

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790021

研究課題名（和文） VDR リガンド結合領域との相互作用を制御する作用選択薬の創製

研究課題名（英文） Syntheses of novel ligands regulating the interaction with VDR-LBD

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

研究成果の概要（和文）：CD 環を化学修飾したビタミン D 誘導体として、収束的な合成法により、いくつかの新しい 15 位置換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、VDR-リガンド複合体の X 線共結晶構造解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Convergent syntheses of several vitamin D analogs with a 15-substituent at CD-ring 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 X-ray crystallographic analysis of the complex with human VDR ligand binding domain have been also studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

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：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 D<sub>3</sub> 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。我々は骨粗鬆症、乾癬、および大腸癌、乳癌、前立腺癌などのビタミン D とかわりの深い癌疾患、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。これまでに報告されている 3000 余りのビタミン D アナログは、17 位側鎖の構造修飾体を中心であるが、A 環の構造修飾によっても薬動学的性質、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がわかっており、その中で我々は、A 環 2 位修飾体を系統的に合成、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 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] 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、タンパク質表層まで続く 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おり、我々は合成した 2 $\alpha$  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) に変化が起こるため、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することとした。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、多彩な生理作用を有するビタミン D の誘導体合成として、セコステロイド骨格では世界初の 15 位置換体の合成を主とした CD 環の化学修飾について検討し、A 環の構造修飾などと組み合わせる同時修飾した誘導体をも含む様々なリガンドの系統合成、得られたリガンドの活性評価試験 (主に骨に対する作用)、代謝過程の解明、そして受容体との X 線共結晶構造解析による複合体におけるリガンドと受容体ヘリックス群の位置関係の確認、その位置と生物活性との関係についての考察を体系的に行うことにより、医薬品のリード化合物として展開可能な、理想的な生物活性、作用選択性を示す新

規ビタミン D 誘導体を創製し、初の VDR モジュレーター獲得を目的とする。

## 3. 研究の方法

セコステロイド CD 環の化学修飾として、まず 15 $\alpha$ -ヒドロキシ体の合成中間体を基に 15 位置換誘導体の系統合成に着手した。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の確立を目指した。

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 (例えば 15 位修飾) 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。

15 $\alpha$ -ヒドロキシ体の合成における CD 環前駆体の合成ではビタミン D<sub>2</sub> より誘導した *trans*-ヒドリندان骨格を有する化合物を出発物質とし、アルケニルエポキシドに変換した後、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 側鎖に相当するユニットの銅試薬を作用させ、S<sub>2</sub>2' 型の炭素-炭素結合形成反応により重要な合成中間体へと導いている。本反応により立体選択的な 20 位の側鎖導入と共に、エポキシドの開環に伴い 15 $\alpha$  水酸基を得ている。15 $\alpha$  水酸基を保護した後、C16-17 位間アルケンの立体選択的な還元、8 位水酸基のシリル基の脱保護、酸化を経て、目的の CD 環前駆体の合成に成功している。また途中水素添加反応を行わなければ、近年抗がん活性で注目される 16-ene 型誘導体が合成可能である。

ここで得られた CD 環前駆体の絶対配置は、まず 15 位については、合成中間体より導いたアセテートの単結晶 X 線結晶構造解析により決定した。さらに最終的にヒト VDR との X 線共結晶構造解析により確認した。

また、17 位および 20 位については、15 $\alpha$  水酸基を Barton-McCombie 法により除去するなどした後、別途ビタミン D<sub>3</sub> より誘導したものと各種分光データと比較し、一致したことにより決定した。

本合成ルートにおける 20 位での炭素-炭素結合形成反応では、始めに導入しておくアルキル鎖 (R<sup>1</sup>)、アルキル化の反応条件、用いるアルキル化試薬 (R<sup>2</sup>) を巧みに使い分けることにより、様々な側鎖を導入することができる。例えば R<sup>1</sup> としてメチル基を導入しておき、R<sup>2</sup> としてジメチル銅試薬等を用いれば、短炭素鎖の 17 位側鎖をもつ前駆体を、R<sup>1</sup> として活性型ビタミン D<sub>3</sub> 側鎖を始めに導入しておき、R<sup>2</sup> として後からジメチル銅試薬を作用させれば 20-*epi* 型前駆体を、あるいは活性型ビタミン D<sub>3</sub> 側鎖ユニットの銅試薬を用いれば Gemini 型前駆体を容易に得ることが可

能である。また、20位天然型と同様に、合成中間体において水素添加反応を行わなければ、それぞれ16-ene型前駆体も合成可能である。

合成した各種CD環部位はA環部位と組合せ、修飾のハイブリッド効果についても検討を行った。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、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D<sub>3</sub>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う。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する。さらに1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>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する。

#### 4. 研究成果

研究期間全体を通じて、CD環を化学修飾したビタミンD誘導体として、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、いくつかの新しい15位置換誘導体の合成を達成した。また合成ルートの途中で用いる反応を変えることで、近年抗がん活性で注目される別の誘導体も合成することができた。さらに15位アルキル置換誘導体についてもまだ限定された構造ではあるものの、その合成を達成した(図1)。

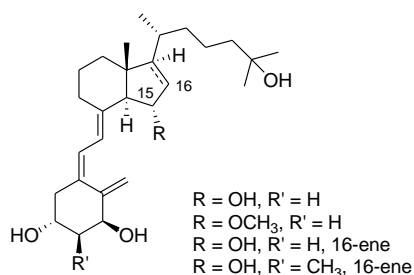


図1 合成した15位置換ビタミンD誘導体

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、VDR-リガンド複合体のX線共結晶構造解析を行うことができ、それら誘導体における構造と活性の関係をVDR-リガンド複合体のレベルで考察することができた。

研究期間後半では、ビタミンD誘導体における構造修飾のハイブリッド効果について考察するために、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 $\alpha$ -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により切断されることが分かった。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(図2)。

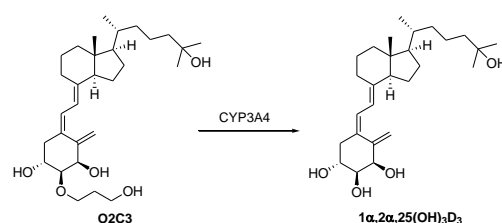


図2 2 $\alpha$ -ヒドロキシプロポキシ基のCYP3A4による代謝

ビタミンD誘導体の15位置換についてはこれまでに報告例がなく、本研究課題の成果は、ビタミンD誘導体の新しい修飾部位として15位置換の可能性を提案し、VDRモジュレーターの候補化合物獲得に貢献するものである。また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CD環修飾リガンドのうち、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

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計7件)

① 高野真史、2 $\alpha$ -(3-ヒドロキシプロポキシ)活性型ビタミンD<sub>3</sub>の代謝物の同定、日本薬学会第133年会、2013年3月28日、パシフィコ横浜(神奈川県)

② 高野真史、Synthesis of 1 $\alpha$ ,25,25-Trihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Major Metabolite of 2 $\alpha$ -(3-Hydroxypropoxy)-1

$\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by CYP3A4、チトクロム P450 発見 50 周年記念シンポジウム、2012 年 12 月 3 日、九州大学コラボレーション I・II (福岡県)

③高野真史、2 $\alpha$ -アルコキシ置換活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の代謝と合成研究、第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2012 年 11 月 29 日、タワーホール船堀 (東京都)

④高野真史、2 $\alpha$ -ヘテロアラキル活性型ビタミン D<sub>3</sub> の合成と生物活性:2 $\alpha$  側鎖長の研究、第 42 回複素環化学討論会、2012 年 10 月 12 日、京都テルサ (京都府)

⑤高野真史、ヒト由来 CYP24A1 抵抗性ビタミン D 誘導体合成と ATRA 耐性 APL 細胞分化誘導、日本ビタミン学会第 64 回大会、2012 年 6 月 22 日、長良川国際会議場 (岐阜県)

⑥高野真史、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の 2 $\alpha$  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 29 日、北海道大学 (北海道)

⑦高野真史、2 $\alpha$  位にアゾール環側鎖を有する活性型ビタミン D<sub>3</sub> 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 5 日、安田女子大学 (広島県)

## 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