制した。これらの結果は、**18p**はPPAR γ インバースアゴニスト活性を有することを示唆し、**18p**がtype

II アンタゴニストに分類される化合物であるとの筆者の推測を支持するものである。

8. アゴニスト誘導性脂肪細胞分化抑制活性評価

PPAR γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、PPAR γ アゴニストはPPAR γ の活性化を介して様々な前駆脂肪細胞や幹細胞から成熟脂肪細胞への分化を促進する。したがって、生理条件下においてPPAR γ アンタゴニストはPPAR γ アゴニストによる成熟脂肪細胞への分化を抑制するよう機能する。そこで、**18p**が生理条件下でPPAR γ アンタゴニストとして機能するか明らかにするために、PPAR γ フルアゴニストである**1**によって誘発されるマウス前駆脂肪細胞の成熟脂肪細胞分化に対する**18p**の抑制効果を検討した [Fig. 5 (D)]。成熟脂肪細胞への分化度は細胞内のトリグリセリドをoil red Oで染色し、490 nmにおける吸光度を測定することで定量化した。**1**は1 μ Mの濃度でマウス前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞に分化させたことが、脂肪滴増加により観察された。一方で**18p**は、**1**による成熟脂肪細胞への分化を用量依存的に抑制し ($IC_{50}=0.68 \mu$ M)、10 μ Mにおいては分化を完全に抑制することが判明した。以上の結果から、**18p**は細胞レベルにおいてもPPAR γ フルアンタゴニストとして機能することが明らかとなった。

9. おわりに

筆者は核内受容体LBDの三次元構造に立脚し考案した概念、具体的には核内受容体リガンドスーパーファミリー概念や核内受容体のH12の適切な折りたたみを阻害する化合物はアンタゴニストになるという概念に基づくPPAR γ 選択的リガンド (アゴニスト、パーシャルアゴニスト、アンタゴニスト) の網羅的創製研究を展開してきた。特にPPAR γ 選択的リガンドの中で未充足なPPAR γ 選択的アンタゴニストを創製するための方法論の提案と妥当性の実証研究を展開した。H12のフォールディングに着目したりガンド創製戦略は、PPAR γ 選択的アゴニストからPPAR γ 選択的アンタゴニストを創出するための有用なアプローチであるのみならず、他の核内受容体リガンドの創製研究に応用されることで、新たな医薬候補物質の創出や核内受容体の機能全容解明につながることを期待する。

謝辞 本研究の遂行にあたり、ご協力やご助言

等を賜りました岡山大学医学部 和田 淳教授並びに日本大学医学部 榎島 誠教授に感謝申し上げます。本研究は科学研究費補助金、創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム）、上原記念生命科学財団の助成により行われたものであり、ここに深謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R. M., *Cell*, **83**, 835–839 (1995).
- Escriva H., Delaunay F., Laudet V., *Bioessays*, **22**, 717–727 (2000).
- Robinson-Rechavi M., Escriva Garcia H., Laudet V., *J. Cell Sci.*, **116**, 585–586 (2003).
- Mandard S., Müller M., Kersten S., *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 393–416 (2004).
- Chen W., Wang L. L., Liu H. Y., Long L., Li S., *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **103**, 240–246 (2008).
- Okuno A., Tamemoto H., Tobe K., Ueki K., Mori Y., Iwamoto K., Umesono K., Akanuma Y., Fujiwara T., Horikoshi H., Yazaki Y., Kadowaki T., *J. Clin. Invest.*, **101**, 1354–1361 (1998).
- Braissant O., Fougelle F., Scotto C., Dauça M., Wahli W., *Endocrinology*, **137**, 354–366 (1996).
- Rosen E. D., Hsu C. H., Wang X., Sakai S., Freeman M. W., Gonzalez F. J., Spiegelman B. M., *Genes Dev.*, **16**, 22–26 (2002).
- Maeda N., Takahashi M., Funahashi T., Kihara S., Nishizawa H., Kishida K., Nagaretani H., Matsuda M., Komuro R., Ouchi N., Kuriyama H., Hotta K., Nakamura T., Shimomura I., Matsuzawa, Y., *Diabetes*, **50**, 2094–2099 (2001).
- Rubenstrunk A., Hanf R., Hum D. W., Fruchart J. C., Staels B., *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 1065–1081 (2007).
- Motojima K., *Yakugaku Zasshi*, **135**, 1083–1089 (2015).
- Choi J. H., Banks A. S., Estall J. L., Kajimura S., Boström P., Laznik D., Ruas J. L., Chalmers M. J., Kamenecka T. M., Blüher M., Griffin P. R., Spiegelman B. M., *Nature* (London), **466**, 451–456 (2010).
- Choi J. H., Banks A. S., Kamenecka T. M., Busby S. A., Chalmers M. J., Kumar N., Kuruvilla D. S., Shin Y., He Y., Bruning J. B., Marciano D. P., Cameron M. D., Laznik D., Jurczak M. J., Schürer S. C., Vidović D., Shulman G. I., Spiegelman B. M., Griffin P. R., *Nature* (London), **477**, 477–481 (2011).
- Leesnitzer L. M., Parks D. J., Bledsoe R. K., Cobb J. E., Collins J. L., Consler T. G., Davis R. G., Hull-Ryde E. A., Lenhard J. M., Patel L., Plunket K. D., Shenk J. L., Stimmel J. B., Therapontos C., Willson T. M., Blanchard S. G., *Biochemistry*, **41**, 6640–6650 (2002).
- Lee G., Elwood F., McNally J., Weiszmann J., Lindstrom M., Amaral K., Nakamura M., Miao S., Cao P., Learned R. M., Chen J. L., Li Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 19649–19657 (2002).
- Camp H. S., Chaudhry A., Leff T., *Endocrinology*, **142**, 3207–3213 (2001).
- Kojetin D. J., Burris T. P., *Mol. Pharmacol.*, **83**, 1–8 (2013).
- Ohashi M., Oyama T., Putranto E. W., Waku T., Nobusada H., Kataoka K., Matsuno K., Yashiro M., Morikawa K., Huh N. H., Miyachi H., *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 2319–2332 (2013).
- Ohashi M., Nakagome I., Kasuga J., Nobusada H., Matsuno K., Makishima M., Hirono S., Hashimoto Y., Miyachi H., *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 6375–6383 (2012).
- Ban S., Oyama T., Kasuga J., Ohgane K., Nishio Y., Morikawa K., Hashimoto Y., Miyachi H., *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 3460–3464 (2012).
- Ohashi M., Gamo K., Tanaka Y., Waki M., Beniyama Y., Matsuno K., Wada J., Tenta M., Eguchi J., Makishima M., Matsuura N., Oyama T., Miyachi H., *Eur. J. Med. Chem.*, **27**, 53–67 (2015).
- Oyama T., Toyota K., Waku T., Hirakawa Y., Nagasawa N., Kasuga J., Hashimoto Y., Miyachi H., Morikawa K., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **65**, 786–795 (2009).
- Einstein M., Akiyama T. E., Castriota G. A., Wang C. F., McKeever B., Mosley R. T.,

- Becker J. W., Moller D. E., Meinke P. T., Wood H. B., Berger J. P., *Mol. Pharmacol.*, **73**, 62–74 (2008).
- 24) Kraus G. A., Taschner M. J., *J. Org. Chem.*, **45**, 1175–1176 (1980).
- 25) Dubé D., Scholte A. A., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2295–2298 (1999).
- 26) Higgins L. S., Depaoli A. M., *Am. J. Clin. Nutr.*, **91**, 267S–272S (2010).
- 27) Lee G., Elwood F., McNally J., Weiszmann J., Lindstrom M., Amaral K., Nakamura M., Miao S., Cao P., Learned R. M., Chen J. L., Li Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 19649–19657 (2002).
- 28) Germain P., Gaudon C., Pogenberg V., Sanglier S., Van Dorsselaer A., Royer C. A., Lazar M. A., Bourguet W., Gronemeyer H., *Chem. Biol.*, **16**, 479–489 (2009).
- 29) Griffett K., Solt L. A., El-Gendy Bel-D., Kamenecka T. M., Burris T. P., *ACS Chem. Biol.*, **8**, 559–567 (2013).