

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 近畿大学大学院薬学研究科生体分子解析学研究室・教授
 三田村 邦子 近畿大学大学院薬学研究科生体分子解析学研究室・准教授

3. 研究成果

我々は、ステロイド骨格を有する生理活性物質である胆汁酸を採り上げ、昨年度までに、コール酸 (CA) の代謝活性中間体であるアシルアデニレートと CoA チオエステルによるチオエステル結合型グルタチオン (GSH) 並びに *N*-アセチルシステイン (NAC) 抱合体への変換を明らかにするとともに、リトコール酸 (LCA) とウルソデオキシコール酸 (UDCA) をラットに投与すると、これら胆汁酸が GSH 抱合体として胆汁中へ排出される一方、胆汁うっ滞モデルラットに NAC を投与すると経口投与した LCA が NAC 抱合体として尿中に排泄されることも実証した (Fig. 1)。さらに、NAC 抱合体胆汁酸のエステラーゼによる加水分解反応に着目し、UDCA の NAC 抱合体を肝胆消化機能の改善を期待したプロドラッグとして提案した (Fig. 2)。

今年度は、これらの研究成果を基に、CA のアシルアデニレートと CoA チオエステルのアミノ基並びにチオール基を持つ bionucleophile との反応性を重水素標識体と非標識体の 1:1 混合物を基質に用いて明らかにするとともに (Fig. 3) [研究業績 1]、正常ラット並びに肝胆道疾患患者の胆汁中に排出される GSH 抱合体も同定した (Fig. 4) [研究業績 2, 3]。また、胆汁酸の硫酸抱合に関するこれまでの知見を基に NAC 抱合体の硫酸抱合に検討を加え、本抱合体が肝サイトゾール画分において 3-サルフェートに変換されることも明らかにした (Fig. 5) [研究業績 4]。さらに、胆汁酸の新規代謝物と推測される (25*R*)-及び (25*S*)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 α -cholestan-27-oic acid とそれらのグリシン並びにタウリン抱合体をコール酸より合成することにも成功した (Fig. 6) [研究業績 5]。

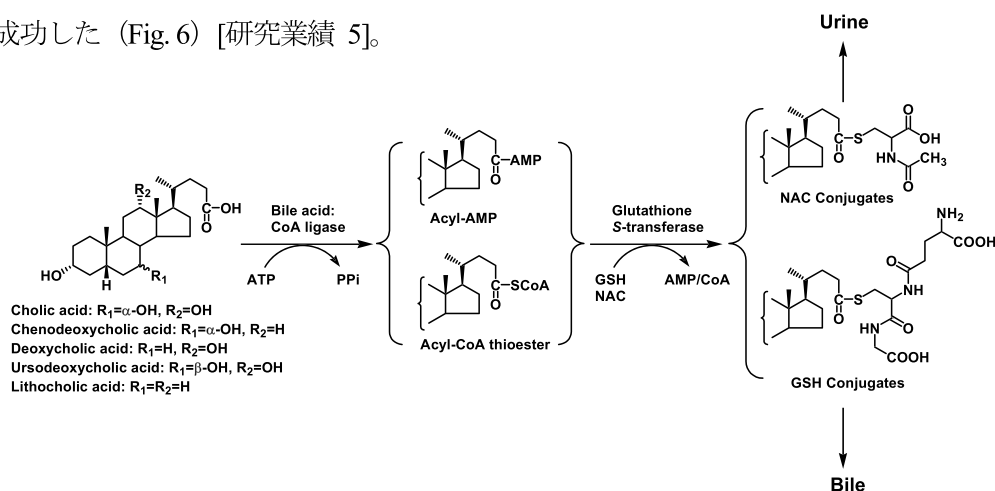


Fig. 1. Formation of glutathione and *N*-acetylcysteine conjugates of bile acids and their excretion into the bile and urine

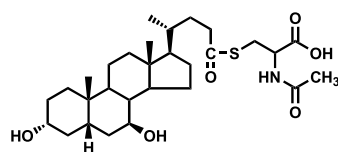


Fig. 2. Structure of proposed prodrug as a treatment for hepatobiliary diseases

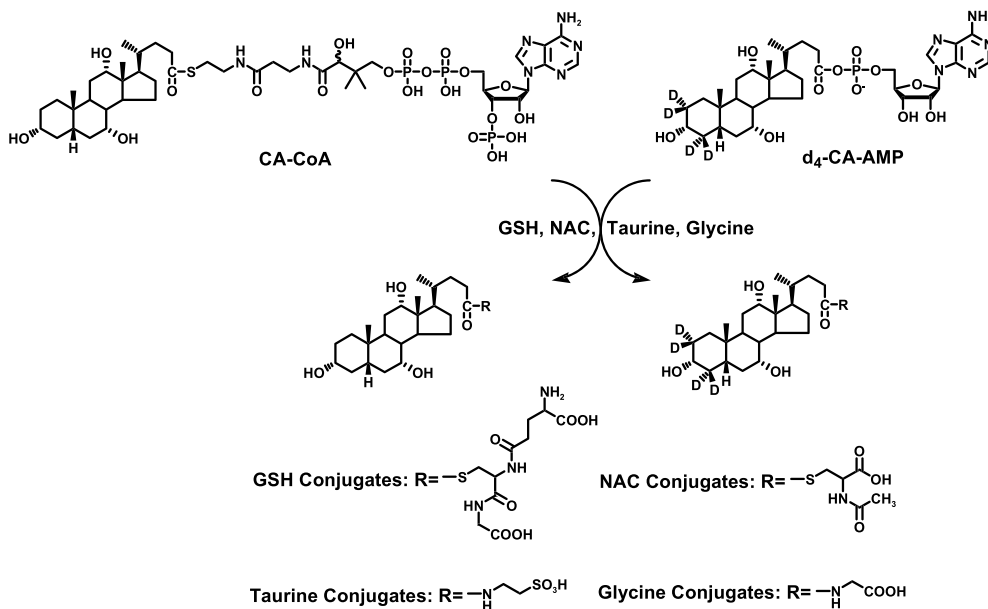


Fig. 3. Transacylation reaction of CA-CoA and d_4 -CA-AMP with bionucleophiles, leading to the formation of acyl conjugates

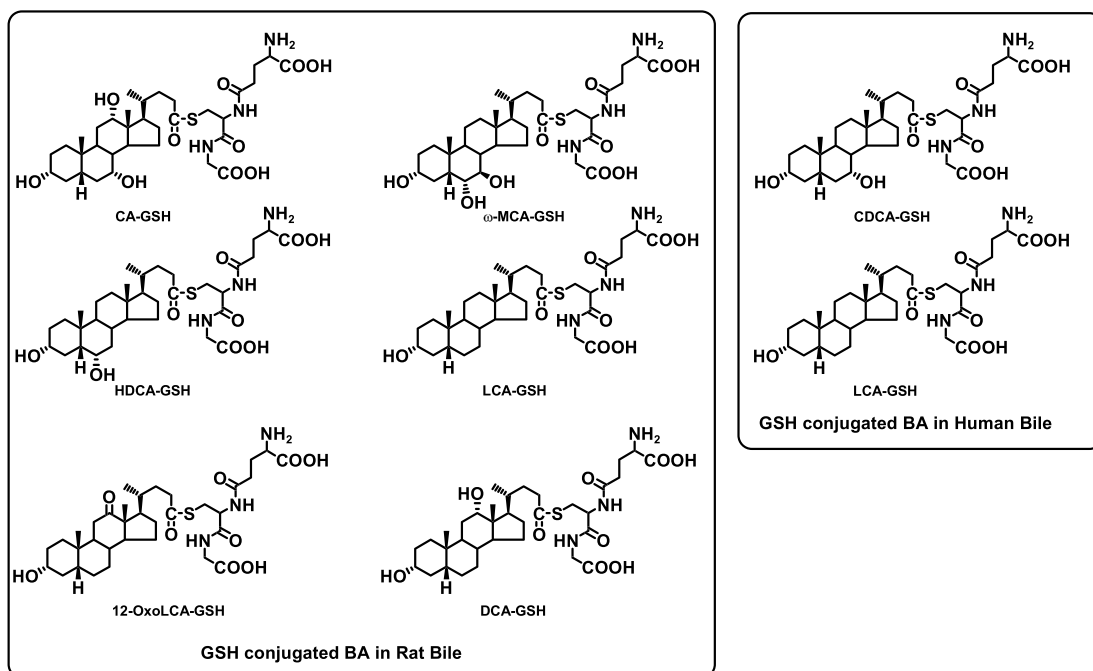


Fig. 4. GSH conjugates of bile acids found in rat and human bile

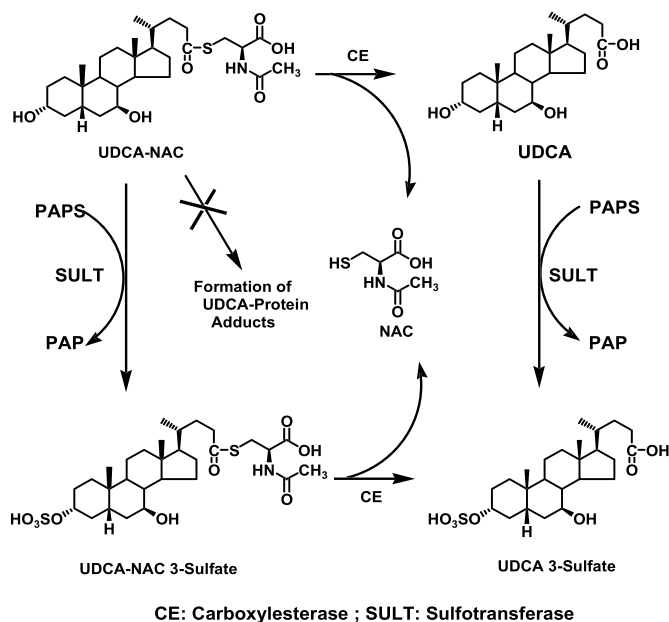


Fig. 5. Sulfation of *N*-acetylcysteine conjugated UDCA in rat liver cytosolic fraction

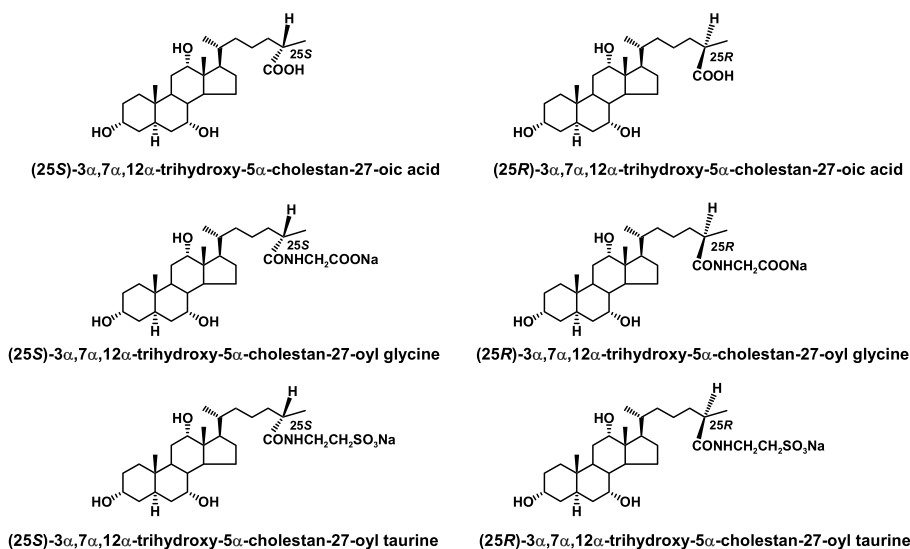


Fig. 6. Structures of (25R)- and (25S)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 α -cholestan-27-oic acid and their glycine and taurine conjugates

一方、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。そこで、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を展開すべく、昨年度までにグルクロニド 12 種の LC/MS による高感度測定法を構築するとともに、本法を臨床に適用して有用な知見を得た。また、尿中テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェートの標品として 3-及び 21-モノサルフェートと 3,21-ジサルフェート計 15 種の合成も達成した。

今年度は、これらの研究成果を基に、尿中テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェート

の安定同位体希釈 LC/MS による定量メタボロミクスに用いる内標準物質として多重重水素標識 5 β -テトラヒドロコルチコステロイド・サルフェート 6 種の合成を達成した (Fig. 7) [研究業績 6]。

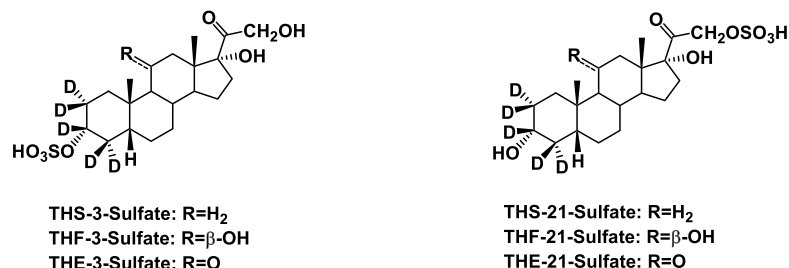


Fig. 7. Structures of 3- and 21-monosulfate conjugates of [2,2,3 β ,4,4-d₅]-tetrahydrocorticosteroids in the 5 β -series

また、甲状腺ホルモンの安定同位体希釈 LC/MS 分析法を構築し、本法が唾液を試料とする甲状腺疾患の検査法として有用なことも示した [研究業績 7]。さらに、エストラジオールに対する 17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの活性中心における三次元構造をもとに、阻害剤として Δ^{14} -17 α -並びに 17 β -エストラジオールのプロパンアミド並びにスピロ- γ -ラクトン誘導体を考案し、種々の化学反応を駆使してこれら化合物の合成を達成し [研究業績 8]、現在、それらの抗腫瘍活性に検討を加えている。

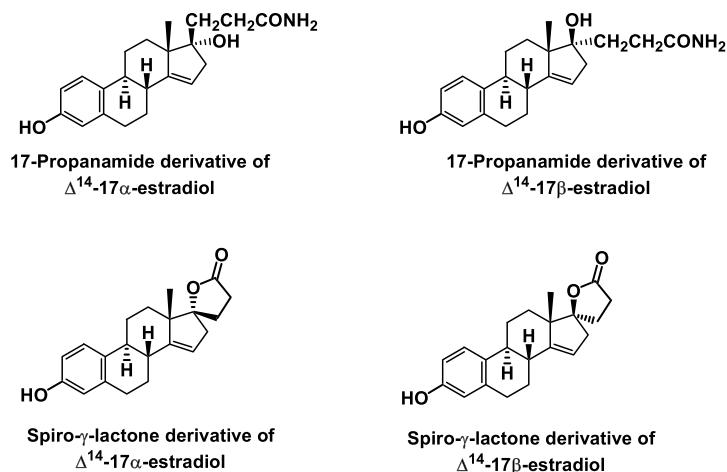


Fig. 8. Structures of the stereoisomeric propanamide and spiro- γ -lactone derivatives of estradiol