

多剤耐性克服を目指した
分子構築に関する基礎的研究

甲第29号

全 洪吉

多剤耐性克服を目指した
分子構築に関する基礎的研究

全 洪吉

目 次

総論の部	1
序 論	1
第一編 Diosgenin の構造変換生成物と癌細胞増殖抑制活性	3
第一章 各種スピロスタン型及びフロスタン型誘導体の合成と ヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 に対する増殖抑制活性	6
第 1 節 スピロスタン型誘導体の合成	6
第 2 節 フロスタン誘導体 (pseudodiosgenin 及び pseudodiosgenone 誘導体) の合成	13
第二章 Diosgenin から側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体 及び関連化合物の合成と癌細胞増殖抑制活性	20
第 1 節 側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体の合成	20
第 2 節 側鎖にヘテロスピロ環を持つビタミン D 型誘導体の 合成の試み	25
第 3 節 側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体及び 関連化合物の癌細胞増殖抑制活性	27
第 4 節 スピロスタン型、フロスタン型及び側鎖にスピロ環を持つ ビタミン D 型の 3 つのタイプの化合物に関する アポトーシス誘導メカニズムの解析	29
第三章 小括	34
第二編 アルキルアロエニン及びアルキルアロエニン硫酸エステル 誘導体の合成と癌細胞増殖抑制活性	35
第一章 アルキルアロエニン誘導体の合成と癌細胞増殖抑制活性	35
第 1 節 アルキルアロエニン誘導体の合成	36
第 2 節 アルキルアロエニン誘導体の癌細胞増殖抑制活性	37

第 3 節	アルキルアロエニン誘導体の疎水性と HCT 116 及び Hep G2 細胞に対する増殖抑制活性との関係	39
第 4 節	アルキルアロエニン誘導体の HCT 116 細胞及び P-糖 タンパクが過剰に発現している HCT 116 / VCR100-1-1 細胞に対する増殖抑制活性の比較	40
第二章	アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体の合成と 癌細胞増殖抑制活性	41
第 1 節	アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体の合成	42
第 2 節	アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体の癌細胞増殖 抑制活性	42
第三章	小括	43
結論		44
謝辞		46
実験の部		47
一般事項		47
合成実験項		48
第一編 第一章の実験		48
第二章の実験		67
第二編 第一章の実験		81
第二章の実験		89
生物実験項		94
RT-PCR 実験項		96
参考文献		98

総論の部

総論の部

序論

癌は、現在でも日本人の死亡原因の第一位¹⁾となっている疾病で、数多くの抗癌剤や癌化学療法の開発をもってしても、未だ克服出来ない難病とされている。癌の治療は大きく分類すると、(1) 外科療法、(2) 放射線療法、(3) 内分泌療法、(4) 化学療法、(5) 免疫療法に分けることができる²⁾。現在では、化学療法という言葉は主に抗癌剤治療のこととまで言われ、癌治療に様々な薬物が使用されてきている。癌細胞は正常細胞と異なり、異常に増殖することが知られており、抗癌剤の多くは癌細胞の増殖を抑える働きを目的にするものである。しかしながら、盛んに増殖する癌細胞は当然抗癌剤の働きによって増殖は抑えられるが、正常な細胞の増殖も同時に抑制し、体内の臓器を始めとする様々な器官の不調を来し、脱毛、吐気、食欲不振、倦怠感などをはじめ様々な副作用が現れる。また、このような副作用の他に、抗癌剤の臨床使用で問題とされていることに多剤耐性 (multidrug resistance (MDR)) の問題がある。これは、化学構造も作用機序も異なる種々の抗癌剤に対して癌細胞が抵抗性を示すことで、効果を十分発揮するためにはより多くの投与量が必要になり、益々副作用の問題が大きくなるのが、臨床での抗癌剤使用の Dose limiting factor ともなっている。現在、この多剤耐性は、癌患者に対して効果的に化学療法を行う上で、大きな障害になっており、癌患者に投与された薬物が癌細胞膜上の MDR1 (P-糖タンパク; P-glycoprotein; P-gp) などのいわゆる薬物汲み出し機構 (efflux system) の過剰発現により、薬物が癌細胞に取り込まれて作用を発揮する以前に細胞外へ追出されてしまい、その効果が発揮できないか、効果を発揮するためにより多くの薬物投与が必要になり、その結果、副作用が増強されてしまう³⁻⁶⁾。この多剤耐性の克服に関する問題解決の研究は世界的規模でなされており、近年のモジュレーター (modulator) 開発は著しい発展を遂げている。このモジュレーターは、直接癌細胞増殖抑制活性を持たないが、P-糖タンパクの薬物汲み出しを抑える効果を持ち、その結果、投与された薬物が十分活性を示すようになるものである。現在までに、calcium channel blockers, calmodulin antagonists, steroidal agents, protein kinase inhibitors, immunosuppressive drugs, protein kinase やある種の界面活性剤などがモジュレーターの候補となっている^{7, 8)}。一方、当臨床薬物化学研究室では、界面活性剤としての性質を持ち天然から単離したサポニ

ンのアグリコン部の構造変換と種々の糖の組合せによる分子構築を行って、これまで肝庇護効果⁹⁻¹⁵⁾及び抗 HIV 活性¹⁶⁾の構造 - 活性相関について研究し報告してきた。

今回、上述したように、ある種のステロイド剤や界面活性剤がモジュレーターになり得る可能性があることから、著者は、薬物の構造 - 活性相関の研究を行う中で癌細胞増殖抑制活性の発現とモジュレーターの可能性に関する一般的な法則を見出すべく基礎的研究を進めた。そして、その基礎的情報を得るためにそれ自身癌細胞増殖抑制活性をほとんど示さないか、あるいは弱い活性を示し、容易に入手し得るヤマノイモの主成分であるステロイド化合物 diosgenin 及びキダチアロエから単離した aloenin をリード化合物として種々分子構築し、それらの主としてヒト結腸上皮癌細胞であり P-糖タンパクがほとんど発現していない HCT 116 細胞とヒト肝上皮癌細胞であり P-糖タンパクが発現している Hep G2 細胞を用いて、活性の評価・比較を行った。その結果、モジュレーターの開発には未だ到達しなかったが、多剤耐性の一因となる癌細胞の持つ P-糖タンパクに感受性が低く、顕著な癌細胞増殖活性を持つ薬物を見出した。また、Hep G2 細胞において、スピロスタン型及び側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体は p53 依存的に、一方、フロスタン型誘導体は p53 非依存的にアポトーシスを誘導していることを明らかにした。

本論文は、著者が、これまで一貫して求めてきた、より活性を高めかつより副作用を軽減した薬物、あるいは多剤耐性を克服した薬物の開発を目指した基礎的研究であり、第一編としてヤマノイモの主成分である diosgenin の構造変換による癌細胞増殖抑制活性の発現、第二編としてキダチアロエの主成分である aloenin の疎水性・界面活性性と癌細胞増殖抑制活性との関連性を検討したものである。

第一編 Diosgenin の構造変換生成物と癌細胞増殖抑制活性

Diosgenin 1^{17,18)} は、ヤマノイモ (山薯、山芋、薯蕷、自然生) (*Dioscorea japonica* Thunb. *Dioscoreaceae*) のステロイドサポニン (steroid saponin) のアグリコン (aglycone) である¹⁹⁾。ステロイドサポニンは、ユリ科やヤマノイモ科、リュウゼツラン科などの単子葉植物に多く見られ、主な生薬としては知母 (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge, *Liliaceae*) や麦門冬 (*Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler, *Liliaceae*) などがある。

ステロイドサポニンの薬理活性に関しては、生薬知母から単離されたスピロスタン (spirostane) 型である **timosaponin A-III** (Figure 1) に血小板凝集抑制作用²⁰⁾が、また、その F 環が開環したフロスタン (furostane) 型の **pseudoprototimosaponin A-III** (Figure 1) に抗糖尿病作用²¹⁾が認められている。ユリ科植物の *Liriope muscari* からは

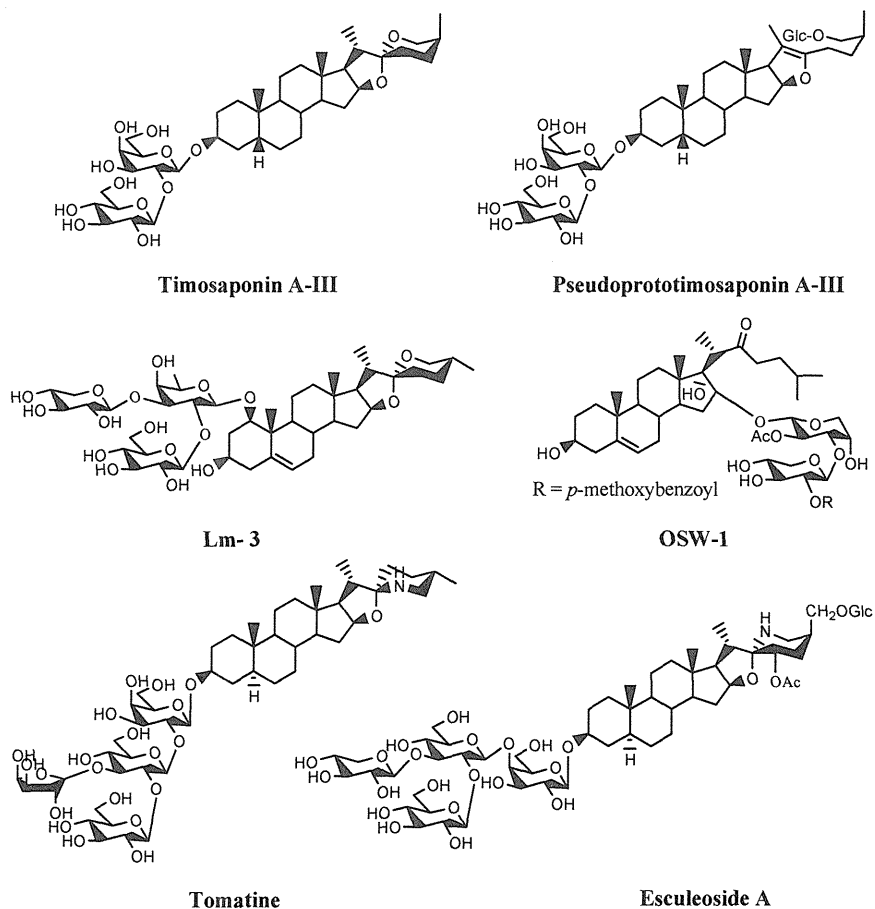


Fig. 1. Steroid saponins

(25*R*)-ruscogenin-1-*O*-[β -D-glycopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-fucopyranoside (**Lm-3**) (Figure 1) が単離され、動物モデルにおいての顕著な抗炎症作用²²⁾が認められている。さらに、Wu ら²³⁾により、ルスコゲニン (ruscogenin) とそのサポニン **Lm-3** の肝障害ラットに対する肝機能改善作用が報告されている。同じく、ユリ科植物 *Ornithogalum saundersiae* から単離された 3 β ,16 β ,17 α -trihydroxycholest-5-en-22-one-16-*O*-(2-*O*-4-methoxybenzoyl- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-2-*O*-acetyl- α -L-arabinopyranoside (**OSW-1**) (Figure 1) は、ヒト白血病細胞 HL-60 とマウス白血病細胞 P388 に対して臨床で使われている抗癌剤であるマイトマイシン C (mitomycin C) (MMC)、シスプラチン cisplatin (CDDP)、カンプトテシン camptothecin (CPT)、エトポシド etoposide (VP-16)、アドリアマイシン (adriamycin, ADM) 及びメトトレキサート methotrexate (MTX) などの 10-100 倍強い癌細胞増殖抑制活性²⁴⁾を持つと報告されている。その他、ナス科のトマトの葉から単離されたトマチン **tomatine** (Figure 1) にはバクテリアや真菌の増殖を抑制する作用²⁵⁾が、また、最近トマト果実から単離された **esculeoside A** (Figure 1) に、乳癌細胞株 MCF-7 に対する増殖抑制作用²⁶⁾が認められている。

このように、スピロスタン型である **tomosaponin A-III** と **Lm-3**、ヘテロスピロスタン (heterospirostane) 型である **tomatine** と **esculeoside A**、また、スピロ環が開環したフロスタン型である **pseudoprototimosaponin A-III** は、種々の生物活性作用が判明されているが、その薬理活性の違いがそれらの持つ構造とどのような関係があるかについては未だ不明であった。

今回、著者は、上記の化合物の構造と活性の関連性を調べる初期研究としてスピロスタン型である **diosgenin 1** の分子構造の変換によって得た誘導体の薬理活性を、癌細胞増殖抑制活性を標的として評価し、構造と活性の相関性を検討することとした。

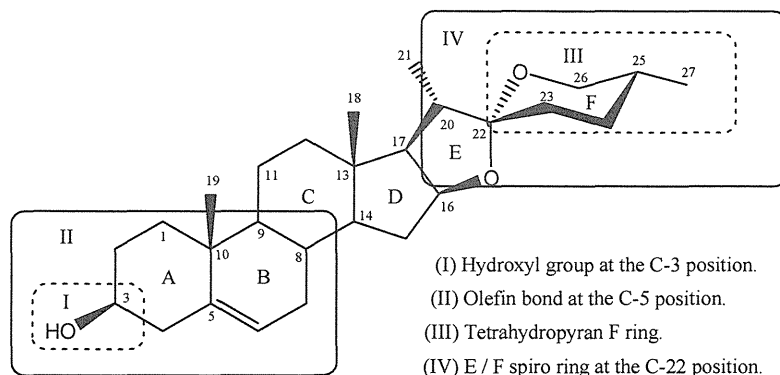


Fig. 2. Structure of diosgenin 1

Diosgenin 1 は Figure 2 に示したように、その分子中に、(I) A 環の 3 位に水酸基、(II) A 環と B 環にまたがる 5 位に二重結合、(III) F 環のテトラヒドロピラン (tetrahydropyran) 環、(IV) E 環と F 環が 22 位で形成するスピロ環など、化学変換し得る官能基を有している。これら官能基を利用して diosgenin 1 の構造を化学的に変換することにより、Figure 3 に示すように、スピロスタン型、フロスタン型および側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型の 3 つのタイプの誘導体を合成し、それらのヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 及びヒト肝上皮癌細胞 Hep G2 細胞に対する細胞増殖抑制活性と化学構造との相関性を検討した。さらに、P-糖タンパク²⁷⁾ が発現している Hep G2²⁸⁻³⁰⁾ 細胞における増殖抑制作用のメカニズムを解明する目的で、アポトーシス (apoptosis)³¹⁾ の関連遺伝子である *p53*、*p21*、*Bax* および *Bcl-2* の mRNA 量の変化を RT-PCR 法³²⁾ で評価した。

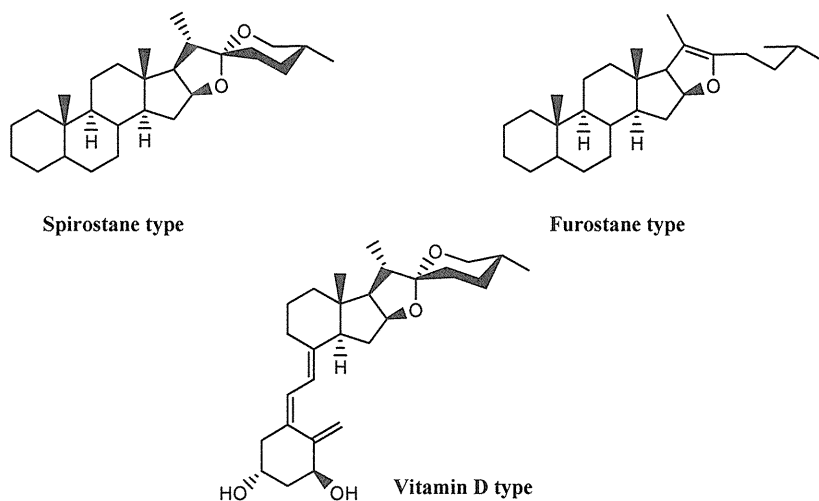


Fig. 3. Structures of spirostane, furostane and vitamin D type.

第一章 各種スピロスタン型及びフロスタン型誘導体の合成とヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 に対する増殖抑制活性

Ikeda ら³³⁾は、スピロスタン型の F 環の立体配座が diosgenin 1 と同様であるステロイドサポニンは、ヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 に対する増殖抑制活性の増強に寄与していると報告している。著者は先ず Ikeda らの知見を基に、diosgenin 1 の F 環の立体配座を変化させず、A 環、B 環の構造変換及び F 環上に他のヘテロ原子の導入を行い、各種スピロスタン型誘導体を合成することにした。次に、F 環が開環した側鎖の 26 位に各種含窒素官能基の導入を行なって、各種フロスタン型誘導体を合成し、それらの癌細胞増殖抑制活性を評価・比較した。

第 1 節 スピロスタン型誘導体の合成³⁴⁾

第 1 項 Diosgenone 2 および dienone 3 の合成

まず、diosgenin 1 の A 環上の 3 位の水酸基および 5 位の二重結合を反応基点として、E と F 環で形成されるスピロ環の立体配座を保ち、F 環に酸素原子を有するスピロスタン型誘導体の合成を行った。

Diosgenin 1 の aluminum *tert*-butoxide を用いた Oppenauer 酸化³⁵⁾により FABMS において m/z 435 に $[M + Na]^+$ のイオンピークを示す α,β -不飽和ケトンである (20*S*,22*R*,25*R*)-spirost-4-en-3-one 2 を 73% の収率で得た (Figure 4)。化合物 2 は、 δ 5.72 に singlet の 4-H のビニールプロトンが観察され、¹³C-NMR スペクトル (Table 1) において、 δ 199.2 に C-3 のカルボニルカーボンシグナルが、 δ 123.7 および 170.9 にそれぞれ C-4 および C-5 位のビニールカーボンシグナルが観察された。ついで、化合物 2 を 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) で酸化して FABMS において m/z 433 に $[M + Na]^+$ のイオンピークを示す (20*S*,22*R*,25*R*)-spirost-1,4-dien-3-one 3 を 49% の収率で得た (Figure 4)。

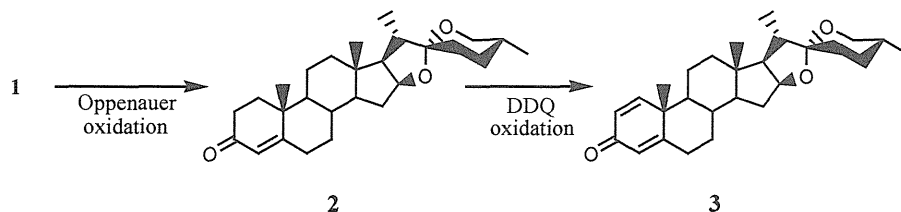


Fig. 4. Preparations of α,β -unsaturated ketone 2 and dienone 3 from diosgenin 1.

Table 1. ^{13}C -NMR spectral data of compounds **1-3**, **10** and **14**^a.

	1	2	3	10	14
C-1	37.2	35.5	155.7	37.2	37.2
C-2	31.6	33.8	127.5	31.4	31.1
C-3	71.7	199.2	186.2	71.7	71.6
C-4	42.2	123.7	123.9	42.2	42.2
C-5	140.8	170.9	168.9	140.8	140.8
C-6	121.4	32.6	32.7	121.4	121.3
C-7	32.0	31.2	33.7	31.6	31.5
C-8	31.4	35.1	35.1	33.3	34.0
C-9	50.0	53.6	52.4	50.0	50.0
C-10	36.6	38.5	43.5	36.6	36.6
C-11	20.8	20.7	22.7	20.8	20.8
C-12	39.7	39.5	39.5	39.7	39.7
C-13	40.2	40.2	40.7	40.3	40.4
C-14	56.5	55.5	55.3	56.6	56.6
C-15	31.8	31.6	31.5	31.7	32.0
C-16	80.8	80.4	80.6	81.6	82.7
C-17	62.0	61.9	61.9	62.8	62.9
C-18	16.2	16.2	16.4	16.6	16.6
C-19	19.4	17.2	16.5	19.4	19.4
C-20	41.6	41.5	42.1	44.4	45.4
C-21	14.5	14.4	14.5	16.2	17.7
C-22	109.3	109.1	109.3	97.5	97.9
C-23	31.3	32.0	31.3	38.5	40.1
C-24	28.7	28.6	28.8	32.0	32.6
C-25	30.2	30.1	30.3	31.4	31.4
C-26	66.8	66.7	66.9	32.1	24.8
C-27	17.1	17.0	17.1	22.5	23.7

^a Spectra were obtained in CDCl_3 .

Chemical shifts were in ppm from internal $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Signal assignments were based on DEPT, ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C COSY, ^1H - ^{13}C long-range COSY and HMBC spectral data.

第 2 項 ヘテロスピロスタン型誘導体の合成

Diosgenin **1** の F 環上の酸素原子を他のヘテロ原子 (S、Se 及び N) に変えたいわゆるヘテロスピロスタン型誘導体の癌細胞に対する増殖抑制効果を調べる目的で以下の研究を行った。

まず、F 環に S 原子の導入を試みた。Diosgenin **1** を無水酢酸中加圧下加熱して 3,26-diacetoxypseudodiosgenin **4**³⁶⁾ を 70% の収率で得た。化合物 **4** を加水分解してジオール **5** を得、ついで、化合物 **5** をピリジン溶媒中、*p*-トルエンスルホニルクロライド (TsCl) で処理して得た 26-toluenesulfonylpseudodiosgenin **6** の NaI との求核置換反応により、重要な中間体である 26-iodopseudodiosgenin **7**³⁷⁾ を得た (Figure 5)。化合物 **7** を KSAc と置換反応を行い 26-thioacetylpsuedodiosgenin **8** を 71% の収率で得た (Figure 5)。ついで、化合物 **8** のアルカリ加水分解により 26,26'-(bispsuedodiosgeninyl) disulfide **9** を 55% の収率で得た。化合物 **9** は、FABMS で *m/z* 881 に [M+Na]⁺ のイオンピークが認められ、更に、¹³C-NMR スペクトルにおいて、チオアセチル基のカーボンシグナルが消失したことから、二量体であることは明らかである。次いで、化合物 **9** を酢酸中亜鉛粉末と加熱還流し、FABMS で *m/z* 453 に [M + Na]⁺ のイオンピークを示す目的の化合物 **10** を 71% の収率で得た (Figure 5)。

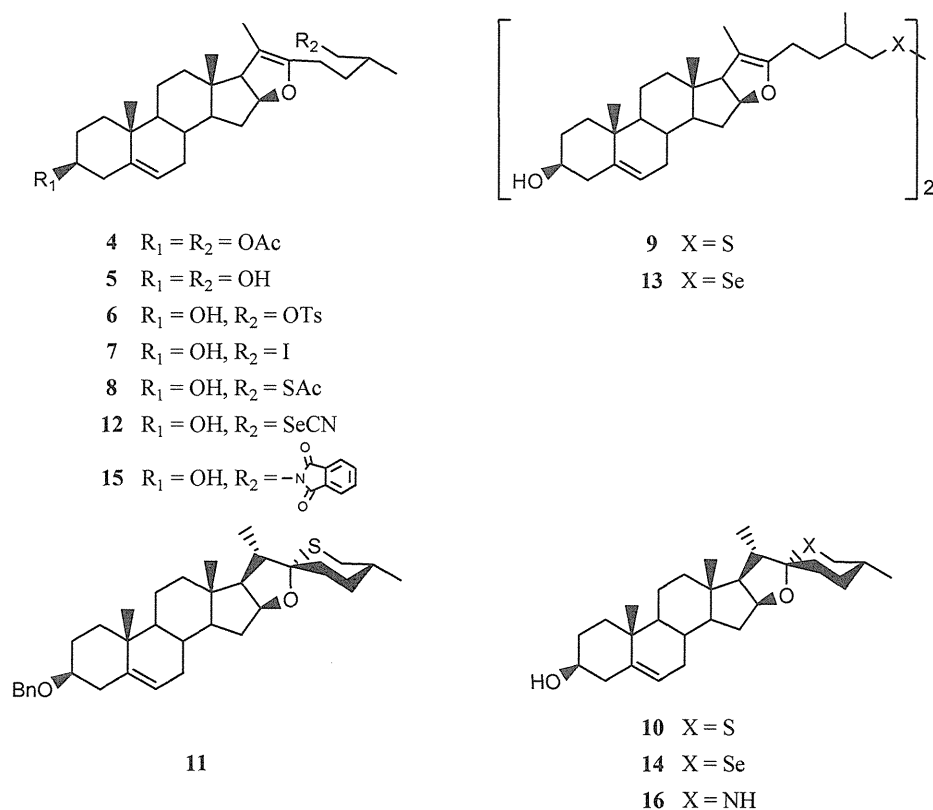


Fig. 5. Structures of compounds 4-16.

上記反応では、化合物 **9** から Figure 6 に示すように **10a** (normal F ring, 21 α -CH₃)、**10b** (normal F ring, 21 β -CH₃)、**10c** (iso F ring, 21 α -CH₃) および **10d** (iso F ring, 21 β -CH₃) が得られる可能性があるが、単一の単量体 **10** が得られたことは、化合物 **10** はそれらのいずれかのうちの一つであると考えられた。化合物 **10** の構造は、すでにその絶対構造が X 線解析で明らかにされた 3 β -*O*-benzyl-(20*S*,22*S*,25*R*)-22-thiospirost-5-ene **11**³⁴⁾ の ¹H-NMR スペクトルと比較して決定した。即ち、化合物 **10** のステロイド骨格上の全てのプロトンは **11** のそれらとほとんど重なって観察された。化合物 **11** は、構造 **10a** とそれぞれ 3 β -*O*-benzyl と 3 β -OH の違いだけであり、両者の ¹H-NMR スペクトル上での変化は、ほとんどないか小さいと考えられ、従って、化合物 **10** は、(20*S*,22*S*,25*R*)-22-thiospirost-5-en-3 β -ol **10a** 構造であると推察した。**10a** 式の構造は、分子モデルから、4 個の異性体 (**10a**~**10d**) の中で最も熱力学的に最も安定な構造をとっていると推察される。

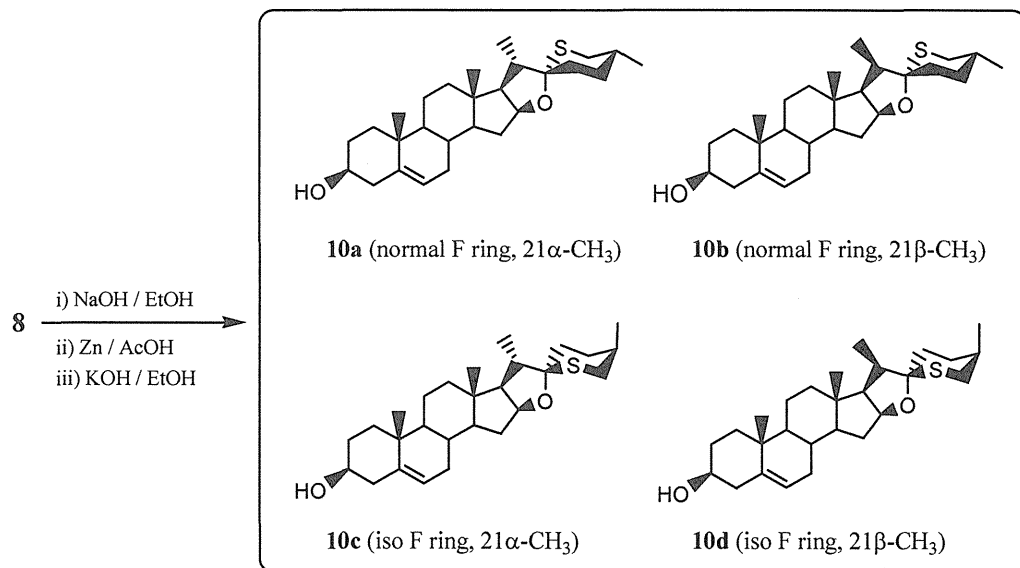


Fig. 6. Possible structures of compound **10** obtained from **8** by alkaline hydrolysis followed by Zn / AcOH reduction and further alkaline hydrolysis.

化合物 **7** の KSeCN による置換反応では、FABMS で m/z 526 に $[M+Na]^+$ のイオンピークを示す 26-selenocyanopseudodiosgenin **12** を 71% の収率で得た。化合物 **12** をアルカリ加水分解して 26,26'-(bispseudodiosgeninyl) diselenide **13** とした後、酢酸中熱時亜鉛と処理して目的の化合物 **14** を得た (Figure 5)。化合物 **13** は FABMS にお

いて m/z 997 に $[M + Na]^+$ のイオンピークを示し、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおいて、SeCN 基のカーボンスIGNALが消失したことから、二量体であることは明らかである。化合物 14 は、FABMS において m/z 501 に $[M + Na]^+$ のイオンピークを示し、 $^1\text{H-}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (Table 1) は、化合物 10 のそれらとほとんど同じように観察されたことから、(20*S*,22*S*,25*R*)-22-selenospirost-5-en-3 β -ol 14 であることは明らかである。

F 環のヘテロ原子を窒素 (N) に変換させる方法は、以下に示すように行った。まず、化合物 7 とフタルイミドカリウム (potassium phthalimide) の反応により化合物 15 を 68% の収率で得た (Figure 5)。次いで、化合物 15 を $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ と反応させた後、10% のリン酸で加水分解して、solasodine 16 を 50% の収率で得た。化合物 16 は、Puri ら³⁸⁾ の報告した $^1\text{H-}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ (Table 2) のそれらと完全に一致した。

第 3 項 スピロスタン型誘導体の A 環の酸化反応

本項では、第 2 項で合成した各種ヘテロスピロスタン型誘導体の A 環の酸化反応による α,β -不飽和ケトンおよびジエノンの導入を行い、第 1 および 2 項で得た化合物と合わせて癌細胞増殖抑制効果を調べる薬理試験に供した。

化合物 10、14 と 16 の Oppenauer 酸化により、 α,β -不飽和ケトン 17、18 および 19 をそれぞれ 81、74 および 68% の収率で得た (Figure 7)。

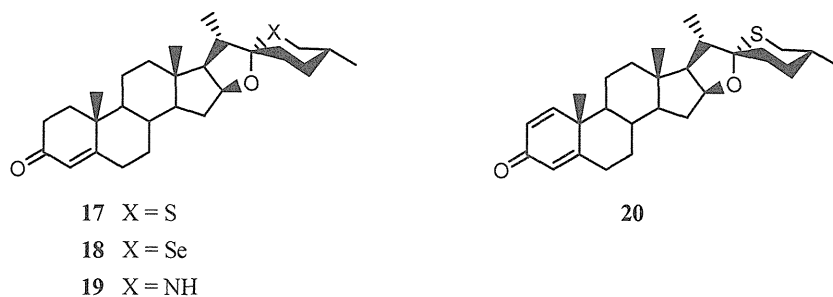


Fig. 7. Structures of α,β -unsaturated ketones 17-19 and dienone 20.

化合物 17 は、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (Table 2) において、 δ 199.4 に C-3 に帰属されるカルボニル基のカーボンスIGNALが観察された。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは、 δ 5.72 に singlet の H-4 位のビニールプロトンシグナルが観察されたことから、(20*S*,22*S*,25*R*)-22-thiospirost- 4-en-3-one 17 であることは明らかである。化合物 18 及

Table 2. ^{13}C -NMR spectral data of compounds **16-20**.

	16	17	18	19	20
C-1	37.2	35.6	35.7	35.7	155.7
C-2	31.6	33.9	33.9	33.9	127.5
C-3	71.6	199.4	199.5	199.4	186.2
C-4	42.2	123.9	123.9	123.9	123.9
C-5	140.9	171.0	171.0	171.1	168.9
C-6	121.3	32.8	32.8	32.8	32.7
C-7	32.1	31.3	31.0	32.0	33.7
C-8	31.4	35.2	34.0	35.2	35.1
C-9	50.1	53.7	53.7	53.8	52.4
C-10	36.6	38.5	38.6	38.6	43.5
C-11	20.9	20.8	20.8	20.9	22.7
C-12	39.9	39.6	39.6	39.8	39.5
C-13	40.5	40.4	40.5	40.6	40.7
C-14	56.5	55.7	55.7	55.6	55.3
C-15	32.2	31.7	32.1	32.1	31.5
C-16	78.7	81.4	82.5	78.5	81.3
C-17	62.8	62.7	62.9	62.7	62.7
C-18	16.4	16.6	16.7	16.5	16.7
C-19	19.4	17.4	17.4	17.4	18.8
C-20	41.2	44.4	45.5	41.2	44.4
C-21	15.3	16.2	17.7	15.2	16.1
C-22	98.2	97.4	97.8	98.3	97.4
C-23	34.0	38.6	40.1	34.1	38.5
C-24	30.3	32.1	32.7	30.3	31.7
C-25	31.3	33.2	35.2	31.4	33.2
C-26	47.6	32.1	24.9	47.7	32.1
C-27	19.3	22.5	23.7	19.3	22.5

^a Spectra were obtained in CDCl_3 .

Chemical shifts were in ppm from internal $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Signal assignments were based on DEPT, ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C COSY, ^1H - ^{13}C long-range COSY and HMBC spectral data.

び **19** は、FABMS においてそれぞれ m/z 499 および 436 に $[\text{M} + \text{Na}]^+$ のイオンピークを示した。両化合物は、 ^1H -NMR スペクトルにおいて、化合物 **17** の全てのプロトンシグナルとほとんど重なって観察されたことから、それぞれ (2*S*,22*S*,25*R*)-22-selenospirost-4-en-3-one **18** および solasodinone **19** であることは明らかである。

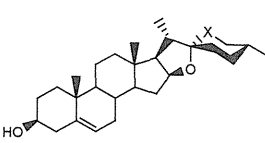
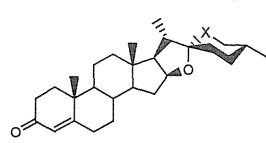
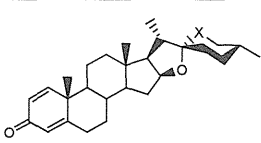
さらに、化合物 17 の DDQ 酸化により、化合物 20 を 21% の収率で得た (Figure 7)。化合物 20 は、FABMS において m/z 449 に $[M+Na]^+$ のイオンピークを示した。 ^{13}C -NMR スペクトル (Table 2) において、C-3 のカルボニル基のカーボンシグナルが δ 186.2 に観察され、更に、C-1、C-2、C-4 および C-5 の 4 個のビニールカーボンシグナルが、 δ 155.7、127.5、123.9 および 168.9 に観察された。また、 1H -NMR スペクトルにおいて、1-H、2-H および 4-H の 3 個のビニールプロトンが、 δ 7.04 (d, $J=10.1$ Hz)、6.22 (dd, $J=10.1, 1.8$ Hz) および 6.07 (s) に観察されたことから、化合物 20 は (20*S*,22*S*,25*R*)-22-thiospirost-1,4-dien-3-one であることは明らかである。

化合物 17 と同様に、化合物 18 および 19 の DDQ 酸化を試みたが、これらの酸化成績体は、薄層クロマトグラフィー (TLC) 上では単一スポットを示したが、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) では分離不可能な混合物を与え、目的のジエノン体の精製は断念した。

第 4 項 合成したスピロスタン型及びヘテロスピロスタン型誘導体のヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 に対する増殖抑制活性に対する比較

ここで、diosgenin 1 及び第 1-3 項で合成した E/F スピロ環を持つ誘導体 2 および 3 と E/F ヘテロスピロスタン型誘導体 10、14 及び 16-20 のヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 に対する増殖抑制活性を評価し (Table 3)、以後の研究の指針とした。

Table 3. Cytotoxic activities of compounds 1-3, 10, 14 and 16-20 against HCT 116 cell lines.

					
compound	IC ₅₀ (μM)	compound	IC ₅₀ (μM)	compound	IC ₅₀ (μM)
1 X = O	> 100	2 X = O	> 100	3 X = O	52
10 X = S	64	17 X = S	> 100	20 X = S	31
14 X = Se	73	18 X = Se	37		
16 X = NH	6	19 X = NH	14		

^a IC₅₀ values indicated that the 50% of inhibitory concentration.

^a IC₅₀ values more than 100 μM were indicated as > 100.

前述したように、HCT 116 細胞は、多剤耐性の一因となる P-糖タンパクがその細胞膜上にほとんど発現していないため³⁹⁾、化合物の細胞増殖抑制活性を直接評価できるものと考えられた。なお、これらの活性の評価は、Takenouchi らの MTT 法⁴⁰⁾ によって行い、ヒト結腸癌細胞 HCT 116 の増殖が 50% 抑制される化合物の濃度を IC₅₀ 値とした。

先ず、A 環に α,β -不飽和ケトンを持たず、F 環のヘテロ原子が各々酸素 (O)、イオウ (S)、セレン (Se) および窒素 (NH として) を持つ化合物 **1**、**10**、**14** および **16** の活性を比較した。Table 3 に示したように、これらの化合物のうち、F 環にヘテロ原子として窒素原子 (NH として) を持つ化合物 **16** は HCT 116 細胞に対して高い増殖抑制活性 (IC₅₀ = 6 μ M) を示し、他の誘導体の活性は低かった (IC₅₀ = 64 ~ > 100 μ M)。

同様な傾向は、A 環に α,β -不飽和ケトンを持ち、F 環に各々 O、S、Se および N 原子を持つ化合物 **2**、**17**、**18** 及び **19** においても観察された。即ち、F 環に N 原子を持つ化合物 **19** の活性 (IC₅₀ = 14 μ M) は、他の化合物 **2**、**17** 及び **18** より強い傾向を示した。このように、スピロスタン型誘導体では、F 環上のヘテロ原子が N のものが、他のヘテロ原子 (O、S および Se) の誘導体のものに比べて活性が高かった。このことは、スピロスタン型誘導体の HCT 116 細胞に対する増殖抑制に関しては、F 環の窒素原子の存在が、より効果的であると推察された。また、A 環にジエノン構造を持つ誘導体 **3** (F 環のヘテロ原子が O 原子) 及び **20** (F 環のヘテロ原子が S 原子) の活性は、相当する A 環に α,β -不飽和ケトンを持たない **1** 及び **10** と A 環が α,β -不飽和ケトンである **2** 及び **17** の活性より高かった。しかしながら、これらいずれも F 環に窒素原子を持つ化合物 **16** 及び **19** の活性を凌駕するものではなかった。このように、スピロスタン型誘導体では、F 環に窒素原子 (NH として) を持つものが HCT 116 細胞に対して効果的な増殖抑制活性を持つことが示唆された。

第 2 節 フロスタン型誘導体 (pseudodiosgenin および pseudodiosgenone 誘導体) の合成⁴¹⁾

Diosgenin **1** の F 環の開裂した化合物 **5** のようなフロスタン構造は非常に不安定で、26 位が OH 基であると、酸性および中性で容易に閉環して再びスピロスタン構造に変化する³⁶⁾。しかしながら、その 26 位に適当な置換基を導入することで、フロスタン型である pseudodiosgenin および pseudodiosgenone 誘導体が安定に存在す

る。著者は、この性質を利用して、フロスタン構造の 26 位に種々の含窒素官能基を導入して各種 pseudodiosgenin および pseudodiosgenone 誘導体を合成し、それらの癌細胞増殖抑制効果を調べる薬理活性に供した。

第 1 項 Pseudodiosgenin および Pseudodiosgenone 誘導体の合成

第 1 節で述べたヘテロスピロスタン型誘導体合成の中間体である 26-iodopseudodiosgenin 7 の 26 位は、容易に置換反応を受やすい。本節では、化合物 7 およびその酸化体である 26-iodopseudodiosgenone 21 の 26 位の反応性を利用して、26 位に種々の含窒素官能基の導入を行った。なお、26-iodopseudodiosgenone 21 は、化合物 7 を Oppenauer 酸化して 73% の収率で得た (Figure 8)。

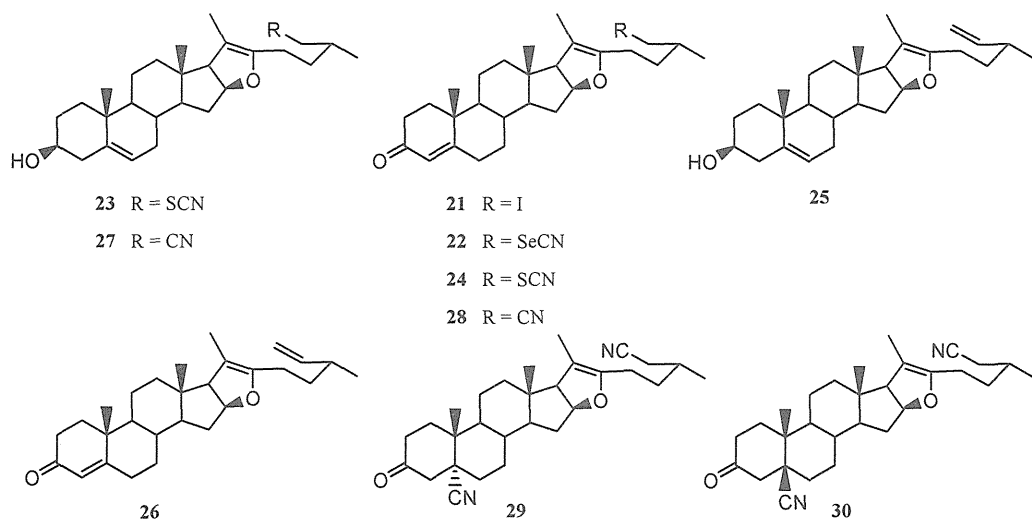


Fig. 8. Structures of compounds 21-30.

フロスタン型誘導体 (pseudodiosgenin および pseudodiosgenone 誘導体) の合成は、全て 26-iodopseudodiosgenin 7 および 26-iodopseudodiosgenone 21 を出発物質として用いて、Table 4 に示した条件で (runs 1~22) で行った。

化合物 7 の KSeCN による置換反応は、既に第 1 節で述べた。本項では、化合物 7 の KSCN および KOCN による置換反応と、化合物 21 の KSeCN、KSCN および KOCN による置換反応を行った (Figure 8)。化合物 21 と KSeCN の置換反応では (run 11)、容易に目的の化合物 22 を 70% の収率で得た。

Table 4. The reaction conditions and products of the substitutions of compounds **7** and **21** with various nucleophiles.^a

Run	Substrate	Nucleophile (equiv.)	Reaction time (h)	Product(s) (%)
1	7	KSCN (4)	12	23 (40)
2	7	KOCN (4)	12	25 (25)
3	7	NaCN (4)	12	27 (75)
4	7	diethylamine (4)	12	31 (58)
5	7	pyrrolidine (4)	1	32 (70)
6	7	piperidine (4)	2	33 (80)
7	7	morpholine (4)	5	34 (54)
8	7	1-methylpiperazine (4)	4	35 (62)
9	7	imidazole (4) ^b	3	41 (33), 25 (47)
10	7	NaN ₃ (4)	12	44 (43)
11	21	KSeCN (4)	12	22 (70)
12	21	KSCN (4)	12	24 (79)
13	21	KOCN (2)	24	26 (40)
14	21	NaCN (4)	12	29 (18), 30 (18)
15	21	NaCN (4)	2.5	28 (33), 29 (12), 30 (17)
16	21	diethylamine (4)	3	36 (64)
17	21	pyrrolidine (4)	2	37 (27)
18	21	piperidine (4)	12	38 (79)
19	21	morpholine (4)	12	39 (73)
20	21	1-methylpiperazine (4)	12	40 (61)
21	21	imidazole (4) ^b	3	42 (18), 26 (27)
22	21	NaN ₃ (4)	12	45 (61)

^a Reaction **21** with KOCN was performed at 30 °C (run 13) and the other reaction at 60 °C.

^b Potassium carbonate (10 equiv.) was added in these reactions.

同様に、化合物 **7** および **21** の KSCN による置換反応 (runs 1 と 12) では、化合物 **23** および **24** を各々 40 および 79% の収率で得た。しかしながら、化合物 **7** と **21** の KOCN を用いた反応 (runs 2 と 13) では、置換成績体は得られずオレフィン成績体 **25** および **26** を各々 25 および 40% を与えるのみであった。KOCN による置換反応が進行せず、オレフィン体を与える理由としては、-OCN 基は -SeCN および -SCN 基に比べて、求核性が弱くかつ塩基性が強いためと推察される。

側鎖に SeCN および SCN などのヘテロシアノ基を持つ化合物の薬理活性とヘテロ原子を持たない CN 基のみからなるフロスタン型誘導体のそれらを比較する化合物を得る目的で、化合物 **7** と **21** の NaCN による置換反応を 60 °C、12 時間で行ったところ、化合物 **7** からは 26-cyanopseudodiosgenin **27** を 75% の収率で得たが (run 3)、化合物 **21** からは、マイケル付加生成物 (25*R*)-5 α ,26-dicyanofurost-3-one **29** と (25*R*)-5 β ,26-dicyanofurost-3-one **30** をいずれも 18% の収率で得た (run 14)。ここで、化合物 **21** と NaCN の反応を同温度で反応時間を 2.5 時間に短縮したところ (run 15)、26-cyanopseudodiosgenone **28** と (25*R*)-5 α ,26-dicyanofurost-3-one **29** 及び

(25*R*)-5 β ,26-dicyanofurost-3-one **30** が各々 33、12 および 17% の収率で得られた。

フロスタン型の化合物の 26 位に種々のアミノ基の導入は、diethylamine、pyrrolidine、piperidine、morpholine、1-methylpiperazine、imidazole および sodium azide を用いて行った。化合物 **7** と diethylamine、pyrrolidine、piperidine、morpholine および 1-methylpiperazine の反応 (runs 4~8) では、アミン **31**、**32**、**33**、**34** および **35** を各々 58、70、80、54 および 62% の収率で得た。化合物 **21** と diethylamine、pyrrolidine、piperidine、morpholine および 1-methylpiperazine の反応 (runs 16~20) では、アミン **36**、**37**、**38**、**39** および **40** を各々 64、27、79、73 および 61% の収率で得た (Figure 9)。

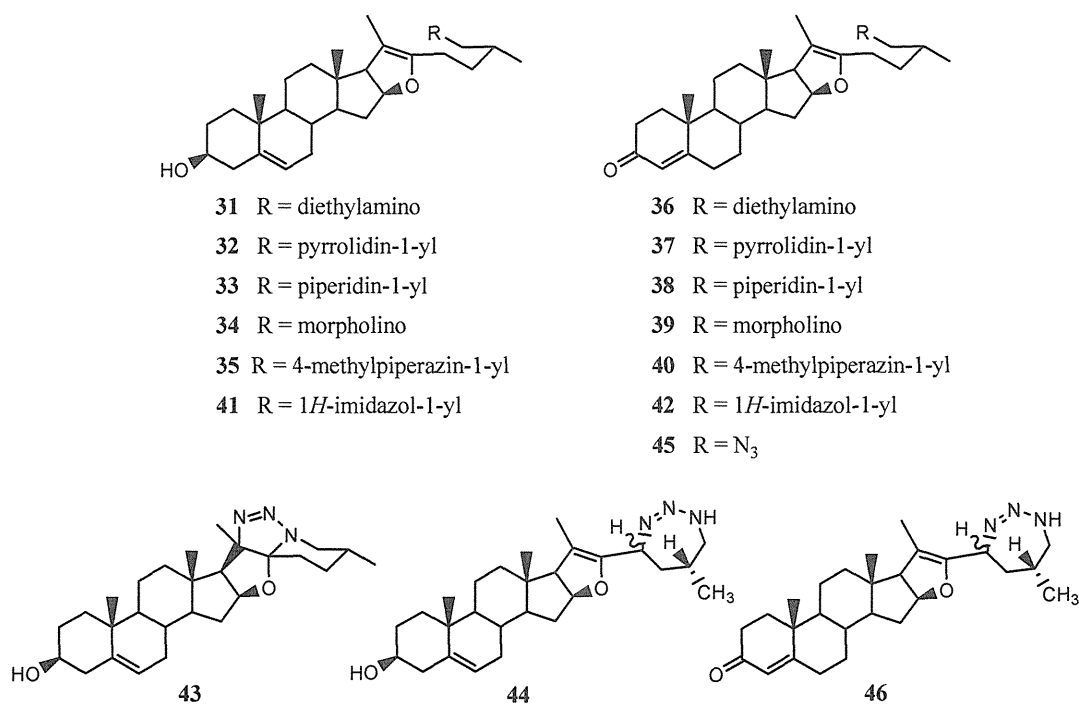


Fig. 9. Structures of compounds 31-46.

化合物 **7** と **21** の imidazole との反応ではいずれも反応が進行しなかったが、imidazole の塩基性が弱いことを考慮し、K₂CO₃ の存在下で反応を行ったところ、化合物 **7** からは (run 9) 置換成績体 **41** (33%) とオレフィン成績体 **25** (47%) を、また、化合物 **21** から (run 21) は、置換成績体 **42** (18%) とオレフィン成績体 **26** (27%) を得た。

26-Azido 誘導体に関して、Uhle ら⁴²⁾は、26-*p*-toluenesulfonylpseudodiosgenin 6 (Figure 5) と NaN_3 の反応で 3 β -hydroxy-22(27)-imino-20(*N*)-azo-25 α -5-furostene 43 を与えるのみで、目的の 26-azido 誘導体は得られなかったと報告している。今回、著者もこの反応を、出発物質を 6 の代わりに、より反応性が高いと考えられる化合物 7 を用いて 60 °C で 12 時間反応したところ、43 とは異なる化合物 44 を得た (Figure 9)。化合物 44 は、FABMS で m/z 440 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ のイオンピークを示した。¹³C-NMR スペクトルでは、C-5 と C-6 に帰属される 2 個のビニールカーボンシグナルが δ 140.8 と 121.1 に観察され、C-20 と C-22 のエノール部のカーボンシグナルがそれぞれ δ 77.6 と 162.9 に観察された。また、¹H-NMR スペクトルでは、23-H のシグナルは δ 4.31 (1H, t, $J=7.6$ Hz) に 1 個のみ観察され、化合物 7 の 23 位のメチレン基 (CH_2) が化合物 44 ではメチン基 (CH) に変換していることが示唆された。

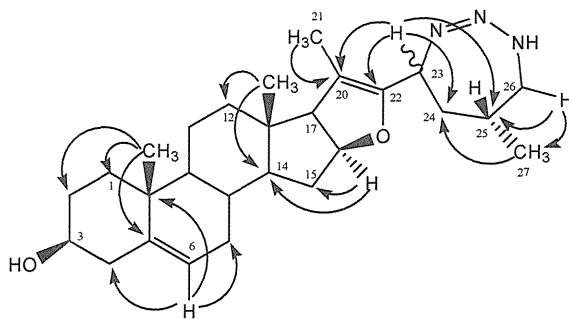


Fig. 10. ¹H-¹³C HMBC correlations of compound 44.

また、化合物 44 の HMBC スペクトル (Figure 10) では、 δ 4.31 の 23-H のシグナルは δ 77.6、162.9、29.5 および 34.2 に現れている C-20、C-22、C-24 および C-25 のシグナルとそれぞれ相関が観られたことから、化合物 44 は 22-((6*R*)-4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-1*H*-1,2,3-triazepine-4-yl)pseudodiosgenin であることは明らかである。なお、化合物 44 の 23 位の配位については現在のところ未定である。同様な反応を化合物 21 で行った (run 22) ところ、この場合には、azido 化合物 45 のみを 61% の収率で得た。しかしながら、化合物 45 を 120 °C で 2 時間加熱したところ、22-((6*R*)-4,5,6,7-tetrahydro-6-methyl-1*H*-1,2,3-triazepine-4-yl)pseudodiosgenone 46 を与えた。このことは、化合物 44 も中間に不安定な azido 化合物を経て形成されたものと推察された。

第 2 項 フロスタン型誘導体の HCT 116 及び Hep G2 細胞に対する増殖抑制活性

本節で合成して得た、pseudodiosgenins **12**、**23**、**25**、**27**、**31-35**、**41**、**44** と pseudodiosgenones **22**、**24**、**26**、**28**、**36-40**、**42** 更に (25*R*)-5,26-dicyanofurost-3-ones **29** および **30** の HCT 116 および Hep G2 細胞における増殖抑制活性を検討した。

まず、P-糖タンパクがほとんど発現していない HCT 116 細胞に対する増殖抑制活性を下記の pseudodiosgenins (Table 5) と pseudodiosgenones (Table 6) で比較した。

Table 5. Cytotoxic activities of pseudodiosgenins against HCT 116 and Hep G2 cell lines.

Compound	IC ₅₀ ± SD (μM) ^a	
	HCT 116	Hep G2
12	2.6 ± 0.3	4.5 ± 1.5
23	5.3 ± 0.7	53.5 ± 5.5
25	14.8 ± 0.7	39.8 ± 7.4
27	6.7 ± 1.4	1.2 ± 0.7
31	11.6 ± 1.3	2.2 ± 0.6
32	49.9 ± 6.8	34.7 ± 6.9
33	13.5 ± 0.6	6.4 ± 2.8
34	106.9 ± 5.6	133.1 ± 27.0
35	32.3 ± 5.1	16.3 ± 4.1
41	5.4 ± 0.9	2.1 ± 0.5
44	16.6 ± 1.7	8.6 ± 2.8

^a IC₅₀ values (mean ± SD) are the concentrations at which 50% of the cells are inhibited from growing. SD, standard deviation.

Table 6. Cytotoxic activities of pseudodiosgenones against HCT 116 and Hep G2 cell lines.

Compound	IC ₅₀ ± SD (μM) ^a	
	HCT 116	Hep G2
22	1.7 ± 0.4	4.9 ± 1.2
24	1.3 ± 0.3	3.5 ± 0.8
26	3.7 ± 0.5	6.0 ± 0.9
28	6.4 ± 0.3	5.5 ± 1.4
29	5.9 ± 0.7	12.4 ± 4.8
30	38.6 ± 6.1	30.4 ± 6.1
36	3.7 ± 0.5	2.9 ± 0.8
37	2.8 ± 0.2	2.4 ± 0.6
38	1.9 ± 0.3	0.6 ± 0.1
39	3.2 ± 0.3	3.7 ± 1.9
40	2.6 ± 0.3	1.6 ± 0.5
42	2.6 ± 0.4	2.5 ± 0.3
45	5.7 ± 0.6	5.2 ± 0.9

^a IC₅₀ values (mean ± SD) are the concentrations at which 50% of the cells are inhibited from growing. SD, standard deviation.

上記 pseudodiosgenin 誘導体のうちで、4 個の化合物 **12**、**23**、**27** および **41** に強い活性が認められた (IC₅₀ = 2.6 ± 0.3 ~ 6.7 ± 1.4 μM) が、上記 pseudodiosgenone 誘導体 (**22**、**24**、**26**、**28**、**36-40** および **42**) では、全ての化合物において強い活性が認められた (IC₅₀ = 1.3 ± 0.3 ~ 6.4 ± 0.3 μM)。このように、ステロイド骨格の A 環に α,β-不飽和ケトンが導入されることにより HCT 116 細胞に対して増殖抑制活性が高まることが認められた。

次に、側鎖の 26 位に SeCN 基を持つ化合物 **12** と **22** および SCN 基を持つ化合物 **23** と **24** のヘテロ原子の癌細胞増殖抑制活性への寄与を検討する目的で、側鎖 26 位がヘテロ原子を持たない CN 基である化合物 **27** と **28** の活性と比較した。その結果、化合物 **12** と **23** の細胞増殖抑制活性 (各々 IC₅₀ = 2.6 ± 0.3 および 5.3 ± 0.7 μM) は化合物 **27** のそれ (IC₅₀ = 6.7 ± 1.4 μM) より高い活性を示し、同様に、化合物

22 と 24 の細胞増殖抑制活性 (各々 $IC_{50} = 1.7 \pm 0.4$ および $1.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$) は化合物 28 のそれ ($IC_{50} = 6.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$) より高い活性を示した。この結果は、一見 26 位置換基が SeCN や SCN 基のようにヘテロ原子が存在することで、細胞増殖抑制活性が高まるように見受けられた。このことは、また、SeCN や SCN 基、さらに CN 基を持たない化合物 25 の活性 ($IC_{50} = 14.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$) が化合物 12、22、23 および 24 より低かったこととも一致した。しかしながら、同様に、SeCN や SCN 基、さらに CN 基を持たない化合物 26 は高い細胞増殖抑制活性 ($IC_{50} = 3.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$) を示した。このことは、ヘテロ原子が活性増強のためには必ずしも必須のものではないようであるが、ある種の化合物においては、活性増強に何らかの関与は否定できず、今後の検討課題であろう。

(25*R*)-5,26-Dicyanofurost-3-ones 29 と 30 の HCT 116 細胞増殖抑制活性の比較では、5 位に α -CN 基が置換する化合物 29 ($IC_{50} = 5.9 \pm 0.7 \mu\text{M}$) の方が β -CN 基の置換した化合物 30 ($IC_{50} = 38.6 \pm 6.1 \mu\text{M}$) より高い活性を示したが、5 位置換および 5、26 位置換したフロスタン型誘導体の癌細胞増殖抑制活性の研究についても、モジュレーターとしての作用を含めて今後に残された問題である。

次に、今回合成した pseudodiosgenin と pseudodiosgenone 誘導体の P-糖タンパクが発現している Hep G2 細胞²⁸⁻³⁰⁾ に対する増殖抑制活性について比較した (Table 5 および Table 6)。Pseudodiosgenin 誘導体では、Hep G2 細胞に対して、化合物 12 ($IC_{50} = 4.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$) と 23 ($IC_{50} = 53.5 \pm 5.5 \mu\text{M}$) の活性は HCT 116 細胞に対する活性 (化合物 12 では、 $IC_{50} = 2.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$; 化合物 23 では、 $IC_{50} = 5.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$) より低下したが、化合物 12 は P-糖タンパクが発現している Hep G2 細胞に対しても十分な増殖抑制活性を有していた。また、化合物 38 と 41 の Hep G2 細胞に対する活性 (各々、 $IC_{50} = 0.6 \pm 0.1$ と $2.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$) は HCT 116 細胞に対する活性 (各々、 $IC_{50} = 1.9 \pm 0.3$ と $5.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$) より増強した。更に、pseudodiosgenin 誘導体 27、31 と 33 (各々、 $IC_{50} = 1.2 \pm 0.7$ 、 2.2 ± 0.6 と $6.4 \pm 2.8 \mu\text{M}$) および pseudodiosgenone 誘導体 37、39、40 と 42 (各々、 $IC_{50} = 2.4 \pm 0.6$ 、 3.7 ± 1.9 、 1.6 ± 0.5 と $2.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$) は Hep G2 細胞に対しても強い活性を示した。特に、化合物 38 は Tables 5 と 6 に記載された薬物中、最も著しい活性を示した。これらの薬物は、細胞外への薬物汲み出し作用を行うと考えられる P-糖タンパクに対して、感受性が低いか、あるいは感受性がないと考えられ、P-糖タンパクが発現している他の癌細胞の増殖を有効に阻止し得るものと考えられ、今後、更に活性が強く、P-糖タンパクに対して感受性の低い薬物の開発の糸口ともなり、また、多剤耐性を克服する薬物の創薬に繋がる可能性を示唆しているものと考えられる。

第二章 Diosgenin から側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体及び関連化合物の合成と癌細胞増殖抑制活性⁴³⁾

活性型ビタミン D₃⁴⁴⁾ はカルシウム代謝の主なホルモンとして副甲状腺ホルモン⁴⁵⁾ と共に血清カルシウム恒常性の維持や骨形成^{46, 47)} に重要な役割を果たしている。一方、阿部、須田らにより活性型ビタミン D₃ の細胞分化誘導作用⁴⁸⁾ が報告された以来、カルシウム代謝調節作用のみならず、乳癌⁴⁹⁻⁵¹⁾ や前立腺癌⁵²⁻⁵⁴⁾、結腸癌⁵⁵⁻⁵⁷⁾ などの細胞の増殖抑制作用やアポトーシス誘導作用⁵⁸⁻⁶⁰⁾ にも深く関わっていることが明らかにされた。今まで 1000 を越す様々なビタミン D 誘導体^{61, 62)} が合成され、その生物活性がスクリーニングされている。

著者は、3 位の水酸基および 5 位の二重結合を利用して、diosgenin 1 の E/F スピロ環をそのまま保持したビタミン D 型誘導体を合成し、これらのスピロ環を持つビタミン D 型誘導体とその合成中間体などの癌細胞増殖抑制活性を、HCT 116 及び Hep G2 細胞を用いて評価した。

第 1 節 側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体の合成

第 1 項 プロビタミン D 誘導体の合成

まず、diosgenin 1 の 1 位に水酸基の導入を行なった。Diosgenin 1 を無水ジオキサン中 DDQ で酸化して、FABMS で m/z 409 に $[M+H]^+$ のイオンピークを示すトリエン (20*S*,22*R*,25*R*)-spirost-1,4,6-trien-3-one 47 を 40% の収率で得た (Figure 11)。化合物 47 は、¹H-NMR スペクトルにおいて、1-H、2-H、4-H、6-H および 7-H の 5 個のビニールプロトンシグナルが各々 δ 7.06 (d, $J=10.1$ Hz)、6.24 (dd, $J=10.1, 1.8$ Hz)、6.00 (d, $J=1.8$ Hz)、6.23 (dd, $J=9.8, 3.0$ Hz) および 6.03 (dd, $J=9.8, 1.8$ Hz) に観察された。

次いで、化合物 47 を H₂O₂ で処理して、FABMS において m/z 425 に $[M+H]^+$ のイオンピークを示す (20*S*,22*R*,25*R*)-spirost-1 α ,2 α -epoxy-4,6-dien-3-one 48 を 81% 収率で得た (Figure 11)。

次に、化合物 48 の Birch 還元を行い、FABMS において m/z 431 に $[M+H]^+$ のイオンピークを示す (20*S*,22*R*,25*R*)-spirost-1 α ,3 β -dihydroxy-5-ene 49 とそのエピ体である (20*S*,22*R*,25*R*)-spirost-1 α ,3 α -dihydroxy-5-ene 50 をそれぞれ 44 と 6% の収率で得た (Figure 11)。

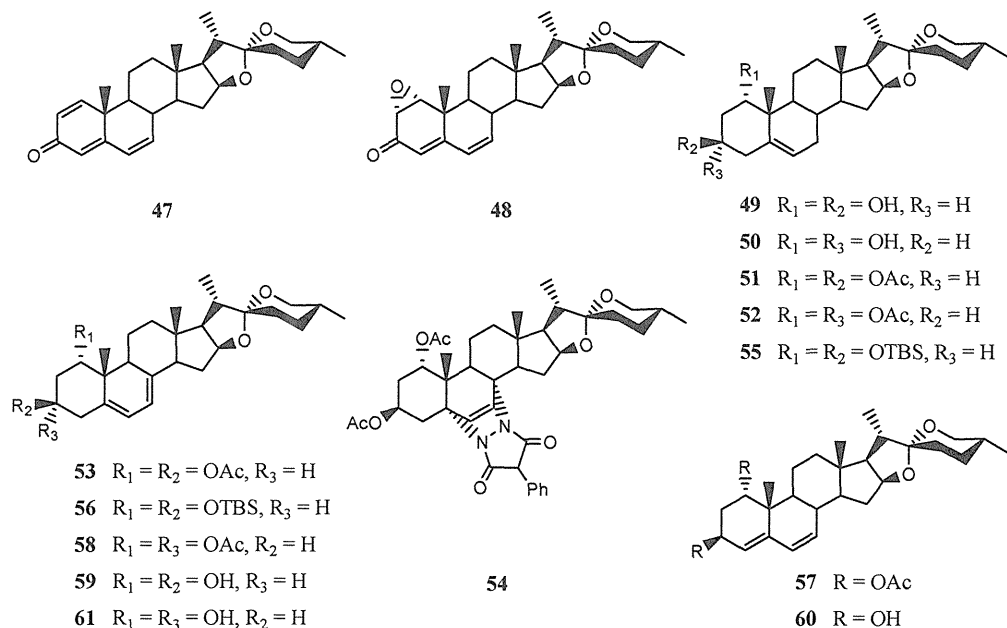


Fig. 11. Structures of compounds 47-61.

化合物 49 の ^1H - および ^{13}C -NMR スペクトル (Table 7) は、Liu ら⁶⁴⁾ の報告したそれらと一致した。また、化合物 50 は、化合物 49 の ^1H - および ^{13}C -NMR スペクトルと比較してその構造を明らかにした。

化合物 49 のアセチル体である化合物 51 の 7 位への二重結合の導入は、従来幾つかの研究グループの報告⁶⁵⁻⁶⁷⁾ があるが、いずれも精製の困難を伴う反応であり、収率の点で問題があった。著者も以下に示す従来の 3 つの方法で試みたが良好な結果は得られず、最終的に改良法によって克服することができた。

先ず、Morisaki ら⁶⁵⁾ の方法を試みた。即ち、化合物 51 を 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin を用いてブロム化後、脱 HBr 化する方法で行なったが、この場合には副生成物が多く、カラム精製は非常に困難であり、HPLC で分取したところ、目的の (20*S*,22*R*,25*R*)-spirost-1 α ,3 β -diacetoxy-5,7-diene 53 を得たが、化合物 51 から 53 の収率は 23% と低かった (Figure 11)。

化合物 53 は、 ^1H -NMR スペクトルにおいて、6-H 及び 7-H の 2 つのビニールプロトンシグナルが各々 δ 5.67 (dd, $J = 6.1, 2.7$ Hz) 及び 5.39 (quint, $J = 2.7$ Hz) に観察されたことから 5,7-*cis* diene 体であることは明らかである。

次に、化合物 51 を Ono ら⁶⁶⁾ の方法で *N*-bromosuccinamide (NBS) を用いてブロム化し後、脱 HBr 化して得た中間体を精製することなく、4-phenyl-1,2,4-triazoline-

Table 7. ^{13}C -NMR spectral data of compounds **47-50** and **59-61**.

	47	48	49	50	59	60	61
C-1	152.8	59.4	72.8	73.2	72.7	72.0	72.4
C-2	128.1	54.7	38.2	33.4	38.5	35.5	33.0
C-3	186.2	194.6	66.3	68.4	65.3	64.7	67.7
C-4	123.8	119.6	41.4	39.8	40.0	125.4	38.4
C-5	162.4	158.5	137.4	135.3	136.3	140.8	134.0
C-6	127.7	127.9	125.3	126.3	121.9	128.6	122.9
C-7	138.0	139.9	31.9	32.0	115.4	131.1	115.0
C-8	37.7	37.1	31.4	31.3	140.0	36.7	141.0
C-9	48.4	46.1	41.6	41.6	37.6	44.4	37.4
C-10	41.2	38.9	41.8	42.9	42.4	39.4	43.5
C-11	21.7	21.0	20.1	19.8	20.7	20.2	20.0
C-12	39.4	39.3	39.5	39.5	39.1	39.6	39.0
C-13	41.0	41.0	40.2	40.2	41.1	41.5	40.8
C-14	53.3	53.0	56.4	56.4	54.5	53.8	54.4
C-15	31.2	31.2	31.8	31.9	30.9	31.4	30.8
C-16	80.4	80.3	80.8	80.8	80.6	80.6	80.7
C-17	61.9	61.9	62.0	62.0	61.9	62.0	61.6
C-18	16.3	16.2	16.3	16.3	16.4	16.3	16.3
C-19	20.8	18.5	19.5	19.2	16.5	19.5	16.5
C-20	41.6	41.6	41.6	41.4	42.1	41.4	42.0
C-21	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.4	14.3
C-22	109.3	109.3	109.3	109.3	109.3	109.2	109.4
C-23	31.3	31.3	31.4	31.4	31.3	31.3	31.2
C-24	28.8	28.8	28.8	28.8	28.8	28.7	28.7
C-25	30.2	30.2	30.3	30.3	30.3	30.2	30.2
C-26	66.9	66.9	66.8	66.8	66.9	66.8	66.7
C-27	17.1	17.1	17.1	17.2	17.1	17.1	17.1

^a Spectra were obtained in CDCl_3 .

Chemical shifts were in ppm from internal $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Signal assignments were based on DEPT, ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C COSY, ^1H - ^{13}C long-range COSY and HMBC spectral data.

3,5-dione (PTAD) を用いた Diels-Alder 反応を行なって、化合物 **54** とした後、1,3-dimethyl-2-imidazolidinone (DMI) 処理によって化合物 **53** を得たが、3 行程の全収率がわずか 12% であった (Figure 11)。

さらに、Kubodera ら⁶⁷⁾の方法で、化合物 **51** の 1 位、3 位の水酸基を高い保護基 *tert*-butyldimethylsilane (TBS) で保護して **55** とし、**55** を順次 NBS、

n-hexane 及び γ -collidine、xylene で処理して m/z 659 に $[M+H]^+$ のイオンピークを示す 5,7-*cis* diene **56** を得たが、2 行程での収率は 36% であった (Figure 11)。

ここで著者は、ジアセチル体 **51** を *n*-hexane に溶解し、1.3 等量の NBS を用いてアリル位をブロム化し、次いで、 γ -collidine と xylene で脱 HBr した後、HPLC で精製して、化合物 **51** から化合物 **53** と (20*S*,22*R*,25*R*)-spirost-1 α ,3 β -diacetox-4,6-diene **57** をそれぞれ 53 と 5% の収率で得ることが出来た (Figure 11)。

化合物 **57** は、FABMS において m/z 513 に $[M+H]^+$ のイオンピークを示した。¹H-NMR スペクトルにおいて、4-H、6-H および 7-H のビニールプロトンシグナルが、それぞれ δ 5.42 (broad s)、5.98 (dd, $J=9.8, 2.8$ Hz) および 5.68 (dd, $J=9.8, 1.5$ Hz) に観察された。

3-Epi 化合物である (20*S*,22*R*,25*R*)-spirost-1 α ,3 α -diacetox-5,7-diene **58** は、化合物 **52** から同様に順次 NBS でのブロム化、脱 HBr 化を行なって 25% の収率で得た。ここに得たアセチル体 **53**、**57** および **58** を脱アセチル化でそれぞれ **59**、**60** および **61** とした (Figure 11)。

第 2 項 光照射と熱異性化によるビタミン D 型誘導体の合成

第 1 項で得た化合物 **59** と **61** の B 環の 5,7-*cis* diene の光照射による開裂反応を行なった。まず、化合物 **59** のジエチルエーテル溶液をアルゴン雰囲気下、0 °C、200 W の高圧水銀ランプ (307 nm) で 2 時間光照射した後、熱異性化して (20*S*,22*R*,25*R*)-(5*Z*,7*E*)-9,10-secospirosta-5,7,10(19)-trien-1 α ,3 β -diol **62** を 20% の収率で得た (Figure 12)。化合物 **62** は、FABMS において m/z 429 に $[M+H]^+$ のイオンピークを示した。¹H-NMR スペクトルにおいて、6-H、7-H、19a-H および 19b-H の

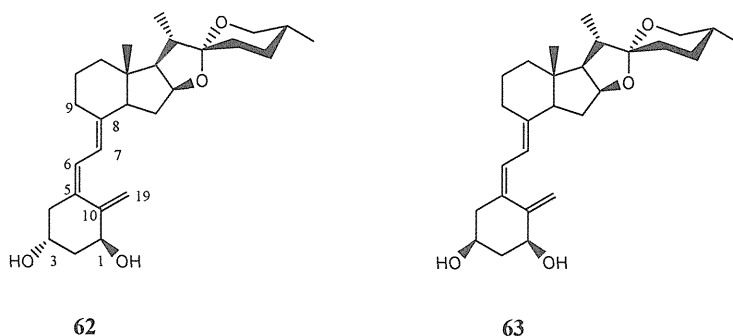


Fig. 12. Structures of vitamin D derivatives **62** and **63**.

Table 8. ^{13}C -NMR spectral data of compounds **62**, **63**, **66**, **67**, **71** and **72** ^a.

	62	63	66	67	71	72
C-1	70.7	73.3	72.4	72.5	72.7	72.7
C-2	42.7	40.5	38.4	38.4	38.4	38.4
C-3	66.8	68.2	66.8	66.8	65.2	65.3
C-4	45.2	45.6	36.4	36.4	39.9	39.9
C-5	133.6	132.3	37.0	37.1	136.4	136.4
C-6	124.5	125.2	130.5	130.3	121.7	121.8
C-7	117.7	117.7	124.6	124.7	115.6	115.6
C-8	141.8	141.9	126.2	125.9	139.5	139.5
C-9	28.4	28.5	41.9	42.0	37.6	37.6
C-10	147.5	147.2	39.8	39.7	42.3	42.3
C-11	23.4	23.4	19.1	19.1	20.8	20.8
C-12	40.2	40.3	36.4	36.9	38.9	38.9
C-13	43.8	43.9	43.5	40.5	43.8	43.8
C-14	56.4	56.4	144.6	145.7	52.8	52.8
C-15	30.7	30.8	34.5	33.0	33.1	32.5
C-16	80.3	80.4	83.8	79.6	84.1	84.1
C-17	62.4	62.5	64.0	61.3	63.9	63.9
C-18	16.3	16.4	22.2	24.1	14.0	14.0
C-19	111.8	112.8	12.3	12.3	16.4	16.4
C-20	42.1	42.1	104.6	43.1	104.5	104.5
C-21	14.4	14.5	11.8	14.2	11.5	11.5
C-22	109.3	109.3	151.0	109.0	150.9	150.9
C-23	31.3	31.4	32.5	31.4	33.1	33.1
C-24	28.7	28.8	23.0	28.7	23.1	23.0
C-25	30.2	30.3	33.2	30.3	33.6	33.2
C-26	66.8	66.9	41.2	67.0	37.6	41.2
C-27	17.1	17.2	18.3	17.1	19.2	18.4
CN	--	--	112.7	--	102.0	112.8

^a Spectra were obtained in CDCl_3 .

Chemical shifts were in ppm from internal $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Signal assignments were based on DEPT, ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C COSY, ^1H - ^{13}C long-range COSY and HMBC spectral data.

4 個のビニールプロトンシグナルが各々 δ 6.34 (d, $J = 11.3$ Hz)、6.00 (d, $J = 11.3$ Hz)、5.29 (d, $J = 1.8$ Hz) および 4.97 (d, $J = 1.8$ Hz) に観察され、更に、 $1\beta\text{-H}$ および $3\alpha\text{-H}$ 位のプロトンがそれぞれ δ 4.42 (dd, $J = 7.3, 4.3$ Hz) と δ 4.23 (m) に観察された。 ^{13}C -NMR スペクトルは Table 8 に示した。

同様に化合物 **61** の光反応に続く熱異性化反応により、(20*S*,22*R*,25*R*)-(5*Z*,7*E*)-9,10-secospirosta-5,7,10(19)-trien-1 α ,3 α -diol **63** を 20% の収率で得た。化合物 **63** は、FABMS において化合物 **62** と同様 m/z 429 に $[M+H]^+$ のイオンピークを示した。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、6-H、7-H、19a-H 及び 19b-H の 4 個のビニールプロトンシグナルが各々 δ 6.41 (d, $J=11.3$ Hz)、6.02 (d, $J=11.3$ Hz)、5.25 (d, $J=1.8$ Hz) 及び 4.97 (d, $J=1.8$ Hz) に観察されており、1 β -H 及び 3 β -H は各々 δ 4.32 及び 4.05 に broad singlet で観察された。 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは Table 8 に示した。化合物 **62** と **63** は側鎖にスピロ環を持つ新規のビタミン D 型誘導体である。

第 2 節 側鎖にヘテロスピロ環を持つビタミン D 型誘導体の合成の試み

前節で、天然物である diosgenin **1** から E/F のスピロ環をそのまま保持したビタミン D 型誘導体を合成した。本節では、そのスピロ環の酸素原子を他のイオウ (S) やセレン (Se) に変換したビタミン D 型誘導体の合成を目指した。

まず、先に得た 5,7-dien-1 α ,3 β -diol **59** を、無水酢酸で加熱加圧して F 環を開環して (25*R*)-furost-1 α ,3 β ,26-triacetoxy-5,7,20(22)-triene **64** を 78% の収率で得た (Figure 13)。化合物 **64** は、FABMS において m/z 555 に $[M+H]^+$ のイオンピークを示した。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、21-CH₃ のプロトンシグナルが δ 1.59 に singlet で観察された。 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおいて、 δ 139.5、135.4、121.5、115.9 と 103.9 にそれぞれ C-8、C-5、C-6、C-7 と C-20 のカーボンシグナルが観察された。また、C-22 のビニールカーボンシグナルが、化合物 **59** の δ 109.3 から化合物 **64** の δ 151.8 と低磁場にシフトしていることから、化合物 **59** の F 環が開裂したことは明らかである (Figure 13)。

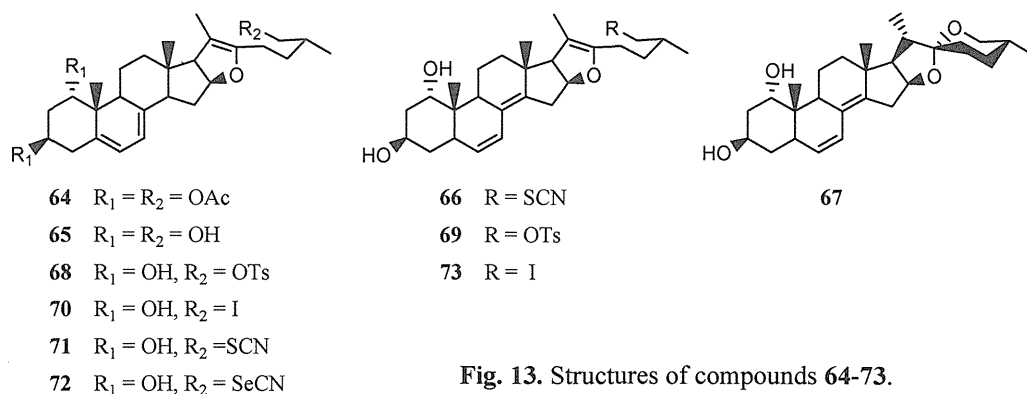


Fig. 13. Structures of compounds **64-73**.

次いで、トリアセチル体 **64** の脱アセチル体であるトリオール **65** の 26 位にヘテロ原子導入を容易にさせる置換基を導入する目的で、26 位の 1 級水酸基と 1 位及び 3 位の 2 級水酸基の反応性の差を利用して、26 位に *p*-トルエンシルホニル基 (Ts 基) の導入を試みた。この反応は、通常行うアルコール類のトシル化とは異なり、酸性或いは中性の条件で 20 位のプロトン化が引き金となって閉環反応が起こりやすいため³⁶⁾、反応条件の塩基性を高め閉環反応を防ぐことがポイントであると思われた。

先ず、通常のトシル化反応を試みた。即ち、トリオール **65** をピリジン溶媒中 TsCl で処理してトシル化した。生成したトシル体の精製が困難であったため、混合物を精製することなく、NaI および KSCN による連続求核置換反応を行なった。しかしながら、目的の化合物 **71** は得ることができず、26 位に SCN 基を持ち、二重結合が転移した (25*R*)-5 α -furost-1 α ,3 β -dihydroxy-26-thiocyano-6,8(14),20(22)-triene **66** (10%、**64** からの収率) と F 環が閉環した生成物 (22*S*,22*R*,25*R*)-5 α -spirost-1 α ,3 β -dihydroxy-6,8(14)-diene **67** (13%、**64** からの収率) を得た (Figure 13)。化合物 **66** は、FABMS において *m/z* 469 に [M]⁺ のイオンピークを示した。¹H-NMR スペクトルにおいて、 δ 5.35 (dd, *J* = 9.8, 1.6 Hz) と 6.12 (dd, *J* = 9.8, 3.1 Hz) にそれぞれ 6-H と 7-H のビニールプロトンが観察された。¹³C-NMR スペクトル (Table 8) において、 δ 151.0、144.6、130.5、126.2、124.6 と 104.6 にそれぞれ C-22、C-14、C-6、C-8、C-7 と C-20 の 6 個のビニールカーボンが観察された。さらに、5-H の立体配置を決定する目的で核オーバーハウザー効果 (NOE) を測定した結果、19-CH₃ のシグナルと 5-H との間に NOE が観察されなかったことから、5-H は α に配位しており、従って、A、B 環はトランス (trans) の立体配座である **66** の構造であることは明らかである。化合物 **67** は、FABMS において *m/z* 429 に [M + H]⁺ のイオンピークを示した。¹H-NMR スペクトルにおいて、 δ 5.33 (dd, *J* = 9.8, 1.5 Hz) と 6.12 (dd, *J* = 9.8, 3.1 Hz) にそれぞれ 6-H と 7-H のビニールプロトンが観察された。¹³C-NMR スペクトル (Table 8) において、 δ 145.7、130.3、125.9 と 124.7 にそれぞれ C-14、C-6、C-8 と C-7 の 4 つのビニールカーボンが観察された。さらに、文献記載⁶⁸⁾ の 6,8(14)-*trans* diene の構造とよく一致した。

この二重結合の転位反応に関しては、既に Windaus ら⁶⁹⁾ は、エルゴステロール (ergosterol) が 1,4-プロトン化による中間体のカルボニウムイオンの生成、次いで、プロトンの脱離により 6,8(14),23-triene になると報告している。この反応のプロトン源としては、反応中に試薬である TsCl から生成する強酸性の *p*-トルエンシルホン酸 (TsOH) であると考えられた。この転移反応は、(25*R*)-furost-1 α ,3 β -dihydroxy-26-*p*-toluenesulfonyloxy-5,7,20(22)-triene **68** を室温で 3 M HCl / MeOH と 20 時間反応

させて、(25*R*)-5 α -furost-1 α ,3 β -dihydroxy-26-*p*-toluenesulfonyloxy-6,8(14),20(22)-triene **69** (49%) を得たことから、プロトン化による二重結合の転位反応であることを立証することができた (Figure 13)。

二重結合が転位していない目的のトシル体 **68** は、Yoshida ら⁷⁰⁾ の報告に従って、CH₂Cl₂ を溶媒として用い、トリオール **65** の溶解性を高めるとともに、ピリジンの代わりに塩基性の強いトリエチルアミン (Et₃N) と触媒としてのトリメチルアミン塩酸塩 (Me₃N·HCl) を加え反応速度を高めてトシル化を行った結果、閉環反応が効率的に抑えられ、化合物 **68** を良い収率 (69%) で得ることができた。

化合物 **69** の ¹H- および ¹³C-NMR は、既に得た化合物 **66** のそれらとほとんど同じように観察されたことから、その構造を明らかにした。

化合物 **68** をヨウ素化して化合物 **70** を得、精製することなく KSCN および KSeCN と求核置換反応し、化合物 **71** および **72** をそれぞれ 38 と 24% の収率で得た。また、化合物 **69** から得たヨウ素体 **73** を精製することなく、KSCN と求核置換反応を行って、化合物 **66** を 76% の収率で得た (Figure 13)。

さらに、上記で得た化合物 **71** および **72** から光照射および続いての熱異性化を行なったが、いずれの場合にも単離不可能な混合物を与えた。これらの混合物の FABMS スペクトルでも目的のビタミン D 型誘導体に相当するイオンピークは何ら観察されなかった。このことは、光反応による B 環の開裂反応のみならず、側鎖の SCN や SeCN 基も光反応で何らかの変化を受け、無数の化合物を与えたのではないかと推察され、目的のヘテロスピロ環を持つビタミン D 型誘導体の合成は、現時点では断念せざるを得なかった。

第 3 節 側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体及び関連化合物の癌細胞増殖抑制活性

第 1 および 2 節で合成したビタミン D 型誘導体 (**62** および **63**)、スピロスタン型誘導体 (**47-50**、**59-61** および **67**) およびフロスタン型誘導体 (**66**、**71** および **72**) の癌細胞増殖抑制活性について、P-糖タンパクがほとんど発現していないヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 と P-糖タンパクが発現しているヒト肝上皮癌細胞 Hep G2 を用いて、Mosmann⁷¹⁾ の MTT 法に準じて評価・比較した。

Table 9 に示した化合物 **47-50**、**59-63**、**66**、**67**、**71** および **72** の HCT 116 および Hep G2 細胞に対する増殖抑制活性の IC₅₀ 値は、化合物 **67** (Hep G2 細胞では IC₅₀ = 21.6 ± 4.7 μ M) を除いて、すべて diosgenin **1** (HCT 116 細胞では IC₅₀ > 100 μ M、

Table 9. Cytotoxic effects of **1**, **47-50**, **59-63**, **66**, **67**, **71** and **72** against HCT 116 and Hep G2 cell lines.

Compound	IC ₅₀ (μM) ^a	
	HCT 116	Hep G2
1 [S] ^b	> 100 ^c	21.0 ± 7.5
47 [S]	16.0 ± 0.4	10.3 ± 1.8
48 [S]	12.3 ± 0.5	10.8 ± 2.8
49 [S]	10.5 ± 0.5	5.2 ± 1.4
50 [S]	15.1 ± 0.4	5.9 ± 0.6
59 [S]	10.4 ± 0.3	6.8 ± 0.5
60 [S]	54.0 ± 3.6	7.7 ± 1.5
61 [S]	9.5 ± 2.6	2.4 ± 0.8
62 [V]	22.4 ± 5.1	16.0 ± 2.1
63 [V]	16.9 ± 0.3	16.3 ± 2.9
66 [F]	1.3 ± 0.2	2.8 ± 0.4
67 [S]	22.7 ± 0.6	21.6 ± 4.7
71 [F]	4.9 ± 0.3	6.4 ± 1.2
72 [F]	10.4 ± 1.0	12.7 ± 2.2

^aIC₅₀ values (mean ± SD) are the concentrations at which 50% of the cells are inhibited from growing. SD, standard deviation.

^b[S], [F] and [V] represent spirostane, furostane and vitamin D derivative, respectively.

^cIC₅₀ values more than 100 μM were indicated as > 100.

Hep G2 細胞では IC₅₀ = 21.0 ± 7.5 μM) の各々の値より小さく、これらの誘導体は **1** に比べて細胞増殖抑制活性が強いことを示した。

HCT 116 細胞に対しては、フロスタン型誘導体 **66** (IC₅₀ = 1.3 ± 0.2 μM) および **71** (IC₅₀ = 4.9 ± 0.3 μM) が、ビタミン D 型誘導体 **62** (IC₅₀ = 22.4 ± 5.1 μM) と **63** (IC₅₀ = 16.9 ± 0.3 μM) およびスピロスタン型誘導体 **47-50**、**59-61** および **67** (IC₅₀ = 9.5 ± 2.6 ~ 54.0 ± 3.6 μM) より著しく高い活性を示した。化合物 **71** と **72** はそれぞれ 26 位に SCN と SeCN 基を持つ 5,7-*cis* diene 誘導体であり、化合物 **66** は 26 位に SCN 基を持つ 6,8(14)-*trans* diene 誘導体である。このような構造と置換基の違いによって HCT 116 細胞に対する増殖抑制活性に差が出たとも考えられた。即ち、26 位に SCN 基が存在し、かつ 6,8(14)-*trans* diene 構造が HCT 116 細胞の増殖を抑制するために有効であると考えられた。

Hep G2 細胞においては、HCT 116 細胞でみられたような活性と構造に相関性が認められなかった。本細胞の増殖抑制に対する効果では、フロスタン型誘導体 **66** のみ

ならずスピロスタン型誘導体 **61** (5,7-*cis* diene 誘導体) においても、同様な強い活性 (各々 $IC_{50} = 2.8 \pm 0.4$ および $2.4 \pm 0.8 \mu M$) が認められた。

興味あることに、今回合成した化合物のうち、化合物 **66** と **71** は P-糖タンパクがほとんど発現していない HCT 116 細胞のみならず P-糖タンパクが発現している Hep G2 細胞にも強い増殖抑制活性を示し、他の化合物は Hep G2 細胞に対して HCT 116 細胞に対してよりも強い活性を示していた。特に、今回評価した化合物のうち、スピロスタン型誘導体 **61** とフロスタン型誘導体 **66** (各々 $IC_{50} = 2.4 \pm 0.8$ および $2.8 \pm 0.4 \mu M$) は P-糖タンパクが発現している Hep G2 細胞に対して著しい増殖抑制活性を示した。また、化合物 **49**、**50**、**59**、**60** および **71** も化合物 **61** と **66** よりも低い活性を示したが、Hep G2 細胞に対して強い活性 ($IC_{50} = 5.2 \pm 1.4 \sim 7.7 \pm 1.5 \mu M$) を示した。このように、癌細胞に発現している P-糖タンパクに感受性の低い化合物を見出したことは、興味深く、今後、多剤耐性克服可能な抗癌剤の開発に何らかの糸口になるものと考えられる。

第 4 節 スピロスタン型、フロスタン型及び側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型の 3 つのタイプの化合物に関するアポトーシス誘導メカニズムの解析

第 3 節で、P-糖タンパクが発現している Hep G2 細胞の増殖を強く抑制するものとそうでないものがあつた。この活性の違いを明らかにする目的で、薬物によるアポトーシスを標的として検討した。

癌の発生及び癌細胞の成長には、細胞増殖の制御異常だけでなく、アポトーシス機構の異常が重要な役割を果たしていると考えられる⁷²⁻⁷⁴。臨床における癌の治療には、手術以外に放射線療法、内分泌療法、化学療法、免疫療法があるが、いずれも癌細胞にアポトーシスを誘発すると考えられている。

最近、癌抑制遺伝子 p53⁷⁵、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害因子 p21⁷⁶、アポトーシス抑制因子 Bcl-2⁷⁷ およびアポトーシス促進因子 Bax⁷⁸ などのアポトーシス関連遺伝子が次々と報告されている。

今回、Hep G2 細胞において、スピロスタン型 **59**、側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型 **62** 及び F 環が開裂したフロスタン型 **66** の 3 つの異なる構造を持つ化合物の癌細胞増殖抑制作用のメカニズムとアポトーシスとの関係を明らかにする目的で、上記 4 つのアポトーシス関連遺伝子の mRNA 量の変化を RT-PCR 法で評価・解析した。

第 1 項 *p53*、*p21*、*Bax* および *Bcl-2* の mRNA 量

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は DNA 配列を増幅するため、鋳型の変性、プライマー (primer) のアニーリング (annealing) およびプライマーの伸長等のサイクルを複数回行う反応である³²⁾。この反応では、直前のサイクルで増幅された産物が次の増幅サイクルの鋳型になるので、PCR は指数関数的なプロセスで増幅する。

今回、実験に用いたアポトーシス関連遺伝子としての *p53*、*p21*、*Bax*、*Bcl-2* および内部標準としてのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*GAPDH*) mRNA の RT-PCR 用プライマーは、既知の遺伝子配列をもとにして、Table 10 に示すように設計した。

Table 10. Primers of RT-PCR for apoptosis-related signals and *GAPDH* mRNA.

Primers	Sequence	Product size (bp)
<i>p53</i>	sense: 5' - GCA CTG GTG TTT TGT TGT GG - 3' antisense: 5' - GTG GTT TCA AGG CCA GAT GT - 3'	304
<i>Bax</i>	sense: 5' - AAG CTG AGC GAG TGT CTC AAG CGC - 3' antisense: 5' - ACC ACT GTG ACC TGC TCC AGA AG - 3'	424
<i>p21</i>	sense: 5' - GAC ACC ACT GGA GGG TGA CT - 3' antisense: 5' - CAG GTC CAC ATG GTC TTC CT - 3'	172
<i>Bcl-2</i>	sense: 5' - AGA TGT CCA GCC AGC TGC ACC TGA C - 3' antisense: 5' - AGC CTC CGT TAT CCT GGA TCC A - 3'	242
<i>GAPDH</i>	sense: 5' - CAA TAT GAT TCC ACC CAT GGC AAA TTC CAT GGC AC - 3' antisense: 5' - TGA AGT CAG AGG AGA CCA CCT GGT GCT CAG TGT AG - 3'	718

Table 11. Reaction mixture for RT-PCR.

Component	Volume / reaction	Final concentration
5 x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer*	10.0 μ L	1 x
dNTP Mix (containing 10 mM of each dNTP)	2.0 μ L	400 μ M of each dNTP
QIAGEN OneStep Enzyme Mix	2.0 μ L	—
Primer A (sense)	1.0 μ L	1.0 μ M
Primer B (antisense)	1.0 μ L	1.0 μ M
Total RNA	0.125 ~ 1.0 μ g	0.125 ~ 1.0 μ g / 50 μ L
RNase-free Water	up to 50 μ L	—
Total volume	50 μ L	

* Contains 12.5 mM MgCl₂

また、*p53*、*Bax*、*p21*、*Bcl-2* 及び *GAPDH* の mRNA 量と蛍光強度との直線性を調べる目的で、0.125、0.25、0.50 及び 1.00 μg のトータル (total) RNA 量の RT-PCR 反応液 (50 μL) を調製し (Table 11)、対応する増幅プライマーを用いて、Table 12 に示した各温度、時間及びサイクル数で RT-PCR を行い、検量線を作成した。

Table 12. Thermal cycler conditions for one-step RT-PCR.

	<i>p53</i>	<i>Bax</i>	<i>p21</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>GAPDH</i>
mRNA \rightarrow cDNA	50°C, 35min	50°C, 35min	50°C, 35min	50°C, 35min	50°C, 35min
	95°C, 15min	95°C, 15min	95°C, 15min	95°C, 15min	95°C, 15min
PCR cycling	94°C, 1min	94°C, 1min	94°C, 1min	94°C, 1min	94°C, 30s
	62°C, 30s	64°C, 1min	64°C, 1min	66°C, 1min	59°C, 10s
	72°C, 30s	72°C, 1min	72°C, 30s	72°C, 1min	72°C, 20s
Number of cycles	25	30	28	34	23
Final extension	72°C, 10min	72°C, 10min	72°C, 10min	72°C, 10min	72°C, 10min

その結果、Figure 14 に示したように、*GAPDH* 及び *Bax* の mRNA 増幅量は、0.125 から 1.00 μg のトータル RNA 量まで高い直線性を示した。その他、*p53*、*p21* 及び *Bcl-2* の mRNA 増幅量は、0.50 μg 以上のトータル RNA 量でやや頭打ちが認められたものの、本実験の mRNA 定量法の妥当性が確認された。上記の結果より、本実験では、いずれも 0.50 μg のトータル RNA 量の RT-PCR 反応液を調製した。

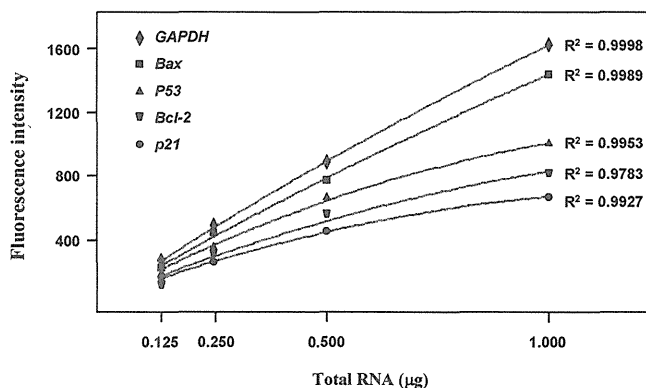


Fig. 14. Relationship between fluorescence intensity of *GAPDH*, *p53*, *Bax*, *Bcl-2* and *p21* mRNA level and total RNA in reaction mixture for RT-PCR.

第 2 項 Hep G2 細胞におけるアポトーシス誘導メカニズムの解析

Table 9 に示したように、各薬物の細胞増殖抑制活性において、スピロスタン型誘導体は、HCT 116 細胞に比べ Hep G2 細胞に対して、活性の増強傾向が認められた。一方、フロスタン型誘導体は、HCT 116 細胞に比べ Hep G2 細胞に対して、活性の低下傾向が見られ、側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体は、両細胞に対する増殖抑制活性の顕著な差は認められなかった。以上の結果より、この 3 つのタイプの誘導体は、異なる作用メカニズムで癌細胞増殖を抑制するものと考えられた。今回、Hep G2 細胞を用いて、同様な細胞増殖抑制活性を示す IC₅₀ 値になるように、スピロスタン型 **59**、スピロ環を持つビタミン D 型 **62** 及びフロスタン型誘導体 **66** を添加し、培養 48 時間後に *p53*、*p21*、*Bax*、及び *Bcl-2* の mRNA 量の変化を RT-PCR 法で解析した。

その結果、Figure 15 に示したように、スピロスタン型 **59** 及びスピロ環を持つビタミン D 型誘導体 **62** の添加によって、*p53* 及び *Bax* mRNA の蛍光強度は、各々の薬物を添加していないコントロールのそれと比較して、顕著な増加が認められた。一方、フロスタン型誘導体 **66** の添加によって、*p53* mRNA の蛍光強度の増加は認められず、*Bax* mRNA の蛍光強度のみの増加が認められた。

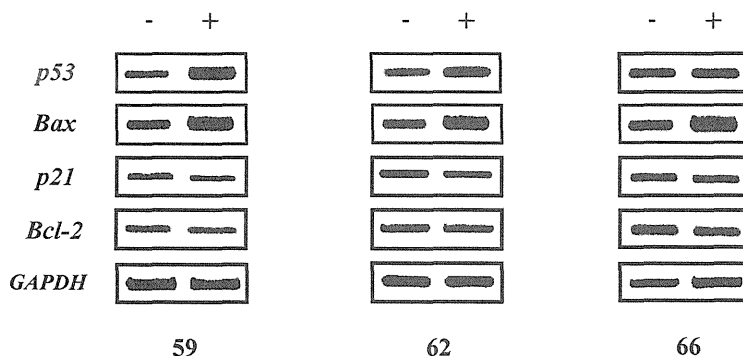


Fig. 15. *p53*, *Bax*, *p21* and *Bcl-2* mRNA in Hep G2 cell with (+) or without (-) compounds **59**, **62** and **66** at IC₅₀ in DMEM for 48h.

これら各薬物添加後の *p53*、*Bax*、*p21* 及び *Bcl-2* の mRNA 量と内部標準としての *GAPDH* の mRNA 量との比と、コントロールのそれらとの比を Table 13 に示した。

まず、スピロスタン型 **59** 及び側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体 **62** の

Table 13. Effect of tested compounds **59**, **62** and **66** on *p53*, *Bax*, *p21* and *Bcl-2* mRNA.

Compound	<i>p53</i>	<i>Bax</i>	<i>p21</i>	<i>Bcl-2</i>
59	2.2 ± 0.1 *	2.1 ± 0.4 *	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.3
62	1.7 ± 0.4 *	2.5 ± 0.3 *	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.3
66	1.1 ± 0.2	2.4 ± 0.3 *	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1

Data showed the ratios for levels of these apoptosis-related signals mRNAs with drug treatment / those of control (DMSO only). n = 3. *; p < 0.05.

添加によって、*p53* の mRNA 量は各々 2.2 ± 0.1 倍と 1.7 ± 0.4 倍の有意の増加が認められ (p < 0.05)、*Bax* mRNA 量は各々 2.1 ± 0.4 倍と 2.5 ± 0.3 倍の有意の増加が認められた (p < 0.05)。その他、*p21* 及び *Bcl-2* の mRNA 量の変化は認められなかった。この結果から、スピロスタン型 **59** 及びスピロ環を持つビタミン D 型誘導体 **62** は、Hep G2 細胞において、*p53* を介した経路によるアポトーシス誘導作用を示すことを明らかにした。即ち、細胞の DNA がダメージを受け、*p53* の活性化により *p53* mRNA 量が増加し、さらに *Bax* 遺伝子が活性化され *Bax* mRNA 量の増加が見られたものと考えられる。*Bax* mRNA 量の増加は、両化合物が直接ミトコンドリアに作用する可能性も示唆している。Chresta ら⁸⁰⁾ は、エトポシド (etoposide) で処理した精巣癌細胞のアポトーシス誘導において、*p53* 及び *Bax* をともに発現することを報告している。また、Ueno ら⁸¹⁾ は、精巣癌細胞に対して、カンプトテシン誘導体の塩酸イリノテカン (CPT-11) の活性代謝物である SN-38 によるアポトーシスには、*p53* 及び *Bax* が促進的に働いていることを報告している。

以上のことより、スピロスタン型 **59** 及び側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体 **62** は、Hep G2 細胞において、エトポシドや SN-38 のような作用メカニズムでアポトーシスを誘導するものと考えられた。

一方、フロスタン型誘導体 **66** の添加によって、*p53* の mRNA 量の増加は認められず、*Bax* mRNA 量のみ 2.4 ± 0.3 倍の有意の増加が認められた (p < 0.05)。その他、*p21* 及び *Bcl-2* の mRNA 量の変化は観察されなかった。この結果から、フロスタン型誘導体 **66** は、Hep G2 細胞において、*p53* を介さない経路^{82, 83)} によるアポトーシス誘導作用を示すことを明らかにした。Takahashi ら⁸⁴⁾ は、精巣癌細胞において、パクリタキセル (paclitaxel) は *p53* 非依存的に *Bax* mRNA 量を増加させ、アポトーシスを誘導していると報告している。この結果より、フロスタン型誘導体 **66**

は、Hep G2 細胞において、パクリタキセルのように p53 非依存性にアポトーシスを誘導しているものと考えられた。

かくして、スピロスタン型 **59** 及び側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体 **62** は p53 依存的に、一方、フロスタン型誘導体 **66** は、p53 非依存的にアポトーシスを誘導していることを明らかにした。この結果は、細胞に対する感受性の差にアポトーシス誘導作用メカニズムが関与している可能性を示唆している。

第三章 小括

1) 天然のヤマノイモの主成分である diosgenin **1** をリード化合物として、スピロスタン型、側鎖にスピロ環を保持したビタミン D 型及びそのスピロ環が開裂したフロスタン型の 3 つのタイプの誘導体を合成した。

2) 天然に存在する F 環に酸素原子を持つスピロスタン型誘導体とその酸素原子をイオウ (S)、セレン (Se) および窒素 (NH として) に変えたスピロスタン型誘導体の P-糖タンパクがほとんど発現していないヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 に対する増殖抑制活性を比較し、F 環に窒素原子を持つスピロスタン型誘導体が最も効果の大きいことを明らかにした。

3) 今回合成したステロイド誘導体のうち、A 環に α,β -不飽和ケトンを持つフロスタン型誘導体に、P-糖タンパクが発現しているヒト肝上皮癌細胞 Hep G2 に対して、著しく高い増殖抑制活性を持つものを見出した。このことは、多剤耐性を獲得した他の癌細胞に対しても有効な薬物の開発への糸口となり得、今後の研究に期待できるものと考えられる。

4) Hep G2 細胞において、スピロスタン型及び側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体は、薬物添加後 p53 及び Bax mRNA 量の有意の増加が認められ、p53 依存的に、一方、フロスタン型誘導体は、薬物添加後 p53 mRNA 量の増加が認められず、Bax mRNA 量のみ有意の増加が認められ、p53 非依存的にアポトーシスを誘導していることを明らかにした。

第二編 アルキルアロエニン及びアルキルアロエニン硫酸エステル誘導体の合成と癌細胞増殖抑制活性⁸⁵⁾

古くから民間薬として使用されて来たアロエは、南アフリカやアラビア諸国を原産地とするユリ科の多年生植物で、現在、世界各地に広がり、約 300 種類もあると言われている⁸⁶⁾。その中で、アロエベラ (*Aloe barbadensis* Miller) から分離される低分子量のフェノール性化合物であるアロエエモジン (aloe-emodin) (Figure 16) が、神経芽細胞種に対して増殖抑制活性を示し⁸⁷⁾、神経外肺葉種に対して選択的活性を持つ新しいタイプの抗癌剤である⁸⁸⁾と報告されている。一方、日本の特産種で、昔から「医者いらず」の愛称で知られていたキダチアロエ (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger) は、健康食品⁸⁹⁾や化粧品原料として使用が認められている他、緩下・瀉下作用⁹⁰⁾、健胃作用⁹¹⁾、抗炎症作用⁹²⁾など様々な作用があり、火傷治療⁹³⁾や美肌効果を目的にするなど、幅広い用途の植物として使用されている。既に、Yagi ら⁹⁴⁾は、キダチアロエから分離された高分子多糖類のアロエマンナン (*Aloe mannan*) がマウスに移植された sarcoma-180 細胞の増殖を抑制したと報告している。近年、Shimpo ら⁹⁵⁾は、キダチアロエの酢酸エチル抽出物に発癌プロモーター (promotor) である 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) により誘発された ear oedema を抑制する効果があり、その抽出成分を分析した結果、バルバロイン (barbaloin)、イソバルバロイン (isobarbaloin)、アロエニン (aloenin) 74 (Figure 16) の 3 つの成分が含有されていたと報告している。

第一章 アルキルアロエニン誘導体の合成と癌細胞増殖抑制活性

既に、当臨床薬物化学研究室では、キダチアロエ成分のヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 に対する増殖抑制活性の検証を行なっており⁹⁶⁾、結果、主成分である aloenin 74 は HCT 116 細胞に対して顕著な活性を示さないことを報告している。

Aloenin 74 は Figure 16 に示すように、フェノール誘導体としてのアグリコン部と糖部の β -D-グルコピラノース (β -D-glucopyranose) からなる配糖体である。Hayashi ら⁹⁷⁾は、フラボン類 (Flavones) の細胞増殖抑制活性の発現にはその分子に適度な疎水性を持たせることが重要であると報告している。彼らの報告は、著者に次のような示唆を与えた。即ち、HCT 116 細胞に対して活性の弱い aloenin 分子の疎水性を高めることにより、癌細胞増殖抑制活性を高めることは出来ないものかと考えた。Aloenin 74

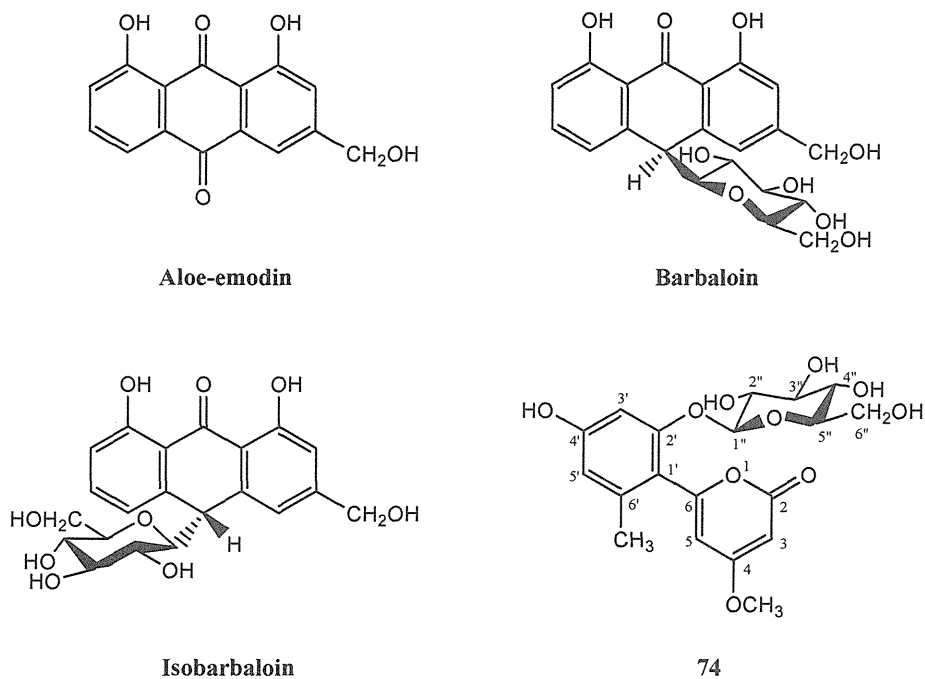
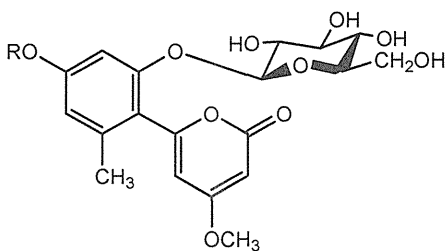


Fig. 16. Structures of aloe-emodin, barbaloin, isobarbaloin and aloenin 74.

は、アグリコン部のフェノール性水酸基と糖部のアルコール性水酸基を持っている。著者は、まず、 aloenin 74 の疎水性を高める目的で、 4'-位のフェノール性水酸基に各種アルキル (alkyl) 基の導入を行なった。

第 1 節 アルキルアロエニン誘導体の合成

Aloenin 74 はアグリコン部にフェノール性水酸基と糖のアルコール性水酸基を有しており、より反応性が高い 4'-位のフェノール性水酸基を選択的アルキル化することができると考えられ、以下の実験を行った。Methylaloenin 75 は、Hirata ら⁹⁸⁾の方法に従って、 aloenin 74 をジアゾメタン (diazomethane) でメチル化して得た。その他のアルキルアロエニンは、炭酸カリウム存在下、種々の alkyl bromide および alkyl iodide と縮合反応を行って、 Figure 17 に示す methylaloenin 75 ~ docosylaloenin 91 と benzylaloenin 92 および allylaloenin 93 の計 19 個のアルキルアロエニン誘導体を得た。



75-93

- 75 R = Methyl
- 76 R = Ethyl
- 77 R = Propyl
- 78 R = Butyl
- 79 R = Pentyl
- 80 R = Hexyl
- 81 R = Heptyl
- 82 R = Octyl
- 83 R = Nonyl
- 84 R = Decyl
- 85 R = Undecyl
- 86 R = Dodecyl
- 87 R = Tetradecyl
- 88 R = Hexadecyl
- 89 R = Octadecyl
- 90 R = Eicosyl
- 91 R = Docosyl
- 92 R = Benzyl
- 93 R = Allyl

Fig. 17. Structure of 4'-O-alkylaloeinins 75-93.

第 2 節 アルキルアロエニン誘導体の癌細胞増殖抑制活性

序論で述べたように、抗癌剤の臨床使用で問題となっている多剤耐性の克服に関する研究は、現在、世界的規模で行なわれており、抗癌剤の副作用軽減とともに大きなテーマとなり得る。今回、前節で合成したアルキルアロエニン誘導体の P-糖タンパクが発現している癌細胞に対する感受性を検討する目的で、ヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 及びヒト肝上皮癌細胞 Hep G2 を選択して研究を行った。これら癌細胞については、Shionoya ら³⁹⁾は、HCT 116 細胞には P-糖タンパクがほとんど発現されておらず、Lee ら²⁸⁾は、Hep G2 細胞には P-糖タンパクが発現していると報告しているものである。

合成したアルキルアロエニン誘導体の細胞増殖抑制活性を HCT 116 と Hep G2 細胞を用い、MTT 法⁷¹⁾により評価・比較し、その IC₅₀ 値 (癌細胞の増殖を 50% 阻害する濃度) を Table 14 に示した。

Aloenin 74 の HCT 116 細胞に対する増殖抑制活性は IC₅₀ 値が 293.1 ± 32.7 μM と報告されている⁸⁵⁾。今回合成したアルキルアロエニン誘導体のうち、アルキル側鎖の短い methylaloeenin 75 と ethylaloeenin 76 は、aloeenin 74 と同様に、IC₅₀ 値が 100 μM 以上であり、活性が弱いか活性がないと考えられた。更に側鎖の長さが順次増加するにつれて、4'-O-propylaloeenin 77 (IC₅₀ = 87.5 ± 9.4 μM) から 4'-O-tetradecylaloeenin

Table 14. Cytotoxic activities of aloenin and 4'-*O*-alkylaloenins against HCT 116 and Hep G2 cancer cell lines.

Compound	IC ₅₀ ± SD (μM) ^a	
	HCT 116	Hep G2
74	> 100 ^b	> 100
75	> 100	> 100
76	> 100	> 100
77	87.5 ± 9.4	> 100
78	75.2 ± 2.4	> 100
79	46.3 ± 9.8	> 100
80	17.9 ± 5.5	36.2 ± 7.1
81	5.1 ± 0.8	28.5 ± 9.2
82	10.4 ± 2.5	23.4 ± 2.2
83	5.7 ± 0.5	14.7 ± 1.5
84	8.9 ± 2.1	13.5 ± 2.3
85	8.7 ± 2.1	20.1 ± 3.7
86	6.6 ± 0.7	12.1 ± 3.1
87	5.3 ± 2.3	4.0 ± 0.6
88	16.2 ± 4.9	16.0 ± 0.9
89	> 100	> 100
90	> 100	> 100

^a IC₅₀ values (mean ± SD) are the concentrations at which 50% of the cells are inhibited from growing. SD, standard deviation.

^b IC₅₀ values more than 100 μM were indicated as > 100.

87 (IC₅₀ = 5.3 ± 2.3 μM) の順に活性が増加し、 aloenin **74** 自身のほぼ 55 倍に活性が高まった。しかしながら、更にアルキル基の長さが増加した 4'-*O*-hexadecylaloenin **88** (IC₅₀ = 16.2 ± 4.9 μM) では活性の低下がみられ、 4'-*O*-octadecylaloenin **89** 及び 4'-*O*-eicosylaloenin **90** では、活性を示さなかった (IC₅₀ > 100 μM)。化合物 **74**~**87** は 150 μM の濃度で測定溶液が全て澄明であったのに対し、化合物 **88** では若干の懸濁が認められ、化合物 **89** と **90** では、かなりの沈殿を生じた。従って、化合物 **88** の若干の活性の低下と化合物 **89** と **90** の顕著な低下は、アルキル鎖の延長に従って、それら化合物が培養液に対する溶解度の低下に起因し、細胞内への薬物透過量が低下したものと推察された。

アルキルアロエニン誘導体 74~90 の Hep G2 細胞に対する増殖抑制活性は、アルキル側鎖の比較的短い methylaloeenin 75 から pentylaloeenin 79 では、その IC₅₀ 値が、全て 100 μM 以上の値を示し、効果的な活性は認められなかったが、側鎖が hexyl から tetradecyl 基までの誘導体で、活性の増加傾向が認められ、tetradecylaloeenin 87 で最高の活性 (IC₅₀ = 4.0 ± 0.6 μM) を示した。また、HCT 116 細胞におけると同様、本細胞実験でも hexadecylaloeenin 88 の活性 (IC₅₀ = 16.0 ± 0.9 μM) は 87 より弱くなり、更に、側鎖の長い octadecylaloeenin 89 と eicosylaloeenin 90 では、IC₅₀ 値が 100 μM 以上となった。このことは、HCT 116 細胞の活性分析で述べたのと同様に、これら誘導体が培養液に対する溶解度の低下に起因したものと考えられる。このように、HCT 116 及び Hep G2 細胞に対する増殖抑制活性は、aloeenin 分子の 4'-O- に適当な長さのアルキル基を導入することにより増加することが明らかとなった。そのうち、tetradecylaloeenin 87 は、HCT 116 細胞 (IC₅₀ = 5.3 ± 2.3 μM) と Hep G2 細胞 (IC₅₀ = 4.0 ± 0.6 μM) の増殖を最も抑制した。

第 3 節 アルキルアロエニン誘導体の疎水性と HCT 116 及び Hep G2 細胞に対する増殖抑制活性との関係

上記で述べたように、Hayashi ら⁹⁷⁾ は、フラボン類の癌細胞増殖抑制活性の発現には、その分子に適当な疎水性を持たせることが重要であると報告しているが、アルキルアロエニン誘導体でもそれらの疎水性と細胞増殖抑制活性との間に同様な関係があるかどうかを検討した。

Figure 18 にアルキルアロエニン誘導体 77 ~ 87 と benzylaloeenin 92 及び allylaloeenin 93 の HCT 116 と Hep G2 細胞に対する増殖抑制活性 (IC₅₀ 値で示す) とそれら誘導体の疎水性 (C log P 値⁹⁹⁾ で示す) の関係を示した。Figure 18 から、アルキル基が長くなるにつれて疎水性が増加するが、その疎水性と共に細胞増殖抑制活性も両細胞に対していずれもほぼ増加することが明らかとなった。また、この疎水性と細胞増殖抑制活性の関係は、新たに合成した benzylaloeenin 92 と allylaloeenin 93 の HCT 116 細胞を用いた評価でも確認された。即ち、疎水性の大きい 92 (C log P = 1.81) の細胞増殖抑制活性 (IC₅₀ = 32.9 ± 4.9 μM) は、疎水性の小さい 93 (C log P = 0.82) のそれ (IC₅₀ = 50.2 ± 3.1 μM) より強かった。この化合物の疎水性と細胞増殖抑制活性の関連性については、更に、Iwase¹⁰⁰⁾ らによっても、アルカロイド (alkaloid) であるベルベリン (berberine) の 8 と 13 位に alkyl 基を導入することによって、活性が高くなることが報告されており、著者の aloeenin 74 の 4'-O- に適当なアルキル基の導

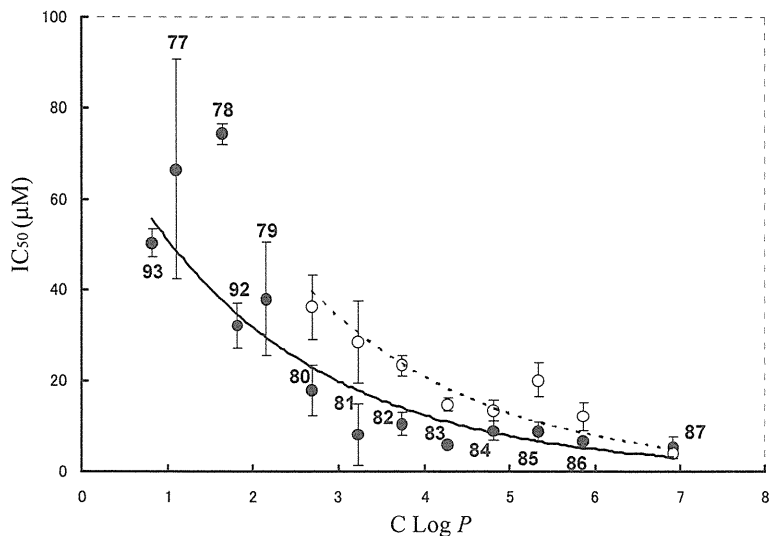


Fig. 18. Relationships between C log *P* and the cytotoxic effects of 4'-*O*-alkylaloeins against HCT 116 and Hep G2 cells.
 Closed circle: HCT 116 cells and open circle: Hep G2 cells.
 Regression lines for HCT 116 and Hep G2 cells were $y = 81.4 \cdot e^{-0.469 \cdot x}$; ($R^2 = 0.733$, $p < 0.001$) and $y = 147.5 \cdot e^{-0.489 \cdot x}$; ($R^2 = 0.827$, $p < 0.001$), respectively. Each value shows the mean \pm SD.

入による細胞増殖抑制活性の増加と一致している。しかしながら、アルキル基導入による化合物の活性発現のメカニズムに関する研究は今後の問題であろう。

第 4 節 アルキルアロエニン誘導体の HCT 116 細胞及び P-糖タンパクが過剰に発現している HCT 116 / VCR100-1-1 細胞に対する増殖抑制活性の比較

Table 14 および Figure 18 に示したように、アルキルアロエニン誘導体 77~86 の個々の HCT 116 細胞に対する増殖抑制活性は Hep G2 細胞に対するそれより高い IC₅₀ 値を示したが、これは Hep G2 細胞に P-糖タンパクが発現していることによるものであるか、それとも単なる両細胞における生理学的な違いに基づくものであるかは明確ではなかった。そこで、HCT 116 細胞の変異株であり P-糖タンパクが過剰に発現している HCT 116 / VCR 100-1-1 細胞¹⁰¹⁾を用いて、化合物 80~87 の細胞増殖抑制活性を HCT 116 細胞に対するそれと比較した (Figure 19)。Figure 19 は、アルキルアロエニン 80~87 の個々化合物の HCT 116 細胞に対する増殖抑制活性より、

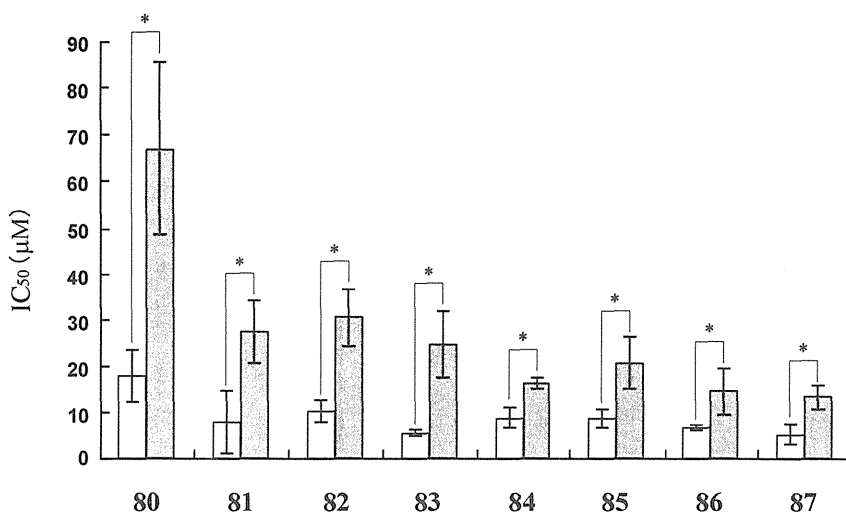


Fig. 19. Cytotoxic activities of 4'-O-alkylaloenins **80-87** against HCT 116 and HCT 116 / VCR100-1-1 cancer cell lines. * ; $p < 0.01$.
Open bar : HCT 116 cells and Closed bar : HCT 116 / VCR100-1-1.

P-糖タンパクが過剰に発現している HCT 116 / VCR 100-1-1 細胞に対するそれが、高い IC₅₀ 値を示しており、従って活性は 1/2 から 1/4 の低下が認められた ($P < 0.01$)。こうした結果は、P-糖タンパクが発現している Hep G2 細胞の結果と一致した。従って、化合物 **80~87** は Hep G2 及び HCT 116 / VCR 100-1-1 細胞の薬物汲み出しポンプである P-糖タンパクの影響を受け、活性が低下しているものと考えられる。

第二章 アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体の合成と癌細胞増殖抑制活性

前章では、アルキル側鎖が methyl 基から docosyl 基までのアルキルアロエニンの合成を行なったが、hexadecylaloenin **88**、octadecylaloenin **89** 及び eicosylaloenin **90** は、培養液に対する溶解性が低く、疎水性と細胞増殖抑制活性との一定の関係からずれを生じた。著者は、アルキルアロエニンの糖部の水酸基をスルホン化することで、糖部の親水性を高め、アルキル基の順次増加による培養液に対する溶解性の低下を克服することができると考えられた。更に、その分子の界面活性性と細胞増殖抑制活性の関係を調べる目的で、本章では、アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体 (alkylaloenin sulfates) を合成し、それらの HCT 116 及び Hep G2 細胞に対する増殖抑制活性を評価・比較した。

第 1 節 アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体の合成

アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体 **94**~**102** は、アルキルアロエニン **75**、**80**、**84**、**86**~**91** の脱水ピリジン中、 SO_3 -pyridine complex との反応及び続いての NaHCO_3 との処理により得た (Figure 20)。

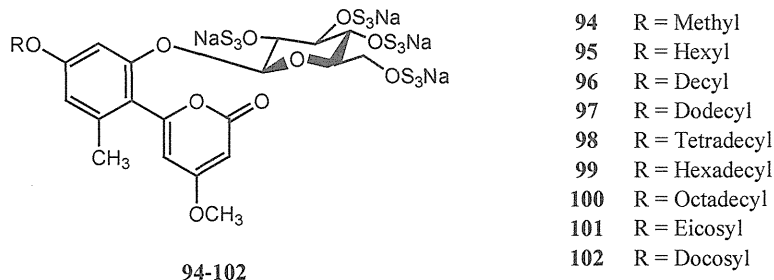


Fig. 20. 4'-O-alkylaloeenin sulfates **94-102**

第 2 節 アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体の癌細胞増殖抑制活性

合成したアルキルアロエニン硫酸エステル誘導体の癌細胞増殖抑制活性を比較し、結果を Table 15 に示した。

Table 15 に示すように、アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体である methyl - **94**、

Table 15. Cytotoxic activity of 4'-O-alkylaloeenin sulfates **94-102** against HCT 116, Hep G2 and HCT 116 / VCR100-1-1 cancer cell lines.

Compound	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD} (\mu\text{M})^{\text{a}}$		
	HCT 116	Hep G2	HCT 116 / VCR100-1-1
94	> 100 ^b	> 100	> 100
95	> 100	> 100	> 100
96	> 100	99.4 ± 9.1	> 100
97	27.1 ± 6.6	21.4 ± 4.6	31.4 ± 4.8
98	47.1 ± 19.6	24.0 ± 2.0	27.6 ± 3.1
99	22.2 ± 4.5	18.1 ± 1.6	21.3 ± 1.3
100	23.2 ± 2.2	14.8 ± 5.1	18.9 ± 1.7
101	12.3 ± 4.0	9.1 ± 0.9	14.9 ± 1.9
102	4.8 ± 0.2	4.0 ± 0.5	19.0 ± 2.6

^a IC_{50} values (mean ± SD) are the concentrations at which 50% of the cells are inhibited from growing. SD, standard deviation.

^b IC_{50} values more than 100 μM were indicated as > 100.

hexyl - 95、decyl - 96、dodecyl - 97、tetradecyl - 98、hexadecyl - 99、octadecyl - 100、eicosyl - 101 及び docosylalkylaloeenin-tetrasodiumsulfate 102 は、アルキル鎖の延長とともに、ほぼ活性の増強傾向が認められ、アルキル鎖が一番長い誘導体 102 は、IC₅₀ 値が HCT 116 細胞に対して $4.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ と Hep G2 細胞に対して $4.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$ と高い活性を示した。この結果は、硫酸エステル化された糖部の親水性と適当な長さのアルキル基によって、化合物の界面活性が増加した結果ミセル (micelle) 形成などによって薬物の溶解性及び細胞内への取り込みが増強されたものと推察される。また、化合物 97 ~ 102 の P-糖タンパクが発現している Hep G2 細胞に対する増殖抑制活性は、P-糖タンパクがほとんど発現していない HCT 116 細胞に対するそれと同程度の活性を示した。さらに、P-糖タンパクが過剰に発現している HCT 116 / VCR100-1-1 細胞に対しても、同程度の活性を示した ($14.9 \pm 1.9 \sim 31.4 \pm 4.8 \mu\text{M}$)。このことは、薬物汲み出し作用を行なうと考えられる P-糖タンパクが、これら化合物 97 ~ 102 に対して感受性が低いために、十分な細胞増殖抑制活性を発揮したものと推察された。

第三章 小括

1) Aloenin 74 は、HCT 116 及び Hep G2 細胞に対して顕著な細胞増殖抑制活性を示さないが、74 の 4'-O- に適当な長さのアルキル基を導入することによって、活性が増強した。合成したアルキルアロエニン 75 ~ 90 のうち、化合物 80 ~ 88 は P-糖タンパクがほとんど発現していない HCT 116 細胞のみならず、P-糖タンパクが発現している Hep G2 及び HCT 116 / VCR 100-1-1 細胞に対して効果的な増殖抑制活性を示した。また、そのなかでも teteradecylaloeenin 87 は、上記 3 つの癌細胞に対して最も強い活性を示した。

2) 4'-O- アルキルアロエニンの硫酸エステル誘導体のうち、長いアルキル鎖を持つ 97 ~ 102 は、短いアルキル側鎖を持つ 94 ~ 96 より HCT 116、Hep G2 及び HCT 116 / VCR100-1-1 細胞に対して増殖抑制活性が高かった。このことは、分子中のアグリコン部の疎水性と糖部の親水性の適度なバランスが、これら癌細胞の増殖を抑制するのに重要なことと推察される。

3) 4'-O- アルキルアロエニン誘導体 80 ~ 88 及び 4'-O- アルキルアロエニン硫酸エステル誘導体 97 ~ 102 は、P-糖タンパクが発現している Hep G2 及び HCT 116 / VCT 100-1-1 細胞に対して著しく高い活性を示した。このことは、これら化合物は細胞のモジュレーターがなくても P-糖タンパクが発現している他の癌細胞に対して有効である薬物の可能性を示唆するものと考えられ、今後の更なる研究が望まれる。

結 論

癌の化学療法に用いられる抗癌剤は、その臨床において大きな役割を果たしている。しかしながら、臨床ではより効果を高めるために異なる作用メカニズムを持つ複数の抗癌剤を使用することがある。しかしながら、癌細胞が細胞自身の存続を維持するために、投与した薬物を異物として認識し細胞外へ排出する機能を獲得し、抗癌剤としての効果が低下したり無効になったりすることがある (多剤耐性の獲得)。これは癌の化学療法に抗癌剤を使用する上で、薬物の副作用と共に大きな問題となっている。この多剤耐性の克服に関しては、現在多くの研究者によって研究が進められ、特に、モジュレーターの開発が盛んになされている。

著者は、本研究に当って、モジュレーターの探索を意図した基礎的研究から開始した。本研究で、現在、モジュレーターそのものを手に入れてはいないが、多剤耐性の原因の一つである、癌細胞に発現している P-糖タンパクに対して感受性の低くかつそれ自身細胞増殖抑制活性を持つ薬物を見出した。

第一編では、天然に存在するステロイド誘導体である diosgenin をリード化合物として、種々のスピロスタン型誘導体、フロスタン型誘導体及び側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体を合成し、それらの細胞増殖抑制活性を P-糖タンパクがほとんど発現していないヒト結腸上皮癌細胞である HCT 116 と P-糖タンパクが発現しているヒト肝上皮癌細胞である Hep G2 を用いて評価した。その結果、P-糖タンパクが発現している Hep G2 に対しても活性の高い誘導体を見出し、ある程度の構造と活性との相関性を見出すことができた。このことは、今後、Hep G2 細胞を始め P-糖タンパクが過剰に発現している他の癌細胞に対して、より活性の高い薬物の開発への糸口になると考えられる。また、今回合成した 3 つのタイプの化合物、即ち、スピロスタン型誘導体、フロスタン型誘導体及び側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体を用いて、Hep G2 細胞に対する増殖抑制作用のメカニズムを、細胞のアポトーシスの面から検討し、スピロスタン型誘導体及び側鎖にスピロ環を持つビタミン D 型誘導体は p53 依存的に、一方、スピロ環が開裂したフロスタン型誘導体は p53 非依存的にアポトーシスを誘導していることを明らかにした。このことは、多くの場合 p53 変異を起こしていると考えられる肺癌や乳癌では、フロスタン型誘導体の臨床応用が望まれ、今後更なる研究が待たれる。

第二編では、アロエから単離した aloenin をリード化合物として、その 4'-位のフェノール性水酸基に長さの異なる種々のアルキル基を導入して、化合物の疎水性と癌

細胞増殖抑制活性を調べた。その結果、アルキル基が長くなりすぎると、化合物の溶解性が低下して活性の評価はできなかったが、溶解性が十分ある化合物では、アルキル基が長くなるとともに、分子が疎水性を持ち、癌細胞増殖抑制活性と疎水性に一定の比例関係があることを見出した。これらのアルキルアロエニン誘導体は、P-糖タンパクがほとんど発現していない HCT 116 細胞でみられた活性が、P-糖タンパクが発現している Hep G2 細胞に対して弱くなった。しかしながら、アルキルアロエニン誘導体の溶解性を高めるために、糖部の水酸基を硫酸エステル化した化合物で、Hep G2 細胞の増殖を十分抑制するものを見出すことができた。

今回、Hep G2 癌細胞に発現している P-糖タンパクの薬物汲み出し作用に耐え、それ自身癌細胞の増殖を抑制する薬物をステロイド誘導体、アロエニン誘導体の中から見出すことができ、今後、P-糖タンパクが過剰に発現している他の癌細胞を用いての研究や、他の誘導体の効果を検討することにより、多剤耐性を克服できる抗癌剤の開発の一助となり得ると考えられる。

謝 辞

本研究に際して、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師 城西大学薬学部臨床薬物化学講座 齋藤 節生 教授に心から厚くお礼を申し上げます。

本研究実験の実施に際して、終始貴重なご指導、御助言を頂きました 城西大学薬学部臨床薬物化学講座 小柳 順一 先生に心から深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました副査 城西大学薬学部薬品製造化学講座 菊川 靖雄 教授、城西大学薬学部薬品情報学講座 駒田 富佐夫 助教授に深く感謝いたします。

NMR スペクトル及び MS スペクトルの測定を行なってくださいました 城西大学中央機器センターの皆様にも厚くお礼を申し上げます。

最後に、留学の機会を与えてくださいました 延辺大学医学院院長 崔炯谟 教授並びに延辺大学薬学院薬物化学講座 朴虎日 教授に深く感謝いたします。

実験の部

実験の部

一般事項

Diosgenin は SIGMA Chemical Co. Ltd より購入した。Aloenin はキダチアロエ (ユリカ株式会社) から抽出したものをを用いた⁹⁶⁾。その他の化学薬品及び有機溶媒は、市販品を用いた。

融点 (m.p.) は Yanagimoto micromelting point apparatus を用いて測定し、全て未補正である。

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) を用い、TLC 上の各スポットは Manaslu light (254 nm) にて確認した後、1 : 9 Ce(SO₄)₂ / 10% H₂SO₄ 試液を噴霧し、250 °C で 3 分間加熱して検出した。

カラムクロマトグラフィーは、Kieselgel 60 (70-230 mesh、E. Merck) を使用し、溶出液は TLC にて確認した。

分析および分取に用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、センシユウ化学製 SSC-6300、SSC auto injector 6310 および SSC fraction collector 6320 を用い、カラムは DOCOSIL (10 φ × 250 mm) を用いた。移動相流量は 1.0 mL / min、カラムオープン温度は 40 °C に設定した。

核磁気共鳴スペクトル (¹H、¹³C-NMR、¹H-¹H、¹H-¹³C COSY、DEPT および HMBC) は、JEOL JNM-A500 FT NMR spectrometer (500 および 125 MHz) を用いた。測定溶媒は、CDCl₃ 及び C₅D₅N を用い、内部標準物質として Tetramethylsilane (TMS) を用いた。略語: s (singlet)、d (doublet)、dd (doublet of doublets)、ddd (doublet of doublet of doublets)、m (multiplet)、t (triplet)、q (quartet)、quint (quintet)、td (triplet of doublets) と dt (doublet of triplets) を表示する。

質量スペクトル (MS) は、JEOL JMS-DX 300 mass spectrometer を用い、Fast atom bombardment mass spectra (FABMS) を測定した。

合成実験項

第一編 第一章

Diosgenone 2

Diosgenin 1 (5.2 g, 12.6 mmol) の toluene (34 mL) 懸濁液に cyclohexanone (40 mL) と aluminum *tert*-butoxide (6.3 g, 25.6 mmol) を加え、12 時間還流後、反応液を氷水 (200 mL) に注加、10% HCl (50 mL) を加え、CH₂Cl₂ (100 mL × 3) で抽出。抽出液を 5% NaHCO₃ (200 mL) および brine (300 mL) で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去して得た残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-6% ethyl acetate in benzene) で精製し、白色粉末の化合物 2 (3.8 g, 73%) を得た。

FABMS: m/z 435 [M + Na]⁺; ¹H-NMR は Saez ら¹⁰²⁾ のデータと一致した。¹³C-NMR スペクトルは Table 1 に示した。

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1,4-dien-3-one 3

Diosgenone 2 (500 mg, 1.0 mmol) の dioxane (20 mL) 溶液に DDQ (90% purity) (1.0 g, 4.0 mmol) を加え、36 時間還流。反応液をろ過。残渣を CH₂Cl₂ (100 mL) に溶解し、順次 10% NaOH (80 mL)、H₂O (80 mL) および brine (100 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後、ろ過。残渣を HPLC (10% H₂O-acetone) で精製し、融点 200-203 °C の白色針状晶 (after recrystallization from methanol) 3 (224 mg, 49%) を得た。

FABMS: m/z 433 [M + Na]⁺; ¹H-NMR は Takahira ら¹⁰³⁾ のデータと一致した。¹³C-NMR スペクトルは Table 1 に示した。

3,26-Diacetoxypseudodiosgenin 4

Diosgenin 1 (5.0 g, 12.1 mmol) の acetic anhydride (50 mL) 溶液をシールドチューブ中、200 °C で 12 時間加熱・加圧。反応後、溶媒を留去。残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-10% ethyl acetate in benzene) で精製し、油状の化合物 4 (3.4 g, 56%) を得た。FABMS: m/z 523[M + Na]⁺; ¹H- および ¹³C-NMR は、文献記載³⁶⁾ のそれらのものと一致した。

Pseudodiosgenin 5

化合物 4 (11.5 g, 23.0 mmol) の 10% KOH (H₂O / EtOH = 1 / 1) (230 mL) 溶液を、室温で 1 時間攪拌。反応液を 5% NaHCO₃ (300 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (150 mL × 3) で抽出。抽出液を brine (300 mL) で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去して化合物 5 (9.5 g) を得、精製することなく次の反応に供した。

26-*p*-Toluenesulfonylpseudodiosgenin 6

化合物 5 (9.5 g, 22.9 mmol) の pyridine (230 mL) 溶液に、TsCl (8.7 g, 45.8 mmol) を加え、0 °C で 4 時間攪拌。反応液を氷水 (300 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (150 mL × 3) で抽出した。抽出液を 5% HCl (150 mL × 3)、5% NaHCO₃ (300 mL) および brine (300 mL) で順次洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去。残渣をカラムクロマトグラフィ (a gradient of 0-15% EtOAc in toluene) で精製し、油状の化合物 6 (12.5 g, 60%) を得た。

FABMS: m/z 591 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 7.80 (1H, d, J = 8.2 Hz, C₆H₄), 7.34 (1H, d, J = 8.2 Hz, C₆H₄), 5.33 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-6), 4.69 (1H, ddd, J = 10.1, 7.6, 5.8 Hz, H-16), 3.51 (1H, m, H-3), 3.89 (1H, dd, J = 9.3, 5.3 Hz, H-26a), 3.80 (1H, dd, J = 9.3, 6.6 Hz, H-26b), 2.44 (3H, s, C₆H₄CH₃), 1.53 (3H, s, 21-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.90 (3H, d, J = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.64 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 150.8 (C-22), 144.5 (C₆H₄), 140.8 (C-5), 132.9, 129.7 and 127.8 (C₆H₄), 121.2 (C-6), 104.0 (C-20), 84.2 (C-16), 74.8 (C-26), 71.5 (C-3), 64.0 (C-17), 54.9 (C-14), 49.9 (C-9), 43.1 (C-13), 42.1 (C-4), 39.4 (C-1), 37.1 (C-12), 36.5 (C-10), 34.0 (C-15), 32.2 (C-25), 32.1 (C-7), 31.5 (C-2), 31.1 (C-8), 29.9 (C-24), 22.8 (C-11), 21.5 (C₆H₄CH₃), 20.9 (C-23), 19.3 (C-19), 16.3 (C-27), 13.8 (C-18), 11.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₄H₄₉O₅S [M + H]⁺, 569.3222, found: 569.3229.

26-Iodopseudodiosgenin 7

化合物 6 (7.8 g, 13.7 mmol) の 3-pentanone (270 mL) 溶液に NaI (8.6 g, 57.2 mmol) を加え、70 °C で 7 時間攪拌。反応液を氷水 (150 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (80 mL × 3) で抽出。抽出液を 10% Na₂S₂O₃ (100 mL × 2) および brine (300 mL) で洗浄後

Na₂SO₄ で乾燥、ろ過。溶媒を留去して得た残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-15% EtOAc in toluene) で精製し、化合物 **10** (4.1 g, 58%) を得た。

FABMS: m/z 524 [M]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.35 (1H, d, J = 4.9 Hz, H-6), 4.74 (1H, ddd, J = 10.1, 7.6, 5.8 Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3), 3.24 (1H, dd, J = 9.5, 4.3 Hz, H-26a), 3.15 (1H, dd, J = 9.5, 6.1 Hz, H-26b), 2.47 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.98 (3H, d, J = 6.4 Hz, 27-CH₃), 0.69 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 150.1 (C-22), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 104.0 (C-20), 84.3 (C-16), 71.6 (C-3), 64.1 (C-17), 55.0 (C-14), 50.0 (C-9), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.4 (C-1), 37.2 (C-12), 36.5 (C-10), 34.1 (C-15), 34.0 (C-25), 33.7 (C-24), 32.1 (C-7), 31.5 (C-2), 31.2 (C-8), 23.1 (C-11), 20.9 (C-23), 20.4 (C-27), 19.4 (C-19), 17.4 (C-26), 13.9 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₁IO₂ [M]⁺, 524.2151, found: 524.2142.

26-Thioacetylpsuedodiosgenin **8**

化合物 **7** (2.93 g, 5.5 mmol) の無水 acetone 溶液に KSAc (705 mg, 6.2 mmol) を加え、室温で 24 時間攪拌。反応液を氷水 (200 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (100 mL × 3) で抽出。抽出液を brine (200 mL) で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去。残渣を HPLC (15% H₂O-acetone) で精製し、融点 92-94 °C の白色針状晶 (after recrystallization from ethanol) **8** (1.86 g, 71%) を得た。

FABMS: m/z 495 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.34 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-6), 4.73 (1H, ddd, J = 10.1, 7.9, 5.8 Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3), 2.93 (1H, dd, J = 13.1, 5.5 Hz, H-26a), 2.77 (1H, dd, J = 13.1, 7.3 Hz, H-26b), 2.46 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 2.32 (3H, s, SCOCH₃), 1.58 (3H, s, 21-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.94 (3H, d, J = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.68 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 195.9 (SCOCH₃), 151.4 (C-22), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 103.9 (C-20), 84.3 (C-16), 71.6 (C-3), 64.2 (C-17), 55.0 (C-14), 50.1 (C-9), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.5 (C-1), 37.2 (C-12), 36.6 (C-10), 35.7 (C-26), 34.1 (C-15), 33.3 (C-24), 32.8 (C-25), 32.2 (C-7), 31.6 (C-2), 31.2 (C-8), 30.7 (SCOCH₃), 23.3 (C-11), 21.0 (C-23), 19.4 (C-19), 19.0 (C-27), 13.9 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₉H₄₄O₃SNa [M + Na]⁺, 495.2909, found: 495.2811.

26,26'-(Bispseudodiosgeninyl) disulfide **9**

化合物 **8** (900 mg, 1.9 mmol) を 0.2 M NaOH (H₂O / EtOH = 1 / 9) (200 mL) に溶解し、

室温で 24 時間攪拌。反応液を 5% HCl (200 mL) に注加し、さらに氷水 (200 mL) を加え、CH₂Cl₂ (100 mL × 3) で抽出。抽出液を 5% NaHCO₃ (200 mL) と brine (300 mL) で順次洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣を HPLC (5% H₂O-acetone) で精製して融点 82-84 °C の白色針状晶 (after recrystallization from ethanol) **9** (450 mg, 55%) を得た。

FABMS: *m/z* 881 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.35 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-6), 4.73 (1H, ddd, *J* = 10.1, 7.6, 5.5 Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3α), 2.75 (1H, dd, *J* = 12.8, 5.5 Hz, H-26a), 2.51 (1H, dd, *J* = 12.8, 7.9 Hz, H-26b), 2.47 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-17), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 1.00 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.69 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 151.5 (C-22), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 103.8 (C-20), 84.3 (C-16), 71.7 (C-3), 64.2 (C-17), 55.0 (C-14), 50.1 (C-9), 46.8 (C-26), 43.3 (C-13), 42.3 (C-4), 39.5 (C-1), 37.3 (C-12), 36.6 (C-10), 34.1 (C-15), 33.4 (C-24), 32.6 (C-25), 32.2 (C-7), 31.6 (C-2), 31.3 (C-8), 23.4 (C-11), 21.0 (C-23), 19.4 (C-19), 18.9 (C-27), 14.0 (C-18), 11.7 (C-21); HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₅₄H₈₂NaO₄S₂ [M + Na]⁺, 881.5552, found: 881.5538.

(20*S*,22*S*,25*R*)-22-Thiospirost-5-en-3β-ol **10**

化合物 **9** (70 mg, 0.08 mmol) の AcOH (10 mL) 溶液に Zn (20 mg, 0.31 mmol) を加え、24 時間還流。ろ過後溶媒を留去。残渣の acetone (1 mL) 溶液に 10% KOH (H₂O / EtOH = 1 / 1) (5 mL) を加え、室温で 24 時間攪拌。反応液を氷水 (40 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (70 mL × 3) で抽出。抽出液を brine (200 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去。残渣を HPLC (15% H₂O-acetone) で精製し、融点 212-214 °C の白色針状晶 (after recrystallized from ethanol) **10** (50 mg, 71%) を得た。

FABMS: *m/z* 453 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.33 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-6), 4.61 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.6 Hz, H-16), 3.50 (1H, m, H-3α), 2.52 (1H, dd, *J* = 13.1, 11.6 Hz, H-26a), 2.26 (1H, dd, *J* = 13.1, 2.1 Hz, H-26b), 1.01 (3H, s, 19-CH₃), 1.00 (3H, d, *J* = 7.3 Hz, 21-CH₃), 0.91 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.82 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Tabel 2 に示した。HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₇H₄₃O₃S [M + H]⁺, 431.2983, found: 431.2968.

3β-*O*-Benzyl-(20*S*,22*S*,25*R*)-22-thiospirost-5-ene **11**

3 β -*O*-benzyl-26-thioacetylpsuedodiosgenin ³³⁾ (1.0 g, 1.8 mmol) の MeOH (200 mL)、10% HCl / MeOH (200 mL) 懸濁液を 36 時間還流。反応後、氷水 (300 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (200 mL \times 3) で抽出。抽出液を brine (300 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。ろ過後、溶媒を留去して得た残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-2% ethyl acetate in benzene) で精製し、融点 149-151 $^{\circ}$ C の白色針状晶 (after recrystallization from ethanol) **11** (544 mg, 56%) を得た。

FABMS: m/z 543 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 7.35-7.24 (5H, aromatic protons), 5.34 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-6), 4.63 (1H, dd, J = 15.3, 7.6 Hz, H-16), 4.55 (2H, d, J = 2.1 Hz, C₆H₅CH₂), 3.27 (1H, m, H-3 α), 2.53 (1H, dd, J = 12.8, 11.6 Hz, H-26a), 2.28 (1H, dd, J = 12.8, 1.8 Hz, H-26b), 1.03 (3H, s, 19-CH₃), 1.01 (3H, d, J = 7.0 Hz, 21-CH₃), 0.92 (3H, d, J = 6.4 Hz, 27-CH₃), 0.80 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 140.9 (C-5), 138.9 (C₆H₅CH₂), 128.2 (C₆H₅CH₂ \times 2), 127.4 (C₆H₅CH₂ \times 2), 127.3 (C₆H₅CH₂), 121.2 (C-6), 97.4 (C-22), 81.5 (C-16), 78.4 (C-3), 69.8 (C₆H₅CH₂), 62.7 (C-17), 56.5 (C-14), 50.0 (C-9), 44.3 (C-20), 40.2 (C-13), 39.7 (C-12), 39.0 (C-4), 38.5 (C-23), 37.1 (C-1), 36.9 (C-10), 33.2 (C-8), 32.0 (C-24, C-26), 31.7 (C-15), 31.3 (C-7, C-25), 28.3 (C-2), 22.4 (C-27), 20.7 (C-11), 19.3 (C-19), 16.4 (C-18), (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₄H₄₉O₃S [M + H]⁺, 521.3453, found: 521.3427.

26-Selenocyanopseudodiosgenin **12**

化合物 **7** (1.45 g, 2.8 mmol) の DMF (130 mL) 溶液に KSeCN (2.0 g, 13.9 mmol) を加え、60 $^{\circ}$ C で 24 時間攪拌。反応液を氷水 (150 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (150 mL \times 3) で抽出。抽出液を 5% NaHCO₃ (300 mL) と brine (300 mL) で洗浄後 Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去、残渣を HPLC (15% H₂O-acetone) で精製して融点 106-108 $^{\circ}$ C の白色針状晶 (after recrystallization from ethanol) **12** (0.98 g, 71%) を得た。

FABMS: m/z 526 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.35 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-6), 4.75 (1H, ddd, J = 10.1, 7.6, 5.5 Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3), 3.16 (1H, dd, J = 11.9, 5.2 Hz, H-26a), 2.95 (1H, dd, J = 11.9, 7.3 Hz, H-26b), 2.48 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 1.60 (3H, s, 21-CH₃), 1.07 (3H, d, J = 6.7 Hz, 27-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.69 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 150.6 (C-22), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 104.4 (C-20), 102.0 (SeCN), 84.4 (C-16), 71.6 (C-3), 64.0 (C-17), 54.9 (C-14), 50.0 (C-9), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.4 (C-1), 37.6 (C-26), 37.2 (C-12), 36.5 (C-10), 34.0 (C-15), 33.6 (C-25), 33.1 (C-24), 32.1 (C-7), 31.5 (C-2), 31.2 (C-8), 23.1 (C-11), 20.9 (C-23), 19.4 (C-19), 19.2

(C-27), 13.9 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{28}H_{41}O_2NSeNa$ $[M + Na]^+$, 526.2200, found: 526.2199.

26,26'--(Bispseudodiosgenyl) diselenide **13**

化合物 **12** (1.50 g, 3.0 mmol) の DMF (70 mL) 溶液に K_2CO_3 (1.7 g) および H_2O (7.2 mL) を加え、80 °C、8 時間攪拌。反応液酸性になるまで AcOH を加え、氷水 (250 mL) に注加後 CH_2Cl_2 (250 mL \times 3) で抽出。抽出液を 5% $NaHCO_3$ (500 mL) および brine (500 mL) で順次洗浄後 Na_2SO_4 で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣を EtOH- H_2O で再結晶し、融点 115-117 °C の白色針状晶 **13** (0.91 g, 64%) を得た。

FABMS: m/z 977 $[M + Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.34 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.74 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3), 3.03 (1H, dd, $J = 11.9, 5.2$ Hz, H-26a), 2.83 (1H, dd, $J = 11.9, 7.9$ Hz, H-26b), 2.47 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 1.59 (3H, s, 21- CH_3), 1.02 (3H, s, 19- CH_3), 1.01 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27- CH_3), 0.69 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 151.5 (C-22), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 103.8 (C-20), 84.3 (C-16), 71.6 (C-3), 64.2 (C-17), 55.0 (C-14), 50.0 (C-9), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.5 (C-1), 39.1 (C-26), 37.2 (C-12), 36.6 (C-10), 34.1 (C-15), 33.9 (C-25), 33.8 (C-24), 32.2 (C-7), 31.6 (C-2), 31.2 (C-8), 23.4 (C-11), 21.0 (C-23), 19.5 (C-27), 19.4 (C-19), 14.0 (C-18), 11.7 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{54}H_{82}NaO_4Se_2$ $[M + Na]^+$, 977.4441, found: 977.4509.

(20*S*,22*S*,25*R*)-22-Selenospirost-5-en-3 β -ol **14**

化合物 **13** (910 mg, 0.95 mmol) を Zn / AcOH で還元後、化合物 **10** の場合と同様に処理して、融点 236-238 °C の白色針状晶 (after recrystallized from EtOH- H_2O) **14** (710 mg, 78%) を得た。

FABMS: m/z 501 $[M + Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.35 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.64 (1H, dd, $J = 15.6, 7.6$ Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3 α), 2.59 (1H, t, $J = 11.9$ Hz, H-26a), 2.37 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, H-26b), 1.02 (3H, s, 19- CH_3), 1.01 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 21- CH_3), 0.97 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27- CH_3), 0.82 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR スペクトルは Tabel 2 に示した。 HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{27}H_{42}NaO_2Se$ $[M + Na]^+$, 501.2248, found: 501.2259.

26-Phthalimidopseudodiosgenin 15

化合物 7 (3.72 g, 7.1 mmol) の DMF (190 mL) 溶液に potassium phthalimide (1.5 g, 8.1 mmol) を加え、80 °C で 4 時間攪拌。反応液を氷水 (200 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (100 mL × 3) で抽出。抽出液を 5% NaOH (200 mL) および brine (250 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。ろ過後、溶媒を留去して得た残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-5% ethyl acetate in benzene) で精製し、化合物 15 (2.61 g, 68%) を得た。

FABMS: m/z 543 [M]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 7.84 (2H, dd, J = 5.5, 3.0 Hz, C₆H₄), 7.71 (2H, dd, J = 5.5, 3.0 Hz, C₆H₄), 5.4 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-6), 4.70 (1H, ddd, J = 10.1, 7.9, 5.8 Hz, H-16), 3.59 (1H, dd, J = 13.4, 6.7 Hz, H-26a), 3.52 (1H, m, H-3α), 3.50 (1H, dd, J = 13.4, 7.9 Hz, H-26b), 2.45 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 1.58 (3H, s, 21-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.92 (3H, d, J = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.63 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 168.6 (CO), 151.3 (C-22), 140.8 (C-5), 133.8, 132.1 and 123.2 (C₆H₄), 121.3 (C-6), 103.9 (C-20), 84.2 (C-16), 71.6 (C-3), 64.1 (C-17), 55.0 (C-14), 50.0 (C-9), 44.0 (C-26), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.5 (C-1), 37.2 (C-12), 36.6 (C-10), 34.0 (C-15), 32.2 (C-7, C-25), 31.8 (C-24), 31.6 (C-2), 31.2 (C-8), 23.1 (C-11), 21.0 (C-23), 19.4 (C-19), 17.3 (C-27), 13.8 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₅H₄₅O₄N [M]⁺, 543.3349, found: 543.3340.

Solasodine 16

化合物 15 (500 mg, 0.9 mmol) の EtOH (10 mL) 溶液に NH₂NH₂ · H₂O (120 mg, 1.9 mmol) を加え、1 時間還流。反応液に 10% H₃PO₄ (10 mL) を加え、さらに 1 時間還流した。反応液を H₂O (150 mL) に注加し、ろ過。ろ液を 10% NaOH でアルカリ性とし、CHCl₃ (100 mL × 3) で抽出。抽出液を brine (200 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣をクロマトグラフィー (a gradient of 0-40% acetone in benzene) で精製し、融点 202-204 °C の solasodine 16 (190 mg, 50%) を得た。

FABMS: m/z 436 [M + Na]⁺; ¹H-NMR は Puri ら³⁸⁾ のデータと一致した。 ¹³C-NMR スペクトルは Table 2 に示した。

(20*S*,22*S*,25*R*)-22-Thiospirost-4-en-3-one 17

化合物 **2** と同様に、**10** (1.50 g, 3.5 mmol) を Oppenauer 酸化し、融点 213-215 °C の白色針状晶 **17** (1.21 g, 81%) を得た。

FABMS: m/z 451 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.72 (1H, s, H-4), 4.63 (1H, dd, J = 15.3, 7.6 Hz, H-16), 2.52 (1H, t, J = 11.9 Hz, H-26a), 2.29 (1H, m, H-26b), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 1.01 (3H, d, J = 7.0 Hz, 21-CH₃), 0.93 (3H, d, J = 6.4 Hz, 27-CH₃), 0.84 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Tabel 2 に示した。 HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₁O₂S [M + H]⁺, 429.2819, found: 429.2818.

(20*S*,22*S*,25*R*)-22-Selenospirost-4-en-3-one **18**

化合物 **2** と同様に、**14** (710 mg, 1.5 mmol) を Oppenauer 酸化し、融点 206-208 °C の白色針状晶 (after recrystallization from ethanol) **18** (520 mg, 74%) を得た。

FABMS: m/z 499 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.65 (1H, dd, J = 15.3, 7.6 Hz, H-16), 2.59 (1H, t, J = 11.9 Hz, H-26a), 2.37 (1H, dd, J = 11.9, 3.1 Hz, H-26b), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 1.03 (3H, d, J = 6.7 Hz, 21-CH₃), 0.97 (3H, d, J = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.84 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Tabel 2 に示した。 HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₁O₂Se [M + H]⁺, 477.2272, found: 477.2260.

Solasodinone **19**

化合物 **2** と同様に、**16** (280 mg, 0.67 mmol) を Oppenauer 酸化し、融点 179-181 °C の solasodinone **22** (190 mg, 68%) を得た。

FABMS: m/z 434 [M + Na]⁺; ¹H-NMR は Adam ら¹⁰⁴⁾ のデータと一致した。
¹³C-NMR スペクトルは Table 2 に示した。

(20*S*,22*S*,25*R*)-22-Thiospirost-1,4-dien-3-one **20**

化合物 **3** と同様に、**17** (430 mg, 1.0 mmol) を DDQ 酸化し、融点 215-217 °C の白色針状晶 (after recrystallization from ethanol) **20** (87 mg, 21%) を得た。

FABMS: m/z 449 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 7.04 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-1), 6.22 (1H, dd, J = 10.1, 1.8 Hz, H-2), 6.07 (1H, s, H-4), 4.62 (1H, dd, J = 11.3, 7.6 Hz, H-16), 2.53 (1H, dd, J = 12.8, 11.6 Hz, H-26a), 2.29 (1H, dd, J = 12.8, 2.4 Hz, H-26b), 1.25 (3H, s, 19-CH₃), 1.01 (3H, d, J = 7.0 Hz, 21-CH₃), 0.93 (3H, d, J = 6.7

Hz, 27-CH₃), 0.87 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Tabel 2 に示した。 HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₇H₃₉O₂S [M + H]⁺, 427.2671, found: 427.2664.

26-Iodopseudodiosgenone 21

化合物 2 と同様に、7 (1.0 g, 1.9 mmol) を Oppenauer 酸化し、半固体 (semisolid) の化合物 21 (725 mg, 73%) を得た。

FABMS: *m/z* 545 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.74 (1H, ddd, *J* = 10.1, 7.9, 5.5 Hz, H-16), 3.25 (1H, dd, *J* = 9.8, 4.3 Hz, H-26a), 3.16 (1H, dd, *J* = 9.8, 6.1 Hz, H-26b), 2.48 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-17), 1.60 (3H, s, 21-CH₃), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 0.99 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 27-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 199.4 (C-3), 171.0 (C-5), 151.3 (C-22), 123.9 (C-4), 103.9 (C-20), 84.1 (C-16), 64.0 (C-17), 54.2 (C-14), 53.7 (C-9), 43.3 (C-13), 39.3 (C-12), 38.6 (C-10), 35.7 (C-1), 35.0 (C-8), 34.1 (C-25), 33.9 (C-2), 33.7 (C-24), 32.8 (C-6), 32.3 (C-7 and C-15), 23.1 (C-11), 20.9 (C-23), 20.5 (C-27), 17.4 (C-19 and C-26), 14.1 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₇H₄₀IO₂ [M + H]⁺, 523.2073, found: 523.2070.

化合物 22-42、44 と 45 の一般的反応

化合物 7 および 21 (200 mg, 0.38 mmol) の DMF (15 mL) 溶液を Table 4 に示した条件で、各求核置換反応を行った。反応後、反応液を氷水 (50 mL) に注加、CH₂Cl₂ (30 mL × 4) で抽出。抽出液を brine (100 mL) で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣を HPLC、カラムクロマトグラフィー及び再結晶で精製し、相当する各化合物を得た。

26-Selenocyanopseudodiosgenone 22

化合物 21 を KSeCN と反応し、semisolid 化合物 22 (270 mg, 67%) を得た。

FABMS: *m/z* 524 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.75 (1H, ddd, *J* = 10.1, 7.9, 5.8 Hz, H-16), 3.16 (1H, dd, *J* = 11.9, 5.5 Hz, H-26a), 2.96 (1H, dd, *J* = 11.9, 7.3 Hz, H-26b), 2.49 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-17), 1.60 (3H, s, 21-CH₃), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 1.08 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 199.5 (C-3), 171.0 (C-5), 150.8 (C-22), 123.9 (C-4), 104.3 (C-20), 102.0

(SeCN), 84.2 (C-16), 64.0 (C-17), 54.2 (C-14), 53.7 (C-9), 43.3 (C-13), 39.3 (C-12), 38.6 (C-10), 35.6 (C-26), 35.7 (C-1), 35.0 (C-8), 33.9 (C-2 and C-5), 33.6 (C-25), 33.2 (C-24), 32.8 (C-6), 32.3 (C-7), 23.1 (C-11), 20.9 (C-23), 19.2 (C-27), 17.4 (C-19), 14.1 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{28}H_{40}NO_2Se$ $[M + H]^+$, 502.2224, found: 502.2218.

26-Thiocyanopseudodiosgenin 23

化合物 7 を KSCN と反応し、HPLC (15% H_2O -acetone) で精製し、semisolid の化合物 23 (70 mg, 40%) を得た。

FABMS: m/z 478 $[M + Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.34 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-6), 4.75 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 3.51 (1H, m, H-3 α), 3.03 (1H, dd, $J = 12.8, 5.5$ Hz, H-26a), 2.80 (1H, dd, $J = 12.8, 7.6$ Hz, H-26b), 2.48 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 1.60 (3H, s, 21- CH_3), 1.07 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27- CH_3), 1.02 (3H, s, 19- CH_3), 0.69 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 150.5 (C-22), 140.8 (C-5), 121.2 (C-6), 112.7 (SCN), 104.4 (C-20), 84.3 (C-16), 71.5 (C-3), 64.0 (C-17), 54.9 (C-14), 50.0 (C-9), 43.2 (C-13), 42.1 (C-4), 41.1 (C-26), 39.4 (C-1), 37.2 (C-12), 36.5 (C-10), 34.0 (C-15), 33.2 (C-25), 32.5 (C-24), 32.1 (C-7), 31.5 (C-2), 31.1 (C-8), 23.0 (C-11), 20.9 (C-23), 19.3 (C-19), 18.3 (C-27), 13.9 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{28}H_{41}O_2NS$ $[M]^+$, 455.2858, found: 455.2853.

26-Thiocyanopseudodiosgenone 24

化合物 21 を KSCN と反応し、HPLC (15% H_2O -acetone) で精製し、semisolid の化合物 24 (137 mg, 79%) を得た。

FABMS: m/z 476 $[M + Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.72 (1H, s, H-4), 4.75 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.5$ Hz, H-16), 3.03 (1H, dd, $J = 12.8, 5.5$ Hz, H-26a), 2.81 (1H, dd, $J = 12.8, 7.6$ Hz, H-26b), 2.48 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 1.60 (3H, s, 21- CH_3), 1.20 (3H, s, 19- CH_3), 1.08 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27- CH_3), 0.72 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 199.3 (C-3), 170.9 (C-5), 150.8 (C-22), 123.8 (C-4), 112.7 (SCN), 104.2 (C-20), 84.1 (C-16), 64.0 (C-17), 54.1 (C-14), 53.6 (C-9), 43.3 (C-13), 39.2 (C-12), 38.6 (C-10), 35.6 (C-1), 34.9 (C-8), 33.9 (C-2), 33.2 (C-25), 32.7 (C-6), 32.5 (C-24), 32.2 (C-7 and C-15), 23.0 (C-11), 20.9 (C-23), 18.3 (C-27), 17.3 (C-19), 14.0 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{28}H_{40}O_2NS$ $[M + H]^+$, 454.2780, found: 454.2754.

Pseudodiosgenin-25(26)-ene 25

化合物 7 を KOCN と反応し、HPLC (15% H₂O-acetone) で精製し、融点 86-88 °C の白色粉末の化合物 25 (38 mg, 25%) を得た。

FABMS: m/z 419 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.35 (1H, dt, $J = 5.5, 2.1$ Hz, H-6), 4.74 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.6, 5.8$ Hz, H-16), 4.70 (2H, m, H-26), 3.52 (1H, m, H-3 α), 2.48 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-17), 1.73 (3H, s, 27-CH₃), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.03 (3H, s, 19-CH₃), 0.69 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 151.3 (C-22), 145.4 (C-25), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 109.9 (C-26), 103.7 (C-20), 84.3 (C-16), 71.7 (C-3), 64.2 (C-17), 55.0 (C-14), 50.1 (C-9), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.5 (C-1), 37.2 (C-12), 36.6 (C-10), 35.2 (C-24), 34.1 (C-15), 32.2 (C-7), 31.6 (C-2), 31.2 (C-8), 24.4 (C-11), 22.4 (C-27), 21.0 (C-23), 19.4 (C-19), 13.9 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₀O₂ [M]⁺, 396.3029, found: 396.3022.

Pseudodiosgenone-25(26)-ene 26

化合物 21 を KOCN と反応し、HPLC (15% H₂O-acetone) で精製し、semisolid の化合物 26 (61 mg, 40%) を得た。

FABMS: m/z 417 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.74 (1H, ddd, $J = 10.4, 8.2, 5.8$ Hz, H-16), 4.70 (2H, m, H-26), 2.48 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-17), 1.73 (3H, s, 27-CH₃), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 199.3 (C-3), 171.0 (C-5), 151.5 (C-22), 145.2 (C-25), 123.8 (C-4), 110.0 (C-26), 103.5 (C-20), 84.0 (C-16), 64.1 (C-17), 54.1 (C-14), 53.7 (C-9), 43.2 (C-13), 39.3 (C-12), 38.6 (C-10), 35.6 (C-1), 35.1 (C-15), 34.9 (C-8), 33.9 (C-2 and C-24), 32.7 (C-6), 32.2 (C-7), 24.3 (C-11), 22.3 (C-27), 20.9 (C-23), 17.3 (C-19), 14.0 (C-18), 11.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₃₉O₂ [M + H]⁺, 395.2951, found: 395.2939.

26-Cyanopseudodiosgenin 27

化合物 7 を KCN と反応し、HPLC (15% H₂O-acetone) で精製し、融点 132 °C の白色粉末の化合物 27 (121 mg, 75%) を得た。

FABMS: m/z 446 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.34

(1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.73 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 3.51 (1H, m, H-3 α), 2.48 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 2.35 (1H, dd, $J = 16.8, 5.2$ Hz, H-26a), 2.24 (1H, dd, $J = 16.8, 7.3$ Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.08 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.68 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 150.5 (C-22), 140.7 (C-5), 121.2 (C-6), 118.7 (CN), 104.2 (C-20), 84.3 (C-16), 71.4 (C-3), 64.0 (C-17), 54.9 (C-14), 49.9 (C-9), 43.1 (C-13), 42.1 (C-4), 39.4 (C-1), 37.1 (C-12), 36.5 (C-10), 34.0 (C-15), 33.1 (C-24), 32.0 (C-7), 31.4 (C-2), 31.0 (C-8), 29.8 (C-25), 24.2 (C-26), 23.0 (C-11), 20.9 (C-23), 19.3 (C-19), 19.1 (C-27), 13.8 (C-18), 11.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₈H₄₁O₂N [M]⁺, 423.3137, found: 423.3137.

26-Cyanopseudodiosgenone **28**, (25*R*)-5 α ,26-dicyanofurost-3-one **29** と (25*R*)-5 β ,26-dicyanofurost-3-one **30**

化合物 **21** を KCN と反応し、HPLC (DOCOSIL-B, 37.5% H₂O-acetone) 精製し、semisolid の化合物 **28** (54 mg, 33%)、**29** (20 mg, 12%) および **30** (30 mg, 17%) を得た。

FABMS of **28**: m/z 444 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.74 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.5$ Hz, H-16), 2.48 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 2.35 (1H, dd, $J = 16.8, 5.2$ Hz, H-26a), 2.24 (1H, dd, $J = 16.8, 7.3$ Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 1.09 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 199.5 (C-3), 171.0 (C-5), 150.8 (C-22), 123.9 (C-4), 118.7 (CN), 104.2 (C-20), 84.2 (C-16), 64.0 (C-17), 54.1 (C-14), 53.7 (C-9), 43.3 (C-13), 39.3 (C-12), 38.6 (C-10), 35.7 (C-1), 35.0 (C-8), 33.9 (C-2), 33.1 (C-24), 32.7 (C-6 and C-15), 32.2 (C-7), 29.9 (C-25), 24.3 (C-26), 23.1 (C-11), 20.9 (C-23), 19.2 (C-27), 17.4 (C-19), 14.0 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₈H₄₀O₂N [M + H]⁺, 422.3059, found: 422.3048.

FABMS of **29**: m/z 471 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 4.75 (1H, ddd, $J = 10.4, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 2.54 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-4a), 2.51 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-17), 2.47 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-4b), 2.35 (1H, dd, $J = 16.8, 5.5$ Hz, H-26a), 2.24 (1H, dd, $J = 16.8, 7.3$ Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.15 (3H, s, 19-CH₃), 1.09 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27-CH₃), 0.69 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 206.1 (C-3), 150.9 (C-22), 122.1 (5-CN), 118.8 (26-CN), 104.2 (C-20), 84.2 (C-16), 64.0 (C-17), 53.9 (C-14), 49.3 (C-9), 47.3 (C-5), 47.2 (C-4), 43.5 (C-13), 39.1 (C-12), 37.9 (C-10), 37.1 (C-1), 34.2 (C-6 and C-8), 33.8 (C-2), 33.2 (C-24), 31.4 (C-15), 29.9 (C-25), 28.3 (C-7), 24.3 (C-26), 23.1 (C-11), 21.4 (C-23), 19.3 (C-27), 14.2 (C-18), 12.1 (C-19), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₉H₄₀O₂N₂ [M]⁺, 448.3090, found: 448.3087.

FABMS of **30**: m/z 471 $[M + Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 4.74 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.5$ Hz, H-16), 2.99 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-4a), 2.50 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 2.38 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-4b), 2.34 (1H, dd, $J = 16.8, 5.2$ Hz, H-26a), 2.24 (1H, dd, $J = 16.8, 7.3$ Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21- CH_3), 1.28 (3H, s, 19- CH_3), 1.08 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27- CH_3), 0.72 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 206.8 (C-3), 151.1 (C-22), 122.6 (5-CN), 118.8 (26-CN), 104.0 (C-20), 84.1 (C-16), 64.1 (C-17), 54.4 (C-14), 45.7 (C-5), 44.2 (C-4), 43.3 (C-13), 40.2 (C-9), 39.2 (C-12), 37.2 (C-10), 36.5 (C-1), 33.9 (C-8), 33.8 (C-2), 33.4 (C-6), 33.2 (C-24), 31.1 (C-15), 30.0 (C-25), 26.0 (C-7), 24.4 (C-26), 23.1 (C-11), 21.3 (C-23), 19.6 (C-19), 19.3 (C-27), 14.1 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{29}H_{40}O_2N_2 [M]^+$, 448.3090, found: 448.3085.

26-Diethylaminopseudodiosgenin **31**

化合物 **7** を diethylamine と反応し、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-90% acetone in toluene) で精製し、融点 115-117 °C の白色粉末の化合物 **31** (104 mg, 58%) を得た。

FABMS: m/z 492 $[M + Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.34 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.72 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 3.51 (1H, m, H-3 α), 2.47 (4H, q, $J = 7.0$ Hz, $NCH_2CH_3 \times 2$), 2.46 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-17), 2.23 (1H, dd, $J = 12.5, 5.8$ Hz, H-26a), 2.09 (1H, dd, $J = 12.5, 7.6$ Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21- CH_3), 1.02 (3H, s, 19- CH_3), 0.98 (6H, t, $J = 7.02$ Hz, $NCH_2CH_3 \times 2$), 0.90 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27- CH_3), 0.69 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 152.0 (C-22), 140.8 (C-5), 121.2 (C-6), 103.2 (C-20), 84.1 (C-16), 71.4 (C-3), 64.1 (C-17), 60.1 (C-26), 55.0 (C-14), 50.0 (C-9), 47.4 (NCH_2CH_3), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.5 (C-1), 37.2 (C-12), 36.5 (C-10), 34.1 (C-15), 32.7 (C-24), 32.1 (C-7), 31.5 (C-2), 31.2 (C-8), 31.1 (C-25), 23.4 (C-11), 20.9 (C-23), 19.3 (C-19), 18.3 (C-27), 13.8 (C-18), 11.6 (C-21 and NCH_2CH_3); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{31}H_{52}O_2N [M + H]^+$, 470.3998, found: 470.3992.

26-(Pyrrolidin-1-yl)pseudodiosgenin **32**

化合物 **7** を pyrrolidine と反応し、融点 181-183 °C の白色針状晶 (after recrystallization from acetone) **32** (125 mg, 70%) を得た。

FABMS: m/z 468 $[M + H]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.35

(1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.73 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 3.51 (1H, m, H-3 α), 2.46 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 2.43 (2H \times 2, m, pyrrolidine-2), 2.25 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, H-26), 1.75 (2H \times 2, m, pyrrolidine-3), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.93 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27-CH₃), 0.69 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 152.0 (C-22), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 103.3 (C-20), 84.2 (C-16), 71.5 (C-3), 64.2 (C-17), 63.6 (C-26), 55.0 (C-14), 54.4 (pyrrolidine), 50.1 (C-9), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.5 (C-1), 37.2 (C-12), 36.6 (C-10), 34.1 (C-15), 32.8 (C-24), 32.1 (C-7), 32.0 (C-25), 31.6 (C-2), 31.2 (C-8), 23.4 (C-11 and pyrrolidine), 21.0 (C-23), 19.4 (C-19), 18.3 (C-27), 13.9 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₁H₅₀O₂N [M + H]⁺, 468.3842, found: 468.3836.

26-(Piperidin-1-yl)pseudodiosgenin **33**

化合物 **7** を piperidine と反応し、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-90% acetone in toluene) で精製し、融点 170-172 °C の白色粉末の化合物 **33** (148 mg, 80%) を得た。

FABMS: m/z 504 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.34 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.72 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.6, 5.5$ Hz, H-16), 3.51 (1H, m, H-3 α), 2.46 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 2.28 (2H \times 2, m, piperidine-2), 2.11 (1H, dd, $J = 12.2, 6.4$ Hz, H-26a), 2.02 (1H, dd, $J = 12.2, 7.9$ Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.54 (2H \times 2, m, piperidine-3), 1.41 (2H, m, piperidine-4), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.89 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27-CH₃), 0.69 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 152.0 (C-22), 140.8 (C-5), 121.2 (C-6), 103.3 (C-20), 84.2 (C-16), 71.5 (C-3), 66.2 (C-26), 64.2 (C-17), 55.0 (C-14 and piperidine), 50.0 (C-9), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.5 (C-1), 37.2 (C-12), 36.6 (C-10), 34.1 (C-15), 32.8 (C-24), 32.1 (C-7), 31.5 (C-2), 31.2 (C-8), 29.8 (C-25), 25.9 (piperidine), 24.5 (piperidine), 23.3 (C-11), 21.0 (C-23), 19.4 (C-19), 18.3 (C-27), 13.9 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₂H₅₂O₂N [M + H]⁺, 482.7608, found: 482.4003.

26-Morpholinopseudodiosgenin **34**

化合物 **7** を morpholine と反応し、アセトンで再結晶し、融点 185-187 °C の白色粉末の化合物 **34** (100 mg, 54%) を得た。

FABMS: m/z 484 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.34 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6); 4.72 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 3.67 (2H \times 2, td, $J = 4.9,$

1.5 Hz, morpholine-2), 3.51 (1H, m, H-3 α), 2.47 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 2.37 (2H \times 2, m, morpholine-3), 2.15 (1H, dd, J = 12.2, 6.7 Hz, H-26a), 2.07 (1H, dd, J = 12.2, 7.6 Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.91 (3H, d, J = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.69 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 151.9 (C-22), 140.9 (C-5), 121.3 (C-6), 103.5 (C-20), 84.2 (C-16), 71.6 (C-3), 67.0 (morpholine), 65.8 (C-26), 64.2 (C-17), 55.0 (C-14), 54.0 (morpholine), 50.1 (C-9), 43.2 (C-13), 42.3 (C-4), 39.5 (C-1), 37.3 (C-12), 36.6 (C-10), 34.1 (C-15), 32.5 (C-24), 32.2 (C-7), 31.6 (C-2), 31.2 (C-8), 29.4 (C-25), 23.2 (C-11), 21.0 (C-23), 19.4 (C-19), 18.1 (C-27), 13.9 (C-18), 11.7 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₁H₅₀O₃N [M + H]⁺, 484.3791, found: 484.3787.

26-(4-Methylpiperazin-1-yl)pseudodiosgenin 35

化合物 7 を 1-methylpiperazine と反応し、acetone で再結晶して融点 207-209 °C の白色粉末の化合物 35 (117 mg, 62%) を得た。

FABMS: m/z 497 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.34 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-6), 4.72 (1H, ddd, J = 10.1, 7.9, 5.8 Hz, H-16), 3.51 (1H, m, H-3 α), 2.46 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 2.41 (2H \times 4, m, piperazine), 2.27 (3H, s, CH₃-N), 2.17 (1H, dd, J = 12.2, 6.4 Hz, H-26a), 2.07 (1H, dd, J = 12.2, 7.9 Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.89 (3H, d, J = 6.4 Hz, 27-CH₃), 0.69 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 151.9 (C-22), 141.0 (C-5), 121.2 (C-6), 103.5 (C-20), 84.2 (C-16), 71.4 (C-3), 65.3 (C-26), 64.2 (C-17), 55.1 (piperazine), 55.0 (C-14), 53.4 (piperazine), 50.1 (C-9), 46.0 (N-CH₃), 43.2 (C-13), 42.3 (C-4), 39.5 (C-1), 37.3 (C-12), 36.6 (C-10), 34.1 (C-15), 32.6 (C-24), 32.2 (C-7), 31.6 (C-2), 31.2 (C-8), 29.7 (C-25), 23.3 (C-11), 21.0 (C-23), 19.4 (C-19), 18.2 (C-27), 13.9 (C-18), 11.7 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₂H₅₃O₂N₂ [M + H]⁺, 497.4107, found: 497.4106.

26-Diethylaminopseudodiosgenone 36

化合物 21 を diethylamine と反応後、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-90% acetone in toluene) で精製し、semisolid の化合物 36 (115 mg, 64%) を得た。

FABMS: m/z 490 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.72 (1H, ddd, J = 10.1, 7.6, 5.5 Hz, H-16), 2.48 (4H, q, J = 7.3 Hz, NCH₂CH₃ \times 2), 2.47 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 2.24 (1H, dd, J = 12.5, 5.8 Hz, H-26a), 2.11 (1H, dd, J =

12.5, 7.6 Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 0.99 (6H, t, $J = 7.0$ Hz, NCH₂CH₃ × 2), 0.90 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 199.2 (C-3), 170.9 (C-5), 152.1 (C-22), 123.7 (C-4), 103.0 (C-20), 83.9 (C-16), 64.0 (C-17), 60.0 (C-26), 54.1 (C-14), 53.6 (C-9), 47.3 (NCH₂CH₃), 43.2 (C-13), 39.2 (C-12), 38.5 (C-10), 35.6 (C-1), 34.9 (C-8), 33.9 (C-2), 33.8 (C-24), 32.7 (C-6), 32.3 (C-7), 31.0 (C-25), 23.3 (C-11), 20.8 (C-23), 18.2 (C-27), 17.3 (C-19), 13.9 (C-18), 11.5 (C-21 and NCH₂CH₃); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₁H₅₀O₂N [M + H]⁺, 468.3842, found: 468.3858.

26-(Pyrrolidin-1-yl)pseudodiosgenone 37

化合物 21 を pyrrolidine と反応後、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-90% acetone in toluene) で精製し、semisolid の化合物 37 (55 mg, 23%) を得た。

FABMS: m/z 466 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.37 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 2.47 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 2.40 (2H × 2, m, pyrrolidine-2), 2.28 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-26), 1.77 (2H × 2, m, pyrrolidine-3), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 0.95 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 199.3 (C-3), 171.0 (C-5), 152.2 (C-22), 123.8 (C-4), 103.2 (C-20), 84.0 (C-16), 64.1 (C-17), 63.6 (C-26), 54.8 (pyrrolidine), 54.1 (C-14), 53.7 (C-9), 43.3 (C-13), 39.3 (C-12), 38.6 (C-10), 35.7 (C-1), 35.0 (C-8), 33.9 (C-2 and C-15), 32.8 (C-24), 32.7 (C-6), 32.2 (C-7), 32.0 (C-25), 23.4 (C-11 and pyrrolidine), 20.9 (C-23), 18.3 (C-27), 17.3 (C-19), 14.0 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₁H₄₈O₂N [M + H]⁺, 466.3686, found: 466.3680.

26-(Piperidin-1-yl)pseudodiosgenone 38

化合物 21 を piperidine と反応後、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-90% acetone in toluene) で精製し、semisolid の化合物 38 (146 mg, 79%) を得た。

FABMS: m/z 502 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.72 (1H, s, H-4), 4.72 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 2.47 (1H, d, $J = 10.07$ Hz, H-17), 2.29 (2H × 2, m, piperidine-2), 2.11 (1H, dd, $J = 11.9, 6.4$ Hz, H-26a), 2.02 (1H, dd, $J = 11.9, 8.2$ Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.55 (2H × 2, m, piperidine-3), 1.41 (2H, m, piperidine-4), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 0.89 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 199.3 (C-3), 171.0 (C-5), 152.3 (C-22), 123.9 (C-4), 103.2 (C-20), 84.0

(C-16), 66.3 (C-26), 64.1 (C-17), 55.0 (piperidine), 54.2 (C-14), 53.7 (C-9), 43.3 (C-13), 39.3 (C-12), 38.6 (C-10), 35.7 (C-1), 35.0 (C-8), 34.0 (C-15), 33.9 (C-2), 32.8 (C-6 and C-24), 32.3 (C-7), 29.9 (C-25), 26.0 (piperidine), 24.6 (piperidine), 23.3 (C-11), 21.0 (C-23), 18.4 (C-27), 17.4 (C-19), 14.0 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{32}H_{50}O_2N$ $[M + H]^+$, 480.3842, found: 480.3838.

26-Morpholinopseudodiosgenone **39**

化合物 **21** を morpholine と反応後、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-50% acetone in toluene) で精製し、semisolid の化合物 **39** (135 mg, 73%) を得た。

FABMS: m/z 482 $[M + Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.72 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 3.69 (2H \times 2, t, $J = 4.0$ Hz, morpholine-2), 2.83 (2H \times 2, t, $J = 4.0$ Hz, morpholine-3), 2.47 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 2.17 (1H, dd, $J = 12.2, 4.9$ Hz, H-26a), 2.07 (1H, dd, $J = 12.2, 7.6$ Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21- CH_3), 1.20 (3H, s, 19- CH_3), 0.91 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27- CH_3), 0.72 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 199.2 (C-3), 170.8 (C-5), 152.0 (C-22), 123.7 (C-4), 103.2 (C-20), 83.9 (C-16), 66.9 (morpholine), 65.7 (C-26), 64.0 (C-17), 54.1 (C-14), 53.9 (morpholine), 53.6 (C-9), 43.2 (C-13), 39.2 (C-12), 38.5 (C-10), 35.6 (C-1), 34.9 (C-8), 33.8 (C-2 and C-15), 32.6 (C-6 and C-24), 32.2 (C-7), 29.3 (C-25), 23.3 (C-11), 20.8 (C-23), 18.0 (C-27), 17.3 (C-19), 13.9 (C-18), 11.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{31}H_{48}O_3N$ $[M + H]^+$, 482.3635, found: 482.3618.

26-(4-Methylpiperazin-1-yl)pseudodiosgenone **40**

化合物 **21** を 1-methylpiperazine と反応後、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-100% acetone in toluene) で精製し、semisolid の化合物 **40** (115 mg, 61%) を得た。

FABMS: m/z 495 $[M + Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.72 (1H, ddd, $J = 10.4, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 2.47 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-17), 2.42 (2H \times 4, m, piperazine), 2.30 (3H, s, N- CH_3), 2.17 (1H, dd, $J = 12.2, 5.5$ Hz, H-26a), 2.08 (1H, dd, $J = 12.2, 7.9$ Hz, H-26b), 1.59 (3H, s, 21- CH_3), 1.20 (3H, s, 19- CH_3), 0.90 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27- CH_3), 0.72 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 199.3 (C-3), 170.9 (C-5), 152.0 (C-22), 123.7 (C-4), 103.2 (C-20), 83.9 (C-16), 65.2 (C-26), 64.0 (C-17), 55.0 (piperazine), 54.1 (C-14), 53.6 (C-9), 53.2 (piperazine), 45.9 (N- CH_3), 43.2 (C-13), 39.2 (C-12), 38.5 (C-10),

35.6 (C-1), 34.9 (C-8), 33.9 (C-15), 33.8 (C-2), 32.7 (C-24), 32.5 (C-6), 32.2 (C-7), 29.6 (C-25), 23.2 (C-11), 20.8 (C-23), 18.1 (C-27), 17.2 (C-19), 13.9 (C-18), 11.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{32}H_{51}O_2N_2$ $[M + H]^+$, 495.3951, found: 495.3942.

26-(1*H*-Imidazol-1-yl)pseudodiosgenin **41**

化合物 **7** を imidazole と反応後、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-100% acetone in toluene) で精製し、融点 181-184 °C の白色粉末の化合物 **41** (59 mg, 33%) を得た。

FABMS: m/z 465 $[M + H]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 7.43 (1H, s, imidazole-2), 7.04 (1H, s, imidazole-4), 6.87 (1H, s, imidazole-5), 5.34 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-6), 4.73 (1H, ddd, $J = 10.1, 8.1, 5.5$ Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3 α), 2.47 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 3.89 (1H, dd, $J = 13.7, 5.8$ Hz, H-26a), 3.67 (1H, dd, $J = 13.7, 7.9$ Hz, H-26b), 1.58 (3H, s, 21- CH_3), 1.02 (3H, s, 19- CH_3), 0.87 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27- CH_3), 0.68 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 150.8 (C-22), 141.0 (C-5), 137.3 (imidazole), 128.9 (imidazole), 121.0 (C-6), 119.3 (imidazole), 104.2 (C-20), 84.3 (C-16), 71.3 (C-3), 64.0 (C-17), 54.9 (C-14), 53.1 (C-26), 50.0 (C-9), 43.2 (C-13), 42.2 (C-4), 39.4 (C-1), 37.2 (C-12), 36.5 (C-10), 34.3 (C-25), 34.0 (C-15), 32.21 (C-7), 31.5 (C-2), 31.4 (C-24), 31.2 (C-8), 23.0 (C-11), 20.9 (C-23), 19.3 (C-19), 17.2 (C-27), 13.9 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{30}H_{45}O_2N_2$ $[M + H]^+$, 465.3481, found: 465.3470.

26-(1*H*-Imidazol-1-yl)pseudodiosgenone **42**

化合物 **21** を imidazole と反応後、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-100% acetone in toluene) で精製し、白色粉末の化合物 **42** (32 mg, 18%) を得た。

FABMS: m/z 463 $[M + H]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 7.44 (1H, s, imidazole-2), 7.05 (1H, s, imidazole-4), 6.88 (1H, s, imidazole-5), 5.73 (1H, s, H-4), 4.73 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 3.89 (1H, dd, $J = 13.7, 5.8$ Hz, H-26a), 3.68 (1H, dd, $J = 13.7, 7.9$ Hz, H-26b), 2.48 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 1.58 (3H, s, 21- CH_3), 1.20 (3H, s, 19- CH_3), 0.88 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27- CH_3), 0.71 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 199.4 (C-3), 170.9 (C-5), 151.0 (C-22), 137.4 (imidazole), 129.1 (imidazole), 123.8 (C-4), 119.3 (imidazole), 104.0 (C-20), 84.1 (C-16), 64.0 (C-17), 54.1 (C-14), 53.7 (C-9), 53.1 (C-26), 43.3 (C-13), 39.2 (C-12), 38.6 (C-10), 35.7 (C-1), 35.0 (C-8), 34.3 (C-25), 33.9 (C-2)

and C-15), 32.7 (C-6), 32.2 (C-7), 31.4 (C-24), 23.0 (C-11), 20.9 (C-23), 17.3 (C-27), 17.2 (C-19), 14.0 (C-18), 11.6 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{30}H_{43}O_2N_2$ $[M + H]^+$, 463.3325, found: 463.3322.

22-((6*R*)-4,5,6,7-Tetrahydro-6-methyl-1*H*-1, 2, 3-triazepin-4-yl)pseudodiosgenin 44

化合物 7 を NaN_3 と反応後、カラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-30% ethyl acetate in toluene) で精製し、油状の化合物 44 (50 mg, 43%) を得た。

FABMS: m/z 440 $[M + H]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.30 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.93 (1H, ddd, $J = 7.6, 6.4, 3.7$ Hz, H-16), 4.31 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.52 (1H, m, H-3 α), 3.25 (1H, dd, $J = 11.9, 5.8$ Hz, H-26a), 2.09 (1H, dd, $J = 11.9, 7.0$ Hz, H-26b), 2.03 (2H, td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, H-24), 2.00 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-17), 1.79 (1H, m, H-25), 1.54 (3H, s, 21- CH_3), 1.02 (3H, s, 19- CH_3), 0.96 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27- CH_3), 0.82 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 162.9 (C-22), 140.8 (C-5), 121.2 (C-6), 91.2 (C-23), 84.2 (C-16), 77.6 (C-20), 71.6 (C-3), 66.2 (C-17), 57.4 (C-26), 56.8 (C-14), 49.8 (C-9), 42.2 (C-4), 40.2 (C-13), 39.0 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 34.2 (C-25), 33.1 (C-15), 31.8 (C-7), 31.6 (C-2), 30.9 (C-8), 29.5 (C-24), 21.2 (C-21), 20.3 (C-11), 19.4 (C-19), 17.7 (C-27), 13.2 (C-18); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{27}H_{42}O_2N_3$ $[M + H]^+$, 440.3277, found: 440.3255.

26-Azidopseudodiosgenone 45

化合物 21 を NaN_3 と反応後、HPLC (15% H_2O -acetone)で精製し、semisolid の化合物 45 (103 mg, 61%) を得た。

FABMS: m/z 438 $[M + H]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$) (only assignable signals were listed) δ 5.72 (1H, s, H-4), 4.74 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.9, 5.8$ Hz, H-16), 3.23 (1H, dd, $J = 11.9, 5.5$ Hz, H-26a), 3.11 (1H, dd, $J = 11.9, 7.0$ Hz, H-26b), 2.49 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 1.59 (3H, s, 21- CH_3), 1.20 (3H, s, 19- CH_3), 0.97 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27- CH_3), 0.72 (3H, s, 18- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ 199.2 (C-3), 170.8 (C-5), 151.3 (C-22), 123.7 (C-4), 103.7 (C-20), 84.0 (C-16), 63.9 (C-17), 57.5 (C-26), 54.0 (C-14), 53.6 (C-9), 43.2 (C-13), 39.2 (C-12), 38.5 (C-10), 35.6 (C-1), 34.9 (C-8), 33.8 (C-2 and C-15), 32.9 (C-25), 32.6 (C-6), 32.2 (C-7), 23.0 (C-11), 20.8 (C-23), 17.4 (C-27), 17.3 (C-19), 13.9 (C-18), 11.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $C_{27}H_{40}O_2N_3$ $[M + H]^+$, 438.3121, found: 438.3109.

22-((6*R*)-4,5,6,7-Tetrahydro-6-methyl-1*H*-1,2,3-triazepin-4-yl)pseudodiosgenone 46

化合物 45 (200 mg, 0.46 mmol) の DMF (20 ml) 溶液を 120 °C で 20 時間攪拌。反応後、溶媒を留去して得た残渣を HPLC (30% H₂O-acetone) で精製して semisolid の化合物 46 (62 mg, 31%) を得た。

FABMS: m/z 438 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, s, H-4), 4.92 (1H, ddd, $J = 10.1, 6.1, 3.7$ Hz, H-16), 4.30 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-23), 3.23 (1H, dd, $J = 11.9, 5.8$ Hz, H-26a), 3.08 (1H, dd, $J = 11.9, 7.0$ Hz, H-26b), 2.03 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-24), 1.99 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-17), 1.79 (1H, m, H-23), 1.52 (3H, s, 21-CH₃), 1.18 (3H, s, 19-CH₃), 0.95 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27-CH₃), 0.84 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 199.4 (C-3), 170.8 (C-5), 162.7 (C-22), 123.8 (C-4), 91.1 (C-23), 83.8 (C-16), 77.3 (C-20), 66.1 (C-17), 57.3 (C-26), 55.9 (C-14), 53.3 (C-9), 40.1 (C-13), 38.6 (C-12), 38.4 (C-10), 35.5 (C-1), 34.5 (C-8), 34.1 (C-25), 33.8 (C-2), 32.8 (C-15), 32.6 (C-6), 31.8 (C-7), 29.4 (C-24), 21.1 (C-21), 20.1 (C-11), 17.6 (C-27), 17.2 (C-19), 13.1 (C-18); HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₀O₂N₃ [M + H]⁺, 438.3121, found: 438.3117.

第一編 第二章

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1,4,6-trien-3-one 47

Diosgenin 1 (40 g, 0.10 mol) の無水 dioxane (600 mL) 溶液に DDQ (75 g, 0.33 mmol) を加え 72 時間還流。ろ過後、溶媒を留去。残渣を CH₂Cl₂ (500 mL) に溶解し、1% NaOH (500 mL) および brine (300 mL) で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-5% acetone in toluene) で精製して融点 211-214 °C の淡黄色針状晶 (after recrystallization from ether-petroleum ether) 47 (15.68 g, 40%) を得た。

FABMS: m/z 409 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 7.06 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-1), 6.24 (1H, dd, $J = 10.1, 1.8$ Hz, H-2), 6.23 (1H, dd, $J = 9.8, 3.0$ Hz, H-6), 6.03 (1H, dd, $J = 9.8, 1.8$ Hz, H-7), 6.00 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4), 4.44 (1H, dd, $J = 15.0, 7.6$ Hz, H-16), 3.48 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.3, 1.8$ Hz, H-26a), 3.37 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 2.47 (1H, m, H-8), 1.22 (3H, s, 19-CH₃), 0.98 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 21-CH₃), 0.90 (3H, s, 18-CH₃), 0.80 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Table 7 に示した。HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₃₇O₃ [M + H]⁺, 409.2742, found: 409.2751.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,2 α -epoxy-4,6-dien-3-one **48**

化合物 **47** (2.0 g, 4.9 mmol) の dioxane (27 mL) および THF (11 mL) 溶液に、methanol (54 mL) と NaOH (44 mg) を加え 10 分間攪拌。次いで、30% H₂O₂ (8 mL) を 15 °C で滴下後、さらに 24 時間攪拌。反応液を氷水 (200 ml) に注加し、ろ過。残渣の CH₂Cl₂ (200mL) 溶液を brine (150 mL) で洗浄後 Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-5% acetone in toluene) で精製して融点 235-236 °C の淡黄色針状晶 (after recrystallization from ether-petroleum ether) **48** (1.69 g, 81%) を得た。

FABMS: m/z 425 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 6.10 (1H, dd, $J = 9.8, 2.4$ Hz, H-6), 6.05 (1H, dd, $J = 9.8, 1.5$ Hz, H-7), 5.65 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4), 4.45 (1H, dd, $J = 14.6, 7.6$ Hz, H-16), 3.58 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-1 β), 3.47 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.3, 1.8$ Hz, H-26a), 3.44 (1H, dd, $J = 4.3, 1.8$ Hz, H-2 β), 3.37 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 2.44 (1H, m, H-8), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 0.99 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 21-CH₃), 0.90 (3H, s, 18-CH₃), 0.80 (3H, d, $J = 6.41$ Hz, 27-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Table 3 に示した。HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₃₇O₄ [M + H]⁺, 425.2692, found: 425.2693.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 β -dihydroxy-5-ene **49** と (20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 α -dihydroxy-5-ene **50**

アルゴン気流下 -40 ~ -50 °C で、液体 NH₃ (160 mL) に細かく切った金属ナトリウム (10.0 g) を加え 20 分間攪拌。この反応容器に、化合物 **48** (4.0 g, 9.4 mmol) の THF (90 mL) 溶液を 40 分かけて滴下した後、冷却浴を取り除き、室温で 1 時間攪拌。反応容器を再び -60 ~ -70 °C に冷却し、NH₄Cl (24 g) を 4 時間かけて添加した後、室温で 2 時間攪拌。アルゴン気流で、残存のアンモニアガスを除き、残渣に EtOH を加え過剰のナトリウムを分解。さらに、5% HCl (200 mL) を注加、CH₂Cl₂ (100 mL \times 3) で抽出。抽出液を brine (200 mL) で洗浄後 Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-50% acetone in toluene) で精製。融点 242-244 °C の白色針状晶 (after recrystallization from EtOH-H₂O) **49** (1.79 g, 44%) と融点 245-248 °C の白色針状晶 (after recrystallization from EtOH-H₂O) **50** (240 mg, 6%) を得た。

FABMS of **49**: m/z 431 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.58 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.41 (1H, dd, $J = 15.0, 7.6$ Hz, H-16), 3.98 (1H, m, H-3 α), 3.84

(1H, broad s, H-1 β), 3.47 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.0, 1.5$ Hz, H-26a), 3.37 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 1.04 (3H, s, 19-CH₃), 0.97 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 21-CH₃), 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.79 (3H, d, $J = 5.8$ Hz, 27-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Table 7 に示した。HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₃O₄ [M + H]⁺, 431.3161, found: 431.3153.

FABMS of **50**: m/z 431 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.58 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 4.42 (1H, dd, $J = 14.6, 7.3$ Hz, H-16), 4.14 (1H, s, H-3 β), 3.75 (1H, broad s, H-1 β), 3.47 (1H, ddd, $J = 11.0, 6.4, 1.8$ Hz, H-26a), 3.37 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 0.99 (3H, s, 19-CH₃), 0.97 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 21-CH₃), 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.79 (3H, d, $J = 6.10$ Hz, 27-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Table 7 に示した。HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₃O₄ [M + H]⁺, 431.3161, found: 431.3151.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 β -diacetoxy-5-ene **51**

化合物 **49** (4.91 g, 11.4mmol) の pyridine (100 mL) 溶液に acetic anhydride (100 mL) を加え 95 °C で 2 時間攪拌。反応後溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-3% acetone in toluene) で精製。融点 171-173 °C の白色針状晶 (after recrystallization from ethanol-water) **51** (5.46 g, 95%) を得た。

FABMS: m/z 515 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.53 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-6), 5.05 (1H, broad s, H-1 β), 4.91 (1H, m, H-3 α), 4.41 (1H, dd, $J = 15.0, 7.3$ Hz, H-16), 3.47 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.3, 1.8$ Hz, H-26a), 3.37 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 2.05 (3H, s, COCH₃), 2.02 (3H, s, COCH₃), 1.10 (3H, s, 19-CH₃), 0.96 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 21-CH₃), 0.79 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27-CH₃), 0.78 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 170.3 (COCH₃ \times 2), 136.1 (C-5), 124.9 (C-6), 109.3 (C-22), 80.7 (C-16), 74.5 (C-1), 69.3 (C-3), 66.8 (C-26), 62.1 (C-17), 56.4 (C-14), 42.1 (C-9), 41.6 (C-20), 40.5 (C-10), 40.3 (C-13), 39.5 (C-12), 37.3 (C-2), 31.9 (C-7), 31.8 (C-4), 31.8 (C-15), 31.4 (C-23), 31.3 (C-8), 30.3 (C-25), 28.8 (C-24), 21.3 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 20.1 (C-11), 19.4 (C-19), 17.1 (C-27), 16.3 (C-18), 14.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₁H₄₇O₆ [M + H]⁺, 515.3373, found: 515.3360.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 α -diacetoxy-5-ene **52**

化合物 **51** と同様に、**50** (1.60 g, 3.72 mmol) をアセチル化し、融点 191-193 °C の白色針状晶 (after recrystallization from acetone-water) **52** (1.50 g, 78%) を得た。

FABMS: m/z 515 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (only assignable signals were listed) δ 5.47 (1H, d, $J = 5.50$ Hz, H-6), 5.00 (1H, broad s, H-3 β), 4.89 (1H, broad s, H-1 β), 4.42 (1H, dd, $J = 15.0, 7.6$ Hz, H-16), 3.47 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.6, 2.1$ Hz, H-26a), 3.37 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 2.03 (3H, s, COCH_3), 2.01 (3H, s, COCH_3), 1.08 (3H, s, 19- CH_3), 0.96 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 21- CH_3), 0.79 (3H, d, $J = 7.9$ Hz, 27- CH_3), 0.78 (3H, s, 18- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 170.4 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 170.4 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 134.5 (C-5), 124.5 (C-6), 109.2 (C-22), 80.7 (C-16), 73.1 (C-1), 68.6 (C-3), 66.8 (C-26), 62.0 (C-17), 56.4 (C-14), 41.8 (C-9), 41.5 (C-20), 40.6 (C-10), 40.2 (C-13), 39.5 (C-12), 35.4 (C-4), 31.8 (C-7), 31.8 (C-15), 31.3 (C-23), 31.2 (C-8), 30.2 (C-25), 29.1 (C-2) 28.7 (C-24), 21.4 (COCH_3), 21.2 (COCH_3), 19.8 (C-11), 19.3 (C-19), 17.1 (C-27), 16.2 (C-18), 14.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{O}_6$ $[M + H]^+$, 515.3373, found: 515.3363.

(2*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 β -diacetoxy-5,7-diene **53**

化合物 **51** (1.42 g, 2.8 mmol) の *n*-hexane (35 mL) 溶液に、1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin (460 mg, 1.6 mmol) を加え 15 分間還流。冷後、ろ過し、溶媒を留去。残渣を xylene (14 mL) に溶解し、2,4,6-trimethylpyridine (γ -collidine) (5 mL) の xylene (11 mL) 溶液を 165 °C で 10 分間かけて滴下し、さらに 10 分間加熱した。反応液をろ過し、溶媒を留去。残渣を diethyl ether (100 mL) に溶解し、1 M HCl (50 mL \times 2) および brine (70 mL) で洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥。ろ過後、溶媒を留去。残渣を HPLC [DOCOSIL, 10 ϕ \times 250 mm, 20% H_2O -Acetone] で精製し、融点 216-218 °C の白色針状晶 (after recrystallization from ethanol-water) **53** (330 mg, 23%) を得た。

FABMS: m/z 513 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (only assignable signals were listed) δ 5.67 (1H, dd, $J = 6.1, 2.7$ Hz, H-6), 5.39 (1H, quint, $J = 2.7$ Hz, H-7), 4.99 (1H, broad s, H-1 β), 4.99 (1H, m, H-3 α), 4.51 (1H, dd, $J = 14.3, 7.6$ Hz, H-16), 3.48 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.3, 1.8$ Hz, H-26a), 3.38 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 2.43 (1H, m, H-9), 2.09 (3H, s, COCH_3), 2.04 (3H, s, COCH_3), 1.03 (3H, s, 19- CH_3), 0.98 (3H, d, $J = 6.72$ Hz, 21- CH_3), 0.80 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27- CH_3), 0.72 (3H, s, 18- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 170.4 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 170.3 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 139.9 (C-8), 135.2 (C-5), 121.5 (C-6), 115.6 (C-7), 109.3 (C-22), 80.5 (C-16), 74.2 (C-1), 68.4 (C-3), 66.9 (C-26), 61.9 (C-17), 54.4 (C-14), 42.1 (C-20), 41.1 (C-10), 40.9 (C-13), 38.9 (C-12), 37.7 (C-9), 35.8 (C-2), 32.0 (C-4), 31.4 (C-23), 30.9 (C-15), 30.3 (C-25), 28.8 (C-24), 21.3 (COCH_3), 21.2 (COCH_3), 20.1 (C-11), 17.1 (C-27), 16.4 (C-18), 16.2 (C-19), 14.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{O}_6$ $[M + H]^+$, 513.3216, found: 513.3205.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-5 α ,8 α -(4-phenyl-1,2-urazolo)-1 α ,3 β -diacetoxy-6-ene **54**

化合物 **51** (200 mg, 0.39 mmol) の無水 *n*-hexane (5 mL) 溶液に、*N*-bromosuccinamide (NBS) (87 mg, 0.49 mmol) および 2,2'-azo-bis-isobutyronitrile (AIBN) (20 mg, 0.12 mmol) を加え 1 時間還流。冷後、ろ過、溶媒を留去。残渣の toluene (2 mL) 溶液に γ -collidine (0.2 mL, 1.51 mmol) を加え 1 時間還流。ろ過後溶媒を留去。残渣を EtOAc に溶解し、5% HCl、5% NaHCO₃ および brine (100 mL) で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去。残渣を CH₂Cl₂ (2 mL) に溶解し、4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) (35 mg, 0.20 mmol) を加え、室温で 15 時間攪拌。反応後、溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-10% acetone in toluene) で精製し、融点 143-145 °C の淡黄色針状晶 (after recrystallization from ethanol-water) **54** (64 mg, 24%) を得た。

FABMS: m/z 688 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 7.30-7.48 (5H, m, C₆H₅), 6.45 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-6), 6.33 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-7), 5.86 (1H, m, H-3 α), 5.11 (1H, broad s, H-1 β), 4.58 (1H, dd, J = 15.0, 7.3 Hz, H-16), 3.45 (1H, ddd, J = 11.0, 4.3, 1.8 Hz, H-26a), 3.32 (1H, t, J = 11.0 Hz, H-26b), 1.06 (3H, s, 19-CH₃), 0.98 (3H, d, J = 7.0 Hz, 21-CH₃), 0.92 (3H, s, 18-CH₃), 0.78 (3H, d, J = 6.1 Hz, 27-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 170.4 (COCH₃), 169.6 (COCH₃), 145.7 (CO), 144.5 (CO), 136.3, 131.9, 129.4 and 128.8 (phenyl carbons), 127.5 (C-7), 125.7 (C-6), 109.2 (C-22), 79.6 (C-16), 73.3 (C-1), 67.1 (C-3), 66.7 (C-26), 63.4 (C-8), 62.8 (C-5), 61.6 (C-17), 48.1 (C-14), 45.6 (C-10), 44.4 (C-13), 41.2 (C-20), 41.1 (C-2), 38.4 (C-12), 31.3 (C-23), 31.2 (C-4), 30.6 (C-15), 30.2 (C-25), 30.0 (C-9), 28.8 (C-24), 22.1 (C-11), 21.3 (COCH₃), 21.2 (COCH₃), 18.9 (C-19), 17.1 (C-27), 17.0 (C-18), 14.5 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₉H₅₀O₈N₃ [M + H]⁺, 688.3598, found: 688.3589.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 β -diacetoxy-5,7-diene **53** from **54**

化合物 **54** (46 mg, 0.07 mmol) の 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone (DMI) (3 mL, 29.57 mmol) 溶液を 140 °C で 2 時間攪拌。反応液を氷水 (50 mL) に注加し、*n*-hexane (30 mL \times 3) で抽出。抽出液を brine (100 mL) で洗浄後 Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-2% acetone in toluene) で精製し、**53** (15 mg, 44%) を得た。

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 β -bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-ene **55**

化合物 **49** (200 mg, 0.46 mmol) の DMF (7 mL) 溶液に、imidazole (640 mg, 9.30 mmol)、*tert*-butyldimethylchlorosilane (600 mg, 2.80 mmol) および 1-hydroxy-1*H*-benzotriazole (25 mg, 0.14 mmol) を加え、70 °C で 45 時間攪拌。反応液を氷水 (100 mL) に注加し、diethyl ether (150 mL) で抽出。抽出液を brine (100 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-2% ethyl acetate in *n*-hexane) で精製し、融点 205-206 °C の白色針状晶 (after recrystallization from acetone) **55** (249 mg, 81%) を得た。

FABMS: m/z 659 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.45 (1H, d, J = 5.8 Hz, H-6), 4.41 (1H, dd, J = 15.3, 7.6 Hz, H-16), 3.98 (1H, m, H-3 α), 3.77 (1H, broad s, H-1 β), 3.47 (1H, ddd, J = 11.0, 4.7, 1.8 Hz, H-26a), 3.37 (1H, t, J = 11.0 Hz, H-26b), 0.98 (3H, s, 19-CH₃), 0.97 (3H, d, J = 7.3 Hz, 21-CH₃), 0.88 (12H, s, (CH₃)₃C-), 0.87 (6H, s, (CH₃)₃C-) 0.79 (3H, d, J = 6.40Hz, 27-CH₃), 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.07 (3H, s, (CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), 0.05 (3H, s, (CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), 0.04 (3H, s, (CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), 0.02 (3H, s, (CH₃)₃CSi(CH₃)₂-); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 138.4 (C-5), 123.0 (C-6), 109.2 (C-22), 80.8 (C-16), 73.5 (C-1), 67.5 (C-3), 66.8 (C-26), 62.2 (C-17), 58.8 (C-14), 42.3 (C-4), 42.3 (C-10), 41.6 (C-20), 41.1 (C-9), 40.3 (C-13), 39.7 (C-12), 38.9 (C-2), 31.9 (C-7), 31.8 (C-23), 31.6 (C-25), 31.4 (C-15), 30.3 (C-8), 28.8 (C-24), 25.9 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), 25.9 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), 25.7 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), 20.3 (C-11), 19.4 (C-19), 18.1 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), 18.1 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), 17.1 (C-27), 16.4 (C-18), 14.5 (C-21), -3.7 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), -4.4 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), -4.5 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂-), -5.3 ((CH₃)₃CSi(CH₃)₂-); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₉H₇₁O₄Si₂ [M + H]⁺, 659.4901, found: 659.4872.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 β -bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5,7-diene **56**

化合物 **55** (500 mg, 0.76 mmol) の無水 *n*-hexane (8 mL) 溶液に NBS (160 mg, 0.90 mmol) および AIBN (40 mg, 0.25 mmol) を加え、90 °C で 1.5 時間還流。ろ過後、溶媒を留去して得た残渣を xylene (10 mL) に溶解し、 γ -collidine (1.0 mL, 7.55 mmol) を加え、165 °C で 1.5 時間還流。反応後、ろ過し、diethyl ether (200 mL) に溶かし、5% HCl および brine (150 mL) で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣の acetone から再結晶して融点 195-196 °C の白色針状晶 **56** (230 mg, 46%) を得た。

FABMS: m/z 657 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (only assignable signals were listed) δ 5.57 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-6), 5.31 (1H, quint, $J = 2.7$ Hz, H-7), 4.50 (1H, dd, $J = 14.3, 7.6$ Hz, H-16), 4.01 (1H, m, H-3 α), 3.69 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-1 β), 3.47 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.3, 1.8$ Hz, H-26a), 3.39 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 0.99 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 21- CH_3), 0.92 (3H, s, 19- CH_3), 0.88 (18H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi-}$), 0.79 (3H, d, $J = 6.41$ Hz, 27- CH_3), 0.73 (3H, s, 18- CH_3), 0.10 (3H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\underline{\text{CH}_3})_2$ -), 0.07 (3H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\underline{\text{CH}_3})_2$ -), 0.06 (3H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\underline{\text{CH}_3})_2$ -), 0.05 (3H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\underline{\text{CH}_3})_2$ -); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 139.1 (C-8), 137.7 (C-5), 120.0 (C-6), 115.1 (C-7), 109.2 (C-22), 80.6 (C-16), 73.9 (C-1), 66.8 (C-26), 66.3 (C-3), 62.0 (C-17), 54.8 (C-14), 42.8 (C-13), 42.0 (C-20), 41.0 (C-10), 40.8 (C-4), 39.2 (C-12), 39.0 (C-2), 37.3 (C-9), 31.4 (C-23), 30.9 (C-15), 30.3 (C-25), 28.8 (C-24), 26.0 ($\underline{\text{CH}_3}$) $_3\text{CSi-}$), 25.9 ($\underline{\text{CH}_3}$) $_3\text{CSi-}$), 20.6 (C-11), 18.2 (CH_3) $_3\text{CSi-}$), 18.0 (CH_3) $_3\text{CSi-}$), 17.1 (C-27), 17.0 (C-19), 16.5 (C-18), 14.5 (C-21), -3.8 (CH_3) $_3\text{CSi}(\underline{\text{CH}_3})_2$ -), -4.3 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\underline{\text{CH}_3})_2$ -), -4.5 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\underline{\text{CH}_3})_2$ -), -5.0 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\underline{\text{CH}_3})_2$ -); HRMS (FAB) m/z calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{71}\text{O}_4\text{Si}_2$ $[M + H]^+$, 657.4735, found: 657.4733

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 β -diacetoxy-5,7-diene **53** と (20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 β -diacetoxy-4,6-diene **57**

化合物 **51** (1.10 g, 2.1 mmol) の無水 *n*-hexane (50 mL) 溶液に NBS (495 mg, 2.8 mmol) を加え 2 時間還流。冷後、ろ過し、溶媒を留去。残渣の xylene (50 mL) 溶液に γ -collidine (8 mL, 60.4 mmol) を加え 2 時間還流。反応後、ろ過。残渣の diethyl ether (200 mL) 溶液を 5% HCl (50 mL \times 2) および brine (100 mL) で洗浄後 Na_2SO_4 で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣を HPLC [DOCOSIL-B, 10 ϕ \times 250 mm, 20% H_2O -Acetone] で精製して **53** (581 mg, 53%) と融点 152-154 $^\circ\text{C}$ の白色針状晶 (after recrystallization from acetone- H_2O) **57** (52 mg, 5%) を得た。

FABMS of **57**: m/z 513 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (only assignable signals were listed) δ 5.98 (1H, dd, $J = 9.8, 2.8$ Hz, H-6), 5.68 (1H, dd, $J = 9.8, 1.5$ Hz, H-7), 5.43 (1H, broad s, H-3 α), 5.42 (1H, broad s, H-4), 5.03 (1H, broad s, H-1 β), 4.43 (1H, dd, $J = 14.6, 7.6$ Hz, H-16), 3.47 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.0, 1.5$ Hz, H-26a), 3.37 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 2.06 (3H, s, COCH_3), 2.03 (3H, s, COCH_3), 1.09 (3H, s, 19- CH_3), 0.96 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 21- CH_3), 0.84 (3H, s, 18- CH_3), 0.79 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, 27- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 170.7 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 170.6 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 142.5 (C-5), 131.5 (C-7), 127.9 (C-6), 121.1 (C-4), 109.2 (C-22), 80.5 (C-16), 73.9 (C-1), 68.0 (C-3), 66.8 (C-26), 62.0 (C-17), 53.8 (C-14), 44.5 (C-9), 41.5 (C-13), 41.4

(C-20), 39.6 (C-12), 38.2 (C-10), 36.7 (C-8), 31.3 (C-15), 31.3 (C-23), 30.2 (C-25), 28.7 (C-24), 28.4 (C-2), 21.2 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 20.1 (C-11), 19.0 (C-19), 17.1 (C-27), 16.3 (C-18), 14.4 (C-21); HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₃₁H₄₅O₆ [M + H]⁺, 513.3216, found: 513.3215.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1α,3α-diacetoxy-5,7-diene **58**

化合物 **53** と同様に、**52** (100 mg, 0.19 mmol) を順次 NBS および γ -collidine で処理し、融点 152-155 °C の白色針状晶 (after recrystallization from acetone-H₂O) **58** (21 mg, 25%) を得た。

FABMS: *m/z* 513 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.68 (1H, dd, *J* = 5.5, 2.4 Hz, H-6), 5.43 (1H, quint, *J* = 2.4 Hz, H-7), 5.08 (1H, broad s, H-3 β), 4.89 (1H, m, H-1 β), 4.51 (1H, dd, *J* = 14.3, 7.6 Hz, H-16), 3.49 (1H, ddd, *J* = 11.0, 4.6, 1.8 Hz, H-26a), 3.39 (1H, t, *J* = 11.0 Hz, H-26b), 2.57 (1H, m, H-9), 2.07 (3H, s, COCH₃), 2.02 (3H, s, COCH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.99 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 21-CH₃), 0.80 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 27-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 170.5 (COCH₃), 170.4 (COCH₃), 139.9 (C-8), 134.2 (C-5), 121.2 (C-6), 115.8 (C-7), 109.3 (C-22), 80.5 (C-16), 72.5 (C-1), 67.7 (C-3), 66.8 (C-26), 61.9 (C-17), 54.5 (C-14), 42.0 (C-20), 41.0 (C-10), 40.9 (C-13), 38.8 (C-12), 37.7 (C-9), 34.1 (C-4), 31.3 (C-23), 30.8 (C-15), 30.2 (C-25), 30.0 (C-2), 28.8 (C-24), 21.4 (COCH₃), 21.3 (COCH₃), 20.0 (C-11), 17.1 (C-27), 16.4 (C-19), 16.3 (C-18), 14.5 (C-21); HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₃₁H₄₅O₆ [M + H]⁺, 513.3216, found: 513.3199.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1α,3β-dihydroxy-5,7-diene **59**

化合物 **53** (270 mg, 0.53 mmol) の MeOH (8 mL) および benzene (9 mL) 溶液に、2 M KOH (H₂O / MeOH = 1 / 9) (10 mL) を加え、65 °C で 1 時間攪拌。反応後、氷水 (100 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (70 mL × 3) で抽出。抽出液を brine (150 mL) で洗浄後 Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣を EtOH-H₂O で再結晶し、融点 233-234 °C の淡黄色針状晶 **59** (210 mg, 93%) を得た。

FABMS: *m/z* 429 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.70 (1H, dd, *J* = 5.8, 2.4 Hz, H-6), 5.37 (1H, quint, *J* = 2.4 Hz, H-7), 4.50 (1H, dd, *J* = 14.4, 7.6 Hz, H-16), 4.05 (1H, m, H-3α), 3.75 (1H, broad s, H-1β), 3.48 (1H, ddd, *J* = 11.0, 4.3, 2.1 Hz, H-26a), 3.39 (1H, t, *J* = 11.0 Hz, H-26b), 2.73 (1H, m, H-9), 0.99 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 21-CH₃),

0.95 (3H, s, 19-CH₃), 0.80 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27-CH₃), 0.74 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Table 7 に示した。 HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₁O₄ [M + H]⁺, 429.3005, found: 429.2977.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 β -dihydroxy-4,6-diene **60**

化合物 **59** と同様に、**57** (64 mg, 0.12 mmol) をアルカリ加水分解し、融点 208-210 °C の淡黄色針状晶 (after recrystallization from acetone) **60** (42 mg, 76%) を得た。

FABMS: m/z 429 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.97 (1H, dd, $J = 9.8, 2.4$ Hz, H-6), 5.64 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-7), 5.48 (1H, broad s, H-4), 4.52 (1H, m, H-3 α), 4.43 (1H, dd, $J = 15.0, 7.6$ Hz, H-16), 3.89 (1H, broad s, H-1 β), 3.47 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.3, 1.5$ Hz, H-26a), 3.37 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 0.97 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 21-CH₃), 0.85 (3H, s, 18-CH₃), 0.79 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 27-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Table 7 に示した。 HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₁O₄ [M + H]⁺, 429.3005, found: 429.2998.

(20*S*,22*R*,25*R*)-Spirost-1 α ,3 α -dihydroxy-5,7-diene **61**

化合物 **59** と同様に、**58** (210 mg, 0.41 mmol) をアルカリ加水分解し、融点 212-214 °C の白色針状晶 (after recrystallization from acetone) **61** (142 mg, 81%) を得た。

FABMS: m/z 429 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.71 (1H, dd, $J = 5.5, 2.4$ Hz, H-6), 5.37 (1H, quint, $J = 2.4$ Hz, H-7), 4.51 (1H, dd, $J = 14.6, 7.3$ Hz, H-16), 4.23 (1H, broad s, H-3 β), 3.63 (1H, broad s, H-1 β), 3.49 (1H, ddd, $J = 11.0, 4.6, 1.8$ Hz, H-26a), 3.40 (1H, t, $J = 11.0$ Hz, H-26b), 3.06 (1H, m, H-9), 0.98 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 21-CH₃), 0.92 (3H, s, 19-CH₃), 0.80 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, 27-CH₃), 0.72 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Table 7 に示した。 HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₁O₄ [M + H]⁺, 429.3005, found: 429.2997.

(20*S*,22*R*,25*R*)-(5*Z*,7*E*)-9,10-Secospirosta-5,7,10(19)-trien-1 α ,3 β -diol **62**

化合物 **59** (120 mg, 0.28 mmol) の diethyl ether (600 mL) 溶液をアルゴン気流下、200 W の高圧水銀ランプ (307 nm) を用いて、0 °C で 2 時間光照射。反応後、溶媒を留去。残渣を EtOH (150 mL) に溶解し、さらに 90 °C で 3 時間還流。反応後、溶

媒を留去して得た残渣を HPLC [DOCOSIL, 10 ϕ \times 250 mm (30% H₂O-acetone)] で精製し、油状の化合物 **62** (24 mg, 20%) を得た。

FABMS: m/z 429 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 6.34 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-6), 6.00 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-7), 5.29 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-19a), 4.97 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-19b), 4.48 (1H, dd, J = 15.0, 7.3 Hz, H-16), 4.42 (1H, dd, J = 7.3, 4.3 Hz, H-1 β), 4.23 (1H, m, H-3 α), 3.48 (1H, ddd, J = 11.0, 4.3, 2.1 Hz, H-26a), 3.38 (1H, t, J = 11.0 Hz, H-26b), 0.98 (3H, d, J = 7.0 Hz, 21-CH₃), 0.79 (3H, d, J = 6.4 Hz, 27-CH₃), 0.67 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Figure 8 に示した。HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₁O₄ [M + H]⁺, 429.3005, found: 429.2990.

(20*S*,22*R*,25*R*)-(5*Z*,7*E*)-9,10-Secospirosta-5,7,10(19)-trien-1 α ,3 α -diol **63**

化合物 **62** と同様に、**61** (50mg, 0.12mmol) を光反応および熱異性化し、油状の化合物 **63** (10 mg, 20%) を得た。

FABMS: m/z 429 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 6.41 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-6), 6.02 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-7), 5.25 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-19a), 4.97 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-19b), 4.49 (1H, dd, J = 15.0, 7.6 Hz, H-16), 4.32 (1H, broad s, H-1 β), 4.05 (1H, broad s, H-3 β), 3.48 (1H, ddd, J = 11.0, 4.3, 2.1 Hz, H-26a), 3.38 (1H, t, J = 11.0 Hz, H-26b), 0.98 (3H, d, J = 7.0 Hz, 21-CH₃), 0.79 (3H, d, J = 6.4 Hz, 27-CH₃), 0.66 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Figure 8 に示した。HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₄₁O₄ [M + H]⁺, 429.3005, found: 429.2987.

(25*R*)-Furost-1 α ,3 β ,26-triacetoxy-5,7,20(22)-triene **64**

化合物 **4** と同様に、**59** (927 mg, 1.81 mmol) を acetic anhydride 中加熱加圧して、油状の化合物 **64** (785 mg, 78%) を得た。

FABMS: m/z 555 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.68 (1H, dd, J = 5.5, 2.1 Hz, H-6), 5.43 (1H, quint, J = 2.1 Hz, H-7), 5.00 (1H, broad s, H-1 β), 5.00 (1H, m, H-3 α), 4.83 (1H, ddd, J = 10.1, 7.9, 5.8 Hz, H-16), 3.94 (1H, dd, J = 10.7, 5.8 Hz, H-26a), 3.88 (1H, dd, J = 10.7, 6.4 Hz, H-26b), 2.61 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 2.44 (1H, m, H-9), 2.09 (3H, COCH₃), 2.05 (3H, COCH₃), 2.04 (3H, COCH₃), 1.59 (3H, s, 21-CH₃), 1.03 (3H, s, 19-CH₃), 0.94 (3H, d, J = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.63 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR(CDCl₃) δ 171.3 (COCH₃), 170.4 (COCH₃), 170.3 (COCH₃), 151.8 (C-22), 139.5

(C-8), 135.4 (C-5), 121.5 (C-6), 115.9 (C-7), 103.9 (C-20), 84.0 (C-16), 74.3 (C-1), 69.2 (C-26), 68.4 (C-3), 64.0 (C-17), 52.8 (C-14), 43.7 (C-13), 41.1 (C-10), 38.8 (C-12), 37.8 (C-9), 35.8 (C-2), 33.2 (C-23), 32.1 (C-25), 32.0 (C-4), 30.8 (C-15), 23.2 (C-24), 21.3 (COCH₃), 21.2 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 20.3 (C-11), 16.7 (C-27), 16.2 (C-19), 14.0 (C-18), 11.5 (C-21); HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₃₃H₄₇O₇ [M + H]⁺, 555.3322, found: 555.3307.

(25*R*)-Furost-1 α ,3 β ,26-trihydroxy-5,7,20(22)-triene **65**

化合物 **64** (1.08 g, 1.95 mmol) の 2 M KOH (H₂O / MeOH = 1 / 9) (30 mL) 溶液を、室温で 2 時間攪拌。反応後、5% NaHCO₃ (100 mL) に注加、CH₂Cl₂ (80 mL × 3) で抽出。抽出液を brine (200 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後溶媒を留去。化合物 **65** (0.82 g) を得、精製することなく次の反応に供した。

(25*R*)-5 α -Furost-1 α ,3 β -dihydroxy-26-thiocyano-6,8(14),20(22)-triene **66** と (22*S*,22*R*,25*R*)-5 α -Spirost-1 α ,3 β -dihydroxy-6,8(14)-diene **67**

化合物 **65** (378 mg, 0.88 mmol) の pyridine (11 mL) 溶液に、TsCl (473 mg, 2.49 mmol) を加え、0 °C で 1.5 時間攪拌。反応液を氷水 (100 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (80 mL × 3) で抽出。抽出液を順次 5% HCl (100 mL × 3)、5% NaHCO₃ (200 mL) および brine (250 mL) で洗浄後 Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去して得た残渣 (363 mg, 0.62 mmol) の 3-pentanone (12 mL) 溶液に NaI (187 mg, 1.25 mmol) を加え、70 °C で 5 時間攪拌。反応後、氷水 (50 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (30 mL × 3) で抽出。抽出液を 10% Na₂S₂O₃ (80 mL × 2) および brine (100 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣 (342 mg, 0.64 mmol) を DMF (20 mL) に溶解し、KSCN (124 mg, 1.28 mmol) を加え、70 °C で 2 時間攪拌。反応後、氷水 (50 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (50 mL × 3) で抽出。抽出液を brine (150 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去。残渣を HPLC (30% H₂O-acetone) で精製し、油状の化合物 **66** (38 mg, 10%) と白色針状晶 (after recrystallization from acetone) **67** (45 mg, 13%) を得た。

FABMS of **66**: *m/z* 469 [M]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 6.12 (1H, dd, *J* = 9.8, 3.1 Hz, H-7), 5.35 (1H, dd, *J* = 9.8, 1.6 Hz, H-6), 4.82 (1H, ddd, *J* = 10.1, 8.2, 4.6 Hz, H-16), 4.08 (1H, m, H-3 α), 3.90 (1H, broad s, H-1 β), 3.04 (1H, dd, *J* = 12.8, 5.5 Hz, H-26a), 2.81 (1H, dd, *J* = 12.8, 7.6 Hz, H-26b), 2.67 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H-5), 2.59 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-17), 1.63 (3H, s, 21-CH₃), 1.08 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.95 (3H, s,

19-CH₃), 0.67 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Table 8 に示した。HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₈H₃₉O₃NS [M]⁺, 469.2651, found: 469.2645.

FABMS of **67**: *m/z* 429 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 6.12 (1H, dd, *J* = 9.8, 3.1 Hz, H-7), 5.33 (1H, dd, *J* = 9.8, 1.5 Hz, H-6), 4.38 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.6 Hz, H-16), 4.08 (1H, m, H-3α), 3.89 (1H, broad s, H-1β), 3.48 (1H, ddd, *J* = 10.7, 4.0, 1.8 Hz, H-26a), 3.39 (1H, t, *J* = 10.7 Hz, H-26b), 2.67 (1H, d, *J* = 13.1 Hz, H-5), 1.04 (3H, s, 18-CH₃), 0.99 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 21-CH₃), 0.80 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 27-CH₃), 0.67 (3H, s, 19-CH₃); ¹³C-NMR スペクトルは Table 8 に示した。HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₇H₄₁O₄ [M + H]⁺, 429.3005, found: 429.2980.

(25*R*)-Furost-1α,3β-dihydroxy-26-*p*-toluenesulfonyloxy-5,7,20(22)-triene **68**

化合物 **65** (0.87 g, 2.03 mmol) の CH₂Cl₂ (25 mL) 溶液に Me₃N·HCl (20 mg, 0.20 mmol)、Et₃N (0.56 mL, 4.08 mmol) および TsCl (464 mg, 2.44 mmol) を加え、0 °C で 15 分間攪拌。反応後、氷水 (300 mL) に注加し、CH₂Cl₂ (150 mL × 3) で抽出。抽出液を順次 5% HCl (150 mL × 3)、5% NaHCO₃ (500 mL) および brine (450 mL) で洗浄後 Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-25% acetone in toluene) で精製して油状の化合物 **68** (0.82 g, 69%) を得た。

FABMS: *m/z* 583 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 7.78 (2H, d, *J* = 7.9 Hz, C₆H₄), 7.34 (2H, d, *J* = 7.9 Hz, C₆H₄), 5.70 (1H, dd, *J* = 5.5, 1.8 Hz, H-6), 5.40 (1H, quint, *J* = 1.8 Hz, H-7), 4.78 (1H, ddd, *J* = 10.1, 7.6, 5.8 Hz, H-16), 4.06 (1H, m, H-3α), 3.89 (1H, dd, *J* = 9.5, 5.2 Hz, H-26a), 3.80 (1H, dd, *J* = 9.5, 6.7 Hz, H-26b), 3.76 (1H, broad s, H-1β), 2.75 (1H, m, H-9), 2.58 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-17), 2.44 (3H, s, C₆H₄-CH₃), 1.54 (3H, s, 21-CH₃), 0.95 (3H, s, 19-CH₃), 0.90 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.60 (3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR(CDCl₃) δ 151.2 (C-22), 144.6 (phenyl carbon), 139.5 (C-8), 136.5 (C-5), 133.0, 129.8 and 127.8 (phenyl carbons), 121.7 (C-6), 115.6 (C-7), 104.2 (C-20), 84.0 (C-16), 74.8 (C-26), 72.6 (C-1), 65.2 (C-3), 63.9 (C-17), 52.8 (C-14), 43.8 (C-13), 42.3 (C-10), 39.9 (C-4), 38.9 (C-12), 38.4 (C-2), 37.6 (C-9), 33.1 (C-23), 32.3 (C-25), 30.0 (C-15), 22.9 (C-24), 21.6 (C₆H₄-CH₃), 20.8 (C-11), 16.4 (C-27), 16.3 (C-19), 13.9 (C-18), 11.4 (C-21); HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₃₄H₄₇O₆S [M + H]⁺, 583.3093, found: 583.3110.

(25*R*)-5 α -Furost-1 α ,3 β -dihydroxy-26-*p*-toluenesulfonyloxy-6,8(14),20(22)-triene **69**

化合物 **68** (45 mg, 0.08 mmol) の CHCl₃ (2 mL) 溶液に 3 M HCl / MeOH (8 mL) を加え、室温で 20 時間攪拌。反応液に 5% NaHCO₃ (30 mL) を加え、CH₂Cl₂ (30 mL \times 3) で抽出。抽出液を brine (100 mL) で洗浄後 Na₂SO₄ で乾燥。ろ過後、溶媒を留去し、残渣をクロマトグラフィー (a gradient of 0-15% acetone in toluene) で精製し、油状の化合物 **69** (22 mg, 49%) を得た。

FABMS: m/z 583 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 7.78 (2H, d, J = 7.9 Hz, C₆H₄), 7.34 (2H, d, J = 7.9 Hz, C₆H₄), 6.12 (1H, dd, J = 9.8, 3.4 Hz, H-7), 5.33 (1H, dd, J = 9.8, 1.6 Hz, H-6), 4.75 (1H, ddd, J = 10.1, 7.6, 5.8 Hz, H-16), 4.09 (1H, m, H-3 α), 3.90 (1H, dd, J = 9.5, 4.87 Hz, H-26a), 3.89 (1H, broad s, H-1 β), 3.81 (1H, dd, J = 9.5, 6.4 Hz, H-26b), 2.64 (1H, d, J = 15.0 Hz, H-5), 2.59 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 2.44 (3H, s, C₆H₄-CH₃), 1.56 (3H, s, 21-CH₃), 0.91 (3H, s, 18-CH₃), 0.91 (3H, d, J = 6.7 Hz, 27-CH₃), 0.67 (3H, s, 19-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 151.3 (C-22), 144.6 (C-14), 144.6 and 133.1 (phenyl carbons), 130.5 (C-6), 129.8 and 127.8 (phenyl carbons), 126.2 (C-8), 124.6 (C-7), 104.2 (C-20), 83.7 (C-16), 74.8 (C-26), 72.4 (C-1), 66.8 (C-3), 64.0 (C-17), 43.5 (C-13), 41.9 (C-9), 39.8 (C-10), 38.4 (C-2), 36.9 (C-5), 36.4 (C-4), 36.4 (C-12), 34.5 (C-15), 32.9 (C-23), 32.3 (C-25), 22.9 (C-24), 22.2 (C-18), 21.6 (C₆H₄-CH₃), 19.0 (C-11), 16.3 (C-27), 12.2 (C-19), 11.7 (C-21); HRMS (FAB) m/z calcd for C₃₄H₄₇O₆S [M + H]⁺, 583.3093, found: 583.3079.

(25*R*)-Furost-1 α ,3 β -dihydroxy-26-iodo-5,7,20(22)-triene **70**

化合物 **7** と同様に、**68** (0.74 g, 1.27 mmol) を NaI と反応し、油状の化合物 **70** (0.61 g) を得、精製することなく次の反応に供した。

FABMS: m/z 538 [M]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) (only assignable signals were listed) δ 5.73 (1H, dd, J = 5.8, 2.8 Hz, H-6), 5.42 (1H, quint, J = 2.8 Hz, H-7), 4.84 (1H, ddd, J = 10.1, 7.9, 5.8 Hz, H-16), 4.07 (1H, m, H-3 α), 3.78 (1H, broad s, H-1 β), 3.25 (1H, dd, J = 9.8, 4.3 Hz, H-26a), 3.16 (1H, dd, J = 9.8, 5.8 Hz, H-26b), 2.62 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-17), 1.61 (3H, s, 21-CH₃), 0.99 (3H, d, J = 6.4 Hz, 27-CH₃), 0.97 (3H, s, 19-CH₃), 0.65 (3H, s, 18-CH₃); HRMS (FAB) m/z calcd for C₂₇H₃₉O₃I [M]⁺, 538.1944, found: 538.1935.

(25*R*)-Furost-1 α ,3 β -dihydroxy-26-thiocyano-5,7,20(22)-triene **71**

化合物 **12** と同様に、**70** (415 mg, 0.77 mmol) を KSCN と反応し、油状の化合物 **71** (135 mg, 38%) を得た。

FABMS: m/z 469 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (only assignable signals were listed) δ 5.71 (1H, dd, $J = 5.5, 2.1$ Hz, H-6), 5.41 (1H, quint, $J = 2.1$ Hz, H-7), 4.84 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.6, 5.8$ Hz, H-16), 4.06 (1H, m, H-3 α), 3.76 (1H, broad s, H-1 β), 3.03 (1H, dd, $J = 12.8, 5.5$ Hz, H-26a), 2.80 (1H, dd, $J = 12.8, 7.6$ Hz, H-26b), 2.75 (1H, m, H-9), 2.63 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 1.61 (3H, s, 21- CH_3), 1.07 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27- CH_3), 0.95 (3H, s, 19- CH_3), 0.64 (3H, s, 18- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは Table 8 に示した。HRMS (FAB) m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_3\text{NS}$ $[M]^+$, 469.2651, found: 469.2658.

(25*R*)-Furost-1 α ,3 β -dihydroxy-26-selenocyano-5,7,20(22)-triene **72**

化合物 **12** と同様に、**70** (174 mg, 0.32 mmol) を KSeCN と反応し、油状の化合物 **72** (40 mg, 24%) を得た。

FABMS: m/z 517 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (only assignable signals were listed) δ 5.71 (1H, dd, $J = 5.5, 2.13$ Hz, H-6), 5.41 (1H, quint, $J = 2.1$ Hz, H-7), 4.84 (1H, ddd, $J = 10.1, 7.6, 5.5$ Hz, H-16), 4.05 (1H, m, H-3 α), 3.76 (1H, broad s, H-1 β), 3.16 (1H, dd, $J = 11.9, 5.5$ Hz, H-26a), 2.96 (1H, dd, $J = 11.9, 7.3$ Hz, H-26b), 2.75 (1H, m, H-9), 2.63 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-17), 1.61 (3H, s, 21- CH_3), 1.08 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, 27- CH_3), 0.95 (3H, s, 19- CH_3), 0.64 (3H, s, 18- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは Table 8 に示した。HRMS (FAB) m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_3\text{NSe}$ $[M]^+$, 517.2095, found: 517.2098.

(25*R*)-5 α -Furost-1 α ,3 β -dihydroxy-26-thiocyano-6,8(14),20(22)-triene **66** from **69** via **73**

化合物 **70** と同様に、**69** (18 mg, 0.06 mmol) を NaI と反応し、化合物 **73** (15 mg, 0.03 mmol) を得、精製することなく、**71** と同様に、KSCN (6 mg, 0.06 mmol) と反応して油状の化合物 **66** (11 mg, 76%) を得た。化合物 **66** の $^{13}\text{C-NMR}$ と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、化合物 **65** から得たそれらのもものと一致した。

第二編 第一章

4'-*O*-Methylaloeenin 75

Aloenin 74 を diazomethane と反応し⁹⁸⁾、融点 114-116 °C の化合物 75 を得た。
FABMS: m/z 425 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 7.21 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3'), 6.57 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5'), 6.52 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5), 5.62 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3), 5.56 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, dd, $J = 11.6, 2.0$ Hz, H-6''a), 4.29 (1H, dd, $J = 11.6, 6.1$ Hz, H-6''b), 4.25 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-3''), 4.17 (1H, m, H-2''), 4.15 (1H, m, H-4''), 4.06 (1H, m, H-5''), 3.75 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.57 (3H, s, 4-OCH₃), 2.31 (3H, s, 6'-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 162.1 (C-4'), 158.8 (C-6), 157.8 (C-2'), 140.0 (C-6'), 116.1 (C-1'), 110.2 (C-5'), 105.1 (C-5), 103.0 (C-1''), 100.4 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.0 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.6 (C-2''), 71.3 (C-4''), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 55.4 (4'-OCH₃), 20.3 (6'-CH₃); HRMS m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_{10}$ $[M + H]^+$, 425.1448, found: 425.1463.

4'-*O*-Alkylaloeenin 76-93 の一般反応

Aloenin 74 (500 mg, 1.22 mmol) の無水 acetone (200 mL) 溶液に各種 alkyl bromide 或いは alkyl iodide (7.32 mmol) および K_2CO_3 (555 mg, 4.02 mmol) を加え、60 °C で 48 時間還流。反応後、溶媒を留去。残渣を精製水 (200 mL) に注加、EtOAc (80 mL \times 3) で抽出。抽出液を Na_2SO_4 で乾燥し、ろ過後、溶媒を留去。残渣をカラムクロマトグラフィー (a gradient of 0-20% MeOH in CHCl_3) で精製して相当する各化合物を得た。

4'-*O*-Ethylaloeenin 76

Yield 67%, m.p. 151-154 °C; FABMS: m/z 495 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 7.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3'), 6.58 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5'), 6.53 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5), 5.64 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3), 5.59 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 4.51 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, H-6''a), 4.30 (1H, dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, H-6''b), 4.27 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H-3''), 4.18 (1H, m, H-2''), 4.17 (1H, m, H-4''), 4.01 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, OCH₂CH₃), 4.00 (1H, m, H-5''), 3.56 (3H, s, 4-OCH₃), 2.32 (3H, s, 6'-CH₃), 1.23 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, OCH₂CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 171.3 (C-4), 165.0 (C-2), 161.4 (C-4'), 158.2 (C-6), 157.8 (C-2'), 139.9 (C-6'), 115.9 (C-1'), 110.6 (C-5'), 105.2

(C-5), 102.9 (C-1''), 100.8 (C-3'), 88.5 (C-3), 78.9 (C-5''), 78.6 (C-3''), 74.6 (C-2''), 71.1 (C-4''), 63.7 (OCH₂CH₃), 62.3 (C-6''), 55.9 (4-OCH₃), 20.3 (6'-CH₃), 14.7 (OCH₂CH₃); HRMS *m/z* calcd for C₂₁H₂₇O₁₀ [M + H]⁺, 439.1604, found: 439.1601.

4'-*O*-Propylaloeenin 77

Yield 66%, m.p. 135-138 °C; FABMS: *m/z* 453 [M + H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.22 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3'), 6.59 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5'), 6.53 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-5), 5.64 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3), 5.58 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1''), 4.49 (1H, dd, *J* = 12.2, 2.1 Hz, H-6''a), 4.27 (1H, dd, *J* = 12.2, 5.8 Hz, H-6''b), 4.24 (1H, t, *J* = 8.9 Hz, H-3''), 4.15 (1H, m, H-2''), 4.14 (1H, m, H-4''), 4.03 (1H, ddd, *J* = 12.2, 5.8, 2.1 Hz, H-5''), 3.94 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, OCH₂), 3.58 (3H, s, 4-OCH₃), 2.33 (3H, s, 6'-CH₃), 1.68 (2H, m, CH₂), 0.92 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.5 (C-4'), 158.8 (C-6), 157.8 (C-2'), 139.9 (C-6'), 115.9 (C-1'), 110.7 (C-5'), 105.1 (C-5), 102.9 (C-1''), 100.8 (C-3'), 88.5 (C-3), 78.8 (C-5''), 78.5 (C-3''), 74.5 (C-2''), 71.1 (C-4''), 69.6 (OCH₂), 62.3 (C-6''), 55.9 (4-OCH₃), 22.6 (CH₂), 20.3 (6'-CH₃), 10.5 (-CH₂CH₃); HRMS *m/z* calcd for C₂₂H₂₉O₁₀ [M + H]⁺, 453.1761, found: 453.1748.

4'-*O*-Butylaloeenin 78

Yield 65%, m.p. 147-150 °C; FABMS: *m/z* 467 [M + H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.28 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-3'), 6.61 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-5'), 6.56 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-5), 5.64 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-3), 5.63 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''), 4.54 (1H, dd, *J* = 11.9, 2.0 Hz, H-6''a), 4.33 (1H, dd, *J* = 11.9, 5.8 Hz, H-6''b), 4.29 (1H, t, *J* = 8.9 Hz, H-3''), 4.22 (1H, m, H-2''), 4.20 (1H, m, H-4''), 3.99 (1H, m, H-5''), 3.99 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, OCH₂), 3.54 (3H, s, 4-OCH₃), 2.33 (3H, s, 6'-CH₃), 1.65 (2H, quint, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 1.39 (2H, m, CH₂), 0.85 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 165.0 (C-2), 161.7 (C-4'), 159.0 (C-6), 158.0 (C-2'), 140.0 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.1 (C-5), 103.1 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.1 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.3 (C-4''), 68.0 (OCH₂), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 31.4 (CH₂), 20.3 (6'-CH₃), 19.4 (CH₂), 13.9 (-CH₂CH₃); HRMS *m/z* calcd for C₂₃H₃₁O₁₀ [M + H]⁺, 467.1917, found: 467.1917.

4'-*O*-Pentylaloeenin 79

Yield 69%, m.p. 155-158 °C; FABMS: m/z 481 [M + H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.25 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3'), 6.60 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5'), 6.55 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5), 5.61 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3), 5.61 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-1''), 4.53 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H-6''a), 4.31 (1H, dd, J = 12.0, 6.0 Hz, H-6''b), 4.27 (1H, t, J = 8.9 Hz, H-3''), 4.21 (1H, m, H-2''), 4.20 (1H, m, H-4''), 3.98 (1H, m, H-5''), 3.98 (2H, t, J = 6.5 Hz, OCH₂), 3.54 (3H, s, 4-OCH₃), 2.33 (3H, s, 6'-CH₃), 1.65 (2H, quint, J = 6.5 Hz, CH₂), 1.39 (4H, m, CH₂ × 2), 0.85 (3H, t, J = 7.5 Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.9 (C-6), 158.0 (C-2'), 139.9 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.1 (C-5), 103.0 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.1 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 67.9 (OCH₂), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 31.4 (CH₂), 30.0 (CH₂), 20.4 (6'-CH₃), 19.4 (CH₂), 13.9 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₂₃H₃₁O₁₀ [M + H]⁺, 481.2074, found: 481.2079.

4'-*O*-Hexylaloeenin 80

FABMS : m/z 495 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.28 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-3'), 6.64 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-5'), 6.56 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-5), 5.64 (1H, d, J = 6.1 Hz, H-1''), 5.63 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-3), 4.53 (1H, dd, J = 11.6, 2.0 Hz, H-6''a), 4.33 (1H, dd, J = 11.6, 6.1 Hz, H-6''b), 4.28 (1H, t, J = 8.9 Hz, H-3''), 4.21 (1H, m, H-2''), 4.19 (1H, m, H-4''), 4.01 (2H, t, J = 6.4 Hz, OCH₂), 4.00 (1H, m, H-5''), 3.54 (3H, s, 4-OCH₃), 2.34 (3H, s, 6'-CH₃), 1.69 (2H, quint, J = 6.4 Hz, CH₂), 1.37 (2H, m, CH₂), 1.21 (4H, m, CH₂ × 2), 0.83 (3H, t, J = 7.0 Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.9 (C-6), 157.9 (C-2'), 140.0 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.2 (C-5), 103.1 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.1 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (OCH₂), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 31.7 (CH₂), 29.4 (CH₂), 25.9 (CH₂), 22.8 (CH₂), 20.4 (6'-CH₃), 14.1 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₂₅H₃₅O₁₀ [M + H]⁺, 495.2230, found: 495.2229.

4'-*O*-Heptylaloeenin 81

Yield 60%, m.p. 121-122 °C; FABMS: m/z 509 [M + H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.27 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-3'), 6.63 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-5'), 6.59 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 5.61 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-1''), 5.60 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3), 4.52 (1H, dd, J = 11.9, 2.0 Hz, H-6''a), 4.30

(1H, dd, $J = 11.9, 5.8$ Hz, H-6''b), 4.27 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-3''), 4.19 (1H, m, H-2''), 4.17 (1H, m, H-4''), 4.01 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, OCH₂), 4.00 (1H, m, H-5''), 3.53 (3H, s, 4-OCH₃), 2.32 (3H, s, 6'-CH₃), 1.70 (2H, quint, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 1.37 (2H, m, CH₂), 1.22 (6H, m, CH₂ × 3), 0.84 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.5 (C-4), 165.0 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.9 (C-6), 158.0 (C-2'), 139.9 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.1 (C-5), 103.0 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.5 (C-3), 79.1 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (OCH₂), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 31.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 26.2 (CH₂), 22.8 (CH₂), 20.3 (6'-CH₃), 14.2 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₂₆H₃₇O₁₀ [M + H]⁺, 509.2387, found: 509.2406.

4'-*O*-Octylaloeenin 82

Yield 58%, m.p. 128-129 °C; FABMS: m/z 523 [M + H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.27 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3'), 6.64 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5'), 6.55 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 5.62 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 5.61 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, dd, $J = 12.2, 2.0$ Hz, H-6''a), 4.30 (1H, dd, $J = 12.2, 5.8$ Hz, H-6''b), 4.26 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-3''), 4.19 (1H, m, H-2''), 4.17 (1H, m, H-4''), 4.03 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, OCH₂), 4.02 (1H, m, H-5''), 3.54 (3H, s, 4-OCH₃), 2.33 (3H, s, 6'-CH₃), 1.71 (2H, quint, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 1.39 (2H, m, CH₂), 1.22 (8H, m, CH₂ × 4), 0.85 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.9 (C-6), 157.9 (C-2'), 140.0 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.2 (C-5), 103.1 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.1 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (OCH₂), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 32.0 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 26.3 (CH₂), 22.8 (CH₂), 20.3 (6'-CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₂₇H₃₉O₁₀ [M + H]⁺, 523.2543, found: 523.2540.

4'-*O*-Nonylaloeenin 83

Yield 57%, m.p. 124-126 °C; FABMS: m/z 537 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃ + C₅D₅N) δ 6.74 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3'), 6.45 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5'), 6.18 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-5), 5.37 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3), 5.07 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 4.10 (1H, dd, $J = 12.2, 3.1$ Hz, H-6''a), 3.93 (1H, dd, $J = 12.2, 5.8$ Hz, H-6''b), 3.90 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-3''), 3.80 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, OCH₂), 3.73 (1H, m, H-2''), 3.72 (1H, m, H-4''), 3.65 (3H, s, 4-OCH₃), 3.63 (1H, ddd, $J = 12.2, 5.8, 3.1$ Hz, H-5''), 2.26 (3H, s, 6'-CH₃), 1.72 (2H, quint, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 1.41 (2H, m, CH₂), 1.27 (10H, m, CH₂ × 5), 0.88 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃ +

C₅D₅N) δ 170.6 (C-4), 164.7 (C-2), 160.5 (C-4'), 157.8 (C-6), 156.5 (C-2'), 138.8 (C-6'), 115.0 (C-1'), 110.0 (C-5'), 104.2 (C-5), 102.0 (C-1''), 100.0 (C-3'), 87.4 (C-3), 76.7 (C-5''), 76.5 (C-3''), 73.0 (C-2''), 69.9 (C-4''), 67.4 (OCH₂), 61.5 (C-6''), 55.0 (4-OCH₃), 31.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.5 (CH₂), 25.4 (CH₂), 22.0 (CH₂), 19.8 (6'-CH₃), 13.4 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₂₈H₄₁O₁₀ [M + H]⁺, 537.2700, found: 537.2703.

4'-O-Decylaloeenin 84

Yield 56%, m.p. 108-111 °C; FABMS: m/z 551 [M + H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.30 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-3'), 6.65 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-5'), 6.56 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-5), 5.64 (1H, d, J = 7.3 Hz, H-1''), 5.63 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-3), 4.54 (1H, dd, J = 11.9, 2.0 Hz, H-6''a), 4.33 (1H, dd, J = 11.9, 6.0 Hz, H-6''b), 4.27 (1H, t, J = 8.9 Hz, H-3''), 4.21 (1H, m, H-2''), 4.20 (1H, m, H-4''), 4.03 (2H, t, J = 6.4 Hz, OCH₂), 4.02 (1H, m, H-5''), 3.54 (3H, s, 4-OCH₃), 2.34 (3H, s, 6'-CH₃), 1.73 (2H, quint, J = 6.4 Hz, CH₂), 1.41 (2H, m, CH₂), 1.22 (12H, m, CH₂ × 6), 0.87 (3H, t, J = 7.3 Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.7 (C-4'), 159.0 (C-6), 157.9 (C-2'), 140.0 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.2 (C-5), 103.1 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.1 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (OCH₂), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 32.1 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 26.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 20.4 (6'-CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₂₉H₄₃O₁₀ [M + H]⁺, 551.2856, found: 551.2875.

4'-O-Undecylaloeenin 85

Yield 52%, m.p. 116-118 °C; FABMS: m/z 587 [M + H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.30 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-3'), 6.65 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-5'), 6.55 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5), 5.64 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-1''), 5.63 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3), 4.54 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H-6''a), 4.32 (1H, dd, J = 12.0, 6.0 Hz, H-6''b), 4.28 (1H, t, J = 8.9 Hz, H-3''), 4.21 (1H, m, H-2''), 4.19 (1H, m, H-4''), 4.04 (2H, t, J = 6.5 Hz, OCH₂), 4.03 (1H, m, H-5''), 3.54 (3H, s, 4-OCH₃), 2.34 (3H, s, 6'-CH₃), 1.73 (2H, quint, J = 6.5 Hz, CH₂), 1.42 (2H, m, CH₂), 1.24 (14H, m, CH₂ × 7), 0.87 (3H, t, J = 7.0 Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.9 (C-6), 157.9 (C-2'), 139.9 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.2 (C-5), 103.0 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.1 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (OCH₂), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 32.1 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5

(CH₂), 26.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 20.4 (6'-CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃); HRMS *m/z* calcd for C₃₀H₄₅O₁₀ [M + H]⁺, 565.3013, found: 565.3031.

4'-*O*-Dodecylaloeenin 86

Yield 48%, m.p. 115-118 °C; FABMS: *m/z* 579 [M + H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.30 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3'), 6.65 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5'), 6.56 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 5.64 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-1''), 5.63 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3), 4.52 (1H, dd, *J* = 11.9, 2.1 Hz, H-6''a), 4.32 (1H, dd, *J* = 11.9, 5.8 Hz, H-6''b), 4.28 (1H, t, *J* = 8.9 Hz, H-3''), 4.22 (1H, m, H-2''), 4.20 (1H, m, H-4''), 4.05 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, OCH₂), 4.03 (1H, m, H-5''), 3.54 (3H, s, 4-OCH₃), 2.34 (3H, s, 6'-CH₃), 1.74 (2H, quint, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 1.42 (2H, m, CH₂), 1.25 (16H, m, CH₂ × 8), 0.87 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.9 (C-6), 157.9 (C-2'), 139.9 (C-6'), 115.9 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.2 (C-5), 103.1 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.1 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (OCH₂), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 32.1 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 26.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 20.4 (6'-CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃); HRMS *m/z* calcd for C₃₁H₄₇O₁₀ [M + H]⁺, 579.3169, found: 579.3165.

4'-*O*-Tetradecylaloeenin 87

Yield 70%, m.p. 127-129 °C; FABMS: *m/z* 629 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.28 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3'), 6.64 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5'), 6.54 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 5.62 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3), 5.61 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-1''), 4.53 (1H, dd, *J* = 11.9, 2.1 Hz, H-6''a), 4.31 (1H, dd, *J* = 11.9, 5.8 Hz, H-6''b), 4.27 (1H, t, *J* = 8.9 Hz, H-3''), 4.19 (1H, m, H-2''), 4.17 (1H, m, H-4''), 4.04 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, OCH₂), 4.03 (1H, m, H-5''), 3.55 (3H, s, 4-OCH₃), 2.34 (3H, s, 6'-CH₃), 1.74 (2H, quint, *J* = 6.3 Hz, CH₂), 1.43 (2H, m, CH₂), 1.27 (20H, m, CH₂ × 10), 0.87 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH₂CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.9 (C-6), 157.9 (C-2'), 139.9 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.1 (C-5), 103.0 (C-1''), 100.8 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.0 (C-5''), 78.6 (C-3''), 74.6 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (-OCH₂-), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 32.1 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 26.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 20.3 (6'-CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃); HRMS *m/z* calcd for C₃₃H₅₀O₁₀ [M + H]⁺, 607.3483, found: 607.3499.

4'-*O*-Hexadecylaloeenin 88

Yield 46%, m.p. 125-127 °C; FABMS: m/z 629 $[M + Na]^+$; 1H -NMR (C_5D_5N) δ 7.28 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3'), 6.64 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5'), 6.54 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 5.62 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3), 5.61 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 4.53 (1H, dd, $J = 12.2, 2.1$ Hz, H-6''a), 4.32 (1H, dd, $J = 12.2, 5.8$ Hz, H-6''b), 4.27 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-3''), 4.19 (1H, m, H-2''), 4.18 (1H, m, H-4''), 4.04 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, OCH₂), 4.03 (1H, m, H-5''), 3.55 (3H, s, 4-OCH₃), 2.34 (3H, s, 6'-CH₃), 1.74 (2H, quint, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 1.43 (2H, m, CH₂), 1.29 (24H, m, CH₂ × 12), 0.87 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₂CH₃), ^{13}C -NMR (C_5D_5N) δ 171.4 (C-4), 165.0 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.9 (C-6), 157.9 (C-2'), 139.9 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.1 (C-5), 103.0 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.0 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (-OCH₂-), 62.4 (C-6''), 55.9 (CH₂), 32.1 (CH₂), 30.0 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 26.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 20.4 (6'-CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₃₅H₅₄O₁₀ $[M + H]^+$, 635.3796, found: 635.3803.

4'-*O*-Octadecylaloeenin 89

Yield 43%, m.p. 121-124 °C; FABMS: m/z 663 $[M + H]^+$; 1H -NMR (C_5D_5N) δ 7.28 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3'), 6.64 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5'), 6.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5), 5.62 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 5.61 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3), 4.53 (1H, dd, $J = 11.5, 2.0$ Hz, H-6''a), 4.31 (1H, dd, $J = 11.5, 7.0$ Hz, H-6''b), 4.26 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-3''), 4.20 (1H, m, H-2''), 4.18 (1H, m, H-4''), 4.02 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, OCH₂), 3.98 (1H, m, H-5''), 3.53 (3H, s, 4-OCH₃), 2.34 (3H, s, 6'-CH₃), 1.74 (2H, quint, $J = 6.5$ Hz, CH₂), 1.43 (2H, m, CH₂), 1.29 (28H, m, CH₂ × 14), 0.87 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, CH₂CH₃), ^{13}C -NMR (C_5D_5N) δ 171.4 (C-4), 168.9 (C-2), 164.9 (C-4'), 158.9 (C-6), 157.7 (C-2'), 142.1 (C-6'), 115.3 (C-1'), 110.9 (C-5'), 105.2 (C-5), 103.1 (C-1''), 100.9 (C-3'), 86.2 (C-3), 79.1 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.4 (-OCH₂-), 62.4 (C-6''), 55.8 (CH₂), 32.1 (CH₂), 30.0 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 26.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 20.4 (6'-CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₃₇H₅₉O₁₀ $[M + H]^+$, 663.4108, found: 663.4105.

4'-*O*-Eicosylaloeenin 90

Yield 76%, m.p. 126-128 °C; FABMS: m/z 713 $[M + Na]^+$; 1H -NMR (C_5D_5N) δ 7.27 (1H, d,

$J = 1.8$ Hz, H-3'), 6.63 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5'), 6.53 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 5.61 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3), 5.60 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, dd, $J = 12.2, 2.1$ Hz, H-6''a), 4.30 (1H, dd, $J = 12.2, 5.8$ Hz, H-6''b), 4.24 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-3''), 4.17 (1H, m, H-2''), 4.16 (1H, m, H-4''), 4.02 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, OCH₂), 4.02 (1H, m, H-5''), 3.53 (3H, s, 4-OCH₃), 2.33 (3H, s, 6'-CH₃), 1.73 (2H, quint, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 1.43 (2H, m, CH₂), 1.29 (32H, m, CH₂ × 16), 0.87 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₂CH₃), ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.9 (C-6), 157.9 (C-2'), 139.9 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.1 (C-5), 103.0 (C-1''), 100.9 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.0 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.6 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (-OCH₂-), 62.4 (C-6''), 55.8 (CH₂), 32.1 (CH₂), 30.0 (CH₂), 30.0 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 26.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 20.4 (6'-CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₃₉H₆₂O₁₀ [M + H]⁺, 691.4422, found: 691.4410.

4'-*O*-Docosylaloeenin 91

Yield 70%, m.p. 126-128 °C; FABMS: m/z 741 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.28 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3'), 6.63 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5'), 6.54 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5), 5.61 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3), 5.60 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, dd, $J = 11.9, 2.1$ Hz, H-6''a), 4.31 (1H, dd, $J = 11.9, 5.8$ Hz, H-6''b), 4.25 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-3''), 4.18 (1H, m, H-2''), 4.17 (1H, m, H-4''), 4.02 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH₂), 4.02 (1H, m, H-5''), 3.53 (3H, s, 4-OCH₃), 2.33 (3H, s, 6'-CH₃), 1.73 (2H, quint, $J = 6.7$ Hz, CH₂), 1.43 (2H, m, CH₂), 1.32 (36H, m, CH₂ × 18), 0.87 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₂CH₃), ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.4 (C-4), 164.9 (C-2), 161.7 (C-4'), 159.0 (C-6), 157.9 (C-2'), 139.9 (C-6'), 116.0 (C-1'), 110.8 (C-5'), 105.1 (C-5), 103.0 (C-1''), 100.8 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.0 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 68.3 (-OCH₂-), 62.4 (C-6''), 55.8 (CH₂), 32.1 (CH₂), 30.0 (CH₂), 30.0 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 26.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 20.4 (6'-CH₃), 14.3 (-CH₂CH₃); HRMS m/z calcd for C₄₁H₆₆O₁₀ [M + H]⁺, 719.4735, found: 719.4717.

4'-*O*-Benzylaloeenin 92

Yield 55%, m.p. 100-103 °C; FABMS: m/z 501 [M + H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.55 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, C₆H₅), 7.37 (2H, m, C₆H₅), 7.36 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3'), 7.30 (1H, m), 6.68 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5'), 6.52 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 5.63 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3), 5.57 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1''), 5.20 (2H, ABq, $J_{AB} = 12.0$ Hz, $\Delta_{AB} = 17.5$ Hz, C₆H₅-CH₂), 4.52 (1H, dd, $J =$

11.9, 2.1 Hz, H-6''a), 4.31 (1H, dd, $J = 11.9, 6.1$ Hz, H-6''b), 4.27 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-3''), 4.18 (1H, m, H-2''), 4.17 (1H, m, H-4''), 4.08 (1H, ddd, $J = 11.9, 6.1, 2.1$ Hz, H-5''), 3.55 (3H, s, 4-OCH₃), 2.30 (3H, s, 6-CH₃); ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.3 (C-4), 164.9 (C-2), 161.2 (C-4'), 158.7 (C-6), 157.8 (C-2'), 140.0 (C-6'), 137.4, 128.8, 128.3 and 128.0 (C₆H₅), 116.3 (C-1'), 111.1 (C-5'), 105.1 (C-5), 103.0 (C-1''), 101.2 (C-3'), 88.6 (C-3), 79.0 (C-5''), 78.7 (C-3''), 74.6 (C-2''), 71.2 (C-4''), 70.2 (OCH₂-C₆H₅), 62.4 (C-6''), 55.8 (4-OCH₃), 20.4 (6'-CH₃); HRMS m/z calcd for C₂₆H₂₈O₁₀ [M + H]⁺, 501.1761, found: 501.1761.

4'-O-Allylaloenin 93

Yield 79%, m.p. 99-101 °C; FABMS: m/z 451[M+H]⁺; ¹H-NMR (C₅D₅N) δ 7.23 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3'), 6.60 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5'), 6.50 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 6.04 (1H, m, CH=CH₂), 5.62 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-3), 5.53 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H''-1), 5.44 (1H, dd, $J = 15.9, 1.5$ Hz, CH=CH₂a), 5.21 (1H, dd, $J = 10.4, 1.5$ Hz, OCH=CH₂b), 4.61 (2H, d, $J = 4.0$ Hz, OCH₂), 4.49 (1H, dd, $J = 11.9, 2.0$ Hz, H-6''a), 4.26 (1H, dd, $J = 11.9, 5.8$ Hz, H-6''b), 4.22 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-3''), 4.12 (1H, m, H-2''), 4.11 (1H, m, H-4''), 4.02 (1H, ddd, $J = 11.9, 5.8, 2.0$ Hz, H-5''), 3.57 (3H, s, 4'-OCH₃), 2.30 (3H, s, 6'-CH₃), ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ 171.3 (C-4), 164.9 (C-2), 161.0 (C-4'), 158.7 (C-6), 157.8 (C-2'), 139.9 (C-6'), 133.6 (CH=CH₂), 117.6 (CH=CH₂), 116.1 (C-1'), 111.0 (C-5'), 105.1 (C-5), 102.9 (C-1''), 101.1 (C-3'), 88.6 (C-3), 78.9 (C-5''), 78.5 (C-3''), 74.5 (C-2''), 71.1 (C-4''), 69.2 (OCH), 62.3 (C-6''), 55.9 (4-OCH₃), 20.3 (6'-CH₃); HRMS m/z calcd for C₂₂H₂₇O₁₀ [M + H]⁺, 451.1604, found: 451.1611.

第二編 第二章

4'-O-Alkylaloenin sulfates 94-102 の一般反応

4'-O-Alkylaloenin 75、80、84 および 86-91 (200 mg, 0.47 mmol) の無水 pyridine (5 mL) 溶液に、SO₃-pyridine complex (899 mg, 5.66 mmol) を加え、遮光下、室温で 72 時間攪拌。反応後、反応液を 1 M NaHCO₃ で pH 8~9 になるように調製後、溶媒を除去。残渣を H₂O (5 mL) に溶解し、イオン交換樹脂 Diaion HP 20 (日本練水株式会社) カラムクロマトグラフィーに吸着させ、水洗後、50% MeOH / H₂O および 100%

MeOH で溶出し、対応する化合物 **94-102** を得た。なお、4'-*O*-alkylaloeenin sulfates **94-102** は、いずれも ¹H- および ¹³C-NMR で確認した。

4'-*O*-Methylaloeenin sulfate **94**

Yield 14%, m.p. 228-233 °C; ¹H-NMR (D₂O) δ 6.60 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3'), 6.48 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5'), 6.23 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 5.47 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-1''), 5.57 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3), 4.69 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H-3''), 4.51 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H-2''), 4.44 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H-4''), 4.24 (1H, overlap with H-5'', H-6''a), 4.21 (1H, overlap with H-6''a, H-5''), 4.03 (1H, td, *J* = 10.0, 2.5 Hz, H-6''b), 3.77 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.71 (3H, s, 4-OCH₃), 2.04 (3H, s, 6-CH₃), ¹³C-NMR (D₂O) δ: 174.1 (C-4), 170.0 (C-2), 162.1 (C-4'), 158.5 (C-6), 156.2 (C-2'), 141.5 (C-6'), 115.9 (C-1'), 111.3 (C-5'), 107.3 (C-5), 99.6 (C-3'), 98.3 (C-1''), 89.5 (C-3), 75.0 (C-2''), 74.9 (C-3''), 74.5 (C-5''), 72.5 (C-4''), 68.6 (C-6''), 57.3 (4'-OCH₃), 56.5 (4'-OCH₃), 19.9 (6'-CH₃).

4'-*O*-Hexylaloeenin sulfate **95**

Yield 57%, m.p. 212-216 °C; ¹H-NMR (D₂O) δ 6.62 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3'), 6.48 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5'), 6.25 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 5.60 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3), 5.47 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-1''), 4.74 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H-3''), 4.49 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H-2''), 4.49 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H-4''), 4.24 (1H, overlap with H-5'', H-6''a), 4.21 (1H, overlap with H-6''a, H-5''), 4.03 (1H, td, *J* = 10.0, 2.5 Hz, H-6''b), 3.96 (2H, m, -OCH₂-), 3.80 (3H, s, 4'-OCH₃), 2.05 (3H, s, 6-CH₃), 0.75 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, -OCH₂CH₃), ¹³C-NMR (D₂O) δ 174.0 (C-4), 170.0 (C-2), 161.5 (C-4'), 158.5 (C-6), 156.2 (C-2'), 141.5 (C-6'), 115.8 (C-1'), 111.9 (C-5'), 107.2 (C-5), 100.2 (C-3'), 98.3 (C-1''), 89.5 (C-3), 75.0 (C-2''), 74.8 (C-3''), 74.6 (C-5''), 72.4 (C-4''), 69.8 (-OCH₂-), 68.5 (C-6''), 57.3 (4'-OCH₃), 31.6 (CH₂), 29.1 (CH₂), 25.7 (CH₂), 22.8 (CH₂), 20.0 (6'-CH₃), 14.2 (-OCH₂CH₃).

4'-*O*-Decylaloeenin sulfate **96**

Yield 14%, m.p. 212-214 °C; ¹H-NMR (D₂O) δ 6.59 (1H, broad s, H-3'), 6.38 (1H, broad s, H-5'), 6.17 (1H, broad s, H-5), 5.54 (1H, broad s, H-1''), 5.40 (1H, broad s, H-3), 4.69 (1H, broad s, H-3''), 4.49 (1H, broad s, H-2''), 4.45 (1H, broad s, H-4''), 4.20 (2H, overlap with

H-5'' and H-6''a, H-5'' and H-6''a), 3.97 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-6''b), 3.90 (2H, broad s, -OCH₂-), 3.72 (3H, s, 4'-OCH₃), 2.01 (3H, s, 6-CH₃), 1.56 (2H, m, CH₂), 1.12 (2H, m, CH₂), 1.03 (12H, m, CH₂ × 6), 0.64 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, -OCH₂CH₃), ¹³C-NMR (D₂O) δ 173.9 (C-4), 170.0 (C-2), 161.5 (C-4'), 158.5 (C-6), 156.3 (C-2'), 141.1 (C-6'), 115.8 (C-1'), 111.9 (C-5'), 107.2 (C-5), 100.4 (C-3'), 98.4 (C-1''), 89.5 (C-3), 74.9 (C-3''), 74.8 (C-5''), 74.6 (C-2''), 72.4 (C-4''), 69.6 (-OCH₂-), 68.4 (C-6''), 57.3 (4-OCH₃), 32.2 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.0 (CH₂), 26.0 (CH₂), 23.0 (CH₂), 20.1 (6'-CH₃), 14.4 (-OCH₂CH₃).

4'-*O*-Dodecylaloeenin sulfate 97

Yield 50%, m.p. 199-201 °C; ¹H-NMR (D₂O) δ 6.61 (1H, broad s, H-3'), 6.27 (1H, broad s, H-5'), 6.07 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5), 5.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3), 5.38 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-1''), 4.74 (1H, t, $J = 5.0$, H-3''), 4.29 (1H, m, H-5''), 4.50 (1H, t, $J = 5.0$ Hz, H-2''), 4.49 (1H, t, $J = 5.0$ Hz, H-4''), 4.29 (1H, dd, $J = 11.5, 5.0$ Hz, H-6''a), 3.96 (1H, dd, $J = 11.5, 5.0$ Hz, H-6''b), 3.86 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, -OCH₂-), 3.70 (3H, s, 4-OCH₃), 2.02 (3H, s, 6-CH₃), 1.56 (2H, m, CH₂), 1.12 (2H, m, CH₂), 1.03 (16H, m, CH₂ × 6), 0.66 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, -OCH₂CH₃), ¹³C-NMR (D₂O) δ 173.5 (C-4), 169.3 (C-2), 161.7 (C-4'), 158.4 (C-6), 156.5 (C-2'), 140.4 (C-6'), 115.8 (C-1'), 111.7 (C-5'), 107.0 (C-5), 100.4 (C-3'), 98.5 (C-1''), 89.5 (C-3), 75.2 (C-3''), 75.1 (C-5''), 74.4 (C-2''), 72.6 (C-4''), 69.4 (-OCH₂-), 68.1 (C-6''), 57.4 (4-OCH₃), 32.5 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.0 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.2 (CH₂), 26.4 (CH₂), 23.3 (CH₂), 20.5 (6'-CH₃), 14.7 (-OCH₂CH₃).

4'-*O*-Tetradecylaloeenin sulfate 98

Yield 62%, m.p. 239-240 °C; ¹H-NMR (D₂O) δ 6.63 (1H, broad s, H-3'), 6.25 (1H, broad s, H-5'), 6.03 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-5), 5.55 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3), 5.37 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-1''), 4.76 (1H, t, $J = 5.0$ Hz, H-3''), 4.51 (1H, t, $J = 5.0$ Hz, H-2''), 4.49 (1H, t, $J = 5.0$ Hz, H-4''), 4.31 (1H, dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, H-6''a), 4.18 (1H, dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, H-5''), 3.96 (1H, dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, H-6''b), 3.84 (2H, broad s, -OCH₂-), 3.69 (3H, s, 4-OCH₃), 2.02 (3H, s, 6-CH₃), 1.53 (2H, m, CH₂), 1.19 (2H, m, CH₂), 1.07 (20H, m, CH₂ × 10), 0.69 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, -OCH₂CH₃), ¹³C-NMR (D₂O) δ 173.4 (C-4), 169.2 (C-2), 161.9 (C-4'), 158.4 (C-6), 156.6 (C-2'), 140.1 (C-6'), 115.9 (C-1'), 111.7 (C-5'), 107.0 (C-5), 100.9 (C-3'), 98.7 (C-1''), 89.6 (C-3), 75.4 (C-3''), 75.2 (C-5''), 74.3 (C-2''), 72.7 (C-4''), 69.4 (-OCH₂-), 68.0 (C-6''), 57.5

(4-OCH₃), 32.7 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.3 (CH₂), 26.6 (CH₂), 23.4 (CH₂), 20.6 (6'-CH₃), 14.7 (-OCH₂CH₃).

4'-*O*-Hexadecylaloeenin sulfate **99**

Yield 66%, m.p. 232-235 °C; ¹H-NMR (D₂O) δ 6.63 (1H, broad s, H-3'), 6.24 (1H, broad s, H-5'), 6.01 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-5), 5.55 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-3), 5.36 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-1''), 4.76 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, H-3''), 4.51 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, H-2''), 4.47 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, H-4''), 4.32 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-6''a), 4.17 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-5''), 3.96 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-6''b), 3.83 (2H, broad s, -OCH₂-), 3.67 (3H, s, 4-OCH₃), 2.02 (3H, s, 6-CH₃), 1.53 (2H, m, CH₂), 1.18 (2H, m, CH₂), 1.09 (24H, m, CH₂ × 10), 0.71 (3H, t, *J* = 3.7 Hz, -OCH₂CH₃), ¹³C-NMR (D₂O) δ 173.3 (C-4), 169.1 (C-2), 161.9 (C-4'), 158.3 (C-6), 156.7 (C-2'), 140.0 (C-6'), 115.9 (C-1'), 111.8 (C-5'), 107.0 (C-5), 100.9 (C-3'), 98.7 (C-1''), 89.6 (C-3), 75.4 (C-3''), 75.3 (C-5''), 74.2 (C-2''), 72.8 (C-4''), 69.4 (-OCH₂-), 68.0 (C-6''), 57.5 (4-OCH₃), 32.7 (CH₂), 30.6 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.4 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.0 (CH₂), 29.4 (CH₂), 26.7 (CH₂), 23.4 (CH₂), 20.6 (6'-CH₃), 14.8 (-OCH₂CH₃).

4'-*O*-Octadecylaloeenin sulfate **100**

Yield 49%, m.p. 214-217 °C; ¹H-NMR (D₂O) δ 6.62 (1H, broad s, H-3'), 6.23 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-5'), 5.99 (1H, broad s, H-5), 5.53 (1H, broad s, H-3), 5.34 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-1''), 4.75 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, H-3''), 4.49 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, H-2''), 4.46 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, H-4''), 4.30 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-6''a), 4.15 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-5''), 3.96 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-6''b), 3.82 (2H, broad s, -OCH₂-), 3.66 (3H, s, 4-OCH₃), 2.01 (3H, s, 6-CH₃), 1.51 (2H, m, CH₂), 1.18 (2H, m, CH₂), 1.08 (28H, m, CH₂ × 14), 0.69 (3H, broad s, -OCH₂CH₃), ¹³C-NMR (D₂O) δ 173.2 (C-4), 169.1 (C-2), 162.0 (C-4'), 158.3 (C-6), 156.7 (C-2'), 139.8 (C-6'), 115.9 (C-1'), 111.8 (C-5'), 107.0 (C-5), 100.9 (C-3'), 98.8 (C-1''), 89.7 (C-3), 75.5 (C-3''), C-5''), 74.1 (C-2''), 73.0 (C-4''), 69.4 (-OCH₂-), 67.8 (C-6''), 57.5 (4-OCH₃), 32.8 (CH₂), 30.7 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.5 (CH₂), 26.8 (CH₂), 23.5 (CH₂), 20.6 (6'-CH₃), 14.8 (-OCH₂CH₃).

4'-*O*-Eicosylaloeenin sulfate **101**

Yield 63%, m.p. 229-231 °C; ¹H-NMR (D₂O) δ 6.63 (1H, broad s, H-3'), 6.24 (1H, broad s,

H-5'), 5.98 (1H, broad s, H-5), 5.54 (1H, broad s, H-3), 5.35 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-1''), 4.76 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, H-3''), 4.31 (1H, broad s, H-6''a), 4.49 (1H, broad s, H-2''), 4.45 (1H, broad s, H-4''), 4.14 (1H, broad s, H-5''), 3.99 (1H, broad s, H-6''b), 3.82 (2H, broad s, -OCH₂-), 3.65 (3H, s, 4-OCH₃), 2.02 (3H, s, 6-CH₃), 1.50 (2H, m, CH₂), 1.13 (34H, m, CH₂ × 17), 0.73 (3H, broad s, -OCH₂CH₃), ¹³C-NMR (D₂O) δ 173.2 (C-4), 169.0 (C-2), 162.0 (C-4'), 158.3 (C-6), 156.7 (C-2'), 139.7 (C-6'), 115.9 (C-1'), 111.8 (C-5'), 106.9 (C-5), 101.0 (C-3'), 98.8 (C-1''), 89.3 (C-3), 75.3 (C-3'', C-5''), 74.2 (C-2''), 73.0 (C-4''), 69.4 (-OCH₂-), 68.0 (C-6''), 57.5 (4-OCH₃), 34.4 (CH₂), 32.8 (CH₂), 30.7 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 26.8 (CH₂), 23.5 (CH₂), 20.6 (6'-CH₃), 14.8 (-OCH₂CH₃).

4'-*O*-Docosylaloeenin sulfate **102**

Yield 57%, m.p. 235-237 °C; ¹H-NMR (D₂O) δ 6.64 (1H, broad s, H-3'), 6.24 (1H, broad s, H-5'), 5.97 (1H, broad s, H-5), 5.55 (1H, broad s, H-3), 5.35 (1H, broad s, H-1''), 4.77 (1H, broad s, H-3''), 4.49 (1H, broad s, H-2''), 4.44 (1H, broad s, H-4''), 4.32 (1H, m, H-6''a), 4.14 (1H, broad s, H-5''), 4.01 (1H, broad s, H-6''b), 3.81 (2H, broad s, -OCH₂-), 3.64 (3H, s, 4-OCH₃), 2.02 (3H, s, 6-CH₃), 1.50 (2H, m, CH₂), 1.15 (2H, m, CH₂), 1.05 (36H, m, CH₂ × 18), 0.75 (3H, t, $J = 3.7$ Hz, -OCH₂CH₃), ¹³C-NMR (D₂O) δ 173.2 (C-4), 169.0 (C-2), 162.0 (C-4'), 158.3 (C-6), 156.8 (C-2'), 139.7 (C-6'), 115.9 (C-1'), 111.9 (C-5'), 106.9 (C-5), 101.1 (C-3'), 98.9 (C-1''), 89.6 (C-3), 75.7 (C-3''), 75.6 (C-5''), 73.9 (C-2''), 73.1 (C-4''), 69.4 (-OCH₂-), 67.7 (C-6''), 57.5 (4-OCH₃), 32.8 (CH₂), 30.7 (CH₂), 30.6 (CH₂), 30.3 (CH₂), 29.6 (CH₂), 27.2 (CH₂), 26.8 (CH₂), 23.5 (CH₂), 20.6 (6'-CH₃), 14.8 (-OCH₂CH₃).

生物実験項

1. 試薬

HCT 116 細胞培養に用いた McCoy's 5A Medium は SIGMA (MO, USA) より、fetal bovine serum (FBS) は Biosource International (CA, USA) より購入した。

Hep G2 細胞培養に用いた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。

HCT 116 / VCR100-1-1 細胞培養に用いた McCoy's 5A Medium は SIGMA (MO, USA) より、ビンクリスチン硫酸塩 (Vincristine sulfate) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。

Phosphate buffered saline (PBS(-)) は宝酒造株式会社 (滋賀) より、penicillin-streptomycin (100U / mL - 100 µg / mL)、dimethyl sulfoxide (DMSO) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より、Trypsin-EDTA 10× (0.5% Trypsin, 5.3 mM EDTA·4Na) はインビトロジェン株式会社 (Invitrogen Co., Ltd.) (東京) より購入した。細胞毒性活性測定に用いた MTT Cell Growth Kit は CEMICOM International (CA, USA) より購入した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

2. 細胞培養

ヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 (ATCC No. CCL-247) は大日本製薬株式会社 (大阪) より購入した。HCT 116 細胞の培養は、37 °C、5% CO₂ 存在下、10% FBS、penicillin-streptomycin (100 U / mL - 100 µg / mL) を添加した McCoy's 5A medium を培養液とし、Mini CO₂ インキュベータ (incubator) 4020 型 (Asahi Life Science Co., Ltd., Tokyo) を用いて行なった。

ヒト肝上皮癌細胞 Hep G2 (ATCC No. RCBo459) は理研セルバンク (RIKEN Cell Bank) (筑波) より購入した。Hep G2 細胞の培養は、37 °C、5% CO₂ 存在下、10% FBS、penicillin-streptomycin (100 U / mL - 100 µg / mL) を添加した DMEM を培地とした。

Vincristine 耐性ヒト結腸上皮癌細胞 HCT 116 / VCR100-1-1 は、第一製薬株式会社より譲り受けた。HCT 116 / VCR100-1-1 細胞の培養は、HCT 116 細胞の培養と同様である。なお、培養の際、vincristine 濃度が 100 ng / mL になるように、培養液に vincristine 硫酸塩を添加した。

3. 細胞播種

96 穴プレート (Microtest™ Tissue Culture Plate, 96 well, Flat Bottom with Low Evaporation Ltd, Falcon, NJ, USA) に HCT 116、 Hep G2 および HCT 116 / VCR100-1-1 細胞を 1000 個ずつ播種し、37 °C、5% CO₂ 存在下、培養液 200 μL にて 24 時間培養した。

4. 薬物添加

各種試験用化合物 (10 mg) を DMSO (1 mL) に溶解させ、10 mg / mL の原液を調製した。

HCT 116、 Hep G2 および HCT 116 / VCR100-1-1 細胞を 24 時間培養後、培養液を除去し、各薬物濃度が 1 μg / mL から 100 μg / mL になるように新たな培養液 200 μL に添加し、37 °C、5% CO₂ 存在下、48 時間培養した。

5. 細胞毒性活性測定

細胞増殖抑制活性の測定は Mosmann ⁷¹⁾ の MTT 方法に準じて行なった。各薬物を添加して 48 時間培養後、培養液を除去し、MTT 試薬 10 μL (5 mg MTT / 1.0 mL PBS (-)) 及び PBS (-) 100 μL を添加して、37 °C、5% CO₂ 存在下、3 時間培養した。その後、生成したホルマザン (Formazans) の結晶を Color development solution (isopropanol with 0.04 N HCl) 100 μL で溶解し、マイクロプレートリーダー (EL 800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instrument, Inc.) を用いて、test wavelength 570 nm および reference wavelength 630 nm の条件で、測定を行なった。測定後、それぞれの薬物の IC₅₀ 値を算出し、細胞増殖抑制活性を評価した。

RT-PCR 実験項

1. 試薬

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法はキアゲン (QIAGEN) 社のワンステップ RT-PCR キット (OneStep RT-PCR Kit) を使い、全てのプライマーはキアゲンテクノロジーより購入した (Table 10)。

2. 細胞培養

Hep G2 細胞の培養は、実験の部 生物実験項 2 の方法に従って行なった。

3. 細胞播種

細胞培養 dish (10 cm) に DMEM 培養液 (12 mL) を加え、細胞を 1×10^6 個ずつ播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下、24 時間培養した。

4. 薬物添加

細胞培養 24 時間後、培養液 (12 mL) を交換し、化合物 **59**、**62** および **66** を IC_{50} 値になるように、それぞれ $3.6 \mu\text{L}$ 、 $8.3 \mu\text{L}$ および $1.6 \mu\text{L}$ の薬物原液 (10 mg in DMSO (1 mL)) を添加し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下、48 時間培養した。

5. RT-PCR 法による mRNA 量の定量

各薬物添加 48 時間培養後、細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA 量は、紫外可視分光光度計 (BioSpec-1600, 島津製作所) を用いて 260 nm および 280 nm の吸光度で測定した。次いで、OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて、 $0.5 \mu\text{g} / 50 \mu\text{L}$ のトータル RNA 量の RT-PCR 反応液を調製した (Table 11)。

この反応液を Table 12 に示した各温度、時間とサイクル数で、MiniCycler (MJ

Research) を用いて RT-PCR を行なった。増幅した cDNA 断片は、2% のアガロースゲル (agarose gel) にて電気泳動を行い、トランスイルミネーターを用いて UV 照射した。デジタル化した画像をフォトショップ (Photoshop ver. 4.0) で処理し、画像解析プログラム NIH イメージ (NIH image ver. 1.60) を用いて蛍光の部分を選択し、単位面積あたりの蛍光強度 (Fluorescence intensity) を求めた。

本実験において、*p53*、*p21*、*Bax* および *Bcl-2* mRNA 量は、*GAPDH* mRNA 量を内部標準とし、各々に相当するバンドとの蛍光強度比例を求めることにより定量した。また、*GAPDH* mRNA 量に相当するバンドの絶対的蛍光強度は、薬物を添加していないコントロールおよび薬物添加後においても大きな変動は見られなかった。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省, 2002. 平成 14 年度人口動態統計.
- 2) Beck, W.T., 1987. The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem. Pharmacol.*, 36, 2879-2887.
- 3) Endicott, J.A., Ling, V., 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 137-171.
- 4) Ueda, K., 1997. Structures and functions of xenobiotic efflux pump P-glycoprotein and MRP-important molecular targets for cancer chemotherapy. *Jpn. J. Cancer Chemother.*, 24, 2190-2195.
- 5) 植田和光, 1999. P-糖タンパク質を介する抗腫瘍薬耐性機構. 最新医学, 54, 2037-2043.
- 6) 小幡徹, 佐々木琢磨, 2001. 薬剤耐性機構. 総合臨床, 50, 197-203.
- 7) Ferry, D.R., Traunceker, H., Kerr, D.J., 1996. Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumours. *Eur. J. Cancer*, 32, 1070-1081.
- 8) Krishna, R., Mayer, L.D., 2000. Multidrug resistance (MDR) in cancer. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 11, 265-283.
- 9) Saito, S., Kurida, K., Hayashi, Y., Nagamura, Y., Nishida, K., Ishiguro, I., 1991. Preparation of glycyrrhetic acid glycosides having various $\beta(1\rightarrow2)$ -linked disaccharides and their cytoprotective effects on carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 2333-2339.
- 10) Saito, S., Sumita, S., Kanda, Y., Sasaki, Y., 1992. Enol glycosylation at α,β -unsaturated ketone on glycyrrhetic acid derivatives. *Tetrahedron Lett.*, 33, 7381-7384.
- 11) Saito, S., Sasaki, Y., Kuroda, K., Hayashi, Y., Sumita, S., Nagamura, Y., Nishida, K., Ishiguro, I., 1993. Preparation of glycyrrhetic acid β -glycosides having $\beta(1\rightarrow2)$ -linked disaccharides by the use of 2-O-trichloroacetyl- β -D-pyranosyl chlorides and their cytoprotective effects on hepatic injury in vivo. *Chem. Pharm. Bull.*, 41, 539-543.
- 12) Saito, S., Ebashi, J., Sumita, S., Furumoto, T., Nagamura, Y., Nishida, K., Ishiguro, I., 1993. Comparison of cytoprotective effects of saponins isolated from leaves of *Aralia elata* Seem. (Araliaceae) with synthesized bisdesmosides of oleanoic acid and hederagenin on carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Chem. Pharm. Bull.*, 41, 1395-1401.

- 13) Saito, S., Sumita, S., Kanda, Y., Sasaki, Y., 1994. Syntheses of glycyrrhetic acid α -diglycosides and enol α -glycosides. *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 1016-1027.
- 14) Saito, S., Sumita, S., Furumoto, T., Ebashi, J., Nagamura, Y., Ishiguro, I., 1994. Studies on synthesis and structure-activity relationships against cytoprotective activity of triterpenoidal diglycosides with an acid saccharide, β -glucopyranosuronic acid. *Eur. J. Med. Chem.*, 29, 455-470.
- 15) Saito, S., Nagase, S., Nagamura, Y., 1996. Synthesis of glycyrrhetic acid diglycosides and their cytoprotective activities against CCl_4 -induced hepatic injury in vitro. *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 557-574.
- 16) Saito, S., Furumoto, T., Ochiai, M., Nagase, S., Hosono, A., Hoshino, H., Ikeda, R., Shimada, N., 1996. Synthetic studies on relationship between anti-HIV activities and abilities of micelle formations of various alkylated glycyrrhetinate diglycoside sodium sulfates and related compounds. *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 365-381.
- 17) Tsukamoto, T., Ueno, Y., 1936. Dioscin, dioscorea-sapotoxin and diosgenin. *J. Pharm. Soc. Japan*, 56, 802-807.
- 18) Marker, R.E., Turner, D.L., Ulshafer, P.R., 1940. Sterols. CIV. Diosgenin from certain American plants. *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 2542-2547.
- 19) 那波速男, 1972. 大有機化学 第8巻 脂環式化合物 III, 12. ステロイドサポニン. 朝倉書店, pp. 501-544.
- 20) Niwa, A., Takeda, O., Ishimaru, M., Nakamoto, Y., Yamasaki, K., Kohda, H., Nishino, H., Segawa, T., Fujimura, K., Kuramoto, A., 1988. Screening test for platelet aggregation inhibitor in natural products. The active principle of *Anemarrhena rhizoma*. *J. Pharm. Soc. Japan*, 108, 555-561.
- 21) Nakashima, N., Kimura, I., Kimura, M., 1993. Isolation of pseudoprotimosaponin A-III from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Nat. prod.*, 56, 345-350.
- 22) Xu, Q., Wang, R., Yu, B.Y., 1993. Effects of ruscogenin fucopyranoside on the delayed type hypersensitivity and inflammatory reactions. *J. China Pharm. Univ.*, 24, 98-101.
- 23) Wu, F.H., Cao, J.S., Jiang, J.Y., Yu, B.Y., Xu, Q., 2001. Ruscogenin glycoside (Lm-3) isolated from *Liriope muscari*, improves liver injury by dysfunctioning liver-infiltrating lymphocytes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 53, 681-688.
- 24) Mimaki, Y., Kuroda, M., Kameyama, A., Sashida, Y., Hirano, T., Oka, K., Dobashi, A., 1997. Cholestane glycosides with potent cytostatic activities on various tumor cells

- from *Ornithogalum saundersiae* bulbs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7, 633-636.
- 25) Fontaine, T.D., Irving, G.W., Ma, R., Pool, J.B., Doolittle, S.P., 1948. Isolation and partial characterization of crystalline tomatine, an antibiotic agent from tomato plant. *Arch. Biochem.*, 18, 467-475.
- 26) Fujiwara, Y., Yahara, S., Ikeda, T., Ono, M., Nohara, T., 2003. Cytotoxic major saponin from tomato fruits. *Chem. Pharm. Bull.*, 51, 234-235.
- 27) Juliano, R.L., Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.*, 455, 152-162.
- 28) Lee, G., Piquette-Miller, M., 2001. Influence of IL-6 on MDR and MRP-mediated multidrug resistance in human hepatoma cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 79, 876-884.
- 29) Kim, J.H., Chung, J.B., Park, I.S., Kim, B.S., Yoo, N.C., Choi, J.H., Roh, J.K., Kim, H.S., Kwon, O.H., Lee, K.S., Kim, B.S., 1993. Combined use of tamoxifen, cyclosporin A, and verapamil for modulating multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Yonsei Med. J.*, 34, 35-44.
- 30) Tong, A.W., Su, D., Mues, G., Tillery, G.W., Goldstein, R., Klintmalm, G., Stone, M.J., 1996. Chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells with cyclosporin A in post-liver transplant patient plasma. *Clin. Cancer Res.*, 2, 531-539.
- 31) 橋本嘉幸, 山田武, 1999. 新アポトーシスの分子医学. 新臨床医のための分子医学シリーズ, 羊土社, 東京.
- 32) 谷口武利, 1997. PCR 実験ノート. 無敵のバイオテクニカルシリーズ, 羊土社, 東京.
- 33) Ikeda, T., Tsumagari, H., Honbu, T., Nohara, T., 2003. Cytotoxic activity of steroidal glycosides from *solanum* plants. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1198-1201.
- 34) Quan, H.J., Koyanagi, J., Ohmori, K., Uesato, S., Tsuchido, T., Saito, S., 2002. Preparations of heterospirostanols and their pharmacological activities. *Eur. J. Med. Chem.*, 37, 659-669.
- 35) Marker, R.E., Tsukamoto, T., Turner, D.L., 1940. Sterols. C. Diosgenin. *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 2525-2532.
- 36) Tobari, A., Teshima, M., Koyanagi, J., Kawase, M., Miyamae, H., Yoza, K., Takasaki, A., Nagamura, Y., Saito, S., 2000. Spirostanols obtained by cyclization of pseudosaponin derivatives and comparison of anti-platelet agglutination activities of spirostanol glycosides. *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 511-527.

- 37) Uhle, F.C., **1954**. The transformation of pseudosapogenins to steroid alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4245-4246.
- 38) Puri, R., Wong, T.C., **1994**. ¹H- and ¹³C-NMR assignments and structural determination of a novel glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*. *J. Nat. prod.*, 57, 587-596.
- 39) Shionoya, M., Jimbo, T., Kitagawa, M., Soga, T., Tohgo, A., **2003**. DJ-927, a novel oral taxane, overcomes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci.*, 94, 459-466.
- 40) Takenouchi, T., Munekata, E., **1995**. Trophic effects of substance P and beta-amyloid peptide on dibutyryl cyclic AMP-differentiated human leukemic (HL-60) cells. *Life Sci.*, 56, 479-484.
- 41) Quan, H.J., Koyanagi, J., Hagiwara, K., Kondo, S., Isshiki, N., Komada, F., Saito, S., **2005**. Cytotoxic and antibacterial activity of pseudodiosgenins and pseudodiosgenones. *Eur. J. Med. Chem.*, (submitted)
- 42) Uhle, F., **1967**. Synthesis and transformations of a heptacyclic triazoline derived from pseudodiosgenin. *J. Org. Chem.*, 32, 1596-1601.
- 43) Quan, H.J., Koyanagi, J., Komada, F., Saito, S., **2005**. Preparations of vitamin D analogs, spirostanols and furostanols from diosgenin and their cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.*, (in press)
- 44) 岡野登志夫, **2000**. ビタミン D と疾患. 基礎と臨床からの考察, 医薬ジャーナル社, 東京.
- 45) Silver, J., Moallem, E., Kilav, R., Sela, A., Naveh-Many, T., **1998**. Regulation of the parathyroid hormone gene by calcium, phosphate and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 13, 40-44.
- 46) Tilyard, M.W., Spears, G.F., Thomson, J., Dovey, S., **1992**. Treatment of menopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *N. Engl. J. Med.*, 326, 357-362.
- 47) Nishii, Y., **1998**. Evaluation of the active form of vitamin D as a therapeutic agent for osteoporosis. *Vitamins (Japan)*, 72, 193-204.
- 48) Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, C., Takeda, H., Konno, M., Yamazaki, K., Yoshiki, T., Suda, T., **1981**. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 4990-4994.
- 49) Colston, K., **1997**. Vitamin D and breast cancer: therapeutic potential of new vitamin D analogs. In: Feldman, D., Glorieux, F.H., Pike, J.W., *Vitamin D*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 1107-1123.

- 50) Bernardi, R.J., Johnson, C.S., Modzelewski, R.A., Trump, D.L., **2002**. Antiproliferative effects of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinology*, 143, 2508-2514.
- 51) Bortman, P., Folgueira, M.A.A.K., Katayama, M.L.H., Snitcovsky, I.M.L., Brentani, M.M., **2002**. Antiproliferative effects of $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃ on breast cells-A mini review. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35, 1-9.
- 52) Gross, C., Peehl, D.M., Feldman, D., **1997**. Vitamin D and prostate cancer. In: Feldman, D., Glorieux, F.H., Pike, J.W., *Vitamin D*, Academic Press, San diego, CA, pp. 1125-1139.
- 53) Hisatake, J., Kubota, T., Hisatake, Yasuko., Uskokovic, M., Tomoyasu, S., Koeffler, H.P., **1999**. $5,6$ -*trans*- 16 -ene-Vitamin D₃: A new class of potent inhibitors of proliferation of prostate, breast, and myeloid leukemic cells. *Cancer Res.*, 59, 4023-4029.
- 54) Poleck, T.C., Weigel, N.L., **2002**. Vitamin D and prostate cancer. *J. Androl.*, 23, 9-17.
- 55) Shabahang, M., Buras, R.R., Davoodi, F., Schumaker, L.M., Nauta, R.J., Uskokovic, M.R., Brenner, R.V., Evans, S.R., **1994**. Growth inhibition of HT-29 human colon cancer cells by analogues of $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res.*, 54, 4057-4064.
- 56) Brasitus, T.A., Sitrin, M., **1997**. Chemoprevention of colon cancer by vitamin D₃ and its metabolites / analogues. In: Feldman, D., Glorieux, F.H., Pike, J.W., *Vitamin D*, Academic Press, San diego, CA, pp. 1141-1154.
- 57) Tangpricha, V., Flanagan J.N., Whitlatch, L.W., Tseng, C.C., Chen, T.C., Holt, P.R., Lipkin, M.S., Holick, M.F., **2001**. 25 -hydroxyvitamin D- 1 α -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet.*, 357, 1673-1674.
- 58) Welsh, J., **1994**. Induction of apoptosis in breast cancer cells in response to vitamin D and antiestrogens. *Biochem. Cell Biol.*, 72, 537-545.
- 59) Diaz, G.D., Paraskeva, C., Thomas, M.G., Binderup, L., Hague, A., **2000**. Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D₃ and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: Possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res.*, 60, 2304-2312.
- 60) Nakagawa, K., **2002**. Analysis of molecular mechanism of cancer cell differentiation and apoptosis induced by vitamin D₃ analogs on the basis of molecular recognition of vitamin D receptor ligand binding domain. *J. Pharm. Soc. Japan*, 122, 781-791.
- 61) Dai, H., Posner, G.H., **1994**. Synthetic approaches vitamin D. *Synthesis*, 1383-1398.

- 62) Bouillon, R., Okamura, W.A., Norman, A.W., 1995. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.*, 16, 200-257.
- 63) Deluca, H.F., 1979. The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. *Nutr. Rev.*, 37, 161-193.
- 64) Liu, M.Z., Yu, B., Wu, X.Y., Hui, Y.Z., Fung, K.P., 2000. Synthesis of (25R)-ruscogenin-1-yl β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopyranoside. *Carbohydr. Res.*, 329, 745-754.
- 65) Morisaki, M., Koizumi, N., Ikekawa, N., 1975. Synthesis of active forms of vitamin D. Part IX. Synthesis of 1 α ,24-Dihydroxycholecalciferol. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1421-1424.
- 66) Qno, Y., Kawase, A., Watanabe, H., Shiraiishi, A., Takeda, S., Higuchi, Y., Sato, K., Yamauchi, T., Mikami, T., Kato, M., Tsugawa, N., Okano, T., Kubodera, N., 1998. Syntheses and preventive effects of analogues related to 1 α ,25-dihydroxy-2 β -(3-hydroxypropoxy)vitamin D₃ (ED-71) on bone mineral loss in ovariectomized rats. *Bioorg. Med. Chem.*, 6, 2517-2523.
- 67) Kubodera, N., Miyamoto, K., Akiyama, M., Matsumoto, M., Mori, T., 1991. Synthetic studies of vitamin D analogues. IX. Synthesis and differentiation-inducing activity of 1 α ,25-dihydroxy-23-oxa-, thia-, and azavitamin D₃. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 3221-3224.
- 68) Wilson, W.K., Sumpter, R.M., Warren, J.J., Rogers, P.S., Ruan, B.F., Schroepfer, G.J., 1996. Analysis of unsaturated C₂₇ sterols by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Lipid Res.*, 37, 1529-1555.
- 69) Fieser, L.F., Fieser, M., 1959. 塩田三千夫, 岡田正治, 沢井政信, 後藤俊夫他訳, ステロイド(上). 丸善, 東京, pp. 126-131.
- 70) Yoshida, Y., Sakakura, Y., Aso, N., Okada, S., and Tanabe, Y., 1999. Practical and Efficient methods for sulfonylation of alcohols using Ts(Ms)Cl / Et₃N and catalytic Me₃N·HCl as combined base: promising alternative to traditional pyridine. *Tetrahedron*, 55, 2183-2192.
- 71) Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- 72) Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-257.

- 73) Carson, D.A., Ribeiro, J.M., **1993**. Apoptosis and disease. *Lancet.*, 341, 1251-1254.
- 74) Rudin, C.M., Thompson, C.B., **1997**. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.*, 48, 267-281.
- 75) Levine, A.J., **1992**. The p53 tumor suppressor gene and product. *Cancer Surveys*, 12, 59-79.
- 76) Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D., **1993**. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366, 701-704.
- 77) Tsujimoto, Y., Cossmann, J., Jaffe, E., Croce, C.M., **1985**. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228, 1440-1443.
- 78) Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J.C., **1998**. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4997-5002.
- 79) Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., **1985**. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354.
- 80) Chresta, C.M., Masters, J.R., Hickman, J.A., **1996**. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res.*, 56, 1834-1841.
- 81) Ueno, M., Nonaka, S., Yamazaki, R., Deguchi, N., Murai, M., **2002**. SN-38 induces cell cycle arrest and apoptosis in human testicular cancer. *Eur. Urol.*, 42, 390-397.
- 82) Strobel, T., Swanson, L., Korsmeyer, S., Cannistra, S.A., **1996**. Bax enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 14094-14099.
- 83) Sawa, H., Kobayashi, T., Mukai, K., Zhang, W., Shiku, H., **2000**. Bax overexpression enhances cytochrome c release from mitochondria and sensitizes KATOIII gastric cancer cells to chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Int. J. Oncol.*, 16, 745-749.
- 84) Takahashi, M., Kigawa, J., Minagawa, Y., Itamochi, H., Shimada, M., Kamazawa, S., Sato, S., Akeshima, R., Terakawa, N., **2000**. Sensitivity to paclitaxel is not related to p53-dependent apoptosis in ovarian cancer cells. *Eur. J. Cancer*, 36, 1863-1868.
- 85) Jin, G.Z., Quan, H.J., Koyanagi, J., Takeuchi, K., Miura, Y., Hagiwara, K., Komada, F., Saito, S., **2005**. 4'-O-Alkylaloeenin derivatives and their sulfates directed toward overcoming multidrug resistance in tumor cells. *Cancer Lett.*, 218, 15-20.
- 86) Umamo, K., Nakahara, K., Shoji, A., Shibamoto, T., **1999**. Aroma chemicals isolated

and identified from leaves of *Aloe arborescens* Mill. Var. *natalensis* Berger. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3702-3705.

- 87) Avila, H., Rivero, J., Herrera, F., Fraile, G., **1997**. Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from Aloe vera (*Aloe varvadásensis* Miller) gel. *Toxicol.* 35, 1423-1430.
- 88) Pecere, T., Gazzola, M.V., Mucignat, C., Parolin, C., Vecchia, F.D., Cavaggioni, A., Basso, G., Diaspro, A., Slvato, B., Carli, M., Palu, G., **2000**. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res.*, 60, 2800-2804.
- 89) Shimpo, K., Chihara, T., Beppu, H., Ida, C., Kaneko, T., Hoshino, M., Kuzuya, H., **2003**. Inhibition of azoxymethane-induced DNA adduct formation by *Aloe arborescens* var. *natalensis*. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 4, 247-251.
- 90) Ishii, Y., Tanizawa, H., Takino, Y., **1988**. Studies of Aloe. II. Mechanism of cathartic effect. *J. Pharm. Soc. Japan*, 108, 904-910.
- 91) Fujita, K., **1993**. *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger. The pharmacological and therapeutic effects I. Fujita Health Univ. Press, Toyooka, pp. 5-138.
- 92) Yagi, A., Takeo, S., **2003**. Anti-inflammatory constituents, aloesin and aloemannan in *Aloe* species and effects of tanshinon VI in *Salvia miltiorrhiza* on heart. *J. Pharm. Soc. Japan*, 123, 517-32.
- 93) Yamamoto, M., Maeda, Y., Nakazawa, H., **1995**. Biological activities of Aloes and evaluations of foods containing Aloes. *Food and Food Ingredients J. Jpn.*, 164, 22-35.
- 94) Yagi, A., Makino, K., Nishioka, I., Kuchino, Y., **1977**. Aloe mannan, polysaccharide, from *aloe arborescens* var. *natalensis*. *Plant medica*, 31, 17-20.
- 95) Shimpo, K., Ida, C., Chihara, T., Beppu, H., Kaneko, T., Kuzuya, H., **2002**. Aloe arborescens extract inhibits TPA-induced ear oedema, putrescine increase and tumour promotion in mouse skin. *Phytother. Res.*, 16, 491-493.
- 96) 竹内一浩, **2003**. キダチアロエ (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger) 成分とアルキル硫酸化アロエニン誘導体におけるヒト由来癌細胞増殖抑制作用の比較検討. 平成 15 年度修士論文.
- 97) Hayashi, K., Nakanishi, Y., Bastow, K.F., Cragg, G., Nozaki, H., Lee, K.H., **2003**. Antitumor agents 221. Buceracidins A and B, two new flavanones from *Bucida buceras*. *J. Nat. Prod.*, 66, 125-127.
- 98) Hirata, T., Suga, T., **1978**. Structure of Aloenin, a new biologically-active bitter glycoside from *Aloe arborescens* var. *natalensis*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 51, 842-849.

- 99) Hydrophobicities of derivatives in this study were calculated by ChemDraw Ultra 8.0 (CambridgeSoft, Cambridge Massachusetts, USA).
- 100) Iwasa, K., Kim, H. S., Wataya, Y., Lee, D. U., **1998**. Antimalarial activity and structure-activity relationships of protoberberine alkaloids. *Eur. J. Med. Chem.*, 33, 65-69.
- 101) 三浦義彦, **2003**. 各種癌細胞を用いた Aloenin 及び Aloe-emodin 誘導体の細胞毒性活性とそのメカニズムの解明検討. 平成 15 年度修士論文.
- 102) Saez, J., Cardona, W., Espinal, D., Blair, S., Mesa, J., Bocar, M., Jossang, A., **1998**. Five new steroids from *Solanum nudum*. *Tetrahedron*, 54, 10771-10778.
- 103) Takahira, M., Kondo, Y., Kusano, G., Nozoe, S., **1979**. Studies on the constituents of "Senshokushichikon". II. Isolation and structural elucidation of spirostane derivatives. *J. Pharm. Soc. Japan*, 99, 528-532.
- 104) Adam, G., Houg, H.Th., Lischewski, M., Khoi, N.H., **1978**. A new steroidal alkaloid from *Solanum hainanense*. *Phytochemistry*, 17, 1070-1071.

