

皮膚疾患に有効な新規骨格を有するビタミンD誘導体の創製

お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系

棚谷 綾

Active vitamin D₃ (**1**) plays important roles in many physiological processes, including calcium and phosphate homeostasis, bone metabolism, and immune regulation, via binding to vitamin D nuclear receptor (VDR). Since VDR is involved in the pathogenesis of various diseases, many VDR ligands have been developed as candidate therapeutic agents. Structurally, almost all of the developed VDR ligands with high potency have the same secosteroidal skeleton, while non-secosteroidal VDR ligands are promising candidates for many clinical applications. In this study, we synthesized several derivatives of lithocholic acid (**2**) that was identified as the second endogenous VDR agonist. Novel compounds were designed by using a lithocholic acid derivative **4** with potent vitamin D activity as the lead compound. Among compounds **3–7** with a different 3-substituent, the compound **5** was more potent inducer of the HL-60 cell differentiation than the lead compound **4**. The SAR study indicated the size and shape of 2-ethyl-2-hydroxy-1-butyl group as the 3-substituent are proper for potent activity. Then, the replacement of the carboxyl group of compound **4** with other functional group was examined. The compounds **8–10** bearing the amide group in the side chain were as potent as active vitamin D₃ (**1**). Further, compounds **11** and **12** with acyclic 1, 3-diol structure, instead of the carboxyl group of compound **4** also showed potent activity in HL-60 cell assay. Since these novel lithocholic acid derivatives are one of the most potent non-secosteroidal VDR agonists reported to date, and would have unique vitamin D functions and different pharmacological properties, compared with the conventional vitamin D derivatives, they would be promising lead for development of novel drug candidates.

1. 緒言

脂溶性ビタミンに属するビタミンD₃は、生体内で代謝を受けて活性型ビタミンD₃ (1 α , 25-ビタミンD₃, **1**, 図1a) となり、特異的核内受容体VDR (Vitamin D receptor) に結合することで、カルシウムやリンの代謝調節や恒常性、骨の形成などを担う生体内分子である¹⁾。皮膚疾患の領域では、ビタミンD₃誘導体が乾癬の特効薬として用いられている。乾癬はケラチノサイトの異常な増殖、分化を特徴とする皮膚疾患であり、近年、その理解が深まるにつれ、ビタミンD₃の細胞分化誘導作用や表皮細胞増殖抑制作用ばかりでなく、炎症や免疫機能に対する役割が注目されるようになり、ビタミンD₃の持つ抗炎症作用や免疫機能制御に基づく皮膚の健康増進、皮膚疾患治療への応用が期待されている。

これまで、皮膚疾患や骨疾患治療薬開発を目的に多くのビタミンD₃誘導体が創製されてきたが、臨床応用された化合物も含めて高活性誘導体はほとんどすべて、天然の活性型ビタミンD₃ (**1**) と同じセコステロイド骨格を有している。セコステロイド骨格は、化学合成が煩雑で、化学的安定性も低く、取り扱いが難しい。そのため、セコステロ

イド骨格を持たない、新しい骨格を有するビタミンD誘導体の創製が望まれているが、高活性な非セコステロイド型誘導体としては、米国リグンド社が開発したジフェニルメタン誘導体²⁾と筆者ら(東京医科歯科大学との共同研究)が開発したホウ素クラスター含有ビタミンD₃誘導体^{3,4)}など数種に限られている(図1b)。本研究では、以上の背景をもとに、皮膚疾患に対する新たなビタミンD療法の開発基盤の構築を目指し、新規非セコステロイド型ビタミンD誘導体の創製を行った。

2. 方法 —分子設計—

2002年にMakishimaらによって二次胆汁酸であるリトコール酸(**2**, 図2)がVDRの第二の内因性リグンドであることが同定された⁵⁾。しかし、リトコール酸(**2**)のビタミンD活性は、活性型ビタミンD₃ (**1**) と比べると数千分の一程度と、非常に弱く、また、高活性なリトコール酸誘導体の報告はなかった⁶⁻⁸⁾。筆者らは、リトコール酸(**2**)とVDRリグンド結合領域との複合体の結晶構造の解析⁹⁾をもとに、リトコール酸の3位水酸基を化学修飾した化合物**3**および**4**(図2)を分子設計、合成したところ、ヒト白血病細胞HL-60の分化誘導活性において、化合物**4**がリトコール酸(**2**)の数千倍で、1 α , 25(OH)₂D₃よりも高い活性を有するを見いだした¹⁰⁾。一方で、化合物**4**の血中からの消失が著しく速く、体内動態の改善が必要であることが示唆された。そこで、化合物**4**をリード化合物として、更なる構造展開を図ることとし、まず、化合物**5–7**を合成して3位置換基の構造活性相関を明らかとし、次いで、側鎖カルボキシ基を化学変換した化合物**8–12**を設計、合成した。



Development of Novel Vitamin D Derivatives with Clinical Utilities in the Field of Skin Diseases

Aya Tanatani

Ochanomizu University

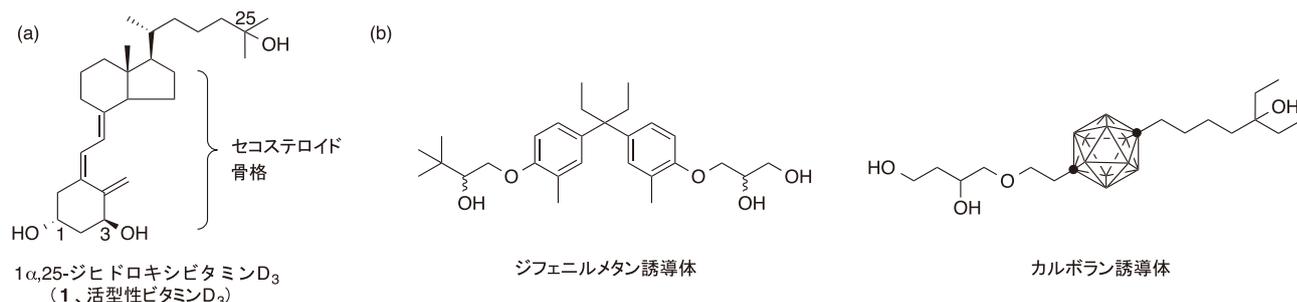
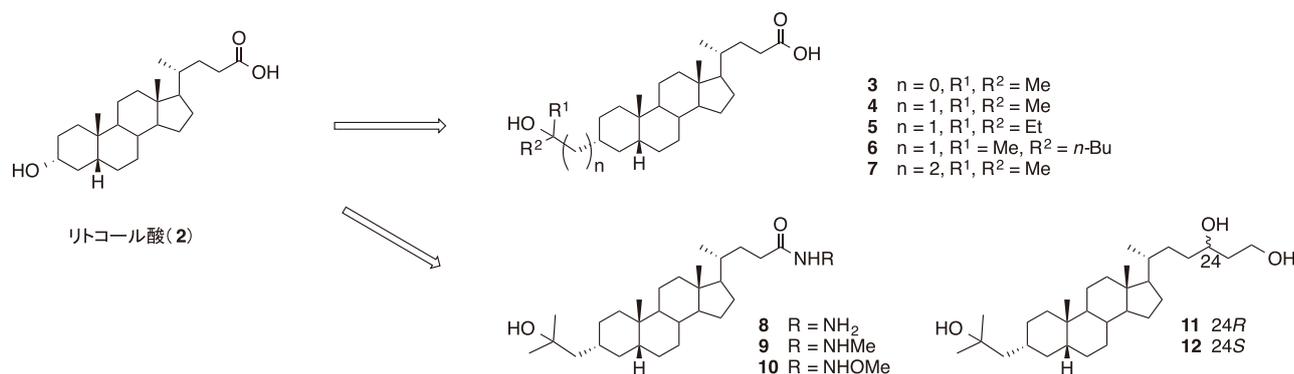
図1 (a) 活性型ビタミンD₃、(b) 高活性非セコステロイド型ビタミンD₃誘導体の構造

図2 リトコール酸および本研究で創製した誘導体の構造

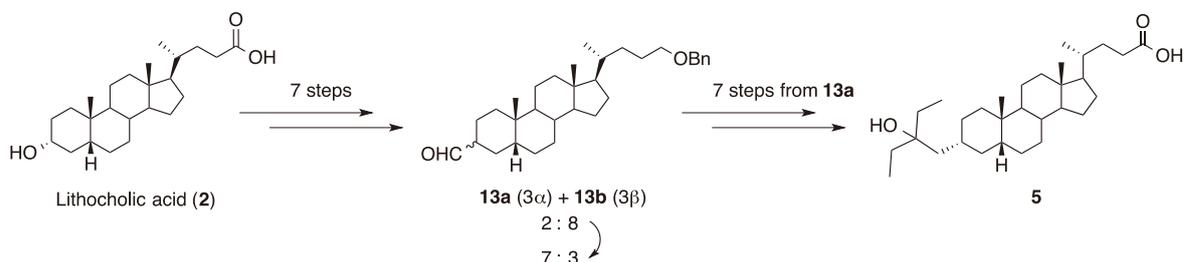


図3 化合物5の合成(概略図)

3. 結果

3.1. 合成

化合物5は、リトコール酸(2)を出発原料として、まず側鎖カルボキシ基の還元、保護を行った後、3位の化学変換により合成した(図3)。鍵化合物である3位にアルデヒド基を有する化合物13は3位の立体がα体とβ体の混合物として得られ、望みの3α体の比率は約20%であった。本混合物をメタノール-THF中で炭酸カリウム処理することで混合比を変えることができ、3α体の比率を約70%とすることができた。これらの異性体はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離することができ、生成したアルデヒド13aを用いて化合物5へと導いた。化合物6および7も同様の方法で合成を達成した。なお、化合物6は3位置換基中に不斉炭素を1つ持っており、異性体の混合物として活性評価に用いた。

化合物3の側鎖カルボキシ基は化合物のADMEに大きく関わると考えられるので、その誘導体として、まずアミド誘導体8~10を合成した。化合物4をリトコール酸(2)より15工程で合成した後、メチルエステルとしてからアンモニアもしくはメチルアミンと反応させて、それぞれ化合物8、9を合成した。また化合物3をクロロギ酸エチルにより酸無水物とした後、O-メチルヒドロキシルアミンと反応させて化合物10を得た(図4)。

リガンド社のジフェニルメタン誘導体や筆者らのカルボラン誘導体(図1)では、非環式ジオール構造が活性型ビタミンD₃(1)の環状ジオール構造に対応すると考えられている。一方、リトコール酸(2)とVDRリガンド結合領域との複合体の結晶構造では、リトコール酸(2)のカルボキシ基は活性型ビタミンD₃(1)の環状ジオール構造の代替となっており、VDRのアミノ酸残基と水素結合を形成している。そこで、リトコール酸誘導体4のカルボキシ基を非環式1,

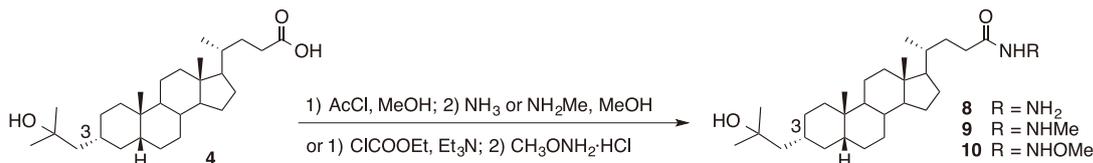


図4 化合物 8 ~ 10 の合成

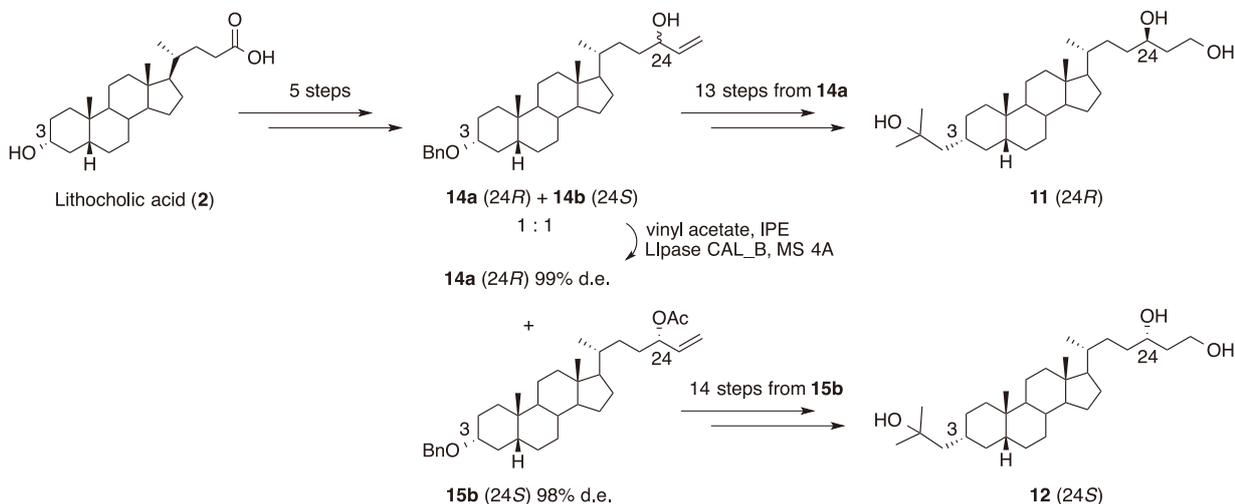


図5 化合物 11、12 の合成

3-ジオール構造に変換した化合物 **11**、**12** を合成した。リトコール酸 (**2**) を出発原料として、5工程で鍵中間体であるアルコール体 **14** へと導いた (図5)。化合物 **14** は24位の立体化学の異なる異性体の1:1の混合物として得られたため、**14** および化合物 **11**/**12** 合成までの中間体の各ステップで異性体の分離を試みたが、いずれの段階でも分離することはできなかった。そこで、化合物 **14** の酵素を利用したアセチル化を種々検討したところ、リパーゼとして CAL_B を用いることで、選択的に24S体のみがアセチル化されることがわかった。精製した化合物 **14a** から13工程で化合物 **11** を、アセチル化体 **15b** から14工程で化合物 **12** を合成することができた。化合物の24位の立体化学については、X線結晶構造解析により決定し、リパーゼの反応性から予想される立体構造と一致していることがわかった。

合成した化合物の構造および純度は、¹H NMR、¹³C NMR、質量分析により確認した。

3.2. 活性評価

合成した化合物のビタミンD活性は、ヒト急性前骨髄球性白血病細胞 HL-60 に対する分化誘導能により評価した。リトコール酸 (**2**) は、この試験濃度範囲ではビタミンD活性を示さなかった。今回合成した誘導体はいずれも細胞分化誘導活性を有していた。リード化合物である化合物 **4** は活性型ビタミンD₃ (**1**) よりも強い細胞分化誘導活性を

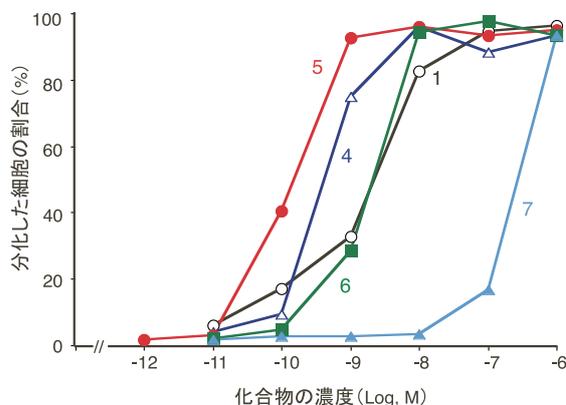


図6 3位修飾体 4 ~ 7 の HL-60 細胞分化誘導活性

持っていた。3位置換基の炭素鎖の長さの違う化合物の比較では、化合物 **4** よりも炭素鎖が1つ長い化合物 **7** では大きく活性が低下した。合成した化合物の中では、化合物 **5** が、活性型ビタミンD₃ (**1**) やリード化合物 **4** よりも高い活性を示した。水酸基の付け根の炭素についているアルキル基としてはエチル基が最適と思われ、化合物 **4** の持つ2つのメチル基のうち1つを *n*-ブチル基に変えた化合物 **6** は活性が若干低下した (図6)。

化合物 **4** のカルボキシ基をアミドに変えた化合物 **8** ~ **10** は、いずれもリード化合物 **4** の活性よりは低いものの、活性型ビタミンD₃ (**1**) と同等の活性を有していた (図7a)。一方、カルボキシ基をジオール構造に変えた化合物 **11** ~

12では若干活性は低下したものの、高い細胞分化誘導活性を保持していた。ジオール構造の立体化学に関しては、24*R*体11の方が24*S*体12よりも活性が高く、水酸基の立体化学が細胞分化活性に影響することがわかった。

4. 考察

本研究では、新規皮膚疾患治療薬開発を念頭に、新規非セコステロイド型ビタミンD₃誘導体としてリトコール酸誘導体を設計、合成した。筆者らが既に見いだした高ビタミンD活性を有する化合物4をリード化合物として構造展開を図った。まず、リトコール酸(2)の3位水酸基をヒドロキシアルキル基としたことで活性が向上したことから、その構造活性相関を検討した。これまでの研究から3位の置換基はα位に位置する方が、活性が高いことがわかっていたので、3α位にアルキル部分の長さの異なる置換体を持つ誘導体を合成した。その結果、化合物4よりも水酸基の位置を骨格から離れた化合物7で活性が著しく低下した。水酸基が直接ステロイド骨格に結合したリトコール酸(2)や炭素1つを挟んで連結した化合物3の活性も化合物4より低いことから、水酸基の位置はステロイド骨格からメチレン鎖2つ分は離れた位置が最適であることがわかった。また、化合物4の3位の水酸基の付け根の炭素に結合したアルキル基を比較すると、ジエチル体5の活性がジメチル体4よりも高く、さらに長い*n*-ブチル基を持つ化合物6では活性が低下した。以上のことから、3位の置換基としては、2-ethyl-2-hydroxy-1-butyl基が適していると考えられる。その要因としては、3位置換基の末端アルキル基をメチル基からエチル基に変換したことによりVDRのリガンド結合ポケットにおける疎水的な相互作用が増加したためと推測している。現在、VDRのリガンド結合領域との共結晶のX線構造解析により、詳細な結合様式の解明を進めている。

次に、化合物4の血中からの早い消失を考慮し、そのカルボキシ基を他の官能基に代替した化合物を設計、合成した。カルボキシ基をアミドに変えた化合物はいずれも、カルボン酸体4よりも活性は低下するものの、活性型ビタミンD₃(1)と同等の高い活性を示した。このことから、リトコール酸誘導体のカルボキシ基は他の生物学的等価性基で代替可能であることが示唆された。そこで、カルボキシ基を1,3-ジオール構造に置き換えた誘導体を合成したところ、化合物11が活性型ビタミンD₃(1)と同等の活性を有することがわかった。化合物11と24位水酸基の立体化学が異なる異性体12では活性が若干低下した。このことから、ジオール構造の置換位置、立体化学が活性に影響すると考えられ、周辺部位の置換基導入も含め、構造最適化の余地があると考えられる。

今回、合成した化合物については、ヒト急性前骨髄球性白血病細胞HL-60の分化誘導活性を指標に活性を評価した。現在、VDRへの結合親和性、活性化能、結合様式の解析等を進めている。また、皮膚疾患治療薬開発のために、体内動態の解析に加え、抗炎症作用や免疫機能制御といった機能の解明を行うことを計画している。

5. 総括

筆者らが見いだした高活性な非セコステロイド型ビタミンD誘導体である化合物4をもとに、更に高い細胞分化誘導活性を有する化合物5を見いだすとともに、3位における構造活性相関を明らかにすることができた。更に、カルボキシル基を持たない高活性誘導体の創製へと展開することができた。これらの化合物の機能を詳細に解析するとともに、更なる構造展開により、ビタミンDとしての活性プロファイルや体内動態で特徴的な性質を持つ新規化合物の創製が期待でき、皮膚疾患等に対するビタミンD療法への応用を目指す。

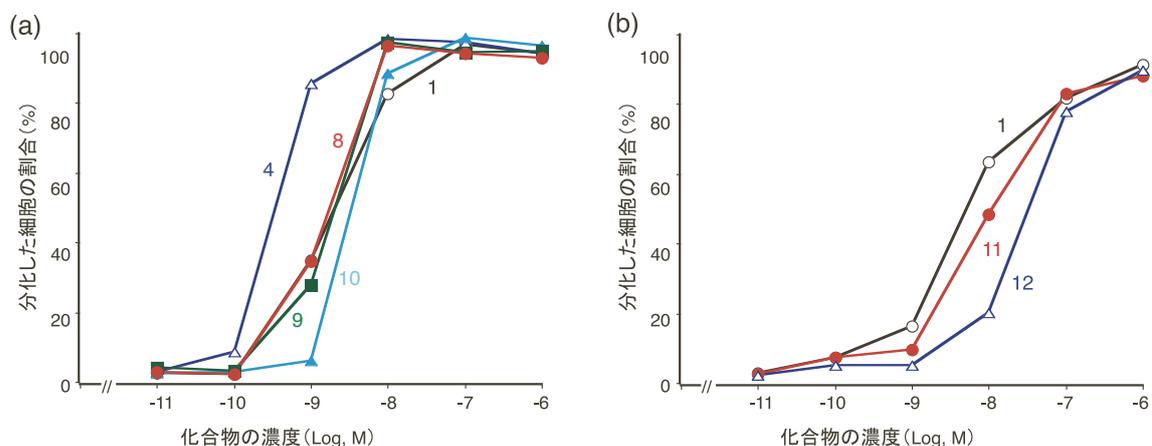


図7 カルボキシ基を変換した化合物8～12のHL-60細胞分化誘導活性

(引用文献)

- 1) Haussler, M. R.; Whitfeld, G. K.; Haussler, C. A.; Hsieh, J. C.; Thompson, P. D.; Selznick, S. H.; Dominguez, C. E.; Jurutka, P. W. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 325-349.
- 2) Boehm, M. F.; Fitzgerald, P.; Zou, A.; Elgort, M. G.; Bischoff, E. D.; Mere, L.; Mais, D. E.; Bissonnette, R. P.; Heyman, R. A.; Nadzan, A. M.; Reichman, M.; Allegretto, E. A. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 265-275.
- 3) Fujii, S.; Masuno, H.; Taoda, H.; Kano, A.; Wongmayura, A.; Nakabayashi, M.; Ito, N.; Shimizu, M.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Endo, Y.; Tanatani, A.; Kagechika, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20933-20941.
- 4) Fujii, S.; Sekine, R.; Kano, A.; Masuno, H.; Songkram, C.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Tanatani, A.; Kagechika, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5891-5901.
- 5) Makishima, M.; Lu, T. T.; Xie, W.; Whitfield, G. K.; Domoto, H.; Evans, R. M.; Haussler, M. R.; Mangelsdorf, D. J. *Science* **2002**, *296*, 1313-1316.
- 6) Adachi, R.; Honma, Y.; Masuno, H.; Kawana, K.; Shimomura, I.; Yamada, S.; Makishima, M. *J Lipid Res.* **2005**, *46*, 46-57.
- 7) Ishizawa, M.; Matsunawa, M.; Adachi, R.; Uno, S.; Ikeda, K.; Masuno, H.; Shimizu, M.; Iwasaki, K.; Yamada, S.; Makishima, M. *J Lipid Res.* **2008**, *49*, 763-772.
- 8) Masuno, H.; Kazui, Y.; Tanatani, A.; Fujii, S.; Kawachi, E.; Ikura, T.; Ito, N.; Yamamoto, K.; Kagechika, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 3674-3681.
- 9) Masuno, H.; Ikura, T.; Morizono, D.; Orita, I.; Yamada, S.; Shimizu, M.; Ito, N. *J.Lipid Res.* **2013**, *54*, 2206-2213.
- 10) 棚谷綾、佐々木晴江、川崎波留、影近弘之、増野弘幸、ビタミンD活性を有するリトコール酸誘導体、PCT/JP2017/002902