

博士（薬学）（課程）2001年9月

ステロイド化合物の反応性と新規ステロイド誘導体の合成研究

戸張彰彦

動植物中に存在するステロイド化合物は、動物ではステロイドホルモンとして副腎皮質ホルモン、性ホルモン等の様に重要な生理活性を担っている。植物からは、様々なステロイド骨格の特定の位置に糖が結合した、いわゆるステロイドサポニンとして多くの化合物が単離されそれらの薬理活性も調べられている。その一例として、生薬のチモ（ハナスゲの根茎）からはsarsasapogeninをアグリコンとする種々のサポニンが単離され、それらの構造について報告されている。それらのうちtimosaponin A- に血小板凝集抑制作用が認められている。

また、Timosaponine A- の様なスピロスタノール型ステロイドサポニンは、そのアグリコンのF環上の立体配座やヘテロ原子の違いによってもその薬効に違いが認められる。例えば、生薬の麦門冬から単離されたOphiopogonin DにはIgM抗体産生抑制作用が認められている。また、ナス科の葉に含まれるTomatineにはバクテリアや真菌の生長を阻害する作用が認められている。

人体では男性ホルモン、女性ホルモン（卵胞、黄体ホルモン）、蛋白同化ホルモン、副腎皮質ホルモン（糖質、鉱質コルチコイド）などの特有の生理活性を持ったステロイド類が知られている。その天然品及び半合成品などは医薬品として広く臨床の現場において使用されている。

本研究は、ステロイド化合物の反応性と新規ステロイド誘導体の合成という観点から、

1) スピロスタノールについては、スピロスタノールのF環の環開裂に続く閉環反応によって生成する新規スピロスタノールの構造解析を行い、反応メカニズムを明らかにすると共に、スピロスタノールのF環の酸素原子を他のヘテロ原子（S、Se、N）に置換したいわゆるヘテロスピロスタノールを合成し、それらのヒト血小板凝集抑制活性を比較した。

2) ステロイドホルモンは、強い薬理活性を持つ反面、副作用もまた強力である。そこでその副作用が軽減、および新規薬理活性の探索を目的にステロイド誘導体の合成を検討しているが、その一環として、ステロイドホルモンのグリコシル化を検討した。すなわち、これまでグリコシル化を受けないとされてきたステロイドホルモンのA環の α -不飽和ケトン及びジエノン構造上でグリコシル化が起こる事を見だし、それら生成物の構造解析を行うと共に新規薬理活性開発への糸口とした。

第一章：スピロスタノール類のF環の環開裂-閉環反応と配座解析

スピロスタノール類のF環に関しては、二つの異なった構造すなわちnormal型とiso型がある。両者の変化にはF環の開いたpseudo型を経るものと予想される。

Marker等およびWall等は、normal型のsarsasapogeninを2.0 M HCl-dioxane/H₂O（1：1）で還流して定量的にiso型のsmilageninを得たと報告している。しかしながら、当研究室で行った実験では、timosaponin A- を同条件で加水分解して得たアグリコンはsarsasapogeninのみであった。

著者はこの違いを明らかにする事およびiso型のスピロスタノールを得る目的で、pseudo体の閉環反応を種々の条件下で行い、強酸中では熱エネルギー的に最も安定なnormal型、21- CH_3 体のみを与えるが、酢酸の様な弱酸性条件下ではkinetic controlを受けてiso型が多く生成する事を見出した。また、normal型2種、iso型2種の構造解析は単結晶X線解析および $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを詳細に検討して行い、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおける20、26位のプロトンおよび18、19、21、27- CH_3 のケミカルシフトからFig. 5に示すA~DのF環の立体配座および21- CH_3 の立体配置を予測する事を見出した。

第二章：F環上の酸素原子を他のヘテロ原子に置換したヘテロスピロスタノールの合成

Timosaponin A- のF環の酸素原子を硫黄 (S) およびセレン (Se) に置換したヘテロスピロスタノールの合成はtimosaponin A- から数段階の合成過程を経て得る事が出来た。

また、F環上の酸素原子を窒素 (N) に置換したスピロスタノールはsarsasapogeninのF環上の酸素原子を窒素原子で置換した化合物をグリコシル化する事によって得る事が出来た。

第三章：ヘテロスピロスタノールグリコシドの抗血小板凝集活性の仕較

Timosaponin A- および第一、二章で得られた化合物におけるadenosin-5'-diphosphate (ADP) 又はristocetine sulfite (ristocetine) で惹起されるヒト血小板凝集作用に対する阻害活性を比較した。

Timosaponin A- は、Niwa等によってADP誘発のヒト血小板凝集において、濃度依存的に阻害活性を示す事がすでに報告されている。著者の実験においても、Timosaponin A- を50、100、200及び40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で用いた場合、それぞれ0.25、4、79.8及び100%の阻害活性を示した。

第一章で得られた化合物では、ristocetineで誘起される凝集反応の阻害活性は、F環の開裂したブソイド体およびF環の最も開裂しやすい化合物に100%の活性があり、やや開裂しやすい化合物では約30%、最も安定で開裂しにくいtimosaponin A- にほとんど活性が認められなかった。

さらに、第二章で合成したF環の酸素原子を硫黄、セレンおよび窒素で置換した新規ヘテロスピロスタノールサポニンのADPおよびristocetineで誘起される血小板の凝集阻止活性を比較した。

ADPで誘起される血小板の凝集反応に対しては、これら全てはtimosaponin A- と同様高い阻止活性を示している。一方、ristocetin誘発の血小板凝集作用に対して、timosaponin A- では阻害活性はなかったが、そのF環の酸素原子がイオウ原子 (S)、セレン原子 (Se) 及び窒素原子 (N) に置換した化合物では、それぞれ100、65及び40%の阻害活性を示した。

第四章：ステロイドホルモンの Δ^4 -不飽和ケトン及びジエノン構造上でのグリコシル化反応

グリコシル化反応は、通常分子中の遊離の水酸基 (-OH) やカルボキシル基 (-COOH) が存在しない場合、グリコシル化反応は進行しないと考えられていた。

しかし、齋藤等はmethyl-3-O-acetyl-glycyrrhetinateを用いたグリコシル化反応においてC環の Δ^4 -不飽和ケトン上で反応が進行しdienol glycosideを得た事を報告した。本章では、A環に Δ^4 -不

飽和ケトンを持つtestosteroneやandrosteneさらにA環にジエノン構造を持つ化合物などにおいて、触媒としてSilver trifluoromethane sulforate (AgOTf)またはHg(CN)₂を用いて同様な反応が進行するか否かを検討した。

ステロイドホルモンのA環上の α , β -不飽和ケトンにおけるグリコシル化反応では触媒にAgOTfを使用した場合6-oxo及び7-bromo-6-oxo体を与えるのみであった。また、Hg(CN)₂-HgBr₂を触媒として用いた場合には、グリコシル化反応が進行するもの同時にシアノ化反応も進行し、シアノグリコシドを与えた。

また、A環にジエノン構造を持つステロイドホルモンのAgOTfを触媒としたグリコシル化反応ではジエノンフェノール転移生成物を与え、グリコシル化も進行していた。また、触媒をHg(CN)₂-HgBr₂とした場合には、上記と同様なフェノールグリコシドの他にシアノグリコシドも同時に与えた。

さらに、第四章で得られた化合物について、以下の新規の薬理活性についての知見を得た。

1. Epidermal growth factor (EGF) 存在下におけるhepatocyte cell増殖阻害活性。
2. 人骨芽細胞株Saos-2細胞におけるOCIF遺伝子発現に対する影響。

まとめ

1. スピロスタノールサポニンのF環の環開裂に続く閉環反応を緩和な酸性条件で行う事で、F環の立体配座およびE環上の21-CH₃基の配位の異なるスピロスタノールの合成法を確立した。同時に、今回明らかにした¹H-NMRスペクトルの結果は、今後天然から新規に単離し得るスピロスタノールのF環の配座および21-CH₃, 27-CH₃基の配座解析に大いに役立つ事を示した。
2. スピロスタノールのF環の立位配座とE環上の21-CH₃基の配位の違いによってADPおよびristocetine誘発のヒト血小板凝集抑制活性に大きな差がある事を見出した。また、F環上のヘテロ原子をS, SeおよびNに置換したヘテロスピロスタノールにも強いヒト血小板凝集抑制活性を認めた。
3. ステロイドホルモンのA環の α , β -不飽和ケトンは触媒としてHg(CN)₂を用いる事によりシアノグリコシドを生成する事、またジエノン構造を持つステロイド化合物では触媒としてAgOTfを用いた場合には、ジエノンフェノール転移をしたグリコシドを与え、Hg(CN)₂を用いた場合にはジエノンフェノール転移をしたグリコシドと共にシアノグリコシドを与える事を明らかにした。
4. ステロイドホルモンのグリコシル化体の新規薬理活性についての知見が得られた。