

新規 FXR アゴニスト及び  
TGR5 アゴニスト創製のための  
レセプター-リガンド構造活性相関

広島大学大学院医歯薬学総合研究科薬学専攻

平成 18 年度秋入学 井口 裕介

## 目次

はじめに	3
第一章 FXR-リガンド構造活性相関	8
序論	9
方法	13
結果	18
小括及び考察	28
第二章 TGR5-リガンド構造活性相関	31
序論	32
方法	34
結果	36
小括及び考察	45
考察及び総括	48
引用文献	49
学位申請の基礎となる原著	56
謝辞	57

## はじめに

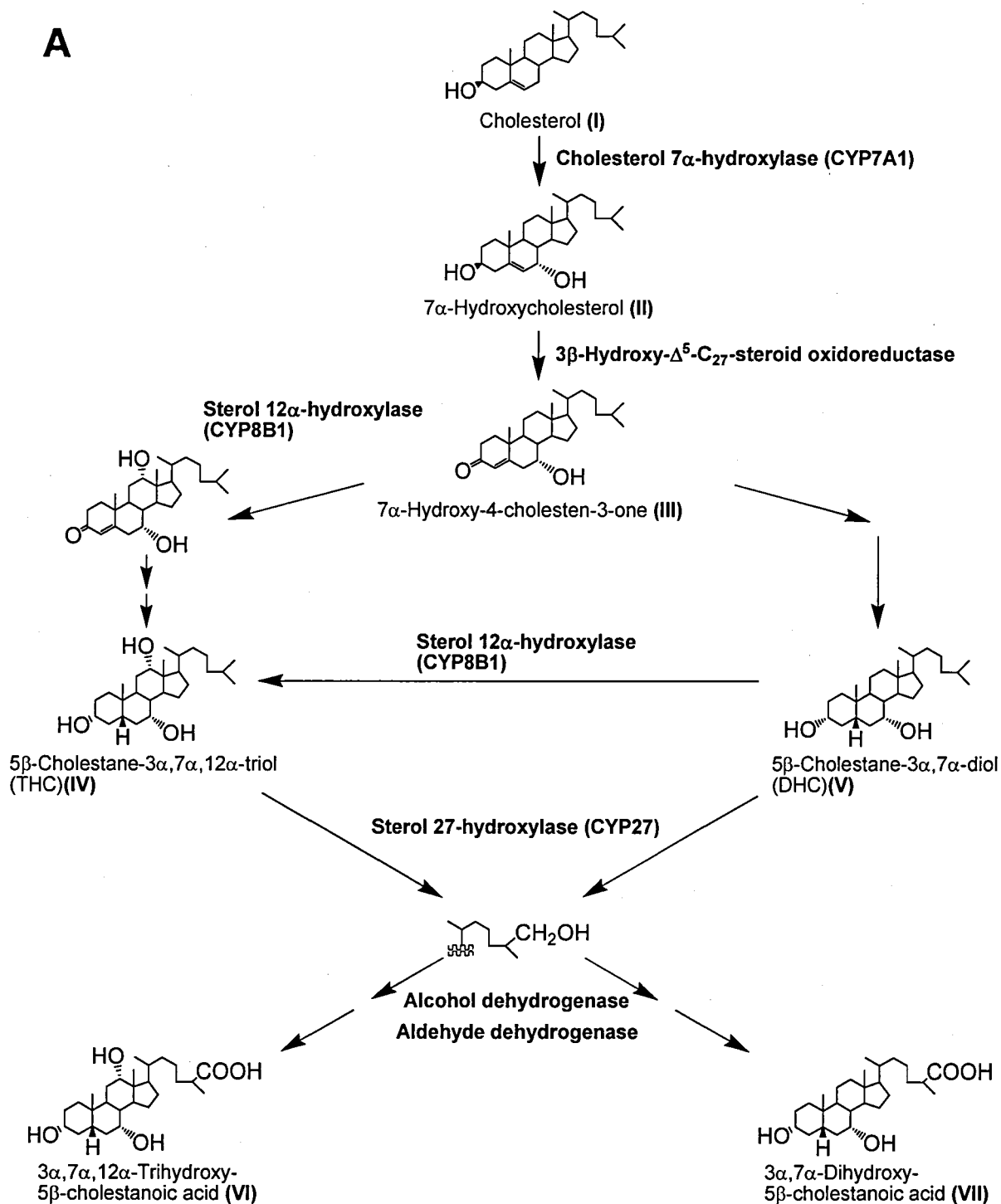
胆汁酸は体内のコレステロール排泄のための最終代謝産物であると同時に、胆汁中におけるコレステロールの溶存、腸管においては脂質の消化・吸収に必須の生理活性物質でもある。このように、胆汁酸は肝臓のコレステロール代謝を含めた脂質代謝全般における中心的役割を演じる化合物の一つといえる。

コレステロールは肝臓で十数段階の過程を経て、一次胆汁酸であるコール酸(Cholic acid, CA)、及びケノデオキシコール酸(Chenodeoxycholic acid, CDCA)に変換される<sup>[1]</sup>。Figure 1A 及び 1B に胆汁酸生合成経路を示した。まず Figure 1A に示すように、コレステロール(II)は肝ミクロソームに存在する P-450 酵素である Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)により、7 $\alpha$ -ヒドロキシコレステロール(III)となる。この最初の反応は胆汁酸生合成の律速段階と考えられている。次に、3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid oxidoreductase の働きにより 3 $\beta$ -水酸基の酸化と二重結合の転移が起こり、7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (III)を与える。CA に変換される場合は (III)(もしくは(V))の C-12 位が sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1)によって、水酸化される反応が加わる。その後、数段階の母核の変換を受けて、母核はそれぞれ CA 及び CDCA と同一でコレステロール側鎖を持つ 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol (THC) (IV) 及び 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol (DHC) (V)が生成され、側鎖変換の過程に至る。

側鎖酸化切断機構の反応は、ミトコンドリアに存在する sterol 27-hydroxylase (CYP27)による、THC (IV)及び DHC (V)の 27 位への水酸化に始まる。次いで、alcohol dehydrogenase、及び aldehyde dehydrogenase により、それぞれ 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholestanoic acid (VI)、及び 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholestanoic acid (VII)と酸化される。さらに、Figure 1B に示すように CoA 誘導体へと変換された後、ペルオキシソームにおいて脂肪酸の $\beta$ 酸化と類似の機構による側鎖切断を受けて、最終的に CA (VIII)及び CDCA (IX)が生成される。

新しく生合成された CA (VIII)及び CDCA (IX)は、そのほとんどがさらに以下の

2つのステップを経て抱合型胆汁酸となる。まず、bile acid-CoA synthase により、胆汁酸の CoA エステル体になる。次いで、bile acid-CoA: amino acid N-



**Fig.1** Bile-acid synthesis pathways.



再び肝臓に戻ってくるという、いわゆる腸肝循環を繰り返す(Fig.2)[2]。この際、吸収を逃れた一部が糞便中に排泄される。この糞便中に失われた量の胆汁酸を補うべく胆汁酸の生合成が行なわれる。胆汁酸の腸肝循環は、肝細胞における生合成により保たれているが、それ以外にも、①胆管側膜からの分泌、②回腸末端部による再吸収と門脈血への輸送、③肝細胞による摂取、に關与する輸送体により維持・制御されている[2]。

肝臓から毛細胆管への胆汁酸の分泌は ATP-binding cassette transporter の一つ、bile salt export pump (BSEP, ABCB11)により行なわれる[3]。その後胆汁中の胆汁酸は一時的に胆嚢に貯蔵・濃縮され、食事の摂取に伴う胆嚢の収縮により、胆管より十二指腸へと分泌される。胆汁酸はその分子内に 1 つ以上の水酸基とカルボキシル基を持ち、これによってアルカリ環境下において陰イオンとして存在し、界面活性作用を示す。この作用により、胆汁酸は食事由来のモノグリセリドやコレステロールと混合ミセルを形成し、小腸粘膜からの消化を容易とし、生体内に効率よく脂質を取り込むのに重要な役割を果たしている。

胆汁酸は脂質の消化吸収に携わった後、その 95%以上は回腸末端部より apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT)の働きにより再吸収される[4]。さらに、腸細胞内で胆汁酸の輸送に關わる intestinal bile acid-binding protein (I-BABP)[5]や、基底側から門脈への排出に關わる organic solute transporter (OST) $\alpha/\beta$ [6]の働きにより門脈へと排出される。門脈中の胆汁酸は血清アルブミンやリポタンパクと結合して存在する。

胆汁酸の門脈血中から肝細胞への取り込みには、 $\text{Na}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) や organic anion transporting polypeptide (OATP)が關与している。

正常人では体内胆汁酸の 99%以上がこの閉鎖的腸肝循環内に存在し、一定のプールを形成している。そのプール量は約 3g で、同一胆汁酸が 1 日 4~12 回の循環を行い、それにより小腸内には毎日約 30g の胆汁酸が流入している。

一方、小腸で吸収を逃れた胆汁酸は回盲弁を通過後、腸内細菌の作用により脱抱合、及び脱水酸化反応を受けて二次胆汁酸となり、一部は大腸粘膜から受

動輸送されるが、再吸収を逃れた胆汁酸は糞便に排出される。この胆汁酸排泄システムは、生体にとってコレステロールが異化され体外に排出される主要経路であり、高コレステロール血症が問題となっている現代の飽食の時代にあつては、高コレステロール血症の治療ターゲットとして重要である。

上述のような胆汁酸の生合成、腸肝循環のメカニズムは古くから知られていたが、近年の研究により、これらのメカニズムは内因性胆汁酸を内因性リガンドとする核内受容体、Farnesoid X receptor (FXR)によって厳密かつ巧妙に制御されていることが明らかにされている<sup>[7, 8]</sup>。また最近、胆汁酸は G タンパク結合受容体 TGR5 のリガンドであることも明らかにされ、腸肝循環系の組織以外でもシグナル分子として機能していることが示唆される。本研究はこれら 2 つのレセプターの構造解析と 2 つのレセプターそれぞれに対する新規リガンドの探索を目的として立案された。以降、「第 1 章 FXR-ligand 構造活性相関」、「第 2 章 TGR5-ligand 構造活性相関」に分けて述べる。

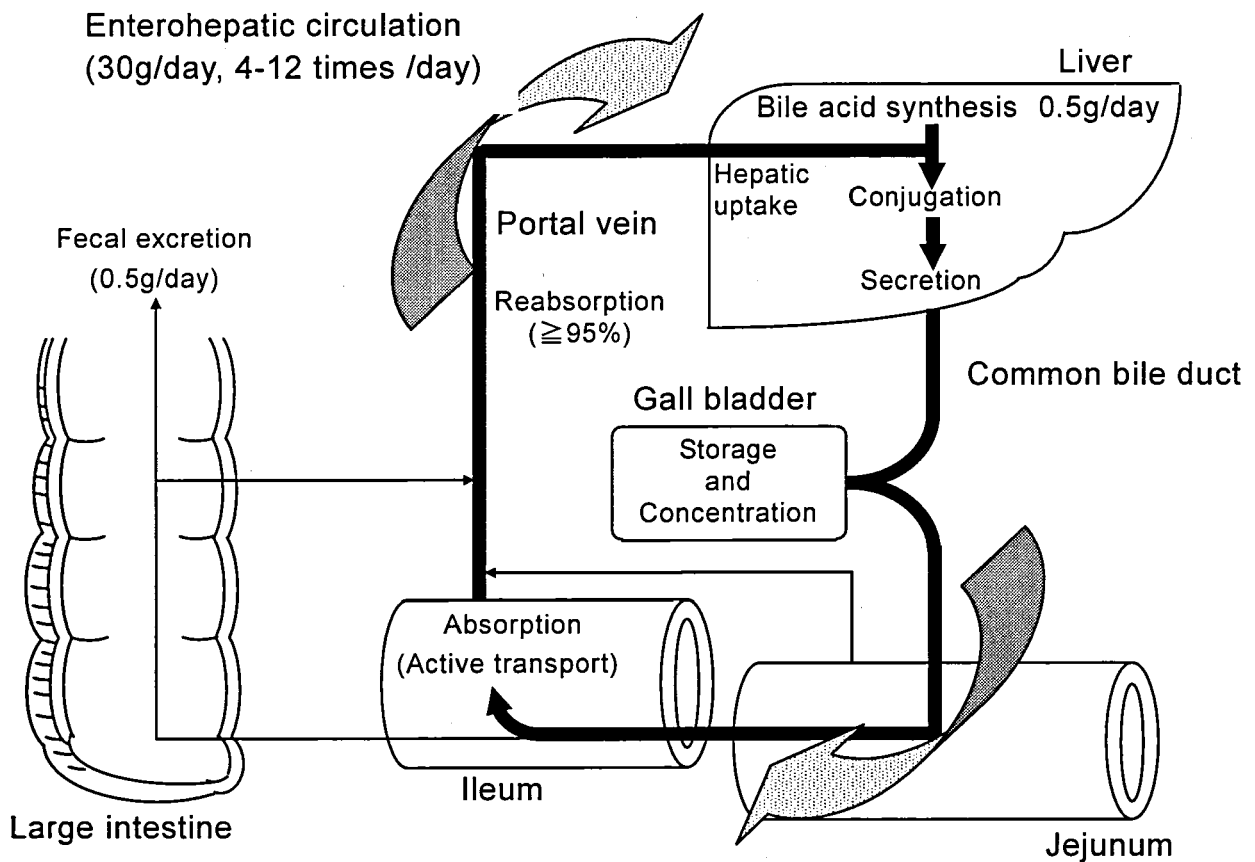


Fig.2 The enterohepatic circulation of bile acids in healthy adult.

# 第 1 章

## FXR-リガンド構造活性相関



## 序論

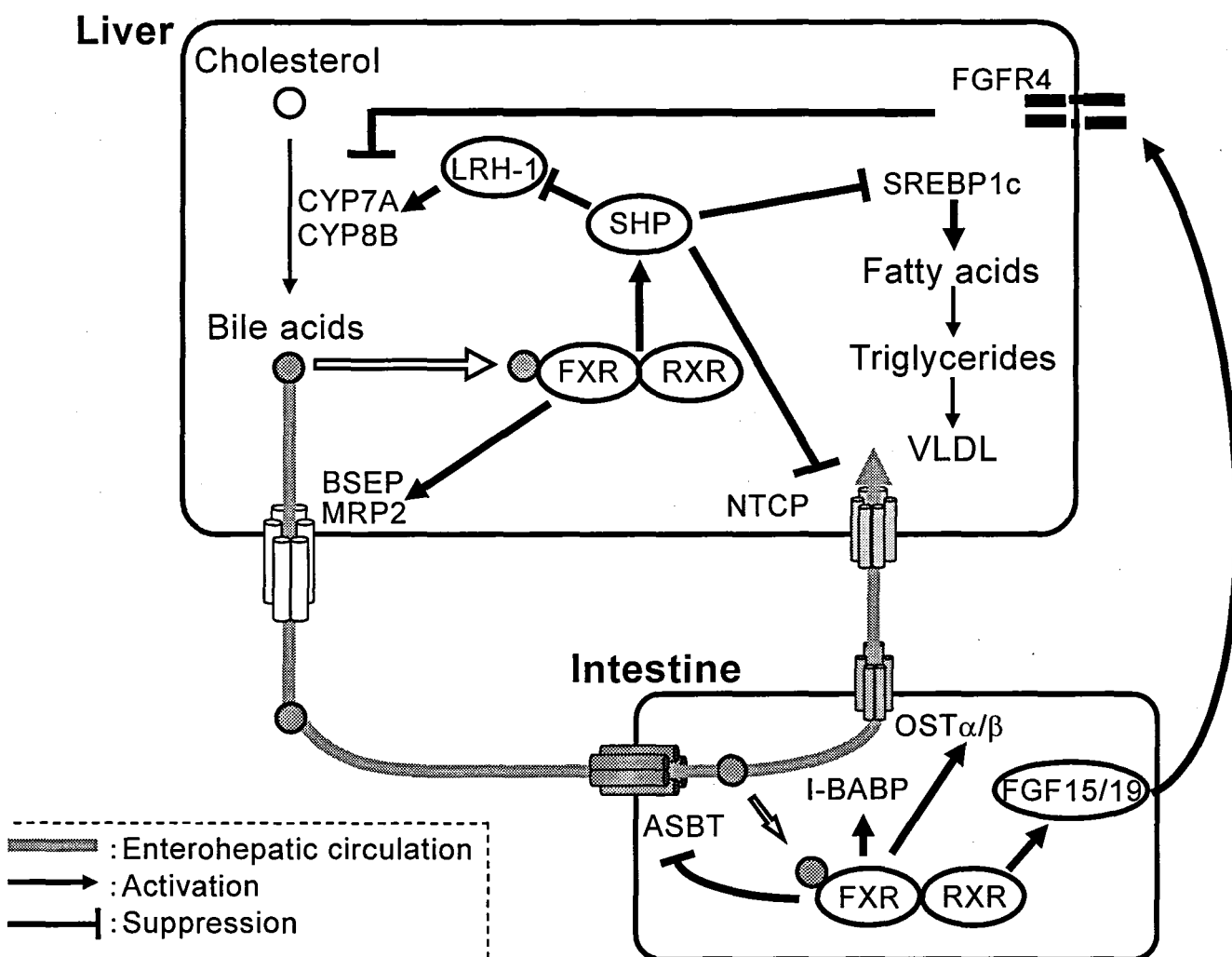
Farnesoid X receptor (FXR)はオーファン受容体として単離され、コレステロール合成経路の中間体である farnesol によって弱い活性が示されたことからこの名前がつけられた<sup>[9]</sup>。1999年、胆汁酸が FXR の内因性リガンドとして同定され、特にケノデオキシコール酸 (CDCA)と高い親和性で結合することが示された<sup>[10, 11]</sup>。FXR は主に、肝臓や小腸に発現し胆汁酸の合成や排出、抱合、輸送など、腸肝循環に関与する遺伝子を直接あるいは間接的に制御し、胆汁酸の恒常性を担っている<sup>[12-14]</sup>。

肝臓の胆汁酸濃度が上昇すると FXR は細胞を保護するため胆汁酸の合成を阻害する。胆汁酸には界面活性作用があり、高濃度においては細胞毒性を示すので、この機構は生体防御としても理にかなった機構である。FXR が胆汁酸と結合すると、retinoid X receptor (RXR)とヘテロダイマーを形成し、small heterodimer partner (SHP)のプロモーター領域に結合し、SHP の発現を正に制御する<sup>[15]</sup>。そして SHP が liver receptor homologue-1 (LRH1)の活性を阻害し、cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)の発現を抑制することにより、胆汁酸の合成を阻害する(**Fig.3**)。また、FXR は SHP を介して CA と CDCA の生成比を決定する酵素である sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1)の発現も抑制する<sup>[7, 16]</sup>。さらに FXR の活性化は胆汁酸を細胞外に排出する bile salt export pump (BSEP)<sup>[3]</sup>や multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)<sup>[17]</sup>の発現を促進し、細胞内に取り込む Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)の発現を SHP 媒介的に抑制することで、細胞内の胆汁酸濃度を制御する<sup>[18]</sup>。

回腸末端における胆汁酸の再吸収に関しては 3 つの輸送担体の関与が明らかとなっている。細胞質において胆汁酸と結合し、胆汁酸の取り込みと細胞内輸送を促進すると考えられている intestinal bile acid binding protein (I-BABP)の発現は FXR により正に制御される<sup>[5]</sup>。また、FXR の活性化は小腸細胞の基底膜上に発現している胆汁酸排出トランスポーターである organic solute

transporter (OST $\alpha/\beta$ )の発現も正に制御する[6]。一方、小腸細胞の頂端膜上に発現している胆汁酸取り込みトランスポーターである apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT)の発現は FXR により抑制される[19]。

このように、FXR は細胞内の胆汁酸濃度が上昇すると、胆汁酸合成や胆汁酸の取り込みを抑制する一方で、胆汁酸排出を促進する。そのため、FXR は胆汁酸のセンサーとして機能していると考えられており、胆汁酸の腸肝循環はこれらのメカニズムを構築している酵素や輸送担体により、厳密に制御されている。最近、小腸の FXR を介して発現が亢進される fibroblast growth factor 15 (FGF15)、もしくは FGF19 が門脈から肝臓に運ばれ、FGFR4 を介し、CYP7A1 の発現を抑制する FXR-FGF15/19-FGFR4 経路も報告されている[20]。



**Fig.3** The regulatory mechanisms of enterohepatic circulation by FXR.

FXR のリガンドである胆汁酸を脂質異常症（高脂血症）やコレステロール胆石症の患者に投与すると、中性脂肪が減少することが報告されている<sup>[21, 22]</sup>。また、胆汁酸吸着剤で高コレステロール血症治療薬のコレスチラミンを投与すると、血中 very-low-density lipoprotein (VLDL) と中性脂肪量が増加することが知られている<sup>[23]</sup>。最近、胆汁酸と脂質代謝のメカニズムに関連して、アセチル CoA カルボキシラーゼ 1、2 及び脂肪酸合成酵素など、脂質合成に関与する遺伝子の発現調節因子である sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) が FXR 及び SHP によって抑制され、脂肪酸合成の抑制、及び肝臓からの VLDL 分泌を減少させることが報告された(**Fig.3**)<sup>[24]</sup>。

また、FXR はコレステロール及び脂質代謝のみならず、糖代謝にも関与する。FXR の活性化はインスリンシグナルを刺激し、マウスの脂肪細胞においてグルコースの取り込みを促進させること<sup>[25]</sup>、また糖新生に関与する酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) や glucose-6-phosphatase (G6Pase) の発現を調節することが報告されている<sup>[26-30]</sup>。以上のように、FXR はコレステロール、脂質、リポタンパク質や糖代謝を制御することから、動脈硬化に加え、生活習慣病の治療薬のターゲットとして注目されている。

先に述べたように、CDCA は内因性胆汁酸の中で最も FXR 活性化能の高い化合物である。著者らは、胆汁酸と同様のステロイド母核を持つ化合物に着目し、これまでも様々な胆汁酸誘導体についてそれらの FXR 活性化能を評価し、FXR 活性化におけるリガンドの構造活性相関について検討してきた<sup>[31-33]</sup>。それらの検討結果により、胆汁酸の側鎖に存在するカルボキシル基が水酸基に還元された化合物の FXR 活性化能を検討したところ活性が認められたことから、FXR に結合し活性化させるためにステロイド側鎖のネガティブチャージは必要ではないことが示された<sup>[31]</sup>。そこで、本研究では胆汁酸と同じステロイド母核構造を持ち、その側鎖に 1 つ以上の水酸基を含む一般的に胆汁アルコールと呼ばれる化合物に着目した。

胆汁アルコールは下等脊椎動物におけるコレステロールの最終代謝産物として知られている。また哺乳動物における胆汁酸生合成中間体として産生される

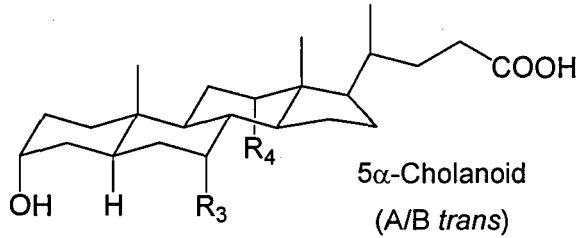
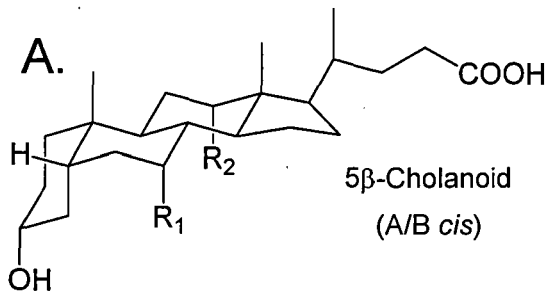
ことも知られている。以前の研究において、胆汁酸生合成中間体である  $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -triol (THC) には FXR 活性化能を認めなかったが、それが生合成経路における酵素である sterol 27-hydroxylase により水酸化された  $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,26$ -tetrol には CDCA と同等の活性を認めたことを報告している [32]。

本研究では胆汁アルコールのステロイド側鎖に存在する水酸基の位置や数の違いが FXR 活性化能に与える影響について検討を行なった。加えて、ステロイド側鎖長の差異による影響、さらに、ステロイド母核の A/B 環の立体配置の違いが胆汁アルコールの FXR 活性化能に与える影響についても評価した。

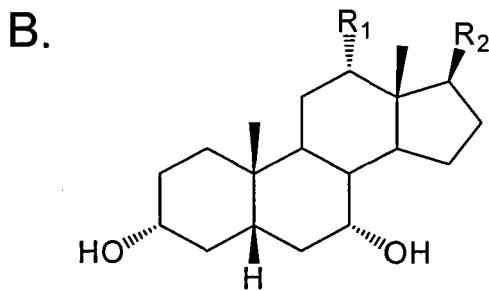
## 方法

### 1. 胆汁酸及び胆汁アルコール

本研究で用いた胆汁酸及びの胆汁アルコールの構造を **Fig.4** に示した。コール酸(CA)、及び CDCA ( $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy- $5\beta$ -cholan-24-oic acid, **(1)**)は市販品を用いた。 $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy- $5\alpha$ -cholan-24-oic acid (allo-CDCA, **(3)**)は日本大学文理学部化学科 飯田隆先生より御供与いただいた。 $5\alpha$ -及び  $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,26,27$ -pentol ( $5\alpha$ -及び  $5\beta$ -cyprinol, **(24 and 19)**)、 $5\alpha$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,26$ -tetrol **(25)**はコイ胆汁よりそれぞれ単離、精製した<sup>[34-36]</sup>。 $5\alpha$ -Cholestane- $3\alpha,7\alpha,26,27$ -tetrol **(26)**は  $5\alpha$ -cyprinol(**24**)より化学合成した<sup>[37]</sup>。 $5\beta$ -Cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,26$ -tetrol(**11**)<sup>[38]</sup>、(22S)-及び(22R)- $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,22$ -tetrol (22S-及び 22R-OH-THC, **(4 and 5)**)<sup>[39]</sup>、(23S)-及び(23R)- $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,23$ -tetrol (23S-及び 23R-OH-THC, **(6 and 7)**)<sup>[39]</sup>、(24S)-及び(24R)- $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,24$ -tetrol (24S-及び 24R-OH-THC, **(8 and 9)**)<sup>[40, 41]</sup>、 $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,25$ -tetrol (25-OH-THC, **(10)**)<sup>[42]</sup>、24-nor- $5\beta$ -cholane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,23$ -tetrol (Nor-C-OH, **(12)**)<sup>[43]</sup>、 $5\beta$ -cholane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,24$ -tetrol (C-OH, **(13)**)<sup>[44]</sup>、26,27-dinor- $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,25$ -tetrol (Ho-C-OH, **(14)**)<sup>[45]</sup>、27-nor- $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,26$ -tetrol (Bis-Ho-C-OH, **(15)**)<sup>[45]</sup>は CA よりそれぞれ合成した。 $5\beta$ -Cholestane- $3\alpha,7\alpha,26,27$ -tetrol **(20)**<sup>[46]</sup>、 $5\alpha$ -及び  $5\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,26$ -triol **(27 and 21)**<sup>[47, 48]</sup>、 $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy-23,24-dinor- $5\beta$ -cholan-22-oic acid (Bis-Nor-CDCA, **(16)**)<sup>[49]</sup>、 $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy-24-nor- $5\beta$ -cholan-23-oic acid (Nor-CDCA, **(17)**)、 $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy-26,27-dinor- $5\beta$ -cholestan-25-oic acid (Ho-CDCA, **(18)**)は CDCA よりそれぞれ合成した<sup>[50, 51]</sup>。

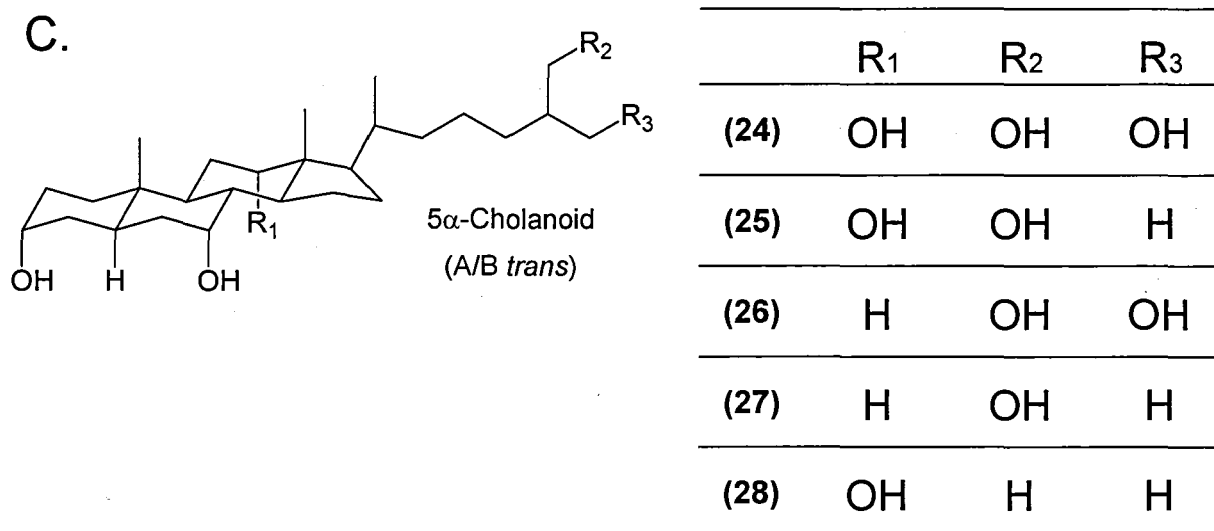


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(1)	OH	H
(2)	H	H
	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
(3)	OH	H



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(4)	OH	
(5)	OH	
(6)	OH	
(7)	OH	
(8)	OH	
(9)	OH	
(10)	OH	
(11)	OH	
(12)	OH	
(13)	OH	

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(14)	OH	
(15)	OH	
(16)	H	
(17)	H	
(18)	H	
(19)	OH	
(20)	H	
(21)	H	
(22)	OH	
(23)	H	



**Fig.4** Structures of bile alcohols and bile acids. A: **(1)**, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid (CDCA); **(2)**, 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid (lithocholic acid, LCA); **(3)**, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -cholan-24-oic acid (allo-CDCA); **(4)**, (22S)-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,22-tetrol (22S-OH-THC); **(5)**, (22R)-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,22-tetrol (22R-OH-THC); **(6)**, (23S)-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,23-tetrol (23S-OH-THC); **(7)**, (23R)-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,23-tetrol (23R-OH-THC); **(8)**, (24S)-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,24-tetrol (24S-OH-THC); **(9)**, (24R)-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,24-tetrol (24R-OH-THC); **(10)**, 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,25-tetrol (25-OH-THC); **(11)**, (25S)-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol (26-OH-THC); **(12)**, 24-nor-5 $\beta$ -cholane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,23-tetrol (Nor-C-OH); **(13)**, 5 $\beta$ -cholane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,24-tetrol (C-OH); **(14)**, 26,27-dinor-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,25-tetrol (Ho-C-OH); **(15)**, 27-Nor-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol (Bis-Ho-C-OH); **(16)**, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-23,24-dinor-5 $\beta$ -cholan-22-oic acid (Bis-Nor-CDCA); **(17)**, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-24-nor-5 $\beta$ -cholan-23-oic acid (Nor-CDCA); **(18)**, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-26,27-dinor-5 $\beta$ -cholestan-25-oic acid (Ho-CDCA); **(19)**, 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26,27-pentol (5 $\beta$ -cyprinol); **(20)**, 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26,27-tetrol; **(21)**, (25S)-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26-triol; **(22)**, 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol (THC); **(23)**, 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol (DHC). B: **(24)**, 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26,27-pentol (5 $\alpha$ -cyprinol); **(25)**, (25S)-5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol; **(26)**, 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26,27-tetrol; **(27)**, (25S)-5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26-triol; **(28)**, 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol (5 $\alpha$ -THC). Compounds in the figure are indicated by bracketed numbers.

## 2. 細胞

ヒト肝癌由来 Huh-7 細胞は、広島大学大学院医歯薬学総合研究科 分子病態制御内科学研究室の茶山一彰教授より御供与いただいた。

## 3. トランスフェクションとレポータージーンアッセイ

pFXRE-tk-Luc、pcDNA3.1-hFXR、pcDNA3.1-hRXR $\alpha$ の各プラスミドは国立医薬品食品衛生研究所の最上知子先生より御供与いただいた。

ヒト肝癌由来細胞 Huh-7 細胞は DMEM(10%FCS を含む)で培養し、24 ウェルプレートに播種しトランスフェクションに用いた。トランスフェクションには Attractene(Qiagen)を用い、pFXRE-tk-Luc.(FXRE-Luc.)を 188ng/well、pcDNA3.1-hFXR(hFXR)、及び pcDNA3.1-hRXR $\alpha$ (hRXR)をそれぞれ 63ng/well、コントロールベクターとして pSV- $\beta$ -galactosidase( $\beta$ -Gal.)を 313ng/well 細胞に導入した。トランスフェクション 3 時間後、胆汁酸または胆汁アルコールを 0 ~50 $\mu$ M 添加し、DMEM(0.5% delipidated serum 含有)中で 20 時間培養した。細胞を溶解後、Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で補正した。さらに、DMSO のみを添加した群をネガティブコントロールとし、そのルシフェラーゼ活性を 1 としたときの各化合物の活性を Relative luciferase activity として示した。

## 4. 定量的リアルタイム RT-PCR

Huh-7 細胞を DMEM (0.5% delipidated serum 含有)中、胆汁酸または胆汁アルコールで 20 時間処理した。細胞を回収した後、SV total RNA Isolation System (Promega)を用いて total RNA を抽出した。mRNA 発現レベルの測定には Taqman one-step RT-PCR Master Mix Reagent Kit と ABI Prism 7700 (Applied Biosystems)を用いた。測定値は 18S rRNA の mRNA 量を用いて補正した。使用したプライマーとプローブの配列は以下に示した。18S rRNA については市販品(Applied Biosystems)を用いた。

### ヒト BSEP

フォワードプライマー : 5'-GGGCCATTGTACGAGATCCTAA-3'

リバースプライマー : 5'-TGCACCGTCTTTTCACTTTCTG-3'



プローブ :

5'-FAM-TCTTGCTACTAGATGAAGCCACTTCTGCCTTAGA-TAMRA-3'

ヒト SHP

フォワードプライマー : 5'-GGTGCAGTGGCTTCAATGC-3'

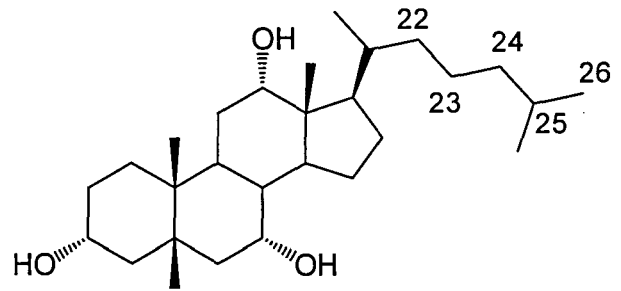
リバースプライマー : 5'-GGTTGAAGAGGATGGTCCCTTT-3'

プローブ :

5'-FAM-TCTGGAGCCTGGAGCCTGGAGCTTAGCCCCA-TAMRA-3'

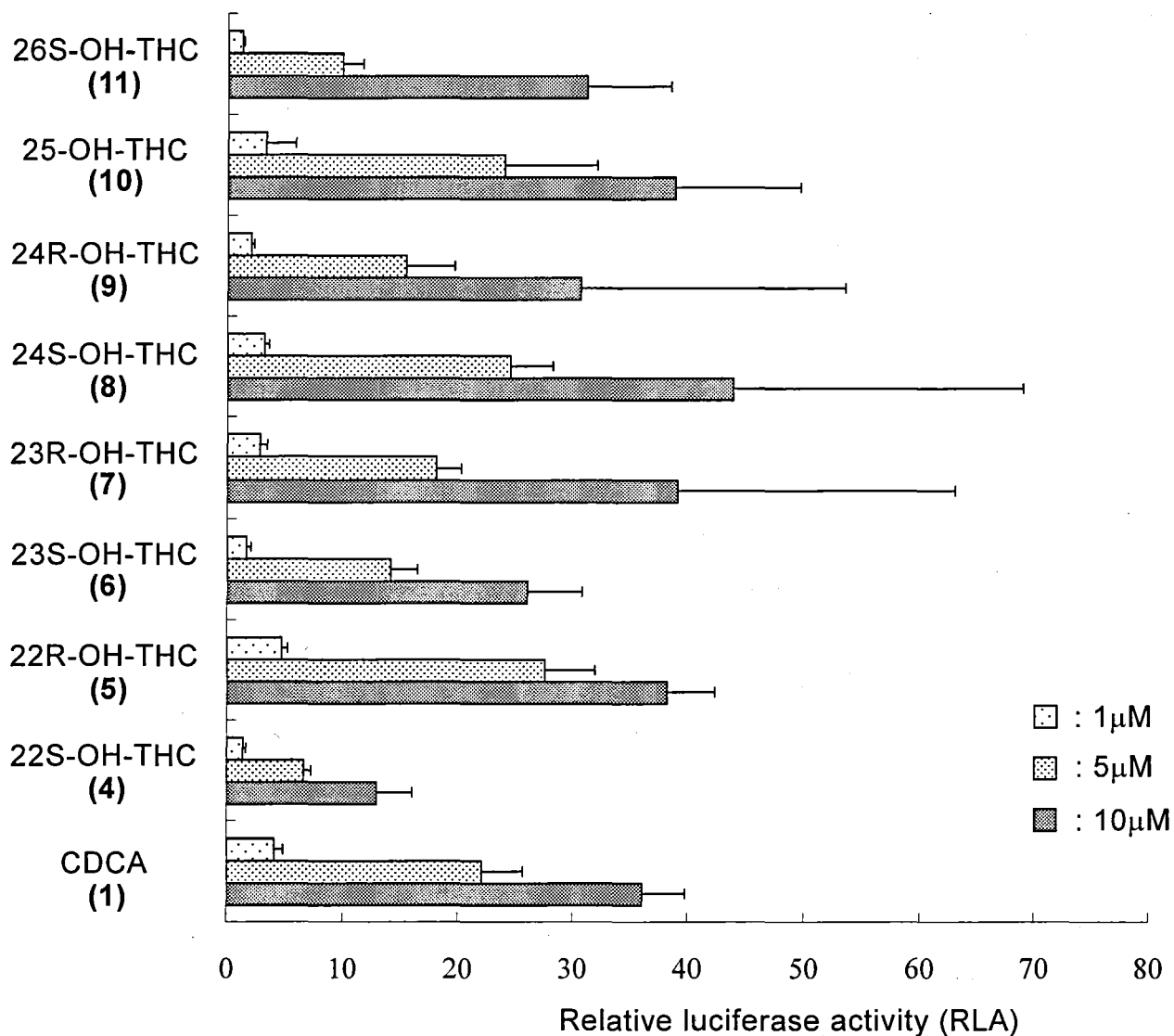
## 結果

まず、母核は CA と同一でコレステロール側鎖を有する 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol (THC、右構造)の側鎖の 22 位~26 位に水酸基が 1 つ導入された胆汁アルコールについてそれらの FXR 活性化能を検討した((4)~(11))。FXR 活性化能の測定は、FXRE-driven



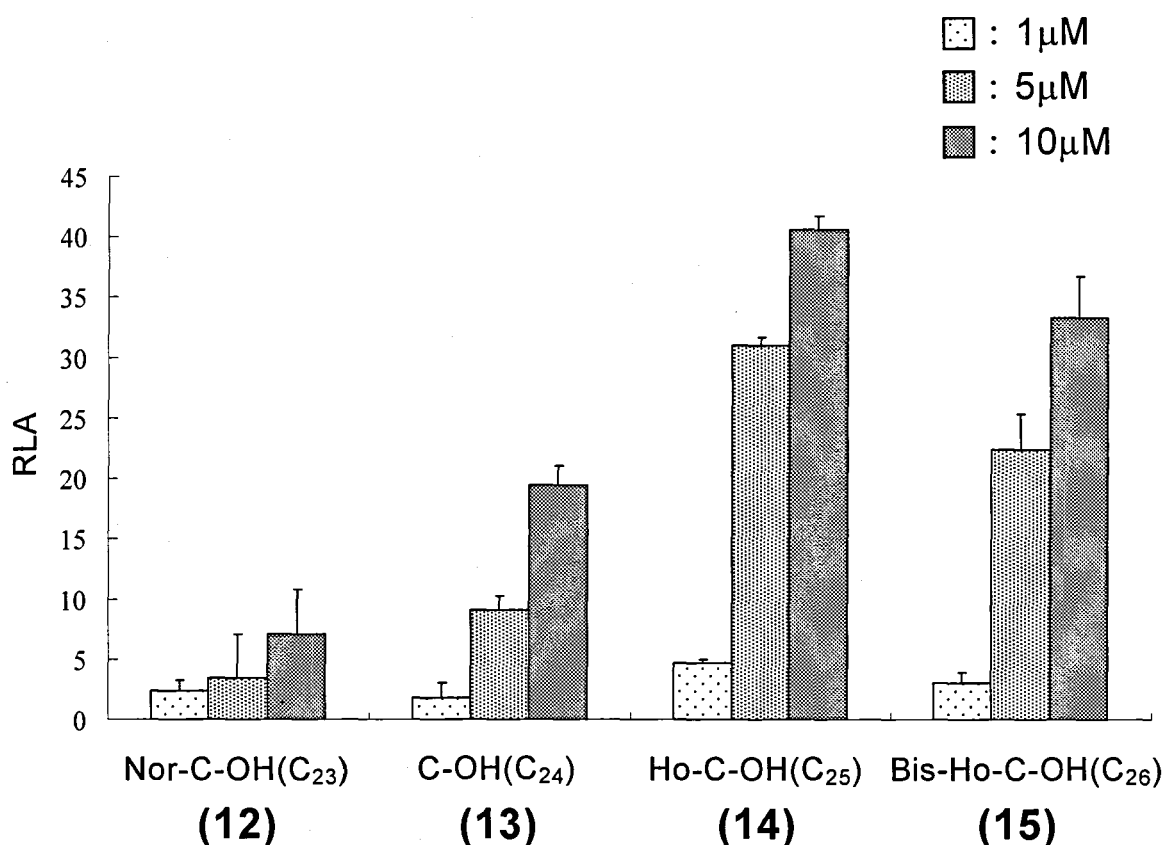
5 $\beta$ -Cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol (THC)

luciferase plasmid、ヒト FXR plasmid、ヒト RXR plasmid、及び $\beta$ -galactosidase plasmid を一過性に形質導入した Huh-7 細胞を用いた cell-based luciferase assay で行なった。Fig.5 に示すように、THC の側鎖の 25 位あるいは 26 位が水酸化された 25-OH-THC(10)あるいは 26-OH-THC(11)は内因性リガンドとして最も強い活性を有する CDCA に匹敵する FXR 活性化能を示した。これは、以前に CV-1 細胞を用いた同様の assay 法による結果と一致した<sup>[32]</sup>。また、THC の 22 位~24 位に一つの水酸基が導入された胆汁アルコールにはそれぞれ 2 つの立体異性体が存在する((4)~(9))。23-OH-THCs(6 and 7)、及び 24-OH-THCs(8 and 9)は CDCA とほぼ同等の FXR 活性化能を示した。また、それぞれの立体異性体間には FXR 活性化能に有意な差は認められなかった。一方、22S-OH-THC(4)と 22R-OH-THC(5)の異性体の間には FXR 活性化能に著しい差を認めた。22R-OH-THC(5)は CDCA と同等の活性を示したが、22S-OH-THC(4)はほとんど活性を示さなかった。



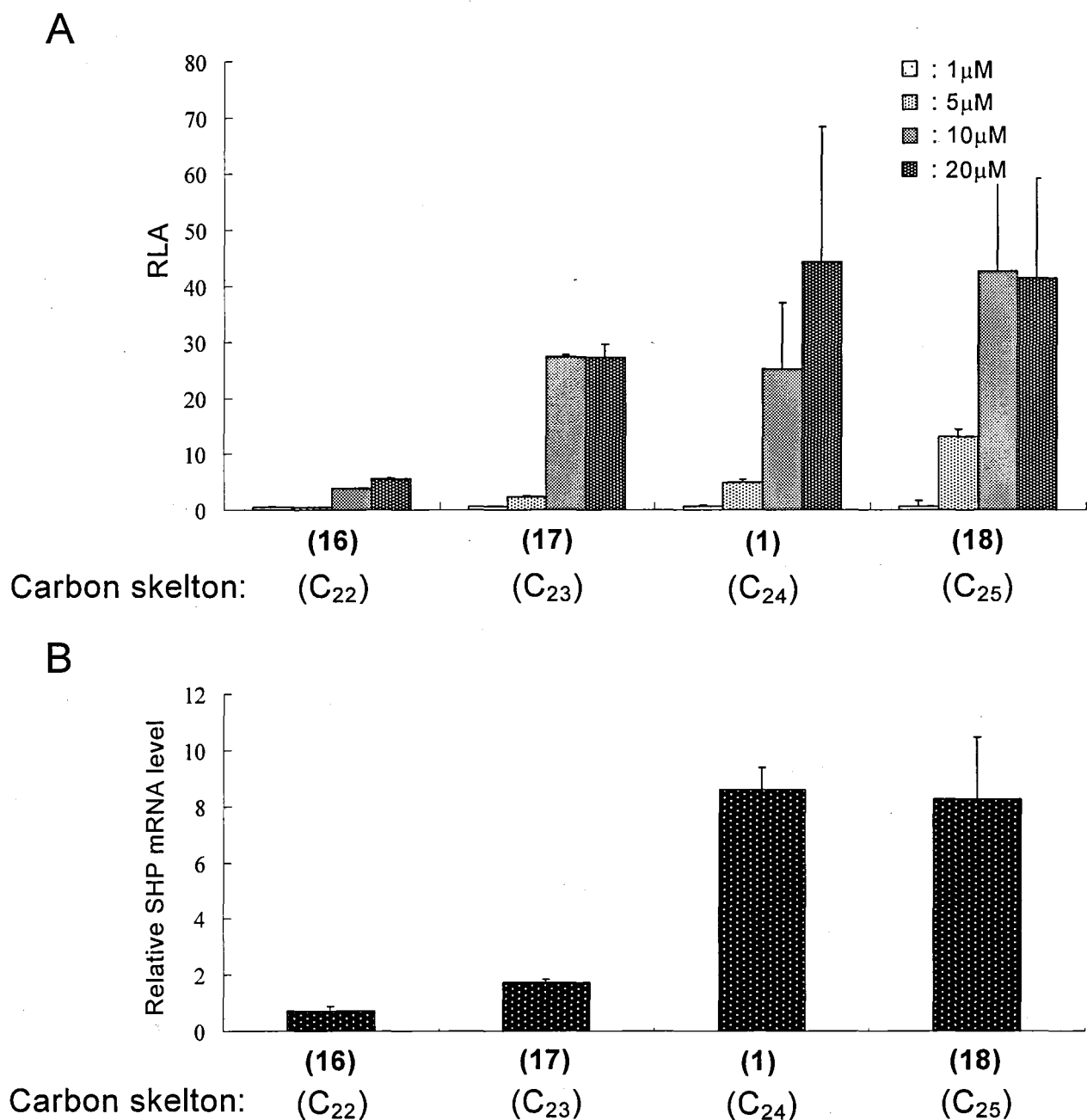
**Fig.5** The effect of the presence of a hydroxyl group at the different positions in the side chain of THC on FXR activation in the cellular transactivation assay. Huh-7 cells were transfected with expression plasmids for human FXR and RXR $\alpha$ , and the FXR<sub>PLTPX4</sub>-tk-luc reporter plasmid together with a pSV- $\beta$ -galactosidase vector as a control. Cells were exposed to vehicle alone or 1-10  $\mu$ M of the bile alcohols indicated. Luciferase activity in the cell extract was normalized to pSV- $\beta$ -galactosidase activity and expressed as fold induction relative to vehicle-exposed cells. The values are means  $\pm$  SD of three experiments. Compounds in the figure are indicated by bracketed numbers.

次に、胆汁アルコールの側鎖長がその FXR 活性化能に与える影響を検討した。**Fig.6** に示すように、胆汁アルコールの側鎖長が短くなるにつれて、FXR 活性化能は低下した。特に、炭素数 24 より少ない C<sub>23</sub>胆汁アルコール(Nor-C-OH(**12**)) は非常に小さい活性しか示さなかった。



**Fig.6** The shortening of steroid side chain of bile alcohol resulted in a decrease in FXR activation. FXR activation was evaluated by the luciferase reporter assay as described in the legend to Fig.4. Data are represented as multiples of induction relative to vehicle-treated cells and represent means  $\pm$  SD of three determinations. Compounds in the figure are indicated by bracketed numbers.

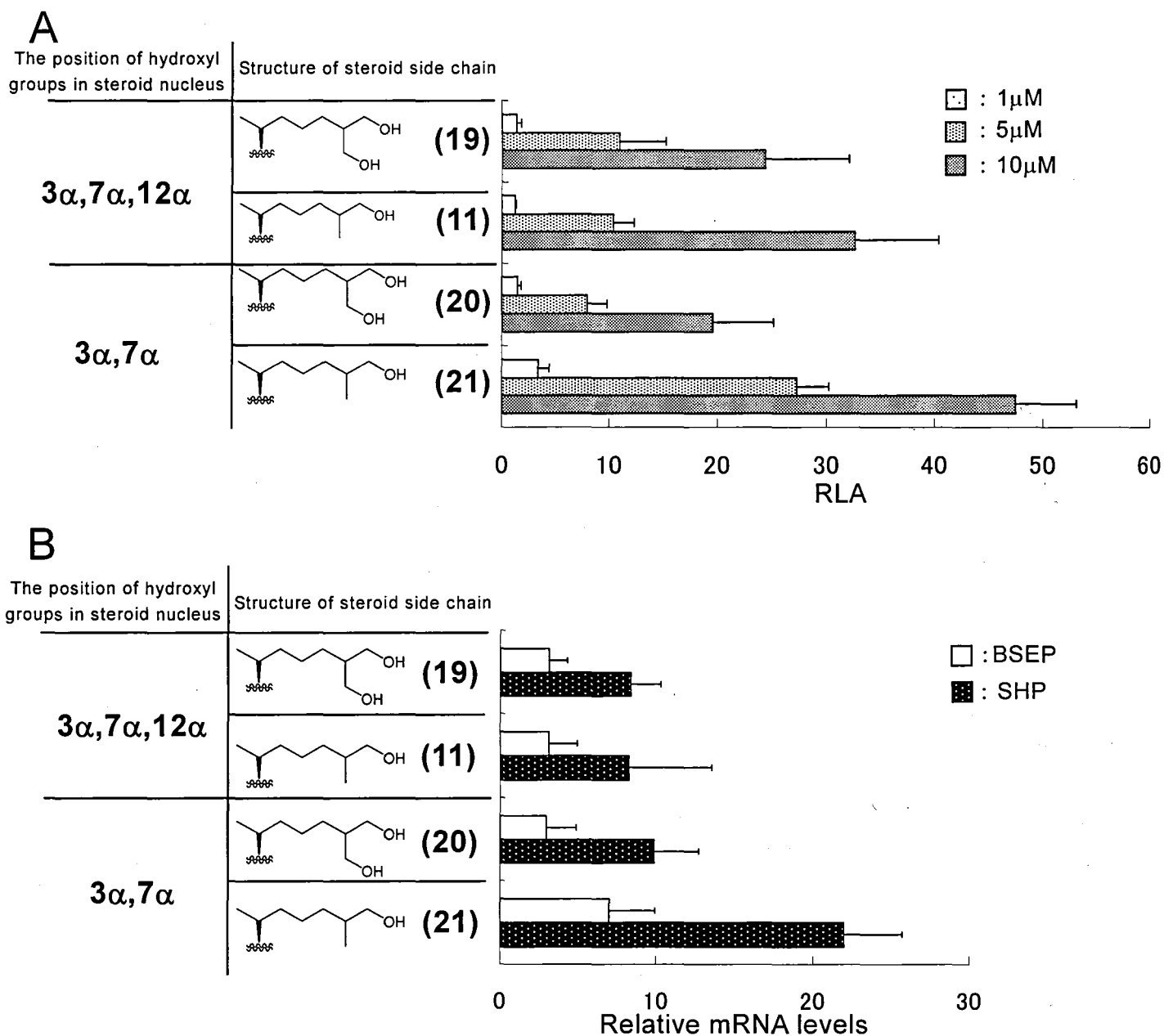
次いで、胆汁酸の側鎖長を変えた胆汁酸ホモログについて同様の検討を行なった。**Fig.7A** に示すように、CDCA より側鎖長が短くなると、FXR 活性化能は徐々に低下し、Bis-Nor-CDCA (C<sub>22</sub>)(**16**)は著しい活性の低下を示した。一方、CDCA より炭素一つ延長した Ho-CDCA(C<sub>25</sub>)(**18**)は有意な活性上昇を示さなかった。さらに、Luciferase assay の結果が FXR ターゲット遺伝子の発現に影響しているかを検討するため、各 CDCA ホモログで Huh-7 細胞を処理後、SHP mRNA 発現レベルを測定した。SHP mRNA レベルは Luciferase assay の結果とよく相関しており、CDCA より側鎖長が短いホモログでは SHP mRNA 発現レベルは有意に低下していた(**Fig.7B**)。一方、CDCA より側鎖長が長い Ho-CDCA(C<sub>25</sub>)(**18**)で処理しても SHP mRNA レベルは変化しなかった(**Fig.7B**)。



**Fig.7** The shortening of steroid side chain of bile acid resulted in a decrease in FXR activation and in expression of SHP mRNA which is direct FXR-target gene. A; FXR activation was evaluated by the luciferase reporter assay as described in the legend to Fig.4. B: Huh-7 cell were treated 20 hr with 10 $\mu$ M CDCA or CDCA-derivatives. Gene expression was analyzed using qRT-PCR. Data are represented as multiples of induction relative to vehicle-treated cells and represent means  $\pm$  SD of three determinations. Compounds in the figure are indicated by bracketed numbers.

天然に存在する胆汁アルコールのほとんどは  $3\alpha$ 、 $7\alpha$ 及び  $12\alpha$ 位に水酸基を 3 つ有する CA と同じ母核構造であるが、 $3\alpha$ 及び  $7\alpha$ 位に水酸基を 2 つ有する CDCA と同じ母核構造の胆汁アルコールも存在する。そこで CDCA 母核を持つ胆汁アルコール群について検討を行なった。5 $\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,26,27$ -tetrol(**20**)、5 $\beta$ -cholestane- $3\alpha,7\alpha,26$ -triol(**21**)は CA 母核をもつ胆汁アルコール (**11**)及び(**19**)と同様、あるいはそれ以上の FXR 活性化能を示した(**Fig.8A**)。また、側鎖に 2 つの水酸基を持つ (**20**)よりも、側鎖に 1 つの水酸基しか持たない (**21**)の方が著しく強い FXR 活性化能を示した。また、CA と同じ母核構造をもつ(**11**)及び(**19**)の FXR 活性化能には (**21**)及び(**20**)に認められたような差が認められなかった(**Fig.8A**)。

さらに、これら胆汁アルコールの FXR ターゲット遺伝子発現への影響を検討したところ、SHP、BSEP いずれにおいても luciferase assay の結果と類似した結果が得られた(**Fig.8B**)。



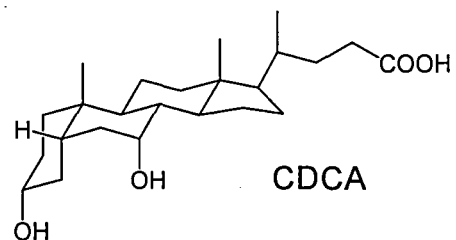
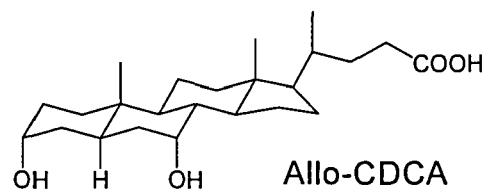
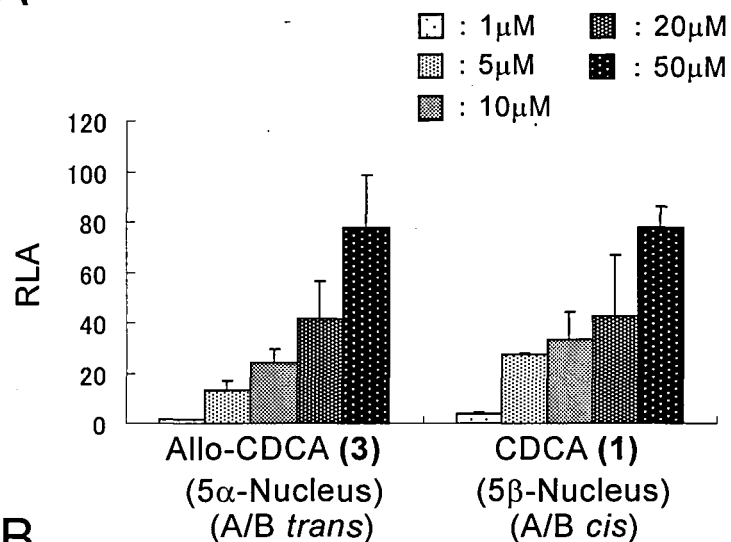
**Fig.8** The number of hydroxyl group of  $5\beta$ - (*A/B cis*) bile alcohols affected FXR activation and FXR-targeted gene expressions. A: FXR activation was evaluated by the luciferase reporter assay as described in the legend to Fig.4. B: Huh-7 cells were treated for 20 hr with vehicle (DMSO) alone, 10  $\mu$ M CDCA, or bile alcohols indicated  $5\beta$ - (*A/B cis*) bile alcohols. Total RNA was isolated from the cells, and the levels of BSEP and SHP mRNA were measured by real-time quantitative RT-PCR. Data were normalized to 18S rRNA levels. Data are represented as multiples of induction relative to vehicle-treated cells and represent means  $\pm$  SD of three determinations. Compounds in the figure are indicated by bracketed numbers.



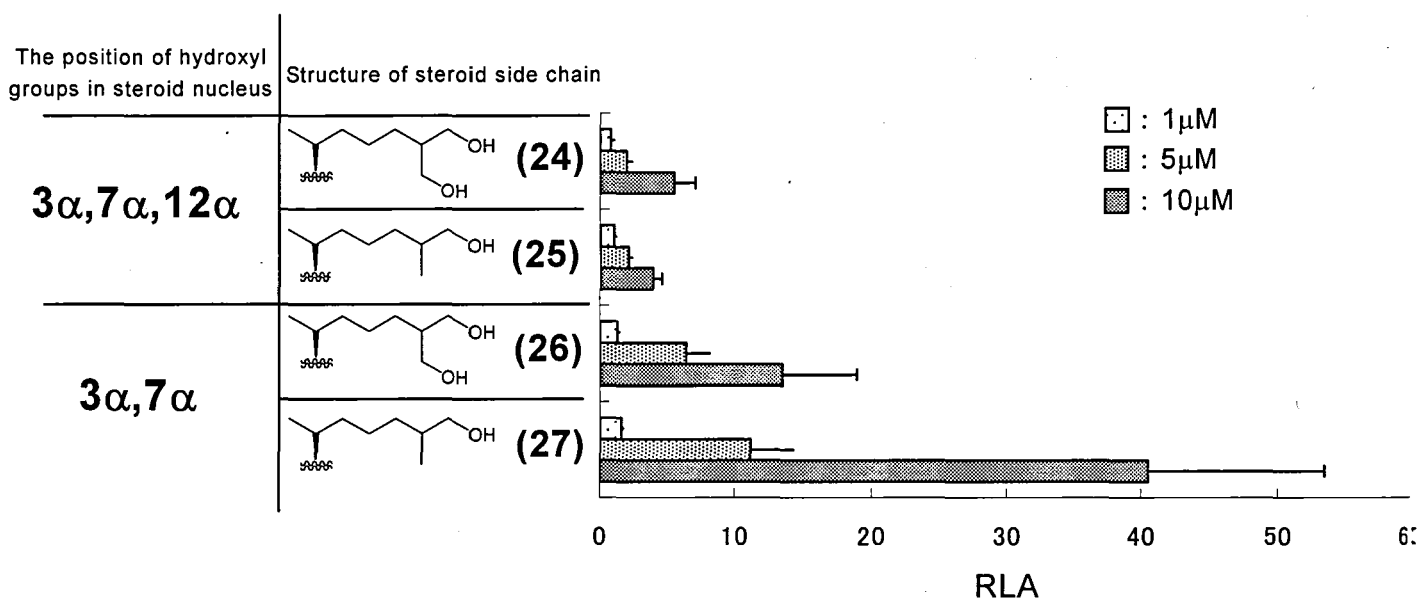
さらに、ステロイド母核の A 環と B 環の立体配置が FXR 活性化能に及ぼす影響について検討した。天然に見出される胆汁酸のほとんどはステロイド母核の A 環と B 環の配位が *cis* 型の 5 $\beta$ -胆汁酸である(**Fig.4A**)。一方、天然に存在する胆汁アルコールの中にはステロイド母核の A 環と B 環の配位が *trans* 型の 5 $\alpha$ -タイプの胆汁アルコールも存在する(**Fig.4C**)。そこで、これら 5 $\alpha$ -体の FXR 活性化能について検討した。

**Fig.9A** に示すように、CDCA の 5 $\alpha$ -体である allo-CDCA(**3**)は CDCA とほぼ同等の FXR 活性化能を示した。また、**Fig.8** で示したように、CA と同じ母核構造を持つ (**19**)及び (**11**)は CDCA と同程度の活性を示したが、それらの 5 $\alpha$ -異性体である 5 $\alpha$ -cyprinol(**24**)、5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol(**25**)にはほとんど活性を認めなかった(**Fig.9B**)。一方、allo-CDCA と同じ母核構造を持つ 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26,27-tetrol(**26**)、5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26-triol(**27**)には FXR 活性化能を認めた(**Fig.9B**)。さらに、これら化合物の FXR ターゲット遺伝子、SHP、BSEP の mRNA レベルは luciferase assay による FXR 活性化能とよく相関していた(**Fig.9C**)。

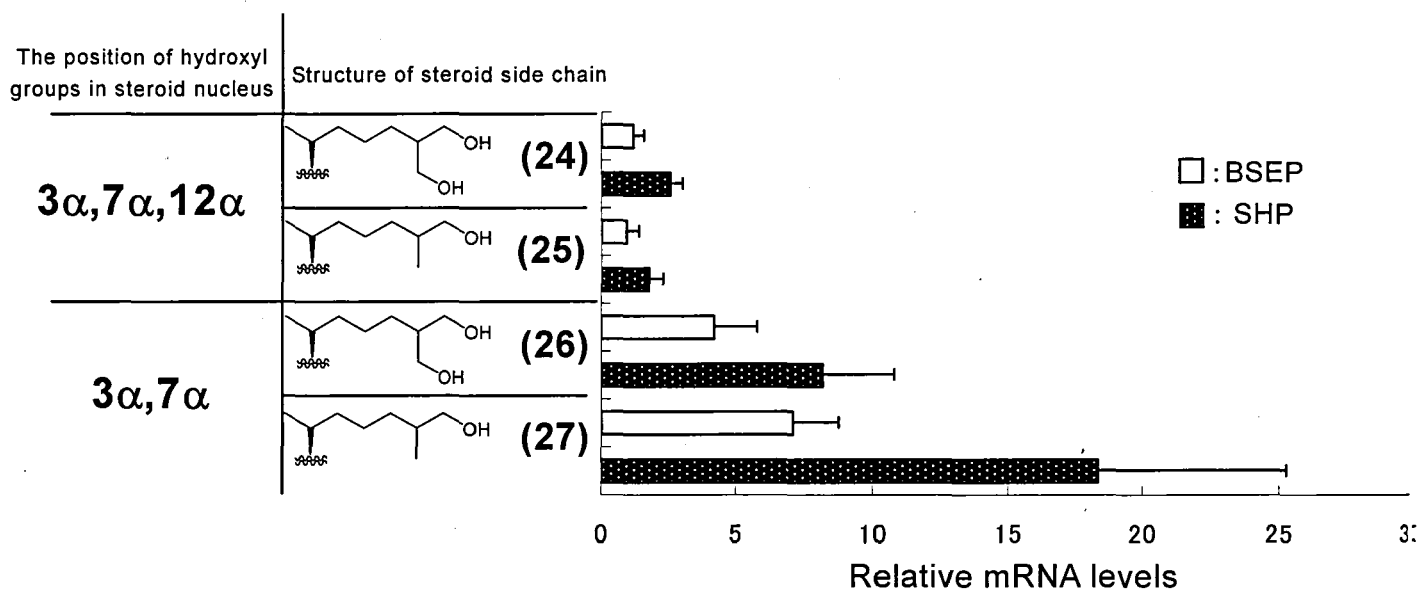
**A**



**B**



**C**



**Fig.9** The number of hydroxyl group of 5 $\alpha$ - (A/B *trans*) bile alcohols affected FXR activation and FXR-targeted gene expressions. A, B: FXR activation was evaluated by the luciferase reporter assay as described in the legend to Fig.4. C: Huh-7 cells were treated for 20 hr with vehicle (DMSO) alone, 10  $\mu$ M allo-CDCA, or bile alcohols indicated 5 $\alpha$ - (A/B *trans*) bile alcohols. Total RNA was isolated from the cells, and the levels of BSEP and SHP mRNA were measured by real-time quantitative RT-PCR. Data were normalized to 18S rRNA levels. Data are represented as multiples of induction relative to vehicle-treated cells and represent means  $\pm$  SD of three determinations. Compounds in the figure are indicated by bracketed numbers.

## 考察及び小括

胆汁アルコールは主に魚類・両生類等の下等脊椎動物の胆汁中に広く見出される中性のポリヒドロキシステロールであり、哺乳動物における胆汁酸と同様、下等脊椎動物の肝臓においてコレステロールの最終代謝産物として生成される<sup>[52]</sup>。また、健常人の胆汁中、糞中及び尿中にも微量ではあるが、胆汁酸生合成中間体あるいはそれらから誘導される胆汁アルコールが存在している (**Fig.1**)<sup>[53]</sup>。この様に胆汁アルコールは生理的にも構造的にも胆汁酸と密接に関係する化合物である。

胆汁酸を内因性リガンドとする FXR はコレステロールや胆汁酸のホメオスタシスを調節するだけでなく、グルコースやトリグリセリドの代謝にも関与する。つまり、FXR アゴニストはメタボリックシンドロームの予防、及び治療薬となりうる。このことから、胆汁酸をリード化合物とする様々な胆汁酸誘導体の FXR 活性化能が検討されてきた。それによって、CDCA の 6 $\alpha$  位にエチル基が導入された化合物が有力な FXR アゴニストとして同定された<sup>[54]</sup>。著者らは以前、CA や CDCA を還元することによって得られたアルコール体が FXR のリガンドとして機能することから、胆汁酸の側鎖のネガティブチャージは FXR の活性化に必要ではないことを示した<sup>[31]</sup>。このことから、天然に存在する中性ポリヒドロキシステロイドである胆汁アルコールに着目し、FXR アゴニストとして有力な化合物を探索すると同時に、FXR と胆汁アルコールとの構造活性相関を明らかにするために本研究を行なった。

まず、THC の側鎖の 22 位～26 位に水酸基が 1 つ置換された胆汁アルコールについて検討した (**Fig.5、(4)～(11)**)。25 位、26 位に水酸基が導入された化合物は CDCA に匹敵する FXR 活性化能を示した。23 位、24 位に水酸基が置換された胆汁アルコールにはそれぞれ 2 つの立体異性体が存在する。それらはすべからず CDCA と同等の活性を示したが、立体異性体間で活性の違いは認められなかった。ところが、22 位についての 2 つの異性体においては、22R-体は CDCA や他の胆汁アルコール同様に FXR 活性化能を示したものの、22S-体にはその活

活性化能はほとんど認められなかった。以前、CDCA の C-22 及び C-23 位にメチレン基を架橋した (22S,23R)-、(22S,23S)-、(22R,23S)- 及び (22R,23R)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-22,23-methylene-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid の 4 種類の異性体についてそれらの FXR 活性化能が検討された<sup>[55]</sup>。その結果、形成されたシクロプロパン環の立体構造、特に 22 位の立体配置の違いにより、それらの FXR 活性化能に大きな差異が認められた。即ち、メチレン基の導入により生じた C-22 位の不斉、更に今回の水酸基の置換による C-22 位の不斉がリガンド活性に大きな影響を与えたことは明白である。これらの結果は、導入された置換基の極性に関係なく bulky な置換基がある特定の空間を占有する事に起因していると考えられる。

また、胆汁アルコール、もしくは胆汁酸の FXR 活性化能はそれらの側鎖が短くなるにつれて減少することを明らかにした。この結果は、炭素数の減少による膜透過性の低下を反映していることは否定できない。しかし、以前、表面プラズモン共鳴を用いたコアクチベータ結合アッセイにおいて、C<sub>22</sub>-胆汁酸である (16) は FXR 結合能がほとんどないことが報告されている<sup>[55]</sup>。これらの結果はステロイドホルモンがヒト FXR を活性化できないということと関連していると思われる<sup>[11]</sup>。以前の X 線結晶構造解析の結果から、胆汁酸は FXR のリガンド結合ポケットにステロイド母核の A 環側から結合するが、ステロイドホルモンなど他のステロイド骨格を有する化合物はそれらに対応する核内受容体のリガンド結合ポケットに D 環側から結合することが明らかにされている<sup>[56, 57]</sup>。以上のことから、CDCA の側鎖長と同じくらい十分な長さの炭素鎖を持つステロイド化合物のみが FXR と結合できることが示唆された。さらに、胆汁酸の側鎖に存在するカルボニル基の酸素原子はヒト FXR のリガンド結合ポケットの入り口付近に存在する 331 番目のアルギニンと水素結合することでレセプター・リガンド複合体の安定性に寄与していることが提唱されている<sup>[56, 57]</sup>。胆汁酸及び胆汁アルコールの側鎖短縮により、この水素結合が形成できなくなったことが、この複合体の安定性の低下、FXR 活性化能の低下をもたらしたと推測された。

さらに、胆汁アルコールの側鎖に存在する水酸基の数が増加することによっ

て、FXR 活性化能が低下することが示された(**Fig.8**)。この結果は前述の炭素鎖の短縮による結果と同様、水酸基の増加に伴う細胞膜透過性の減少を反映したものであるという可能性もある。しかし、側鎖に水酸基を2個有する5 $\alpha$ -cyprinol(**19**)や5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -25,26-triol (5 $\alpha$ -bufol)がFXR 合成アゴニストであるGW4064やCDCAのFXR 活性化能を阻害するという結果は、これらの胆汁アルコールが細胞内に取り込まれていることを示すものであり、水酸基の増加に伴う膜透過性の減少は否定できるものと考えられる。従ってこの結果から、ステロイド側鎖の hydrophobicity がFXR 活性化能に影響を与えたものと考えられる。一方で、水酸基の存在が側鎖に立体的な嵩高さを付与したことによって、FXR 活性化能が低下したという可能性も考えられる。

最後に、ステロイド母核のA環、B環の立体配置が胆汁アルコールのFXR 活性化能に与える影響について検討した。CDCAの5 $\alpha$ -異性体であるallo-CDCA(**3**)にCDCAと同等の活性を認め、さらに5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26,27-tetrol(**26**)、5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,26-triol(**27**)がそれらに対応する5 $\beta$ -異性体と同程度のFXR 活性化能を持つことを明らかにした。対照的に、5 $\alpha$ -cyprinol(**24**)、及び5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol(**25**)にはほとんど活性を認めなかった。著者らは、5 $\beta$ -cyprinolがFXRのアゴニストであり、5 $\alpha$ -cyprinol(**24**)がFXRのアンタゴニストであることを報告し、FXRの活性化にステロイド母核のA/B環の立体配置が重要な役割を果たすこと推測していた<sup>[33]</sup>。しかし、今回allo-CDCAと同じ母核構造を有する5 $\alpha$ -胆汁アルコール(A/B trans)にもFXR 活性化能が認められたことから、A/B環の立体配置の違いは必ずしもFXR 活性化能に重要ではないことが判明した。

## 第 2 章

### TGR5-リガンド構造活性相関

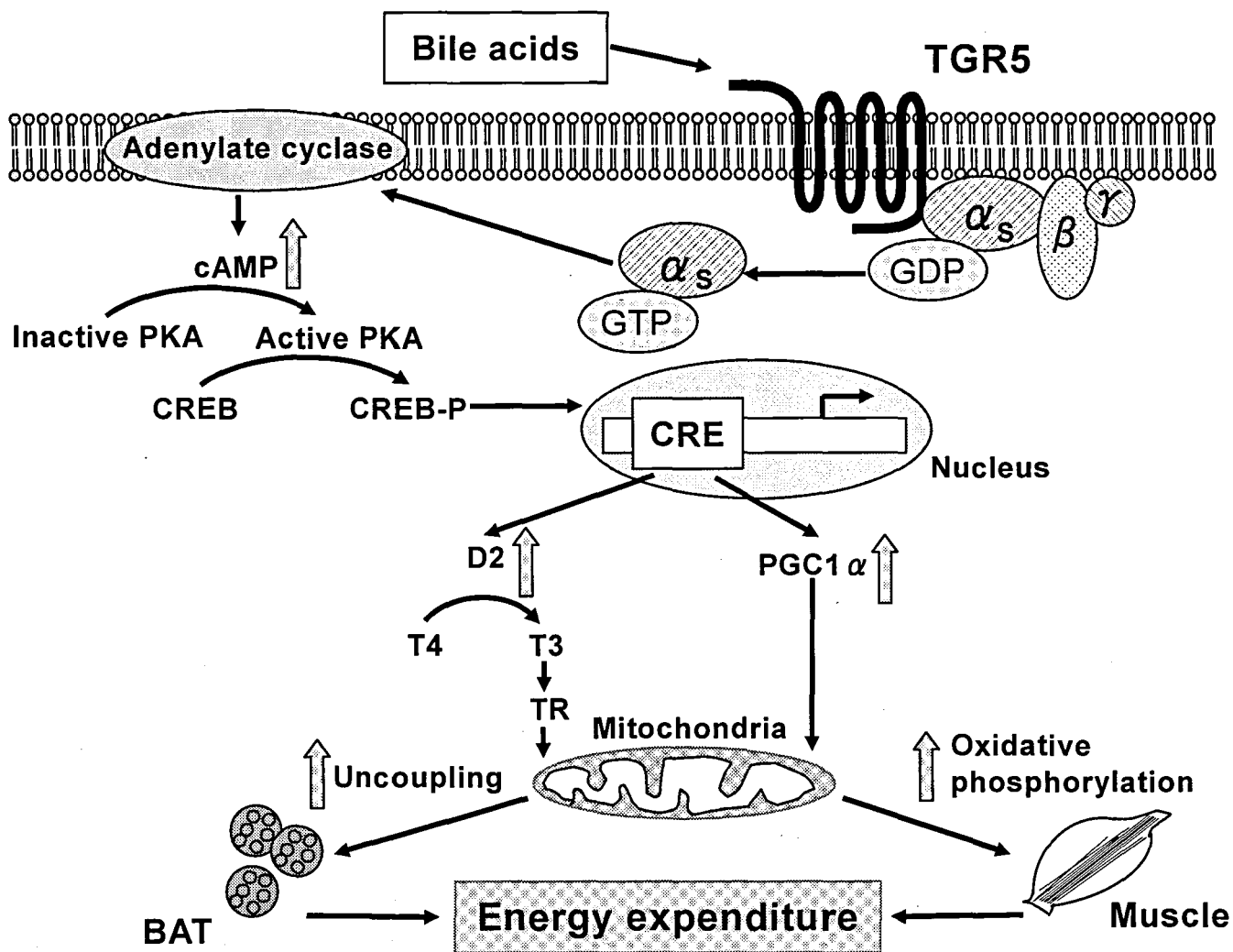
## 序論

胆汁酸が食物中の脂質の消化・吸収やコレステロール恒常性の維持に必要な物質であることは前章までで述べた。ヒトにおいて、体内胆汁酸の99%以上が腸肝循環系組織に局在しているが、胆汁酸の血中濃度が食間では約 $5\mu\text{M}$ と全身循環系にもわずかながら存在する。しかも、食事後その血中濃度は $15\mu\text{M}$ にまで上昇する<sup>[58]</sup>。このことから胆汁酸の生理作用が腸管においてのみ発揮されるのではなく、食事とリンクした全身のシグナル伝達分子として作用している可能性も充分考えられる。

最近、Gタンパク質結合受容体、TGR5が胆汁酸によって活性化されることが示された<sup>[59, 60]</sup>。活性化されたTGR5はGsタンパクを介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、セカンドメッセンジャーである細胞内cAMP濃度を増加させる。ヒト筋細胞やマウス褐色脂肪細胞において胆汁酸により活性化されたTGR5が細胞特異的なシグナル伝達系を介してエネルギー消費を増加させることが示された(**Fig.10**)<sup>[61]</sup>。これは、胆汁酸のTGR5を介した抗肥満作用といった極めて意外な作用を期待させるものである。

一方著者らは、FXR活性化能と同様に様々な胆汁酸や胆汁酸類似体のTGR5活性化能を検討し<sup>[62]</sup>、胆汁酸の疎水性が高くなるにつれて、TGR5活性化能、及びTGR5への親和性が増加することを報告している。あわせて、胆汁酸の側鎖に存在するカルボキシル基が水酸基に還元された化合物のTGR5活性化能及び親和性を検討したところ、対応する胆汁酸に比して著しく上昇することも明らかにした。これらの知見から、本研究では胆汁酸様のステロイド母核を有する中性ポリヒドロキシステロールで、天然に豊富に存在する胆汁アルコールに着目し、それらのTGR5活性化能を測定すると共にTGR5と胆汁アルコールとの構造活性相関について検討を行なった。





**Fig.10** Intracellular cell signaling pathways induced by TGR5 activation. Upon ligand binding, TGR5 activation is followed by release of the  $G\alpha_s$  subunit and activation of adenylate cyclase. The increase in intracellular concentration of the cAMP second messenger activates protein kinase A (PKA), which phosphorylates cAMP-response element binding protein (CREB). This activated transcription factor transactivates its target genes by binding to cAMP response elements (CREs) contained in their promoter. In metabolic tissues (brown adipose tissue (BAT), muscle), bile-acid- dependent increases in cAMP leads to the activation of type 2 iodothyronine deiodinase 2 (D2) and hence boosts the local production of thyroid hormone. Activation of the thyroid receptor (TR) increases mitochondrial oxidative phosphorylation (muscle) and uncoupling (BAT), resulting in enhanced energy expenditure. PGC1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$ ; T3, 3,3',5-triiodothyronine; T4, thyroxine.

## 方法

### 1. コラノイドの調製

本研究で用いた化合物を **Fig.4** に示した(前章参照)。lithocholic acid (LCA, 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid)(**3**)は市販品を用いた。内因性胆汁酸のうち、LCA は最も TGR5 リガンド活性が高いことが以前の報告で示されているため、ポジティブコントロールとして用いた<sup>[59]</sup>。5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol (THC)(**22**)、5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol (DHC) (**23**)は以前の報告で示されたように調製した<sup>[63]</sup>。5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol (5 $\alpha$ -THC)(**28**)は以前の報告に従って、5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol(**25**)より化学合成した<sup>[64, 65]</sup>。他のコラノイドについては前章に記述のとおり調整した。

### 2. 細胞

ヒト胎児性腎細胞由来 Hek293T 細胞は広島国際大学薬学部薬学科、生理化学研究室の山口雅史准教授より御供与いただいた。Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞は富山大学大学院医学薬学研究部分子細胞機能学研究室の今中常雄教授より御供与いただいた。

### 3. トランスフェクションとレポータージーンアッセイ

CHO cell、もしくは Hek293T 細胞を 96 well plate で一晩培養後、pCMV-SPORT6/hTGR5 (invitrogen) を 18.75ng/well、CRE (cAMP response element)-driven luciferase reporter constructs (SA Bioscience)を 12.5ng/well で細胞に形質導入した。24 時間後メディウムを交換し、0.1 $\mu$ M ~10 $\mu$ M の濃度に調製した化合物をそれぞれ添加し、37 $^{\circ}$ C、5 時間インキュベーションした。1  $\times$  Passive Lysis Buffer (Promega)で細胞を溶解し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いたレポーターアッセイにてルシフェラーゼ活性を測定し、ウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正した。さらに、DMSO のみを添加した群をネガティブコントロールとし、そのルシフェラーゼ活性を 1 としたときの各化合物の活性を Relative luciferase activity として示した。

### 4. EC<sub>50</sub>( $\mu$ M)と Efficacy(%)の算出

各ルシフェラーゼアッセイは各化合物あたり 4 点以上の濃度で行ない、かつそれぞれの条件において triplicate で行った。EC<sub>50</sub> 値はプロビット分析により求めた。FXR 活性化能における Efficacy (%) は内因性胆汁酸のうち、最も FXR 活性化能が高い CDCA 10 $\mu$ M の活性を 100% とした各化合物の最大活性で示した。TGR5 活性化能における Efficacy (%) は内因性胆汁酸のうち、最も TGR5 活性化能が高い LCA 10 $\mu$ M の活性を 100% とした各化合物の最大活性で示した。

・ FXR 活性化能の Efficacy (%):

$$\text{Efficacy (\%)} = \frac{\text{各胆汁アルコールの最大の Relative luciferase activity}}{\text{CDCA } 10 \mu \text{ M の relative luciferase activity}} \times 100$$

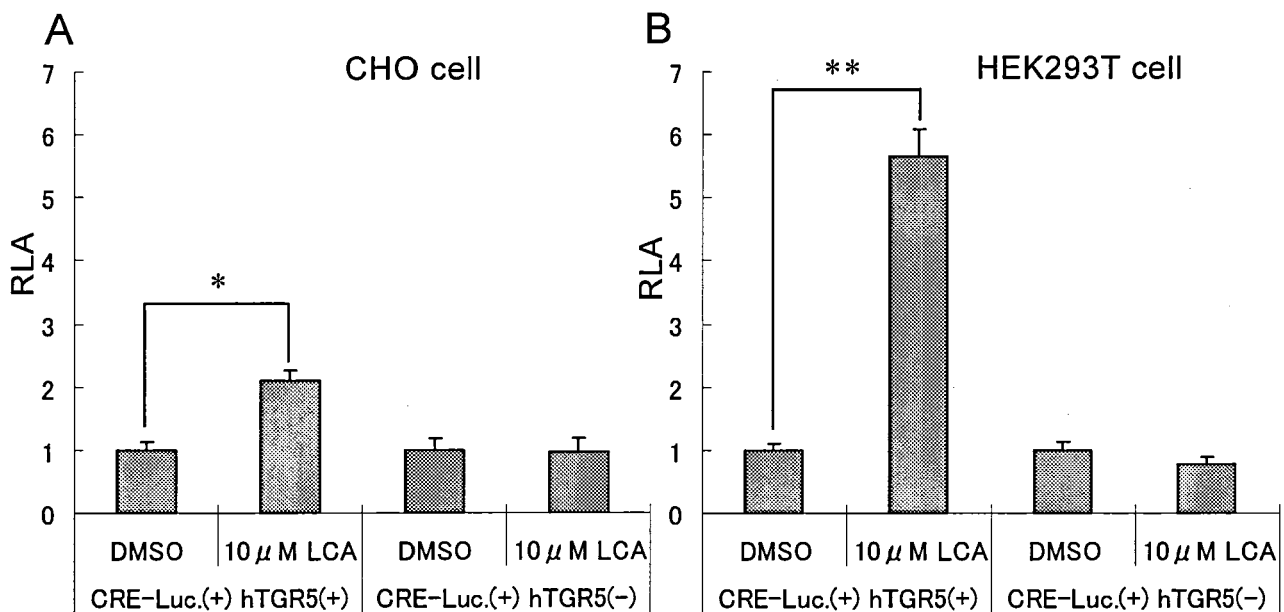
・ TGR5 活性化能の Efficacy (%):

$$\text{Efficacy (\%)} = \frac{\text{各胆汁アルコールの最大の Relative luciferase activity}}{\text{LCA } 10 \mu \text{ M の relative luciferase activity}} \times 100$$

## 結果

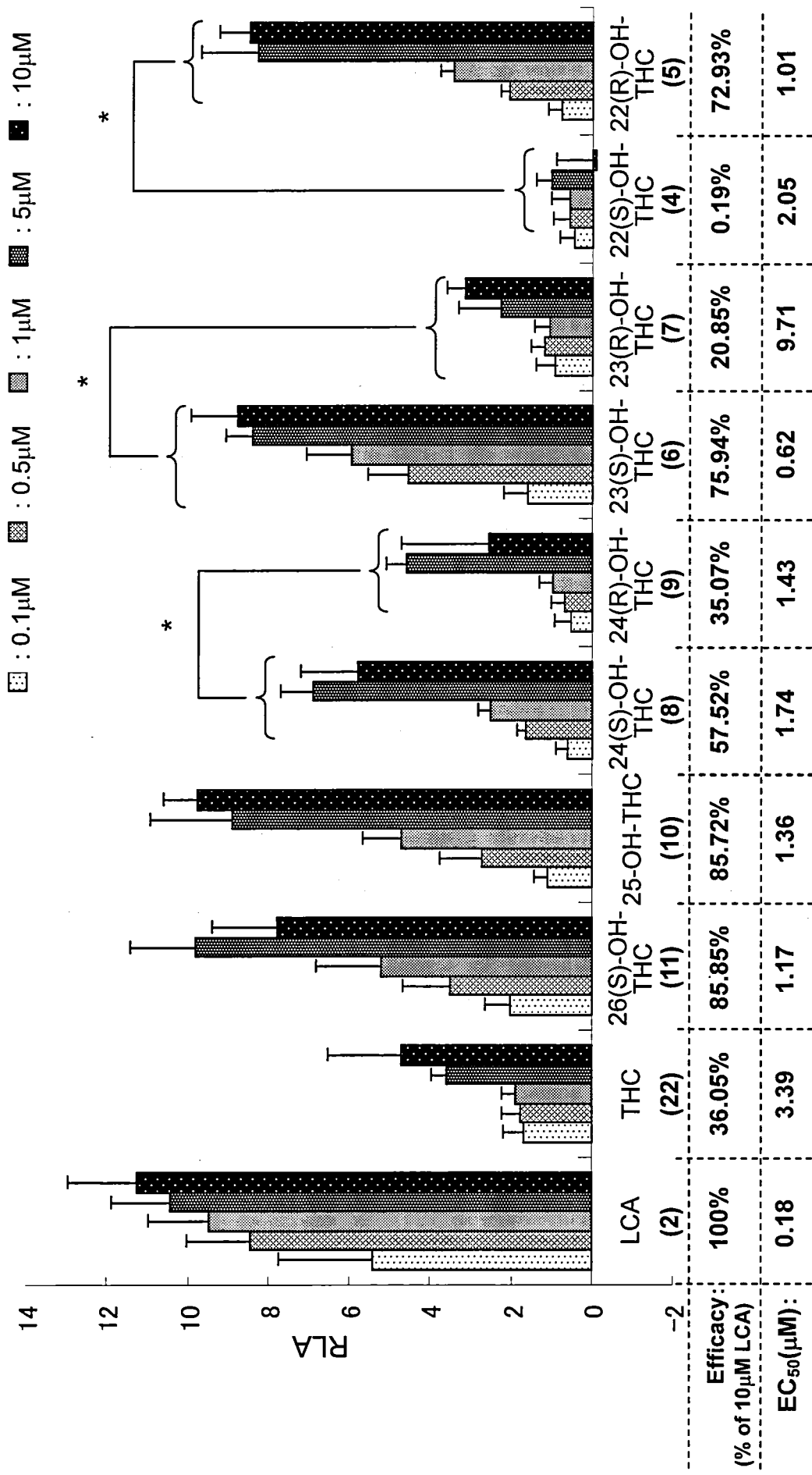
### TGR5-リガンドアッセイに用いる細胞株の選択

以前の報告において、TGR5-リガンド活性の検討に用いた細胞株は CHO 細胞であったため、その細胞株を用いて予備実験を行なった。胆汁酸の中で最も活性の高い LCA を用いて TGR5 活性化能を測定した。Fig.11A に示すように、LCA はネガティブコントロール(DMSO)に比べて活性を増加させたが、有意差はあるもののその増加は約 2 倍であった。一方、Hek293T 細胞を用いて同様の実験を行なったところ、LCA はコントロールに比べて 5 倍以上の TGR5 活性化能を示した(Fig.11B)。従って、本研究は Hek293T 細胞を用いて検討することとした。



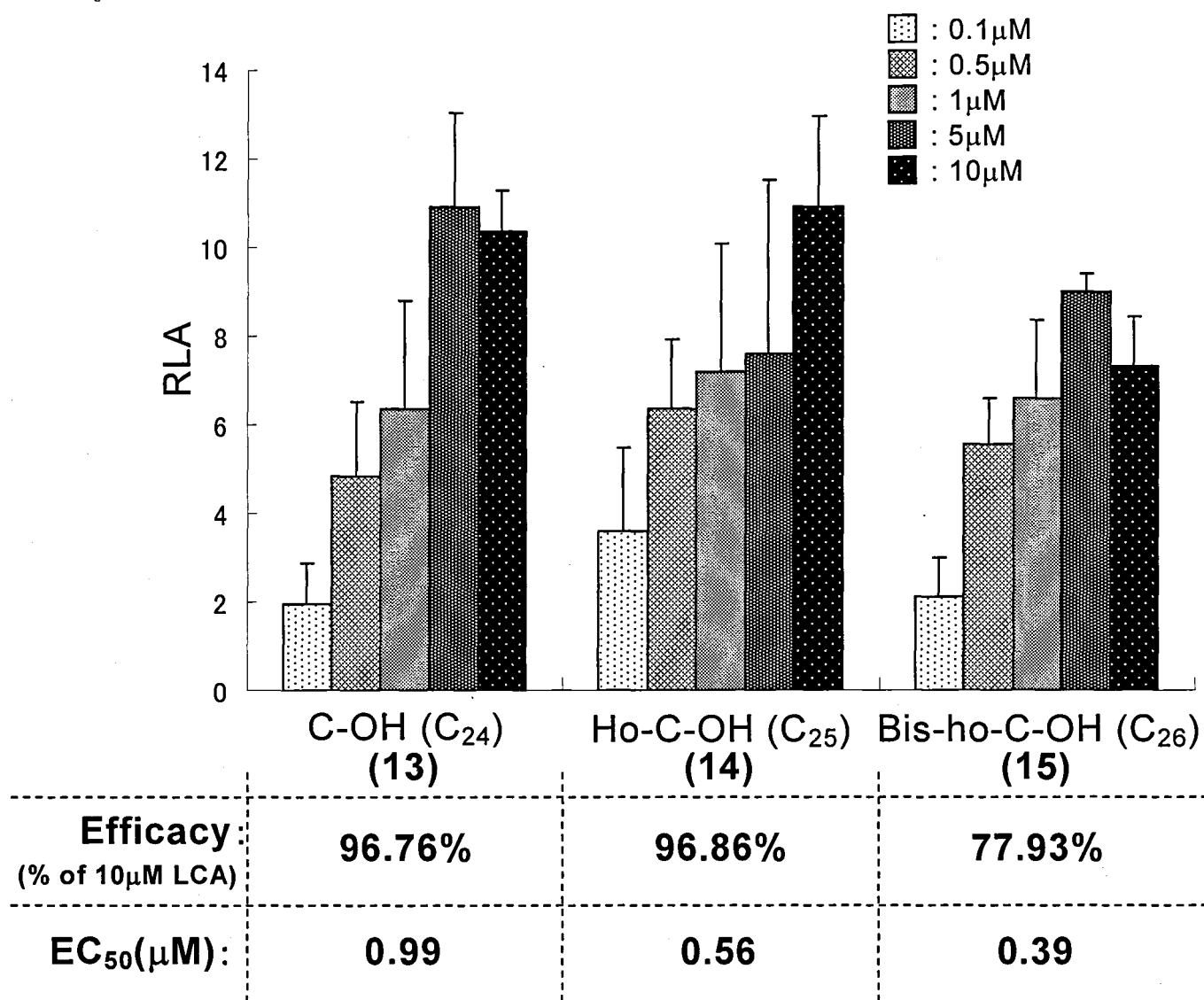
**Fig.11** LCA activates CRE-Luc reporter construct via TGR5 in the cellular transactivation assay. CHO (A) or Hek293T (B) cells were transfected with the CRE-driven luciferase reporter constructs (SA Bioscience) and human TGR5 expression plasmid (pCMV·SPORT6/hTGR5) or mock (pCMV·SPORT6). Each cell was exposed to DMSO or 10 μM of LCA. Luciferase activity in the cell extract was normalized to *Renilla* luciferase activity and expressed as fold induction relative to vehicle-exposed cells. The values are means ± SD of three experiments. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 respectively.

CA と同じ母核構造を有し、側鎖はコレステロールと同じ構造の 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol (THC)(**22**)について検討したところ、TGR5 活性化能も TGR5 への親和性も LCA に比して極めて低いものであった(**Fig.12**)。次いで THC の側鎖に水酸基を一つ有する胆汁アルコールについて検討を行なった。5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol(**11**) 及び 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,25-tetrol(**10**)の TGR5 活性化能は THC(**22**)に比して著しく増加した。C-24 位から C-22 位に水酸基を持つ各胆汁アルコールにはそれぞれ 2 種類の異性体が存在し、各異性体間に活性の差は認められたものの、全体的には側鎖の水酸基の位置が母核に近づくにつれ、TGR5 活性化能は減少する傾向を示した。また、とりわけ C-23 位、及び C-22 位に水酸基を持つ胆汁アルコールの異性体間で TGR5 活性化能の顕著な差が見られた。



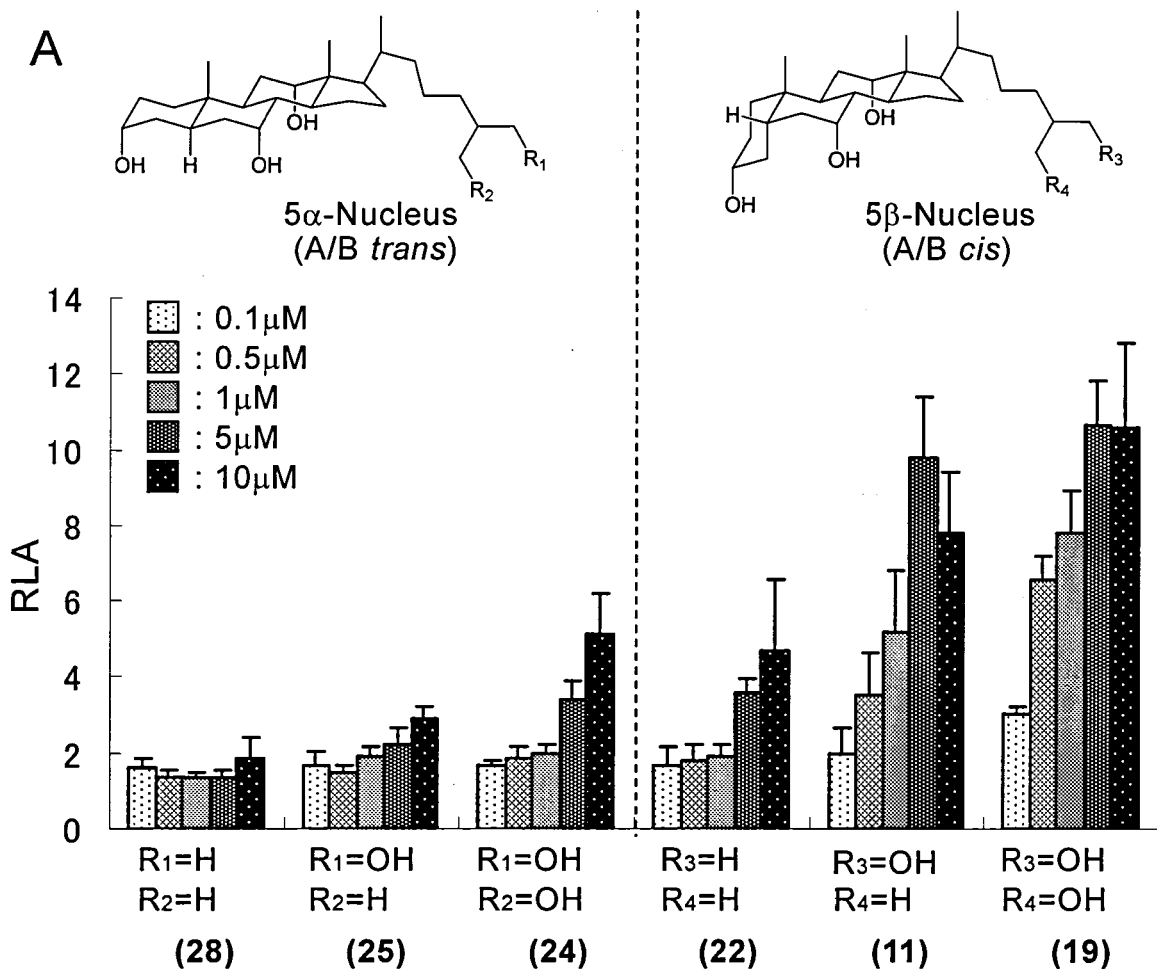
**Fig.12** The effect of the presence of a hydroxyl group at the different positions in the side chain of THC on TGR5 activation in the cellular transactivation assay. Hek293T cells were transfected with the CRE-Luc. reporter constructs and human TGR5 expression plasmid. Cells were exposed to vehicle alone or 0.1-10  $\mu$ M of the bile alcohols indicated. Firefly luciferase activity in the cell extract was normalized to Renilla luciferase activity and expressed as fold induction relative to vehicle-exposed cells. The values are means  $\pm$  SD of three experiments. Compounds in the figure are indicated by bracketed numbers. \*:  $p < 0.05$ .

次に、胆汁アルコールの側鎖長が TGR5 活性化能に与える影響について検討した。Fig.13 に示すように、C<sub>26</sub>~C<sub>24</sub> の胆汁アルコールにおいて、その炭素鎖の短縮に伴って活性に有意な差は認められなかったが、増加傾向にあった。また、炭素鎖の短縮に伴い、TGR5 に対する親和性(EC<sub>50</sub>)が低下する結果となった。

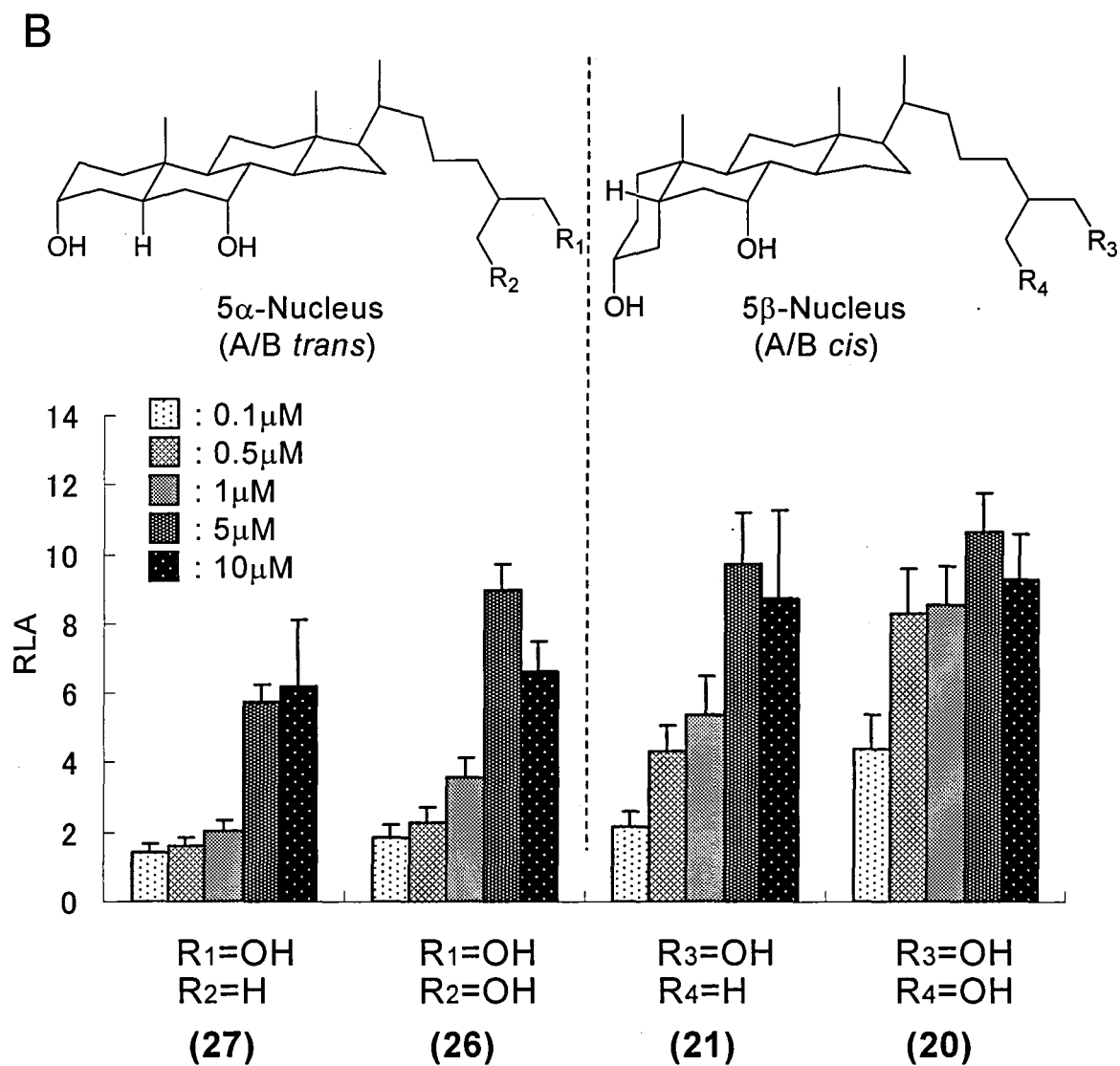


**Fig.13** The effect of shortening of steroid side chain of bile alcohol on TGR5 activation. TGR5 activation was evaluated by the luciferase reporter assay as described in the legend to Fig.12. Data represent means ± SD of three determinations. Compounds in the figure are indicated by bracketed numbers.

さらに、胆汁アルコールの側鎖に存在する水酸基の数やステロイド母核の A/B 環の立体配置が、TGR5 活性化能に与える影響について検討した。母核の 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ 位に水酸基を持つ胆汁アルコール群において、A/B 環の結合が *trans* 型である 5 $\alpha$ -胆汁アルコール群((24),(25),(28))に比べ、それらに対応する A/B *cis* 型の 5 $\beta$ -胆汁アルコール群((19),(11),(22))の TGR5 活性化能は高かった (Fig.14A)。また、母核の 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ 位に水酸基を持つ胆汁アルコール群においても 5 $\alpha$ -胆汁アルコールに比して、対応する 5 $\beta$ -胆汁アルコールのほうが高い TGR5 活性化能を示す傾向にあった (Fig.14B)。さらに、5 $\alpha$ -、及び 5 $\beta$ -胆汁アルコール群共に、側鎖の水酸基が存在しない THC (28 and 22)、側鎖に水酸基を 1 つ有する 26-OH-THC (25 and 11)、側鎖に水酸基を 2 つ有する cyprinol (24 and 19) の順で TGR5 活性化能が増加することも認めた (Fig.14A)。この結果は母核の 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$  位に水酸基を持つ胆汁アルコール群 (5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol (27 and 21)、及び 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26,27-tetrol (26 and 20)) においても同様であった (Fig.14B)。







**Fig.14** The number of hydroxyl group in the side chain of bile alcohols and their A/B ring juncture configuration affected TGR5 activation. TGR5 activation was evaluated by the luciferase reporter assay as described in the legend to Fig.12. Data represent means  $\pm$  SD of three determinations. Compounds in the figure are indicated by bracketed numbers.

**Fig.12、Fig.13** 及び **Fig.14** で示した胆汁アルコールについて、それらの TGR5 への選択性を検討した。

FXR 及び TGR5 におけるアゴニストとしての各胆汁アルコールの EC<sub>50</sub> の比 (TGR5/FXR EC<sub>50</sub> 比) を算出し、その値を TGR5 選択性の指標とし、**Table.1A-D** に示した。算出した EC<sub>50</sub> 値はそれぞれ危険率が 1%以下で有意な値であった ( $r>0.8$ )。 **Table.1A** に示したように、23-OH-THCs (**6** and **7**) の異性体間の TGR5/FXR EC<sub>50</sub> 比に著しい差が認められた。23S-OH-THC の TGR5/FXR EC<sub>50</sub> 比は 0.113 に対し、23R-OH-THC のそれは 2.651 と約 20 倍高いものであった。他の化合物について差は認められなかった。

また、胆汁アルコールの側鎖長による TGR5/FXR 選択性の変化は少なくとも C<sub>24</sub>~C<sub>26</sub> 胆汁アルコールの間では認められなかった(**Table.1B**)。

さらに **Table.1C** に示すように、TGR5/FXR EC<sub>50</sub> 比は側鎖の水酸基の数が増えるにつれて減少したことより、側鎖の水酸基の数の増加が TGR5 への選択性を高くすることが明らかとなった。また、側鎖に水酸基が存在しない 5β-cholestane-3α,7α-diol (DHC)(**23**) の TGR5/FXR EC<sub>50</sub> 比は 2.2 であるが、側鎖に水酸基を 2 個有する 5β-cholestane-3α,7α,26,27-tetrol(**20**) のそれは 0.069 とおよそ 1/30 に低下しており、CDCA 母核を持つ胆汁アルコール群の方がより顕著な結果が示された(**Table.1D**)。

**Table.1** TGR5 selectivity of bile alcohols.**A**

Compound	TGR5		FXR		TGR5 selectivity index, EC <sub>50</sub> ratio (TGR5/FXR)
	EC <sub>50</sub>	Efficacy	EC <sub>50</sub>	Efficacy	
26-OH-THC (11)	1.17	85.85%	4.18	85.96%	0.279
25-OH-THC (10)	1.36	85.72%	3.56	109.65%	0.383
24R-OH-THC (9)	1.43	35.07%	3.83	84.68%	0.373
24S-OH-THC (8)	1.74	57.52%	3.26	122.11%	0.535
23R-OH-THC (7)	9.17	20.85%	3.46	108.75%	2.651
23S-OH-THC (6)	0.62	75.94%	5.47	110.96%	0.113
22R-OH-THC (5)	1.01	72.93%	2.92	113.64%	0.346
22S-OH-THC (4)	2.05	0.19%	3.62	34.09%	0.566

TGR5, FXR: Units are  $\mu\text{M}$  for EC<sub>50</sub> and % of 10 $\mu\text{M}$  LCA or CDCA value for efficacy, respectively.

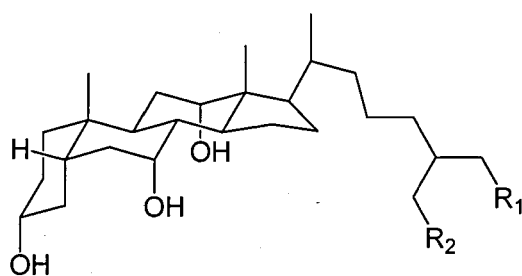
**B**

Compound	TGR5		FXR		TGR5 selectivity index, EC <sub>50</sub> ratio (TGR5/FXR)
	EC <sub>50</sub>	Efficacy	EC <sub>50</sub>	Efficacy	
Bis-Ho-C-OH (15)	0.38	77.93%	2.62	92.22%	0.148
Ho-C-OH (14)	0.56	96.86%	2.86	113.08%	0.195
C-OH (13)	0.99	96.76%	5.79	81.11%	0.171

TGR5, FXR: Units are  $\mu\text{M}$  for EC<sub>50</sub> and % of 10 $\mu\text{M}$  LCA or CDCA value for efficacy, respectively.

**Table.1** TGR5 selectivity of bile alcohols.

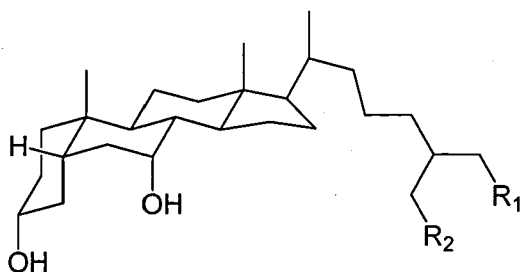
**C**



Compound No.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	TGR5		FXR		TGR5 selectivity index, EC <sub>50</sub> ratio (TGR5/FXR)
			EC <sub>50</sub>	Efficacy	EC <sub>50</sub>	Efficacy	
(22)	-H	-H	3.39	36.05%	4.29	130.8%	0.789
(11)	-OH	-H	1.17	85.85%	4.18	85.96%	0.279
(19)	-OH	-OH	0.58	94.28%	3.99	63.70%	0.146

TGR5, FXR: Units are  $\mu\text{M}$  for EC<sub>50</sub> and % of 10 $\mu\text{M}$  LCA or CDCA value for efficacy, respectively.

**D**



Compound No.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	TGR5		FXR		TGR5 selectivity index, EC <sub>50</sub> ratio (TGR5/FXR)
			EC <sub>50</sub>	Efficacy	EC <sub>50</sub>	Efficacy	
(23)	-H	-H	5.07	43.71%	2.31	53.34%	2.2
(21)	-OH	-H	1.02	84.89%	3.18	126.6%	0.32
(20)	-OH	-OH	0.27	93.97%	3.88	50.3%	0.069

TGR5, FXR: Units are  $\mu\text{M}$  for EC<sub>50</sub> and % of 10 $\mu\text{M}$  LCA or CDCA value for efficacy, respectively.

## 考察及び小括

FXR は胆汁酸のゲノミック作用を媒介する核内受容体であるが、TGR5 は胆汁酸のノンゲノミック作用を媒介する代謝型受容体として近年新しく同定された[59, 60]。

Gタンパク質共役型受容体の一つである TGR5 の mRNA は全身に発現しているが、その発現レベルは組織間で異なる。胆嚢での発現は比較的高く、褐色脂肪組織、肝臓、小腸では比較的低い[61, 66]。また、胆汁酸は TGR5 を介して以下の作用を示す；①免疫系組織における免疫調節作用[59]②肝臓での肝保護作用や胆嚢での胆石形成調節作用[66, 67]③褐色脂肪細胞や筋細胞におけるエネルギー代謝調節作用[61, 68, 69]。著者らは、特に胆汁酸の TGR5 を介したエネルギー代謝調節作用に着目した。

シグナル伝達物質としての胆汁酸が結合するとその構造変化が三量体 G タンパク質に伝わり、G タンパク質を活性化させる。活性化された G タンパク質(Gs) は細胞膜に存在するアデニル酸シクラーゼを活性化し、ATP から cAMP の産生を誘導する。産生された cAMP によりプロテインキナーゼ A (PKA) が活性化され、核内へと移動し、cAMP 応答配列(CRE)結合タンパク質(CREB)をリン酸化する。CREB はリン酸化されると DNA 上に存在する CRE と呼ばれる短い塩基配列に結合し、CREB 結合タンパク質(CBP)を引き寄せる。CREB-CBP 複合体は CRE の下流に存在する遺伝子、type2 iodothyronine deiodinase (D2)の転写を活性化する。D2 はホルモン前駆体であるチロキシン(T4)を活性型甲状腺ホルモンである 3,3',5-トリヨードチロニン(T3)に変換する。産生された T3 はミトコンドリアに作用し、脱共役や酸化的リン酸化を増加させることでエネルギー消費を促進させる(Fig.10)。ここで、TGR5 と D2 はマウスでは褐色脂肪細胞(BAT)に、ヒトにおいては骨格筋に共発現しており、これらの組織には FXR は発現していない。これらのことから、胆汁酸は TGR5 を介して(FXR 非依存的に)抗肥満作用を持つことが示されている[61]。以前、胆汁酸の疎水性と TGR5-リガンド活性、もしくは親和性に正の相関関係が見られ、さらに、胆汁酸の側鎖末端に

存在するカルボニル基が水酸基に還元された化合物に TGR5・リガンド活性が見られたことが報告されている<sup>[62]</sup>。このことから、リガンドが TGR5 に結合し活性化させるためにステロイド側鎖のネガティブチャージは必要ではないことが示された。そこで、著者は中性のポリヒドロキシステロイドである胆汁アルコールに着目した。本研究では、天然に存在する胆汁アルコールやそれらを化学合成により調製した胆汁アルコールの TGR5・リガンド活性を網羅的に評価するとともにレセプター・リガンド構造活性相関について検討した。

まず、THC の側鎖に水酸基が一つ置換された胆汁アルコールについて、それらの TGR5 活性化能を検討した(**Fig.12**)。セルベースのレポーターアッセイを用いた検討結果より、THC(**22**)は TGR5 をあまり活性化しなかったものの、側鎖に水酸基を 1 つ有する 25-OH-THC(**10**)、26-OH-THC(**11**)はポジティブコントロールとして用いた LCA(**2**)に匹敵する TGR5 活性化能を示した。このことから胆汁アルコールの側鎖の酸素原子の存在は TGR5 活性化能を高めることが明らかとなった。また、水酸基の存在する位置により、活性化能に違いがあることも判明した。さらに水酸基の立体配置も活性発現の重要な因子になることが併せて明らかとなった。

次に、胆汁アルコールの側鎖長を短縮させると、TGR5 に対する親和性が減少する傾向にあることが判明した(**Fig.13**)。これは、胆汁酸の側鎖を短縮させた化合物(炭素数 22)には TGR5 活性化能を認めなかった以前の報告と一致しており<sup>[62]</sup>、ステロイド側鎖を構築している炭素鎖が TGR5 活性化能に必要であることが示唆された。

また、ステロイド母核配置が TGR5 活性化能に影響することも明らかとなった。A/B トランス型である 5 $\alpha$ -胆汁アルコールよりも A/B *cis*型である 5 $\beta$ -胆汁アルコールの方が、TGR5 活性化能が高かった(**Fig.14**)。A 環、B 環の立体配置が異なるステロイドホルモンについて、それらの TGR5 活性化能を検討した以前の報告において、ステロイドホルモンは胆汁酸に比して低い TGR5 活性化能を示したが、A/B *cis*型の方が TGR5 に対する親和性が相対的に高いことが示されていたことから A/B 環の立体配置は活性発現の重要な因子になることが明

らかとなった<sup>[62]</sup>。

前述のように、FXR は主に肝臓や小腸においてコレステロール・胆汁酸代謝や腸肝循環の調節、さらには糖質・脂質代謝に関わっている。一方、TGR5 は腸肝循環系組織以外の褐色脂肪細胞や筋細胞において、エネルギー代謝の調節を行なっている。つまり FXR と TGR5 はそれぞれ独立した組織において、非依存的にそれぞれの作用を示していると考えられる。また、*in vivo* における TGR5 の生理機能の解明のためにも TGR5 選択的アゴニストの探索は必要不可欠であると考えられる。そこで、FXR と TGR5 それぞれに対する各化合物の EC<sub>50</sub> の比をとることにより、TGR5/FXR 選択性について検討した。その結果、同じ 23 位に水酸基を持つ 23-OH-THC の異性体間に TGR5/FXR EC<sub>50</sub> 比の著しい差異を認めた (**Table.1A**)。このことから、23S 体には選択性が見られないものの、23R 体は FXR に対し選択性を持つことが示された。また、22-OH-THCs、及び 24-OH-THCs の各異性体間には各レセプターに対する選択性の差は認められず (**Table.1A**)、さらに、側鎖長の異なる胆汁アルコール群についても、それらの TGR5/FXR 選択性は認められなかった (**Table.1B**)。

一方、側鎖の水酸基の数が増えるにつれてより TGR5 選択性が高くなった。側鎖の水酸基の数の影響は CA 母核を持つ胆汁アルコール群よりも CDCA 母核を持つ胆汁アルコール群の方が顕著に認められた (**Table.1C, D**)。これらの変化はそれぞれの受容体のリガンド結合領域、特にステロイド側鎖と作用する部分の構造の違いによるものと示唆された。すなわち、TGR5 の胆汁アルコール側鎖との作用部位は空間的に比較的広く、FXR のそれは比較的狭いものと推定された。また、胆汁アルコールの側鎖と作用する TGR5 のリガンド結合領域は FXR に比べて多くの親水性アミノ酸によって構成されている可能性も考えられた。

以前の報告において、LCA の 7 位にメチル基が置換した化合物により強力な TGR5 アゴニスト活性が認められている<sup>[62]</sup>。これらのことから、より疎水性の高いステロイド母核とより親水性の高い側鎖を併せ持つ化合物が TGR5 選択的アゴニストとなることが示唆された。

## 考察及び総括

先進国において心血管疾患の頻度は着実に増加している。それは動脈硬化の増加とよく相関しており、動脈硬化の基盤には多彩な要因がリスクファクターとして関わっていることが明らかとなっている。コレステロールの蓄積が動脈硬化の危険因子であることは一般に認識されているが、それに高トリグリセリド血症、高血糖、高血圧、肥満が合併すると動脈硬化リスクが相乗的に増加する。これら動脈硬化リスクを改善する次世代の抗動脈硬化治療薬の創製を目指して本研究を計画した。本研究では天然に豊富に存在する胆汁アルコールに着目し、抗高脂血症作用や抗糖尿病作用を媒介する FXR、及び抗肥満作用を媒介する TGR5 といった全く異なる各受容体と各胆汁アルコールとの構造活性相関について検討した。その結果、内因性胆汁酸と同等のアゴニスト活性を有する胆汁アルコールが認められたが、より強力なアゴニストを見出すには至らなかった。しかし、本研究の結果から得られた新たなレセプター-リガンド構造活性相関の知見は、新たな治療薬創製へと繋がっていくものと確信している。また本研究において、各胆汁アルコールの TGR5/FXR 選択性を検討し、TGR5 選択的なアゴニストの探索を試みた。今後は本研究を基に、TGR5 選択的なアゴニストを用いた *in vivo* における TGR5 の系統的な機能解析へと研究を発展させていきたい。



## 引用文献

- [1] 甲斐 真弘 山田 学, 東 英史, 瀬戸口敏明. 胆汁酸の生合成. *The Lipid* 2000;11(3):220-28.
- [2] 中村 公英, 牧野 勲. 胆汁酸の腸肝循環. *The Lipid* 2000;11(3):229-34.
- [3] Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 2001;276(31):28857-65.
- [4] Chen F, Ma L, Dawson PA, Sinal CJ, Sehayek E, Gonzalez FJ, *et al.* Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 2003;278(22):19909-16.
- [5] Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, *et al.* Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem* 1999;274(42):29749-54.
- [6] Landrier JF, Eloranta JJ, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(3):G476-85.
- [7] Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, *et al.* Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 2000;6(3):507-15.
- [8] Brendel C, Schoonjans K, Botrugno OA, Treuter E, Auwerx J. The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 2002;16(9):2065-76.
- [9] Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, *et al.* Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 1995;81(5):687-93.
- [10] Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, *et al.* Identification of

a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999;284(5418):1362-5.

[11] Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, *et al.* Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999;284(5418):1365-8.

[12] Modica S, Moschetta A. Nuclear bile acid receptor FXR as pharmacological target: are we there yet? *FEBS Lett* 2006;580(23):5492-9.

[13] Makishima M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J Pharmacol Sci* 2005;97(2):177-83.

[14] Chiang JY. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev* 2002;23(4):443-63.

[15] Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, *et al.* A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 2000;6(3):517-26.

[16] del Castillo-Olivares A, Gil G. Role of FXR and FTF in bile acid-mediated suppression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase transcription. *Nucleic Acids Res* 2000;28(18):3587-93.

[17] Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, *et al.* Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 2002;277(4):2908-15.

[18] Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, *et al.* The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 2001;121(1):140-7.

[19] Neimark E, Chen F, Li X, Shneider BL. Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* 2004;40(1):149-56.

[20] Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, *et al.* Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2005;2(4):217-25.

[21] Bell GD, Lewis B, Petrie A, Dowling RH. Serum lipids in cholelithiasis: effect of

chenodeoxycholic acid therapy. *Br Med J* 1973;3(5879):520-3.

[22] Bateson MC, Maclean D, Evans JR, Bouchier IA. Chenodeoxycholic acid therapy for hypertriglyceridaemia in men. *Br J Clin Pharmacol* 1978;5(3):249-54.

[23] Angelin B, Einarsson K, Hellstrom K, Leijd B. Effects of cholestyramine and chenodeoxycholic acid on the metabolism of endogenous triglyceride in hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res* 1978;19(8):1017-24.

[24] Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, *et al.* Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 2004;113(10):1408-18.

[25] Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, *et al.* The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem* 2006;281(16):11039-49.

[26] Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, *et al.* Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(4):1006-11.

[27] Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, *et al.* Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* 2005;146(3):984-91.

[28] De Fabiani E, Mitro N, Gilardi F, Caruso D, Galli G, Crestani M. Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle. *J Biol Chem* 2003;278(40):39124-32.

[29] Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, *et al.* Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem* 2004;279(22):23158-65.

[30] Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006;116(4):1102-9.

[31] Fujino T, Une M, Imanaka T, Inoue K, Nishimaki-Mogami T. Structure-activity

relationship of bile acids and bile acid analogs in regard to FXR activation. *J Lipid Res* 2004;45(1):132-8.

[32] Nishimaki-Mogami T, Une M, Fujino T, Sato Y, Tamehiro N, Kawahara Y, *et al.* Identification of intermediates in the bile acid synthetic pathway as ligands for the farnesoid X receptor. *J Lipid Res* 2004;45(8):1538-45.

[33] Nishimaki-Mogami T, Kawahara Y, Tamehiro N, Yoshida T, Inoue K, Ohno Y, *et al.* 5Alpha-bile alcohols function as farnesoid X receptor antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339(1):386-91.

[34] Hoshita T, Sasaki T, Tanaka Y, Betsuki S, Kazuno T. Stero-bile acids and bile sterols. LXXIV. Biosynthesis of bile acids and bile alcohols in toad. *J Biochem* 1965;57(6):751-7.

[35] Une M, Matsumoto N, Kihira K, Yasuhara M, Kuramoto T, Hoshita T. Bile salts of frogs: a new higher bile acid, 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha, 26-tetrahydroxy-5 beta-cholestanoic acid from the bile *Rana plancyi*. *J Lipid Res* 1980;21(3):269-76.

[36] Hoshita T, Sasaki T, Kazuno T. Isolation of a bile alcohol, 5alpha-cholestane-3alpha,7alpha,12alpha,26-tetrol from carp bile. *Steroids* 1965;5:241-7.

[37] Kuramoto T, Kikuchi H, Sanemori H, Hoshita T. Bile salts of anura. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1973;21(5):952-9.

[38] Dayal B, Tint GS, Batta AK, Shefer S, Salen G. Synthesis of biological precursors of cholic acid II. *Steroids* 1981;37(2):205-11.

[39] Kuramoto T, Matsumoto N, Hoshita T. Syntheses of 22- and 23-hydroxylated bile alcohols. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1978;26:2788-92.

[40] Masui T, Staple E. The separation of the stereo-isomers of bile sterols, 5-beta-cholestane-3-alpha, 7-alpha, 12-alpha, 24-alpha-tetrol and 5-beta-cholestane-3-alpha, 7-alpha, 12-alpha, 24-beta-tetrol, by thin layer chromatography. *Steroids* 1967;9(4):443-50.

[41] Dayal B, Batta AK, Shefer S, Tint GS, Salen G. Synthesis of biological precursors of cholic acid. *Steroids* 1978;32(3):337-44.

[42] Dayal B, Shefer S, Tint GS, Salen G, Mosbach EH. Synthesis of

5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,25-tetrol and 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,24 $\xi$ ,25-pentol. *J Lipid Res* 1976;17:74-7.

[43] Kihira K, Mikami T, Ikawa S, Okamoto A, Yoshii M, Miki S, *et al.* Synthesis of sulfonate analogs of bile acids. *Steroids* 1992;57(4):193-8.

[44] Kuramoto T, Kihira K, Matsumoto N, Hoshita T. Determination of the sulfated position in 5 $\beta$ -bufol sulfate by a carbon-13 nuclear magnetic resonance study. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1981;29:1136-39.

[45] Kazuno T, Masui T, Hoshita T. Stero-bile acids and bile sterols. 36. Isolation of a new bile sterol, 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha, 26-tetrahydroxy-delta23-bishomocholene, from bull frog bile. *J Biochem* 1961;50:12-9.

[46] Une M, Shinonaga Y, Matoba N, Kuroki S, Kihira K, Hoshita T. Identification of new bile alcohols, 5 beta-cholestane-3 alpha,7 alpha,24,26-tetrol, 5 beta-cholestane-3 alpha,7 alpha,25,26-tetrol, and 5 beta-cholestane-3 alpha,7 alpha,26,27-tetrol in human gallbladder bile. *J Lipid Res* 1986;27(12):1318-23.

[47] Une M, Kihira K, Kuramoto T, Hoshita T. Two new bile alcohols, 3-epimyxinol and 3-epi-16-deoxymyxinol from the hagfish, *Heptatretus burgeri*. *Tetrahedron Lett* 1978:2527-30.

[48] Dayal B, Batta AK, Shefer S, Tint GS, Salen G, Mosbach EH. Preparation of 24(R)- and 24(S)-5beta-cholestane-3alpha,7alpha,24-triols and 25(R)- and 25(S)-5beta-cholestane-3alpha,7alpha,26-triols by a hydroboration procedure. *J Lipid Res* 1978;19(2):191-6.

[49] Ishihara T. Uber den systematischen abbau der chenodesoxycholsaure. *J Biochem* 1937;27:265-77.

[50] Schteingart CD, Hofmann AF. Synthesis of 24-nor-5 beta-cholan-23-oic acid derivatives: a convenient and efficient one-carbon degradation of the side chain of natural bile acids. *J Lipid Res* 1988;29(10):1387-95.

[51] Cohen BI, Tint GS, Kuramoto T, Mosbach EH. New bile alcohols--synthesis of 5beta-cholestane-3alpha, 7alpha, 25-triol and 5beta-cholestane-3alpha, 7alpha, 25-24

- (14C)-triol. *Steroids* 1975;25(3):365-78.
- [52] Hoshita T, Kazuno T. Chemistry and metabolism of bile alcohols and higher bile acids. *Adv Lipid Res* 1968;6:207-54.
- [53] Karlaganis G, Sjovall J. Formation and metabolism of bile alcohols in man. *Hepatology* 1984;4(5):966-73.
- [54] Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, *et al.* 6 $\alpha$ -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem* 2002;45(17):3569-72.
- [55] Pellicciari R, Costantino G, Camaioni E, Sadeghpour BM, Entrena A, Willson TM, *et al.* Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid X receptor. Synthesis, evaluation, and structure-activity relationship of a series of body and side chain modified analogues of chenodeoxycholic acid. *J Med Chem* 2004;47(18):4559-69.
- [56] Mi LZ, Devarakonda S, Harp JM, Han Q, Pellicciari R, Willson TM, *et al.* Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Mol Cell* 2003;11(4):1093-100.
- [57] Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB, Kast-Woelbern HR, *et al.* A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell* 2003;11(4):1079-92.
- [58] Everson GT. Steady-state kinetics of serum bile acids in healthy human subjects: single and dual isotope techniques using stable isotopes and mass spectrometry. *J Lipid Res* 1987;28(3):238-52.
- [59] Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, *et al.* A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003;278(11):9435-40.
- [60] Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, *et al.* Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298(5):714-9.
- [61] Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, *et al.* Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation.

Nature 2006;439(7075):484-9.

[62] Sato H, Macchiarulo A, Thomas C, Gioiello A, Une M, Hofmann AF, *et al.* Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem* 2008;51(6):1831-41.

[63] Bergstrom S, L. Krabisch. Preparation of some hydroxycoprostanes: 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ - and 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxycoprostanes. *Acta Chem. Scand. A.* 1957;11:1067.

[64] Hoshita T, Hirofuji S, Nakagawa T, Kazuno T. Studies on the bile salts of the newt and synthesis of 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,25,26-pentol (5 $\alpha$ -bufol). *J Biochem* 1967;62:62-6.

[65] Hoshita T, Shefer S, Mosbach EH. Conversion of 7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxycholest-4-en-3-one to 5 $\alpha$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol by iguana liver microsomes. *J Lipid Res* 1968;9(2):237-43.

[66] Vassileva G, Golovko A, Markowitz L, Abbondanzo SJ, Zeng M, Yang S, *et al.* Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation. *Biochem J* 2006;398(3):423-30.

[67] Keitel V, Reinehr R, Gatsios P, Rupprecht C, Gorg B, Selbach O, *et al.* The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 2007;45(3):695-704.

[68] Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329(1):386-90.

[69] Maruyama T, Tanaka K, Suzuki J, Miyoshi H, Harada N, Nakamura T, *et al.* Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice. *J Endocrinol* 2006;191(1):197-205.

## 学位申請の基礎となる原著

### I

Structure activity relationship of bile alcohols as farnesoid X receptor agonist.

Yusuke Iguchi, Kenji Kihira, Tomoko Nishimaki-Mogami and Mizuho Une  
*Steroids* in submission

### II

Bile alcohols function as G protein-coupled receptor TGR5 agonist.

Yusuke Iguchi, Kenji Kihira Tomoko Nishimaki-Mogami and Mizuho Une  
*J. Lipid Res.* in preparation



## 謝辞

本研究の修了に臨み、広島大学大学院医歯薬学総合研究科 木平健治教授に心から御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、直接御指導並びに御助言をいただきました広島国際大学薬学部薬学科 宇根瑞穂教授に深く感謝いたします。

本研究に際し、快く細胞を御提供くださいました広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態制御内科学研究室 茶山一彰教授、広島国際大学薬学部薬学科 山口雅史准教授、富山大学大学院医学薬学研究部分子細胞機能学研究室 今中常雄教授に感謝いたします。

本研究の審査をしていただきました広島大学大学院医歯薬学総合研究科 樋木修教授、仲田義啓教授、永井純也准教授、木村康浩准教授に感謝いたします。

本研究に際し、御助言をいただきました国立循環器病センター研究所 佐藤寛之博士に感謝いたします。

本研究に際し、プラスミドを御提供くださり、御助言をいただきました国立医薬品食品衛生研究所 最上知子先生に感謝いたします。

最後に、本研究に御協力戴き、博士課程をより充実した時間にして下さった広島大学附属病院薬剤部の職員の皆様、諸先輩方、及び広島国際大学薬学部薬学科の先生方に感謝いたします。