様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月　 ６ 日現在

機関番号：３２６２４
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ１５２３５

研究課題名（和文）カルシウム作用分離を指向したビタミンD誘導体の創製

研究課題名（英文）Design and synthesis of Vitamin D analogues for reduction of hypercalcemia.

研究代表者
石田　寛明（Ishida, Hiroaki）

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：７０７５５９７５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ビタミンD誘導体は医薬品として活用されている化合物以外にも数多くの高活性な誘導体が報告されている。しかし重篤な副作用として高カルシウム血症を併発することが問題となる。そこで本研究ではビタミンD受容体の新規アンタゴニストを創製して、カルシウム作用の分離を目指した誘導体の開発を目指した。その過程で共有結合型の分子の開発に成功し、X線結晶構造解析により、その結合様式を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
生体分子であるタンパク質と強力に結合する共有結合型の医薬品は、現在臨床で使用されているものもあるが、その多くは偶然の産物であり、意図して設計・開発された医薬品はごく最近になって上市されたものに限られる。
今回の研究成果として、X線結晶構造解析と有機化学的アプローチから共有結合型の新規ビタミンD誘導体を創製し、受容体の作用をコントロールするために必要な基礎的知見を得ることに成功した。この知見を基にして更なる誘導体を創製することで、受容体の作用発現をコントロールして、ビタミンD受容体のカルシウム作用を分離した治療薬開発への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Numerous highly active vitamin D derivatives have been reported in addition to compounds utilized as pharmaceuticals. However, a clinically significant side effect is hypercalcemia. Therefore, the author tried to create the new antagonists of the vitamin D receptor and to develop the derivatives aimed at the separation of calcium action. In the process, the author succeeded in developing the covalent ligands and elucidated its binding mode by X-ray crystallography.

研究分野：創薬化学

キーワード：ビタミンD受容体　核内受容体　共有結合モディファイア　アンタゴニスト　創薬化学　X線結晶構造解析

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

活性型ビタミン D である 1α,25-ジヒドロキシビタミン D_3（1,25D_3）とその誘導体は骨疾患に加えてガンや免疫疾患の治療薬として期待されている。しかし、ガンや免疫疾患に有効な量では高カルシウム血症を併発することから、作用分離された誘導体の開発が望まれる。また、核内受容体スーパーファミリーの一つであるビタミン D 受容体（VDR）の発見以来、作用メカニズムの解明に関する研究が急速に進展し、誘導体も数多く報告されてきたが、受容体構造と作用分離の関係については未だ不明な点が多い。

我々のグループでは、受容体構造を制御するリガンドを共結晶構造に基づき戦略的に創製し、受容体構造と各種作用発現の関係を明らかにする研究を行ってきた。その結果、22 位に n-ブチル基を導入することでブチル基を収容するキャビティを誘導し、受容体のポケット構造の制御が可能であることを見出した。さらに結晶構造に基づいてリガンドを設計して、予想した活性を示すアゴニスト及びアンタゴニストを創製することにも成功した。特に VDR アンタゴニストは骨パジェット病などのビタミン D 機能亢進症の治療薬として期待されているだけでなく、VDR 制御のメカニズム解明研究にも有用であり、カルシウム作用を分離した VDR リガンドの研究など基礎研究上のニーズも高まっている。しかし現在までに報告されたビタミン D 骨格を有するアンタゴニストは、我々のグループで見出した 2 系統を含めて 6 系統のみに限られている。

一般的に化合物は、酵素や受容体をはじめとする生体内のタンパク質との間に何らかの相互作用が生じることで生理活性もしくは生物活性を示す。タンパク質と化合物の相互作用については、超分子化学により体系的に研究されており、非共有結合性相互作用のみが関与している系の結合定数は最大で 10 pM^{-1} であるが、共有結合やキレート錯体を形成する系ではその 1000 倍近い結合能を示すとされている。つまり、標的タンパク質と共有結合して作用を発現する化合物は、従来の非共有結合性相互作用のみを有するものと比較して、作用が強力かつ持続性がある化合物になりうる。一方で共有結合能を示す構造（共有結合モディファイア）を含む化合物は標的以外のタンパク質と非特異的に共有結合を形成して予想外の活性や副作用を示す懸念があり、いかに標的タンパク質特異的に作用させるかが課題となる。

２．研究の目的

標的タンパク質に高い選択性を維持し、かつ共有結合形成により作用持続性を向上したアンタゴニストの創製が本研究の目的である。ビタミン受容体（VDR）との相互作用（水素結合、van der Waals 接触、立体相補性など）を保持し、VDR への特異性を高めるために、誘導体の基本骨格は活性型ビタミン D_3（セコ型）にする。その上で共有結合モディファイアを導入して、特異的相互作用と共有結合を両立する点が特色である（図 1）。

また合成したリガンド（化合物）を用いて、VDR-LBD（ligand binding domain; リガンド結合領域）との共結晶化により結合様式を明らかにして、リガンドの構造最適化を行う。さらに細胞を用いた実験により、遺伝子転写活性化能の評価を行い、カルシウム作用を分離したビタミン D 誘導体の創製を目指す。

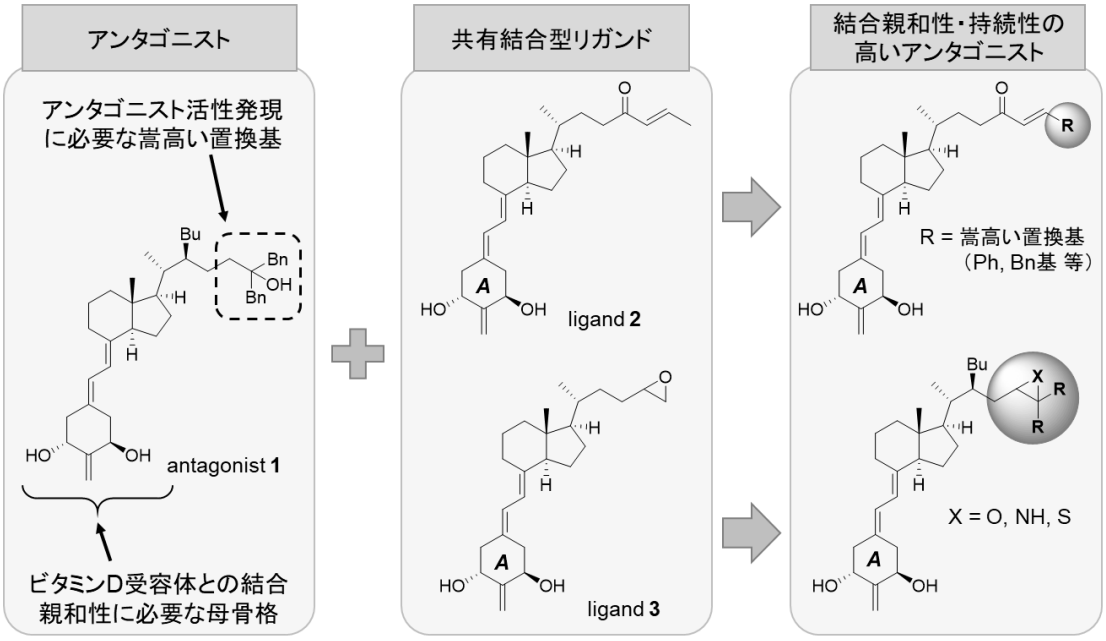


図1. 共有結合モディファイアを融合させたアンタゴニストの設計

３．研究の方法

（１）リガンドの設計

本研究では、我々のグループで見出したアンタゴニスト **1** と共有結合型リガンド **2**（*J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 6339.）および新たに設計したヘテロ小員環を有する **3** の構造を融合した独自のリガンド（誘導体）を創製する。すなわち、ビタミン D 骨格の側鎖末端にアンタゴニスト活性発現に必要な嵩高い置換基を配し、さらに共有結合モディファイアである Michael acceptor 基（エノン構造）や環ひずみを有するヘテロ小員環構造を導入する（図 1）。共有結合形成により、**1** の開発段階で課題点であった VDR への結合親和性や作用持続性の向上が実現できると考えており、2 つの機能を持った分子構造の融合による相加相乗効果を狙う。生物活性といった表現型を基盤とした誘導体創製ではなく、X 線共結晶構造解析による VDR の構造変化に基づいた誘導体の設計をするため、独自の新たな誘導体の開発が可能となる。

（２）リガンドの合成と共有結合モディファイアとしてのヘテロ小員環の反応性評価

図 1 に示した通り、ビタミン D 骨格は保持した上で、側鎖に共有結合モディファイアとしてヘテロ小員環を有するリガンドを合成する。さらにエポキシ環のジアステレオ選択合成を行い、立体化学による反応性の違い、およびアジリジン環やチイラン環等、他のヘテロ小員環の反応性を比較する。これにより、共有結合型リガンドとして最適な共有結合モディファイアを検討する。

（３）リガンドの共有結合能の評価

合成したリガンド、共有結合モディファイアの反応性の評価は、大腸菌を用いて発現し、精製したリコンビナントタンパク質（rVDR-LBD）を用いて、ESI 質量分析により実施する。すなわち各リガンドとタンパク質を混和後、タンパク質の質量を ESI 質量分析装置で経時的に測定し、分子量の変化を追跡することで、リガンドの共有結合能を評価する。また VDR との結合親和性はトリチウムラベル化された活性型ビタミン D との競合的結合実験により測定する。

（４）VDR との結合様式の解明

リコンビナントタンパク質（rVDR-LBD）と合成したリガンドの共結晶化を行い、X 線結晶構造解析により、共有結合様式の解明や VDR タンパク質の三次元構造の変化を明らかにする。これにより、リガンド構造と生物活性試験の相関を可視化することができ、さらなる誘導体合成へと展開可能となる。なお申請者は、タンパク質結晶などの X 線結晶構造解析が可能な構造生物学用ビームタイム（高エネルギー加速器研究機構、課題番号 2018G608, 2020G618、2022G588）を保有しており、より高精度な X 線回折の測定ができる。

（５）遺伝子転写活性化能の評価

遺伝子転写活性試験は COS-7 細胞、HEK293 細胞を用いたレポーターアッセイ（デュアルルシフェラーゼアッセイ）により行う。これにより、細胞内及び核内へのリガンドの移行性についても考慮した評価が可能である。

４．研究成果

（１）はじめに共有結合モディファイアとしてエポキシ基を選択し、そのジアステレオ選択的合成を検討した。化合物の疎水性を考慮して、モデル基質としてリトコール酸を選択してエポキシ基のジアステレオ選択的合成を行った（図 2）。すなわちリトコール酸から 5 段階の反応を経てエポキシ体 **4** を合成したのち、Jacobsen 触媒を用いた速度論的選択的加水分解反応に付して一方

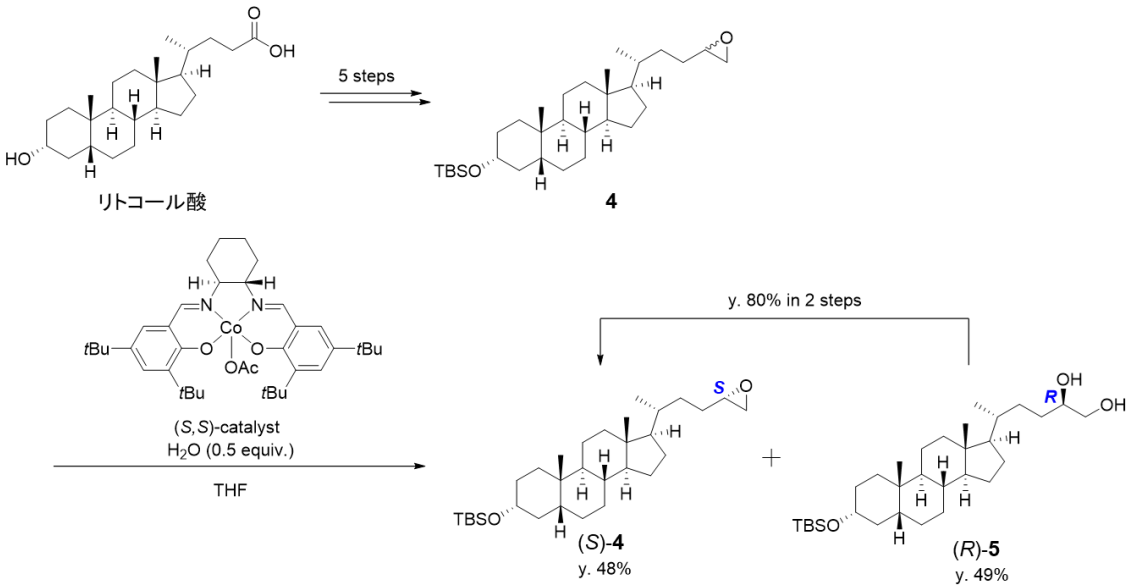
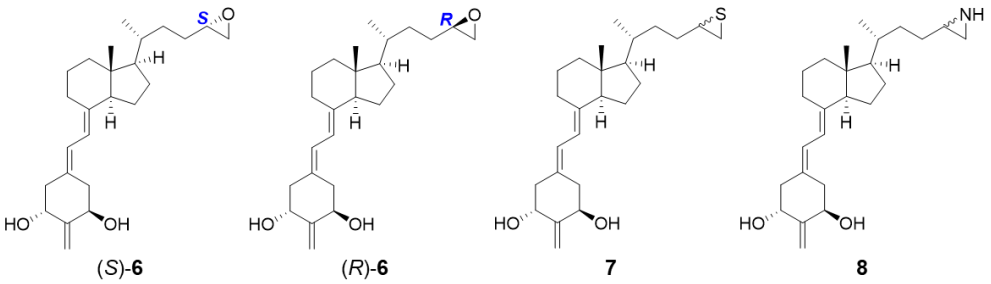


図2. モデル基質を用いたエポキシ基のジアステレオ選択的合成の検討

のジアステレオマーのみを加水分解した。なお、この反応はほぼ定量的に進行した。その後、開環したジオール体 **5** は 2 段階の変換により、立体化学の反転を伴って、所望の立体化学を有するエポキシ基に変換することに成功した。また用いる触媒を逆のエナンチオマーの触媒に置き換えることで、逆の立体化学のエポキシ体 **4** を得ることができた。これにより、炭素鎖のみ、かつ不斉合成に必要な足掛かりとなる構造がないビタミン D 誘導体の側鎖に対して、ジアステレオ選択的なエポキシ基の構築法を確立することに成功した。

（2）つづいて、モデル基質で確立した合成法に基づき、側鎖にヘテロ小員環を有するビタミン D 誘導体の合成を行い、以下の 4 つの誘導体を得た。エポキシ体はそれぞれのジアステレオマー (*S*)-**6**, (*R*)-**6** を合成し、アジリジン体 **7** とチイラン体 **8** はジアステレオマー混合物として創製した（図 3）。このうち、十分量供給できたエポキシ体(*S*)-**6**, (*R*)-**6** を用いて共有結合能の評価、及び VDR との結合様式の解明実験、遺伝子転写活性化能の評価を行った。



(*S*)-**6**　(*R*)-**6**　**7**　**8**

図3. 本研究で創製したビタミンD誘導体

（3）リガンド(*S*)-**6**, (*R*)-**6** について、ESI 質量分析による rVDR-LBD（apoVDR-LBD、MW:30557）との共有結合能の評価を行ったところ、20 ℃下ではいずれのリガンドも共有結合能を示さなかったが、ヒトの体温に相当する 37 ℃下では、(*S*)-**6** のみが 1 分子結合して共有結合能を示し、(*R*)-**6** はほとんど共有結合しないことが明らかになった（図 4）。この結果は、rVDR のリガンド結合ポケット内における化合物の立体配座が共有結合形成に影響していると想定されたため、X 線結晶構造解析により、その相互作用様式を明らかにすることにした。

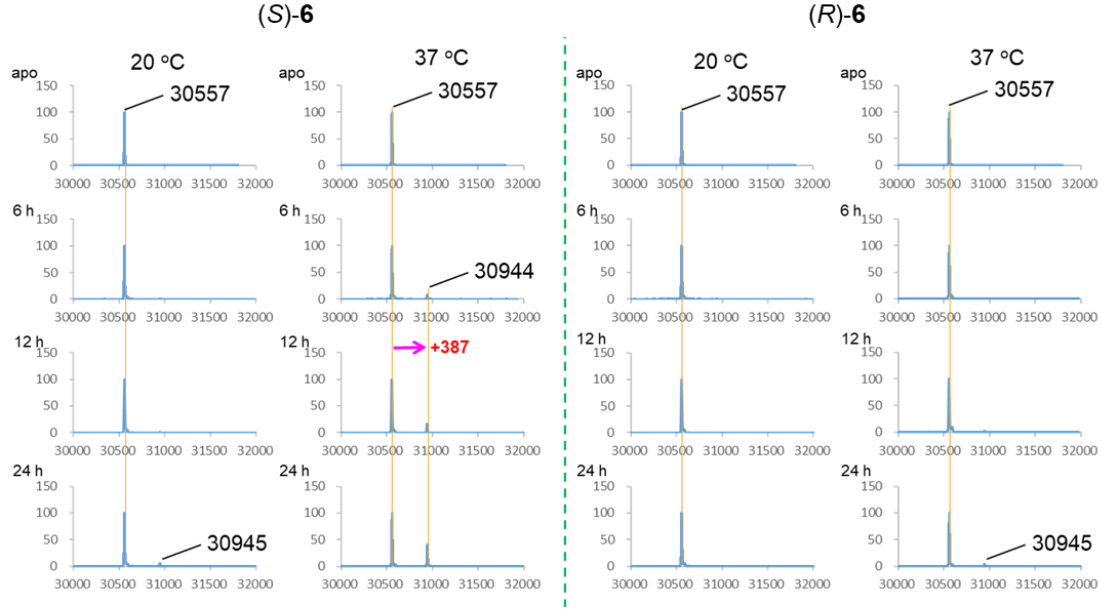


図4. ESI質量分析によるrVDR-LBDとの共有結合実験

またトリチウムラベル化された活性型ビタミン D との競合的結合実験により、VDR との結合親和性を測定した結果、1,25D_3（IC_{50} 0.73 nM）とエポキシ体 **6**（IC_{50} 9.20 nM）となり、合成したリガンドの結合親和性は約 10 分の 1 程度であった。しかし、nM オーダーの結合親和性を示したことから、リガンドとして十分な親和性を有していると考えている。

（4）つぎに rVDR のリガンド結合ポケット内における誘導体の相互作用様式を明らかにして、より効果的なリガンド創製に発展させるために、rVDR-LBD とエポキシ体 **6** の共結晶化を検討して、得られた結晶について、X 線結晶構造解析を行った。その結果、エポキシ基に関する各ジアステレオマーを用いたときは、いずれも VDR と共有結合した結晶構造を得ることができなかったが、予想外にも、ジアステレオマー混合物である **6** を用いた結晶化実験において、存在比

50%で共有結合を形成している共結晶構造を得ることに成功した（図 5）。この結果は、ESI 質量分析による共有結合実験と同じく、一方のジアステレオマーが優先して共有結合能を有する結果を支持していると言える。今後は非特異的な共有結合形成を避けつつ、リガンド結合ポケット内での反応性を高めるリガンド構造の設計を進める計画である。

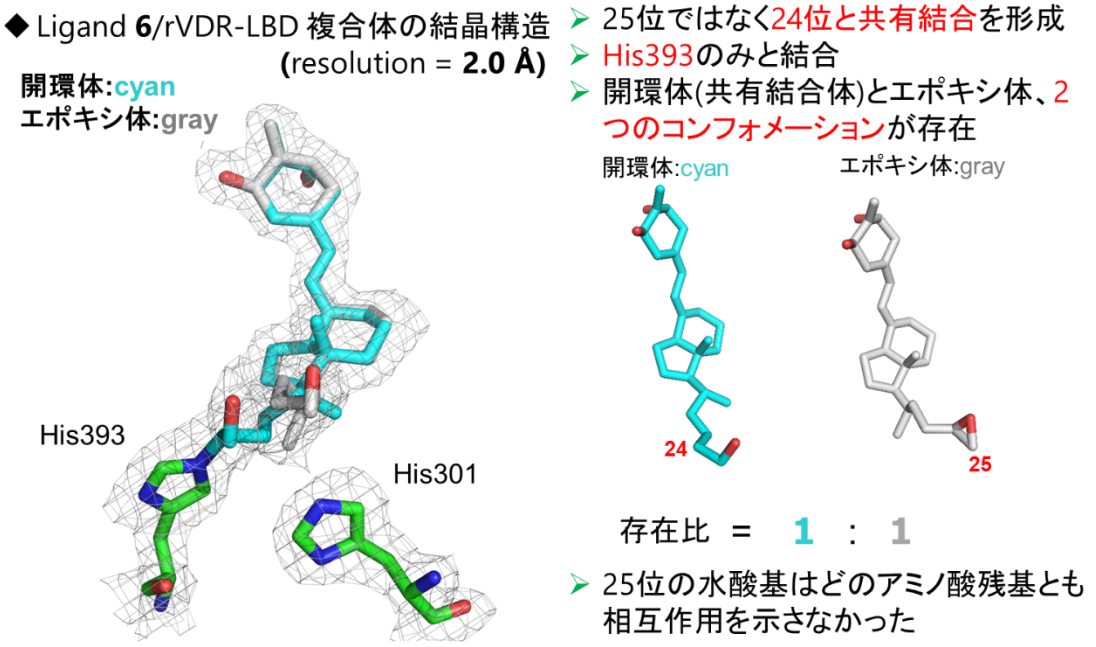


図5. rVDR-LBD/エポキシ体6のX線結晶構造解析

（５）また合成したエポキシ体(*S*)-**6**, (*R*)-**6** について、遺伝子転写活性化能の評価をレポーターアッセイ（デュアルルシフェラーゼアッセイ）により行った。その結果、(*S*)-**6** は EC_{50} 0.52 nM (efficacy 71%)、(*R*)-**6** は EC_{50} 1.2 nM (efficacy 85%)となり、1,25D_3 (EC_{50} 0.25 nM, efficacy 100%)と比較すると遺伝子転写活性化能は劣るものの十分なアゴニスト活性を示すことが明らかとなった。今後は、当初の研究計画に基づき、側鎖末端に嵩高い置換基を導入したリガンドを合成して、共有結合型アンタゴニストの創製を目指す計画である。

以上のように、カルシウム作用を分離した新規共有結合型アンタゴニストの開発には至らなかったものの、新規共有結合モディファイアとしてエポキシ基を導入したビタミン D 誘導体の創製を達成した。現在、本研究で得られた相互作用様式に基づき、新規共有結合型リガンドの創製に取り組んでおり、遺伝子転写能の調節が自在にできるリガンド開発を目指す。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Yano Tetsuya、Yamada Takahiro、Ishida Hiroaki、Ohashi Nami、Itoh Toshimasa	４．巻 14
２．論文標題 2-cyanopyridine derivatives enable N-terminal cysteine bioconjugation and peptide bond cleavage of glutathione under aqueous and mild conditions	５．発行年 2024年
３．雑誌名 RSC Advances	６．最初と最後の頁 6542～6547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D4RA00437J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Sekine Miyu、Ishida Hiroaki、Itoh Toshimasa	４．巻 12
２．論文標題 Synthesis of Triazolo[c]coumarins and Differences in the Fluorescence Properties of Their Isomers	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Asian Journal of Organic Chemistry	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajoc.202300013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Kojima Hiroyuki、Yanagi Ryota、Higuchi Eri、Yoshizawa Mami、Shimodaira Tomoyuki、Kumagai Misaki、Kyoya Tatsuhiro、Sekine Miyu、Egawa Daichi、Ohashi Nami、Ishida Hiroaki、Yamamoto Keiko、Itoh Toshimasa	４．巻 66
２．論文標題 Covalent Modifier Discovery Using Hydrogen/Deuterium Exchange-Mass Spectrometry	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	６．最初と最後の頁 4827～4839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.2c01986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Ishida Hiroaki、Homma Shoya、Kasuga Ryota、Yamamoto Keiko、Itoh Toshimasa	４．巻 70
２．論文標題 Synthesis of Tetrahydrofuro[2,3-d]oxazoles and Oxazoles by Hypervalent Iodine (III)-Promoted [2+2+1] Annulation	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	６．最初と最後の頁 192～194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c21-01001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計17件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名
関根 美夢、石田 寛明、伊藤 俊将

２．発表標題
Huisgen 環化反応を用いたクマリン骨格構築法の開発

３．学会等名
日本アカデミック・ディテーリング研究会 第1回学術大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
京谷 竜宏、石田 寛明、齋藤 俊昭、伊藤 俊将

２．発表標題
歪を持たないアルキンでも穏和な条件下メタルフリーで Huisgen 環化反応が進行する

３．学会等名
日本アカデミック・ディテーリング研究会 第1回学術大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
矢野 哲也、山田 孝博、石田 寛明、伊藤 俊将

２．発表標題
シアノピリジンと生体分子の共有結合性に関する研究

３．学会等名
日本アカデミック・ディテーリング研究会 第1回学術大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
石田 寛明、岩本 遊磨、本間 翔也、伊藤 俊将

２．発表標題
超原子価ヨウ素反応剤によるオキサゾール合成を活用したPPARリガンドの合成と遺伝子転写活性化能の評価

３．学会等名
第66回日本薬学会関東支部大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
関根美夢、石田寛明、伊藤俊将

２．発表標題
Huisgen環化反応を用いた三環性クマリンの合成法の確立とその応用

３．学会等名
第66回日本薬学会関東支部大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
京谷 竜宏、石田 寛明、齋藤 俊昭、伊藤 俊将

２．発表標題
エチニルスルホンアミドは金属フリーHuisgen環化反応が進行する

３．学会等名
第66回日本薬学会関東支部大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
石田 寛明、小澤 穂奈実、伊藤 俊将

２．発表標題
ビタミンD受容体を標的としたヘテロ小員環を有する共有結合型リガンドの合成

３．学会等名
日本薬学会第143年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
京谷 竜宏、石田 寛明、齋藤 俊昭、伊藤 俊将

２．発表標題
エチニルスルホンアミドの共役付加反応と金属フリーHuisgen環化反応に関する研究

３．学会等名
日本薬学会第143年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
関根美夢、石田寛明、伊藤俊将

２．発表標題
トリアゾール型三環性クマリン誘導体の合成と蛍光特性の評価

３．学会等名
日本薬学会第143年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
吉澤 麻美、清水 恵理、大橋 南美、石田 寛明、山田 孝博、伊藤 俊将

２．発表標題
VDRを活性化する金属錯体

３．学会等名
日本薬学会第143年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
矢野 哲也、山田 孝博、石田 寛明、大橋 南美、伊藤 俊将

２．発表標題
シアノピリジン誘導体を用いたシステイン選択的ペプチド結合切断反応の開発と反応機構の解明

３．学会等名
日本薬学会第143年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
大橋 南美、三浦 有里未、石田 寛明、伊藤 俊将

２．発表標題
スルホンアミド型4-oxoDHAのPPARγリガンドとしての評価

３．学会等名
日本薬学会第143年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
石田 寛明、本間 翔也、春日 良太、山本 恵子、伊藤 俊将

２．発表標題
超原子価ヨウ素反応剤を用いた新規フロオキサゾール合成法に関する研究

３．学会等名
日本薬学会第142年会

４．発表年
2022年

１．発表者名
京谷 竜宏、石田 寛明、齋藤 俊昭、伊藤 俊将

２．発表標題
熱も金属も歪みも必要としないHuisgen環化反応

３．学会等名
日本ケミカルバイオロジー学会　第17回年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
大橋 南美、三浦 有里未、石田 寛明、伊藤 俊将

２．発表標題
スルホンアミド型DHA誘導体のPPARγリガンドとしての評価

３．学会等名
日本ケミカルバイオロジー学会　第17回年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
石田 寛明、五十嵐 良樹、阿部 笑里、京谷 竜宏、伊藤 俊将

２．発表標題
分子内塩基アシスト型共有結合モチーフの開発研究

３．学会等名
日本薬学会第144年会

４．発表年
2024年

１．発表者名 京谷 竜宏、石田 寛明、齋藤 俊昭、伊藤 俊将
２．発表標題 求核性アミノ酸に対するエチニルスルホンアミドの反応性に関する研究
３．学会等名 日本薬学会第144年会
４．発表年 2024年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関