

## ビタミンD<sub>3</sub>新規誘導体の *in vitro*, *in vivo* における抗腫瘍効果の研究

野 矢 三 樹<sup>1</sup>    タメーズセリーナ<sup>1</sup>

土 黒 一 郎<sup>2</sup>    浦 島 充 佳<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京慈恵会医科大学分子疫学研究室

<sup>2</sup> 株式会社ケムジェネシス開発本部

(受付 平成 24 年 8 月 15 日)

### ANTICANCER EFFECTS OF NOVEL VITAMIN D<sub>3</sub> DERIVATIVES *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Miki NOYA<sup>1</sup>, Seryna TAMEZ<sup>1</sup>, Ichiro HUIKURO<sup>2</sup>, and Mitsuyoshi URASHIMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Molecular Epidemiology, The Jikei University School of Medicine

<sup>2</sup>Department of Development, ChemGenesis Incorporated

1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, which is the active form of vitamin D<sub>3</sub>, induces cancer cells to undergo apoptosis and differentiation and inhibits their growth. However, to date, no derivatives of active vitamin D<sub>3</sub> have been used clinically as anticancer agents, because of the side effect of hypercalcemia. Accordingly, we experimentally searched for novel vitamin D<sub>3</sub> derivatives that have anticancer effects but do not cause hypercalcemia.

To search for anticancer effects, we examined 46 vitamin D<sub>3</sub> derivatives, each with slight structural changes, during screening with HL60 human leukemia cells *in vitro*. The 50% inhibitory dose (ID<sub>50</sub>) is defined as the dose of an agent that inhibits tumor proliferation by 50% compared with a control solution. The ID<sub>50</sub> for active vitamin D<sub>3</sub> is 4 nM. The screening test determined that 20-epi-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (VD01) and 20-epi-26,27-dihomo-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (VD3), each with an ID<sub>50</sub> of 0.07 nM, were the derivatives that most effectively inhibited the growth of tumors. We then created 20-epi-25(OH)D<sub>3</sub> (VD47) and 20-epi-26,27-dihomo-25(OH)D<sub>3</sub> (VD48), which were derivatives that lacked the 1 $\alpha$ -hydroxyl group of VD01 and VD03, respectively, and performed a similar screening test *in vitro*. Only VD48 was found to have anticancer effects (ID<sub>50</sub> 2.5-1.25 nM); VD47 did not show anticancer effects (ID<sub>50</sub> < 40 nM). Next, we compared the effects of VD03 and VD48 in C.B-17/Icr-*scid/scid*Jel mice into which HL60 human leukemia cells had been transplanted to verify whether these derivatives have anticancer effects without causing hypercalcemia. Because all the mice treated with VD03 died before the tumor proliferated, the anticancer effects could not be evaluated in these mice, although hypercalcemia was detected. On the other hand, hypercalcemia was not detected in mice treated with VD48, but anticancer effects were not detected either, because the extent of tumor proliferation was similar to that in the control group.

In the present study, none of the vitamin D<sub>3</sub> derivatives examined had anticancer effects without causing hypercalcemia.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2012;127:259-73)

Key words: vitamin D<sub>3</sub> derivatives, 20-epi-26,27-dihomo- 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,  
20-epi-26,27-dihomo-25(OH)D<sub>3</sub>, anticancer effects, hypercalcemia

## I. 緒 言

食事から摂取されたビタミンD<sub>3</sub>または皮膚で紫外線の作用により産生されたビタミンD<sub>3</sub>は、肝臓で25位、つぎに、主に腎臓で1α位が水酸化され、活性型ビタミンD<sub>3</sub>:1α, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1α, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)に代謝される<sup>1) 2)</sup>。活性型ビタミンD<sub>3</sub>は副甲状腺ホルモンとともに血清カルシウムの恒常性の維持や骨形成に重要な役割を果たしている<sup>1) 2)</sup>。また、前立腺がん、大腸がん、乳がん、血液腫瘍細胞など、さまざまながん細胞に対してアポトーシス誘導、血管新生や増殖、転移の抑制、分化誘導の報告<sup>3)</sup>があり、多くの腫瘍タイプに対して増殖抑制効果が認められている<sup>4)</sup>。しかし、現在活性型ビタミンD<sub>3</sub>誘導体には、骨粗鬆症、慢性腎不全による二次性副甲状腺機能亢進症や乾癬に対して医薬品化されたものがある<sup>5) 6)</sup>が、抗がん剤として臨床応用された薬物は存在しない<sup>7)</sup>。

1981年阿部、須田らにより、活性型ビタミンD<sub>3</sub>がマウスおよびヒトの骨髄性白血病細胞を正常細胞のマクロファージへ分化誘導することが発見された<sup>8) 9)</sup>。同時に、活性型ビタミンD<sub>3</sub>の生理作用に必要なビタミンD受容体 (vitamin D receptor: VDR) が、膵臓、胎盤、下垂体、心臓、乳腺、生殖器といったさまざまな臓器や組織に存在することが分かったことで<sup>10)</sup>、1α, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の生理活性がカルシウム代謝調節作用のみならず、分化誘導作用をはじめ細胞増殖抑制作用や免疫調節作用の生理活性にかかわっていることも明らかになってきた<sup>10)</sup>。これらの発見以降、抗腫瘍効果をもつビタミンD製剤の開発が活発に行われ、種々の腫瘍タイプにおける分化誘導や増殖抑制をもたらすビタミンD<sub>3</sub>誘導体が研究されてきた<sup>11) 12)</sup>。しかし、腫瘍抑制作用の濃度を維持すると、副作用として高カルシウム血症を来とし、抗がん剤として臨床的に使用可能な化合物の医薬品化は困難な状況にある。なぜなら、25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が1α位水酸化酵素により活性型ビタミンD<sub>3</sub>に代謝されることで、小腸および腎尿細管からカルシウム吸収の促進と、骨からのカルシウム吸収が起こり、血中カルシウムが上昇するからである<sup>1) 2)</sup>。これに対して我々は、1α位水酸基を欠く誘導体の作成を考えた。活性型ビタミンD<sub>3</sub>は、肝臓で代謝された25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>がお

もに腎臓に発現する1α位水酸化酵素により代謝され産生される<sup>1)</sup>が、1α位水酸化酵素は腎臓以外の大腸、脳、胎盤、膵臓、リンパ節、皮膚などや、がん細胞において発現していることが確認されており<sup>13)</sup>、個々の組織で直接にビタミンD<sub>3</sub>が代謝されるため、25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>はがん細胞内で1α位水酸化酵素により活性型ビタミンD<sub>3</sub>に代謝され、カルシウム上昇作用を来すことなく、抗腫瘍効果を得られると仮定した。近年では*in vitro*分化誘導作用と*in vivo*血中カルシウム上昇作用を指標として、その作用に強弱を持たせようとする創薬研究が行われている<sup>14)</sup>。今回、我々は*in vitro*で腫瘍抑制作用が強く発揮され、かつ*in vivo*で高カルシウム血症を来さないビタミンD<sub>3</sub>新規誘導体を探索することを目的とした。

## II. 対象と方法

新規ビタミンD<sub>3</sub>誘導体46種類 (VD01 ~ VD46) (付記1) と、1α位水酸基を欠く誘導体2種 (VD47, VD48) (付記2) について抗腫瘍効果を判定するために、HL60ヒト白血病細胞を用いて*in vitro*によるスクリーニング検査を実施した。スクリーニング検査で抗腫瘍効果を強く認めた誘導体については、*in vivo*においてHL60ヒト白血病細胞を移植したC. B-17/Icr-scid/scidJcl (重症複合型免疫不全) マウスの腫瘍モデルを用いて検討した。なお動物実験は研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針に基づき、かつ東京慈恵会医科大学動物実験指針 (動物実験委員会) を遵守して施行された。

### 1. *In vitro*

#### 1) 細胞培養

European Collection of Cell Cultures (ECACC, UK, Dr Chris Bunce, Department of Medicine) より購入したヒト由来 (36歳女性) の白血病細胞株であるHL60細胞 (Human promyelocytic leukemia cells; 1vial (1×10<sup>6</sup> cells) # EC98070106) を用いて、10%ウシ胎児血清 (FBS; Invitrogen, CA, USA), 1%抗生物質: Penicillin, Streptomycin, 抗真菌剤: AmphotericinB, (Anti-Anti®; Invitrogen) を加えたDulbecco改変Eagle培養液 (DMEM; 和光純薬工業株, 大阪) で培養した。細胞はフラス

コ内で培養し、37℃、5%のCO<sub>2</sub>濃度を維持した培養器内で管理した。細胞増殖速度の倍加時間が48時間の増殖期にある細胞を5.0～10×10<sup>5</sup> cells/mlの密度に調整し継代培養した。継代の際は培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水(Ca, Mg不含)(PBS(-);和光純薬工業株)で洗浄し、遠心分離機を用いて毎分1,500回転で3分間遠心分離したのち、上清にある死細胞や浮遊物を吸引除去した。

## 2) ビタミンD<sub>3</sub>新規誘導体とActive/Inactive control希釈溶液の作成

ChemGenesis(株)(東京)にて合成したビタミンD<sub>3</sub>新規誘導体46種(VD01～VD46)(付記1)と1 $\alpha$ 位水酸基を欠く誘導体2種(VD47, VD48)(付記2)について段階希釈した溶液を作成した。粉末状の各誘導体をDimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma Aldrich, MO, USA)溶媒で1 mMとなるように溶解したのちウシ胎児血清で100倍希釈し10  $\mu$ Mを作成した。そこから40 nMを最高濃度としウシ胎児血清で希釈し、40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2.5 nM, 1.25 nM, 0.6 nM, 0.3 nM, 0.15 nM, 0.07 nMの10段階の希釈溶液を作成した。Active controlとして活性型ビタミンD<sub>3</sub>: 1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(Cayman Chemical, MI, USA), Inactive controlとして非活性型ビタミンD<sub>3</sub>: 24, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(Sigma Aldrich, MO, USA)を使用し、同様の手順で10段階濃度の希釈溶液を作成した。スクリーニング検査によりActive controlより腫瘍増殖抑制を認めた誘導体に対してはさらに低濃度の希釈溶液を追加し、0.035 nM, 0.0175 nM, 0.0088 nM, 0.0044 nM, 0.0022 nMの5段階を作成した。

## 3) スクリーニング検査の手順

HL60細胞を24穴プレートに3.0～6.0×10<sup>4</sup> cells/ml・wellに分注し、10段階濃度の各誘導体、Active control, Inactive control希釈溶液を各穴に10  $\mu$ l添加後、96～144時間培養した。各誘導体、Active control, Inactive controlに対するcontrol溶液は99%ウシ胎児血清に1% DMSOを加えて作成し、各誘導体、Active control, Inactive controlにつき各1穴に10  $\mu$ l添加後、同様に培養した。96～144時間の培養後、位相差顕微鏡下、細胞数を細胞計算盤で測定した。control溶液と比較し細胞増殖を50%抑制できた濃度を50% inhibitory dose: ID<sub>50</sub>とし、Active controlのID<sub>50</sub>より低濃度で増殖

抑制効果を認めた誘導体に対しては、さらに低濃度に希釈した5段階の溶液を追加した15段階の希釈溶液を用いて同様の作業を3回続けて細胞数を測定した。増殖抑制効果を認めなかった誘導体においては細胞数測定を1回で終了した。

## 2. In vivo

### 1) マウス腫瘍モデル

C. B-17/Icr-scld/scldJcl(重症複合型免疫不全)マウス(日本クレア, 東京), 6～8週齢, 雌性, 1群6匹, 計24匹を実験に用いた。マウスは東京慈恵会医科大学動物実験施設において管理した。入舎後、マウス用固形飼料(CE-2;日本クレア)を自由摂取させ、1週間予備飼育後、実験に供した。HL60ヒト白血病細胞1.0×10<sup>6</sup> cellsをPBS(-)溶液で0.15 mlに溶解し、マウス後頭部皮下に23G針にて移植し、マウス腫瘍モデルを作成した。

### 2) 抗腫瘍効果判定

マウス腫瘍モデルを1群6匹に割り付け、4群で比較した。(1) VD 03 投与群 (2) VD 48 投与群 (3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>投与群 (4) control群とした。腫瘍細胞を移植と同時に(1)群に対しVD03を0.3  $\mu$ g, (2)群に対しVD48を0.3  $\mu$ g, (3)群に対し活性型ビタミンD<sub>3</sub> 0.3  $\mu$ gをそれぞれウシ胎児血清で0.075 mlに溶解し27G針で腹腔内投与した。(4)群に対し99%ウシ胎児血清に1% DMSOを加えたcontrol溶液0.075 mlを作成し、同様に腹腔内投与した。薬剤投与は週1回実施した。実験は1群6匹, 計4群24匹を3回に分けて実施した。1回目の実験を1群2匹ずつ計8匹で開始し、毎週1回で計3回の薬剤投与を実施、21日間観察した。1回目の実験終了後に2回目の実験を開始し、同様の匹数を用いて21日間観察した。実験3回目は実験1, 2回目において21日間で抗腫瘍効果と副作用の判定が困難であったため、マウスの全身状態の悪化がないことを確認した上で、腫瘍の増殖を待つため薬剤投与を1回追加し計4回、観察期間を28日まで延長した。腫瘍の大きさとマウスの体重を薬剤投与と同日に測定した。腫瘍移植かつ初回薬剤投与後21日または28日にDiethyl ether(和光純薬工業株)吸入麻酔下にマウスを安楽死させ腫瘍を摘出した。腫瘍は10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業株)で固定したのち、SRL(株)(東京)にHematoxylin

Eosin (HE) 染色を依頼し、病変部位の病理組織検索を実施した。

### 3) 副作用判定

腫瘍移植かつ初回薬剤投与後21日または28日にDiethyl ether吸入麻酔下に心臓から採血し、生化学自動分析装置(富士ドライケム4000;富士フィルムメディカル(株),東京)を用いて血清カルシウム値を測定した。また、マウスの体重が20%以上の減少を呈する著しいい瘦や全身状態の悪化を認め、マウスに苦痛が伴うと考えられた場合は、その時点でDiethyl ether吸入麻酔下に採血しカルシウム値を測定した。採血により大量の脱血を伴うため採血直後に頸椎脱臼を実施、安楽死させた。

## III. 結 果

### 1. *In vitro*

Active controlである $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の $\text{ID}_{50}$ は4

nMだった (Fig. 1A)。Active controlより低濃度で腫瘍増殖を抑制した誘導体は46種のうち6種存在した。最も低濃度で腫瘍を抑制した誘導体は20-epi- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ : VD01 (Fig. 1B) と20-epi-26, 27-dihomo- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ : VD03 (Fig. 1C) であり、これらの誘導体で $\text{ID}_{50}$ は0.07 nMだった。つぎに、20-epi-24, 26, 27-trihomo- $1\alpha, 2\beta, 25(\text{OH})_3\text{D}_3$ : VD18 ( $\text{ID}_{50}$  0.15-0.07 nM) (Fig. 1D), 20-epi-24, 24-dihomo- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ : VD02 ( $\text{ID}_{50}$  0.3-0.15 nM), 20-epi-24, 24, 26, 27-tetrahydro- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ : VD04 ( $\text{ID}_{50}$  0.6-0.3 nM), 20-epi-24-homo- $1\alpha, 2\beta, 25(\text{OH})_3\text{D}_3$ : VD17 ( $\text{ID}_{50}$  0.6-0.3 nM) の順に腫瘍抑制効果を認めた。また、もっとも低濃度で腫瘍を抑制した誘導体2種: VD01, VD03について $1\alpha$ 位水酸基を欠く誘導体を作成した。VD03から $1\alpha$ 位水酸基を欠いた20-epi-26, 27-dimethyl- $25(\text{OH})\text{D}_3$ : VD48はActive controlより低濃度で腫瘍増殖を抑制したが ( $\text{ID}_{50}$  2.5-1.25 nM), VD01から $1\alpha$ 位水酸基を欠いた20-epi-25 ( $\text{OH})\text{D}_3$ : VD47は

Fig. 1A

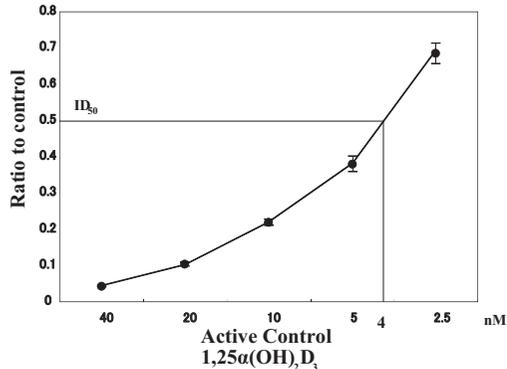


Fig. 1B

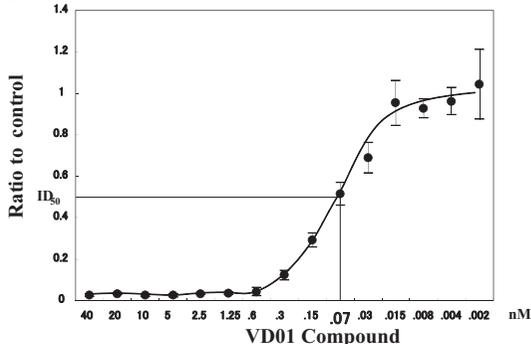


Fig. 1C

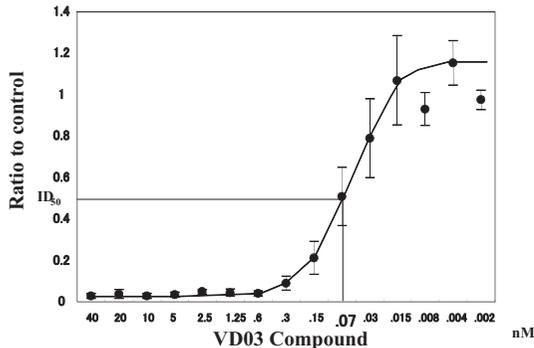


Fig. 1D

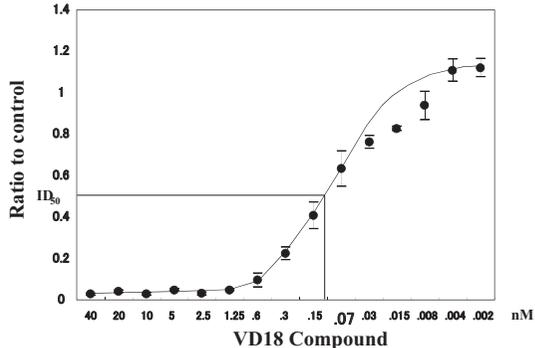


Fig. 1A ~ 1D. 50% inhibitory dose in typical compounds

50% inhibitory dose:  $\text{ID}_{50}$  is defined when tumor proliferation can be inhibited by 50% as compared to a control solution; (A)  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ : Active Control, (B) VD01 compound, (C) VD03 compound, (D) VD18 compound

抑制効果を認めなかった (ID<sub>50</sub> 40 nM<).

2. In vivo

In vitroにおいて最低濃度で腫瘍増殖を抑制した誘導体2種のうち、20-epi-1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:VD01 (MC1288) はLeo Pharmaceuticals Inc., (Ballerup, Denmark)<sup>15) -17)</sup>において抗腫瘍効果を目的に開発中であり、また同誘導体から1 $\alpha$ 位水酸基を欠く20-epi-25 (OH) D<sub>3</sub>:VD47は米国で特許申請中の誘導体<sup>18)</sup>であったため使用しなかった。そこで、in vivoでは20-epi-26, 27-dihomo-1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:VD03とその1 $\alpha$ 位水酸基を欠く20-epi-26, 27-dihomo-25 (OH) D<sub>3</sub>:VD48を使用した。

腫瘍形成は腫瘍移植後14日以降に確認できたが、(1) VD03群では実験1~3回各2匹計6/6匹すべてが薬剤投与後12日までに死亡もしくは安楽死となったため、腫瘍の形成を確認できなかった。実験1回目2/2匹は投与11日目に死亡、実験2回目2/2匹は投与7日目に衰弱のため安楽死、実験3回目2/2匹も投与12日目に衰弱のため安楽死した。また(2) VD48, (3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>, (4) controlの

各群1/6匹は腫瘍の移植が不十分のため28日の時点で腫瘍形成を確認できなかった。よって腫瘍移植後28日の時点で腫瘍形成を認めたのは(2) VD48群5/6匹, (3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>群5/6匹, (4) control群5/6匹, 計15/24匹だった。同時点で腫瘍の大きさは各群で同程度であり、触診上、腫瘍の硬さも同程度で可動性を認めた。薬剤投与回数を増やし観察期間を延長した実験3回目は(1) VD03群2/2匹, (2) VD48群2/2匹, (3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>群2/2匹, (4) control群2/2匹計8匹を用いて28日間観察を予定したが、(1) VD03群2/2匹は衰弱のため早期に安楽死, (2) VD48群1/2匹は26日の夜間に死亡したため、28日に観察可能なマウスは(2) VD48群1/2匹, (3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>群2/2匹, (4) control群2/2匹の計5/8匹だった。28日で腫瘍の増大は顕著となったが、大きさは同程度だった。腫瘍形態は、(2) VD48群では肉眼的に壊死の混在を認めたが、(3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>群, (4) control群には認めなかった。体重は(1) VD03群6/6匹は投与後7~12日までに20%以上の体重減少(中

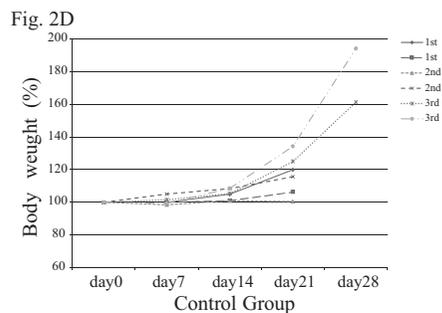
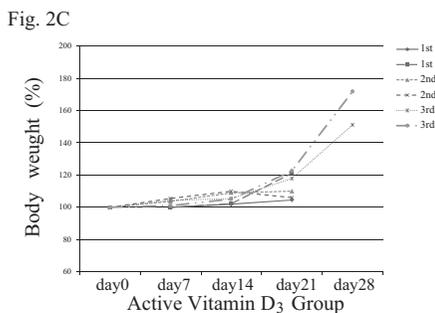
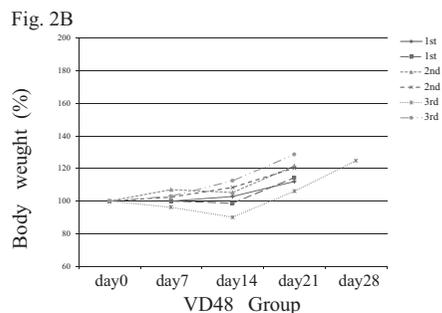
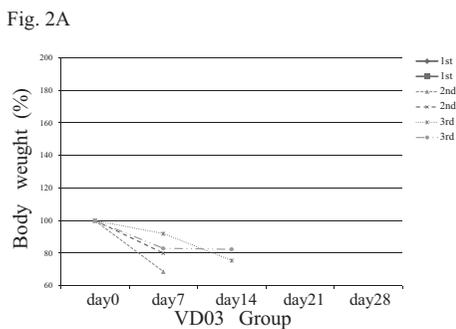


Fig. 2A ~ 2D. Body weight changes during experiments in each experimental group

Total 24 mice were divided into 4groups with 6 mice in each group; (A)VD3 group, (B)VD48 group, (C)Active Vitamin D<sub>3</sub> group, (D)Control group. Experiments were conducted on 3 times; 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>. 2 mice per group and 8 mice per experiment were used. Drug injections were done once a week, including a total of three different injections during the 21 day observation period for the first and second experiments, and a total of 4 drug injections during the 28 day observation period of the third experiment. Body weights were measured on the same days as the drug injections.

央値-22.3%) (Fig. 2A), 毛並み悪化と活気低下があり, 明らかな全身衰弱を認めたが, (2) VD48群 6/6匹 (中央値+20%) (Fig. 2B), (3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>群 6/6匹 (中央値+21%) (Fig. 2C),<sup>4)</sup> control群 6/6匹 (中央値+20%) (Fig. 2D) の計18/24匹は投与後21日まで全身状態の悪化なくすべてのマウスで約20%の体重増加を認めた. このうち28日まで観察した (2) VD48群 1/2匹 (+24%), (3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>群 2/2匹 (+71%, +51%), (4) control群 2/2匹 (+94%, +61%) はさらなる体重増加を認めたが, 腫瘍の増大も顕著であり, 腫瘍の重量を含んだ体重である. カルシウム値は (1) VD03群の2/6匹, (2) VD48群の1/6匹は夜間に死亡したため採血できず測定値が不明だった. 採血可能だった (1) VD03群 4/6匹ではカルシウム値 (中央値 11.4 mg/dl) は他群より高値だった. (Mann Whitney, p=0.0054). (2) VD48群の5/6匹 (中央値 6.9 mg/dl), (3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>群の6/6匹 (中央値 7.9 mg/dl), (4) control群の6/6匹 (中央値 5.7 mg/dl) のカルシウム値は同程度だった (Fig. 3). 病変部位のHE染色像は腫瘍形成を認めた15/24匹について比較したが, 個々の細胞は核が大きくN/C比が高いことや核分裂像が目立ち, 悪性度の高い細胞が

ほとんどで, 分化傾向は認めなかった. これらの所見は (2) VD48, (3) 活性型ビタミンD<sub>3</sub>, (4) control各群で共通していた. (Fig. 4A, 4B)

#### IV. 考 察

抗腫瘍効果が強く, 同時に副作用としての高カルシウム血症を来し難い新規ビタミンD<sub>3</sub>誘導体を探索したが, 今回の研究で該当する化合物を発見できなかった. しかし, 先行文献において未発表の化合物についても検討しており, これまでに報告のある化合物との比較も含め考察する.

*In vitro* で抗腫瘍効果が活性型ビタミンD<sub>3</sub>より強い誘導体は6種類存在した. ID<sub>50</sub>の低い順に, VD01, VD03, VD18, VD02, VD04, VD17である. これらの誘導体に共通してみられた修飾は側鎖20位の異性化 (エピメリ化: epimerization) だった. この修飾を持たない誘導体はすべて活性型ビタミンD<sub>3</sub>より抗腫瘍効果が弱かった. 側鎖20位の立体配置が天然と逆の20-epi-1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>およびその誘導体が, 天然のビタミンD<sub>3</sub>より高い活性を示すことは先行研究においても明らかにされており<sup>19)</sup>, 今回の我々の結果と一致している. しかし, 20位エピメリ化を持つ誘導

Fig. 3

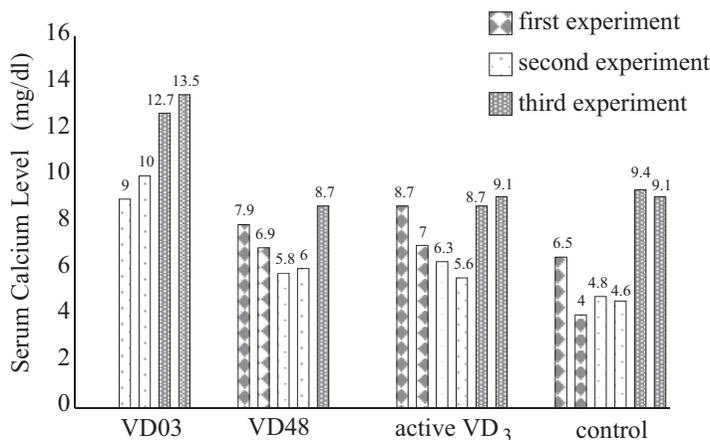


Fig. 3. Serum calcium level in each experimental group

Blood was collected from the heart to measure the serum calcium level at 21days or 28days following tumor transplantation and the first drug injection under inhalation anesthesia by diethyl ether. When emaciation or asthenia such as a body weight loss over 20% occurred, blood was collected to measure the serum calcium level under inhalation anesthesia by diethyl ether.

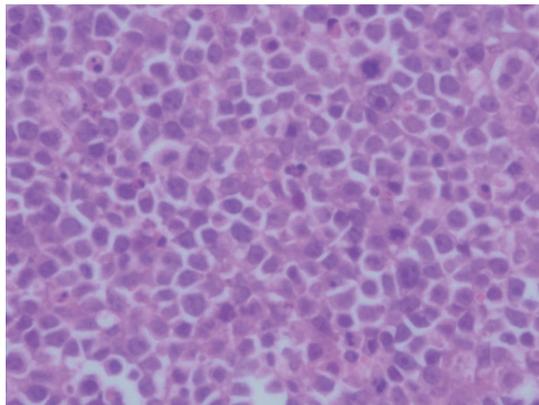
体は他に6種あったが、これらの誘導体は活性型ビタミンD<sub>3</sub>より抗腫瘍効果が弱かった。ID<sub>50</sub>の低い順に20-epi-24, 24-dihomo-1 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 25 (OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>:VD16 (ID<sub>50</sub> 5-2.5 nM), 20-epi-24-homo-3-prenyl-1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:VD40 (ID<sub>50</sub> 5-2.5 nM), 20-epi-26, 27-dihomo-3-prenyl-1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:VD41 (ID<sub>50</sub> 5-2.5 nM), 3- (3-hydroxypropyl) -24, 24, 26, 27-tetrahydro-1 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 25 (OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>:VD30 (ID<sub>50</sub> 40 nM< ), 20-epi-3- (3-hydroxypropyl) -1 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 25 (OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>:VD31 (ID<sub>50</sub> 40 nM<), 20-epi-26, 27-dihomo-3- (3-hydroxypropyl) -1 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 25 (OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>:VD32 (ID<sub>50</sub> 40 nM<) である。これらの誘導体に共通したのは、側鎖修飾に加えA環修飾が行われていることであり、VD16では2位にOH基の導入、VD40, VD41では3位へのアルキル基の導入、VD30, VD31, VD32では2位へのOH基導入と3位へのヒドロキシプロポキシル基導入を同時に行っていた。ただし、抗腫瘍効果が活性型ビタミンD<sub>3</sub>より強かったVD17, VD18もVD16と同様のA環修飾が行われていたが、これらでは20位エピメリ化以外での側鎖の修飾が異なっていた。よって、今回の研究からは20位エピメリ化により抗腫瘍効果が期待できることと同時に、側鎖修飾や他環構造体への修飾と影響し合い効果の高低に差が出るのが分かった。

2 $\beta$ - (3-hydroxypropoxy) -1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>:VD39 (ED-71) は2011年に中外製薬より骨粗鬆薬エディール®として販売されているが、今回のスクリーニング検査において腫瘍抑制効果は低かった (ID<sub>50</sub> 40 nM<)。この結果は、幹細胞分化誘導作用が弱い化合物であるという報告に一致していた<sup>20)</sup>。

*In vitro*でのスクリーニング検査結果からID<sub>50</sub>を比較すると、抗腫瘍効果が強かったVD01 (ID<sub>50</sub> 0.07 nM) とVD03 (ID<sub>50</sub> 0.07 nM) は、Active controlである活性型ビタミンD<sub>3</sub> (ID<sub>50</sub> 4 nM) の約100分の1の濃度で腫瘍抑制の効果を確認できた。この濃度は14-28 pg/mlであり、体内活性型ビタミンD<sub>3</sub>濃度の基準値20-60 pg/mlとほぼ同等であるため、VD01とVD03は高カルシウム血症を来たさず腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆されたため、*in vivo*での検討を決めた。さらに我々は、最低濃度で腫瘍を抑制したVD01, VD03の個々に対して1 $\alpha$ 位水酸基を欠く誘導体VD47, VD48を作成し実験を追加した。体内で1 $\alpha$ 位水酸化酵素に代謝され、カルシウム上昇を来さずに、VD47はVD01に、VD48はVD03と同等の抗腫瘍効果を得られると仮定した。

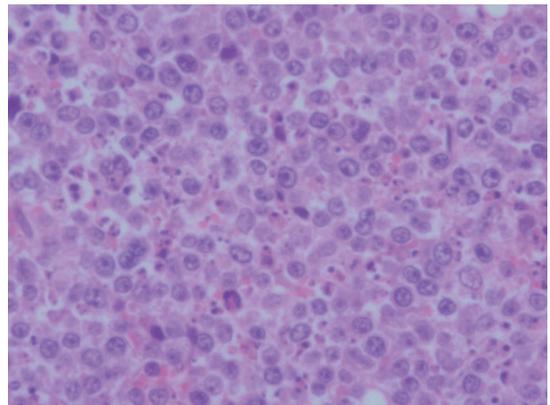
*In vitro*では、VD47, VD48はともにVD01, VD03よりも抗腫瘍効果は低かった。1 $\alpha$ 位水酸基はビタミンD受容体 (vitamin D receptor : VDR) の特

Fig. 4A



control

Fig. 4B



VD48

Fig. 4A, 4B. Histopathology of HL60 tumor in each experimental group

The pathological examination was demonstrated on tumors. Tumors were fixed by 10% Formalin Neutral Buffer Solution and stained by hematoxylin and eosin (HE) staining method. (H&E, x400 Original magnification)

定のアミノ酸と直接水素結合してビタミンDの作用発現の制御に関連することが知られている<sup>21)</sup>。一方で、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がHL60細胞に対してVDRとの結合を介さずにアポトーシスを誘導する可能性が検討されている<sup>21)</sup>。今回の結果からは、*In vitro*においてVD01, VD03に対しては $1\alpha$ 位水酸基がVDRとの結合に関与し、分化誘導・増殖抑制を行うために必要だったと考えられた。

つぎに、*in vivo*による検討に移った。VD01 ( $\text{ID}_{50}$  0.07 nM) は前述の通りLeo社で開発中であり、*in vivo*での検討から外した。また同誘導體から $1\alpha$ 位水酸基を欠く20-epi-25(OH)D<sub>3</sub>:VD47 ( $\text{ID}_{50}$  40 nM) は米国の特許文献に記載があったが、抗腫瘍効果の目的で研究されていなかったため<sup>18) 22)</sup>、VD47における本研究の新規性は高いと考えられる。しかし、VD47は抗腫瘍効果を認めなかったため*in vivo*での検討に使用しなかった。そこで、*in vivo*ではVD01と同じく最低濃度で腫瘍増殖を抑制した20-epi-26, 27-dihomo- $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ :VD03 ( $\text{ID}_{50}$  0.07 nM) を使用した。VD03は、抗腫瘍効果に関して*in vitro*での研究は存在したが<sup>23) 24)</sup>、*in vivo*での研究は存在せず、そのためVD03の新規性は高いと判断した。また、その $1\alpha$ 位水酸基を欠く20-epi-26, 27-dihomo-25(OH)D<sub>3</sub>:VD48 ( $\text{ID}_{50}$  2.5-1.25 nM) は先行文献において未発表であり、新規性の高い誘導體と判断し*in vivo*での検討に使用した。

今回の動物実験では、活性型ビタミンD<sub>3</sub>群、コントロール群、VD48群の腫瘍抑制効果に差が見られなかった。我々の実験では0.3 μg/マウス(1匹あたり体重約20 g)を週1回で投与しており、約15 μg/kgに値する。Muindiら<sup>25)</sup>の研究で、活性型ビタミンD<sub>3</sub>を0.5 μg/kg ~ 2.1 μg/kg、週3回マウスに投与し高カルシウム血症を来さずにsquamous cell cancerの増殖を抑制した報告と比較すると、今回の実験では約2.5 ~ 10倍の投与量を使用したことになる。しかし、今回実施した動物実験では抗腫瘍効果を認めることができず、HL60細胞においてはさらなる投与量が必要であった可能性が考えられた。

また、Osbornら<sup>26)</sup>のホルモン抵抗性前立腺がんに対する活性型ビタミンD<sub>3</sub>内服の第II相臨床試験では、1.5 ~ 2.0 μg/日の内服した患者のうち20 ~ 30%で高カルシウム血症を来しており、今回の投与量をさらに増量することで高カルシウム血症を伴う可

能性は認めなかった。

VD03投与群6/6匹は開始から12日までの間に死亡もしくは安楽死となったため、腫瘍抑制効果を他群と比較することはできなかったが、6/6匹すべてで活気低下と毛並み悪化、体重減少を認めており、また、このうち採血を行った4/6匹では血清カルシウム値が高値であった。高カルシウム血症では食欲低下による脱水や衰弱、重度の場合は意識混濁など脳の機能障害や、不整脈などの心機能障害が起こるため<sup>27)</sup>、体重減少や早期死亡はカルシウム作用による可能性が考えられた。よってVD03は臨床応用が可能な化合物ではないと判断した。一方で、VD48投与群5/6匹のマウスはカルシウム値の上昇なく、副作用としてのカルシウム作用は弱いことが示された。しかし、体内で $1\alpha$ 位水酸化酵素により代謝され、VD03と同等の抗腫瘍効果を発揮すると仮定したが、腫瘍の大きさは他群と同程度であり、抗腫瘍効果も弱いことが考えられた。よって、VD48においても臨床応用が可能な化合物ではないと判断した。

## V. 結 語

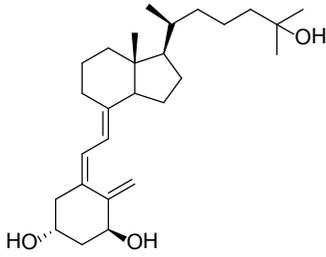
今回の実験では抗腫瘍効果を発揮する濃度を維持しながらカルシウム作用を抑えたビタミンD<sub>3</sub>誘導體を探索することは出来なかったが、 $1\alpha$ 位水酸基を欠くビタミンD<sub>3</sub>誘導體はこれまでに報告がない化合物であり、研究結果を報告した。

著者の利益相反 (conflict of interest:COI) 開示:

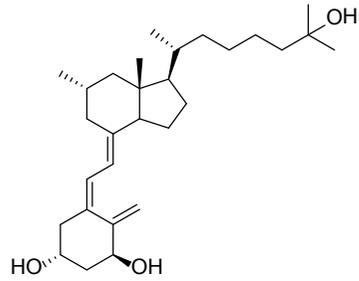
本論文の研究内容に関連して特に申告なし

付記 1

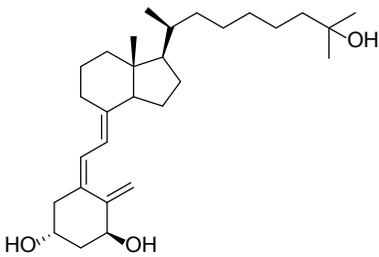
VD01: ID<sub>50</sub> 0.07-0.035 nM



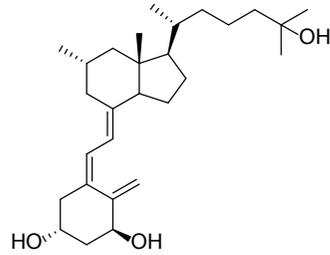
VD05: ID<sub>50</sub> 20-10 nM



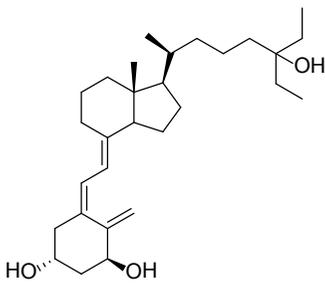
VD02: ID<sub>50</sub> 0.3-0.15 nM



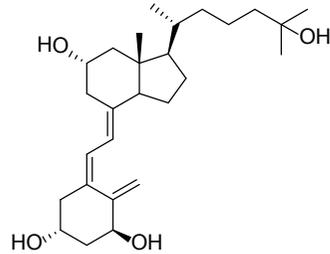
VD06: ID<sub>50</sub> 20-10 nM



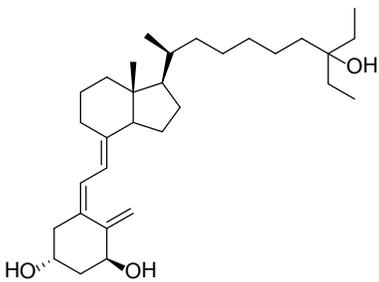
VD03: ID<sub>50</sub> 0.07-0.035 nM



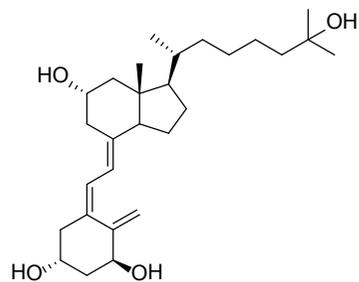
VD07: ID<sub>50</sub> 40 nM <

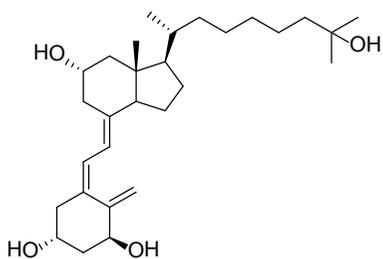
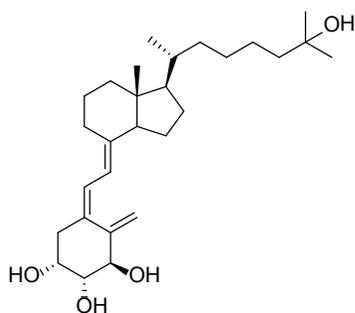
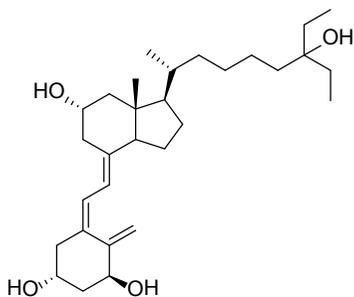
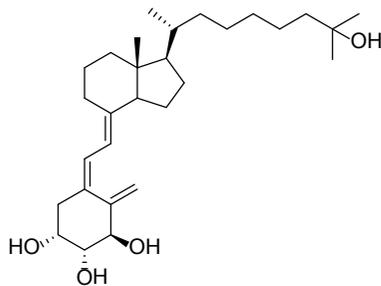
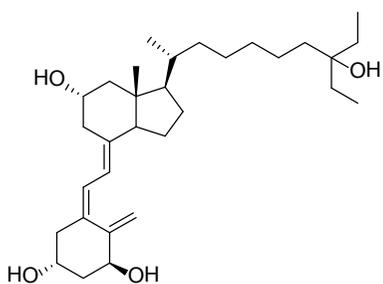
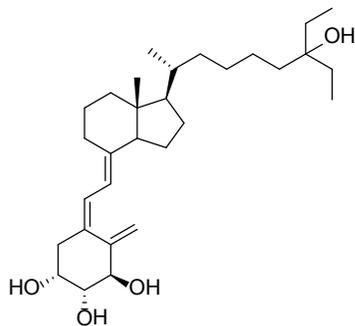
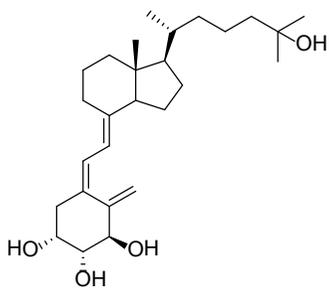
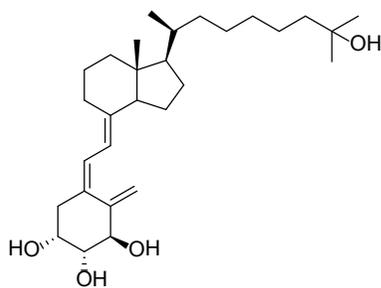


VD04: ID<sub>50</sub> 0.6-0.3 nM

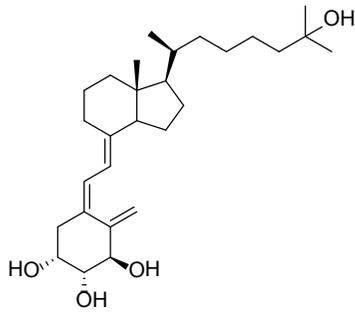


VD08: ID<sub>50</sub> 40 nM <

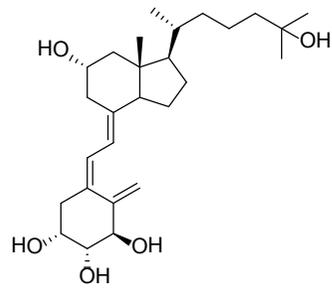


VD09 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD13 : ID<sub>50</sub> 40-20 nMVD10 : ID<sub>50</sub> 20-10 nMVD14 : ID<sub>50</sub> 40-20 nMVD11 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD15 : ID<sub>50</sub> 10-5 nMVD12 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD16 : ID<sub>50</sub> 5-2.5 nM

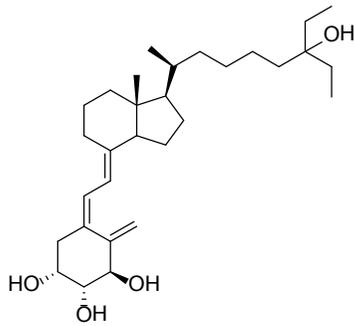
VD17 : ID<sub>50</sub> 0.6-0.3 nM



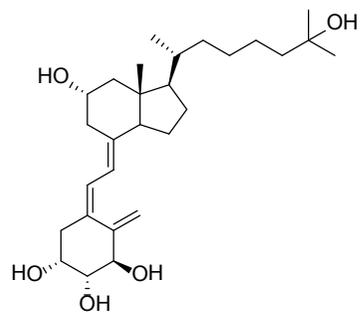
VD21 : ID<sub>50</sub> 20-10 nM



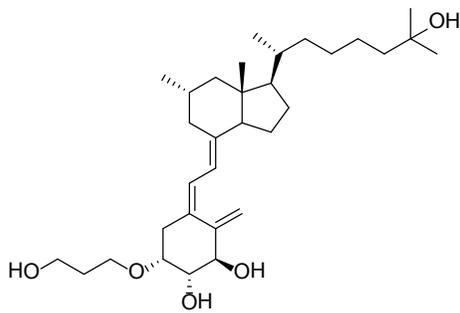
VD18 : ID<sub>50</sub> 0.15-0.07 nM



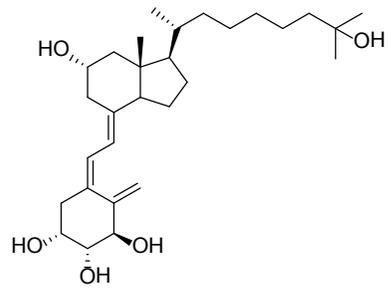
VD22 : ID<sub>50</sub> 20-10 nM



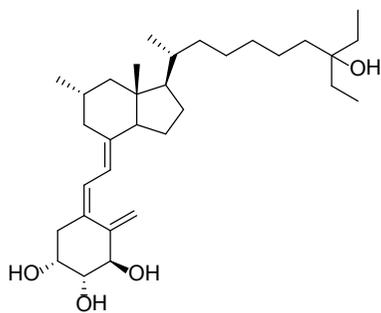
VD19 : ID<sub>50</sub> 40 nM <



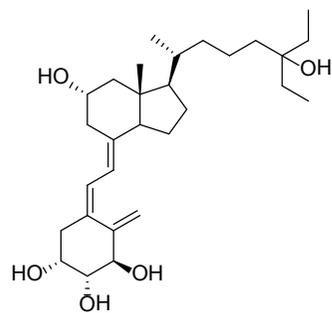
VD23 : ID<sub>50</sub> 40-20 nM

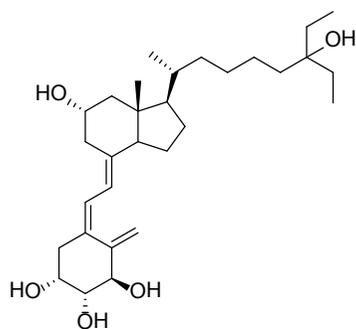
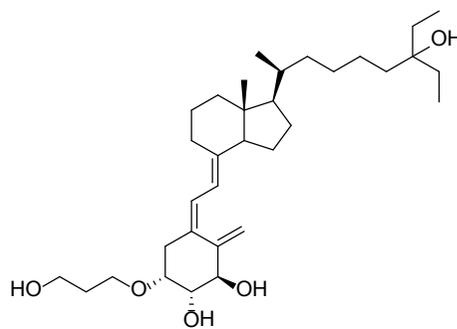
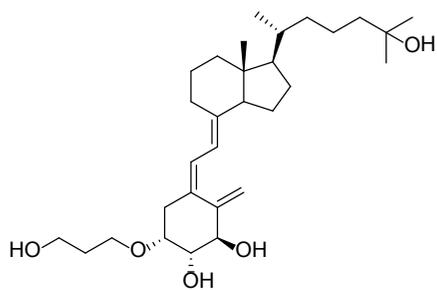
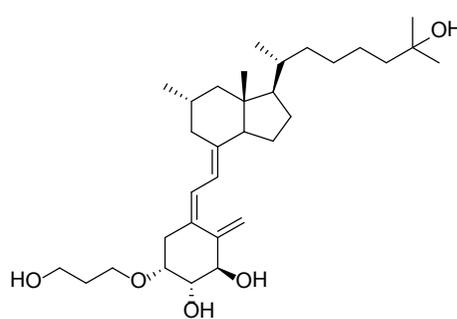
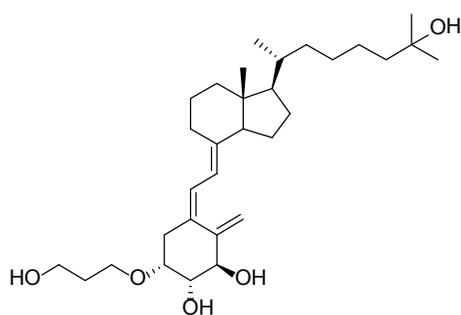
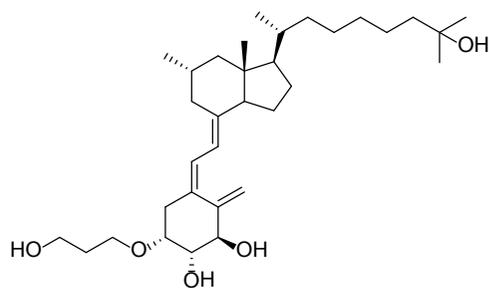
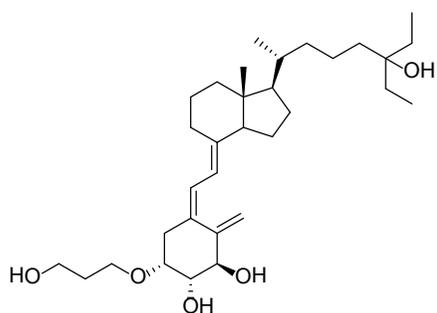
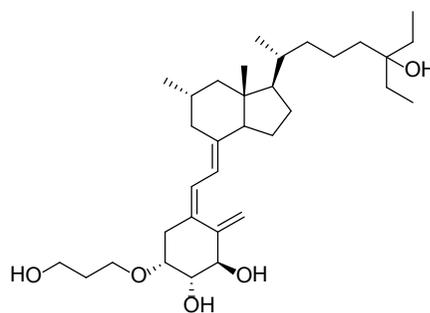


VD20 : ID<sub>50</sub> 20-10 nM

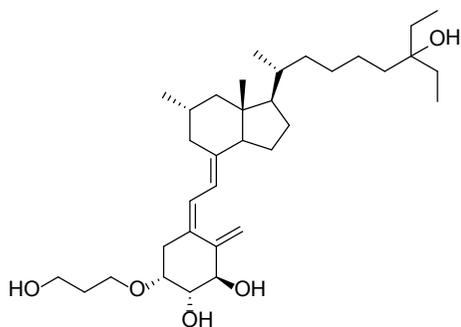


VD24 : ID<sub>50</sub> 40 nM <

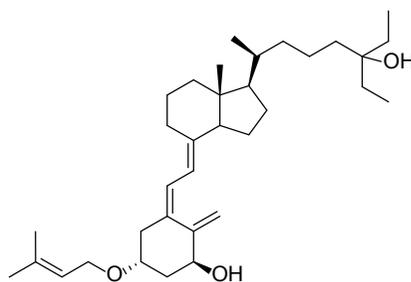


VD25 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD33 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD26 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD34 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD27 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD35 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD28 : ID<sub>50</sub> 40 nM <VD36 : ID<sub>50</sub> 40 nM <

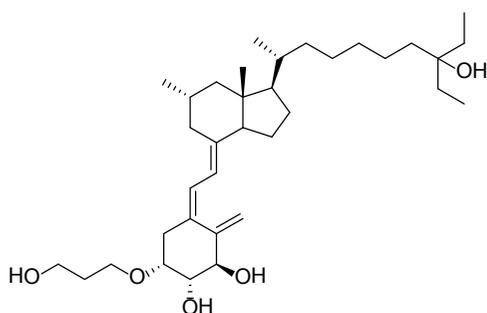
VD37: ID<sub>50</sub> 40 nM <



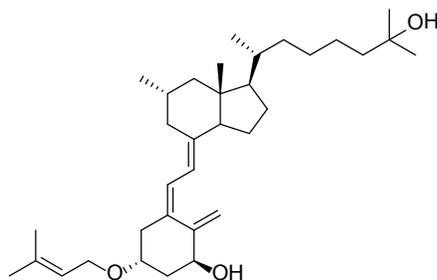
VD41: ID<sub>50</sub> 5-2.5 nM



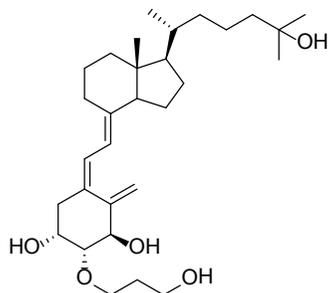
VD38: ID<sub>50</sub> 40 nM <



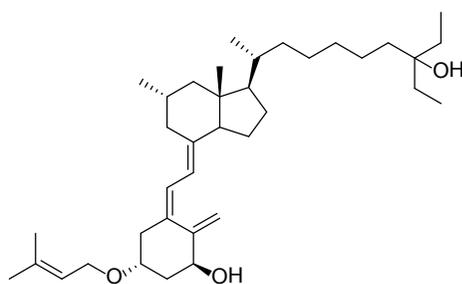
VD42: ID<sub>50</sub> 40 nM <



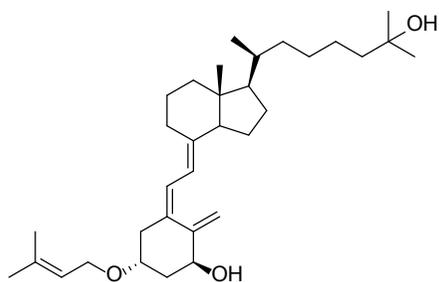
VD39: ED-71 ID<sub>50</sub> 40 nM <



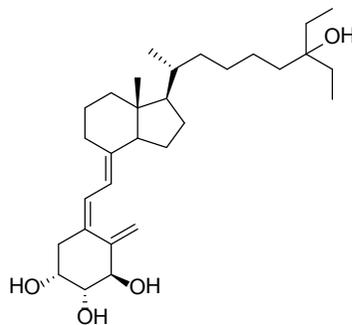
VD43: ID<sub>50</sub> 40 nM <

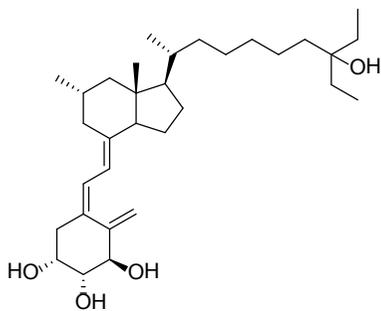
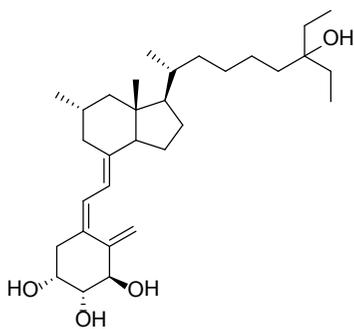


VD40: ID<sub>50</sub> 5-2.5 nM

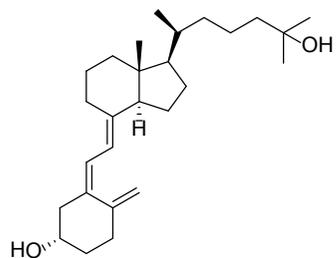
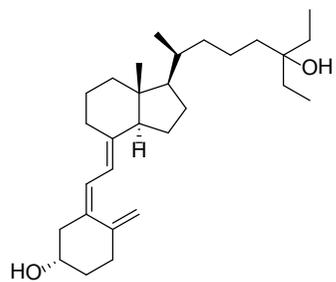


VD44: ID<sub>50</sub> 40 nM <



VD45: ID<sub>50</sub> 40 nM <VD46: ID<sub>50</sub> 40 nM <

付記 2

VD47: ID<sub>50</sub> 40 nM <VD48: ID<sub>50</sub> 2.5-1.25 nM

## 文 献

- 1) Jones G, Prosser DE. The activating enzymes of vitamin D metabolism(25-and 1 $\alpha$ -hydroxylases). In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. Vitamin D. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2011.p.23-42.
- 2) DeLuca HF. Evolution of our understanding of vitamin D. Nutr Rev. 2008; 66 Suppl 2: S73-87.
- 3) Beer TM, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. Mol Cancer Ther. 2004; 3: 373-81.
- 4) Trump DL, Muindi J, Fakih M, Yu WD, Johnson CS. Vitamin D compounds: clinical development as cancer therapy and prevention agents. Anticancer Res. 2006; 26: 2551-6.
- 5) Masuda S, Jones G. Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions. Mol Cancer Ther. 2006; 5:797-808.
- 6) Kubodera N, Takahashi F. Analogs for the treatment of Osteoporosis. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. Vitamin D. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2011. p.1489-96.
- 7) 久保寺登. 新規ビタミンD誘導体エルデカルシトールの探索・生理活性・薬物動態. Clinical Calcium. 2011; 21: 1637-44.
- 8) Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Suda T, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; 78: 4990-4.
- 9) Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Kuribayashi T, Konno K, Nishii Y, et al. 1  $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60). Biochem J. 1982; 204: 713-9.
- 10) Pike JW, Meyer MB, Lee SM. The vitamin D receptor: Biochemical, Molecular, Biological, and Genomic era investigations. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. Vitamin D. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2011. p.97-135.
- 11) Bikle DD. Clinical counterpoint: vitamin D: new actions, new analogs, new therapeutic potential. Endocr Rev. 1992; 13: 765-84.
- 12) Verlinden L, Eelen G, Bouillon R, Vandewalle M, Clercq PD, Verstuyf A. Analogs of Calcitriol. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. Vitamin D. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2011.p.1461-87.
- 13) Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nat Rev Cancer. 2007; 7: 684-700.
- 14) 久保寺登. 活性型ビタミンD誘導体の創薬研究と実用的合成法. 有機合成化学協会誌. 2010; 68: 904-10.
- 15) Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D analogs: therapeutic applications and mechanisms for selectivity. Mol Aspects Med. 2008; 29: 433-52.
- 16) Mäenpää PH, Väisänen S, Jääskeläinen T, Ryhänen S, Rouvinen J, Mahonen A, et al. Vitamin D<sub>3</sub> analogs (MC 1288, KH 1060, EB 1089, GS 1558, and CB 1093): studies on their mechanism of action. Steroids. 2001; 66: 223-5.
- 17) 中川公恵. ビタミンD作用の分離を目指した誘導体の開発. 生化学. 2003;75:1233-8.
- 18) Bridges JA. Efficient process for preparing steroids and vitamin D derivatives with the unnatural configuration at c20 (20  $\alpha$ -methyl) from pregnenolone. United States patent application US 20080171728. 2008 Jul 17.
- 19) Sicinska W, Rotkiewicz P. Structural changes of vitamin D receptor induced by 20- $\text{epi-1}\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ : an insight from a computational analysis. J Steroid Biochem Mol Biol. 2009; 113: 253-8.
- 20) 西井易穂. ビタミンD作用の多様性から医薬品化への道. ビタミン. 2000;74:239-53.
- 21) 中川公恵. ビタミンD受容体リガンド結合ドメインの分子認識を基盤としたがん細胞分化とアポトーシスの制御機構の解析. 薬学雑誌. 2002; 122: 781-91.
- 22) Deluca HF, Wicha J. Method of treating hypoparathyroidism with (20S)-vitamin D<sub>3</sub> compounds. United States patent US 5552392. 1996 Sep 3.
- 23) Yang W, Freedman LP. 20-Epi analogues of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> are highly potent inducers of DRIP coactivator complex binding to the vitamin D<sub>3</sub> receptor. J Biol Chem. 1994; 274: 16838-45.
- 24) Hansen C, Danielsson C, Calberg C. The potent anti-proliferative effect of 20- $\text{epi}$  analogs of 1,25  $\text{ihydroxyvitamin D}_3$  in human breast-cancer MCF-7 cells is related to promoter selectivity. Int J Cancer. 1996; 67: 739-42.
- 25) Muindi JR, Modzelewski RA, Peng Y, Trump DL, Johnson CS. Pharmacokinetics of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in normal mice after systemic exposure to effective and safe antitumor doses. Oncology. 2004;66:62-6.
- 26) Osborn JL, Schwartz GG, Smith DC, Bahnsen R, Day R, Trump DL. Phase II trial of oral 1,25-dihydroxyvitamin D (calcitriol) in hormone refractory prostate cancer. Urol Oncol. 1995;1:195-8.
- 27) Cusano NE, Thys-Jacobs S, Bilezikian JP. Hypercalcemia due to vitamin D toxicity. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. Vitamin D. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2011.p.1381-402.