

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月26日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590022

研究課題名（和文） 骨形成に働く新規 14-エピ-19-ノルプレビタミン D 型セコステロイドの構造展開

研究課題名（英文） Study on structural development of novel 14-epi-19-norprevitamin D type seco-steroids working on bone formation

研究代表者

橋高 敦史 (KITAKA ATSUSHI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：00214833

研究成果の概要（和文）：骨形成に関与するビタミン D 誘導体の新規骨格として、14-エピ-2 α -メチル-1 α ,25-ジヒドロキシ-19-ノルプレビタミン D₃ の合成を達成した。興味深いことに、本化合物は酸触媒により 14-エピ-2 α -メチル-1 α ,25-ジヒドロキシ-19-ノルタキステロールへと異性化し、ビタミン D 受容体を介する骨芽細胞への強い生理活性を有することを認めた。次いで本異性化生成物を直接化学合成することに成功し、動物実験等に耐えうる量を確保することが可能となった。また、受容体との複合体の X 線共結晶構造解析に成功し、特異な受容体結合様式を解明した。

研究成果の概要（英文）：As a novel skeleton of vitamin D working on bone formation, 14-epi-2 α -methyl-1 α ,25-dihydroxy-19-norprevitamin D₃ has been synthesized. Interestingly, we found that the new compound epimerizes to 14-epi-2 α -methyl-1 α ,25-dihydroxy-19-nortachysterol by acidic catalysts, and the tachysterol analog showed potent osteocalcin promoter transactivation activity through the vitamin D receptor. Next, we developed a direct synthetic route to the tachysterol analog to obtain enough amount of the tachysterol analog for in vivo studies. X-ray co-crystallographic studies explained an unprecedented binding mode of the tachysterol to the vitamin D receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：有機化学、薬学、合成化学、生理活性、活性型ビタミン D₃、ビタミン D 受容体、タキステロール

1. 研究開始当初の背景

我々はプレビタミン D 型のセコステロイド骨格を構築してその生理作用を純粹に抽出する目的で、CD 環の 14 位を異性化させた

14-エピプレビタミン D 誘導体 (pre-2) を種々合成してきた。この誘導体群は天然ホルモンである活性型ビタミン D₃ とは逆に、80 °C に加熱すると [1,7]シグマトロピー転位

による平衡が 95%以上ビタミン D 型から pre-2 に傾く。HPLC による分析から pre-2 は、37 °C ではプレ型のみで存在し、cis-ジャンクションの CD 環では [1,7]シグマトロピー転位でビタミン D 型にもどる活性化エネルギーがかなり高いことがわかった。pre-2 そのものは、ビタミン D 受容体 (VDR) への結合親和性が活性型ビタミン D₃ の 0.5% しか示さないことから、これまで VDR のアゴニストとして注目されてこなかったが、我々が合成した 2 α -メチル基およびフェニル基を導入した pre-2a、pre-2e では活性型ビタミン D₃ の 8.4% 程度の VDR 結合親和性を示し、骨芽細胞系 HOS 細胞のオステオカルシン転写活性 (骨形成作用の指標) が活性型ビタミン D₃ の 25% 程度と中庸ながら発現することがわかった。しかし今後の *in vitro* *in vivo* 実験における、対応するビタミン D 型との平衡の可能性は残る。そこで [1,7]シグマトロピー転位に関与する 19-メチル基を除去した 14-エピ-19-ノルプレビタミン D 誘導体を合成し、平衡の可能性を完全に払拭することとした。

2. 研究の目的

14-エピ-19-ノルプレビタミン D 誘導体は新規化合物である。骨芽細胞系 HOS 細胞のオステオカルシン転写活性は、活性型ビタミン D₃ の 15% を示した。さらに、2 α 位にメチル基を導入した化合物 3a は、同 140% と天然体を凌ぐ強力なオステオカルシン転写活性を示した。オステオカルシン転写活性はリガンドが VDR に結合してはじめて発現することから、3a のもつ genomic な作用を確認したことになる。プレビタミン D 型でありながら 3a の VDR を介する生物活性は非常に強く、骨粗鬆症治療薬として認可されたエルデカルシトール (中外製薬) と同等以上に高いことから、骨形成作用選択的に働く可能性が高い合成リガンドであることがわかった。プレビタミン D の骨格で活性型ビタミン D₃ を上回る生物活性を発現した例は過去に無く、骨粗鬆症のモデルマウスである OVX マウスを使った動物実験や、プレビタミン D の骨格構造でいったいどのように VDR と結合しているのか調べるために、VDR-3a 複合体の X 線結晶構造解析を行うことを目的とした。また、潤沢にサンプル量を確保し得る 3a の効率のよい合成法を目指すこととした。さらに、3a を基盤としてより強い骨形成作用を示す誘導体探索研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

14-エピ-2 α -メチル-1 α ,25-ジヒドロキシ-19-ノルプレビタミン D₃ 誘導体 (3a) の合成は、A 環部をキナ酸からエニン体に通じた。Wittig 反応によりエキソメチレン基を導入

した。一方、14-エピ-CD 環部はビタミン D₃ からオゾン分解を経由して得られる 8-ケト体の 14 位を塩基性条件下異性化した。ケトンを経由してエノールトリフラートに導き、先の A 環エニン体と Pd(II)-Cu(I)触媒を用いてカップリングした。カップリング成績体を脱保護し、Wilkinson 触媒でエキソメチレン部を選択的に還元し、次いでアルキン部を Lindlar 触媒で部分還元することによりプレビタミン D 型とし、HPLC 精製して目的とする 3a を得た。2位の立体化学は NOE により決定した。

4. 研究成果

骨形成に関与するビタミン D 誘導体の新規骨格として、14-エピ-2 α -メチル-1 α ,25-ジヒドロキシ-19-ノルプレビタミン D₃ (3a) の合成を達成した。興味深いことに、本化合物は酸触媒による 6-7 位間でのシス-トランス異性化反応を経て、14-エピ-2 α -メチル-1 α ,25-ジヒドロキシ-19-ノルタキステロール (4) へと異性化し、ビタミン D 受容体 (VDR) を介する骨芽細胞への強い生理活性を有することを認めた。しかし、この異性化反応を経る (4) の取得量は微量である。そこで異性化成績体 4 を直接化学合成し、VDR-4 複合体の X 線共結晶構造解析や、*in vivo* 研究に耐えうる量を確保することとした。

タキステロール誘導体 (4) の合成は、A 環部分をキナ酸から導くこととした。5 位に相当する位置にエチニル基を増炭し、このアルキン部をラジカル的にビニルスズ化合物に変換した。一方、14-エピ-CD 環部は、8-ケト体の 14 位を塩基性条件下異性化し、エノールトリフラートに導き、A 環ビニルスズ化合物と Pd 触媒を用いて Stille カップリングし、新規 19-ノルタキステロール骨格を構築することができた。カップリング成績体を脱保護し、Wilkinson 触媒で 2 位エキソメチレン部を選択的に還元することにより、2 位にメチル基が導入された新規 19-ノルタキステロール誘導体 (4) を効率良く合成することができた。HPLC 精製後、Spring-8 による VDR-4 複合体の X 線共結晶構造解析に成功した。これまでの常識を覆す受容体への結合様式を解明し、学術雑誌 (*J. Am. Chem. Soc.*) に研究成果を掲載した。

本研究課題を通じ、これまで不安定とされ生理活性物質の対象として研究されてこなかったタキステロール骨格を初めて安定な誘導体に導くことができた。今後も本骨格のもつ生理活性を多面的に評価し、骨粗鬆症モデル OVX マウスを用い、骨密度改善と骨形成に対する効果を動物実験で調べることにする。さらに、新規化合物 (4) の代謝については、天然の活性型ビタミン D₃ の 24 位を

水酸化して代謝不活性化する CYP24A1 への抵抗性について検討中である。

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 13 件)

- ① Daisuke Sawada, Tomoyuki Katayama, Yuya Tsukuda, Nozomi Saito, Hiroshi Saito, Shinji Kakuda, Midori Takimoto-Kamimura, Kazuya Takenouchi, and Atsushi Kittaka “The Difference between 14-*Epi*-previtamin D₃ and 14-*Epi*-19-norprevitamin D₃: Their Synthesis and Binding Affinity for Human VDR” *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 319-326. 査読有 <http://ar.iiarjournals.org/content/32/1/319.full?sid=d6507568-bc32-4ba6-841c-6b606396458b>
- ② Go Kumagai, Masashi Takano, Kanako Shindo, Daisuke Sawada, Nozomi Saito, Hiroshi Saito, Sshinji Kakuda, Ken-ichiro Takagi, Midori Takimoto-Kamimura, Kazuya Takenouchi, Tai C. Chen and Atsushi Kittaka “C15-Functionalized 16-Ene-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ is a New Vitamin D Analog with Unique Biological Properties” *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 311-318. 査読有 <http://ar.iiarjournals.org/content/32/1/311.full?sid=d6507568-bc32-4ba6-841c-6b606396458b>
- ③ Tai C. Chen, Toshiyuki Sakaki, Keiko Yamamoto, and Atsushi Kittaka “The Roles of Cytochrome P-450 Enzymes in Prostate Cancer Development and Treatment” *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 291-298. 査読有 <http://ar.iiarjournals.org/content/32/1/291.full?sid=d6507568-bc32-4ba6-841c-6b606396458b>
- ④ Toru Sugiyama, Yasutada Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano and Atsushi Kittaka “ β -PNA: Peptide Nucleic Acid (PNA) with a Chiral Center at the β -Position of the PNA Backbone” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 7317-7320. 査読有 DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.10.017
- ⑤ Kun-Chun Chiang, Chun-Nan Yeh, Huang-Yang Chen, Jim-ming Lee, Horng-Heng Juang, Miin-Fu Chen, Masashi Takano, Atsushi Kittaka, and Tai C. Chen “19-Nor-2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (MART-10) is a Potent Cell Growth Regulator with Enhanced Chemotherapeutic Potency in Liver Cancer Cells” *Steroids* **2011**, *76*,

1513-1519. 査読有 DOI: 10.1016/j.steroids.2011.08.006

- ⑥ Diego Iglesias-Gato, Shasha Zheng, John N. Flanagan, Lan Jiang, Atsushi Kittaka, Toshiyuki Sakaki, Keiko Yamamoto, Toshimasa Itoh, Nathan K. LeBrasseur, Gunnar Norstedt, Tai C. Chen “Substitution at Carbon 2 of 19-Nor-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ with 3-Hydroxypropyl Group Generates an Analog with Enhanced Chemotherapeutic Potency in PC-3 Prostate Cancer Cells” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *127*, 269-275. 査読有 DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.010
- ⑦ Eiji Munetsuna, Sachie Nakabayashi, Rie Kawanami, Kaori Yasuda, Miho Ohta, Midori A. Arai, Atsushi Kittaka, Tai C. Chen, Masaki Kamakura, Shinichi Ikushiro and Toshiyuki Sakaki “Mechanism of the Anti-proliferative Action of 25-Hydroxy-19-nor-vitamin D₃ in Human Prostate Cells” *J. Mol. Endocrinol.* **2011**, *47*, 209-218. 査読有 DOI: 10.1530/JME-11-0008
- ⑧ Tai C. Chen and Atsushi Kittaka “Novel Vitamin D Analogs for Prostate Cancer Therapy” *International Scholarly Research Network (ISRN) Urology* **2011**, Vol. *2011*, Article ID 301490, 査読有 DOI: 10.5402/2011/301490.
- ⑨ Toru Sugiyama, Yasutaka Imamura, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Masashi Takano, and Atsushi Kittaka “Synthesis of 4-Substituted Chiral PNA Monomers” *Peptide Science 2010*, **2011**, *47*, 284. 査読無 <http://www.prf.or.jp/psb.html>
- ⑩ Kanako Shindo, Go Kumagai, Masashi Takano, Daisuke Sawada, Nozomi Saito, Hiroshi Saito, Shinji Kakuda, Ken-ichiro Takagi, Eiji Ochiai, Kyohei Horie, Midori Takimoto-Kamimura, Seiichi Ishizuka, Kazuya Takenouchi, and Atsushi Kittaka “New C15-Substituted Active Vitamin D₃” *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2852-2855. 査読有 DOI: 10.1021/ol200828s
- ⑪ Daisuke Sawada, Yuya Tsukuda, Hiroshi Saito, Shinji Kakuda, Midori Takimoto-Kamimura, Eiji Ochiai, Kazuya Takenouchi, and Atsushi Kittaka “Development of 14-*epi*-19-Nortachysterol and Its Unprecedented Binding Configuration for the Human Vitamin D Receptor” *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7215-7221. 査読有 DOI: 10.1021/ja201481j
- ⑫ Hiroshi Saitoh, Takayuki Chida, Kenichiro Takagi, Kyohei Horie, Yoshiyuki

Sawai, Yuko Nakamura, Yoshifumi Harada, Kazuya Takenouchi, and Atsushi Kittaka "Synthesis of C-2 Substituted Vitamin D Derivatives Having Ringed Side Chains and Biological Evaluation, Especially Biological Effect on Bone by Modification at C-2 Position" *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3954-3964. 査読有 DOI: 10.1039/c1ob05142c

⑬ 安田佳織、林 恵子、生城真一、鎌倉昌樹、宗綱栄二、杉本 宏、城 宜嗣、橘高敦史、太田美穂、榊 利之「CYP105A1 二重変異体を発現する放線菌を用いた活性型ビタミン D₃ の生産」ビタミン **2011**, *85*, 109-114. 査読有 <http://web.kyoto-inet.or.jp/people/vsojkn/journal/index.html>

〔学会発表〕 (計 13 件)

① 澤田大介ら「1 α ,4,25-トリヒドロキシビタミン D₃ の合成とヒト水酸化酵素による代謝に関する研究」日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学

② 高野真史ら「活性型ビタミン D₃ 誘導体の 2 α 側鎖上の二級水酸基の効果と生物活性評価」日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学

③ 倉島恵愛ら「長鎖アルキル基を持つノンセコステロイド型 VDR リガンドの創製」日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学

④ Daisuke Sawada et al. 「New Skeleton in Vitamin D Family: 14-epi-19-Nortachysterol and Its Unprecedented Binding Configuration for the Human Vitamin D Receptor」8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium AIMECS 2011、2011 年 11 月 29 日-12 月 2 日、京王プラザホテル (新宿区)

⑤ Toru Sugiyama et al. 「Synthesis and DNA Binding Properties of β -Chiral Peptide Nucleic Acid」8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium AIMECS 2011、2011 年 11 月 29 日-12 月 2 日、京王プラザホテル (新宿区)

⑥ 澤田大介ら「14-epi-19-Nortachysterol 類の合成と受容体結合様式の解明」第 37 回反応と合成の進歩シンポジウム、2011 年 11 月 7-8 日、あわぎんホール (徳島市)

⑦ Toru Sugiyama et al. 「Synthesis of beta-Chiral Peptide Nucleic Acids and Their DNA Binding Properties」第 48 回ペプチド討論会、2011 年 9 月 26-29 日、札幌コンベンションセンター

⑧ 橘高敦史ら「14-エピ-19-ノルタキステロールの合成と VDR リガンド骨格としての可能性」第 332 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、2011 年 9 月 30 日、昭和薬科大学

⑨ 橘高敦史「新たなビタミン D 骨格 14-epi-19-ノルタキステロール」帝人・核内レセプター創薬研究会 (招待講演)、2011 年 6 月 16 日、霞が関ナレッジスクエア (千代田区)

⑩ 高野真史ら「2 α 位にアゾール環側鎖を有する活性型ビタミン D₃ の合成と生物活性評価」日本ビタミン学会第 63 回大会、2011 年 6 月 4-5 日、安田女子大学 (広島市)

⑪ 安田佳織ら「2 α 位に置換基を有するビタミン D 誘導体のヒト体内における代謝予測」日本ビタミン学会第 63 回大会、2011 年 6 月 4-5 日、安田女子大学 (広島市)

⑫ Daisuke Sawada et al. 「Evaluation and characterization of 14-epi-19-nortachysterol analogs from 14-epi-19-norprevitamin D₃」4th Symposium Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy、2011 年 5 月 20-21 日、Schlossberg Hotel (Homburg, Germany)

⑬ Atsushi Kittaka et al. 「Synthesis of C15-Modified 16-ene-active vitamin D₃ analogs for the receptor-ligand interaction studies」4th Symposium Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy、2011 年 5 月 20-21 日、Schlossberg Hotel (Homburg, Germany)

〔図書〕 (計 1 件)

橘高敦史ら、東京化学同人「薬学用語辞典」2012 年、535 頁

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：7,8-シス-14-エピ-ビタミン D 誘導体
発明者：齋藤 博、橘高敦史、澤田大介
権利者：帝人ファーマ株式会社
種類：特許
番号：特願 2011-125278
出願年月日：平成 23 年 6 月 3 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/419/16>
<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/lab/yakka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橘高 敦史 (KITAKA ATSUSHI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：00214833

(2)研究分担者

高野 真史 (TAKANO MASASHI)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：50386611

(3)連携研究者

澤田 大介 (SAWADA DAISUKE)
帝京大学・薬学部・准教授
研究者番号：00338691
杉山 亨 (SUGIYAMA TORU)
東京大学・総合文化研究科・助教
研究者番号：40242036