

強力なビタミン D 受容体アンタゴニストの創製に関する研究

齋藤 望

Creation of Highly Potent Vitamin D Receptor Antagonists

Nozomi SAITO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Suwarashi, Sagamiko-cho, Sagami-hara City 229-0195, Japan

(Received March 14, 2007)

Vitamin D receptor antagonist has attracted significant level of interests because of its potential utility in the treatment of Paget's disease, which is known as the most flagrant example of disordered bone remodeling and the second most common bone disease after osteoporosis in Anglo-Saxons. Recent studies on Paget's disease suggested a specific increase in osteoclasts sensitivity to the differentiation activity of active vitamin D₃ as the principal mechanism for abnormal bone formation. We set out to conduct a structure-activity relationship study on the first VDR antagonists of TEI-9647 and TEI-9648 (25-dehydro-1 α -hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone) toward improved VDR antagonistic activity. Given that both potent agonists and antagonists must have high affinity for the VDR, we hoped that our accumulated knowledge in VDR agonists would help us identify potent antagonists. First, 2 α -modified TEI-9647 analogs were synthesized, and then, 24-substitution was next investigated to stabilize its lactone structure under the physiological conditions. Finally, 2 α -modified 24-methyl-, 24,24-dimethyl-25-dehydro-1 α -hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone analogs were synthesized. It was found that 2 α ,24,24-trimethyl-TEI-9647 was found to possess approximately 90-fold improved antagonistic activity (IC₅₀ 0.093 nM) over the original TEI-9647 (IC₅₀ 8.3 nM).

Key words—vitamin D₃; vitamin D receptor (VDR); antagonist; hormone; α -methylene- γ -lactone

1. はじめに

活性型ビタミン D₃ (Fig. 1, **1**) は生体内において骨代謝を司るとともに、腫瘍細胞の増殖抑制や分化誘導作用、免疫調節作用など様々な生理作用を示すホルモン様物質である。¹⁻³⁾ **1** の主な作用は核内受容体スーパーファミリーに属するビタミン D 受容体 (VDR) との結合を引金として、標的遺伝子の転写を制御することによって発現する。⁴⁻⁷⁾ これまでわれわれは **1** の A 環部に着目し系統的な構造-活性相関研究を行ってきたが、その結果 2 α 位に適切な官能基を導入することにより、**1** の VDR への結合親和性を含む基本的なビタミン D 活性が飛躍的に向上することを初めて明らかにした。⁸⁻¹⁵⁾ 種々合成さ

れた 2 α 位修飾体の中でも、特にメチル基 (**1a**),^{8,9)} 3-ヒドロキシプロピル基 (**1b**)^{10,11)} 及び 3-ヒドロキシプロポキシ基 (**1c**)^{12,13)} を有する誘導体は **1** に比べて受容体親和性が 3-4 倍上昇する。

これまで合成された **1** の誘導体の数は 2000 を超えるとされているが、ほとんどが VDR アゴニストであり、アンタゴニストの報告はなかった。しかし 1999 年、石塚らは **1** の代謝物^{16,17)} 研究の過程にお

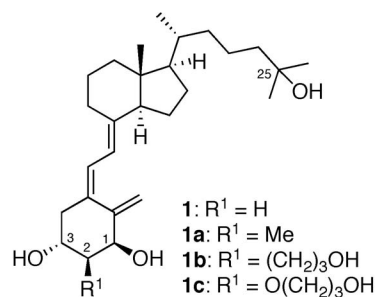


Fig. 1. Structures of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (**1**), and its 2 α -Modified Analogs (**1a-c**)

帝京大学薬学部 (〒229-0195 相模原市相模湖町寸沢嵐 1091-1)

現住所: 北海道大学大学院薬学研究院 (〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目)

*e-mail: nozomi-s@pharm.hokudai.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

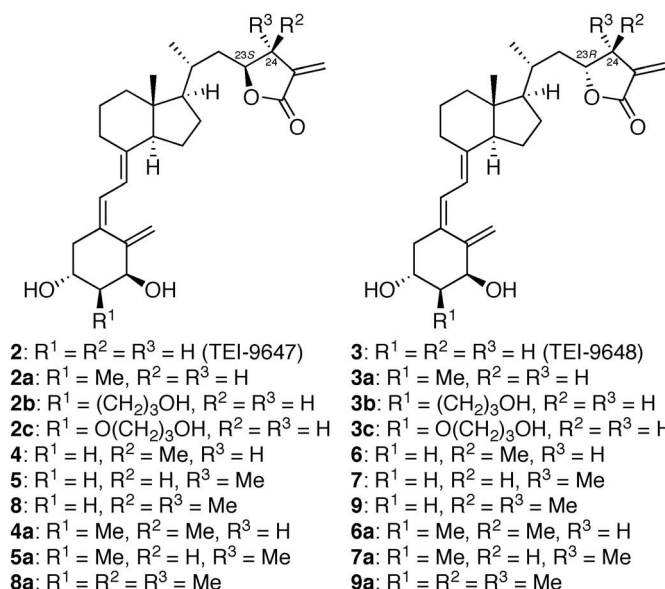


Fig. 2. Structures of 25-Dehydro-1 α -hydroxyvitamin D₃-26,23-lactones (TEI-9647: **2** and TEI-9648: **3**), and its 2 α -Modified Analogs (**2a-c** and **3a-c**), 24-Modified Analogs (**4-9**) and 2,24-Double Modified Analogs (**4a-9a**)

いて、VDR に対するアンタゴニスト作用を示す誘導体、ビタミン D₃ ラクトン TEI-9647 (Fig. 2, **2**) 及び TEI-9648 (**3**) を初めて見出した。¹⁸⁻²³⁾ **2** 及び **3** は側鎖に α -メチレン- γ -ラクトンを持つ構造的にも極めて興味深いビタミン D 誘導体であり、**1** によって引き起こされる VDR を介する作用を特異的に抑制する。^{24,25)} したがって、VDR アンタゴニストは VDR 機能亢進症、特に局所的な奇形骨疾患である Paget 骨病²⁶⁾ の治療薬として期待されている。そこで、われわれはビタミン D₃ ラクトン骨格を基盤とする Paget 骨病治療薬の開発を目指すことにした。しかし、**2** 及び **3** は VDR への結合親和性が天然ホルモン **1** の 10% 程度¹⁸⁾ と低く、また血中で速やかに分解されてしまうことが明らかとなっていた。そこで、われわれはこのような問題を解決するために以下に示すような分子設計を行った。

(1) ラクトン **2** 及び **3** の A 環 2 α 位にメチル、3-ヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロポキシ基を導入した化合物 (**2a-c** and **3a-c**) のデザインによる受容体親和性の向上。

(2) α -メチレン- γ -ラクトンのエキソメチレン部近傍にメチル基を導入した **4-9** のデザインによる血中内安定性の改善。

(3) A 環 2 α 位とラクトン環の同時修飾による生物活性発現に対する影響の探索。

このような研究戦略を基盤として合成を中心とする創薬研究を展開することにより、極めて高活性な VDR アンタゴニストの創出に成功したので、その経緯について紹介する。²⁷⁻³²⁾

2. 2 α 位修飾ビタミン D₃ ラクトンの合成と生物活性評価²⁷⁾

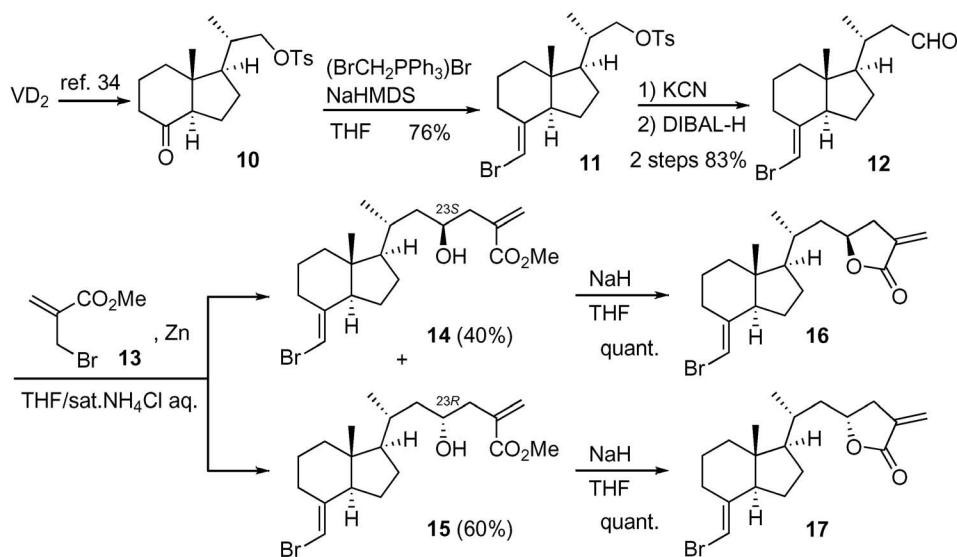
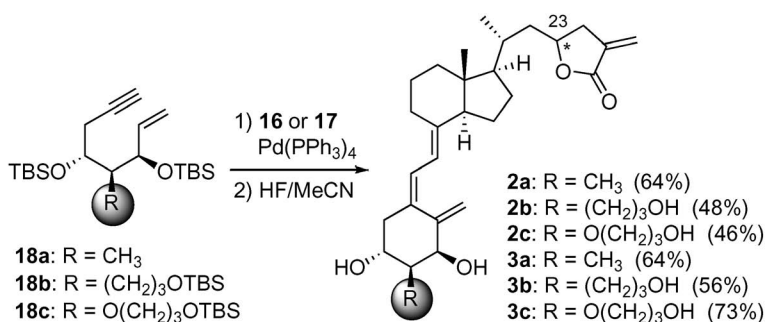
2-1. 誘導体の合成

ビタミン D₃ のトリエン骨格は、Pd 触媒を用いた A 環前駆体であるエンインと CD 環前駆体であるプロモオレフィンとのカップリング反応³³⁾ によって構築することにし、まず CD 環前駆体の合成を行った (Scheme 1)。市販のビタミン D₂ から文献記載の方法³⁴⁾ に従って調製したケトン **10** をプロモメチレン化して **11** を得た。**11** のトシル基をニトリル基へ変換後、DIBAL-H で還元し得られたアルデヒド **12** を、亜鉛存在下で **13** との Reformatsky 型反応に付したところ、 γ -ヒドロキシエステル **14** 及び **15** が得られた。最後にそれぞれ



齋藤 望

北海道大学大学院薬学研究院准教授。1972 年北海道生まれ。北海道大学薬学部卒業、北海道大学大学院薬学研究科修士・博士課程修了。2000 年日本学術振興会特別研究員 (PD)、UCSB 化学科博士研究員。2002 年帝京大学薬学部助手、同講師を経て、2006 年 10 月北海道大学大学院薬学研究院助教授。2007 年より現職。

Scheme 1. Synthesis of CD-ring Precursors **16** and **17**Scheme 2. Synthesis of 2α -Modified Vitamin D₃ Lactones (**2a-c** and **3a-c**)

れを NaH でラクトン化させると、**16** 及び **17** が定量的に生成した。

CD 環前駆体 **16** 及び **17** を、それぞれ A 環前駆体 (**18a-c**) と Pd 触媒存在下でカップリングさせた後 HF によって脱シリル化し、目的とする 2α 置換ビタミン D₃ ラクトン誘導体 **2a-c** 及び **3a-c** を合成した (Scheme 2)。

2-2. 2α 修飾体の生物活性評価 合成した **2a-c** 及び **3a-c** の生物活性評価の結果を Table 1 に示した。受容体結合親和性はニトリ小腸由来の VDR を用いて測定し、それぞれの受容体親和性は **1** の親和性を 100 としたときの相対値で示した。まず、**2** 及び **3** の VDR 親和性はそれぞれ天然ホルモン **1** の 12% 及び 7% であった。TEI-9647 (**2**) の 2α 位に置換基を導入した **2a-c** の受容体親和性は **2** とほぼ同じであったが、**2** の 23 位のエピマーである

TEI-9648 (**3**) タイプの化合物 (**3a-c**) においては、受容体親和性はいずれも **3** より大きく向上した。特に 2α 位にメチル基を導入した **3a** では、**3** の親和性よりも約 5 倍上昇し **1** の 37% となった。一方、アンタゴニスト活性は 10 nM の **1** による HL-60 細胞の分化誘導作用を 50% 阻害する値 (IC₅₀ 値) を指標として検討したが、**2** の IC₅₀ 値を 100 としたときの相対値で比較した。その結果、 2α 位の修飾によって顕著な活性の増強がみられた。TEI-9647 タイプの **2a** では **2** の約 10 倍に向上し、**2b** では約 30 倍、**2c** でも **2** の 12 倍のアンタゴニスト活性を示した。一方、TEI-9648 (**3**) タイプでも TEI-9647 タイプ (**2**) と比べると相対的に低いものの、いずれも **3** よりも高いアンタゴニスト活性を示し、**3** の 5-13 倍となることが明らかとなった。以上のようにわれわれは A 環の適切な修飾により、ビタミン D₃ ラク

トン誘導体においても VDR 親和性が向上するとともに、アンタゴニスト活性も顕著に増強されることを明らかにすることができた。

3. 24 位修飾ビタミン D₃ ラクトン誘導体の合成と生物活性評価²⁸⁻³²⁾

3-1. 24-モノメチル及び 24,24-ジメチル体の合成^{28,30,31)} ラクトン環 24 位への置換基の導入には大罵らの低原子価クロム錯体による *syn* 選択的ア

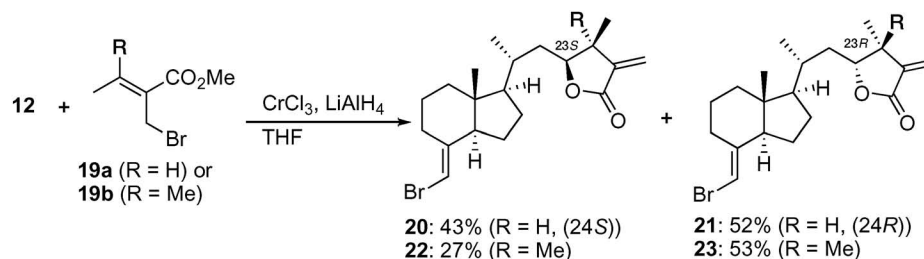
リル化-ラクトン化反応³⁵⁾を利用することにし、まず 23,24-*syn*-24-モノメチル体の合成を行った (Scheme 3). アルデヒド **12** 及び **19a** を CrCl₃ と LiAlH₄ から調製した低原子価クロム錯体と反応させたところ、良好な収率でラクトン体 **20** 及び **21** が生成した。ラクトン環上の側鎖の立体配置は、NOE 実験と楠見らによる改良 Mosher 法³⁶⁾を組み合わせることにより、**20** が (23*S*,24*S*) 配置で、**21** が (23*R*,24*R*) 配置であるとそれぞれ決定した。一方、24,24-ジメチル体の CD 環前駆体 **22** 及び **23** も同様に、アルデヒド **12** とブロム体 **19b** を低原子価クロム錯体存在下で反応させることによって合成した。なお、**22** 及び **23** の絶対立体配置はいずれも X 線結晶構造解析によって決定した。

次に 23,24-*anti* ラクトン誘導体を対応する 23,24-*syn* 体の 23 位の立体配置を反転する経路で合成することにした (Scheme 4). まず (23*S*,24*S*)-**20** を DIBAL-H でジオールとしてから、第一級水酸基をピバロイル (Piv) 基で保護、第二級水酸基を酸化してケトン **24** とした。ケトン **24** を LiAlH(O*t*Bu)₃

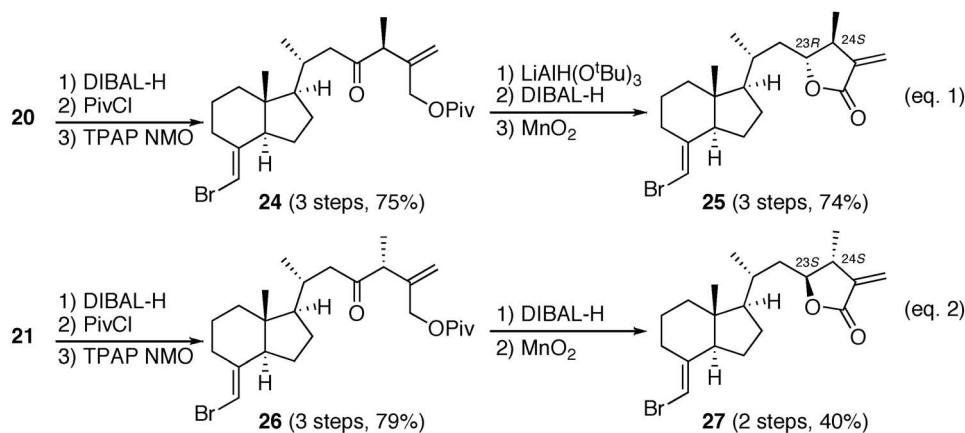
Table 1. Biological Activities of **2a-c** and **3a-c**

Compound	VDR binding affinity ^{a)}	Antagonistic activity ^{b)}
2 (TEI-9647)	12	100
2a	16	1019
2b	18	2989
2c	16	1160
.....		
3 (TEI-9648)	7	7
3a	37	38
3b	33	100
3c	23	66

a) The potency of **1** is normalized to 100. b) The antagonistic activity was assessed in terms of IC₅₀ for differentiation of HL-60 cells induced by 10 nM of **1**. The potency of **2** (IC₅₀=8.3 nM) is normalized to 100.



Scheme 3. Synthesis of CD-ring Precursors **20-23** by Cr-mediated Allylation-lactonization Cascade



Scheme 4. Synthesis of 23,24-*anti*-lactone Derivatives (**25** and **27**)

で立体選択的に還元した後、Piv基の脱保護、酸化を経て(23*R*,24*S*)-**25**へ導いた(Eq. (1)). 一方、その立体異性体である(23*S*,24*R*)-**27**も同様に、対応する**21**から数工程を経て合成した(Eq. (2)).

合成した24-モノメチル体の4種類のジアステレオマー(**20**, **21**, **25**及び**27**)及び24,24-ジメチル体(**22**及び**23**)を、A環前駆体(**18**)とPd触媒存在下でカップリングさせてから、脱シリル化を行い、対応する24位置換ビタミンD₃ラクトン誘導体を(**4**-**9**)を合成した(Scheme 5).

3-2. 24位修飾体の生物活性評価 24-モノメチル体**4**-**7**及び24,24-ジメチル体**8**と**9**の生物活性評価を行った(Table 2). TEI-9647(**2**)の24位にメチル基を1つ導入した**4**及び**5**ではいずれもVDRへの結合親和性が向上し、それぞれ**2**の2.4倍、1.8倍となった. また、その立体異性体である**3**の24モノメチル体**6**及び**7**では、メチル基の導入による受容体親和性への影響はほとんどみられなかった. 一方、24,24-ジメチル体の場合、23*S*配置

の**8**では**2**の3倍の受容体親和性を示すとともに、23*R*配置の**9**においてもVDR親和性は向上し**3**の2.6倍となった. さらにアンタゴニスト活性は24-モノメチル体、24,24-ジメチル体のいずれの場合も23*S*シリーズにおいて大きく向上し、モノメチル体**4**及び**5**では2倍強の増強がみられ、24,24-ジメチル体では約13倍となった. 一方、23*R*配置を持つTEI-9648タイプの誘導体では、**6**において**3**とほぼ同じであったものの、**7**及び**9**ではいずれも**3**の約2.7倍程度のアンタゴニスト活性の増強がみられた. このようにラクトン環上の置換基の立体配置の違いを反映しつつ生物活性が著しく変化する点は非常に興味を持たれる.³⁷⁾

4. 2 α 及び24位の同時修飾体の生物活性

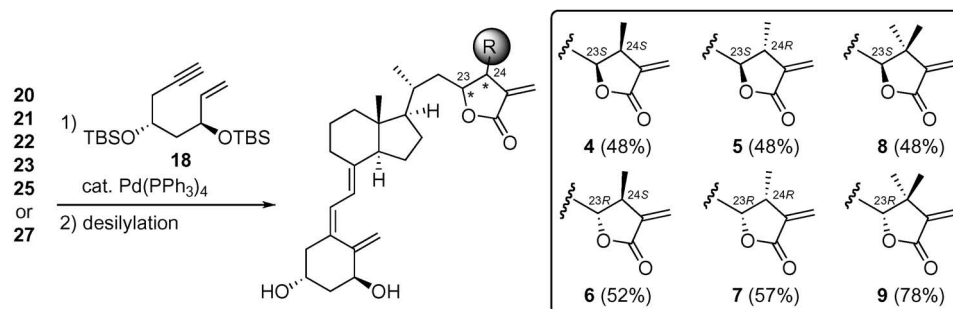
最後にA環部の2 α 位とラクトン環上の24位の両方にメチル基を持つ同時修飾体(**4a**-**9a**)を合成し、生物活性評価を行った. その結果、受容体親和性及びアンタゴニスト活性ともに大きく増強されることが明らかとなった(Table 3). すなわち23*S*配置のTEI-9647タイプにおいては、モノメチル体**4a**で**2**の約5倍のVDR親和性と38倍のアンタゴニスト活性を示した. **5a**の場合、受容体親和性は**2**の2倍程度であったが、アンタゴニスト活性は約62倍となった. さらに2 α ,24,24-トリメチル体(**8a**)は**2**の約5倍のVDR結合親和性と89倍のアンタゴニスト活性を示した. **5a**を用いた場合10 nMの**1**の作用を50%阻害する濃度は、わずか0.093 nMである. 一方、TEI-9648タイプの生物活性はTEI-9647タイプよりは低いものの、2 α 位と24位の同時修飾によって増強されることも明らかとなった.

Table 2. Biological Activities of **4**-**9**

Compound	VDR binding affinity ^{a)}	Antagonistic activity ^{b)}
2	12	100
4	23 <i>S</i> -series	250
5		220
8		1318

3	7	7
6	23 <i>R</i> -series	7
7		18
9		19

^{a)} The potency of **1** is normalized to 100. ^{b)} The antagonistic activity was assessed in terms of IC₅₀ for differentiation of HL-60 cells induced by 10 nM of **1**. The potency of **2** (IC₅₀=8.3 nM) is normalized to 100.



Scheme 5. Synthesis of 24-Methylvitamin D₃ Lactones (**4**-**7**) and 24,24-Dimethylvitamin D₃ Lactones (**8** and **9**)

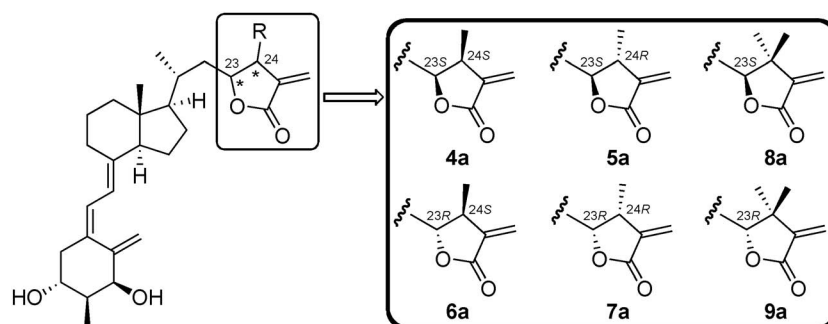


Table 3. Biological Activities of 4a–9a

23S-series			23R-series		
Compound	VDR binding affinity ^{a)}	Antagonistic activity ^{b)}	Compound	VDR binding affinity ^{a)}	Antagonistic activity ^{b)}
2	12	100	3	7	7
4a	63	3752	6a	12	85
5a	23	6191	7a	5	476
8a	67	8925	9a	48	143

a) The potency of **1** is normalized to 100. b) The antagonistic activity was assessed in terms of IC₅₀ for differentiation of HL-60 cells induced by 10 nM of **1**. The potency of **2** (IC₅₀=8.3 nM) is normalized to 100.

5. 考 察

一般に活性型ビタミン D₃ (**1**) 及びその誘導体による VDR を介した遺伝子発現は、まず転写不活性なアポ型の VDR のリガンド結合領域 (ligand-binding domain, LBD) に **1** を始めとするリガンドが結合することから開始される。リガンドが結合した VDR はコンフォメーション変化を起こし転写活性なホロ型へ移行する。このホロ型の VDR に転写共役因子が結合することによって形成される巨大なタンパク複合体が、標的遺伝子を活性化し遺伝子発現に至る。³⁸⁾ この VDR のコンフォメーション変化の過程では、受容体 C 末端の α -helix である helix 12 の位置が重要になる。Helix 12 は転写活性化に必要なコアクチベータなどのタンパクと相互作用する部位を持ち、VDR 表面のどこに位置するかによってリガンドの作用がアゴニスト作用となるのかアンタゴニスト作用となるのか決定される。すなわち、様々なリガンドの構造の違いによる生物活性の変化は、結合したリガンドの種類によって helix 12 の受容体表面における位置がそれぞれ異なるためということになる。³⁹⁾ 一方、VDR アンタゴニストである **2** が VDR の LBD に結合すると、アゴニストの場合と異なり、転写不活性なコンフォメーションへ移行する。⁴⁰⁾ われわれはこの異常なコンフォメー

ション変化は LBD 中のアミノ酸残基とリガンドのエキソメチレン部との相互作用によるものではないかと考えた。最近、LBD 中の helix 11 上及び、helix 11 と helix 12 を連結するヒンジ部位にそれぞれ存在する Cys403 と Cys410 のシステイン残基が、**2** のアンタゴニスト作用発現に係わっていることが明らかにされた。^{41,42)} また、TEI-9647 のラクトン部を様々に変化させた誘導体の合成研究によってアンタゴニスト活性発現にはオレフィン上に置換基を持たない α -メチレン- γ -ラクトン構造が必須であることも分かっている。⁴³⁾ 以上の知見よりわれわれは VDR-LBD 中の Cys403 及び Cys410 のメルカプト基が **2** のエキソメチレン部に 1,4-付加し対応する VDR-**2** 複合体が生成し得るのではないかと考えた。⁴⁴⁾ そのような受容体とリガンドとの異常な相互作用の影響によって helix 12 が通常のアゴニストの場合とは異なる場所へ移動する。その結果、VDR が転写活性なコンフォメーションにならないため、**2** は VDR アンタゴニストとして働くのではないかと推定される。今回報告したビタミン D₃ ラクトン誘導体の中には極めて高いアンタゴニスト活性を示す化合物が見出された。活性が向上した詳細な理由については明らかではないが、恐らく、それらのビタミン D₃ ラクトン誘導体がリガンド結合領域中で

上述したようなシステイン残基との相互作用に有利に働く位置に固定されたためと考えている。

6. おわりに

以上のようにわれわれは強力な VDR アンタゴニストの創製を目指し、ビタミン D₃ ラクトン骨格を基盤とする構造展開研究を行ってきた。特にわれわれが VDR アゴニストの合成研究で見出した A 環部 2 α 位への受容体親和性モチーフとラクトン環 24 位への置換基の導入を機軸として様々な誘導体を合成した結果、極めて低濃度で活性型ビタミン D₃ の作用を抑制する化合物として、(23S)-2 α ,24,24-trimethylvitamin D₃-26,23-lactone (**8a**) などを見出すことができた。⁴⁵⁾ 今後、これらの誘導体が Paget 骨病の新しい治療薬のリード化合物や、アンタゴニスト活性発現機構の解明のためのツールとなることを期待している。

謝辞 本研究は帝京大学薬学部有機化学講座薬化学教室で行われたものであり、終始ご懇篤なるご指導ご鞭撻を賜りました橘高敦史教授に深く感謝いたします。ここに紹介した研究成果は、参照論文に記載した共同研究者の皆様のご協力によるものです。特に毎日夜遅くまで実験を行ってくれた帝京大学大学院薬学研究科・松永敏広修士並びに増田麻奈美修士に感謝するとともに、帝人ファーマ(株)の共同研究者諸氏(竹之内一弥博士、石塚誠一博士)に厚くお礼申し上げます。なお、本研究は文部科学省科学研究費若手研究(B)、武田科学振興財団による助成を受けたものであり、これらの助成に深く感謝致します。

REFERENCES AND NOTES

- 1) "Vitamin D," 2nd eds, ed. by Feldman D., Glorieux F. H., Pike J. W., Academic Press, New York, 2005.
- 2) Ettinger R. A., DeLuca H. F., *Adv. Drug Res.*, **28**, 269–312 (1996).
- 3) Bouillon R., Okamura W. H., Norman A. W., *Endocr. Rev.*, **16**, 200–257 (1995).
- 4) Evans R. M., *Science*, **240**, 889–895 (1988).
- 5) Umezono K., Murakami K. K., Thompson C. C., *Cell*, **65**, 1255–1266 (1991).
- 6) Chambon P., *Mol. Endocrinol.*, **19**, 1418–1428 (2005).
- 7) 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).
- 8) Konno K., Maki S., Fujishima T., Liu Z., Miura D., Chokki M., Takayama H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 151–156 (1998).
- 9) Konno K., Fujishima T., Maki S., Liu Z., Miura D., Chokki M., Ishizuka S., Yamaguchi K., Kan Y., Kurihara M., Miyata N., Smith C., DeLuca H. F., Takayama H., *J. Med. Chem.*, **43**, 4247–4265 (2000).
- 10) Suhara Y., Nihei K.-i., Tanigawa H., Fujishima T., Konno K., Nakagawa K., Okano T., Takayama H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 1129–1132 (2000).
- 11) Suhara Y., Nihei K.-i., Kurihara M., Kittaka A., Yamaguchi K., Fujishima T., Konno K., Miyata N., Takayama H., *J. Org. Chem.*, **66**, 8760–8771 (2001).
- 12) Kittaka A., Suhara Y., Takayanagi H., Fujishima T., Kurihara M., Takayama H., *Org. Lett.*, **2**, 2619–2622 (2000).
- 13) Saito N., Suhara Y., Kurihara M., Fujishima T., Honzawa S., Takayanagi H., Kozono T., Matsumoto M., Ohmori M., Miyata N., Takayama H., Kittaka A., *J. Org. Chem.*, **69**, 7463–7471 (2004).
- 14) For our accout, see: Takayama H., Kittaka A., Fujishima T., Suhara Y., "Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy, Recent Results in Cancer Research 164," eds. by Reichrath J., Friedrich M., Tilgen W., Springer-Verlag, Berlin · Heidelberg, 2003, pp. 289–317.
- 15) This concept was also applicable to 1 α ,25-dihydroxy-19-norvitamin D₃, see: Ono K., Yoshida A., Saito N., Fujishima T., Honzawa S., Suhara Y., Kishimoto S., Sugiura T., Waku K., Takayama H., Kittaka A., *J. Org. Chem.*, **68**, 7407–7415 (2003).
- 16) Ishizuka S., Ishimoto S., Norman A. W., *Biochemistry*, **23**, 1473–1478 (1984).
- 17) Ishizuka S., Ohba T., Norman A. W., "Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology," eds. by Norman A. W., Schaefer K., Grigoleit H. G., von Herrath D., Walter de Gruyter, Berlin, 1988, pp. 143–144.
- 18) Miura D., Manabe K., Ozono K., Saito M.,

- Gao Q., Norman A. W., Ishizuka S., *J. Biol. Chem.*, **274**, 16392–16399 (1999).
- 19) Ozono K., Saito M., Miura D., Michigami T., Nakajima S., Ishizuka S., *J. Biol. Chem.*, **274**, 32376–32381 (1999).
- 20) Miura D., Manabe K., Gao Q., Norman A. W., Ishizuka S., *FEBS Lett.*, **460**, 297–302 (1999).
- 21) Ishizuka S., Miura D., Eguchi H., Ozono K., Chokki M., Kamimura T., Norman A. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**, 92–102 (2000).
- 22) Ishizuka S., Miura D., Ozono K., Chokki M., Mimura H., Norman A. W., *Endocrinology*, **142**, 59–67 (2001).
- 23) Ishizuka S., Miura D., Ozono K., Saito M., Eguchi H., Chokki M., Norman A. W., *Steroids*, **66**, 227–237 (2001).
- 24) For the other type of vitamin D antagonist, 25-carboxylic esters ZK159222 and ZK168281, see: Väisänen S., Peräkylä M., Kärkkäinen J. I., Steinmeyer A., Carlberg C., *J. Mol. Biol.*, **315**, 229–238 (2002).
- 25) Recently, the third type of vitamin D antagonist DLAM was reported, see: Nakano Y., Kato Y., Imai K., Ochiai E., Namekawa J.-i., Ishizuka S., Takenouchi K., Tanatani A., Hashimoto Y., Nagasawa K., *J. Med. Chem.*, **49**, 2398–2406 (2006).
- 26) Recent report on Paget's bone disease, see: Roodman G. D., Windle J. J., *J. Clin. Invest.*, **115**, 200–208 (2005).
- 27) Saito N., Matsunaga T., Fujishima T., Anzai M., Saito H., Takenouchi K., Miura D., Ishizuka S., Takayama H., Kittaka A., *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 4396–4402 (2003).
- 28) Saito N., Saito H., Anzai M., Yoshida A., Fujishima T., Takenouchi K., Miura D., Ishizuka S., Takayama H., Kittaka A., *Org. Lett.*, **5**, 4859–4862 (2003).
- 29) Saito N., Matsunaga T., Saito H., Anzai M., Takenouchi K., Miura D., Ishizuka S., Takayama H., Kittaka A., *Heterocycles*, **67**, 311–336 (2006).
- 30) Saito N., Matsunaga T., Saito H., Anzai M., Takenouchi K., Miura D., Namekawa J.-i., Ishizuka S., Kittaka A., *J. Med. Chem.*, **49**, 7063–7075 (2006).
- 31) Saito N., Masuda M., Matsunaga T., Saito H., Anzai M., Takenouchi K., Miura D., Ishizuka S., Takimoto-Kamimura M., Kittaka A., *Tetrahedron*, **60**, 7951–7961 (2004).
- 32) Saito N., Masuda M., Saito H., Takenouchi K., Ishizuka S., Namekawa J.-i., Takimoto-Kamimura M., Kittaka A., *Synthesis*, 2533–2543 (2005).
- 33) Trost B. M., Dumas J., Villa M., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9836–9845 (1992).
- 34) Hijikuro I., Doi T., Takahashi T., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3716–3722 (2001).
- 35) Okuda Y., Nakatsukasa S., Oshima K., Nozaki H., *Chem. Lett.*, 481–484 (1985).
- 36) Ohtani I., Kusumi T., Kashman Y., Kakisawa H., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092–4096 (1991).
- 37) The biological activities were markedly affected by the structure of the lactone ring, including length of the alkyl chain and the stereochemistries on C23 and C24 positions, see: Refs. 29) and 30).
- 38) Masuno H., Yamamoto K., Wang X., Choi M., Ooizumi H., Shinki T., Yamada S., *J. Med. Chem.*, **45**, 1825–1834 (2002).
- 39) Carlberg C., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **89–90**, 227–232 (2004).
- 40) Bula C. M., Bishiop J. E., Ishizuka S., Norman A. W., *Mol. Endocrinol.*, **14**, 1788–1796 (2000).
- 41) Ochiai E., Miura D., Eguchi H., Ohara S., Takenouchi K., Azuma Y., Kamimura T., Norman A. W., Ishizuka S., *Mol. Endocrinol.*, **19**, 1147–1157 (2005).
- 42) Peräkylä M., Molnár F., Carlberg C., *Chem. Biol.*, **11**, 1147–1156 (2004).
- 43) Takenouchi K., Sogawa R., Manabe K., Saitoh H., Gao Q., Miura D., Ishizuka S., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **89–90**, 31–34 (2004).
- 44) Some biologically active natural products having an α -methylene- γ -lactone structure react with the thiol group of cysteine to give the corresponding cysteine adduct: Kupchan S. M., Fessler D. C., Eakin M. A., Giacobbe T. J., *Science*, **168**, 376–377 (1970).
- 45) Saito N., Kittaka A., *ChemBioChem.*, **7**, 1478–1490 (2006).