

学 位 論 文 題 名

Studies on Novel 1α , 25-Dihydroxyvitamin D_3 -26,
23-lactone Analogs and Their Biological Functions:
Antagonistic Activity to Genomic Action of 1α ,
25-Dihydroxyvitamin D_3 .

(1α , 25-ジヒドロキシビタミン D_3 -26, 23-ラクトン誘導体の
生理作用に関する研究)

学位論文内容の要旨

ビタミンDは病治癒因子として 100 年近く前に発見され、カルシウム恒常性の維持などの多様な生理作用を有することが明らかにされている。ビタミンDは肝臓、腎臓などで様々な経路による代謝を受けることが知られており、その結果生成した活性型ビタミン D_3 (以下、 1α , 25-(OH) $_2D_3$) が最も強力なビタミンD作用を発揮する。また、ビタミンDの作用発現様式としては、遺伝子発現を介する genomic 作用と遺伝子発現を介さない non-genomic 作用が知られている。

1α , 25-(OH) $_2D_3$ の側鎖ラクトン環形成により生成される (23S, 25R)- 1α , 25-(OH) $_2D_3$ -26, 23-lactone (以下、1, 25- D_3 -lactone) は、 1α , 25-(OH) $_2D_3$ と異なった生理作用を発現することが知られている。我々は 1, 25- D_3 -lactone の特異な生理作用の発現は、その構造のどの部分に起因するのかを明らかにすることを目的に、種々の 1, 25- D_3 -lactone 誘導体を合成し受容体 (以下、VDR) への結合性および典型的なビタミンDの genomic 作用である細胞分化誘導活性を検討してきた。その中で、ビタミンDの genomic 作用に対してアンタゴニスト活性を有するのではないかと推察される誘導体を得られたので、本研究では、その化合物の遺伝子発現レベルでの作用について詳細に検討するとともに、生体内での作用および生体内代謝経路においても生成されうるものであるのかを検討し、生理的意味の考察を試みた。

まず、VDR 結合親和性とヒト白血病細胞 HL-60 細胞での分化誘導活性について比較検討したところ、1, 25- D_3 -lactone 誘導体である (23S)-25-dehydro- 1α -OH- D_3 -26, 23-lactone (以下、TEI-9647) および (23R)-25-dehydro- 1α -OH- D_3 -26, 23-lactone (以下、TEI-9648) は、VDR 結合親和性からは分化誘導活性が予測されたにも拘わらず、実際にはそのような活性が全く認められないことが明らかとなった。

次に、HL-60 細胞の分化誘導活性を指標に TEI-9647 および TEI-9648 の作用を詳細に検討した。その結果、TEI-9647 あるいは TEI-9648 の単独処理では分化

が誘導されなかったが、 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ による分化誘導を特異的に抑制することが確認された。また、ヒトリンフォーマ細胞 U-937 細胞の $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ による分化誘導に対しても同様な結果が得られた。これらの結果から、TEI-9647 および TEI-9648 そのものにはビタミンD様の作用はほとんど認められず、ビタミンD作用に対する特異的な抑制活性を示すことが明らかとなった。上述の細胞分化誘導は、ビタミンDの genomic 作用に基づくものであると考えられており、TEI-9647 および TEI-9648 は genomic 作用に対するビタミンDアンタゴニストである可能性が強いと推察された。

次に genomic 作用に対するアンタゴニストであることを検証するために、ビタミンDによる遺伝子発現調節に対する TEI-9647 および TEI-9648 の活性を、RT-PCR による内在性遺伝子 (*p21^{waf1/cip1}* および *25-OH-D₃-24-hydroxylase* (*25-OH-D₃-24-OHase*) 遺伝子) の発現変動の検討、さらにヒト *25-OH-D₃-24-OHase* プロモーターを含むルシフェラーゼ発現ベクターおよびヒト VDR 発現ベクターを導入した COS-7 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによる転写活性の検討を行った。その結果、何れの評価系においても TEI-9647 および TEI-9648 は $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写活性促進を抑制することが確認された。

次に、non-genomic 作用によって細胞分化が誘導されることが知られている NB-4 細胞の分化誘導系を用いて、ビタミンDの non-genomic 作用に対する効果を検討したところ、TEI-9647 および TEI-9648 には抑制活性が認められないことが明らかとなった。

次に、ラットおよびマウスを用いて、生体内においてビタミンD作用を抑制するのかどうかを検討した。その結果、TEI-9647 単独で投与した場合はビタミンD様の作用は殆ど認められなかったが、 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ と TEI-9647 とを同時に投与した場合は $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の生理作用 (血中カルシウム濃度上昇) を用量依存的に有意に抑制した。さらに、 ^3H 標識 *1, 25-D₃-lactone* をラットに投与し血清中あるいは胆汁中の代謝物を HPLC により解析したところ、TEI-9647 の溶出ピークと一致した代謝物ピークが認められた。これらの結果から、化学的に合成された *1, 25-D₃-lactone* 誘導体である TEI-9647 は、生体内においてもビタミンDアンタゴニストとして作用することが確認されるとともに、生体内ではビタミンD代謝物の一つとして存在する可能性が示唆された。

以上の結果から、TEI-9647 および TEI-9648 はビタミンDの genomic 作用に対する特異的なアンタゴニストであると結論づけられた。このような化合物はこれまでに報告がなく、ビタミンDの遺伝子発現機序を研究する上で極めて有用なツールになると期待される。また、TEI-9647 は培養細胞系のみならず生体内においても作用を有すること、さらにビタミンDの代謝経路、特に *1, 25-D₃-lactone* 経路の代謝物として生体内で生成されうるものであることが示唆されたことから、ビタミンDの作用を負に調節する生体内因子である可能性も推察された。今後、ビタミンDの遺伝子発現機序に関する研究のツールとして、また、医薬品のシーズとしての可能性が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 山 下 正 兼

学 位 論 文 題 名

Studies on Novel 1α , 25-Dihydroxyvitamin D_3 -26, 23-lactone Analogs and Their Biological Functions: Antagonistic Activity to Genomic Action of 1α , 25-Dihydroxyvitamin D_3 .

(1α , 25-ジヒドロキシビタミン D_3 -26, 23-ラクトン誘導体の
生理作用に関する研究)

ビタミンDは、カルシウム恒常性の維持などの多様な生理作用を有し、肝臓や腎臓などで様々な経路による代謝を受けることが知られている。その結果生成した活性型ビタミンD₃ (以下、 1α , 25-(OH)₂D₃) は最も強力なビタミンD作用を発揮する。また、ビタミンDの作用発現様式として、遺伝子発現を介する genomic 作用と遺伝子発現を介さない non-genomic 作用が知られている。

1α , 25-(OH)₂D₃ の側鎖ラクトン環形成により生成される (23S, 25R)- 1α , 25-(OH)₂D₃-26, 23-lactone (以下、1, 25-D₃-lactone) は、 1α , 25-(OH)₂D₃ と異なった生理作用を発現することが知られている。著者は、1, 25-D₃-lactone の特異な生理作用の発現と構造の関係を明らかにする一連の研究を進める過程で、ビタミンDの genomic 作用に対してアンタゴニスト活性を有するのではないかと推察される誘導体を得た。本研究では、それらの新規化合物の作用について詳細に検討するとともに、それらが生体内代謝経路において生成されうる化合物であるのかどうかについても調べた。

まず、VDR 結合親和性とヒト白血病細胞 HL-60 細胞での分化誘導活性について検討した。1, 25-D₃-lactone 誘導体である (23S)-25-dehydro- 1α -OH-D₃-26, 23-lactone (以下、TEI-9647) および (23R)-25-dehydro- 1α -OH-D₃-26, 23-lactone (以下、TEI-9648) は、分化誘導活性が予測されたにも拘わらず、実際にはそのような活性が全く認められなかった。

次に、HL-60 細胞およびヒトリソファーマ細胞 U-937 細胞の分化誘導活性を指標に TEI-9647 および TEI-9648 の作用を検討した。TEI-9647 と TEI-9648 はこれらの細胞に対して分化誘導活性を示さないが、 1α , 25-(OH)₂D₃ による分化誘導を特異

的に抑制した。TEI-9647 および TEI-9648 は、genomic 作用に対するビタミンDアンタゴニストである可能性が強いと推察された。

次に genomic 作用に対するアンタゴニストであることを検証するために、ビタミンDによる遺伝子発現調節に対する TEI-9647 および TEI-9648 の活性を調べた。RT-PCR による内在性遺伝子 (p21^{waf1/Cip1} および 25-OH-D₃-24-hydroxylase (25-OH-D₃-24-OHase) 遺伝子) の発現変動、またヒト 25-OH-D₃-24-OHase プロモーターを含むルシフェラーゼ発現ベクターおよびヒト VDR 発現ベクターを導入した COS-7 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによる転写活性について検討した。何れの評価系においても TEI-9647 および TEI-9648 は 1 α , 25-(OH)₂D₃ による転写活性促進を抑制することが確認された。さらに、non-genomic 作用によって細胞分化が誘導されることが知られている NB-4 細胞の分化誘導系を用いて、ビタミンDの non-genomic 作用に対する効果を検討した。TEI-9647 および TEI-9648 には抑制活性が認められないことが明らかとなった。

最後に、ラットおよびマウスを用いて、生体内においてビタミンD作用を抑制するのかどうかを検討した。TEI-9647 単独で投与した場合はビタミンD様の作用は殆ど認められなかったが、1 α , 25-(OH)₂D₃ と TEI-9647 とを同時に投与した場合は 1 α , 25-(OH)₂D₃ の生理作用 (血中カルシウム濃度上昇) を抑制した。さらに、³H 標識 1, 25-D₃-lactone をラットに投与し血清中あるいは胆汁中の代謝物を HPLC により解析したところ、TEI-9647 の溶出ピークと一致した代謝物ピークが認められた。従って、化学的に合成された TEI-9647 が、生体内においてもビタミンDアンタゴニストとして作用すること、さらにこれが生体内でビタミンD代謝物の一つとして存在する可能性があることが示された。

以上の結果から、著者は、TEI-9647 および TEI-9648 がビタミンDの genomic 作用に対する特異的なアンタゴニストであると結論した。このような化合物の発見とそれに続く一連の研究についてはこれまで全く報告がなく、著者の研究は、今後のビタミンD研究に新たな展開をもたらすものと期待される。

これらの成果はすでに 3 編の国際的学術専門誌に公表されており、著者の研究が世界的レベルで評価を受けていることは明らかである。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。