

## 2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	<b>FXR ligand 開発における戦略的特性評価法の構築</b> —世界初の FXR inverse agonist 同定を目指して—
キーワード	① FXR、② リガンド分類、③ focused library

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ヤマシタ ユキコ 山下 ユキコ
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	広島国際大学 薬学部・特任助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	広島国際大学 薬学部・特任助教
プロフィール	2011年3月に広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬学専攻 博士課程後期(博士課程)を修了[博士(薬学)]。その後、広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 特任助教を経て、2013年より広島国際大学に着任し、現在に至る。これまでの研究遍歴は、構造活性相関研究を中心に、天然物化学、有機合成化学、薬効評価解析など多岐にわたる。さまざまな研究分野で培った知識と技術を基盤とし、これまで多くの創薬研究に携わってきた。現在は、FXR/TGR5 リガンド開発に従事し、新規化合物の合成展開を精力的に進めている。

### 1. 研究の概要

胆汁酸によって活性化される farnesoid X receptor (FXR) は、胆汁酸を内因性リガンドとする核内受容体の一種で、代謝性疾患関連治療薬の標的分子として国内外で注目されている。その一方で、長期投与における副作用などの課題から現在医薬品として臨床応用されているものは少ない。本研究では、「構造的類似性と機能的相違は何に由来するのか」という観点に着目し、リガンドの正確な特性評価を可能にする FXR リガンド評価系の構築を試み、新しいタイプの FXR リガンドを見出した。

### 2. 研究の動機、目的

核内受容体の1つである FXR は、胆汁酸を内因性リガンドとする核内受容体の一種で、胆汁酸センサーとして、胆汁酸の合成や腸肝循環に関わる遺伝子の発現を調節し、生体内の胆汁酸量及び胆汁酸の腸肝循環を厳密に制御している。また、FXR は脂質や糖質の代謝調節に関与することが明らかになっており、脂質異常症や糖尿病をはじめとする代謝性疾患関連治療薬の標的分子としても、FXR リガンド開発研究が進められている。一方で、代謝性疾患をターゲットとする創薬研究において長期投与における副作用低減は大変重要な課題であるため、調節機能を有するパーシャルリガンドへの関心は高く、FXR リガンド開発研究においてもその傾向は顕著である。

核内受容体のリガンドは大きくフルアゴニスト、パーシャルアゴニスト及びアンタゴニストの3群に大別される。アンタゴニストは、さらに核内受容体の転写活性に影響を与えないニュートラルアンタゴニストと、核内受容体の転写活性を抑制するインバースアゴニストに分けられる。核内受容体に対するニュートラルアンタゴニストは、転写共活性化因子であるコアクチベーターが結合できる活性型コンフォメーションと転写共抑制因子であるコリプレッサーが

結合できる不活性型コンフォメーションの両方に等しく結合するため、コンフォメーションの平衡状態に変化はない。それに対してインバーシアゴニストは、不活性型コンフォメーションを取っている受容体に選択的に結合し、それを安定化させる。そのため、平衡は不活性型コンフォメーションの方へ傾き、活性型コンフォメーションを取る受容体数が減少し、核内受容体の活性が低下する。このようなリガンドの作用機序の違いは、薬理的及び薬物動態学的作用に影響を与える可能性があり、大変興味深い。

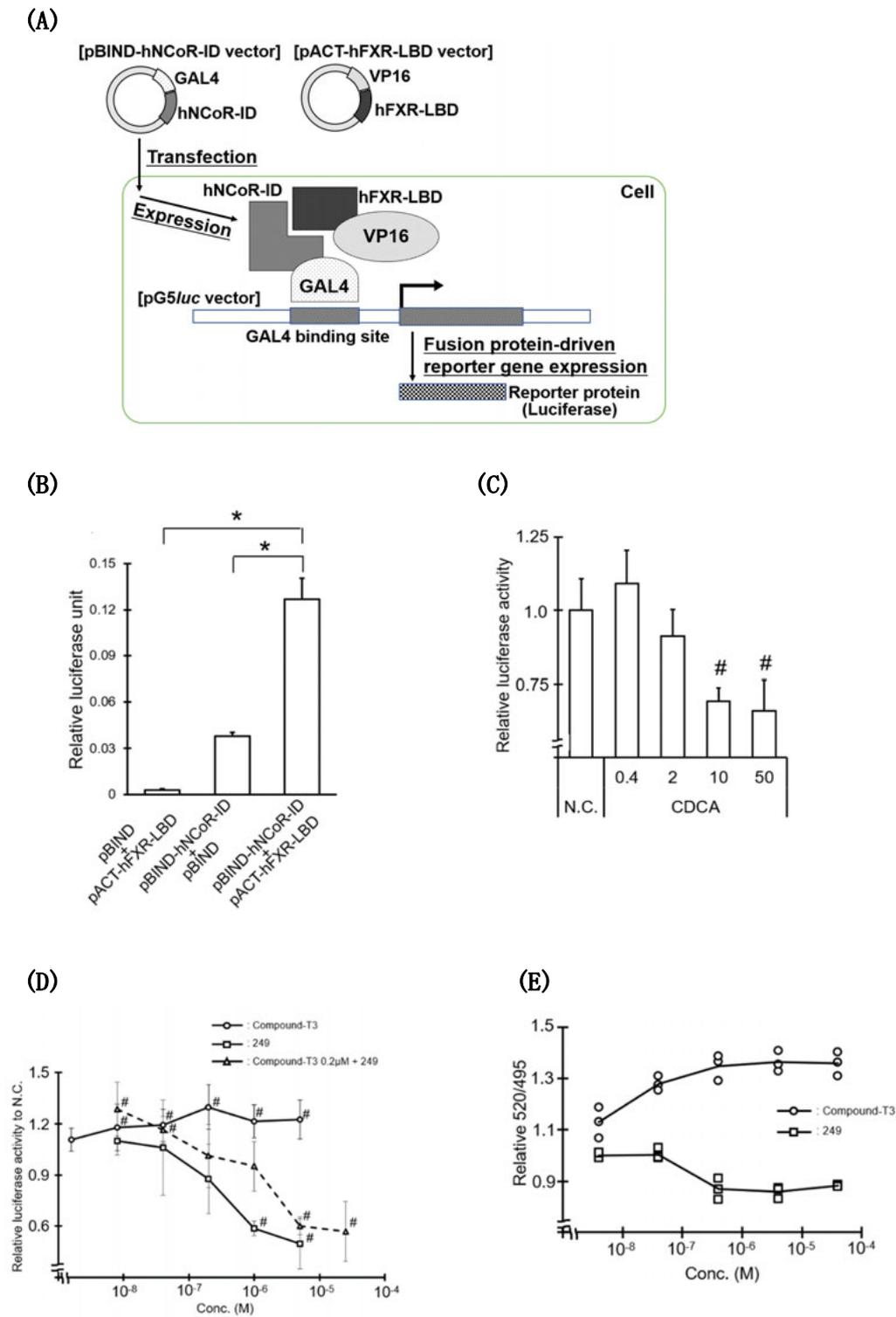
これまで積み重ねてきた FXR の構造活性相関研究の洞察から、申請者は FXR-LBD (FXR ligand binding domain) の占有に必須となる core structure と、各リガンドの機能を運命づける specific modulator に相当する構造が存在するのではないかと考えている。そこで、「構造的類似性と機能的相違は何に由来するのか」という観点に着目し、リガンドの正確な特性評価と適切なリガンド分類を行うことができる戦略的特性評価スキームを開発することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の結果

申請者は、これまでの研究において、腸管 FXR のターゲット遺伝子に選択的に作用する FXR アンタゴニストとして FLG249 を報告している。そこで、FLG249 (249) の FXR リガンドとしての新たな特徴づけを試みるべく、**Fig. 1A** に示すような FXR-LBD と NCoR-interaction domain (NCoR-ID) との相互作用を評価する two-hybrid assay を構築した。**Fig. 1B** に示すように、FXR-LBD 及び NCoR 発現ベクターを形質導入すると、GAL4 応答性ルシフェラーゼの活性は empty vector を形質導入した場合よりも有意に増加した。またこれらのベクターを形質導入後、FXR フルアゴニストであるケノデオキシコール酸 (CDCA) で処理すると、想定通りにルシフェラーゼ活性を濃度依存的に減少させた (**Fig. 1C**)。FXR アゴニストが結合することにより、FXR は NCoA との結合を強めるため、相対的に NCoR との結合は弱まる。これらの結果より、FXR と NCoR との作用を評価するための実験系が構築できたと考えられる。

この実験系を用いて、FXR アンタゴニストとして報告されている Compound-T3 及び 249 を評価したところ、Compound-T3 は用量依存的にルシフェラーゼ活性を増加させたが、意外なことに 249 はその活性を減少させた (**Fig. 1D**)。また 249 は Compound-T3 によって増加した FXR と NCoR との作用も減少させた。さらに TR-FRET assay においても同様の結果を示した (**Fig. 1E**)。すなわち、Compound-T3 及び 249 は NCoR に対して逆の作用を示したことになる。これらの結果から Compound-T3 はインバーシアゴニストである可能性が示唆された。一方 249 は FXR に結合することにより、コアクチベーターだけでなくコリプレッサーとの結合も低下させ FXR を「孤立」させることで、その作用を抑制させる新しいタイプの FXR リガンドであることが示唆された。

本研究では、戦略的特性評価スキームのうち、特にニュートラルアンタゴニストとインバーシアゴニストを明確に区別できる two-hybrid assay 評価系の構築に成功した。FXR の inverse agonist は未だ報告がなく、本手法の確立は世界初となる FXR inverse agonist の同定を実現し得る可能性も秘めており、新規性の高い先駆的な要素を十分に兼ね備えている。同時に、“FXR の孤立”を誘導する新しい FXR リガンドタイプの発見は、新たな FXR リガンドキャラクターの発見であり、FXR をターゲットとする創薬分野の発展に大きく貢献することが期待される。



**Fig.1 Modification of interaction between FXR and NCoR by FXR ligands.** (A) shows an overview of the constructed two-hybrid assay. Co-expression of FXR-LBD and NCoR-ID significantly increased luciferase activity (B). CDCA dose-dependently decreased the interaction between FXR and NCoR (C). Two FXR antagonists showed different effects in this two-hybrid assay and TR-FRET assay (D, E). N=3, \*:  $p < 0.05$ , #:  $p < 0.05$  vs. N.C. respectively.

#### 4. 研究者としてのこれからの展望

これまでの研究において、代謝性疾患関連治療薬の標的分子として注目されている2つの胆汁酸受容体、farnesoid X receptor (FXR) 及び transmembrane G protein-coupled receptor 5 (TGR5) の新規リガンド創製を目指して研究を行ってきた。特に FXR リガンド開発研究においては、agonist/antagonist に固執しない柔軟な視点でベンゾイミダゾールフェーマコフォアを中心とした創製展開を実現し agonist/antagonist の switching に成功するなど成果を遂げてきた。これらの研究は、脂質代謝や糖質代謝の改善や糖尿病をはじめとする生活習慣病の予防治療薬開発に貢献することが期待される。本奨励金のご支援により得られた成果を新たな基盤とし、多角的な知見に基づく柔軟な発想を大切にしながら更なる研究の発展に努めたい。

#### 5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

2022 年度女性研究者奨励金に採択いただき深く感謝申し上げます。研究者としての日は浅く未熟なうえに、これまでの雇用形態が不安定であったことも重なり、1つの機関で腰を据えて研究することが叶わない不安な日々を歩んできました。また、結婚・出産を経て、幼い子供を育てながら研究活動を行う中で、時間的・体力的な制約により実験活動が十分に行えず苦しい葛藤を抱いてきました。ですが、前向きに努力を続けることで、多くの方々のご支援を賜り今日に至っております。研究機関を転々とし1つのテーマを追求できる環境でなかったことは、一見ネガティブな要素にも思えますが、多岐にわたる研究遍歴があるからこそ見出せる斬新かつ先駆的な視点もあり、それを実現するための具体的な方策を立案・実行する研究遂行能力も鍛えられたように思います。

自分の子供や学生と日々過ごす中で「日常は宝物」という言葉を意識して共有するようにしています。特別なことがなくても、何気ない日々こそがかけがえのない宝物だということを胸に刻み、1人でも多くの方が大切な人との“日常”を過ごせるようにという気持ちで、創薬研究に取り組んでいます。

本奨励金のご支援により、今後の発展につながる研究成果を得ることができました。今後も初心を大切に、支えて下さる方々への感謝を忘れず、研究活動に邁進し社会に貢献していきたいと思えます。