

平成 22 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790019  
 研究課題名（和文）新規セコステロイド誘導体の合成とその生体機構解明への利用及び、  
 医薬品開発への展開  
 研究課題名（英文）Synthesis of new seco-steroidal compounds, their use for steroidal  
 biological evaluation, and development of new drug candidates  
 研究代表者  
 澤田 大介 (SAWADA DAISUKE)  
 帝京大学・薬学部・講師  
 研究者番号：00338691

研究成果の概要（和文）：本研究テーマではプレビタミン D<sub>3</sub> を安定に単離すべく、有機合成化学により化学修飾を行い新規セコステロイド化合物として 14-エピ-プレビタミン D<sub>3</sub> の安定誘導体を合成した。それらを用いて生物活性評価を行い、骨粗鬆症治療薬の基盤となる誘導体を開発し、また、遺伝子発現を介さない応答を調べる道筋をつけることができた。更に、19 位メチル基の除去により、プレビタミン D 骨格からタキステロール骨格への異性化を見出し、その医薬品としての新たな可能性を示す事ができた。

研究成果の概要（英文）：In this project, I have synthesized and stably isolated the 14-epi-previtamin D<sub>3</sub> analogs as new seco-steroidal compounds by synthetic chemical modification. Using these new analogs, I evaluated their biological properties, and have found a new lead compound for osteoporosis drug. Also, I was able to have preliminary results for the evaluation of their nongenomic action. By the removal of 19-methyl group, I have discovered the isomerization from previtamin D<sub>3</sub> to tachysterol skeleton, which could be a new drug candidate.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：ビタミンD、プレビタミンD、骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンは人体において様々な生理現象を制御しており、B-セコステロイド骨格を有する Vitamin D も血中カルシウム濃度調節機構に関与するなど、種々の生理作

用を持つ事が知られている。Vitamin D は古くからくる病の、近年では骨粗鬆症の治療薬として用いられ、医薬品としても人類に大きな貢献をしてきた。また、Vitamin D は生体内のほぼ全ての組織に存在する特異的な核内受

容体を介してその作用を発現することから様々な生理作用をあらわし、例えば古典的なカルシウム、リンの恒常性維持のみならず、最近では細胞の増殖、分化、免疫系の調節因子としても注目されている。このことは、Vitamin D は多くの疾病に関与していることに他ならず、Vitamin D 誘導体は医薬品のリード化合物となることが期待されている。また、Vitamin D は種々の細胞の増殖、分化誘導に関わる因子であることが報告され、抗ガン剤としても期待されるなど、現在もお Vitamin D 誘導体開発について精力的に研究が行われている。一方、Vitamin D<sub>3</sub>には Previtamin D<sub>3</sub>と呼ばれるトリエン部の[1,7]シグマトロピー転位を介する構造異性体が存在し、この異性化は熱にのみ依存し、通常は Vitamin D<sub>3</sub>に偏っている (20°C で 93:7)。また、Maynardらの報告によれば、14位をエピ化した 14-*epi*-Vitamin D<sub>3</sub>は Previtamin D<sub>3</sub>との熱平衡が Previtamin D<sub>3</sub>側に偏ることが報告されている。そして、興味深いことに Normanらの報告によれば、steroid 性化合物(ルミステロール)の実験から上述の nongenomic action を介した rapid response は Vitamin D<sub>3</sub>構造よりも Previtamin D<sub>3</sub>構造でより強く発現されることが示唆された。申請者は以上より Previtamin D<sub>3</sub>に着目し研究を進めることとした。

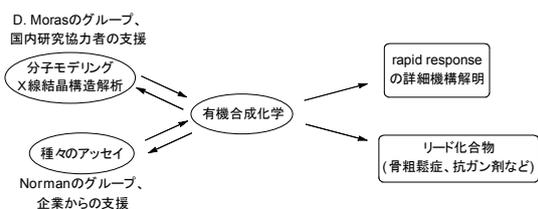
## 2. 研究の目的

本研究において申請者はこれまで低分布、低生物活性とされ詳細な生理活性と構造要因の解明がなされなかった、活性型ビタミン D<sub>3</sub>(1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)の異性体である Previtamin D<sub>3</sub>の A 環部修飾体を種々合成し、それらの生理活性を明らかにすると共に、それら化合物を用いて rapid response の詳細な機構解明に寄与することを目的とする。更に、構造活性相関研究により天然 Vitamin D の持つ多彩な作用に強弱をつけることを計り、骨粗鬆症治療薬などのリード化合物探索を目的とする。

## 3. 研究の方法

A 環修飾セコステロイド誘導体の効率的な合成法を確立し、2,4位置換を中心に立体化学と官能基の適性を探る種々のアナログ合成を行う。合成した化合物は順次、生物活性試験を行いそれらの構造活性相関研究から化合物デザインに利用し、rapid response の詳細機構解明のツールとする。そして、合成化合物と VDR との複合体の X 線結晶構造解析を行い、生物活性とホロ型 VDR のヘリックス 12 の位置との相関を調べる(IGBMC, CNRS, D. Moras 教授との共同研究)。また、A. W. Norman 教授 (Univ. of California, Riverside) との共同研究により、NB4-cell 以外の nongenomic action を評価するアッセイ系への展開を計り、rapid response の詳細機構解

明のための chemical biology を発展させる (Univ. of California, Riverside, A. W. Norman 教授との共同研究)。治療薬開発に向けては VDR との親和性だけでなく、化合物と血中 DBP との親和性に着目し、分子モデリングによる 2002 年に報告された血中 DBP の X 線結晶構造との重ね合わせを検討し、誘導化デザインへの支援を行う。また、代謝研究は CYP24A1, CYP7A1, CYP27B1 を用いて解析する(富山大学工学部、榊利之教授との共同研究)。



## 4. 研究成果

本研究テーマではプレビタミン D<sub>3</sub>を安定に単離すべく、有機合成化学により化学修飾を検討し、新規セコステロイド誘導体として 14-エピ-プレビタミン D<sub>3</sub>の安定誘導体を単離した。すなわち、D-グルコースや D-酒石酸をキラルテンプレートとして、A 環 2 位の化学修飾 ( $\alpha$ 方向と  $\beta$ 方向)、4 位の化学修飾 ( $\alpha$ 方向と  $\beta$ 方向)をプレビタミン D<sub>3</sub>に施すことに成功した。さらに、合成した新規セコステロイド誘導体を未修飾の 14-エピ-プレビタミン D<sub>3</sub>と生物活性面で比較した。活性型ビタミン D<sub>3</sub>のもつ、VDR を介する強力な genomic action はプレビタミン D<sub>3</sub>には期待できないはずであるが、2-メチル体には VDR 結合親和性や、骨芽細胞で産生される骨基質

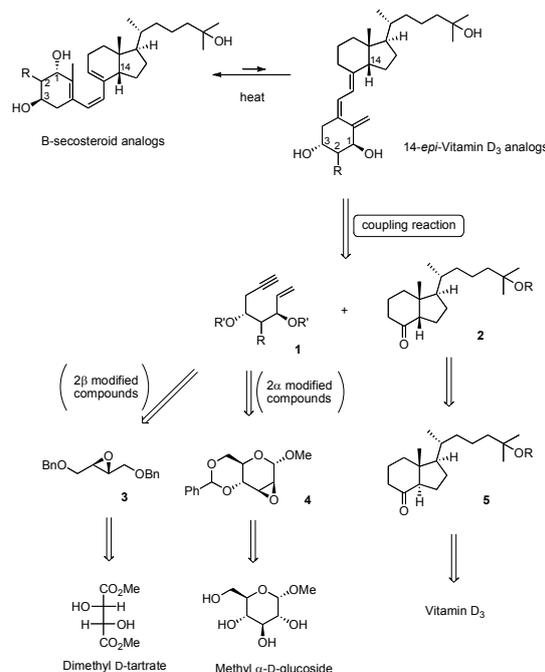


図1: B-セコステロイド誘導体の合成

タンパク質のオステオカルシン転写活性が

認められ、また 2-フェニル体には VDR 結合親和性がほとんどないにもかかわらず、高いオステオカルシン転写活性を見出した。これらの誘導体に生体内半減期の改善や VDR との特異な結合様式を示唆する結果を得た。超高齢化社会で重要な骨粗鬆症治療薬の基盤となる新しいセコステロイド骨格につながるものと考えられる。また、本研究で得られた安定な誘導体を使うことにより、プレビタミン D<sub>3</sub> に期待される nongenomic action を調べる道筋をつけることができた。(図 1)

ここで、上記の平衡によって微量に含まれるビタミン D 骨格をもつ化合物による生物活性への寄与を除くため、本研究では次に 19 位のメチル基を除去し、[1,7]シグマトロピー転位が成立しない 14-epi-19-norprevitamin D<sub>3</sub> 誘導体の合成、活性評価を行うこととした。A 環合成の出発物質として(-)-キナ酸を用い、

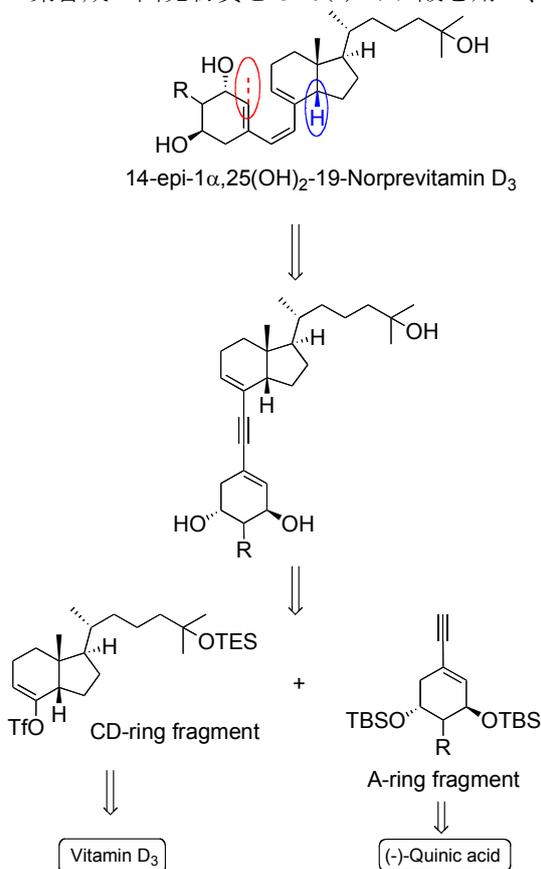
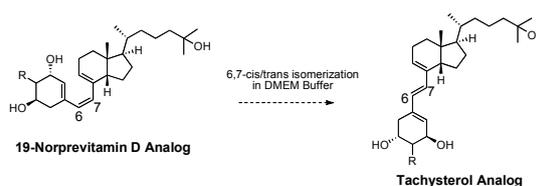


図2

ビタミン D<sub>3</sub> から得られる 14-epi-CD 環前駆体を用いてカップリング反応を行った。また、2 位メチル置換体については、A 環 2 位にエキソメチレンを導入し、同様にカップリングすることにより合成した。(図 2)

これらの生物活性を調べたところ、ビタミン D 受容体 (VDR) 結合親和性は低いにも関わらず、高いオステオカルシン転写活性が見られた。これを精査したところ、測定条件下で

化合物の異性化が観察された。すなわち、6,7-*cis* 結合 (previtamin D 骨格) が 6,7-*trans* 結合 (tachysterol 骨格) へと異性化していることが示唆された。そこで、異性化後の化合物と考えられる、14-epi-19-nortachysterol 誘導体の化学合成を行ったところ、上記の異性化後の化合物と一致し、VDR 結合親和性、およびオステオカルシン転写活性について共に高い活性が認められた。これらの誘導体は tachysterol 骨格の医薬品としての新たな可能性を示すとともに、超高齢化社会で重要な骨粗鬆症治療薬の基盤となる新しいセコステロイド骨格につながるものと考えられる。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Daisuke Sawada, Yuya Tsukuda, Hiroshi Saito, Ken-ichiro Takagi, Eiji Ochiai, Seiichi Ishizuka, Kazuya Takenouchi, and Atsushi Kittaka, Synthesis of 2 $\beta$ -substituted-14-epi-previtamin D<sub>3</sub> and testing of its genomic activity, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2010**, in press. (査読有)
- ② Daisuke Sawada, Yuya Tsukuda, Hiroshi Saito, Ken-ichiro Takagi, Kyouhei Horie, Eiji Ochiai, Kazuya Takenouchi, and Atsushi Kittaka, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Substituted Vitamin D and 14-Epi-Previtamin D Analogs, *Chem. Pharm. Bull.*, **2009**, *57*, 1431-1433. (査読有)
- ③ Colin A. Lowery, Nicholas Salzedana, Daisuke Sawada, Kim D. Janda, A Therapeutic Window for the Chemical Modulation of Quorum Sensing, *J. Med. Chem.*, **2010**, in press. (査読有)
- ④ Colin A. Lowery, Takumi Abe, Junguk Park, Lisa M. Eubanks, Daisuke Sawada, Gunnar F. Kaufmann, Kim D. Janda, Revisiting AI-2 quorum sensing inhibitors: a direct comparison of alkyl-DPD analogs and a natural product fimbrolide, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 15584-15585. (査読有)

- ⑤ Daisuke Sawada, Tomoyuki Katayama, Yuya Tsukuda, Nozomi Saito, Masashi Takano, Hiroshi Saito, Ken-ichiro Takagi, Eiji Ochiai, Seiichi Ishizuka, Kazuya Takenouchi, Atsushi Kittaka, Synthesis of 2 $\alpha$ -substituted-14-*epi*-previtamin D<sub>3</sub> and its genomic activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 5397-5400. (査読有)
- ⑥ Atsushi Kittaka, Hideki Hara, Masashi Takano, Daisuke Sawada, Midori A. Arai, Kenichiro Takagi, Takayuki Chida, Yoshifumi Harada, Hiroshi Saito, Kazuya Takenouchi, Seiichi Ishizuka, Keiko Hayashi, Shinichi Ikushiro, Toshiyuki Sakaki, Takayuki Sugiura, and Tai C. Chen, Synthesis and Biological Activities of 14-*epi*-MART-10 and 14-*epi*-MART-11: Implications for Cancer and Osteoporosis Treatment, *Anticancer Res.*, **2009**, *29*, 3563-3569. (査読有)
- ⑦ 新藤香菜子、高野真史、齋藤 望、澤田 大介、橋高敦史、角田真二、齋藤 博、高木健一郎、上村みどり、石塚誠一、竹之内一弥、新規 15 位置換活性型ビタミン D<sub>3</sub> の合成とビタミン D 受容体との相互作用および生物活性、*ビタミン* **2009**, *83* (10) 593. (査読無)
- ⑧ 高野真史、澤田大介、杉浦隆之、橋高敦史、角田真二、高木健一郎、上村みどり、石塚誠一、竹之内一弥、林 恵子、生城真一、榊 利之、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の 2 $\alpha$ 位の構造修飾と VDR リガンド結合領域に存在する水分子 (water channel) との相互作用と生物活性、*ビタミン* **2009**, *83* (5・6) 328-329. (査読無)
- ⑨ 高野真史、澤田大介、林 恵子、生城真一、榊 利之、角田真二、高木健一郎、堀江恭平、上村みどり、竹之内一弥、杉浦隆之、野尻久雄、橋高敦史、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体における核内受容体 Water Channel の維持と生物活性、*ビタミン*, **2009**, *83*, 206. (査読無)
- ⑩ Atsushi Kittaka, Daisuke Sawada, Masashi Takano, Nozomi Saito, Tomoyuki Katayama, Kanako Shindo, Yuya Tsukuda, Shinobu Honzawa, Midori A. Arai, Hiroshi Saito, Ken-ichiro Takagi, Kazuya Takenouchi, Seiichi Ishizuka, Toshiyuki Sakaki and Tai C. Chen, Vitamin D Hormone: Structural Refinement of the Seco-Steroidal Skeleton and the Nuclear Receptor Mediated Biological Activity, *Anticancer Res.*, **2008**, *28*, 1611-1612. (査読無)
- ⑪ 高野真史、澤田大介、林 恵子、生城真一、榊 利之、高木健一郎、石塚誠一、杉浦隆之、橋高敦史、2 $\alpha$ -(2-hydroxypropoxy)-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> の合成と生物活性評価、*ビタミン*, **2008**, *82*, 272. (査読無)
- ⑫ 佃勇也、澤田大介、高木健一郎、石塚誠一、橋高敦史、14-エピプレビタミン D<sub>3</sub> への 4 位置換基の導入、*ビタミン*, **2008**, *82*, 272. (査読無)
- [学会発表] (計 23 件)
- ① 澤田大介、他 8 名、14-エピ-19-ノルタキステロール誘導体の合成と活性評価、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28-30 日、岡山
- ② 熊谷剛、他 5 名内、澤田大介含む、新規 16-エン-1,15,25-トリヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> の合成研究、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28-30 日、岡山
- ③ 松尾実紀、他 12 名内、澤田大介含む、新規 2 $\alpha$ -[2-(テトラゾール-1-イル)エチル]活性型ビタミン D<sub>3</sub> の合成、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28-30 日、岡山
- ④ 熊谷剛、他 11 名内、澤田大介含む、ビタミン D 受容体に対する新規 15 位置換活性型ビタミン D<sub>3</sub> の影響、第 18 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2009 年 11 月 25-27 日、東京
- ⑤ 澤田大介、他 10 名、14 位エピ化による 19-norprevitamin D<sub>3</sub> から tachysterol 類縁体への展開：その合成と生物活性、第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム、2009 年 11 月 16-17 日、金沢
- ⑥ 松尾実紀、他 12 名内、澤田大介含む、2 $\alpha$ 側鎖上に複素環を有する活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の合成と生物活性、第 39 会複素環化学討論会、2009 年 10 月 14-16 日、柏
- ⑦ Kanako Shindo、他 11 名内、Daisuke Sawada 含む、Novel C15-Substituted Active Vitamin D<sub>3</sub> Analogs: Design, Synthesis and Biological Activity、14th Vitamin D Workshop、2009 年 10 月 4-8 日、Brugge、ベルギー
- ⑧ Daisuke Sawada、他 11 名、Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of New 14-Epi-Previtamin D<sub>3</sub> and Its 19-Nor-Analogs with 2-Modification、14th Vitamin D Workshop、2009 年 10 月 4-8 日、Brugge、ベルギー
- ⑨ 新藤香菜子、他 11 名内、澤田大介含む、新規 15 位置換活性型ビタミン D<sub>3</sub> の合成とビタミン D 受容体との相互作用お

- よび生物活性、第 324 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、2009 年 7 月 10 日、神戸
- ⑩ 高野真史、他 1 2 名内、澤田大介含む、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体における核内受容体 Water Channel の維持と生物活性、日本ビタミン学会第 61 回大会、2009 年 5 月 30-31 日、京都
- ⑪ 澤田大介、他 7 名、新規 19-nor-Previtamin D<sub>3</sub> 誘導体の合成、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、京都
- ⑫ 橘高敦史、他 6 名内、澤田大介含む、4 位に置換基を導入した 14-エピ-プレビタミン D<sub>3</sub> の合成と生物活性評価、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、京都
- ⑬ 長谷川麻美、他 8 名内、澤田大介含む、2 位側鎖上に複素環を有する活性型ビタミン D<sub>3</sub> の合成、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、京都
- ⑭ 高野真史、他 1 2 名内、澤田大介含む、核内受容体 Water Channel を維持する 2 $\alpha$ 置換活性型ビタミン D<sub>3</sub>、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、京都
- ⑮ 澤田大介、他 7 名、14-*epi*-Previtamin D<sub>3</sub> 誘導体の合成と Genomic 作用、第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2008 年 11 月 26-28 日、大阪
- ⑯ 高野真史、他 1 1 名内、澤田大介含む、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の 2 $\alpha$ 置換と核内受容体 Water Channel、第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム、2008 年 11 月 4-5 日、京都
- ⑰ 橘高敦史、他 1 2 名内、澤田大介含む、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の 2 $\alpha$ 位の構造修飾と VDR リガンド結合領域に存在する水分子 (water channel) との相互作用と生物活性、第 321 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、2008 年 9 月 26 日、東京農業大学
- ⑱ Masashi Takano、他 1 0 名内、Daisuke Sawada 含む、New Vitamin D<sub>3</sub> Analogs: 2 $\alpha$ -(2,3-Dihydroxypropoxy)- and 2 $\alpha$ -(2-Hydroxypropoxy)-Active Vitamin D<sub>3</sub> with Highly Potent VDR Agonism、第 236 回アメリカ化学会、2008 年 8 月 17-21 日、フィラデルフィア、米国
- ⑲ Daisuke Sawada、他 1 0 名、Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2-Substituted 14-*epi*-Previtamin D<sub>3</sub> Analogs、第 236 回アメリカ化学会、2008 年 8 月 17-21 日、フィラデルフィア、米国
- ⑳ 高野真史、他 8 名内、澤田大介含む、2 $\alpha$ -(2-hydroxypropoxy)-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> の合成と生物活性評価、日本ビタミン学会第 60 回大会、2008 年 6 月 13-14 日、仙台
- 21 佃 勇也、他 4 名内、澤田大介含む、14-エピプレビタミン D<sub>3</sub> への 4 位置換基の導入、日本ビタミン学会第 60 回大会、2008 年 6 月 13-14 日、仙台
- 22 澤田大介、他 9 名、2 位置換 14-エピプレビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の合成と活性評価、日本ビタミン学会第 60 回大会、2008 年 6 月 13-14 日、仙台
- 23 Atsushi Kittaka、他 1 4 名内、Daisuke Sawada 含む、Vitamin D hormone: structural refinement of the seco-steroidal skeleton and the nuclear receptor mediated biological activity、3rd Symposium Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy、2008 年 5 月 17-18 日、Krefeld, Germany

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤田 大介 (SAWADA DAISUKE)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：00338691