

201209014A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

免疫疾患治療に資する小分子医薬創出を指向した核内受容体  
モデュレーターの新規創出と評価

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加来田 博貴

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

免疫疾患治療に資する小分子医薬創出を指向した核内受容体  
モデュレーターの新規創出と評価に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加来田 博貴

平成 25 (2013) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	-----	3
免疫疾患治療に資する小分子医薬創出を指向した核内受容体 モデレーターの創出と評価 (代表 加来田博貴)	-----	4
II. 分担研究報告	-----	45
薬効評価を目的とする遺伝子等発現解析 (分担者 大橋俊孝)	-----	46
III. 研究成果を含む刊行物	-----	51
研究成果の刊行に関する一覧表	-----	52
発表論文	-----	53

## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (創薬基盤推進研究事業)

総括研究報告

免疫疾患治療に資する小分子医薬創出を指向した核内受容体  
モデュレーターの新規創出と評価

研究代表者 加来田博貴

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 合成薬品開発学 准教授

研究要旨

本研究は、クローン病や乾癬などの免疫疾患治療に有効な新たな小分子型医薬候補物質を創出することを目指した。

本研究を実施するにあたり、注目した分子標的はレチノイド X 受容体 (RXR) である。その理由は、PPAR アゴニストおよび LXR アゴニストによる糖代謝促進や抗炎症作用が、PPAR/RXR また LXR/RXR という RXR とのヘテロダイマーを介して発揮されること、さらにこれらの RXR ヘテロダイマーが RXR アゴニスト単独で活性化されることが報告されていたこと、さらに、自己免疫疾患治療への応用が期待されている制御性 T 細胞 (Treg) への誘導促進作用について、PPAR アゴニストおよび LXR アゴニストの報告があり、RXR を標的とすることで Treg 誘導、また上述する免疫疾患に対する治療効果が期待できるのではと考えたからである。

しかしながら、RXR アゴニスト単独での Treg 誘導については未報告であった。そのような中、著者らは RXR を十分活性化する RXR フルアゴニスト NEt-3IP が Treg 誘導促進作用を示すことを、世界で先駆けて見出した。しかし RXR フルアゴニストは、肝肥大や血中トリグリセリド上昇などの副作用が課題となっていた。そこで申請者は、RXR を適度に活性化できる RXR モデュレーター (パーシャルアゴニスト) であれば所望の薬効を維持しつつこれらの副作用を回避できるのではと考えた。RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN を創出し薬効等を評価したところ、上記副作用を回避し、Treg 誘導能、2 型糖尿病モデルマウスにて有意な血糖降下作用を示すことに成功している。

本年度は、クローン病モデル動物および乾癬モデルでの薬効評価系の確立に加え、新規創出した RXR パーシャルアゴニストのラット 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。その結果、CBt-PMN よりも優れた新規 RXR パーシャルアゴニスト NEt-4IB の発見、さらにこのクローン病・乾癬モデル動物での有効性を示し、特許出願に至った。

## 研究分担者

大橋俊孝（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・分子医化学，准教授）；薬効評価を目的とする遺伝子等発現解析

## A. 研究目的

本研究の目的は，抗体医薬で課題とされる投与形式の限定や抗体の出現，費用的課題を回避した，クローン病や乾癬などの免疫疾患治療に有効な新たな小分子型医薬候補物質を創出するものである。

本研究を実施するにあたり，申請者は核内受容体の一つであるレチノイド X 受容体（RXR）を対象に研究を行った。その理由は，RXR アゴニストによる糖代謝の促進<sup>1</sup>，抗炎症効果<sup>2</sup>などが，核内受容体の PPAR や LXR と関係していること，これらの受容体が RXR とヘテロダイマーを形成して機能し，かつ RXR アゴニスト単独でも活性化する報告があったこと，さらに，PPAR や LXR のアゴニストにより自己免疫疾患治療への応用が期待されている制御性 T 細胞（Treg）への誘導促

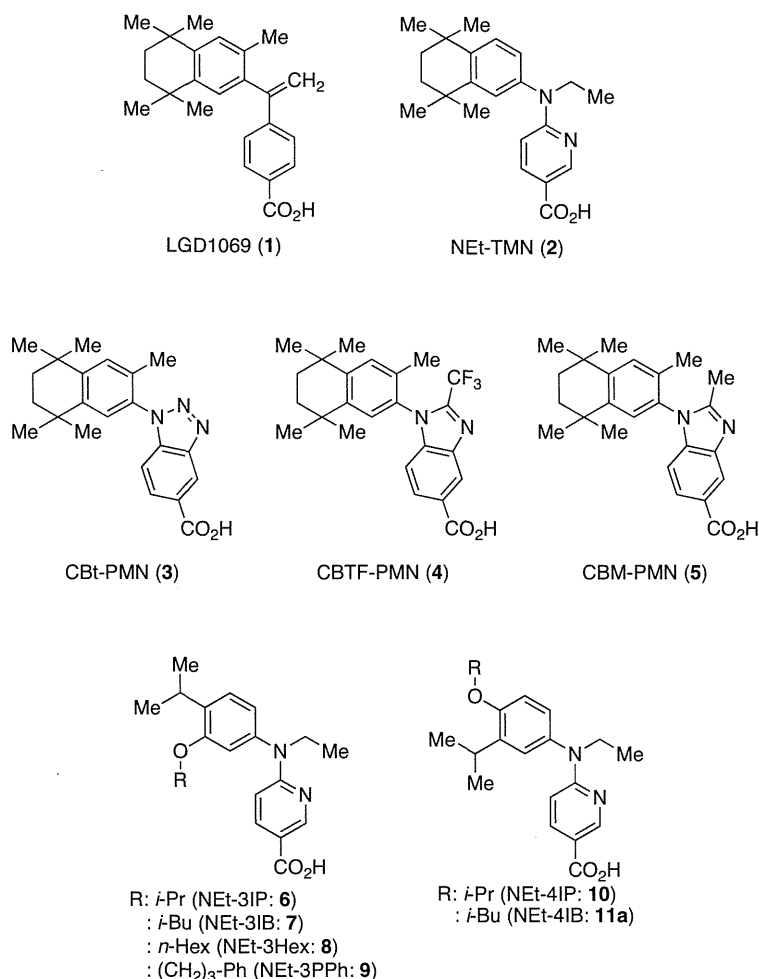


Figure 1. Chemical structures of RXR agonists.

進作用<sup>3</sup>が見られる報告があり、RXR アゴニストであれば、いずれのヘテロダイマーを単剤にて活性化出来ることで、免疫疾患治療に有効ではないかと考えたからである。

しかしながら、RXR フルアゴニストは、肝肥大や血中トリグリセリド上昇などの副作用が課題となっていた<sup>4</sup>。そこで申請者は、RXR を適度に活性化できる RXR モデュレーター（以後はパーシャルアゴニストと記す）であれば所望の薬効を維持しつつこれらの副作用を回避できるのではと考え、RXR パーシャルアゴニスト CBt-PMN (4)

(1-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)-1H-benzotriazole-5-carboxylic acid : E<sub>max</sub> = 75 %, EC<sub>50</sub> = 143 nM)創出したところ、上述する副作用を回避し、Treg 誘導能を示すことを世界で初めて見出した。また、2 型糖尿病モデルマウスにて有意な血糖降下作用も示しながら、ラット 28 日間反復経口投与毒性試験では、5 週齢の雄雌の SD ラットに対し、CBt-PMN (3)を経口にて 30 mg/kg/day で投与しても、臓器の肥大や萎縮、トリグリセリドを含む 9 項目におよぶ血液生化学検査、血球数などについても、非投与群との差は見られないことを確認している（昨年度成果）<sup>5</sup>さらに、CBt-PMN (3)のバックアップ化合物として E<sub>max</sub> が 67%, EC<sub>50</sub> 値が 15 nM の CBTF-PMN (5)などを見出している（昨年度成果）<sup>6</sup>

平成 24 年度は、前年度未実施であった CBTF-PMN(4)のラット 28 日間反復経口投与毒性試験をまず行った。また、RXR パーシャルアゴニストの in vivo における報告はこれらに限られるため、RXR パーシャルアゴニストであれば副作用を回避しつつ薬効を示すことができるのか疑問がもたれたこと、さらに本研究の目的とするクローン病や乾癬などの免疫疾患治療に有効な新たな小分子型医薬候補物質たる RXR パーシャルアゴニストの創出を目指し、新たな RXR パーシャルアゴニストの創出、その薬効・副作用発現について調べた。

#### 【参考文献】

1. *Nature* 2007, 445, 219–223.
2. *PPAR Res.*, 2011, Article ID 840194.
3. a) *J. Immunol.* 2007, 178, 2940–9. b) *Mol. Cells.*, 2012, 33, 217–22. c) *Cell.* 2008, 134, 97–111.
4. a) *Diabetologia*, 1999, 42, 545–554. b) *Biochem. Pharmacol.*, 2001, 62, 1501–9.
5. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2012, 3, 427–432.
6. *J. Med. Chem.*, 2013, 56, 1865–77

## B. 研究方法

1. CBTF-PMNのin vivoにおける薬効・副作用の評価

1-1) マウス経口単回投与による化合物の血中移行性ならびに血中トリグリセリド値の評価

(1)

6週齢の雄性 ICR マウスを搬入し、1つの化合物、1つの時間につき、1群 4-8 匹で実施した。

(2)

化合物投与量は 1 匹あたり 30 mg/kg で行った。投与する化合物は、終濃度 1% 量のエタノールで溶かし、0.5% カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液で懸濁することにより調整した。

(3)

(2) で調整した化合物溶液を 10 mL/kg の容量で胃ゾンデによって経口投与し、0.5, 1, 3, 6 時間後にエーテル麻酔を行い、腹部を切り開いて大静脈より血液を採取し、ヘパリン処理チューブに移した。その後、5 分間 1900 g で遠心分離を行って血漿とし、一部を血中 TG 値測定に用い、一部を血中濃度測定用として 100  $\mu$ L を保存した。血中 TG 値は富士ドライケム 4000 を用いて測定した。

(4)

血漿 100  $\mu$ L に酢酸アンモニウム緩衝液 (酢酸アンモニウム 5 mM に酢酸を加え、pH を 5 に調整して作成した) を 100  $\mu$ L 加え、酢酸エチルを 1 mL 加えた。それを 30 秒間ボルテックスにかけ、室温で 10 分間放置したのち 30 秒間遠心し、上清液

800  $\mu$ L を取り、遠心エバポレーターで濃縮し、残さを -20°C で保存した。

(5)

-20°C で保存されたサンプルにメタノールを 100  $\mu$ L 加え、ボルテックスにかけ、HPLC にて化合物ピークのエリア面積を測定した。

(6)

1, 3, 10, 30  $\mu$ M の化合物溶液を作成し、HPLC にて化合物ピークのエリア面積を測定することで検量線を作成した。

1-2) 雄性 ICR マウス経口 1 週間反復投与による副作用発現確認試験

(1)

6 週齢の雄性 ICR マウスを搬入し、6 日間の順化を行った。その後、群間での体重のばらつきが少なくなるように 1 群 8 匹で群分けを行った。

(2)

毎日朝 10 時に体重測定を行った後、1 匹あたり 30 mg/kg で化合物の経口投与を行った。なお、normal については 0.5% カルボキシセルロース (CMC) 溶液の経口投与を行った。

(3)

投与する化合物は終濃度 1% となる量のエタノールで溶かし、0.5% CMC 溶液で懸濁することにより調整した。



(4)

ICR マウスに 3 で調整した化合物溶液を 10 mL/kg で胃ゾンデによって経口投与した。化合物を 7 日間連続で経口投与し、体重変化を確認した。化合物投与最終日である 7 日目の 17 時に絶食し、翌日の 10 時にマウスをエーテル麻酔により安楽死させ、肝臓、血液の採取を行った。肝臓は重量を測定し、血液はヘパリン処理チューブに移した後、5 分間 1900 g で遠心分離を行って血漿とし、AST, ALT,  $\gamma$ -GTP, ALP, CRE, BUN, TG, TCHO, GLU を富士ドライケム 4000 を用いて測定した。

#### 1-3) SD ラット経口 28 日間反復投与による副作用発現確認試験

(1)

本試験は、「化審法に基づく新規化学物質の届出等に係る資料」に要求される試験(経済協力開発機構(OECD)毒性試験ガイドライン 407)である。

(2)

5 週齢の SD ラット(雄性, 雌性)を搬入し、群間での体重のばらつきが少なくなるように 1 群 6 匹で群分けを行った。

(3)

毎日朝 10 時に体重測定を行った後、1 匹あたり 30 mg/kg で化合物の経口投与を行った。なお、normal については 0.5% CMC 溶液の経口投与を行った。

(4)

投与する化合物は終濃度 1%となる量のエタノールで溶かし、0.5% CMC 溶液で懸濁することにより調整した。

(5)

SD ラットに 4 で調整した化合物溶液を 5 mL/kg で胃ゾンデによって経口投与した。化合物を 28 日間連続で経口投与し、体重変化、摂餌量、摂水量、死亡数を観察した。最終日である 29 日目には、エーテル麻酔により安楽死させ、脳・肝臓・脾臓・腎臓・副腎・精巣を採取し、それぞれ重量を測定し、肉眼的所見を確認した。さらに採血を行い、ヘパリン処理チューブに移した後、4°Cにて 10 分間 2000 g で遠心分離を行って血漿とし、AST, ALT,  $\gamma$ -GTP, ALP, CRE, BUN, TG, TCHO, GLU を、富士ドライケム 4000 により測定した。

#### 1-4) 血液生化学検査ならびに血球測定

白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) および血小板数 (PLT)については、pocH-100i (Sysmex)を用いて測定した。

また, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP), alkaline phosphatase (ALP), creatinine (CRE), blood urea nitrogen (BUN), triglyceride (TG), total cholesterol (TCHO)および glucose (GLU) については, Fuji Dry Chem system (Dry Chem 4000V, Fuji Medical Co., Tokyo, Japan)を用いて測定した.

## 2. 新規RXRパーシャルアゴニストの創出

### 2-1) 化合物の合成

著者らは, これまでに 6-[ethyl-(3-hexyloxy-4-isopropylphenyl)amino]pyridine-3-carboxylic acid (NEt-3Hex: **8**) ( $E_{\max} = 77\%$ ,  $EC_{50} = 280$  nM) および 6-{ethyl-[4-isopropyl-3-(3-phenylpropoxy)phenyl]amino}pyridine-3-carboxylic acid (NEt-3PPH: **9**) ( $E_{\max} = 78\%$ ,  $EC_{50} = 820$  nM) がRXRに対しパーシャルアゴニスト活性を示すことを報告している.<sup>7</sup> しかしこれらの化合物は, 経口投与による血中移行性が悪く, 問題であった. RXRフルアゴニスト NEt-3IP (**6**) (6-[ethyl-(3-isopropoxy-4-isopropylphenyl)amino]pyridine-3-carboxylic acid :  $E_{\max} = 136\%$ ,  $EC_{50} = 32$  nM) 見出した際, アルコキシ基の位置異性体であるNEt-4IP (**10**) (6-[ethyl-(4-isopropoxy-3-isopropylphenyl)amino]pyridine-3-carboxylic acid) の $EC_{50}$ が

NEt-3IP (**6**)に比べ高いことから,<sup>8</sup> NEt-4IP (**10**)のアルコキシ基の変換は行っていない. しかし, 著者らは, *in vitro*における活性が低くても経口投与後の血中濃度が高ければ, 所望の薬効が得られることを報告している.<sup>9</sup> そこで, アルコキシ基の位置の違いにより, 経口吸収性が向上するのではないかと考え, NEt-4IP (**10**)のイソプロポキシ部位の変換を行うことで新規RXRパーシャルアゴニストの創出を行った.

なお新規RXRパーシャルアゴニストの合成法については, 項目Cに記載した.

### 【参考文献】

7. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2010, 1, 521-525.
8. *ChemMedChem* 2008, 3, 780-7.
9. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97, 5446-52.

### 2-2) 転写活性評価

#### (1) 測定原理

核内受容体の多くは転写調節に関わる転写因子であるため, その転写活性を測定する手段としてレポーター遺伝子アッセイ (reporter gene assay) が行われる. CO S-1細胞やHeLa細胞などの細胞に, RXR受容体タンパク質発現プラスミド及びレポータープラスミドを導入し, 融合タンパク質 (fusion protein) を過剰発現させる. そこに, RXR作動性物質 (リガンド) が受容体に結合すると, 転写がリガンド依存的

に起こり、その下流にある融合タンパク質が生成され、下流にあるルシフェラーゼの産生が始まる。このルシフェラーゼ活性を測ることにより、RXR作動活性を測定した。

## (2) 宿主細胞の培養

細胞の増殖培地は、ダルベッコ変法イーグルMEM培地 (DMEM) を用いた。まず、500 mLの超純水 (Milli-Q®にて生成) にDMEM粉末4.75 gを溶解し、高圧加熱滅菌 (121°C, 20分間) を行った後、室温に戻し、これを非働化したウシ胎児血清 (FBS) を10 % (v/v)となるように加え、さらに高圧加熱滅菌した10 % NaHCO<sub>3</sub>を10 mL添加し、その後L-グルタミン0.292gを8 mLの超純水に溶解したものをろ過滅菌後添加して調製した。

各細胞の継代は、100 mm培養シャーレで培養した細胞の培養上清を除き、トリプシン処理により細胞を回収し、4 °C, 100 rpm, 3分間遠心分離後、増殖培地を加えて細胞を分散させ、100 mm培養シャーレに細胞を分散した増殖培地を15 mL加え、37°C, 5 % CO<sub>2</sub>存在下で培養した。

## (3) 形質転換

形質転換はEffectene™ Transection Reagent (QIAGEN社)を用いて行った。

## (4) 転写活性の測定

### (1日目)

60 mm培養シャーレに、増殖培地5 mLとともにCOS-1細胞を50 × 10<sup>4</sup> cells播種

し、一晚培養した。

### (2日目)

Effectene™ Transection Reagent (QIAGEN社)を用いたりポフェクション法により形質転換を行った。加えたプラスミドは下記の通りである。レポータープラスミド: CRBPII-tk-Luc (RXR), tk-TREPII-Luc (RAR), tk-PPREx3-Luc (PPAR), and tk-rBARx3-Luc (LXR)。使用したプラスミド量は、受容体発現用プラスミド (ホモダイマーの場合は1.0 μg, ヘテロダイマーの場合は0.5 μg), レポータープラスミド (4.0 μg) である。

### (3日目)

16-18時間後、培養上清を除き、トリプシン処理により細胞を回収し、4 °C, 100 rpm, 3分間遠心分離後、増殖培地を加えて細胞を分散し、2.0 × 10<sup>4</sup> cells/wellとなるように96ウェルのホワイトプレートに播種した。その後、DMSO濃度が1%以下になるように各化合物を加えた。

### (4日目)

24時間後、上清25 μLをSEAP測定に用い、残りの細胞液はルシフェラーゼ活性測定に用いた。

## (5) 緩衝溶液の準備

アッセイ用緩衝液は、以下の方法で調製した。50 mLの超純水 (Milli-Q®にて生成) にL-ホモアルギニン (0.45 g) と塩化マグネシウム (0.02 g) を溶解させ、ジエタノールアミン (21 mL) を加えた。その後、塩酸を用いてpHを9.8になるように調整後、

超純水を用いて全量が100 mLになるようにメスアップし、それを4 °C で保存した。

希釈用緩衝液は、以下の方法で調製した。90 mLの超純水 (Milli-Q®にて生成) に塩化ナトリウム (4.38 g) とTris Base(2.42g) を溶解させた。その後、塩酸を用いてpHが7.2になるように調整し、5倍濃度希釈用緩衝液を作製し、それを4 °C で保存した。使用直前にそれを5倍希釈することで希釈用緩衝液を作製した。

#### (6) SEAP測定

SEAP測定は、Methods in molecular biology, 63, pp.49-60, 1997/ BD Great Escape SEAP User manual (BD bioscience)に記載の方法にしたがい行った。

必要となる4-メチルウンベリフェリルホスフェート溶液は、4-メチルウンベリフェリルホスフェートを25 mMになるように超純水 (Milli-Q®にて生成) に溶解させ、それを-20 °C で保存したものを、10× MUPとした。

具体的測定法は、以下の方法で測定した。上記4日目の上清25 μLに対して希釈用緩衝液を25 μL加えた後、65 °C で30分インキュベートした。その後室温に戻し、アッセイ用緩衝液 (7 μL), 10×MUP (0.3 μL), 希釈用緩衝液 (2.7 μL)を加え、暗所室温で60分インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダー(インフィニット™ (infinite)200, TECAN社製)を用い励起波長360 nm, 蛍光波長465 nmにより蛍光強度を測定した。

#### (7) ルシフェラーゼ活性測定

ルシフェラーゼ活性は、NUNC社製の96穴ホワイトプレートを用い、発光基質 (Steady-Glo® Luciferase Assay System, Promega社製) との反応産物との発光強度をマイクロプレートリーダー(インフィニット™ (infinite)200, TECAN社製)を用いて測定した。

#### (8) 陽性コントロール

RXRの陽性コントロールにはLGD1069 (1)<sup>10</sup>, PPARの陽性コントロールにはTI PP-703<sup>11</sup>, LXRの陽性コントロールにはcarba-T0901317<sup>12</sup>を用いた。これらは、DMSO溶解したものをストック溶液とし、アッセイするプレートにおいて計測した。

測定結果は、陽性コントロールを1 μM反応させたときの転写活性を1とし、相対活性値を調べた。

#### 【参考文献】

10. *Cancer Res.* 1996, 56, 5566–70.
11. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, 18, 4 525–4528.
12. *Heterocycles*, 2008, 76, 137–142.

#### 3. ドッキングシミュレーション

化合物とRXRとのドッキングシミュレーションには、タンパク質構造としてProtein Data BankよりRXR アゴニストLGD1069 (1)の結合したX線構造データ(3H0A)をweb

(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)  
より入手し、さらに化合物の立体構造を  
Spartan10 で構築後、AutoDock 4.2 を用い  
て行った。なお、画像化は MolFeat v4.5  
を用いた。

#### 4. 新規創出RXRパーシャルアゴニストのin vivoにおける薬効・副作用の評価

本項目については、1. CBTF-PMN (4)  
の in vivo における薬効・副作用の評価  
に記載した方法と同じである。

#### 5. NBD-Cl 誘発クローン病モデルマウスの作成および抗炎症試験による目的化合物の薬効評価

##### 5-1) モデルの作成方法

モデル作成は、文献 12 を参考に実施し  
た。

##### (1)

NBD-Cl (東京化成工業) 200 mg を 1 mL  
のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶  
解した。

##### (2)

(1) で調整した溶液 7.5  $\mu$ L にエタノール 500  $\mu$ L を加え、さらに精製水を 492.5  $\mu$ L 加えたものを NBD-Cl 溶液とした。

##### (3)

7 週齢(体重 17-18 g)の雌性 BALB/c マウスを搬入した。

##### (4)

投与する化合物は NEt-4IB (11a)は 10 mg/mL, prednisolone は 30 mg/mL となるように、終濃度 1%となる量のエタノールで溶かし、0.5% CMC 溶液で懸濁することにより調整した。なお、vehicle については化合物溶液の代わりに 0.5% CMC 溶液の経口投与を行った。Normal については何も投与しなかった。

##### (5)

実験開始日(day 1)の朝 9 時に体重を測定し、体重のばらつきが少なくなるように群分け(1 群 3-5 匹)を行った。その後、胃ゾンデにて 4 で調整した化合物溶液を 1 匹あたり 200  $\mu$ L の投与量で経口投与を行った。

##### (6)

化合物の投与を行った後、NBD-Cl 溶液を腸注しやすくするため、マウスに排便を促し、ジエチルエーテル麻酔下、2 で作製した NBD-Cl 溶液 100  $\mu$ L をカテーテルを用いて直腸投与した(10 時)。NBD-Cl 直腸投与後 6 時間後に再び化合物の経口投与を行った(16 時)。以降 3 日間(days 2-4) 同じように 10 時に体重測定を行い、10 時と 16 時に胃ゾンデにて 4 で調整した化合物溶液を 1 匹あたり 200  $\mu$ L の投与量で経口投与を行った。

##### (7)

NBD-Cl 直腸投与から 5 日目(day 5)の朝 10 時に体重測定を行った後、マウスをジエチルエーテルにより安楽死させ、解剖した。肝臓および大腸を摘出し、大腸は炎症の程度を観察するとともに腸長の測定を行った。

### 5-2) 評価方法

薬効の評価は、体重変化、解剖時の大腸長を測定、PCR による炎症部位の炎症性サイトカイン発現、組織切片を比較し行った。

### 5-3) 統計学的処理

有意差検定は vehicle 群と薬物投与群との間には、Bonferroni の多重検定により行った。

#### 【参考文献】

12. *Biotechniques*, 2010, 49, 641-648.

## 6. Imiquimod 誘発乾癬モデルマウスの作成および目的化合物の薬効評価

### 6-1) モデルの作成方法

モデルの作成は、文献 13 を参考に実施した。

#### (1)

Imiquimod は、持田製薬より販売されているベセルナクリーム(5% Imiquimod)を用いた。

#### (2)

7 週齢(体重 20-24 g)の雄性 BALB/c マ

ウスを搬入し、1 化合物につき、1 群 6 匹用いた。化合物投与は、1 匹あたり 30 mg/kg で行った。投与する化合物は、終濃度 1%となる量のエタノールで溶かし、0.5% CMC 溶液で懸濁することにより調整した。化合物調製は 10 mL/kg の容量で行った。なお、vehicle については化合物溶液の代わりに 0.5% CMC 溶液の経口投与を行った。

#### (3)

ジエチルエーテル麻酔下、バリカンを用いて、マウスの背中を 1.5 × 1.5 cm 毛ぞりした。毛ぞり 3 日後を実験開始日(day 1)とし、朝 10 時に体重測定を行った後、体重のばらつきが少なくなるように群分け(1 群 3-5 匹)を行った。その後、胃ゾンデを用いて化合物の CMC 溶液を経口投与した。経口投与後、毛ぞりした箇所に、1 で準備したベセルナクリームを 1 匹あたり 40 mg スパ-テルを用いて塗布した。

#### (4)

実験開始日から毎日、マウスの体重を測定した。測定後、3 と同様に胃ゾンデを用いて化合物の CMC 溶液を経口投与した後、背中にベセルナクリームを 40 mg 塗布した(days 1-4)。

#### (5)

4 日後(day 5)からはベセルナクリームの塗布は行わず、体重測定、化合物の経口投与のみとした。最終日(day 7)にマウスをジエチルエーテルにより安楽死させ

た.

## 6-2) 評価方法

薬効の評価は、体重変化の測定ならびに皮膚の様子を観察、非薬物投与群と比較することで行った。

## 6-3) 統計学的処理

有意差検定は vehicle 群と薬物投与群との間は、Bonferroni の多重検定により行った。

### 【参考文献】

13. *J. Immunol.*, 2009, 182, 5836–5845.

### (倫理面への配慮)

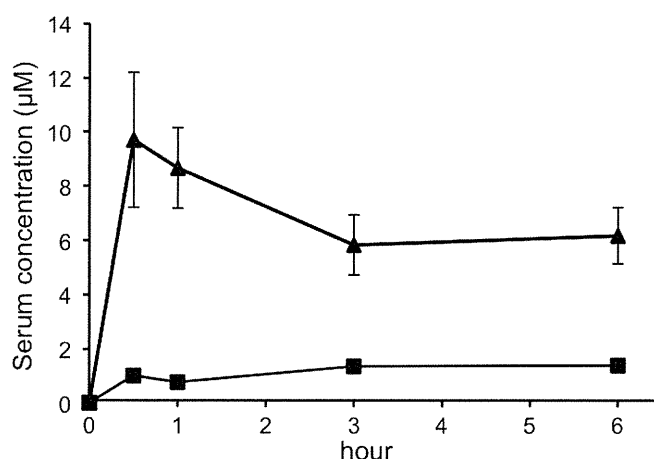
いずれの動物実験とも、岡山大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

## C. 研究結果

### 1. RXRパーシャルアゴニスト

CBTM-PMNの長期投与における副作用発現に関して

CBTF-PMN(4)の副作用発現評価に先立ち、化合物の経口投与による血中移行性を調べた。なお、比較対象としてRXRフルアゴニストであるNEt-TMN(2)の血中濃度についても調べた。Figure 2に、それぞれの化合物の30 mg/kgでのICRマウスへの単回投与時の血中濃度を示す。CBTF-PMN(4)は、投薬後30分で10  $\mu$ M程度の血中濃度を与えたのに対し、RXRフルアゴニストであるNEt-TMN(2)は1  $\mu$ M程度であった。さらにCBTF-PMN(4)は投与後3時間から6時間後であっても、その血中濃度は6  $\mu$ Mであり、本化合物の最大活性 ( $E_{max}$ ) を与えるのに十分であるこ



**Figure 2.** Plasma concentrations of NEt-TMN (2) and CBTF-PMN (4) in ICR mice after single oral administration of 30 mg/kg. Closed Squares and triangles indicate NEt-TMN and CBTF-PMN (4), respectively. The data (n = 5–9) represent the mean  $\pm$  SEM.

とも分かった。

つぎに、ICRマウスに対して30 mg/kgで7日間連続経口投与した際の、血清パラメータについて述べる。このデータについては、Table 1に示している。ここに示す化合物CBM-PMN (5)はRXRフルアゴニストである。RXRフルアゴニストNEt-TMN (2)やCBM-PMN (5)がAST, ALT, ALPを顕著に上昇させたのに対し、CBTF-PMN (4)の投与群においては、ASTを除いてNEt-TMN (2)やCBM-PMN (5)に比べ低く、薬物非投与群と変わらない程度であった。

ラットに対する28日間反復経口投与の

結果は、Figure 3, Table 2に示している。

CBTF-PMN (4) は、RXRアゴニストに報告されている体重増加は顕著でなく、肝肥大、トリグリセリド上昇についても、薬物非投与群に比べ有意な差は認められなかった。なお、臓器重量において肝臓の重量が有意に増加しており、この点については、今後の検討課題である。また、血液成分に関する生化学検査の結果、薬物非投与群に比べ有意な差が見られるものもあったが、ラット購入元であるCharles River社から提供されている平均データと比較すると、正常範囲であると判断出来る。

**Table 1.** Plasma parameters of male ICR mice after oral administration of vehicle, NEt-TMN (2), CBTF-PMN (4) or CBM-PMN (5) at 30 mg/kg/day for 7 consecutive days (n = 7–16)

	Vehicle	NEt-TMN (2)	CBTF-PMN (4)	CBM-PMN (5)
AST (U/I)	54.6 ± 3.8	87.9 ± 18.9**	70.1 ± 6.5	51.3 ± 3.9
ALT (U/I)	22.3 ± 1.5	43.5 ± 6.0**	26.5 ± 2.1	32.7 ± 6.4*
γ-GTP (U/I)	6.1 ± 0.7	7.1 ± 0.3	4.5 ± 0.6	6.4 ± 0.3
ALP (U/I)	281.3 ± 15.7	968.9 ± 115.0**	381.6 ± 58.9	456.0 ± 51.5*
CRE (mg/dL)	D.L. <sup>a</sup>	D.L.	D.L.	D.L.
BUN (mg/dL)	24.1 ± 1.0	26.0 ± 1.8	24.8 ± 2.1	24.1 ± 2.1

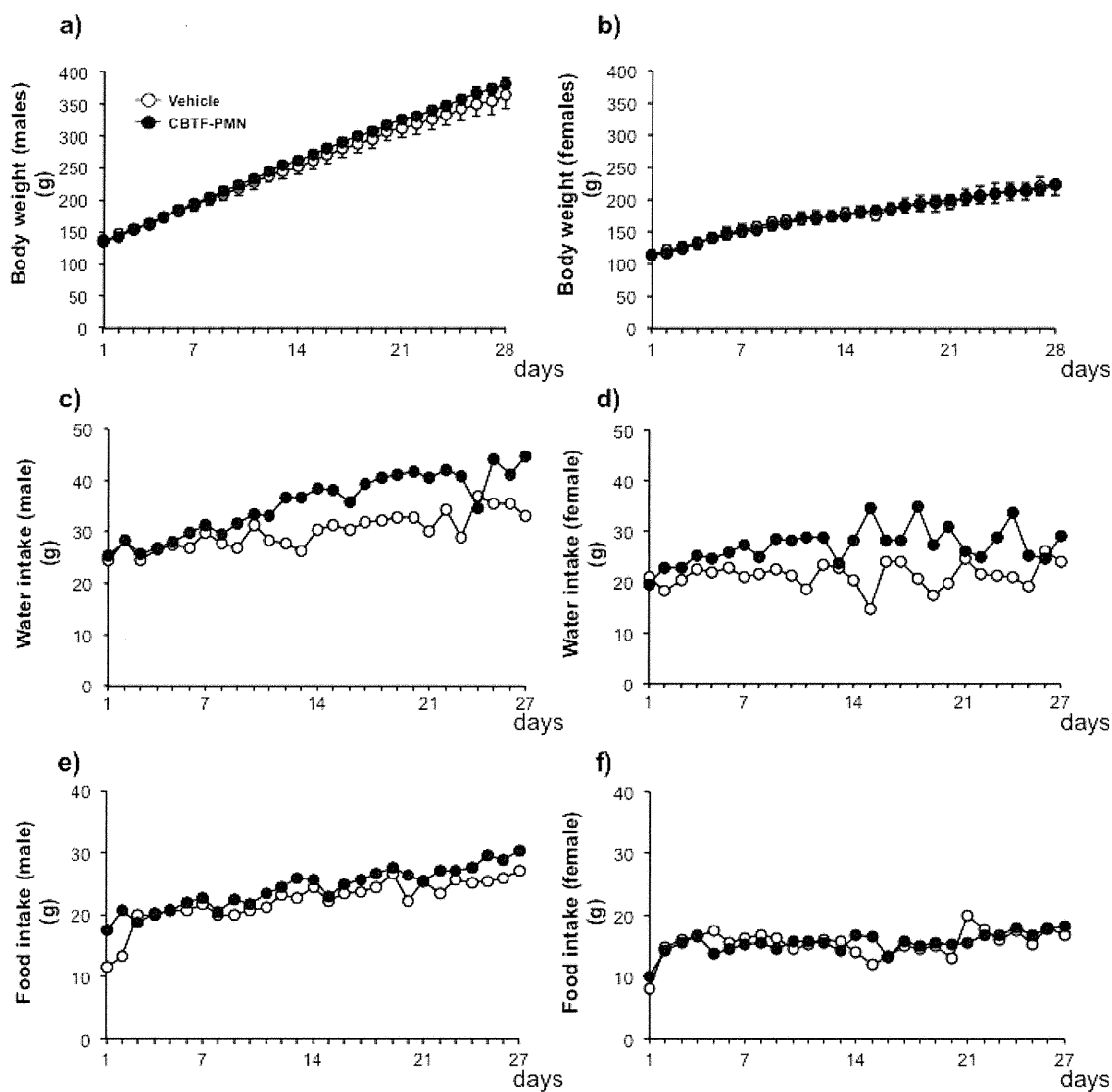
a) D.L. means below the detection limit (0.2 mg/dL).

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, γ-GTP : γ-glutamyltranspeptidase, ALP: alkaline Phosphatase, CRE: creatinine, BUN: blood urea nitrogen.

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

Significant differences: \* p < 0.05 vs. vehicle. \*\* p < 0.01 vs. vehicle.





**Figure 3.** Changes in body weight gain, water intake, and food intake of male or female SD rats treated with oral administration of vehicle or CBTF-PMN (**4**) 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 and closed circles indicate vehicle and **4** treatment, respectively.

## 2. 新規RXRパーシャルアゴニストの探索に関して

### 2-1) 化合物の合成

合成は、Scheme 1 にしたがって行った。

2-isopropylphenol (**12**) を出発原料とし、超音波条件下にて、硝酸と塩化亜鉛を用いてニトロ化することで **13** を合成した。化合物 **13** のフェノール性ヒドロキシ基をイソプロポキシ基に置換することで **14** を合成し、ニトロ基の接触還元後、メシル

**Table 2.** Plasma parameters of male and female SD rats after oral administration of vehicle or CBTF-PMN (4) at 30 mg/kg/day for 28 consecutive days (n = 2–6).

	Male		
	Vehicle	CBTF-PMN (4)	Reference <sup>a</sup>
AST (U/I)	65.7 ± 6.3	91.7 ± 3.7**	87.0–114.0
ALT (U/I)	30.0 ± 1.7	50.2 ± 2.3**	28.0–40.0
γ-GTP (U/I)	6.7 ± 0.9	7.0 ± 0.0	0.0–1.0
ALP (U/I)	703.7 ± 58.6	864.0 ± 94.2	–
CRE (mg/dL)	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
TG (mg/dL)	61.3 ± 9.9	49.0 ± 4.6	61.0–99.0
TCHO (mg/dL)	50.0 ± 2.5	60.3 ± 4.0	54.0–74.0

	Female		
	Vehicle	CBTF-PMN (4)	Reference <sup>a</sup>
AST (U/I)	69.7 ± 4.8	67.8 ± 2.1	85.0–123.0
ALT (U/I)	21.7 ± 1.2	37.0 ± 1.2**	25.0–36.0
γ-GTP (U/I)	7.0 ± 0.6	5.8 ± 0.2*	0.0–0.4
ALP (U/I)	382.5 ± 46.5	387.7 ± 31.4	–
CRE (mg/dL)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.5–0.6
BUN (mg/dL)	14.5 ± 0.6	15.5 ± 2.0	11.0–16.0
TG (mg/dL)	18.7 ± 4.1	45.2 ± 4.6**	42.0–74.0
TCHO (mg/dL)	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®.

b. Data are mean ± SEM. Statistical analysis was performed by t-test. Significant differences:

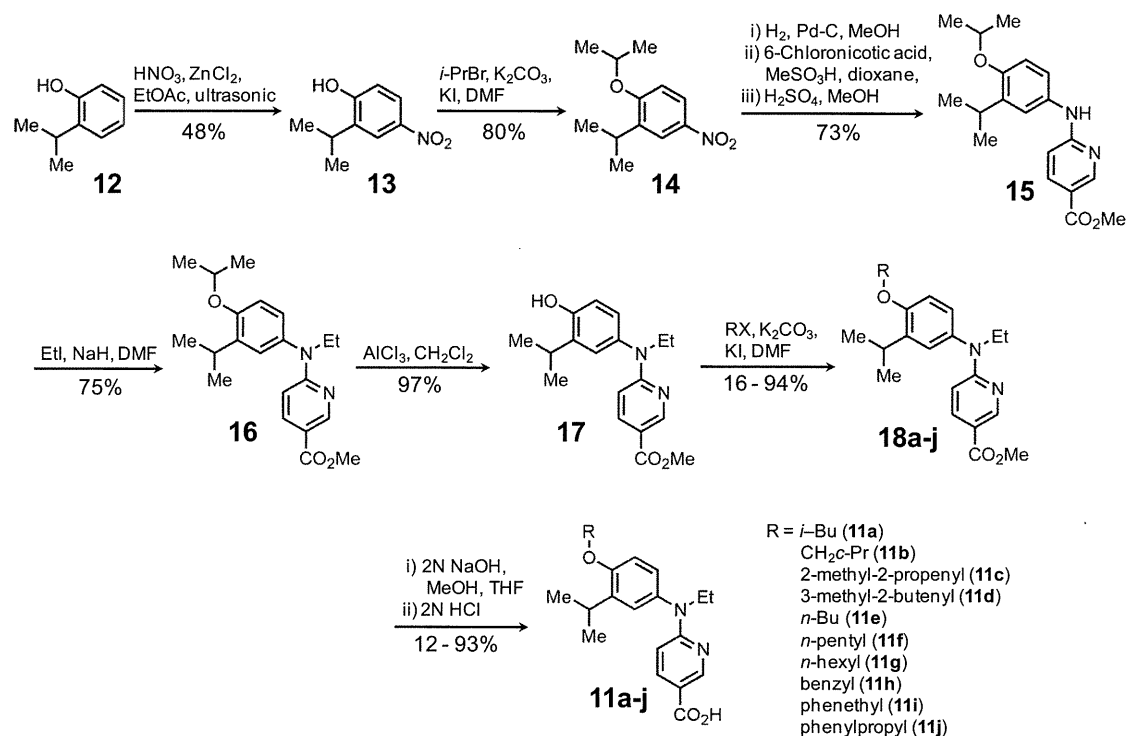
\* p < 0.05 vs. vehicle. \*\* p < 0.01 vs. vehicle.

酸触媒下にて 6-chloronicotinic acid とのカップリングを行い、カルボン酸のメチルエステル化によって **15** を得た。その後、化合物 **15** のアミノ基を N-エチル化することで **16** を合成した。次に、塩化アルミニウムを用いて **16** のイソプロピル基を脱保護し、共通中間体 **17** を合成した。化合物 **17** と、**11a-j** に対応する種々のアルキ

ルハライドを反応させることで **18a-j** を得、加水分解によって目的化合物 **11a-j** を合成した。

#### General methods.

Melting points were determined with a Yanagimoto hot-stage melting point apparatus and are uncorrected. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a VarianVXR-300



**Scheme 1.** Synthesis scheme of **11a-j**.

(300 MHz), JEOL JMN-AL-300 (300 MHz) or VarianVXR-500 (500 MHz) spectrometer. Elemental analysis was carried out with a Yanagimoto MT-5 CHN recorder elemental analyzer and results were within  $\pm 0.4\%$  of the theoretical. FAB-MS was carried out with a VG70-SE.

#### HPLC conditions

The HPLC system used in this study was a Shimadzu liquid chromatographic system (Kyoto, Japan) consisting of an LC-10AD pump, SPD-10AV UV-Vis spectrophotometric detector, CTO-10AS column oven and C-R5A Chromatopac. The samples (each 20  $\mu\text{L}$ ) were injected. The chromatographic analyses were carried out

on an Inertsil ODS-3 (4.6 i.d. x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , GL Sciences, Tokyo, Japan) with a guard column of Inertsil ODS-3 (4.0 i.d. x 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ , GL Sciences) kept at 40°C, using methanol : 25 mM ammonium acetate (adjusted with acetic acid to pH 5.0) (80:20 or 70:30, v/v) as a mobile phase. The flow rate was 0.7 mL/min and the absorbance at 278 nm was monitored.

#### LGD1069 (1).

This compound was prepared according to reference 14.

#### NEt-3IB (7).

This compound was prepared according to reference 8.

### NEt-3nHex (8), NEt-3PPH (9).

These compounds were prepared according to reference 7.

### 2-Isopropyl-4-nitrophenol (13).

Conc. HNO<sub>3</sub> (3.4 mL, 45 mmol) was added to a solution of 2-isopropylphenol (6.1 mL, 45 mmol) in EtOAc (200 mL) in an ice bath. The reaction mixture was placed in an ultrasonic reactor, and ZnCl<sub>2</sub> (6.1 g, 45 mmol) was added, then stirred for 0.8 h. The reaction mixture was washed with H<sub>2</sub>O (2 × 100 mL) and brine (100 mL), and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography to yield **13** (4.9 g, 60%) as brown solid. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 8.13 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.00 (dd, *J* = 9.0, 2.8 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 3.26 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H).

### Isopropoxy-2-isopropyl-4-nitrobenzene (14).

2-Bromopropane (990 μL, 11 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.6 g, 19 mmol) and KI (800 mg, 4.8 mmol) were added to a solution of **13** (1.7 g, 9.6 mmol) in dry DMF (4.8 mL). The reaction mixture was stirred at 70°C under Ar atmosphere for 3 h. Then the reaction mixture was poured into 2N HCl (70 mL) and extracted with EtOAc (3 × 80 mL). The organic layer was collected, washed with H<sub>2</sub>O (2 × 80 mL) and brine (80 mL), and

dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography to yield **14** (1.7 g, 80%) as orange oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 8.13 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.07 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.70 (sep, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.31 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.40 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H), 1.24 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H).

### Methyl

### 6-[(4-isopropoxy-3-isopropylphenyl)amino]pyridine-3-carboxylate (15).

10% activated Pd-C (catalytic amount) was added to a solution of **14** (4.7 g, 21 mmol) in MeOH (30 mL). The reaction mixture was stirred under H<sub>2</sub> atmosphere at room temperature for 5.5 h. The reaction mixture was filtered through celite, and the celite cake was washed with EtOAc. The solvent was evaporated under reduced pressure. 6-Chloronicotinic acid (3.7 g, 23 mmol) and MeSO<sub>3</sub>H (1.5 mL, 23 mmol) was added to a solution of the residue in dry dioxane (30 mL). The reaction mixture was stirred at 120°C under Ar atmosphere for 17 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. Conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.0 mL) was added to a solution of the residue in dry MeOH (20 mL). The reaction mixture was stirred at 80°C under Ar atmosphere for 5.7 h. The reaction mixture was evaporated