

氏 名 ( 本 籍 )                      本                      間                      誠                      次                      郎

学 位 の 種 類                      薬                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      薬                      第                      1 1 0                      号

学 位 授 与 年 月 日                      昭 和 5 0 年 7 月 9 日

学 位 授 与 の 要 件                      学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目                      Catechol Estrogen の O - メ チ ル 化 と  
抱 合 に 関 す る 研 究

( 主 査 )

論 文 審 査 委 員   教 授   南   原   利   夫   教 授   竹   本   常   松

教 授   鶴   藤   丞

# 論文内容要旨

ヒトにおける estrogen の代謝は C-2 水酸化により生じた 2-hydroxy 体が選択的に O-メチル化を受け、2-methoxyestrogen を生成するのが主な経路の一つとして知られている。この体内変換は tyrosine が芳香核水酸基のオルト位に水酸化を受けカテコールアミンとなったのち、catechol O-methyltransferase (COMT) により metanephrine へ代謝されるのときわめて類似している。Catechol estrogen の両水酸基には化学反応性において顕著な差異がみられないにもかかわらず、生体内の O-メチル化にはこのような位置特異性が認められる。さらにラットではこの O-メチル化の様相がヒトの場合と異なって 3-methyl ether も産生され、methoxy 体総量の約 10-15% も占める。生体内における catechol estrogen の O-メチル化にはこれら 2 つの興味ある問題が指摘されるが、その機構については今日まで十分な説明が与えられていない。

そこで著者は最近重要視されている抱合がこの選択的 O-メチル化にどのように関与するかを明らかにするため、各種 catechol estrogen 抱合体を合成するとともに、ラットでの代謝を追求し、さらに in vivo および in vitro における O-メチル化について検討を加えた。

## 1. Catechol Estrogen 抱合体の合成

まず 2-methoxyestradiol の合成は出発原料の 3-deoxyestradiol に Friedel-Crafts 反応を応用して行なった。すなわち、(1) を塩化アルミニウムの存在下アセチルクロリドと Friedel-Crafts 反応に付すと 2-acetyl-3-deoxyestradiol 17-acetate (3) が主成分として得られ、同時に置換が 3 位におこった 3-acetyl 体も約 5% 副生した。得られた 2- および 3-acetyl 体の構造は NMR スペクトルにおける C-1, 4 プロトンの化学シフトの差から推定されたが、それぞれを既知物質に誘導することにより確認した。(3) は過酸を用いる Baeyer-Villiger 反応に付して 2-hydroxy-3-deoxyestradiol 2, 17-diacetate (5) とし、ついでアルカリ水解にて 2, 17-diol (6) に導いたのちジメチル硫酸で 2-methoxy 体(7)、さらにその 17-acetate を製した。ここに得られた(8)に再びアセチルクロリドを用いる Friedel-Crafts 反応を試みたところ 3-acetyl 体(10)が生成し、その構造は NMR スペクトルにおいて C-1, 4 プロトンがそれぞれ一重線で観察されることから確認された。(10)を過酸処理で 3, 17-diol diacetate (12)にかえ、ついでけん化し目的とする 2-methoxyestradiol (13)を得た。つぎにより簡便な合成法について検討を試みた。すなわち estrone acetate (24) をテトラクロルエタン中無水塩化アルミニウムを用いて、Fries 転位を行なうと 2-acetylestro-18 が生成した。また、

estrone methyl ether (15) から Friedel-Crafts 反応により得られた 2-acetyl 体 (17) を臭化水素酸で脱メチル化し、さきに得た (18) を収率よく製することができた。炭酸カリウムの存在下ベンジルクロリドと縮合させ、3-benzyl ether (19) としたのち過酸処理で得られる 2-acetoxy 体 (25) を常法通り 2-hydroxy 体 (26), 2-methoxy 体 (27) に導き、ついで接触還元により脱ベンジル化し 2-methoxyestrone (14) を 78% の収率で得た。一方、2-methoxyestradiol についても estradiol 3-methyl ether を出発原料とし、同様の経路にしたがって合成した (Chart 1)。

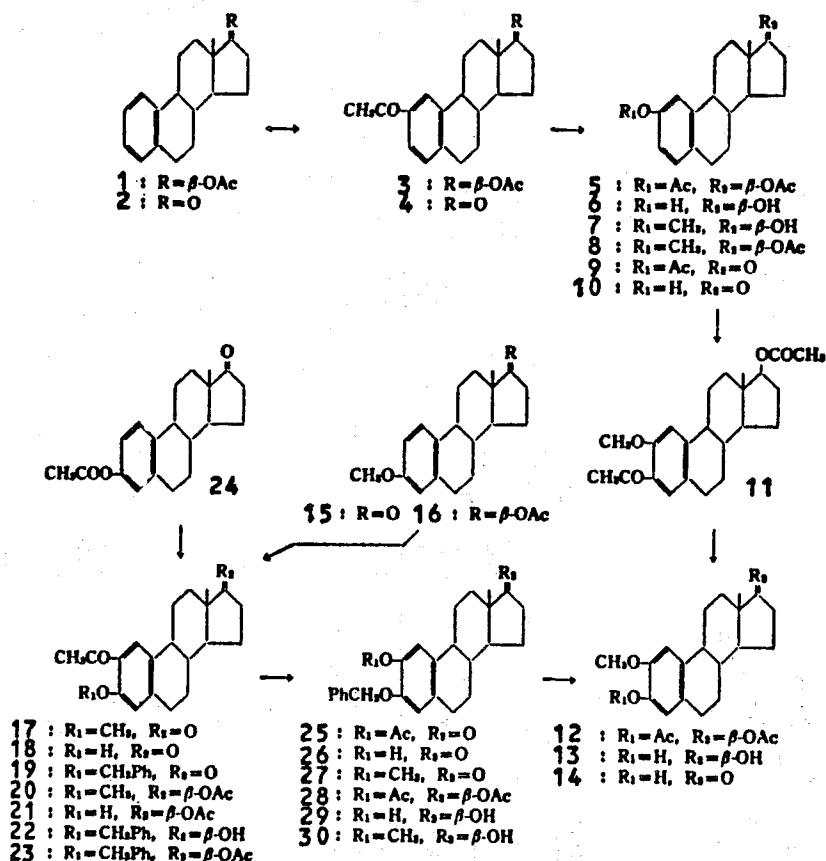


Chart 1

ここに得られた 2-, 3-モノ置換ならびに 2-, 3-ジ置換 estrogen の芳香環プロトンの化学シフトについて検討すると、3-および 2-, 3-酸素化物の C-1 プロトンはいずれも C-4 プロトンよりも低磁場に現われ、逆に 2-酸素化体では C-1 プロトンの方が高磁場に観察された。

Galactol estrogen 3-glucuronide の合成には基幹化合物として 2-benzoyloxyestradiol を用いた。まず、(10) を脱メチル化して 2-hydroxy 体 (31) としたのち、2-benzyl ether (32) に導きその 17-acetate (33) を Baeyer-Villiger 反応に付した。ここに得られた 3, 17-diacetate (34) を炭酸水素カリウムを用いて緩和な条件下部分水解し 17-monoacetate

(35)を製した。ステロイド水酸基への glucuronyl 基の導入は一般に広く用いられている Koenigs-Knorr 反応により行なった。すなわち (35) を炭酸銀の存在下、アセトブROMグルコン酸メチルエステルと縮合させ (37) を 17% の収率で得た。ついで接触還元により脱ベンジル化して 2-hydroxy 体 (36) に導き、アルカリにて保護基を一挙にはずし目的とする 2-hydroxy-estradiol 3-glucuronide (38) を合成した。位置異性体の 2-glucuronide の合成はまず estradiol を出発原料として Fishman 法を用い 3 工程で 2-hydroxy 体 (39) を得た。ついでこれを 2-tetrahydropyranyl ether (40) とし、ピペリジンにて 3 位保護基を一たん除去したあと 3-benzyl ether (42) にかえた。さらに鉍酸で処理して catechol 3-benzyl ether (43) に誘導し、その 2, 17-diacetate (45) の部分水解により 17-monoacetate (44) を得た。(37) の

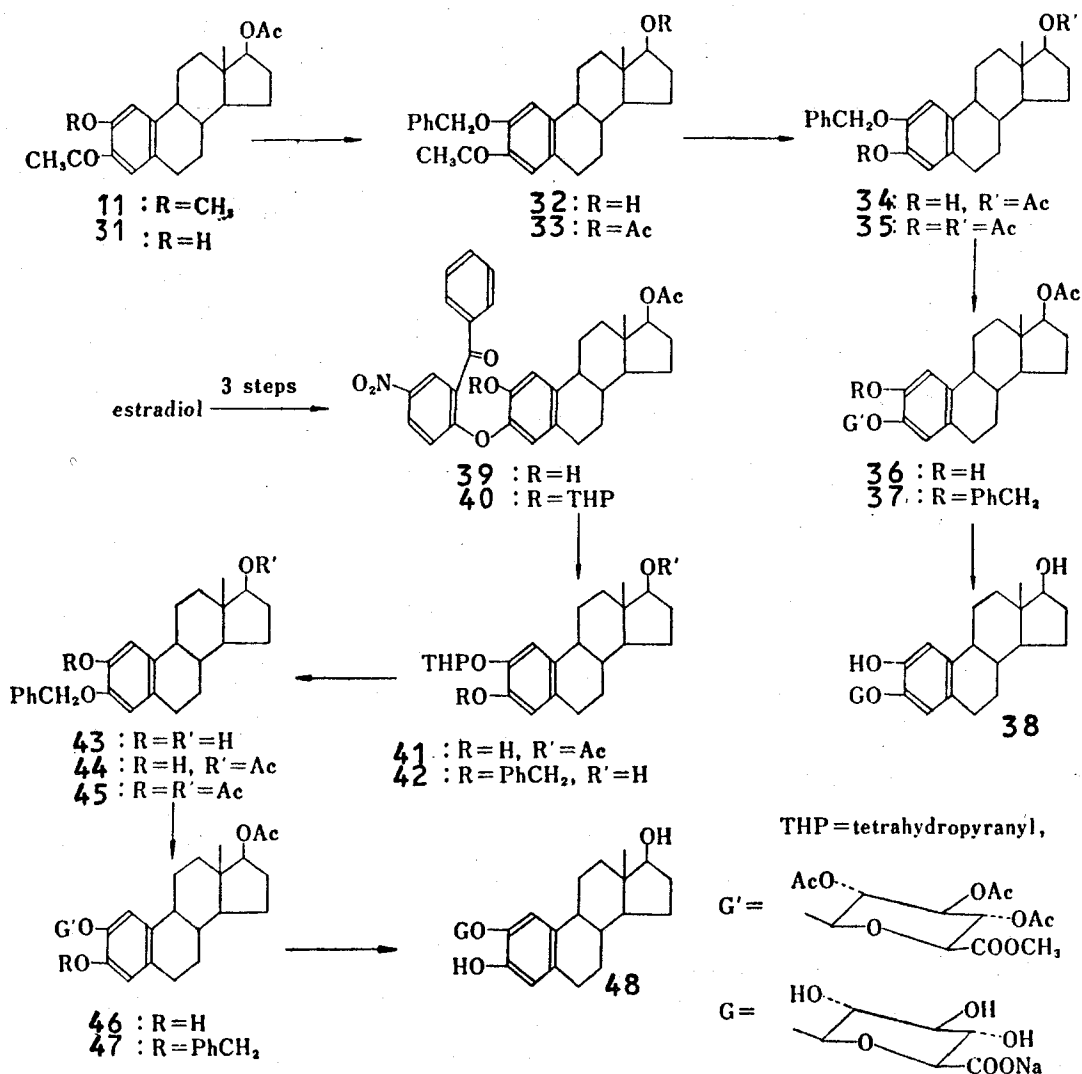


Chart 2

場合と同様Koenings-Knorr 反応に付し, 得られた縮合成績体 (47) を脱ベンジル化, ついでアルカリ水解で保護基をはずし目的の 2-glucuronide (48) を製した (Chart 2)。

ここに得られた acetate-methyl ester (37), (47) は IR スペクトルにおいて  $890\text{ cm}^{-1}$  にピラノース環の  $\text{C}_1\text{-H}$  の変角振動にもとづく吸収を示し, NMR スペクトルで糖部の  $\text{C}-1$  プロトンが  $4.5\text{--}5.0\text{ ppm}$  に  $J = 8\text{ Hz}$  で観察されること, さらに (38), (48) は  $\beta\text{-glucuronidase}$  で水解を受け 2-hydroxyestradiol を遊離することなどから  $\beta\text{-glucuronoside}$  構造であることが確認された。

## 2. Estrone のラット胆汁中代謝産物

胆管カニュレーションを施した Wistar 系ラットに estrone- $4\text{-}^{14}\text{C}$  を投与し 48 hr 胆汁を捕集した。胆汁は直接 Amberlite XAD-2 樹脂, ついで Sephadex LH-20 を用いるカラムクロマトグラフィーに付し, 精製した抱合ステロイド画分の一部は  $\beta\text{-glucuronidase}$  水解さらに solvolysis を行なった。ここに得られた遊離ステロイド画分をセライトの分配クロマトグラフィーで精製し, Chart 3 に示す 9 種の代謝産物を単離した。他方, 残部の抱合体画分は Sephadex G-25, LH-20 を用いるゲル濾過, さらに必要によってはペーパークロマトグラ

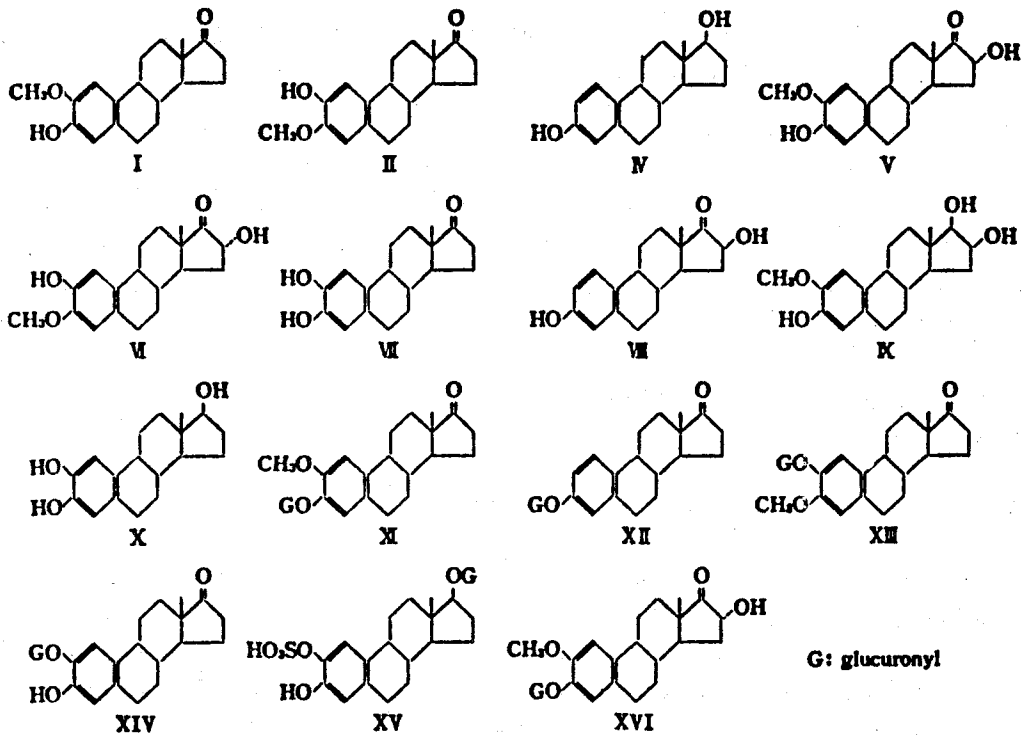


Chart 3

フィーで精製し 6 種の抱合型代謝産物を得た。

これら遊離型ならびに抱合型代謝産物の構造は NMR, IR, Mass スペクトルの物理分析的手法, 呈色反応, 微量化学反応, acetate-methyl ester への誘導などにより確認した。

これらの結果からラットにおける estrogen 代謝はヒトのそれと比較しステロイド核水酸化の様相が大きく異なることが判明した。すなわち, ラットでは芳香核 C-2 水酸化の酵素活性が著しく高いのに反して 16-hydroxylase 活性は比較的 low, C-2 水酸化とそれに伴う 2 位の O-メチル化能がきわめて強い。また従来, *in vivo* における catechol estrogen 3-methyl ether の生成は知られていなかったがラットではそれが methoxy 体総量の約 10-15% を占めること, 2-hydroxyestrogen では C-2 に選択的にグルクロン酸抱合をうけることなども明らかとなった。

### 3. Catechol Estrogen の O-メチル化

各種 estrogen および抱合体の合成標品を基質とし, メチル供与体に S-adenosylmethionine- $O^3H_3$  を用いてラット肝 1,500 × 9 上清における O-メチル化を検討し, Table I, II に示す結果を得た。

Table I. In Vitro Formation of Catechol Monomethyl Ethers from Estrogen Glucuronide<sup>a)</sup>

Substrate	Ratio		
	2-Methoxy	3-Methoxy	
2-Hydroxyestrone 2-glucuronide	dpm 4,900	dpm 3,200	1.5
2-Hydroxyestradiol 3-glucuronide	60,000	19,000	1.5
Estrone	212,000	30,000	7.1
Estradiol 3-glucuronide	95,000	2,700	3.5

a) All incubations were carried out using substrate (200 μg) and [ $^3H$ -methyl]-S-adenosylmethionine ( $2.2 \times 10^6$  dpm).

Table II. In Vitro Formation of Catechol Monomethyl Ethers from Estrogen Sulfate<sup>a)</sup>

Substrate			Ratio
	2-Methoxy	3-Methoxy	2-Methoxy/3-Methoxy
2-Hydroxyestradiol	10,000 dpm	14,300 dpm	0.7
2-Hydroxyestradiol 3-sulfate	15,800	2,200	7.2
Estrone sulfate	8,300	1,200	6.9

a) All incubations were carried out using substrate (200 μg) and [<sup>14</sup>C-methyl]-S-adenosylmethionine (4.4 × 10<sup>5</sup> dpm).

Estrone sulfate, 2-hydroxyestradiol 3-sulfate は estrone, 2-hydroxyestradiol と比較し C-2 水酸基が優位に O-メチル化をうけることから、硫酸抱合がこの選択性に重要な役割を演じている可能性が示唆された。一方 catechol monoglucuronide を基質に用いたときは両水酸基の O-メチル化に選択性はほとんど認められずその生成量も sulfate に比して著しく少なかった。

Table III. Excretion of Catechol Estrogen Monomethyl Ethers in Bile<sup>a)</sup>

Substrate			Ratio
	2-Methoxy	3-Methoxy	2-Methoxy/3-Methoxy
2-Hydroxyestrone	9.40 %	2.80 %	3.4
2-Hydroxyestradiol 3-sulfate	6.20	0.50	12.0
2-Hydroxyestrone 2-glucuronide	0.20	0.15	1.3
Estrone	4.70	0.70	6.7
Estrone sulfate	4.20	0.70	6.0

a) Expressed as per cent of dose administered intravenously to the fistula rat.

さらに, *in vivo*におけるO-メチル化の選択性を検討すべく Table III に示した基質をラットに投与し, 胆汁中の2-および3-methyl etherの生成量をみたところ, *in vitro*の場合と同様O-メチル化における硫酸抱合体の関与を支持する結果を得た。

つぎに, estrone-4-<sup>14</sup>Cと estrone-6, 7-<sup>3</sup>H 3-sulfate (<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C 3.4) をそれぞれ同時投与する二重標識法を駆使して catechol estrogen methyl etherの生成を検討し, Table IV, V に示す結果を得た。

Table IV. In Vivo Formation of Catechol Estrogen Monomethyl Ethers from Estrone-6, 7-<sup>3</sup>H Sulfate and Estrone-4-<sup>14</sup>C in the Rat <sup>a, b)</sup>

	Amount added(mg)	Specific activity (dpm/mg)		
		<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H/ <sup>14</sup> C
2-Methoxy	33.3	308	15.4	20.0
3-Methoxy	37.2	254	33.0	7.7

a) Estrone-6, 7-<sup>3</sup>H sulfate (9.0×10<sup>7</sup> dpm) and estrone-4-<sup>14</sup>C (1.56×10<sup>7</sup> dpm) (<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C=5.7) were administered.

b) Radioactivity of total urinary metabolites was as follows; <sup>14</sup>C, 2.18×10<sup>5</sup> dpm.

Table V. In Vivo Formation of Catechol Estrogen Monomethyl Ethers from Estradiol-6, 7-<sup>3</sup>H 3-Glucuronide and Estrone-4-<sup>14</sup>C in the Rat <sup>a)</sup>

	Radioactivity (dpm)		
	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H/ <sup>14</sup> C
2-Methoxy	1334	1590	0.84
2-Methoxy	936	836	1.12

a) Estradiol-6, 7-<sup>3</sup>H 3-glucuronide (7.5×10<sup>7</sup> dpm, 51 mg) and estrone-4-<sup>14</sup>C (2.2×10<sup>7</sup> dpm, 30 mg) (<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C=3.4) were administered.

前者の組合せによる投与の場合, 尿中代謝産物として得られた2-methoxyestroneの<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C値は2.0であり, estrone sulfateは estroneの約3.6倍の効率で2-methoxy体に変換されることが判明した。しかし, estradiol 3-glucuronide投与の場合には選択性がなくグルクロン酸抱合の寄与はなんら認められなかった。以上の結果生体内における2-methoxyestrogenの産生には estrone sulfateさらにC-2が水酸化された catechol 3-sulfate が中間体と



して重要な役割を演じていることが明らかとなった。

O-メチル化には動物種差がみられ、ラットでは 3-methyl ether が methoxy 体総量の約 10-15% 産生する。その生成機序として estrone の主代謝産物である 2-hydroxyestrone 2-glucuronide の関与が示唆されたことから 2-hydroxyestrone およびその 2-glucuronide をラットに投与し、胆汁中にみられる 2- および 3-methyl ether の生成比を検討した。その結果 2-glucuronide の場合は 1.3, 2-hydroxyestrone では 3.4 であることがわかり、glucuronide 結合を保持したまま C-3 に O-メチル化をうける変換が推測された (Table III)。この点をさらに *in vitro* で証明するため生合成的に調製した 2-hydroxyestrone 2-glucuronide- $^{14}\text{C}$  と S-adenosylmethionine- $\text{C}^3\text{H}_3$  を用い二重標識法で検討した。インキュベーションにより生成した 2-hydroxyestrone 3-methyl ether- $^3\text{H}$  2-glucuronide- $^{14}\text{C}$  は acetate-methyl ester 誘導体について  $^3\text{H}$  の incorporation を、一方  $\beta$ -glucuronidase 処理で遊離した 2-hydroxyestrone 3-methyl ether について  $^{14}\text{C}$  の消失を逆同位体希釈法で確かめることより構造を確認した (Table VI, VII)。

Table VI. Identification of 2-Hydroxyestrone 3-Methyl- $^3\text{H}$  Ether 2-Glucuronoside- $^{14}\text{C}$  by Reverse Isotope Dilution Analysis <sup>a)</sup>

No.	Crystallization from	Specific activity (dpm/mg)		
		$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}/^3\text{H}$
1	MeOH	15,660	3,860	4.1
2	MeOH	14,960	4,150	3.6
3	MeOH	17,000	4,130	4.1

a) Crystallization was carried out on the acetate-methyl ester.

Table VII. Identification of 2-Hydroxyestrone 3-Methyl- $^3\text{H}$  Ether derived from Its 2-Glucuronoside- $^{14}\text{C}$  by Reverse Isotope Dilution Analysis

No.	Crystallization from	Specific activity (dpm/mg)		
		$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{14}\text{C}/^3\text{H}$
1	benzene-hexane	1,170	16,460	0.07
2	benzene-hexane	1,340	16,350	0.08
3	benzene-hexane	1,370	16,450	0.08

これらの結果から 2-hydroxyestrogen 3-methyl ether の産生には主代謝産物である 2-hydroxyestrone 2-glucuronide が重要な中間体であり、これが直接 O-メチル化をうけるものと結論された。

## 審査結果の要旨

本研究はエストロゲンの主代謝産物である 2-hydroxyestrone methyl ether の生成機構を検討し、O-メチル化にみられる位置特異性を抱合との関連において解明したものである。

代謝研究に先だちまず基質として必要な methoxyestrogen および catechol estrogen monoglucuronide の合成を行なった。すなわち estrone acetate の Fries 転位により得られる 2-acetyl 体を Baeyer-Villiger 反応に付して acetoxy 体としたのち加水分解、ついでメチル化により目的物を製した。また、2-hydroxyestradiol の水酸基を保護したのちアセトブROMグルクロン酸メチルエステルとの Koenigs-Knorr 反応に付し、得られる縮合成績体の保護基を一挙に除去して 2-および 3-glucuronide を合成した。

ついでこれらの標品を指標に estrone を投与したラットの胆汁中代謝産物を精査した。その結果 9 種の遊離型、6 種の抱合型代謝産物が単離され、機器データ、微量化学反応などからそれらの構造が解明された。これらのうち主代謝産物である catechol estrogen はほとんどが glucuronide であり、2-methoxy 体 (2-MeO) と 3-methoxy 体 (3-MeO) の量比は約 6 : 1 であった。ついで S-adenosylmethionine をメチル供与体に用いラット肝による methoxy 体の生成を各種基質について検討した。すなわちラット肝 1500×g 上清と  $Mg^{2+}$  の存在下インキュベートしたのち生成物を加水分解、水素化ホウ素ナトリウム還元を付し、得られる 2-hydroxyestradiol 2-および 3-methyl ether を分画してメチル化量をもとめた。2-hydroxyestradiol を基質に用いたときはメチル化に何ら位置特異性はみられなかったがその 3-mono-sulfate, estrone sulfate では 2-MeO と 3-MeO の生成比は約 7 : 1 であった。一方、2-hydroxyestrone 2-glucuronide では抱合体のまま 3 位に O-メチル化をうけることが示唆されたので二重標識法を駆使してこの点の証明を試みた。すなわち UDPGA- $^{14}C$ 、ラット肝ホモジネートを用い生合成的に調製した 2-glucuronide- $^{14}C$  と S-adenosylmethionine- $^3H$  を前述同様インキュベートした。ここに得られた O-メチル化物の一部は acetate-methyl ester に導き同位体希釈法により  $^{14}C/^3H$  が一定となることを確認した。他方、生成物を  $\beta$ -glucuronidase で水解し、遊離する 2-hydroxyestrone 3-methyl ether について同様逆同位体希釈分析を行ない 2 位水酸基に結合した glucuronic acid- $^{14}C$  が消失していることを確かめた。

さらに estrone-4- $^{14}C$  と estrone-6,7- $^3H$  sulfate を同時にラットに投与後尿中代謝産物の 2-hydroxyestradiol 2-および 3-monomethyl ether を分離し  $^{14}C/^3H$  を測定したところ estrone sulfate は estrone に比し約 3.6 倍の量比で 2-methoxy 体に変換されること

が明らかとなった。また, estrone-4- $^{14}\text{C}$ と estradiol-6, 7- $^3\text{H}$  3-glucuronide 投与の場合では 2-MeOと 3-MeOの $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ に顕著な差はみられず glucuronideはいったん加水分解されたのち変換をうける経路が示唆された。

以上, 本研究は catechol estrogen の C-2 における選択的 O-メチル化に 3 位の硫酸抱合, 一方ラットにおける 3-methyl ether 生成には 2-glucuronide が関与することを明らかにするなどエストロゲン代謝における抱合の意義に数々の新知見を加えたものであり学位論文として十分価値あるものと認める。