

素に種々のヘテロ環やベンゼン環 (R^1) とアルキル基 (R^2) を組み合わせて導入した化合物の合成を行った。

昨年度、 R^1 として 2-pyridinyl 基を有する化合物が優れた活性をもつこと、さらにそれらの中でも R^2 として長鎖のアルキル基 (*n*-octyl 基) を導入した化合物が最も強い活性を持つことが明らかとなった。PPAR γ が非常に大きな疎水性のリガンド結合部位を有していること、および長鎖のアルキル鎖をもつ脂肪酸やプロスタグランジンが PPAR γ のリガンドとなるという知見から、アミノ窒素に導入したアルキル鎖が活性発現に効果的であると考えられる。そこで、本年度は、アルキル鎖の長さなど R^1 、 R^2 の疎水性および嵩高さが活性に及ぼす影響を明らかにする

ために、 R^1 が 2-pyridinyl 基で R^2 に炭素数 1~10 の直鎖アルキル基を導入した *N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体、 R^1, R^2 に含窒素芳香環を導入した *N, N*-diaryl 誘導体を合成し活性評価を行った。

1-1 PPAR γ 作用薬の合成

今年度新たに合成した化合物を図 1 に示す。*N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体のアルキル鎖の炭素数が 4 から 10 の化合物 (4~10)、carbazole 誘導体 11、norharman 誘導体 12、および三級アミノ窒素に phenyl 基と 2-pyridinyl 基を組み合わせ導入した化合物 (13, 14, 15) を合成した。なお、これらの化合物は全て新規化合物である。

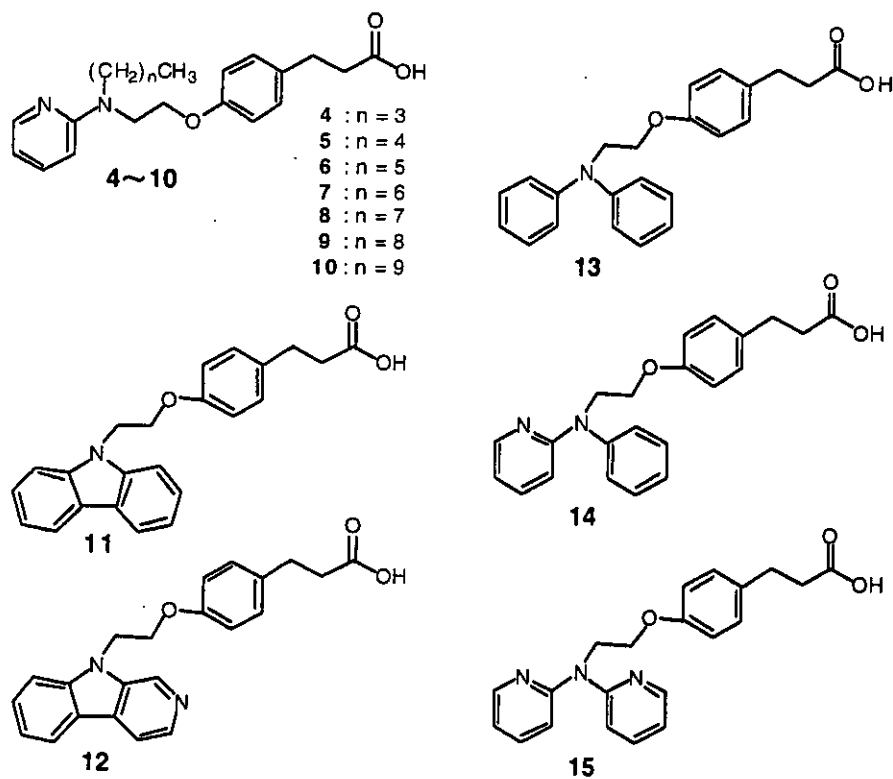


図 1 新規に合成した PPAR γ アゴニスト候補化合物

1-1-1 *N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体の合成

2-(*n*-alkylamino)pyridine (17a-g) を Stephen L. Buchwald らの方法を参考に、2-bromopyridine と *n*-alkylamine を Pd₂(DBA)₃, BINAP を触媒下反応させ合成した。また、化合物 18 に 1,2-dibromoethane を反応させプロマイド 19 とし、これを triethylamine 存在下、化合物 17a-g とカップリングさせ化合物 20a-g とした。最後にアルカリ加水分解によりメチルエステルを除去して化合物 4-10 を合成した (図 2)。

1-1-2 化合物 11、12 の合成

NaH を用いて化合物 19 と carbazole (21) および norharman (22) を反応させて、それぞれ化合物 23、24 とし、アルカリ加水分解によりメチル基を除去して化合物 11 と化合物 12 を合成した (図 3)。

1-1-3 化合物 13 の合成

化合物 19 と diphenylamine (25) を NaH を用いて反応させて化合物 26 とし、アルカリ加水分解によりメチル基を除去し化合物 13 を合成した (図 4)。

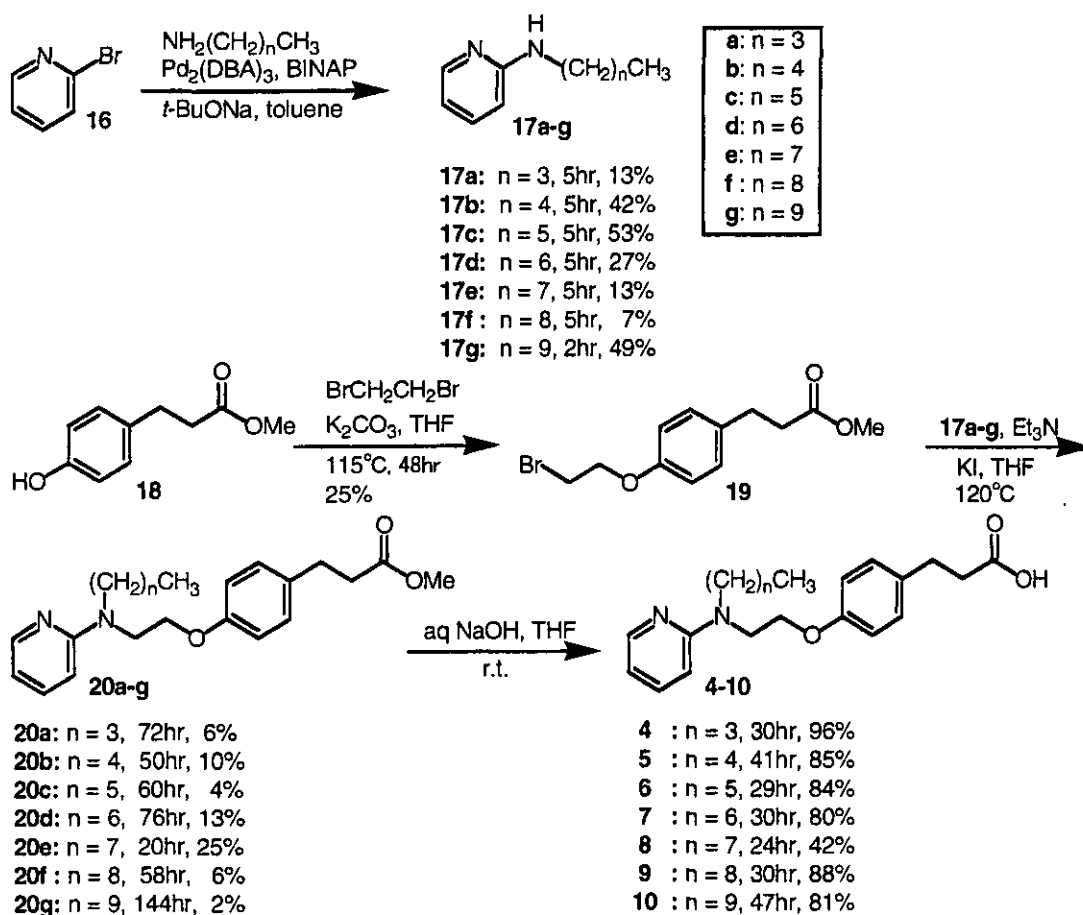


図 2

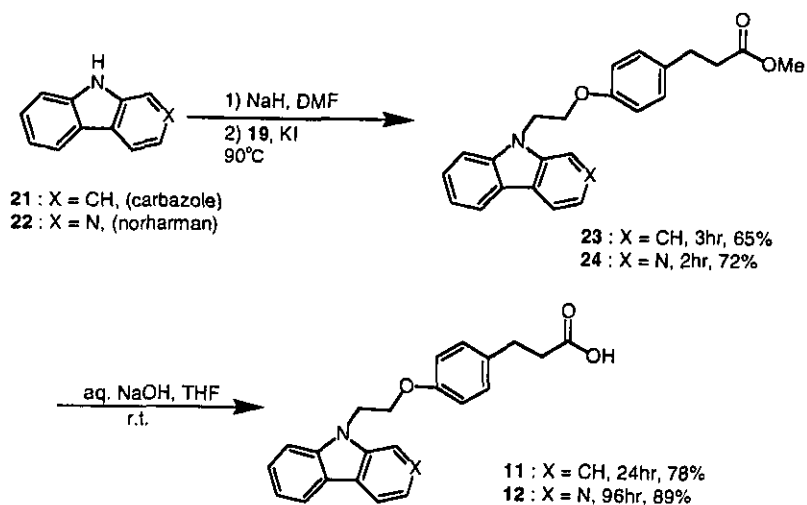


图 3

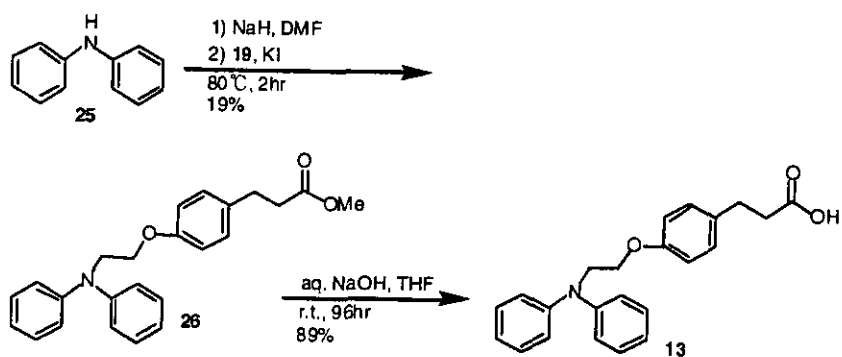


图 4

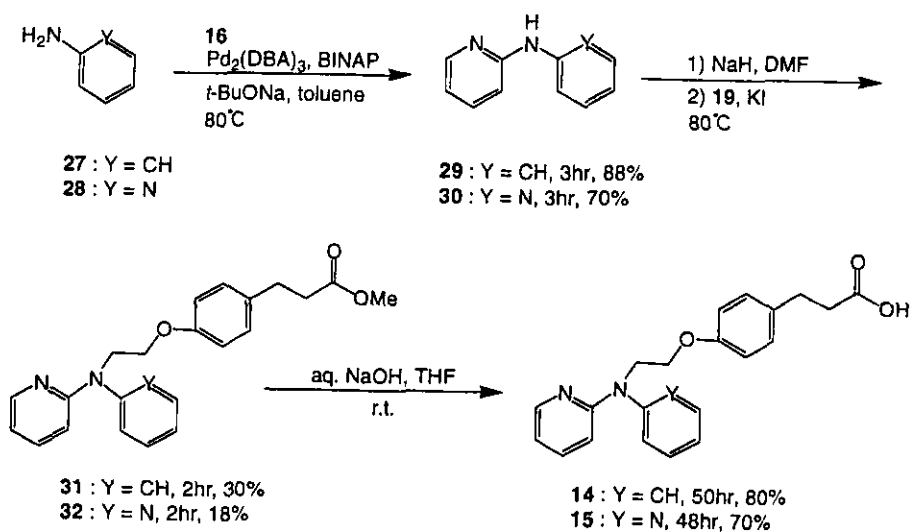


图 5

1-1-4 化合物 14、15 の合成

aniline (27)、あるいは 2-aminopyridine (28) と 2-bromopyridine (16) を $\text{Pd}_2(\text{DBA})_3$, BINAP 触媒下反応させ、化合物 29、30 を合成した。これらを NaH 存在下、化合物 19 と反応させて化合物 31、32 とし、アルカリ加水分解によりメチル基を除去し化合物 14、15 を合成した (図 5)。

以上の方法により、目的とする化合物 (4~15) を合成した。

1-2 生理活性評価

PPAR γ アゴニストの活性を評価する方法として、binding assay、前駆脂肪細胞分化試験、transactivation assay などが挙げられるが、今回は、昨年度に行った脂肪細胞分化試験に加えて PPAR γ レセプターに対する binding assay も行い活性を評価した。

1-2-1 Binding assay

binding assay は、主にファーストスクリーニングとして用いられるが、結合能の高い化合物が必ずしも高い転写活性化能をもつとは限らない。binding assay の代表例としては、scintillation proximity assay (SPA) 法がある。これは、候補化合物を RI 標識したリガンド (^3H rosiglitazone など) と競合させる競合的結合試験であるが、放射性ラベルした化合物を使用するので簡便ではない。今回、我々は binding assay として大阪大学の西川らが昨年開発した CoA-BAP System (マイクロシステムズ社製) を用いた。

1-2-1-1 CoA-BAP System の原理

PPAR γ がリガンドの結合により転写を活性化するためには、転写共役因子であるコアクチベーターとの結合を必要とする。本システムは、hPPAR γ -LBD (ligand binding domain) とコアクチベーターで

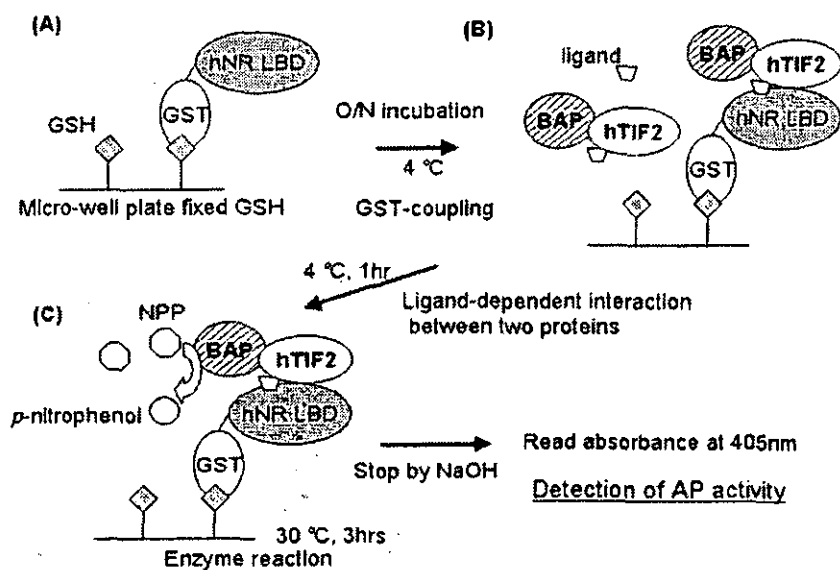


図 6

ある hTIF2 とのリガンドを介した結合を利用している。詳しい原理を、図 6 に示す。

まず、グルタチオン (GSH) が固定されたマイクロプレート上に、GST-hPPAR γ LBD 融合蛋白を作用させ、カップリング反応によりプレートに固定する。ついで、hTIF2 と BAP (bacterial alkaline phosphatase) の融合蛋白および、リガンド化合物を加えることで、リガンド依存的に hPPAR γ -LBD と hTIF2 が結合する。そこに、BAP の基質として NPP (*p*-nitrophenylphosphoric acid) を加

えることで、脱リン酸化反応により黄色を呈する *p*-nitrophenol が生成し、その 405 nm における吸光度を測定することにより、binding 活性を評価した。実験では、back ground の値 (リガンド化合物を入れずに DMSO だけを加えた時の値) を引いたものを AP 活性値 (alkaline phosphatase activity) とした。すなわち、CoA-BAP System では、リガンド化合物の PPAR γ に対する結合能が高いほど、高い AP activity を示すこととなる。

上記の原理に基づき、実際に CoA-BAP system を用いて binding assay を行った

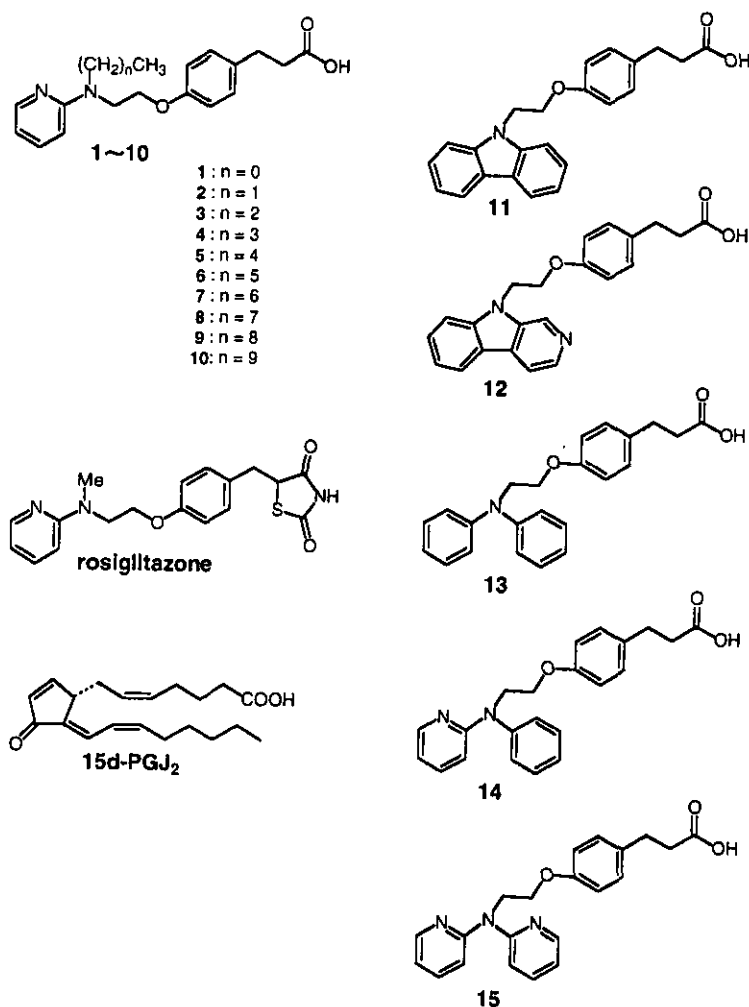


図 7

化合物を図 7 に示す。合成した化合物 4 ~10, 11~15 に加え、昨年度報告した化合物 1~3 と、ポジティブコントロールとして rosiglitazone、15d-PGJ₂ を使用した。ポジティブコントロールとして用いた rosiglitazone と 15d-PGJ₂ の binding assay の結果を図 8 に示す。

rosiglitazone は、非常に強い結合能をもつため今回設定した濃度領域では、濃度依存的に AP activity は上昇し、15d-PGJ₂ よりも強い活性を示した。15d-PGJ₂ の AP activity は、0.1 μM から上昇し始め 1 μM ではっきりと上昇が確認できた。つまり、15d-PGJ₂ は、0.1~1 μM

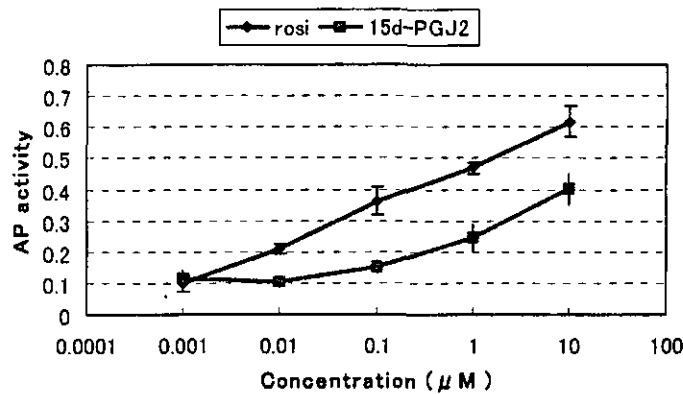


図 8 rosiglitazone と 15d-PGJ₂ の AP activity (180分後, n=3, mean±S.D., background value was 0.111)

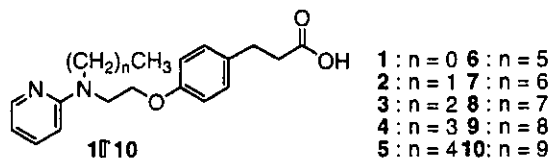
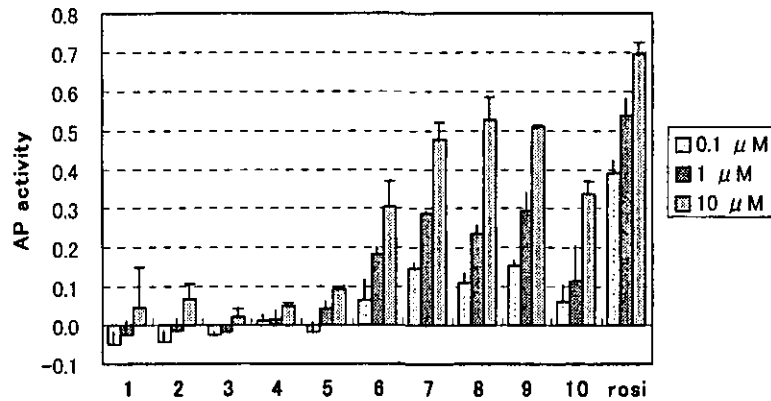


図 9 *N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl誘導体の AP activity (n=3, mean±S.D., background values were 0.148 [1~6], 0.111 [7,8, rosi] and 0.160 [9, 10])

程度の濃度で、PPAR γ に対して結合能をもち始めることがわかる。

1-2-1-2 *N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体の結合能評価

N-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体 (1~10) の結合能を評価するために、まずポジティブコントロールの濃度を考慮したうえで、各化合物の濃度を 0.1~10 μ M に設定し assay を行った (図 9)。

AP activity の上昇する濃度に注目してみると、化合物 6~9 は 0.1 μ M から、化合物 10 は 1 μ M から AP activity が上昇し始めることがわかった。化合物 9 は、0.01 μ M でも少しではあるが上昇が見られ、10 μ M の AP activity は、rosiglitazone よりも高い値を示した。このことから、化合物 6~9 の中では化合物 9 が最も高い結合能をもつことがわかった。また、化合物 10 は 1 μ M でも少し

しか AP activity が上昇しないことから低い結合能しかもたないことがわかる。

以上の結果より、*N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体 1~10 の PPAR γ への結合能に関しては、アルキル鎖の長さは 9 が最適であることが明らかになった。

1-2-1-3 *N,N*-diaryl 誘導体 (11~15) の結合能評価

化合物 11~15 についての結合能を評価するために、まず各化合物の濃度を 0.1~10 μ M に設定し assay を行った (図 10)。

carbazole 誘導体 11 および norharuman 誘導体 12 は、少しではあるが AP activity の上昇はみられるが化合物 13、14、15 はほとんど上昇していない。化合物 12 の結合能は、化合物 10 と同程度であると考えられる。このことから、アルキル鎖をもたない化合物の PPAR γ への結合能は低い

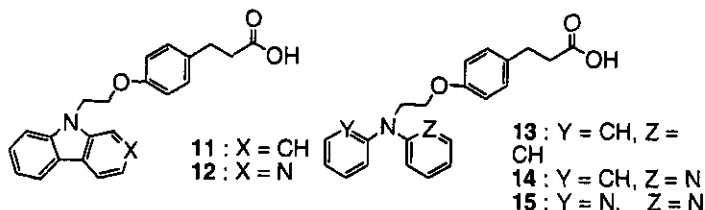
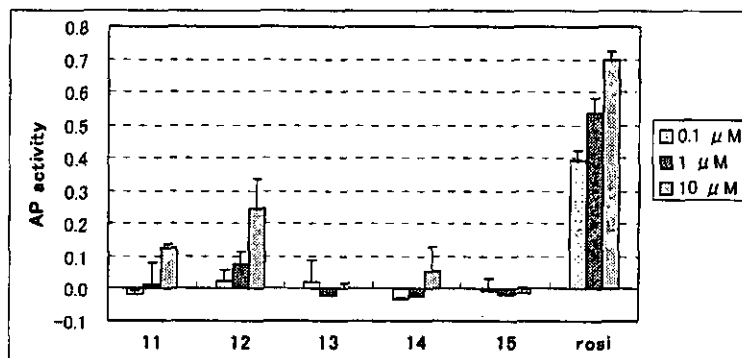


図 10 化合物11~15の AP activity (n=3, mean \pm S.D., the background value is 0.160 [11~15])

ことが明らかとなった。

1-2-2 前駆脂肪細胞分化試験

我々は、ラット前駆脂肪細胞 Total Kit (TOYOBO) を使用し、初代培養の腸管由来ラット前駆細胞を用いて分化試験を行った。前駆脂肪細胞分化試験の利点として、*in vivo* 系での血糖降下試験との相関性の高さが挙げることができる。

1-2-2-1 前駆脂肪細胞分化試験

前駆脂肪細胞は、繊維芽細胞様の形態を示しているが、分化条件下で培養すると脂肪細胞へ分化し細胞内に多泡性の油滴（脂肪滴）が形成される。序論でも述べたように、PPAR γ は C/EBP α や SREBP1 などと協調し、前駆脂肪細胞の分化過程においてマスターレギュレーターとして機能していることが明らかとなっている。そのため、前駆脂肪細胞の分化は PPAR γ アゴニストによって促進され、分化にともない脂肪滴が観察される（図 1 1）。

前駆脂肪細胞分化試験では、脂肪滴を

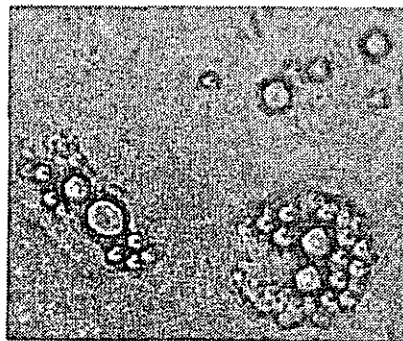


図 1 1 細胞内に蓄積された脂肪滴 (rosiglitazone : 10 μ M)

中性脂肪定量試薬により定量することで、リガンド化合物の分化促進能を評価することができる。実験の手順は、Total kit のプロトコールに従った。

使用した化合物は、rosiglitazone、15d-PGJ $_2$ 、化合物 1~15 および化合物 9 である。またネガティブコントロールとして 0.1% DMSO 溶液を投与した。化合物投与後、5 日目から脂肪滴の存在を確認し、そこからさらに 12 日間培養し、リピドス・リキッド (TOYOBO) を用いて脂肪滴中の中性脂肪を定量した（図 1 2）。

化合物濃度 10 μ M で活性を比較すると、

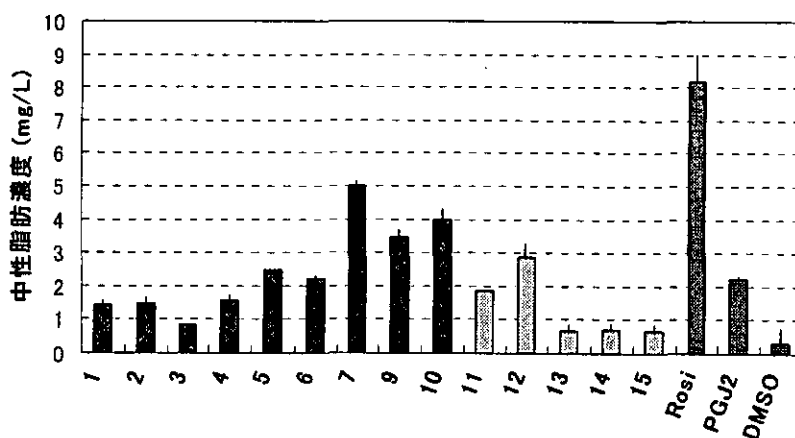


図 1 2 PPAR γ アゴニストの中性脂肪産生能

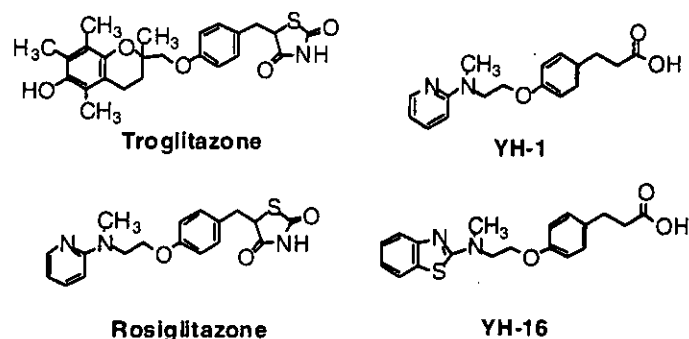


図 1 3 遺伝子発現実験に用いたPPAR γ 作用薬

化合物 5, 6, 7, 9, 10, 12 が比較的高い値を示した。これらはいずれもポジティブコントロールの 15d-PGJ₂ より高い値を示したが、rosiglitazone には及ばなかった。*N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体では、化合物 5~10 が化合物 1~4 に比べて高い値を示した。また *N,N*-diaryl 化合物では、化合物 11, 12 が化合物 13~15 よりも高い値を示した。

Binding assay の結果最も結合能の高かった化合物 9 とポジティブコントロールの rosiglitazone は、濃度を 1, 2.5, 5, 10 μ M で投与した。その結果、rosiglitazone は 10 μ M で、化合物 9 は 2.5 μ M で最も高い値を示した。2.5 μ M で投与した化合物 9 の値は、rosiglitazone に匹敵する値であり高い分化促進能を示した。

また、脂肪滴を定量する前に行った形態観察で、10 μ M で化合物 9 を投与した細胞は、脂肪滴は観察されるが明らかに他の細胞と形状が異なり、細胞数も少ないことが観察された。これは、化合物の毒性による可能性が考えられる。

1-2-3 Gene Chip を用いた網羅的遺伝子発現解析

すでに troglitazone (30 μ M)、

rosiglitazone (30 μ M) については、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用い、網羅的な遺伝子発現実験を終了した。今年度は、得られた実験の結果を KeyMolnet を用いて分子ネットワーク解析した。実験方法・結果・考察は、分担研究者である二宮の報告書に記載した。現在、合成した関連化合物について、プライマリーヒト肝細胞を用いて遺伝子発現解析実験を行い、毒性と遺伝子発現との相関の解析を行っている。

2 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、ヒストンの脱アセチル化反応に関与して、遺伝子の転写活性を制御していることが知られている。この HDAC の阻害剤はがん細胞に対して細胞周期の停止、分化誘導、腫瘍細胞の形態正常化、アポトーシスなどの生物活性を示すことがわかっており、既存の抗がん剤とは異なる機構で作用する薬剤として注目を集めている。

真核生物の DNA は塩基性たんぱく質であるヒストンに巻きついて、クロマチン構造を形成している。クロマチンの最小単位はヌクレオソームであり、DNA とヒストンコアからなっている。ヒストンコア

はH2A、H2B、H3、H4の4種類のタンパクの8量体からなり、その周りを146bpのDNAが1.75回転、左巻きに巻きついている。また、ヌクレオソーム間にはリンカーDNAとよばれる20bpほどのDNAが存在している。このような構造でヌクレオソームが数珠状につながったものは11nmファイバーとよばれ、それらはリンカーヒストンや非ヒストン蛋白質によって30nmファイバーへ、さらに高度なクロマチン構造へと凝集していく。転写反応の開始にはこの高度に凝集したクロマチン構造の変換（クロマチンリモデリング）がおこなわれ、転写基本因子がDNAと相互作用することが必要である。転写制御の大半はこのクロマチンの構造変化に伴い転写活性が制御されていると考えられている。ヒストンのN末端における種々の化学修飾はヒストンとDNAとの相互作用を変化させるために、遺伝子の発現に関与していることが知られている。N末端ではアセチル化やメチル化、リン酸化、ユビキチン化などの修飾によって多彩な機能発現を制御している。ヒストンのN末端は塩基性に富んでおり、その中でもリシン残基のアセチル化は、化学修飾の代表的なものとして上げられる。ヒストンのアセチル化、脱アセチル化は遺伝子の転写活性化、不活性化に関与することが、40年前に Allfrey らによって示唆させている。

遺伝子が転写される領域においては、ヒストンのアセチル化が亢進していることは以前から知られていたが、いかにしてヒストンのアセチル化が遺伝子の転写を亢進しているかについては、不明な点

が多い。ひとつの説として、「アセチル化によってヒストンの正の電荷が中和されヒストンとDNAとの相互作用が弱まる」というのがあるが、いまだに実験的証明はなされていない。少なくとも *in vitro* においては影響しないことが示されている。現在、ヒストンのアセチル化の転写活性化の分子機構としてヌクレオソームリモデリング因子や基本転写因子、RNAポリメラーゼなどが特定の遺伝子プロモーターに着きやすくなる可能性が考えられている。ヒストンをアセチル化する酵素（HAT）がクローニングされX線構造解析によって構造が特定されたことで、ヒストンのアセチル化、脱アセチル化の研究は盛んになってきた。HATは、アセチルCoAのアセチル基をヒストンのリシン残基に転移する反応を触媒している。HDACはHATの逆で、ヒストンのN末端のアセチル化されたリシン残基からアセチル基を取り除く反応を触媒している。HDACは、1999年にM. S. FinnickらによってヒトHDAC homologである高度高熱菌 *Aquifex aeolicus* の脱アセチル化酵素であるHDLP (Histone deacetylase like protein) がX線構造解析による構造が報告されている。これらの酵素群はヒストン以外にも転写因子や、その他の蛋白も脱アセチル化することが知られている。HDLPは、8本の β シートと16本の α ヘリックスから構成される。 β シートのL1-L7の7本のループが深く狭い疎水性のポケットを形成しておりその底部には Zn^{2+} イオンが存在し、それに水分子が配位していることが分かっている。

具体的な脱アセチル化機構は、他の重

鉛配位型の蛋白質と同様にまず、N-アセチルアミドのカルボニル基が Zn^{2+} に配位して、付近の Zn^{2+} やアミノ残基によって活性化された水分子が求核攻撃をする。カルボニルの炭素は四面体構造をとるが、最終的には C-N 結合の開裂が起きて、Asp173 と His132 からプロトンを受け取り脱アセチル化すると推定されている。(図 1 4)

HDAC の阻害剤は、がん細胞に対して、p21 遺伝子の誘導による細胞周期の停止やアポトーシスの誘導、などの生物活性を示す。既存の HDAC 阻害剤 (HDAI) とし

ては、Trichostatin A (TSA) や Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) などがあげられ、さらに医薬品として MS-275 や、FK-228 などが臨床試験に上っている。(図 1 5)

TSA や SAHA などのヒドロキサム酸系の化合物は、カルボニル基とヒドロキシル基の酸素が Zn^{2+} に配位してその阻害活性を示しており、それらは X 線構造解析もなされている。ヒドロキサム酸は HDAC の活性中心である Zn^{2+} に対して、カルボニル基とヒドロキシル基の酸素が配位していると考えられている。

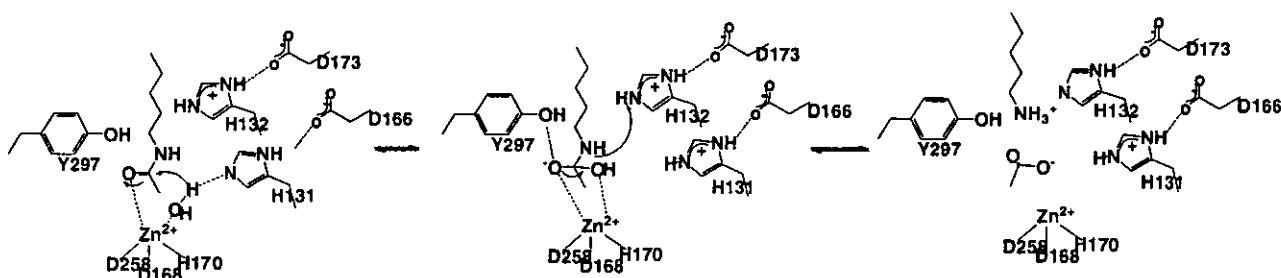


図 1 4 HDACによるヒストンの脱アセチル化反応機構

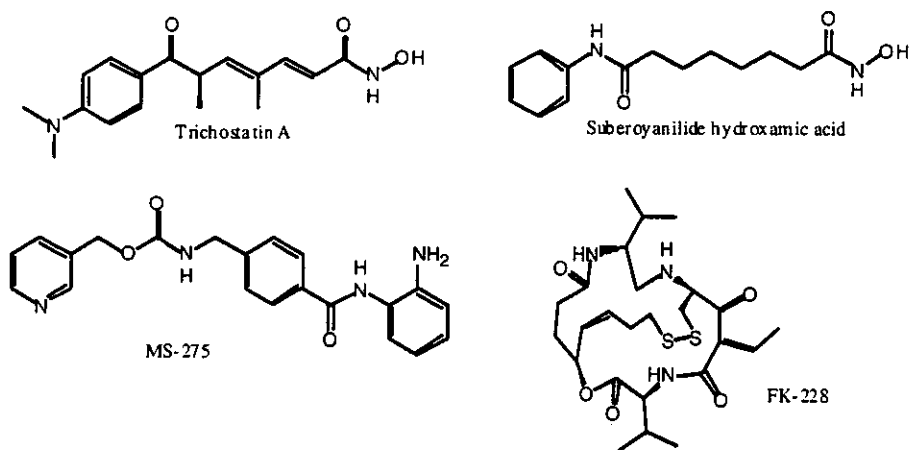


図 1 5 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、ヒストンの脱アセチル化反応に関与して、遺伝子の転写活性を制御している。この HDAC の阻害剤はがん細胞に対して細胞周期の停止、分化誘導、腫瘍細胞の形態正常化、アポトーシスなどの生物活性を示すことがわかっており、既存の抗がん剤とは異なる機構で作用する薬剤として注目を集めている。そこで我々は新規の HDAC 阻害剤の開発に向けて合成研究に着手し、有効な薬剤の開発を目的として、活性を解析するとともに、ヒトのプライマリー細胞を用いた実験により、作用・副作用に関する遺伝子発現解析を行った。

2-1 阻害剤のデザイン

Histone deacetylase (HDAC) の活性部分は、細長い疎水性のポケットから成っており、その先に Zn^{2+} が存在している。この構造から HDACI として必要な構造は図 16 のように表せる。

Binding element は、HDAC の活性部位である Zn との相互作用をする。Cap 部分は、疎水性の高い芳香環であり、さらに構造での立体的に大きな部分を占める。その 2 つの構造をリンカー部分でつなぐという構造をいっている。本年度は、target 分子として、ヒドロキサム酸系の化合物の cap 部分の構造およびリンカー部分の長さのことなる化合物を合成した。

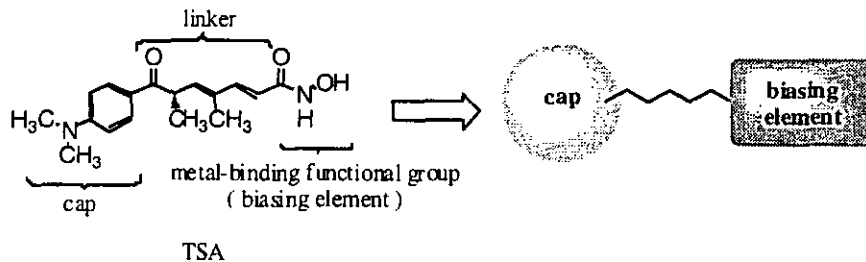


図 16 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の構造

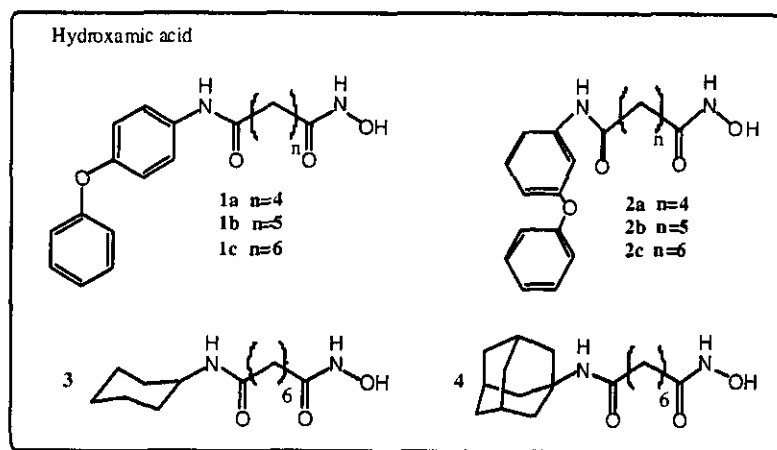


図 17 新規に合成したHDAC阻害候補化合物

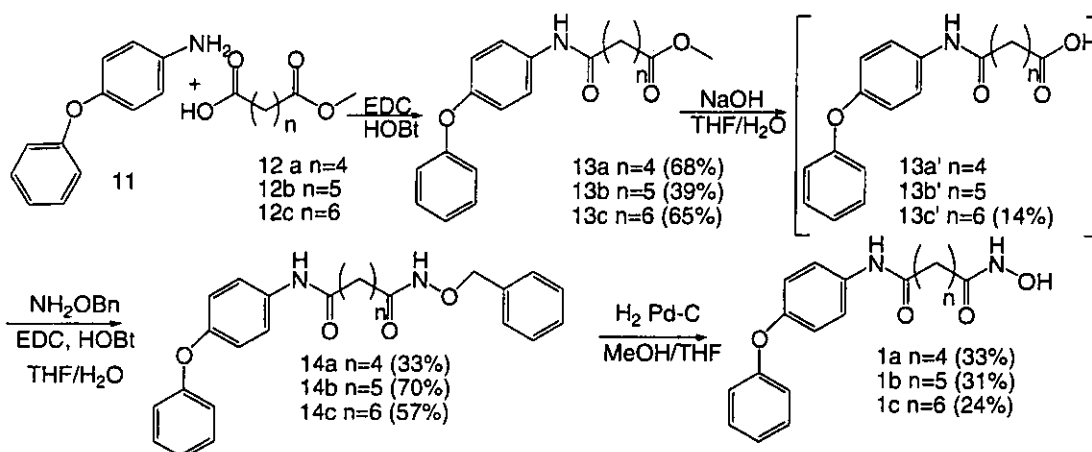


図 1 8 化合物1a,1b,1cの合成

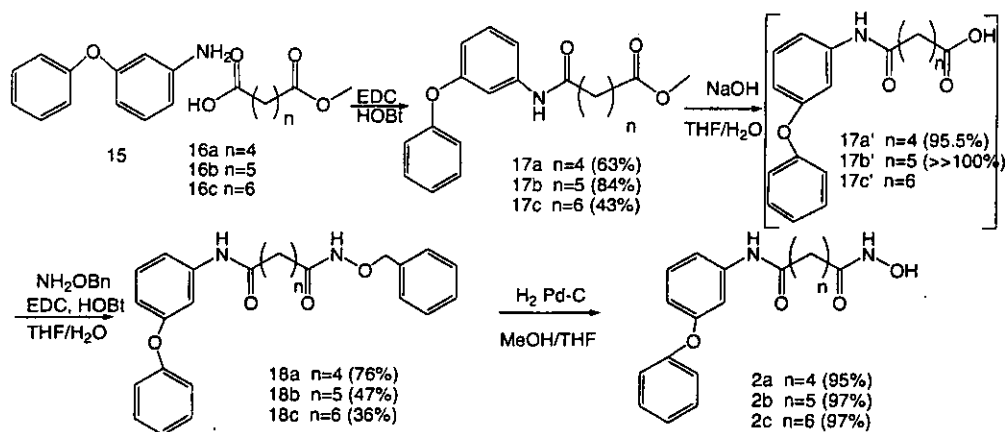


図 1 9 化合物2a, 2b, 2cの合成

2-2-1 化合物 1a~1c の合成

図 1 8 に示すように、p-フェノキシアニン(11)とジカルボン酸メチル(12)とを、EDC、HOBT で縮合させて、化合物 13 を得た。化合物 13 を加水分解することで 13' とし、ベンゾキシアミンと縮合させて化合物 14 を得た。化合物 14 は水素雰囲気下 Pd 触媒をもちいて脱ベンジルを行うことで化合物 1a, 1b, 1c を得た。

2-2-2 化合物 2a~2c の合成

図 1 9 に示すように、m-フェノキシアニン(15)とジカルボン酸メチル(16)とを、EDC、HOBT で縮合させて、化合物 17 を得た。化合物 17 を加水分解することで化合物 17' とし、ベンゾキシアミンと縮合させて化合物 18 を得た。化合物 18 は水素雰囲気下 Pd 触媒をもちいて脱ベンジルを行うことで化合物 2a, 2b, 2c を得た。

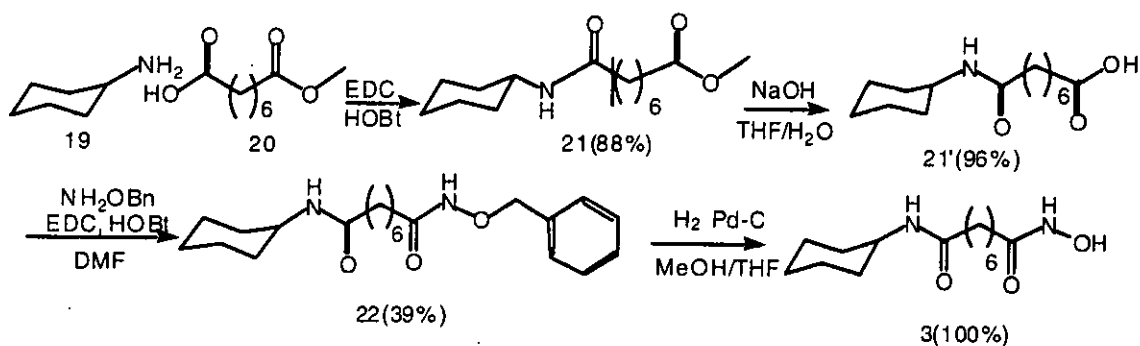


図 2 0 化合物 3 の合成

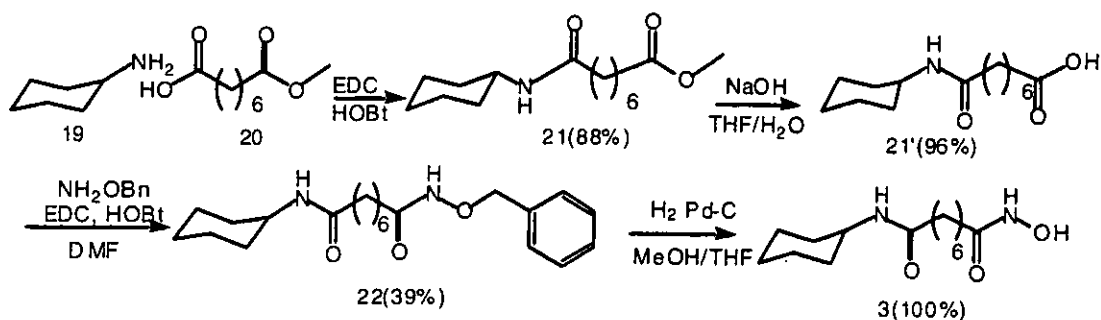


図 2 1 化合物 4 の合成

2-2-3 化合物 3,4 の合成

図 2 0 に示すように、シクロヘキシルアミン(19)とジカルボン酸メチル(20)を、EDC、HOBt で縮合させて、化合物 21 を得た。化合物 21 を加水分解することで化合物 21' とし、ベンゾキシーアミンと縮合させて化合物 22 を得た。化合物 22 は水素雰囲気下化合物 Pd 触媒をもちいて脱ベンジルを行うことで化合物 3 を得た。同様に、図 2 1 に示すように、アダマンチルアミン(23)とジカルボン酸メチル(24)を、EDC、HOBt で縮合させて、化合物 25 を得た。化合物 25 を加水分解することで化合物 25' とし、ベンゾキシーアミンと縮合させて化合物 26 を得た。化合物 26 は水素雰囲気下 Pd 触媒をもちいて脱ベンジルを行うことで化合物 4 を得た。

2-3 HDAC 阻害活性

HDAC 活性の測定は、Deacetylase Fluorescent Activity Assay / Drug Discovery kit (BIOMOL®)を用いた。この活性測定の原理を、図 2 2 に示した。

蛍光標識されたアセチル体のリシン残基にHela細胞由来のHDACが働くことで、脱アセチル化が起こる。それにDEVELOPERを加えることで脱アセチル体のみが蛍光を発する。この方法で測定した蛍光強度から阻害活性を計算した。

阻害割合 (%)

$$= \frac{(\text{被検物質の蛍光強度} - \text{Blankの蛍光強度})}{(\text{コントロールの蛍光強度} - \text{Blankの蛍光強度})}$$

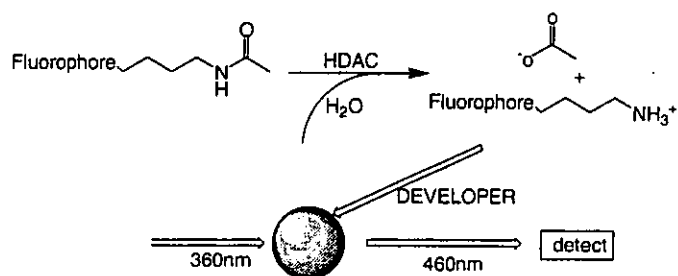

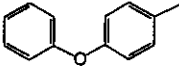
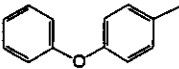
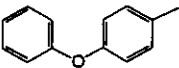
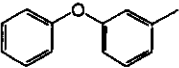
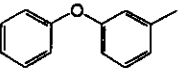
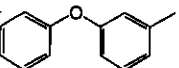




図 2 2 HDAC阻害活性測定システム

この式より割合が小さいほど、より強く阻害していることがわかる。また、ポジティブコントロールとして SAHA を用いた。阻害活性の結果を下の Table にまとめた。SAHA の IC₅₀ 値は、0.15 μM であるのに対し、化合物 2b, 2c は、同程度の活性を示した。化合物 2a, 2b, 2c のほうが化合物 1a, 1b, 1c よりも強い活性を示したことが

ら、3 位に付いているフェニル基が HDAC 阻害に効果的なことが明らかになった。また、リンカー部分の長さは、n=5, 6 が最適である結果が得られた。なお、aliphatic な置換基を導入した化合物 3, 4 では、aromatic な置換基を導入した化合物ほど活性がないことがわかった。

Table

entry	compound	R	n	% inhibition at 1 μM	IC ₅₀
1	SAHA		6	85.4 ± 3.5	0.15 μM
2	1a		4	32.1 ± 2.1	Not Tested
3	1b		5	60.9 ± 3.2	Not Tested
4	1c		6	76.1 ± 0.7	Not Tested
5	2a		4	53.6 ± 0.8	Not Tested
6	2b		5	87.5 ± 3.4	0.33 μM
7	2c		6	88.7 ± 1.4	0.24 μM
8	3		6	67.0 ± 2.7	Not Tested
9	4		6	57.7 ± 2.3	Not Tested

2-3-2 Gene Chip を用いた網羅的遺伝子発現解析

接着型凍結プライマリーヒト肝細胞 Lot100 を用いて網羅的遺伝子発現解析実験を行っている。被験物質としては、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA)、*N*-Hydroxy-*N*-phenyloctanediamide (SAHA) (10 μ M)、および、新規に合成したメチル 6-アニリノ-6-オキソヘキシルカルバメート (P-Me) と 6-[(アミノカルボニル)アミノ]-*N*-フェニルヒキサミド (P-Urea) である。実験は、分担研究者である二宮が行った。今後、新規に合成した化合物について、構造と活性と遺伝子発現との相関の解析を行う予定である。

C. 結論、考察

本研究事業では、新規技術による長期培養可能なプライマリーヒト肝・腎細胞を用いて、薬剤曝露時の網羅的遺伝子発現解析を行い、毒性発現に関わる遺伝子群の同定、ならびに、遺伝子発現パターンのデータベース構築を行う。さらに、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす効果の解析を行い、より安全性の高い薬剤を設計するための知見を得る。また、ヒトでの安全性の高い薬剤開発を可能にする目的で、実験動物から得られた遺伝子発現解析のデータをヒトへ外挿するための基本手法の開発を行い、薬剤の副作用を回避あるいは軽減する評価法を確立する。

今年度、分担研究者 宮田は、肝毒性が報告されている薬剤としてインスリン非依存型糖尿病治療薬 toroglitazone の類

縁体の合成を行い、チアゾリジンジオン骨格を持たない PPAR- γ アゴニスト候補化合物として、新たに 15 化合物を合成した。昨年度に合成した化合物とあわせて総計 39 化合物となる。これらの化合物の生物活性を調べるために昨年度に開始した前駆脂肪細胞を用いる定量的スクリーニング法に加えて、PPAR γ 受容体との結合性を直接解析する手法を導入した。その結果、新規に合成した化合物のうちの幾つかが、PPAR γ 受容体との結合性を有するとともに、前駆脂肪細胞の分化誘導を促進し細胞内に脂肪滴の蓄積を誘導する活性を有することを見いだした。また、中性脂肪定量試薬を用いて分化誘導能の定量化実験を行った結果、今年度合成した化合物 9 は、rosiglitazone に匹敵する前駆脂肪細胞の分化誘導能を有することが判明した。現在までに合成した前駆脂肪細胞分化誘導能を有する化合物の中には、分化誘導能を有するが毒性を示すもの、分化誘導能を有するが PPAR γ 受容体との結合性が低いものなど興味ある化合物が存在する。今後は、これら一連の化合物について、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現と毒性・活性との相関を解析する予定である。

また、遺伝子発現を制御し新しいタイプの抗がん剤になることが期待されているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤については、既知の阻害剤である SAHA をモデルにして、HDAC の活性部位の構造と触媒反応機構に着目した新規阻害剤の設計を行い、昨年度から総計約 50 種類の新規化合物の合成を達成した。こ

れらについて、HDAC 阻害活性を調べた結果、幾つかの化合物がHDAC 阻害活性を有することが確認でき、構造と活性の相関も明らかになってきた。新規に合成した化合物の中には、ヒドロキサム酸構造を有しないHDAC 阻害物質が見つかった。ヒドロキサム酸構造は、HDAC 阻害剤の毒性発現の構造因子と考えられていることから、これらの化合物は新規医薬品の創製につながる可能性がある。現在、昨年度に引き続き新規に合成したHDAC 阻害剤について接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析実験を行っている。発現変動した遺伝子の中には、発現抑制される遺伝子が多く、TSA 処理と SAHA 処理で共通した遺伝子の変動しており、これらの薬剤がヒストン脱アセチル化酵素を阻害する効果によって起こる遺伝子発現変化が似ていることを示す。また、新規合成化合物、TSA、あるいは、SAHA 処理で、発現変動する遺伝子が共通していることを見出している。これらの結果は、新規合成化合物が新たなヒストン脱アセチル化酵素阻害剤となる可能性を示唆する。HDAC 阻害剤による遺伝子発現制御の結果は非常に顕著であり、これまで、このように遺伝子発現を変化させた薬剤はない。今後は、遺伝子の同定ならびに抗がん活性に関わる遺伝子が同定することも期待できる。

薬剤の構造修飾が遺伝子発現パターンに及ぼす影響の解析は、毒性が少なくより有効な医薬品の創製にも有用な知見を与えることが期待できる分野である。本研究で得られた遺伝子発現解析のデータと実験動物を用いた遺伝子発現解析のデ

ータを比較し、ヒトへの外挿を行うための基本手法の開発を行うことにより、プロテオーム解析による安全性・有効性評価のための新たな診断マーカーを見つけることも期待できる。

本研究を遂行することにより、ゲノム創薬の根幹となる薬剤の毒性発現に係わるヒトでの遺伝子発現情報が収集できるようになることが期待される。医薬品候補化合物等について迅速・効率的にヒトでの安全性の予測が可能になれば、安全性が高い薬剤の開発するためのトキシコゲノミックスの基盤技術開発に資することができるかと確信している。

D. 健康危険情報

なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A Planar Catechin Analogue as a Promising Antioxidant with Reduced Prooxidant Activity, Kiyoshi Fukuhara, Ikuo Nakanishi, Tomokazu Shimada, Kei Ohkubo, Kentaro Miyazaki, Wataru Hakamata, Shiro Urano, Nobuo Ikota, Toshihiko Ozawa, Haruhiro Okuda, Naoki Miyata, Shunichi Fukuzumi, *Chem. Res. Toxicol.*, (2003), **16** (1), 81-86.
- 2) Activation of human Ah receptor by aza-polycyclic aromatic hydrocarbons and their halogenated derivatives, Ken-ichi Saeki, Tomonari Matsuda, Taka-aki Kato, Katsuya Yamada, Takaharu Mizutani, Saburo Matsui,

- Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, *Biol. Pharm. Bull.*, (2003), **26(4)**, 448-452.
- 3) Signal enhancement in ESR spin-trapping for hydroxyl radicals, Li, Linxiang; Abe, Yoshihiro; Mashino, Tadahiko; Mochizuki, Masataka; Miyata, Naoki. *Analytical Sciences* (2003), **19(7)**, 1083-1084.
 - 4) Novel histone deacetylase inhibitors: design, synthesis, enzyme inhibition, and binding mode study of SAHA-Based non-hydroxamates, Suzuki, Takayoshi; Nagano, Yuki; Matsuura, Azusa; Kohara, Arihiro; Ninomiya, Shin-Ichi; Kohda, Kohfuku; Miyata, Naoki, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2003), **13(24)**, 4321-4326.
 - 5) Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene (C60) as Potential Medicines: O²⁻. versus ¹O₂. Yamakoshi, Yoko; Umezawa, Naoki; Ryu, Akemi; Arakane, Kumi; Miyata, Naoki; Goda, Yukihiro; Masumizu, Toshiki; Nagano, Tetsuo. *Journal of the American Chemical Society* (2003), **125(42)**, 12803-12809.
 - 6) Tokiwa, Hiroshi; Sera, Nobuyuki; Fukuhara, Kiyoshi; Utsumi, Hideo; Sasaki, Shigeki; Miyata, Naoki., Structural activity relationship between Salmonella-mutagenicity and nitro orientation of nitroazaphenanthrenes. *Chemico-Biological Interactions* (2003), **146(1)**, 19-25.
 - 7) [60]Fullerene as a novel photoinduced antibiotic, Kai, Yoko; Komazawa, Yuka; Miyajima, Atsuko; Miyata, Naoki; Yamakoshi, Yoko., *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures*, (2003), **11(1)**, 79-87.
 - 8) Preparation of deuterated methyl and dimethyl substituted nicotinoylating agents for derivatization of N-terminal of protein, Hiroki Tsumoto, Chie Murata, Naoki Miyata, Ryo Taguchi, and Hohfuku Kohda, *Chem. Pharm. Bull.*, (2003), **51(12)**, 1399-1401.
2. 関連する主要な学会発表
(2003.4-2004.3)
- 1) フラボノイド系抗酸化剤のラジカル消去機構、中西郁夫, 大久保敬, 宮崎健太郎, 袴田航, 浦野四郎, 奥田晴宏, 宮田直樹, 上田順市, 小澤俊彦, 福住俊一, 福原潔, 伊古田暢夫、第25回日本フリーラジカル学会, 東京工科大学, 2003年, 6月27日。
 - 2) 平面型カテキン誘導体の合成と抗酸化作用、福原潔, 中西郁夫, 袴田航, 大久保敬, 島田知一, 宮崎健太郎, 浦野四郎, 宮田直樹, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, 奥田晴宏、第25回日本フリーラジカル学会, 東京工科大学, 2003年, 6月28日。
 - 3) タンパク質の質量分析のためのN末端修飾試薬の開発、津元裕樹、幸田光復、宮田直樹、平成15日本薬学会東海支部会, 名古屋, 2004年, 7月5日。
 - 4) Discovery of novel histone deacetylase inhibitors, Suzuki, T., Nagano, Y., Kohara, A., Sudou, T.,

- Kohda, K., Miyata, N., Fifth AFMC Internatinoal Medicinal Chemistry Symposium, Kyoto, October 14-17, 2003.
- 5) Synthesis of new PPAR γ agonist without thiazolizinedione moiety, Naoki Miyata, Yoshinori Hattori, Kazuma Etoh, Arihiro Kohara, Tetsuji Sudou, Kohfuku Koda,, Fifth AFMC Internatinoal Medicinal Chemistry Symposium, Kyoto, October 14-17, 2003.
 - 6) Planar Catechin Analogue as a New Type of Synthetic Antioxidant, Kiyoshi Fukuhara, Ikuo Nakanishi, Wataru Hakamata, Kei Ohkubo, Kentaro Miyazaki, Shiro Urano, Naoki Miyata, Toshihiko Ozawa, Shunichi Fukuzumi, Nobuo Ikota, and Haruhiro Okuda, Fifth AFMC Internatinoal Medicinal Chemistry Symposium, Kyoto, October 14-17, 2003.
 - 7) 活性酸素毒性の予防を目的とした平面型カテキン誘導体の開発、福原 潔、中西郁夫、袴田航、中村友里子、清水健彦、樋口創、増田雄、奥忠武、浦野四郎、齋藤慎一、小澤利彦、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、日本環境変異原学会第32回大会、三重、2003年、11月26-28日。
 - 8) 新規PPAR γ リガンドの合成とその生理活性評価、江藤一摩、服部義史、幸田光復、宮田直樹、平成15年度日本薬学会東海支部会、岐阜、2003年、12月6日。
 - 9) 水溶性フラレンによる活性酸素毒性防御作用の解析、藤澤祐樹、加賀寛人、幸田光復、宮田直樹、平成15年度日本薬学会東海支部会、岐阜、2003年、12月6日。
 - 10) 新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の創製、鈴木孝禎、長野友紀、瀨瀬章泰、小原有弘、二宮真一、幸田光復、宮田直樹、名古屋大学21世紀COE有機化学若手研究会、名古屋、2003年12月12日。
 - 11) 平面型カテキン誘導体の開発：生活習慣病の予防及び治療薬を目指して、福原潔、袴田航、中西郁夫、中村友里子、清水健彦、樋口創、増田雄、奥忠武、浦野四郎、齋藤慎一、宮田直樹、小澤俊彦、伊古田暢夫、奥田晴宏、第18回日本フリーラジカル学会関東部会、神奈川歯科大、2003年、12月22日。
 - 12) Chemical and biological study on reactive oxygen species (ROS) scavenging activity of water-soluble C60 derivatives, Yuki Fujisawa, Hiroto Kaga, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, The 26th Fullerene-Nanotubes General Symposium, Okazaki, 2004, 1, 7.
 - 13) 非ヒドロキサム酸系ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の設計・合成と酵素阻害活性評価、鈴木孝禎、瀨瀬章泰、松浦梓、小原有弘、二宮真一、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月29日
 - 14) 新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の合成と作用機序の解析、松浦

- 梓、長野友紀、鈴木孝禎、小原有弘、二宮真一、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月29日
- 15) PPAR γ アゴニスト作用を持つ 3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]propionic acid誘導体の合成、江藤一摩、服部義史、小原有弘、二宮真一、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月29日
- 16) Zebularineを基本とした新規DNAメチル化阻害薬の創製、稲葉健介、鈴木孝禎、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月29日。
- 17) 活性酸素毒性に対する水溶性C60の防御作用、藤澤祐樹、加賀寛人、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月29日。
- 18) 水溶性C60誘導体の合成と活性酸素種発生能の解析、加賀寛人、藤澤祐樹、藤井清、鈴木孝禎、宮田直樹、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月29日。
- 19) トリフルオロアセチル誘導体によるスチルベン等のエポキシ化反応の検討、永坂憲、鈴木孝禎、宮田直樹、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月31日。
- 20) ペプチドの高感度質量分析のためのフラーレン残基導入試薬の開発、津元裕樹、幸田光復、宮田直樹、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月30日。
- 21) GeneChipを用いた薬剤曝露時の遺伝子発現解析 (Toxicogenomicsへの応用を目指して)、二宮真一、鈴木孝昌、鈴木孝禎、宮田直樹、小原有弘、須藤哲司、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月30日。
- 22) チアゾリジンジオン誘導体曝露ヒトプライマリー肝細胞のGeneChip遺伝子発現解析 (KeyMolnetを用いた分子ネットワーク解析への展開)、小原有弘、鈴木孝昌、小貫慶昭、佐藤陽美、板井昭子、鈴木孝禎、宮田直樹、二宮真一、須藤哲司、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月30日。
- 23) ESR-スピントラップ法による水酸ラジカル消去活性測定上の問題点について、李林香、阿部芳廣、金川聖忠、薄井典子、今井一洋、望月正隆、宮田直樹、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月29日。
- 24) キノンによる酸化的DNA損傷の化学的解析、中西郁夫、内藤有紀、佐藤由紀子、宮田直樹、奥田晴宏、小澤俊彦、伊古田暢夫、福原潔、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月31日。
- 25) 脂溶性平面型カテキン誘導体の合成と抗酸化活性、福原潔、袴田航、中西郁夫、中村友里子、清水健彦、樋口創、増田雄、奥忠武、浦野四郎、齋藤慎一、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、日本薬学会第124年会、大阪、2004年、3月29日。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
登録および登録予定共になし。