

201209014B

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
モジュレーターの新規創出と評価

平成23年度～24年度 総合研究報告書

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23年度～24年度 総合研究報告書

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 モデュレーターの新出と評価（代表 加来田博貴）		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	67
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	71

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、高額な抗体医薬が使用されている自己免疫疾患に対し、安価に供給可能な小分子医薬候補物質の新規創出を目指し、レチノイド X 受容体（RXR）を分子標的に、そのモデュレーター新規創出から薬効評価、副作用評価などを一貫して実施した。

RXR アゴニストは、単独で PPAR/RXR また LXR/RXR などを活性化できることから、糖代謝の促進、抗炎症効果が報告されている。また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）の誘導促進作用が、RXR とヘテロダイマーを構築して機能する RAR の活性化によって得られること、さらにその効果を PPAR/RXR また LXR/RXR などを介してより高める報告もあることから、著者らは RXR アゴニストによる Treg 誘導促進作用が見られるのではとの仮説をたて研究を行ってきた。その結果、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。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 モデュレーター CBt-PMN を創出し薬効等々を評価したところ、上述する副作用を回避し、Treg 誘導能、また 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を世界で初めて見出した。

本事業では、1) CBt-PMN の免疫疾患モデル動物での薬効評価、2) CBt-PMN の毒性試験を初年度の実施項目とし、さらに 3) 新規 RXR モデュレーターの新規創出、4) 創出 RXR モデュレーターの薬効並びに副作用発現評価を次年度の実施項目とした。

以上の結果、CBt-PMN よりも優れた新規 RXR モデュレーター NEt-4IB の発見、さらにこれによるクローン病・乾癬モデル動物での有効性を示すことに至った。

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），大塚 正人（岡山大学自然生命科学研究支援センター，准教授．現 摂南大学 教授，異動のため平成 23 年度のみ分担）；薬効評価を目的とする遺伝子等発現解析

A. 研究目的

本研究は，クローン病のような免疫疾患治療に資する小分子型治療薬候補創出またその手法提示を目的とした創薬研究である．その背景には，クローン病のような免疫疾患に対して抗体医薬が臨床適用され始めているとは言え，高額であることに加え，抗体医薬に対する抗体の発現，投与形式の制限などもあり依然課題が残ること，また，有機合成的に創出される小分子医薬については，所望の標的分子探索の行き詰まりなどもあり停滞状態であることなどが挙げられる．

低分子医薬の創出には，所望の薬効に通ずる分子標的が要求されるが，新たな分子標的が提示されにくい今日において画期的な新薬を創出するには，発想の転換が必要と思われる．そのような観点から，本研究実施者である著者らは副作用発現などを理由に見捨てられていた過去の創薬ターゲットに着目し，有機化学先導的に副作用発現を軽減しつつ所望の薬効を発揮しうる医薬候補物質創出に興味をもった．これを本研究の研究代表者で

ある加来田は「リバイバル創薬」と称している．本研究課題では，その一環として行ってきた核内受容体研究，中でもレチノイド X 受容体 (RXR) を分子標的に，そのモデュレーター創出から薬効評価，副作用評価について一貫して実施した．

核内受容体 PPAR や LXR のアゴニストによる抗炎症・抗アレルギー作用が報告されているが，これらは PPAR/RXR また LXR/RXR を介して発揮される．これらのヘテロダイマーは RXR アゴニスト単独でも活性化される (RXR パーミッシブヘテロダイマー)¹．また RXR アゴニストは，外因性のみならず内因性の PPAR² や LXR³ 活性を増強しうるシナジー効果も有する．したがって RXR を標的とすることでは，数々の核内受容体と機能するため，機能的選択性の低さを問題視し，製薬企業等での研究は滞っていた．著者はこれを逆手にとって，体内環境のトータルバランス的な改善へ応用し，これによる免疫疾患治療への展開を考えた．

これまでに著者は，独自に創出した RXR アゴニスト NEt-3IP⁴ によるリウマチモデルでの薬効，また顕著な Th17 発現抑制能を見出している．また，上述するような免疫疾患に対する治療薬候補物質として関心を集めている制御性 T 細胞 (Treg) 誘導能が本化合物にも見られることを発見している (投稿準備中)．

しかし，NEt-3IP をはじめ既存の RXR

アゴニストは、血中トリグリセリド上昇などの副作用発現が認められる⁵。これらのRXRアゴニストはRXRフルアゴニストであるため、RXRの活性過多に基づき副作用発現を生じうるのではないかと考えられた。そこで申請者は、フルアゴニストに比べてefficacy (E_{max})が60%前後であるRXRモデュレーター（以降、パーシャルアゴニストと記す）に興味を抱いた。

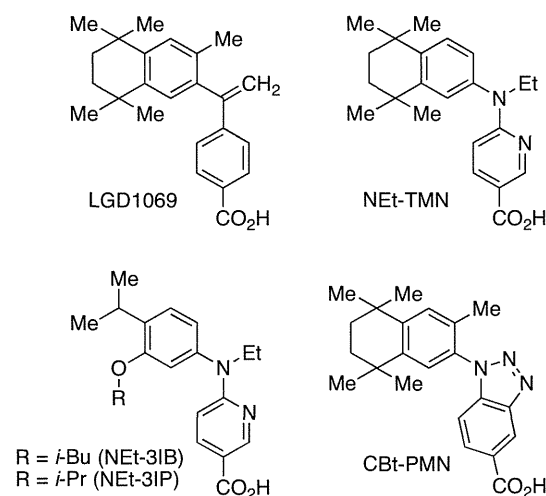


Figure 1. 各種RXRリガンドの分子構造。

RXRパーシャルアゴニストの合理的分子設計は報告されているが⁶数も少なく、*in vivo*での有効性に関する報告はない。そのような中、CBt-PMNと命名した化合物に E_{max} が75%、 EC_{50} 値が150 nM程度の活性を見出し（特許第5255994号）、かつ上述する副作用を回避しつつ1型2型糖尿病モデルにおいて有意な血糖降下作用を示すことを見出している^{7,8}（日本薬学会医薬化学部会MCS優秀発表賞を受賞）。

しかし、本化合物によるクローン病などに対する薬効評価は未実施であった。そこで、本研究ではその薬効評価、また、各種RXRパーシャルアゴニストを創出し、製薬企業との共同研究に発展しうる小分子型免疫疾患治療薬の医薬候補もしくはリード化合物の提供を目指した。

なお、各年度において実施した項目は下記の通りである。

【平成23年度】

- 1) CBt-PMNの毒性試験（28日間ラット反復投与）
- 2) CBt-PMNのRXRパーシャルアゴニスト活性発現メカニズムの解明
- 3) CBt-PMNの免疫疾患モデル動物での薬効評価（乾癬、クローン病モデルマウスでの有効性の確認）
- 4) 新規RXRパーシャルアゴニスト（CBTF-PMN）等の創出
- 5) マウスリウマチモデルの構築

【平成24年度】

- 1) CBTF-PMNの毒性試験（28日間ラット反復投与）
- 2) 新規RXRパーシャルアゴニストの探索
- 3) 新規RXRパーシャルアゴニストNEt-4IBの免疫疾患モデル動物での薬効評価（クローン病・乾癬モデルマウスでの有効性の確認）
- 4) 研究成果をもととした企業との共同研究先の発掘

【参考文献】

1. a) *Science* 2001, 294, 1866–70. b) *Cell* 1995, 83, 841–50. c) *Nature* 1997, 386, 407–10.
2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995, 132, 317–24.
3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101, 17813–8.
4. *ChemMedChem.* 2008, 3, 780–7.
5. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 62, 1501–9.
6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007, 104, 17323–8.
7. *MedChem News* 2011, 21, 21–25.
8. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2012, 3, 427–432.

B. 研究方法

1. RXRパーシャルアゴニスト CBt-PMNの毒性試験

1-1) SD ラットを用いた 28 日間連続経口投与による体重、器官重量並びに血液生化学測定

チャールスリバーより 5 週齢の雄性および雌性 SD ラットを購入して用いた。動物搬入後、実験実施日まで 1 ケージあたり 3 匹で飼育した。1 群の例数は 6 匹とし、動物はすべて温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の条件下で単独飼育とした。また、飼育中は飼料及び水を自由摂取させた。実験開始初日に、平均体重が揃うように群分けしたのち、経口ゾンデを用いて投薬した。なお、経口薬物はエタノールで溶解させ

た後、エタノール最終濃度が 1%になるよう 0.5% (カルボキシメチルセルロース) CMC 水溶液にて 5 mL/kg (ラット) で経口投与できるよう調整した。毎朝 10 時に体重測定後、30 mg/kg/day での投与を 28 日間施し、投薬最終日の 17 時より絶食、自由飲水させた。翌朝 10 時よりジエチルエーテルにて前麻酔した後、イソフルラン麻酔機を用いた麻酔下採血、深麻酔殺した後、各臓器をサンプリングし、重さを測定した。得られた血液は、2,000g、 4°C で 10 分間遠心し血清サンプルとしたもの、血球数測定用にヘパリン処理したものを作成した。

1-2) 雄性 ICR マウスを用いた 7 日間連続経口投与による体重並びに肝肥大試験

チャールスリバーより 6 週齢の雄性 ICR マウスを購入して用いた。動物搬入後、実験実施日まで 1 ケージあたり 5 匹以下で飼育した。1 群の例数は 7 匹で、動物はすべて温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の条件下で単独飼育とした。また、飼育中は飼料及び水を自由摂取させた。実験開始初日に、平均体重が揃うように群分けしたのち、経口ゾンデを用いて投薬した。なお、経口薬物はエタノールで溶解させた後、エタノール最終濃度が 1%になるよう 0.5% (カルボキシメチルセルロース) CMC 水溶液にて 1 mL/kg (マウス) で経口投与できるよう調整した。毎朝 10 時に

体重測定後、30 mg/kg/day での投与を7日間施し、投薬最終日の17時より絶食、自由飲水させた。翌朝10時よりジエチルエーテルにて深麻酔殺した後、肝臓をサンプリングし、重さを測定した。

1-3) 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), 平均赤血球色素量 (MCH), 平均赤血球色素濃度 (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), g-glutamyl transpeptidase (g-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. RXR パーシャルアゴニスト

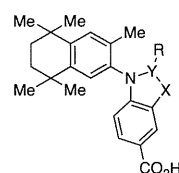
CBt-PMN の RXR パーシャルアゴニスト活性発現メカニズムの解明

CBt-PMN が RXR パーシャルアゴニスト活性を示す要因について不明である。そこで, CBt-PMN の構造的特徴であるト

リアゾール部位について種々構造展開を行い, 本化合物がパーシャルアゴニスト活性を示した要因解明を目指した。

2-1) 分子設計ならびに合成

CBt-PMN の閉環構造部位の構造展開は Figure 2 にしたがって行った。なお, 化合物の合成スキームについては, Scheme 1 および 2 に記す。



Compound	X	Y-R
CBt-PMN	N	N
1a	N	C-CH ₃
1b	N	C-H
1c	N	C-NH ₂
1d: CBTF-PMN	N	C-CF ₃
1e	NH	C=O
1f	NH	C=S
2	CH	C-H

Figure 2. 平成24年度の研究で創出したRXRリガンド。

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、高压加熱滅菌 (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、さらに高压加熱滅菌した10 % NaHCO₃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 % CO₂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 × 10⁴ cells播種し、一晚培養した。

(2日目)

Effectene™ Transection Reagent (QIAGEN社)を用いたリ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: CRBP_{II}-tk-Luc (RXR), tk-TRE_{II}-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 × 10⁴ 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LGD1069⁹, PPARの陽性コントロールにはTIPP-70³¹⁰, LXRの陽性コントロールにはcarba-T0901317¹¹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】

9. *Cancer Res.* 1996, 56, 5566–70.
10. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, 18, 4525–4528.
11. *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. CBTF-PMNのin vivoにおける薬効・副作用の評価

4-1) 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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。

4-2) 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, γ -GTP, ALP, CRE, BUN, TG, TCHO, GLUを富士ドライケム4000を用いて測定した。

5. TPA誘発皮膚炎(乾癬様)モデルにおける薬効評価

5-1) 本実験の意義

乾癬は、赤い発疹と皮膚上皮の角質細胞が剥がれ落ちる皮屑を伴う皮膚疾患であり、ヘルパーT細胞の増加やTh1, Th17などの亢進が原因と考えられる皮膚疾患である。その治療には、副腎皮質ホルモンなどのステロイド系抗炎症薬やビタミンD製剤の利用があるが、新薬の希求されている疾患の一つでもある。本疾患がTh1, Th17の関与が報告されていることから、免疫系に影響を及ぼしうるRXRモデュレーターの効果に興味を持たれた。

本モデルは、後述するようにphorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)をマウスの耳に塗布することで作成出来ること、また薬効を評価する上で、用いる薬物のアセトン溶液を耳に塗布することで行え、少量のサンプルによる評価が可能であることから、クローン病モデル動物による評価に先立ち実施した。

5-2) モデルの作成方法

モデル作成は、参考文献12を参考に実施した。

1) 7週齢の雄性ICRマウスを購入し、1化合物につき、1群5匹用いた。

2) Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)の0.03%アセトン溶液を作成した。マウスの左耳を炎症誘発群、右耳を未感作部として利用した。

3) 試験化合物は、アセトンにて5 mM溶液を作成した。

4) TPA 処置前に、シクネスゲージ (ダイヤルシクネスゲージ 0.01 mm タイプ - PEACOCK 株式会社 尾崎製作所 : G-1A) を用いて、両耳の厚さを測った。

5) 両耳の厚さ測定の後、TPA もしくはアセトン在所定の耳に片面 10 μ L ずつ塗布した。

6) 4 の処置 1 時間後に、3 で作成した試験化合物のアセトン溶液を、各耳、片面 10 μ L ずつ塗布した。

7) 5 および 6 を 4 日間繰返した。

8) 7 の作業の翌日、シクネスゲージを用いて、両耳の厚さを測った後、エーテルにて安楽死させた後、耳を切断し、6 mm トレパン (アズワン製) を用いてサンプリングし、得られたサンプルの質量を測定した。また、切断した耳を PCR 測定、組織切片作成用に保存した。

5-3) 評価方法

薬効の評価は、耳の肥厚の厚さ、また 4 日間処置後にサンプリングした耳の質量測定で行った。

5-4) 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】

12. *J. Invest. Dermatol.*, 2002, 119, 94-101.

6. 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発腸炎モデルでの薬効評価

6-1) モデルの作成方法

モデル作成は、参考文献 13 を参考に実施した。

1) 7 週齢 (体重 18-20 g) の雌性 BALB/c マウスを購入し、1 化合物につき、1 群 5 匹用いた。

2) アセトンで 5% TNBS 水溶液 (Sigma) を 5 倍希釈して、前処理用の TNBS 溶液を作成した。

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 x 1.5 cm² 毛ぞりした。毛ぞり後、体重別に群わけし、200 μ L ピペットマンを用いて、2 で作製した前処理用の TNBS 溶液を 1 匹あたり 150 μ L、毛ぞりした箇所に塗布した。なお、ノーマル群については、アセトン-水溶液を塗布した。

4) TNBS 前感作 5 日後に、改めて体重別に群分け (1 群 5 匹) を行った。

5) この日より 7 日間、毎日体重測定した後、胃ゾンデを用いて化合物の CMC 溶液を経口投与した。なお、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% 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。化合物調製は 10 mL/kg の容量で行った。

6) 経口投与開始 2 日目に腸注用の TNBS 溶液を作成した。これは、5% TNBS 水溶液(Sigma)を精製水及びエタノールにて希釈し、2%TNBS 溶液とした。この時エタノールは全体量の 50%となるようにした。

7) 経口投与開始 3 日目に、経口投与を施した後、イソフルラン麻酔下、TNBS 前感作処理群について、6 で作成した TNBS 溶液をカテーテルにより 100 μ L 直腸投与を行った。TNBS 前感作未処理群については、50%エタノールを腸注した。

8) TNBS 直腸投与から 4 日後に、体重測定した後、マウスをジエチルエーテルにより安楽死させ、解剖した。なお、前日の絶食は行わなかった。大腸を摘出し、大腸長の測定の後、一部を PCR 測定、組織切片作成用に保存した。

6-2) 評価方法

薬効の評価は、TNBS 腸注開始日からの体重減少の抑制、また解剖によりサンプリングされた大腸の長さにより行った。

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は、Bonferroni の多重検定により行った。

【参考文献】

13. *Nature Protocol*. 2007, 2, 541.

7. リウマチモデルの作成

7-1) リウマチモデルの構築

実験動物は7週齢の雌の DBA/1J マウスを用いた。まず、体重による群分けを行い、関節炎惹起カクテル Arthrogen-CIA Arthritogenic Monoclonal Antibody (Chondrex®) (10 mg/mL)を 150 μ L 腹腔内注射した (0 日)。3 日目に LPS(0.5 mg/mL)を 100 μ L 腹腔内注射した。臨床症状は発赤・腫脹の症状をもとにスコア化を行った (Minaguchi et al., 2008)。1 足あたり最高点 4 点とし、4 足分 16 点満点とする。通常 4 日目あたりから、発赤を認め、腫脹のピークは7日目にみられる。5 日目に手足の腫脹が適度に見られたため、薬物 (prednisolone) を 10 mg/kg の投与量で投与を開始した。その後 14 日目まで手足を観察し、Table 1 に示す基準 (スコア) を用いてスコア化を行うことで評価した。

Table 1. コラーゲン抗体誘発マウスリウマチモデルで利用した炎症判定スコア

0	Normal
1	Mild but definite redness and swelling of the ankle or wrist, or redness and swelling of any severity for 1 digit

2	Moderate to severe redness and swelling of the ankle or wrist
3	Redness and swelling of the entire foot including digits
4	Maximally inflamed limb with involvement of multiple joints

7-2) PCR実験

Fifty milligrams of colon tissue from Balb/c mice described above was resected and mechanically homogenized with a Politron PT 10/35 (Kinematica Inc., Littau-Luzern, Switzerland) in 0.5 mL of Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Total RNA was extracted as previously described (reference 14). Quantitative real-time RT-PCR analysis was performed using a LightCycler rapid thermal cycler system (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) following the protocol previously reported (reference 15). Two micrograms of

total RNA was reverse-transcribed by random hexamer priming using ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan). The PCR mixture consisted of 1x SYBR Green PCR Master Mix (Toyobo), which includes DNA polymerase, SYBR Green I Dye, dNTPs, PCR buffer, 8.0 pmol forward and reverse primers and cDNA of samples in a total volume of 10 μ L. The amplification of a housekeeping gene, β -actin, was used to normalize the efficiency of cDNA synthesis and the amount of RNA applied. PCR was performed with initial denaturation at 94°C for 30 sec, followed by amplification for 40 cycles, each cycle consisting of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 58°C for 30 sec, and polymerization at 72°C for 40 sec.

【参考文献】

14. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2003, 24, 148–159.

Table 2. Primer list

Primer		Sequence
β -actin	Forward	5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3'
	Reverse	5'-GCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3'
<i>IL-1β</i>	Forward	5'-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3'
	Reverse	5'-GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3'
<i>IL-6</i>	Forward	5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3'
	Reverse	5'-CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTTC-3'
<i>TNF-α</i>	Forward	5'-TATGGCCCAGACCCTCACA-3'
	Reverse	5'-GGAGTAGACAAGGTACAACCCATC-3'

15. *J. Comp. Neurol.*, 2012, 520, 1721–1736.

8. 新規RXRパーシャルアゴニストの創出

8-1) 化合物の分子設計ならびに合成

著者らは、これまでに

6-[ethyl-(3-hexyloxy-4-isopropylphenyl)amino]pyridine-3-carboxylic acid (NEt-3Hex: 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: 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.¹⁶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-[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

(6-[ethyl-(4-isopropoxy-3-isopropylphenyl)amino]pyridine-3-carboxylic acid) の EC_{50} がNEt-3IPに比べ高いことから,¹⁷ NEt-4IPのアルコキシ基の変換は行っていなかった。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。¹⁸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】

16. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2010, 1, 521–525.

17. *ChemMedChem* 2008, 3, 780–7.

18. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97, 5446–52.

8-2) 転写活性評価

2-2に同じ。

9. 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

9-1) モデルの作成方法

モデル作成は、文献 19 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 μ L にエタノール 500 μ L を加え、さらに精製水を 492.5 μ 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 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 μ 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 μ 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) 同様に 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 μ 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。

9-2) 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。

9-3) 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】

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

10. 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

10-1) モデルの作成方法

モデルの作成は, 文献 20 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。

1 0–2) 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。

1 0–3) 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】

20. *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 CBt-PMNの毒性試験

結果を、Figure 3およびTable 3, 4に示す。CBt-PMN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、臓器重量において精巣の重量が有意に

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。

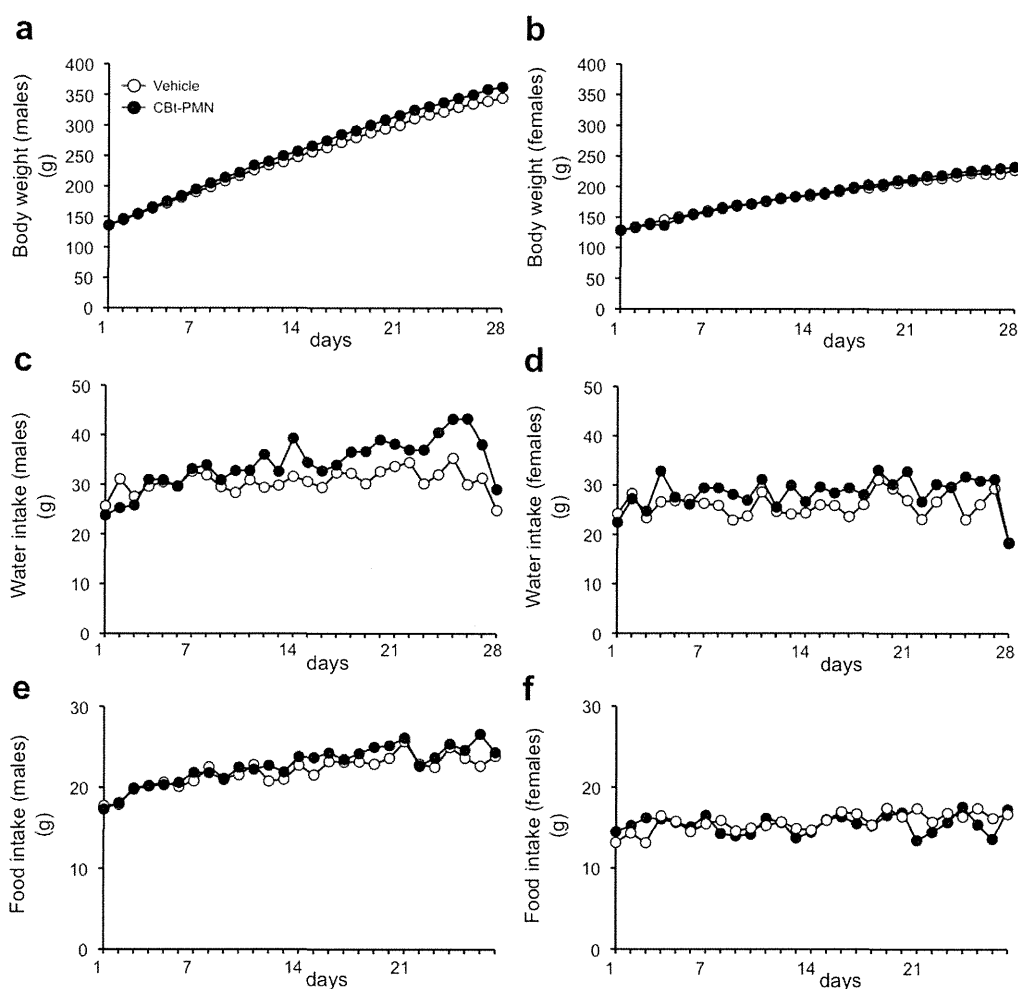


Figure 3. CBt-PMN ラット 28 日間反復経口投与による体重推移、飲水量、摂餌量. 薬物非投与群には 0.5% CMC 水溶液を、CBt-PMN 投与群は 30 mg/kg/day で投薬した. **a-b)** 体重推移. **c-d)** 摂餌量. **e-f)** 飲水量. オス: **a, c,** および **e.** メス: **b, d,** および **f.** ○: vehicle, ●: CBt-PMN. n = 6.