

ビタミン D 受容体リガンド結合ドメインの分子認識を基盤とした がん細胞分化とアポトーシスの制御機構の解析

中川 公恵

Analysis of Molecular Mechanism of Cancer Cell Differentiation and Apoptosis Induced by Vitamin D₃ Analogs on the Basis of Molecular Recognition of Vitamin D Receptor Ligand Binding Domain

Kimie NAKAGAWA

Department of Hygienic Sciences, Kobe Pharmaceutical University, 4-19-1
Motoyamakitamachi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan

(Received July 2, 2001)

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ [1 α ,25(OH)₂D₃] has antiproliferative, differentiation and apoptosis-inducing effects on many malignant cells. These properties have raised the possibility of its use as a therapeutic agent in cancer. Our recent studies using stereoisomers of the A-ring of monohydroxylated 19-nor or 2-methyl substituted 1 α ,25(OH)₂D₃ have clearly demonstrated that the A-ring analogs that contain 1 α -hydroxy or 3 β -hydroxy group are potent inducers of HL-60 cell differentiation. In contrast, the A-ring analogs that contain 1 β -hydroxy or 3 α -hydroxy group are potent stimulators of HL-60 cell apoptosis. It was interesting to note that the analogs could induce differentiation or apoptosis of HL-60 cells on the basis of the stereochemistry of both hydroxy groups at positions 1 and 3 of the A-ring. To further elucidate the possible roles of both the hydroxy groups in regulating cell differentiation and apoptosis, we have synthesized all possible diastereomers of the A-ring of 1 α ,25(OH)₂D₃ and examined their molecular mechanism of differentiation and apoptosis-inducing actions of HL-60 cells *in vitro*. This study shows that differentiation and apoptosis of HL-60 cells are strictly controlled by the stereochemistry of both hydroxy groups at positions 1 and 3 of the A-ring of 1 α ,25(OH)₂D₃, and the proteins responsible for the regulation of cell cycle and mitochondrial membrane potential are the major targets of 1 α ,25(OH)₂D₃ analogs. These findings provide useful information not only for structure-function studies of 1 α ,25(OH)₂D₃ analogs but also for the development of therapeutic agents for the treatment of cancer.

Key words—vitamin D; cancer cells, differentiation; apoptosis; structure-function study

1. はじめに

皮膚で紫外線の作用により産生される、あるいは食事から摂取されたビタミン D は、肝臓で 25 位が腎臓で 1 α 位が水酸化され、活性型ビタミン D である 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D [1 α ,25(OH)₂D] となる。¹⁻⁵⁾ 1 α ,25(OH)₂D₃ は、カルシウム (Ca) 代謝の主要ホルモンとして、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone: PTH) とともに血清 Ca の恒常性の維持や骨形成に重要な役割を果たしている。一方、1981 年に Abe らは、1 α ,25(OH)₂D₃ がマウス骨髄性白血病細胞の増殖を抑制し、マクロフ

ージへ分化誘導することを見出した。^{6,7)} これ以降、1 α ,25(OH)₂D₃ の生理作用が Ca 代謝調節作用のみならず、種々の細胞の増殖や分化、アポトーシスなど、細胞の普遍的な機能までを制御することが明らかにされてきた (Fig. 1)。

このような 1 α ,25(OH)₂D₃ のがん細胞への作用から、臨床的にもがん治療薬としての応用性が考えられるようになった。しかし、1 α ,25(OH)₂D₃ をがんに対して治療効果を示す量投与すると、必ず副作用として高 Ca 血症が惹起される。したがって、1 α ,25(OH)₂D₃ そのものをがん治療薬として応用することが困難であることから、非 Ca 作用 (増殖抑制・分化誘導作用) のみを発揮する活性型ビタミン D 誘導体の開発研究が進められてきた。^{8,9)}

1 α ,25(OH)₂D₃ の生理作用は、核内に存在するビ

神戸薬科大学衛生化学 (〒658-8558 神戸市東灘区山本北町 4-19-1)

*本総説は、平成 12 年度日本薬学会近畿支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

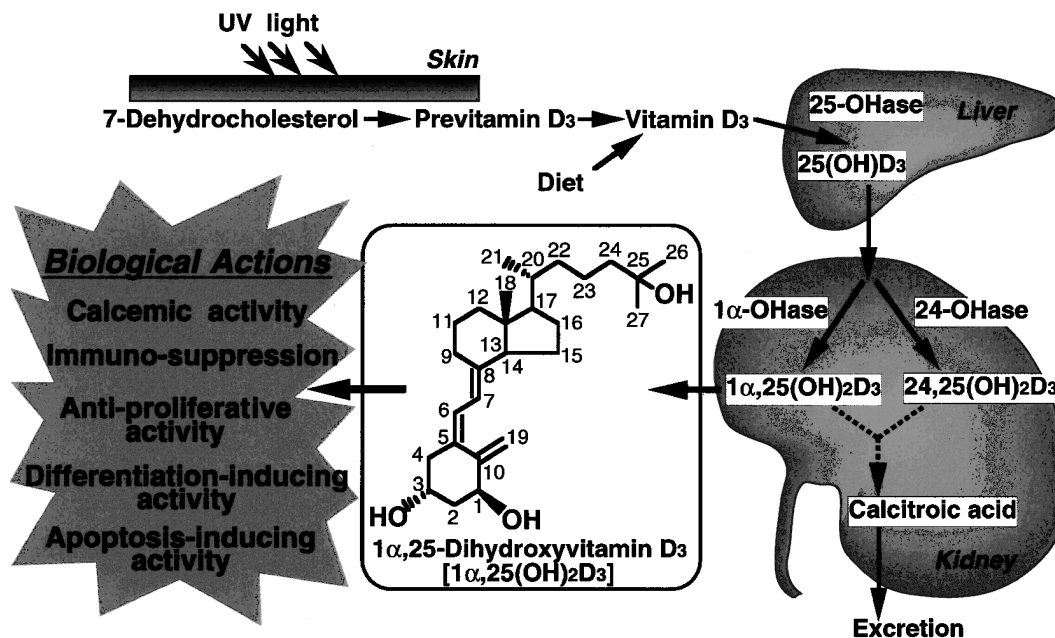


Fig. 1. Generation and Metabolism of Vitamin D₃ and Potential Applications of 1 α ,25(OH)₂D₃

タミン D 受容体 (vitamin D receptor: VDR) を介した標的遺伝子の発現制御により引き起こされる。¹⁰ これまでの研究から、生体内のほぼすべての組織・細胞に VDR が存在することが確認され、様々な病態・遺伝子変異の解析により、がん・免疫疾患やホルモン応答異常症などの疾患の原因が、ビタミン D の生理作用と深く関係していることが明らかになってきている。¹¹ さらに、1997 年には Kato らにより VDR 遺伝子欠損マウスが作出され、¹² 2000 年には、Moras らによって VDR のリガンド結合領域の X 線結晶構造が明らかにされ、2001 年にはその機能ドメインの詳細も解析された。^{13,14} このように、ビタミン D と疾患との関係や VDR の機能解明は飛躍的に進展してきている。

しかし、1 α ,25(OH)₂D₃ の作用が Ca 代謝のみならず、ホルモンの産生・分泌、免疫調節、細胞の分化・増殖、細胞内シグナル伝達、アポトーシス誘導など、様々な生命反応にまで関与していることから、VDR の機能解析のみでは全作用機序の解明は不可能と言える。したがって、構造選択的な活性を持つリガンド側からのアプローチが、選択的活性を示す誘導体の創製のみならず、作用機序解明においても極めて重要となる。

著者は、これまでにリガンド側からのアプローチとして、作用分離可能で組織選択的活性を有するビ

タミン D 誘導体の開発を目標に、リガンド構造と活性の相関性を統一的に検討してきた。その中で、最近がん細胞の分化とアポトーシスを選択的に誘導制御できる新規ビタミン D 誘導体を見出し、さらに分化とアポトーシスの制御に重要な鍵構造モチーフを同定することに成功した。¹⁵⁻¹⁹

本総説では、著者らが見出したがん細胞の分化とアポトーシスを選択的に誘導制御できる新規ビタミン D 誘導体及びその誘導制御の鍵構造モチーフを紹介し、VDR の X 線結晶構造との関連性を記述する。また、ビタミン D 誘導体によるがん細胞の増殖・分化・アポトーシス制御機構について最近明らかにした知見についても紹介する。

2. VDR の構造と機能

VDR は核内受容体スーパーファミリーの一員であり、ヒト VDR は 427 アミノ酸からなる分子量 50 kDa のタンパク質である。VDR タンパクは N 末端側から、A~E までの領域に分割できる。²⁰ 直接 DNA に結合する領域は、受容体タンパク中央に存在する C 領域であり、2 つの Zn フィンガーを持っている。リガンド結合領域は E 領域に存在し、12 個の Helix と 3 つの β -sheet より構成され、この領域がリガンド依存的な転写促進領域 (AF-2) である (Fig. 2A)。1 α ,25(OH)₂D₃ はリガンド結合領域中央部にあるリガンド結合キャビティーを持つ疎水

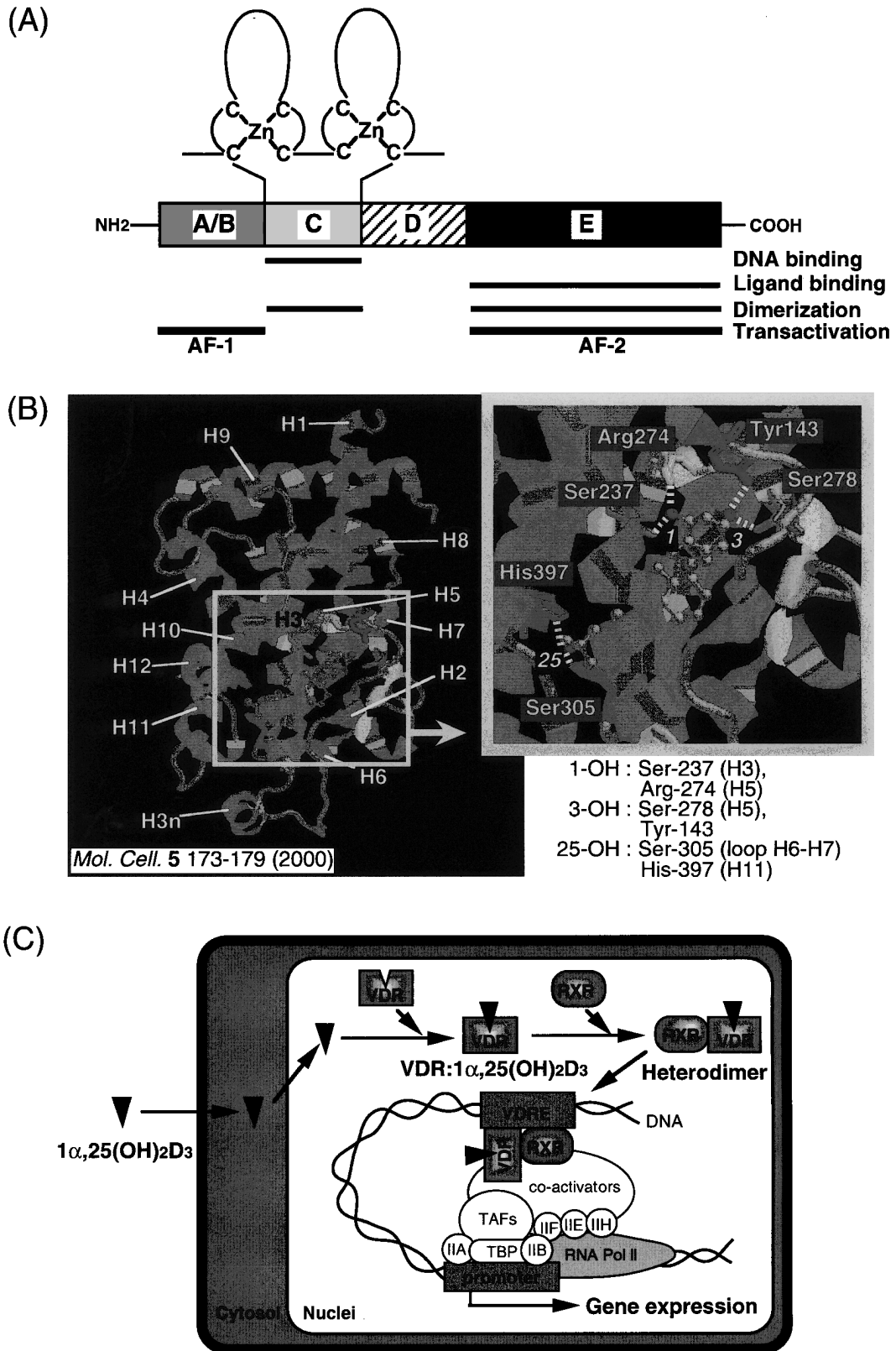


Fig. 2. Structure of Vitamin D Receptor and Model for Transcriptional Activation of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on the Target Gene Promoter
 (A) Structure and functional domain of vitamin D receptor, (B) Crystal structure of vitamin D receptor, (C) Model for transcriptional activation of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on the target gene promoter.

性の空間に入り、1位水酸基は Ser237 と Arg274、3位水酸基は Tyr143 と Ser278、25位水酸基は Ser305 と His397 という特定のアミノ酸と水素結合することが X 線結晶構造解析により証明されている (Fig. 2B).¹³⁾ リガンド結合後の VDR は、Helix12 が大きく移動することによりリガンドをホールドし、転写共役活性化因子 (コアクチベーター) をリクルートできる構造となる。また、E 領域はリガンドを捉えるのみならず、RXR とのヘテロ二量体形成を行う領域でもある。つまり、リガンドと結合した VDR は、VDR/RXR ヘテロ二量体を形成して、ビタミン D 標的遺伝子のプロモーター上流に存在する特異的エンハンサー配列であるビタミン D 応答配列 (vitamin D response element: VDRE) に結合し、コアクチベーターをリクルートすることにより転写を促進している (Fig. 2C).^{21,22)} VDRE のコンセンサス配列は、5'-AGGTCA-3'の基本配列が2つ直列に並び、モチーフ間が 3bp 離れたもの (Direct Repeated 3: DR3) であると考えられており、この DR3 の 5'上流側に RXR が、3'下流側に VDR が結合する。²¹⁾ 最近、VDR と相互作用するコアクチベーターに関する研究が盛んに進められ、ヒストンアセチル化酵素活性を持つ SRC-1/TIF-2 ファミリータンパクや p300/CBP が同一の複合体として VDR に結合すること、ヒストンアセチル化酵素活性を持たない DRIP/TRAP 複合体も VDR に直接相互作用することなどが明らかにされている。^{23,24)} このようなコアクチベーターは、組織選択的な活性発現の制御に重要な因子と考えられており、ビタミン D 誘導体による組織選択的な活性発現の制御に、コアクチベーター選択性が1つの重要な鍵となる可能性が示唆されている。²⁵⁾

3. がん細胞に対するビタミン D の作用

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は前立腺がん、大腸がん、乳がん、血液系腫瘍細胞など、様々ながん細胞に対して増殖抑制、分化誘導、アポトーシス誘導作用などを示すことが報告されている。²⁶⁻²⁸⁾ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による増殖抑制には、細胞周期の G0/G1 arrest とアポトーシスが関与するとの報告が多く、分化も増殖抑制に伴い誘導されると言われている。細胞周期は、サイクリン (cyclin)/サイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase: Cdk) や p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2} などの Cdk 阻害因子などにより厳

密に制御されている。²⁹⁾ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による増殖抑制や分化誘導作用のメカニズムについては、血液系の細胞を用いて解析された報告が多い。ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ やホルボールエステルなどにより、単球やマクロファージに分化することが知られており、その際に p21^{Cip1} の発現が mRNA 及びタンパク質レベルで上昇することが証明されている。HL-60 細胞は p53 遺伝子の大部分を欠失することから、p53 経路非依存的な作用であると考えられる。³⁰⁾ Freedman らは、p21^{Cip1} 遺伝子のプロモーター上流 770bp に DR3 タイプの VDRE (5'-AGGGAGattGGTTCA-3') が存在することを報告しており、p21^{Cip1} の発現上昇が $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による直接的な遺伝子制御であることを証明している。³¹⁾

一方、アポトーシス誘導作用については、細胞種などにより様々な報告がなされている。乳がんや前立腺がんに対して、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がアポトーシスを誘導するという報告が数多くなされているが、その作用機構については未だ不明な点が多い。Binderup らは、Leo 社の合成ビタミン D 誘導体である EB1089 が、Bcl-2 ファミリー遺伝子の発現調節 (特に Bcl-2 遺伝子の発現低下) を介して、乳がんや大腸がん、前立腺がん細胞のアポトーシスを誘導するということを *in vitro* 及び *in vivo* レベルで証明している。^{32,33)} しかし、その一方で、紫外線や Tumor necrosis factor (TNF) などにより誘導される HL-60 細胞のアポトーシスを $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が抑制するという報告もあり、³⁴⁾ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のアポトーシス誘導作用については、細胞種による違いが大きく、作用機序に関する統一的な見解は得られていない。

4. 新規ビタミン D 誘導体のアポトーシス誘導作用

著者らは、最近 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の A 環を修飾した新規ビタミン D 誘導体として、10-19 位のメチレンを水素で置換した 19-nor 誘導体及び 2 位にメチル基を導入した 2-methyl 誘導体について、構造と活性の相関性を中心に生物活性を検討してきた。その結果、これら誘導体の中に、HL-60 細胞に対して分化ではなくアポトーシスを選択的に誘導する誘導体を見出すことに成功した。しかも、リガンドの A 環 1 位 3 位水酸基の立体配置により、選択

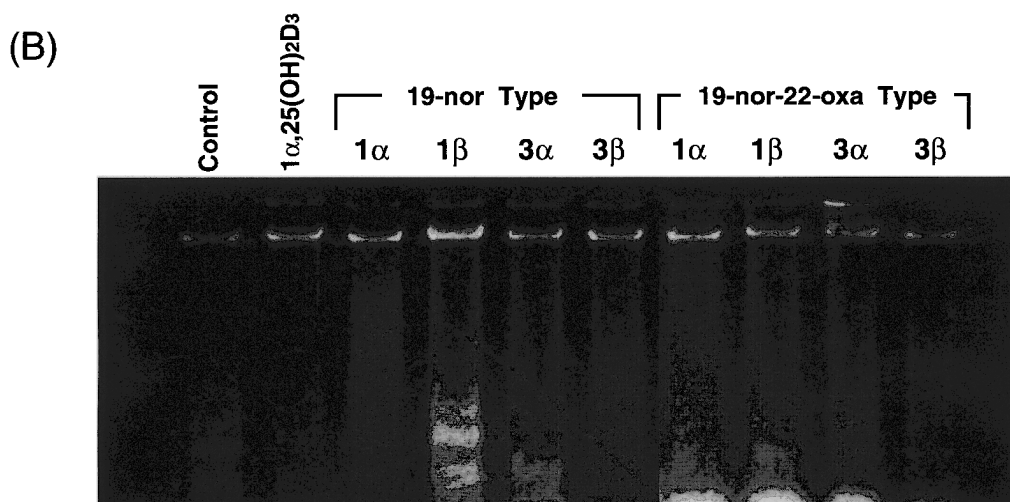
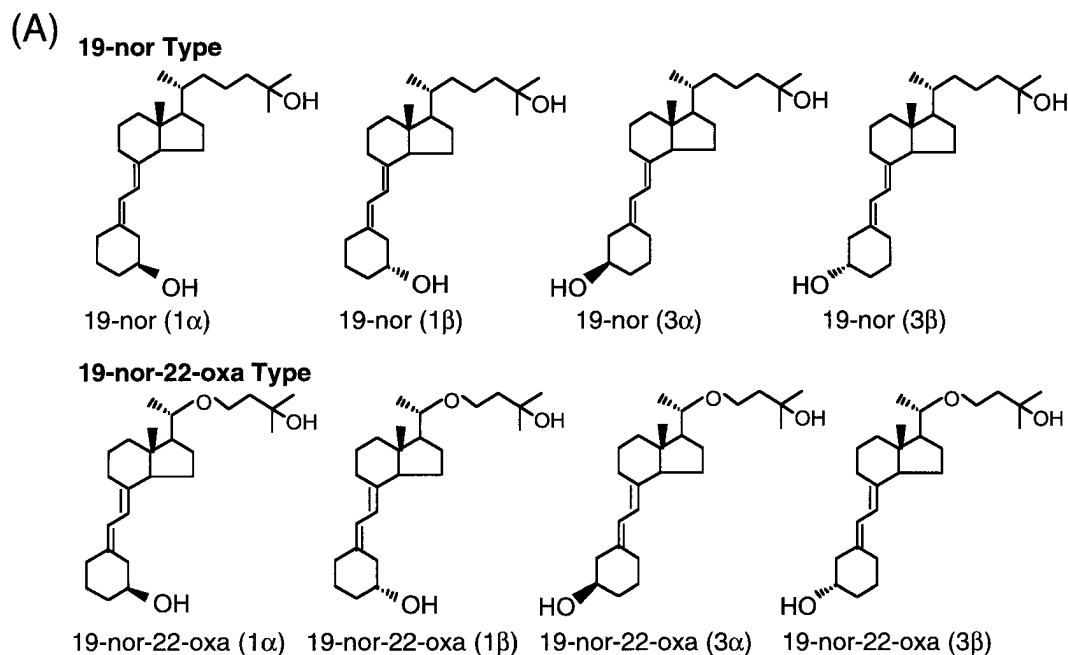


Fig. 3. Chemical Structures and Apoptosis-Inducing Activity of 19-Nor-1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ Analogs

(A) Chemical structures of 19-nor-1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ analogs, (B) DNA fragmentation assay of apoptosis in HL-60 cells treated with 19-nor-1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ analogs (10^{-8} M) for 5 days. The fragmentation of chromosomal DNA was assessed by electrophoresis on 2.0% agarose gels.

的にアポトーシスが誘導されているという極めて興味深い傾向が認められた (Figs. 3, 4).¹⁵⁻¹⁹⁾ これは、分化とアポトーシスという異なる作用をリガンド構造により明確に制御できる可能性を示した初めての結果であると言える。さらに、アポトーシス誘導作用を示した誘導体は、いずれも VDR に対する結合能をほとんど持たないことから、VDR を介した既知の作用メカニズムとは全く異なる機構を介し

てアポトーシスが誘導されている可能性が示唆された。

5. 分化とアポトーシスの誘導制御に必須な構造モチーフの同定

A 環を修飾した 19-nor 誘導体及び 2-methyl 誘導体が、1 位 3 位水酸基の立体配置選択的に HL-60 細胞を分化かアポトーシスかに誘導制御することを明らかにしたが、¹⁵⁻¹⁹⁾ これらの誘導体では、1 位 3

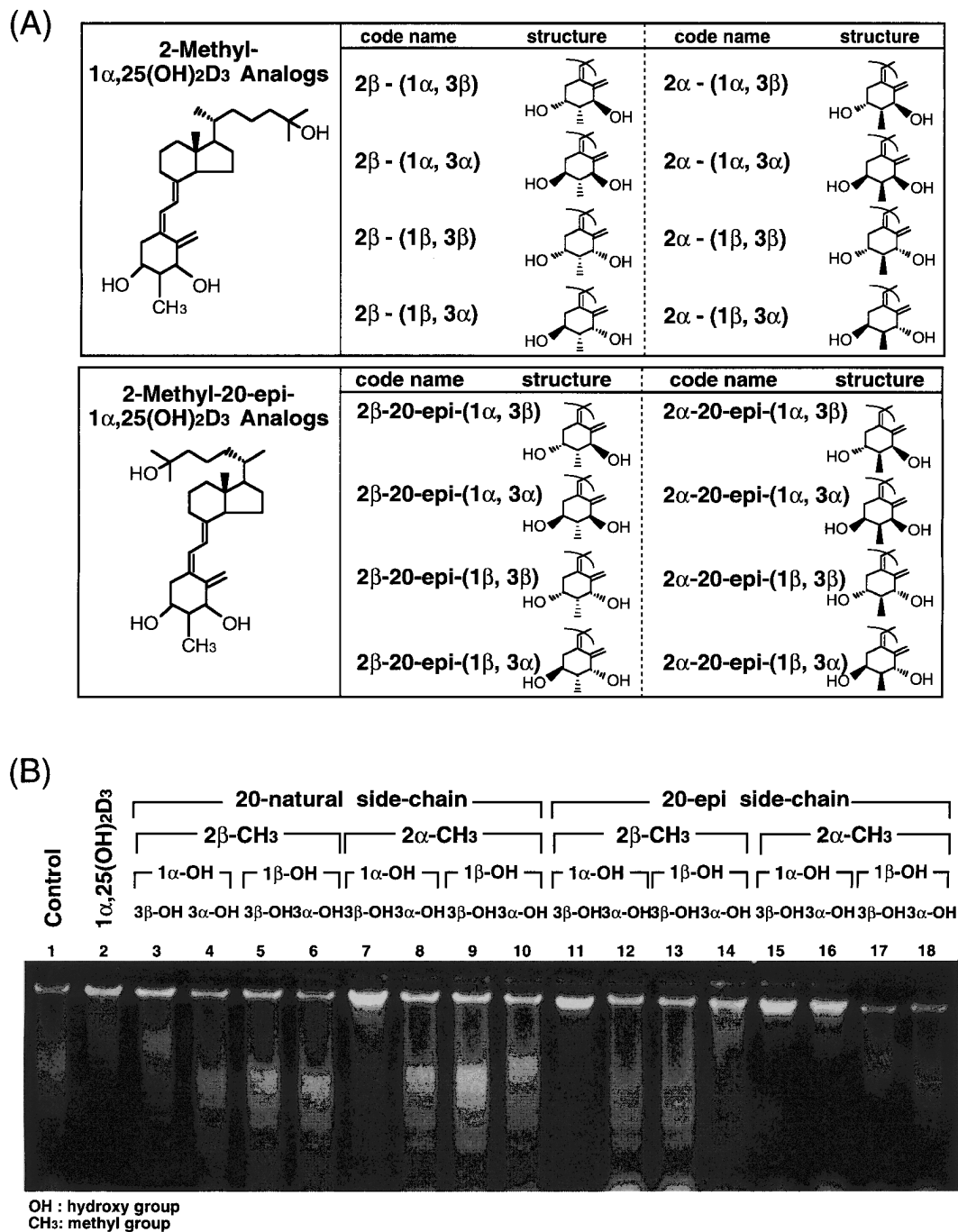


Fig. 4. Chemical Structures and Apoptosis-Inducing Activity of 2-Methyl- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Analogs

(A) Chemical structures of 2-methyl- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ analogs, (B) DNA fragmentation assay of apoptosis in HL-60 cells treated with 2-methyl- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ analogs (10^{-8} M) for 5 days. The fragmentation of chromosomal DNA was assessed by electrophoresis on 2.0% agarose gels.

位水酸基の異性化以外の構造修飾が伴うため、アポトーシス誘導に必須な鍵構造モチーフを特定するには至らなかった。そこで、分化とアポトーシスの振り分けに必須な鍵構造モチーフを同定する目的で、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の 1 位 3 位水酸基の可能なすべての異性体全 4 種を用いて HL-60 細胞に対する分化誘

導作用とアポトーシス誘導作用を検討した。

その結果、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は用量依存的に VDR を介した転写活性及び分化誘導作用を示し、3 位水酸基の異性体である 3-epi- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1\alpha,3\alpha$) では、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ より活性が低下する結果となった。一方、アポトーシス誘導作用は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2$

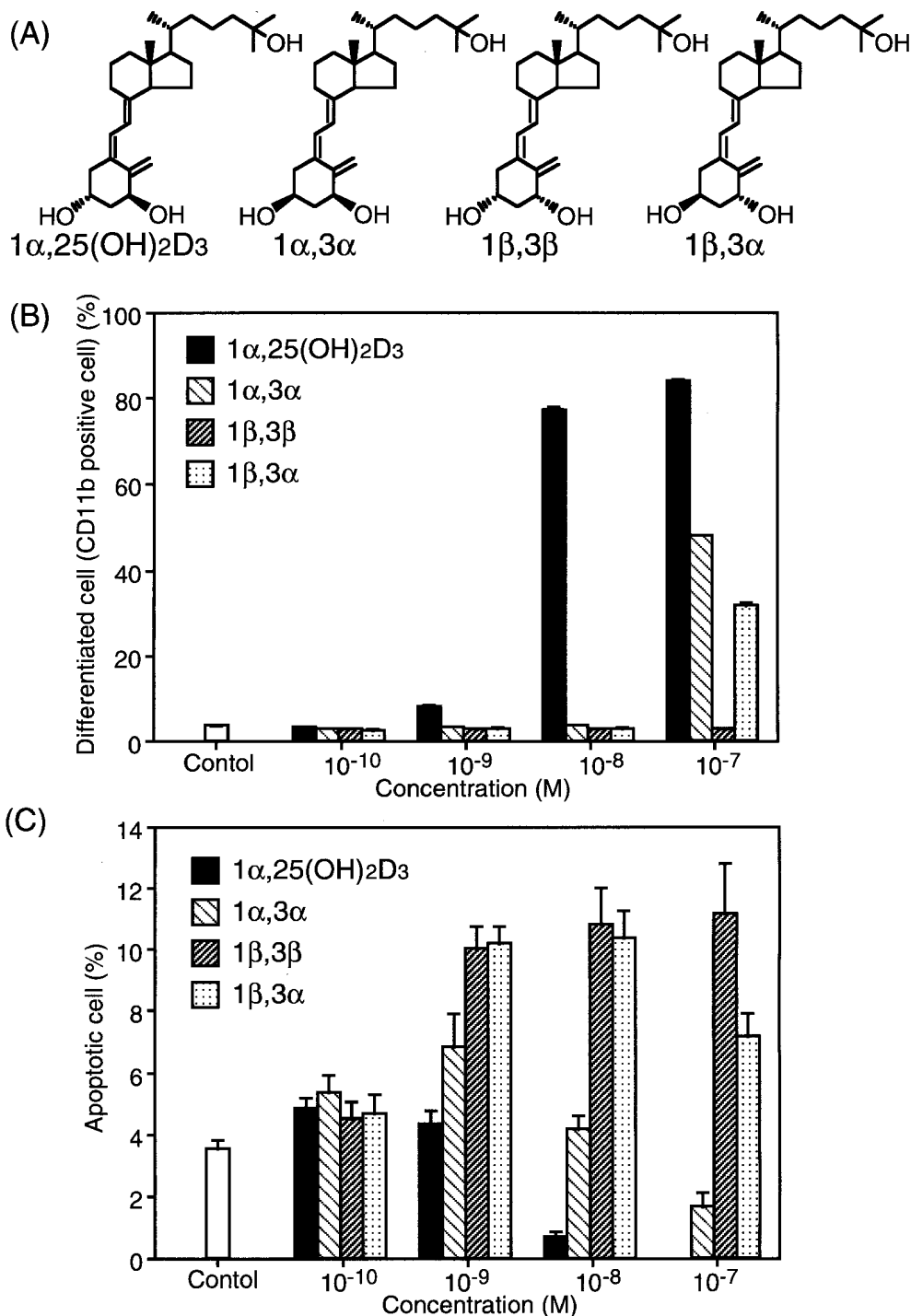


Fig. 5. Chemical Structures and Differentiation and Apoptosis-Inducing Activity of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Diastereomers

(A) Chemical structures of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diastereomers, (B) Cell surface CD11b antigen-positive cell number in culture of HL-60 cells treated with vehicle or $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diastereomers, (C) Apoptotic cell number in culture of HL-60 cells treated with vehicle or $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diastereomers.

D_3 , $1\alpha,3\alpha$ 共に低濃度条件においてのみ認められたが、分化誘導作用を示す濃度条件になるに従い、低下あるいは完全に消失した。このアポトーシス誘導作用は、 $1\alpha,3\alpha$ が $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ よりやや強い活性を示した (Fig. 5)。分化が誘導されるに従い、ア

ポトーシス誘導作用が低下する理由については、分化によるアポトーシス耐性化が考えられる。実際に、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及び $1\alpha,3\alpha$ は、Protein kinase C 阻害剤である Staurosporine が誘導するアポトーシスを用量依存的に抑制する作用を示した。このことか

ら、分化とアポトーシスは、リガンド濃度によっても制御され、分化が強く誘導される（マクロファージや単球などの正常細胞に変わる）場合には、アポトーシスに対して耐性化することが明らかとなった。

一方、 1β 位に水酸基を持つ $1\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1\beta,3\beta$) 及び $3\text{-epi-}1\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($1\beta,3\alpha$) は、VDR を介した転写活性及び分化誘導作用をほとんど示さなかった (Fig. 5)。しかし、 $1\beta,3\beta$ 及び $1\beta,3\alpha$ は、用量依存的にアポトーシスを誘導し、Staurosporine により誘導されるアポトーシスに対して抑制作用は示さなかった。

以上のことから、 1α 水酸基及び 3β 水酸基は HL-60 細胞を分化の方向に、 1β 水酸基あるいは 3α 水酸基はアポトーシスの方向に有意に誘導できる構造モチーフであること、特にアポトーシス誘導には 1β 水酸基の影響が強いことが明らかとなった。また、VDR 結合能が低い構造体、つまり、VDR のリガンド結合領域に認識されにくい構造体の方が、よりアポトーシスを選択的に誘導できることから、アポトーシスが VDR を介さない作用メカニズムにより誘導されている可能性が強く示唆される。VDR を介さない作用メカニズムについては、VDR 以外の受容体の関与や、 1β 水酸基あるいは 3α 水酸基を有する誘導体がビタミン D 以外の生体内生理活性物質の作用を代替あるいは模倣している可能性などが考えられるが、それらを証明する明確な結論は未だ得られていない。

6. アポトーシス誘導機序の解析

HL-60 細胞に対する分化誘導作用の機構については、VDR を介した $p21^{\text{Cip1}}$ 及び $p27^{\text{Kip1}}$ 遺伝子の発現上昇や cyclin 遺伝子の発現変化などによる細胞周期停止の影響が明らかにされている。しかし、著者らが見出した VDR 結合能の低い誘導体に特徴的に起こるアポトーシスが、どのような作用機構を介して誘導されているのかについては全く不明であった。そこで著者らは、一般に知られているアポトーシス誘導機序を中心に作用機序の解析を試みた。アポトーシスには、促進的に働く中心因子である Caspase、促進と抑制の両方に関与する因子である Bcl-2 ファミリー遺伝子、それらを活性化する因子である細胞死のシグナルや生存のシグナルなどが複雑に関与している。^{35,36)} そこでまず、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の 1 位あるいは 3 位水酸基の異性体のアポト

シス誘導機構について、Caspase 活性を検討した。その結果、TNF 受容体や Fas などの膜受容体刺激を介して活性化される Caspase-8 は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及び 1 位 3 位水酸基の異性体いずれにおいても全く活性化されなかった。しかし、ミトコンドリア膜電位変化を介して活性化される Caspase-9 及び最終段階の Caspase である Caspase-3 は、1 位あるいは 3 位水酸基の異性体において有意に活性化されていた。さらに、ミトコンドリアの膜電位変化について Rhodamin 染色法により検討した結果、1 位あるいは 3 位水酸基の異性体を処理した細胞において、ミトコンドリア膜電位の破綻した細胞像が観察され、ミトコンドリア膜電位変化の関与が強く示唆された。

ミトコンドリア膜電位は、主に Bcl-2 ファミリー遺伝子により制御されていることから、Bcl-2 ファミリー遺伝子のうち、アポトーシス抑制に働く Bcl-2 遺伝子及びアポトーシス促進に働く Bax α 遺伝子の発現変化について検討を行った。その結果、Bcl-2 の発現は変化しないものの、Bax α 遺伝子の発現がアポトーシス誘導作用を示す 1 位あるいは 3 位水酸基の異性体において、添加後 3 から 12 時間目に有意に上昇する結果が得られた。

以上のことから、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の 1 位あるいは 3 位水酸基の異性体によるアポトーシスが、Bax α 遺伝子の発現上昇によるミトコンドリア膜電位の低下、Caspase-9,3 の活性化という経路を介して誘導されていることが明らかとなった (Fig. 6)。しかし、Bax α 遺伝子の発現上昇がどのような機構を介して誘導されているのか、アポトーシス誘導作用を示すリガンドがどのように認識されているのかについては未だ不明であり、今後さらに検討する必要がある。

7. まとめ

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の A 環 1 位 3 位水酸基は、VDR のリガンド認識に最も重要な構造部位であり、作用発現の制御に密接に関連している。X 線結晶構造解析の結果より、VDR の特定のアミノ酸が、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の A 環 1 位 3 位水酸基と直接水素結合することから、これら水酸基の立体配置の異性化は、特定のアミノ酸との結合を弱める方向に影響することがわかる。¹³⁾ 実際に、1 位水酸基の異性体では VDR 結合能及び転写活性はほとんど消失し、3 位

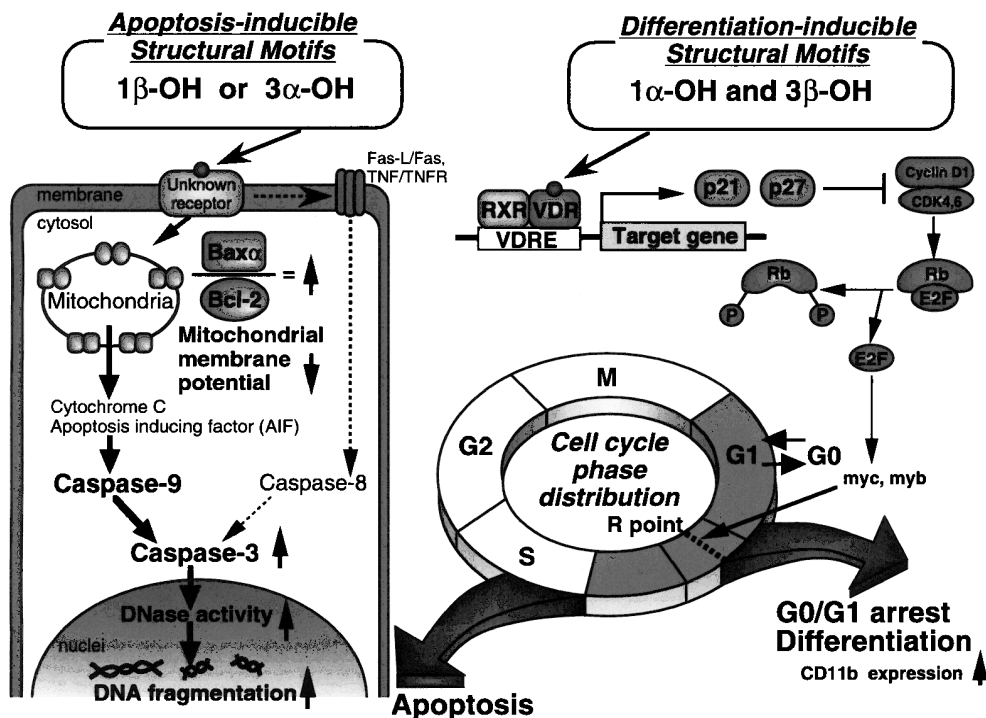


Fig. 6. Molecular Mechanism of Differentiation and Apoptosis-Inducing Actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Analogs in HL-60 Cells

水酸基の異性体では VDR 結合能及び転写活性はわずかに残る程度となる。つまり、VDR のリガンド認識には、3 位水酸基よりも 1 位水酸基の方が強く、1 位 3 位水酸基の立体配置は VDR を介した活性発現に極めて重要となる。

一方、HL-60 細胞に対するアポトーシス誘導作用では、VDR のリガンド認識とは全く正反対のリガンド特異性が認められた。これまで VDR 結合能や転写活性を全く示さないことから、不活性誘導体として捉えられていた $1\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が、HL-60 細胞に対して用量依存的にアポトーシスを誘導できることが今回初めて見いだされた。また、アポトーシスを強く誘導する 1 位あるいは 3 位水酸基の異性体は、特に VDR 結合能が低い構造体であることから、アポトーシス誘導作用に、VDR との結合が必須ではないことが示唆され、VDR を介さない作用メカニズムによる可能性が高いと推察される。しかし、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ でも非常に低濃度の時にはアポトーシス誘導作用がわずかながら認められ、分化誘導作用を示す濃度条件では消失したことから、この作用は単にアナログ特異的な効果であるのではなく、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が本来持っている作用である可能性も考えられる。つまり、分化とアポトーシスが相反

する生命現象であり、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の HL-60 細胞に対する分化誘導作用が非常に強力であるため、分化誘導作用を評価する実験条件ではアポトーシス誘導作用が完全に打ち消された状態となり、これまでの研究では発見できなかったのかもしれない。

1 位あるいは 3 位水酸基の異性体で見られたアポトーシスの誘導機序については、Bcl-2 ファミリー遺伝子（特に Bax α 遺伝子）の発現量の変化、ミトコンドリア膜電位の低下、Caspase-9, 3 の活性化を介していることが明らかとなった。この経路に VDR が関与するのか否か、VDR が関与しない場合、どのようなリガンド認識機構を介しているのかについては現時点では不明であり、今後さらに解析する必要があると考えている。

8. おわりに

著者らは、VDR が認識するリガンド構造のうち、極めて重要な構造部位である 1 位 3 位水酸基の立体配置が、がん細胞の分化とアポトーシスを誘導制御できる鍵構造モチーフであることを初めて見出し、その作用機序の一端を明らかにすることに成功した。

VDR により最も強く認識されるリガンド構造部位の立体配置が、がん細胞の分化とアポトーシスの

誘導制御における鍵構造部位であったことは、VDR とリガンドを相互に構造化学的に解析する意義の重要性を示すとともに、生命科学における新たな作用や作用機序の解析に、リガンド構造と活性の相関研究が有用であることを立証したと言える。がん細胞の増殖を抑制し分化を誘導する（がん細胞を減らしかつ正常細胞に変える）、アポトーシスを誘導する（がん細胞を自殺させる）という作用は、いずれもがん治療においては極めて有力な作用であることから、今後は、著者らが見出した事実を基にして、作用分離や組織選択的に優れたがん・難治性疾患治療薬となるビタミン D 誘導体が創製できるものと期待している。将来、種々の疾患を選択的活性を有するビタミン D 誘導体により治療できる日が来ることを願い本稿を終える。

謝辞 本研究は神戸薬科大学衛生化学研究室において行われたものであり、終始、御懇切な御指導、御鞭撻を賜りました神戸薬科大学衛生化学研究室教授 岡野登志夫先生に心から感謝申し上げます。本研究に対し、御協力と御助言を賜りました同研究室の諸先生に深謝いたします。また、本研究を推進するにあたり、幾多の御協力と有益な御助言を賜りました大阪府立母子保健総合医療センター研究所 大藪恵一先生、帝京大学薬学部教授 高山浩明先生、東京工業大学工学部助教授 三上幸一先生、長崎大学薬学部教授 畑山範先生、中外製薬株式会社 久保寺登先生に深謝致します。なお、本研究は文部科学研究助成金の援助の下に行われたものであることを記し感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Lund J., DeLuca H. F., *J. Lipid Res.*, **7**, 739–744 (1966).
- 2) Blunt J. W., DeLuca H. F., Schnoes H. K., *Biochemistry*, **7**, 3317–3322 (1968).
- 3) Lawson D. E., Wilson P. W., Kodicek E., *Biochem. J.*, **155**, 269–277 (1969).
- 4) Lawson D. E., Fraser D. R., Kodicek E., Morris H. R., Williams D.H., *Nature*, **230**, 228–230 (1971).
- 5) Holick M. F., Schnoes H. K., DeLuca H. F., Suda T., Cousins R. J., *Biochemistry*, **10**, 2799–2804 (1971).
- 6) Abe E., Miyaura C., Sakagami H., Takeda M., Konno K., Yamazaki T., Yoshiki S., Suda T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4990–4994 (1981).
- 7) Miyaura C., Abe E., Kuribayashi T., Tanaka H., Konno K., Nishii Y., Suda T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 937–943 (1981).
- 8) Bikle D. D., *Endocr. Rev.*, **13**, 765–784 (1992).
- 9) Bouillon R., Okamura W. H., Norman A. W., *Endocr. Rev.*, **16**, 200–257 (1995).
- 10) Darwish H., DeLuca H. F., *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **3**, 89–116 (1993).
- 11) Walters M. R., *Endocr. Rev.*, **13**, 719–764 (1992).
- 12) Yoshizawa T., Handa Y., Uematsu Y., Takeda S., Sekine K., Yoshihara Y., Kawakami T., Arioka K., Sato H., Uchiyama Y., Masushige S., Fukamizu A., Matsumoto T., Kato S., *Nat. Genet.*, **16**, 391–396 (1997).
- 13) Rochel N., Wurtz J. M., Mitschler A., Klaholz B., Moras D., *Mol. Cell.*, **5**, 173–179 (2000).
- 14) Rochel N., Tocchini-Valentini G., Egea P. F., Juntunen K., Garnier J. M., Vihko P., Moras D., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 971–979 (2001).
- 15) Okano T., Nakagawa K., Tsugawa N., Ozono K., Kubodera N., Osawa A., Terada M., Mikami K., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1300–1305 (1998).
- 16) Okano T., Nakagawa K., Kubodera N., Ozono K., Isaka A., Osawa A., Terada M., Mikami K., *Chem. Biol.*, **7**, 173–184 (2000).
- 17) Nakagawa K., Kurobe M., Ozono K., Konno K., Fujishima T., Takayama H., Okano T., *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 691–702 (2000).
- 18) Nakagawa K., Kurobe M., Konno K., Fujishima T., Takayama H., Okano T., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1937–1947 (2000).
- 19) Nakagawa K., Sowa Y., Kurobe M., Ozono K., Siu-Caldera M. L., Reddy G. S., Uskokovic M. R., Okano T., *Steroids*, **66**, 327–337 (2001).
- 20) Haussler M. R., Whitfield G. K., Haussler C. A., Hsieh J. C., Thompson P. D., Selznick S. H., Dominguez C. E., Jurutka P. W., *J. Bone Miner. Res.*, **13**, 325–349 (1998).
- 21) Giguere V., *Endoc. Rev.*, **15**, 61–79 (1994).
- 22) Ebihara K., Masuhiro Y., Kitamoto T., Suza

- wa M., Uematsu Y., Yoshizawa T., Ono T., Harada H., Matsuda K., Hasegawa T., Masushige S., Kato S., *Mol. Cell Biol.*, **16**, 3393–3400 (1996).
- 23) Rachez C., Gamble M., Chang C. P., Atkins G. B., Lazar M. A., Freedman L. P., *Mol. Cell Biol.*, **20**, 2718–2726 (2000).
- 24) MacDonald P. N., Baudino T. A., Tokumaru H., Dowd D. R., Zhang C., *Steroids*, **66**, 171–176 (2001).
- 25) Takeyama K., Masuhiro Y., Fuse H., Endoh H., Murayama A., Kitanaka S., Suzawa M., Yanagisawa J., Kato S., *Mol. Cell Biol.*, **19**, 1049–1055 (1999).
- 26) Colston K., “*Vitamin D.*,” Academic Press, San Diego, CA, 1997, pp. 1107–1123.
- 27) Gross C., Peehl D. M., “*Vitamin D.*,” Academic Press, San Diego, CA, 1997, pp. 1125–1139.
- 28) Brasitus T. A., Sitrin M., “*Vitamin D.*,” Academic Press, San Diego, CA, 1997, pp. 1141–1154.
- 29) Sherr C. J., Roberts J. M., *Gene & Dev.*, **9**, 1149–1163 (1995).
- 30) Schwaller J., Koeffler H. P., Niklaus G., Loetscher P., Nagel S., Fey M. F., Tobler A., *J. Clin. Invest.*, **95**, 973–979 (1995).
- 31) Liu M., Lee M. H., Cohen M., Bommakanti M., Freedman L. P., *Genes Dev.*, **15**, 142–153 (1996).
- 32) James S. Y., Mercer E., Brady M., Binderup L., Colston K. W., *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 953–962 (1998).
- 33) Diaz G. D., Paraskeva C., Thomas M. G., Binderup L., Hague A., *Cancer Res.*, **60**, 2304–2312 (2000).
- 34) Wu Y. L., Jiang X. R., Lillington D. M., Allen P. D., Newland A. C., Kelsey S. M., *Cancer Res.*, **58**, 633–640 (1998).
- 35) Thornberry N. A., Rano T. A., Peterson E. P., Rasper D. M., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V. M., Nordstrom P. A., Roy S., Vaillancourt J. P., Chapman K. T., Nicholson D. W., *J. Biol. Chem.*, **272**, 17907–17911 (1997).
- 36) Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y., *Nature*, **399**, 483–487 (1999).