

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

# ステロイド新規創製化合物 YK11 の選択的アンドロゲン受容体調節薬としての作用の 追究

分子病態解析学講座 谷津 智史

## 【背景・目的】

アンドロゲン（男性ホルモン）は、性ホルモン作用のみならず、骨や筋肉に対する作用、いわゆるアナボリック作用を有している。最近、加齢に伴うアンドロゲンの体内含量の低下は、サルコペニアを含めた骨格筋の減少を伴う疾患や骨粗しょう症の要因になることが盛んに実証されるようになり、実際に、それら疾患の改善にアンドロゲンの補充療法が有効であると考えられている。しかし、アンドロゲン補充療法は、アンドロゲンの主たる作用である性ホルモン作用により、前立腺肥大や前立腺がんの発症リスクと進展を高める可能性があり、慎重に行われなくてはならない。

アンドロゲンは、核内受容体の1つであるアンドロゲン受容体（AR）のリガンドとなり作用する。ARや女性ホルモン（エストロゲン）の受容体ER（エストロゲン受容体）を含めた核内受容体は、リガンドに結合することにより、細胞質から核に移行し、核内受容体ごとに、遺伝子の転写調節領域の特異的な塩基配列を認識、結合し、特定の転写共役（活性化もしくは抑制）因子をリクルートすることで、標的遺伝子群の転写（mRNA発現）を調節する。発現が調節されたmRNAがタンパク質に翻訳され、それらタンパク質が様々な機能を発揮することでリガンドの作用が示される。

これまでに、同一の核内受容体のリガンドとなって機能を発揮するにもかかわらず、化合物ごとにその機能が微妙に異なる場合があることがわかってきている。例えば、ARのリガンドであるにもかかわらず、性ホルモン作用を発揮せずに骨や筋肉に対するアナボリック作用を発揮することである。言い換えれば、核内受容体のリガンドを作用ごとに分類して、それらを適切な治療に応用することができれば、薬物治療に大きな広がりを与えることになると考えられる。これはまさに、最近提唱されている（機能・作用・組織）選択的核内受容体調節薬（selective nuclear receptor modulators, SNRMs）の概念である。アンドロゲン受容体に関しても、性ホルモン作用を発揮せずに、アナボリック作用を発揮する選択的AR調節薬（selective AR modulator, SARM）の探索や創製が行われることにより、冒頭に示したアンドロゲン補充療法の欠点を取り除いた効果的な男性の加齢に伴う筋疾患や骨粗しょう症の治療が可能になると考えられる。

そこで、所属教室（公衆衛生学教室）では、アナボリック作用を発揮する選択的AR調節薬（selective AR modulator, SARM）を探索することを目指し、薬化学教室が創製した新規ステロイド骨格含有化合物群の中から、まずARのリガンドを探索した。さらに、前立腺がん細胞株に対する増殖誘導能やアンドロゲン応答遺伝子プロモーターに対す

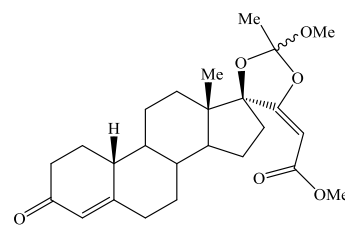


図 1 YK11 の構造式

る活性から男性ホルモン作用が弱いと思われる化合物 YK11 ((17 $\alpha$ ,20 $E$ )-17,20-[(1-methoxyethylidene)bis(oxy)]-3-oxo-19-norpregna-4,20-diene-21-carboxylic acid methyl ester) を見だし (図 1) (参考論文)、さらには YK11 が筋芽細胞株の分化を促進することも見だししている。

本研究では、YK11 が、アンドロゲン補充療法に代わる安全な筋や骨疾患の治療に有用な SARM となり得るかを検証することを目的とし、第一章として、YK11 が骨形成に作用するかを検討すること、第二章では、YK11 が筋分化を促進することについて、筋分化促進因子 Follistatin (Fst) 遺伝子の発現に与える影響を、YK11、内因性活性型男性ホルモン 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT)、および、SARM として研究が進められている Gtx-024 (Gtx、Ostarine) について比較検討することとした。

## 第一章 YK11 の骨芽細胞に対する作用

前述したように、SARM に期待される作用として、骨に対するアナボリック作用がある。アンドロゲンは AR を介して骨芽細胞の増殖および分化を促進することにより、骨密度を正に制御することが知られている。しかしながら YK11 の骨芽細胞に対する影響は検討されていない。そこで、本章では、YK11 のさらなる作用を明らかにするため、YK11 の骨芽細胞の分化に対する影響、およびその機構について、DHT と比較しながら検討することにした。

### 【方法】

マウス前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を、血清中のホルモンを除去するために活性炭処理を施したウシ胎児血清 (csFBS) を 10%含有する培地で 3 日間培養後、10% csFBS、骨分化に伴うカルシウム沈着に必須な 50  $\mu$ g/mL アスコルビン酸および 5 mM  $\beta$ -グリセロールリン酸を含有する培地 (骨分化誘導培地) で 24 時間培養し、YK11 など種々薬剤で処理した。処理 21 日後に骨芽細胞分化における骨形成の指標であるカルシウム沈着をアリザリンレッド法で染色した。また、同様の培養条件下で薬剤を 10 日間処理した後、骨分化マーカーであるアルカリンホスファターゼ (ALP) 活性を *p*-ニトロフェニルリン酸基質法により測定した。total Akt (tAkt)、リン酸化 Akt、tubulin の各タンパク質の発現量については、SDS-サンプルバッファーで溶解した細胞溶解液のタンパク質を SDS-PAGE を用いて分離し、ウエスタンブロット法により評価した。

### 【結果および考察】

カルシウム沈着が、DHT 処理と同程度に YK11 処理で増加した (図 2A) ことから、YK11 は、骨芽細胞の骨分化誘導作用を有していることがわかった。また、骨分化マーカーである ALP 活性を測定したところ、YK11 処理により上昇が認められた。さらに、YK11

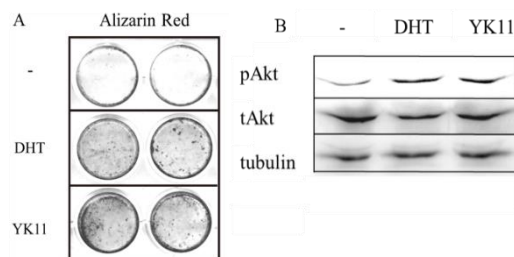


図 2 YK11 による骨形成促進作用

処理による ALP 活性の上昇は、AR アンタゴニストであるヒドロキシフルタミドとの共処理により抑制されたことから、YK11 は AR を介して骨分化を促進することが明らかとなった。アンドロゲンによる骨分化促進作用には、AR と DNA の結合を介した作用に加えて細胞内シグナル伝達のうちの 1 つである PI3/Akt シグナルの活性化が現段階で重要であるとされている。そこで、PI3/Akt シグナルの活性化の指標である Akt のリン酸化に対する YK11 の作用を検討した。その結果、処理 15 分後において YK11 は DHT と同程度に Akt のリン酸化を促進することが明らかとなった (図 2B)。これらのことから、DHT と同様、YK11 の骨芽細胞分化誘導作用に、PI3/Akt シグナルの活性化も重要であることが示唆された。

## 第二章 YK11 による筋分化促進因子 Fst の遺伝子発現誘導機構の解明

これまでに、所属教室では、YK11 がマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞において筋分化促進因子である Fst の遺伝子発現を AR 依存的に誘導することを見いだしている。この AR 依存的な Fst 発現誘導作用は AR の生理リガンドである DHT では認められていないことから、YK11 の筋肉に作用する SARM としての特徴である可能性が考えられる。そこで本研究では、YK11 による AR を介した Fst 遺伝子発現誘導機構を種々のシグナル伝達阻害剤を用いて推定することとした。

### 【方法】

C2C12 細胞を 2%ウマ血清含有培地 (筋分化誘導培地) で 24 時間培養後に種々のシグナル伝達阻害剤と YK11 を共処理し、24 時間後に細胞を回収し RT-real time PCR 法を用いて Fst mRNA の発現量を測定した。

### 【結果】

Fst mRNA 発現量は、DHT もしくは Gtx 処理では増加せず、YK11 処理でのみ増加した。一方で、myosin heavy chain タンパク質の発現量は、いずれのリガンド処理でも同程度に増加した。このことから、YK11 は Fst 遺伝子発現誘導を介して筋分化促進作用をもたらす可能性が示唆された。また、Gtx の筋分化促進作用は、DHT と同様 Fst 遺伝子発現誘導を介さずに行われる可能性も併せて示唆された。AR の活性化による筋分化促進作用には、前述の骨分化促進作用と同様に、AR と DNA の結合を介さないで、種々シグナル伝達経路の活性化によってもたらされる可能性もまた報告されている。そこで YK11 による Fst 遺伝子発現誘導機構を明らかにするために、様々なシグナル伝達経路の阻害剤と

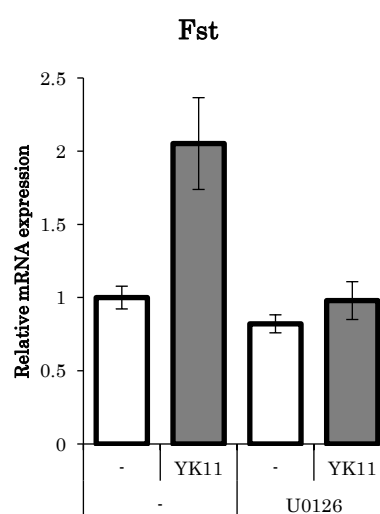


図 3 MEK/ERK シグナル阻害剤 U0126 による Fst 発現誘導抑制

YK11 を共処理し、YK11 の Fst 遺伝子発現誘導作用に与える影響を検討した。その結果、MEK/ERK 阻害剤である U0126 との共処理によって YK11 による Fst 遺伝子発現誘導作用が抑制された (図 3)。このことから、YK11 による Fst 遺伝子発現誘導作用には MEK/ERK シグナルが強く関与していることが明らかとなった。

## 総括

第一章の成果によって、YK11 は、筋分化促進作用のみならず、骨形成促進作用をも併せ持っていることを明らかにすることができた。

さらに、第二章では、YK11 の筋芽細胞における Fst 遺伝子発現誘導作用は、DHT のみならず SARM とされる Gtx でも認められなかったことから、この作用は YK11 の特徴であることが明らかとなった。また、この誘導作用には、MEK/ERK シグナル活性化が強く起因することも併せて示すことができた。

これらの結果は、YK11 が、骨や筋疾患に対するアンドロゲン補充療法に取って代わる有用な SARM であることを示す一助となったが、今後、以下のような検討が必要であると考える。

・ YK11 の (男) 性ホルモン作用：これまで、YK11 は、特定の前立腺がん細胞株に対する増殖誘導能やアンドロゲン応答遺伝子プロモーターに対する活性から男性ホルモン作用が弱いと判断しているが、SARM と位置付けるためには、さらに性ホルモン作用の強弱を詳細に調べる必要がある。

・ YK11 の筋、骨に対する作用：本研究では、YK11 は骨分化作用をもつこと、筋分化作用は、DHT や他の SARM である Gtx と異なり、Fst 遺伝子発現誘導作用を介する可能性を示したが、さらにこれら作用の詳細な意義・機構を明らかにして、SARM としての有用性を追究する必要がある。

これらの研究を通じて、YK11 を含めた様々な SARM が開発され、男性の加齢に伴う筋、骨疾患の治療法が大いに発展することを願う。

## 対象論文

**Yatsu T**, Kusakabe T, Kato K, Inouye Y, Nemoto K, Kanno Y. Selective androgen receptor modulator, YK11, up-regulates osteoblastic proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

## 参考論文

Kanno Y, Hikosaka R, Zhang S, Inoue Y, Nakahama T, Kato K, Yamaguchi A, Tominaga N, Kohra S, Arizono K, Inouye Y. (17 $\alpha$ ,20 $E$ )-17,20-[(1-methoxyethylidene)bis(oxy)]-3-oxo-19-norpregna-4,20-diene-21-carboxylic acid methyl ester (YK11) is a partial agonist of the androgen receptor. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 318–323 (2011).



作用には、MEK/ERK シグナル伝達経路が必須であることが明らかとなった。さらに、そのシグナル上の ERK1/2 タンパク質のリン酸化誘導能は、YK11 のみならず、DHT も Gtx-024 いずれも同程度に有していたが、ERK1/2 タンパク質の核局在性は、YK11 処理でのみ処理後 1 時間でも維持されており、YK11 の Fst 遺伝子発現誘導には、MEK/ERK シグナル伝達経路の活性化と ERK1/2 タンパク質の核局在性持続が重要であることが C2C12 細胞を用いて明らかとなった。ERK1/2 は、核内に移行して種々遺伝子の転写を促進するとされる。その作用と Fst 遺伝子の発現との関わりに興味を持たれる。

本論文では、SARM の候補化合物として、YK11 が骨格筋のみならず骨に対しても有益なアンドロゲンのアナボリック作用を発揮すること、ならびに、筋分化機序に関しては、アンドロゲンや他の SARM 候補化合物である Gtx-024 とは異なった機序が関わることを明らかとした。本研究成果は、YK11 ならびにそれを基盤として開発されるであろう SARM が男性のサルコペニアや骨粗しょう症などアンドロゲンのアナボリック作用が治療標的となる疾患の治療法確立など薬学上大きく貢献するものと考えられ、本研究の業績は高く評価できる。また、本論文の内容は、国際的学術雑誌に学術論文として既に受理されている。

よって本論文は、博士（薬学）の学位論文に相応しいものと判断する。