

## Seco-ステロイド骨格の構造展開と核内受容体を介する生物活性

橘高 敦史

## Structural Refinement of seco-Steroidal Skeleton and the Biological Activity through Nuclear Receptors

Atsushi KITAKA

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

(Received May 8, 2008)

$1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (**1**) regulates a variety of biological actions through vitamin D receptor (VDR), including calcium and phosphorus homeostasis, bone remodeling, cellular proliferation and differentiation and many other functions. To enhance its potency and to study the structure/function relationship, we synthesized a series of analogs of **1** with a modification at the C-2 $\alpha$  position. Introducing 2 $\alpha$ -methyl, 2 $\alpha$ -(3-hydroxypropyl), or 2 $\alpha$ -(3-hydroxypropoxy) group increased its binding affinity for the VDR 2- to 4-fold compared to **1**. The crystal structures of the VDR bound to these analogs provide a molecular explanation for the interaction between the 2 $\alpha$ -substituents and water molecules exist in the VDR-ligand binding domain. Based on the accumulated knowledge in VDR agonists, we synthesized 2-substituted analogs of 'double side chain' (gemini), 19-norvitamin D<sub>3</sub> (MART-10), TEI-9647 (VDR antagonist), 1-alkylated vitamin D<sub>3</sub>, 14-*epi*-previtamin D<sub>3</sub> etc. Gemini analogs showed potent HL-60 cell differentiation activity (13–38 times compared to **1**), and MART-10 exhibited remarkable antiproliferative activity on PZ-HPV-7 cells even at 10<sup>-10</sup> M. (24S)-2 $\alpha$ -(3-Hydroxypropoxy)-24-propyl-TEI-9647 showed potent VDR antagonism, and its IC<sub>50</sub> value was 7.4 pM against 10 nM of **1**. 1 $\alpha$ -Methyl-2 $\alpha$ -(3-hydroxypropyl)-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> improved the binding affinity for the mutant VDR (Arg274Leu), which causes hereditary vitamin D resistant rickets. 1 $\alpha,25$ -Dihydroxy-2 $\alpha$ -methyl-14-*epi*-previtamin D<sub>3</sub> showed moderate osteocalcin transcriptional activity on HOS cells. We theorize that modification at A-ring alone and in combination with functionalization of the other parts of the vitamin D molecule would provide important new information on the mechanism of vitamin D actions that could lead to the development of new therapeutic regimes for the treatment of various diseases.

**Key words**—vitamin D analog; vitamin D receptor; structure-activity relationship; agonist; antagonist

## 1. はじめに

活性型ビタミン D<sub>3</sub> は多様な生理活性を有し、人類の健康と長寿に重要な役割を担う生体内物質である。その多彩な生理活性は、医学・薬学の進展とともに年々益々興味深く、研究を続けているとその奥深さを実感する。活性型ビタミン D<sub>3</sub> は、古典的には血中カルシウム濃度（健常人で 10 mg/dl）やリンの恒常性維持と骨形成・骨代謝・骨質の改善を司る基幹物質であるが、現在ではビタミン D 受容体 (vitamin D receptor: VDR) が古くから知られるカ

ルシウム代謝に関連した組織（小腸、腎、骨）以外にも皮膚、筋、血管、免疫系細胞、脳神経系細胞などをはじめほぼ全身組織に存在が確認され、活性型ビタミン D<sub>3</sub> が細胞の分化誘導・増殖抑制作用、免疫系、脳神経系、あるいは腎・循環器系などにおいて、多彩な生命現象に係わるホルモン様物質として働くことが分かっている。

ビタミン D<sub>3</sub> は、8 炭素で構成された側鎖が構造的に強固な *trans*-ヒドリンダン骨格に結合し、C 環部 8 位から *exo*-トリエンで連結した A 環へと至る細長い構造を有する。生合成過程においてトリエン部分は、7-デヒドロコレステロールの B 環が光開裂し、体温での [1, 7] シグマトロピー転位による水素移動を伴って生成し、続く A 環部にはフレキシブルなコンフォメーション変化が認められる弾力

帝京大学薬学部有機化学講座薬化学教室 (〒229-0195 相模原市相模湖町寸沢嵐 1091-1)

e-mail: akittaka@pharm.teikyo-u.ac.jp

本総説は、平成 19 年度宮田記念学術論文賞の受賞を記念して記述したものである。

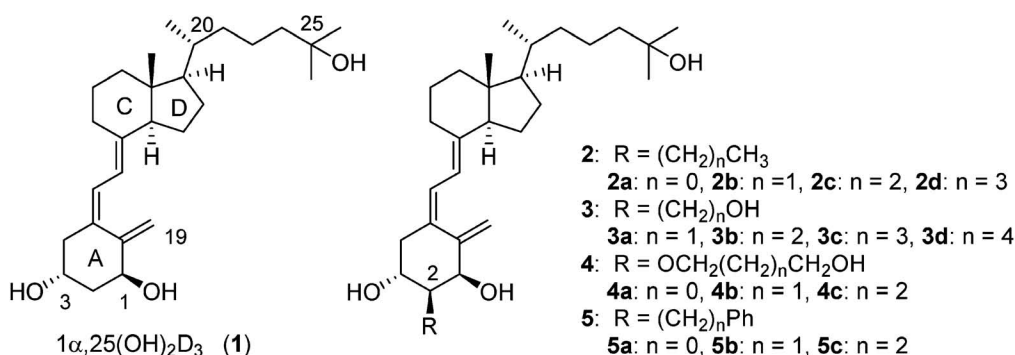


Fig. 1. Structures of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1) and the 2 $\alpha$ -Modified Analogs 2-5

的な構造をとる。ビタミン D<sub>3</sub> そのものは生理作用を示さないが、主として肝臓 (CYP27A1, CYP2R1) と腎臓近位尿細管 (CYP27B1) で順次代謝活性化されて 1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> (活性型ビタミン D<sub>3</sub>) に変換され、核内受容体の 1 つである VDR を介して標的遺伝子の発現を制御する。代謝により 25 位と 1 $\alpha$  位の両ヒドロキシ基が導入されると、VDR 結合親和性はビタミン D<sub>3</sub> の数十万倍にも高められる。特に 1 $\alpha$  水酸化に必要な CYP27B1 の発現は、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone: PTH) やカルシトニンにより促進され、活性型ビタミン D<sub>3</sub> が産生されると副甲状腺からの PTH の分泌や CYP27B1 の発現を抑制するフィードバック機構を示す。また、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の側鎖を酸化してカルシトロン酸へと代謝不活性化する CYP24A1 の発現が、活性型ビタミン D<sub>3</sub> により VDR を介して誘導される。

1971 年に活性型ビタミン D<sub>3</sub> [1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1, Fig. 1] の化学構造が明らかにされてから、これまで 3000 を超えるビタミン D 誘導体が化学合成され生物活性について評価されてきた。<sup>1-4)</sup> ビタミン D 誘導体研究を医薬品研究としてみると、各ビタミン D 誘導体の血中輸送の最適化と組織・細胞への移行特異性を向上させ、1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> のもつ血中カルシウム濃度上昇作用と目的とする作用を分離することが重要な課題となる。誘導体研究では CD 環側鎖の化学修飾が最も進んでいるが、これは合成研究の歴史から比較的化学修飾がし易かった点、かつ CYP24A1 による側鎖の酸化的代謝速度を化学修飾により低下させ生体内での活性物質の半減期を長くし、高カルシウム血症を発症しない極めて低濃度で薬効を発揮させようという戦略でもあった。<sup>1)</sup> ビタ

ミン D 誘導体の標的となる疾患でこれまでの成功例は、慢性腎不全、骨粗鬆症、乾癬、二次性副甲状腺機能亢進症などであり、これらの疾患については臨床的に医薬品として既に使われているアルファカルシドール、カルシポトリオール、タカルシトール、マキサカルシトールなどや、これから役立てられようとしている医薬品候補化合物 (ED-71 など)<sup>5)</sup> がある。また、白血病、乳がん、前立腺がん、大腸がんなどある種のがんでは細胞増殖抑制作用や細胞分化誘導作用の比活性が高い誘導体を用いた基礎研究が活発である。Moras らはヒト VDR (hVDR, 結晶化のため一部のアミノ酸配列を削除しているものの、VDR の基本的な機能は保持した hVDR ( $\Delta$ 165-215)) と活性型ビタミン D<sub>3</sub> との複合体 X 線構造解析<sup>6)</sup> を、山田らはホモロジーモデリング<sup>7)</sup> を発表し、これらを契機としてビタミン D 誘導体と VDR との相互作用が X 線構造解析<sup>8,9)</sup> や分子モデリング、及び部位特異的に VDR に変異を入れるアラニンスキャニング解析により精度の高い考察が可能となってきた。<sup>10,11)</sup> さらに、ビタミン D 誘導体が VDR と結合したのちの転写共役因子との相互作用解析が進み、標的遺伝子の転写を開始するまでのプロセスが分子レベルで解明されるようになった。<sup>12-15)</sup>



橋高敦史

帝京大学薬学部教授 薬学博士。1982 年東京大学薬学部卒業。1987 年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。1987-1989 年スイス連邦工科大学博士研究員。1989 年昭和大学薬学部助手。1994 年同講師。1999 年帝京大学薬学部助教授。2003 年より現職。2007 年 Brown University Vitamin D Research Award 受賞。

われわれは、A環部2位の特に $\alpha$ 方向の効率的な化学修飾法を開発し、 $2\alpha$ -置換活性型ビタミンD<sub>3</sub>のアゴニスト作用の強弱、VDR-合成リガンド複合体でのX線レベルでの結合解析、各リガンドの代謝効率、転写に係わるタンパク質複合体形成時のコアクチベーター選択性、遺伝性くる病II型の病因となる変異VDR(Arg274Leu)に対するリガンド設計と合成、また強力なVDRアンタゴニストの創製などに興味をもち、それぞれ特徴あるVDRリガンド合成を行ってきた。本稿ではそれらの研究成果についてまとめてみたい。

## 2. $2\alpha$ -置換活性型ビタミンD<sub>3</sub>誘導体の合成

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ には、骨疾患治療のみならず、がんの予防、がん細胞の増殖抑制効果やヒト免疫系制御物質としての可能性が確認されている。<sup>16,17)</sup>しかし、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の正常値を超える投与は重篤な副作用として高カルシウム血症や柔組織の石灰化を伴うため不適格である。そこで、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に骨格変換や官能基変換などの化学修飾を施し、安全、かつ作用選択的な新規ビタミンD誘導体の設計と合成に挑むこととした。

紺野・藤島・高山らはA環コンフォメーションと生物活性の研究から、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の2位メチル化を行い、その際、1,3位の両水酸基の立体化学を含めてA環8種類の全ジアステレオマーを揃えて合成した。<sup>18,19)</sup>生理活性については岡野らが、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ との詳細な比較をした。<sup>20)</sup>その結果、1,3位の立体配置を保持したまま、A環 $2\alpha$ 方向にメチル基を導入すると $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の生理活性は著しく増強することが判明した。これはA環のみの化学修飾によりVDRへの結合親和性が向上した初めての例である。なお、それらの2-メチル誘導体のうち、 $(1\alpha, 2\beta, 3\alpha)$ の立体配置を持つ化合物は、HL-60細胞に対して強いアポトーシス活性を示し、<sup>21)</sup>さらに、 $(1\beta, 2\beta, 3\alpha)$ 、 $(1\beta, 2\beta, 3\beta)$ 、及び $(1\alpha, 2\beta, 3\alpha)$ の立体配置を持つ化合物は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によりNB4細胞で起こる遺伝子を介さないrapid responseに対するアンタゴニスト活性を示した。<sup>22)</sup>

VDRアゴニスト活性向上に効果の大きかった $2\alpha$ 置換体に関して、われわれは立体選択的な合成法の開発を含めて、さらに $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のA環部の体系的な構造修飾に関する研究を展開した。その結

果、A環 $2\alpha$ 位にメチル基を導入した**2a**以外にも、3-ヒドロキシプロピル基(**3c**)、<sup>23,24)</sup>3-ヒドロキシプロポキシ基(**4b**)<sup>25,26)</sup>を導入した化合物は、VDR結合親和性をはじめとするビタミンD活性が天然ホルモン $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を凌駕することを見出した。<sup>23-27)</sup>Figure 1に $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の化学構造(1)と、合成した $2\alpha$ 修飾構造の一部を示した。<sup>28-30)</sup>

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は3つの水酸基を用いてVDRのリガンド結合領域(ligand binding domain: LBD)で6つの親水性アミノ酸残基と水素結合を形成することによりドッキングする。<sup>6)</sup>すなわち、hVDRでは $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の $1\alpha$ -OHはArg-274とSer-237、3-OHはTyr-143とSer-278、25-OHはHis-305とHis-397とそれぞれ水素結合を形成する。そこで導入した $2\alpha$ 位側鎖構造の知見を得るためMorasらとの共同研究で、**2a**、**2c**、**3c**、及び**4b**とhVDR( $\Delta 165-215$ )との共結晶X線構造解析を行った。<sup>31)</sup>VDR結合親和性を4倍にまで引き上げた**2a**では、メチル基によるA環周りの疎水性相互作用の増強が分かった。すなわち、 $2\alpha$ -メチル基はLBDの小さくばみにはまり、Phe-150、Leu-233、Ser-237との付加的なvan der Waals相互作用が可能となる。また、**3c**と**4b**では、 $2\alpha$ 位側鎖の末端の水酸基がVDRのLBD内部に存在する水分子の代役を担い、リガンドとVDRアミノ酸残基(Arg274)間の水素結合箇所が増加し、VDR-リガンド複合体を高度に安定化させることが判明した。すなわち、VDRのLBDにはA環2位近傍からタンパク質の表面まで水分子による水素結合のネットワーク(Water Channel)が形成されており、 $2\alpha$ 位を化学修飾してVDRへ結合するときこのネットワークを遮断するような置換基はVDR結合親和性を低下させる。X線構造解析によると、誘導体**3c**と**4b**の $2\alpha$ 位置換基は、アルキル鎖のメチレン部分で1分子の水(W1と命名)を追い出し、本来W1が担う隣の水分子(W2)及びAsp-144(カルボニル基)との水素結合を破壊するものの、本来存在するW2の位置に末端水酸基を代替配置して、Arg-274(グアニジノ基)及び隣の水分子W3との水素結合を維持する。<sup>31)</sup>合成リガンドそのものがWater Channelによる水素結合の形成に直接関与することが、VDR結合親和性の向上に大きく効いてくると思われる。また、**2a**の $2\alpha$ -メチル基で重要なvan der Waals力を2位メチレン

基から付加的に得て、天然ホルモン **1** の 3 倍 (**3c**) と 1.8 倍 (**4b**) の VDR 結合親和性を発揮すると考えられる。

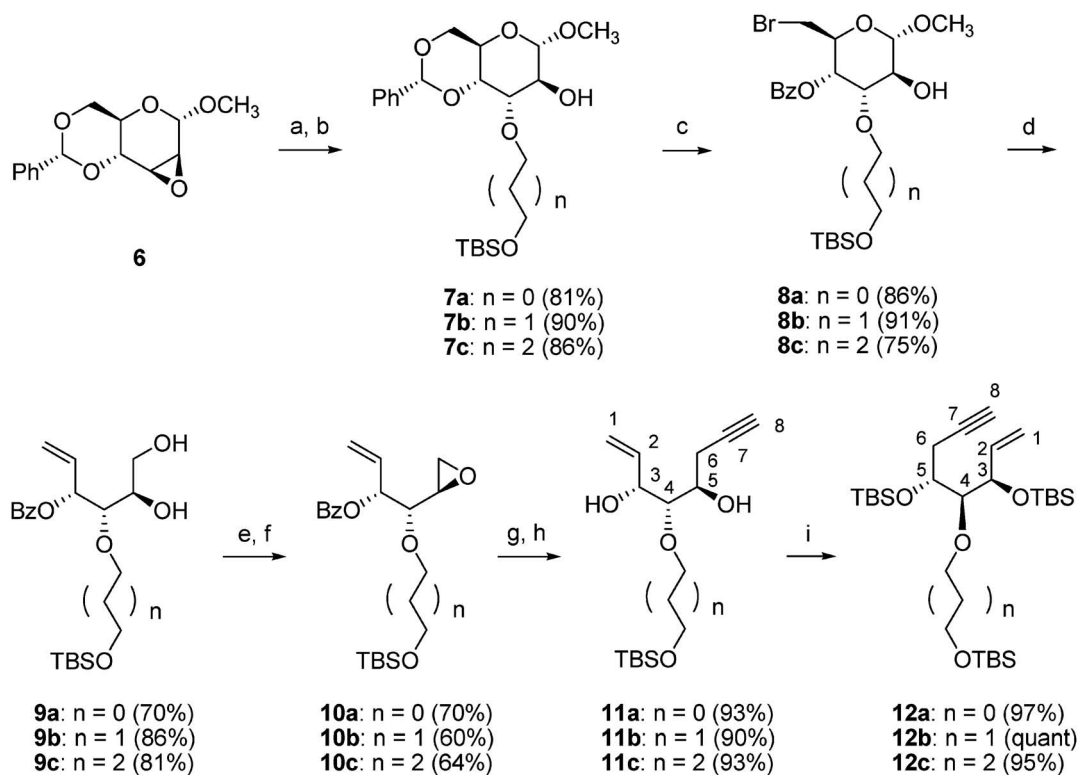
活性型ビタミン D<sub>3</sub> は腎臓で CYP24A1 を誘導して側鎖の水酸化を経る代謝不活性化を受けるが、興味深いことに、2 $\alpha$  位に長鎖を有する **3c** や **4b** では、CYP24A1 による代謝効率が活性型ビタミン D<sub>3</sub> の 2% にまで著しく低下することが特徴的である。<sup>32)</sup> 代謝速度の低下は、低濃度でも長時間生体内で作用し続けるビタミン D 誘導体の創製を意味しており、高カルシウム血症を起こさない濃度でがんの予防や治療薬、あるいは骨代謝改善薬の可能性が期待できる。

### 3. 2 $\alpha$ -置換と CD 環側鎖修飾の組み合わせ

次に、**2a** (メチル基)、**3c** (3-ヒドロキシプロピル基)、**4b** (3-ヒドロキシプロポキシ基) の 2 $\alpha$  側鎖構造の適用範囲と可能性について詳細に検討した。活性型ビタミン D<sub>3</sub> (**1**) の 20-*epi* 体は、VDR 結合親和性や HL-60 細胞分化誘導活性が **1** よりも数倍強いことが知られている。藤島・高山らは、2-

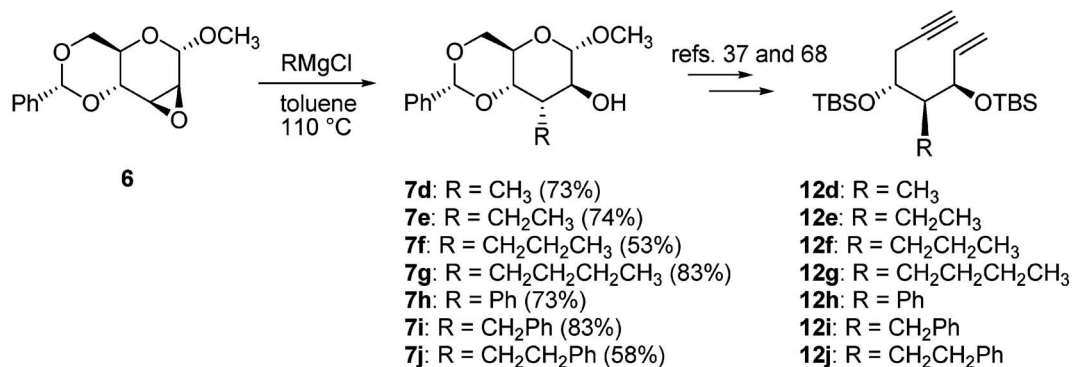
メチル-20-*epi*-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 誘導体の A 環すべてのジアステレオマー 8 種の合成と生物活性評価を行い、2 $\alpha$ -メチル-20-*epi*-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の顕著なスーパーアゴニスト活性を見出した。<sup>33,34)</sup> われわれはさらに、様々な 2 $\alpha$ -置換体を立体選択的に合成し、20-*epi* 側鎖と 2 $\alpha$ -置換基との組み合わせについて検討した。A 環部は D-グルコースから結晶性エポキシド **6** に導き、塩基性条件下で 1,3-プロパンジオール中、加熱還流により 3-ヒドロキシプロポキシ基を 2 $\alpha$  位に相当する位置に導入することから研究を開始した。本法は先の **4a-c** 合成の際に開発した方法であるが、<sup>25,35)</sup> 保護基の最適化などにより、さらに効率よく合成できるようになった (Scheme 1)。<sup>26)</sup>

1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の 2 $\alpha$  位に相当する位置への炭素-炭素結合形成において、本澤らはエポキシド **6** に対し、トルエン中 Grignard 試薬で直接様々な炭素置換基を効率よく導入する条件を見出した (Scheme 2)。<sup>36,37)</sup> そこで Scheme 1 に示した合成法を適用し、A 環前駆体であるエンイン **12d-j** へと導

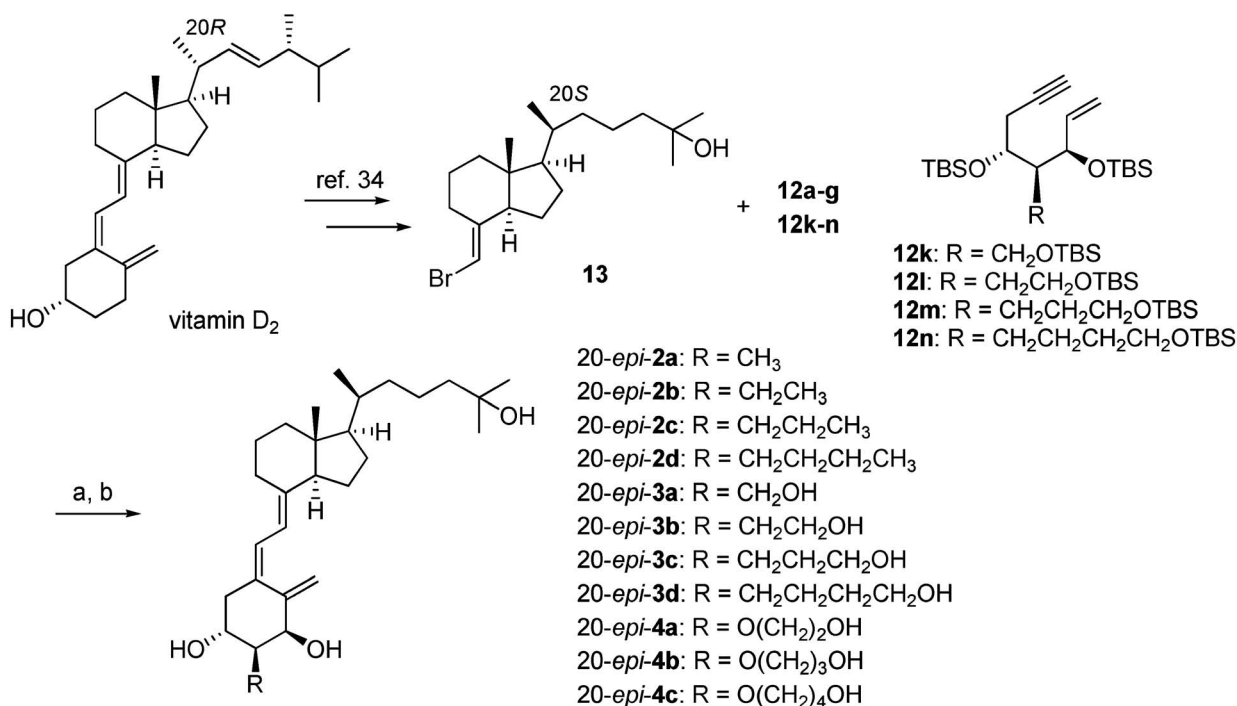


Scheme 1. Improved Synthesis of A-ring Precursor Enynes for Trost Coupling with CD-ring Bromoolefin

(a): HOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>OH, KO<sup>t</sup>Bu, 110°C, (b): TBSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (c): NBS, BaCO<sub>3</sub>, CCl<sub>4</sub>, reflux, (d): Zn powder, NaBH<sub>3</sub>CN, 1-propanol-H<sub>2</sub>O (10 : 1), 95°C, (e): 2,4,6-trimethylbenzenesulfonyl chloride, pyridine, (f): LiHMDS, THF, -78°C to 0°C, (g): TMSCCH, BuLi, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, THF, -78°C to rt, (h): K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, (i): TBSOTf, 2,6-lutidine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C.



Scheme 2. Introduction of 2 $\alpha$ -Alkyl Groups to the Chiral Template **6** Using Grignard Reagent in Toluene  
 Enyne products (**12d-j**) were obtained from **7d-j** through the similar reaction route as in Scheme 1.



Scheme 3. Synthesis of 2 $\alpha$ -Substituted 20-*epi*-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

(a): cat. (Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>Pd, Et<sub>3</sub>N-toluene (1 : 1), reflux, (b): HF/MeCN, 1 M TBAF in THF, or CSA in MeOH.

いた。得られたエンイン体のうち **12a-g**、及びヒドロキシアルキル側鎖のエンイン **12k-n**<sup>23,24,38)</sup> とビタミン D<sub>2</sub> より導いた 20 位をエピ化した CD 環プロモオレフィン **13** とをそれぞれ Trost 法でカップリングし、目的とする 20-*epi*-**2a-d**,<sup>37)</sup> 20-*epi*-**3a-d**,<sup>37)</sup> 20-*epi*-**4a-c**<sup>26)</sup> を合成した (Scheme 3)。

20-*epi*-化と 2 $\alpha$ -置換基の組み合わせでは、藤島らの 2 $\alpha$ -メチル体 (20-*epi*-**2a**) が最強の活性を示した。今回合成した 20-*epi* 誘導体は、いずれも天然ホルモン **1** を超える高い HL-60 細胞分化誘導能を示した (Table 1)。<sup>26,37)</sup>

天然ホルモンが VDR に結合する際、リガンド結合領域の 56% しか占拠しないことから、Uskokovićらはより嵩高く 20 位に対称に側鎖を伸ばした Gemini 誘導体 (**14**) を設計した。<sup>39)</sup> この場合、20 位の不斉は消失し、また代謝速度は天然ホルモンに比べかなり遅い。われわれは Leo 社 (当時) で独自に Gemini (*double side chain* と命名) の合成<sup>30)</sup> を発表していた M. J. Calverley とともに、その 2 $\alpha$ -置換誘導体 **14a-c** を合成した。<sup>41)</sup> いずれの化合物も VDR 結合親和性が Gemini より向上した。特に **14a** の HL-60 細胞分化誘導活性は天然ホルモンに比較

Table 1. Relative Binding Affinity for Bovine Thymus VDR and HL-60 Cell Differentiation Activity of 2 $\alpha$ -Modified Vitamin D<sub>3</sub> Analogs

Compound	VDR binding affinity	HL-60 cell differentiation	Refs.
<b>1</b>	100	100	
20- <i>epi</i> - <b>1</b>	400	3571	[33, 34]
<b>2a</b>	400	200	[18, 19]
<b>2b</b>	40	106	[23, 24]
<b>2c</b>	20	44	[23, 24]
<b>2d</b>	8	74	[24, 37]
20- <i>epi</i> - <b>2a</b>	1200	9688	[19, 20, 33]
20- <i>epi</i> - <b>2b</b>	150	4200	[37]
20- <i>epi</i> - <b>2c</b>	119	1750	[37]
20- <i>epi</i> - <b>2d</b>	33	2300	[37]
<b>3a</b>	20	10	[23, 24]
<b>3b</b>	70	86	[23, 24]
<b>3c</b>	300	240	[23, 24]
<b>3d</b>	120	460	[23, 24]
20- <i>epi</i> - <b>3a</b>	190	570	[37]
20- <i>epi</i> - <b>3b</b>	320	4030	[37]
20- <i>epi</i> - <b>3c</b>	370	4900	[37]
20- <i>epi</i> - <b>3d</b>	183	3910	[37]
<b>4a</b>	120	100	[25, 26]
<b>4b</b>	180	70	[25, 26]
<b>4c</b>	40	40	[25, 26]
20- <i>epi</i> - <b>4a</b>	260	5820	[26]
20- <i>epi</i> - <b>4b</b>	165	2120	[26]
20- <i>epi</i> - <b>4c</b>	100	2770	[26]
<b>5a</b>	7	220	[68]
<b>5b</b>	15	460	[68]
<b>5c</b>	1	140	[68]

The potency of **1** is normalized to 100. Data are mean of three separate experiments.

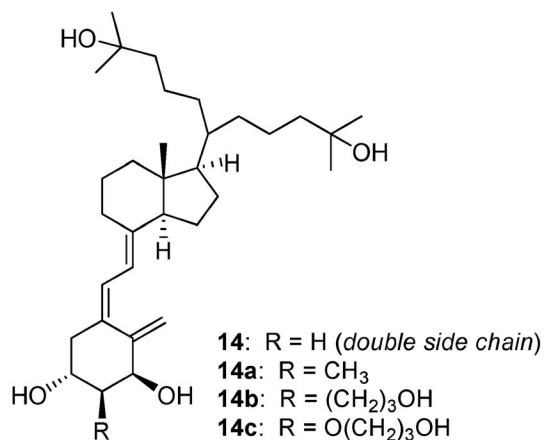
して 38 倍 (**Gemini** そのものの 3.6 倍) に高まった (Table 2). この結果から, 2 $\alpha$  位の適切な官能基化が VDR 結合親和性の低いセコステロイド誘導体に対しても活性の向上に役立つ化学修飾であることをほぼ確信するに至った.

#### 4. 2 位置換活性型 19-ノルビタミン D<sub>3</sub> 誘導体

ビタミン D 製剤の副作用の 1 つである高カルシウム血症を引き起こし難い活性型 19-ノルビタミン D<sub>3</sub> 骨格 (**15**, Scheme 6) に着目し, その 2 位アルキル置換体の合成を計画した. ウィスコンシン大学の DeLuca らは, **10** (19) 位のエキソメチレン基を除去した **15** が, VDR への結合親和性は低減するにも係わらず (われわれの測定では **1** の 17%), 細胞増殖抑制活性や細胞分化誘導能が保持されることを見出した.<sup>42,43)</sup> そこで, 2 位修飾の効果で VDR への結合親和性を回復した場合の生理活性に及ぼす影響について興味を湧いた. キナ酸を A 環の出発物質とし, 2 位に相当する部分の炭素-炭素結合形成をラジカルアリル化により行った. 続いて末端オレフィンの化学修飾により, 3 種類の A 環前駆体 **16a-c** を合成した (Scheme 4).<sup>44)</sup>

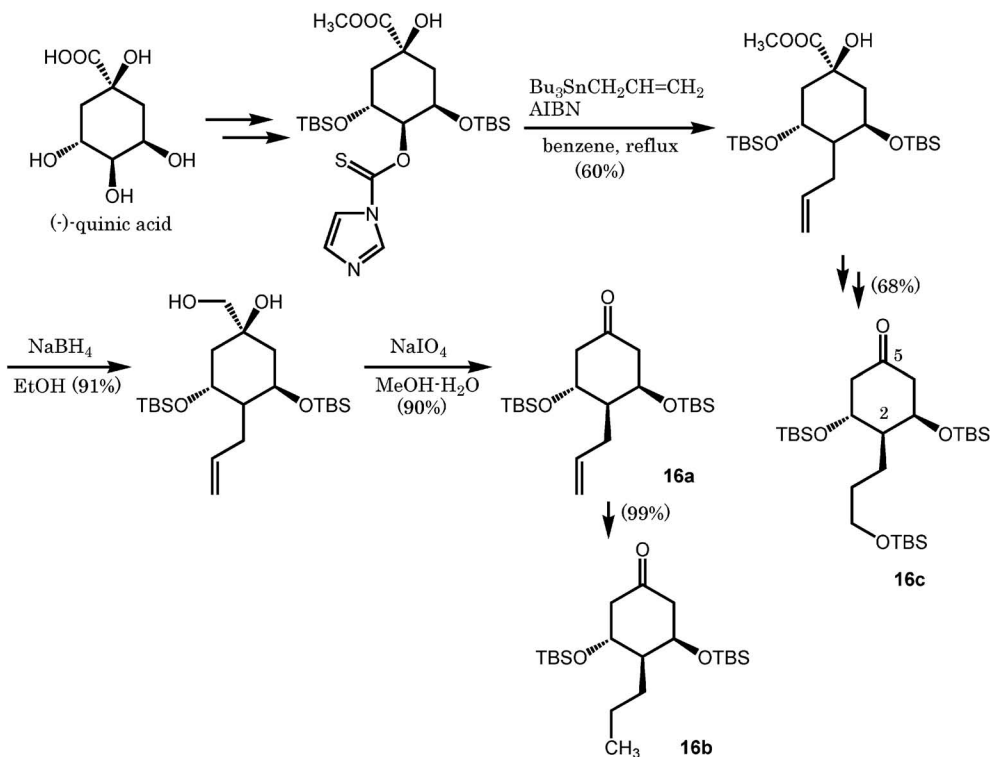
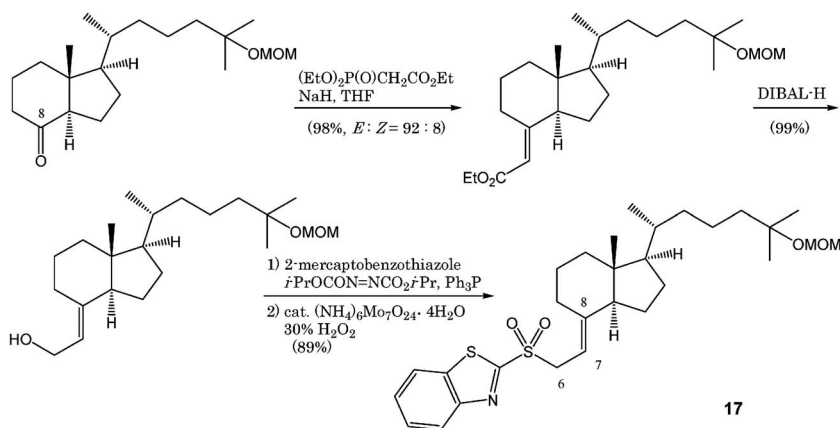
2 位置換活性型 19-ノルビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の合成は, DeLuca<sup>45)</sup> や清水ら<sup>46)</sup> が報告しているが, 当時 3 炭素以上を導入した例はなかった. また, 多くの研究グループがそれまで A 環部と CD 環部を 7-8 位間での Wittig-Horner カップリングで連結していたが, 2 位に相当する位置の A 環側鎖が伸長すると, 7-8 位間でのカップリングが全く進行しなか

Table 2. Structures of Gemini (Double Side Chain **14**) and Its 2 $\alpha$ -Modified Analogs **14a-c** and Their Relative Binding Affinity for VDR and HL-60 Cell Differentiation Activity



The potency of **1** is normalized to 100. Data are mean of three separate experiments.

Compound	VDR	HL-60
Natural hormone ( <b>1</b> )	100	100
<b>14</b>	24	1060
<b>14a</b>	53	3840
<b>14b</b>	57	1280
<b>14c</b>	36	1920

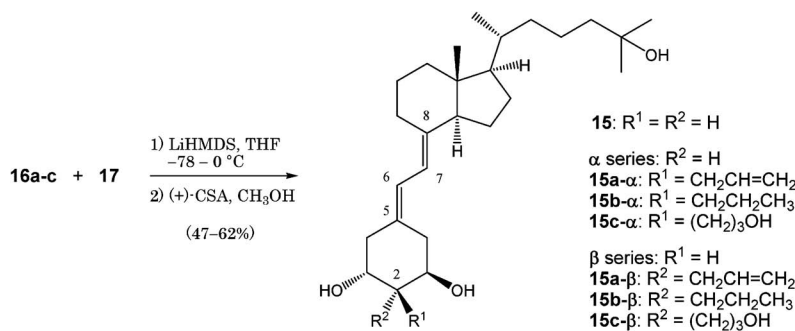
Scheme 4. Synthesis of A-ring Precursors of 19-Norvitamin D<sub>3</sub> with 2-Substituent (**16a-c**)

Scheme 5. Synthesis of CD-ring Part Elongated C6-C7 Carbons for Julia Coupling

った。そこで CD 環 8 位から二炭素増炭してアリールスルホン **17** に導き、5-6 位間での Julia 型オレフィン化を検討したところ、目的とする **15a-c** を得ることができた (Schemes 5, 6).<sup>44,47)</sup> なお、いずれの生成物も  $2\alpha$  体と  $2\beta$  体のほぼ 1:1 のジアステレオマー混合物となり、これらを HPLC にて分離する必要があった。しかしこの方法により様々な 19-ノルビタミン D 誘導体合成の効率が向上し、<sup>48)</sup> 榊らにより 19-ノルビタミン D 誘導体の代謝研究へと

展開された。<sup>49)</sup>

これらの 19-ノルビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の中で、 $2\alpha$ -(3-hydroxypropyl)- $1\alpha,25$ -dihydroxy-19-norvitamin D<sub>3</sub> (**15c- $\alpha$** ) は期待通り VDR への結合親和性が天然体のトリエン構造を有する **1** と同程度までに回復した。また、**15c- $\alpha$**  の HL-60 細胞分化誘導作用は、**1** に比べ 36 倍の高活性を示した (Table 3).<sup>47)</sup> ポストン大学の T. C. Chen らと **15c- $\alpha$**  を MART-10、**15c- $\beta$**  を MART-11 とそれぞれ命名し、不死化した

Scheme 6. Julia Olefination between C5-C6 Positions for Synthesizing New 19-Norvitamin D<sub>3</sub> Analogs with 2-SubstituentTable 3. Biological Activity of 2-Substituted 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-19-norvitamin D<sub>3</sub><sup>47,75)</sup>

Compound	VDR binding affinity <sup>a,b)</sup>	HL-60 cell differentiation <sup>a,c)</sup>	Anti-proliferative on prostate cells <sup>a,d)</sup>	Transactivation <sup>a,e)</sup>
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (1)	100	100	100	100
19-nor (15)	17	27	n.t.	n.t.
15a- $\alpha$	3	54	102	161
15b- $\alpha$	3	84	164	151
15c- $\alpha$ (MART-10)	100	3563	100000	157
15a- $\beta$	0.15	20	338	187
15b- $\beta$	0.3	32	165	142
15c- $\beta$ (MART-11)	3	667	70115	156

a) The potency of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was normalized to 100. b) Bovine thymus VDR. c) Determined by NBT assay. d) PZ-HPV-7 cells. e) Relative luciferase activity (ligand: 10<sup>-6</sup> M).

前立腺細胞 (PZ-HPV-7) に対する細胞増殖抑制活性を検定したところ、MART-10は、10<sup>-10</sup>-10<sup>-11</sup> Mという極めて低濃度でも前立腺細胞増殖抑制作用を示し、一方、1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は10<sup>-8</sup> M以下では活性を示さなくなるので、前立腺細胞に対しては天然ホルモンの500-1000倍の高活性であることが判明した (Table 3).<sup>50,51)</sup> また、前立腺がん細胞 (PC-3) の正常細胞への浸潤実験では、MART-10が天然ホルモンの10倍の細胞浸潤抑制活性を示した。<sup>51)</sup> 現在、MART-10とMART-11の制がん作用とカルシウム作用について *in vivo* 実験を検討中である。

### 5. 最強の hVDR-アンタゴニスト

帝人の研究陣が1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の代謝産物研究から見出した初のhVDR特異的アンタゴニストであるTEI-9647とTEI-9648は、側鎖に化学的に活性な $\alpha$ -メチレン- $\gamma$ -ラクトン構造を有する (Fig. 2).<sup>52)</sup> 両者は互いに23位エピマーであるが、TEI-9647 (23*S*)の方がVDR結合親和性もアンタゴニスト活性もTEI-9648 (23*R*)より強い。ほぼ同時期にドイツシェーリング社から報告された

ZK159222は、CD環に長鎖構造を有するVDRアンタゴニストであるが、そのアンタゴニスト活性は長鎖がVDRのLBDに収まりきれず、VDRのhelix 12の折りたたみを阻害してアゴニズムポジションへ移動させないことによる作用発現と考えられている。<sup>53,54)</sup> その点、TEI-9647のラクトン構造は十分にLBDに収まる大きさである。その作用発現メカニズムについては側鎖ラクトン部分を収納するLBDのシステイン残基の関与が考えられている。<sup>55,56)</sup>

VDRアンタゴニストの医薬品の可能性として、石塚らはPaget's病を対象疾患として考えた。<sup>57)</sup> Paget's病はVDRの1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に対する感受性の異常亢進から発症する骨代謝異常の疾患で、骨の湾曲とともに痛みを伴う。特にアングロサクソンにおける本疾患の患者数は骨粗鬆症に次ぐものであり、有効な治療薬が望まれている。Paget's病の発症メカニズムから考えてVDRのアンタゴニストは有効な治療薬として期待される。そこでTEI-9647のVDR結合親和性を向上させる目的で、A環部



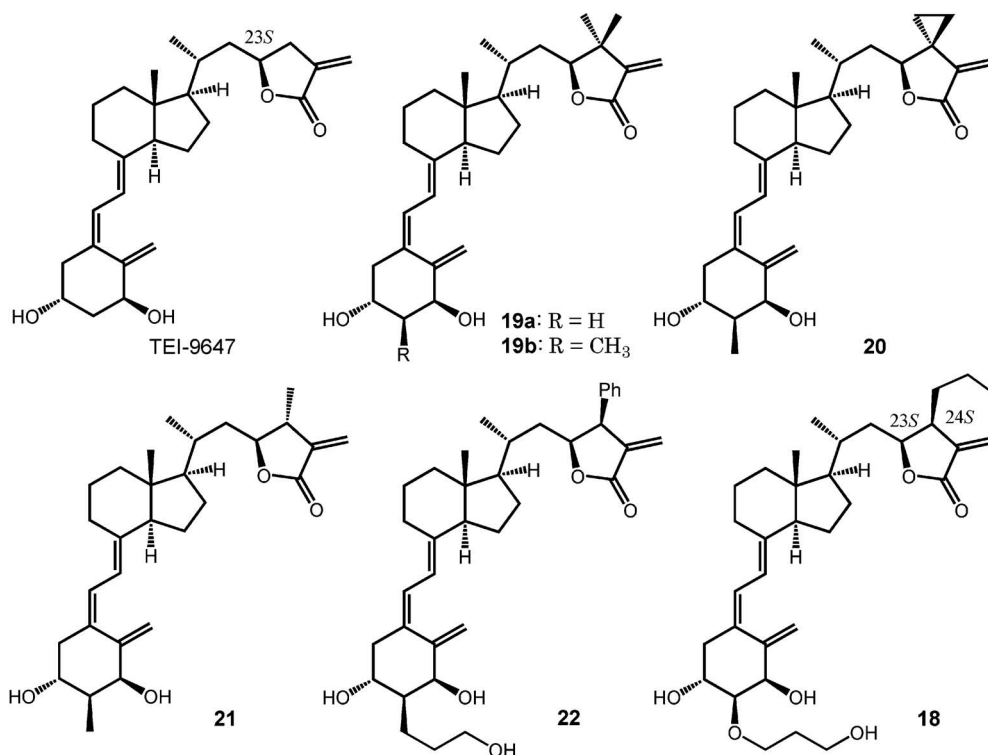
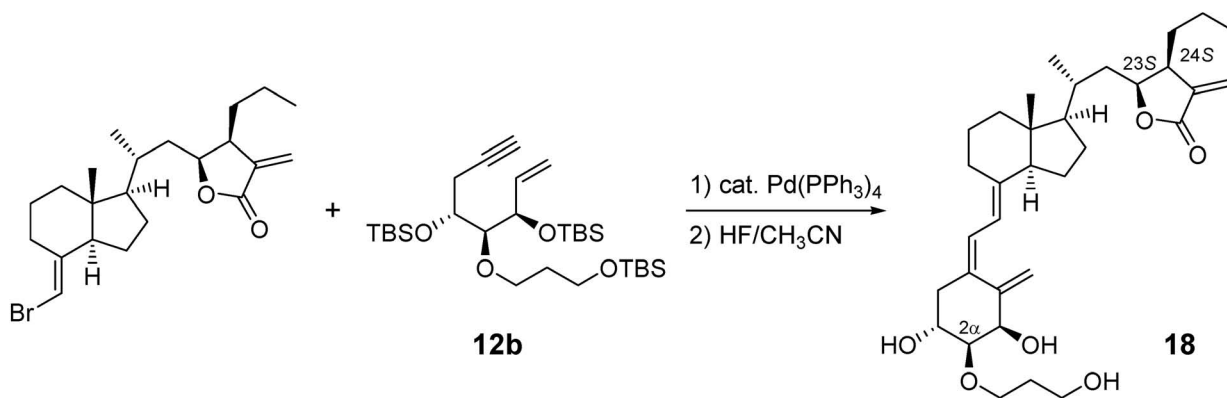


Fig. 2. Structures of TEI-9647 and Its 2 $\alpha$  and 24 Double Modified Analogs with Highly Potent VDR-antagonism



Scheme 7. Pd-Catalyzed Alkenylative Cyclization of Enyne as A-ring Precursor with Lactone CD-ring Bromoolefin to Create the Most Potential VDR Antagonist

2 $\alpha$ 位を構造修飾し、またラクトン環を生理的条件下に安定化するため24位を系統的に構造修飾した。齋藤らを中心に100種類以上の誘導体を合成した。<sup>38,58-63</sup> Scheme 7にラクトンCD環とA環前駆体とのカップリング反応の1例を示す。<sup>63</sup>

また、Fig. 2にはTEI-9647の構造とともに、特に強い活性を示す2 $\alpha$ 位と24位を同時に化学修飾した構造式を代表作として記載した。<sup>62</sup> すなわち、TEI-9647 (IC<sub>50</sub> 6.3–9.4 nM) に比べ強力な hVDR

アンタゴニスト **19a** (IC<sub>50</sub> 0.71 nM),<sup>38)</sup> **19b** (IC<sub>50</sub> 0.093 nM),<sup>38)</sup> **20** (IC<sub>50</sub> 0.49 nM),<sup>60)</sup> **21** (IC<sub>50</sub> 0.13 nM),<sup>59)</sup> **22** (IC<sub>50</sub> 0.23 nM),<sup>61)</sup> 前述の Scheme 7 に合成法を紹介した **18** (IC<sub>50</sub> 7.4 pM) などを見出した。10 nM の活性型ビタミン D<sub>3</sub> による HL-60 細胞分化誘導に対するアンタゴニスト活性を IC<sub>50</sub> 値で評価すると、特に **18** では pM オーダーまで向上し、驚異的である。<sup>63)</sup> また **18** はこれまでの文献史上最強の VDR アンタゴニストであり、細胞毒性を

示さないことから、今後 Paget's 病治療薬としての適用の可能性が期待できる。

## 6. 遺伝性くる病Ⅱ型の病因となる変異 VDR (Arg274Leu) への選択的リガンド：1-Alkylvitamin D<sub>3</sub> の設計と合成

1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が VDR の LBD で安定にドッキングする際、1 $\alpha$ -ヒドロキシ基と Arg274 のグアニジノ基間での水素結合形成が特に重要となる。われわれは遺伝性ビタミン D 抵抗性くる病 (hereditary vitamin D resistant rickets: HVDRR) の原因の1つとなる変異 VDR (Arg274Leu) に着目した。<sup>64</sup> 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の VDR (Arg274Leu) に対する結合親和性は正常 VDR に比較して 1000 分の 1 程度まで減弱する。われわれは、M. D. Anderson Cancer Center の S. Peleg とともに VDR (Arg274Ala) に対する **3c** や **4b** などの結合親和性をプロテアーゼアッセイで解析し、2 $\alpha$  位の 3-ヒドロキシプロピル基や 3-ヒドロキシプロポキシ基が変異 VDR への結合親和性向上にも有効であることを見出した。<sup>65</sup> そこで、VDR (Arg274Leu) では正常 VDR に比べ 1 $\alpha$  位周りの疎水性の空間が広がっていることから、その至適リガンドの探索を目指し、2 $\alpha$ -(3-hydroxypropyl)-1 $\alpha$ -methyl-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub><sup>66</sup> や、同じく 1 $\alpha$  位にヒドロキシメチル基を導入した **24** を設計・合成した (Scheme 8)。<sup>67</sup> エンイン **23** は D-ガラクトースから導き、CD 環プロモオレフィンと Trost 法によりカップリングした。また、疎水性相互作用を期待して 2 $\alpha$  位に芳香環を有する誘導体 (**5a-c**, Fig. 1) も合成した。<sup>68</sup>

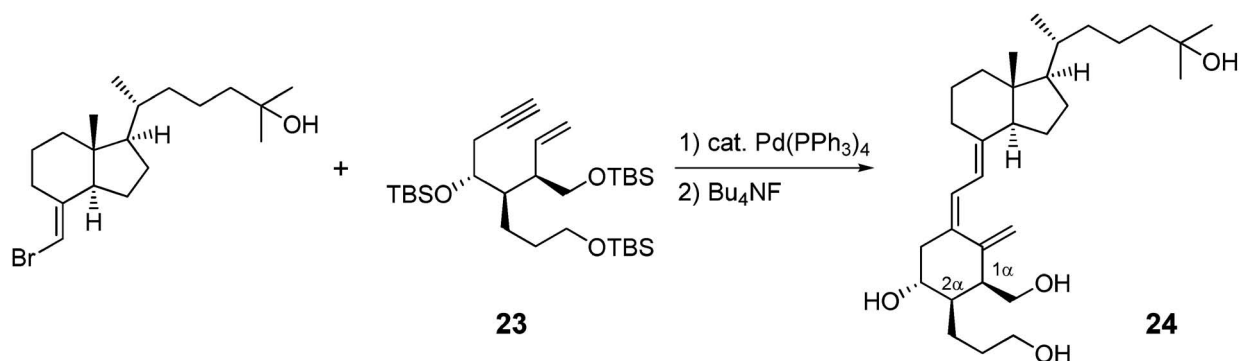
ルシフェラーゼを用いるレポーターアッセイにより変異 VDR (Arg274Leu) に対する **24** の活性を天

然ホルモン 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> と比較すると、5.6 倍の転写活性を示した。<sup>67</sup> 一方、プロテアーゼアッセイにより **5a-c** のうち、**5b** に弱いながら変異 VDR (Arg274Leu) に対する結合親和性が認められた。<sup>68</sup>

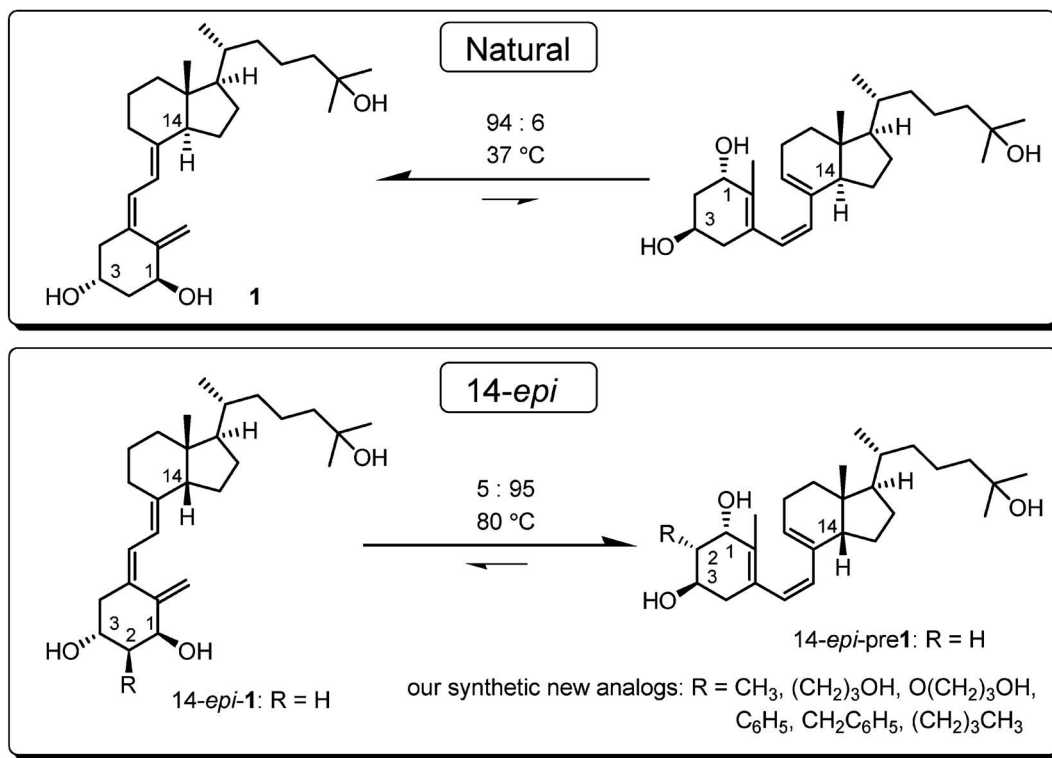
## 7. 14-*epi*-Previtamin D<sub>3</sub> 誘導体

活性型ビタミン D<sub>3</sub> は、体温による [1, 7] シグマトロピー転位を介してプレビタミン D<sub>3</sub> と平衡状態で存在する。その存在比は 37°C で、ビタミン D<sub>3</sub> : プレビタミン D<sub>3</sub> = 96 : 4 である。<sup>69</sup> カリフォルニア大学 A. W. Norman らによれば、プレビタミン D<sub>3</sub> は膜に存在が想定される受容体に結合し、遺伝子を介さない nongenomic 作用により、カルシウムチャンネルの開口や各種キナーゼの活性化を制御していると考えられている。<sup>70,71</sup> この細胞応答は数秒から数分で起こる速い応答であることから、rapid response と呼ばれている。しかし、プレビタミン D<sub>3</sub> を単離し、常温でプレビタミン D<sub>3</sub> そのものの純粋な生物活性を調べることはこの平衡が存在する限り不可能である。そこで 14 位を異性化した *cis*-ヒドリندان骨格での 14-*epi*-プレビタミン D<sub>3</sub> (14-*epi*-pre1) の生物活性を調べることにした (Scheme 9)。

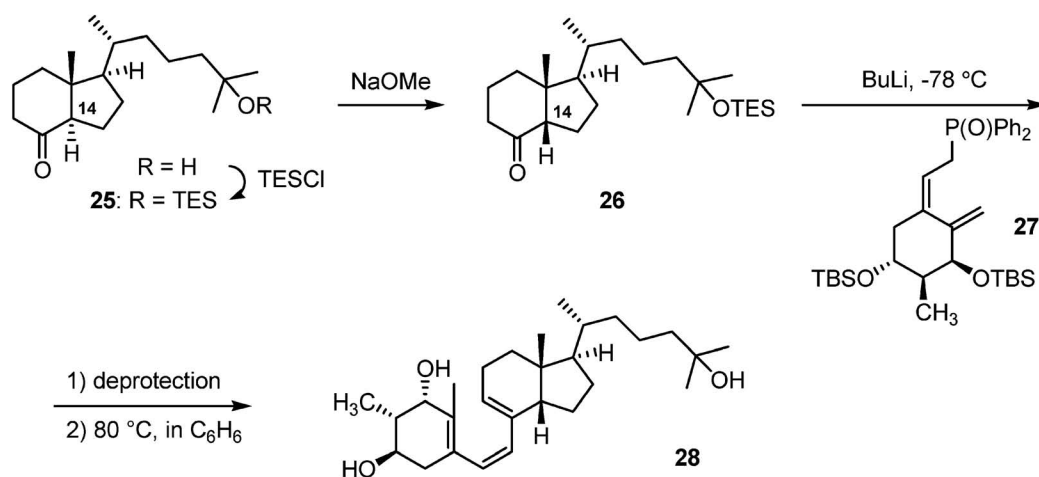
まず、14-*epi*-プレビタミン D<sub>3</sub> の 2 位修飾により、プレビタミン D<sub>3</sub> や 14-*epi*-プレビタミン D<sub>3</sub> ではほとんどみられない VDR を介する作用が発現しないか検討した。14 位の異性化は、Grundmann ケトン誘導体 **25** の塩基処理により進行した。<sup>69</sup> 先に Scheme 1 と 2 で示したエンイン化合物を畑山らの方法<sup>72</sup>で閉環して A 環前駆体となるホスフィンオキド (**27** など) に導き、Wittig 反応 (Lythgoe 法) で 14-*epi*-CD 環-8-ケト体 (**26**) とカップリン



Scheme 8. Synthesis of 2 $\alpha$ -(3-Hydroxypropyl)-1 $\alpha$ -alkylvitamin D<sub>3</sub> (**24**)



Scheme 9. "Vitamin D ⇌ Previtamin D" Equilibrium

Scheme 10. Synthesis of 2 $\alpha$ -Methyl-14-*epi*-previtamin D<sub>3</sub>

グした。合成の一例を Scheme 10 に挙げた。2 $\alpha$ -メチル-1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシ-14-*epi*-プレビタミン D<sub>3</sub> (**28**) には活性型ビタミン D<sub>3</sub> の 8.4% と弱い VDR 結合親和性が認められた。また骨芽細胞系 HOS を用いて、骨基質として重要なオステオカルシンの転写活性も認められた。<sup>73)</sup> VDR に結合しない誘導体については、rapid response の有無と強弱が興味深く、現在この詳細をつきとめるべく研究を進めてい

る。

#### 8. 選択的な転写共役活性化因子のリクルート能をハイスループットで評価する方法の開発

リガンド依存性転写因子である VDR は、その作用発現に多くの転写共役活性化因子 (コアクチベーター) が係わっている。VDR はリガンドと結合すると helix 12 を中心に構造変化を起こし、コリプレッサーを分離してコアクチベーターをリクルートす

る。VDR-合成リガンド複合体がリガンドの構造に応じて、複数あるコアクチベーターに対して選択的なリクルート能があれば、各リガンドにより生理活性発現に影響が現れると思われる。加藤らは、現在医薬品として上市されているマキサカルシトールと骨粗鬆症治療薬として臨床第Ⅲ相のED-71とでは、コアクチベーターSRC-1やTIF2のリクルート能に差があることを示した。<sup>15)</sup> われわれは数多くのVDR-リガンドを合成し、ビタミンD誘導体ライブラリーを構築しつつあるので、これら誘導体のコアクチベーター選択性について短時間に一時に解析できる方法について思案していた。この問題に関して、荒井緑らにより解決の糸口をつかむことができた。<sup>74)</sup> すなわち、大腸菌から発現して精製したGST-human VDRを96穴マイクロプレートに固定化し、1ウェルにつき1種のリガンドを加えVDR-リガンド複合体を形成させた。ついで蛍光ラベル化したhuman TIF2とhuman SRC-1を加えインキュベーションし、そこで形成される複合体を希薄ホルムアルデヒドで安定化後、過剰リガンドやコアクチベーターを洗い流し、マイクロプレートリーダーで蛍光を分析することにより、どのリガンドでVDR上どのコアクチベーターとの複合体が形成されたかをハイスループットに解析できる方法を確立した。一方、そのビタミンD誘導体が誘導する細胞や個体レベルの生理活性を調べることににより、起こる現象を総合的に解析することを目指した。この方法で前述のMART-10など19-norvitamin D<sub>3</sub>誘導体(15a-c)の2 $\alpha$ 体と2 $\beta$ 体について調べ、VDRへの結合親和性と生理活性が乖離することについてリガンド特異的なVDR-コアクチベーター相互作用の観点から新たな知見を得ることができた。すなわち、15a- $\alpha$ 、15a- $\beta$ 、15b- $\alpha$ 、15c- $\beta$ (MART-11)では1より強いTIF2とSRC-1に対するリクルート能が認められ、MART-10ではTIF2とSRC-1について、1と同程度のリクルート能が示された。<sup>75)</sup> 現在、MART-10とMART-11について、個体レベルでの生理活性を共同研究中である。

## 9. おわりに

われわれのビタミンD<sub>3</sub>誘導体合成の詳細は、それぞれの論文をご参照頂ければ幸いである。これまでビタミンD誘導体の合成と生物活性評価に関する研究には20年以上の歴史があるが、合成した誘

導体にそれぞれ独自の生理活性の面で特長があり、誘導体毎にいろいろな表情(活性プロファイル)をみせるので興味がつきない。変異VDR(Arg274Leu)への有効なリガンド設計は、小分子と受容体タンパク質との相互作用、結合後の受容体の構造変化、その構造変化を認識してコリプレッサーの離脱とコアクチベーターのリクルートのメカニズムを分子レベルで理解する上で、格好の研究領域と思われる。前立腺細胞を用いた19-ノルビタミンD誘導体研究では、組織特異的に強いアゴニスト活性を発現するMART-10とMART-11を見出した。これらの誘導体はVDRに強い親和性を有する訳ではなく、リガンド結合後の受容体が他のタンパク質と巨大タンパク質複合体を形成する幾多の化学平衡において、転写のスイッチをオンにする方向に優位に働くものと考えられる。転写共役活性化因子の選択的リクルート能をハイスループットで評価する方法は、今後さらに数多く明らかにされるリガンドとタンパク質との選択的相互作用を迅速に調べる上で実用的なツールになると思われる。TEI-9647誘導体のhVDRアンタゴニズムの発現メカニズムは興味深く、これら一連の誘導体合成でその解明に道筋が付くものと思われる。特に、細胞毒性を示さず強力なhVDRアンタゴニスト活性を示す18は、Paget's病治療薬への展開が期待される。<sup>76)</sup>

より優れた治療指数を目指すには、ビタミンD結合タンパク質(vitamin D binding protein: DBP)への結合親和性、リガンドの代謝効率、VDR-リガンド複合体のタンパク質表面構造と転写共役因子との相互作用解析などいろいろな検討項目があると思われる。慢性腎不全や骨粗鬆症治療薬であるアルファカルシドール、尋常性乾癬治療薬のタカルシトール、二次性副甲状腺機能亢進症治療薬であり乾癬治療薬としても認可されたマキサカルシトールや現在開発中の骨粗鬆症治療薬ED-71のような日本発のビタミンD医薬品がこれから数多く誕生することを願っている。

**謝辞** 本研究は帝京大学薬学部有機化学講座薬化学教室において、研究開始時は高山浩明現名誉教授のご指導の下、藤島利江博士、須原義智博士、二瓶賢一博士らの研究に1999年4月より吉田彰宏博士、及び大学院生らと参画してなし得たものであ

る。また、1990年代に活性型ビタミンD<sub>3</sub>の2位メチル化を開始された当時の研究室の皆様に深い敬意を表する次第である。そしてこれまでの知見を活かし、本研究領域を筆者とともに強力に進展、展開させてくれた齋藤 望博士、本澤 忍博士、荒井 緑博士、及び現在の薬化学教室教職員である澤田大介博士（講師）と高野真史博士（助教）、また活発に合成研究に邁進してくれた大学院生らの努力とご協力の賜物である。生物活性評価については、帝人ファーマ㈱の石塚誠一博士と竹之内一弥博士（代表して）、岡野登志夫教授（神戸薬科大学）、中外製薬㈱の大森正幸博士（代表して）、T. C. Chen 教授（ボストン大学医学部）、分子生物学領域では加藤茂明教授（東京大学分子細胞生物学研究所）、代謝研究では榊 利之教授（富山県立大学工学部）、VDR複合体のX線解析では宝来真志博士とDino Moras博士（IGBMC, CNRS）、分子モデリングでは栗原正明博士（国立医薬品食品衛生研究所）、宮田直樹教授（名古屋市立大学大学院薬学研究科）、また、幅広くご助言を頂きました核内受容体とリガンド科学領域の素晴らしい研究者の皆様に、深く感謝申し上げます。

最後に本研究を暖かく見守っていただきました恩師大野雅二先生（東京大学名誉教授）に深謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Posner G. H., Kahraman M., "Vitamin D" 2nd ed., Vol. 2 Chap. 80, eds. by Feldman D., Pike J. W., Glorieux F. H., Elsevier Academic Press, New York, 2005, pp. 1405-1422.
- 2) Binderup L., Binderup E., Godtfredsen W. O., Kissmeyer A.-M., "Vitamin D" 2nd ed., Vol. 2 Chap. 84, eds. by Feldman D., Pike J. W., Glorieux F. H., Elsevier Academic Press, New York, 2005, pp. 1489-1510.
- 3) Saito N., Honzawa S., Kittaka A., *Curr. Top. Med. Chem.*, **6**, 1273-1288 (2006).
- 4) Yamada S., Shimizu M., Yamamoto K., *Med. Res. Rev.*, **23**, 89-115 (2003).
- 5) Kubodera N., *Curr. Bioact. Comp.*, **2**, 301-315 (2006).
- 6) Rochel N., Wurtz J. M., Mitschler A., Klaholz B., Moras D., *Mol. Cell*, **5**, 173-179 (2000).
- 7) Yamamoto K., Masuno H., Choi M., Nakashima K., Taga T., Ooizumi H., Umesono K., Sicinska W., VanHooke J., DeLuca H. F., Yamada S., *PNAS*, **97**, 1467-1472 (2000).
- 8) Tocchini-Valentini G., Rochel N., Wurtz J. M., Mitschler A., Moras D., *PNAS*, **98**, 5491-5496 (2001).
- 9) Tocchini-Valentini G., Rochel N., Wurtz J. M., Moras D., *J. Med. Chem.*, **47**, 1956-1961 (2004).
- 10) Choi M., Yamamoto K., Itoh T., Makishima M., Mangelsdorf D. J., Moras D., DeLuca H. F., Yamada S., *Chem. Biol.*, **10**, 261-270 (2003).
- 11) Yamamoto K., Abe D., Yoshimoto N., Choi M., Yamagishi K., Tokiwa H., Shimizu M., Makishima M., Yamada S., *J. Med. Chem.*, **49**, 1313-1324 (2006).
- 12) Yanagisawa J., Yanagi Y., Masuhiro Y., Suzawa M., Watanabe M., Kashiwagi K., Toriyabe T., Kawabata M., Miyazono K., Kato S., *Science*, **283**, 1317-1321 (1999).
- 13) Kato S., Fujiki R., Kitagawa H., "Vitamin D" 2nd ed., Vol. 1 Chap. 17, eds. by Feldman D., Pike J. W., Glorieux F. H., Elsevier Academic Press, New York, 2005, pp. 305-312.
- 14) Fujiki R., Kim M., Sasaki Y., Yoshimura K., Kitagawa H., Kato S., *EMBO J.*, **24**, 3881-3894 (2005).
- 15) 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).
- 16) van Leeuwen J. P. T. M., Pols H. A. P., "Vitamin D" 2nd ed., Vol. 2 Chap. 89, eds. by Feldman D., Pike J. W., Glorieux F. H., Elsevier Academic Press, New York, 2005, pp. 1571-1597.
- 17) Adorini L., "Vitamin D" 2nd ed., Vol. 1 Chap. 36, eds. by Feldman D., Pike J. W., Glorieux F. H., Elsevier Academic Press, New York, 2005, pp. 631-648.
- 18) Konno K., Maki S., Fujishima T., Liu Z.-P., Miura D., Chokki M., Takayama H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 151-156 (1998).
- 19) Konno K., Fujishima T., Maki S., Liu Z.-P., 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).

- 20) Nakagawa K., Kurobe M., Ozono K., Konno K., Fujishima T., Takayama H., Okano T., *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 691–702 (2000).
- 21) Nakagawa K., Kurobe M., Konno K., Fujishima T., Takayama H., Okano T., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1937–1947 (2000).
- 22) Miura D., Norman A. W., Mizwicky M. T., Fujishima T., Konno K., Kittaka A., Takayama H., Ishizuka S., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **94**, 469–479 (2005).
- 23) Suhara Y., Nihei K., Tanigawa H., Fujishima T., Konno K., Nakagawa K., Okano T., Takayama H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 1129–1132 (2000).
- 24) Suhara Y., Nihei K., Kurihara M., Kittaka A., Yamaguchi K., Fujishima T., Konno K., Miyata N., Takayama H., *J. Org. Chem.*, **66**, 8760–8771 (2001).
- 25) Kittaka A., Suhara Y., Takayanagi H., Fujishima T., Kurihara M., Takayama H., *Org. Lett.*, **2**, 2619–2622 (2000).
- 26) 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).
- 27) Takahashi E., Nakagawa K., Suhara Y., Kittaka A., Nihei K., Konno K., Takayama H., Ozono K., Okano T., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2246–2250 (2006).
- 28) Takayama H., Kittaka A., Fujishima T., Suhara Y., “Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy, Recent Results in Cancer Research,” Vol. 164, eds. by Reichrath J., Friedrich M., Tilgen W., Springer-Verlag, Berlin, 2003, pp. 289–317.
- 29) Takayama H., Kittaka A., Fujishima T., Suhara Y., *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, **60**, 370–381 (2002).
- 30) Kittaka A., Saito N., Takano M., *Clin. Calcium*, **16**, 1154–1165 (2006).
- 31) Hourai S., Fujishima T., Kittaka A., Suhara Y., Takayama H., Rochel N., Moras D., *J. Med. Chem.*, **49**, 5199–5205 (2006).
- 32) Abe D., Sakaki T., Kusudo T., Kittaka A., Saito N., Suhara Y., Fujishima T., Takayama H., Hamamoto H., Kamakura M., Ohta M., Inouye K., *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 778–784 (2005).
- 33) Fujishima T., Liu Z.-P., Miura D., Chokki M., Ishizuka S., Konno K., Takayama H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 2145–2148 (1998).
- 34) Fujishima T., Konno K., Nakagawa K., Kurobe M., Okano T., Takayama H., *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 123–134 (2000).
- 35) Kittaka A., Suhara Y., Takayanagi H., Fujishima T., Kurihara M., Takayama H., “Vitamin D Endocrine System: Structural, Biological, Genetic and Clinical Aspects,” eds. by Norman A. W., Bouillon R., Thomasset M., Printing and Reprographics University of California, Riverside Calif., 2000, pp. 49–52.
- 36) Honzawa S., Yamamoto Y., Hirasaka K., Takayama H., Kittaka A., *Heterocycles*, **61**, 327–338 (2003).
- 37) Honzawa S., Suhara Y., Nihei K., Saito N., Kishimoto S., Fujishima T., Kurihara M., Sugiura T., Waku K., Takayama H., Kittaka A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3503–3506 (2003).
- 38) 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).
- 39) Norman A. W., Manchand P. S., Uskoković M. R., Okamura W. H., Takeuchi J. A., Bishop J. E., Hisatake J., Koeffler H. P., Peleg S., *J. Med. Chem.*, **43**, 2719–2730 (2000).
- 40) Kurek-Tyrlik A., Makaev F. Z., Wicha J., Zhabinskii V., Calverley M. J., “Vitamin D: Chemistry, Biology, and Clinical Applications of the Steroid Hormone,” eds. by Norman A. W., Bouillon R., Thomasset M., Printings and Reprographics University of California, Riverside Calif., 1997, pp. 30–31.
- 41) Suhara Y., Kittaka A., Kishimoto S., Calverley M. J., Fujishima T., Saito N., Sugiura T., Waku K., Takayama H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3255–3258 (2002).
- 42) Perlman K. L., Sicinski R. R., Schnoes H. K., DeLuca H. F., *Tetrahedron Lett.*, **31**, 1823–1824 (1990).
- 43) Sicinski R. R., Prahl J. M., Smith C. M., DeLuca H. F., *J. Med. Chem.*, **41**, 4662–4674 (1998).

- 44) Yoshida A., Ono K., Suhara Y., Saito N., Takayama H., Kittaka A., *Synlett*, 1175–1179 (2003).
- 45) Sicinski R. R., Rotkiewicz P., Kolinski A., Sicinska W., Prahl J. M., Smith C. M., DeLuca H. F., *J. Med. Chem.*, **45**, 3366–3380 (2002).
- 46) Shimizu M., Iwasaki Y., Shibamoto Y., Sato M., DeLuca H. F., Yamada S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 809–812 (2003).
- 47) 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).
- 48) Arai M. A., Tsutsumi R., Hara H., Chen T. C., Sakaki T., Urushino N., Inouye K., Kittaka A., *Heterocycles*, **66**, 469–479 (2005).
- 49) Urushino N., Nakabayashi S., Arai M. A., Kittaka A., Chen T. C., Yamamoto K., Hayashi K., Kato S., Ohta M., Kamakura M., Ikushiro S., Sakaki T., *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1482–1488 (2007).
- 50) Kittaka A., Saito N., Honzawa S., Takenouchi K., Ishizuka S., Chen T. C., Peleg S., Kato S., Arai M. A., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **103** 269–276 (2007).
- 51) Chen T. C., Persons K. S., Zheng S., Mathieu J., Holick M. F., Lee Y. F., Bao B., Arai M. A., Kittaka A., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **103**, 717–720 (2007).
- 52) Miura D., Manabe K., Ozono K., Saito M., Gao Q., Norman A. W., Ishizuka S., *J. Biol. Chem.*, **274**, 16392–16399 (1999).
- 53) Herdick M., Steinmeyer A., Carlberg C., *J. Biol. Chem.*, **275**, 16506–16512 (2000).
- 54) Carlberg C., *J. Cell. Biochem.*, **88**, 274–281 (2003).
- 55) Ochiai E., Miura D., Eguchi H., Takenouchi K., Harada Y., Azuma Y., Kamimura T., Ishizuka S., *J. Bone Miner. Res.*, **18** (suppl. 2), S103 (2003).
- 56) 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).
- 57) Roodman G. D., Windle J. J., *J. Clin. Invest.*, **115**, 200–208 (2005).
- 58) 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).
- 59) Saito N., Saito H., Anzai M., Yoshida A., Fujishima T., Takenouchi K., Miura D., Ishizuka S., Takayama H., Kittaka A., *Org. Lett.*, **5**, 4857–4862 (2003).
- 60) Saito N., Masuda M., Saito H., Takenouchi K., Ishizuka S., Namekawa J., Takimoto-Kamimura M., Kittaka A., *Synthesis*, 2533–2543 (2005).
- 61) Saito N., Matsunaga T., Saito H., Anzai M., Takenouchi K., Miura D., Ishizuka S., Takayama H., Kittaka A., *Heterocycles*, **67**, 311–336 (2006).
- 62) Saito N., Kittaka A., *ChemBioChem*, **7**, 1478–1490 (2006).
- 63) Saito N., Matsunaga T., Saito H., Anzai M., Takenouchi K., Miura D., Namekawa J., Ishizuka S., Kittaka A., *J. Med. Chem.*, **49**, 7063–7075 (2006).
- 64) Malloy P. J., Pike J. W., Feldman D., *Endocr. Rev.*, **20**, 156–188 (1999).
- 65) Kittaka A., Kurihara M., Peleg S., Suhara Y., Takayama H., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 357–358 (2003).
- 66) Honzawa S., Kittaka A. *et al.* (unpublished results).
- 67) Honzawa S., Yamamoto Y., Yamashita A., Sugiura T., Kurihara M., Arai M. A., Kato S., Kittaka A., *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 3002–3024 (2008).
- 68) Honzawa S., Hirasaka K., Yamamoto Y., Peleg S., Fujishima T., Kurihara M., Saito N., Kishimoto S., Sugiura T., Waku K., Takayama H., Kittaka A., *Tetrahedron*, **61**, 11253–11263 (2005).
- 69) Maynard D. F., Trankle W. G., Norman A. W., Okamura W. H., *J. Med. Chem.*, **37**, 2387–2393 (1994).
- 70) Norman A. W., Mizwicki M. T., Norman D. P. G., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 27–41 (2004).
- 71) Mizwicki M. T., Keidel D., Bula C. M., Bishiop J., Zanello L. P., Wurtz J. M., Moras D., Norman A. W., *PNAS*, **101**, 12876–12881 (2004).
- 72) Hatakeyama S., Irie H., Shintani T., Noguchi Y., Yamada H., Nishizawa M., *Tetrahedron*, **50**, 13369–13376 (1994).

- 
- 73) Sawada D., Saito N., Katayama T., Kittaka A. *et al.* (unpublished results).
- 74) Arai M. A., Kittaka A., *Anticancer Res.*, **26**, 2621–2632 (2006).
- 75) Arai M. A., Takeyama K., Ito S., Kato S., Chen T. C., Kittaka A., *Bioconjug. Chem.*, **18**, 614–620 (2007).
- 76) Saito N., Kittaka A., *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, **65**, 947–958 (2007).