

博士論文

副作用低減化を可能にする

レチノイド X 受容体アゴニストに関する研究

平成 25 年 9 月

大澤 史宜

## 目次

目次	1
略語表	4
序論	6
第1章 副作用発現に関与する RXR ヘテロダイマーに着目した研究	10
第1節 NEt-3IP 誘導体の RXR アゴニスト活性評価	10
第2節 低 EC <sub>50</sub> 群の PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 活性化能評価	13
第3節 化合物 <b>7c</b> , <b>7i</b> および <b>7k</b> の PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 活性化能評価	14
第4節 化合物 <b>6</b> , <b>7a</b> および <b>7b</b> の <i>in vivo</i> 薬効評価データの解析	15
第5節 化合物 <b>6</b> , <b>7a</b> および <b>7b</b> の <i>in vivo</i> 副作用発現評価	17
第6節 本章のまとめ	20
第2章 RXR パーシャルアゴニストを利用した副作用の軽減化	21
第1節 背景および RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN ( <b>8</b> ) について	21
第1項 核内受容体パーシャルアゴニストとは	22
第2項 RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN ( <b>8</b> ) の <i>in vitro</i> 活性評価および <i>in vivo</i> 薬効・副作用評価	23
第3項 CBt-PMN ( <b>8</b> ) の RT-PCR 法による遺伝子発現評価	33
第4項 第1節のまとめと問題点	36

第2節	CBt-PMN (8) の RXR パーシャルアゴニスト活性の	
	発現機構の解明	37
第1項	既存の RXR パーシャルアゴニストの構造と活性発現機構	37
第2項	5員環部位に着目してデザインした	
	CBt-PMN (8) 誘導体の RXR アゴニスト活性評価	38
第3項	蛍光偏光法によるコファクター誘導能評価	42
第1目	蛍光偏光法	42
第2目	コファクターリクルートメントアッセイの条件検討	43
第3目	蛍光偏光法による	
	コファクターリクルートメントアッセイ	44
第4項	<i>In vitro</i> における RXR アゴニスト活性と	
	置換基定数による考察	47
第5項	静電場ポテンシャルによる考察	49
第6項	ドッキングシミュレーションによる活性発現の考察	50
第7項	第2節のまとめ	53
第3節	新規 RXR パーシャルアゴニスト <b>9d</b> による薬効・副作用の分離	54
第1項	CBTF-PMN ( <b>9d</b> ) の	
	PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 活性の検討	55
第2項	血中濃度測定	56
第3項	CBTF-PMN ( <b>9d</b> ) の <i>in vivo</i> 薬効評価	57
第4項	CBTF-PMN ( <b>9d</b> ) の <i>in vivo</i> 副作用評価	59
第5項	CBTF-PMN ( <b>9d</b> ) の長期間投与における副作用発現評価	62
第6項	第3節のまとめ	67

総括および展望	68
謝辞	71
実験の部	73
参考文献	80

## 略 語 表

ALP	alkaline Phosphatase
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
BUN	blood urea nitrogen
CRE	creatinine
CoA	co-activator
CoR	co-repressor
$C_{\max}$	maximum concentration
CMC	carboxymethyl cellulose
DNA	deoxyribonucleic acid
EC <sub>50</sub>	half maximal effective concentration
$E_{\max}$	efficacy maximal response
FBS	fetal bovine serum
FXR	farnesoid X receptor
$\gamma$ -GTP	$\gamma$ -glutamyltranspeptidase
HbA1c	hemoglobin A1c
HPLC	high performance liquid chromatography
ICR	the institute for cancer research
LXR	liver X receptor
NR	nuclear receptor

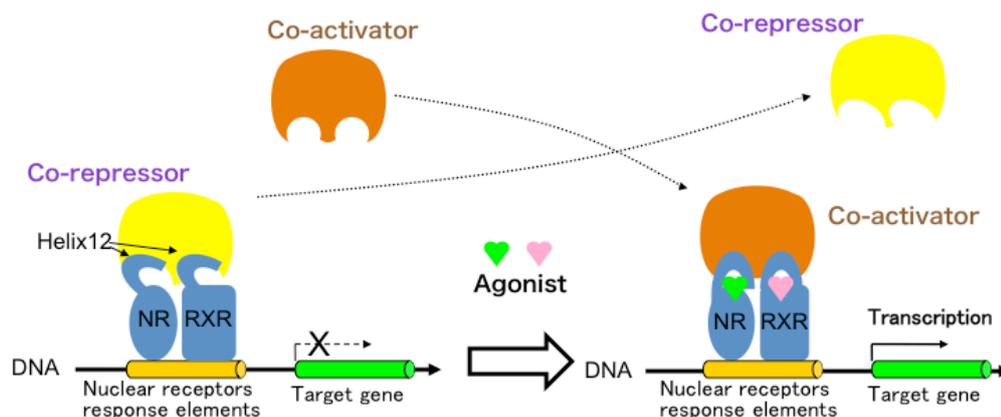
NRE	nuclear receptor response element
OGTT	oral glucose tolerance tests
<i>p.o.</i>	per os
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RAR	retinoic acid receptor
RXR	retinoid X receptor
SD rat	Sprague-Dawley rat
SEAP	secreted alkaline phosphatase
SEM	standard error of the mean
TCHO	total cholesterol
TG	triglyceride

## 序論

1940年代以降、抗菌薬に代表される「選択毒性的創薬」アプローチにより、感染性疾患に対して多くの有効な医薬品が創出された。「選択毒性的創薬」アプローチは、病原体と宿主の毒性への感受性の差異に着目した創薬手法であり、単因子性疾患に対しては、顕著な有効性を発揮する。これに対峙して、がんや糖尿病、アルツハイマー病などの疾患は、精力的に創薬研究が行われ、医薬品の創出はなされているものの、未だ有効な治療法は見出されていないのが現状であり、新規医薬品の創出およびその手法が強く望まれている。がんや糖尿病、アルツハイマー病は遺伝的要因や生活習慣など複数の要因が絡み合い引き起こされる多因子性疾患であり、このような疾患の制圧に対しては、「選択毒性的創薬」アプローチとは異なる創薬アプローチを見いだす必要がある。著者は、本問題の解決には、体内環境を改善すること、すなわち、体内恒常性に大きな影響を及ぼしうる糖・脂質代謝などの総合的な改善が多因子性疾患の治療に有効であると考えた。

著者は、体内環境改善型の創薬アプローチへの挑戦として、多機能性受容体であるレチノイド X 受容体 (RXR) に着目した。RXR は、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を制御する核内受容体の一つであり<sup>1)</sup>、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、および RXR $\gamma$  のサブタイプが存在する。また、RXR はその構造および機能上の特徴から、リガンド非依存的な転写活性化に関与する A/B 領域、DNA との結合に関与する C 領域、ヒンジ領域である D 領域、リガンド依存的な転写活性化やコファクターのリクルートメントに関与する E 領域および C 末に位置する F 領域の 6 つの領域に分けることができる<sup>2)</sup>。

核内受容体の転写活性化に関与している AF-1 (Activation Function-1) および AF-2 (Activation Function-2) はそれぞれ A/B 領域および E 領域に存在し、AF-1 においてはリガンド非依存的に転写活性化を促進させる<sup>2)</sup>。AF-1 を有する A/B 領域に対して、AF-2 を有する E 領域は、12 の  $\alpha$  ヘリックスから構成される LBD (Ligand binding domain) を有しており、リガンド依存的な転写活性化を担っている<sup>2)</sup>。E 領域の LBD にアゴニストが結合すると、RXR の部分構造であるヘリックス 12 が適切に折り畳まれた構造に変化する。その結果、RXR は転写活性化を引き起こすことが可能な holo 型構造をとり、転写抑制因子の解離に伴い転写促進因子が誘導されることで、RXR アゴニスト活性が発現する(Figure 1)<sup>3)</sup>。一方、RXR にアンタゴニストが結合すると、アゴニストと同様に RXR と結合するものの、ヘリックス 12 の適切な折りたたみは起こらないために、転写促進因子の誘導が起こらず、RXR と転写抑制因子との複合体が安定化されるため、RXR を介したリガンド依存的転写活性化は起こらないことが報告されている。



**Figure 1.** DNA transcriptional mechanism via nuclear receptors.

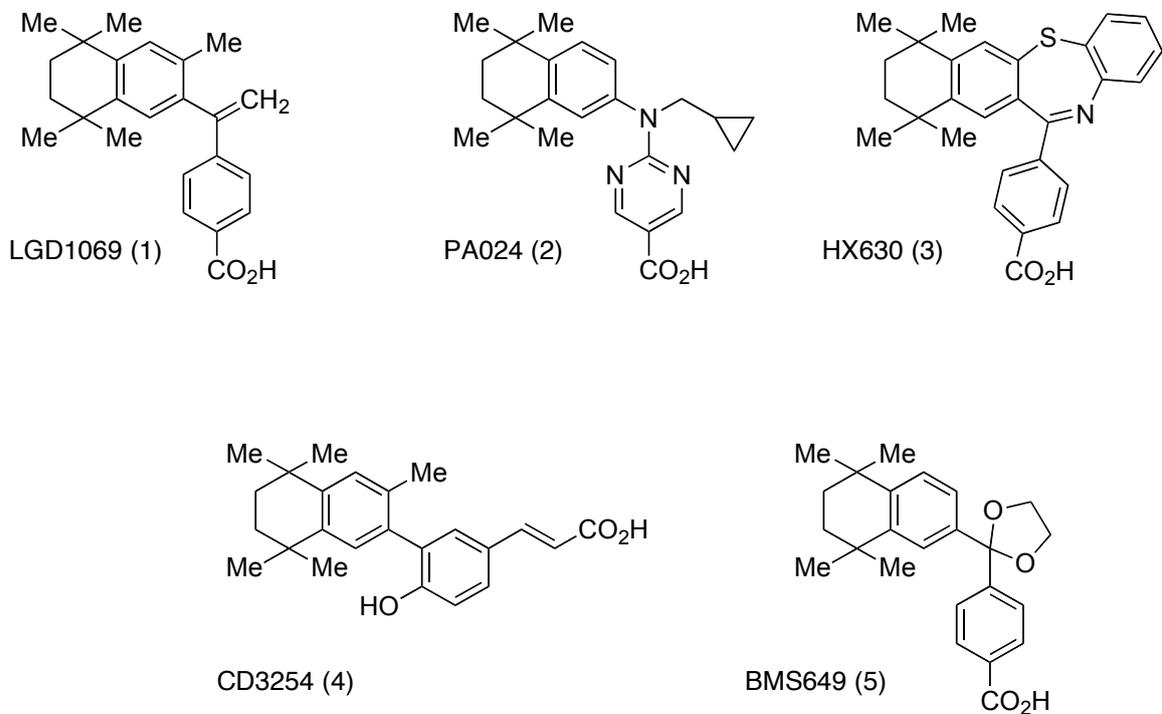
RXR は、自身のホモダイマーもしくは他の核内受容体 (RAR, PPAR, LXR,あるいは、FXR など) とヘテロダイマー(以下、RAR/RXR , PPAR/RXR, LXR/RXR,あるいは、FXR/RXR のように記す)を形成し、様々な機能を発揮する<sup>4,5)</sup>。

特に、RXR のパートナー受容体である PPAR は、そのアゴニストによるインスリン抵抗性改善作用が報告されている<sup>6)</sup>。PPAR には  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  のサブタイプが存在し、PPAR $\alpha$  アゴニストであるベザフィブラートが脂質異常症の治療薬として臨床応用されている。また、PPAR $\gamma$  はインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジンジオン (TZD) 系薬剤の標的分子として知られており、PPAR $\gamma$  アゴニストであるピオグリタゾン<sup>6)</sup>は、2 型糖尿病治療薬として臨床応用されている<sup>6)</sup>。LXR は  $\alpha$  と  $\beta$  のサブタイプが存在しており、糖・脂質代謝を制御している核内受容体であることが報告されている<sup>7-9)</sup>。RXR ヘテロダイマーの中でも、RAR/RXR や PPAR/RXR および LXR/RXR などは、パートナー受容体のアゴニスト存在下で RXR アゴニストの添加により転写活性が増強される(シナジー作用)ことが知られている<sup>10,11)</sup>。更に、PPAR/RXR や LXR/RXR などの特殊なヘテロダイマーについては、パートナー受容体のアゴニストの非存在下においても、RXR アゴニスト単独で活性化が可能である(パーミッシブ機構)ことが報告されている<sup>12,13)</sup>。

以上のことから著者は、RXR アゴニストによりこれら受容体の相加的な活性化を介して体内環境に大きな影響を及ぼす糖や脂質の代謝を制御することにより、体内環境の総合的な調節が可能と考えた。RXR は、糖尿病や脂質異常症に対する創薬標的として研究が行われている<sup>14,15)</sup>。さらに2012年には、RXR アゴニストによる抗アルツハイマー病作用が報告された<sup>16)</sup>。一方で、RXR アゴニストの投与による、甲状腺機能低下や体重増加や血中 TG 値の上昇および肝臓肥大などの副作用発現が問題となってい

る<sup>14,17-19</sup>). そのため, これまでに様々な RXR アゴニストが創出されているものの<sup>20-24</sup>), 現在までに臨床応用されている RXR アゴニストは, bexarotene (LGD1069: **1**) が米国において皮膚浸潤性 T 細胞リンパ腫の治療薬として承認されているのみである (Figure 2)<sup>25</sup>).

これらの背景を基盤とし, 著者は, 薬効を示しつつ既存 RXR アゴニストが有する副作用の軽減を可能とする創薬手法の創出を目的として本研究に着手した.



**Figure 2.** Chemical structures of known RXR agonists.

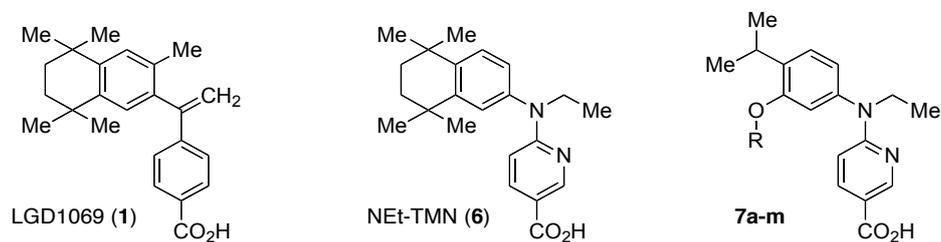
## 第1章 副作用発現に関与する RXR ヘテロダイマーに着目した研究

RXR は、様々な核内受容体とヘテロダイマーを形成し機能することから、体内環境を総合的に調節することが可能である<sup>4,5,11,12</sup>。さらに、RXR アゴニストは単独で、パーミッシブ機構を介して、糖・脂質代謝に関与している PPAR や LXR とのヘテロダイマー (PPAR/RXR および LXR/RXR) を活性化できることから、RXR アゴニストにより、PPAR および LXR の相加的な抗糖尿病作用が期待できる<sup>12,13</sup>。一方で、RXR アゴニスト投与により血中 TG 値上昇等のような副作用発現が問題となっている<sup>19</sup>。著者は、LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  の活性化による血中 TG 値上昇が報告されていること<sup>26</sup>)に着目した。RXR アゴニストの魅力である相加的な薬効を得るために、LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  は活性化させるもののその活性化能を抑制しつつ、PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  活性を保持できる RXR アゴニストであれば、薬効を保持しつつ副作用の軽減化を可能にするものであると仮説を立て、本研究を行った。

### 第1節 NEt-3IP 誘導体の RXR アゴニスト活性評価

前述のように RXR アゴニストは、パーミッシブ機構を介して単独で PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  や LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  を活性化する。そこで著者は、PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  アゴニスト活性を保持しつつ LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  アゴニスト活性を抑制した RXR アゴニストを見出すにあたり、当研究室で創出した RXR アゴニスト NEt-TMN (**6**)<sup>27</sup>), NEt-3IP (**7a**)<sup>28</sup>) および NEt-3IP のアルコキシ基を種々変換した化合物の RXR アゴニスト活性について検討した (Table 1-1)。なお、活性評価方法の詳細については、実験の部に記した。

**Table 1-1.** The data of RXR $\alpha$  homodimer reporter gene assay for **1**, **6** and **7a-m** in COS-1 cells



Compound	R	RXR $\alpha^a$	
		EC <sub>50</sub> (nM) <sup>b</sup>	E <sub>max</sub> (%) <sup>b,c</sup>
<b>1</b>	-	20 ± 3	100
<b>6</b>	-	5.3 ± 1.0	94 ± 1
<b>7a</b>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	66 ± 9	97 ± 6
<b>7b</b>	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	19 ± 6	114 ± 0
<b>7c</b>	-CH <sub>2</sub> c-Pr	290 ± 40	95 ± 4
<b>7d</b>		110 ± 20	110 ± 0
<b>7e</b>		160 ± 80	91 ± 3
<b>7f</b>	-CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	160 ± 30	100 ± 0
<b>7g</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	450 ± 80	120 ± 0
<b>7h</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	180 ± 30	100 ± 10
<b>7i</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	160 ± 20	96 ± 7
<b>7j</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	280 ± 150	77 ± 4
<b>7k</b>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	160 ± 60	98 ± 2
<b>7l</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	330 ± 120	99 ± 4
<b>7m</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	820 ± 110	78 ± 6

a) All values represent the standard error of the mean value of at least three separate experiments with triplicate determinations.

b) EC<sub>50</sub> values and E<sub>max</sub> values were determined from dose-response curves ranging from 10<sup>-8</sup> to 10<sup>-5</sup> M in COS-1 cells.

c) Luciferase activity of **1** at 1 μM was defined as 100%.

Table1-1 には, COS-1 細胞を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイの結果を示している. イソブトキシ基を有する **7b** が **1** とほぼ同程度の強力な RXR アゴニスト活性を示した. シクロプロピルメトキシ基を有する **7c** や二重結合を有する化合物 **7d** および **7e** についての RXR アゴニスト活性を評価した結果, いずれの化合物も  $10^{-7}$  M オーダーの  $EC_{50}$  値を与えた. また, 1,1,1-トリフルオロエトキシ基を有する化合物 **7f** は, **7d** や **7e** と同程度の RXR アゴニスト活性であった. 直鎖アルコキシ基を有する化合物については, アルキル鎖が *n*-プロピル基から *n*-ブチル基, *n*-ペンチル基と伸長するにつれて RXR アゴニスト活性の増強が見られた. 側鎖置換基に *n*-ヘキシルオキシ基を有する化合物 **7j** では活性の減弱が見られたものの, 本化合物においても 300 nM 程度の RXR アゴニスト活性を示したことから, RXR のリガンド結合部位中の RXR アゴニストのいわゆる疎水性部位周辺には空間的余裕があることが示唆された. また, 直鎖アルコキシ基の末端にフェニル環を有する化合物 **7k-7m** について RXR アゴニスト活性を評価した. その結果, いずれの化合物も RXR アゴニスト活性を示したことから, RXR のリガンド結合部位中の RXR アゴニスト疎水性部位を収容する部位ではフェネチルオキシ基のような嵩高い基であっても許容されることが示唆された.

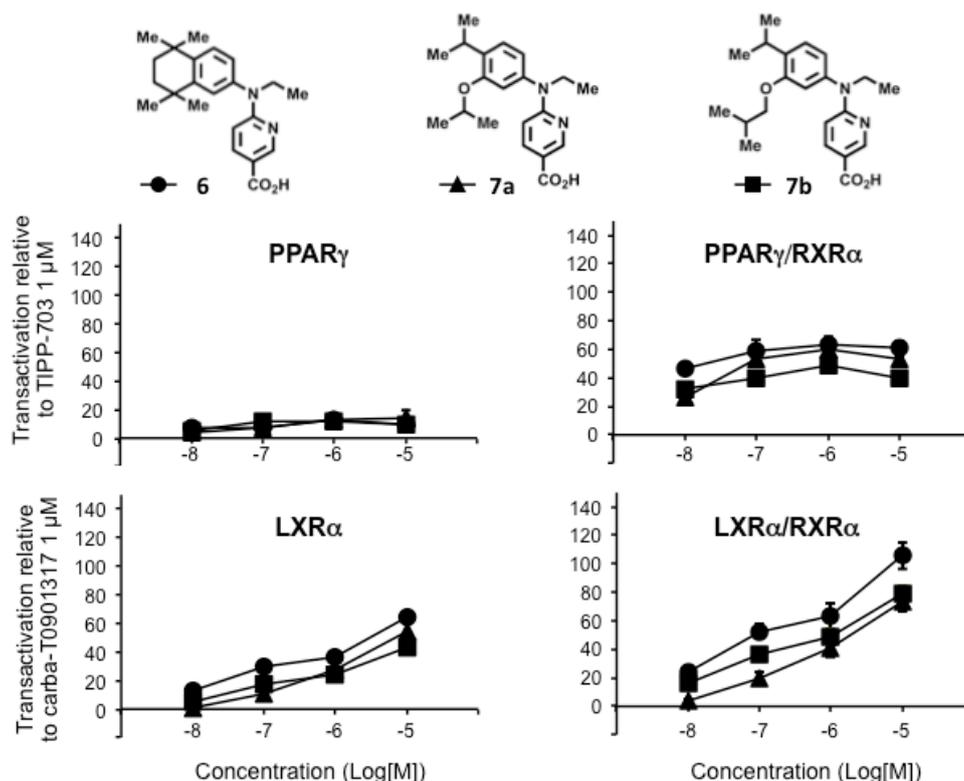
これらの化合物の  $EC_{50}$  値から,  $10^{-8}$  M オーダーの高活性グループ (**6**, **7a** および **7b**) と,  $10^{-7}$  M 以上の低活性グループに分類できることがわかった.

そこで, 後者のグループうち,  $10^{-8}$  M オーダーの  $EC_{50}$  値を示した高活性グループ (前者) とは異なるアルコキシ基を有するシクロプロピルメトキシ基を有する化合物 **7c**, 直鎖アルキル基である *n*-ペンチルオキシ基を有する **7i** およびベンゼン環を導入した化合物 **7k** について注目し, PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性について検討した.

## 第2節 低 EC<sub>50</sub> 群の PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 活性化能評価

本節では、前節で示した RXR アゴニスト活性が高かった **6**, **7a** および **7b** の RXR へテロダイマー活性について述べる。Figure1-1 には **6**, **7a** および **7b** の PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$  ホモダイマーおよび RXR とのへテロダイマー活性化能評価の結果を示している。

その結果、いずれ化合物も PPAR $\gamma$  ホモダイマー活性化能はほぼ認められなかったものの PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  活性を示したことから、これら RXR アゴニストが抗糖尿病作用を発現することが期待できた。また、LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  について、**7a** が今回評価したいずれの濃度においても、**6** および **7b** に比べ最も活性が弱いことから、本化合物が **6** および **7b** に比べ血中 TG 値上昇等の副作用を軽減できることが期待できた。

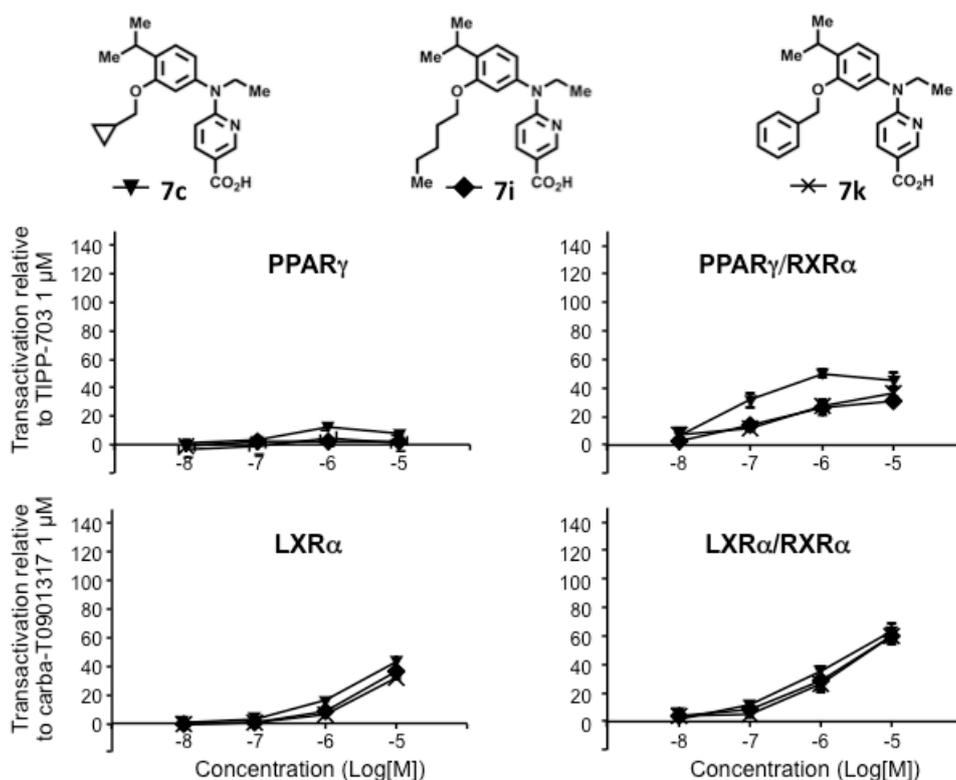


**Figure 1-1.** Relative transactivation data of **6** (closed circle), **7a** (closed triangle), and **7b** (closed square) toward PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ , and LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ .

### 第3節 化合物 **7c**, **7i** および **7k** の PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 活性化能評価

本節では, 第1節で示した RXR アゴニストのうち, EC<sub>50</sub> がほぼ同程度でありながら, 構造が異なるアルコキシ部位を有する **7c**, **7i** および **7k** の RXR ヘテロダイマー活性について述べる. Figure1-2 にはこれらの PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$  ホモダイマーおよび RXR とのヘテロダイマー活性化能評価の結果を示している.

いずれの化合物 (**7c**, **7i**, **7k**) も PPAR $\gamma$  ホモダイマー活性は示さず, PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  ヘテロダイマー活性を示した. また, LXR $\alpha$  ホモダイマー, LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  ヘテロダイマー活性化能を評価したところ, **7c**, **7i** および **7k** はほぼ同程度の活性を示した. LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性を抑えつつ, PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  活性を保持した RXR アゴニストの探索が本研究の目的であったため, これらの化合物を用いた *in vivo* での検討では, 前述の仮説の検証には至らないと判断した.



**Figure 1-2.** Relative transactivation data of **7c** (closed inverted triangle), **7i** (closed diamond), and **7k** (cross) toward PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ , and LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ .

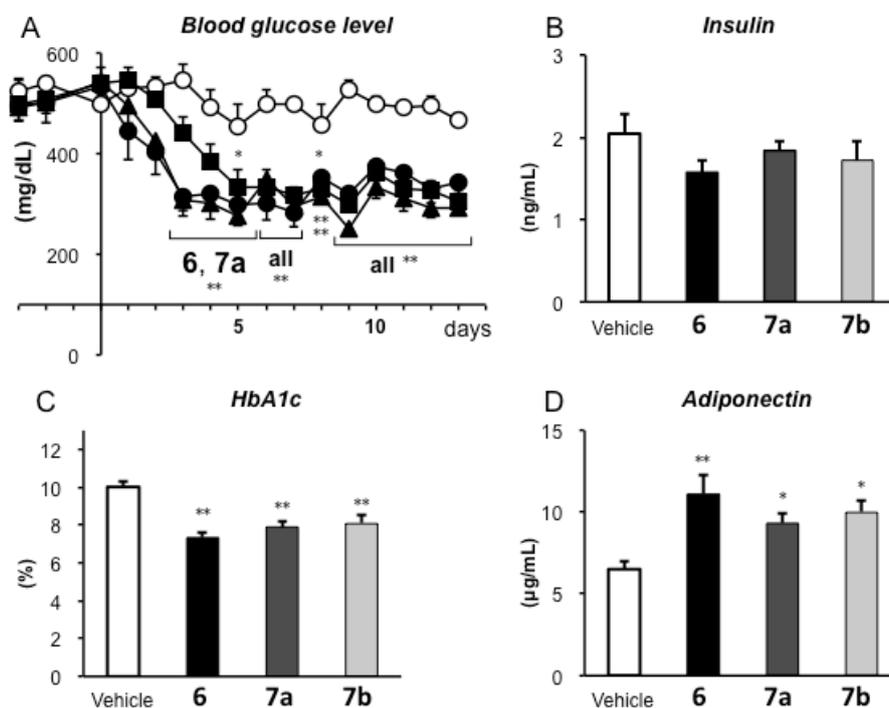
#### 第4節 化合物 **6**, **7a** および **7b** の *in vivo* 薬効評価データの解析

前二節で述べたように、LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性を抑えつつ、PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  活性を保持した RXR アゴニストであれば、薬効は保持しつつ副作用の軽減化が可能であると仮説を検証する上で、**6**, **7a** および **7b** について薬効ならびに副作用を調べるのが適切と判断した。そこで京都薬科大学吉川講師らに、これらの化合物について、2 型糖尿病モデルマウスである KK-A<sup>y</sup> マウスを用いた抗糖尿病作用評価を実施して頂き、そのデータをもとに解析を行った。

各化合物を 10 mg/kg/day で 14 日間、1 日 1 回経口投与し、日々の血糖値変化と投

与最終日翌日のヘモグロビン A1c 濃度と血中インスリン量およびインスリン抵抗性の改善に寄与することが知られるアディポネクチン量を測定した (Figure1-3). 化合物非投与群の血糖値が約 500 mg/dL であるのに対し, いずれの化合物も投与により約 300 mg/dL 程度まで血糖値が低下し, 血糖降下作用が認められた. 化合物 **6** および **7a** では投与 3 日目から, 一方 **7b** では投与 5 日目から有意な血糖降下作用が認められ, **7b** に作用発現の遅れが見られたものの, 最終日においてはいずれの化合物も同程度の血糖降下作用を認めた.

さらに, 化合物投与によりインスリン量の低下傾向とともに, ヘモグロビン A1c の有意な低下およびアディポネクチン量の有意な上昇が認められた. これらのことから, RXR アゴニスト **6**, **7a** および **7b** が, KK-A<sup>y</sup>2 型糖尿病モデルマウスにおいて薬効として, 抗糖尿病作用を示すことが確認された<sup>29)</sup>.



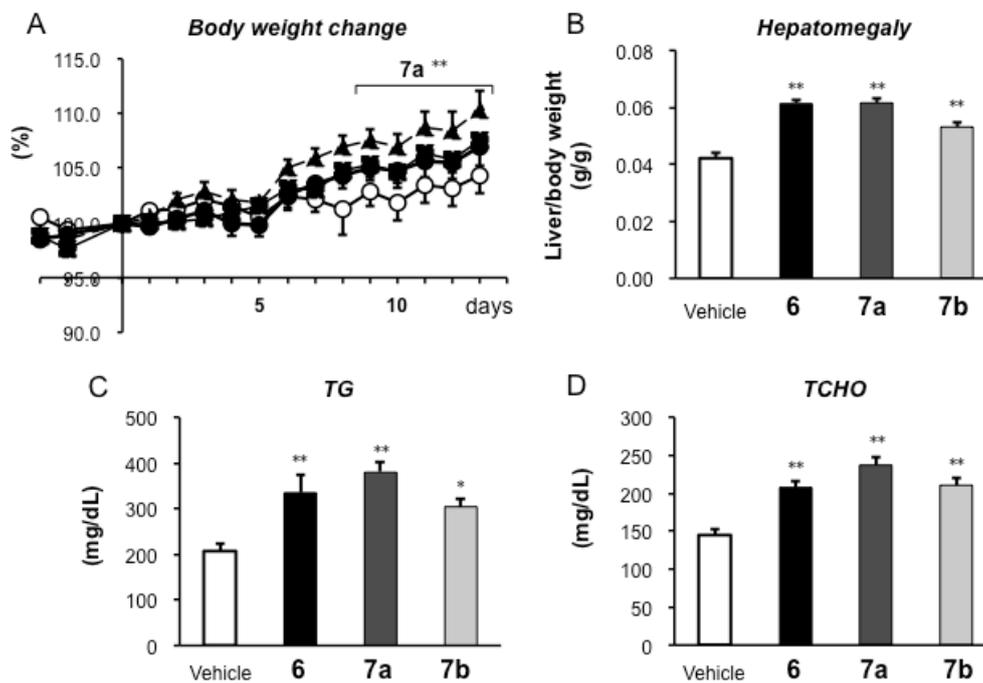
**Figure 1-3.** Evaluation of antitype 2 diabetes effects of repeated oral administration of **6**, **7a** or **7b** at 10 mg/kg/day to male KK- $A^y$  mice for 14 consecutive days. A) Time course of blood glucose levels. Open circle, closed circle, closed triangle, and closed square indicate vehicle, NET-TMN (**6**), NET-3IP (**7a**), and NET-3IB (**7b**), respectively. B) Effects of compounds on serum insulin levels. C) Effects of compounds on serum hemoglobin A1c levels. D) Effects of compounds on adiponectin levels. The data (n = 3–7) represent the mean  $\pm$  sem. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. Significant differences: \* p < 0.05 vs vehicle. \*\* p < 0.01 vs vehicle.

### 第5節 化合物 **6**, **7a** および **7b** の *in vivo* 副作用発現評価

化合物 **7a** が **6** および **7b** と比べ LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性化能を抑えていたことから、本化合物が血中 TG 値上昇などの副作用を回避できることが期待された。そこで、**6**, **7a** および **7b** について副作用の検討として、KK- $A^y2$  型糖尿病モデルマウスに各化合物を 10 mg/kg/day で 14 日間、1 日 1 回経口投与したときの、体重変化、肝臓重量変

化, 血中 TG 値および血中 TCHO 値を測定した (Figure 1-4).

その結果, いずれの RXR アゴニストも投与により体重の増加傾向を示した. 特に **7a** は, 投与 7 日目以降で顕著な体重上昇を示した. また, 化合物投与最終日翌日の肝臓肥大率, 血中 TG 値および血中 TCHO 値を評価したところ, いずれの化合物とも肝臓肥大率, 血中 TG 値および血中 TCHO 値の優位な上昇を示した. LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性化能を最も抑えていた **7a** が他の 2 つの RXR アゴニストと比較し最も血中 TG 値を上昇させており, *in vitro* における LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性化能と *in vivo* における副作用発現の程度との間に相関を得ることはできなかった. また, 化合物 **7b** 投与群に肝臓肥大率の増加や血中 TG 値上昇の軽減傾向が見られた.



**Figure 1-4.** Evaluation of side effects of repeated oral administration of **6**, **7a** or **7b** at 10 mg/kg/day to male KK- $A^Y$  mice for 14 consecutive days. A) Time course of body weight change. Open circle, closed circle, closed triangle, and closed square indicate vehicle, NET-TMN (**6**), NET-3IP (**7a**), and NET-3IB (**7b**), respectively. B) Effects of compounds on liver weight. C) Effects of compounds on serum triglyceride. D) Effects of compounds on serum total cholesterol. The data (n = 3–7) represent the mean  $\pm$  sem. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. Significant differences: \* p < 0.05 vs vehicle. \*\* p < 0.01 vs vehicle.

*In vitro* での LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性と *in vivo* における副作用発現の程度との間に相関が得られなかったことについては、動物への薬物投与では各化合物間で、*in vitro* で期待されたような RXR ヘテロダイマー活性化能の差異を生じる血中濃度を与えなかったことなどが考えられる。

## 第6節 本章のまとめ

著者は, LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性を抑制し, PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  活性を保持した RXR アゴニストが, 薬効を保持し, 副作用の軽減化に繋がる可能性を探る目的で, 当研究室で創出した RXR アゴニスト化合物 **6**, **7a** および **7a** の誘導体である **7b-m** の RXR アゴニスト活性評価および PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  ヘテロダイマー活性について検討した<sup>30)</sup>. その結果, **7a** が **6** と **7b** と比べ LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性を抑制することを見出し, これらの化合物の KK-A<sup>y</sup>2 型糖尿病モデルマウスにおける抗糖尿病作用を評価した<sup>29)</sup>. しかしながら, **6**, **7a** および **7b** はいずれも投与により血糖降下作用, ヘモグロビン A1c の有意な低下作用を示したが, 体重増加, 肝臓肥大, 血中 TG 値の上昇が認められ, その副作用発現の程度と, *in vitro* での LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性化能との間に相関は得ることはできなかった. 今回, 化合物 **7b** に肝臓肥大率の増加や血中 TG 値上昇の軽減傾向が見られ, また化合物の血中濃度から予想される LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性化能と副作用発現との間には相関が示唆されたものの, いずれの化合物においても肝臓肥大や血中 TG 値上昇などの副作用発現について完全に回避するには至らなかった.

## 第2章 RXR パーシャルアゴニストを利用した副作用の軽減化

前章では、LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  の活性化による血中 TG 値上昇に着目した検討について述べた。すなわち、LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  の活性の抑制による副作用の軽減化を試みたが、いずれの化合物においても肝臓肥大や血中 TG 値上昇などの副作用発現について完全に回避するには至らなかった<sup>29,30</sup>。内因性 RXR アゴニストである 9-*cis* レチノイン酸や副作用を示した RXR アゴニストを精査すると、いずれも高濃度において RXR を 100%活性化するフルアゴニストであることに特徴があった。そこで、著者は、RXR アゴニストの副作用発現は、受容体の過剰活性化に起因するものであると仮定し、RXR の適度な活性化でも十分に所望の薬効を得ることが可能ではないかと考えた。

RXR パーシャルアゴニストは幾つか創出されているものの<sup>31,32</sup>、RXR パーシャルアゴニストを用いた *in vivo* での薬効・副作用発現評価を行った研究は未報告であることから、著者は上記仮説を立証すべく、本研究を行った。

### 第1節 背景および RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8) について

著者は、RXR 活性化による *in vivo* での薬効および副作用の発現には、それぞれ閾値が存在しており、フルアゴニストに比べ Efficacy を抑えた RXR パーシャルアゴニストであれば RXR アゴニストの薬効と副作用との分離が可能であると仮説を立てた (Figure 2-1)。

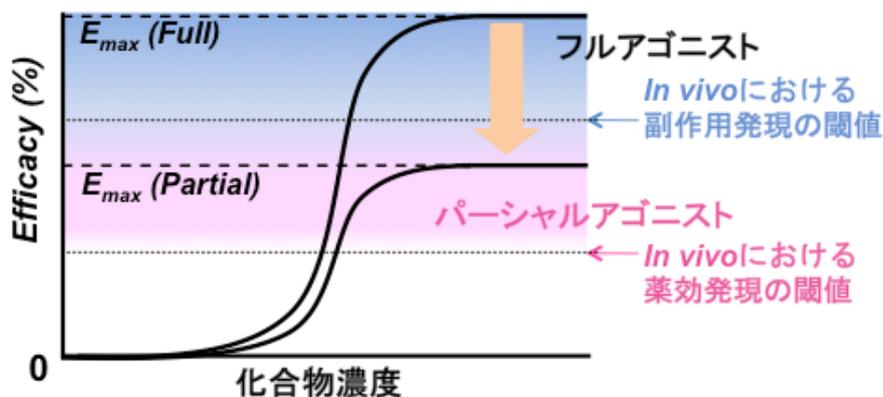


Figure 2-1. RXR 活性化能と *in vivo* での薬効・副作用発現 (本章における仮説)

#### 第1項 核内受容体パーシャルアゴニストとは

Pierre Germain らの報告では、核内受容体パーシャルアゴニストとは「転写活性化能を示すが、フルアゴニストと比べて減弱した efficacy を示す化合物」と定義されている<sup>33)</sup>。また、「核内受容体パーシャルアゴニストはヘリックス 12 と、リガンドやヘリックス 3 もしくはヘリックス 11 との相互作用が小さいため、受容体のアゴニスト型が不安定となる」とも示されている<sup>33)</sup>。すなわち、RXR パーシャルアゴニストは、ヘリックス 12 が適切に折り畳まれた holo 型の RXR とアンタゴニストが結合し転写活性化能を示さないアンタゴニストが結合した型の RXR のどちらにも誘導しうるリガンドであり、過剰投与においても受容体を完全には活性化しない適度な活性化で抑えることが可能と考えられる。

## 第2項 RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8) の *in vitro* 活性評価および *in vivo* 薬効・副作用評価

RXR アゴニストの基本骨格は、テトラメチルテトラリンもしくはペンタメチルテトラリン構造を有する疎水性部位と安息香酸やニコチン酸構造を有する酸性部位、および、それらを繋ぐリンカー部位から構成される。

これまでに著者は、共同研究者とともに、構造の剛直化に伴う RXR 活性の不完全化を期待して、RXR フルアゴニスト 6 の分子構造に閉環構造を導入した RXR アゴニストの創出を行った。その結果、酸性部位とリンカー部位とをトリアゾール環で閉環した化合物 CBt-PMN (8) が  $E_{max}$  値を抑えた RXR パーシャルアゴニスト活性 ( $EC_{50} = 143$  nM,  $E_{max} = 75\%$ ) を有することを見出した (Figure 2-2)<sup>34</sup>。パーシャルアゴニストのコアクチベータ誘導能については第二章第三節にて述べる。

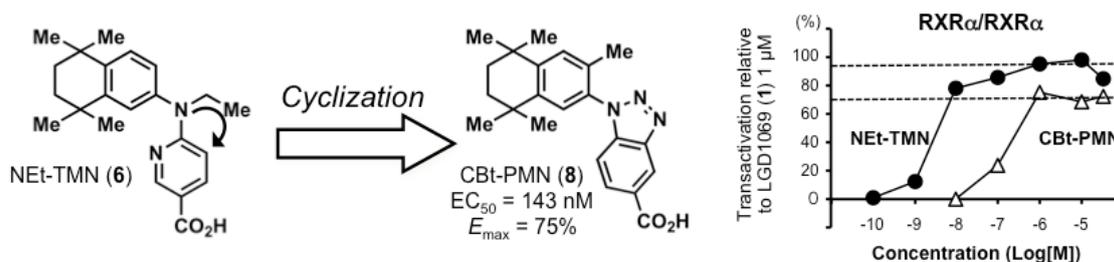
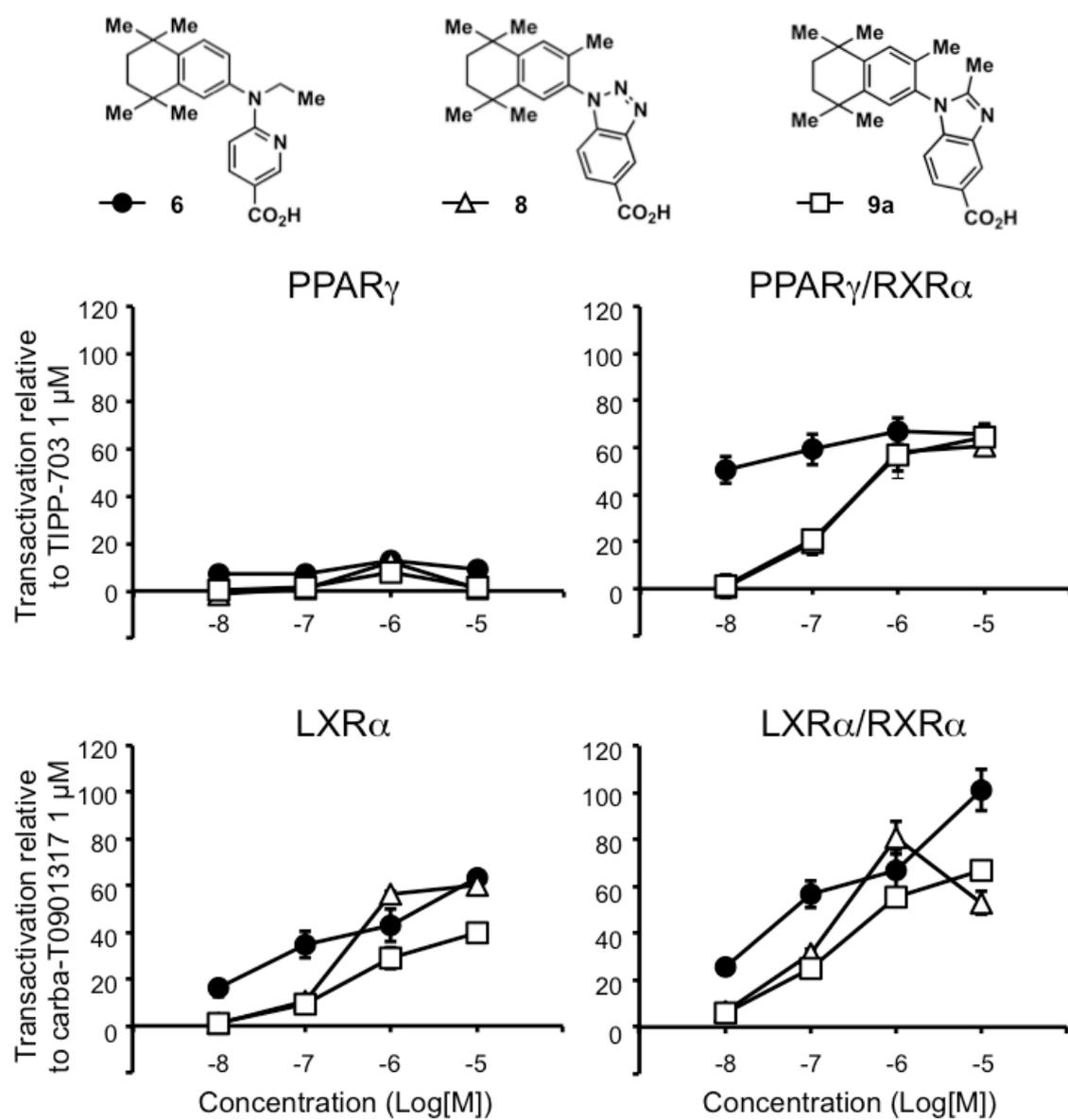


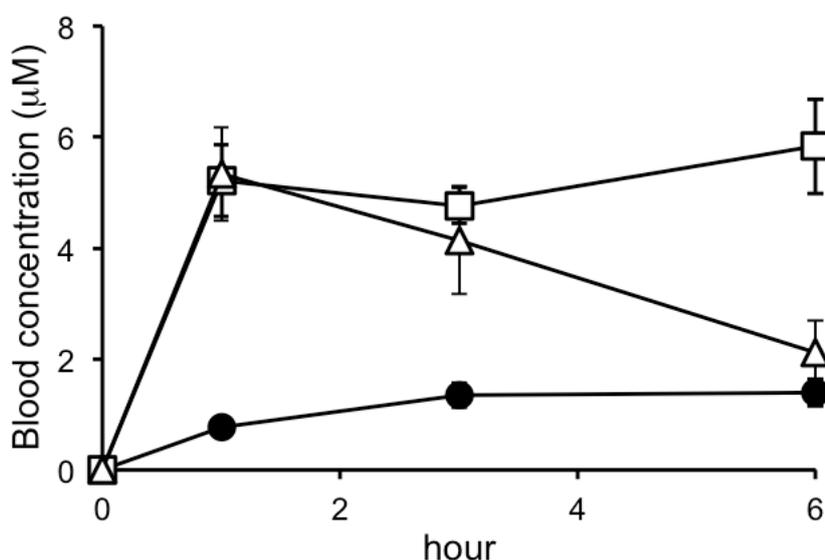
Figure 2-2. Molecular design strategy for RXR partial agonist CBt-PMN (8).

これまでの研究で見出した RXR パーシャルアゴニスト 8 および 8 誘導体の RXR フルアゴニスト CBiM-PMN (9a) は、PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  や LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  に対して活性化能を示した (Figure 2-3).



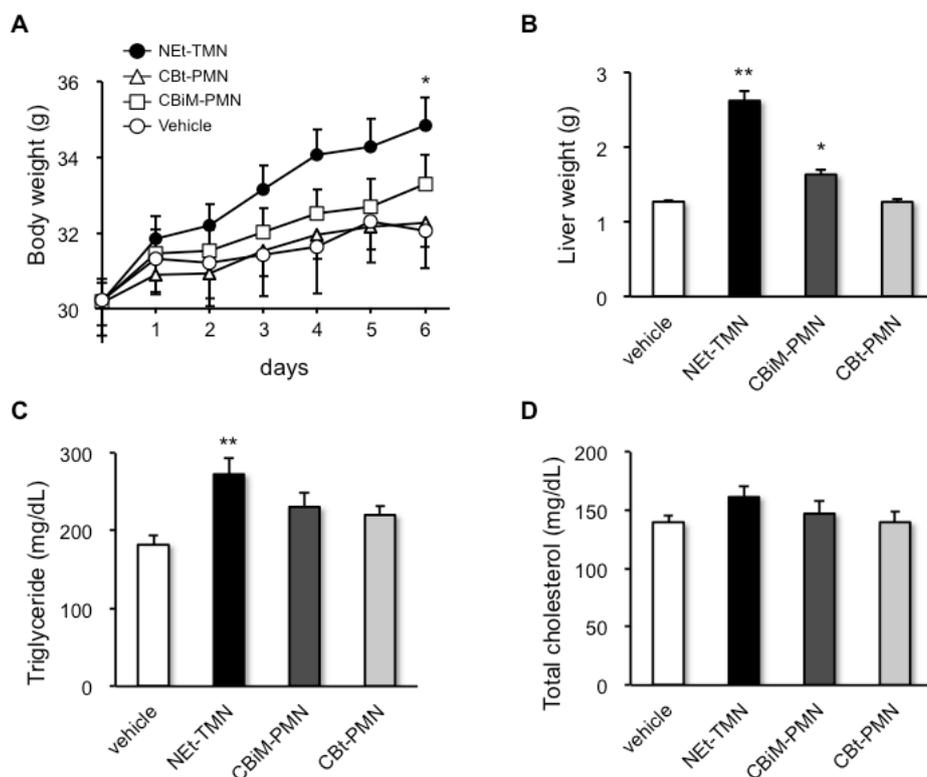
**Figure 2-3.** Relative transactivation data of **6** (closed circle), **8** (open triangle), and **9a** (open square) toward PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ , and LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ .

*In vivo* での薬効および副作用評価に先立ち、各化合物 (NEt-TMN, CBt-PMN, CBiM-PMN) を雄性 ICR マウスに 30 mg/kg で経口投与し、岡山大学加来田博貴准教授および県立広島大学田井章弘教授に化合物の血中濃度を測定して頂いた。その結果、いずれの化合物も投与後 6 時間までにおいて、1  $\mu$ M 以上の血中濃度を示すことを確認した (Figure 2-4)。



**Figure 2-4.** Plasma concentration of **6** (closed circle), **8** (open triangle) and **9a** (open square) in ICR mice (single dose at 30 mg/kg by oral administration).

次に、雄性 ICR マウスに 30 mg/kg/day で 7 日間経口投与し、体重変化、肝臓肥大率、血中 TG 値および血中 TCHO 値について評価した (Figure 2-5)。動物実験を行うにあたっては、岡山大学加来田博貴准教授および同大学院合成薬品開発学教室員にご助力頂いた。

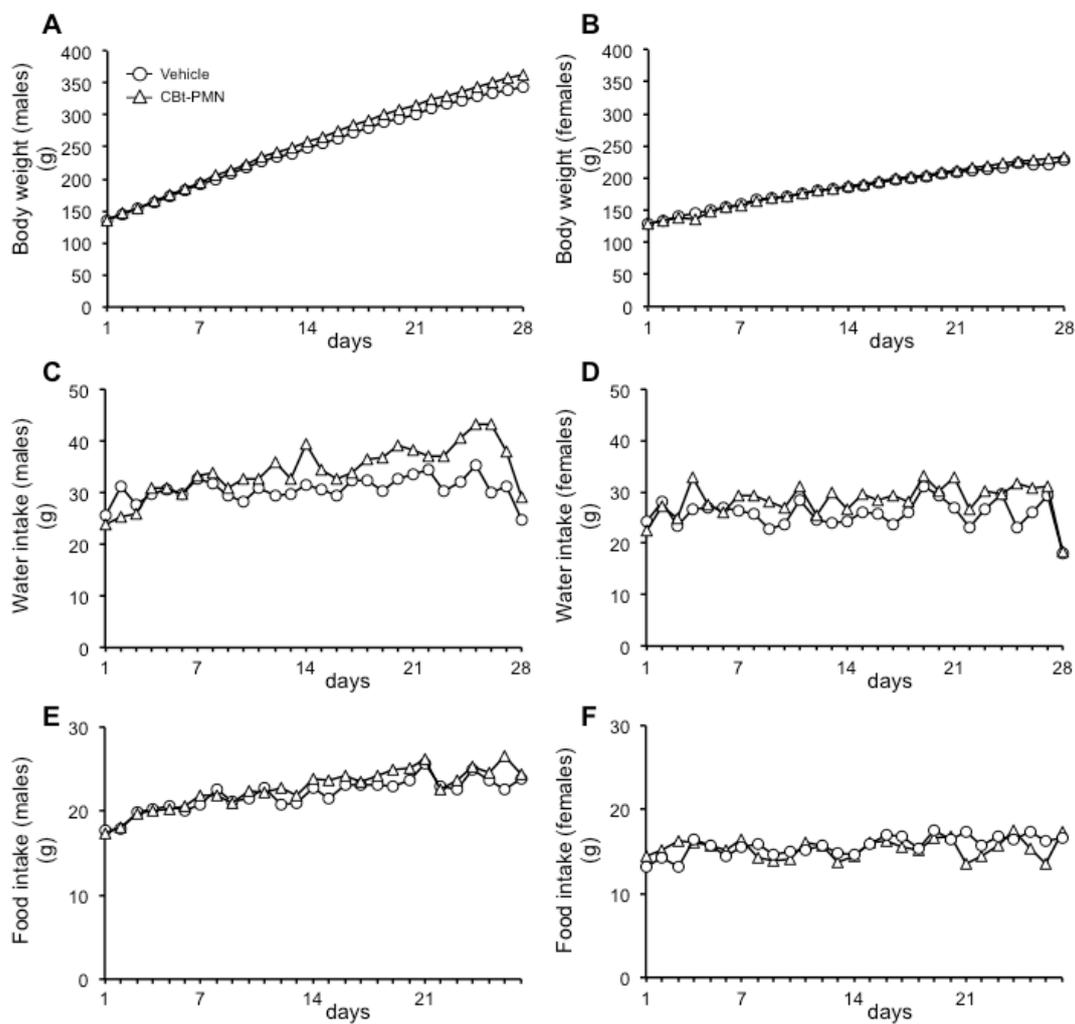


**Figure 2-5.** Evaluation of adverse effects of repeated oral administration of compounds at 30 mg/kg/day to male ICR mice for 7 consecutive days. A) Time course of body weight. Open circle, closed circle, open triangle, and open square indicate vehicle, NEt-TMN (6), CBt-PMN (8), and CBiM-PMN (9a), respectively. B) Effects of compounds on liver weight gain. C) Effects of compounds on serum triglyceride. D) Effects of compounds on total cholesterol. The data (n = 7–23) represent the mean  $\pm$  s.e.m. Significant differences: \* p<0.05 vs. vehicle. \*\* p<0.01 vs. vehicle.

RXR フルアゴニスト NEt-TMN (6) もしくは CBiM-PMN (9a) を投与したマウスでは、非投与群と比較して体重が増加しており、NEt-TMN (6) では有意な増加が見られた。一方、CBt-PMN (8) 投与群では化合物非投与群と同様の体重変化推移を示した (Figure 2-5A)。肝臓重量は、NEt-TMN (6) および CBiM-PMN (9a) 投与群では非投与群と比較し有意に増加していた一方で、RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8)

投与群では肝臓重量の増加は示さなかった (Figure 2-5B). また, NEt-TMN (6) が投与により有意な血中 TG 値の上昇を示したのに対し, CBt-PMN (8) 投与群では非投与群と比較し血中 TG 値および血中 TCHO 値の上昇を示さなかった (Figure 2-5C, D).

CBt-PMN (8) の長期投与による副作用発現の有無を検討するために, 雌雄 SD ラットに 30 mg/kg/day で 28 日間経口投与し, 体重変化, 飲水量, 食餌量, 臓器重量および血中 TG 値などの血清成分について評価した. CBt-PMN (8) は, 雌雄 SD ラットに 30 mg/kg/day で 28 日間経口投与した場合においても, 非投与群と比較して, 体重変化や飲水量, 食餌量の変化は見られなかった (Figure 2-6).



**Figure 2-6.** Body weight gain, water intake change, and food intake change of male or female SD rats treated with oral administration of vehicle or CBt-PMN (**8**) at 30 mg/kg/day for 28 consecutive days. A–B) Body weight gain. C–D) Water intake change. E–F) Food intake change. Males: A, C, and E. Females: B, D, and F. Open circle and open triangle indicate vehicle and CBt-PMN (**8**) treatment, respectively. n = 6.

臓器重量については、CBt-PMN (**8**) の投与によりわずかに精巣の重量増加が認められたが、肝臓などの他の臓器重量は非投与群と比較し変化は見られなかった (Table 2-1).

**Table 2-1.** Organ weights of male or female SD rats after oral administration of vehicle or CBt-PMN (8) at 30 mg/kg/day for 28 consecutive days (n = 6)

	Males		Females	
	Vehicle	CBt-PMN (8)	Vehicle	CBt-PMN (8)
Weight (g)	324.3 ± 8.7	337.8 ± 4.6	213.4 ± 2.1	216.1 ± 10.7
Brain (g)	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.7 ± 0.0
Liver (g)	9.7 ± 0.6	9.7 ± 0.4	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.4
Kidney (g)	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1	1.6 ± 0.0	1.5 ± 0.1
Spleen (g)	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Testis (g)	3.9 ± 0.2	4.5 ± 0.1 *		

Data are mean ± s.e.m.; Significant differences: \* p<0.05 vs. vehicle.

血清成分については、非投与群と比較して、いくつかの値で有意な差は見られたものの、その値は、実験動物供給元の基準値の範囲内であった (Table 2-2).

**Table 2-2.** Plasma parameters of male ICR mice after oral administration of vehicle or compounds at 30 mg/kg/day for 7 consecutive days (n = 7-8)

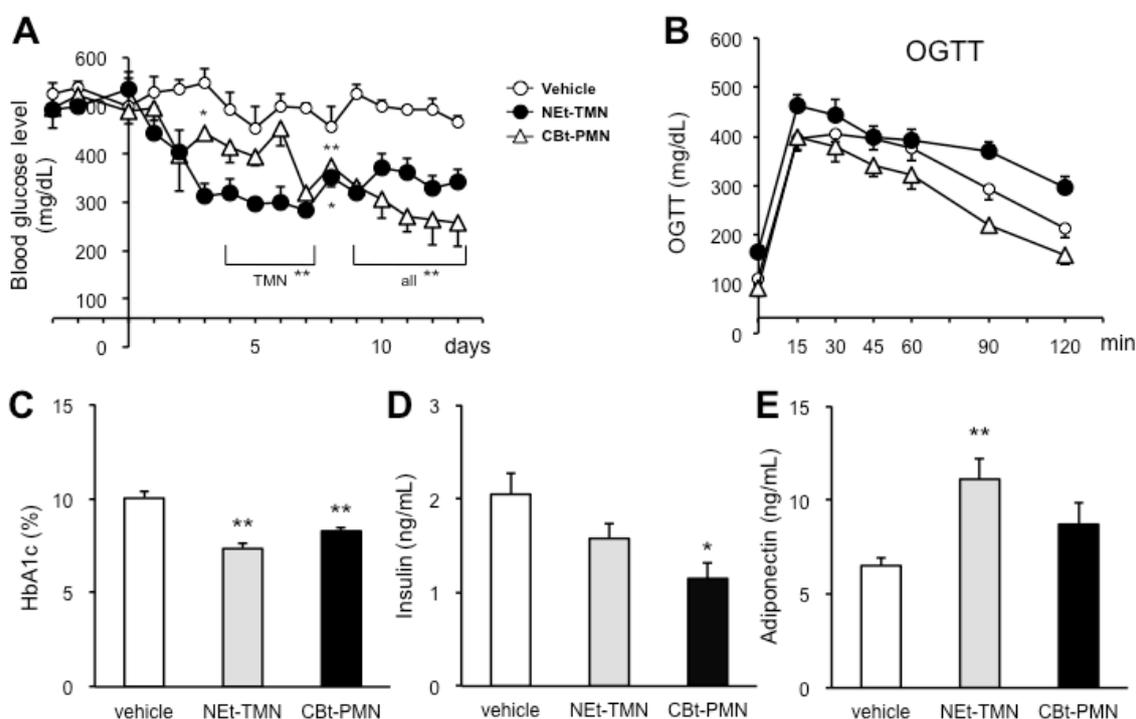
	Vehicle	NEt-TMN (6)	CBiM-PMN (9a)	CBt-PMN (8)
AST (U/I)	50.5 ± 5.6	87.9 ± 18.9 *	51.3 ± 3.9	48.9 ± 3.0
ALT (U/I)	21.4 ± 1.5	43.5 ± 6.0 **	32.7 ± 6.4	21.9 ± 0.7
γ-GTP (U/I)	7.9 ± 0.8	7.1 ± 0.3	6.4 ± 0.3	6.5 ± 0.2
ALP (U/I)	305.1 ± 27.1	968.9 ± 115.0 **	456.0 ± 51.5	391.9 ± 37.5
CRE (mg/dL)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
BUN (mg/dL)	25.1 ± 1.4	26.0 ± 1.8	24.1 ± 2.1	25.1 ± 1.9
GLU (mg/dL)	107.5 ± 9.8	177.8 ± 8.8 **	125.7 ± 7.2	95.6 ± 4.2

AST : Alanine aminotransferase, ALT : aspartate aminotransferase, γ-GTP : γ-glutamyl transpeptidase, ALP : alkaline phosphatase, CRE : creatinine, BUN : blood urea nitrogen, GLU : glucose.

Data are mean ± s.e.m.; Significant differences: \* p<0.05 vs. vehicle. \*\* p<0.01 vs. vehicle.

以上のことから、RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8) は、RXRフルアゴニストにより引き起こされる副作用を示さなかった。

次に著者らは、KK-A<sup>y</sup> 型糖尿病モデルマウスに CBt-PMN (8) および RXRフルアゴニスト NEt-TMN (6) を 10 mg/kg/day で 14 日間、1 日 1 回経口投与し日々の血糖値変化と投与最終日翌日のヘモグロビン A1c 濃度と血中インスリン量およびアディポネクチン量を測定することで、化合物の抗 2 型糖尿病作用を評価した (Figure 2-7)。

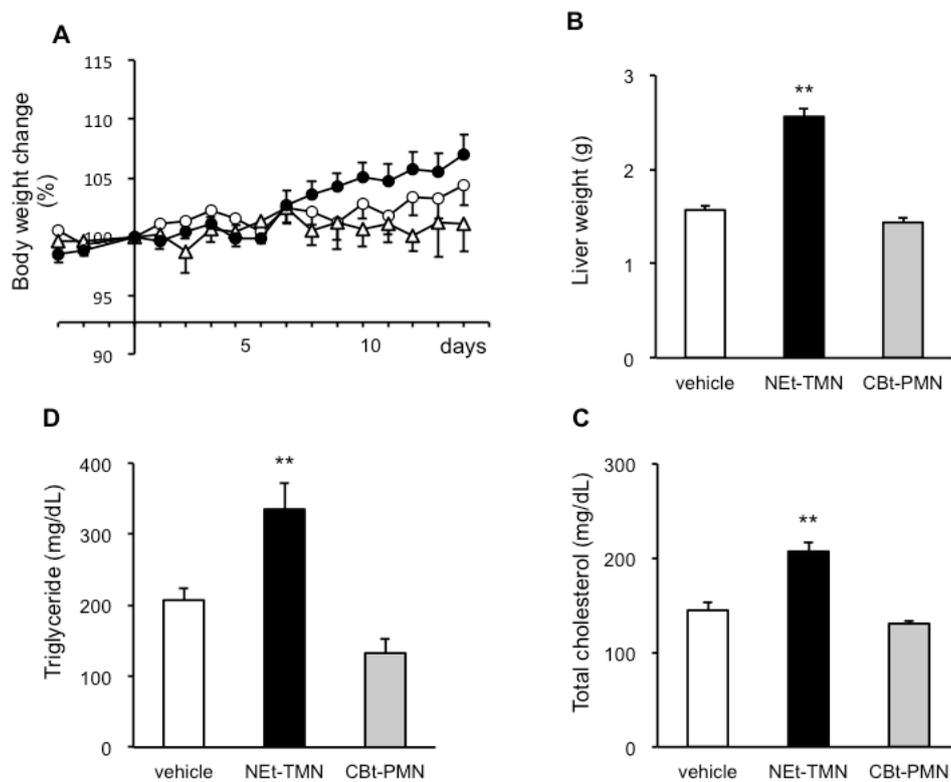


**Figure 2-7.** Repeated oral administration of compounds to KK-A<sup>y</sup> mice for 14 consecutive days (10 mg/kg). A) Time-dependent change of plasma glucose level. Open circle, closed circle, and open triangle indicate vehicle, NEt-TMN (6), and CBt-PMN (8), respectively. B) Results of oral glucose tolerance tests (OGTT). C) Hemoglobin A1c level. D) Serum insulin level. E) Serum adiponectin level. The data shown are the average (n = 4–7) ± SEM. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. Significant differences: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs vehicle.

その結果、化合物非投与群の血糖値は 500 mg/dL であるのに対し、NEt-TMN (6) 投与群では、投与 3 日目から 300 mg/dL 程度まで血糖値を低下しており、有意な血糖降下作用を示した。CBt-PMN (8) 投与群についても、その作用発現までの時間は NEt-TMN (6) よりも長かったものの、投与 7 日目から有意な血糖降下作用が示された。さらに CBt-PMN (8) は、投与により有意な血中インスリン濃度と HbA1c 値の低下および OGTT の改善作用を認め、有意な抗糖尿病作用を示した。

CBt-PMN (8) が、KK-A<sup>y</sup> マウスにおいてインスリン抵抗性の改善を示したことから、インスリン抵抗性との関係が報告されているアディポネクチンの測定を行った。その結果、NEt-TMN (6) が有意にアディポネクチンの増加を示し、一方で CBt-PMN (8) はその増加が穏やかであった。アディポネクチン量の低下とインスリン抵抗性との間には相関が見られることから、RXR アゴニストによるアディポネクチンの増加が抗 2 型糖尿病作用と相関していることが考えられた。

また、ICR マウスと同様に KK-A<sup>y</sup> マウスにおいても、化合物投与による副作用を評価した。体重変化、肝臓重量、血中 TG 値および血中 TCHO 値について調べた結果、NEt-TMN (6) 投与では ICR マウスと同様に有意な増加が見られた一方で、CBt-PMN (8) 投与では、化合物非投与群と比較してそれらの値に変化は見られなかった (Figure 2-8)。



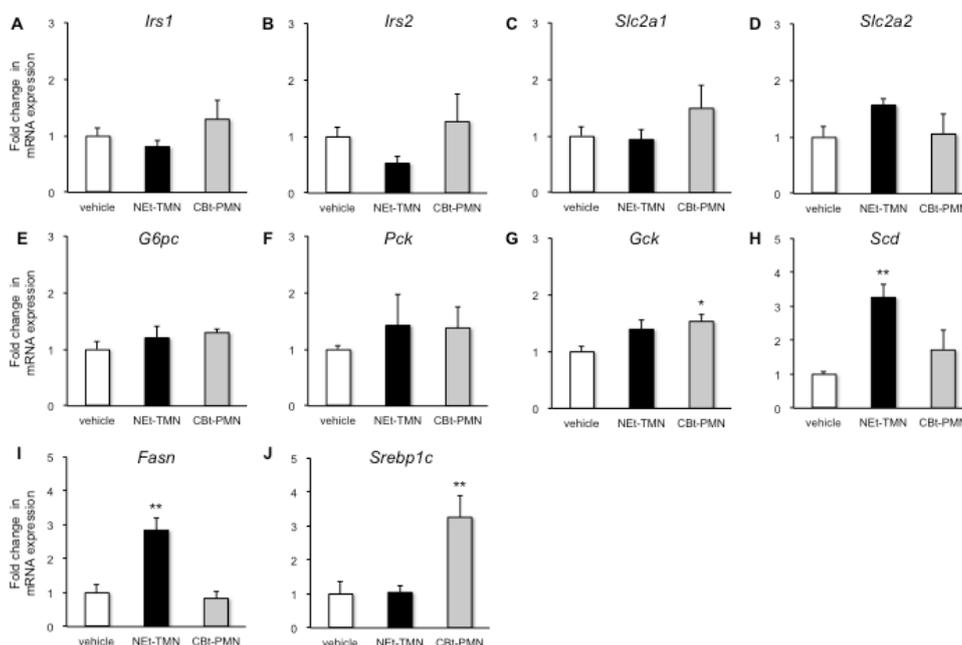
**Figure 2-8.** Evaluation of side effects of repeated oral administration of **6** or **8** at 10 mg/kg/day to male KK-A<sup>y</sup> mice for 14 consecutive days. A) Time course of body weight change. Open circle, closed circle, and open triangle indicate vehicle, NEt-TMN (**6**), and CBt-PMN (**8**), respectively. B) Effects of compounds on liver weight. C) Effects of compounds on serum triglyceride. D) Effects of compounds on serum total cholesterol. The data (n = 4–7) represent the mean ± sem. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. Significant differences: \* p < 0.05 vs vehicle. \*\* p < 0.01 vs vehicle.

以上のことから、RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (**8**) は RXR フルアゴニストの見られる体重増加や肝臓重量増加、血中 TG 値および血中 TCHO 値上昇といった副作用を回避し、2 型糖尿病モデルマウスにおいて薬効を示したといえる。

### 第3項 CBt-PMN (8) の RT-PCR 法による遺伝子発現評価

化合物 CBt-PMN (8) は, 10 mg/kg/day での経口投与にて抗 2 型糖尿病作用を示しながら,  $E_{max}$  を示すのに十分な血中濃度を与える投与量である 30 mg/kg/day での経口投与であっても, RXR フルアゴニストに見られる副作用を示さなかった.

そこで, CBt-PMN (8) の抗 2 型糖尿病作用のメカニズムについて調べるため, 著者らは KK- $A^y$  マウスにおいて糖・脂質代謝に関与している遺伝子の発現量の変化を RT-PCR により評価した (Figure 2-9). なお, RT-PCR による実験は, 岡山大学加来田博貴准教授, 同大学合成薬品開発学教室員および岡山大学院医歯薬学総合研究科大橋俊孝准教授に行って頂いた.



**Figure 2-9.** Fold changes in mRNA expression of *Irs1* (a), *Irs2* (b), *Slc2a1* (c), *Slc2a2* (d), *G6pc* (e), *Pck* (f), *Gck* (g), *Scd1* (h), *Fasn* (i) and *Srebp1c* (j) in KK- $A^y$  mice treated with vehicle, NEt-TMN (6) or CBt-PMN (8). The data (n = 3–7) represent the mean  $\pm$  s.e.m. Significant differences: \* p<0.05 vs. vehicle. \*\* p<0.01 vs. vehicle.

RXR アゴニストにより肝臓における *Slc2a1* (GLUT1), *Slc2a2* (GLUT2) の発現量が増加し、肝臓へのグルコース取り込みを促進させることが報告されている<sup>35)</sup>。

解糖系に寄与する *Gck* も *Slc2a1* や *Slc2a2* と同様 RXR アゴニストにより発現量が増加するという報告がある<sup>35)</sup>。さらに、LXR アゴニストによる *Gck* の発現促進<sup>35)</sup>や、肝臓における糖新生に関与する酵素の *G6pc* (Glucose-6-phosphatase) および *Pck* (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) の発現抑制も報告されている<sup>36)</sup>。また一方で、LXR アゴニストにより、脂質合成に関わる *Scd1* (Stearoyl-CoA desaturase-1) や *Fasn* (Fatty acid synthase) および *Srebp1c* (Sterol regulatory element-binding protein-1c) の上昇の報告もある<sup>36)</sup>。

著者らはさらに、肝臓において糖・脂質代謝の恒常性に寄与している *Irs1* (Insulin receptor substrate-1) や *Irs2* (Insulin receptor substrate-2) についても評価した。

薬効に関与する遺伝子については、NEt-TMN (6) および CBt-PMN (8) の投与による *Irs1*, *Irs2*, *Slc2a1*, *Slc2a2*, *G6pc*, *Pck* の発現の有意な増加は見られなかったものの、CBt-PMN (8) 投与群では *Gck* が有意に増加していたことから、CBt-PMN (8) の血糖降下作用の一因として *Gck* の増加による解糖系の促進を介した機構が考えられる。

副作用に関与すると考えた遺伝子である *Scd1* や *Fasn* および *Srebp1c* について評価した結果、NEt-TMN (6) 投与群では *Scd1* や *Fasn* の発現量が優位に増加しているのに対し、CBt-PMN (8) 投与群では化合物非投与群と比べて顕著な増加は認められなかった。

*Scd1* や *Fasn* は脂質代謝に関与していることから、これらの発現が低いことが、CBt-PMN (8) が血中 TG などの副作用を示さなかった要因であると考えられる。

*Gck* や *Scd1* および *Fasn* は *Srebp1c* により発現が制御されているという報告があり<sup>37-39)</sup>, また, 肝臓における *Srebp1c* の発現はアディポネクチンにより抑制されることが報告されている<sup>40)</sup>.

*Srebp1c* の発現について, NEt-TMN (6) 投与群の化合物非投与群と同程度であった. 何故, NEt-TMN (6) の投与が *Srebp1c* の発現に影響を与えなかったのかについては, Figure 2-7E に示すようにアディポネクチンの発現量を NEt-TMN (6) が有意に増加させていることに起因していることが考えられる. 一方で, RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8) 投与群が化合物非投与群と比較し, 有意に *srebp1c* の発現を増加させていながら, 脂質合成を促進する *Scd1* や *Fasn* の過度な発現上昇を示さなかったことについての詳細な機序の解明については今後の課題である.

#### 第4項 第1節のまとめと問題点

著者らは、RXR 活性化による薬効発現の閾値と副作用発現の閾値に差があると仮説を立て、既存RXRアゴニストの分子構造の自由度を低減させることによるRXR パーシャルアゴニストの創出を目的として研究を行った。その結果、見出した RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (**8**:  $EC_{50} = 143 \text{ nM}$ ,  $E_{\max} = 75\%$ ) は、KK-A<sup>y</sup>2 型糖尿病モデルマウスにおいて、薬効を示しつつ、体重増加や血中 TG 値上昇などの RXR フルアゴニストに見られる副作用の回避に成功した。RXR フルアゴニストの少量投与により、RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (**8**) と同様に副作用を回避した薬効発現が認められることも考えられるが、医療過誤により過剰投与となってしまう場合にはRXR フルアゴニストでは副作用発現は引き起こされてしまう。したがって、RXR パーシャルアゴニストはRXR フルアゴニストよりも魅力的な抗2型糖尿病治療薬の候補物質となると考えられる。

しかし、本化合物が示したRXR パーシャルアゴニストの詳細な活性機序については、未解決な問題として残されていた。また、RXR パーシャルアゴニストの *in vivo* における知見は、CBt-PMN (**8**) の一例に限られていることから、薬効を示しつつ副作用の回避が可能であるRXR パーシャルアゴニストについての一般性や有用性を示すには、他のRXR パーシャルアゴニストについて、更なる検討が必要であった。

## 第2節 CBt-PMN (8) の RXR パーシャルアゴニスト活性の発現機構の解明

前節では、RXR パーシャルアゴニストの創出と *in vivo* における薬効・副作用発現評価を行い、RXR パーシャルアゴニストの有用性を提示した。しかし、見出した RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8) の詳細な活性機序については、未解決な問題として残されていた。また、RXR パーシャルアゴニストの *in vivo* における知見は、CBt-PMN (8) の一例に限られていることから、薬効を示しつつ副作用の回避が可能である RXR パーシャルアゴニストについての一般性や有用性を示すには、他の RXR パーシャルアゴニストについて、更なる検討が必要であった。本節では、CBt-PMN (8) の RXR パーシャルアゴニスト活性の発現機構の解明と新規 RXR パーシャルアゴニストの創出を行うことを目的として、CBt-PMN (8) 誘導体の RXR アゴニスト活性についての構造活性相関を検討した。

### 第1項 既存の RXR パーシャルアゴニストの構造と活性発現機構

既存の RXR パーシャルアゴニストの構造を以下に示す (Figure. 2-10)<sup>31,32</sup>。

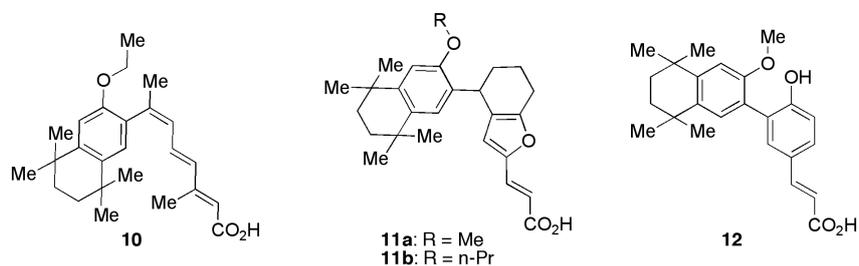


Figure 2-10. Chemical structures of known RXR partial agonists.

これらの RXR アゴニストのパーシャルアゴニスト活性発現機構はいずれも、

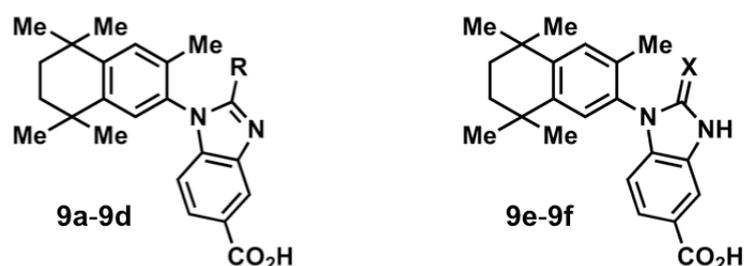
疎水性部位側鎖アルコキシ基と RXR の転写活性化に重要な役割を担っているヘリックス 11 やヘリックス 12 との立体障害に由来する反発を示すことによると報告されている<sup>41,42)</sup>。一方で CBt-PMN (8) は、疎水性部位にアルコキシ基を有しておらず、ヘリックス 12 との直接的な相互作用とは異なる機構で RXR パーシャルアゴニスト活性を発現するものと考えられる。

## 第 2 項 5 員環部位に着目してデザインした CBt-PMN (8) 誘導体の RXR アゴニスト活性評価

RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8) を見いだす過程において、CBt-PMN (8) と同様にリンカー部位と酸性部位とで 5 員環構造を形成した CBiM-PMN (9a) が、RXR フルアゴニスト活性を示すという知見を得ている<sup>34)</sup>。CBt-PMN (8) と CBiM-PMN (9a) の構造上の差異は、その 5 員環部位の 2 位のみである。これより、閉環構造を有する RXR アゴニストでは 5 員環部位の 2 位の置換基が RXR パーシャルアゴニスト活性やフルアゴニスト活性発現に大きく関与していることが示唆された。

共同研究者である岡山大学大学院薬師寺修士および篠崎修士は、CBt-PMN (8) の 5 員環部位の 2 位の構造展開を行った化合物を合成している<sup>43,44)</sup>。しかし、これら化合物の RXR 活性および構造活性相関についての詳細な検討は行われていなかった。そこで著者は、これらの RXR アゴニスト活性と、置換基の立体因子や疎水性因子などとの構造活性相関の検討を行い、CBt-PMN (8) の RXR パーシャルアゴニスト活性発現の要因を調べることにした (Figure 2-11)。





**Table 2-3.** The data of RXR $\alpha$  homodimer reporter gene assay for **6**, **8**, and **9a–9f** in COS-1 cells

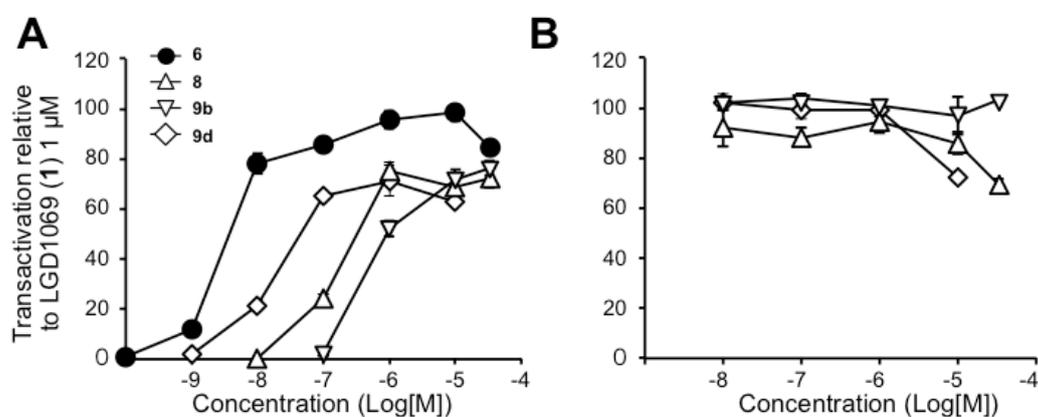
Comp.	R or X	Efficacy <sup>a</sup> (%)		EC <sub>50</sub> (nM) <sup>b</sup>	E <sub>max</sub> (%) <sup>b</sup>
		@ 1 $\mu$ M	@ 10 $\mu$ M		
<b>6</b>	-	96 $\pm$ 4	98 $\pm$ 3	3.8 $\pm$ 0.2	96 $\pm$ 4
<b>8</b>	-	75 $\pm$ 3	69 $\pm$ 3	143 $\pm$ 2	75 $\pm$ 4
<b>9a</b>	CH <sub>3</sub>	70 $\pm$ 4	80 $\pm$ 5	367 $\pm$ 130	94 $\pm$ 5
<b>9b</b>	H	52 $\pm$ 3	72 $\pm$ 4	633 $\pm$ 33	75 $\pm$ 3
<b>9c</b>	NH <sub>2</sub>	35 $\pm$ 3	96 $\pm$ 4	155 $\pm$ 10	103 $\pm$ 2
<b>9d</b>	CF <sub>3</sub>	65 $\pm$ 1	71 $\pm$ 6	15 $\pm$ 0	67 $\pm$ 2
<b>9e</b>	O	1 $\pm$ 0	22 $\pm$ 2	–	–
<b>9f</b>	S	2 $\pm$ 0	37 $\pm$ 0	–	–

a) The relative transactivation activity is based on the luciferase activity of 1  $\mu$ M **1** (RXR full agonist) taken as 100 percent. All values represent the mean value of at least three separate experiments with triplicate determinations.

b) EC<sub>50</sub> values and E<sub>max</sub> values were determined from dose-response curves.

パーシャルアゴニストは受容体との結合により、受容体をアンタゴニスト構造にも誘導することができる。例えば、PPAR $\gamma$  パーシャルアゴニストの GW0072 は、弱い PPAR $\gamma$  アゴニスト活性を示しながらも、PPAR フルアゴニストである rosiglitazone の競合的アンタゴニストとして作用することが報告されている<sup>45)</sup>。そこで、E<sub>max</sub> 値を抑えていた RXR アゴニスト (CBt-PMN (**8**), CBi-PMN (**9b**),

CBTF-PMN (**9d**) について, RXR パーシャルアゴニスト活性の確認の為に, RXR フルアゴニストとの競合試験に行い, 競合的アンタゴニスト活性を評価した. その結果, 高濃度において, CBTF-PMN (**9d**) が CBt-PMN (**8**) と同様に RXR フルアゴニストと競合し  $E_{max}$  値を低減させる作用を示し, RXR パーシャルアゴニスト活性が認められた (Figure 2-12).



**Figure 2-12.** Relative transactivation activities of **6**, **8**, **9b** and **9d** toward RXR $\alpha$ . A) Dose-dependence of RXR $\alpha$ -agonistic activities of **6** (closed circle), **8** (open triangle), **9b** (open inverted triangle) and **9d** (open diamond). B) Dose-dependence of RXR $\alpha$ -antagonistic activities of **8** (open triangle), **9b** (open inverted triangle) and **9d** (open diamond) in the presence of 1  $\mu$ M LGD1069 (**1**).

### 第3項 蛍光偏光法によるコファクター誘導能評価

RXR ホモダイマーのリガンド依存的な転写活性化は、apo 構造 (リガンド非結合型であり、コリプレッサーを誘導する) から holo 構造 (アゴニスト結合型で、コアクチベータを誘導する) へと受容体が構造変化することにより引き起こされる<sup>46)</sup>。ステロイド受容体の関わる遺伝子発現モデル解析では、パーシャルアゴニストはコアクチベータとコリプレッサーの両方を誘導することが可能なりガンドと定義されていることから<sup>47)</sup>、RXR パーシャルアゴニストについても同様に、コアクチベータとコリプレッサーの両方を誘導し、パーシャルアンタゴニストとしても作用すると考えられる。そのため、パーシャルアゴニストによるコファクター誘導能はフルアゴニストやフルアンタゴニストによる誘導能よりも抑えられていると推測された。そこで、転写活性化能評価により RXR パーシャルアゴニストと推定された化合物についてコファクターリクルートメントアッセイを行った。

#### 第1目 蛍光偏光法

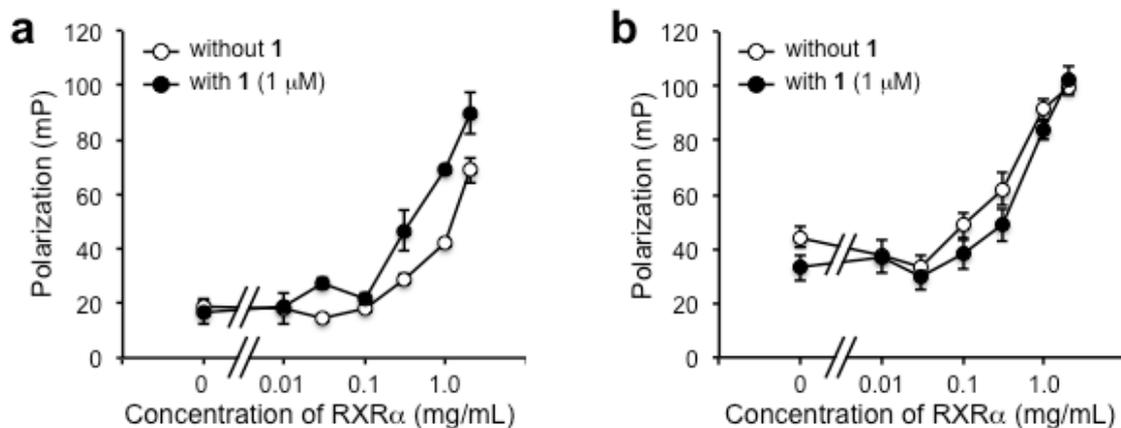
蛍光性分子が偏光によって励起されると偏光面を維持した蛍光 (蛍光偏光) を発する。蛍光偏光の偏光度は、蛍光性分子の運動状態に依存する。蛍光性分子単独で存在している場合、蛍光性分子が RXR などの巨大分子と結合している場合に比べて、激しく運動しているため、偏光度の低い蛍光偏光が観測される。蛍光性分子が巨大分子と結合していると、蛍光性分子の見かけの分子量が増加するため、蛍光性分子の運動性が低下し、偏光度の高い蛍光が観測される。

蛍光性分子と巨大分子との結合の前後で生じる蛍光偏光度の変化を利用し、試験化合物との競合的な結合を評価する方法を蛍光偏光法という。

## 第2目 コファクターリクルートメントアッセイの条件検討

コファクターリクルートメントアッセイは Lévy-Bimbot らの報告している方法に従い、RXR 受容体とリガンドおよびフルオレセイン標識コファクターを用いた蛍光偏光測定により行った<sup>48,49)</sup>。コアクチベータとして著者らは、RXR を用いた TR-FRET 法に使用されている D22 を選択した<sup>50)</sup>。コリプレッサーには、apo 型の RXR と結合することが報告されている SMRT-ID2 を選択した<sup>51)</sup>。

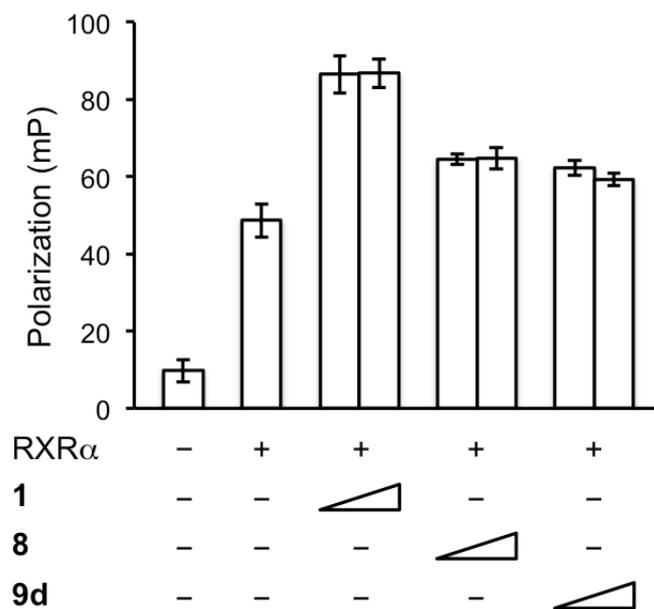
まず、使用する受容体の最適な濃度を求めるために、フルオレセイン標識コファクターの濃度を 5 nM に固定し、リガンド非存在下もしくは 1 μM の **1** 存在下において様々な RXR 濃度における FP (Fluorescence polarization) 値を測定した (Figure 2-13)。リガンド非存在下においても、RXR 濃度の上昇に伴い FP 値の上昇が確認され、コファクターとRXRとの結合が示された。RXRフルアゴニスト**1**の存在によりフルオレセイン標識D22を用いた際のFP値とRXRとの用量反応曲線は低濃度側にシフトしており、**1**がD22とRXRとの相互作用を誘導することが示された (Figure 2-13a)。一方、RXRフルアゴニスト**1**の存在によりフルオレセイン標識SMRT-ID2を用いた際のFP値とRXRとの用量反応曲線は高濃度側にシフトしており、**1**がSMRT-ID2とRXRとの相互作用を減弱することが示された (Figure 2-13b)。RXRフルアゴニスト**1**によりFP値の差が最大となるRXR濃度は、D22では1.0 mg/mL、SMRT-ID2では0.1 mg/mLであったことから、それらのRXR濃度で今後の実験を行うこととした。



**Figure 2-13.** Changes in fluorescence polarization values at various RXR concentrations in the absence (open circles) or presence of 1  $\mu\text{M}$  **1** (closed circles). a) Fluorescein-labeled co-activator peptide D22 (5 nM). b) Fluorescein-labeled co-repressor peptide SMRT-ID2 (5 nM). Fluorescence polarization values, expressed in mP, are the mean  $\pm$  SEM of measurements obtained from triplicate wells.

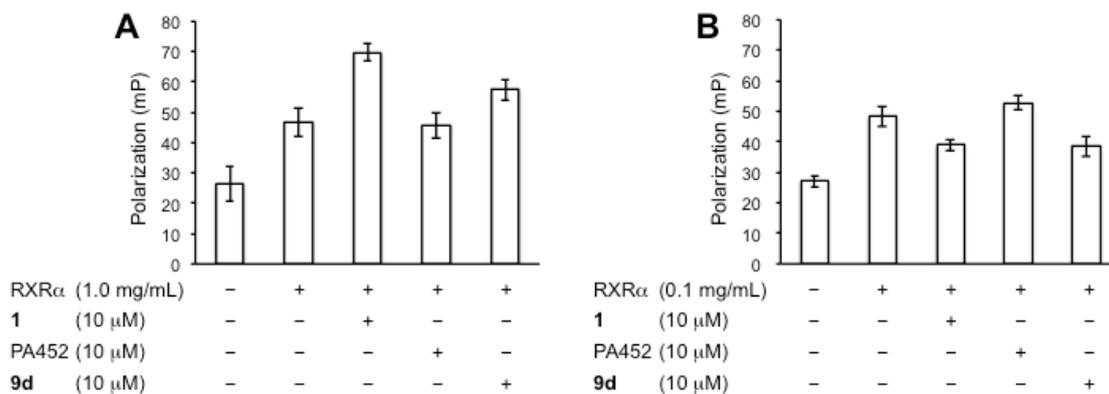
### 第3目 蛍光偏光法によるコファクターリクルートメントアッセイ

コファクター濃度を 5 nM として、前述の実験で求めた RXR 濃度にて、RXR フルアゴニスト **1** および RXR フルアンタゴニスト PA452 と、RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (**8**) および CBTF-PMN (**9d**) のコファクター誘導能を比較した。化合物濃度について、10  $\mu\text{M}$  と 33  $\mu\text{M}$  におけるフルオレセイン標識 D22 の誘導能に差が見られなかったことから、いずれの化合物も 10  $\mu\text{M}$  にてコファクター誘導能を評価した (Figure 2-14)。



**Figure 2-14.** Dose dependency of the effect of RXR agonists at 10 or 33  $\mu\text{M}$  on fluorescence polarization of fluorescein-labeled D22 (5 nM). Fluorescence polarization values, expressed in mP ( $n = 3-4$ ), are the mean  $\pm$  SEM. Arrow symbols opposite compound numbers indicate 10  $\mu\text{M}$  (left side/column) and 33  $\mu\text{M}$  (right side/column).

CBTF-PMN (**9d**) は、RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (**8**) と同様に RXR フルアゴニスト **1** と RXR フルアンタゴニスト PA452 の中間のコアクチベータ誘導能を示した。一方、CBTF-PMN (**9d**) のコリプレッサー誘導能は PA452 よりも弱く、RXR フルアゴニスト **1** と同程度であった。

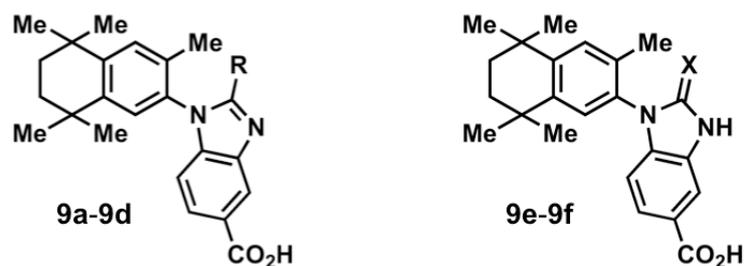


**Figure 2-15.** Changes in fluorescence polarization of (a) 5 nM fluorescein-labeled coactivator peptide D22 or (b) 5 nM fluorescein-labeled corepressor peptide SMRT-ID2 induced by **9d** (putative partial agonist), compound **1** (RXR full agonist), and PA452 (RXR antagonist). Fluorescence polarization values, expressed in mP, are the mean  $\pm$  SEM of measurements obtained from triplicate wells.

著者は、レポータージーンアッセイによる転写活性化試験とコファクターリクルートメントアッセイの結果から、CBTF-PMN (**9d**) はCBt-PMN (**8**) と同様にRXRパーシャルアゴニストであると判断した。

#### 第4項 *In vitro* における RXR アゴニスト活性と置換基定数による考察

構造活性相関を明らかにするにあたり、著者は代表的な因子である立体因子、疎水性因子および電子的効果に着目し検討を行った。Table 2-4 には、第3項にて示した RXR アゴニスト活性と置換基の立体因子として  $E_s$  値および疎水性を示す  $\pi$  値を示している。なお、電子的効果として Hammett の  $\sigma$  値が用いられるが、CBt-PMN (8) 誘導体については 2 位置換体ベンズイミダゾールカルボン酸構造であり、適切な値を導入することができず、記載していない。その結果、立体因子および疎水性因子と RXR アゴニスト活性との間には相関を得ることができず、RXR フルアゴニスト活性および RXR パーシャルアゴニスト活性については、ベンズイミダゾール構造 2 位の電子的効果が重要であると考えられた。



**Table 2-4.** The data of RXR $\alpha$  homodimer reporter gene assay for **6**, **8**, and **9a–9f** in COS-1 cells and substituent constants at the heterocyclic 2-position

Comp.	R or X	Efficacy <sup>a</sup> (%)		EC <sub>50</sub> (nM) <sup>b</sup>	E <sub>max</sub> (%) <sup>b</sup>	Properties of R or X	
		@ 1 $\mu$ M	@ 10 $\mu$ M			Es <sup>c</sup>	$\pi$ <sup>d</sup>
<b>6</b>	-	96 $\pm$ 4	98 $\pm$ 3	3.8 $\pm$ 0.2	96 $\pm$ 4	–	–
<b>8</b>	-	75 $\pm$ 3	69 $\pm$ 3	143 $\pm$ 2	75 $\pm$ 4	–	–
<b>9a</b>	CH <sub>3</sub>	70 $\pm$ 4	80 $\pm$ 5	367 $\pm$ 130	94 $\pm$ 5	-1.24	0.56
<b>9b</b>	H	52 $\pm$ 3	72 $\pm$ 4	633 $\pm$ 33	75 $\pm$ 3	0.00	0.00
<b>9c</b>	NH <sub>2</sub>	35 $\pm$ 3	96 $\pm$ 4	155 $\pm$ 10	103 $\pm$ 2	-0.61	-1.23
<b>9d</b>	CF <sub>3</sub>	65 $\pm$ 1	71 $\pm$ 6	15 $\pm$ 0	67 $\pm$ 2	-2.40	0.88
<b>9e</b>	O	1 $\pm$ 0	22 $\pm$ 2	–	–	–	–
<b>9f</b>	S	2 $\pm$ 0	37 $\pm$ 0	–	–	–	–

a) The relative transactivation activity is based on the luciferase activity of 1  $\mu$ M **1** (RXR full agonist) taken as 100 percent. All values represent the mean value of at least three separate experiments with triplicate determinations.

b) EC<sub>50</sub> values and E<sub>max</sub> values were determined from dose-response curves.

c) Es: Taft's steric substituent constant (steric effect). d)  $\pi$ : lipophilicity. These data were cited from Hansch, C., Leo, A. *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, Wiley-Interscience, NY, 1979.

## 第5項 静電場ポテンシャルによる考察

RXR パーシャルアゴニスト活性を示す要因を検討するために、著者は RXR フルアゴニストおよび RXR パーシャルアゴニストにおける 5 員環部位の 2 位周辺の静電ポテンシャルに着目し、誘導体の空間的な電子的効果について考察した。静電ポテンシャルとは分子の電場の偏りを示したものである。Figure 2-16 には CBt-PMN (**8**) およびその誘導体 **9a-f** の, Spartan-10 を用いて計算した静電ポテンシャルを示している。RXR フルアゴニスト **9a** および **9c** の 5 員環部位の 2 位周辺は正の静電ポテンシャルを示したのに対し、RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (**9d**) は弱い負の静電ポテンシャルを示した。一方で弱い RXR アゴニスト活性しか示さなかった **9e** および **9f** は、強い負の静電ポテンシャルを示した。

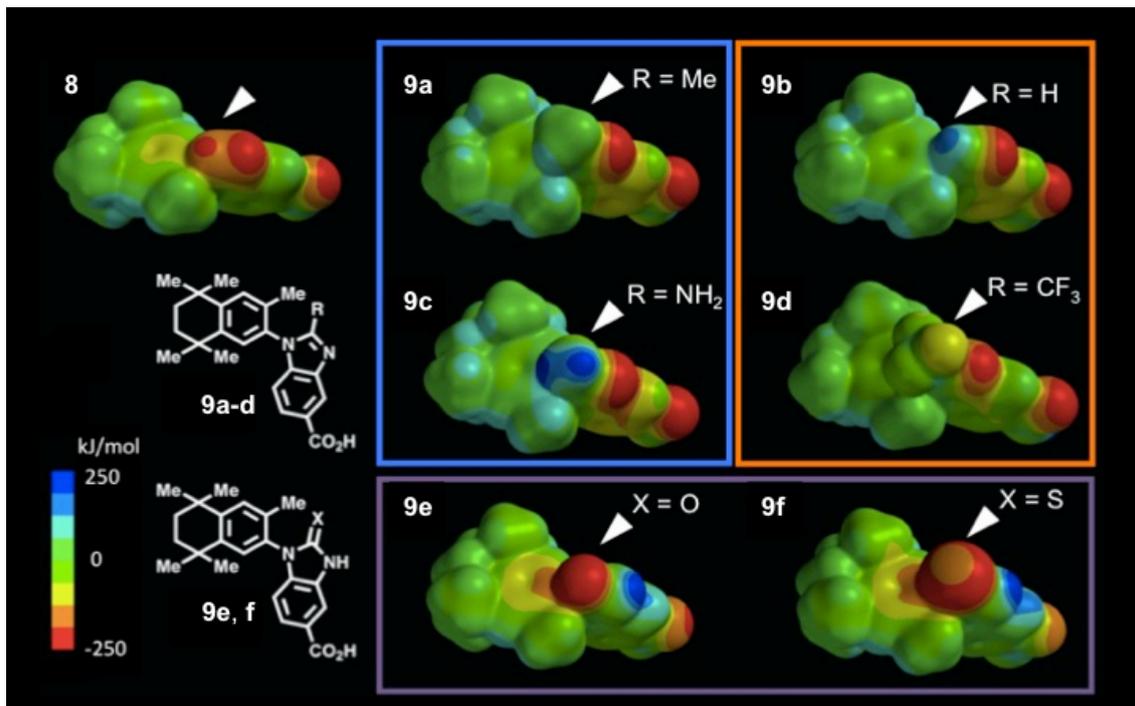


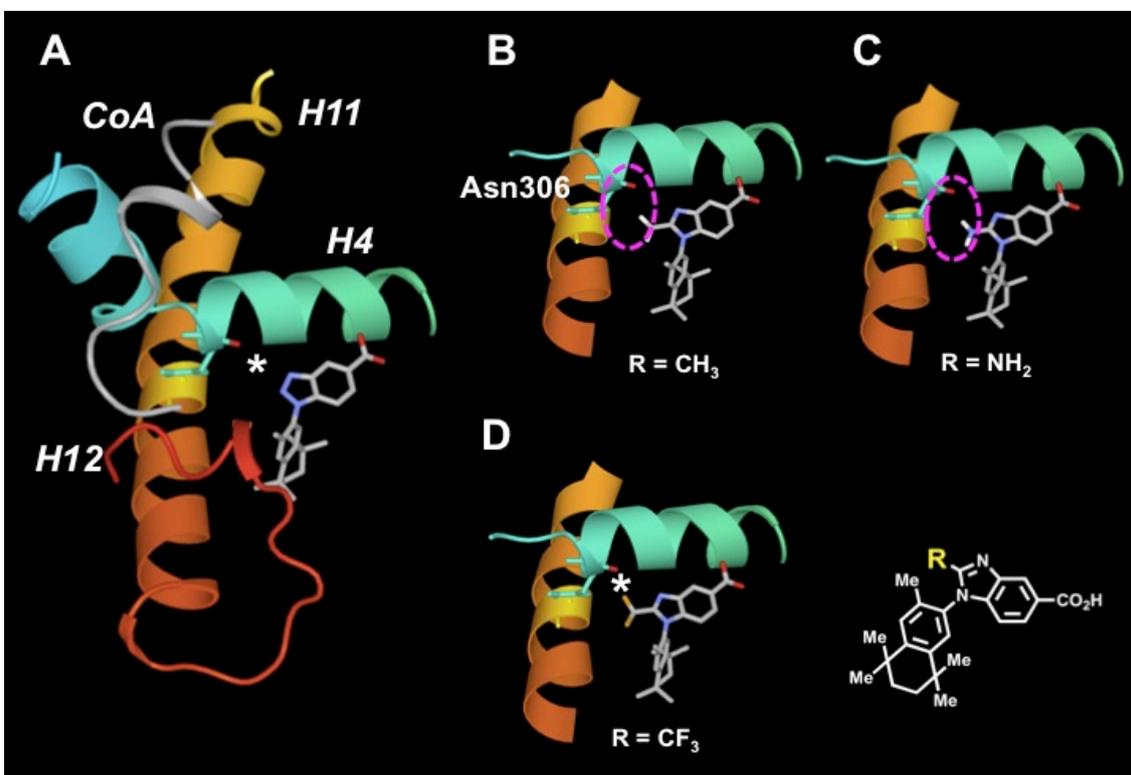
Figure 2-16. Electrostatic potential distribution of **8** and **9a-f**.

## 第6項 ドッキングシュミレーションによる活性発現の考察

続いて、CBt-PMN (**8**) およびその誘導体のベンズイミダゾール構造2位と、受容体であるRXRとの相互作用について考察するために、AutoDock 4.2を用いたドッキングシュミレーションを行った。前述のようにCBt-PMN (**8**)のRXRパーシャルアゴニスト活性発現機構は既存のものと異なることが考えられたため、ドッキングシュミレーションには、CBt-PMN (**8**)と構造の類似したRXRフルアゴニストである**1**とRXRとのX線結晶構造解析の結果である3H0A<sup>52)</sup>を使用した。

Figure 2-17には、Autodock 4.2を用いて、RXRフルアゴニストである**1**の結合した構造のRXRとRXRフルアゴニスト、パーシャルアゴニストとのドッキン

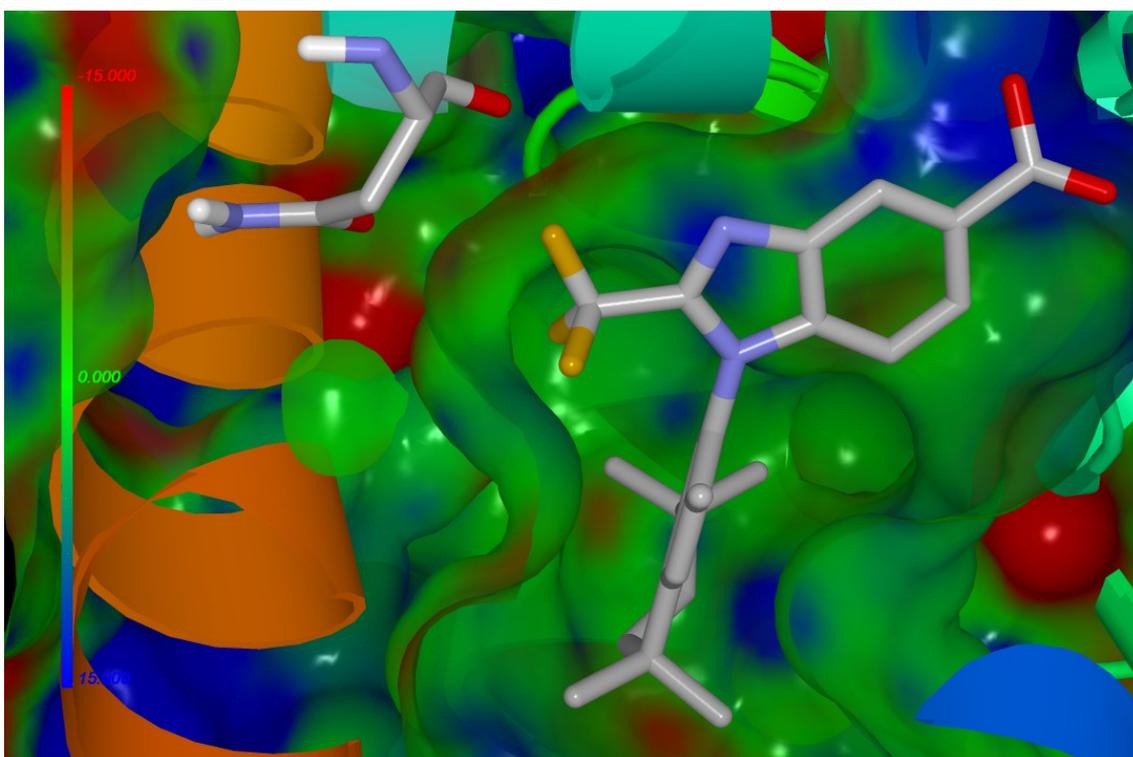
グシミュレーションの結果を示している。



**Figure 2-17.** A) Docking model of RXR partial agonist **8** in the ligand-binding pocket of RXR $\alpha$  (PDB code: 3H0A). H4, H11, and H12 mean Helix 4 (jade green), Helix 11 (orange), and Helix 12 (red), respectively. B) Docking model of RXR full agonist **9a** in the ligand-binding pocket of RXR $\alpha$ . Asn306 mean asparagine 306. C) Docking model of RXR full agonist **9c** in the ligand-binding pocket of RXR $\alpha$ . D) Docking model of RXR partial agonist **9d** in the ligand-binding pocket of RXR $\alpha$ . The asterisk indicates electrostatic repulsion.

CBt-PMN (**8**) およびその誘導体の 5 員環部位の 2 位は、RXR のヘリックス 4 中のアミノ酸残基であるアスパラギン 306 の主鎖の酸素原子と近接していることが示された。また、Figure 2-18 には molfeat を用いて計算した RXR (pdb:

3H0A) の静電ポテンシャルを示している。Asn306 の主鎖の酸素原子周辺は負の静電ポテンシャルを示している。



**Figure 2-18.** Docking model of RXR partial agonist **9d** in the ligand-binding pocket of RXR $\alpha$  (PDB code: 3H0A) and electrostatic potential distribution of RXR $\alpha$ .

従って、ベンズイミダゾール構造 2 位に正の静電ポテンシャルを有している RXR フルアゴニスト CBiM-PMN (**9a**) および **9c** は、H4 の Asn306 との間に静電的引力を示すことが示唆された。一方、ベンズイミダゾール構造 2 位に強い負の静電ポテンシャルを有する **9e** および **9f** では、ベンズイミダゾール構造 2 位と Asn306 との結合は、正の静電ポテンシャルを有する **9a** や **9c** に比べ不利で

ある。

一方、CBt-PMN (**8**) および CBTF-PMN (**9d**) は、ベンズイミダゾール構造 2 位に弱い負の静電気ポテンシャルを有するため、フルアゴニスト **9a** や **9c** に比べ結合は不利ではあるがその程度は **9e** および **9f** ほどではない。

#### 第 7 項 第 2 節のまとめ

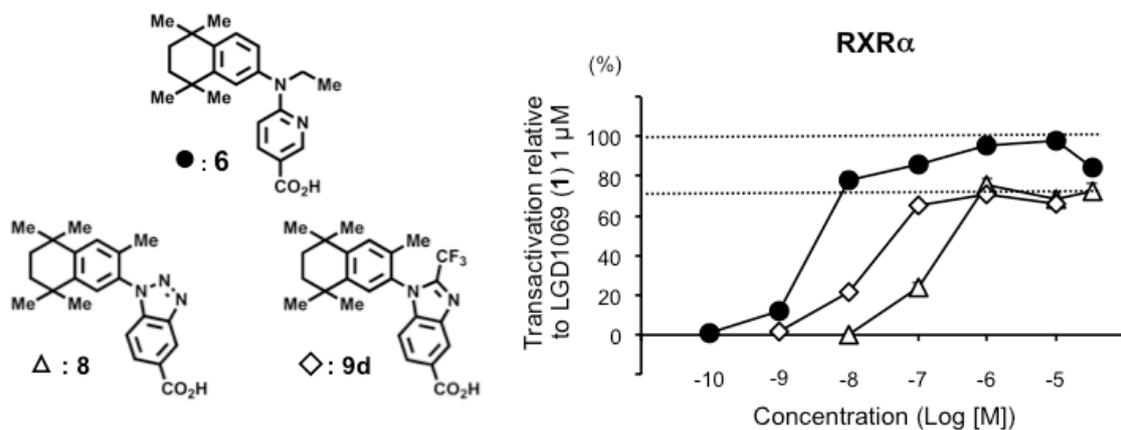
第 2 節で著者は、RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (**8**) の RXR パーシャルアゴニスト活性発現機構の解明を目的に、CBt-PMN (**8**) 誘導体の RXR アゴニスト活性における構造活性相関を行った。CBiM-PMN (**9a**) が RXR フルアゴニスト活性を示したことから、5 員環部位の 2 位の置換基が RXR アゴニスト活性発現に大きく関与していることが推測された。そこで、CBt-PMN 誘導体 **9a-f** について、5 員環部位の 2 位の置換基と RXR アゴニスト活性との相関を調べた。置換基の立体因子や疎水性因子と RXR アゴニスト活性との間に相関を得ることはできなかった。しかし、5 員環部位の 2 位の静電ポテンシャルと RXR アゴニスト活性との間に相関が見られ、5 員環構造 2 位に近接するアミノ酸残基である Asn306 との相互作用が、RXR アゴニスト活性発現に大きく関与している可能性が示唆された。

また、本研究を通して、CBt-PMN (**8**) よりも低濃度で RXR を活性化できる新規 RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (**9d**) を見出すことができた。

### 第3節 新規 RXR パーシャルアゴニスト **9d** による薬効・副作用の分離

第1節では、CBt-PMN (**8**) よりも低濃度で活性を示す RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (**9d**:  $EC_{50} = 15 \text{ nM}$ ,  $E_{\text{max}} = 67\%$ ) を見出した経緯について述べた。Figure 2-19 に、RXR フルアゴニスト NEt-TMN (**6**), RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (**8**), および CBTF-PMN (**9d**) の構造と RXR アゴニスト活性を示している。

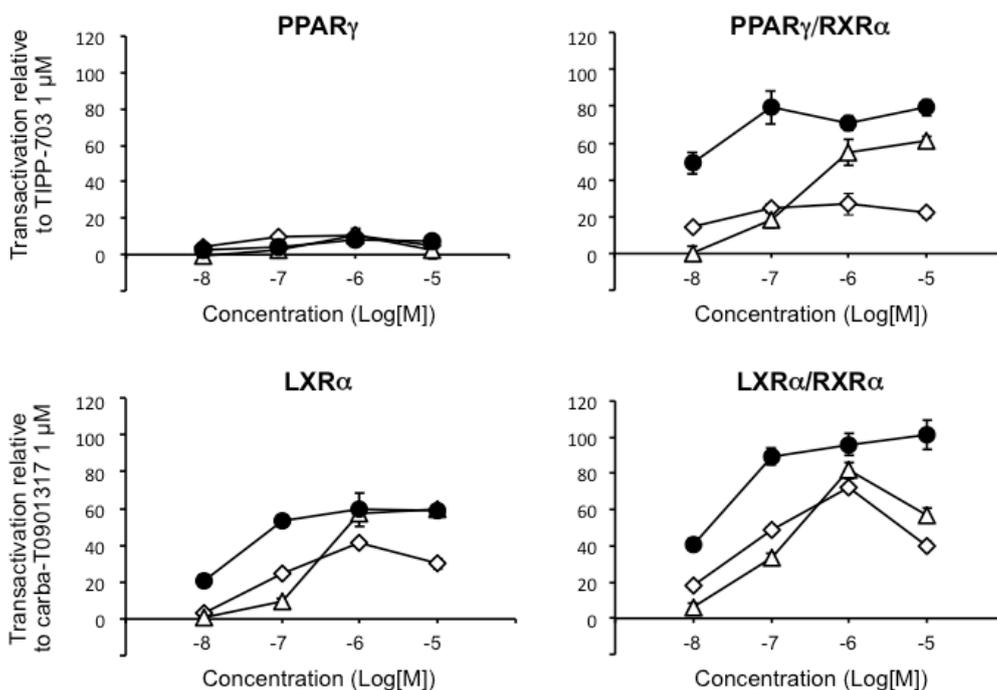
RXR パーシャルアゴニストの *in vivo* における知見は、CBt-PMN (**8**) に限られることから、RXR パーシャルアゴニストにより、薬効と副作用との分離の可能性を一般化するために、本節では CBTF-PMN (**9d**) の *in vivo* 薬効と副作用について述べる。



**Figure 2-19.** Chemical structures and relative transactivation data of **6** (closed circle), **8** (open triangle) and **9d** (open diamond) toward RXRα.

## 第1項 CBTF-PMN (9d) の PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 活性の検討

CBTF-PMN (9d) は, RXR ホモダイマーに対してパーシャルアゴニスト活性を示した. RXR アゴニストの利点は, パーミッシブ機構を介して様々な核内受容体とのヘテロダイマーを活性化し, 相加的な作用を得ることが可能な点であることから, CBTF-PMN (9d) の RXR ヘテロダイマー活性化に注目した. Figure 2-20 には, RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) および CBt-PMN (8) の *in vitro* における PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$  ホモダイマーおよび RXR とのヘテロダイマー活性についての結果を示している. *In vitro* において CBTF-PMN (9d) は, CBt-PMN (8) と同様に PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  を活性化できることから, 本化合物は, パーミッシブ機構により相加的な薬効の発現や総合的な体内環境の改善作用が期待できた.

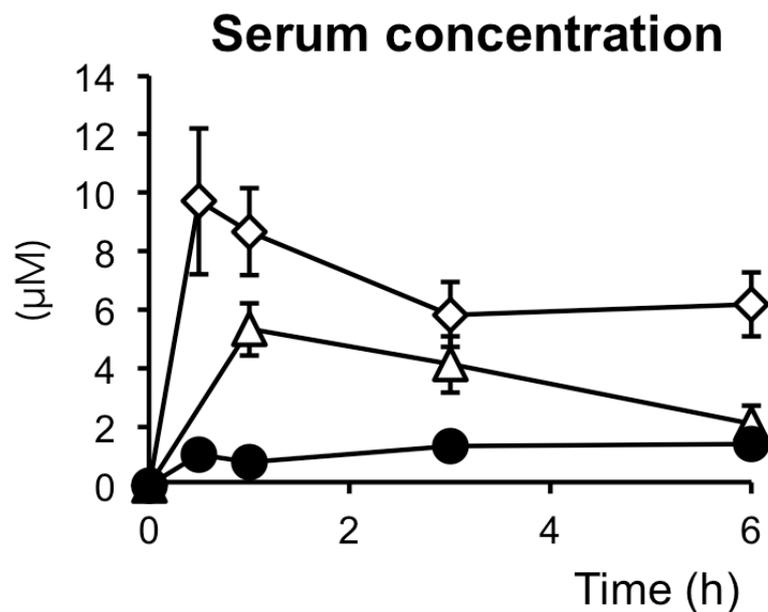


**Figure 2-20.** Relative transactivation data of **6** (closed circle), **8** (open triangle), and **9d** (open diamond) toward PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ , and LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ .

## 第2項 血中濃度測定

薬効評価を検討する前段階として、CBTF-PMN (**9d**) の *in vivo* における血中移行性を検討した。ICR マウスに化合物を 30 mg/kg で経口投与し、経口投与後 0.5, 1.0, 3.0 および 6.0 時間後に採血を行い、岡山大学加来田博貴准教授および県立広島大学田井章弘教授に化合物の血中濃度を測定して頂いた。CBTF-PMN (**9d**) は良好な血中移行性を示し、6.0 時間後においても約 6  $\mu$ M と CBt-PMN (**8**) よりも高い血中濃度を与えた (Figure 2-21)。CBTF-PMN (**9d**) は、30 mg/kg において EC<sub>50</sub> 以上の血中濃度が期待できた。また、NEt-TMN (**6**) および CBt-PMN (**8**) が 10 mg/kg の投与量で薬効を示していることから、CBTF-PMN (**9d**) の薬効につい

では 10 mg/kg/day で、副作用については十分な血中濃度を与える 30 mg/kg/day の投与量で検討することとした。



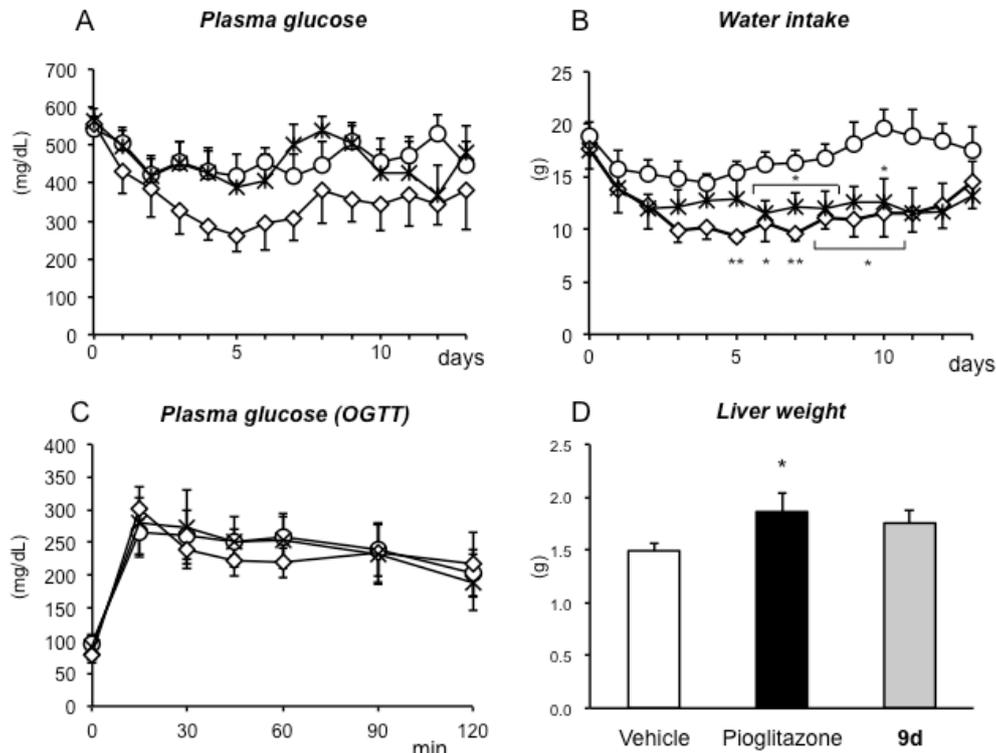
**Figure 2-21.** Plasma concentration of **6** (closed circle), **8** (open triangle) and **9d** (open diamond) in ICR mice (single dose at 30 mg/kg by oral administration).

### 第3項 CBTF-PMN (**9d**) の *in vivo* 薬効評価

RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (**9d**) および既存の経口血糖降下薬であるピオグリタゾンを経口投与した KK-A<sup>y</sup>2 型糖尿病モデルマウスに 10 mg/kg/day で 14 日間、1 日 1 回経口投与し、日々の血糖値変化と飲水量の測定および糖負荷試験 (OGTT) により化合物投与による抗糖尿病作用を検討した (Figure 2-22).

CBTF-PMN (**9d**) の投与により、耐糖能の改善作用は認められなかったものの、高血糖に対する有意な血糖降下作用が示された。また、CBTF-PMN (**9d**) 投与に

より有意な飲水量の減少が観察されたことから、糖尿病の症状である多飲に対する改善が認められ RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) が抗糖尿病作用を示すことを見出した。医薬品として利用されているピオグリタゾンにおいても肝重量増加が見られた上に、CBTF-PMN (9d) に比べその血糖降下作用が弱いものであった。今回、ピオグリタゾンの投与量は RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) と同量である 10 mg/kg/day にて検討したが、ピオグリタゾン投与群では顕著な血糖値降下作用やインスリン抵抗性改善作用は認められなかった。先行研究において、ピオグリタゾンの ED<sub>50</sub> は 29 mg/kg/day であり 10 mg/kg/day ではほぼ血糖降下作用が認められないという報告があることから<sup>53)</sup>、今回のピオグリタゾン投与群の結果は、投与量が少なかったためであると考えられる。

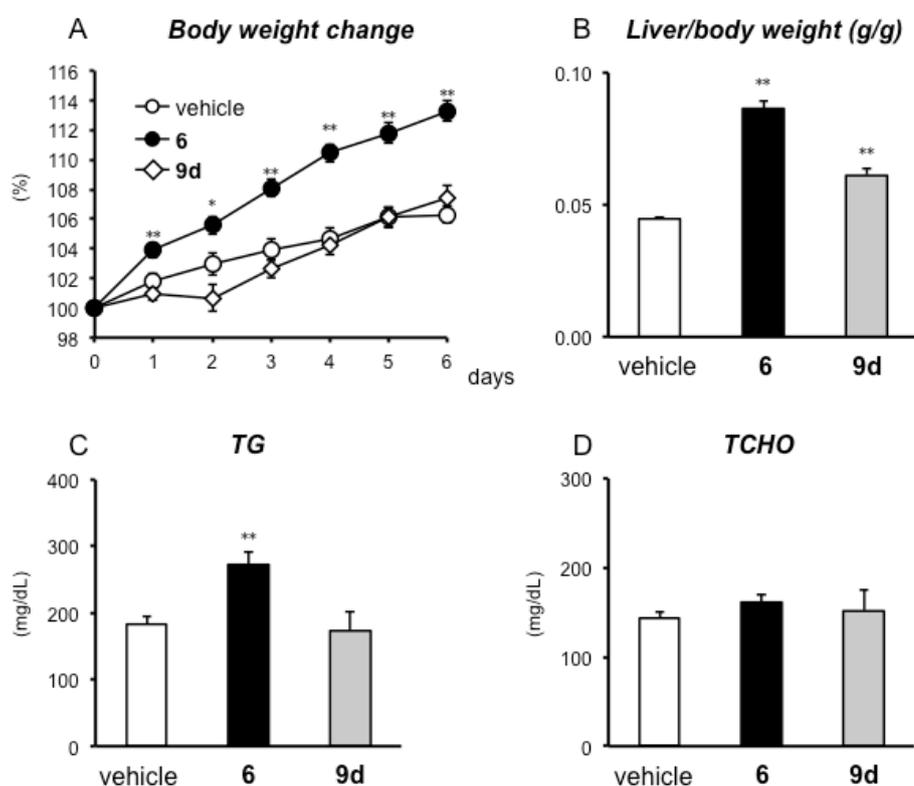


**Figure 2-22.** Evaluation of anti-type 2 diabetes effects of repeated oral administration of **9d** or pioglitazone at 10 mg/kg/day to male KK- $A^y$  mice for 14 consecutive days. A) Time course of blood glucose levels. B) Water intake change. C) Results of oral glucose tolerance tests (OGTT). D) Liver weight gain in male KK- $A^y$  mice treated with vehicle and compounds. Open circle, open diamond and asterisks indicate vehicle, **9d** and pioglitazone, respectively. The data (n = 4–5) represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. Significant difference: \*  $p < 0.05$  **9d** vs vehicle. \*\*  $p < 0.01$  **9d** vs vehicle. †  $p < 0.05$  pioglitazone vs vehicle. ††  $p < 0.01$  pioglitazone vs vehicle.

#### 第4項 CBTF-PMN (**9d**) の *in vivo* 副作用評価

RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (**9d**) は、KK- $A^y$ 2 型糖尿病モデルマウスにおいて、抗糖尿病作用を示した。そこで、RXR パーシャルアゴニストによ

る副作用の軽減化の可能性を立証するべく、CBTF-PMN (**9d**) および RXR フルアゴニスト NEt-TMN (**6**)の投与による副作用について、検討した。ICR マウスに化合物を 30 mg/kg/day で 7 日間、1 日 1 回経口投与し、日々の体重変化と投与最終日翌日の肝臓肥大率、血中 TG 値、および血中 TCHO 値と各種血清パラメータを測定した (Figure 2-23, Table 2-5).



**Figure 2-23.** Evaluation of adverse effects of repeated oral administration of compounds at 30 mg/kg/day to male ICR mice for 7 consecutive days. A) Time course of body weight change. Open circle, closed circle and open diamond indicate vehicle, **6** and **9d**, respectively. B) Effects of compounds on liver weight gain. C) Effects of compounds on serum triglyceride. D) Effects of compounds on total cholesterol. The data (n = 7–23) represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. Significant difference: \* p < 0.05 vs vehicle. \*\* p < 0.01 vs vehicle.

RXR フルアゴニスト NEt-TMN (**6**) 投与群では、有意な体重増加が見られたが、RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (**9d**) 投与群の体重増加は、化合物非投与群と同程度であった。更に、CBTF-PMN (**9d**) 投与による肝臓肥大は、RXR フルアゴニスト投与群に比べ緩やかであり、血中 TG 値の上昇は観察されなかった。

**Table 2-5.** Plasma parameters of male ICR mice after oral administration of vehicle, **6** or **9d** at 30 mg/kg/day for 7 consecutive days (n = 8–16)

	Vehicle	<b>6</b>	<b>9d</b>
AST (U/I)	54.6 ± 3.8	87.9 ± 18.9 *	70.1 ± 6.5 *
ALT (U/I)	22.3 ± 1.5	43.5 ± 6.0 **	26.5 ± 2.1
γ-GTP (U/I)	6.1 ± 0.7	7.1 ± 0.3	4.5 ± 0.6
ALP (U/I)	281.3 ± 15.7	968.9 ± 115.0 **	381.6 ± 58.9 *
CRE (mg/dL)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
BUN (mg/dL)	24.1 ± 1.0	26.0 ± 1.8	24.8 ± 2.1

AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase,

γ-GTP : γ-glutamyltranspeptidase, ALP : alkaline Phosphatase,

CRE : creatinine, BUN : blood urea nitrogen,

Data are mean ± SEM; Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA)

followed by Bonferroni test. Significant differences: \* p < 0.05 vs. vehicle. \*\* p < 0.01 vs. vehicle.

化合物投与最終日翌日の各種血清パラメータの測定を行ったところ、腎臓毒性の指標である CRE 値や BUN 値は化合物非投与群と同程度であった。一方で CBTF-PMN (**9d**) 投与群では、フルアゴニスト投与群に見られる ALT 値の有意な上昇は観察されなかった。AST 値および ALP 値は、化合物非投与群に比べ有

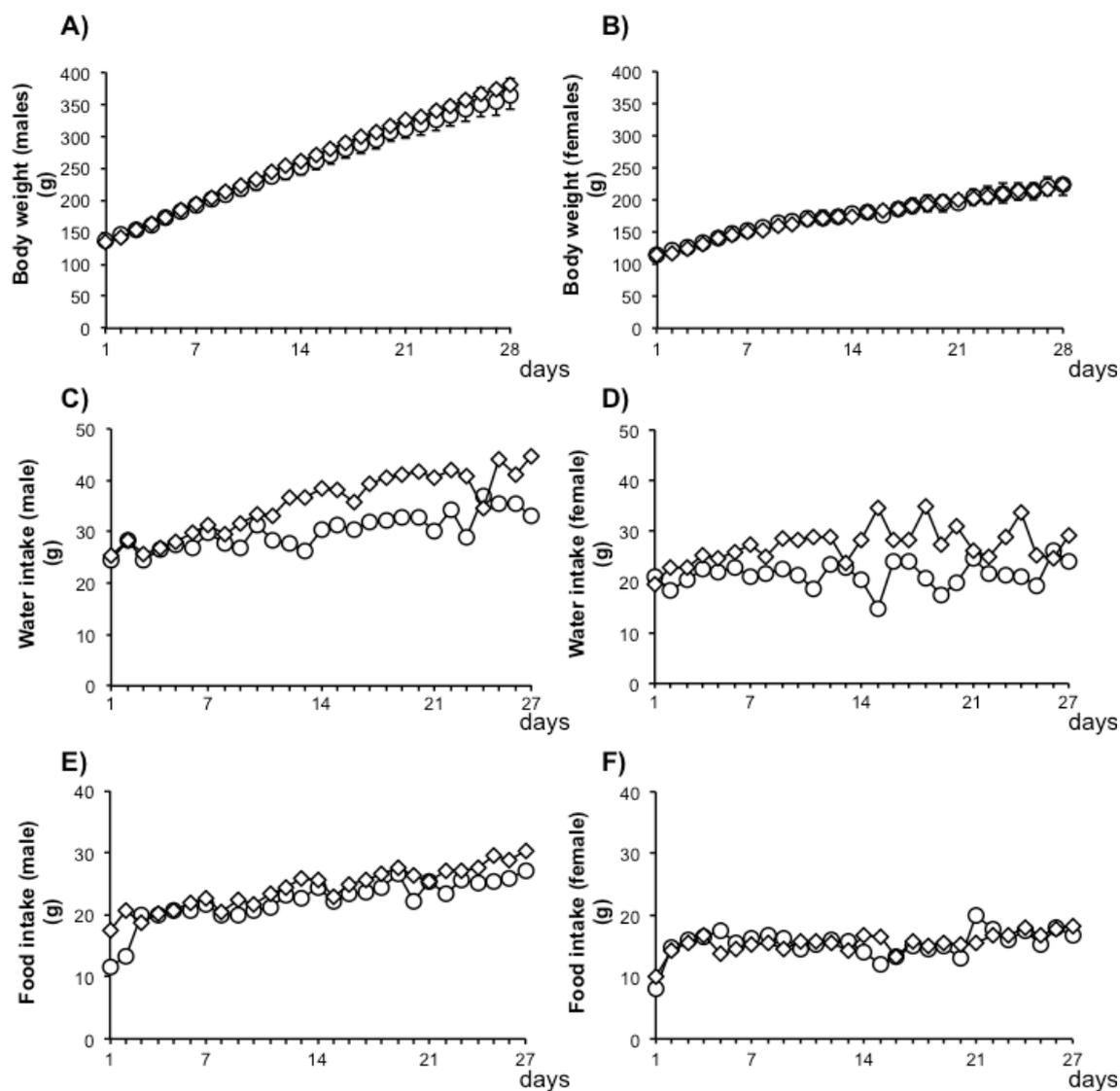
意に上昇していたものの、それらの上昇はフルアゴニスト投与群と比較し緩やかであった。AST 値, ALT 値, および ALP 値は、肝臓毒性の指標であるが、RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) 投与に見られた肝臓肥大は、RXR フルアゴニスト NEt-TMN (6) に比較し軽度であった。

#### 第 5 項 CBTF-PMN (9d) の長期間投与における副作用発現評価

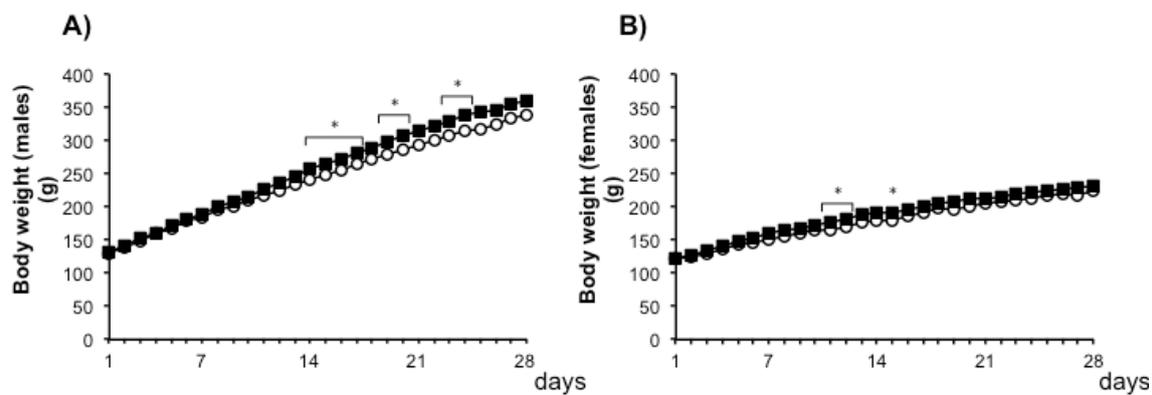
ICR マウスでの 7 日間投与において、CBTF-PMN (9d) が体重増加や血中 TG 値上昇などの RXR フルアゴニストに見られる副作用は軽減していたことから、本化合物の長期間投与による副作用発現の有無に興味を持たれた。

そこで、RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) を SD ラットに 30 mg/kg/day で 28 日間、1 日 1 回経口投与し、測定した日々の体重、食餌量、および飲水量を Figure 2-24 に示している。また、比較対象として RXR フルアゴニスト NEt-3IB (7b) を、SD ラットに 30 mg/kg/day で 28 日間、1 日 1 回経口投与し、測定した日々の体重を Figure 2-25 に示している<sup>54)</sup>。その結果、RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) は、RXR フルアゴニスト NEt-3IB (7b) に見られた顕著な体重増加を引き起こさないことが分かった。次に、RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) 投与最終日翌日の各種血清パラメータおよび臓器重量の測定を行い、長期投与における副作用発現の有無を検討した (Tables 2-6, 2-7)。その結果、ICR マウスでの副作用発現評価の結果と同様に、CBTF-PMN (9d) は長期投与においても血中 TG 値上昇等の副作用を発現しないことがわかった。血清パラメータについては、化合物非投与群と比較し有意な上昇を示した項目は

あったものの、雄ラットにおける ALT 値および雌ラットにおける血中 TCHO 値以外は実験動物供給元の基準値とほぼ同程度であった。肝臓毒性については、AST 値や ALT 値, ALP 値など複数の項目から判断される。今回の雄ラットでは、ALT 値の上昇のみであったためその肝臓毒性は重篤なものではないと考えられる。一方で、雌ラットにおける血中 TCHO 値上昇については今回の実験結果からはその機序について説明することはできず、今後の検討課題であると言える。また、臓器重量に関しては ICR マウスと同様に肝臓重量の増加が見られ、雄マウスにおいては脾臓重量の増加が見られたものの、その他の臓器については化合物非投与群とほぼ同程度であった。以上の結果から、RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) は長期投与においても、既存 RXR フルアゴニストに見られる副作用の軽減化が可能であることが示された<sup>55)</sup>。



**Figure 2-24.** Body weight gain, water intake change, and food intake change of male or female SD rats treated with oral administration of vehicle or **9d** at 30 mg/kg/day for 28 consecutive days (n = 3–6). A–B) Body weight gain. C–D) Water intake change. E–F) Food intake change. Males: A, C and E. Females: B, D and F. Open circle and open diamond indicate vehicle and **9d** treatment, respectively.



**Figure 2-25.** Body weight gain of male or female SD rats treated with oral administration of vehicle or NET-31B (**7b**) at 30 mg/kg/day for 28 consecutive days (n = 3–6). A) Time-dependent change of male SD rat's body weight for 28 days. B) Time-dependent change of female SD rat's body weight for 28 days. Open circle and closed square indicate vehicle and NET-31B (**7b**) treatment, respectively. Statistical analysis was performed by t-test. Significant differences: \* p < 0.05 vs. vehicle. \*\* p < 0.01 vs. vehicle.

**Table 2-6.** Plasma parameters of male and female SD rats after oral administration of vehicle or **9d** at 30 mg/kg/day for 28 consecutive days (n = 2–6)

	Male			Female		
	Vehicle	<b>9d</b>	Reference <sup>a</sup>	Vehicle	<b>9d</b>	Reference <sup>a</sup>
AST (U/I)	65.7 ± 6.3	91.7 ± 3.7 **	87.0–114.0	69.7 ± 4.8	67.8 ± 2.1	85.0–123.0
ALT (U/I)	30.0 ± 1.7	50.2 ± 2.3 **	28.0–40.0	21.7 ± 1.2	37.0 ± 1.2 **	25.0–36.0
γ-GTP (U/I)	6.7 ± 0.9	7.0 ± 0.0	0.0–1.0	7.0 ± 0.6	5.8 ± 0.2 *	0.0–0.4
ALP (U/I)	703.7 ± 58.6	864.0 ± 94.2	–	382.5 ± 46.5	387.7 ± 31.4	–
CRE (mg/dL)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.5–0.6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.5–0.6
BUN (mg/dL)	15.5 ± 0.4	14.4 ± 1.4	13.0–16.0	14.5 ± 0.6	15.5 ± 2.0	11.0–16.0
TG (mg/dL)	61.3 ± 9.9	49.0 ± 4.6	61.0–99.0	18.7 ± 4.1	45.2 ± 4.6 **	42.0–74.0
TCHO (mg/dL)	50.0 ± 2.5	60.3 ± 4.0	54.0–74.0	57.7 ± 6.9	99.7 ± 6.4 **	67.0–87.0

a. These data are taken from the Clinical Laboratory Parameters for Crl:CD (SD) Rats (CRL\_Mar, 2006) by Charles River®. Data are mean ± SEM.; Statistical analysis was performed by t-test. Significant differences: \* p < 0.05 vs. vehicle. \*\* p < 0.01 vs. vehicle.

**Table 2-7.** Organ weights of male or female SD rats after oral administration of vehicle or **9d** at 30 mg/kg/day for 28 consecutive days (n = 3–6).

	Male		Female	
	Vehicle	<b>9d</b>	Vehicle	<b>9d</b>
Weight (g)	339.0 ± 19.1	352.1 ± 7.0	210.2 ± 13.7	206.1 ± 5.4
Brain (g)	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.0	1.8 ± 0.0
Liver (g)	10.2 ± 0.8	12.7 ± 0.6 *	5.7 ± 0.4	7.6 ± 0.1 **
Kidney (g)	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1
Spleen (g)	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0 *	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1
Testis (g)	6.1 ± 0.2	6.4 ± 0.2		

Data are mean ± SEM.; Statistical analysis was performed by t-test. Significant differences: \* p < 0.05 vs. vehicle. \*\* p < 0.01 vs. vehicle.

## 第6項 第3節のまとめ

本節で著者は、RXR パーシャルアゴニストによる薬効と副作用との分離の可能性について検証するために、前章にて見出した新規 RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) の薬効および副作用の発現について検討した。

KK-A<sup>y</sup>2 型糖尿病モデルマウスにおける薬効を検討した結果、CBTF-PMN (9d) 投与により高血糖の改善、飲水量の低下が見られ、本化合物は、抗糖尿病作用を有することが明らかとなった。次に、ICR マウスを用いた7日間連続投与による副作用について検討した。CBTF-PMN (9d) 投与により肝臓重量の増加は見られたものの、血中 TG 値上昇などの RXR フルアゴニスト投与に見られる副作用発現は回避していた。また、CBTF-PMN (9d) 投与群の肝臓重量については、フルアゴニスト投与群に比べその増加の程度は緩やかであった。以上の結果より、CBTF-PMN (9d) が、KK-A<sup>y</sup>2 型糖尿病モデルマウスにおいて抗糖尿病作用を示しつつ、RXR フルアゴニストの示す副作用を回避できる化合物であることを見出すことができた。

本研究成果と当研究室の加来田らがこれまでに報告した RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8) における知見は、RXR パーシャルアゴニストにより薬効と副作用との分離が可能であることを支持する知見であり、RXR アゴニストの副作用の軽減化の手法として、RXR パーシャルアゴニストから検討するというアプローチが有効であることを提示できた。また、本研究を通じて、RXR アゴニストの抗糖尿病作用の閾値が副作用発現の閾値に比べ低い可能性を示唆することができた。

## 総括および展望

現在問題となっているがんや糖尿病, アルツハイマー病等の多因子性疾患への創薬手法として, 体内環境改善型創薬 (体内恒常性維持)からのアプローチが有効と考えた. 核内受容体の一つである RXR は, 糖・脂質代謝に関与する様々な核内受容体と協働的に機能し、総合的に体内環境を整えることが可能な多機能性受容体であることから, 著者は, RXR アゴニストが, 体内環境改善型創薬のアプローチを可能にするものと考えた. しかしながら, RXR アゴニストはその投与により体重増加や血中 TG 値の上昇および肝臓肥大などの副作用発現が問題である. そこで著者は, これまでの RXR アゴニストに見られた副作用を軽減しつつ薬効を示す RXR アゴニストの創出を目的として本研究に着手した.

第 1 章で著者は, 副作用である血中 TG 値上昇の要因として報告されている LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性化能を抑えた RXR アゴニストであれば副作用が回避出来るのではと仮説を立て, 本研究を行った. 当研究室で創出された RXR アゴニスト NEt-3IP およびそのアルコキシ部位を種々変換した化合物について RXR 活性を調べた後, PPAR $\gamma$  および LXR $\alpha$  との RXR ヘテロダイマーに対する活性を調べた結果, **7a** が他の RXR アゴニストである **6** や **7b** に比べ LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  活性を抑えていることを見出した. そこで, 本化合物により, 薬効と副作用との分離が可能と考え, *in vivo* 薬効・副作用についての検討を行ったところ, **7a** は KK-A<sup>y</sup>2 型糖尿病モデルマウスに対して血糖降下作用を示したものの, 血中 TG 値上昇等の副作用も見られた.

第2章では、副作用を示した RXR アゴニストが RXR を 100%活性化するフルアゴニストであることに着目し研究を展開した。RXR アゴニストの副作用は、RXR の過度な活性化に起因するものであり、薬効を得るには RXR の適度な活性化で十分であると考え、RXR パーシャルアゴニストであれば薬効・副作用分離が可能であると仮説を立て、本研究を行った。

第1節では、共同研究者とともに RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8) の創出を行い、本化合物が KK-A<sup>y</sup>2 型糖尿病モデルマウスでは、血糖降下作用を示すことに加え、RXR フルアゴニストに見られる副作用が回避できることを確認した。さらに、CBt-PMN (8) 投与による糖・脂質代謝に関連した遺伝子発現についての評価を行った。その結果、CBt-PMN (8) の投与により *Gck* の有意な増加が認められ、CBt-PMN (8) の血糖降下作用は *Gck* の上昇による解糖系の亢進である推測された。また、RXR フルアゴニスト NEt-TMN (6) 投与群では *Scd1* や *Fasn* が有意に上昇していたのに対し、RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (8) ではその上昇が見られなかったことから、血中 TG 値の上昇などの副作用を回避した要因であると考えられた。

第2節では、CBt-PMN (8) の RXR パーシャルアゴニスト活性発現機構を解明することを目的に、研究を行った。CBt-PMN (8) 誘導体の RXR アゴニスト活性を検討した結果、誘導体では RXR フルアゴニストは 5 員環部位の 2 位に正の静電ポテンシャルを、RXR パーシャルアゴニストは弱い負の静電ポテンシャルを有することを見出した。5 員環部位の 2 位は、RXR ヘリックス 4 の Asn306 のカルボニル酸素と近接しており、RXR パーシャルアゴニストは、フルアゴニストと比較し Asn306 との結合が不利となるこ

とでパーシャルアゴニスト活性を示したと推測された。さらに、CBt-PMN (8) よりも一桁  $EC_{50}$  が小さく、同程度に  $E_{max}$  値を示す RXR パーシャルアゴニスト CBTF-PMN (9d) を見出すことが出来た。

第3節では、RXR パーシャルアゴニストによる薬効と副作用との分離の可能性を実証すべく、CBTF-PMN (9d) の *in vivo* における薬効と副作用の検討を行った。その結果、CBTF-PMN (9d) はわずかな肝臓肥大はみられたもののその程度は RXR フルアゴニストに比べ小さく、既存 RXR フルアゴニストの示す体重増加や血中 TG 値上昇などの副作用も回避しつつ、抗糖尿病薬効作用を与えた。RXR パーシャルアゴニストである CBt-PMN (8) と CBTF-PMN (9d) のこれらの動物実験の結果は、RXR アゴニストによる薬効と副作用の発現には、異なる閾値があるという仮説を立証できたものと考えている。

RXR アゴニストは、抗糖尿病作用の他にも抗がん作用<sup>56)</sup>や抗メタボリック作用<sup>15)</sup>、抗アルツハイマー病作用<sup>16)</sup>などの様々な薬効が報告されている。今後、本研究成果に基づき RXR パーシャルアゴニストが創出されることで、副作用を低減した RXR アゴニストが多因子性疾患の治療薬候補物質として展開されていくことに期待したい。

## 謝辞

本論文に関し、御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科合成薬品製造学分野 竹内靖雄教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科合成薬品開発学分野 加来田博貴准教授に衷心より感謝の意を表します。

主査として本論文について議論頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科創生医薬化学分野 宮地弘幸教授に深謝致します。また、宮地弘幸教授には、PPAR アゴニスト TIPP-703 および LXR アゴニスト carba-T0901317 を譲渡頂きました。重ねてお礼申し上げます。

副査として本論文について議論頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科構造生物薬学分野 山下敦子教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科創生医薬化学分野 松野研司准教授に深謝致します。

*In vitro* 実験に使用したプラスミドを提供してくださいました日本大学医学部生体機能医学系生化学分野 榎島誠教授に厚く御礼申し上げます。

*In vivo* 実験に際し、御協力賜りました京都薬科大学代謝分析学分野 吉川豊講師に厚く御礼申し上げます。

化合物の血中濃度測定実験において、ご支援頂きました県立広島大学生命環境学部生命科学科 田井章博教授に深く感謝申し上げます。

RT-PCR による実験に際し、ご支援頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科分子医化学分野 大橋俊孝准教授に深く感謝申し上げます。

RXR $\alpha$  蛋白質を提供くださいました静岡県立大学環境科学研究所環境微生物学研

研究室 内藤博敬助教に深く感謝申し上げます。

本研究に際し、様々な御協力を頂いた合成薬品開発学諸氏に感謝致します。

## 実験の部

### Reagents

All reagents were purchased from Kanto chemical, Nacalai Tesque, Sigma-Aldrich, TCI chemical companies or Wako pure chemical industries unless otherwise specified.

LGD1069 (**1**) was prepared according to reference 20.

NEt-TMN (**6**) was prepared according to reference 27.

NEt-3IP (**7a**) and NEt-3IB (**7b**) were prepared according to reference 28.

Compounds **7c-7m** were prepared according to reference 29.

CBt-PMN (**8**) and CBiM-PMN (**9a**) were prepared according to reference 33.

Compounds **9b-9f** were prepared according to reference 54.

TIPP-703 and carba-T0901317 were kindly provided from Dr. Hiroyuki Miyachi (Division of Pharmaceutical Sciences, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences).

Pioglitazone (as hydrochloride) was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

### ***Culture of COS-1 cells.***

COS-1 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS, NaHCO<sub>3</sub> (1.0 g), L-glutamine (0.292 g), penicillin (25,000 Units) and streptomycin (25,000 µg) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C.

### ***Luciferase reporter gene assay.***

Plasmids used luciferase reporter gene assay were kindly provided from Dr. Makoto Makishima (Division of Biochemistry, Department of Biomedical Sciences, Nihon University School of Medicine).<sup>57-59)</sup>

Luciferase reporter gene assays were performed using COS-1 cells transfected with three kinds of vectors: each receptor subtype (CMX-hRXR $\alpha$ , CMX-hPPAR $\gamma$  and CMX-hLXR $\alpha$ ), a luciferase reporter gene under the control of the appropriate NR response element, and secreted alkaline phosphatase (SEAP) gene as a background.<sup>60)</sup> CRBP-II-tk-Luc, tk-PPREx3-Luc, and tk-rBARx3-Luc reporters were used as RXR, PPAR, and LXR response elements, respectively. The amounts of each receptor subtype and response element were 1.0 µg and 4.0 µg,

respectively. In the case of heterodimer assay, RXR $\alpha$  (0.5  $\mu$ g), each partner receptor (PPAR $\gamma$  or LXR $\alpha$ , 0.5  $\mu$ g) and the partner response element (4.0  $\mu$ g) were transfected into COS-1 cells. Transfection was performed with QIA Effectene Transfection Reagent (QIAGEN) according to the supplier's protocol (lipofection method). Cells in 60 mm tissue culture plates were incubated at 37°C with medium with a transfection mixture composed of plasmid and Effectene reagents. Test compound solutions (DMSO concentration 1%) were added to the suspension of transfected cells, which were seeded at about  $2.0 \times 10^4$  cells/well in 96-well white plates. After incubation in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 18 h, 25  $\mu$ L of the medium was used for analyzing SEAP activities and the remaining cells were used for luciferase reporter gene assays with a Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega). The luminescence was measured in a Tecan Infinite F200 multimode plate reader. SEAP activities were detected by the fluorescence assay using 4-methylumbelliferyl phosphate as a fluorescent substrate. SEAP activities were measured at an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 465 nm in a Tecan Infinite F200 multimode plate reader. Luciferase values were normalized using SEAP activities to control for transfection efficiency. The assays were carried out in triplicate three times.

#### *Production and purification of RXR $\alpha$ protein.*

RXR $\alpha$  protein was kindly provided from Dr. Hirotaka Naito (Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka) as following method.

Production and purification of recombinant RXR $\alpha$  protein were done using the GATEWAY<sup>TM</sup> technology.<sup>61,62</sup> Destination vectors were generated by insertion of human RXR $\alpha$  DNA (Ultimate<sup>TM</sup> Human ORF Clone, Invitrogen)<sup>63</sup> into a pDEST17 vector (Invitrogen), and were transformed into *E. coli* BL21-AI cells (Invitrogen) by means of LR reaction. These cells were used as expression clones. The expression clones were cultured in LB medium containing 100  $\mu$ g/mL ampicillin at 37°C with shaking until the OD<sub>600</sub> reached 0.6 to 1.0, and then were diluted to OD 0.1 at 600 nm. After addition of 0.2% L-arabinose and 0.1% glucose to the culture during the exponential phase of growth (OD 0.4 at 600 nm), cells were cultured for 2 hours and then harvested. The cell pellets were resuspended in Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% SDS, 1.0% Triton X-100, 1 mM PMSF) at 4°C. The RXR protein was purified using a His GraviTrap column (GE Healthcare)<sup>64</sup> to give 2.2 mg/L pure protein in the culture medium.

#### *Fluorescence polarization assay.*

Fluorescein-labeled co-factor peptides were purchased from Invitrogen. Assays were performed in 96-well half area black plates (Greiner) in a final volume of 40  $\mu$ L. All reagents were diluted in phosphate buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.2, 154 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 0.01% NP40), and the final DMSO concentration in the assay mixtures was adjusted to 1%. The mixtures containing fluorescein-labeled co-factor peptide, RXR $\alpha$  and various RXR ligands in phosphate buffer were incubated for 1 h at 25°C. The fluorescence polarization of the mixtures was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm. Fluorescence polarization measurements were made with a TECAN Polarion. Fluorescence polarization is the ratio of the difference between the intensities of parallel and perpendicularly polarized fluorescent light to the total light intensity.

#### *Electrostatic potential fields of compounds and molecular docking.*

The crystal structure of human RXR $\alpha$  ligand binding domain was retrieved from the Brookhaven Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do>. Polar hydrogen atoms were added to both the protein and the ligand. United atom Kollman charges were assigned for the protein. The 3D structures of ligands used for the docking study were constructed by using Spartan® (Wavefunction, Inc.). After semi-empirical pm3 calculations, 6-31G\* *ab initio* calculations were performed to find the lowest energy conformers. The electrostatic potential fields (ESP) were drawn with Spartan®. The AutoDock4.2 molecular docking program<sup>65</sup> was employed by using a genetic algorithm with local search (GALS). One hundred individual GA runs, 150 chromosomes, a crossover ratio of 0.80, a rate of gene mutation of 0.02, and an elitism ratio of 0.10 were used for each ligand. The grid box was created with dimensions of 40  $\times$  40  $\times$  40  $\text{\AA}^3$ , which encloses the original ligand. Molfeat (FiatLux Co., Tokyo, Japan) was used for molecular modeling.

#### *Electrostatic potential field of RXR (3H0A).*

The electrostatic potential fields (ESP) were drawn with Molfeat after docking simulation using Autodock 4.2 molecular docking program. The calculation parameter of dielectric constant and radius of water molecule were 4.0r (threshold is 10  $\text{\AA}$ ) and 1.4  $\text{\AA}$ , respectively. The calculated ESP was displayed on the solvent-accessible surfaces (1.4  $\text{\AA}$ ) of protein.

***Measurement of serum concentration of test compounds after oral administration at 30 mg/kg to mice.***

Groups of six-week-old ICR male mice (n = 6-9 in each) were treated with solutions of test compounds 30 mg/kg (1% ethanol and 0.5% CMC in distilled water) at a volume of 10 mL/kg of body weight by oral administration. At the indicated times, 0.6 mL of blood was taken from the inferior vena cava under diethyl ether anesthesia. Each blood sample was centrifuged at  $1,900 \times g$  for 5 min at r.t. To 100  $\mu$ L of the resulting plasma were added 100  $\mu$ L of ice-cold 5 mM ammonium acetate solution (adjusted with acetic acid to pH 5.0) and 1 mL of ice-cold ethyl acetate. The resulting mixture was vortexed for 30 sec, kept at room temperature for 10 min, and centrifuged at  $1,900 \times g$  for 30 sec at room temperature. An 800  $\mu$ L aliquot of the ethyl acetate phase was removed and concentrated to dryness in a centrifugal evaporator. To the resulting residue was added 100  $\mu$ L of HPLC-grade methanol. This solution was directly subjected to HPLC analysis, and the concentration of each compound was determined from the peak area of the sample with reference to a calibration plot obtained with the authentic compound. This experiment was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experiments at Okayama University Advanced Science Research Center, and all procedures were approved by the Animal Research Control Committee of Okayama University.

***HPLC conditions.***

The HPLC system used in this study was a Shimadzu liquid chromatographic system (Kyoto, Japan) consisting of an SCL-10A system controller, LC-10AD pump, SPD-10AV UV-Vis spectrophotometric detector, SIL-10AD autoinjector, CTO-10A column oven, DGU-14A degasser and C-R7A Chromatopac. The samples (each 20  $\mu$ L) were injected using a refrigerated autosampler kept at 10°C. The chromatographic analyses were carried out on an Inertsil ODS-3 (4.6 i.d. x 250 mm, 5  $\mu$ m, GL Sciences, Tokyo, Japan) kept at 40°C, using methanol : 33.3 mM ammonium acetate (adjusted with acetic acid to pH 5.0) (85 : 15, v/v) as a mobile phase. The flow rate was 0.7 mL/min and the absorbance was monitored at 280 nm.

***Evaluation of blood glucose-lowering activities of 12d or pioglitazone in KK-A<sup>y</sup> mice.***

Four-week-old male KK-A<sup>y</sup> mice were purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). The KK-A<sup>y</sup> mice were allowed free access to solid food and tap water. After arrival of the animals,

all were group-housed and acclimated to the colony for 6 weeks before the experiment. Before the experiment, they were housed with one mouse per cage, with free access to water and chow pellets. The animals were housed in an air-conditioned room at a temperature of  $23 \pm 1$  °C and a humidity of  $60 \pm 10\%$ , with lights on from 8:00 a.m. to 20:00 p.m.. Before experiments, mice were assigned to experimental groups so as to minimize the variance between groups based on the blood glucose level (one per cage ( $17 \times 33 \times 15$  cm)). Body weight and water intake change was measured at approximately 10:00 a.m. every day for 14 days before dosing. Mice were administered orally with a solution of test compound at a dose of 10 mg/kg or with the vehicle (1% ethanol and 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) in distilled water) at a volume of 10 mL/kg of animal at approximately 10:00 a.m. every day for 14 days. At day 15, oral glucose tolerance test (OGTT) was performed and animals were fasted from 17:00 p.m. and given water *ad libitum*. On the next day, at approximately 10:00 a.m., animals were weighed and anesthetized with diethyl ether. Blood was removed immediately and centrifuged in an Eppendorf sample tube to obtain serum. Each blood sample was centrifuged at  $1,900 \times g$  for 5 min at r.t.. This experiment was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experiments at Okayama University Advanced Science Research Center, and all procedures were approved by the Animal Research Control Committee of Okayama University.

***Glucose Level in Blood in KK-A<sup>y</sup> mice.***

Samples for measurements of fed blood glucose level were taken from the tail vein of the mice, and glucose was measured by using the glucose oxidase method (Medisafe-mini, TERUMO, Tokyo, Japan).

***Oral glucose tolerance test (OGTT).***

KK-A<sup>y</sup> mice treated with each compound for 14 days were fasted for 17 h, and orally given glucose solution (100 mg glucose in 1 mL distilled water) at a dose of 1 g/kg body weight. At 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after the glucose loading, blood glucose level was measured as described above.

***Observation of side effects after once-daily oral administration at 30 mg/kg for 7 consecutive days in male ICR mice.***

Six- to seven-week-old male ICR mice were purchased from Charles River Laboratories Japan,

Inc.. After arrival of the animals, all were group-housed and acclimated to the colony for 1 or 2 days before the experiment. Before the experiment, they were housed with four mice per cage, with free access to water and chow pellets. The animals were housed in an air-conditioned room at a temperature of  $23 \pm 1$  °C and a humidity of  $50 \pm 20\%$ , with lights on from 8:00 a.m. to 20:00 p.m.. Before experiments, mice were assigned to experimental groups so as to minimize the variance between groups based on the measured weight (four per cage ( $17 \times 33 \times 15$  cm)). Body weight was measured at approximately 10:00 a.m. every day for 7 days before dosing. Mice were administered orally with a solution of test compound at a dose of 30 mg/kg or with the vehicle (1% ethanol and 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) in distilled water) at a volume of 10 mL/kg of animal at approximately 10:00 a.m. every day for 7 days. On the final day of dosing, animals were fasted from 17:00 p.m. and given water *ad libitum*. On the next day, at approximately 10:00 a.m., animals were weighed and anesthetized with diethyl ether. Blood and liver were removed immediately, and the liver was weighed. Approximately 1 mL of blood in an Eppendorf sample tube was centrifuged to afford a serum sample. Each blood sample was centrifuged at  $1,900 \times g$  for 5 min at rt. This experiment was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experiments at Okayama University Advanced Science Research Center, and all procedures were approved by the Animal Research Control Committee of Okayama University.

***Observation of side effects after once-daily oral administration at 30 mg/kg for 28 consecutive days in SD rats.***

Four-week-old male and female SD rats were purchased from Charles River Laboratories Japan, Inc.. After arrival of the rats, all were group-housed and acclimated to the colony for 6 (male) or 7 (female) days before the experiment. Before the experiment, they were housed with two rats per cage, with free access to water and chow pellets. The animals were housed in an air-conditioned room at a temperature of  $23 \pm 1$  °C and a humidity of  $50 \pm 20\%$ , with lights on from 8:00 a.m. to 20:00 p.m.. Before experiments, rats were assigned to experimental groups so as to minimize the variance between groups based on the measured weight (two per cage ( $25.0 \times 41.5 \times 19.0$  cm)). Body weight, water intake change and food intake change were measured at approximately 10:00 a.m. every day for 28 days before dosing. Rats were administered orally with a solution of test compound at a dose of 30 mg/kg or with the vehicle (1% ethanol and 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) in distilled water) at a volume of 5 mL/kg of animal at

approximately 10:00 a.m. every day for 28 days. On the final day of dosing, animals were fasted from 17:00 p.m. and given water *ad libitum*. On the next day, at approximately 10:00 a.m., animals were weighed and anesthetized with isoflurane. Blood, liver, brain, kidney, spleen, and testis (male only) were removed immediately. The liver, brain, kidney, spleen, and testis were weighed and frozen with liquid nitrogen. Approximately 10 mL of blood in a centrifuge tube was centrifuged at  $2,000 \times g$  for 10 min at 4°C to obtain a serum sample. This experiment was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experiments at Okayama University Advanced Science Research Center, and all procedures were approved by the Animal Research Control Committee of Okayama University.

***Measurements of blood parameters.***

All values were measured by using a Fuji Dry Chem system (Dry Chem 4000V, Fuji Medical Co., Tokyo, Japan) according to the supplier's protocol.

## 参考文献

- (1) Leid, M.; Kastner, P.; Chambon, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 427–433.
- (2) de Lera, A. R.; Bourguet, W.; Altucci, L.; Gronemeyer, H. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 811–820.
- (3) Glass, C. K.; Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 121–141.
- (4) Mangelsdorf, D. J.; Evans, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **1995**, *83*, 841–850.
- (5) Svensson, S.; Ostberg, T.; Jacobsson, M.; Norström, C.; Stefansson, K.; Hallén, D.; Johansson, I. C.; Zachrisson, K.; Ogg, D.; Jendeborg, L. Crystal structure of the heterodimeric complex of LXR $\alpha$  and RXR $\beta$  ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *EMBO J.* **2003**, *22*, 4625–4633.
- (6) Kanda, S.; Nakashima, R.; Takahashi, K.; Tanaka, J.; Ogawa, J.; Ogata, T.; Yachi, M.; Araki, K.; Ohsumi, J. Potent antidiabetic effects of rivoglitazone, a novel peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, in obese diabetic rodent models. *J. Pharmacol Sci.* **2009**, *111*, 155–166.
- (7) Mitro, N.; Mak, P. A.; Vargas, L.; Godio, C.; Hampton, E.; Molteni, V.; Kreusch, A.; Saez, E. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* **2007**, *445*, 219–223.
- (8) Joseph, S. B.; Castrillo, A.; Laffitte, B. A.; Mangelsdorf, D. J.; Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 213–219.
- (9) Schultz, J.R.; Tu, H.; Luk, A.; Repa, J. J.; Medina, J. C.; Li, L.; Schwendner, S.; Wang, S.; Thoolen, M.; Mangelsdorf, D. J.; Lustig, K. D.; Shan, B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.*, **2000**, *14*, 2831–2838.

- (10) Schulman, I. G.; Shao, G.; Heyman, R. A. Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimers: intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function. *Mol. Cell Biol.*, **1998**, *18*, 3483–3494.
- (11) Yoshikawa, T.; Shimano, H.; Amemiya-Kudo, M.; Yahagi, N.; Hasty, A. H.; Matsuzaka, T.; Okazaki, H.; Tamura, Y.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Osuga, J.; Harada, K.; Gotoda, T.; Kimura, S.; Ishibashi, S.; Yamada, N. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol. Cell Biol.*, **2001**, *21*, 2991–3000.
- (12) Forman, B. M.; Umesono, K.; Chen, J.; Evans, R. M. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **1995**, *81*, 541–550.
- (13) Shulman, A. I.; Larson, C.; Mangelsdorf, D. J.; Ranganathan, R. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* **2004**, *116*, 417–429.
- (14) Lenhard, J.M.; Lancaster, M. E.; Paulik, M. A.; Weiel, J. E.; Binz, J. G.; Sundseth, S. S.; Gaskill, B. A.; Lightfoot, R. M.; Brown, H. R. The RXR agonist LG100268 causes hepatomegaly, improves glycaemic control and decreases cardiovascular risk and cachexia in diabetic mice suffering from pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetologia* **1999**, *42*, 545–554.
- (15) Pinaire, J. A.; Reifel-Miller, A. Therapeutic Potential of Retinoid X Receptor Modulators for the Treatment of the Metabolic Syndrome. *PPAR Research* **2007**, 94156.
- (16) Cramer, P. E.; Cirrito, J. R.; Wesson, D. W.; Lee, C. Y.; Karlo, J. C.; Zinn, A. E.; Casali, B. T.; Restivo, J. L.; Goebel, W. D.; James, M. J.; Brunden, K. R.; Wilson, D. A.; Landreth, G. E. ApoE-directed therapeutics rapidly clear  $\beta$ -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* **2012**, *335*, 1503–1506.
- (17) Liu, S., Ogilvie, K.M., Klausning, K., Lawson, M.A., Jolley, D., Li, D., Bilakovics, J., Pascual, B., Hein, N., Urcan, M., Leibowitz, M.D. Mechanism of selective retinoid X receptor agonist-induced hypothyroidism in the rat. *Endocrinology* **2002**, *143*, 2880–2885.

- (18) Standeven, A. M.; Thacher, S. M.; Yuan, Y. D.; Escobar, M.; Vuligonda, V.; Beard, R. L.; Chandraratna, R. A. Retinoid X receptor agonist elevation of serum triglycerides in rats by potentiation of retinoic acid receptor agonist induction or by action as single agents, *Biochem. Pharmacol.*, **2001**, *62*, 1501–1509.
- (19) Davies, P. J.; Berry, S. A.; Shipley, G. L.; Eckel, R. H.; Hennuyer, N.; Crombie, D. L.; Ogilvie, K. M.; Peinado-Onsurbe, J.; Fievet, C.; Leibowitz, M. D.; Heyman, R. A.; Auwerx, J. Metabolic effects of rexinoids: tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity. *Mol. Pharmacol.*, **2001**, *59*, 170–176.
- (20) Beard, R. L.; Colon, D. F.; Song, T. K.; Davies, P. J.; Kochhar, D. M.; Chandraratna, R. A. Synthesis and structure-activity relationships of retinoid X receptor selective diaryl sulfide analogs of retinoic acid. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 3556–3563.
- (21) Ohta, K.; Kawachi, E.; Inoue, N.; Fukasawa, H.; Hashimoto, Y.; Itai, A.; Kagechika, H. Retinoidal Pyrimidinecarboxylic Acids. Unexpected Diaza-Substituent Effects in Retinobenzoic Acids. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1504–1513.
- (22) Tashima, T.; Kagechika, H.; Tsuji, M.; Fukasawa, H.; Kawachi, E.; Hashimoto, Y.; Shudo, K. Polyenylidene thiazolidinedione derivatives with retinoidal activities. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1805–1813.
- (23) Pogenberg, V.; Guichou, J. F.; Vivat-Hannah, V.; Kammerer, S.; Pérez, E.; Germain, P.; de Lera, A. R.; Gronemeyer, H.; Royer, C. A.; Bourguet, W. Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 1625–1633.
- (24) Gendimenico, G. J.; Stim, T. B.; Corbo, M.; Janssen, B.; Mezick, J. A. A pleiotropic response is induced in F9 embryonal carcinoma cells and rhino mouse skin by All-trans-retinoic acid, a RAR agonist but not by SR11237, a RXR-selective agonist. *J. Invest. Dermatol.* **1994**, *102*, 676–680.

- (25) Gniadecki, R.; Assaf, C.; Bagot, M.; Dummer, R.; Duvic, M.; Knobler, R.; Ranki, A.; Schwandt, P.; Whittaker, S. The optimal use of bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma. *Br. J. Dermatol.*, **2007**, *157*, 433–440.
- (26) Lalloyer, F.; Pedersen, T. A.; Gross, B.; Lestavel, S.; Yous, S.; Vallez, E.; Gustafsson, J. A.; Mandrup, S.; Fiévet, C.; Staels, B.; Tailleux, A. Reginoid bexarotene modulates triglyceride but not cholesterol metabolism via gene-specific permissivity of the RXR/LXR heterodimer in the liver. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 1488–1495.
- (27) Fujii, S.; Ohsawa, F.; Yamada, S.; Shinozaki, R.; Fukai, R.; Makishima, M.; Enomoto, S.; Tai, A.; Kakuta, H. Modification at the acidic domain of RXR agonists has little effect on permissive RXR heterodimer activation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5139–5142.
- (28) Takamatsu, K.; Takano, A.; Yakushiji, N.; Morohashi, K.; Morishita, K.; Matsuura, N.; Makishima, M.; Tai, A.; Sasaki, K.; Kakuta, H. The first potent subtype-selective retinoid X receptor (RXR) agonist possessing a 3-isopropoxy-4-isopropylphenylamino moiety, NEt-3IP (RXR $\alpha$ / $\beta$ -dual agonist). *ChemMedChem* **2008**, *3*, 780–787.
- (29) Kakuta, H.; Ohsawa, F.; Yamada, S.; Makishima, M.; Tai, A.; Yasui, H.; Yoshikawa, Y. Feasibility of structural modification of RXR agonists to separate blood glucose-lowering action from adverse effects: studies in KKAY type 2 diabetes model mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 629–633.
- (30) Ohsawa, F.; Morishita, K.; Yamada, S.; Makishima, M.; Kakuta, H. Modification at the lipophilic domain of RXR agonists differentially influences activation of RXR heterodimers. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 521–525.
- (31) Michellys, P. Y.; Ardecky, R. J.; Chen, J. H.; Crombie, D. L.; Etgen, G. J.; Faul, M. M.; Faulkner, A. L.; Grese, T. A.; Heyman, R. A.; Karanewsky, D. S.; Klausning, K.; Leibowitz, M. D.; Liu, S.; Mais, D. A.; Mapes, C. M.; Marschke, K. B.; Reifel-Miller, A.; Ogilvie, K. M.; Rungta, D.; Thompson, A. W.; Tyhonas, J. S.; Boehm, M. F. Novel (2E,4E,6Z)-7-(2-alkoxy-3,5-dialkylbenzene)-3-methylocta-2,4,6-trienoic acid retinoid X receptor modulators are active in models of type 2 diabetes. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2683–2696.

- (32) Haffner, C. D.; Lenhard, J. M.; Miller, A. B.; McDougald, D. L.; Dwornik, K.; Ittoop, O. R.; Gampe, R. T. Jr.; Xu, H. E.; Blanchard, S.; Montana, V. G.; Consler, T. G.; Bledsoe, R. K.; Ayscue, A.; Croom, D. Structure-based design of potent retinoid X receptor alpha agonists. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2010–2029
- (33) Germain, P.; Staels, B.; Dacquet, C.; Spedding, M.; Laudet, V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 685–704.
- (34) Kakuta, H.; Yakushiji, N.; Shinozaki, R.; Ohsawa, F.; Yamada, S.; Ohta, Y.; Kawata, K.; Nakayama, M.; Hagaya, M.; Fujiwara, C.; Makishima, K.; Uno, S.; Tai, A.; Maehara, A.; Nakayama, M.; Oohashi, T.; Yasui, H.; Yoshikawa, Y. RXR partial agonist CBt-PMN exerts therapeutic effects on type 2 diabetes without the side effects of RXR full agonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 427–432.
- (35) Heim, M.; Johnson, J.; Boess, F.; Bendik, I.; Weber, P.; Hunziker, W.; Fluhmann, B. Phytanic acid, a natural peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonist, regulates glucose metabolism in rat primary hepatocytes. *FASEB J.* **2002**, *16*, 718–720.
- (36) Laffitte, B. A.; Chao, L. C.; Li, J.; Walczak, R.; Hummasti, S.; Joseph, S. B.; Castrillo, A.; Wilpitz, D. C.; Mangelsdorf, D. J.; Collins, J. L.; Saez, E.; Tontonoz, P. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 5419–5424.
- (37) Kim, S. Y.; Kim, H. I.; Kim, T. H.; Im, S. S.; Park, S. K.; Lee, I. K.; Kim, K. S.; Ahn, Y. H. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 30823–30829.
- (38) Miyazaki, M.; Dobrzyn, A.; Man, W. C.; Chu, K.; Sampath, H.; Kim, H. J.; Ntambi, J. M. Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25164–25171.
- (39) Horton, J. D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 1125–1131.

- (40) Awazawa, M.; Ueki, K.; Inabe, K.; Yamauchi, T.; Kaneko, K.; Okazaki, Y.; Bardeesy, N.; Ohnishi, S.; Nagai, R.; Kadowaki, T. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/ LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *382*, 51–56.
- (41) Nahoum, V.; Pérez, E.; Germain, P.; Rodríguez-Barrios, F.; Manzo, F.; Kammerer, S.; Lemaire, G.; Hirsch, O.; Royer, C. A.; Gronemeyer, H.; de Lera A. R.; Bourguet, W. Modulators of the structural dynamics of the retinoid X receptor to reveal receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, *104*, 17323–17328.
- (42) Hashimoto, Y.; Miyachi, H. Nuclear receptor antagonists designed based on the helix-folding inhibition hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5080–5093.
- (43) 岡山大学院 医歯薬学総合研究科 医薬分子設計学 薬師寺信匡 修士論文 (2008)
- (44) 岡山大学院 医歯薬学総合研究科 合成薬品製造学分野 篠崎亮介 修士論文 (2011)
- (45) Oberfield, J.L.; Collins, J. L.; Holmes, C. P.; Goreham, D. M.; Cooper, J. P.; Cobb, J. E.; Lenhard, J. M.; Hull-Ryde, E. A.; Mohr, C. P.; Blanchard, S. G.; Parks, D. J.; Moore, L. B.; Lehmann, J. M.; Plunket, K.; Miller, A. B.; Milburn, M. V.; Kliewer, S. A.; Willson, T. M. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, *96*, 6102–6106.
- (46) Egea, P. F.; Mitschler, A.; Rochel, N.; Ruff, M.; Chambon, P.; Moras, D. Crystal structure of the human RXRalpha ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis Retinoic acid. *EMBO J.* **2000**, *19*, 2592–2601.
- (47) Li, L.; Andersen, M. E.; Heber, S.; Zhang, Q. Non-monotonic dose-response relationship in steroid hormone receptor-mediated gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* **2007**, *38*, 569–585.
- (48) LeVý-Bimbot, M.; Major, G.; Courilleau, D.; Blondeau, J.; LeVý, Y. Tetrabromobisphenol-A disrupts thyroid hormone receptor alpha function in vitro: Use of fluorescence polarization to assay corepressor and coactivator peptide binding. *Chemosphere* **2012**, *87*, 782–788.

- (49) Ozers, M. S.; Ervin, K. M.; Steffen, C. L.; Fronczak, J. A.; Lebakken, C. S.; Carnahan, K. A.; Lowery, R. G.; Burke, T. J. Analysis of ligand-dependent recruitment of coactivator peptides to estrogen receptor using fluorescence polarization. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 25–34.
- (50) Stafslie, D. K.; Vedvik, K. L.; Rosier, T.; Ozers, M. S. Analysis of ligand-dependent recruitment of coactivator peptides to RXR $\beta$  in a time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2007**, *264*, 82–89.
- (51) Ghosh, J. C.; Yang, X.; Zhang, A.; Lambert, M. H.; Li, H.; Xu, H. E.; Chen, J. D. Interactions that determine the assembly of a retinoid X receptor/corepressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5842–5847.
- (52) Connors, R. V.; Wang, Z.; Harrison, M.; Zhang, A.; Wanska, M.; Hiscock, S.; Fox, B.; Dore, M.; Labelle, M.; Sudom, A.; Johnstone, S.; Liu, J.; Walker, N. P.; Chai, A.; Siegler, K.; Li, Y.; Coward, P. Identification of a PPAR $\delta$  agonist with partial agonistic activity on PPAR $\gamma$ . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3550–3554.
- (53) Arakawa, K.; Ishihara, T.; Aoto, M.; Inamasu, M.; Saito, A.; Ikezawa, K. Actions of novel antidiabetic thiazolidinedione, T-174, in animal models of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) and in cultured muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *125*, 429–436.
- (54) 岡山大学 薬学部 薬学科 川田浩平 卒業論文 (2013)
- (55) Ohsawa, F.; Yamada, S.; Yakushiji, N.; Shinozaki, R.; Nakayama, M.; Kawata, K.; Hagaya, M.; Kobayashi, T.; Kohara, K.; Furusawa, Y.; Fujiwara, C.; Ohta, Y.; Makishima, M.; Naitou, H.; Tai, A.; Yoshikawa, Y.; Yasui, H.; Kakuta, H. Mechanism of retinoid X receptor partial agonistic action of 1-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)-1H-benzotriazole-5-carboxylic acid and structural development to increase potency. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1865–1877.
- (56) Qu, L.; Tang, X. Bexarotene: a promising anticancer agent. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2010**, *65*, 201–205.
- (57) Cho, Y.; Noshiro, M.; Choi, M.; Morita, K.; Kawamoto, T.; Fujimoto, K.; Kato, Y.; Makishima, M. The basic helix-loop-helix proteins differentiated embryo chondrocyte

- (DEC) 1 and DEC2 function as corepressors of retinoid X receptors. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76*, 1360–1369.
- (58) Uno, S.; Endo, K.; Jeong, Y.; Kawana, K.; Miyachi, H.; Hashimoto, Y.; Makishima, M. Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 186–195.
- (59) Kaneko, E.; Matsuda, M.; Yamada, Y.; Tachibana, Y.; Shimomura, I.; Makishima, M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 36091–36098.
- (60) Kain, S. R. Use of secreted alkaline phosphatase as a reporter of gene expression in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* **1997**, *63*, 49–60.
- (61) Landy, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 913–949.
- (62) Walhout, A. J.; Temple, G. F.; Brasch, M. A.; Hartley, J. L.; Lorson, M. A.; van den Heuvel, S.; Vidal, M. GATEWAY recombinational cloning: Application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol.* **2000**, *328*, 575–592.
- (63) Liang, F.; Matrubutham, U.; Parvizi, B.; Yen, J.; Duan, D.; Mirchandani, J.; Hashima, S.; Nguyen, U.; Ubil, E.; Loewenheim, J.; Yu, X.; Sipes, S.; Williams, W.; Wang, L.; Bennett, R.; Carrino, J. ORFDB: An information resource linking scientific content to a high-quality open reading frame (ORF) collection. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D595–D599.
- (64) Hengen, P. Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 285–286.
- (65) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.