

## 1. 研究課題名

「ステロイド骨格を有する生理活性物質の体内動態解析に基づいた創薬研究」

## 2. 研究メンバー

池川 繁男 近畿大学薬学薬学部生体分子解析学研究室・教授  
 三田村 邦子 近畿大学薬学薬学部生体分子解析学研究室・準教授  
 堺 俊博 ハイテクリサーチセンター・RA

## 3. 研究成果

### 3-1. LC-MS/MSによる唾液中胆汁酸の定量と唾液分泌量亢進に伴う濃度変動

最近ステロイド検査において、唾液が簡便、無侵襲、随時に、かつ繰り返し採取できる試料として注目されている。しかし、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) のような酸性ステロイドでは、その低い $pK_a$  ( $\leq 1$ ) と膜透過性のために唾液中濃度が唾液分泌量亢進に伴って低下し、正確なレベルが把握できない例も認められる。ところで、肝胆道系機能検査に有用とされる胆汁酸のうち、遊離型 ( $pK_a = 5$ ) 及びグリシン抱合型 ( $pK_a = 3.9$ ) 胆汁酸は、側鎖にカルボキシル基を有しており、唾液がその検査試料になり得るか否かに興味を持たれる。以上の背景から、chenodeoxycholic acid (CDCA) 及びglycochenodeoxycholic acid (GCDCA) をモデル胆汁酸に選択し、唾液中これらのLC-ESI-MS/MSによる高感度定量法を開発するとともに、唾液分泌量亢進による唾液中レベルの変動を精査した。

初めに唾液 (200  $\mu$ L) にISとして $[^2H_4]$ -CDCA及び $[^2H_4]$ -GCDCAを添加後、除蛋白及びStrata-Xカートリッジにより精製した。次いで2-hydrazinopyridine (HP) による誘導体化後 (Fig. 1), LC-ESI-MS/MS [装置: Applied Biosystems API 2000, カラム: Cadenza CD-C18 (75 x 2.0 mm i.d.), 移動相: MeOH-10 mM HCOONH<sub>4</sub> (7:3), 流速: 0.2 mL/min, 検出: SRM ( $[M+H]^+ \rightarrow m/z 110.1$ )] で分析した。CDCA及びGCDCAを直接負イオン検出した場合と比較すると、誘導体化により定量限界が

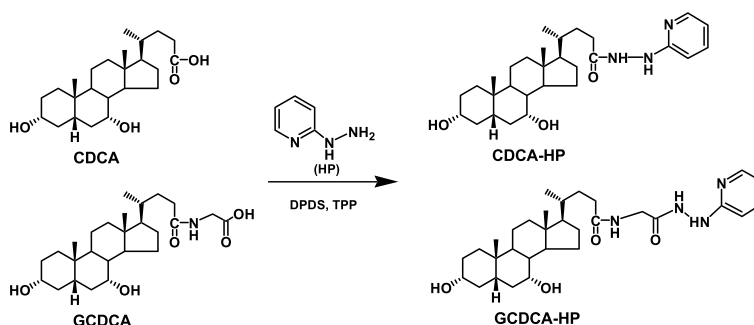


Fig. 1. Derivatization of CDCA and GDCA with HP

それぞれ15倍 (25 pg/mL) 及び6倍 (50 pg/mL) 向上した。本法では共存物質による妨害は認められず、良好な精度・正確度が得られた。そこで、本分析法を健常人唾液に適用したところ、遊離型ではCDCAと共にcholic acidが、グリシン抱合型ではヒト主要胆汁酸5種が検出された (Fig. 2)。次に唾液分泌亢進 (ガム咀嚼) に伴う唾液中胆汁酸の濃度変動を精査した。その結果、CDCA濃度は唾液分泌量に左右されないのに対し、GCDCA濃度は分泌量亢進により大き

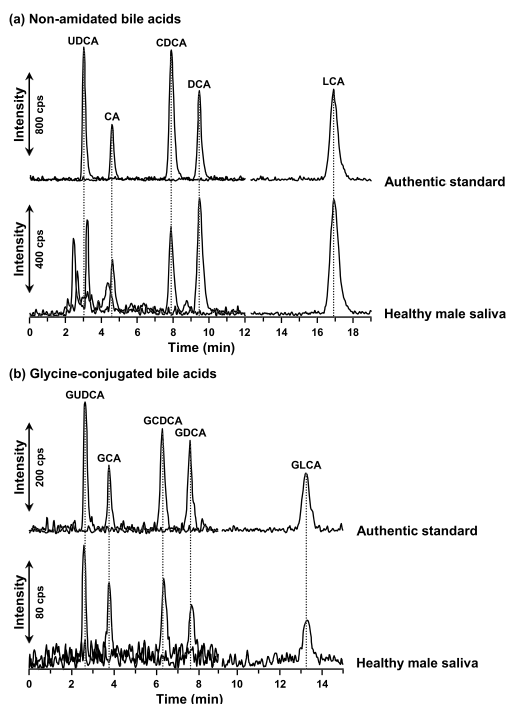


Fig. 2. Overlaid chromatogram of (a) non-amidated and (b) glycine-conjugated bile acid derivatized with HP: upper chromatograms, authentic standards and lower chromatograms, a healthy male saliva (in this sample, UDCA was not detected).

く減少した (Fig. 3). この違いは, CDCAは $\text{pH}=7$ における $\log D$ が2.3と, イオン型でも十分な脂溶性を有しており, 腺房細胞の細胞膜を容易にかつ十分な速度で透過して血液から唾液に移行できるのに対し,  $\log D$ が0.45のGCDCAは, 細胞間隙を僅かに通過して唾液に移行することによるものと考えられる. このように遊離型胆汁酸に対しては, 唾液中濃度が唾液分泌量に非依存的であることが確認され, 唾液がその検査試料となり得る可能性が示唆された<sup>1)</sup>.

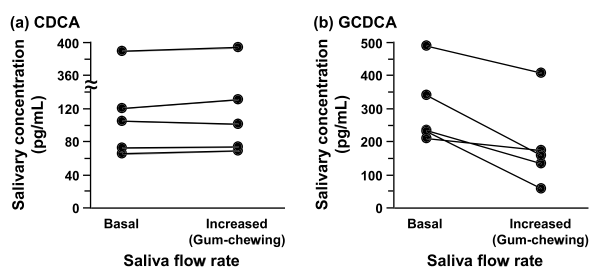


Fig. 3. Changes in salivary steroid concentrations due to increased saliva flow rate (gum-chewing).

### 3-2. 硫酸抱合型テトラヒドロコルチコステロイドの合成

ステロイドホルモンや胆汁酸などの低分子生理活性物質にフォーカスした臨床メタボローム研究では, 隠された未知代謝物が少なからず存在し, これらを解き明かすことが病因を解明し, 病態を解析する上で重要な課題となる. これには的確な標品の確保と信頼度の高い測定法の確立がその前提となる. こうした観点から我々は, 内分泌・代謝疾患の診断指標として期待される尿中抱合型テトラヒドロコルチコステロイドを対象とするメタボロミクス研究に着手し, LC/MSによるテトラヒドロコルチコステロイド・グルクロニド12種の高感度一斉分析法を構築するとともに, 本法を臨床に適用し有用な知見を得た<sup>2)</sup>. 今回さらに, テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートを対象とする臨床メタボローム研究を推進すべく,  $3\alpha$ -ヒドロキシ- $5\beta$ -ステロイド構造を有するTHF, THE, THSの3-及び21-モノサルフェートと3,21-ジサルフェート 9種並びにそれらの5位立体異性体である $5\alpha$  (Allo) 体 9種 (Fig. 4) の合成を試みた<sup>3)</sup>.

合成法は種々考えられるが, 比較的安価に入手可能なコルチコステロイドを出発原料に用いて, これらステロイドが保有する4-エン-3-オン構造を $3\alpha$ -ヒドロキシ- $5\alpha/5\beta$ -ステロイドに立体選択的に変換した後, 3位あるいは21位水酸基を選択的に硫酸化する合成ルートと, 市販のテトラヒドロコルチコステロイドを原料に用いて3位あるいは21位水酸基を選択的に硫酸化する合成法が考えられる. しかしながら, 後者の合成法は, 原料が極めて高価なため入手し難く現実的とは言えない. そこで前者のコルチコステロイドを原料に用いて合成することとした.

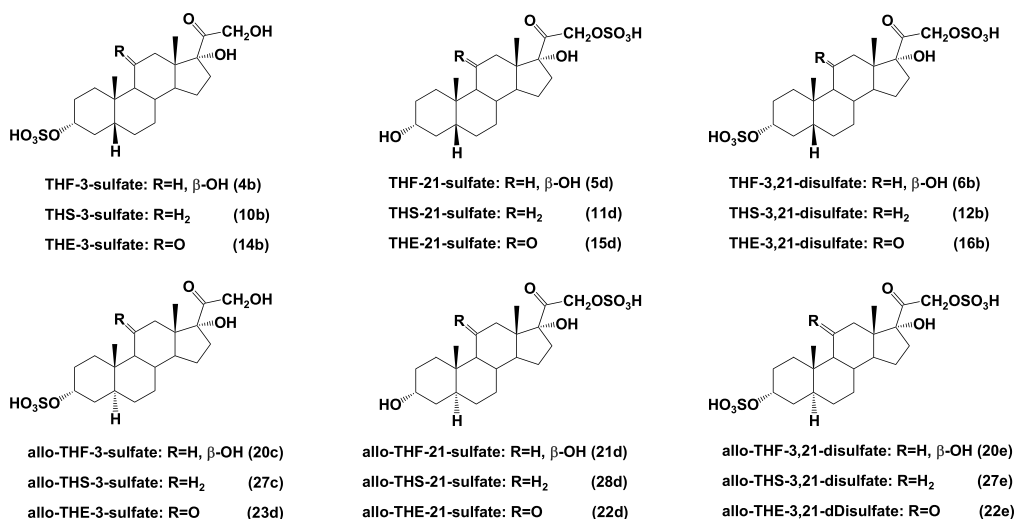


Fig.4. Chemical structures of the desired sulfates of tetrahydrocorticosteroids

### 3-2-1. 硫酸抱合型A/B-シス-5 $\beta$ -テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートの合成

すでに、ステロイドの $\Delta^4$ -3-ケト部の化学的還元については、種々の検討がなされている。接触還元においては、使用する触媒あるいはステロイド核上の置換基の違いにより5位立体異性体 (5 $\alpha$ /5 $\beta$ ) の生成比が異なり、一般に両者の分離は困難である。しかし、Jacksonら<sup>4)</sup>によりピリジン中2% Pd/CaCO<sub>3</sub>を用いる反応条件が考案され、立体選択的に5 $\beta$ -ジヒドロ体を得ることができるようになった。Hosodaら<sup>5)</sup>は、本法によって、コルチゾール-21-アセテートと11-DOC-21-アセテートを5 $\beta$ -ジヒドロ体に誘導後、THF、THE、THSの3-及び21-グルクロニドの合成を達成している。そこで初めに、コルチゾール (1a) を常法通りアセチル化して得た21-アセテート (1b) をピリジン中5% Pd/CaCO<sub>3</sub>を用いて水素気流下接触還元を行った。しかしながら、期待に反して反応は全く進行せず原料回収に終わった。そこで、塩基性条件下でより高い触媒活性を示すことが知られる10% Pd(OH)<sub>2</sub>/Cを用いて再度接触還元を試みた。その結果、期待通り目的とする5 $\beta$ -3-ケト体 (2) を得ることができた。

化合物2の3 $\alpha$ -ヒドロキシ体への誘導については、3及び20位カルボニル基のうち3位のみを、しかも3 $\alpha$ -OHに立体選択的に還元する必要がある。Hosodaら<sup>5)</sup>は、ラネーニッケルを用いる選択的な還元反応によって3 $\alpha$ -ヒドロキシ体を得ているが、ラネーニッケルは試薬の調製に時間を要するばかりか、得られる試薬の活性が一定しないなどの問題がある。そこで、20位カルボニル基がステロイド核D環上のジヒドロキシアセトン側鎖であること、また、水素化ホウ素亜鉛 (Zn(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)<sup>6)</sup>が中性に近い還元剤であり、緩和で官能基選択性が高く、しかもキレーション制御による立体選択的なカルボニル基の還元に適している点に着目し、本試薬による3位カルボニル基の位置並びに立体選択的な還元を試みた。すなわち、2をエーテル中塩化亜鉛と水素化ホウ素ナトリウムを用いて調製したZn(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>と室温で45分間攪拌して還元反応を行った。その結果、期待通り3 $\alpha$ -ヒドロキシ体 (3) を高収率で得ることができた。

以上、 $\Delta^4$ -3-ケトステロイドの3 $\alpha$ ,5 $\beta$ 系への変換を達成したので、引き続き、これを中間体と

して目的とするサルフェートの合成を行った。まず、化合物**3**を無水ピリジン中トリエチルアミン-三酸化イオウ錯体と室温で30分間反応させて3位水酸基を硫酸エステル化後、メタノール中ナトリウムメトキシドでアルカリ加水分解に付し、THF-3-サルフェート (**4b**)を得た。一方、21-サルフェート (**5d**)は、化合物**3**の3位水酸基をシリルエーテルとして保護した後、21位アセチル基を先と同様に加水分解し、得られる21-ヒドロキシ体 (**5b**)を硫酸化後、最後にアセトン中5%塩酸で脱シリル化して合成した。また、3,21-ジサルフェート (**6b**)は化合物**3**をアルカリ加水分解し、得られるTHF (**6a**)を硫酸化して製した (Fig. 5)。

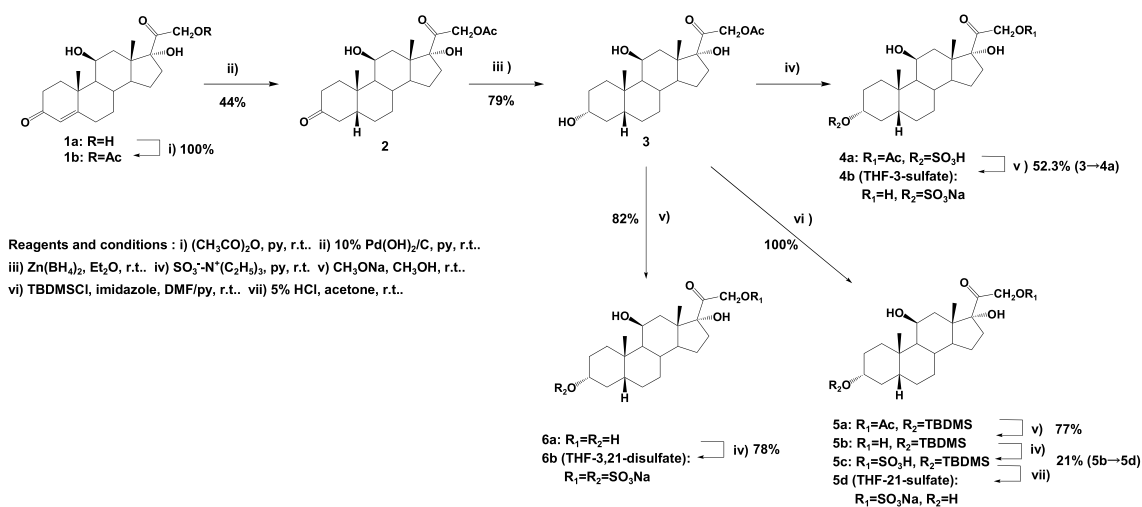


Fig. 5. Synthetic route to the sulfate conjugates of THF

一方、THS-サルフェート3種は11-DOC (**7a**)を原料とし、また、THE-サルフェート3種はTHF-21-acetate (**2**)を塩化メチレン中pyridinium chlorochromateで酸化して得られるTHE-21-acetate (**13**)を原料としてTHF-サルフェートと同様の合成ルートで合成した(Fig. 6, 7)。

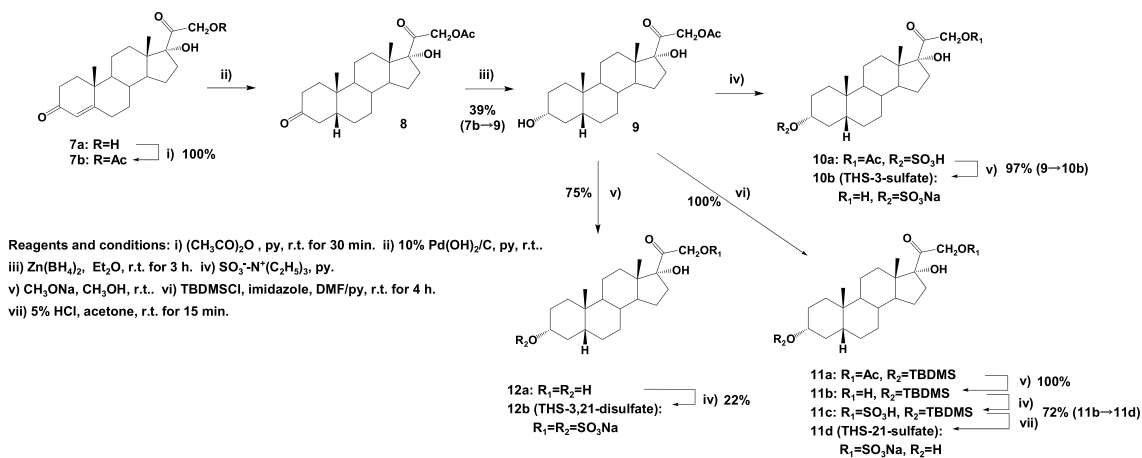


Fig. 6. Synthetic route to the sulfate conjugates of THS

### 3-2-2. 硫酸抱合型A/B-トランス-5 $\alpha$ -テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートの合成

$\Delta^4$ -3-ケトステロイドの5 $\alpha$ 体への変換には、液体アンモニア中Liを用いるBirch還元<sup>7)</sup>やエノールアセチル化後NaBH<sub>4</sub>還元を行う $\Delta^5$ を経由する方法<sup>8)</sup>などが報告されている。しかしながら、これらはいずれも側鎖の保護並びに3 $\beta$ -水酸基の3 $\alpha$ 位への反転を要するなど、収率的に満足できるもの

ではない。また、homogeneousな系であるがRhCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>9)</sup>を用いる接触還元では、かなりの選択性が得られるものの、実用的とはいえない。Tsudaらは<sup>10)</sup>、MeCu-DIBAH-HMPAを用いる $\alpha,\beta$ -不飽和ケトンの還元が5 $\alpha$ 体を与えると報告しているが、これをコルチゾールに応用するとき、 $\alpha/\beta$ 比は1:2であり期待に反する結果を示している。Hosodaらは<sup>11)</sup>、 $\Delta^4$ -3-ケトステロイドを5 $\alpha,3\alpha$ 系ステロイドに変換する還元反応に種々検討を加え、コルチゾール-21-アセテート (**1b**)をいったん3,5-ジエン体とする合成法を報告している。すなわち、 $\Delta^4$ -3-オキシ体を3-エトキシエーテル-3,5-ジエンに誘導後、Pd/C触媒下接触還元を付し、ついで酸処理して5 $\alpha$ 体に誘導後、3位カルボニル基を還元するというものである。そこで本法に準じて5 $\alpha$ -ジヒドロ体を合成することとした (Fig. 8)。すなわち、コルチゾール-21-アセテート (**1b**) をテトラヒドロフラン-エタノール (10:1, v/v) 混液中 *p*-トルエンスルホン酸触媒下オルトギ酸エチルと反応させて3-エトキシエーテル-3,5-ジエン (**17**) へと変換した。これをエタノール-酢酸エチルエステル (1:1) 混液中水素気流下10% Pd/Cを用いる接触還元を付し、ついで酸処理 (7.3% HCl) することによって目的とする5 $\alpha$ 体 (**19a**) を得た。

本還元反応において、5 $\alpha$ -ジヒドロ体の生成が優先する理由については、Fig. 9に示したように触媒との相互作用で説明できる。すなわち、complex Aでは、1, 7及び9位のaxial水素と相互作用するが、complex Bでは1, 8位の水素に加え、立体障害の大きい19位のメチル基との相互作用を示すことから、前者のほうがより安定であり、その結果、A/B環がtrans配置である5 $\alpha$ -ジヒドロ体へと還元される。

次に5 $\alpha$ -3-ケト体 (**19a**) の3 $\alpha$ -ヒドロキシ体への変換を試みた。通常、5 $\alpha$ -系の3位カルボニル基は、金属ヒドリド還元の際し、3 $\beta$ -ヒドロキシ体を与えるが、かさ高い置換基を導入したK-selectride (tri-*sec*-butylborohydride)<sup>12,13)</sup>を用いるとき、高収率で3 $\alpha$ 異性体を与えることが知られる。また、21位の水酸基をかさ高いテトラヒドロピラニルエーテルあるいは*tert*-ブチルジメチルシリル (TBDMS) エーテルとして保護すると20位のカルボニル基は還元されないことも示されている<sup>14)</sup>。

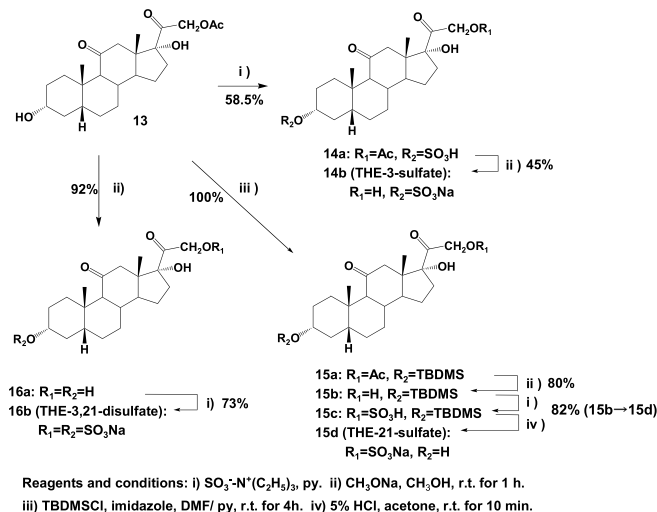
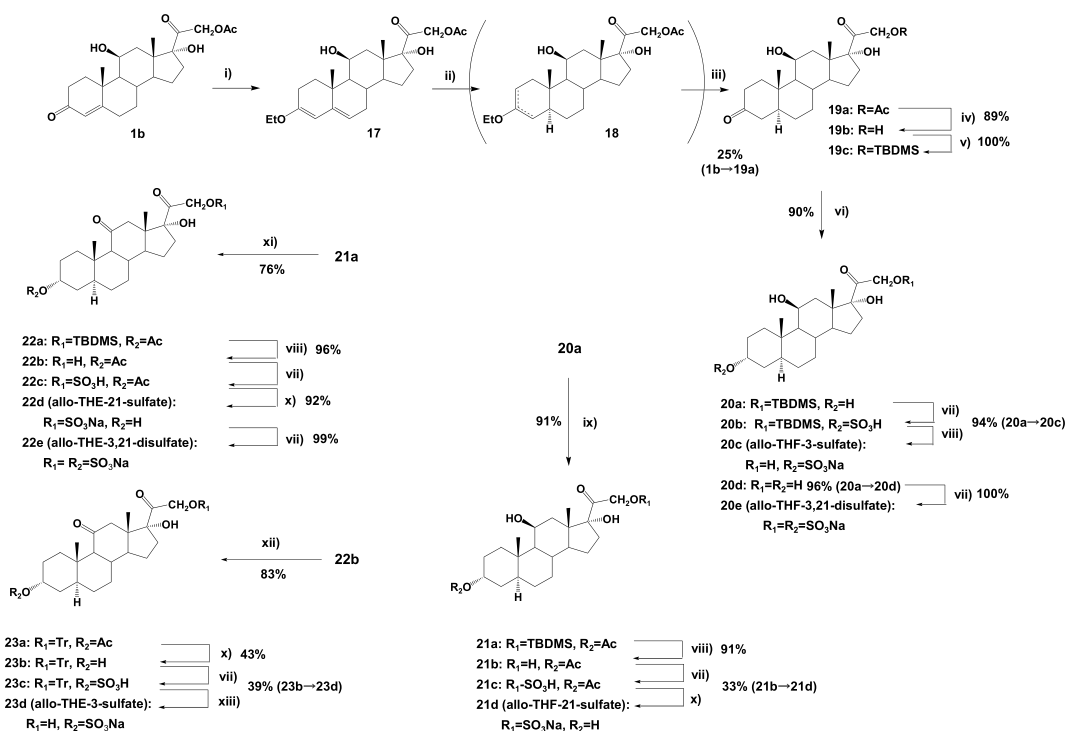


Fig. 7. Synthetic route to the sulfate conjugates of THE



Reagents and conditions: i) Triethyl orthoformate, *p*-TsOH, THF-EtOH, r.t. for 2h. ii) 10% Pd/C, EtOAc-EtOH, r.t.. iii) 7.3% HCl.  
 iv) CH<sub>3</sub>ONa, CH<sub>3</sub>OH, r.t.. v) TBDMSCl, imidazole, DMF/py, r.t.. vi) K-Selectride, tetrahydrofuran, -78°C. vii) SO<sub>3</sub>-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, py, r.t.. viii) 5% HCl, acetone, r.t.. x) NaOH, CH<sub>3</sub>OH, r.t.. xi) PCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t. for 1.5 h. xii) Tritylchloride, py, 60°C for 3 h. xiii) c.HCl-EtOH, r.t. for 2 h.

Fig. 8. Synthetic route to the sulfate conjugates of allo-THF and allo-THE

そこで、化合物**19a**の21位アセチル基を加水分解して21-ヒドロキシ体 (**19b**) とした後、TBDMSエーテル (**19c**) に誘導し、テトラヒドロフラン中-78°CでK-selectride還元に付し、高収率で鍵中間体である3 $\alpha$ -ヒドロキシ体 (**20a**) を得た。引き続き、**20a**の3位水酸基を硫酸エステル化後、アセトン中5%塩酸でシリル基を除去し、目的とする Allo-THF-3-sulfate (**20c**) を得た。

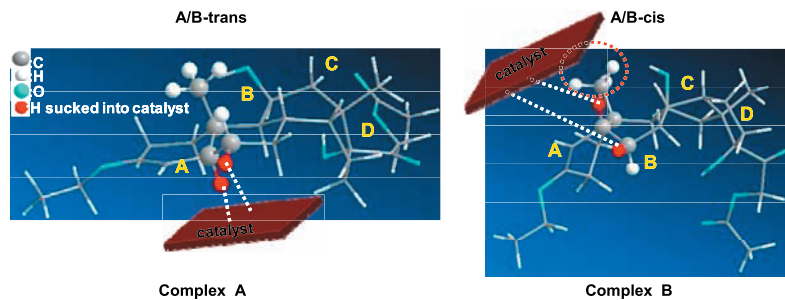


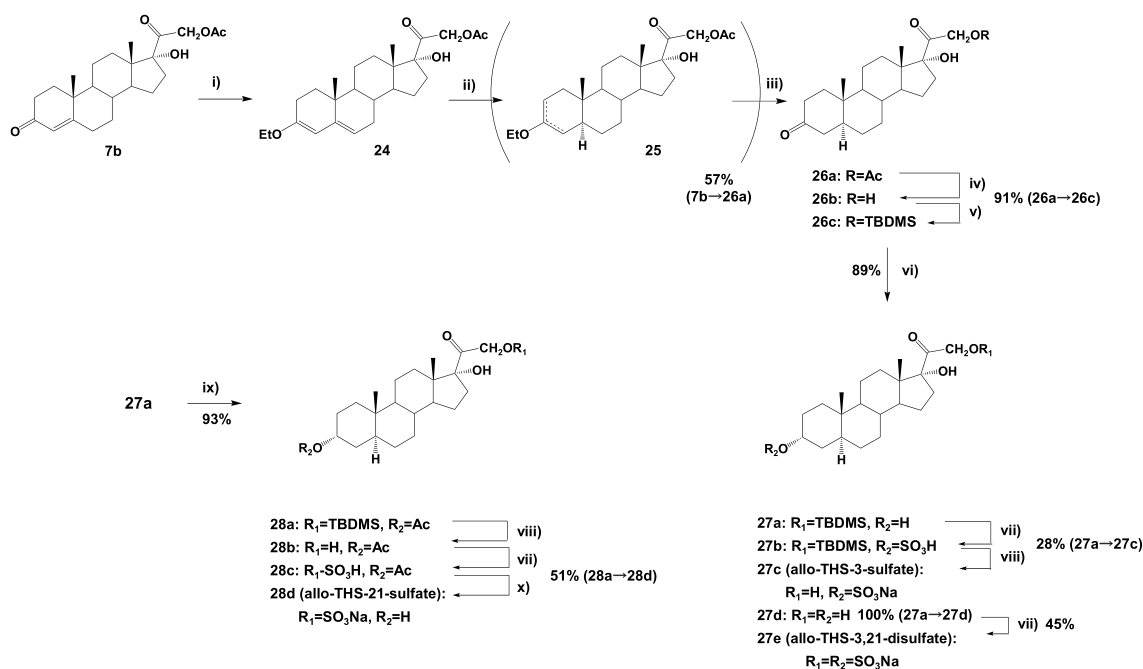
Fig. 9. Stereochemical Course of a Hydrogenation

さらに、Allo-THF-21-sulfate (**21d**) は、まず**20a**の3位水酸基を常法通りアセチル化(**21a**)後、シリル基を除去して遊離した21位水酸基を硫酸エステル化し、最後に3位アセチル基を除去して合成した。また、Allo-THF-3,21-ジサルフェート (**20e**) は、THF-21-シリルエーテル (**20a**) のシリル基をアセトン中5%塩酸で加水分解した後、硫酸化して合成した。

一方、Allo-THE-21-サルフェート (**22d**) は、**21a**の11位水酸基をPCC酸化して得られる**22a**を原料としてTHF-サルフェートの合成法と同様のルートに従って、また、3,21-ジサルフェート (**22e**)は、Allo-THE-21-サルフェート (**22d**) を再度硫酸化反応に付して合成した。

最後に、Allo-THE-3-サルフェート (**23d**) を化合物**22a**の3位アセチル基をアルカリ加水分解して3 $\alpha$ -OHとした後、硫酸化し、21-シリル基を酸で除去して合成することとし、はじめに、アルカリ加水分解反応に付した。しかしながら、期待に反して分解物が多く生成し、目的化合物を得ることができなかった。そこで、化合物**22b**の21位水酸基が一級水酸基であることに着目し、トリチル基で保護することとした。すなわち、化合物**22b**をピリジン中トリチルクロリドと60°Cで3時間作用させて21-トリチレート (**23a**) に誘導後、アルカリ加水分解反応に付した。その結果、分解物の生成は認められるものの、収率約50%で期待する3 $\alpha$ -ヒドロキシ体 (**23b**) を得ることができた。そこで、**23b**を硫酸エステル化後、21位トリチル基をエタノール中0.5N塩酸で除去し、目的とするAllo-THE-3-サルフェート (**23d**) を得た。

また、Allo-THS-3-サルフェート (**27c**)、Allo-THS-21-サルフェート (**28d**) 及びAllo-THS-3,21-ジサルフェート (**27e**) は、11-DOC-21-アセテート (**7b**) を出発原料として、同様の方法にて合成した (Fig. 10)。



Reagents and conditions: i) Triethyl orthoformate, c. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dioxane-EtOH, r.t. for 1 h. ii) 10% Pd/C, EtOAc-EtOH, r.t.. iii) 12% HCl. iv) 1% NaOH, CH<sub>3</sub>OH, r.t.. v) TBDMSCl, imidazole, DMF/py, r.t.. vi) K-Selectride, tetrahydrofuran, -80°C for 30 min. vii) SO<sub>3</sub>-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, py, r.t.. viii) 10% HCl, acetone, r.t.. ix) (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, py, r.t.. x) 10% NaOH, CH<sub>3</sub>OH, r.t..

Fig. 10. Synthetic route to the sulfate conjugates of Allo-THS

## 引用文献

- Higashi T., Shibayama Y., Ichikawa T., Ito K., Toyo'oka T., Shimada K., Mitamura K., Ikegawa S., Chiba H., *Steroids*, **75**, 338–345 (2010).
- Ikegawa S., Hasegawa M., Okihara R., Shimizu C., Chiba H., Hofmann A. F. Mitamura K., *Anal. Chem.* **81**, 10124–10135 (2009).
- Okihara R., Mitamura K., Hasegawa M., Mori M., Muto A., Kakiyama G., Iida T., Shimada M.,

- Mano M., Ikegawa S., *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 344–353 (2010).
- 4) Combe M. G., Henbest H. R., Jackson W. R., *J. Chem. Soc., C*, **22**, 2467–2469 (1967).
  - 5) Hosoda H., Saito K., Ito Y., Yokohama H., Ishii K., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(6), 211–2118 (1982).
  - 6) Gensler W. J., Johnson F., Sloan A. D. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 6074–6081 (1960).
  - 7) Johnson W. S., Bannister B., Pappo R., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6331–6339 (1956).
  - 8) Ringold H. J., Malhotra S. K., *Tetrahedron Lett.*, **3**, 669–672 (1962).
  - 9) Suggs J. W., Cox S. D., Crabtree R. H., Quirk J. M., *Tetrahedron Lett.*, **22**, 303–306 (1981).
  - 10) Tsuda T., Hayashi T., Satomi H., Kawamoto T., Saegusa T., *J. Org. Chem.*, **51**, 537–540 (1986).
  - 11) Hosoda H., Osanai K., Hukusawa I., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38** (7) 1949–1952 (1990).
  - 12) Brown C. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4100–4102 (1973).
  - 13) Cotreras R., Mendoza L., *Steroids*, **34**, 121–124 (1979).
  - 14) Göndös G., Orr J. C., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 1239–1240.