

ステロールを用いる生物活性化合物の合成と構造活性相関

橘 陽二

Synthesis and Structure-Activity Relationships of Bioactive Compounds Using Sterols

Yoji TACHIBANA

Research Laboratory, Nisshin Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd., 5-3-1 Tsurugaoka, Fujimino City, Saitama 356-8511, Japan

(Received May 25, 2006; Accepted August 23, 2006)

Sterols are widely and abundantly distributed in nature. It is convenient to utilize them for the preparation of useful compounds such as pharmaceuticals with steroid and secosteroid skeletons. This paper describes the synthesis and structure-activity relationships of naturally occurring active forms of vitamin D analogues, sterols having neurite outgrowth activity, and liver X receptor agonist. The active form of vitamin D₄ showed similar biological activities but had higher affinity to the vitamin D-binding protein compared with the corresponding vitamins D₂ and D₃. This shows that the active form of vitamin D₄ is a good candidate for an agent to replace the active forms of vitamins D₂ and D₃. In the course of screening for low molecular-weight compounds that exhibit neurite outgrowth activity in the culture broth, we found that the natural product dictyosterol showed strong activity. From screening of the analogues, it was found that the double bond between C22 and C23 in the side chain of the sterol is essential for its activity. Ergost-22-ene-1 α ,3 β -diol was found to serve as a stronger liver X receptor agonist than 24(S), 25-epoxycholesterol, which regulates the expression of genes involved in lipid metabolism. Structure-function study showed that the 1 α -hydroxyl group, the saturated steroid structure, and the double bond between C22 and C23 are needed to function as a liver X receptor agonist.

Key words—naturally occurring active vitamin D; dictyosterol; neurite outgrowth; liver X receptor agonist; structure-activity relationship

1. はじめに

ステロール類は糖類と同様、自然界に広くかつ豊富に存在しており、それらをそのままあるいはサポニンとして利用、又は酵素や化学反応により変換し、ステロイド及びセコステロイド骨格を有する医薬品等の有用な化合物を得るための原料として用いることは地球環境、原料価格の面から考えて非常に有益である。ステロール及びステロイド誘導体は種々の生物活性を示すことが明らかになっており、分子生物学の発展に伴い遺伝子レベルでの研究が活発に行われている。

以上の理由により、筆者らはステロール類を出発原料にして生物活性を有する化合物の合成と構造活性相関及び治療薬としての可能性を検討してきた。本論文ではその中で、骨代謝改善作用を始めとして種々の生物活性を有する天然の活性型ビタミン D

誘導体、神経細胞再生伸長作用を有するジクチオステロール誘導体、脂質代謝及びクローン病、大腸がんにも関連が深いと考えられているオキシステロール類をリガンドとする liver X receptor (LXR) アゴニストの合成及び生物活性と側鎖との構造活性相関について紹介する。

2. 天然活性型ビタミン D 誘導体

ビタミン D 受容体は、骨、腎、小腸の古典的標的臓器以外にも、心筋、免疫細胞、神経系、その他に広く分布しており、ビタミン D は広範な生命機能に関与していると考えられている。ビタミン D₃ が肝臓で 25 位が、ついで腎臓で 1 α 位が水酸化されて生成する活性型ビタミン D₃, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃) (1)¹⁾は現在ではホルモンとして認識され、カルシウム代謝作用、免疫調節作用、細胞増殖抑制作用、分化誘導作用、副甲状腺ホルモン調節作用等多彩な生物活性を有している。²⁻⁹⁾

しかし、1はその強い毒性（カルシウム上昇作

日清キョーリン製薬株式会社創薬研究所 (〒356-8511 埼玉県ふじみ野市鶴ヶ岡 5-3-1)
e-mail: tachibanay@nk-pharm.co.jp

用)¹⁰⁾のため使用が制限されており、毒性と薬理作用の乖離を目的としてこれまでに1000を越える誘導体が検討され、¹¹⁾骨粗鬆症、乾癬症、副甲状腺機能亢進症の治療薬として数種の誘導体がこれまでに上市されている。最近では大腸がん、直腸がんの治療にも使用されている。^{12,13)}

一方、自然界ではよく知られている植物由来のビタミンD₂、動物由来のビタミンD₃のほか、側鎖が異なるビタミンD₄,¹⁴⁾ D₅,¹⁵⁾ D₆,¹⁶⁾ 及びD₇¹⁷⁾が存在している。ビタミンD₄, D₅, D₆, 及びD₇についてはラットの抗くる病活性について検討されたが、その活性は低いと報告されている。¹⁸⁾ ビタミンD₂は哺乳類ではビタミンD₃と活性(抗くる病)は同等にも係わらず、鳥類では1/10—1/20であることが知られており、その原因として代謝が関係していると言われている。^{19,20)}

先に述べたようにビタミンD誘導体が生物活性を示すためには、活性型に変換される必要がある。したがって、ビタミンD₄, D₅, D₆, 及びD₇が活性型に変換されるまでに体内動態又は代謝等に何らかの問題があれば、活性型の生物活性、代謝を検討することで、活性型でないビタミンD₄, D₅, D₆ 及びD₇のこれまでの結果とは異なる生物活性が観測される可能性があり、また新しい代謝経路、新規な構造を有する代謝物が見出されることも期待できる。今話題のタミフルやタキソールを始めとして医薬品として利用されている化合物の中で天然物あるいは天然物を中間体に用いた例は多い。天然物が何らかの意味を持って生物によって生み出された化合物は、人間などの生物に対しても何らかの生理活性を持つ確率が高い。以上の観点から、筆者らは、これら天然ビタミンDの活性型誘導体の生物活性並びに代謝経路に興味を持ち、活性型を合成し、生物活

性、代謝に側鎖が及ぼす影響について活性型ビタミンD₂誘導体及びD₃との比較検討を行った(Fig. 1)。

2-1. 天然活性型ビタミンD誘導体の合成

1 α -Hydroxyvitamin D₃ (5)²¹⁾及びD₂ (12)²²⁾以外の活性型ビタミン誘導体は、ステロイド部と側鎖部を構成するフェニルスルホン誘導体を用いて合成した。側鎖に二重結合を有する1 α ,25-dihydroxyvitamin D₂ (9)及び24-epi-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₂ (10)はC20-アルデヒド (17) (Scheme 1)とフェニルスルホン誘導体 (25a, 25b) (Scheme 2)とをカップリングして得られる5,7-ジエン体 (35a, 35b)を光照射、熱異性化して合成した (Scheme 3)。²³⁾ C20-アルデヒド (17)から合成されるC22-ヨード体 (18)とフェニルスルホン誘導体 (21b, 25a, 25b, 27a, 27b)を1,3-ジメチルイミダゾリジノン(DMI)の存在下、縮合し、9及び10の合成と同様に処理して1 α ,25-dihydroxyvitamin D₄ (2), 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₇ (4), 1 α -hydroxyvitamin D₄ (6), 1 α -hydroxyvitamin D₇ (8)を合成した (Scheme 4)。²⁴⁾

活性型ビタミンD₃ (1)の側鎖部を構成するフェニルスルホン誘導体 (21b)はメチルフェニルスルホン (19)とイソブチレンオキシド (20)との反応により合成した。²⁵⁾ 活性型ビタミンD誘導体 (2, 4, 9 及び10)の側鎖部 (25a, 25b)は光学活性なヒドロキシイソブチレート (22a, 22b)を用いて、ジオール (23a, 23b)、フェニルスルフィドの酸化を経て合成した。1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₅ (3), 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₆ (11)の側鎖部 (31b)は光学活性なエポキシド (28)をエチルマグネシウムブロミドで開環して得たジオール (29)を25a, 25bの合成と同様にして処理して調整した。フェニルスルホン誘導体 (24a, 24b 及び30)を選択的に脱水、ついで水素添加を行い、6, 1 α -hydroxyvitamin D₅

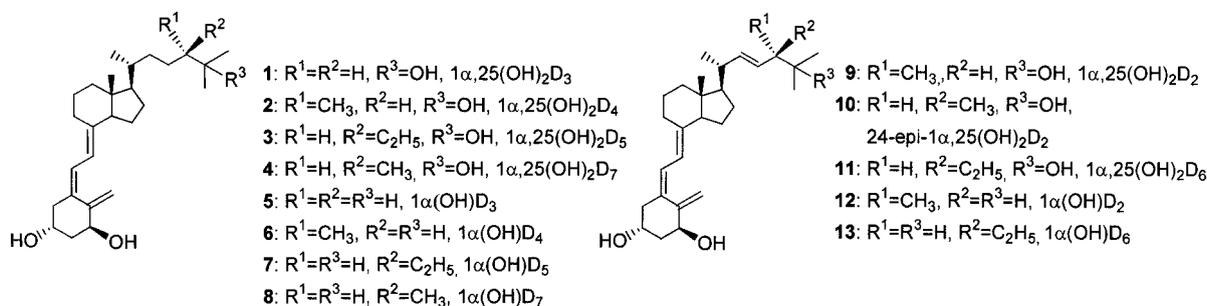
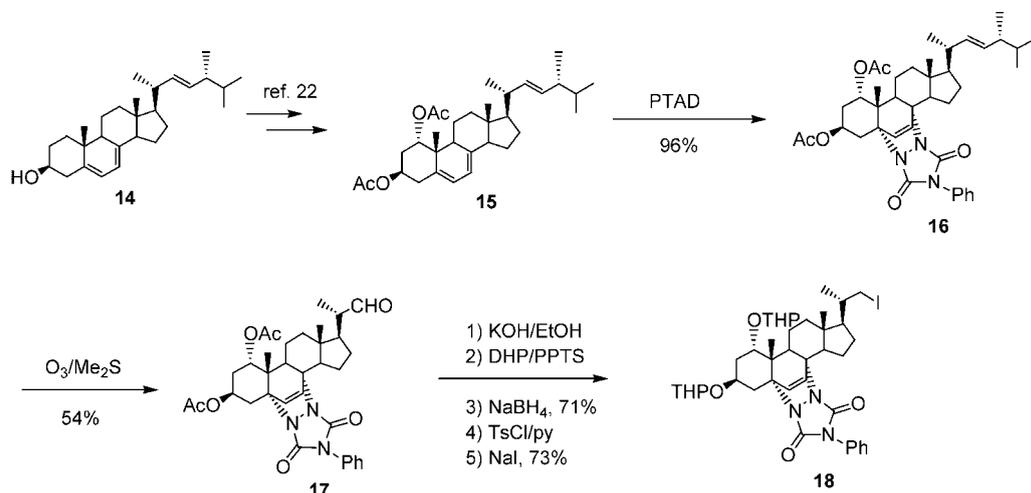
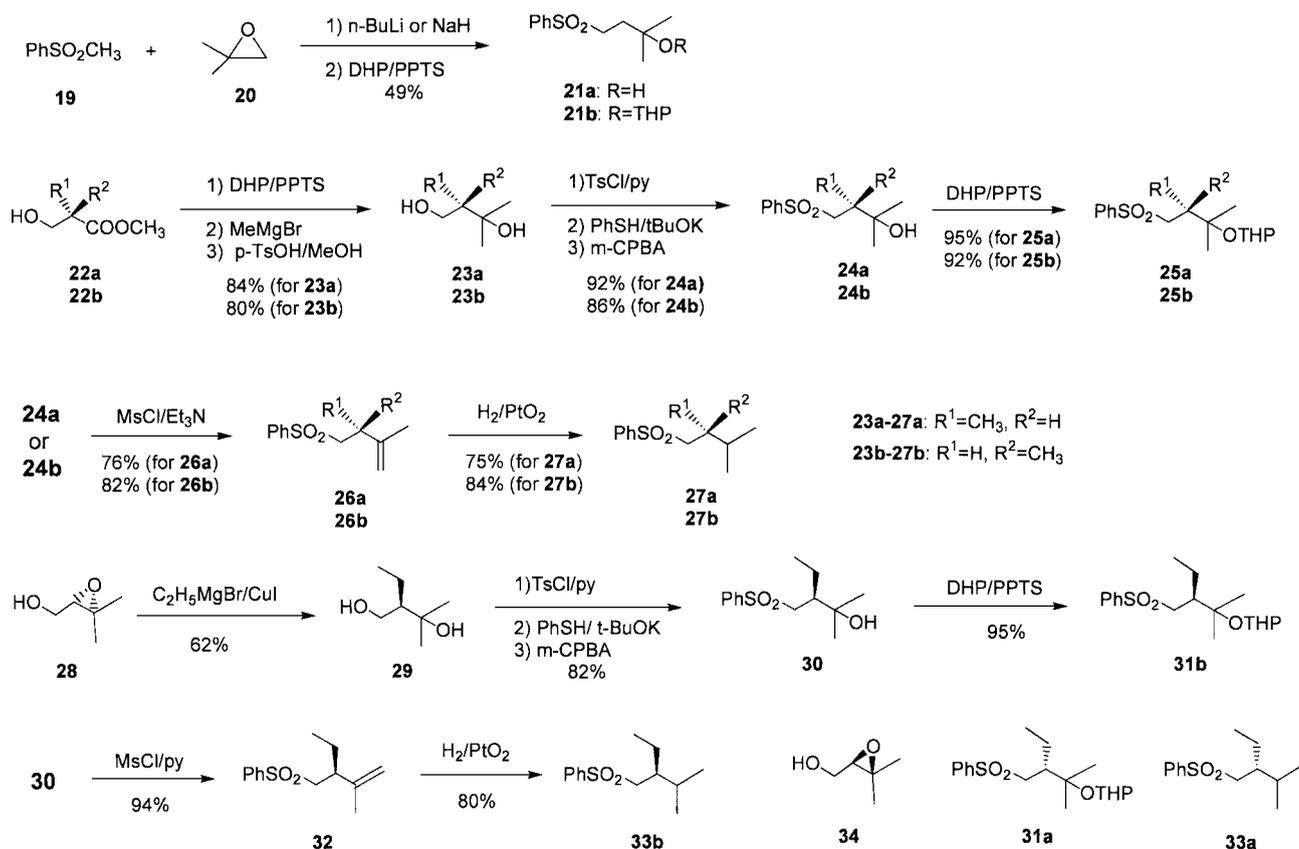


Fig. 1. Chemical Structures of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D and 1 α -Hydroxyvitamin D Analogues Derived from Sterols



Scheme 1. Synthesis of Steroid Moiety

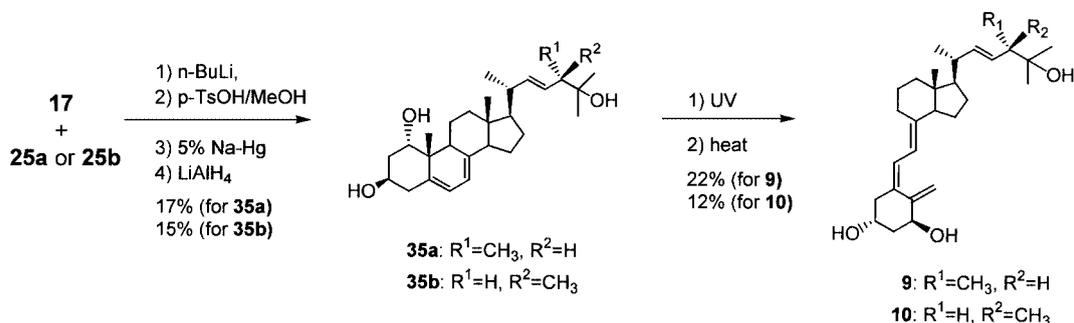
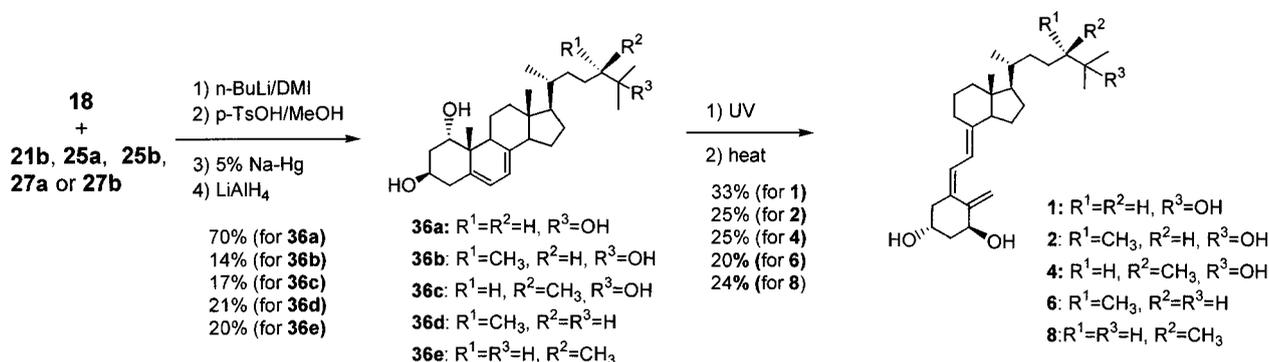


Scheme 2. Synthesis of Phenylsulfone Derivatives to Constitute Side Chain Moiety

(7), 8 及び 1α -hydroxyvitamin D₆ (13) 合成に用いるフェニルスルホン誘導体 (27a, 27b 及び 33b) を得た。光学活性エポキシド (28) のエナンチオマー (34) を用いて対応するフェニルスルホン誘導体 (31a, 33a) を合成した。ここで得られたジオール (23a, 23b 及び 29) は一級水酸基を MTPA エステ

ルにして ¹H-NMR を測定したところ純粋なものであった。

また、エルゴステロール (14) の 4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン (PTAD) 付加体 (37) から誘導される C22-ヨード体 (39) に側鎖を導入して 5,7-ジエン体 (40a—40g) を合成した。

Scheme 3. Synthesis of Active Forms of Vitamin D₂ and 24-Epi-D₂Scheme 4. Synthesis of Active Forms of Vitamin D₃, D₄ and D₇

ビタミン D 誘導体 (41a—41g) に変換後, DeLuca らの方法に従いシクロビタミン D 誘導体 (42a—42g) の 1 α 位に水酸基を導入し, 1, 2, 3, 4, 6, 7 及び 8 を合成した. C20-アルデヒド (38) とフェニルスルホン誘導体 (25a, 25b, 31b, 33b) を用いて C22-C23 に二重結合を有する 9, 10, 11, 13 を合成した (Scheme 5).^{26,27)} 活性型ビタミン D₃ 及び D₂ (5 及び 12) は市販のビタミン D₃ 及び D₂ を用いて同様に合成した.

2-2. 天然活性型ビタミン D 誘導体の生物活性と構造活性相関 合成した天然活性型ビタミン D 誘導体の生物活性における側鎖の影響を検討した.

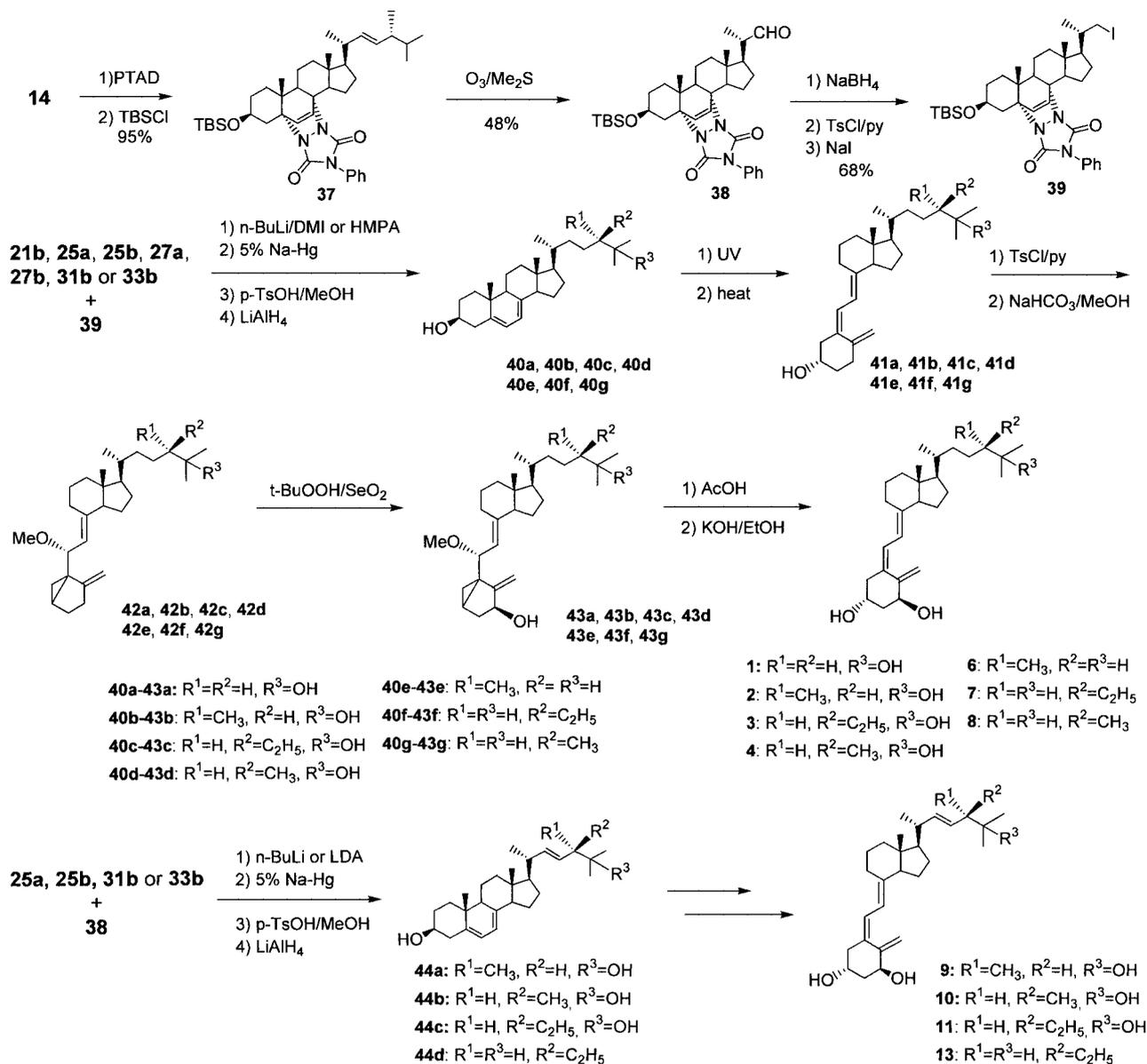
2-2-1. Vitamin D Receptor (VDR) との結合性 活性型ビタミン D は核内受容体である VDR と結合して初めてその生物活性を示すため, その生物活性は VDR との結合の強さに比例すると考えられる. しかし, 実際にはかならずしもそうではなく, いわゆる作用の分離がみられることも多い.^{28—32)}

活性型ビタミン D 誘導体 (2 及び 9) は 1 と同程度の結合性を示すが, 4, 10 はそれぞれ 30% と 20% と弱かった. 側鎖 24 位に S-メチル基の導入は

VDR との結合性を妨げないが, R-メチル基の導入は結合を弱めると考えられた. 立体的な要因が考えられる.

2-2-2. Vitamin D Binding Protein (DBP) との結合性 一般的には血漿中の DBP との結合性が高いほど血中での寿命が長い, すなわち生体内で安定であることを示している. しかし逆に強すぎると DBP から離脱しないために本来の薬理作用が発揮できない可能性もある.³³⁾ 活性型ビタミン 24-epi-D₂ (10) を除いて 2, 4 及び 9 はいずれも DBP との結合性は 1 に比較して増強された. 側鎖への 24-メチル基の導入は R 体, S 体とも DBP との結合を強めたが, C22-C23 位への二重結合の導入は DBP との結合性を弱める傾向がみられた. 二重結合の影響で側鎖が立体的に固定され DBP との結合が阻害されるためと推定される.

2-2-3. 細胞増殖抑制作用と分化誘導作用 従来の研究から 1 の誘導体及び代謝物の HL-60 に対する細胞増殖抑制作用と分化誘導作用はほぼ比例することが知られていた.³⁴⁾ 活性型ビタミン D 誘導体 (2 及び 9) は 1 と同等の活性を示し, VDR への



Scheme 5. Synthesis of Active Forms of Vitamin D Analogues via Cyclovitamin D Derivatives

親和性と一致した。しかし、**10**はVDRとの結合が弱いにもかかわらず**1**とほぼ同等の活性を示し、予想外の結果であった。^{35,36} 活性型ビタミンD₇(**4**)は**10**よりもVDRとの結合性が強いにも係わらず弱い活性を示した。**4**はDBPとの結合が非常に強いので本来の活性が減弱したと思われた。⁴⁵CaCl₂を用いるRaiszの系における骨吸収活性(*in vitro*)、MG-63 cellを用いた転写活性も同様の結果を示した(Table 1)。^{37,38}

2-2-4. カルシウム上昇作用 (In vivo) 血中カルシウム上昇作用を指標にして活性型ビタミンD₃(**1**)及びD₄(**2**)の毒性比較を行った。**1**及び**2**

を卵巣摘除した骨粗鬆症モデルラット(Wistar系)に6週間(5日/週)投与した。**1**を0.15 μg/kg投与したラットの血中のカルシウム濃度は10.5 mg/dlであった(コントロール群は9.6 mg/dl)。これに反して**2**を0.6 μg/kg投与した群では10.3 mg/dlであり、約4倍程度毒性が低いと推定された。**1**及び**2**のVDRとの結合性、骨吸収能(*in vitro*)はほぼ同等であり、この差はDBPの影響によると考えられる。活性型ビタミンD₄(**2**)は**1**と比較してVDRへの直接的な結合が生体内では弱くなったためと思われる。

以上示したように活性型ビタミンD誘導体の生

Table 1. Biological Activities of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}$ Analogues (% of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1))

| Biological activities | $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}$ analogues | | | |
|--|--|---|---|--|
| | $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_4$ (2) | $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_7$ (4) | $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_2$ (9) | 24-epi- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_2$ (10) |
| Competitive binding for calf thymus vitamin D receptor | 100 | 30 | 100 | 20 |
| Competitive binding to vitamin D binding protein | 500 | 1280 | 240 | 40 |
| Differentiation of human HL-60 cell lines | 100 | 40 | 60 | 70 |
| Inhibition of proliferation of human HL-60 cell lines | 110 | 60 | 80 | 100 |
| Bone-resorbing activity | 110 | — | 100 | — |

物活性は側鎖の二重結合の有無、24位アルキル基の立体化学によって変化することが分かった。このことはさらに側鎖を修飾することで新しい活性を持つ誘導体（代謝物も含めて）を見出せる可能性を示している。

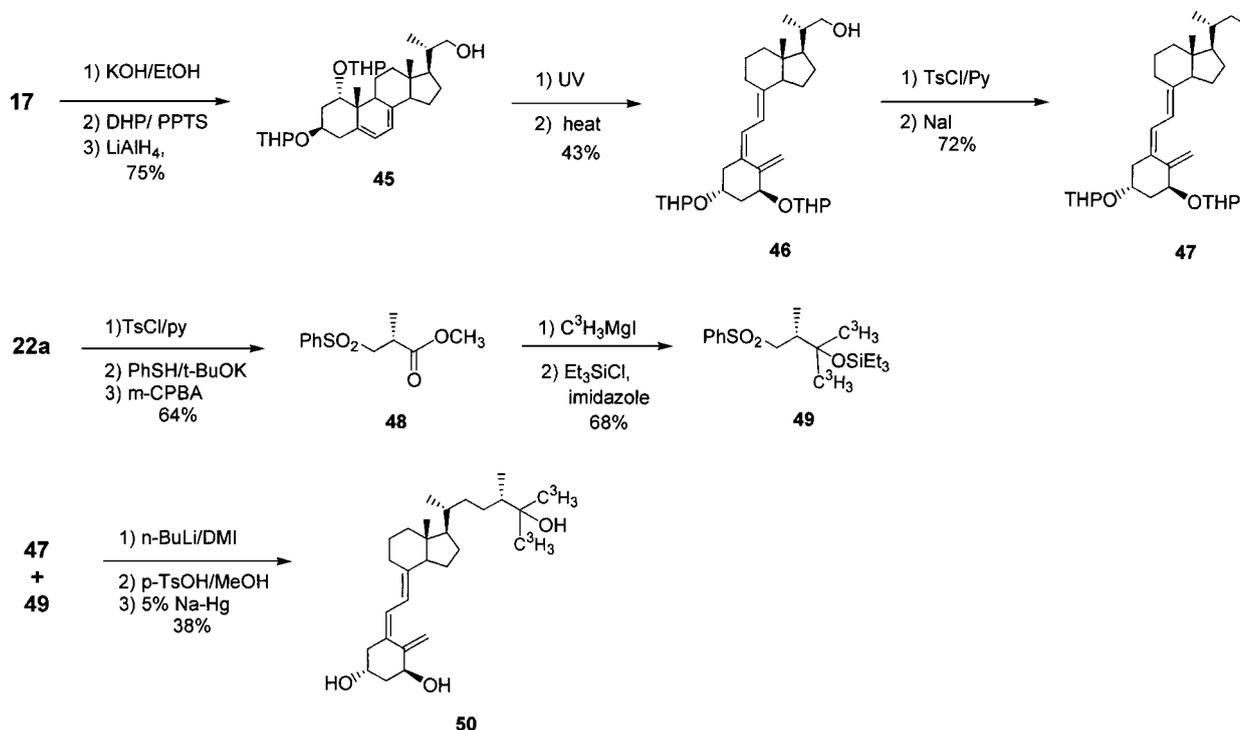
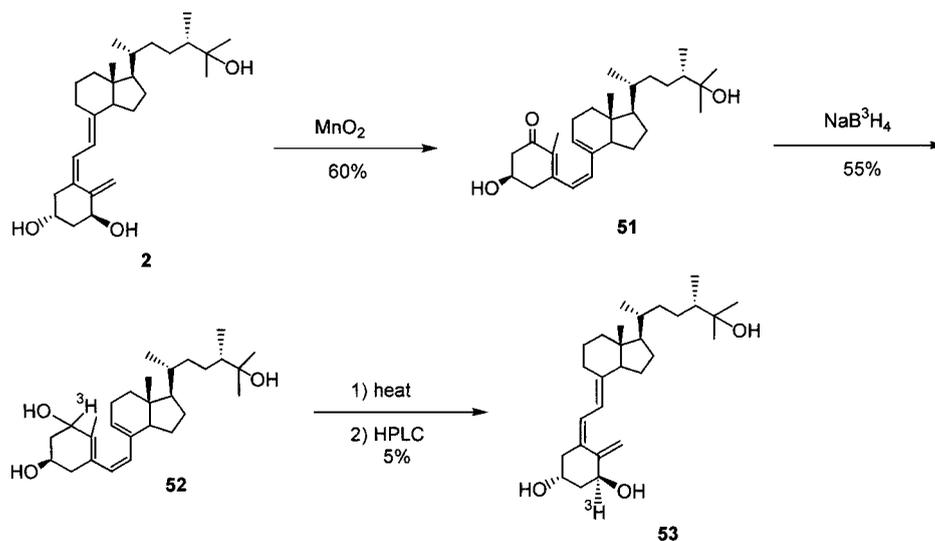
2-3. 代謝 2-2. で述べた活性型ビタミンD誘導体の中で活性型ビタミンD₄ (2) は活性型ビタミンD₃ (1) と比較して種々の *in vitro* の生物活性にはほとんど差がなく、DBPとの結合性が5倍高いことから生体内で長時間活性を示すと予想される。^{39,40)} この確認と側鎖24位メチル基の影響が代謝及び代謝物に及ぼす影響を調べるため *in vivo* の2の薬物動態、代謝経路、代謝物を1と比較検討した。

活性型ビタミンD誘導体は高毒性であり、少量しか投与できないため、生体内で極微量しか存在しない。そのため血中濃度測定用に側鎖にトリチウムを導入した $[26,27\text{-}^3\text{H}]\text{-}1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_4$ (50) を、また50の側鎖は代謝、開裂を受け易いので安定なステロイド骨格にトリチウムでラベル化した $[1\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-}1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_4$ (53) を代謝物探索のために合成した。C20-アルデヒド (17) の水酸基の保護基の変換、還元を行いC-22アルコール (45) とし、光照射、加熱し、ビタミンD誘導体 (46)、ついでC-22ヨード体 (47) に変換した。ヒドロキシイソブチレート (22a) を25aの合成に準じてフェニルスルホン誘導体 (48) に変換したのち、トリチウムでラベル化したグリニヤー試薬と反応、水酸基を保護し49を合成した。C-22ヨード体 (47) と49をカップリング、水酸基の保護基、フェニルスルホン基を順次脱離して50を合成した (Scheme 6)。

ラベル体 (53) は2のアリール位水酸基を酸化して得た51をNaB³H₄で還元、生成したプレ体 (52) を熱異性化して得た (Scheme 7)。合成した50と市販の $[26,27\text{-}^3\text{H}]\text{-}1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を用いてラジオレセプターアッセイ (RRA) 法により代謝パラメーターを測定した。DBPとの結合の強さから予想された通り、すべての代謝パラメーターは2の方が生体内で1に比較して長時間安定に存在していることを示した。もともと生体内で存在している量を考慮すれば、2の血漿薬物濃度曲線下面積 (AUC) は1の2—3倍に達した (Table 2)。

活性型ビタミンD₃ (1) の代謝経路は詳細に調べられており、まず24位、ついで23位の水酸化が起こり、ジオールが開裂、さらに酸化されて最終代謝物と言われている calcitric acid (54) を生成するのが主要な代謝経路とされている。^{41,42)} 活性型ビタミンD₄ (2) の場合は26 (27) 位あるいは28位のメチル基がカルボン酸まで酸化されたこれまでに知られていない代謝物55, 56が54と共に1:1:1の比率で得られた。これら代謝物の構造は2及び53をラットに経口投与し、胆汁を採取、酵素処理、メチルエステル体としたのち、HPLCで精製し、¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-1H COSY, ¹H-13C COSY, マススペクトルの解析によって、55及び56と推定した。さらに単離した55及び56のメチルエステル体がNaIO₄による酸化開裂で57と58を与えることから確認した (Figs. 2, 3)。^{43,44)}

代謝経路は2の24位、26 (27) 位及び28位が水酸化、さらに酸化されてカルボン酸 (55, 56) になると推定される。対応するトリオール誘導体は9の代謝でも認められているが、カルボン酸誘導体は報

Scheme 6. Synthesis of [26,27-³H]-1 α ,25(OH)₂D₄Scheme 7. Synthesis of [1 β -³H]-1 α ,25(OH)₂D₄

告されていない。^{45,46} 側鎖に二重結合あるいはアルキル基が存在することによってかなり代謝の機構が異なることが判明した。

これら代謝物の生物活性を検討するため合成検討を行った。メチルフェニルスルホン (19) とエポキシド (59) (ラセミ体) の反応で得たジオール (60) の選択的脱水、水酸基の保護を行い、フェニルスルホン誘導体 (62) を得た。C-22 ヨード体 (63) と

62 を縮合、ついで生成した C-28 アルコール誘導体 (64) を二重結合に変換してジエン体 (65) を合成した。ジエン体 (65) を等量の *m*-CPBA で酸化、還元さらに PTAD で処理すると 66 と 67 が 3/2 の比率で得られた。化合物 (66 及び 67) の二重結合をエポキシ化、加水分解してジオール、ついでアルデヒド、カルボン酸へと順次酸化し、68 と 69 を得た。現在、55, 56 への変換を検討中である (Scheme

8).

3. 神経突起伸長作用を有するステロールの合成及び構造活性相関

急激な高齢化に伴いアルツハイマー病やパーキンソン病のような中枢神経疾患が増加しており、これら疾患の治療を目的として種々のアプローチが行われている。近年、成熟した細胞でも切断された神経細胞突起の良好な再生が神経栄養因子 (neurotrophic factor: NTF) 等の神経細胞突起伸長因子に

Table 2. Pharmacokinetics Parameters of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1) and $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_4$ (2) after a Single Oral Administration in Male Rats or Dogs (1)^{a)}

| Pharmacokinetics parameters | $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1) | $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_4$ (2) |
|-------------------------------|--|--|
| T_{\max} (hr) | 2.0 | 2.0 |
| C_{\max} (pg/ml) | 661.9 | 757.5 |
| $T_{1/2}$ (2–12 h) | 3.5 | 5.9 |
| AUC (0–48 h) (pg · h/ml) | 7107.5 | 11611.7 |
| AUC (0–48 h) - BG (pg · h/ml) | 3241.2 | 10517.3 |

| Pharmacokinetics parameters | $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1) | $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_4$ (2) |
|-------------------------------|--|--|
| T_{\max} (hr) | 2.0 | 3.0 |
| C_{\max} (pg/ml) | 248.0 | 421.5 |
| $T_{1/2}$ (2–12 h) | 8.1 | 8.1 |
| AUC (0–48 h) (pg · h/ml) | 3062.5 | 4595.0 |
| AUC (0–48 h) - BG (pg · h/ml) | 2153.7 | 4423.1 |

a) Male rats were orally administered with $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ of 1 or 2. b) Male dogs (beagles) were orally administered with $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ of 1 or 2. Pharmacokinetics parameters were determined by means of radio receptor assay using $[26, 27\text{-}^3\text{H}]\text{-}1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or $[26, 27\text{-}^3\text{H}]\text{-}1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_4$ (50).

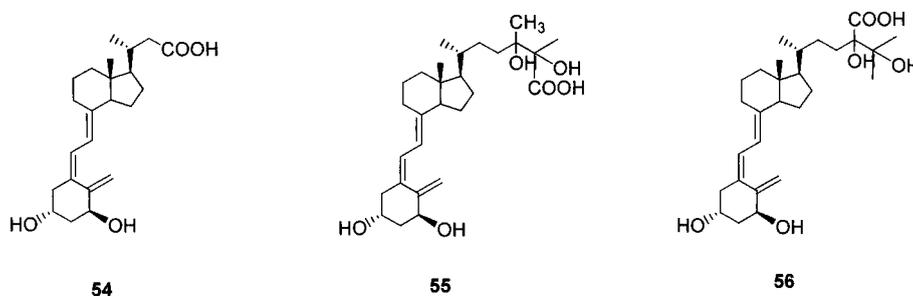


Fig. 2. Chemical Structures of Metabolites of 2

よって可能であることが報告された。したがって、中枢神経細胞突起伸長作用を有する化合物は有望な治療薬と考えられる。例えば、NTF ファミリーの1つである神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) を記憶や学習能力が低下したラットに投与するとこれらの機能が改善することから認知症の治療薬として期待された。^{47–49)} しかし、NGF はペプチドでありペプチダーゼによって容易に分解され、末梢投与では血液脳関門の通過も困難であり、実際の応用は困難なのが実情である。そのため血液脳関門を通過できる NGF 様作用を示すあるいは NGF の合成を促進する低分子化合物の探索が活発に行われており、これまでに微生物の代謝産物からスタウロスポリン、⁵⁰⁾ K-252a、⁵¹⁾ ラクタスタチン、⁵²⁾ エポラクタエン⁵³⁾ 等が見出されている。

筆者らはラット視床下部由来の初代培養神経細胞に対する神経突起伸長作用を指標として、細胞性粘菌 (*Dictyostelium purpureum* K1001) の代謝産物から NTF 作用を有する化合物をスクリーニング中に強い活性を有する低分子化合物を単離した。化合物の ^{13}C -NMR スペクトルがフコステロールを水素添加して得られるポリフェラスタノール (75b) とスチグマスタノール (75c) の内、75b と一致する

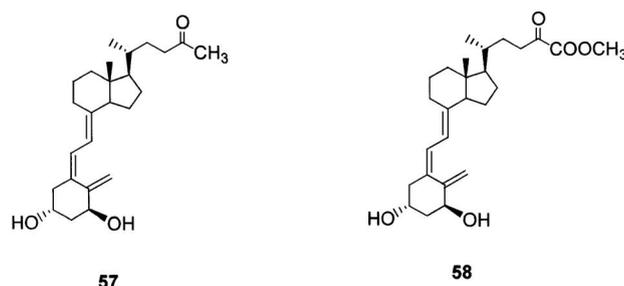
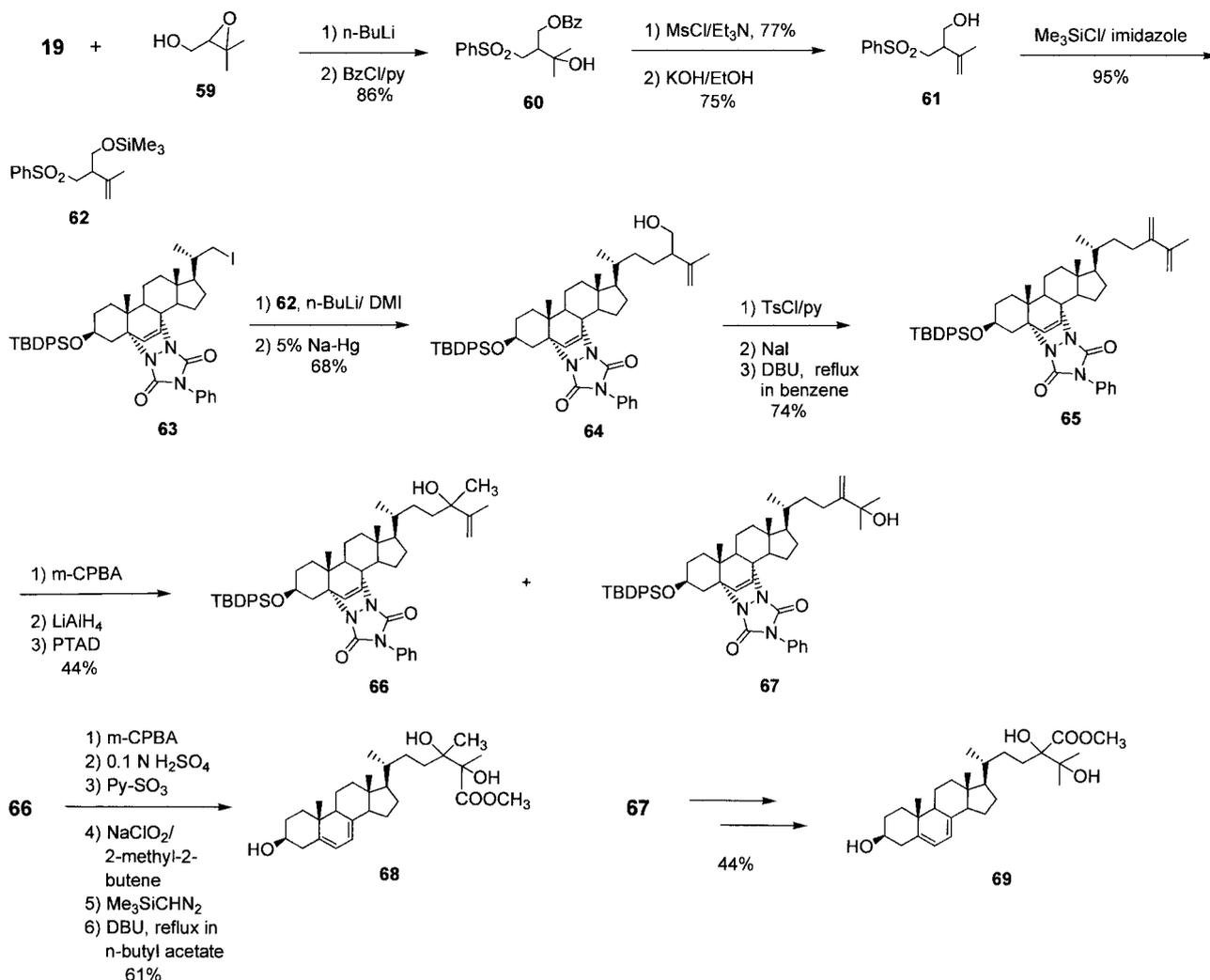


Fig. 3. NaIO_4 Oxidation Products of Methyl Esters of 55 and 56



Scheme 8. Preparation of Synthetic Intermediates of 55 and 56

こと及び単離した化合物のアセチル体の¹H-及び¹³C-NMR スペクトルが文献記載のジクチオステロール (74b) のアセチル体と一致することから 74b と決定した。^{54,55)} 最終的には合成によって得られた 74b とスペクトルデータが完全に一致したことから確認した。

ここでは培養で得られるジクチオステロールは極微量であるため、詳細な生物活性を検討するに足る量の合成とほかのステロール誘導体との構造活性相関について述べる。

3-1. ジクチオステロールの立体選択的合成

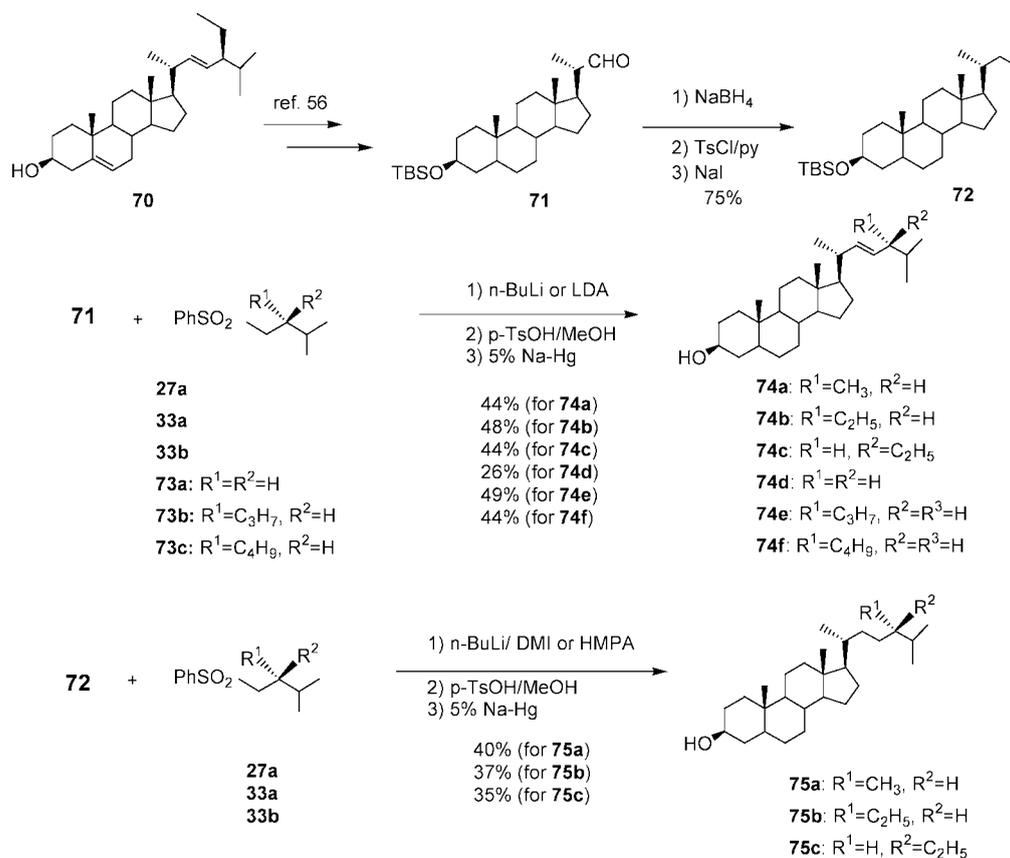
ジクチオステロール (74b) の合成はこれまでに W. Sucraw によって達成されているが、ステロイド側鎖部の構築が立体選択でないこと及び末端二重結合と内部二重結合の選択的な還元が必要であった。⁵⁶⁾ われわれは活性型ビタミン D₃ 及び D₆ の合成

に用いたフェニルスルホン誘導体 (33a, 33b) とスチグマステロール (70) より誘導される C-20 アルデヒド (71)⁵⁶⁾ とのカップリングによって 74b 及びその 24 位エピマー (74c) を立体選択的に合成した。ジクチオステロール (74b) の 24 位エピマー (74c) は 70 のハイドロボレーション、トシル化、還元による 76 の水酸基の除去で別途合成された。スチグマステロール (70) から誘導されるトシレート誘導体 (77) を LiAlH₄ で還元する際、エーテル中では反応が進行したが、THF, DME 中では反応は進行せず 76 のみが回収された。構造活性相関を検討するため種々の誘導体をステロイド誘導体 (71 及び 72) とフェニルスルホン誘導体 (27a, 33a, 33b, 73a-c) との反応で得た。化合物 (74d) は 21a を脱水、水素添加して得たフェニルスルホン誘導体 (73a) を用いて合成した。24 位がプロピル、ブチル基を

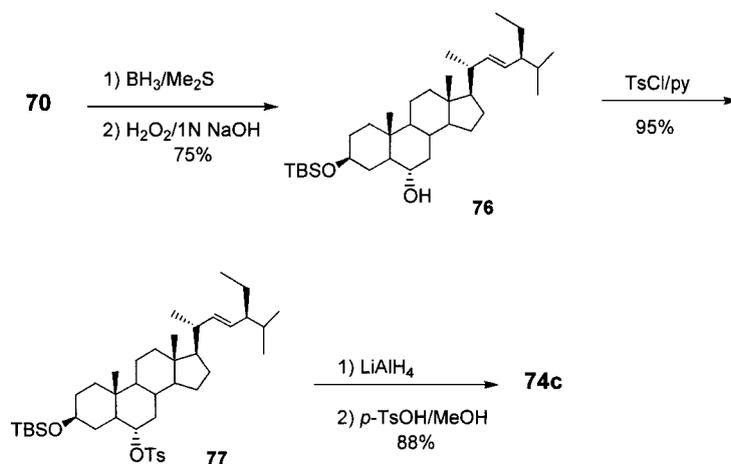
有する誘導体 (**74e**, **74f**) はエポキシド (**28**) とプロピルマグネシウムブロミド, *n*-ブチルリチウムとの反応で得られるフェニルスルホン誘導体 (**73b**, **73c**) を用いて合成した (Schemes 9, 10).

3-2. 構造活性相関 得られたジクチオステロール及び誘導体をラット視床下部由来の初代培養

神経細胞に対する発芽及び神経突起伸長作用を評価した. 陽性コントロールとしてアストロサイト培養上清 (ACM) を試験に加えた. 培養 4—6 日後に細胞体の 2 倍以上の突起を伸ばした神経細胞をカウントし, 溶媒コントロール分を引いたのち, ACM に対する割合 (% of ACM) で活性を示した.⁵⁷⁾



Scheme 9. Synthesis of Dictyosterol and Related Derivatives



Scheme 10. Alternative Synthesis of 24-Epimer of Dictyosterol

その結果、天然のステロールが活性を示すためには側鎖二重結合の存在、3位水酸基が保護されていないことが必須の条件であった。24位アルキル基に関しては水素、メチル基、エチル基の順で活性が向上した。しかし、エチル基よりバルキーなプロピル基、ブチル基では活性を全く示さなかった。ジクチオステロール(74b)が一番活性が強かったが、24位エピマー体(74c)もほぼ同じ活性を示し、24位エチル基の立体配置は活性に影響を及ぼさなかった(Table 3)。

側鎖に二重結合(C22-C23)を有する化合物が生物活性を有することが判明したので側鎖のほかの位置に二重結合を持つ誘導体を合成し、比較検討した。⁵⁸⁾ フェニルスルホン誘導体(61)を水素添加、水酸基を保護して得た78と39を縮合、28位の水酸基をヨード誘導体に変換したのち、脱ハロゲン化水素、保護基の脱離を行い、81を得た。化合物(39)の代わりに38を用いてジエン体(82)、39と62から83も合成したが残念ながら活性はなかった(Scheme 11)。⁵⁹⁾ なおこれらはエルゴステロールの生合成中間体である。^{60,61)} ステロール誘導体の微かな構造の違いが生物活性に大きな影響を及ぼしており、さらなる誘導体の検討が必要である。⁶²⁾

4. 小腸選択的LXRアゴニストの開発

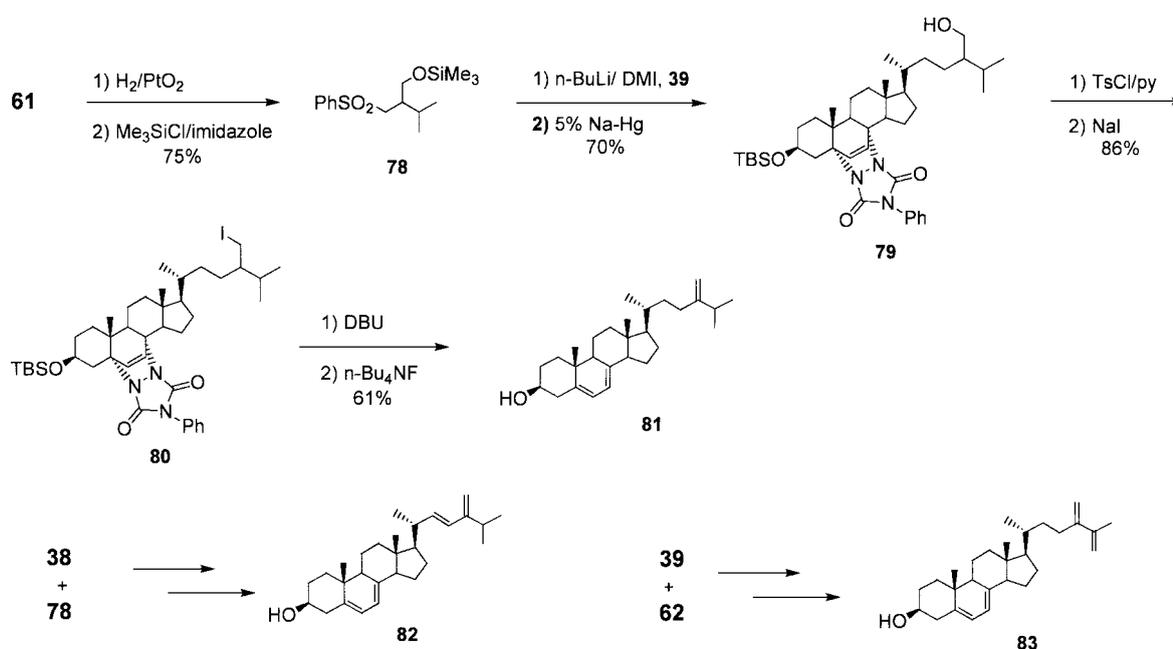
ステロールの代表的化合物であるコレステロール

は、細胞膜の構成成分及びステロイドホルモンや胆汁酸の原料として、生体にとって必要な化合物である。コレステロールの生体内バランスは、食物からの吸収、アセチルCoAからの生合成、胆汁酸への変換、胆汁中への排泄によって調節されている。この調節機構の障害、特に過剰状態は、高脂血症や動脈硬化症を引き起こし、虚血性心疾患、脳卒中の原

Table 3. Neurite Outgrowth Activity of Dictyosterol and Related Compounds (c : 1 μ g/ml)

| Compounds | Activity (% of ACM ^{a)}) |
|---|------------------------------------|
| 74a (ergost-22-en-3 β -ol) | 51 |
| 74b (dictyosterol) | 74 |
| 74b (dictyosterol) (c : 0.1 μ g/ml) | 39 |
| 74b (dictyosterol, 3 β -acetate) | 5 |
| 74c (stigmast-22-en-3 β -ol) | 68 |
| 74c (stigmast-22-en-3 β -ol) (c : 0.1 μ g/ml) | 36 |
| 74d (cholest-22-en-3 β -ol) | 20 |
| 74e (24-propyl-cholest-22-en-3 β -ol) | 0 |
| 74f (24-butyl-cholest-22-en-3 β -ol) | 0 |
| Campesterol | 10 |
| Cholesterol | 12 |
| Ergosterol | 37 |
| β -Sitosterol | 6 |
| Stigmasterol | 38 |
| Stigmastanol | 4 |

a) Astrocyte-conditioned medium.



Scheme 11. Synthesis of Biosynthetic Intermediates of Ergosterol

因となっているほか、肥満、糖尿病など生活習慣病、いわゆるメタボリックシンドロームの原因ともなる。生体内でコレステロールが過剰に存在するときはコレステロールの合成系遺伝子の発現を誘導しないので、前駆物質であるスクワレンから 24 (S),25-epoxycholesterol (**84**), コレステロールから 22 (R)-hydroxycholesterol (**85**) (Fig. 4) が合成され、それらをリガンドとして核内レセプター、liver X receptor (LXR) が転写因子として活性化する。LXR は脂質の代謝に関与する遺伝子発現を調節しており、その活性化は ABC (ATP binding cassette) トランスポーターを誘導し、コレステロール及び植物ステロール (フィトステロール) の小腸における吸収を阻害することが知られている。^{63,64} また、LXR はコレステロール代謝関連遺伝子のほかに、脂肪酸代謝遺伝子の発現も調節している。合成 LXR アゴニスト (例えば T0901317 (**86**), Fig. 4) の投与は抗動脈硬化作用は有するが、高中性脂肪血症を誘導するために臨床応用はなされていない。⁶⁵ したがって、コレステロール代謝に対する作用選択的なりガンドの開発が待たれていた。

植物ステロールにはコレステロール低下作用があることが以前から知られており、そのメカニズムとして小腸での競合阻害が考えられていた。最近の研究によりこの作用が LXR を介する可能性が示唆されている。^{66,67} 著者らはシトステロール血症の原因遺伝子であるステロール排出性 ABC トランスポーター、ABCG5/G8 (肝細胞中のコレステロールを胆汁中に排出し、また小腸で食物からのコレステロール吸収を抑制する) の遺伝子発現が LXR 依存的に誘導されること、^{66,67} コレステロール蓄積による動脈硬化を起こす遺伝病として知られていたタンジール病の原因遺伝子も ABC トランスポーターの遺伝子 (ABCA1) であること、腸粘膜由来細胞へ

のステロール投与により LXR の標的遺伝子が誘導されること、LXR の生体内リガンドがオキシステロール類 (**84**, **85**) であること等の事実から、天然の植物ステロール及びその誘導体がリガンドとして機能することを期待して検討を行った。これまでに合成したステロール及びステロイド誘導体の LXR アゴニスト活性を調べた (LXR には肝臓、小腸、脂肪組織、マクロファージなどに発現している LXR α と全身の組織に分布している LXR β がある)。

検討した化合物の中で ergst-22-en-1 α ,3 β -diol (**89**) が LXR α に対して最も効果的で、生体内リガンドで最も強いと言われている **84** よりも強い活性を示した。ステロール誘導体 (**89**) の二重結合を還元した **90** の活性は **89** と比べると低下した。LXR β に対する作用では **85** と **89** は同等の活性を示した。1 α 位に水酸基を有していても 5-エン誘導体 (**91**) の活性は弱く、5,7-ジエン化合物 (**92**) では活性はなかった。1 α 位に水酸基を有しない **74a** や天然の植物ステロール (エルゴスタノール, エルゴステロール, スチグマステロール, ブラシカステロール, カンベステロール, β -シトステロール, ジクチオステロール等) も活性はみられなかった (Table 4)。以上の事実からステロール誘導体が LXR を強く活性化するためには、1 α 位に水酸基を有することが重要で、ステロイド骨格が飽和されていること、さらに C22-C23 に二重結合の存在が有効であることが明らかになった。

化合物 (**89**) は当初 **12** のプロ体 (**15**) の中間体 (**91**) の合成検討時にやや高温 (-30°C) でバーチ還元を行った際に副生した生成物である。また、**89** はトリエノン (**93**)⁶⁸ のバーチ還元で得られる 1,3-ジオール (**94**) から誘導される C-20 アルデヒド (**95**) とフェニルスルホン誘導体 (**27a**) のカップリングによっても合成した (Scheme 12)。

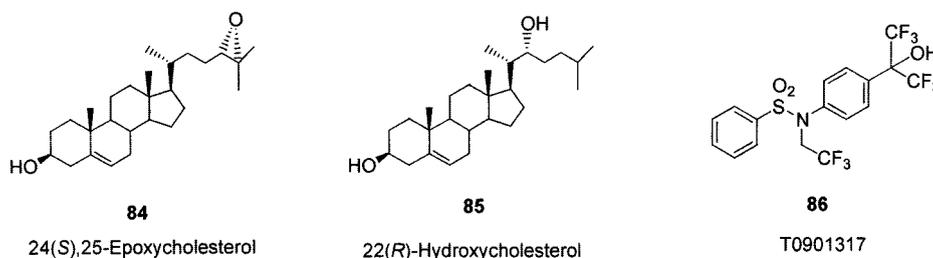


Fig. 4. Compounds Acting as LXR Agonist

ステロール誘導体 (**89** 及び **90** ($10 \mu\text{M}$)) をヒト腸粘膜由来細胞株 SW480 細胞へ投与したところ LXR の標的遺伝子 ABCA1 の遺伝子発現を著明に誘導した. ステロール誘導体 **89** (250 mg/kg) 及び非ステロイドアゴニスト T0901317 (**86**) (10 mg/kg) をマウスに経口投与し, 小腸, 肝臓における標的遺伝子の mRNA 発現を検討した. いずれも小腸では ABCA1, ABCG5, ABCG8 の発現を誘導した. LXR アゴニスト (**86**) は同時に肝臓において中性脂肪に関連する遺伝子 (SREBP-1c, FAS) を発現したが, **89** ではこのような発現はみられなかった (Table 5).⁶⁹⁾ 放射ラベル化したコレステロール投与後 (12 時間) のコレステロール吸収はコン

Table 4. Activation of LXR α and LXR β by Sterol Agonists

| Compound | EC ₅₀ ^{a)} (μM) | |
|-----------|--|-------------|
| | LXR α | LXR β |
| 84 | 0.81 | 1.1 |
| 85 | — | 3.2 |
| 89 | 0.41 | 1.1 |
| 90 | 1.3 | 8.8 |
| 91 | 15 | — |

a) Effective concentration for 50% maximal activation.

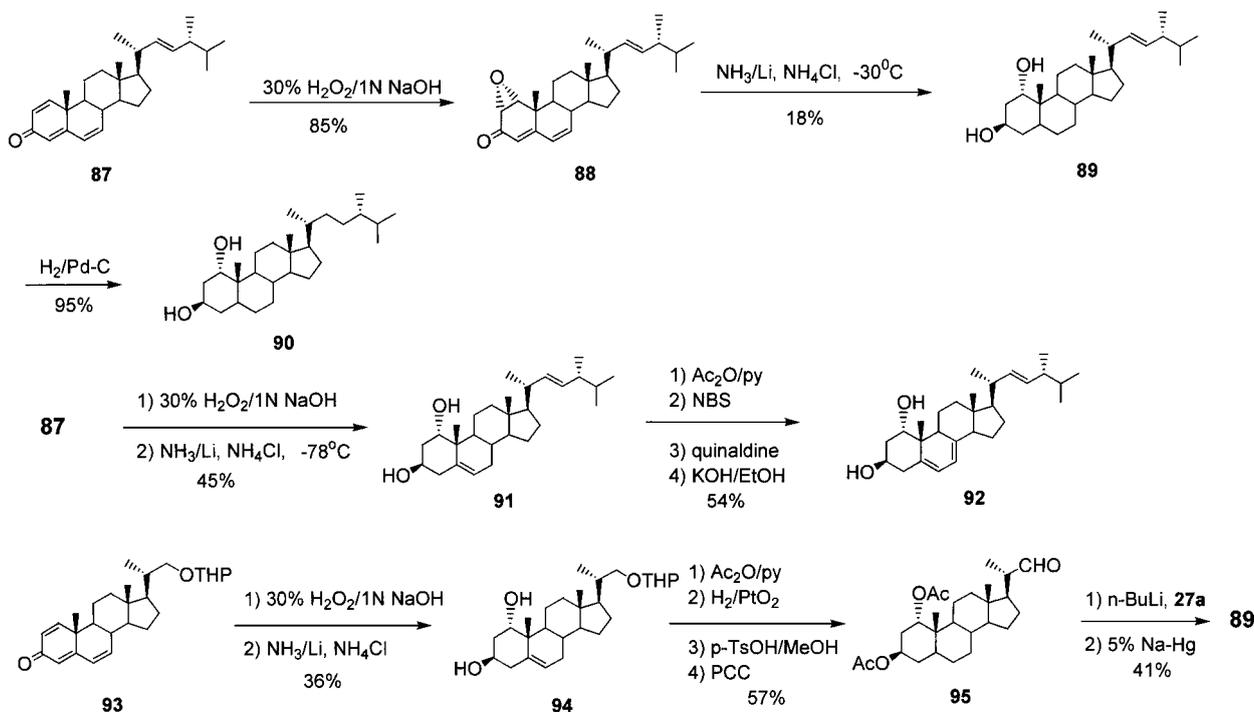
Table 5. LXR Target Gene Expression in Intestine and Liver of Mice Treated with **86** or **89** (% of Control) (1)^{a)}

| Gene expressions | 86 | 89 | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 10 mg/kg | 50 mg/kg | 250 mg/kg |
| ABCA1 | 350 | 220 | 230 |
| ABCG5 | 440 | 280 | 350 |
| ABCG8 | 7300 | 1800 | 3700 |
| LXR α | 140 | 110 | 110 |
| LXR β | 80 | 90 | 100 |

(2)^{b)}

| Gene expressions | 86 | 89 | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 10 mg/kg | 50 mg/kg | 250 mg/kg |
| ABCA1 | 170 | 120 | 120 |
| ABCG5 | 390 | 110 | 90 |
| ABCG8 | 560 | 110 | 90 |
| SREBP-1c | 420 | 130 | 160 |
| FAS | 430 | 140 | 160 |

a) Quantitative real-time PCR from intestinal RNA for ABCA1, ABCG5, ABCG8, LXR α and LXR β after treatment with **86** or **89**. b) Quantitative real-time PCR from liver RNA for ABCA1, ABCG5, ABCG8, SREBP-1c and FAS after treatment with **86** or **89**. Mice were orally administered with 10 mg/kg of **86** or 50 or 250 mg/kg of **89**. Twelve hours after administration, total RNA was extracted from intestinal and liver mucosa.

Scheme 12. Synthesis of LXR Agonists (**89**, **90**)

トロール群に対してそれぞれ 14% (86), 19% (89) と減少していた。アゴニスト (86) ではトリグリセリドは大幅に増加しており、高中性脂肪血症を誘導したが、89 ではコントロール群と差がみられなかった。以上の事実は 89 のコレステロール吸収抑制が小腸選択的な LXR を介したものであることを示唆するものである。⁷⁰⁻⁷²⁾ 植物ステロール誘導体である 89 は小腸で ABC トランスポーターの発現を誘導し、自らの排出を誘導するため肝臓に十分に到達できないか、到達しても肝臓に発現している ABCG5/8 により胆汁中へ排出される可能性が考えられる。非ステロール誘導体 (86) は ABCG5/8 の基質にならないため、肝臓での脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を誘導し、高中性脂肪血症を引き起こしたと思われる。以上示したように LXR は生体内コレステロールの異化と輸送を制御しており、コレステロール恒常性維持にとって極めて重要な核内レセプターである。LXR アゴニスト (89) は標的遺伝子産物の特性を利用した LXR のリガンドとして作用し、高脂血症、動脈硬化症に対する治療効果が期待される。

以上、ステロール誘導体の生物活性と側鎖が活性に及ぼす影響についてみてきた。その中で印象に残るのは側鎖の二重結合が生物活性に大きな影響を与えていることである。立体的な理由によるものと推定されるが、チオール、アミノ基等のマイケルアクセプターとしての機能の可能性も考えられる。ビタミン類についても興味ある結果が最近得られている。例えばゲラニルゲラニオール由来の側鎖を持つビタミン K₂ は本来の血液凝固作用のほかに骨形成作用や制がん作用を有するが、フィトール由来の側鎖を持つビタミン K₁ はそのような効果はみられない。また、ゲラニルゲラニオール由来のクロマン核を有するトコトリエノールはフィトール由来のトコフェロール (ビタミン E) よりはるかに強い抗酸化作用を有するし、さらにアポトーシス誘導作用、ヒト乳がん細胞の増殖抑制作用も示す。トコフェロールにはこのような作用はなく、逆にアポトーシス抑制作用を有する (ただし、ある種のエステル、例えば α -トコフェロールのコハク酸エステルはアポトーシス誘導作用を有している)。⁷³⁾ 二重結合の示す役割がもっと明らかになればより効果的な生物活性化合物の設計が可能になるかも知れない。

最後に、本総合論文の執筆に当たり有益なご助言をいただいた岡野登志夫教授 (神戸薬大)、槇島誠教授 (日大医学部)、本間誠次郎博士 (元帝国臓器製薬㈱)、川原富美男博士 (元杏林製薬㈱) 及び共同研究者の皆様に感謝いたします。

REFERENCES

- Holick M. F., Schnoes H. K., DeLuca H. F., Suda T., Cousins R. J., *J. Biochem.*, **10**, 2799-2804 (1971).
- Minghetti P. P., Norman A. W., *FASEB J.*, **2**, 3043-3053 (1988).
- Walters M. R., *Endocr. Rev.*, **13**, 719-764 (1992).
- 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).
- Honma Y., Hozumi M., Abe E., Konno K., Fukushima M., Hata S., Nishii Y., DeLuca H. F., Suda T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 201-204 (1983).
- Palmieri G. M., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 3516-3517 (1997).
- Bikle D. D., *Endocr. Rev.*, **13**, 765-784 (1992).
- Reichrath J., Perez A., Muller S. M., Chen T. C., Kerber A., Bahmer F. A., Holick M. F., *Acta Derm. Venereol.*, **77**, 268-272 (1997).
- Snyman J. R., De Sommers K. M., Steinmann M. A., Lizamore D. J., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **52**, 277-280 (1997).
- Bishop J. E., Collins D., Okamura W. H., Norman A. W., *J. Bone Miner. Res.*, **9**, 1277-1288 (1994).
- Bouillon R., Okamura W. H., *Endocr. Rev.*, **16**, 200-257 (1995).
- Lamprecht S. A., Lipken M., *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 601-614 (2003).
- Dalhoff K., Dancy J., Skovsgaard T., Hamberg K. J., Lofts F. J., Rosmordus O., Relinger S., Hansen J. B., Steward W. P., Skov T., Burcharth F., Evans T. R. J., *Br. J. Cancer*, **89**, 252-257 (2003).
- Windaus A., Trautmann G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **247**, 185-188 (1937).
- Wunderlich W., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **241**, 116-124 (1936).

- 16) Linsert O., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **241**, 125–128 (1936).
- 17) Ruigh W. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 1900–1902 (1942).
- 18) DeLuca H. F., Weller M., Blunt J. W., Neville P. F., *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 122–124 (1968).
- 19) Sjorden G., Smith C., Lindgren U., DeLuca H. F., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **178**, 432–436 (1985).
- 20) Ikekawa N., *Med. Res. Rev.*, **7**, 333–366 (1987).
- 21) Tachibana Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 3702–3704 (1986).
- 22) Tachibana Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 3915–3918 (1988).
- 23) Tsuji M., Yokoyama S., Tejima T., Tachibana Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 3132–3137 (1989).
- 24) Tsuji M., Yokoyama S., Tejima T., Tachibana Y., Ikekawa N., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 2233–2238 (1990).
- 25) Tachibana Y., Yokoyama S., Tsuji M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 2579–2603 (1989).
- 26) Paaren H. E., DeLuca H. F., Schnoes H. K., *J. Org. Chem.*, **45**, 3253–3258 (1980).
- 27) Tachibana Y., Yokoyama S., Tejima T., *Nippon Kagaku Kaishi*, 345–353 (1994).
- 28) Pike J. W., *Annu. Rev. Nutr.*, **11**, 189–216 (1991).
- 29) Yu V. C., Delsert C., Anderson B., Holloway J. M., Devary O. V., Naar A. M., Kim S. Y., Boutin J. M., Glass C. K., Rosenfeld M. G., *Cell*, **67**, 1251–1266 (1991).
- 30) Evans R. M., *Science*, **240**, 889–895 (1988).
- 31) Umesono K., Murakami K. K., Thompson C. C., Evans R. M., *Cell*, **65**, 1255–1266 (1991).
- 32) Kliewer S. A., Umesono K., Mangelsdorf D. J., *Nature*, **355**, 446–448 (1992).
- 33) Okano T., Tsugawa N., Masuda S., Takeuchi A., Kobayashi T., Takita Y., Nishii Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 1444–1447 (1989).
- 34) Miyaura C., Abe E., Kuribayashi T., Tanaka H., Konno K., Nishii Y., Suda T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 937–943 (1981).
- 35) Sato F., Okamoto Y., Ouchi Y., Kaneki M., Nakamura T., Ikekawa N., Orimo H., *Biochem. Biophys. Acta*, **1091**, 188–192 (1991).
- 36) Ostern V. K., Lau W. F., Lee S., Perlman K., Prah J., Schnoes H. K., DeLuca H. F., Ikekawa N., *J. Biol. Chem.*, **262**, 14164–14171 (1987).
- 37) Tsugawa N., Nakagawa K., Kawamoto Y., Tachibana Y., Hayashi T., Ozono K., Okano T., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 371–377 (1999).
- 38) Makishima M., Okabe-Kado J., Honma Y., *Brit. J. Cancer*, **77**, 33–39 (1998).
- 39) Bouillon R., Allewaert K., Van Leeuwen J. P., Tan B. K., Xiang D. Z., De Clereq P., Vandewalle M., Pols H. A., Bos M. P., Van Baelen H., *J. Biol. Chem.*, **267**, 3044–3051 (1992).
- 40) Kobayashi T., Tsugawa N., Okano T., Masuda S., Takeuchi A., Kubodera N., Nishii Y., *J. Biochem.*, **115**, 373–380 (1989).
- 41) Reddy G. S., Tserng K.-Y., *Biochemistry*, **25**, 5328–5336 (1986).
- 42) Onisco B. L., Esvelt R. P., Schnoes H. K., DeLuca H. F., *Biochemistry*, **19**, 4124–4130 (1980).
- 43) Tachibana Y., Tsuji M., *Steroids*, **66**, 93–97 (2001).
- 44) Tachibana Y., Tsuji M., Yokoyama S., Tejima T., Symposium papers, the 41th Symposium on the Chemistry of Natural Products, Nagoya, October 14, 1999, pp. 607–612.
- 45) Bligh E. G., Dyer W. J., Lera A. R., *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911–917 (1959).
- 46) Reddy G. S., Tserng K.-Y., Thomas B. R., Dayal R., Norman A.W., *Biochemistry*, **26**, 324–331 (1987).
- 47) Angeletti R., Bradshaw R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2417–2420 (1971).
- 48) Brinton R. D., Yamazaki R. S., *Pharmacol. Res.*, **15**, 386–398 (1998).
- 49) Lewin G. R., Barfdi Y. A., *Ann. Rev. Neurosci.*, **19**, 289–317 (1996).
- 50) Tomoda H., Omura S., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 935–949 (2000).
- 51) Koizumi S., Conttreras M. L., Matsuda Y., Hama T., Lazarovici P., Guroff G., *J. Neurosci.*, **8**, 715–721 (1988).
- 52) Omura S., Sasaki Y., Iwai Y., Takeshima H., *J. Antibiot.*, **48**, 535–546 (1995).
- 53) Makeya H., Takahashi I., Okada G., Isono K., Osada H., *J. Antibiot.*, **48**, 733–735 (1995).

- 54) Nes W. D., Norton R. A., Crumley F. G., Madigan S. J., Katz P. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 7565–7659 (1990).
- 55) Akihisa T., Matsubara Y., Chosh P., Thakur S., Tamura T., Matsumoto T., *Steroids*, **54**, 625–638 (1989).
- 56) Sucraw W., Slopianka N., Caldeira P. P., *Chem. Ber.*, **108**, 1101–1110 (1975).
- 57) Kawahara F., Saito H., Katsuki H., *Brain Res.*, **651**, 101–107 (1994).
- 58) Stonik V. A., Ponomareniko T. N., Makarieva V. M., Boguslavsky A. S., Dmitrenok S. N., Fedorov S. N., Strobikin S. A., *Comput. Biochem. Physiol., Part. B*, **120**, 337–347 (1998).
- 59) Tachibana Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1454–1458 (1998).
- 60) Fryberg M., Oehlschager A. C., Unrau A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 5747–5757 (1973).
- 61) Choudhry S. C., Bolic P. S., Coffen B. L., Pocela A., Maehr H., Monchand P. S., Serico L., Yang R. T., *J. Org. Chem.*, **58**, 1496–1500 (1993).
- 62) Tachibana Y., Kawahara F., Symposium papers, the 43rd Symposium on the Chemistry of Natural Products, Osaka, October 2, 2001, pp. 503–508.
- 63) Lehmann J. M., Kliewer S. A., Moore L. B., Smith-Oliver T. A., Oliver B. B., Su J. L., Sundseth S. S., Winegar D. A., Blanchard D. E., Spencer T. A., Willson T. M., *J. Biol. Chem.*, **272**, 3137–3140 (1997).
- 64) Repa J. J., Mangelsdorf D. J., *Nat. Med.*, **8**, 1243–1248 (2002).
- 65) Joseph S. B., McKilligin E., Pei L., Watson M. A., Collins A. R., Laffitte B. A., Chen M., Noh G., Goodman J., Hagger G. N., Tran J., Tippin T. K., Wang X., Lusi A. J., Hsueh W. A., Law R. E., Collins J. L., Willson T. M., Tontonoz P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 7604–7609 (2002).
- 66) Repa J. J., Berge K. E., Pomajzl C., Richardson J. A., Hobbs H., Mangelsdorf D. J., *J. Biol. Chem.* **277**, 18793–18800 (2002).
- 67) Plat J., Mensink R. P., *FASEB J.*, **16**, 1248–1253 (2002).
- 68) Furst A., Labler L., Meier W., *Helv. Chim. Acta*, **65**, 1499–1521 (1982).
- 69) Schultz J. R., Tu H., Luk A., Repa J. J., Medina J. C., Li L., Schwendner S., Wang S., Thoolen M., Mangelsdorf D. J., Lustig K. D., Shan B., *Genes Dev.*, **14**, 2831–2838 (2000).
- 70) Kaneko E., Matsuda M., Yamada Y., Tachibana Y., Shimamura I., Makishima M., *J. Biol. Chem.*, **278**, 36091–36098 (2003).
- 71) Kaneko E., Tachibana Y., Shimamura I., Makishima M., Symposium papers, the 45th Symposium on the Chemistry of Natural Products, Kyoto, October 6, 2003, pp. 251–256.
- 72) Tachibana Y., *Saibou*, **36**, 34–36 (2004).
- 73) Fukuzawa K., *Vitamins*, **79**, 431–443 (2005).