

氏 名(本籍) 石 塚 誠 一

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 5 5 6 号

学位授与年月日 平 成 8 年 7 月 18 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 Isolation and identification of the novel vitamin D<sub>3</sub> metabolites and physiological functions of (23S, 25R)-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26, 23-lactone  
(新規ビタミンD<sub>3</sub>代謝物の単離同定と(23S, 25R)-1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26, 23-lactoneの生理作用に関する研究)

論文審査委員(主査) 教授 水 野 重 樹

教授 古 川 勇 次

教授 折 谷 隆 之

# 論文内容要旨

## 第 I 章 序 論

ビタミンDは、抗クル病因子として1919年-1922年に、Mellanbyら および McCollumらによって発見され、その因子の構造は、1932年にビタミンD<sub>2</sub>が、1936年にビタミンD<sub>3</sub>が Windausらによって決定された。ビタミンDは、カルシウムおよびリンの代謝調節や恒常性の維持に必要で、骨代謝調節に関わるビタミンであり、ビタミンD<sub>2</sub>とビタミンD<sub>3</sub>は、ほぼ同等の生理作用を発現する。ビタミンDは動物に投与してもその生理作用を発現するのに24時間のtime lagがあることより、生体内で活性化されて初めて作用発現されている可能性が示唆されていた。1968年になって、Bluntらによって初めて25-OH-D<sub>3</sub>が単離同定され、更に1971年にLawsonら、Myrtleら および Holickらによって最終活性代謝物として1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が単離同定された。食物由来および皮膚で生成したビタミンD<sub>3</sub>は、まず肝臓で25位が水酸化され、次に腎臓で1 $\alpha$ 位が水酸化されて1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>となる。1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は、特異的リセプターと結合してその生理作用を発現することよりビタミンではなくホルモンと考えられている。近年ビタミンD<sub>3</sub>の新しい作用として細胞増殖抑制作用、細胞分化誘導作用、インシュリン分泌促進作用および免疫調節作用が見い出されたが、これら全ての生理作用を1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が司っているのか、他のビタミンD<sub>3</sub>代謝物が寄与しているのかは不明である。

そこで、私は、生体内に存在するビタミンD<sub>3</sub>代謝物の単離同定を行ない、14種の新規ビタミンD<sub>3</sub>代謝物を単離同定した。その中で(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、カルシウム代謝において、1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に拮抗した作用（アンチビタミンD作用）を示し、更に、骨吸収抑制作用と骨形成促進作用の両活性を有する特異な新規代謝物である。この論文では、新規ビタミンD<sub>3</sub>代謝物の単離同定とそれら代謝物の生物活性および生理的意義について述べる。

## 第 II 章 25-OH-D<sub>3</sub>の代謝

ビタミンD<sub>3</sub>は、まず肝臓でその25位が水酸化された25-OH-D<sub>3</sub>となり、次いで腎臓で1 $\alpha$ 位、23位、24位、および26位が水酸化された種々の代謝物が生成される。1 $\alpha$ 位が水酸化された1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は、25-OH-D<sub>3</sub>の活性代謝物であるが、その他の代謝物の生理活性は不明であった。私は、ビタミンD<sub>3</sub>を大

量に投与したラット血清中からFig.1 に示した方法で種々の代謝物を分離精製した。構造決定は、紫外線吸収スペクトル (UVスペクトル)、赤外線吸収スペクトル (IRスペクトル)、マススペクトル、化学修飾および合成化合物との co-chromatography によって行なった。その結果、新規代謝物として 24S,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25R,26-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 23S,25R,26-(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone および (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-peroxylactone を単離同定した (Fig. 2)。

特に、(23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-peroxylactone の構造は、IRスペクトルが 1733 cm<sup>-1</sup> を示し δラクトン様構造を示すこと、FD-マススペクトルが 444 であることより分子量が 444 であること、また triphenylphosphine との反応で (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone と triphenylphosphine oxide を生成することで決定された。単離した (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-peroxylactone は、-20°C 以上で速やかに (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone に変換した。また (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone は、腎臓で 25-OH-D<sub>3</sub> から産生されることが明らかになったので、腎臓の酵素と種々の 25-OH-D<sub>3</sub> 代謝物との反応速度論からその代謝経路を決定した (Table 1)。即ち、25-OH-D<sub>3</sub> は、まず

Table 1

Production of (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone from various 25-OH-D<sub>3</sub> metabolites.

Substrates	(23S,25R)-25-OH-D <sub>3</sub> -26,23-lactone ng/4.8 g kidney/hr.
25-OH-D <sub>3</sub>	120
23S,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	260
25R,26-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	180
23S,25R,26-(OH) <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	4200
(23S,25R)-25-OH-D <sub>3</sub> -26,23-lactol	5600

A 10 % kidney homogenate from 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-supplemented chicks was incubated with 8 $\mu$ g of 25-OH-D<sub>3</sub>, 23S,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25R,26-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 23S,25R,26-(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub> or (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactol. (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone produced in vitro was isolated and purified by HPLC using 2 solvent systems. The amounts of (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone were quantitated by comparison with a standard curve made with authentic (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone.

23S,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> または 25R,26-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> に代謝され、これらが 23S,25R,26-(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub> に代謝され更に (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactol を経て (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone が生成されることが明らかになった。しかし、生体内では、(23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-peroxylactone が生成され、その後、これが分解し (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactone が生成されることより、25-OH-D<sub>3</sub> から

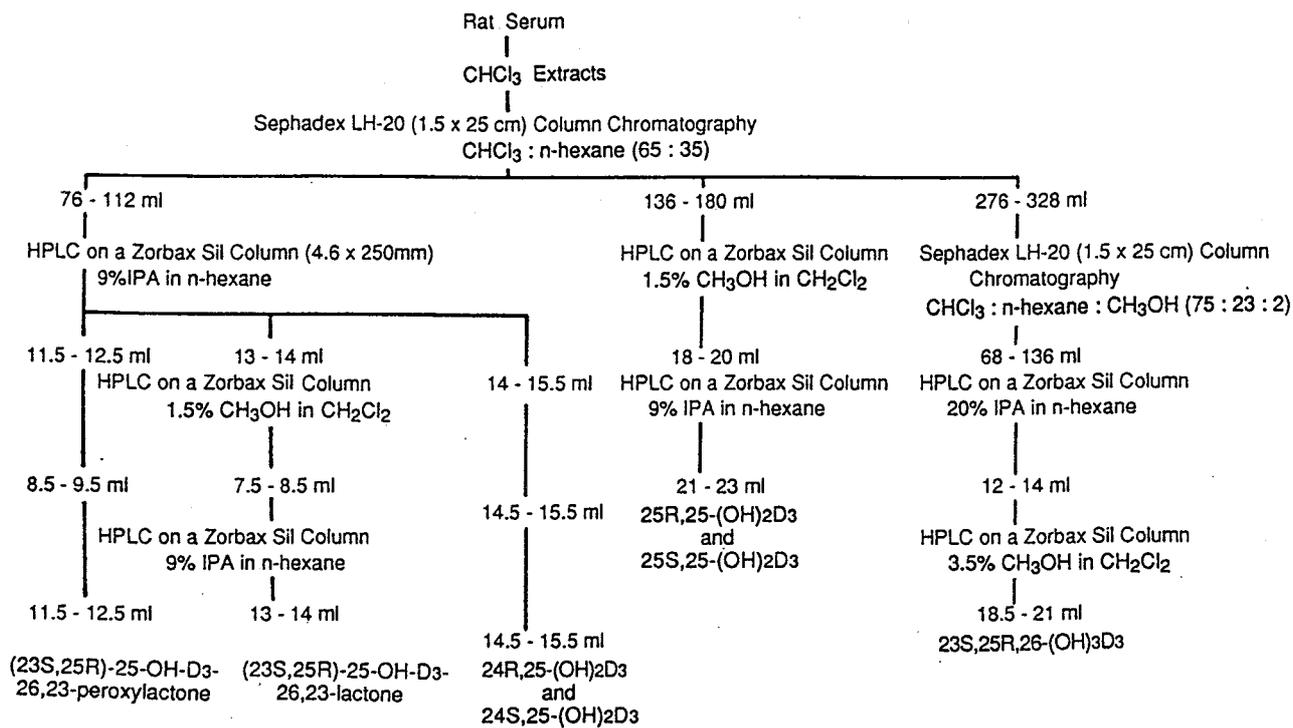


Figure 1. Flow sheet of the isolation of the vitamin D<sub>3</sub> metabolites from the serum of rats given large doses of vitamin D<sub>3</sub>.

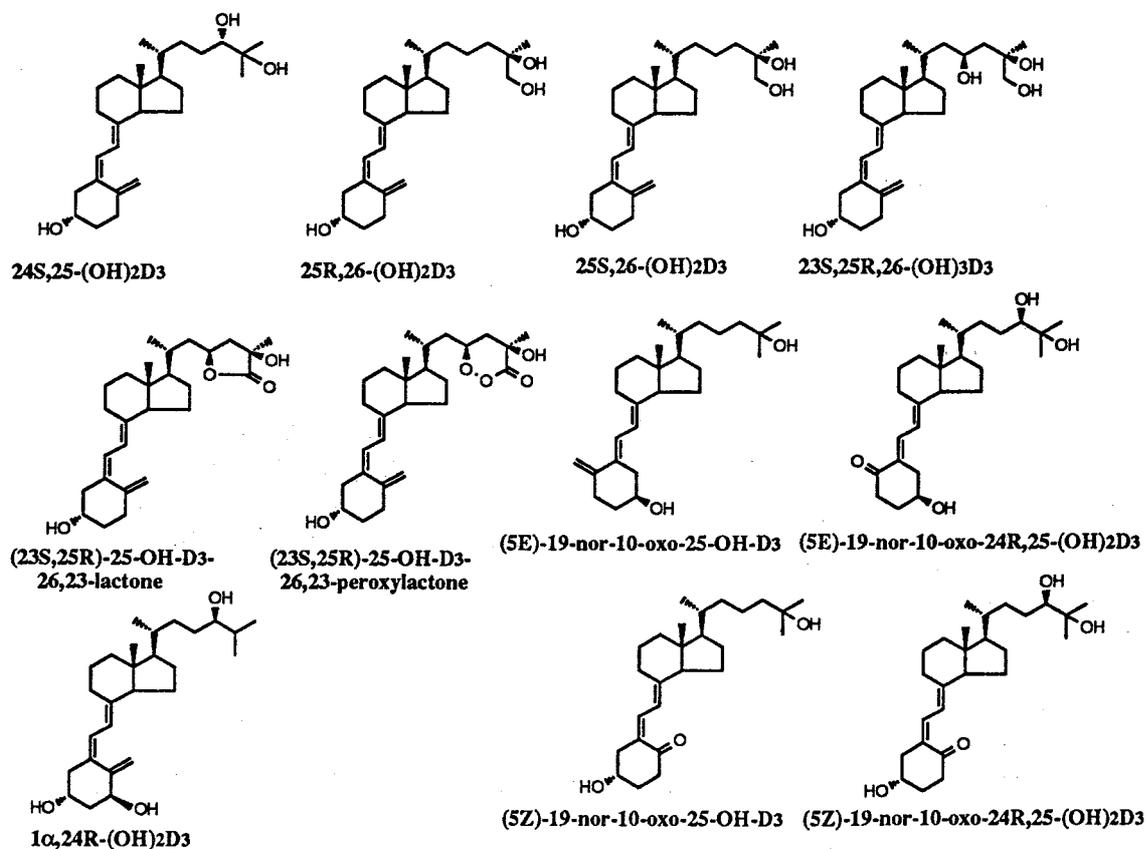


Figure 2. Structures of the newly isolated 25-OH-D<sub>3</sub> metabolites.

(23S,25R)-25-OH-D3-26,23-lactoneへの代謝経路は、Fig. 3の様に要約出来る。

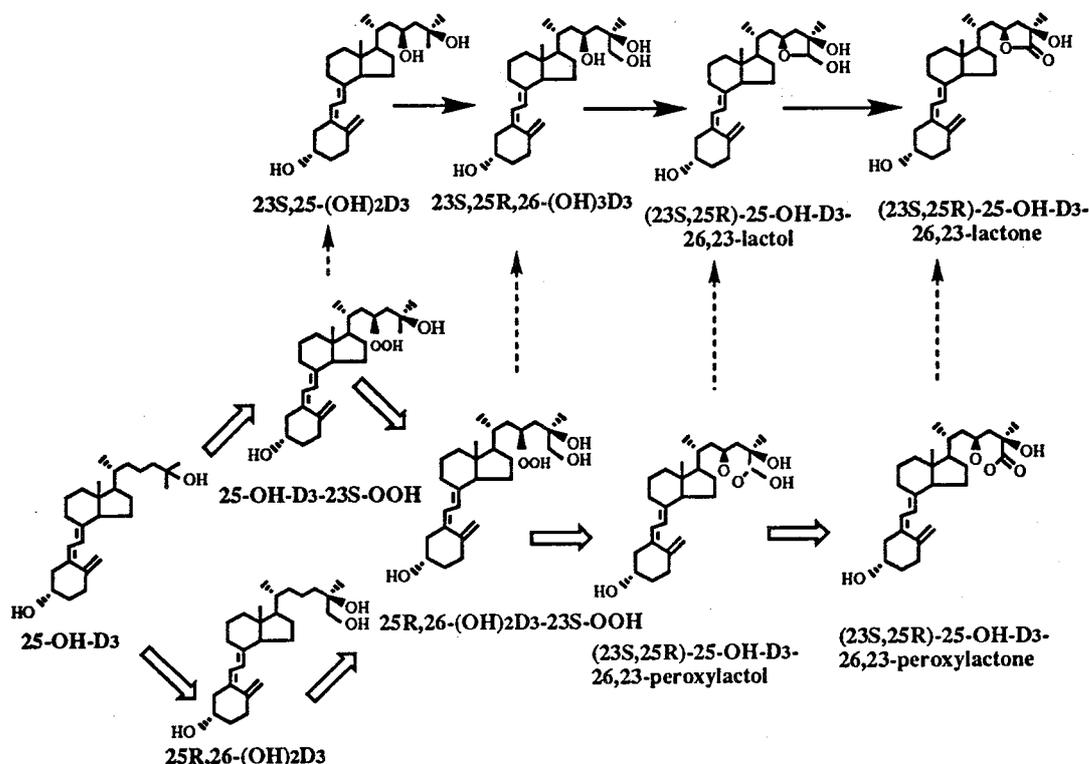


Figure 3. Proposed metabolic pathways from 25-OH-D3 to (23S,25R)-25-OH-D3-26,23-peroxylactone.

また、ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60 cell) およびリンパ球は25-OH-D3および24R,25-(OH)2D3をそれぞれ (5Z)- および (5E)-19-nor-10-oxo-25-OH-D3, (5Z)- および (5E)-19-nor-10-oxo-24R,25-(OH)2D3に代謝することを明らかにした。Fig.2には、私が単離同定した新規25-OH-D3代謝物の構造を示した。更に、私が単離同定した25-OH-D3代謝物 ( □ で囲んで示した) を含めたビタミンD3代謝経路をFig.4に示した。

Table 2に新規25-OH-D3代謝物の生物活性を25-OH-D3の生物活性と比較して要約した。殆どの代謝物は、25-OH-D3よりも生物活性が低下したが、(5E)-19-nor-10-oxo-25-OH-D3 および (5E)-19-nor-10-oxo-24R,25-(OH)2D3のHL-60細胞の分化誘導活性は25-OH-D3よりも強かった。また、骨吸収を抑制する初めての代謝物として、(23S,25R)-25-OH-D3-26,23-lactone および (23S,25R)-25-OH-D3-26,23-peroxylactoneを見出した。

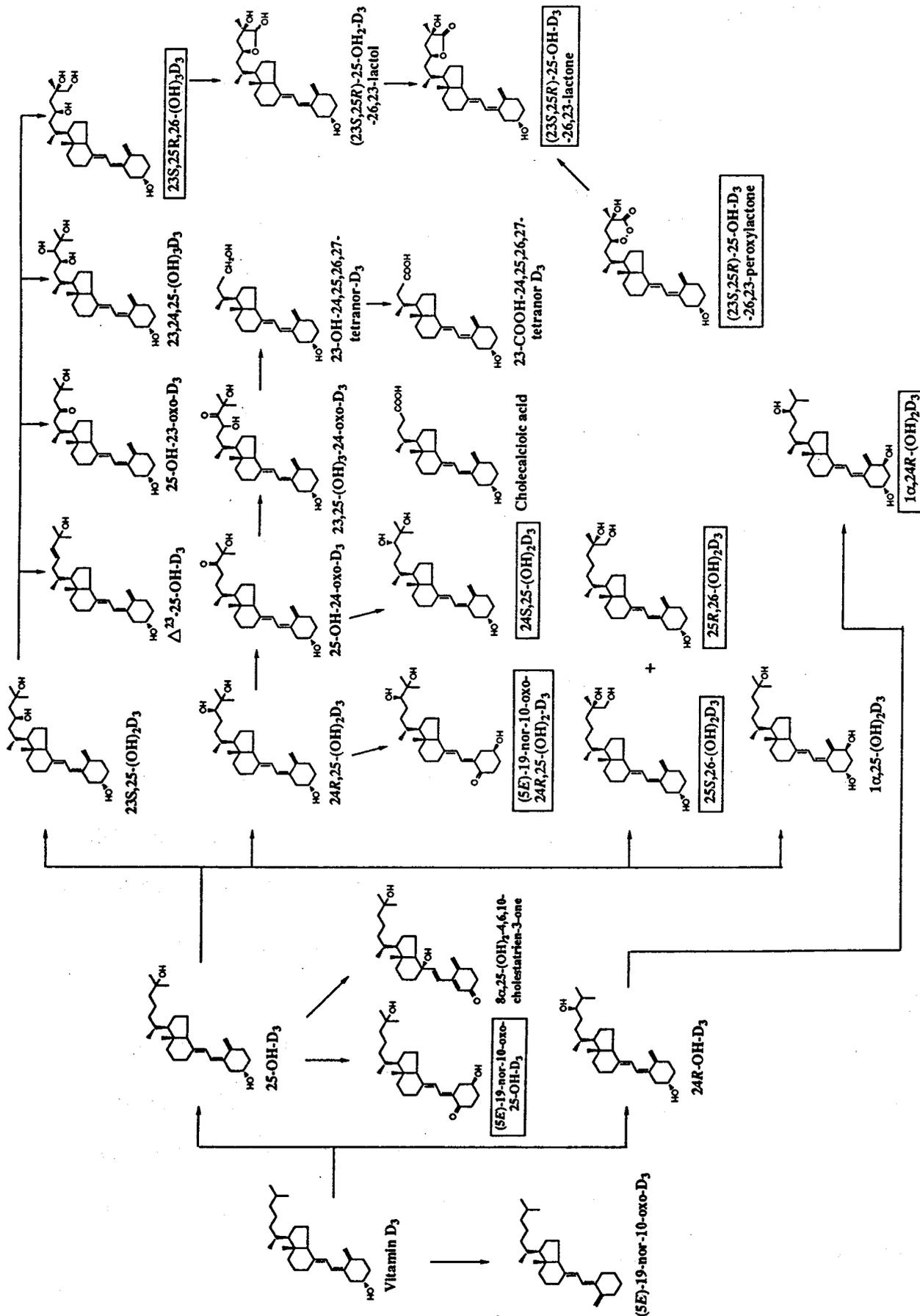


Figure 4. Metabolic pathways of vitamin D<sub>3</sub>.

Table 2

Biological activities of the newly isolated 25-OH-D<sub>3</sub> metabolites compared with those of 25-OH-D<sub>3</sub>.

Metabolites	Receptor Binding Affinity (%)	Intestinal Ca Absorption	Bone Resorption	HL-60 cell Differentiation
25-OH-D <sub>3</sub>	100	+++	+++	+
24S,25-(OH)2D <sub>3</sub>	1.7	+	+	-
25R,26-(OH)2D <sub>3</sub>	8.7	+++	++	+
23S,25R,26-(OH)3D <sub>3</sub>	0.1	+	-	-
(23S,25R)-25-OH-D <sub>3</sub> -26,23-lactone	24.6	+	Inhibit	-
(23S,25R)-25-OH-D <sub>3</sub> -26,23-peroxylactone	not determined	+	Inhibit	-
(5Z)-19-nor-10-oxo-25-OH-D <sub>3</sub>	92.8	-	-	+
(5E)-19-nor-10-oxo-25-OH-D <sub>3</sub>	129.7	-	-	+++
(5Z)-19-nor-10-oxo-24R,25-(OH)2D <sub>3</sub>	20.6	-	-	+
(5E)-19-nor-10-oxo-24R,25-(OH)2D <sub>3</sub>	28.0	-	-	++

### 第 III 章 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>の代謝

ビタミンD<sub>3</sub>の最終活性代謝物である1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>は、標的組織でその生理作用を発現した後、どの様に代謝されて行くかはあまり研究されていなかった。私は、1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>の代謝物を単離同定し、その生理活性を明らかにすることによって1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>の不活性化機構の解明を試みた。

1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>を150 $\mu$ g/kg体重で2回経口投与したビーグル犬より採血して得られた血清からFig.5の方法で種々の代謝物を分離精製した。構造決定は、UVスペクトル、IRスペクトル、マススペクトル、化学修飾および合成化合物とのco-chromatographyによって行なった。その結果、新規代謝物として、1 $\alpha$ ,25-(OH)2-24-oxo-D<sub>3</sub>、1 $\alpha$ ,24S,25-(OH)3D<sub>3</sub>、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>-26,23-lactol および(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2-D<sub>3</sub>-26,23-lactoneを単離同定した (Fig. 6)。また、これらの代謝物は小腸粘膜細胞および腎臓の酵素によって1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>から産生されることも明らかにした。1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>は、腎臓の酵素によって1 $\alpha$ ,24R,25-(OH)3D<sub>3</sub>に代謝されることが知られていたため、1 $\alpha$ ,24R,25-(OH)3D<sub>3</sub>と腎臓のホモジネートとをインキュベートすると、1 $\alpha$ ,25-(OH)2-24-oxo-D<sub>3</sub>が生

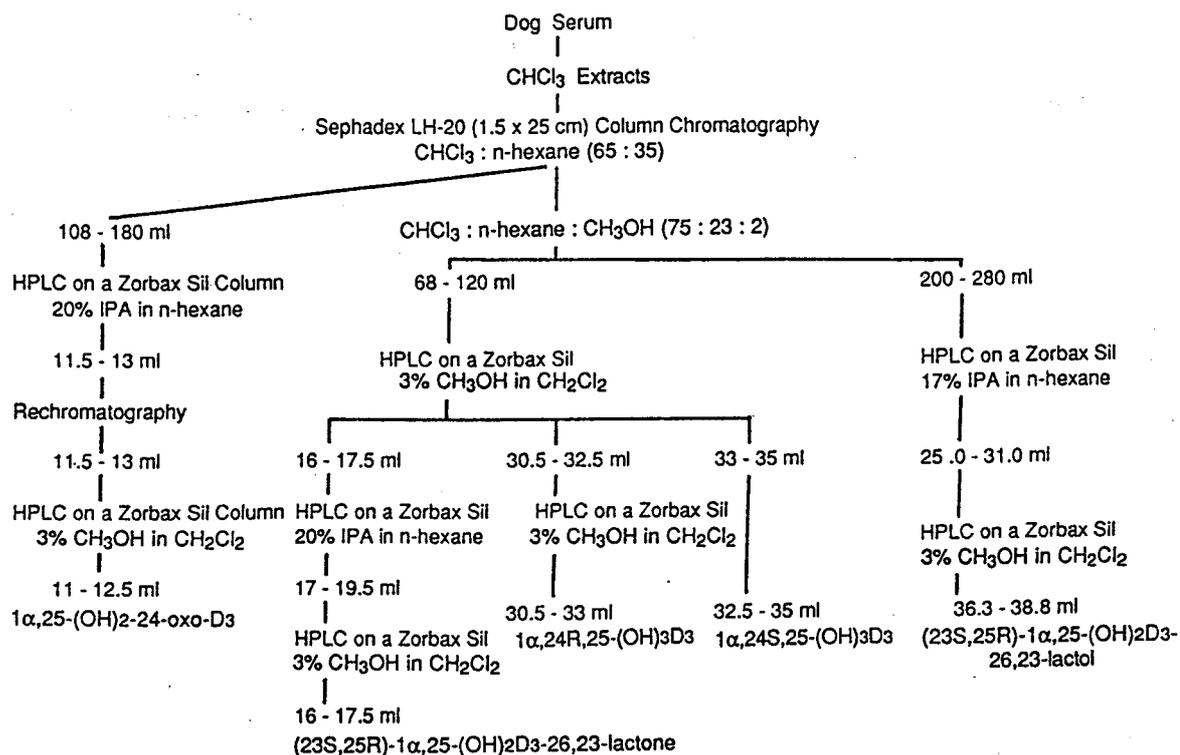


Figure 5. Flow sheet of the isolation of the 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> metabolites from the serum of beagle dogs given large doses of 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

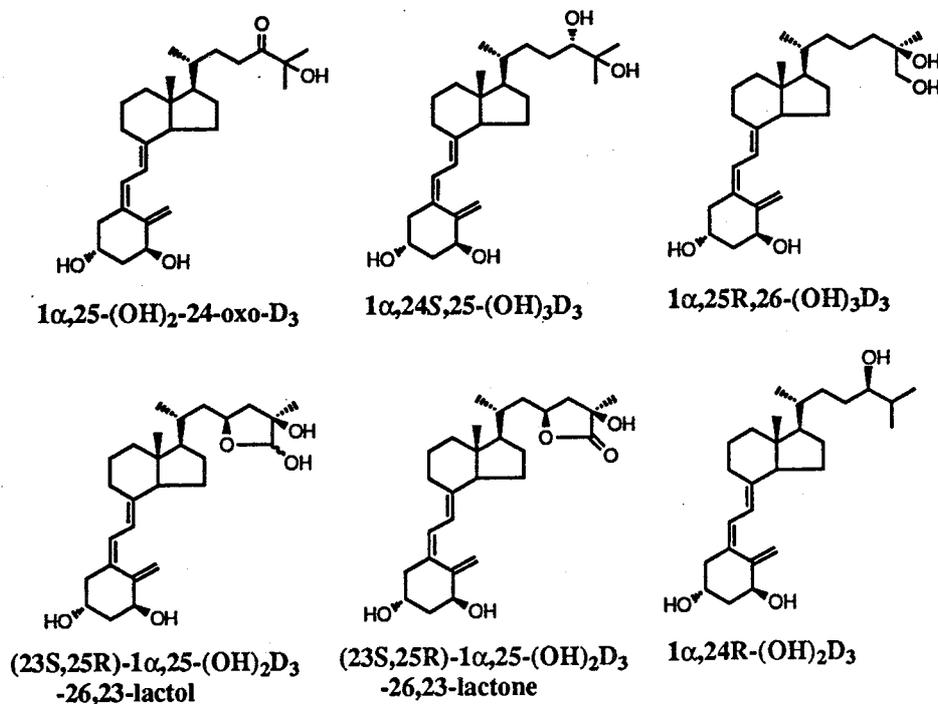


Figure 6. Structures of the newly isolated 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> metabolites.

成されること、更に、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-24-oxo-D}_3$ と腎臓のホモジネートとをインキュベートすると主として $1\alpha,24\text{S},25\text{-(OH)}_3\text{D}_3$ が、そして少量の $1\alpha,24\text{R},25\text{-(OH)}_3\text{D}_3$ が生成されることから、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は、Fig. 7に示した経路で代謝されることが明らかになった。これに対し、 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactol}$  および  $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ は、

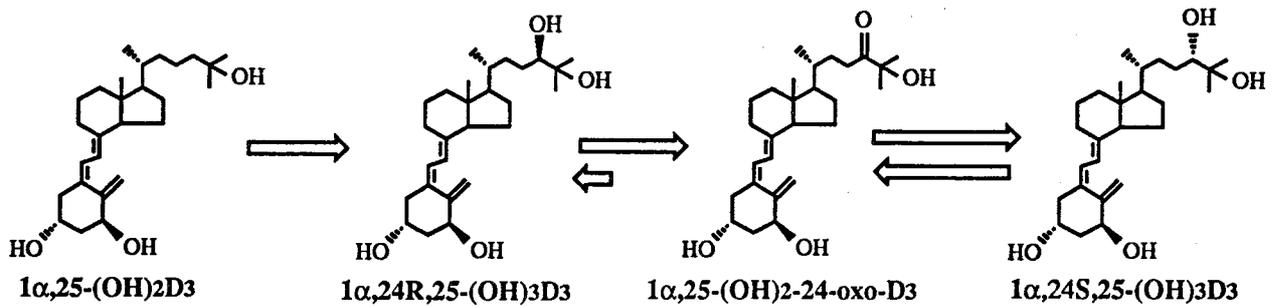


Figure 7. Proposed metabolic pathway from  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  to  $1\alpha,24\text{S},25\text{-(OH)}_3\text{D}_3$ .

$1\alpha,24\text{R},25\text{-(OH)}_3\text{D}_3$ への代謝経路とは別の代謝経路で産生された（詳細は第四章）。従って $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の不活性化に関して、 $1\alpha,24,25\text{-(OH)}_3\text{D}_3$ への代謝と、 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ への代謝の2つの代謝経路が存在することを明らかにした。また、生体内には $24\text{R-OH-D}_3$ が存在することが知られていたので、 $24\text{R-OH-D}_3$ をラットに静脈内投与し24時間後の血液中の代謝物を単離すると $1\alpha,24\text{R-(OH)}_2\text{D}_3$ が同定された。また、 $24\text{R-OH-D}_3$ と腎臓のホモジネートとをインキュベートすると $1\alpha,24\text{R-(OH)}_2\text{D}_3$ が生成された。以上、私が新しく単離同定した $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 代謝物の構造をFig. 6に示した。更に、今まで知られていた $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を起点とした代謝経路に、私が単離同定した $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の代謝物（□で囲んで示した）を加え、Fig. 8に示した。

$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の不活性化には5つの経路が存在することが明らかになった。最初は23位水酸化に始まる $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ への代謝による、2つ目は $1\alpha,24\text{R},25\text{-(OH)}_3\text{D}_3$ から $\text{calcitroic acid}$ への代謝による、3つ目は26位水酸化による、4つ目は25位水酸基の脱水反応による、5つ目は25位水酸基のグルクロン酸抱合によるビタミンD作用の減弱による不活性化がそれである。

Table 3に新規 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 代謝物の生物活性を $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ のそれと比較して要約した。



1 $\alpha$ ,25-(OH)2-24-oxo-D3の腸管カルシウム吸収活性および骨吸収活性は1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3の1/3-1/5であったが、HL-60細胞の分化誘導活性は1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3と同等であった。1 $\alpha$ ,24S,25-(OH)3D3および(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactolの活性は非常に弱いものであった。(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3特異的リセプターに対する結合親和性は、1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3の1/662であり腸管カルシウム吸収活性およびHL-60細胞の分化誘導活性も弱かった。骨吸収活性については、1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3が促進するのに対し、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneは抑制作用を示し、また、1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3によって促進された骨吸収活性をも抑制する特異な生物活性を示した。

24R-OH-D3の代謝物として単離した1 $\alpha$ ,24R-(OH)2D3は、1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3が示す全ての生理活性においてほぼ同等の作用を示した。

Table 3

Biological activities of the newly isolated 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3 metabolites compared with those of 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3.

Metabolites	Receptor Binding Affinity (%)	Intestinal Ca Absorption	Bone Resorption	HL-60 Cell Differentiation
1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3	100	+++	+++	+++
1 $\alpha$ ,25-(OH)2-24-oxo-D3	34.5	++	++	+++
1 $\alpha$ ,24R,25-(OH)3D3	20.8	++	++	++
1 $\alpha$ ,24S,25-(OH)3D3	2.7	+	+	++
(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactol	1.7	+	+	++
(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone	0.15	+	Inhibit	+
1 $\alpha$ ,24R-(OH)2D3	131.6	+++	+++	+++

#### 第 IV 章 (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの生合成経路

第III章で述べた様に、1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3を投与したビーグル犬の血清中から新規1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3代謝物として単離同定した1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneには、23位および25位に不斉炭素原子が存在することより4種類の立体異性体が存在する。そこで1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihydroxyergosterolを出発原料として17ステップの反応で1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの4種立体異性体を合成し核磁気共鳴スペクトル(NMRスペクトル)およびX線解析データよりその立体配位を決定した。合成した4種1 $\alpha$ ,25-(OH)2

D3-26,23-lactoneをZorbax Silカラムで溶出溶媒としてisopropanol:n-hexane(12:88)を用いて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析すると(23S,25S)-および(23R,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、同じ位置に溶出されるが、(23R,25S)-および(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneとは異なる位置に溶出され、3つのピークに分離された (Fig.9A)。そこでビーグル犬の血清中から単離した天然の1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneを同一条件で分析すると、合成(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneと同位置に溶出された (Fig.9B)。

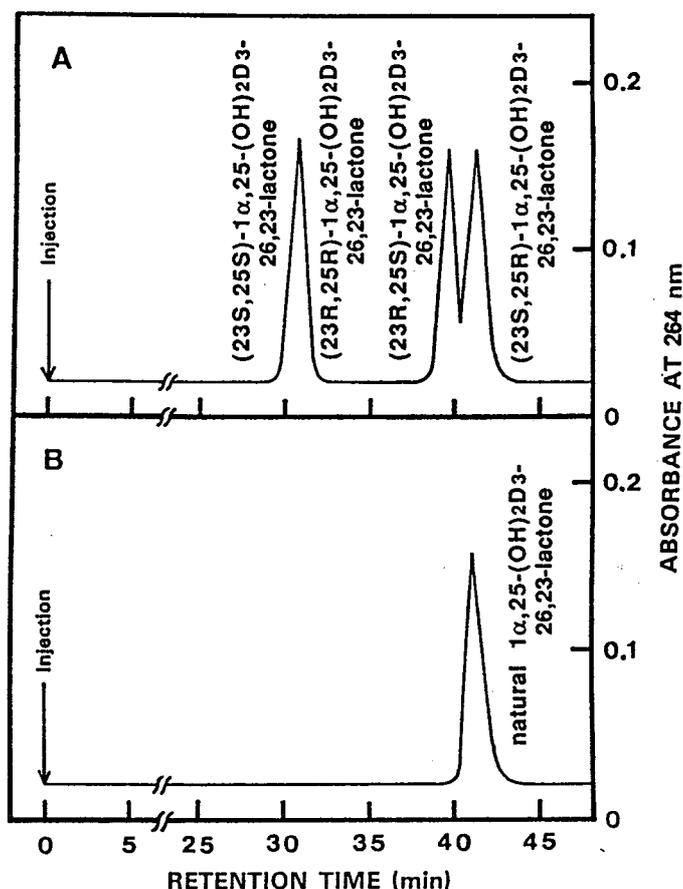


Figure 9. HPLC profiles of four diastereoisomers of synthetic 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone and natural 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone.

(A) Four diastereoisomers of synthetic 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone.

(B) Natural 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone from dog serum.

1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-Lactone was subjected to HPLC on a 4.6 x 250 mm Zorbax Sil column eluted with 12% isopropanol in n-hexane at 1 ml/min.

更に、1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>特異的リセプターは、ビタミンD構造を厳密に識別するリセプターであることが

知られている。そこで、合成4種1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneと天然1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-

lactoneのこのリセプターに対する結合親和性を調べたところ、1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneの4種立

体異性体は、この $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 特異的リセプターに対して非常に異なった結合親和性を有することが明らかになった(Table 4)。天然 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ は、合成 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ と全く同じ結合親和性を示した。以上の結果より、天然 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ は、 $(23\text{S})$ および $(25\text{R})$ 配位を有していると結論された。

**Table 4**

Ability of  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  and four diastereoisomers of  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  to competitively inhibit [ $^3\text{H}$ ] $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  binding to the chick intestinal cytosol  $3.7\text{S}$  receptor.

Vitamin D3 derivatives	50% Displacement (pg)	Molar ratio
$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	35.5	1
$(23\text{S},25\text{S})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$	440	12.4
$(23\text{R},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$	1,700	47.9
$(23\text{R},25\text{S})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$	15,100	425.4
$(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$	23,500	662.0
natural $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$	23,800	670.4

Molar ratio indicates the ratio of moles per liter of vitamin D3 analogue over the moles per liter of  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  required for 50% displacement of [ $^3\text{H}$ ] $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  from the receptor.

$(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ は、腎臓および小腸で生成されることが明らかにされたので、それらの臓器より調製した酵素を用い、中間体と考えられる種々の $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 代謝物とインキュベートすることにより生成される $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ 量を定量した (Table 5)。その結

**Table 5**

Production of  $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  from various vitamin D3 derivatives. Kidney homogenates or intestinal mucosa homogenates from  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -supplemented chicks were incubated separately with 6  $\mu\text{g}$  of various vitamin D3 derivatives. The  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  produced in vitro was isolated and purified by HPLC using two solvent systems. The amounts of  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  were quantitated by comparison with standard curves generated from authentic  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ .

Vitamin D3 derivatives	Production of $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$	
	Kidney	Intestine
	ng/3.0g tissue/30 min.	
$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	40	50
$1\alpha,23\text{S},25\text{-(OH)}_3\text{D}_3$	280	300
$1\alpha,25\text{R},26\text{-(OH)}_3\text{D}_3$	150	180
$1\alpha,23\text{S},25\text{R},26\text{-(OH)}_4\text{D}_3$	1,200	910
$(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactol}$	3,760	3,250

果、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ の生成量は、 $1\alpha,25\text{R},26\text{-(OH)}_3\text{D}_3$ 、 $1\alpha,23\text{S},25\text{-(OH)}_3\text{D}_3$ 、 $1\alpha,23\text{S},25\text{R},26\text{-(OH)}_4\text{D}_3$ 、 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactol}$ の順に増加することより、 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ は、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ よりFig.10に示す代謝経路で生成されることが明らかになった。

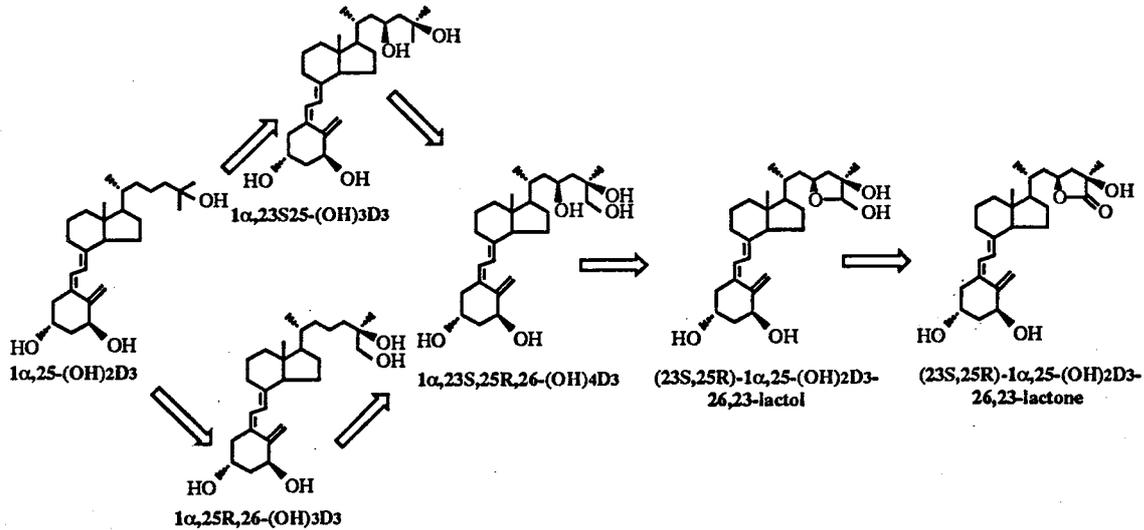


Figure 10. Proposed metabolic pathways from  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  to  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ .

ビーグル犬で $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ から $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ への代謝を調べるために、 $0.2\mu\text{g/kg}$ 体重で $[^3\text{H}]1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を経口投与したときの各代謝物の血中濃度変化をFig.11に示した。投与された $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は、速やかに吸収され投与1時間後に最高血中濃度を示し、その後

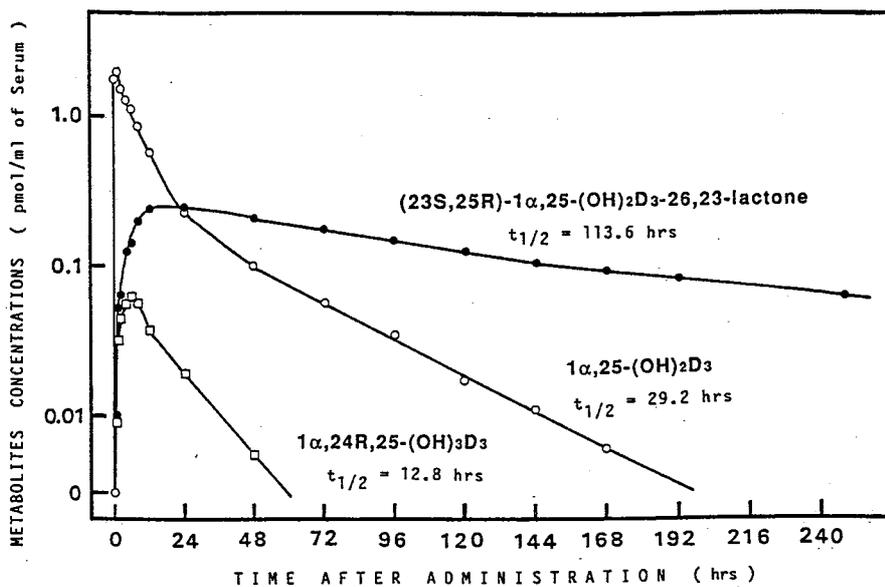


Figure 11. Time-course of change in serum concentrations of  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  metabolites after administration of  $0.2\mu\text{g/kg}$  of  $[^3\text{H}]1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  to beagle dog.

半減期29.2時間で血中から消失した。一方、吸収された $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、一部 $1\alpha,24\text{R},25-(\text{OH})_3\text{D}_3$ に代謝されるが、大部分は $(23\text{S},25\text{R})-1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3-26,23\text{-lactone}$ に代謝され、しかも生体内半減期113.6時間と非常にゆっくり消失した。生理的状态下の正常ビーグル犬の血清中にも $(23\text{S},25\text{R})-1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3-26,23\text{-lactone}$ は、100pg/ml存在し、 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 血清中濃度39pg/mlの約2.5倍存在することから $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ の主代謝物であることが示された。

## 第 V 章 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3-26,23\text{-lactone}$ の新規生物活性

ビタミンDの主要な生理活性は、小腸からのカルシウム吸収を促進することと、骨からのカルシウム溶出を促進する骨吸収促進作用である。そこで、私が単離した $(23\text{S},25\text{R})-1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3-26,23\text{-lactone}$ および合成4種 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3-26,23\text{-lactone}$ のカルシウム代謝活性をビタミンD欠乏ラットを用いて検討した。小腸からのカルシウム吸収作用について4種立体異性体の $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3-26,23\text{-lactone}$ は、生体内ホルモンである $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ と同様、投与後8時間で最大活性を発現し、以後速やかに活性が低下し、投与後48時間ではほぼコントロールレベルまで低下した (Fig.12)。活性の強さは、用

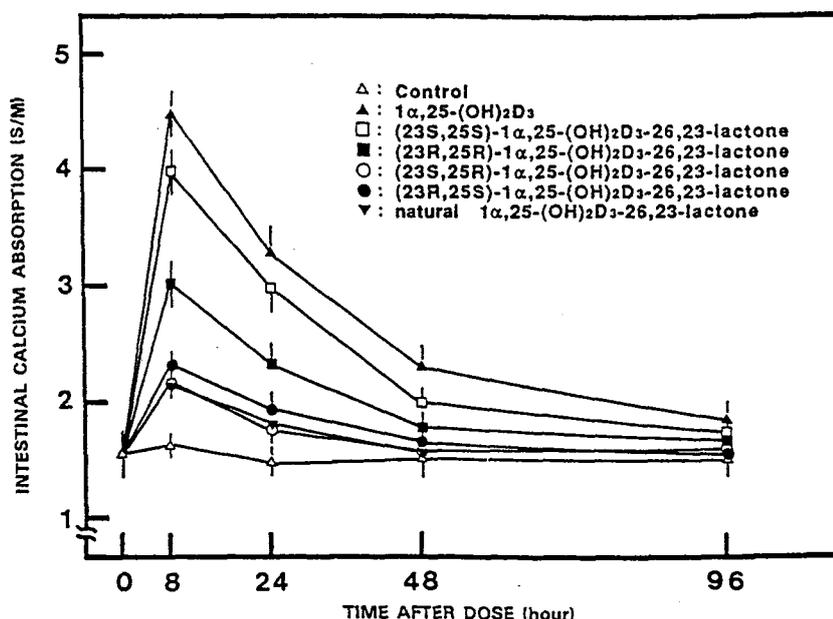


Figure 12. Time-course response of intestinal calcium transport system. Rats on a low calcium diet received a single intravenous dose of either 250 ng of  $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$  or four diastereoisomers of  $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3-26,23\text{-lactone}$ . At the indicated times, animals were decapitated and their duodena were used for the determination of intestinal calcium transport. The rate of intestinal calcium transport is represented by the ratio of  $^{45}\text{Ca}$  in the serosal medium to  $^{45}\text{Ca}$  in the mucosal medium. Each point is the mean  $\pm$  SEM of determinations from five rats.

量依存試験より、(23S,25S)-, (23R,25R)-, (23R,25S)-および(23S,25R)- $1\alpha,25-(OH)_2D_3-26,23$ -lactoneの順に減弱し、 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ に比較して、それぞれ1/4, 1/20, 1/53 および 1/74であった。

骨吸収活性は、血清中カルシウム濃度上昇作用で評価したが、(23S,25S)-および(23R,25R)- $1\alpha,25-(OH)_2D_3-26,23$ -lactoneは、 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ と同様投与後8時間で血清中カルシウム濃度が最大になり骨吸収促進作用を示すが、(23S,25R)- $1\alpha,25-(OH)_2D_3-26,23$ -lactoneは、投与後8時間で有意に血清中カルシウム濃度を低下させ、24時間後に最低濃度に達し、以後徐々に回復し96時間後にコントロールレベルまで回復した。(23R,25S)- $1\alpha,25-(OH)_2D_3-26,23$ -lactoneにも弱いながら血清中カルシウム濃度低下作用が認められた(Fig.13)。

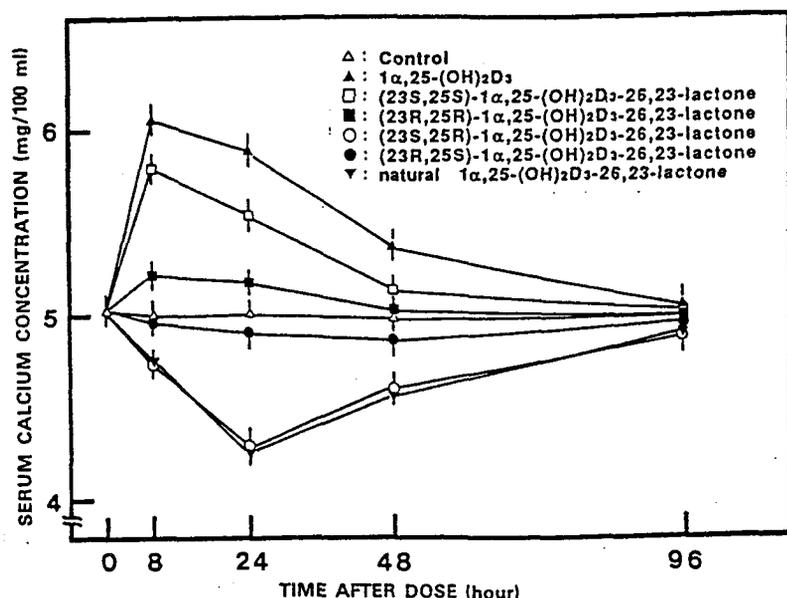


Figure 13. Time-course response of bone calcium mobilization induced in rats by 250 ng of  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  or four diastereoisomers of  $1\alpha,25-(OH)_2D_3-26,23$ -lactone. Rats on a low calcium diet received a single intravenous dose of compounds. At the indicated times, animals were decapitated, blood was collected, and calcium was measured in the serum by the OCPC method. Data are expressed as mg of Ca/100 ml of serum and are the mean  $\pm$  SEM of five determinations.

血清中カルシウム濃度低下作用を発現する機構には、3つの可能性がある。(1)骨吸収抑制作用(2)骨形成促進作用そして(3)腎臓からのカルシウム排泄促進作用である。骨に対する $1\alpha,25-(OH)_2D_3-26,23$ -lactoneの作用は、第V章および第VI章で詳細に述べるので、ここでは腎臓からのカルシウム排泄について検討した。(23S,25R)- $1\alpha,25-(OH)_2D_3-26,23$ -lactoneをビタミンD欠乏ラットに投与し、24時間までに尿中に排泄されたカルシウム量を定量すると、尿中カルシウム排泄量が増加し、血清中カルシウム濃度が低下していた(Table 6)。このことは、血清中カルシウム濃度低下については尿中へのカルシウム排泄促進が起因していることが明らかにされた。

Table 6

Increase in urinary calcium excretion by administration of (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone.

Compound	Serum Ca (mg/100 ml)	Urinary Ca excretion ( $\mu$ g)
Vehicle	4.90 $\pm$ 0.12	51.2 $\pm$ 3.6
(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -26,23-lactone	3.97 $\pm$ 0.07**	69.8 $\pm$ 4.8*

After 6 weeks on the vitamin D-deficient, low calcium diet, rats were divided into two groups of 5 animals; each rat received a single intravenous dose of 125 ng of (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone in 0.2 ml of 0.2% Triton X-100 solution. Control rats received only vehicle. Twenty-four hours later, the animals were killed and urine was collected from the urinary bladder. Data are expressed as mean + SEM.

Significantly different from control: \* P < 0.05 and \*\* P < 0.001.

1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は、小腸からのカルシウム吸収を促進させると同時に骨吸収促進作用によって、血清中カルシウム濃度上昇作用を示すが、1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のこのような作用に対して(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneがどのように作用するか検討した。ビタミンD欠乏ラットに125ngの(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneを投与し、更に、12時間後に125ngの1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を投与し、12時間後の小腸からのカルシウム吸収活性と血清中カルシウム濃度を測定した。結果はTable 7に示した様に(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による小腸からのカルシウム吸収活性には何の影響も及ぼさなかったが、1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による血清中カルシウム濃度上昇作用は抑制した。

Table 7

Effect of (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone on intestinal calcium transport and serum calcium concentration of vitamin D-deficient rats.

Compound given		Intestinal Ca transport	Serum Ca
First dose	Second dose	<sup>45</sup> Ca serosal/ <sup>45</sup> Ca mucosal	mg/100ml
Vehicle	Vehicle	1.66 $\pm$ 0.21	4.82 $\pm$ 0.09
1 $\alpha$ ,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -26,23-lactone	Vehicle	1.79 $\pm$ 0.13	4.12 $\pm$ 0.09**
Vehicle	1 $\alpha$ ,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	3.52 $\pm$ 0.14**	5.94 $\pm$ 0.12**
1 $\alpha$ ,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -26,23-lactone	1 $\alpha$ ,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	3.62 $\pm$ 0.16**	5.52 $\pm$ 0.12*

Rats fed a low calcium, vitamin D-deficient diet for 6 weeks divided into 4 groups of 5 rats. They received the first dose of 125 ng of (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone dissolved in 0.2% Triton X-100 solution or vehicle only. Twelve hours later, they received a second dose of 125 ng of 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> or vehicle only. Twelve hours after the second dose, the animals were killed and intestinal calcium transport activity and serum calcium concentration were measured. The data expressed as the mean + SEM. Significantly different from control: \* P < 0.01 and \*\* P < 0.001.

Fig. 10に示した1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>から(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneへの代謝過程で生

成される代謝物の中で $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ から $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactol}$ までは、全て弱いながらビタミンD様作用を示すが、 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ に代謝されて初めてアンチビタミンD様作用を発現した。従って、 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ は、生体内ホルモンである $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の作用を抑制する初めてのビタミンD3代謝物であることが明らかになった。

## 第 VI 章 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ の骨細胞に対する作用

第V章で述べた様に $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ は、骨形成促進作用または骨吸収抑制作用を発揮している可能性が示唆されたので、骨形成を司る骨芽細胞および骨吸収を司る破骨細胞に対する $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ の作用を検討した。

### 1. 骨芽細胞に対する作用

骨石灰化能を有するマウス骨芽細胞MC3T3-E1細胞を用いて、細胞分化とコラーゲン合成に対する $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ の作用を検討した。細胞分化の指標であるアルカリホスファターゼ (Al-P) 活性に対する $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ の活性をFig. 14に示した。この系で $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は、10pg/mlの濃度でAl-P活性を最大にするのに対し、 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ は、80pg/mlと10,000pg/mlの濃度でその活性を上昇させる二相性のピークを示した。 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ によるAl-P活性の上昇は、骨芽細胞内に存在する $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ リセプターを介して発現されることが知られている。骨芽細胞内に存在する $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ リセプターに対する $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ の結合親和性は、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の約1/805であった。従って、10,000pg/mlの $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ で上昇するAl-P活性は、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ リセプターを介して発現したと考えられる。しかし80pg/mlの濃度での作用の発現は $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ リセプターを介する作用とは考え難く、 $(23\text{S},25\text{R})\text{-}1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ に特異性のあるリセプターが存在する可能性がある。このことは骨芽細胞でAl-P活性を上昇させるインスリンまたはデキサメタゾン共存下でのAl-P活性に対する相加作用の相違およびステロイドホルモンリセプターのホルモン結合部位をふさぐL-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone(TPCK)でAl-P活性が完全に抑制されることから予測される。

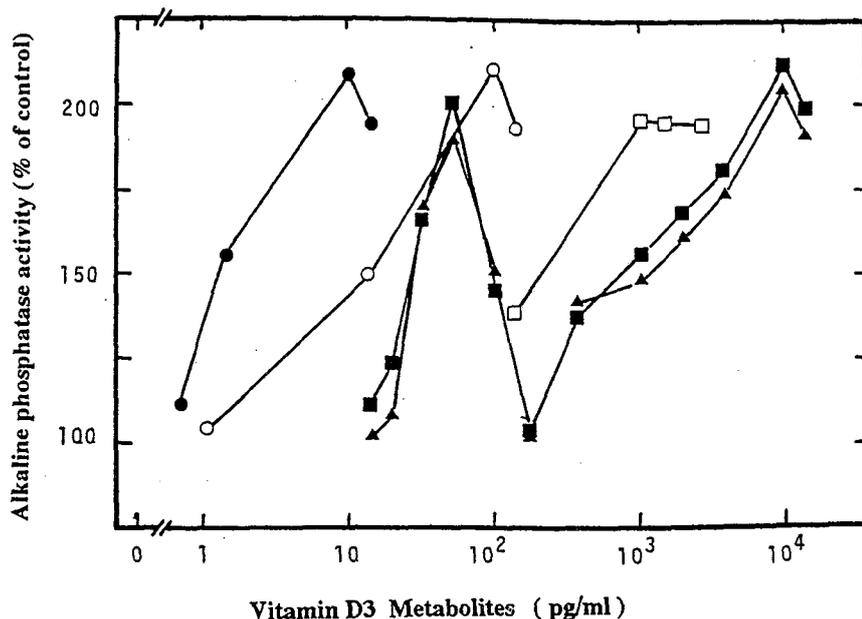


Figure 14. Effects of  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  and four diastereoisomers of  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23$ -lactone on alkaline phosphatase activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells. The cells ( $2.5 \times 10^4$ ) were plated in a 35 mm plastic dishes containing 2 ml of  $\alpha$ -MEM medium supplemented with 0.1% BSA. For experiments, the medium was supplemented with  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  or its metabolites in various concentrations. After 4 days of culture, alkaline phosphatase activity was assayed. Values are mean  $\pm$  SEM for four dishes.  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  (●); (23S,25S)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  (○); (23R,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  (□); (23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  (■) and (23R,25S)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  (▲).

(23R,25S)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ も、(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ と同様に Al-P 活性を上昇させる二相性のピークを示した。しかし(23S,25S)-および(23R,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ は、100pg/mlおよび1,000pg/mlの濃度で Al-P活性を最大にする単一ピークを与え、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ リセプターを介して作用発現していると考えられた。

コラーゲン合成に対する(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ の作用を検討した結果をTable 8に示した。コラーゲン合成に対し $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は全く作用しないが、(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -

Table 8

Effects of (23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  or  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  on collagen and non-collagen protein synthesis in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were treated for 24 hours and were labeled with 10  $\mu\text{Ci}$  of L-[3,4- $^3\text{H}$ ]proline for the last 3 hours. Values are mean  $\pm$  SEM for four dishes.

Treatment	Concentration (pg/ml)	Collagen (dpm $\times 10^{-3}$ /dish)	Non-collagen protein (dpm $\times 10^{-3}$ /dish)
Control		2.33 $\pm$ 0.05	6.00 $\pm$ 0.50
$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	10	2.33 $\pm$ 0.13	6.13 $\pm$ 0.53
(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$	80	4.05 $\pm$ 0.13*	8.15 $\pm$ 0.60
(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$	10000	2.15 $\pm$ 0.19	4.88 $\pm$ 0.18

\*, Significantly different from control ( $p < 0.01$ ).

26,23-lactoneは80pg/mlの濃度でのみコラーゲン合成を促進した。

またヒト骨芽細胞MG-63細胞においても、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneはAl-P活性を上昇させ、細胞分化を促進させると同時に、骨基質成分であるコラーゲン合成およびオステオカルシン合成を促進した。

## 2. 破骨細胞に対する作用

破骨細胞による骨吸収作用を評価する系として、<sup>45</sup>Caでプレラベルしたマウス頭頂骨から溶出される<sup>45</sup>Caの放射能を測定するRaiszの系がよく用いられている。この実験系で(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneの骨吸収作用についての結果をTable 9に示した。

(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは骨吸収抑制作用を示し、また、1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>および副甲状腺ホルモン(PTH)による骨吸収促進作用をも抑制した。また、ヒトの骨髄細胞から形成された破骨細胞およびヒトの骨から単離した破骨細胞を骨片上で培養しているなかに、10<sup>-7</sup>Mの(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneを加えると、カルシトニンと同様に添加後30分以内に細胞質の収縮が起こり、

Table 9  
Effect of (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone on <sup>45</sup>Ca release  
from prelabeled mouse calvaria in 96-hour cultures.

Treatment		No. of pairs	Inhibition Ratio
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> - 26,23-lactone (pg/ml)	1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (pg/ml)		
200	none	4	0.99 ± 0.08
2000	none	5	0.95 ± 0.09
20000	none	6	0.87 ± 0.06 <sup>b</sup>
none	20	8	1.22 ± 0.07 <sup>b</sup>
20	20	8	1.16 ± 0.06 <sup>a</sup>
200	20	7	1.02 ± 0.05
2000	20	8	0.97 ± 0.09
none	200	8	1.47 ± 0.12 <sup>b</sup>
200	200	11	1.31 ± 0.07 <sup>b</sup>
2000	200	8	0.99 ± 0.06
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> - 26,23-lactone (pg/ml)	PTH ( $\mu$ g/ml)		
none	0.32	11	1.52 ± 0.14 <sup>b</sup>
200	0.32	10	1.57 ± 0.09 <sup>b</sup>
2000	0.32	7	1.62 ± 0.18 <sup>b</sup>
20000	0.32	8	1.61 ± 0.16 <sup>b</sup>
none	0.032	18	1.28 ± 0.09 <sup>a</sup>
200	0.032	17	1.13 ± 0.04
2000	0.032	19	1.16 ± 0.04
20000	0.032	21	1.02 ± 0.05

Ratio significantly different from 1.0: a, P<0.05; b, p<0.01  
Significant difference between the control and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-  
26,23-lactone- added group; \*p<0.05 and \*\*P<0.01

破骨細胞の運動機能が低下した。これらの結果は、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneが直接破骨細胞に作用し、その機能を抑制することによって骨吸収を抑制していることを示している。

### 3. 破骨細胞形成系に対する作用

近年、破骨細胞は造血幹細胞中の顆粒球-マクロファージ系の細胞 (GM-CFU)から種々の因子の関与で形成されることが明らかにされてきた。久米川らによって開発されたマウス骨髄細胞および5-fluorouracil (5-FU) 処理マウスの脾臓由来の芽球細胞からの破骨細胞形成系に対する(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの作用を検討した。これらの系で1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3は破骨細胞前駆細胞中に存在する1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3リセプターを介して破骨細胞の形成を10<sup>-10</sup>M-10<sup>-7</sup>Mで濃度依存的に促進した (Fig. 15)。(23S,25S)- および (23R,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneも10<sup>-9</sup>M-10<sup>-7</sup>Mで濃度依存的に破骨細胞の形成を促進したが、(23S,25R)-および(23R,25S)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneは10<sup>-7</sup>M(44.4ng/ml)でも全く破骨細胞の形成は見られなかった (Fig. 15)。

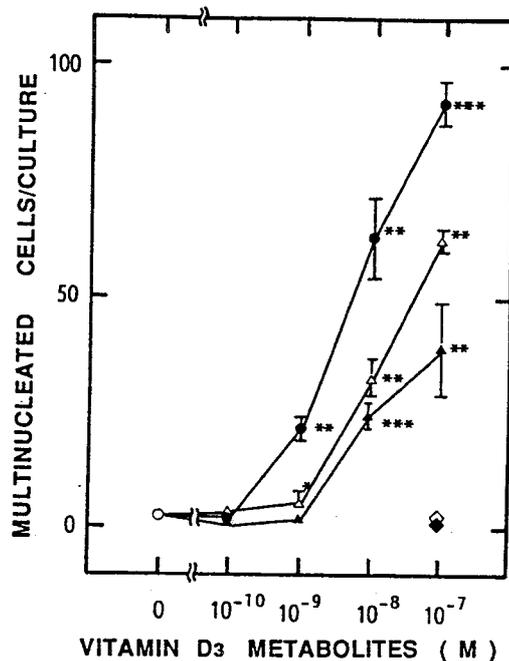


Figure 15. Dose response of multinucleated cell formation in cultures treated with various concentrations of 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3 or four diastereoisomers of 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone. Mouse bone marrow mononuclear cells were cultured (10<sup>6</sup> cells/ml; 1ml/culture) in  $\alpha$ -MEM medium containing 5% fetal bovine serum in the presence or absence of the various compounds, as indicated. The medium containing the hormones was changed every 3 days. After 8 days cells containing 3 or more nuclei per cell were counted at x 100 magnification as multinucleated cells (10 fields along the diameter of the culture plate). Control (O); 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3 (●); (23S,25S)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone ( $\Delta$ ); (23R,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone ( $\blacktriangle$ ); (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone ( $\diamond$ ) and (23R,25S)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone ( $\blacklozenge$ ). Results are presented as the mean  $\pm$  SEM for quadruplicate determinations in two independent determinations. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 (vs. control).

更に、 $10^{-8}$ Mおよび $10^{-7}$ Mの $1\alpha,25-(OH)2D3$ による破骨細胞の形成を $10^{-8}$ Mの(23S,25R)-および(23R,25S)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$ はほぼ完全に抑制したが、(23S,25S)-および(23R,25R)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$ に抑制作用は見られなかった(Fig. 16)。また、このような作用は、Fig. 10に示した $1\alpha,25-(OH)2D3$ から(23S,25R)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$ への代謝経路中の代謝産物には認められず、(23S,25R)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$ に代謝されて初めて破骨細胞形成抑制作用を発現した。

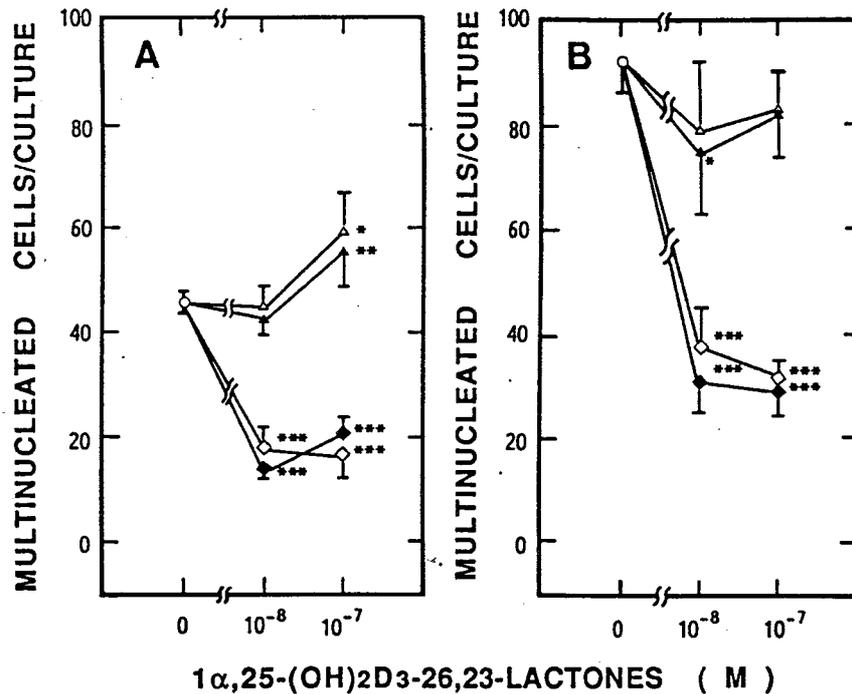


Figure 16. Effects of four diastereoisomers of  $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$  on multinucleated cell formation induced by  $1\alpha,25-(OH)2D3$  in mouse bone marrow cell cultures. Mouse bone marrow mononuclear cells were cultured with  $10^{-8}$  M (A) or  $10^{-7}$  M (B)  $1\alpha,25-(OH)2D3$  in the absence (○) or presence (Δ, ▲, ◇, and ◆) of  $10^{-8}$  M or  $10^{-7}$  M of each of the four diastereoisomers of  $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$  for 8 days. (23S,25S)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$  (Δ); (23R,25R)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$  (▲); (23S,25R)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$  (◇) and (23R,25S)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$  (◆). Results are presented as the mean  $\pm$  SEM for quadruplicate determination in two independent determinations. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (vs.  $1\alpha,25-(OH)2D3$  alone).

ヒト骨髄細胞中のGM-CFUからの破骨細胞形成系に対する(23S,25R)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$ の作用を調べた。 $10^{-8}$ Mの $1\alpha,25-(OH)2D3$ の存在下では、多数の核をもった破骨細胞様多核細胞が形成され、これに $10^{-10}$ M -  $10^{-7}$ Mの(23S,25R)- $1\alpha,25-(OH)2D3-26,23-lactone$ を加えると破骨細胞様多核細胞の形成が抑制された(Fig. 17)。更に、このように形成された破骨細胞様多核細胞の中で破骨細胞に対するモノクローナル抗体23C6と反応する細胞数をシャーレ全体で数えた。

(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneは、破骨細胞様多核細胞の形成を濃度依存的に抑制することがわかる。さらに10<sup>-8</sup>Mの1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3によって促進された破骨細胞様多核細胞の形成においては、10<sup>-10</sup>M-10<sup>-7</sup>Mの(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneが濃度依存的にかつ著しく抑制的に働いた。従って、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneによる骨吸収抑制作用は、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneが直接破骨細胞に作用しその機能を抑制すると同時に、新しい破骨細胞の形成を阻害することによって発揮されることが明らかにされた。

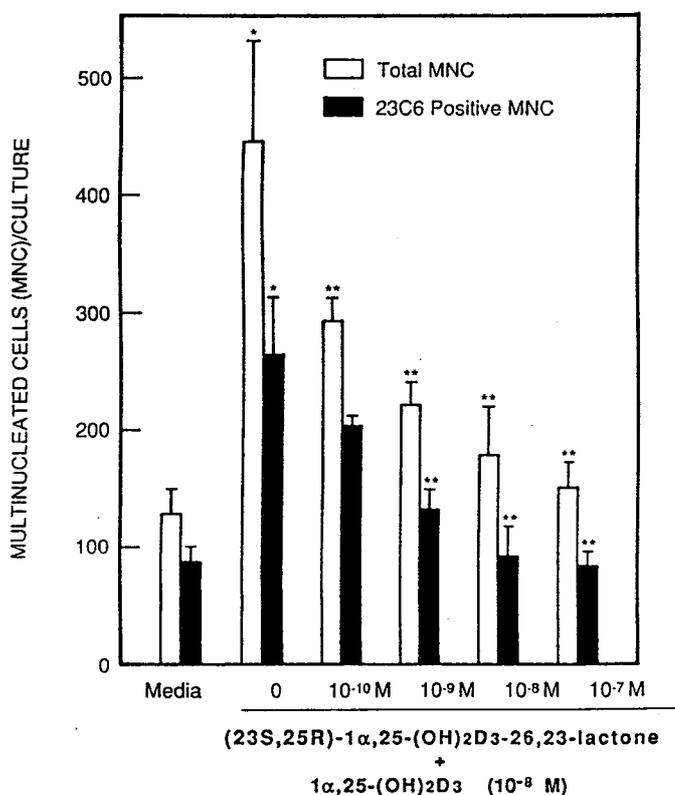


Figure 17. Effect of (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone on multinucleated cell formation induced by 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3 in human bone marrow mononuclear cell cultures. Human bone marrow mononuclear cells (10<sup>5</sup> cells/well) were cultured in  $\alpha$ -MEM medium containing 20% horse serum in the presence of 10<sup>-8</sup>M of 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3 and various concentrations of (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone. The medium containing the hormones was changed twice per week by replacing half the medium. After 3 weeks, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde and were stained with osteoclast monoclonal antibody 23C6. Cells containing three or more nuclei were counted as multinucleated cells. Results are presented as the mean  $\pm$  SD for quadruplicate determinations. \*, p < 0.01 (vs. media alone); \*\*, p < 0.01 (vs. 10<sup>-8</sup> M 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3)   
 , total multinucleated cells;  , 23C6 positive multinucleated cells.

## 第 VII 章 (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの骨形成促進作用

第VI章で、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneは、骨芽細胞に作用して骨芽細胞の分化を促進するとともに骨基質成分であるコラーゲン合成およびオステオカルシン合成を促進することによって骨形成促進作用を発現すること、また破骨細胞に直接作用してその機能を抑制すること、更に、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞の形成を阻害することによって骨吸収抑制作用を発揮することを明らかにした。

骨芽細胞および破骨細胞で見られた(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの骨形成促進作用および骨吸収抑制作用が動物でも見られるかどうか検討した。

### 1. 骨誘導因子を用いた異所性骨形成実験系

Dunnの骨肉腫細胞より抽出し、凍結乾燥して作成した移植用骨誘導因子含有ペレットをマウスの背部筋膜下に移植すると、そこに異所性の誘導骨が形成されることが知られている。この異所性骨形成実験系を用いて(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの骨形成作用を検討した。6週令の雄ddyマウスの背部筋膜下に骨誘導因子含有ペレットを移植し、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneを0, 45および225 pmol/マウス/日で連日腹腔内投与した。移植3週間後に誘導骨を回収し、重量を測定し、骨軟X線上で誘導骨の面積を計測した。また、骨基質合成の指標として誘導骨への<sup>3</sup>H]プロリンの取り込み量を、骨石灰化の指標として誘導骨への<sup>85</sup>Srの取り込み量を測定した。

(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの投与で血清中のカルシウム濃度が対照群に比べて有意に低下し、逆に血清中リン濃度は有意ではないが上昇傾向であった。体重および尿中cyclicAMP/クレアチニン比には全く変化が見られなかった (Table 10)。

Table 10

Comparison of body weight, plasma Ca and P, and urinary cAMP/Cr between control group and animals receiving (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone.

	Control Vehicle only	(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone 45pmoles/head	(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone 225pmoles/head
Body weight (g : n=6)	31.4 $\pm$ 0.5	30.4 $\pm$ 0.7	31.1 $\pm$ 0.4
Plasma Ca (mg/dl : n=6)	9.0 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.2	8.3 $\pm$ 0.2*
Plasma P (mg/dl : n=6)	8.5 $\pm$ 2.4	9.1 $\pm$ 0.2	9.1 $\pm$ 0.2
Urinary cAMP/Cr (nmol/mg Cr)	55.9 $\pm$ 2.8 (n=26)	55.9 $\pm$ 2.9 (n=26)	52.1 $\pm$ 2.8 (n=24)

Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Plasma Ca, P and urinary cAMP/Cr ratio were measured in controls and animals receiving 45 pmoles or 225 pmoles of (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone. \* P < 0.02 vs control.

画像解析装置を用いて誘導骨の面積を測定すると、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone 225pmolの投与で対照群の約1.4倍になり、誘導骨の重量では1.8倍に増大した(Table 11)。また、骨基質成分であるコラーゲン合成の指標として[<sup>3</sup>H]プロリンの取り込みおよび骨石灰化の指標としての<sup>85</sup>Srの取り込みは、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの投与で有意に増加した。

(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone投与で形成された誘導骨の組織学的検索において、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone 225 pmol投与群では立方体様の骨芽細胞が骨梁表面に認められ骨形成を行なっているが、組織上は対照群と差がなく、ただ全体の骨重量が増加していた。これに対し、体重および血清中カルシウム濃度が変化しない1.2 pmolの1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3の投与では、誘導骨の

Table 11

Comparison of parameters of induced bone between control group and animals receiving (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone.

	Control Vehicle only	(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone 45 pmoles/head	(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone 225 pmoles/head
Area (mm <sup>2</sup> : n=8)	24.2 $\pm$ 1.3	27.0 $\pm$ 2.1	34.8 $\pm$ 2.0**
Weight (mg : n=8)	33.6 $\pm$ 3.7	40.4 $\pm$ 3.7	61.4 $\pm$ 4.0**
[ <sup>3</sup> H]Proline uptake (dpm)	610 $\pm$ 85 (n=5)		1,070 $\pm$ 155* (n=7)
<sup>85</sup> Sr uptake (cpm)	4,070 $\pm$ 290 (n=6)	5,140 $\pm$ 390 (n=6)	5,580 $\pm$ 380* (n=7)

Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Implants recovered from animals were weighed and photographed. The area of induced tissue on the film was measured.

\*; P < 0.05, higher than control. \*\*; P < 0.001, higher than control.

面積および重量さらには<sup>85</sup>Srの取り込みも増加せず、むしろ減少傾向にあった。これらの結果は、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneは、1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3と異なり骨基質合成と骨石灰化を増進することにより骨形成促進作用を発現していることを示している。

## 2. 実験的骨粗鬆症モデルラット実験系

7-8か月齢のウイスター系雌ラットに両側卵巣摘除および右坐骨神経切除を施行し、正常飼料で12週間飼育すると、骨有機質成分と灰分重量比は変化せず骨量のみが減少した骨粗鬆症モデルラットが作成できる。そこで卵巣摘除および右坐骨神経切除を施行し、手術翌日から連日経口的に12週間(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneを1  $\mu$ g/kg(L1群), 5  $\mu$ g/kg(L5群), 25  $\mu$ g/kg(L25群), 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3を0.02  $\mu$ g/kg(D群) および(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone 5  $\mu$ g/kgと1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3を

0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (LD群) を併用投与した。骨粗鬆症群(OP群)および偽手術群(I群)には溶媒のみを投与した。(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ を投与したL1群およびL5群では、血清中カルシウム濃度がOP群に対して有意に低下し、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を投与したD群ではOP群に比べ有意に上昇した。血中Al-P活性は、OP群で正常動物I群に比べ有意に上昇したが、(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ を投与したL1群でのみI群と同程度まで低下した。血清中PTH濃度は(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ および $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 投与により低下傾向に、また血清中オステオカルシン(BGP)濃度は増加傾向にあった。大腿骨の乾燥重量は、OP群でI群に比べ有意に減少し、この減少は(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ を投与しても防止できなかったが、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の投与D群および併用投与LD群では骨乾燥重量の減少を抑制した。大腿骨中の灰分含量の変化も、骨乾燥重量の変化とまったく同様であった。骨体積は、L5群およびL25群で減少傾向にあり、D群で有意に減少したが、LD群ではI群まで回復した。体重あたりの骨体積は、(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ の投与量に依存して減少し、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の投与で顕著に減少した。これらの結果は(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$ の投与量の増加につれて、また $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の投与によってコンパクトな骨が形成されていることを示している。コラーゲン量の指標になるヒドロキシプロリン量は、OP群はI群に比べ有意に減少したが、(23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  および $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 投与によってOP群より有意に増加した(Fig. 18)。

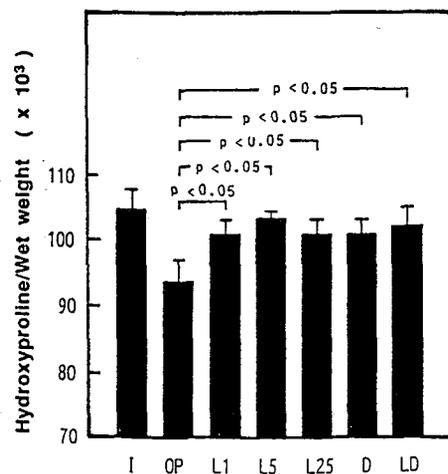


Figure 18. Effects of  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  and (23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-}26,23\text{-lactone}$  on hydroxyproline content in femur in osteoporotic rats.

脛骨皮質骨を用いた骨形態計測の結果をFig. 19 に示した。(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneを投与したL1群およびL5群では類骨表面がOP群およびI群に比べ顕著に増加し、新生骨の形成が促進されていることが示されたが、骨中カルシウム含量が増加する(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneのL25群、1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3のD群およびその併用投与LD群ではOP群とまったく同様で新生骨の形成は認められなかった(Fig. 19A)。骨石灰化表面に沈着する性質があるテトラサイクリンを投与して、骨石灰化表面を標識した類骨テトラサイクリン標識表面(骨石灰化表面)も(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneを投与した、L1群およびL5群で顕著に増加しており、その割合は類骨表面の割合とよく相関していた(Fig. 19B)。しかし、L25, D およびLD群では、骨石灰化表面もまったく増加しなかった(Fig. 19B)。

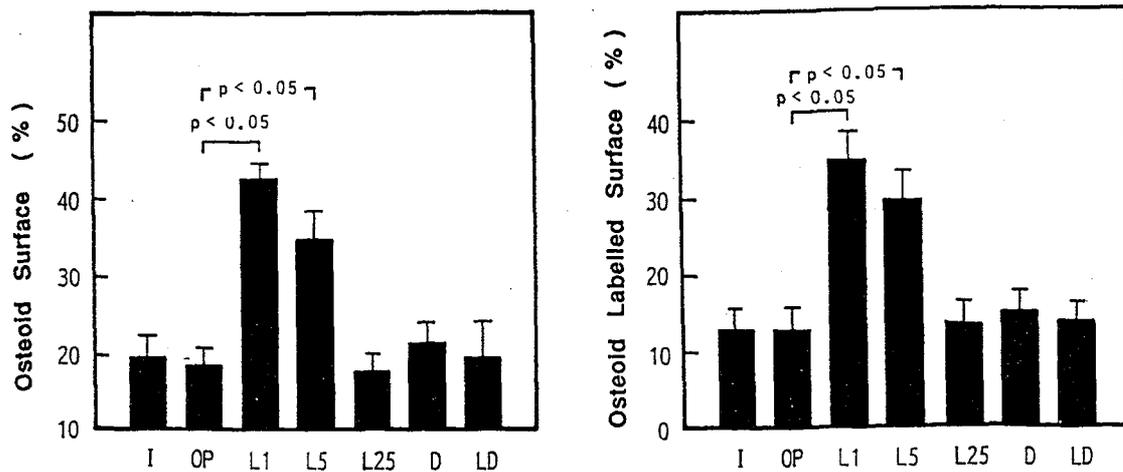


Figure 19. Effects of 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3 and (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone on bone histomorphometric parameters in osteoporotic rats.

卵巣摘除および坐骨神経切除の実験的骨粗鬆症モデルラットにおいて(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneの特徴的な作用は、骨基質成分であるコラーゲン合成を増加させ、新生骨の形成と骨石灰化作用から、骨形成を促進したことである。

## 第 VIII 章 カルシウム代謝異常と

### 血清中(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone濃度

動物の血清中カルシウム濃度は、ビタミンD、副甲状腺ホルモン(PTH)およびカルシトニンによって厳密に調節されている。しかし、腎臓機能が低下した慢性腎不全患者や老人に多発する骨粗鬆症患者で

は、カルシウム代謝異常および骨代謝異常が発症すると同時にビタミンD代謝異常も認められるため、これら疾患患者には活性型ビタミンD<sub>3</sub>類縁体投与による治療が行なわれている。

私が単離同定した(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、活性型ビタミンD<sub>3</sub>の主代謝物であり、カルシウム代謝を調節すると同時に骨代謝改善作用をも発現するので、種々のカルシウム代謝異常患者の血清中(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone濃度を定量し病態との関連を検討した。

(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を投与した動物では主代謝物として血清中から単離できるが(第三章参照)、生理的状态下で血清中に存在しているかどうか不明であった。そこで、正常ヒト血清60mlからビタミンD代謝物をchloroform:methanol(1:1)抽出し、その抽出物からSephadex LH-20 column chromatographyおよびZorbax Sil columnを用いたHPLCで(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone画分を分離精製した。(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、trimethyl silyl化後マススペクトルを取ると高分子領域に 660, 570, 529および480のfragment ionが検出できた。そこで、正常ヒト血清中から分離精製した(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone画分をtrimethyl silyl化後、mass fragmentgraphyを取ると660, 570, 529および480のfragment ionが標準(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneと同じ比率で検出された(Fig. 20)。また、検出された(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneのmass fragment ionのピークから血清中濃度は約100 pg/ml程度と推測できた。従って5 mlの血清で(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone濃度を測定するには、5-10pg/tubeで検出できる定量系を構築する必要があることが分かった。そこで、私はcalcitric acidを牛血清アルブミンに結合させたものを抗原として、ウサギに3週間に1回ずつ5回免疫してcalcitric acidに対する抗体を得た。この抗体は、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneのみならず1 $\alpha$ 位が水酸化されたビタミンD<sub>3</sub>代謝物とよく結合することがわかったので、血清中の種々の代謝物をchromatographyで分離精製すればそれらの濃度を定量出来ることが明らかになった。この抗体を用いたradioimmunoassayにより(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、2.5 - 200 pg/tubeで定量可能であった。

3 - 10mlのヒト血清から種々のビタミンD代謝物は、Fig. 21に示した方法で分離精製した。精製した25-OH-Dおよび24(R)25-(OH)<sub>2</sub>Dは、血清中に存在するビタミンD結合蛋白質を用いたcompetitive protein binding assayで、1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>Dは、radioreceptor assayで、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-

26,23-lactoneは、radioimmunoassayで定量した。

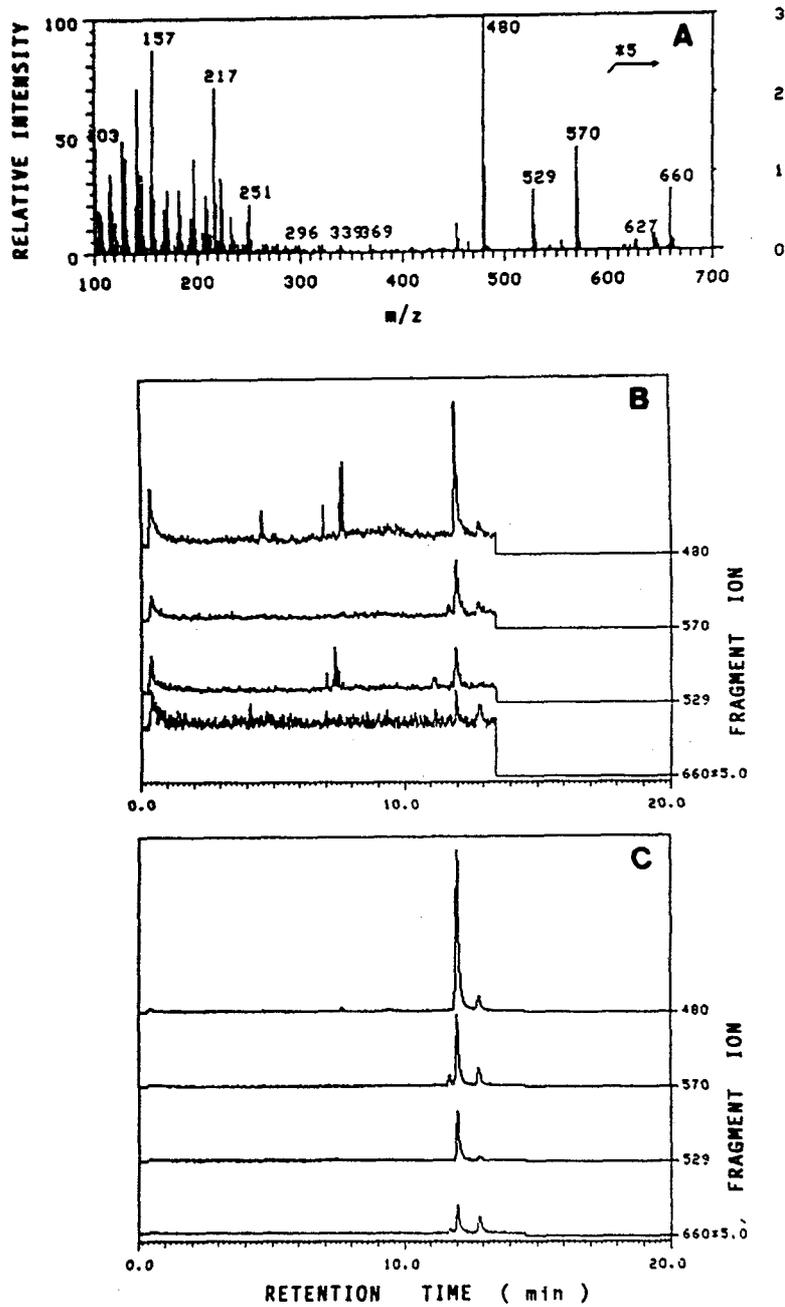


Figure 20. Mass-fragmentography of trimethylsilylated  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-26,23-lactone}$  isolated from the serum of healthy adults.  
 (A) Mass spectrum of authentic trimethylsilylated (23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-26,23-lactone}$ .  
 (B) Mass-fragmentography of authentic trimethylsilylated (23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-26,23-lactone}$ .  
 (C) Mass-fragmentography of trimethylsilylated (23S,25R)- $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3\text{-26,23-lactone}$  isolated from the serum of healthy adults.

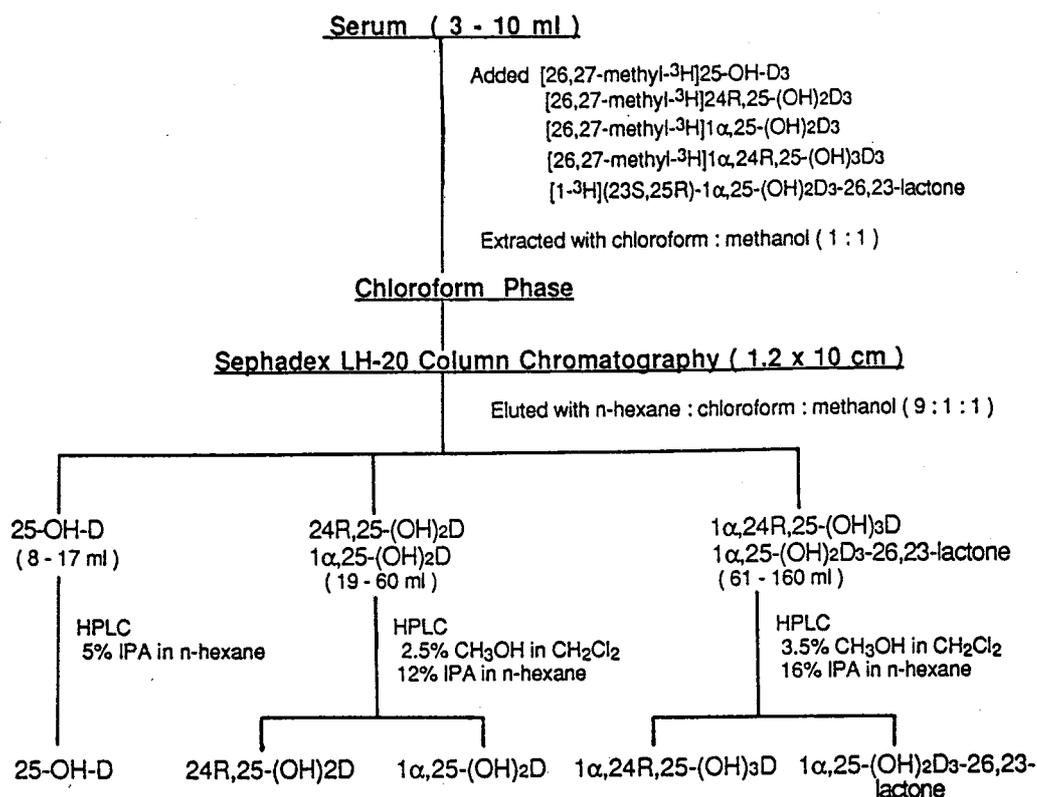


Figure 21. Isolation and purification procedures of vitamin D metabolites in serum.

Table 12には、正常人および種々のカルシウム代謝異常疾患患者の血清中ビタミンD代謝物濃度を定量した結果を要約した。正常男性に対し老齡正常女性では、全般に血清中ビタミンD代謝物濃度が低下傾向にあった。しかし、閉経後骨粗鬆症患者では全てのビタミンD代謝物濃度が低下していたが、特に24R,25-(OH)<sub>2</sub>Dおよび(23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、老齡正常女性の約1/2の濃度まで低下していた。このような閉経後骨粗鬆症患者を1μg/dayの1α-OH-D<sub>3</sub>で治療すると、最終投与24時間後に定量した全てのビタミンD代謝物濃度は、老齡正常女性の血清中濃度まで回復し、また、骨密度が上昇し骨代謝異常の改善が認められた。これらの結果から、骨粗鬆症に対する1α-OH-D<sub>3</sub>の臨床効果発現の一部には1α-OH-D<sub>3</sub>から代謝された(23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneの寄与が考えられる。また、腎臓機能が低下しビタミンDの活性化機構に障害をきたしている慢性腎不全患者は、ビタミンD欠乏状態で低カルシウム血症を呈し、また、骨軟化症を併発している。これらの患者では活性型ビタミンD<sub>3</sub>治療が著効を示し骨代謝異常も改善される。事実、私の定量結果でも慢性腎不全患者で、未透析の患者においては正常人に比べ、24R,25-(OH)<sub>2</sub>D、1α,25-(OH)<sub>2</sub>D および (23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone濃度は、極端に低下しているが、血液透析患者では、さらに1α,25-(OH)<sub>2</sub>Dおよび

(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone濃度が低下し、骨軟化症が進行している。これらの患者を、0.5 - 1 $\mu$ g/day の1 $\alpha$ -OH-D3で治療すると1 $\alpha$ ,25-(OH)2D および (23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3- 26,23-lactoneの血清中濃度が上昇し、骨軟化症も改善された(Table 12)。

Table 12

Serum concentrations of vitamin D metabolites in normal, osteoporosis, osteoporosis administered 1 $\alpha$ -OH-D3 and renal failure.

Patients	n	Age	Sex	25-OH-D ng/ml	24R,25-(OH)2D ng/ml	1 $\alpha$ ,25-(OH)2D pg/ml	1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactone pg/ml
Normal men	11	25 - 40	M	27.7 $\pm$ 5.9	2.53 $\pm$ 0.41	56.1 $\pm$ 12.9	131.3 $\pm$ 55.5
Aged healthy women	15	60 - 80	F	18.5 $\pm$ 3.4	1.61 $\pm$ 0.46	46.8 $\pm$ 5.8	66.6 $\pm$ 9.6
Postmenopausal osteoporosis	23	60 - 88	F	12.2 $\pm$ 4.0	0.73 $\pm$ 0.45	31.1 $\pm$ 10.4	36.6 $\pm$ 16.1
Postmenopausal osteoporosis + 1 $\mu$ g/day 1 $\alpha$ -OH-D3	17	60 - 85	F	16.5 $\pm$ 4.0	1.27 $\pm$ 0.42	47.7 $\pm$ 9.6	59.5 $\pm$ 10.1
Renal failure							
Hemo-dialysis	6	38 - 45	F	18.5 $\pm$ 5.7	0.29 $\pm$ 0.17	12.6 $\pm$ 3.5	19.9 $\pm$ 3.6
Hemo-dialysis + 1 $\alpha$ -OH-D3	6	40 - 45	F	17.9 $\pm$ 7.4	0.24 $\pm$ 0.07	29.7 $\pm$ 12.5	29.8 $\pm$ 9.6
Renal failure no-dialysis	4	38 - 44	F	14.6 $\pm$ 3.3	0.36 $\pm$ 0.15	18.9 $\pm$ 2.7	28.7 $\pm$ 4.7

低カルシウム血症を伴う骨軟化症の治療には、活性型ビタミンD3投与が著効を示すが、ほぼ正常な血清中カルシウム濃度を示す骨粗鬆症の治療において活性型ビタミンD3投与は、骨病変に対し緩徐な作用しか示さないことから活性化ビタミンD3投与の直接作用なのか、その代謝物である(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D3-26,23-lactoneによる間接作用であるのか今後の研究課題である。

## 第 IX 章 結論

この論文では、ビタミンD3の活性化の過程と活性型ビタミンD3が生体内でその生理作用を発現後、不活化されていく両過程を研究し、14個の新規代謝物を単離同定すると同時にそれら代謝物の中にビタミンD3骨格を有しながら、アンチビタミンD3様活性を有する代謝物を見いだしたことについて述べた。以下に、私の研究で得られた成果を要約する。

- (1) 25-OH-D3の新規代謝物として、24S,25-(OH)2D3, 25S,26-(OH)2D3, 25R,26-(OH)2D3, 23S,25R,26-(OH)3D3, (23S,25R)-25-OH-D3-26,23-lactone, (23S,25R)-25-OH-D3-26, 23-peroxylactone, (5Z)- および(5E)-19-nor-10-oxo-25-OH-D3, (5Z)-および(5E)-19-nor-10-oxo-24R,25-(OH)2D3を単離同定した。

- (2) (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-peroxylactoneは、-20℃以上で非酵素反応的に、(23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactoneに変換した。
- (3) 25-OH-D<sub>3</sub> から(23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactoneへの代謝経路は、2経路存在する。25-OH-D<sub>3</sub> から23S,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>または25R,26-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に代謝され、さらに23S,25R,26-(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>をキー中間体として(23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactolを経由して(23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactoneが生成される。
- (4) (23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-lactoneおよび(23S,25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26,23-peroxylactoneは、骨吸収抑制作用を示す初めてのビタミンD<sub>3</sub>代謝物である。
- (5) 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の新規代謝物として1α,25-(OH)<sub>2</sub>-24-oxo-D<sub>3</sub>, 1α,24(S)25-(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, 1α,25(R)26-(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, (23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactol および(23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone を単離同定した。
- (6) 1α位水酸化された新規代謝物として1α,24R-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を単離同定した。
- (7) 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>から(23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone への代謝経路は、2経路存在する。1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は1α,23S,25-(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub> または1α,25R,26-(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>に代謝され、さらに1α,23S,25R,26-(OH)<sub>4</sub>D<sub>3</sub>をキー中間体として(23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactolを経由して(23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneが生成される。
- (8) (23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、単独でも骨吸収抑制作用を発現し、また、1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による骨吸収活性をも抑制する。このように直接1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の生理活性を抑制するビタミンD<sub>3</sub>代謝物は(23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneが最初のものである。
- (9) (23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>と異なり骨芽細胞の分化を促進し、また、骨基質の重要成分であるコラーゲンの合成を促進し、その結果として骨形成促進作用を発揮する。
- (10) (23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは、生理的状态下でも約100 pg/ml 血清で存在しカルシウム代謝異常疾患である慢性腎不全患者および骨粗鬆症患者では、血清中(23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone濃度が極端に低下している。活性型ビタミンD<sub>3</sub>治療でカルシウム代謝異常および骨代謝異常が改善する患者では、血清中(23S,25R)-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-

lactone 濃度が上昇していることより、これら代謝異常疾患改善作用の一部に(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>-26,23-lactoneが寄与している可能性が示唆された。

(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>-26,23-lactoneについて、私が解明した研究成果は、分子構造的には4種の立体異性体が存在するが、天然には一種しか存在しないこと、また、生物活性は4種立体異性体間で非常に異なっており、天然型(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>-26,23-lactoneがアンチビタミンD様活性を発現した。すなわち、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>-26,23-lactoneは生体内ホルモンである1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>のカルシウム代謝促進作用をnegative feedback的にその活性を調節し、また、骨代謝においては、骨芽細胞に作用して骨形成促進作用を発現すると同時に破骨細胞に作用して骨吸収抑制作用を示すことによって、骨量増加作用を示す特異な代謝物である。その生理作用発現には、(23S,25R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub>-26,23-lactone特異的リセプターを介している可能性もあり、カルシウム代謝調節ホルモンの一つとして今後の研究成果が期待される。

## 発表論文

本論文の内容は以下の報文により全て印刷公表されている。

1. Ishizuka, S., Bannai, K., Naruchi, T., and Hashimoto, Y. Intrinsic biological activities by  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 904-910 (1979)
2. Ishizuka, S., Yamaguchi, H., Yamada, S., Nakayama, K., and Takayama, H. Stereochemistry of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone and  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone in rat serum. *FEBS Lett.* **134**, 207-211 (1981)
3. Ishizuka, S., Naruchi, T., Hashimoto, Y., and Orimo, H. Radioreceptor assay for  $1\alpha,24(R)25$ -trihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human serum. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **27**, 71-75 (1981)
4. Ishizuka, S., Ohnuma, N., Kiyoki, M., Yamaguchi, H., and Hashimoto, Y. Biological activities, metabolism and mechanism of action of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Bone Metab.* **14**, 159-169 (1981)
5. Ishizuka, S., Ishimoto, S., and Norman, A. W. Metabolic pathway to 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone from 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *FEBS Lett.* **138**, 83-87 (1982)
6. Ishizuka, S., Ishimoto, S., and Norman, A. W. Biological activity assessment of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone in the rat. *FEBS Lett.* **139**, 267-270 (1982)
7. Ishizuka, S., Ishimoto, S., and Norman, A. W. Isolation, identification, and biological activity of 23,25,26-trihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, an in vitro and in vivo metabolite of vitamin D<sub>3</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 264-272 (1982)
8. Ishizuka, S., Ishimoto, S., and Norman, A. W. Isolation and identification of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-peroxylactone : A novel in vivo metabolite of vitamin D<sub>3</sub>. *J. Biol. Chem.* **257**, 14708-14713 (1982)
9. Ishizuka, S., and Norman, A. W. The stereochemical configuration of the natural 23,25,26-trihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *FEBS Lett.* **156**, 321-324 (1983)
10. Ikekawa, N., Koizumi, N., Ohshima, E., Ishizuka, S., Takeshita, T., Tanaka, Y., and DeLuca, H. F. Natural 25,26-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is an epimeric mixture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 5286-5288 (1983)
11. Ishizuka, S., Bannai, K., and Norman, A. W. The  $1\alpha$ -hydroxylation of 24-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> by chick kidney homogenates. *Arch. Biochem. Biophys.* **225**, 986-992 (1983)
12. Ishizuka, S., Ishimoto, S., and Norman, A. W. Biological activity assessment of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone in the rat. *J. Steroid Biochem.* **20**, 611-615 (1984)
13. Ishizuka, S., and Norman, A. W. Stereo-retained and stereo-selective lactonization of four diastereoisomers of 23,25,26-trihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vitamin D-supplemented chick kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 179-184 (1984)
14. Ishizuka, S., Ishimoto, S., and Norman, A. W. Isolation and identification of  $1\alpha,25$ -dihydroxy-24-oxo-vitamin D<sub>3</sub>,  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone and  $1\alpha,24(S)25$ -trihydroxyvitamin D<sub>3</sub> : In vivo metabolites of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Biochemistry* **23**, 1473-1478 (1984)
15. Ishizuka, S., Takeshita, T., and Norman, A. W. Naturally occurring 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a mixture of both C-24R and C-24S epimers. *Arch. Biochem. Biophys.* **234**, 97-104 (1984)
16. Ishizuka, S., Oshida, J., Tsuruta, H., and Norman, A. W. The stereochemical configuration of the natural 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 82-89 (1985)

17. Kiyoki, M., Kurihara, N., Ishizuka, S., Ishii, S., Hakeda, Y., Kumegawa, M., and Norman, A. W. The unique action for bone metabolism of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 693-698 (1985)
18. Ishizuka, S., and Norman, A. W. The difference of biological activity among four diastereoisomers of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone. *J. Steroid Biochem.* **25**, 505-510 (1986)
19. Ishizuka, S., Matsui, T., Nakao, Y., Fujita, T., Okabe, T., Fujisawa, M., Watanabe, J., Takaku, F., Bishop, J. E., Reichel, H., and Norman, A. W. Metabolism of 25-hydroxy-cholecalciferol in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). Isolation and identification of 5(Z)- and 5(E)-19-nor-10-oxo-25-hydroxy-cholecalciferol. *Eur. J. Biochem.* **161**, 233-239 (1986)
20. Ishizuka, S., Matsui, T., Nakao, Y., Fujita, T., Reichel, H., and Norman, A. W. Metabolism of the vitamin D<sub>3</sub> derivative (24R)-hydroxycalcidiol by human promyelocytic leukemia cells (HL-60). Isolation and identification of 5(Z)- and 5(E)-(24R)-19-nor-10-oxo-24-hydroxycalcidiol. *Eur. J. Biochem.* **170**, 475-483 (1987)
21. Ishizuka, S., and Norman, A. W. Metabolic pathways from 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone. Stereo-retained and stereo-selective lactonization. *J. Biol. Chem.* **262**, 7165-7170 (1987)
22. Ishizuka, S., Kiyoki, M., Kurihara, N., Hakeda, Y., Ikeda, K., Kumegawa, M., and Norman, A. W. Effects of diastereoisomers of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone on alkaline phosphatase and collagen synthesis in osteoblastic cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **55**, 77-86 (1988)
23. Ishizuka, S., Kurihara, N., Hakeda, Y., Maeda, N., Ikeda, K., Kumegawa, M., and Norman, A. W. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>[1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]-26,23-lactone inhibits 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-mediated fusion of mouse bone marrow mononuclear cells. *Endocrinology* **123**, 781-786 (1988)
24. Ishizuka, S., Sumitani, K., Hiura, K., Kawata, T., Okawa, M., Hakeda, Y., and Kumegawa, M. Biological activity assessment of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone and its intermediate metabolites in vivo and in vitro. *Endocrinology* **127**, 695-701 (1990)
25. Shima, M., Tanaka, H., Norman, A. W., Yamaoka, K., Yoshikawa, H., Takaoka, K., Ishizuka, S., and Seino, Y. 23(S),25(R)-1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone stimulates murine bone formation in vivo. *Endocrinology* **126**, 832-836 (1990)
26. Sui-Caldera, M. L., Zou, L., Ehrlich, M. G., Schwartz, E. R., Ishizuka, S., and Reddy, G. S. Human osteoblasts in culture metabolize both 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its precursor 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> into their respective lactones. *Endocrinology* **136**, 4195-4203 (1995)

他に次のような参考文献が印刷公表または今後公表される予定である。

1. Kawashima, H., Hoshina, K., Ishizuka, S., Hashimoto, Y., Takeshita, T., Ishimoto, S., Noguchi, T., Ikekawa, N., Morisaki, M., and Orimo, H. Biological activity of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>; A new synthetic analog of the hormonal form of vitamin D. pp143-145 (1977) In A. W. Norman, K. Schaefer, D.v. Herrath, H. G. Grigoleit, J. W. Coburn, H. F. DeLuca, E. B. Nower, and T. Suda. [Editors], Vitamin D: Biochemical, Chemical and Clinical Aspects Related to Calcium Metabolism, Walter de Gruyter, Berlin.
2. Ohnuma, N., Bannai, K., Ishizuka, S., Kiyoki, M., Fukushima, H., Naruchi, T., Hashimoto, Y., and Noguchi, T.  $1\alpha$ -Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its disposition (I). Metabolism and distribution of  $1\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in rats. *Pharmacometrics* **16** 1103-1121 (1978)
3. Ohnuma, N., Ishizuka, S., Kubo, J., Kiyoki, M., Bannai, K., Fukushima, H., Naruchi, T., Hashimoto, Y., and Noguchi, T.  $1\alpha$ -Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its disposition (II). Distribution of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in rats; Main metabolite of  $1\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Pharmacometrics* **15**, 447-457 (1978)
4. Ohnuma, N., Bannai, K., Ishizuka, S., Naruchi, T., Hashimoto, Y., and Noguchi, T.  $1\alpha$ -Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its disposition (III). Placental transfer and mammary secretion in rats. *Pharmacometrics* **15**, 459-467 (1978)
5. Ohnuma, N., Bannai, K., Kiyoki, M., Fukushima, H., Ishizuka, S., Naruchi, T., Hashimoto, Y., and Noguchi, T.  $1\alpha$ -Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its disposition (IV). Studies on excretion and enterohepatic circulation of  $1\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its metabolite  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in rats. *Pharmacometrics* **16**, 1128-1136 (1978)
6. Bannai, K., Ishizuka, S., Naruchi, T., and Hashimoto, Y. Synthesis of 24S- and 24R- $1\alpha$ -hydroxy-[24-<sup>3</sup>H]-cholecalciferol. *J. Steroid Biochem.* **10**, 411-418 (1979).
7. Ishizuka, S., Bannai, K., Naruchi, T., Hashimoto, Y., Noguchi, T., and Hosoya, N. Studies on the mechanism of action of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (I) : Synthesis of  $1\alpha,24$ (R)- and  $1\alpha,24$ (S)-dihydroxy-[24-<sup>3</sup>H]vitamin D<sub>3</sub> and their metabolism in the rat. *J. Biochem.* **88**, 87-95 (1982)
8. Ishizuka, S., Bannai, K., Naruchi, T., Hashimoto, Y., and Noguchi, T. In vitro 25-hydroxylation of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in various rat tissues. *FEBS Lett.* **121**, 149-152 (1980)
9. Ishizuka, S., Bannai, K., Naruchi, T., and Hashimoto, Y. Studies on the mechanism of action of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> II: Specific binding of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to chick intestinal receptor. *Steroids* **37**, 33-43 (1981)
11. Ishizuka, S., Bannai, K., Naruchi, T., and Hashimoto, Y. Studies on the mechanism of action of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> III : The specific binding of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to the receptor of chick parathyroid gland. *Steroids* **39**, 53-62 (1982)
12. Ishizuka, S., Ishimoto, S., and Orimo, H. Biological activity, metabolism and mechanism of action of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. pp341-344 (1982) In A. W. Norman, K. Schaefer, H. G. Grigoleit, and D. v. Herrath. [Editors], Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism, Walter de Gruyter, Berlin.

13. Orimo, H., Shiraki, M., Izawa, Y., Ishizuka, S., Kiyoki, M., and Ishimoto, S. Potentiality of  $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> ( $1\alpha,24(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) in the treatment of metabolic bone diseases pp959-964 (1982) In A. W. Norman, K. Schaefer, H. G. Grigoleit, and D. v. Herrath. [Editors], Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism, Walter de Gruyter, Berlin.
14. Shiraki, M., Ito, H., Akiguchi, I., Takahashi, R., Nakano, T., Nakao, J., Orimo, H., Sato, Y., and Ishizuka, S. The pathogenic role of decreased serum 1,25-dihydroxycholecalciferol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) levels in osteopenia in elderly female diabetics. *J. Japan Diab. Soc.* **25**, 1147-1156 (1982)
15. Ishida, H., Seino, Y., Seino, S., Tsuda, K., Takemura, J., Nishi, S., Ishizuka, S., and Imura, H. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on pancreatic B and D cell function. *Life Science* **33**, 1779-1786 (1983)
16. Matsui, T., Shiraki, M., Akiguchi, T., Takahashi, R., Sato, Y., Kaneko, T., Ishizuka, S., Ito, H., and Orimo, H. Effects of active vitamin D<sub>3</sub> on calcium and phosphorus metabolism in the elderly. *Jap. J. Bone Metab.* **2**, 62-68 (1984)
17. Matsui, T., Nakao, Y., Kobayashi, N., Kishihara, M., Ishizuka, S., Watanabe, S., and Fujita, T. Phenotypic differentiation-linked growth inhibition in human leukemia cells by active vitamin D<sub>3</sub> analogues. *Int. J. Cancer* **33**, 193-202 (1984)
18. Okabe, T., Ishizuka, S., Fujisawa, M., Watanabe, J., and Takaku, F. Sarcoid granulomas metabolize 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 822-830 (1984)
19. Yoshida, M., Ishizuka, S., and Hoshi, A. Biological activity of vitamin D<sub>3</sub> derivatives in inducing differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J. Pharm. Dyn.* **7**, 962-968 (1984)
20. Ishida, H., Seino, Y., Tsuda, K., Matsukura, S., Miyamoto, Y., Ishizuka, S., and Imura, H. Circulating levels of vitamin D metabolites in patients with hyperinsulinaemia. *Human Nutrition: Clinical Nutrition* **380**, 473-475 (1984)
21. Ishida, H., Seino, Y., Matsukura, S., Ikeda, M., Yawata, M., Yamashita, G., Ishizuka, S., and Imura, H. Diabetic osteopenia and circulating levels of vitamin D metabolites in type 2 (Noninsulin-dependent) diabetes. *Metabolism* **34**, 797-801 (1985)
22. Shiraki, M., Akiguchi, I., Ito, H., Ishizuka, S., and Orimo, H. Effect of aging on bone mineral content part IV; Normal range and physiological importance of serum vitamin D metabolites and parathyroid hormone (PTH) levels in healthy aged females. *Jpn. J. Geriat.* **22**, 420-425 (1985)
23. Okabe, T., Ishizuka, S., Fujisawa, M., Watanabe, J., and Takaku, F. Human myeloid leukemia cells metabolize 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 635-641 (1985)
24. Ishida, H., Seino, Y., Nishi, S., Kitano, N., Seno, M., Taminato, T., Matsukura, S., Ishizuka, S., and Imura, H. Effects on insulin on a altered mineral and vitamin D metabolism in streptozotocin-induced diabetes. *Acta. Endocrinologica* **108**, 231-236 (1985)
25. Ishida, H., Seino, Y., Matsukura, S., Ishizuka, S., and Imura, H. The role of vitamin D metabolites in hypercalcemia of Zucker fa/fa rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **31**, 1-5 (1985)
26. Shiraki, M., Orimo, H., Ito, H., Akiguchi, I., Nakao, J., Takahashi, R., and Ishizuka, S. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with active vitamin D<sub>3</sub>, 1-alpha-hydroxycholecalciferol ( $1\alpha\text{-OH-D}_3$ ) and 1,24-dihydroxycholecalciferol ( $1,24(\text{OH})_2\text{D}_3$ ). *Endocrinol. Japon.* **32**, 305-315 (1985)
27. Kumegawa, M., Kurihara, N., Ikeda, Y., Hakeda, Y., Kiyoki, M., and Ishizuka, S.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and its analogues induce alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells derived from newborn mouse calvaria. pp267-268 (1985) In A. W. Norman, K. Schaefer, H. G. Grigoleit, and D. v. Herrath [Editors], Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update, Walter de Gruyter, Berlin.

28. Kurihara, N., Kumegawa, M., Ikeda, K., Hakeda, Y., Kiyoki, M., and Ishizuka, S. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> increases ALP activity and type I collagen production in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells in serum-free media. pp477-478 (1985) In A. W. Norman, K. Schaefer, H. G. Grigoleit, and D. v. Herrath [Editors], Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update, Walter de Gruyter, Berlin.
29. Ishizuka, S., Matsui, T., Nakao, Y., Fujita, T., Okabe, T., and Norman, A. W. Metabolism of 25-OH-D<sub>3</sub> in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). Isolation and identification of 19-nor-10-keto-25-OH-D<sub>3</sub>. pp45-46 (1985) In A. W. Norman, K. Schaefer, H. G. Grigoleit, and D. v. Herrath [Editors], Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update, Walter de Gruyter, Berlin.
30. Ishizuka, S., Matsui, T., Nakao, Y., Fujita, T., and Norman, A. W. Metabolism of 24(R)25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). Isolation and identification of 19-nor-10-keto-24(R)25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. pp259-260 (1985) In A. W. Norman, K. Schaefer, H. G. Grigoleit, and D. v. Herrath [Editors], Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update, Walter de Gruyter, Berlin.
31. Ishizuka, S., Kiyoki, M., Orimo, H., and Norman, A. W. Biological activity and characteristics of 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone. pp402-403 (1985) In A. W. Norman, K. Schaefer, H. G. Grigoleit, and D. v. Herrath [Editors], Vitamin D: Chemical, Biochemical and Clinical Update, Walter de Gruyter, Berlin.
32. Kurihara, N., Ishizuka, S., Kiyoki, M., Hakeda, Y., Ikeda, K., and Kumegawa, M. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Endocrinology* 118, 940-947 (1986)
33. Ishizuka, S., Reichel, H., and Norman, A. W. Synthesis and biological activity of 1 $\alpha$ ,23,25,26-tetrahydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* 254, 188-195 (1987)
34. Ishizuka, S., Ohba, T., and Norman, A.W. 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone is a major metabolite of 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> under physiological conditions. pp143 - 144 (1988) In A. W. Norman, K. Schaefer, and H. G. Grigoleit, [Editors], Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology, Walter de Gruyter, Berlin.
35. Yoshimoto, Y., Ohno, K., Fujita, T., and Ishizuka, S. Metabolism of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in perfused duodena from normal chicks. pp114-115 (1988) In A. W. Norman, K. Schaefer, and H. G. Grigoleit, [Editors], Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology, Walter de Gruyter, Berlin.
36. Tanaka, H., Seino, Y., Shima, M., Yamaoka, K., Yoshikawa, H., Takaoka, K., Ishizuka, S., Norman, A. W., and Yabuuchi, H. 23(S),25(R)-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone stimulates bone formation in vivo. pp610-611 (1988) In A. W. Norman, K. Schaefer, and H. G. Grigoleit, [Editors], Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology, Walter de Gruyter, Berlin.
37. Yamato, H., Matsumoto, T., Fukumoto, S., Ikeda, K., Ishizuka, S., and Ogata, E. Effect of 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] metabolism in vitamin D-deficient rats infused with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology* 124, 511-517 (1989)
38. Koizumi, T., Nakao, Y., Ishizuka, S., Oshida, J., Hara, N., Ikekawa, N., and Fujita, T. Novel vitamin D<sub>3</sub> derivatives, 26-homo-22-dehydro-1 $\alpha$ ,25(S)-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 26-homo-22-dehydro-1 $\alpha$ ,25(R)-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> ; Preferential activity in c-myc mRNA reduction and in induction of phenotypic differentiation of HL-60 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 310-316 (1990)
39. Hara, N., Eguchi, T., Ikekawa, N., Ishizuka, S., and Sato, J. Synthesis and biological activity of (22E,25R)- and (22E,25S)-22-dehydro-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-26-methylvitamin D<sub>3</sub>. *J. Steroid Biochem.* 35, 655-664 (1990)

40. Honda, A., Mori, Y., Otomo, S., Ishizuka, S., and Ikekawa, N. Effects of novel 26,27-dialkyl analoges of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on differentiation-inducing activity of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells in serum-supplemented or serum-free culture. *Steroids* **56**, 142-147 (1991)
41. Kumegawa, M., Ishizuka, S., Sumitani, K., Hiura, K., Kawata, T., Okawa, M., and Hakeda, Y. Effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone and its intermediate metabolites on bone metabolism in vivo and in vitro. Edited by Morii, H. : Calcium Regulating Hormones. II./ Calcium Transport, Bone Metabolism, and New Drugs. *Contrib. Nephrol.* Vol. 91, 109-115 (1991)
42. Hakeda, Y., Sudo, T., Ishizuka, S., Tanaka, K., Higashino, K., Kusuda, M., Kodama, H., and Kumegawa, M. Murine recombinant leukemia inhibitory factor modulates inhibitory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 577-582 (1991)
43. Seino, Y., and Ishizuka, S. 23(S),25(R)-1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-26,23-lactone in bone formation. pp565-571 (1991) In A. W. Norman, R. Bouillon, and M. Thomasset, [Editors], *Vitamin D: Gene Regulation, Structure-Function Analysis and Clinical Application*, Walter de Gruyter, Berlin.
44. Honda, A., Nakashima, N., Mori, Y., and Ishizuka, S. Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in HL-60 cells. pp217-218 (1991) In A. W. Norman, R. Bouillon, and M. Thomasset, [Editors], *Vitamin D: Gene Regulation, Structure-Function Analysis and Clinical Application*, Walter de Gruyter, Berlin.
45. Kurihara, N., Tatsumi, J., Ikeda, K., Ishizuka, S., Kumegawa, M., and Roodman, G. D. 23(S)25(R)-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone (1,25 D<sub>3</sub>-lactone), a naturally occurring metabolite of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>), inhibits osteoclast-like cell formation in human bone marrow and cord blood cultures. pp302-303 (1991) In A. W. Norman, R. Bouillon, and M. Thomasset, [Editors], *Vitamin D: Gene Regulation, Structure-Function Analysis and Clinical Application*, Walter de Gruyter, Berlin.
46. Tatsumi, J., Kurihara, N., Ikeda, K., Ishizuka, S., and Roodman, G. D. 24(R),25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibits fusion of committed precursors for human osteoclast-like cells pp535-536 (1991) In A. W. Norman, R. Bouillon, and M. Thomasset, [Editors], *Vitamin D: Gene Regulation, Structure-Function Analysis and Clinical Application*, Walter de Gruyter, Berlin.
47. Ishizuka, S., and Seino, Y. Bone formation stimulating activity of 23(S)25(R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone. in *Recent Progress in Osteoporosis Research* vol. 6, pp50 - 56 (1991) Inoue, T. ed. Topuoco Publishers.
48. Ishizuka, S., Sato, J., Takahama, S., Seino, Y., and Norman, A.W. Serum concentrations of 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone in normal adults. pp300 - 301 (1991) In A. W. Norman, R. Bouillon, and M. Thomasset, [Editors], *Vitamin D: Gene Regulation, Structure-Function Analysis and Clinical Application*, Walter de Gruyter, Berlin.
49. Honda, A., Nakashima, N., Mori, Y., Katsumata, T., and Ishizuka, S. Effects of vitamin D-binding proteins on HL-60 cell differentiation induced by 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**, 109-112 (1992)
50. Ikekawa, N., and Ishizuka, S. Molecular structure and biological activity of vitamin D metabolites and their analogs. pp293-316 (1992) Bohl, N., and Duax, W. L. [Editors], in *Molecular Structure and Biological Activity of Steroids*. CRC Press, Boca Roton.
51. Seino, Y., and Ishizuka, S. 23(S),25(R)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-lactone. *Drugs of the Future* **17**, 655-659 (1992)

52. Honda, A., Nakashima, N., Shida, Y., Mori, Y., Nagata, A., and Ishizuka, S. Modification of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> metabolism by introduction of 26,26,26,27,27,27-hexafluoro atoms in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells: Isolation and identification of a novel bioactive metabolite 26,26,26,27,27,27-hexafluoro- $1\alpha,23(S)25$ -trihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Biochem. J.* **295**, 509-516 (1993)
53. Ishizuka, S., Honda, A., Mori, Y., Kurihara, N., Tatsumi, J., Anai, K., Ikeda, K., and Norman, A. W. Effects of vitamin D-binding proteins on biological functions of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogues. pp109-110 (1994) In A. W. Norman, R. Bouillon, and M. Thomasset, [Editors], *Vitamin D: A Pluripotent Steroid Hormone: Structural Studies, Molecular Endocrinology and Clinical Applications*. Walter de Gruyter, Berlin.
54. Kurihara, N., Ishizuka, S., Tatsumi, J., Anai, F., Kumegawa, M., Ikeda, K., and Roodman, G. D.  $23(S)25(R)-1,25-(OH)_2D_3-26,23$ -lactone, a naturally occurring metabolite of  $1,25-(OH)_2$  vitamin D<sub>3</sub>, inhibits osteoclast-like cell formation in human bone marrow cultures. (Submitted to *J. Bone Miner. Metab.*)
55. Kurihara, N., Hosoda, K., Tatsumi, J., Anai, K., Ishizuka, S., Yamaji, T., Shiraki, M., Seino, Y., and Ikeda, K. N-terminal osteocalcin elevated during osteoclastic bone resorption is a probable new marker of bone resorption. (Submitted to *J. Bone Miner. Metab.*)

## 論文審査結果要旨

ビタミンDはカルシウムおよびリンの代謝調節や恒常性維持に必要で、骨代謝調節に関与することが古くから知られていたが、近年の研究でさらに細胞増殖抑制と細胞分化誘導、インシュリン分泌促進、免疫調節などの作用も見い出され、ホルモンとしての機能が注目されている。ビタミンDの主成分であるD<sub>3</sub>の構造は1936年に明らかにされたが、1971年にD<sub>3</sub>は先ず肝臓で25位が水酸化され、次に腎臓で1 $\alpha$ 位が水酸化されて最終活性代謝物である1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>となることが明らかにされた。この化合物は細胞内の特異的受容体タンパク質と結合してその機能を発揮することがその後の研究で明らかにされた。しかし、ビタミンDの示す多様な生理作用が全てこの化合物によるものであるかどうかは不明である。本研究は、生体内に存在するD<sub>3</sub>代謝物の単離同定を行い、それらの生理作用を明らかにすることを目的としたものである。

先ず、D<sub>3</sub>を大量に投与したラット血清中から代謝物を分離精製し、紫外線および赤外線吸収スペクトル、マススペクトル、化学修飾と化学合成の諸方法によって構造決定を行い、5種類の新規代謝物を同定した。これらの化合物の代謝経路をニワトリ腎臓ホモジネート中の酵素系を利用して決定した。新規代謝物の生物活性試験により(23S, 25R)-25-OH-D<sub>3</sub>-26, 23-lactoneほかもう1種類の化合物が骨吸収を抑制する初めての代謝物であることが分かった。

次に、D<sub>3</sub>の最終活性代謝物として知られる1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を大量投与したビーグル犬の血清中より4種類の新規代謝物を分離精製し、構造決定を行った。そして、これらの化合物が小腸粘膜および腎臓の酵素によって生じることを示した。これらの化合物中で1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26, 23-lactoneが活性D<sub>3</sub>と異なり、骨吸収活性を抑制することに注目し、以下この化合物の立体構造、生合成経路、生物活性について詳細な研究を行った。4種の立体異性体を合成し、それらの機器分析的性質と1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>受容体に対する結合活性を分離精製した化合物と比較することにより、その立体構造が(23S, 25R)型であることを明らかにした。本化合物は小腸および腎臓で生成され、その代謝経路を明らかにした。本化合物は活性D<sub>3</sub>の示す骨吸収活性を抑制するほか、骨芽細胞の分化促進、骨基質として重要なコラーゲンの合成促進作用を有し、全体として骨形成促進作用を発揮する新しい生理活性をもつことが明らかになった。さらに、本化合物はヒトにおいても生理的条件下で血清中に約100pg/ml濃度で含まれ、カルシウム代謝異常疾患の患者血清では著しく濃度低下していることも示され、これらの代謝異常疾患改善への応用の可能性が示唆された。

以上のように、本研究により多数の新規のビタミンD<sub>3</sub>代謝物が分離、精製、構造決定され、従来知られていた活性型D<sub>3</sub>とは生理作用の異なる化合物の存在も示されたことから、本研究はビタミンD<sub>3</sub>研究に大きく貢献するものと考えられ、審査員一同、著者は博士(農学)の学位を授与されるに充分の資格を有すると判定した。