

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860011

研究課題名(和文) 生体内で活性を維持する作用部位選択的新規VDRリガンドの創製

研究課題名(英文) Syntheses of novel ligands that maintain these unique biological activities in vivo

研究代表者

高野 真史 (TAKANO, MASASHI)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：50386611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2位にヒドロキシプロポキシ基を有する活性型ビタミンD₃(O₂C₃)のCYP24A1による主代謝産物である1,2,25-トリヒドロキシビタミンD₃の合成を達成した。また収束的な合成法により、C2位のプロピル置換基にテトラゾール環をもつ、いくつかの新しい19-ノル型ビタミンD誘導体の合成を達成した。本合成で確立した合成ルートは種々の誘導体合成に適用可能な汎用性の高いルートであり、合成効率が高く、今後の新しい誘導体合成につなげることが可能である。得られた誘導体は、それぞれVDR結合親和性や骨芽細胞へのオステオカルシン転写活性等の各種生物活性評価、CYP24A1による代謝実験を行った。

研究成果の概要(英文)：The synthesis of 1,2,25-trihydroxyvitamin D₃, which is the major metabolite of 2⁻-(3-hydroxypropoxy)-1,25-dihydroxyvitamin D₃ (O₂C₃) by CYP3A4, has been achieved. Convergent syntheses of several novel 19-norvitamin D analogs with a tetrazole ring at the C2 position possessing the propyl linker have been achieved. These syntheses are characterized as useful syntheses with the high efficiency and yield, so that other ligands would be synthesized in these synthetic ways. Binding affinity for vitamin D receptor (VDR) of these ligands, transactivation activity of osteocalcin promoter in HOS cells, and metabolism by CYP24A1 have been also studied.

研究分野：有機合成化学

キーワード：ビタミンD 合成化学 生理活性 有機化学 薬学

1. 研究開始当初の背景

活性型ビタミン D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃) はビタミン D 受容体 (VDR) のリガンドとして標的遺伝子の発現制御を司り、骨形成、細胞増殖と分化誘導、免疫調節といった生命現象に深くかかわる。これまでに 3000 余りのビタミン D アナログが報告されているが、それらは 17 位側鎖の構造修飾体を中心である。我々は骨粗鬆症、乾癬、および大腸がん、乳がん、前立腺がんなどのビタミン D とかわり深いがん疾患、神経系疾患ではアルツハイマーなどの治療への適用を視野に入れ、ビタミン D 誘導体の特長ある合成研究を行ってきた。その中で我々は、A 環の構造修飾によって、薬動学的性質、有効性、安全性に優れたビタミン D 誘導体の開発が可能であることを発見し、A 環 2 位修飾体を系統的に合成、生物活性評価を行い、いくつかの効果的な活性向上モチーフを見出してきた。また VDR-[1 α ,25(OH)₂D₃]複合体の X 線共結晶構造解析によるとリガンド結合領域 (LBD) には結合したリガンドの A 環 2 位近傍に水分子が複数存在し、リガンド及び VDR の親水性アミノ酸残基とそれら水分子は、タンパク質表面まで続く water channel とよばれる水素結合ネットワークを構築し、リガンドタンパク質複合体の安定化に寄与していることがわかってきた。我々は合成した 2 α 修飾リガンドとヒト VDR との X 線共結晶構造解析を行い、リガンドの構造修飾と結合親和性向上との関係をそれらの水分子との相互作用を含む結晶解析に基づいて合理的に説明した。

核内受容体の領域における構造分子生物学の著しい進歩により VDR についても作用メカニズムの解明が急速に発展し、リガンドが結合することにより起こる VDR の構造変化が、VDR と種々の転写共役因子との相互作用に重要な役割を果たすことが明らかになっている。X 線共結晶構造解析によると、リガンドの結合は VDR の特に C 末端のヘリックス 12 のコンフォメーションを特異的に変化させる。すなわち、リガンドが結合していない状態では、主にヘリックス 12 が伸びた転写不活性型のコンフォメーションをとっており、この形に転写抑制因子が結合していると考えられているが、リガンドが結合すると、ヘリックス 12 はリガンド結合領域 (LBD) の本体に折畳まれ、リガンド結合ポケット (LBP) に蓋をした転写活性型コンフォメーションとなる。つまり、リガンドは転写の分子スイッチの役割を果たし、ヘリックス 12 の位置変化により活性が発現する。ところで、核内受容体に対する人工リガンドでは、「モジュレーター」と呼ばれるものが見出されている。これらは天然リガンド (フルアゴニスト) とは若干異なる作用を示す。VDR と同じく核内受容体であるエストロゲン受容体 (ER) の領域では、ラロキシフェンが選択的 ER モジュレーター (SERM) として見出され、骨粗鬆症治療薬として認可されている。X 線解析によ

れば、ラロキシフェンはリガンド結合後の ER の活性コンフォメーションにおけるヘリックス 12 の位置が天然リガンドと若干異なり、転写共役因子との相互作用 (種類や作用強度) に変化が起るため、結果として骨形成作用強化に成功している。そこで、VDR においてもリガンドの構造修飾によりヘリックス 12 の位置変化を起こすことができれば「モジュレーター」機能獲得が可能と考え、15 位置換誘導体の合成を検討してきた。すなわち、まずヘリックス 12 と相互作用のあるヘリックス 3 を 15 位に導入した置換基により立体障害で動かし、それによりヘリックス 12 の位置変化をもたらすことを計画した。これまでに、15 α -ヒドロキシ体、15 α -メトキシ体、15 α -ヒドロキシプロピル体およびそれらの 16-ene 型の合成に成功し、15 α -メトキシ体についてヒト VDR との X 線共結晶構造解析を行ったところ、15 α -メトキシ基は Ser275 との引力を保ちつつ、Trp286、Leu313、Gln317 の三つの周辺のアミノ酸残基により CD 環から 17 位側鎖にかけて炭素原子が側鎖方向に押し上げられているが、25 位水酸基は 1 α ,25(OH)₂D₃ と同じ位置で His305 と His397 と相互作用していることがわかった。

2. 研究の目的

これまでに多彩な生理作用を有するビタミン D の系統的な誘導体合成を行い、生物活性向上に効果的な構造修飾モチーフを見出してきた。これらの知見を医薬品開発に活かすためには、より生体内に近い環境における構造修飾の評価が必要である。そこで本研究課題では、特に合成リガンドの各酵素による代謝研究により解明された代謝過程、予測される血液中での安定性、各臓器での挙動に基づくリガンドの設計、合成を行い、生体内で望まれる活性発現する合成リガンドを見出すことを目的とする。また修飾部位として、受容体との X 線共結晶構造解析により、生理作用選択性を獲得する鍵となることが期待される、セコステロイド骨格ではほとんど報告例のない 15 位置換体の合成等、CD 環の化学修飾についても引き続き検討し、理想的活性プロファイルを有する化合物を創製し、初の VDR モジュレーター獲得を目的とする。

3. 研究の方法

誘導体合成は A 環前駆体と CD 環前駆体を別途合成し、それらを結合し収束的に行った。本法は、それぞれ修飾した前駆体の組合せにより、相乗的に誘導体合成が可能であり、ある一つの修飾のみならず同時修飾の効果も評価でき、本研究においては特に有効である。合成では合成効率についても探求し、立体選択性、収率などにおける反応条件の最適化を行い、種々の誘導体合成に適用可能な汎用性の高いルートの確立を目指した。

合成した各種 A 環前駆体と CD 環前駆体を組合せ、修飾のハイブリッド効果について検

討を行った。ハイブリッド化については、これまで報告されているビタミンD誘導体において、最も高活性なA環前駆体とCD環前駆体が最良の組合せとは限らないことを見出し、目的の活性プロファイルに対し最も理想的な組合せを得るために、可能な組合せについて、誘導体の網羅的な合成に着手した。

得られた誘導体についてはHPLC精製後、天然活性型ビタミンD₃に対する優位性を明らかにするために、VDR結合親和性や骨芽細胞へのオステオカルシン転写活性、前立腺細胞の分化誘導活性等の各種生物活性評価を行った。またVDR-リガンド複合体のX線共結晶構造解析を行うことで作用部位選択性を調べ、それら誘導体における構造と活性の関係をVDR-リガンド複合体のレベルで明らかにした。さらに1,25(OH)₂D₃を代謝不活性化するCYP24A1による各誘導体の代謝について検討した。

4. 研究成果

研究期間前半では、A環部位の化学修飾について、特に2位側鎖の代謝について検討を行った。VDR結合親和性の向上や各種生物活性の変化に効果的な構造修飾モチーフである2-ヒドロキシプロポキシ基はCYP24A1に対し高い代謝抵抗性を示すが、CYP3A4により切断される。そこで代謝物候補化合物を化学合成し、それらを比較同定した。その際得られた新規化合物について、各種分光データ等を測定しまとめ、代謝過程の考察とともに報告した。

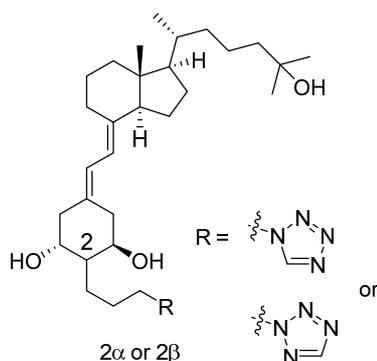


図1 合成した2位置換ビタミンD誘導体

研究期間全体を通じて、これまで検討してきた、A環2位置換活性型ビタミンD₃誘導体の合成においてビタミンD受容体と効果的に相互作用しうる2位置換基上の官能基として複素環窒素原子に着目した2位方向にアゾール環をもつ活性型ビタミンD₃誘導体と、化学的安定性で優位であり、また特徴的な生物活性を期待できるジエン構造を有する19-ノル型誘導体の両方の構造的特徴をもつ活性型ビタミンD₃誘導体の合成および生物活性評価を行うこととし、A環前駆体とCD環前駆体をそれぞれ合成しそれらを結合する収束的な合成法により、2側鎖上にヘテロ環を

有する新しい19-ノル型ビタミンD₃誘導体として、2α置換基上にテトラゾリルプロピル基を有する誘導体およびその2β体の4種の新規リガンドを合成した(図1)。

CD環前駆体へテロアリアルスルホンはビタミンD₃より構築し、A環前駆体は、(-)-キナ酸から得られる2-(3-ヒドロキシプロピル)基を有する合成中間体の一級水酸基をS_N2反応で複素環へと置換することでN-アルキル置換テトラゾール位置異性体として構築した。それぞれ単離精製し、CD環前駆体とJuliaカップリング、脱保護することで2α-[3-(テトラゾリル)プロピル]-1α,25-ジヒドロキシ-19-ノルビタミンD₃およびその2β体を合成した。合成では種々の誘導体合成に適用可能な汎用性の高いルートを確認するために合成効率についても探求し、立体選択性、収率などにおける反応条件の最適化を行った。

得られた誘導体についてHPLC精製後、VDR結合親和性や代謝実験等の評価を行い、CYP24A1による代謝をきわめて受けにくいことがわかった。また、得られた誘導体について骨芽細胞へのオステオカルシン転写活性等の各種生物活性評価を行うことができ、それら誘導体における構造と活性の関係について考察することができた。

本研究課題の成果は、CYP24A1に対して抵抗性のあるリガンドを獲得し、ビタミンD誘導体によるCYP24A1選択的な阻害剤の開発研究に貢献するものである。得られた結果を基にして、引き続き他のヘテロ環や、アルキル側鎖長を有するA環部位の合成へと展開し、さらに新しい誘導体合成につなげることが可能である。さらに2位置換誘導体の代謝過程の解明は、医薬品リード化合物獲得を目的とする今後のリガンドデザインに大きく寄与するものである。

今後は引き続き誘導体合成に力を入れ、合成したリガンドのうち、特に強力な活性や作用分離能を有するものを基礎とし、さらなる特性の増強を目的としたA環及びCD環側鎖等を同時修飾した誘導体の合成を行い、VDRモジュレーターの候補化合物を見出していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1 Masashi Takano, Erika Higuchi, Kazunari Higashi, Keisuke Hirano, Akiko Takeuchi, Daisuke Sawada and Atsushi Kittaka
“Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of 2-[3-(Tetrazolyl)propyl]-1α,25-dihydroxy-19-norvitamin D₃”
Heterocycles, 査読有、90、2015、1274-1287
10.3987/COM-14-S(K)108

2 Masashi Takano, Saori Ohya, Kaori Yasuda,

Miyu Nishikawa, Akiko Takeuchi, Daisuke Sawada, Toshiyuki Sakaki and Atsushi Kittaka

“ Synthesis and Biological Activity of $1\alpha,25$ -Trihydroxyvitamin D_3 : Active Metabolite of 2α -(3-Hydroxypropoxy)- $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 by Human CYP3A4 ”
Chem. Pharm. Bull., 査読有、62、2014、182-184

10.1248/cpb.c13-00646

〔学会発表〕(計6件)

1 高野真史、2-(3-トリアゾリルプロピル)- $1\alpha,25(OH)_2$ -19-ノルビタミン D_3 の合成、日本薬学会第135年会、2015年3月25日～28日、神戸学院大学(兵庫県・神戸市)

2 高野真史、 2α -(3-ヒドロキシプロピル)活性型ビタミン D_3 (MART-10)の合成と制がん活性、第32回メディシナルケミストリーシンポジウム、2014年11月26日～28日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

3 高野真史、 2α -ヘテロアリアルプロピル-19-ノルビタミン D_3 の合成と生物活性評価、第44回複素環化学討論会、2014年9月10日～12日、札幌市民ホール(北海道・札幌市)

4 高野真史、 2α 位にテトラゾールプロピル基を有する19-ノル型ビタミン D_3 の合成と生物活性評価、日本ビタミン学会第66回大会、2014年6月13日～14日、姫路商工会議所(兵庫県・姫路市)

5 高野真史、2-[3-(テトラゾール-2-イル)プロピル]- $1\alpha,25(OH)_2$ -19-ノルビタミン D_3 の合成、日本薬学会第134年会、2014年3月27日～30日、熊本大学(熊本県・熊本市)

6 高野真史、C5-C6 Coupling of MART-10 Synthesis and Its Clinical Implication in Cancer Treatment and Prevention、10th International Symposium on Carbanion Chemistry (ISCC-10)、2013年9月23日～26日、同志社大学(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 真史 (TAKANO MASASHI)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：50386611