

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08018

研究課題名(和文)新規ビタミンD受容体リガンドを目指した胆汁酸誘導体の構造活性相関研究

研究課題名(英文) Structure activity relationship study of bile acid derivatives to development of novel vitamin D receptor ligand

研究代表者

増野 弘幸 (MASUNO, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・技術専門職員

研究者番号：80376714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンD受容体(VDR)リガンドとしてリトコール酸に着目し、より高い活性をもつビタミンD骨格を持たない新規VDRリガンドの開発と、VDRリガンドとしてのリトコール酸誘導体の構造活性相関の解明を目指し、リトコール酸の3位に3級水酸基を含むアルキル基を導入した誘導体を設計、合成した。VDR活性をヒト前骨髄性白血病細胞の分化誘導能で評価したところ、合成した化合物のはいずれも既知のリトコール酸誘導体に比較し高い活性を示した。最も活性の高かった化合物は1,25-ジヒドロキシビタミンD3に匹敵する活性を持つことが明らかになり、医薬品への応用に十分なVDR活性を持つリトコール酸誘導体の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：To develop potent vitamin D receptor ligand which have no vitamin D skeleton and to investigate structure and activity relationships of lithocholic acid derivateves, I designed, synthesized and evaluated biological activity of novel lithocholic acid derivateves. I synthesized several lithocholic acid derivatives which have hydroxyl group containing alkyl group at carbon three on steroid skeleton. The vitamin D receptor activity of synthesized compounds were evaluated by differentiation-inducing activity in HL-60 human promyelocytic leukemia cell line. All of the compounds have higher activity than known lithocholic acid derivatives. The most potent compound have activity as well as 1,25-dihydroxyvitamin D3. These compounds have enough activities to use clinical application.

研究分野：有機化学

キーワード：ビタミンD 核内受容体 胆汁酸 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

1,25-ジヒドロキシビタミンD₃はビタミンDの活性代謝物であり、核内受容体の一種であるビタミンD受容体(VDR)のリガンドとして作用しその機能を発現する。VDR リガンドはカルシウム疾患や乾癬の治療薬として臨床応用されているほか免疫疾患や抗がん剤への応用も期待されており、活発に新規化合物の開発が行われている。VDR リガンドの大部分は天然リガンドの誘導体であったが、近年になりいくつかの全く異なる構造を持つ化合物が報告されているが臨床応用に至っていない。ビタミンD受容体リガンドを医薬品として応用するためにはこれらの作用の分離が重要であるが最も強いカルシウム活性が副作用として問題になる。その解決のためにはビタミンD骨格を持たない化合物の開発は有効な手段であると考えられている。申請者は弱いながらもVDRアゴニスト活性をもつリトコール酸に着目しVDRとリトコール酸誘導体の共結晶解析を行いVDRとリトコール酸の総合作用メカニズムを明らかにするとともに、いくつかの誘導体の合成を行ってきたが、わずかな活性上昇にとどまっている。

2. 研究の目的

医薬品としての核内受容体リガンドにおいては天然型リガンドと全く異なる構造を持つ化合物を利用することにより物性や作用の改善に成功した事例がある。しかしながら合成VDRアゴニストは医薬品として臨床応用されているものはすべてビタミンD₃の誘導体である。近年なり、二次胆汁酸のリトコール酸が第二の内在性リガンドとして同定されたが、その活性は非常に弱い。VDRリガンドとしてのリトコール酸の誘導体の研究は少数の既知化合物や簡単な誘導体に限られている。申請者はVDRリガンドとしてのリトコール酸誘導体の有用性を明らかにしようと考え、新規リトコール酸誘導体の設計、合成を行い、その構造活性相関を明らかにするとともに、医薬品としての応用が期待できる、より活性の高い誘導体の開発を目指す。

3. 研究の方法

申請者が明らかにしたVDR-リトコール酸誘導体の共結晶構造に基づいてよりVDR活性の高い化合物の設計を行う。それを参考に種々の誘導体を合成しリトコール酸誘導体を合成する。活性はヒト前骨髄性白血病細胞HL-60の分化誘導活性で評価し、活性の高い化合物については競合結合試験を行う。それらの結果を新たな化合物の設計に反映する。

4. 研究成果

(1)化合物の設計

VDRリガンドとしてのリトコール酸誘導体の研究はわずかな例が報告されているのみ

である。その結果、6位や12に水酸基をもつコール酸やデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸にはほとんど活性がないこと、カルボキシル基がエステル化された化合物や抱合胆汁酸は活性が弱いことが知られている。一方、3位水酸基のアシル化は活性を向上させることが明らかになっている。

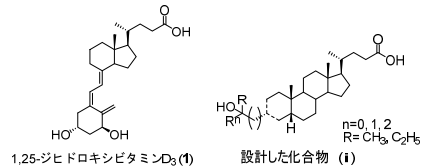


図 1

また申請者らによりリトコール酸誘導体とVDRのX線共結晶構造が明らかにされており、LCA誘導体のカルボキシル基は1,25ジヒドロキシビタミンD₃の1位水酸基と同一残基に直接、3位水酸基が水素結合している残基と水を介してそれぞれ水素結合している。一方リトコール酸の3位水酸基は活性の弱いリトコール酸では1,25ジヒドロキシビタミンD₃の25位水酸基が水素結合している残基と水を介して水素結合しているが比較的活性の強い3-アセチルリトコール酸では直接水素結合している。このことから胆汁酸のステロイド骨格および側鎖カルボキシル基は修飾せず、3位に25位水酸基が水素結合している残基であるヒスチジンと水素結合可能な水酸基をもつアルキル基を導入した化合物群を設計した。(図1, i)

(2)リトコール酸3位への炭素官能基の立体選択的導入と化合物の合成

合成はリトコール酸を原料に種々の化合物に誘導することとした。24位は還元したアルコールをベンジル基で保護した。化合物を用いて合成を行うこととした。リトコール酸をジヒドロピランと反応させ3位水酸基をTHP基で保護した。この時カルボキシル基が反応した化合物も複製するが、混合物のまま水素化リチウムアルミニウムで還元しアルコール4を得た。この24位アルコールをベンジル基で保護したのち3位を脱保護し化合物6を得た。この化合物を用いて3位への立体選択的な置換基の導入を検討した。(図2)

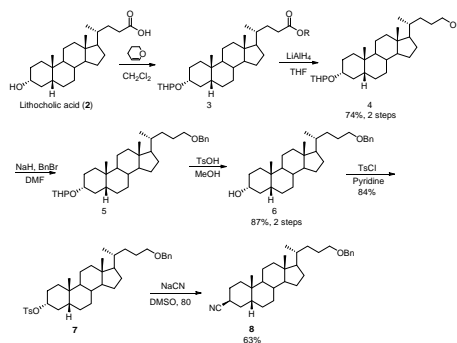


図 2

ステロイド 3 位においては置換反応が立体反転で選択的に進行する例が報告されている。そこで 3 位水酸基をトシル化したのちシアン化ナトリウムと反応を行ないニトリル **8** を合成した。ニトリル **8** は単一の異性体からなり、¹H-NMR の 3 位水素の結合定数から置換基はアキシアル即ち beta であり、反応は立体反転で選択的に進行した。3-alpha 体については立体配座が固定された六員環に結合したアルデヒドがアルカリ存在下でエカトリアルに異性化する反応を利用することにした。立体選択的に合成した 3-beta シアノ体 **8** を DIBAL で還元し 3-beta ホルミル体 **9b** を得た。これをメタノール中炭酸カリウムに作用させると大部分が 3-alpha 体に異性化した。カラムクロマトグラフィーにより生成し 3-alpha 体 **9a** のみを得ることができた(図 3)。

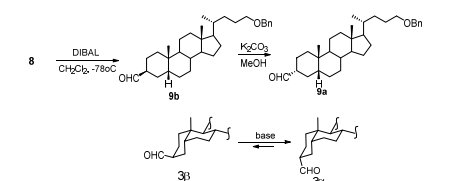


図 3

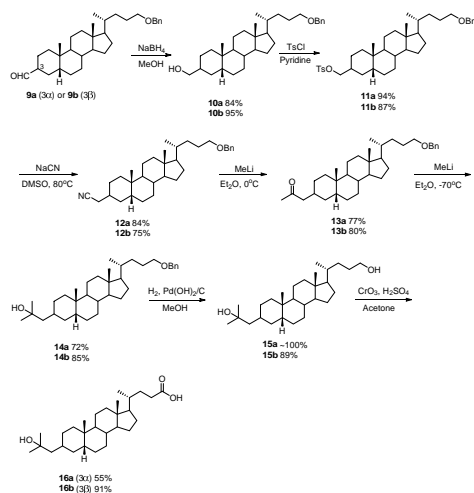


図 4

それぞれの 3-アルデヒド体 **9a** 及び **9b** は還元してヒドロキシメチル体 **10a**, **10b** としたのち、水酸基をトシル化、シアン化ナトリウムとの反応によりシアノメチル体 **12a**, **12b** へと変換した。シアノ体にメチルリチウムを反応させ、メチルケトンとしたのちにメチルリチウムをさらに反応させ 3 級アルコールへ **14a**, **14b** と導いた。これらの化合物の 2,4 位水酸基を脱保護したのち、酸化し目的物のカルボン酸 **16a**, **16b** へと導いた(図 4)。

(3) 活性評価

合成した化合物は HL-60 細胞分化誘導能により活性を評価した(図 5)。その結果いずれの化合物もこれまでに知られているリトコール酸の誘導体よりも高い活性を示し、

3-alpha 体 **16a** については 1,25 ジヒドロキシビタミン D₃ に匹敵する活性を持つことが明らかになった。これらの化合物については VDR との競合結合試験も行い VDR に結合することを確認した(図 6)。

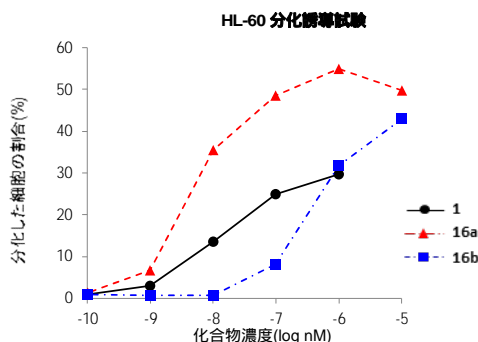


図 5

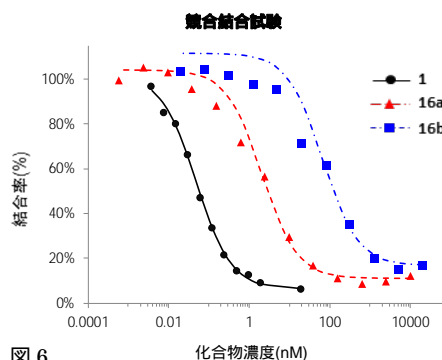


図 6

(4) 誘導体の合成と活性評価

次により活性の高かった 3-alpha 体についてアルキル鎖の長さの異なる化合物の合成を行った。炭素鎖が一つ短い化合物については共通中間体のアルデヒド **9a** を酸化してカルボン酸 **17** としたのちメチルエステル **18** に誘導した。このエステルに対してメチルグリニヤール試薬を作用させ 3 級アルコール **21** とした(図 7)。

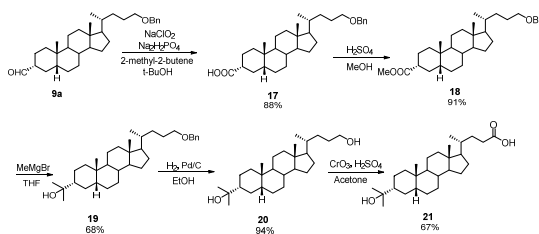


図 7

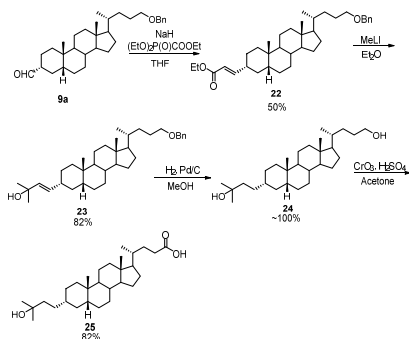
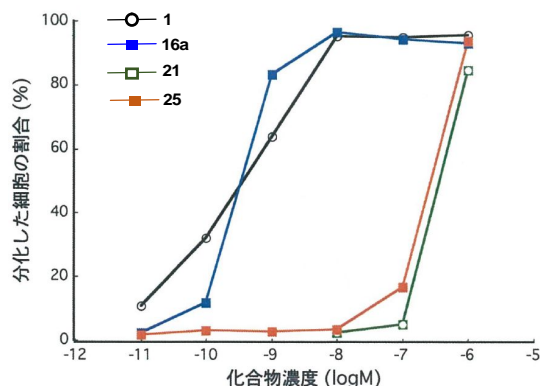


図 8

アルキル鎖の長い化合物については共通中間体のアルデヒド **9a** を Horner-Emmons 反応により共役エステル **22** とした。エステルをメチルリチウムにより 3 級アルコール **23** とした。接触水素化により 2 重結合の還元と同時に水酸基の脱保護を行ったのち、酸化により目的物 **25** へと導いた。(図 8)

これらの化合物についても HL-60 分化誘導により活性を評価したところ、以前に知られていた LCA 誘導体よりも強い活性ではあったものの $n=1$ の化合物 **16a** に比較していずれも弱い活性であった。



リトコール酸 3 位に 3 級水酸基を持つ誘導体を合成し VDR への活性を評価したところこれまでに知られている LCA 誘導体よりも高い活性を持つことを明らかにした。これまで弱い VDR 活性しか持たないと考えられていたリトコール酸が構造修飾によりビタミン D₃ 誘導体と同程度の V 活性をもち得ることを示した。3 位の置換基は 3 α 体が 3 β 体よりも高い活性を持ち、3 級水酸基とステロイド骨格の間にはメチレン基 1 つのものが最も高い活性を示した。最も活性が高い化合物は 1,25 ジヒドロキシビタミン D₃ に匹敵する活性を持ち、ビタミン D 骨格を持たない化合物としては最も高い VDR 活性を持つ化合物の一つであり、医薬品としての応用が期待できる。

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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

佐々木晴江, 増野弘幸, 他、リトコール酸 3 位誘導体の合成とビタミン D 活性、第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2015 年。

佐々木晴江, 増野弘幸, 他、リトコール酸をリード化合物とした非セコステロイド型 VDR リガンドの創製、日本薬学会第 136 年会、2016 年。

川崎波留, 増野弘幸, 他、リトコール酸をリード化合物とした非セコステロイド型ビタミン D 誘導体の創製、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2016 年。

川崎波留, 増野弘幸, 他、高いビタミン D 活性を有するリトコール酸誘導体の創製、日本薬学会第 137 年会、2017 年。リトコール酸をリード化合物にした新規ビタミン D 誘導体の創製、

川崎波留, 増野弘幸, 他、日本ビタミン学会第 69 回大会、2017 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: ビタミン D 活性を有するリトコール酸誘導体

発明者: 国立大学法人お茶の水女子大学、国立大学法人東京医科歯科大学

権利者: 棚谷綾、佐々木晴江、影近弘之、増野弘幸

種類: 特許

番号: 特願 2016- 14012

出願年月日: 2016 年 1 月 28 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/omc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増野弘幸 (MASUNO, Hiroyuki)

東京医科歯科大学、生体材料工学研究所、技術専門職員

研究者番号: 80376714