

令和元年6月21日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08031

研究課題名(和文) ホルモン様作用で強力な制がん活性を発揮する新規VDRリガンドの創製

研究課題名(英文) Syntheses of novel VDR ligands with potent anticancer activity

研究代表者

高野 真史 (TAKANO, MASASHI)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：50386611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：2位に2-(テトラゾール-2-イル)エチル基を有する活性型ビタミンD3(AH-1)のCYP24A1による主代謝産物である24位水酸化体の化学合成を達成した。また収束的な合成法により、C2位のアルキル置換基に各種アゾール環をもつ、新しい19-ノルビタミン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、今後の新規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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果として得られた2位置換ビタミンD誘導体の代謝過程の解明は、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大きく貢献するものである。確立した合成ルートは、引き続き他のヘテロ環や、アルキル鎖長を有する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ため、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。

研究成果の概要(英文)：The synthesis of (24R)-2 α -[2-(tetrazol-2-yl)ethyl]-1 α ,24,25-trihydroxyvitamin D₃, which is the major metabolite of 2 α -[2-(tetrazol-2-yl)ethyl]-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (AH-1) by CYP24A1, has been achieved. Convergent syntheses of novel 19-norvitamin D analogs with an azole at the C2 position possessing the alkyl 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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、骨形成を代表とする様々な生命現象に深くかかわる活性型ビタミン D_3 ($1,25(OH)_2D_3$) の多彩な生理作用を効果的に活用し、医薬品創製を目的として、これまでに多くのビタミン D アナログが報告されている。既に骨形成作用を活用した優れた医薬品が見出されているが、一方でその制がん作用を利用した医薬品開発が期待されている。しかしながら、 $1,25(OH)_2D_3$ は同時に強力な血中カルシウム濃度上昇作用を有しているため、有効な制がん作用を得るための量を投与すると高頻度で高カルシウム血症を伴い、その利用が妨げられているのが現状である。したがって、 $1,25(OH)_2D_3$ を基盤とする制がん剤を開発するためには、活性を一律に高めるのではなく作用選択的なリガンドを見出す必要があった。

(2) 特に A 環の構造修飾を精力的に検討し、A 環 2 位修飾体の系統的な合成と生物活性評価の結果、いくつかの効果的な活性向上モチーフを見出している。合成した 2 位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タンパク質表面層まで続く water channel とよばれる水素結合ネットワーク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。さらに 2 位置換基上の水酸基の代わりに、各種アゾール環を有するリガンドを設計し、その合成と生物活性について検討した。テトラゾール環を有するリガンドにおいてもヒト VDR との X 線共結晶構造解析を行いアゾール環上の窒素原子が水酸基と同様に VDR-Arg274 残基との新たな水素結合を形成しうることを証明した。

(3) エキソメチレンのない 19-ノルビタミン D_3 の A 環部に VDR 結合親和性向上モチーフとして 2 位-(3-ヒドロキシプロピル)基を導入した誘導体 (MART-10) を合成したところ、その VDR 結合親和性は $1,25(OH)_2D_3$ と同程度まで高まることがわかった。合成した MART-10 の制がん活性について *in vitro* および *in vivo* 評価を行ったところ血中カルシウム濃度上昇作用を抑えつつ強力な制がん活性を示した。

2. 研究の目的

リガンドの巧みな構造修飾により VDR との相互作用に影響を及ぼし、リガンド-VDR 複合体に変化をもたらすことで生理作用選択性の獲得が果たして可能であるのか、生体内での安定性を考慮し、また複合体の詳細な構造解析に基づく合理的なリガンドの設計、合成を行い、所望の活性を持続的に発現する合成リガンドを見出すことを目的とした。また、合成した A 環 2 位置換基上にアゾール類を導入したリガンド類は、アゾール環がヘムと相互作用することで活性型ビタミン D_3 を代謝不活性化する CYP24A1 の阻害剤になることが期待されるため、19-ノル化、CD 環修飾等と組合せることで、医薬品として理想的な活性プロファイルを有する化合物の創製を代謝研究を含めた活性評価により追及することを目的とした。

3. 研究の方法

誘導体合成は A 環前駆体と CD 環前駆体をそれぞれ合成し、それらを結合し収束的に行った。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を採用した。A 環部位の構造修飾としては、既に合成を達成した 2 位-(3-ヒドロキシプロピル)活性型 19-ノルビタミン D_3 (MART-10) の合成中間体を基に 2 位-アゾールアルキル体を中心に系統合成をさらに進めることとした。またアゾール上の窒素原子の数やそれらの位置関係の相違は、VDR との相互作用の強弱に影響を及ぼすことが予想されるため、結合炭素鎖数の異なるものも含め各種アゾールをもつリガンドを合成目標とした。また、CD 環新規修飾部位として、ビタミン D モジュレーター獲得を目指した 15 位置換誘導体の合成法を既に確立しており、それらを利用し、多彩な CD 環前駆体の合成を行うこととした。合成した各種 A 環部位と CD 環部位を組合せて同時修飾した誘導体の合成を行い、修飾のハイブリッド効果についても検討を行うこととした。ハイブリッド化については、これまでに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ており、可能な組合せについて誘導体を網羅的に合成することとした。最後に合成した誘導体について、VDR との複合体の X 線結晶構造解析、生物活性評価を行うことで、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、また、代謝研究も同時に行い、生体内での安定性について活性型ビタミン D_3 に対する優位性を明らかにし、そしてそれらの合成したリガンドで大学発の医薬品リード化合物を獲得することとした。

4. 研究成果

所望の活性プロファイルの獲得を目的とし、VDR-リガンド複合体のレベルで設計したビタミン D 誘導体群の合成を行った。すなわち 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った。これまでに既に 2 位置換基上にテトラゾールプロピル基やトリアゾールプロピル基を有するいくつかの誘導体合成を達成しているが、それらの合成に用いたルートを基に、他のアゾールを有する誘導体の新規合成を検討した。CD 環前駆体へテロアリールスルホンはビタミン D₃ より構築し、2 位置換基上に各種アゾールアルキル基を有する A 環前駆体は、(-)-キナ酸から得られる 2-(3-ヒドロキシアルキル)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-アルキル置換ア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 オレフィン化、脱保護することで 2 位置換基上に各種アゾールアルキル基を有する 19-ノル型ビタミン D₃ 誘導体の 2 位のジアステレオマーやアゾール環上窒素原子位置異性体等を合成した。さらに 2 位側鎖長についても検討し、各種アゾールエチル基を有する誘導体の合成を達成した。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立するために合成効率についても探求し、立体選択性、収率などにおける最適な反応条件を見出した。得られた誘導体について HPLC 精製後、VDR 結合親和性や各種生物活性評価、CYP24A1 による代謝研究等を行い、代謝過程の詳細を明らかにした。またトリエン構造を有するリガンドとして、2 位置換基上にアゾールを有する有用な誘導体である 2-[2-(テトラゾール-2-イル)エチル]-1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ について主代謝物の候補化合物を化学合成し、正確な構造決定とより詳しい代謝物の各種生物活性評価や、さらなる代謝についても明らかにした。

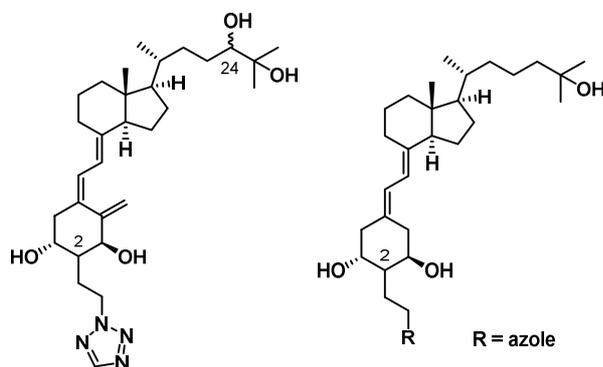


図 合成した 2 位置換ビタミン D 誘導体

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M. Takano, K. Yasuda, H. E. Tohyama, E. Higuchi, T. Sakaki, A. Kittaka
“Synthesis of the CYP24A1 major metabolite of
2-[2-(tetrazol-2-yl)ethyl]-1,25-dihydroxyvitamin D₃”
Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 査読有、173、2017、75-78
10.1016/j.jsbmb.2016.11.022

〔学会発表〕(計 15 件)

M. Takano, “SYNTHESIS OF 2-[2-(TETRAZOL-2-YL)ETHYL]-1α,25-DIHYDROXY-
19-NORVITAMIN D₃ AND ITS METABOLISM” The 21st Vitamin D Workshop, 2018

高野真史、2-(2-テトラゾールエチル)活性型ビタミン D₃ とその 19-ノル体の合成と代謝、第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2018

高野真史、2 位置換基上にアゾールを有する新規 19-ノルビタミン D 誘導体の合成と代謝、第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム、2018

高野真史、ビタミン D 誘導体 AH-1 の CYP24A1 代謝物 24 位エピマーの合成、日本ビタミン学会第 69 回大会、2017

M. Takano, "SYNTHESIS OF (24S)-ISOMER OF AH-1 CYP24A1 METABOLITE" The 20th Vitamin D Workshop, 2017

高野真史、ビタミン D₃ 誘導体の CYP24A1 代謝物の化学合成、第 42 回反応と合成の進歩シンポジウム、2016

高野真史、2-[2-(テトラゾール-2-イル)エチル]-1,24,25-トリヒドロキシビタミン D₃ の合成、日本ビタミン学会第 68 回大会、2016

M. Takano, "SYNTHESIS OF (24R)-2-[2-(TETRAZOL-2-YL)ETHYL]-1,24,25-TRIHYDROXYVITAMIN D₃" The 19th Vitamin D Workshop, 2016

高野真史、高い骨形成作用を有するビタミン D 誘導体の合成、活性評価及び代謝研究、第 41 回反応と合成の進歩シンポジウム、2015

高野真史、2 位にトリアゾリルプロピル基を有する 19-ノル型ビタミン D₃ の合成と生物活性評価、日本ビタミン学会第 67 回大会、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。