

論文題目「新規ビタミン D 誘導体の設計・合成と活性評価」

工学研究科応用化学専攻

伊部 公太

[博士学位論文要約]

活性型ビタミン D₃ (1 α ,25(OH)₂-VD₃)は、生体内の血清カルシウムの恒常性維持や骨形成、さらには、がん細胞に対する増殖抑制効果など、多くの生理活性作用を持つことが知られている。一方、これを治療薬として用いる場合、高カルシウム血症などの副作用が惹起されることも同時に報告されており、非カルシウム作用 (増殖抑制・分化誘導作用など)のみを発揮するビタミン D 誘導体開発が行なわれてきた。実際に、乾癬症、副甲状腺機能亢進症、骨粗鬆症治療薬としてのビタミン D 誘導体が医薬品として上市されている。これらビタミン D 誘導体は、ビタミン D 骨格の側鎖や A 環部を修飾したものがほとんどを占める。

近年では、ビタミン D 骨格を簡略化した誘導体や全てが芳香族骨格で構築された、従来のステロイド骨格を持たない誘導体においても、ビタミン D 作動薬として機能することが報告されている。これらの報告例から、必ずしも従来のビタミン D 骨格は必要でなく、その 1, 3, 25 位 (steroid numbering)に位置する水酸基と屈曲した脂溶性構造を有することで、ビタミン D 受容体タンパク質 (Vitamin D Receptor: VDR)に対する一定の結合能が得られることが示唆され、これによりビタミン D 誘導体の開発領域は大きな広がりを見せている。

以上の背景から、本研究では、多様な新規ビタミン D 誘導体からなるライブラリーの構築を行い、作用分離性の高い薬剤開発のプラットフォームの創生を目指した。新規誘導体ライブラリーは、ビタミン D 骨格の C,D 環部を修飾した、16-oxa 型ビタミン D 誘導体と *des*-D 型ビタミン D 誘導体の構造設計と合成、そして、これら誘導体の *in vitro* での VDR 結合能評価による構築を計画した。本学位論文は、以下の六章から構成される。

第一章では、ビタミン D 誘導体の研究背景を基に、C,D 環部を修飾した誘導体、即ち、C,D 環部 16 位を酸素原子に置換した 16-oxa 型ビタミン D 誘導体と D 環部を廃した

des-D 型ビタミン D 誘導体の構造設計を行った。これら新規誘導体の構造設計には、AutoDock Vina™ program を用いたビタミン D 受容体タンパク質 (VDR) とのドッキングシミュレーションを取り入れた。このドッキングシミュレーションでは、公共のプラットフォームにデータ構築されている任意の VDR と新規ビタミン D 誘導体との親和性を計算し、既存のビタミン D 誘導体との overlap model を比較することで、新規ビタミン D 誘導体の VDR に対する結合能のシミュレーションを行う。ドッキングシミュレーションの結果、幾つかの誘導体候補で、一定の VDR 親和性と既存のビタミン D 誘導体と同等の空間配置を有する overlap model が得られた。これらシミュレーション結果を基に、16-oxa 型ビタミン D 誘導体と *des*-D 型ビタミン D 誘導体の合成を計画した。

第二章では、新規ビタミン D 誘導体の構築に必要な共通 A 環部ユニットの合成と、これの天然型 C,D 環部とのカップリング反応を用いたコンバージェント法によるビタミン D 骨格構築の検討を行った。A 環部ユニットは、当研究室で開発されている合成法により、数種類のユニット調達を行った。合成した A 環部ユニットは、天然型 C,D 環部との Suzuki-Miyaura Cross Coupling 及び Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) Reaction により $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-VD}_3$ や $19\text{-nor-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-VD}_3$ などの誘導体構築が可能であった。

第三章では、ビタミン D 骨格の 16 位を酸素原子に置換した、16-oxa 型ビタミン D 誘導体の合成を行った。16-oxa 型 C,D 環部ユニットは、エンイン型中間体と四価のチタンアルコキシドの二当量の Grignard 反応剤から発生する二価チタン反応剤との反応による、チタナサイクル中間体を經由したチタン環化反応と、続く CuCN を触媒としたアリルブロミドとの反応によるアリル化反応によるトリエン化合物の合成を鍵反応とした構築を行った。合成したトリエン化合物は、閉環メタセシス反応 (RCM) と部分接触水素化反応、側鎖ユニットの導入を行うことで双環状化合物を合成。続く、ブromoヒドリシ化反応により得られるエポキシ体の低原子価チタン種による立体選択的なラジカル還元反応により、16-oxa 型となる *trans*-ヒドロインダン骨格を経て、2 級アルコールの酸化反応と Wittig-olefination により、A 環部とのカップリング反応に対応した 16-oxa 型 C,D 環部ユニットを合成した。この 16-oxa 型 C,D 環部ユニット

は第二章にて調達した A 環部ユニットとのカップリング反応と脱保護反応を行うことで, 16-oxa 型ビタミン D 誘導体の合成を達成した。

第四章では, D 環部を廃した *des*-D 型ビタミン D 誘導体の合成を行った。*des*-D 型 C 環部ユニットは, β -アリールシクロヘキセノンの不斉還元により光学活性アルコール体を合成し, 接触水素化, 2 級アルコールの酸化, α -methyl 基の異性化, Wittig-olefination により, A 環部ユニットとのカップリング反応に対応した *des*-D 型 C 環部ユニットを合成した。この *des*-D 型 C 環部ユニットは第二章にて調達した A 環部ユニットとのカップリング反応と脱保護反応を行うことで, *des*-D 型ビタミン D 誘導体のライブラリー構築を行った。

第五章では, 第三章, 第四章にて合成した新規ビタミン D 誘導体の *in vitro* での VDR 結合能評価を行った。VDR 結合能評価には, 蛍光偏光ビタミン D 受容体競合アッセイ (fluorescence polarization vitamin D receptor competitor assay (PolarScreenTM, Invitrogen))と時間分解蛍光共鳴エネルギー転移ビタミン D 受容体コアクチベーターアッセイ (time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) VDR co-activator assay (LanthaScreen[®], Invitrogen))の 2 種類のアッセイシステムを用いた。

蛍光偏光ビタミン D 受容体競合アッセイは, 完全長ヒト VDR (無標識)と蛍光リガンド (FluoromoneTM VDR Red)の複合体に対して, 新規ビタミン D 誘導体を加え, 照射した偏光を蛍光リガンドを介して観測することで, VDR に対する親和性を評価するアッセイ系である。16-oxa 型ビタミン D 誘導体を対象とした評価の結果, すべての誘導体で一定の偏光値の減少が得られたことから, これら新規誘導体が VDR に対する親和性を有することが証明された。

時間分解蛍光共鳴エネルギー転移ビタミン D 受容体コアクチベーターアッセイは, GST タグを介してテルビウム (Tb)キレート標識された VDR に対して擬似的に co-activator として作用する短鎖ペプチド (Fluorescein peptide)と新規ビタミン D 誘導体を加え, これらの複合体が形成された時に起こる FRET (蛍光共鳴エネルギー転移)を観測することで, VDR に対する結合能を評価するアッセイ系である。16-oxa 型及び *des*-D 型ビタミン D 誘導体を対象とした評価の結果, 一部誘導体の VDR 結合能 (EC₅₀)

値)が $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-VD}_3$ と比較して、約 3~4 倍濃度で得られた。よって、これら新規誘導体は十分に VDR 結合能を持つと結論付けた。そしてこの結果は、新規誘導体の構造設計に用いたドッキングシミュレーションとも一定の相関が取れる結果であり、この種の研究領域に関しては AutoDock Vina™ program の有用性も証明されつつある。

第六章は、本研究の総括である。本研究では、新規ビタミン D 誘導体となる 16-oxa 型ビタミン D と *des-D* 型ビタミン D の誘導体ライブラリーの構築を行い、これら誘導体が VDR に対して十分な結合能を有することを見出した。これら誘導体は、ビタミン D の基本骨格を新規にしたものであり、A 環部や側鎖のさらなる誘導化と組み合わせると、多様な新規誘導体からなるライブラリーの構築が可能である。即ち、今後の作用分離性の高い薬剤開発のプラットフォームを創生したものとして評価できると考えている。

以上