

2,2-Dimethylandrostedioneのアロマターゼ反応における メタボリックスイッチングに関する研究： 予測代謝物の合成とアロマターゼ阻害活性

山田 恵子, 伴田和香子, 長岡 正男, 沼澤 光輝*

Study of Aromatase-Catalyzed Metabolic Switching of 2,2-Dimethylandrostedione: Synthesis of Possible Metabolites and Their Inhibitory Activities of Aromatase

Keiko YAMADA, Wakako HANNA, Masao NAGAOKA, and Mituteru NUMAZAWA*

(Received November 22, 2004)

Aromatase is a cytochrome P-450 enzyme responsible for the conversion of androgens to estrogens. 2,2-Dimethylandrostedione (**5**) is one of the powerful inhibitors of the enzyme. To explore a metabolic switching in the aromatase-catalyzed biotransformation of the 2,2-dimethyl steroid **5**, possible switching metabolites, the 6 β -hydroxy and 6-ene derivatives **9** and **14**, as well as 2 α -methyl-6 β -ol **12** were synthesized and their inhibitory activities of aromatase in human placental microsomes were determined. All of the steroids synthesized were good competitive inhibitors of the enzyme with apparent K_i values ranging from 23 to 110 nM.

Key words — Aromatase; Metabolic switching; 2,2-Dimethylandrostedione; 6 β -Hydroxy steroid; Synthesis; Aromatase inhibition

アロマターゼはアンドロステジオン(AD, **1**)やテストステロンなどのアンドロゲンを経由してエストロンやエストラジオールへの変換を触媒するシトクロムP-450酵素である。¹⁻³⁾この芳香核化反応は、これらアンドロゲンの3回の連続した酸素添加反応による19-メチル基の切断と1,2-水素の脱離を伴い進行する。^{4,5)}このうち最初の2回は19位で起き19-ヒドロキシ体(**2**)を経て19-オキソ体(**3**)を生成する。3回目の反応については、いまだ不明なところが在り、19位をペルオキシドの形で攻撃する説⁶⁾が有力であるが2位水酸化反応説⁷⁾もある(Fig. 1)。アロマターゼの阻害剤は、最近エストロゲン依存性乳がんの治療薬として広く用いられるようになってきているが、これまでにステロイド性のアロマターゼ阻害剤が数多くデザインされている。^{8,9)}

Furth等¹⁰⁾は、2,2-dimethylAD (**5**)が優れたアロマターゼ拮抗阻害剤($K_i=2.3$ nM, ADに対す

る $K_m=20$ nM)であり、これまでに開発されたステロイド性阻害剤の中で最も強力なものの一つであることを見出した(Fig. 2)。一方、アロマターゼ自殺基質である4-hydroxyADや6-oxoADの2,2-dimethyl誘導体(**6**と**7**)は、アロマターゼの拮抗阻害活性を保持するものの自殺基質としての特性を失うことから、2,2-dimethyl基が、これらの19位酸素化反応を経る自殺基質作用発現を妨害することが示唆されてきた。^{10,11)}また、先に我々は、化合物**5**がアロマターゼにより19位水酸化体に代謝されないことを、GC-MS分析により明らかにし、2,2-dimethyl基が、天然基質ADのアロマターゼ反応を立体障害的に妨害することを報告した。¹²⁾一方、ADの19位にトリチウムを標識すると、そのアイソトープ効果により、C(19)-H結合の酵素切断反応が抑制され、その代償として、19-methyl基と1,3-diaxialの関係にあり19位と空間距離の近い2 β

位が, アロマトラーゼにより水酸化されるメタボリックスイッチングの発現することが知られている。¹³⁾

前述のADのアロマトラーゼ反応機構における2位水酸化説をも踏まえ, これら以前に報告された結果から, 2,2-dimethyl基がアロマトラーゼ反応のメタボリックスイッチングを引き起こし, 19-methylともう一つの1,3-diaxialの関係にある6β位水酸化反応を惹起する可能性が推測された。そこで, このことを明らかにするための研究の一環として, 予測される代謝物の合成とそれらのアロマトラーゼ阻害活性を検討したので報告する。

結果および考察

先に, 予測される化合物を合成した。すなわち, 2,2-dimethylAD (5)を硫酸存在下 orthomethylformate

との反応に付した。ついで, エノールエーテル生成物を取り出すことなく, EtOH中攪拌しながら室温で太陽光に2日間さらした。¹⁴⁾ 粗生成物を再結晶し6β-hydroxy体9 (55%)を得た (Fig. 3)。一方その母液から, カラムクロマトグラフィー精製にて6-oxo体7 (12%)を単離した。化合物9の6位立体配置は, 従来の報告¹⁴⁾と¹H-NMRスペクトロメトリーにおいて, 19-methyl基の水素 (δ 1.49 ppm)又は6α-水素 (δ 4.44 ppm)を照射しても, いずれもこれら水素シグナルのNOE増強が観察されなかったことより確認した。一方, 化合物5をSeO₂を用いる酸化反応¹⁴⁾に付したところ一工程で6β-hydroxy体9を得ることが出来たが, 収率は17%と低いものであった。アロマトラーゼの効率的な基質として知られ, 芳香核化, すなわち, 19位酸素化反応を受ける2α-methylAD (10)¹²⁾を, 前述同様にformate試薬による処理次いで光照射し, 6β-hydroxy体12を

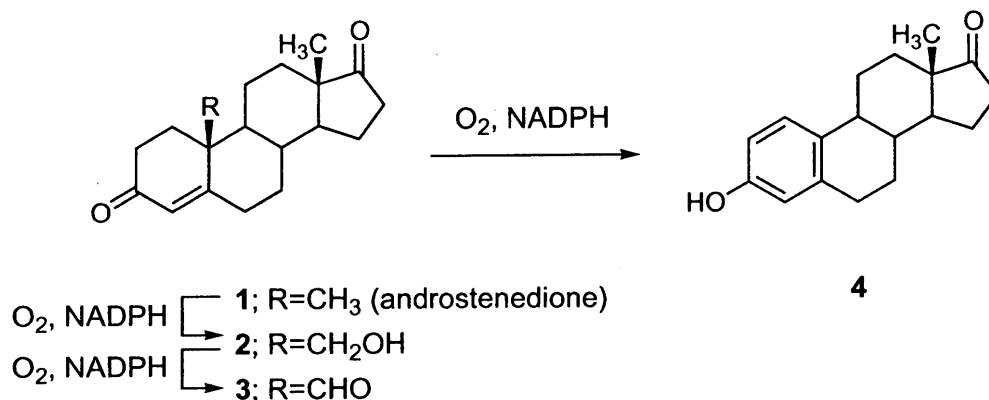


Fig. 1. Aromatization Sequence of Androstenedione (AD) with Human Placental Aromatase.

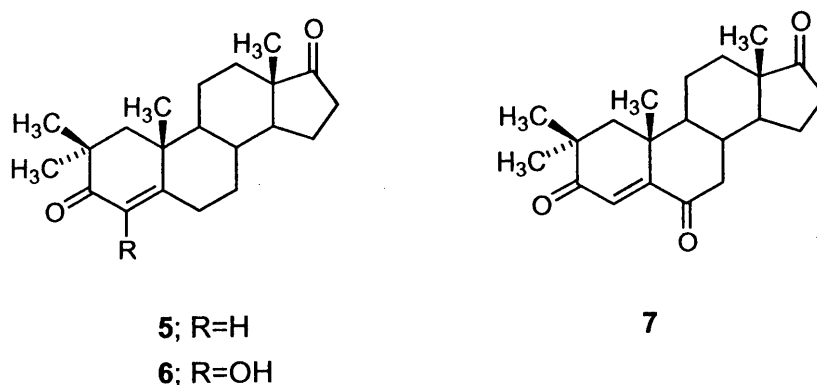


Fig. 2. Structures of Aromatase Inhibitors with a 2,2-Dimethyl Group.

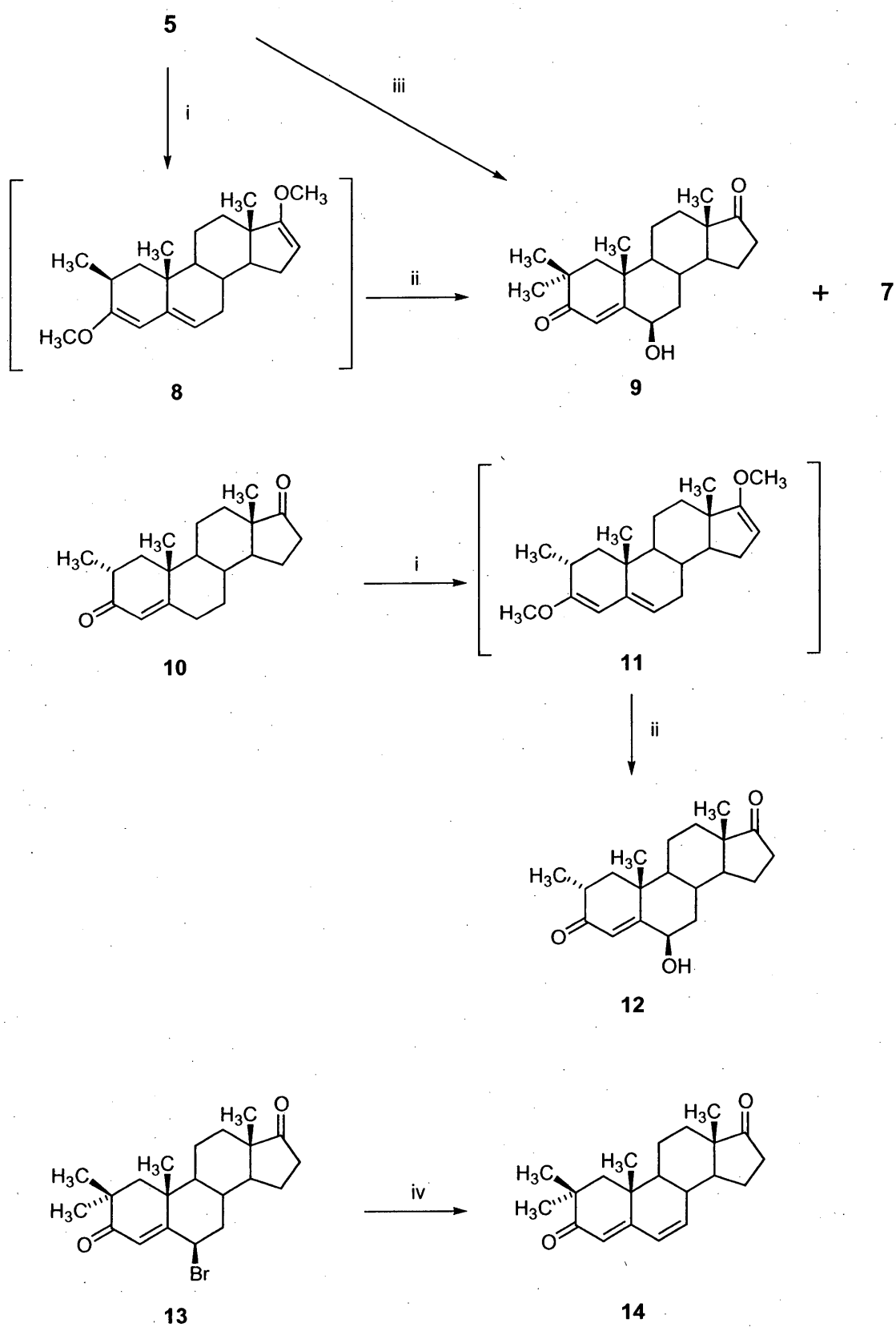


Fig. 3. Synthesis of Possible Metabolites of 2,2-DimethylAD (5). Reagents: i) orthomethylformate, H₂SO₄, MeOH, CH₂Cl₂; ii) sunlight, EtOH; iii) SeO₂, dioxane; iv) CaCO₃, DMF.

60%の収率で得た。このとき、6-oxo誘導体の生成は確認できなかった。

先に合成した2,2-dimethyl-6-bromoAD (**13**)¹⁵⁾をDMF中CaCO₃処理し4,6-diene化合物**14**(54%)を得た。この化合物は、6 β -ol **9**の脱水生成物であり、アロマトラーゼ反応の2次生成物として考えられるものである。

ここに合成した化合物の種々スペクトルデータは、いずれも構造を支持した。

次いで、これら化合物のアロマトラーゼに対する親和性を阻害活性から求めた。アロマトラーゼ活性は、酵素源としてヒト胎盤マイクロゾームを用い、[1 β -³H]ADを基質とするラジオメトリック法、すなわち、酵素反応によりインキュベーション液に放出されるトリチウム水の量から酵素活性をもとめた。¹⁶⁾ Table 1に比較化合物と共にその結果を示した。化合物**9**、**12**と**14**は、いずれもIC₅₀値が約1200nM以下とアロマトラーゼに高い親和性を示した。これら化合物は、Lineweaver-Burkプロットから拮抗阻害剤であり、Dixonプロットで求めた阻害定数(K_i値)が23-110nMと小さく、ステロイド性化合物としては比較的強力な阻害剤であった。6 β -Hydroxy体**9**と**12**の阻害活性は強いにもかかわらず、それぞれの母化合物**5**と**10**のそれに比較し低く、ADシリーズと同様に、^{17,18)} 6 β -水酸基の導入が親和性の低下を引き起こすことが判明した。一方、4,6-diene体**14**は、最も強い阻害活性を示し、そのK_i値

(23nM)は基質ADのK_m値よりも小さいものであった。化合物**14**のLineweaver-BurkプロットをFig. 4に示す。

また、4,6-diene**14**は、NADPH非存在下時間依存的にアロマトラーゼを不活性化せず、逆に残存活性が阻害剤存在下、コントロール値よりも高い物となった(Fig. 5)。この結果は、本阻害剤が、プレインキュベーション中での酵素の失活を保護したことを意味し、自殺基質としての特性を持たないことを明らかにした。母化合物4,6-dieneステロイドの場合^{19,20)}も同様な結果が得られており、2,2-dimethyl基を導入することにより、不活性化反応に関する母化合物の特性を変えることはなかった。

以上、今回合成された2,2-dimethylAD (**5**)の誘導体は、アロマトラーゼに対する親和性も高く、現在メタボリックスイッチング代謝物としての同定を検討中である。

実験の部

2,2-DimethylAD (**5**),¹⁰⁾ 2 α -methylAD (**10**),¹²⁾ 6 β -bromo-2,2-dimethylAD (**13**)¹⁵⁾は、文献に従い合成した。[1 β -³H]AD(27.5 Ci/mmol; ³H-distribution, 74-79% at 1 β)は、New England Nuclear Corp. (Boston, MA, USA)から購入した。NADPHは興人株式会社(東京)のものを用いた。

融点は柳本融点測定装置(京都)を用い測定

Table 1. Aromatase inhibition by 2,2-dimethyl- and 2 α -methylandrostenedione analogs

Steroid	IC ₅₀ , nM ^{a)}	K _i , nM ^{b)}	Inhibition ^{c)}
2,2-Dimethyl-6 β -ol 9	540	60	Competitive
2,2-Dimethyl-4,6,-diene 14	225	23	Competitive
2 α -Methyl-6 β -ol 12	1200	110	Competitive
For comparison			
2,2-Dimethyl 5	89	8.8	Competitive
2 α -Methyl 10	690	55	Competitive

a) A concentration of 300 nM of [1 β -³H] androstenedione and 20 μ g of protein from human placental microsomes were used.

b) Inhibition constant was obtained by Dixon plot. In these experiments, the apparent K_m for the substrate androstenedione was found to be about 33 nM.

c) Inhibition type was determined by Lineweaver-Burk plot.

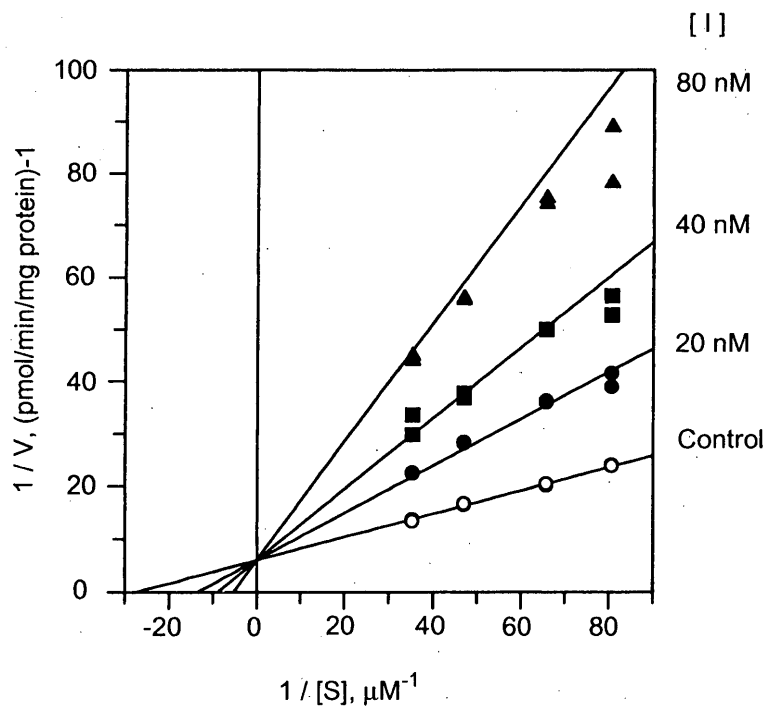


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of inhibition of human placental aromatase by 2,2-dimethyl-4,6-diene steroid **14** with AD as a substrate. Each point represents the mean of two determinations, which varied by less than 5% of the the mean. The inhibition experiments performed with all of the other steroids gave essentially similar plots (data not shown).

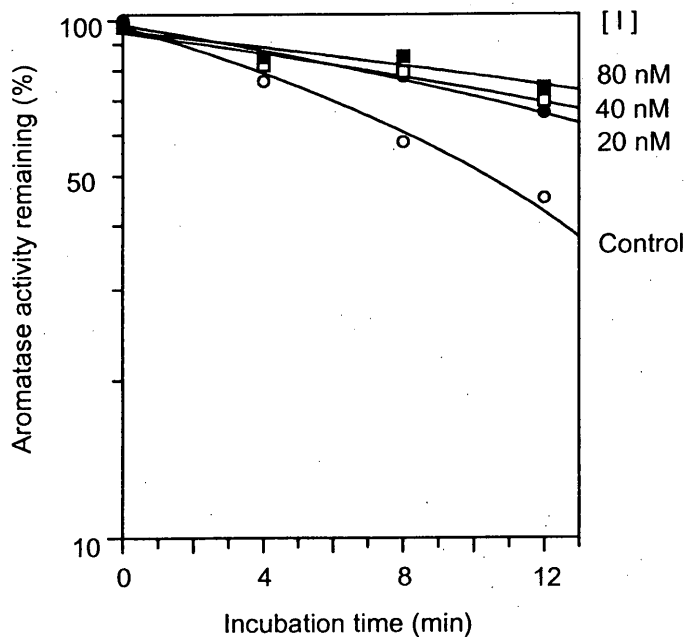


Fig. 5. Time-dependent inactivation by 2,2-dimethyl-4,6-diene steroid **14** in the presence of NADPH in air. The aromatase activity remaining under 0-min preincubation and the no inhibitor samples equals 100% activity (120 pmol/min/mg protein). Each point represents the mean of two determinations that varied less than 5% of the mean.

し, 未補正. IR スペクトルはKBr ペレットとして Perkin-Elmer FT-IR 1725X スペクトロメーター (Norwalk, CT, USA) で, UV スペクトルは95% EtOH 溶液で日立 150-200UV スペクトロメーター (東京) を用い, それぞれ測定した. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは, tetramethylsilane を内標とし CDCl_3 溶液中 日本電子 JEOL EX270 (270 MHz) スペクトロメーター (東京) で, MS スペクトルは, 日本電子 JEOL JMS-DX303 スペクトロメーター でそれぞれ求めた. 薄層クロマトグラフィー (TLC) は, 0.25mm 層長 silica gel 60F-254 を, また, カラムクロマトグラフィーは, silica gel 60, 70-230 メッシュ (E. Merck, Darmstadt, German; 展開溶媒, いずれも, hexane-EtOAc) を, それぞれ用いて行った.

2,2-Dimethyl-6 β -hydroxyandrost-4-en-17-one (9) の合成

(A) 2,2-DimethylAD (5) (215mg, 0.68 mmol) を CH_2Cl_2 (3mL) に溶かし, この溶液に dioxane (1.4mL), dry MeOH (0.01mL), orthomethylformate (0.36mL, 3.29mmol) と H_2SO_4 (2 drops) を加え, この混合液を氷冷下 7.5h 攪拌. その後, pyridine (5 drops) を加え, 反応液を減圧下濃縮. EtOAc (100mL) で希釈, 水洗, Na_2SO_4 乾燥後, 溶媒留去し粗生成物 (210mg) を得. このものは, TLC 分析で3スポットを示す化合物の混合物であったが, 不安定で精製過程で分解することから, 生成物 enoether 8 を単離せずに次の反応に付した.

粗生成物 8 (200mg) を EtOH (30mL) に溶かし, 攪拌しながらこの溶液を室温で太陽光に2日間さらし, 生成する沈殿物をろ取後, 溶媒を減圧留去. 残渣を acetone より再結晶し化合物 9 (120mg, 55%) を無色針状晶として得. 化合物 9: mp 216-220 °C; FT-IR ν 3468 (OH), 1663 and 1738 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} ; UV λ_{max} 237nm ($\epsilon=13,200$); $^1\text{H-NMR}$ δ 0.95 (3H, s, 18-Me), 1.12 and 1.23 (3H each, s, 2-Me₂), 1.49 (3H, s, 19-Me), 4.44 (1H, t, $J=2.7\text{Hz}$, 6-H), 5.80 (1H, s, 4-H); MS m/z (relat. int.) 330 (M^+ , 48), 274 (100), 256 (18), 241 (10), 178 (22). Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$: C, 76.32; H, 9.15. Found: C, 75.98; H, 9.35.

この母液をカラムクロマトグラフィーにて精

製し, 2,2-dimethylandrost-4-ene-3,6,17-trione (7) (24mg, 12%) を副生成物として得. 化合物 7: mp 192-195 °C (lit.¹¹) 191-193 °C; $^1\text{H-NMR}$ δ 0.94 (3H, s, 18-Me), 1.16, 1.24, and 1.28 (3H each, s, 2-Me₂ and 18-Me), 6.08 (1H, s, 4-H).

(B) 化合物 5 (52mg, 0.16mmol) の dioxane (5mL) 溶液に SeO_2 (74mg, 0.67mmol) を加え 100 °C で 32h 加熱. 固形物をろ取後, EtOAc (100mL) で希釈し水洗後 Na_2SO_4 で乾燥. 溶媒を減圧下留去し油状物 (50mg) を得. このものをカラムクロマトグラフィーにて精製し, 化合物 9 (9mg, 17%) を得; mp 217-220 °C. 本品は, 先に合成したものと種々スペクトルが一致した. 2 α -Methyl-6 β -hydroxyandrost-4-ene-3, 17-dione (12) の合成

2 α -MethylAD (10) (150mg, 0.50mmol) を前述の化合物 5 の反応の場合と同様に orthomethylformate で氷冷下処理した [CH_2Cl_2 , 2.1mL; dioxane, 0.98mL; MeOH, 10 μL ; orthomethylformate, 0.31mL, 2.38mmol; H_2SO_4 , 2 drops; 4h]. 反応終了後, pyridine (5 drops) を加え前と同じように後処理をして粗生成物 11 (180mg) を得. この物を精製することなく次の反応に用いた.

粗化合物 11 (120mg) を EtOH (10mL) に溶かし, 前述同様室温で太陽光に2日間さらした. 固形物をろ取後, 溶媒を減圧下留去し, 残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製, ついで acetone-hexane で再結晶し化合物 12 (50mg, 43%) を得. 化合物 12: mp 153-156 °C; FT-IR ν 3449 (OH), 1660 and 1738 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} ; UV λ_{max} 236nm ($\epsilon=11,700$); $^1\text{H-NMR}$ δ 0.95 (3H, s, 18-Me), 1.12 (3H, d, $J=6.6\text{Hz}$, 2 α -Me), 4.41 (1H, s, 6 α -H), 5.82 (1H, s, 4-H). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$: C, 77.90; H, 6.54. Found: C, 77.56; H, 6.77.

2,2-Dimethylandrosta-4,6-diene-3,17-dione (14) の合成

2,2-Dimethyl-6 β -bromoAD (13) (58mg, 0.15 mmol) の DMF (2.5mL) 溶液に CaCO_3 (39mg, 0.39mmol) を加え 1.5h 加熱還流した. 反応液を EtOAc (50mL) で希釈後水洗, 乾燥 (Na_2SO_4) し, 溶媒留去. 得られた油状物をカラムクロマトグラフィーついで acetone からの再結晶にて

精製し、化合物 **14** (20mg, 44%) を得。化合物 **14**: mp 168-170 °C; FT-IR ν 1656 and 1736 (C=O) cm^{-1} ; UV λ_{max} 282nm ($\epsilon=24,800$); $^1\text{H-NMR}$ δ 0.97 (3H, s, 18-Me), 1.16 and 1.23 (3H each, s, 2-Me₂), 1.27(3H, s, 19-Me), 5.68 (1H, s, 4-H), 6.11-6.23 (2H, m, 6- and 7-H); MS m/z (relat. int.) 312(M⁺, 37), 284(27), 269(28), 256(100), 171(10). Anal. Calcd for C₂₁H₂₈O₂: C, 80.73; H, 9.03. Found: C, 80.52; H, 9.14.

アロマターゼ酵素源の調製

ヒト胎盤ミクロゾームは、Ryanらの方法²¹⁾に従い、105,000xg, 60-min遠心のペレットとして調製し、0.05mM dithiothreitolで洗浄後凍結乾燥し-20°Cで保存した。この条件下約6ヶ月間アロマターゼ活性は保持された。

アロマターゼ活性測定

アロマターゼ活性は、SiiteriとThompsonの方法¹⁶⁾すなわち、[1 β -³H]ADを基質としてインキュベートするとき、インキュベーション混合液中に放出されるトリチウム水を指標として測定した。可逆的ならびに時間依存的・不可逆的不活性化反応は、我々が先に報告した条件を用いた。²²⁾簡潔に述べると、20 μ g蛋白の凍結乾燥ミクロゾームとNADPHとともに空気のもとで、67mMリン酸緩衝液(pH,7.5, 0.5mL)の中で標識基質を阻害剤存在下インキュベート。時間依存的な不活性化実験では、200 μ gミクロゾーム蛋白を用い、4, 8, 12minのプレインキュベーション後、その1/10を残存アロマターゼ活性の測定に供した。

謝辞 本研究は、文部科学省科学研究費にて一部援助を受けた。ヒト胎盤の供与を頂いた今泉産婦人科医院(仙台市)・院長今泉英明氏に深謝する。

REFERENCES

- 1) Thompson E. F., Jr., Siiteri P. K., *J. Biol. Chem.*, **249**, 5373-5378 (1974).
- 2) Kellis J. T., Vickery L. E., *J. Biol. Chem.*, **262**, 4413-4420 (1987).
- 3) Yoshida N., Osawa Y., *Biochemistry*, **30**, 3003-3010 (1991).
- 4) Oh S. S., Robinson C. H., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **44**, 389-397 (1993).
- 5) Athtar M., Lee-Robichaud P., Akhtar M. E., Wright J. N., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **61**, 127-132 (1997).
- 6) Cole P. A., Robinson C. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1284-1285 (1988).
- 7) Hahn E. F., Fishman J., *J. Biol. Chem.*, **259**, 1689-1699 (1984).
- 8) Brodie A. M. H., Njar V. C. O., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **66**, 1-10 (1998).
- 9) Johnston J. O., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 375-405 (1998).
- 10) Furth P. S., Rosenberger J., Marcotte P. A., Robinson C. H., *J. Enzyme Inhib.*, **4**, 131-135 (1990).
- 11) Numazawa M., Tachibana M., *Steroids*, **59**, 579-585 (1994).
- 12) Numazawa M., Watari Y., Yamada K., Uemura N., Handa W., *Steroids*, **68**, 503-513 (2003).
- 13) Osawa Y., Higashiyama T., Fronckowiak M., Yosida N., Yarborough C., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **27**, 781-789 (1987).
- 14) Thalen A., Wickstrom L.-I., *Steroids*, **65**, 16-23 (2000).
- 15) Numazawa M., Handa Y., Yamada K., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1878-1882 (2004).
- 16) Siiteri P. K., Thompson E. A., Jr., *J. Steroid Biochem.*, **6**, 317-322 (1975).
- 17) Numazawa M., Tsuji M., Osawa Y., *Steroids*, **48**, 347-359 (1986).
- 18) Numazawa M., Kamiyama T., Tachibana M., Oshibe M., *J. Med. Chem.*, **39**, 2245-2252 (1996).
- 19) Li P.-K., Brueggemeier R. W., *J. Med. Chem.*, **33**, 101-105 (1990).
- 20) Numazawa M., Oshibe M., Yamaguchi S., *Steroids*, **62**, 595-602 (1997).
- 21) Ryan K. J., *J. Biol. Chem.*, **234**, 268-272 (1975).
- 22) Numazawa M., Mutsumi A., Hoshi K., Osibe M., Ishikawa E., Kigawa K., *J. Med. Chem.*, **34**, 2496-2504.