

博士論文

フェノール性抗酸化物質を用いた環固定化反応による
新規生理活性物質の創製研究

水野 美麗

目次

略語一覧表	3
1. 緒言	4
(1-1) フェノール性抗酸化物質の薬理作用	5
(1-2) フェノール性抗酸化物質をリード化合物とした創薬研究.....	8
(1-3) 目的.....	12
2. catechin 類の環固定化反応と生物活性評価	13
(2-1) 背景.....	13
(2-2) catechin 類の環固定化反応	13
(2-3) 抗酸化活性の評価.....	15
(2-4) がん細胞増殖抑制作用の検討	19
(2-5) α -グルコシダーゼ阻害作用.....	20
(2-6) 小括.....	22
3. silibinin の環固定化反応と生物活性評価	23
(3-1) 背景.....	23
(3-2) 設計.....	23
(3-3) 合成計画	24
(3-4) 抗酸化活性の評価.....	25
(3-5) α -グルコシダーゼ阻害作用.....	28
(3-6) $A\beta$ を標的とした活性評価	30
(3-7) がん細胞増殖抑制作用の検討	35
(3-8) 小括.....	37
4. proanthocyanidin の環固定化反応と生物活性評価	38
(4-1) proanthocyanidin(PA).....	38
(4-2) 設計.....	38

(4-3) 合成計画	39
(4-4) 抗酸化活性の評価.....	42
(4-5) α -グルコシダーゼ阻害作用.....	46
(4-6) $A\beta$ を標的とした活性評価	47
(4-7) 小括.....	52
5. 結論	53
Experimental section	54
参考文献.....	62
謝辞	65

略語一覽表

A β	:amyloid beta
ACh	:acetylcholine
AChE	:acetylcholine esterase
AcOH	:acetic acid
AD	:Alzheimer's disease
BnBr	:benzyl bromide
BnCl	:benzyl chloride
CD	:circular dichroism
DCC	: <i>N,N</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCM	:dichloromethane
DDQ	:2,3-dichloro-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzoquinone
DFT	:density functional theory
DMA	: <i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMAP	:4-dimethyl aminopyridine
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMPO	:5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide
DMSO	:dimethyl sulfoxide
DPP-4	:dipeptidyl peptidase-IV
EDTA	:ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	:electrospray ionization
ESR	:electron spin resonance
EtOAc	:ethyl acetate
Et ₂ O	:diethyl ether
EtOH	:ethanol
FAB	:fast atom bombardment
HFIP	:1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HOMO	:highest occupied molecular orbital
HX	:hypoxanthine
IHB	:intramolecular hydrogen bond
IP	:ionization potential
LDL	:low-density lipoprotein
LOX-1	:lectin-like oxidized LDL receptor-1
MeOH	:methanol
mp	:melting point
MS	:mass spectrum
MTT	:3-(4, 5- dimethylthial -2 -yl)- 2, 5-diphenyltetrazolium bromide
NADPH	:nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBS	: <i>N</i> -bromosuccinimide
BuLi	:buthyl lithium
NMDA	:N-Methyl-D-aspartate
NMR	:nuclear magnetic resonance
PA	:proanthocyanidin
Pb(OAc) ₄	:lead tetraacetate
PBS	:phosphate buffered salts
PNP-G	: <i>p</i> -nitrophenyl α -D-glucopyranoside
PTX	:paclitaxel
RB	:rose bengal
ROS	:reactive oxygen species
rt	:room temperature
STS	:staurosporine
TBDMSCl	: <i>tert</i> -butyldimethylchlorosilane
TBE	:tris-borate-EDTA
TEM	:transmission electron microscope
THF	:tetrahydrofuran
Th-T	:thioflavin-T
TLC	:thin-layer chromatography
TMSOTf	:trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
PI	:propidium iodide
XO	:xanthine oxidase

1. 緒言

日本の三大死因としてがん・脳血管疾患・心疾患があげられ、これらは生活習慣病を引き金として発症することが知られている。これらをはじめとした大半の疾患には酸化ストレスの関与が明らかとなっている。健常人においても生体内でのエネルギー産生や核酸塩基の代謝過程において活性酸素種(ROS)が発生し、酸化ストレスを引き起こす。そのため、生物は生きるうえで常に酸化ストレスに暴露され傷害を受けることとなる。天然抗酸化物質は脂質過酸化におけるラジカル連鎖反応を停止し、DNAの酸化的損傷の原因となるROSを消去することで、生体内の様々な酸化ストレスを抑制する。しかしながらROSを創薬標的とした医薬品は非常に希少であり、唯一エダラボンのみが臨床で使用されている。エダラボンは、脳梗塞時の虚血再灌流によって発生したROSを消去し、細胞膜脂質酸化を抑制することで酸化的傷害を抑制する効果を示す合成抗酸化物質である。¹しかしこれは脳梗塞時の神経細胞毒性の抑制作用を示すものであって対症療法にすぎない。

catechin や resveratrol、proanthocyanidin などの天然抗酸化物質は、健康増進を目的としたサプリメントとして汎用されている。これらは高い抗酸化活性のみならず、がんやアルツハイマー病、脳血管系疾患、糖尿病、動脈硬化などROSが関与する多くの疾患に対して、予防作用や治療効果が報告されている。^{2,3,4,5}しかしながらいずれも弱い活性であることが課題となり、近年これら活性の増強を目的とした化学修飾による新規誘導体の研究が行われている。次節では、代表的な疾患に対する天然抗酸化物質の生理作用およびフェノール性抗酸化物質をリード化合物とした創薬研究の一例について述べる。

(1-1) フェノール性抗酸化物質の薬理作用

(1-1-1) 動脈硬化への有用性

動脈硬化は生活習慣病患者の大半に併発し、不可逆性の高い疾患であることが知られている。自覚症状はなく、二次的に発症した疾患により気がつくケースが圧倒的に多い。動脈硬化に対する直接的な治療薬は存在せず、日常生活を改善して発症を未然に防ぐことが最善の方法となる。近年の研究より、動脈硬化の進展には酸化 LDL と酸化 LDL(LOX-1)受容体の結合による血管内皮細胞の機能的変化が明らかとなった。⁶ LOX-1 受容体は通常健康人には発現せず、高血圧⁷ や高脂血症⁸、糖尿病⁹ などの動脈硬化を基礎疾患として罹患している患者に高発現している。¹⁰ この受容体は血管内皮細胞のみならず、マクロファージ¹¹ や血小板¹² など広い範囲で発現することが知られている。酸化 LDL が LOX-1 受容体に結合することにより、細胞内のシグナル伝達が活性化し、血管内皮細胞の機能的変化、細胞増殖、アポトーシス、炎症などを引き起こし、動脈硬化を進展させる。さらに、NADPH オキシダーゼの活性化による ROS の発生も報告されており¹³、これが LDL を酸化し、リガンドである酸化 LDL を増加させる。この生体内での連鎖的な反応によって、動脈硬化が増悪される。catechin のポリマーである proanthocyanidin (PA) は LOX-1 受容体阻害作用を有しており、重合度が高いほどその作用が強力となる。¹⁴ 抗酸化活性も重合度が高いほどその活性が増強するため、LDL の酸化抑制作用が増強する。これより重合度の高い PA は動脈硬化の進展の抑制及び予防効果が期待できる化合物となる。

(1-1-2) アルツハイマー型認知症(AD)への有用性

ADは進行性かつ難治性神経変性疾患であり、大脳萎縮、神経原線維変化、老人斑形成、NMDA受容体の活性化、ACh減少が病理学的特徴としてあげられる。老人斑の主要構成成分はアミロイドβタンパク(Aβ)であり、アミロイド前駆タンパクからセクレターゼにより様々な残基のアミノ酸鎖が切り出される。アミノ酸40, 42, 43残基が代表的であり、切り出されたAβは速やかに重合を開始し繊維化して老人斑を形成し、海馬などに沈着する。この重合の過程でROSが発生することが知られており、ROSとその凝集塊が神経細胞傷害を引き起こして症状を増悪させる。¹⁵ Aβはタウタンパクリン酸化の促進作用を有し、過剰リン酸化タウの蓄積による神経原線維変化を起こす。病態が非常に複雑であることから、未だ根治治療が期待できる画期的治療法は見出されておらず、薬物治療に関してはNMDA受容体拮抗薬及びAChE阻害薬の投与による症状進行の遅延にとどまる。近年、多くの研究者が新規AD治療薬の開発に着手しており、一部の天然抗酸化物質はADの治療効果に期待できることが報告されている。¹⁶

Freyssin Aらの報告によると、Figure 1に示したようにポリフェノールにはAβの重合阻害や脱凝集促進作用を示す化合物が多く存在する。¹⁷ catechinやcurcuminは重合と脱凝集の両方を阻害する作用を併せ持っている。これら化合物を、よりAβとの親和性が高まるような構造修飾をすることで、さらに強力な活性が期待できる。

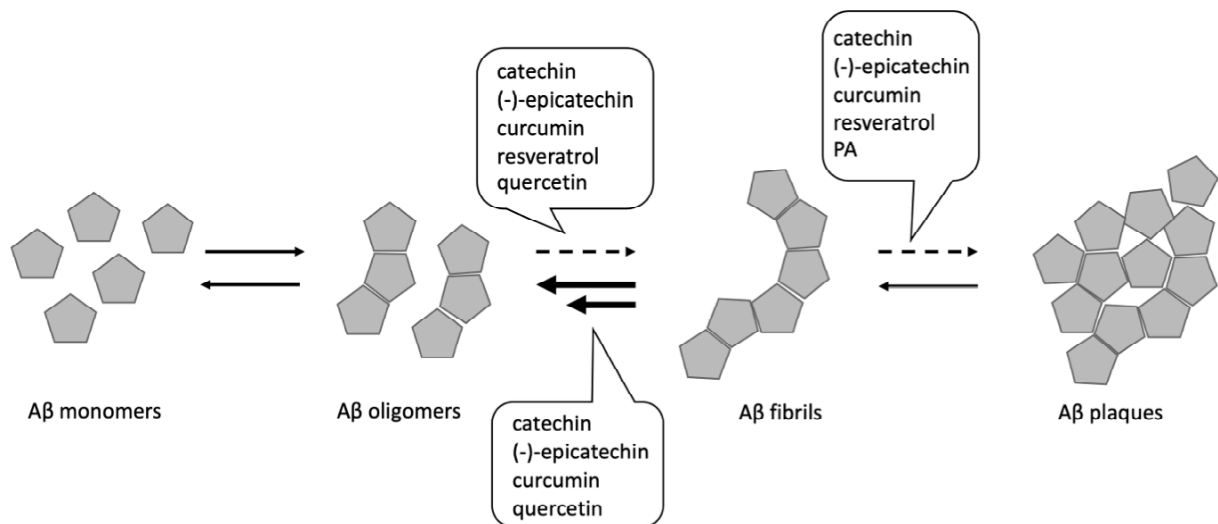


Figure 1. Aβ凝集阻害・脱凝集阻害作用を有する天然抗酸化物質

(1-1-3) がん治療への有用性

悪性腫瘍は、日本国内で死因1位の疾患であり若年期にも発症することが知られている。がんは、がん遺伝子の増幅・転座・突然変異や、がん抑制遺伝子の不活性化などの変化が重なることで悪性化する「多段階発がん」が特徴となる。この多段階的变化によって、正常細胞が過形成し、異型性とたどってがん化する。シスプラチンやイリノテカンをはじめとした抗がん剤は、その有効性の高さより様々ながんに対する治療薬として汎用されている。がん細胞への作用は強力である一方、標的部位のみならず正常細胞へも作用することによって重度な副作用を発現することが問題となる。

天然物ががん細胞に対して作用を示す化合物は多く存在する。植物中に含まれるポリフェノールは、その単独もしくは複数成分の相乗効果によって、アポトーシス誘導作用など、がん細胞への作用を示すことが報告されている。¹⁸ アーユルヴェーダ療法において古くから用いられている curcumin は、がん細胞の転写因子やプロテインキナーゼ、発がん遺伝子など複数のターゲットに対して作用する。¹⁹ 茶葉などに豊富に含有し日本人に馴染みのある catechin 類は、細胞増殖と血管新生の抑制、アポトーシスの促進作用を示す。²⁰ さらに silibinin や冬虫夏草は、細胞周期へ作用することが明らかとなっており、silibinin は G1 期、冬虫夏草中の成分である cordycepin は G2/M 期を停止することが報告された。^{21, 22} 抗酸化物質は元来生体への安全性が高いことより、がん細胞への選択性を高めることに成功すれば非常に優れたリード化合物になり得ると考えられる。

(1-1-4) 糖尿病治療への有用性

糖尿病は、インスリン作用の絶対的あるいは相対的不足によりおこる慢性の高血糖を主徴として、種々の代謝異常をきたす疾患である。糖尿病では糖代謝異常による高血糖が最大の特徴であり、自覚症状がない。しかし長期にわたる高血糖状態により、細小血管障害による網膜症、腎障害、末梢神経障害を併発する。主に1型・2型糖尿病に分類され、2型糖尿病は全糖尿病患者の95%以上を占める。これはインスリン分泌低下やインスリン抵抗性を起こす複数の遺伝的要因に、過食や運動不足、肥満、ストレスなどの環境因子や加齢などの因子が加わることにより発症する。スルホニルウレア薬や α -グルコシダーゼ阻害薬、DPP-4阻害薬など、様々な薬理作用を標的とした医薬品が使用されている。

ポリフェノールは、組織内へのグルコースの取り込み能促進やインスリン抵抗性改善作用を有し、グリセミアや2型糖尿病に効果を示すことが報告されている。特にフラバン-3-オールを持つ骨格は、インスリン抵抗性の改善作用を示す。²³ ポリフェノールをリード化合物とした創薬は、安全性が高く副作用が少ないことが期待される。

(1-2) フェノール性抗酸化物質をリード化合物とした創薬研究

前述のように天然抗酸化物質は多様な生理作用が見出されているが、各種疾患に対する予防や治療目的で使用するためには各活性が決して高くはないことが課題となっている。近年、各種活性の増強を目的とし天然抗酸化物質の一部を構造修飾した新規誘導体の創薬研究が行われている。その研究の一例として catechin 類があげられる。代表的な catechin 類として、(+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate が知られている。これらはフラバン-3-オールを共通の骨格として有しており、芳香環部位のヒドロキシ基が種々の活性に寄与している。catechin 類の C8 位は求核反応が起こりやすく、C4 位は脱離基を導入することで求核反応を受けやすくなるため、これらの位置への置換基導入が可能となる (Figure 2)。

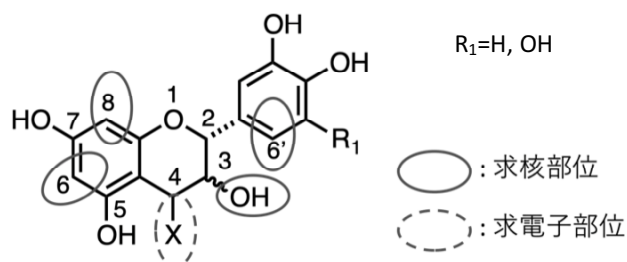


Figure 2. catechin 類の反応性

Park らは、(+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin のフェノール性ヒドロキシ基をベンジルブロミドを用いて保護し、3 位ヒドロキシ基への反応選択性を高めて様々なアルキルハライドを反応させ、脱保護反応を行った (Figure 3)。その結果、3 位ヒドロキシ基部分に様々な長さのアルキル基やベンジル基を導入することに成功した。²⁴ (+)-catechin の 3-OH 誘導体は、アルキル基を導入することでグラム陽性菌や真菌に対して強力な抗菌作用を有するようになり、側鎖が延長されるとその効果が増強することが明らかとなった。また、(-)-epicatechin の 3-OH 誘導体はがん細胞に対して強い増殖阻害作用を示し、同様に導入された側鎖の長さに依存することがわかった。

さらに、(+)-catechin の 3-OH 誘導体および(-)-epigallocatechin 3-OH 誘導体について、A/シドニー (H3N2)型ウイルスに対する増殖阻害活性を MDCK 細胞に感作させ、その抗ウイルス活性を評価した。²⁵ その結果これらに抗ウイルス活性を示し、C10 デシル基を有するものが最も強力であった。また、発育鶏卵中における鳥インフルエンザの増殖速度は、オセルタミビルやアマンタジンと比べて非常に強力に抑制した。これら誘導体は、感染初期にウイルス膜上のヘマグルチニンに作用することで物理化学的性質が変化し、ヘマグルチニンと宿主細胞のエンドソーム膜との融合性が低下したことによると考えられる。

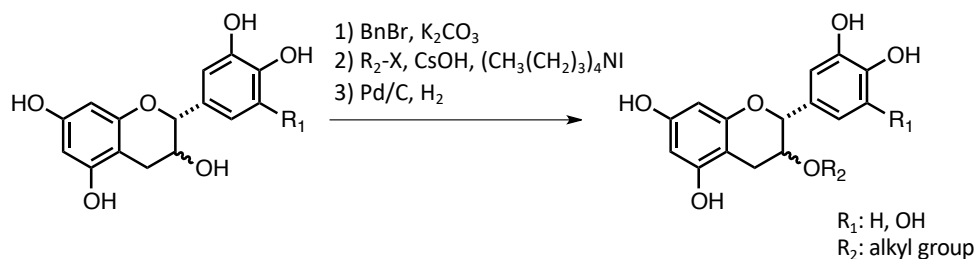
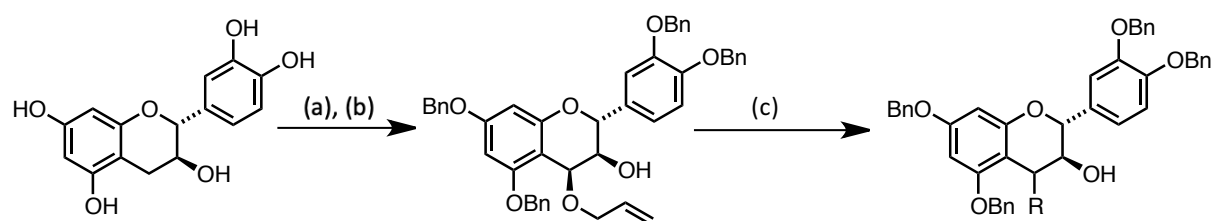


Figure 3. 3-OH 誘導体の合成方法

Hayes らはフェノール性ヒドロキシ基を保護した(+)-catechin にアリルアルコール存在下、DDQ 酸化により相対配置が β の C4-*O*-allyl catechin を高収率で得た。²⁶ これをさらに Lewis 酸存在下求核試薬との置換反応によって、C4 位に様々な置換基を導入することに成功した(Figure 4)。この反応は、求核試薬の種類によって立体選択性が大きく異なり、求核試薬が非芳香族性の場合には C4- β 型の生成物が、芳香族性の場合には C4- α 型の生成物が得られることが明らかとなった。



- (a) NaH, BnCl/ DMF
- (b) allyl alcohol, DDQ/ DCM
- (c) Reagent (nucleophile)/ $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, DCM

Figure 4. C4 誘導体の合成方法

Basak らは(+)-catechin と(-)-epicatechin の 4 位にレゾルシノール及びフロログルシノールを導入した化合物を合成した。²⁷ これらは catechin 類のフェノール性ヒドロキシ基を保護し、その 4 位を Pb(OAc)₄ を用いてアセトキシ化後、LiBr を用いたカップリング反応によってレゾルシノール及びフロログルシノールを導入し、脱保護反応を行うことで合成できた(Figure 5)。これらは血管新生を強力に抑制し、アンジオゲニンをターゲットとしていることが明らかとなった。また血管新生作用の発現に必要な RNase へ強い親和性を示し、(+)-catechin や(-)-epicatechin と比べて強力な阻害活性を示すことがわかった。消化器がんにはアンジオゲニンが多く発現していることより、新たなターゲットとした抗がん薬が期待される。

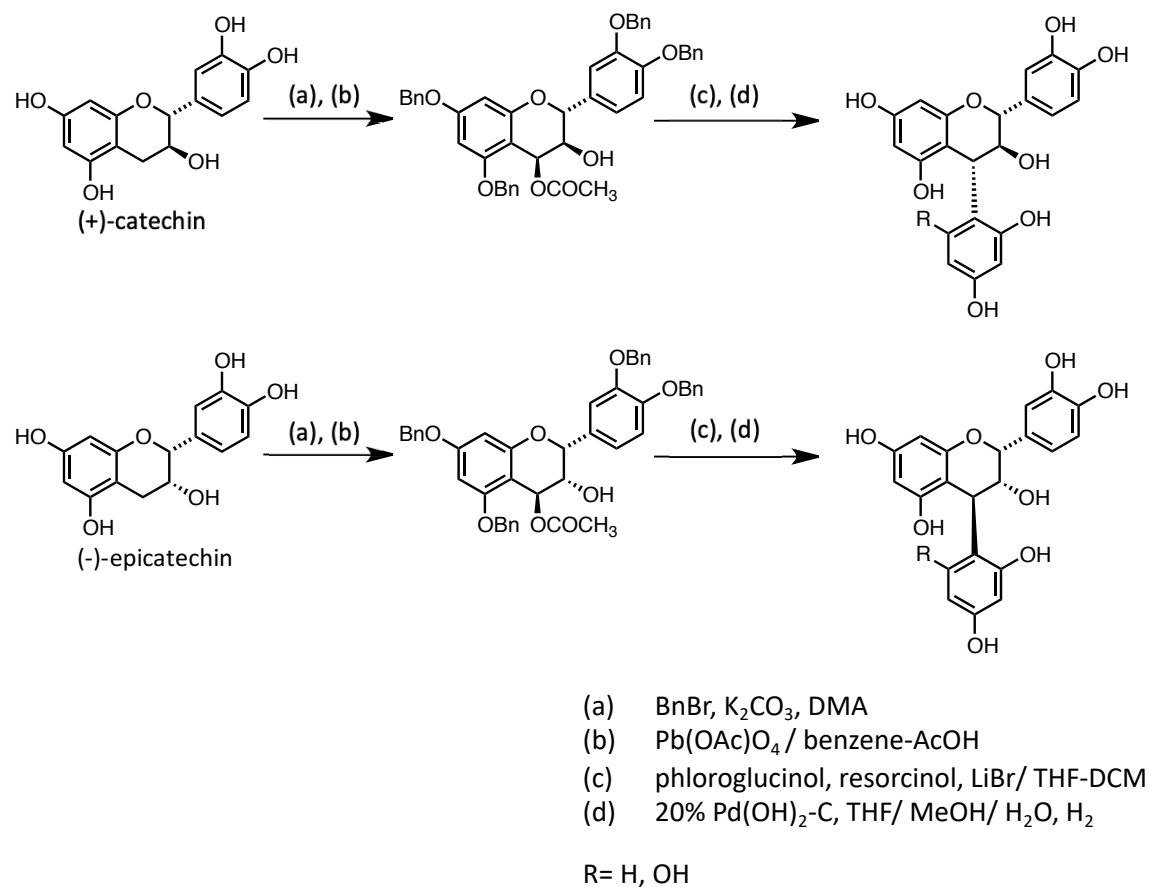


Figure 5. C4 位へのフェノールの導入方法

catechin 類の C8 位は求核性が高く、この反応性を利用した誘導体やカテキンオリゴマーの合成が報告されている。²⁸ Figure 6 に示すように、(+)-catechin に NBS を反応させて C8 位を選択的に臭素化した後、n-BuLi を用いたハロゲン-リチウム交換反応によってリチオ化を行うことで、ハロゲン化アルキルへの求核反応が進行して C8 位にアルキル基を導入することに成功した。Hayes らは本方法によって合成した C8-プロピルカテキンガレートが、天然のカテキンガレートやそのエピ体と比較して強力ながん細胞増殖阻害効果を示すことを明らかとした。²⁶

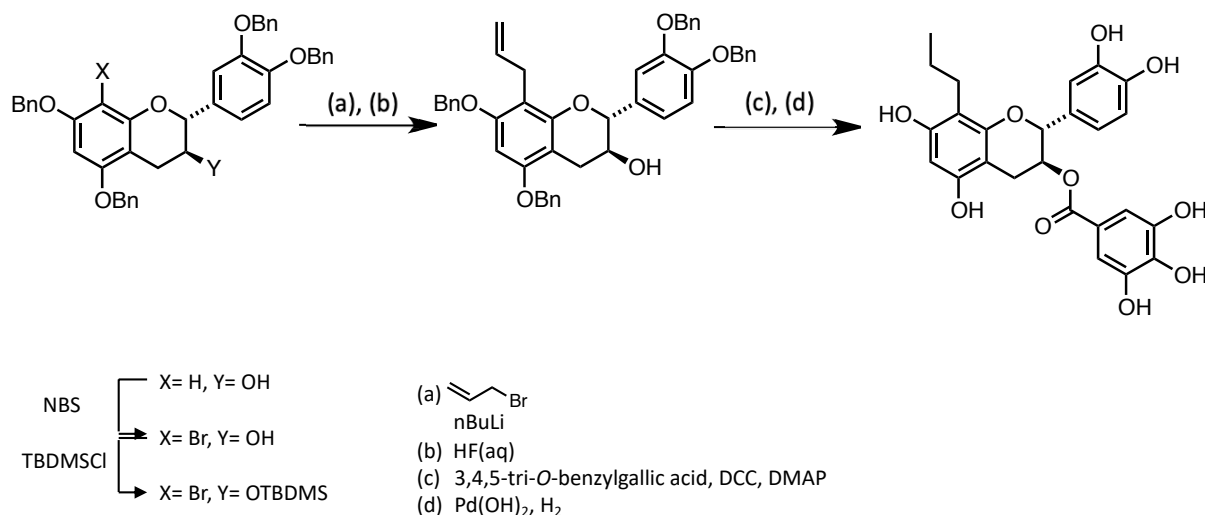


Figure 6. C8 誘導体の合成方法

次に(+)-catechin にメチルメルカプタン存在下、アルキルアルデヒドを反応させると C6 位と C8 位がアルデヒドに求核付加した後、生成するアルコールとチオールとの置換反応が進行して、チオエーテルが導入された誘導体を得られた(Figure 7)。

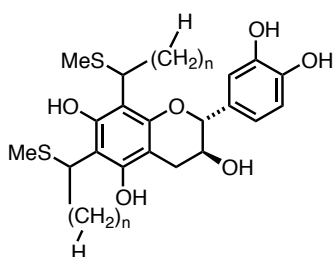


Figure 7. チオエーテル付加体の構造式 (n=0~9)

Nakayama らは様々な長さのアルキルアルデヒドを用いて本反応を行い、(+)-catechin の二箇所にチオエーテルを導入した誘導体を合成した。²⁹ アルキル側鎖が延長されてることで膜への透過性が向上し、グラム陽性菌に対する抗菌活性が増強した。特に C4-C7 の長さのアルキル基を導入した誘導体は、非常に強い抗菌活性を示すことが明らかとなった。

(1-3) 目的

catechin などのフラボノイド系抗酸化物質は分子内に複数のフェノール性ヒドロキシ基を有しており、それらの立体構造に基づいた生体分子との芳香環相互作用や水素結合によって様々な生物作用を発現する。これらの多くは、安全性が高く既に機能性物質として利用されていることから、創薬化学の分野では医薬品への展開を期待して様々な構造展開が行われている。前述の通り、これまでに報告されているフラボノイド系抗酸化物質の生物活性増強を目指した構造修飾法は、アルキル基などの置換基導入による catechin 類の吸収効率の向上や生体分子への親和性の増強を目指したものであり、化合物とレセプターなどの生体分子との相互作用に着目した立体構造の制御に関する報告はない。創薬において化合物の構造固定化は有用な手法であり、例えばアンギオテンシン変換酵素阻害剤であるエナラプリルの腎毒性を軽減させる目的で、分子内のアミド構造をベンゼン環を有する環状アミドで固定化したベナゼプリルが開発されている。フラボノイド骨格を有する天然抗酸化物質は、分子内に自由回転できる C-C 単結合を有しているため、受容体や標的分子と結合する際には誘導適合を起こすことが考えられる。したがってフラボノイド系抗酸化物質の分子内の環を固定化することで安定性を増加させることができれば、エントロピーの損失が少なくなり、誘導適合による活性よりも標的部位との親和性が向上して各種活性の増強が期待される。また、catechin などのフラボノイド系抗酸化物質は ROS や生体内で発生するラジカルを還元して消去するが、環固定化で還元力を増加させることができればさらに強力な抗酸化活性を有することが可能となる。

本研究ではフェノール性抗酸化物質の立体構造制御による生物活性の増強を目的として、分子内環固定化反応を開発し、本反応を用いて立体構造の固定化による分子内自由回転を制御した新規誘導体の創製を試みた。

2. catechin 類の環固定化反応と生物活性評価

(2-1) 背景

catechin 類は茶葉などに多く含有される成分であり、抗酸化作用³⁰や抗腫瘍作用²⁰、血糖上昇抑制作用³¹をはじめとした多くの生理作用が報告されている。その高い生理活性が着目されているが、医薬品への実用化を考慮すると十分な生理活性が認められないことが課題としてあげられる。catechin 類は、AC 環に対して B 環は自由回転が容易であることより、我々は catechin 類の分子内の自由回転を制御することで標的部位への親和性が向上し、活性が増強することを期待した(Figure 8)。本研究では分子内を環固定化することによる自由回転の制御を試みた。

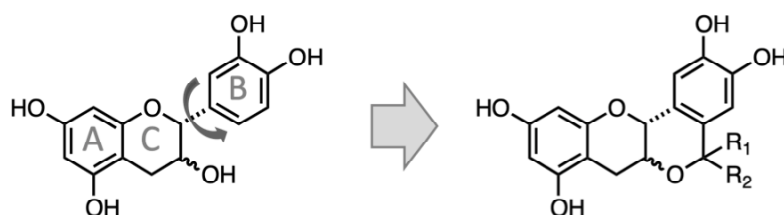


Figure 8. catechin 類の分子内自由回転の制御

(2-2) catechin 類の環固定化反応

oxa-Pictet-Spengler 反応は β -アリールエチルアルコールとケトンを縮合させ閉環させる反応である。(+)catechin(Cat)は C 環のヒドロキシ基と B 環が β -アリールエチルアルコールの構造をとっていることから、oxa-Pictet-Spengler 反応を応用することで Cat の立体構造の固定化が可能と考え、様々な条件を検討した。その結果、acetone 溶媒中で三フッ化ホウ素ジエチルエーテル溶液($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$)を添加することで、Cat を acetone で縮合させ閉環させることができた。本反応では、Lewis 酸によって活性化された acetone に C 環のアルコールが求核付加した後、B 環への分子内 Friedel-Crafts 型の付加反応が進行して、立体構造が平面に固定化された新規誘導体 (planar catechin: PCat, **1**) が 76% の収率で得られた(Figure 9)。

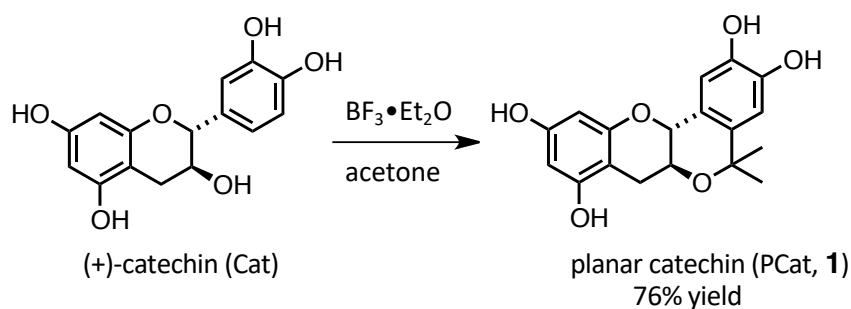


Figure 9. (+)-catechin の環固定化反応

しかし、この方法では環固定化の際に導入されるアルキル側鎖がメチル基に限定される。さらなる脂溶性の増強を目指してより長いアルキル側鎖を導入した環固定化体を合成するために、様々なケトンが導入できる条件を検討した。その結果、catechin 類を THF に溶解し、任意のケトンと TMSOTf を添加することで、様々なアルキル側鎖が導入された誘導体の合成に成功した。本反応を用いて、Cat および(-)-epicatechin (EC)を出発物質として分子内の環固定化反応を行った。その結果、Cat の環固定化体(PCat, **1**)は 92%、EC の環固定化体(PEC, **2**)は 78%の収率で合成することができた(Figure 10)。

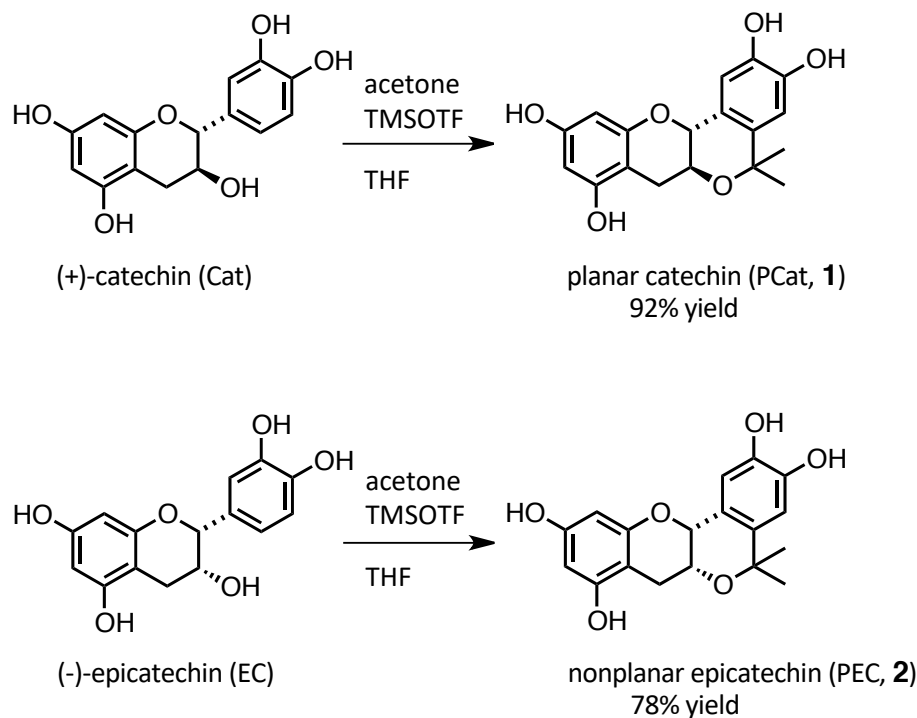


Figure 10. catechin 類の環固定化反応

得られた化合物の立体構造を明らかにすべく、DFT 法(B3LYP, 6-31G*)を用いて最安定化構造及び Gibbs エネルギー(ΔG)を算出した。その結果、Cat に対し PCat(**1**)は分子全体の平面性が非常に高く、一方 PEC(**2**)は分子全体が折れ曲がったような構造に固定化されていることが明らかとなった (Figure 11)。

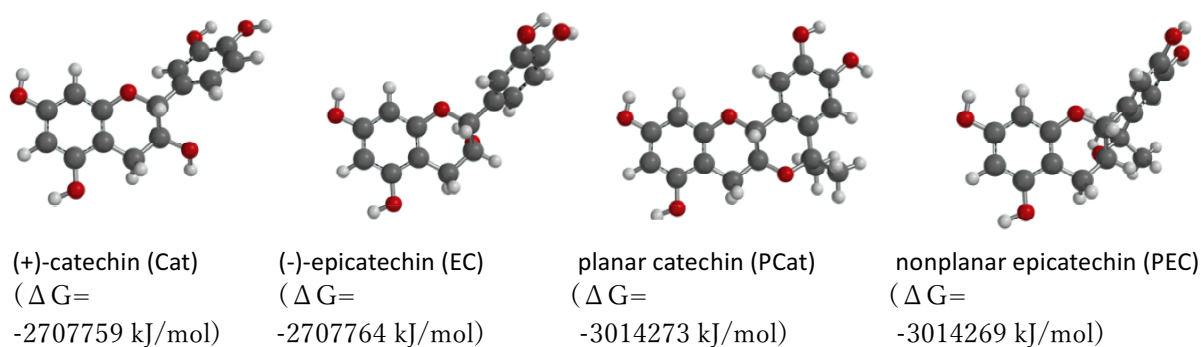


Figure 11. catechin 類とその誘導体の最安定化構造

(2-3) 抗酸化活性の評価

(2-3-1) ラジカル消去反応速度の算出

活性酸素種のモデル化合物として知られているガルビノキシルラジカル(GO•)は 428nm に極大吸収を示し、抗酸化物質など還元物質が共存すると GO• が還元されて吸収が消失する。本実験では、試験化合物と GO•との反応についてストップフロー分光測定装置を用いて 428nm の吸収の減少を測定した。この吸収の減少について速度論的解析を行い、試験化合物のラジカル消去反応速度定数 (K_{HT}) を求めた(Figure 12)。その結果、Cat の K_{HT} は $26 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ に対し、PCat(1)の K_{HT} は約 6 倍($K_{HT}=150 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)、EC は $K_{HT}=143 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ に対して PEC(2)は約 4 倍($K_{HT}=590 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)ラジカル消去反応速度が増大することが明らかとなった(Table 1)。

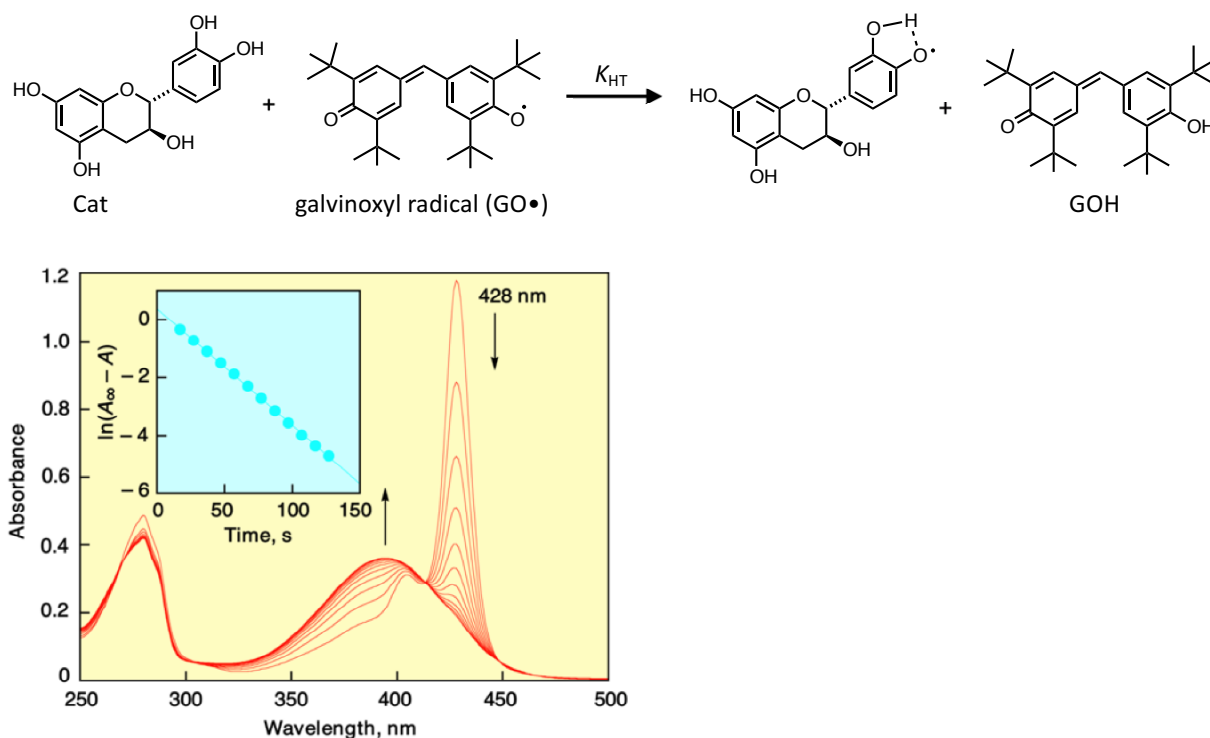


Figure 12. catechin 類とその誘導体のラジカル消去反応速度の解析

	Cat	PCat	EC	PEC
$K_{HT} (\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$	26	150	143	590

Table 1. ラジカル消去反応速度定数 (Cat, EC, PCat(1), PEC(2))

(2-3-2) Electron Spin Resonance を用いた・OH の検出 (ESR スピントラップ法)

生体内のエネルギー代謝の過程において、細胞内で過酸化水素が発生する。これはカタラーゼによる不均化反応により酸素と水に分解されるが、鉄イオンによる Fenton 反応によりヒドロキシラジカル(・OH)を産生し、細胞を傷害することが知られている。本実験では、Fenton 反応により発生した・OH に対する Cat, PCat(1)の・OH 消去活性を検討した。・OH は非常に酸化力が強いため、・OH 単体では非常に不安定となり検出が困難である。そこで・OH をスピントラップ剤である DMPO を用い、安定ラジカル(DMPO-OH)の生成・検出を行った。ESR では Mn^{2+} マーカーの 6 本の微細分裂のうち 3 本目と 4 本目のシグナルの間に DMPO-OH 特有のピークが観測される。各反応開始後 5 分、10 分後を測定し、Mn マーカーに対する DMPO-OH による 1 本目のピークの高さの割合を算出し、・OH 消去活性を検討した。その結果、開始後 10 分に PCat(1)は約 20%程度 ・OH の発生を抑えることが明らかとなった。(Figure 13, Table 2)



Figure 13. ESR スペクトル

	average (n=3)	・OH 産生率(%)	・OH 消去率(%)
Fenton reaction 5min	0.11	100	-
+Cat 5min	0.16	>100	-
+PCat 5min	0.12	>100	-
Fenton reaction 10min	0.16	100	-
+Cat 10min	0.16	96	4
+PCat 10min	0.13	80	20

Table2. ESR 測定結果

【1 番目のピーク全長/Mn マーカー全長】によって得られた値(3 回分の測定結果)を平均し算出

(2-3-3) •OH による DNA 酸化的傷害に対する各化合物の抑制作用

•OH の発生は、前述の通り生体内でのエネルギー代謝の過程で発生した過酸化水素に起因するが、ヌクレオチドの分解過程で生じたスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)に由来する場合も知られている。ヒポキサンチン(HX)から尿酸への代謝はキサンチンオキシダーゼ(XO)が関与し、空気中の酸素分子を O_2 へ還元する。発生した $O_2^{\cdot-}$ は非常に不安定であり、生体内の Fe^{2+} により速やかに•OH に変化し DNA に酸化的損傷を与える。

本実験では酸素分子の HX による還元と、つづく Fenton 反応で発生した•OH による DNA 切断の実験系を構築した。実験に使用した DNA は、アガロース電気泳動法において汎用される *E. coli* 由来 pBR322 DNA を選択した。Cat および PCat(1) 50, 200 μ M を添加しその抑制効果を検討したところ、いずれの化合物も濃度依存的に DNA 切断を抑制したが化合物間での差は認められなかった(Figure 14)。

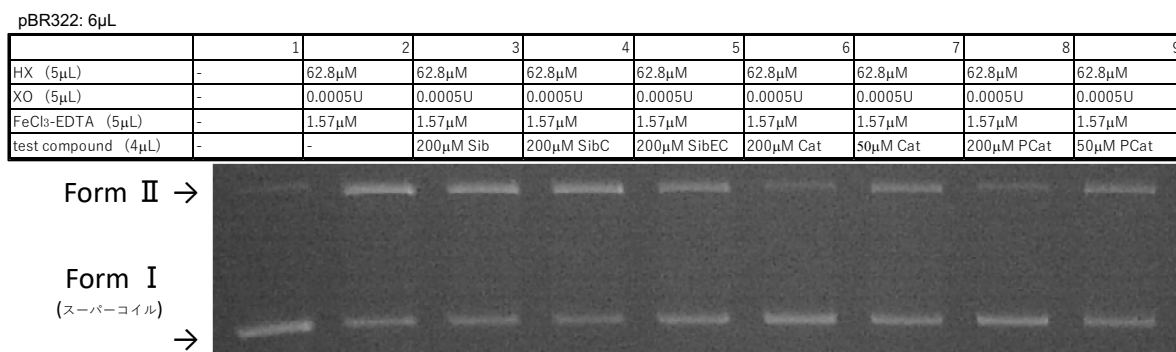


Figure 14. アガロースゲル電気泳動法による•OH での DNA 切断抑制作用の解析

(2-3-4) 一重項酸素による DNA 酸化的傷害に対する各化合物の抑制作用

生体内で発生した過酸化水素は、好中球中のミエロペルオキシターゼにより一重項酸素(1O_2)を発生することが知られている。本実験では、有機光増感剤であるローズベンガル(RB)で発生させた 1O_2 による DNA 酸化的損傷に対する各化合物の抑制作用を検討した。Cat および PCat(1) を 25, 250 μ M と添加しその抑制効果を検討したところ、いずれの化合物も抑制作用は認められなかった(Figure 15)。

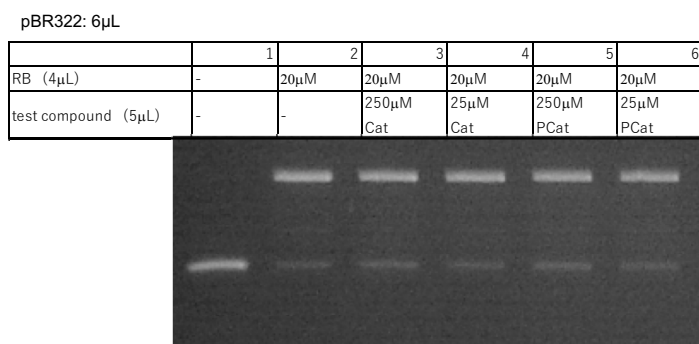


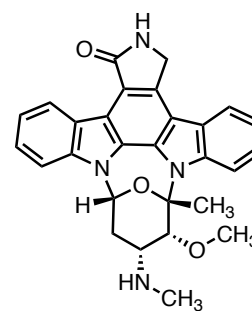
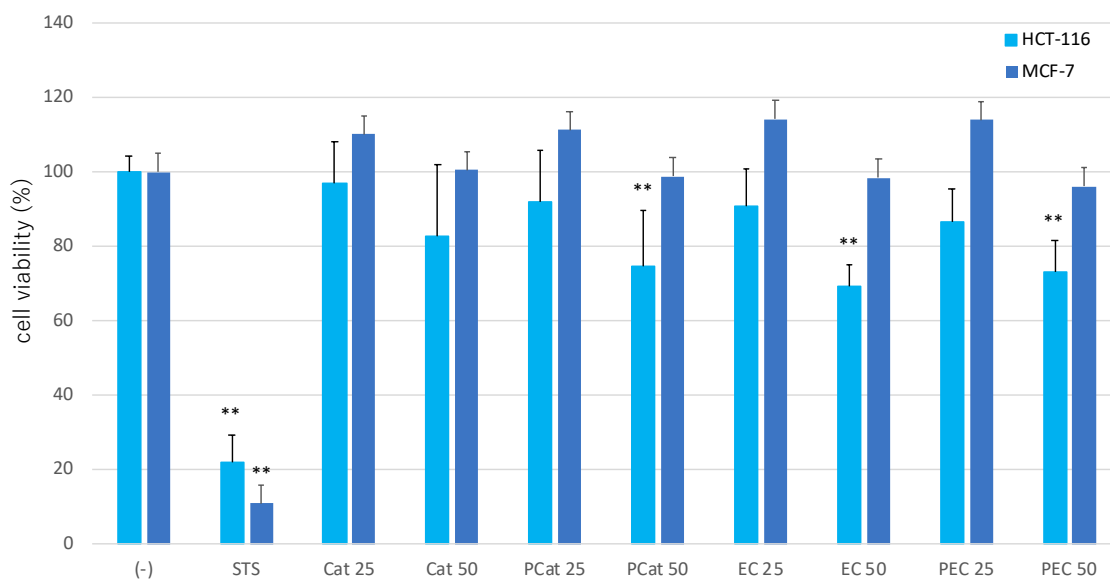
Figure 15. アガロースゲル電気泳動法による 1O_2 での DNA 切断抑制作用の解析

ラジカル消去反応速度定数および ESR の結果から、分子内環固定化により抗酸化活性が大幅に増強することが明らかとなった。これは環固定化の際に導入されたアルキル側鎖により、カテコール部位の電子密度が増強したことが考えられる。PCat(**1**)および PEC(**2**)の活性の差については、当初カテキンラジカルの超共役作用によって平面性の高い PCat(**1**)の方が抗酸化活性が増強すると予想した。しかし分子全体の平面性が乏しい PEC(**2**)に強い抗酸化活性が認められたことにより、別の作用機序が予測される。 $\cdot\text{OH}$ による DNA 切断抑制作用は、化合物間の差異は見られなかったものの、抗酸化作用により $\cdot\text{OH}$ が消去され DNA 切断が抑制されたことが考えられる。

$^1\text{O}_2$ 消去作用の機序として、物理的消去と化学的消去が挙げられる。物理的消去は、 $^1\text{O}_2$ がその励起エネルギーを消去剤に移すことにより基底状態に戻ることであり、カロテノイドがその一例である。³² 化学的消去は、消去剤への酸素化反応が関与しておりモノエンの Ene 反応か *cis*-1,3-diene への 1,4-付加反応が知られている。³³ 本実験で使用した化合物はこれらの構造を有していないことから、消去作用が見られなかったことが推測される。

(2-4) がん細胞増殖抑制作用の検討

DNA インターカレーター作用を示すエチジウムブロミドや、トポイソメラーゼ阻害作用を有するイリノテカン分子全体の平面性が高いことが知られている。立体構造と抗腫瘍活性の相関は明らかとなっていないが、分子全体の平面性が高い抗がん剤が少なくないことより、何らかの相関が示唆される。catechin 類はがん細胞増殖抑制作用を有するが、その作用は決して強力ではない。そこで環固定化反応により、増殖抑制作用が増強するかを検討した。本実験では、ヒト乳がんである MCF-7 とヒト結腸がんである HCT116 を用い、Cat, PCat(1), EC, PEC(2) を各 25, 50 μ M を添加して 48 時間後の生存率を測定した。なお、ポジティブコントロールとしてアルカロイドの一種で強力なプロテインキナーゼ C 阻害作用を有するスタウロスポリン(STS)を用いた。その結果、HCT116 において、いずれも 50 μ M を添加することで弱いながらも細胞増殖抑制作用が観察された。Cat に対して PCat(1) は増殖抑制作用が観察されたものの、PEC(2) は活性に差異が見られなかった。これより分子全体の平面性が細胞増殖抑制作用と相関があることが考えられる (Figure 16)。



staurosporine (STS)

Figure 16. catechin 誘導体のがん細胞増殖抑制作用

(2-5) α -グルコシダーゼ阻害作用

catechin や silibinin など一部のポリフェノールには血糖上昇抑制作用が報告されている。Fatmah A. Alasmary らのグループは、catechin 類と類似した構造を有する quercetin と α -グルコシダーゼをドッキングスタディにより、活性中心と化合物との相互作用を検討した。³⁴ その結果、quercetin とアミノ酸残基の芳香環同士のスタッキング作用 (Trp432)、ヒドロキシ基との水素結合 (Asp568, His626, Asp357) と疎水性相互作用 (Phe601, Trp329) が酵素の活性中心に作用していることを明らかとした (Figure 17)。quercetin は B 環と AC 環が共鳴しているため分子全体の平面性が高い。我々は酵素の活性中心への作用は、quercetin 程度の分子サイズと平面性の高さが重要であると考え、同様のフラボノイドである catechin 類についても、平面に固定化することで、酵素の活性中心に作用して活性が増強すると考えた。本研究では環固定化反応により分子全体の平面性を増強させたため、特に PCat(**1**)において α -グルコシダーゼへの親和性が増強することが期待される。

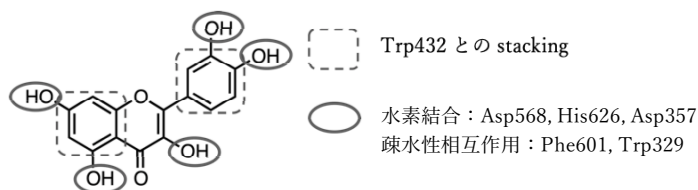


Figure 17. quercetin の α -グルコシダーゼへの相互作用 ³⁴

基質として *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (PNP-G)、酵素は酵母由来の α -グルコシダーゼを使用し、Cat, PCat(**1**), EC, PEC(**2**)の阻害作用を測定・IC₅₀値の算出を行った。その結果、Cat, EC どちらも 100 μ M 以上でない阻害活性を示さないことに対し、環固定化することで阻害活性を増強することに成功した。しかし、平面性の乏しい PEC(**2**)においても阻害活性が増強する結果となった (Table 3)。

	Cat	PCat	EC	PEC	Acarbose
IC ₅₀ (μ M)	>100	73.1	>100	54.1	<1.0

Table3. 各化合物が有する α -グルコシダーゼ阻害活性(IC₅₀値)

そこでこれら化合物の α -グルコシダーゼ阻害作用と立体構造の相関を検討すべく、各化合物の最安定化構造をDFT法(B3LYP, 6-31G*)により算出した。本実験で使用した基質であるPNP-Gは1位の酸素原子とニトロ基が同一平面上に存在する。同様にPCat(1)も1位の酸素原子と3'位のヒドロキシ基が同一平面上に存在することが明らかとなった。一方、Catについては同一平面上に存在せず、ねじれた配置をとる。これらの結果より、PCat(1)はPNP-Gと同様に分子全体の平面性が高いことにより α -グルコシダーゼ阻害活性が増強したことが推測される。ECとPEC(2)についても同様の結果が得られた。catechin誘導体については、1位の酸素原子と3'位のヒドロキシ基の位置関係が重要であることが示唆される(Figure 18)。

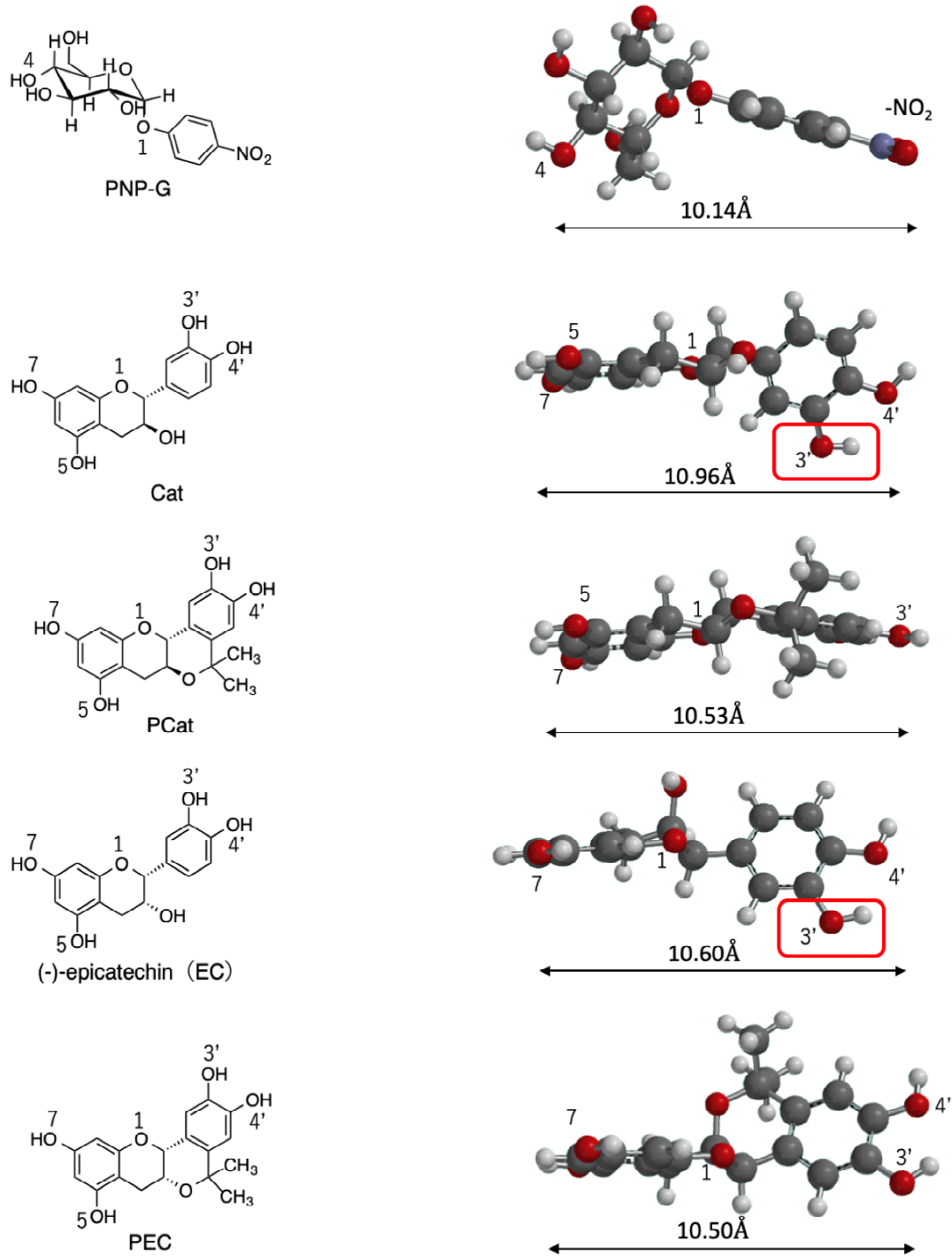


Figure 18. 各化合物の最安定化構造

(2-6) 小括

本節では catechin 類の分子内自由回転を制御することにより、各種生理活性が増強することを期待して環固定化反応を試みた。(+)catechin および(-)epicatechin において、良好な収率で環固定化体 PCat(1), PEC(2)が得られた。これらの各種活性を評価した結果、抗酸化活性と α -グルコシダーゼ阻害活性が増強した。抗酸化活性の増強については、環固定化反応の際に導入されたアルキル側鎖による電子供与能の増強によるものだと考えられる。 α -グルコシダーゼ阻害活性は、フェノール性抗酸化物質が活性中心に相互作用して親和性が向上して阻害活性を示すことが考えられる。立体構造を固定化することで、PCat(1)と PEC(2)の芳香環とヒドロキシ基が活性中心への結合にさらに適切に位置して親和性が増強し、強力な阻害活性を示したと推察される。これらの結果から分子内を環固定化することへの有用性を見出し、他の天然抗酸化物質への応用に意義あることが示唆される。

3. silibinin の環固定化反応と生物活性評価

(3-1) 背景

マリアアザミはキク科の植物で、南ヨーロッパや北アフリカ、アジアなど広い地域に生息する。この種子から抽出されるフラボノイドとして、silibinin (Sib), silybin, silydianin, silychristin などあげられており、これらは肝細胞保護作用、肝機能改善作用、抗がん作用、糖尿病改善作用、抗炎症作用など多様な作用が報告されている。米国では肝機能改善効果を謳ったサプリメントとして汎用されている。また、AD の原因タンパクである $A\beta$ の凝集阻害作用³⁵や $A\beta$ 誘引性記憶障害、ROS による傷害の改善作用なども報告されている。³⁶ 興味深いことに Lei Xiang Yang らの報告によると³⁷、Sib の最安定化構造は分子全体の平面性が非常に高く、この平面性と $A\beta$ 凝集阻害作用に何らかの相関を有することが示唆されている。さらに Sib は血液脳関門を通過することから³⁵、幅広い疾患をターゲットにすることが可能である。したがって Sib 分子内の自由回転を制御することにより、各種活性の増強及び脂溶性の増強が期待される。

(3-2) 設計

本研究では、Sib の分子内自由回転の制御による生物活性の増強を目的として、Sib のフラバン骨格を前節で合成した PCat(1), PEC(2)に置換した SibC(5), SibEC(6)を設計した(Figure 19)。catechin 誘導体および Sib の有する作用の相乗効果を期待し、また立体構造の差異についても検討すべく新規誘導体の合成・生物活性の評価を行った。

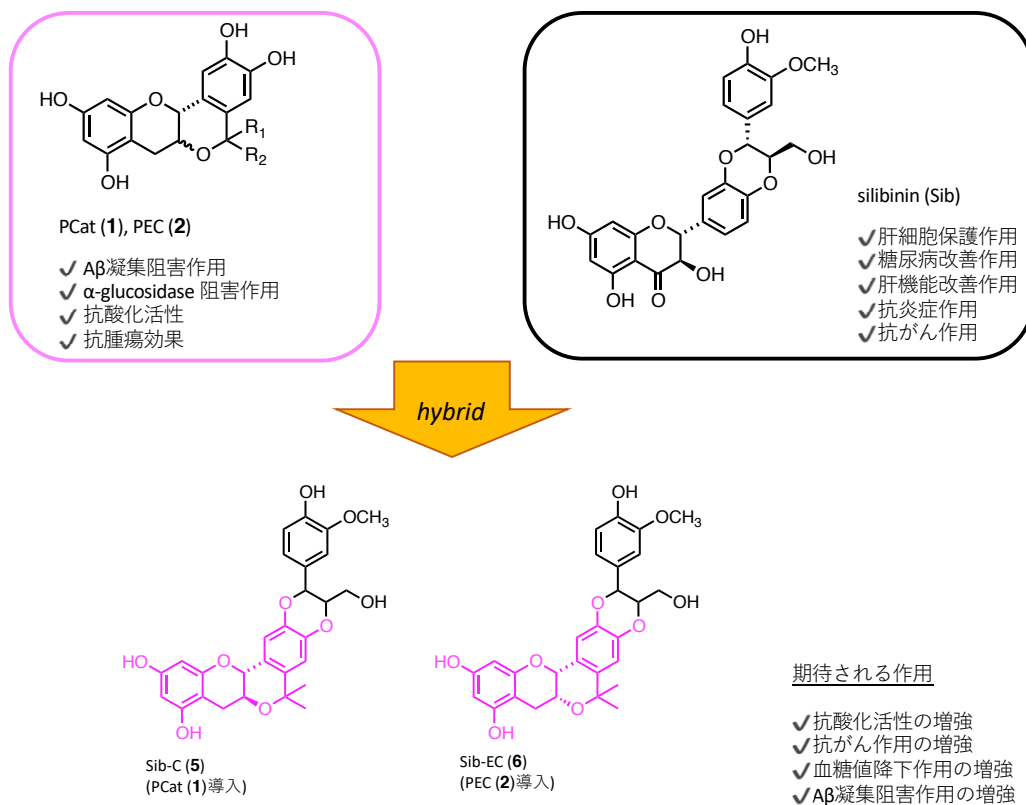


Figure 19. Sib 誘導体の設計

(3-3) 合成計画

vanillin を出発物質として、Wittig 反応によりエステル構造を有する側鎖を導入し、続く水素化アルミニウムリチウムを用いた還元反応によりアルコール体に変換した。³⁷ これに PCat(1) を炭酸銀を用いた酸化的カップリング反応によって縮合させ、SibC(5) を合成した。SibEC(6) も同様の方法で合成に成功した (Figure 20)。酸化的カップリングの反応機構³⁸ より、syn 付加体の SibC(5) および SibEC(6) が得られたと推測される (Figure 21)。どちらも syn 付加体は E 環とヒドロキシメチル基の立体配置が (S, R) と (R, S) の混合物であり、そのうちの主生成物を単離することに成功した。

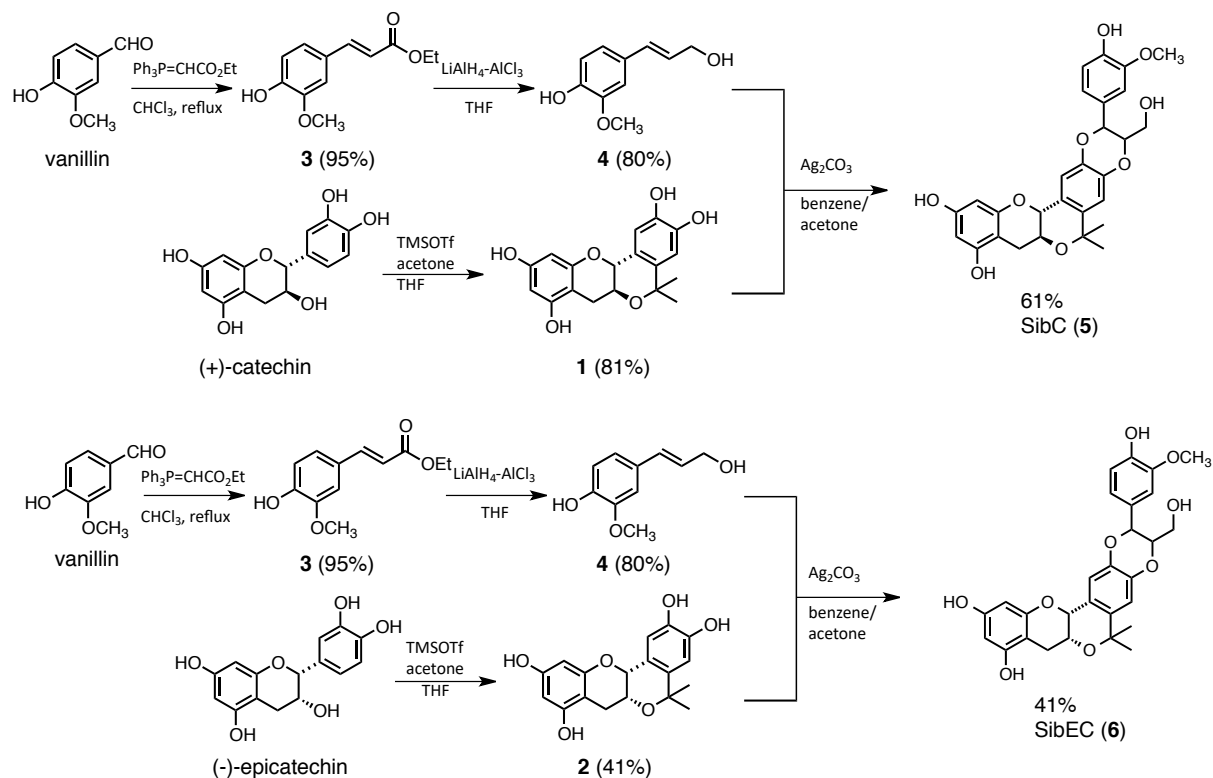


Figure 20. SibC(5), SibEC(6) の合成スキーム

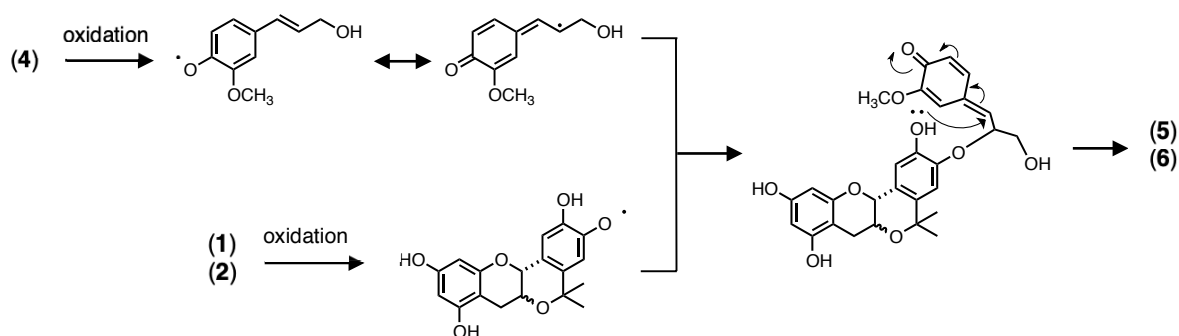


Figure 21. 酸化的カップリングの推定反応機構

(3-4) 抗酸化活性の評価

(3-4-1) ESR スピントラップ法による $\cdot\text{OH}$ の検出

Fenton 反応により発生した $\cdot\text{OH}$ に対して、合成した各化合物のラジカル消去活性を ESR スピントラップ法にて測定した。その結果いずれの化合物も顕著な消去作用は認められなかったが、SibEC(6)は弱い消去作用が認められた(Table 4, Figure 22)。

	average (n=3)	$\cdot\text{OH}$ 産生率(%)	$\cdot\text{OH}$ 消去率(%)
Fenton reaction 5min	0.16	100	0
+Sib 5min	0.16	98	2
+SibC 5min	0.17	107	0
+SibEC 5min	0.17	104	0
Fenton reaction 10min	0.19	100	0
+Sib 10min	0.20	106	0
+SibC 10min	0.22	117	0
+SibEC 10min	0.17	92	8

Table 4. ESR 測定結果

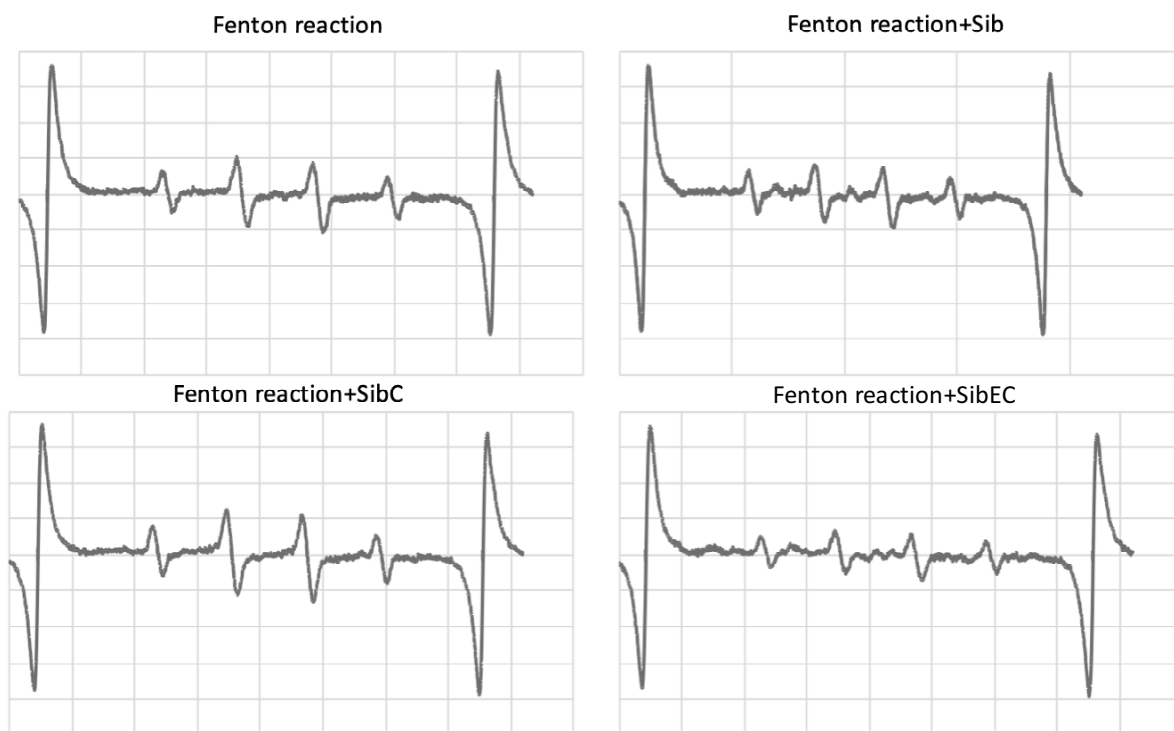


Figure 22. ESR 測定チャート

(3-4-2) •OH による DNA 酸化的傷害に対する各化合物の抑制作用

本実験は前節と同様に、HX による酸素分子の還元と、つづく Fenton 反応で発生した•OH による DNA 切断の実験系を利用して評価を行った。Sib およびその誘導体に顕著な抑制作用は認められなかったが、わずかながら SibEC(6)に抑制作用が認められた(Figure 23)。

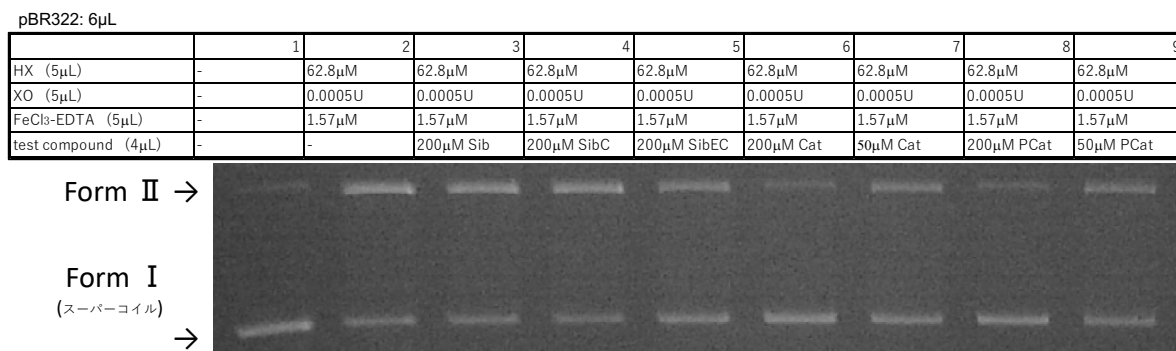


Figure 23. アガロースゲル電気泳動法による•OH での DNA 切断抑制作用の解析

(3-4-3) ¹O₂ による DNA 酸化的傷害に対する各化合物の抑制作用

前節と同様、有機光増感剤で発生させた ¹O₂ による DNA 酸化的損傷に対する各化合物の抑制作用を検討した。いずれの化合物においても catechin 誘導体と同様、¹O₂ による DNA の酸化的損傷を抑制することができなかった(Figure 24)。

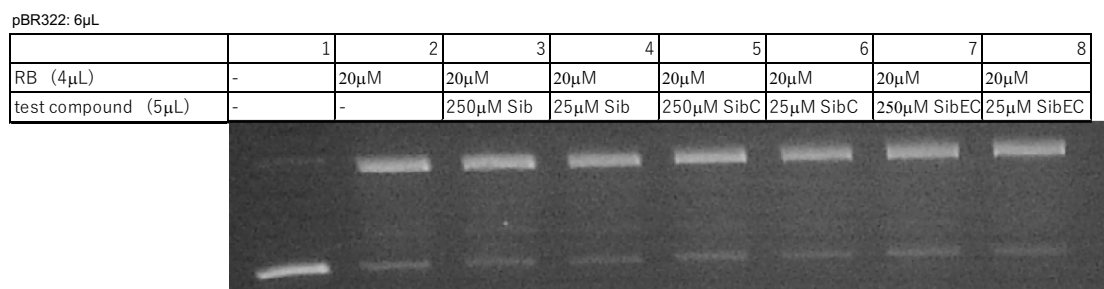


Figure24. アガロースゲル電気泳動法による ¹O₂ での DNA 切断抑制作用の解析

(3-4-4) HOMO・イオン化ポテンシャル(IP)の算出

これら化合物の抗酸化活性を構造化学的に推察するため、各化合物の HOMO および IP を算出した。SibC(5)および SibEC(6)は、Gibbs エネルギーが最も低い (*S, R*) 体で算出した (Figure 26)。その結果 Sib に対して、SibC(5)、SibEC(6)のどちらも HOMO が E 環から A 環に移動したことが明らかとなった (Figure 25)。これは AC 環をフラボン骨格からフラバン骨格に置換したこと、分子内の自由回転の制御による影響だと推察される。

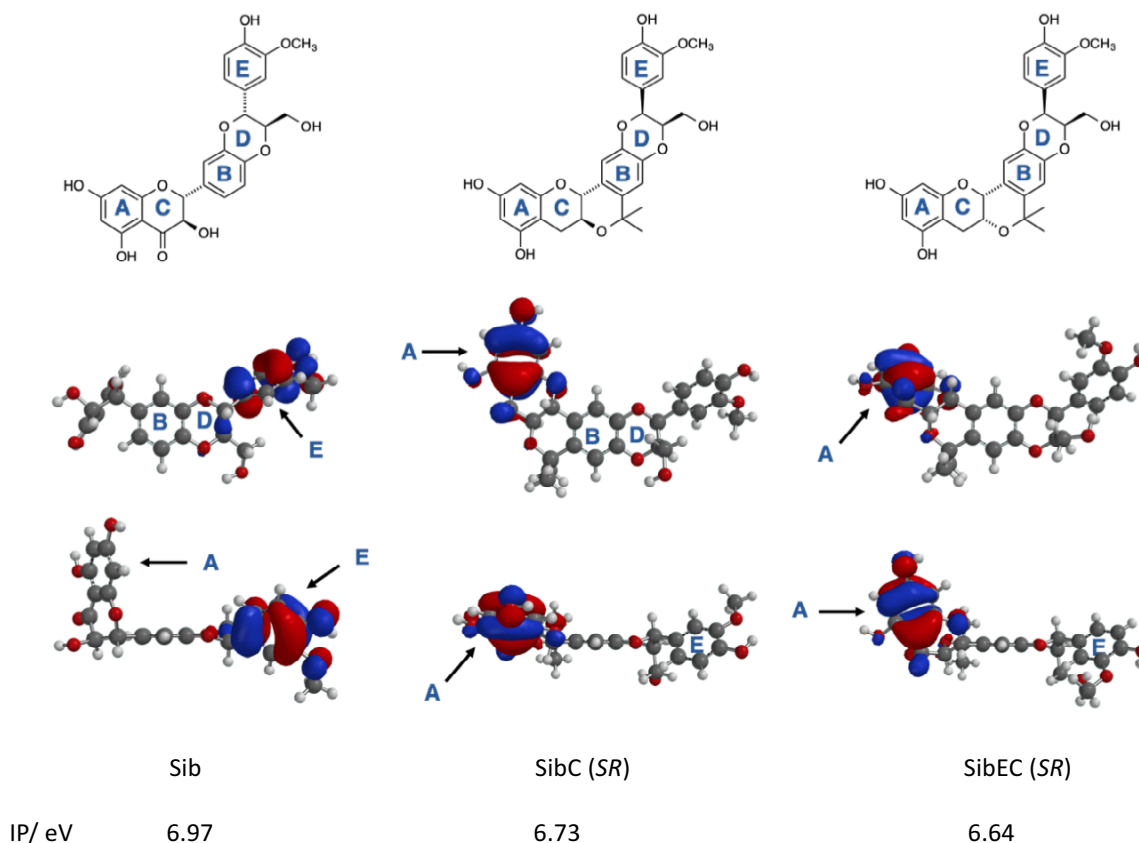


Figure 25. 各化合物の最安定化構造

ESR 測定およびアガロースゲル電気泳動法の結果より、いずれの化合物においても catechin 誘導体ほどの顕著な抗酸化活性は認められず、わずかに SibEC(6)にその作用が認められた。これらは catechin 誘導体と異なってカテコール構造を持たないため、非常に抗酸化活性が弱まったと考えられる。ただし Sib に PEC(2)を導入した SibEC(6)はわずかに抗酸化活性を有し、IP の結果と相関が見られた。これは、導入した PEC(2)の抗酸化活性が高いことが影響していると推察される。

(3-5) α -グルコシダーゼ阻害作用

Sib は血糖降下作用を持つことが報告されており、サプリメントの服用時には低血糖症状に関する注意喚起がされている。Sib の血糖降下作用について詳細は不明瞭であるが、前節で catechin 誘導体の分子全体の平面性と α -グルコシダーゼ阻害活性に相関が示唆されたため、Sib も α -グルコシダーゼ阻害による血糖降下作用が考えられる。そこで Sib についても同様の方法で α -グルコシダーゼ阻害作用を明らかにし、分子の平面性との相関について検討を行った。Sib は Cat や EC およびそれらの環固定化体と比べて強力な阻害作用を示した。さらに、Sib に対して分子全体の平面性が高い SibC(5) は阻害活性が大幅に増強し、一方平面性が乏しい SibEC(6) は減弱することが明らかとなった (Table 5)。

	Sib	SibC	SibEC	Acarbose
IC ₅₀ (μ M)	16.0	2.4	28.1	<1.0

Table 5. 各化合物が有する α -グルコシダーゼ阻害活性(IC₅₀ 値)

これらの最安定化構造を DFT 法(B3LYP, 6-31G*)により算出し、 α -グルコシダーゼ阻害活性と化合物の立体構造の相関を検討した。Sib は E 環とヒドロキシメチル基の立体配置が (R, R) であり、BD 環に対して AC 環が折れ曲がった構造をとる。SibC(5), SibEC(6) は E 環とヒドロキシメチル基の立体配置が (S, R) と (R, S) の混合物であるため、両方の立体配置を想定した計算を試みた。

D 環と E 環との立体は SibC(5) と SibEC(6) はどちらも (S, R) 体と比べて (R, S) 体が折れ曲がった構造をとっている。一方、AC 環と BD 環との立体に関しては、SibC(5) は (S, R) (R, S) どちらも平面性が高いのに対して、SibEC(6) は (S, R) (R, S) どちらも大きく折れ曲がった構造をとっている。したがって SibC(5) が SibEC(6) よりも強力な阻害活性を示したのは、この AC 環と BD 環との高い平面性によることが考えられる。SibC(S, R) は A 環から E 環にわたって分子全体の平面性が高く ΔG も SibC(R, S) より低値であることより、最も安定な構造かつ最も強力な阻害活性を有していることが示唆される (Figure 26)。

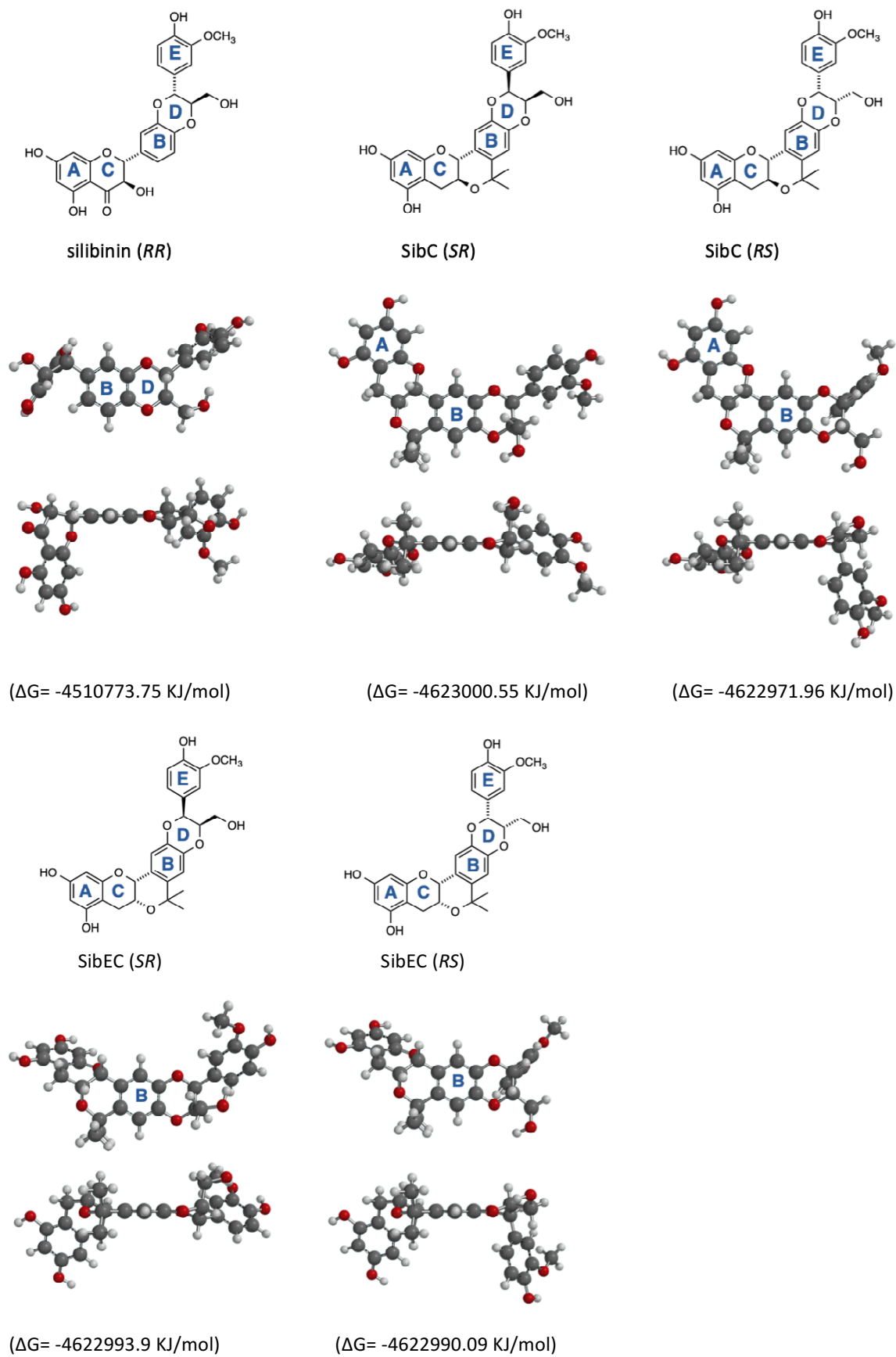


Figure 26. 各化合物の最安定化構造

(3-6) A β を標的とした活性評価

Sib は A β 凝集阻害作用と A β による神経細胞毒性抑制作用を有することが報告されている。^{39, 40} そこで、Sib 誘導体についても A β に対する作用を明らかにし、立体構造との相関について検討を行った。A β はアミノ酸が 40, 42 および 43 残基からなるペプチドがある。このうち 42 残基の A β_{1-42} が最も細胞傷害性が高いことより、本研究では A β_{1-42} を用いて活性の差異を検討した。

(3-6-1) A β 凝集阻害作用

A β 凝集阻害程度を評価する際に一般的な手法である Thioflavin-T 法(Th-T 法)を行った。A β 繊維に特異性が高い Th-T は、結合することで蛍光を発する。この蛍光強度を 12 時間、継時的に測定し阻害活性を評価した。各化合物(Sib, SibC(5), SibEC(6), Cat)10 μ M、A β 20 μ M を添加し、0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 時間後の蛍光強度を測定した。その結果、Figure 27 に示した通り、Sib と同程度に Cat, SibEC(6) が A β 凝集阻害作用を示した。これに対し、分子全体の平面性が高い SibC(5) はさらに強力な凝集阻害作用を示した。

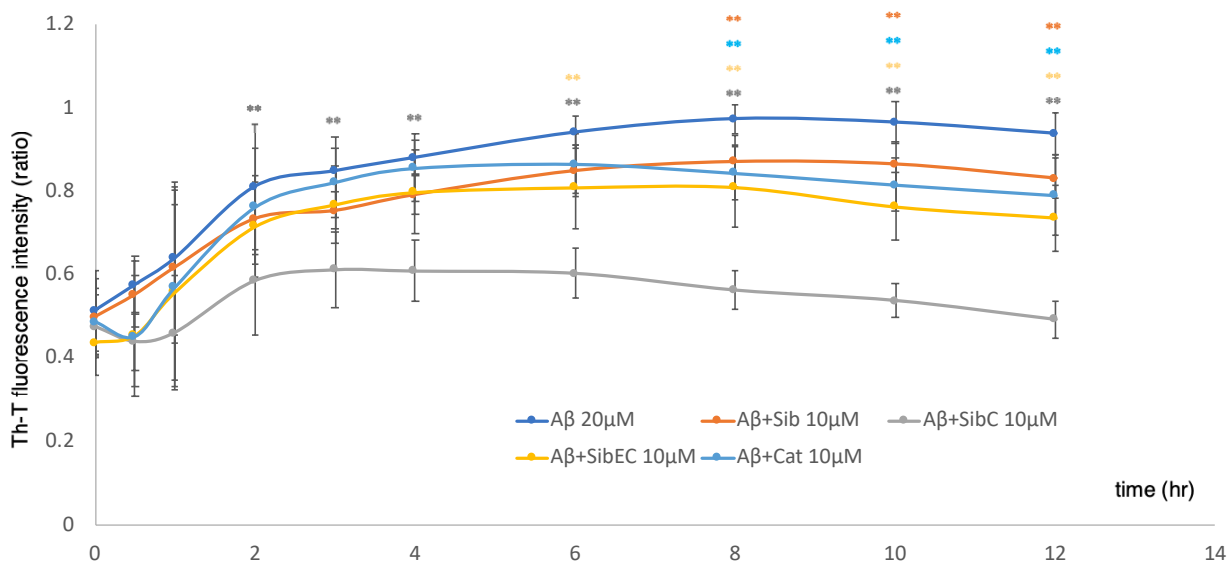


Figure 27. 各化合物の A β 凝集阻害活性

次に最も凝集阻害活性が高かった SibC(5)が A β 凝集体の立体構造に及ぼしている影響を円二色性 (CD) スペクトル法により測定した。A β は凝集が進行すると β シート構造を形成し、218nm に負の極大を示す。これに Sib を添加することで Sib-A β 複合体を形成し、 β -シート構造ではなく、 α -ヘリックス構造を構築することが報告されている。³⁵ 本実験では最も凝集阻害活性の高かった SibC (5) 43 μ M に A β 17 μ M を混和し約 4 時間 37°C でインキュベーションして CD を測定した。その結果、A β の β シート構造に特徴的な 218nm の負の極大吸収は SibC(5)の添加によって著しく減少した (Figure 28)。これより SibC(5)は A β 凝集による β シート構造の形成を阻害していることがわかった。

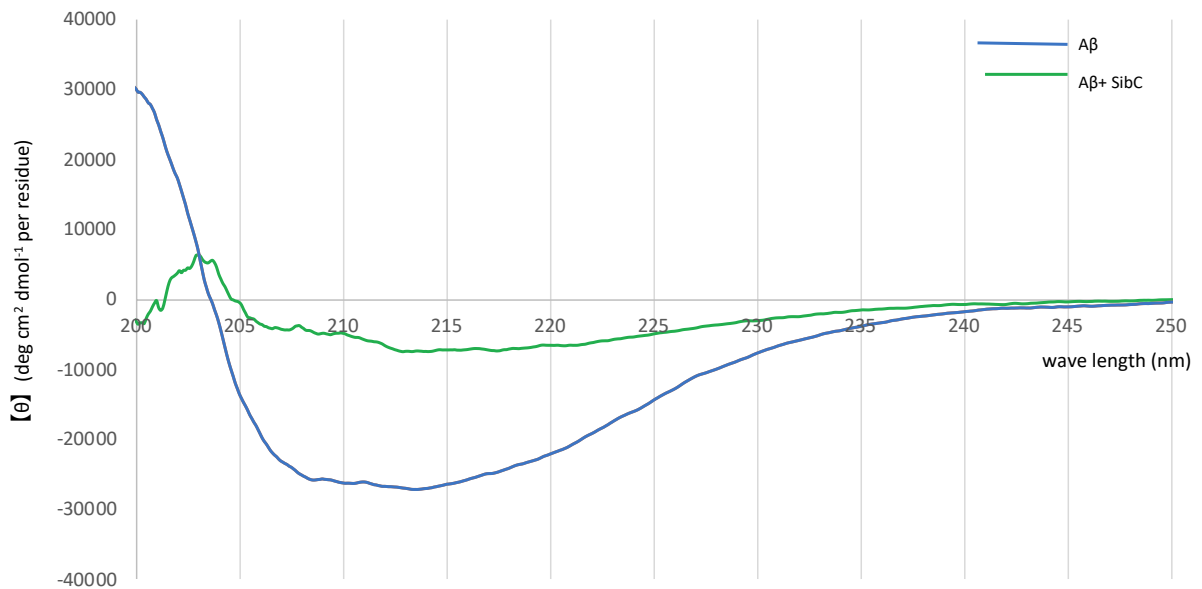


Figure 28. A β および A β + SibC(5) における CD スペクトル

$A\beta$ は凝集が進行すると繊維化が起これり老人斑が形成される。そこで $A\beta$ の凝集を強力に抑制する SibC(5) について、繊維化に対する抑制作用の検討を行なった。Th-T 法と同一条件で作成した $A\beta$ 及び $A\beta$ + SibC(5) の反応液を 48 時間インキュベーションし、 $A\beta$ 単独の凝集塊及び $A\beta$ に SibC(5) を添加した場合の凝集塊を透過電子顕微鏡(TEM)で観察した。

この画像から $A\beta$ は繊維化が進行すると高密度で凝集塊を形成しているが、SibC(5) が存在すると凝集塊の密度が大きく低下することが確認された。これより SibC(5) は $A\beta$ の凝集を阻害することで繊維化からの凝集塊の形成を抑制することが明らかとなった(Figure 29)。

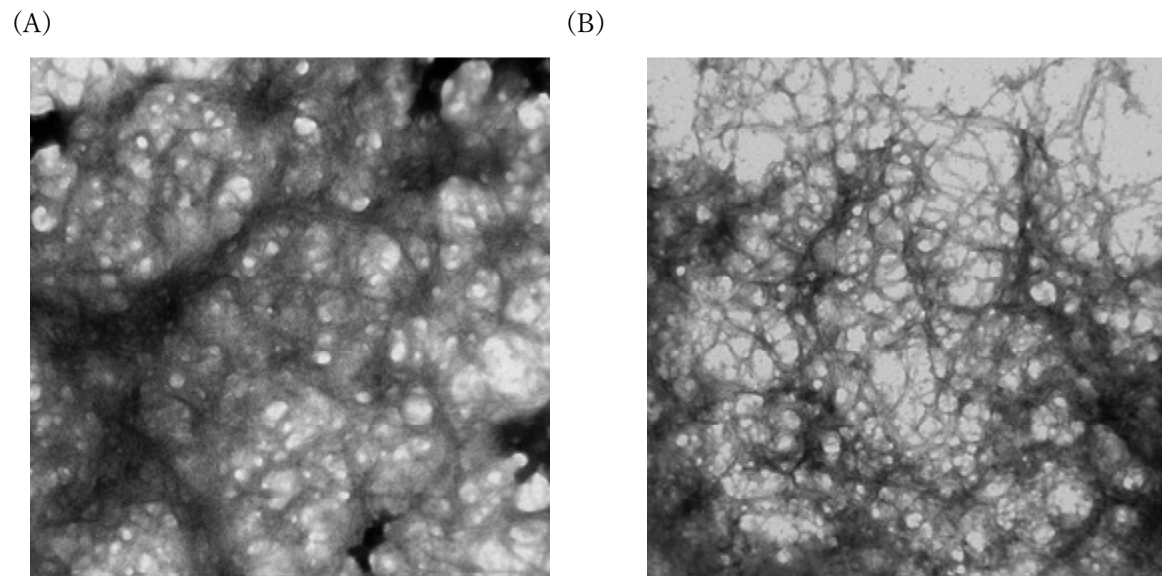


Figure 29. TEM を用いた観察写真
(A) $A\beta$, (B) $A\beta$ + SibC(5)

Lei Xiang Yang らは Sib の立体的平面性が $A\beta$ 凝集阻害作用に影響する可能性を報告している。³⁷ 本研究で SibC(5) が SibEC(6) と比べて強力な $A\beta$ 凝集阻害作用を有し、また繊維化から凝集塊の形成も抑制していることから、Sib の $A\beta$ 凝集阻害作用に平面性の高さが大きく影響していることが示された。TEM の結果は、SibC(S, R) か SibC(R, S) による凝集塊形成の抑制作用を示しているが、分子全体の平面性が高い SibC(S, R) がこの抑制作用に大きく寄与していることが予測される。

(3-6-2) A β による神経細胞毒性に対する化合物の抑制作用

A β の凝集過程で生じた ROS 及びその凝集塊は、神経細胞を傷害し病状が進展することが知られている。SibにはA β による神経細胞毒性を弱いながらも抑制する作用が報告されている。SibC(5)はA β 凝集阻害による β -シート形成を顕著に阻害した。また SibC(5)は PCat(1)を導入したことにより Sibに比べて高い脂溶性を示すことから、細胞膜への透過性が増強していることが予想される。これより、SibC(5)はA β による神経細胞毒性に対して Sibよりも強い抑制作用が期待される。本実験ではヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y を用い、A β による神経細胞毒性に対する各化合物の抑制効果を検討した。

はじめに本実験で添加する各化合物の至適濃度を決定するために、SH-SY5Y に対する各化合物の細胞毒性を確認した。化合物 8, 32, 63 μ M を添加し、48 時間後の細胞の生存率を MTT assay により確認した。いずれの化合物も低濃度から細胞毒性を示したことにより、各化合物 8 μ M を細胞に添加することとした(Figure 30)。

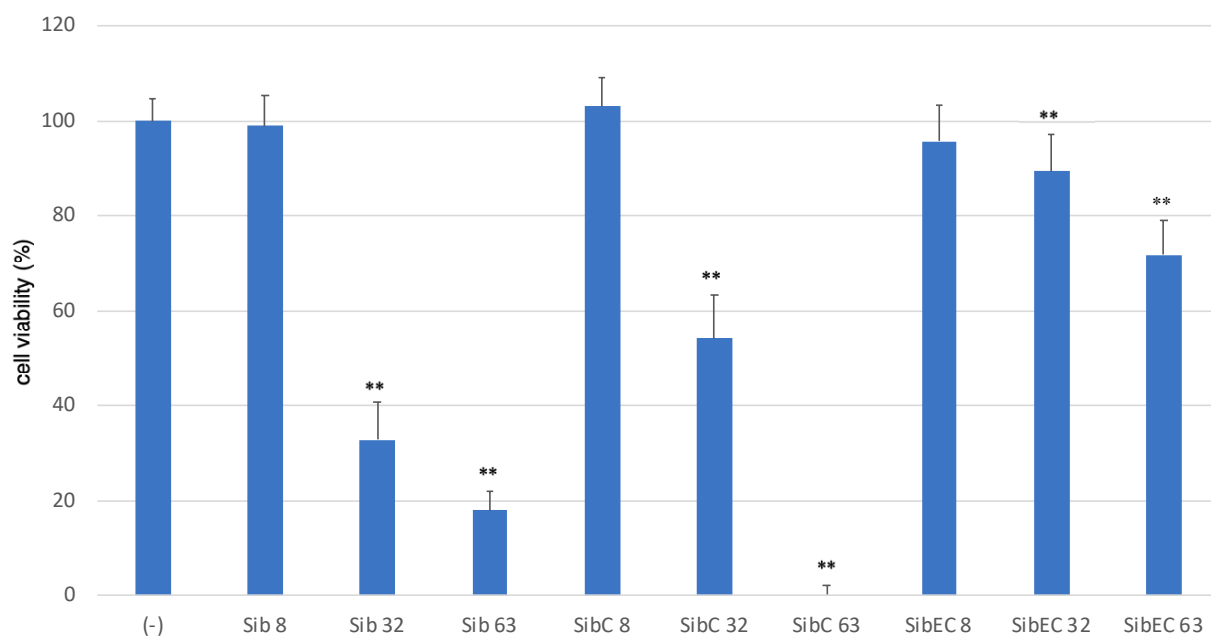


Figure 30. SH-SY5Y における Sib 誘導体の細胞毒性

次に $A\beta$ 0~20 μ M を添加してその細胞毒性を確認したところ、 $A\beta$ 20 μ M を SH-SY5Y に添加すると約半数程度の生存率を示した。そこで $A\beta$ 20 μ M を添加して惹起させた細胞傷害に対し、各化合物 8 μ M での抑制作用を検討したところ、いずれも $A\beta$ による細胞傷害を抑制することができなかった (Figure 31)。Th-T 法の結果より、SibC(5)を 10 μ M 添加することで約 50%の凝集阻害活性を示したため、神経細胞への保護効果は同一もしくはそれよりも高い濃度での検討が必要であった。しかし、化合物による毒性が低濃度から確認されたため、十分な濃度の範囲で検討することができなかった。

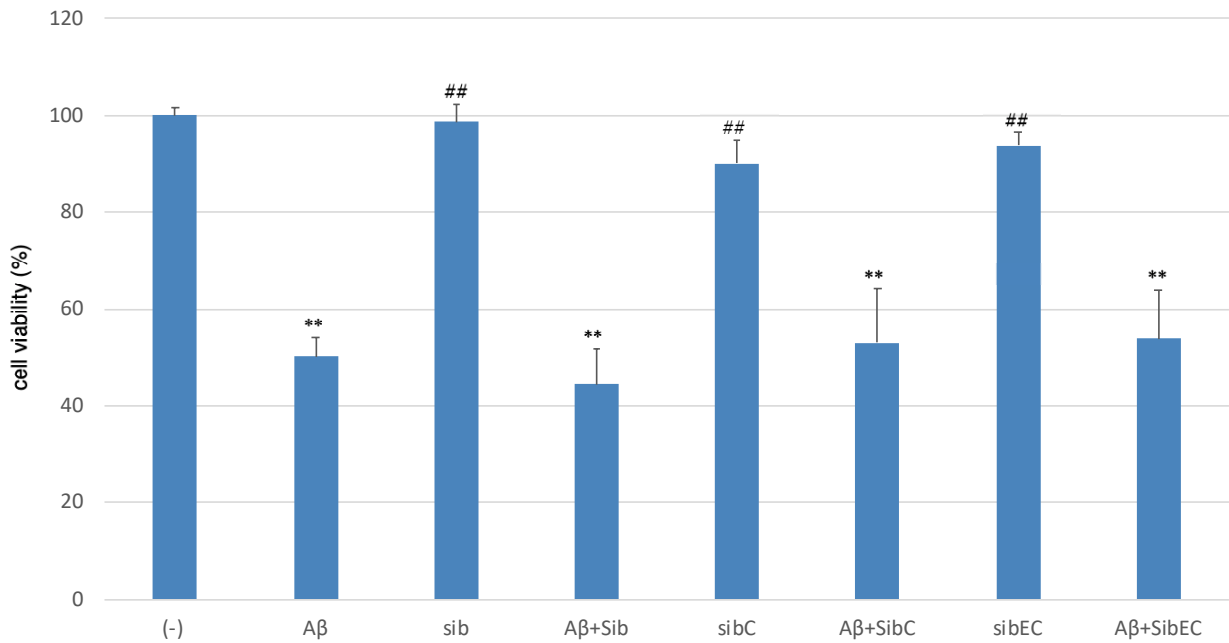
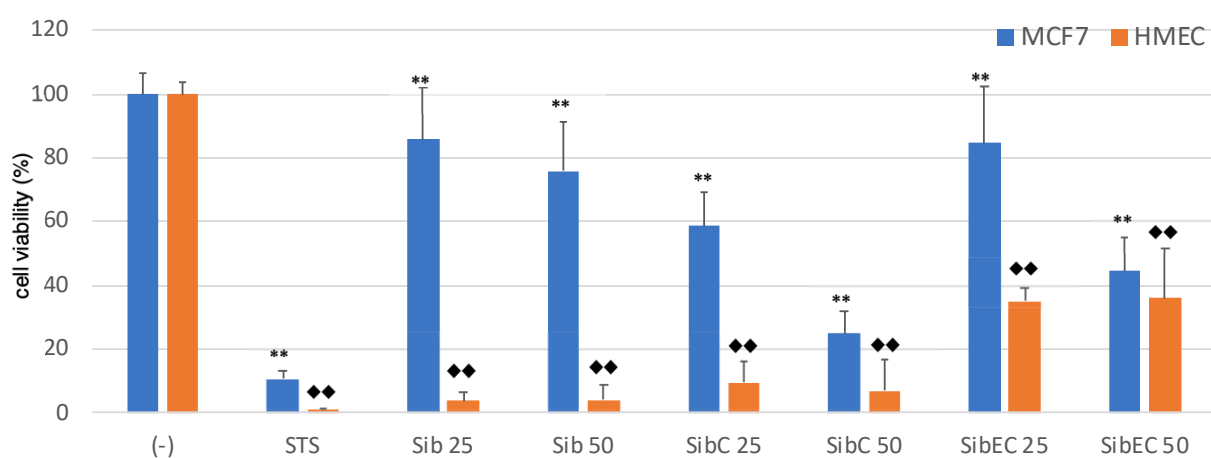


Figure 31. $A\beta$ による神経細胞毒性に対する各化合物の抑制作用

(3-7) がん細胞増殖抑制作用の検討

Sib と SibC(5)は SH-SY5Y に対して低濃度から毒性を示すことが、前節で明らかとなった。Sib は MCF-7 や MDA-MB-231 に対してアポトーシスを引き起こすことが報告されている。⁴¹ この細胞毒性に着目し、MCF-7 及び HCT116 に対する細胞増殖抑制作用を catechin 誘導体と同様の方法で検討した。はじめに MCF-7 で評価を行ったところ、いずれも有意に細胞増殖を抑制したが、特に SibC(5)において顕著な細胞増殖抑制作用が認められた。がん細胞への選択性を確認すべく、乳腺上皮細胞 (HMEC)でも同様の実験を試みたところ、いずれも MCF-7 に添加した場合よりも生存率は低下した。このため、がん細胞への選択性は乏しいことが示唆される。HCT116 についても MCF-7 と同様、いずれの化合物も有意に抑制したが、特に SibC(5)において顕著な細胞増殖抑制作用が認められた (Figure 32)。

(A)



(B)

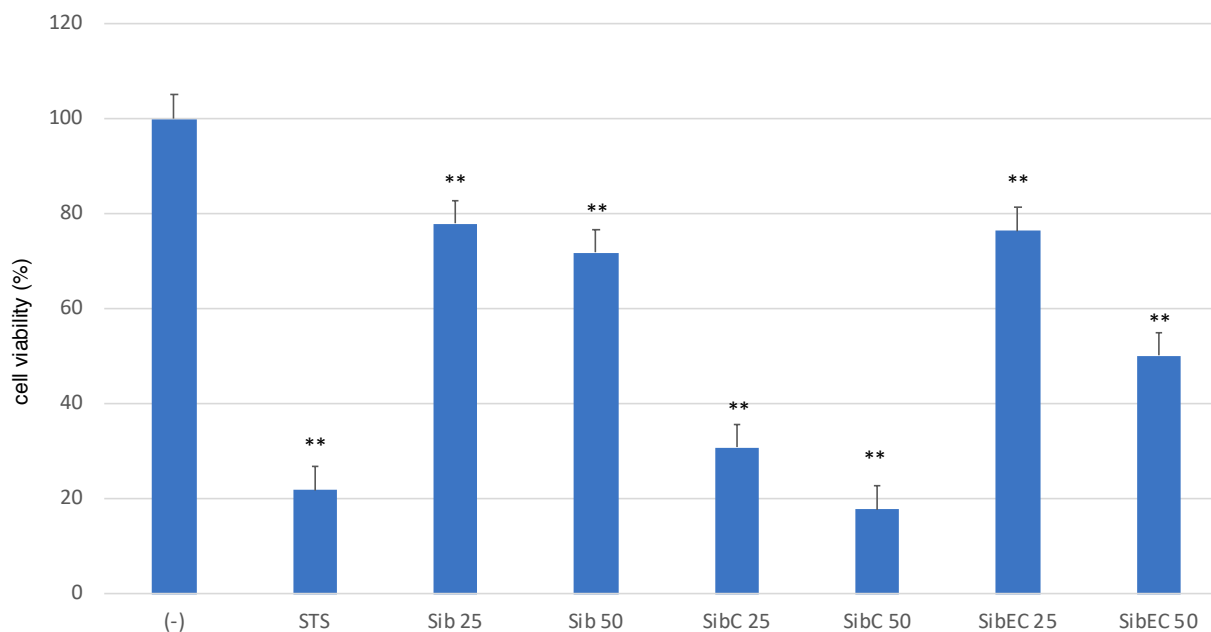


Figure 32. Sib 誘導体のがん細胞増殖抑制作用

(A) MCF7(ヒト乳腺上皮腺がん)/ HMEC (ヒト乳腺正常細胞)

(B) HCT116 (ヒト結腸腺がん)

Fawn S らの報告によると、Sib は HCT116 において G₁ 期を停止させる作用が報告されている。²¹ SibC(5)において Sib よりも生存率の低下が確認されたことにより、細胞周期への影響を考え、各化合物 25 μM を細胞に添加し測定を行った。なお、ポジティブコントロールとして paclitaxel (PTX)100nM を添加した。その結果、Fawn S らの報告の通り、Sib は HCT116 に対して G₁ 期停止作用が見られ、SibC(5)ではさらに G₁ 期停止作用が増強した。MCF-7 の場合、Sib では G₁ 期停止作用は観察できず、SibC(5)での G₁ 停止が確認できた(Figure 33)。この結果から Sib と SibC(5)の細胞生存率の低下の一因に、G₁ 期で停止することによって細胞周期が延長し増殖速度が抑制することが示唆される。

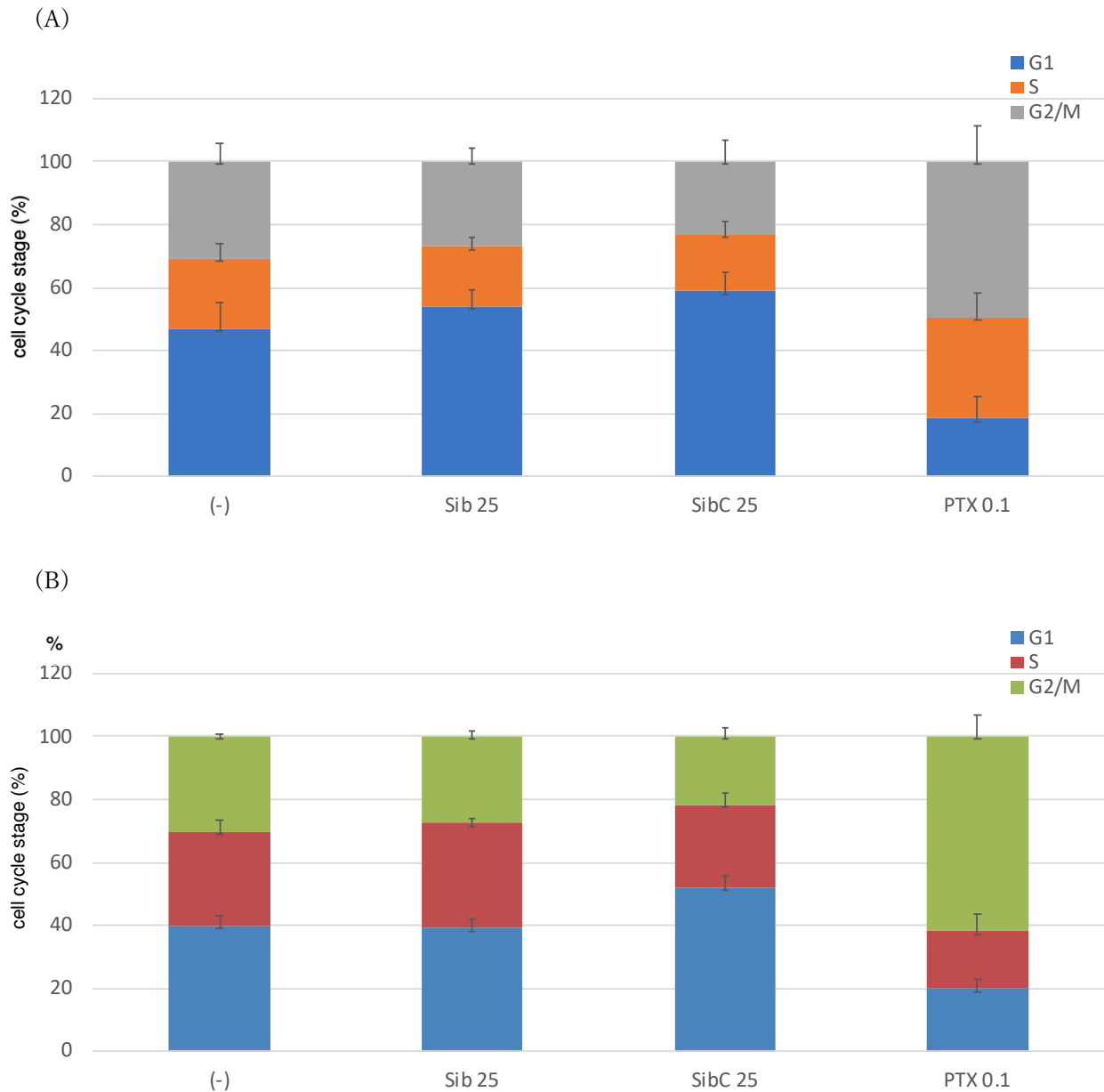


Figure 33. Sib 誘導体の細胞周期への影響

(A) HCT116

(B) MCF-7

次にこれら化合物の細胞増殖抑制作用がアポトーシス誘導によるものか、化合物(Sib, SibC(5)) 25 μ M を HCT116 に添加して PI/annexin V 染色で確認した。細胞はアポトーシス初期で、細胞膜の構造を保ちながらホスファチジルセリンが膜表面に露出することが知られており、Annexin V と結合することで発色する。アポトーシス後期になると、細胞膜に穴が開くため PI が細胞内に入り込み DNA と結合して発色する。一般的にアポトーシスは 48 時間で観察されるため、本実験も試験化合物添加後 48 時間で観察した。しかし、本実験での測定時には、Annexin V と PI どちらも発色が見られた。これよりこれらの化合物は細胞死を引き起こすことが明らかとなったが、アポトーシスによる細胞死かは明らかにすることができなかった。トポイソメラーゼ I 阻害作用をもつイリノテカンや DNA インターカレーター作用を有するエチジウムブロミドなど一部の細胞増殖抑制作用を有する化合物は、分子全体の平面性が非常に高いことが知られている。Sib および SibC(5)も同様の作用機序を期待したが、G1 期を停止させたことにより当初の予測したものとは別の機序が推測される。アポトーシスの有無は不明瞭であるが細胞死を引き起こしているため、細胞周期の延長と細胞死の相乗作用が予測される。

(3-8) 小括

本節では Sib の分子内自由回転を制御すべく、PCat(1)および PEC(2)を導入した SibC(5), SibEC(6) を合成した。分子全体の平面性が非常に高い SibC(5)は、 α -グルコシダーゼ阻害活性、がん細胞増殖抑制作用、A β 凝集阻害作用が増強した。この結果から分子全体の平面性の高さが、生物活性の増強に寄与していることが示唆される。抗酸化活性については、Sib とその誘導体いずれもカテコール構造を有さないことにより、catechin 誘導体と比較して抗酸化活性が減弱したと考えられる。

4. proanthocyanidin の環固定化反応と生物活性評価

(4-1) proanthocyanidin(PA)

PA は catechin 類のポリマー(2~15 量体, $n=1\sim 14$)で非常に高い抗酸化活性を示し、vitamin C や vitamin E、 β -carotene よりも強力である。⁴² ブドウ種子や果皮、リンゴ未熟果実、ピーナッツの果皮などに多く含有しており¹⁴、酸素や日光などの自然界の酸化から植物体の保護するものだと考えられている。1950年代からPAに関する研究は進行しており、特に1970年以降、フランスではPAを主成分とする「ブドウ種子ポリフェノール」を医薬品として登録するための研究が実施された。その効能の高さのみならず、安全性や物理化学的性質(水溶性や安定性)の観点からも注目されており、白内障改善作用⁴³など様々な作用が見出されている。加えて動脈硬化やADに対する作用も報告されており、生活習慣病をはじめとした様々な疾患に対しての有用性が期待できる化合物である。

PAはADに対する効果も報告されている。ブドウ種子エキス(PA含有物)をモデルマウスに投与することで、空間認識能及び認知機能が改善された。⁴⁴ どのPA種か未だ不明瞭な点が多いが、ADに対する有効性は期待できる。

(4-2) 設計

一般的にPAは重合度が高いほど抗酸化活性が増強することが報告されているが、血液脳関門への透過性が反比例して低下することが問題となる。本研究では、血液脳関門への透過性を考慮し、(+)-catechinの二量体である procyanidin B3(Cat-Cat, **12**)に着目した。Cat-Cat(**12**)は分子内で3箇所自由回転が可能であり、非常に自由度が高い化合物である。このうち環固定化反応により catechin 分子内のB環とC環、E環とF環を固定化することで、分子内の自由度を下げる事が可能となり、立体構造を固定化することで各種生理活性が増強すると期待した。Cat-Cat(**12**)の一方を環固定化した Cat-PCat(**16**)、両方を環固定化した PCat-PCat(**18**)を設計し、各種活性の増強を期待して合成に着手した(Figure 34)。

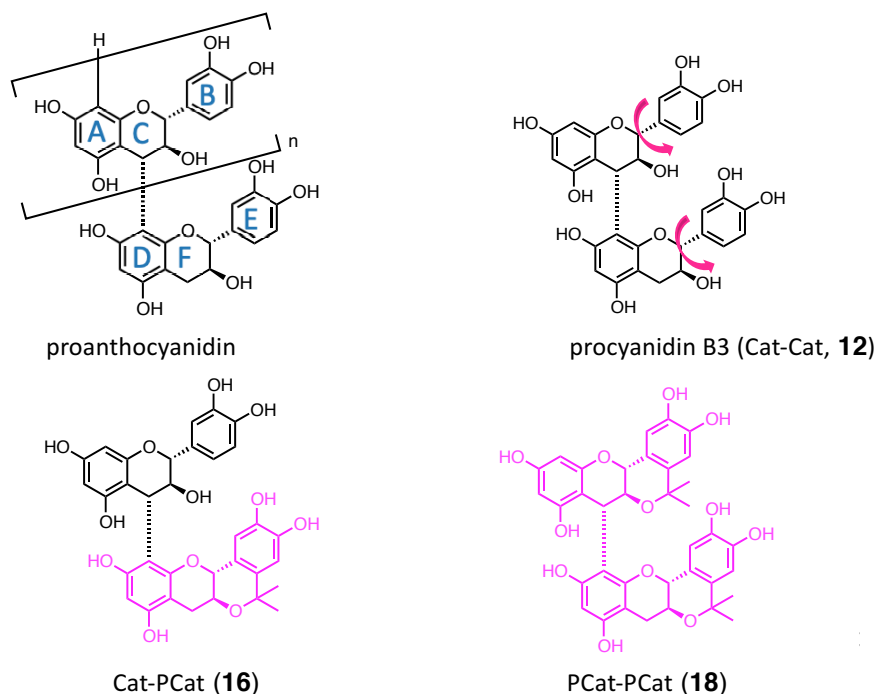


Figure 34. PA 誘導体の構造式一覧

(4-3) 合成計画

(4-3-1) Cat-Cat(**12**)の合成 (Figure 35)

Saito, A による合成方法に倣って Cat-Cat(**12**)の合成を試みた。⁴⁵ (+)-catechin のフェノール性ヒドロキシ基を保護した誘導体(**7**)と、これにアルコール性ヒドロキシ基も保護し、4位に脱離基であるエトキシエチル基を導入した誘導体(**9**)を得た。これらを Lewis 酸存在下で縮合反応により二量化した。得られた化合物の4位の立体選択性は非常に高く、高収率で α 体の合成に成功した。その後、2段階の脱保護反応を経て Cat-Cat (procyanidin B3, **12**)を合成した。

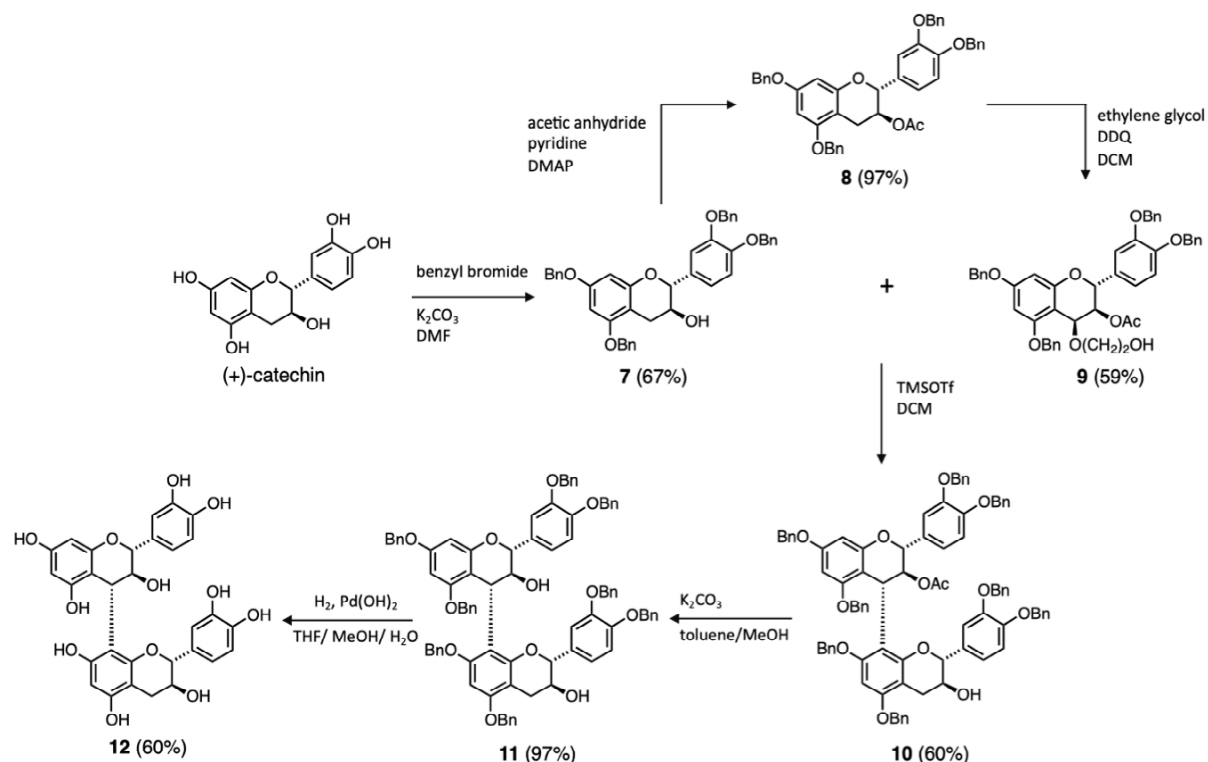


Figure 35. Cat-Cat(**12**)の合成スキーム

(4-3-2) Cat-PCat(**16**)の合成 (Figure 36)

(+)-catechin の立体構造を平面に固定化した PCat(**1**)のヒドロキシ基を保護した(**13**)と、ヒドロキシ基を保護して4位にエトキシエチル基を導入した誘導体(**9**)を得た。これらを Lewis 酸存在下で縮合し(**14**)、脱保護反応により Cat-PCat(**16**)を合成した。

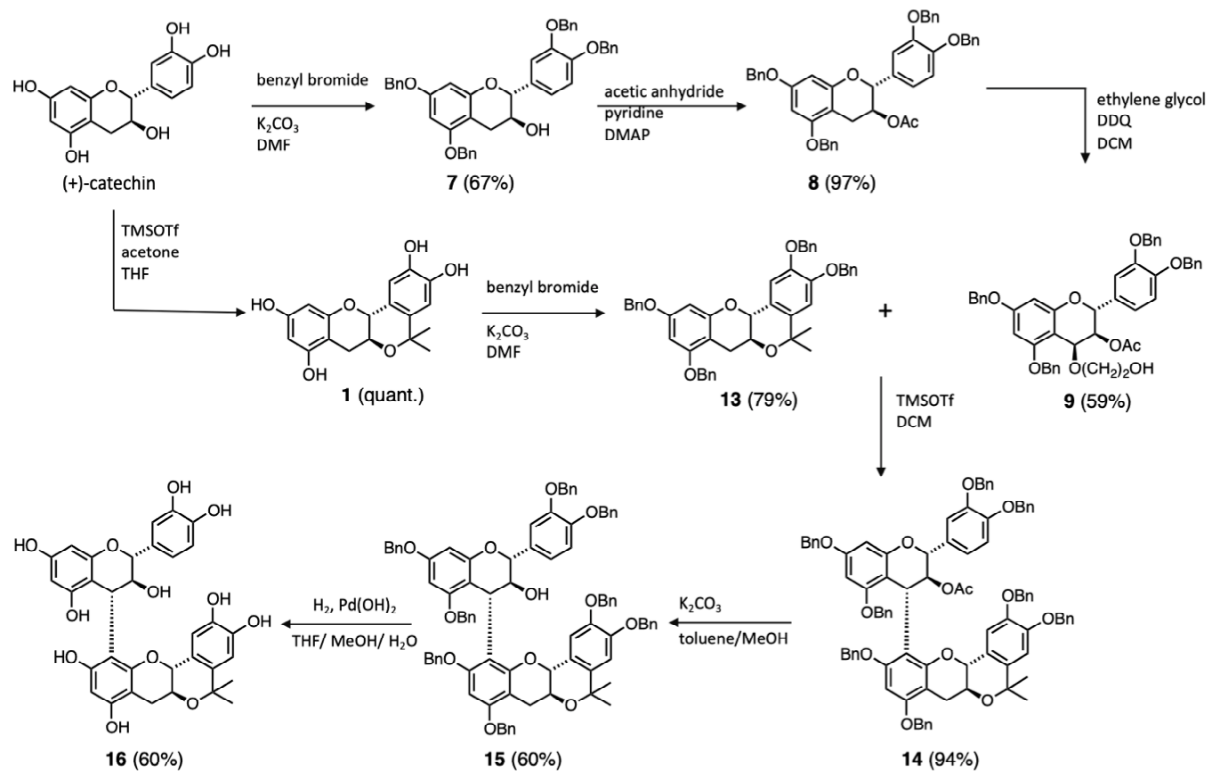


Figure 36. Cat-PCat(**16**)の合成スキーム

(4-3-3) PCat-PCat(**18**)の合成 (Figure 37)

Cat-Cat(**12**), Cat-PCat(**16**)の合成中間体である化合物 **11** と **15** を PCat(**1**)の合成反応を利用して環固定化し、脱保護反応により PCat-PCat(**18**)を合成した。

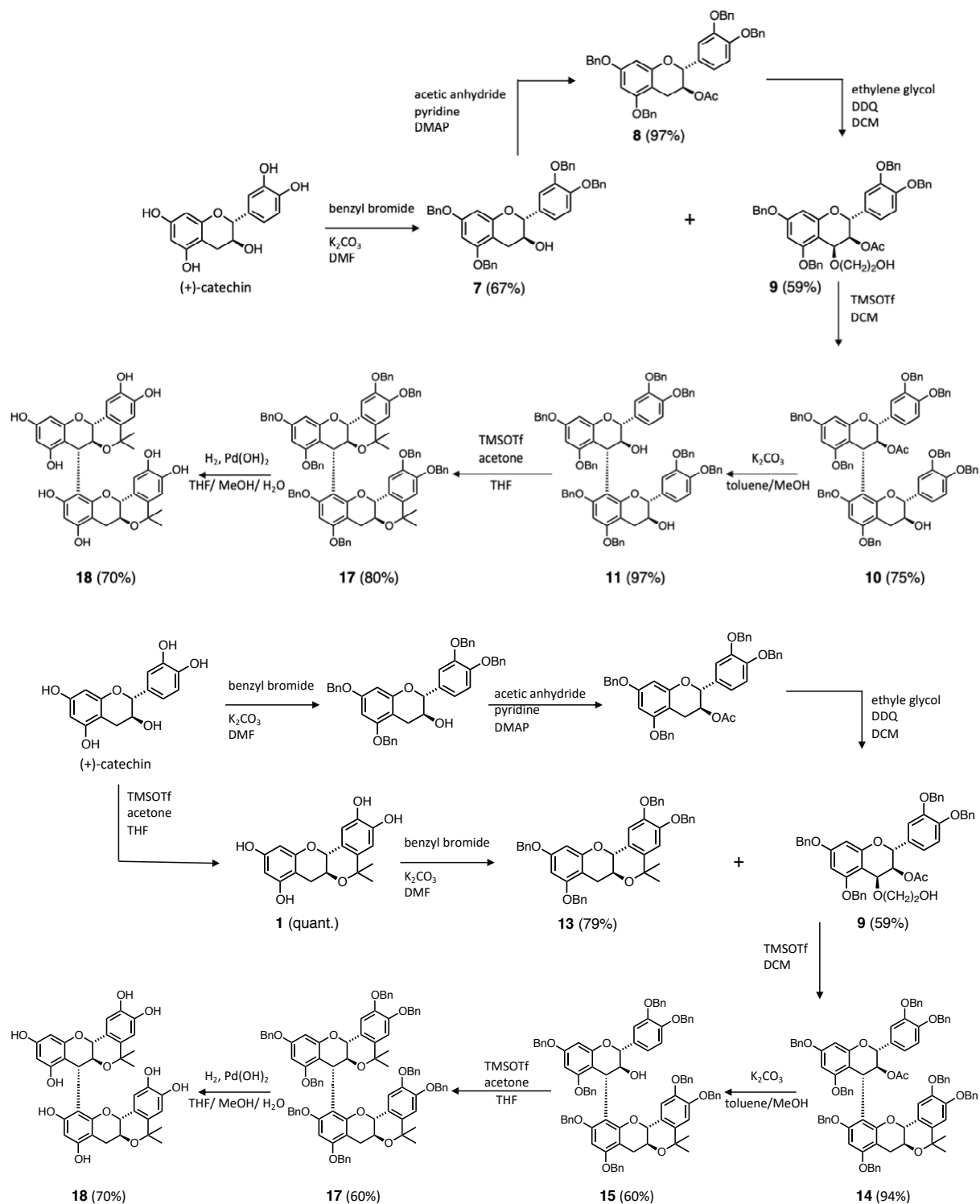


Figure 37. PCat-PCat(**18**)の合成スキーム

(4-4) 抗酸化活性の評価

(4-4-1) ラジカル消去反応速度の算出

試験化合物と $\text{GO}\cdot$ との反応についてストップフロー分光測定装置を用いてラジカル消去反応速度を測定し、速度論的解析を行った。また各化合物の IP についても算出した。その結果、Cat-Cat(**12**)のラジカル反応消去速度定数(K_{HT})は $100 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ に対し、Cat-PCat(**16**)の K_{HT} は約 1.9 倍 ($K_{\text{HT}}=189 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)、PCat-PCat(**18**)は 2.85 倍 ($K_{\text{HT}}=285 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$) 増大することが明らかとなった (Figure 38, Table 6)。

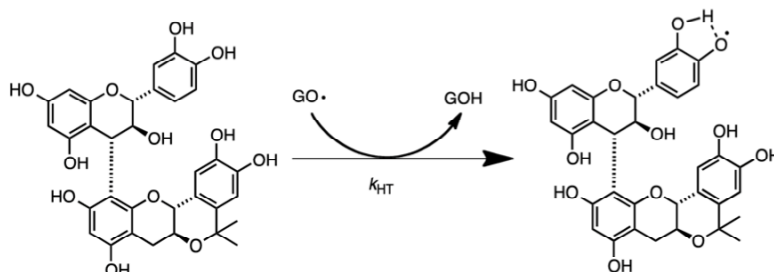


Figure38. Cat-PCat(**16**)のラジカル消去反応の機構

	Cat-Cat	Cat-PCat	PCat-PCat
$K_{\text{HT}} (\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$	100	189	285
IP (eV)	6.81	6.74	6.71

Table 6. PA とその誘導体のラジカル消去反応速度定数

(4-4-2) ESR スピントラップ法による $\cdot\text{OH}$ の検出

Fenton 反応により発生した $\cdot\text{OH}$ に対して、合成した各化合物のラジカル消去活性を ESR スピントラップ法にて測定した。全ての化合物は Fenton 反応による $\cdot\text{OH}$ を消去した。PCat 構造を有することで消去作用の増大がみられ、特に PCat-PCat(**18**)は反応開始 10 分後で約 60%程度 $\cdot\text{OH}$ を消去した (Figure 39, Table 7)。

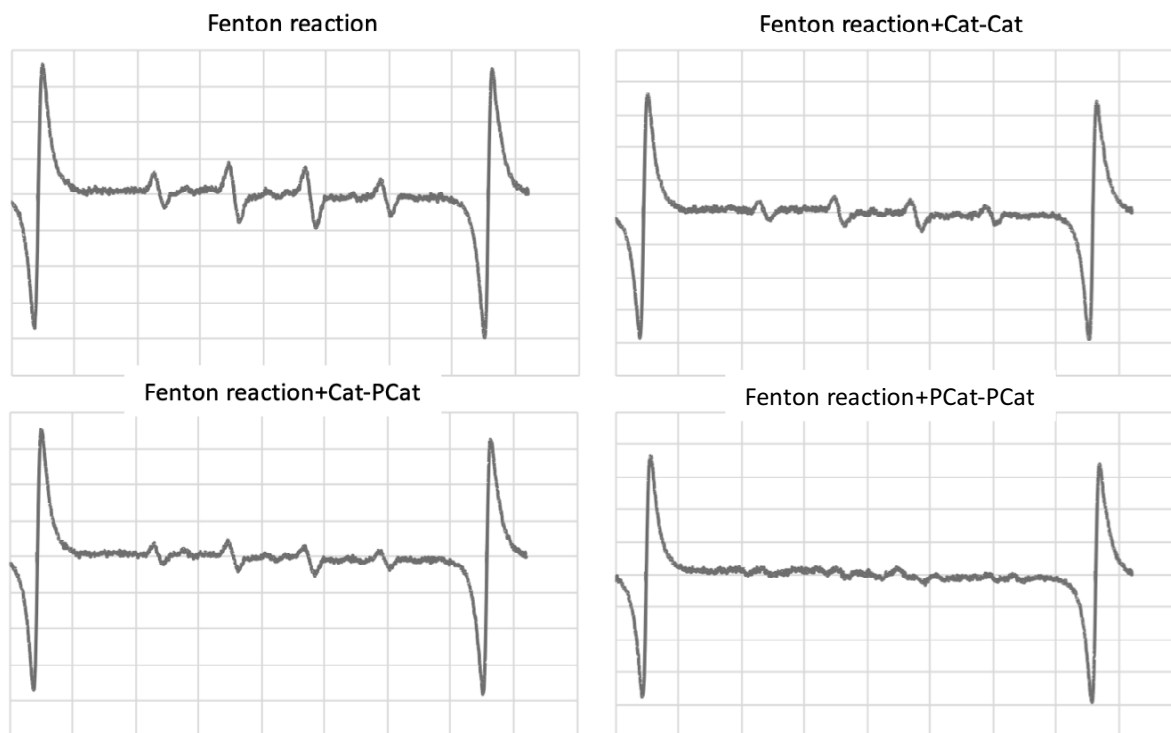


Figure39. PA とその誘導体の ESR 測定結果

	average (n=3)	活性酸素産生率(%)	活性酸素消去率(%)
Fenton reaction 5min	0.16	100	0
+Cat-Cat 5min	0.11	67	33
+Cat-PCat 5min	0.13	77	23
+PCat-PCat 5min	0.10	49	51
Fenton reaction 10min	0.16	100	0
+Cat-Cat 10min	0.13	80	20
+Cat-PCat 10min	0.14	90	10
+PCat-PCat 10min	0.10	41	59

Table 7. PA とその誘導体の ESR 測定結果

(4-4-3) •OH による DNA 酸化的傷害に対する各化合物の抑制作用

本実験は前節と同様に、HX による酸素分子の還元と、つづく Fenton 反応で発生した•OH による DNA 切断の実験系を利用して評価を行った。その結果、いずれの化合物も 200 μM で•OH による DNA の切断を大幅に抑制していることが明らかとなった。しかし、化合物間での差は認められなかった (Figure 40)。

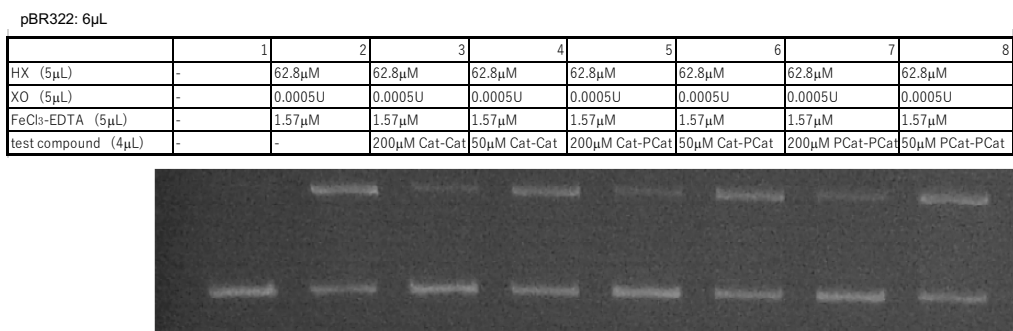


Figure 40. アガロースゲル電気泳動法による•OH での DNA 切断抑制作用の解析

(4-4-4) ¹O₂ による DNA 酸化的傷害に対する各化合物の抑制作用

有機光増感剤で発生させた ¹O₂ による DNA 酸化的損傷に対する各化合物の抑制作用を検討した。いずれの化合物においても catechin 誘導体, Sib 誘導体と同様、¹O₂ による DNA の酸化的損傷を抑制することができなかった (Figure 41)。

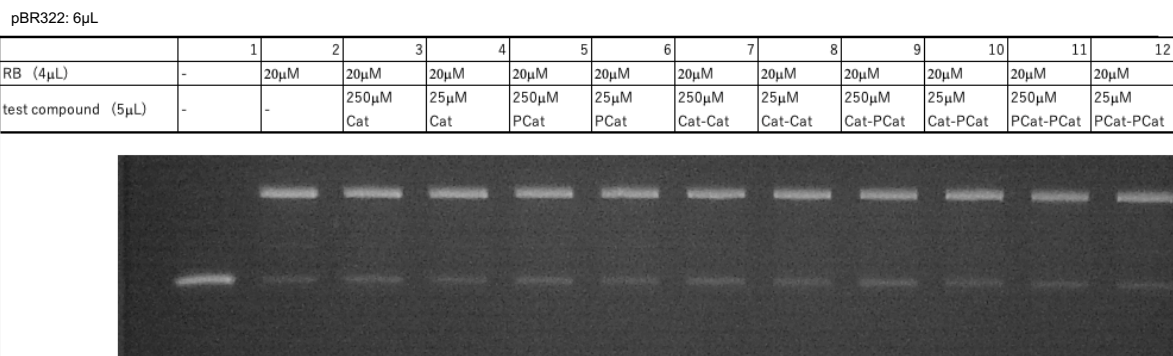


Figure 41. アガロースゲル電気泳動法による ¹O₂ での DNA 切断抑制作用の解析

(4-4-5) HOMO の算出

これら化合物の抗酸化活性を構造化学的に推察するため、各化合物の HOMO を算出した。その結果、Cat-Cat(**12**)の HOMO は D 環に局在しているのに対して分子内を環固定化した Cat-PCat(**16**)と PCat-PCat(**18**)は B 環のカテコール部位に HOMO が局在していることがわかった(Figure 42)。フラボノイド系抗酸化物質の抗酸化作用はカテコール構造からの電子移動反応によることから、Cat-PCat(**16**)、PCat-PCat(**18**)は HOMO がカテコール構造に局在することで強力な抗酸化作用を示すことが明らかとなった。

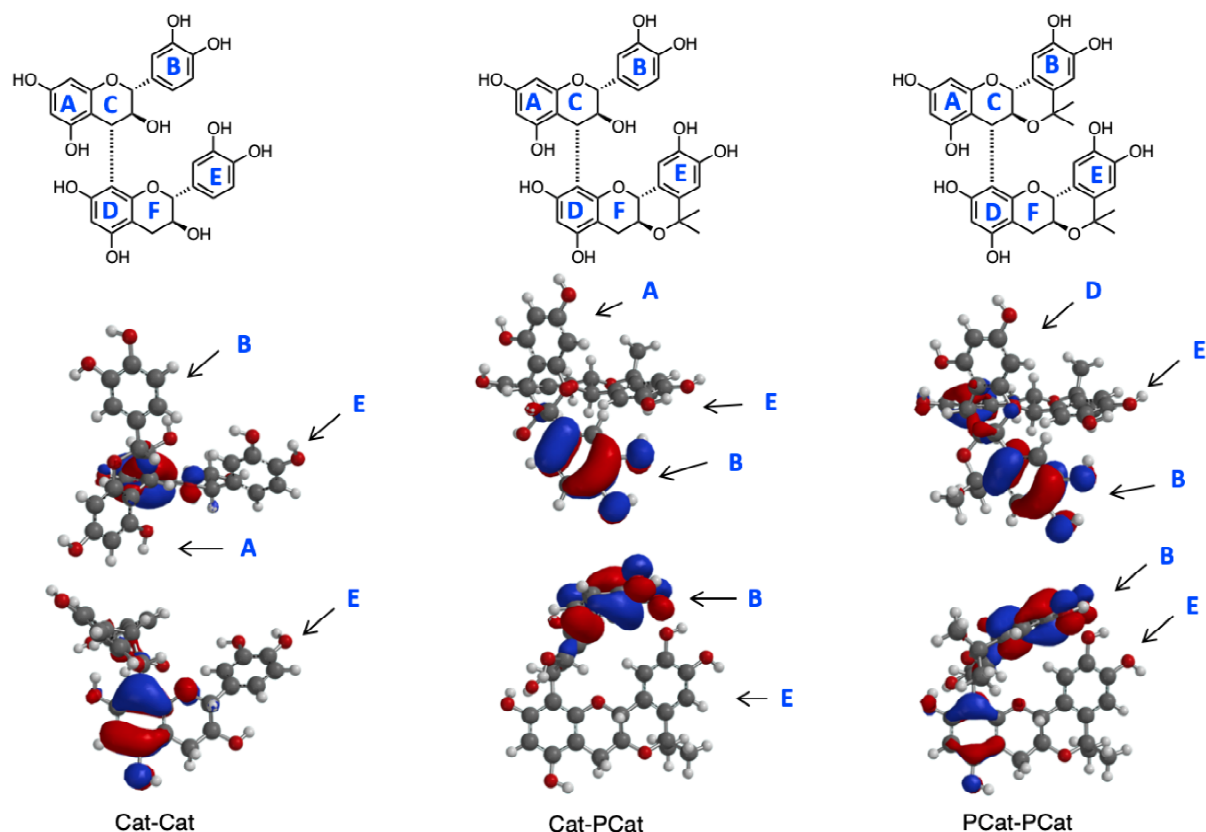


Figure 42. 各化合物の HOMO 計算

各種抗酸化活性の評価結果より、Cat-Cat(**12**)分子内の自由回転を制御することによって抗酸化活性が大幅に増強することが明らかとなった。特に両方の立体構造を環固定化した PCat-PCat(**18**)に強力な作用が見出された。これは HOMO のカテコール構造への局在化とともに環固定化反応の際に導入されたジメチル基による電子供与能の効果だと考えられる。•OH による DNA 酸化的傷害への抑制作用については、Cat-Cat(**12**)が DNA 酸化的傷害に対して十分な抑制作用を示したことにより、他との差が見出せなくなったと推察される。Sib 誘導体同様に、PA 誘導体にはモノエンもしくは 1,3-diene 構造を持たないため、 $^1\text{O}_2$ に対する作用は示さなかったと考えられる。

(4-5) α -グルコシダーゼ阻害作用

第2節で報告した catechin 誘導体は、分子内の自由回転を制御し、かつ平面性を高めることにより α -グルコシダーゼ阻害作用が増強することを明らかにした。Cat-Cat(**12**)は(+)-catechin 2分子が重合したものであるため、同様に環固定化することで阻害活性が増強することが期待される。同様の方法で阻害活性を評価したところ、一方および両方を環固定化(Cat-PCat(**16**), PCat-PCat(**18**))することにより、大幅に阻害活性が増強した(Table 8)。

	Cat-Cat	Cat-PCat	PCat-PCat	Acarbose
IC ₅₀ (μ M)	33.8	6.37	5.4	<1.0

Table 8. 各化合物が有する α -グルコシダーゼ阻害活性(IC₅₀ 値)

これらの最安定化構造を DFT 法(B3LYP, 6-31G*)により算出し、 α -グルコシダーゼ阻害活性と化合物の立体構造の相関を検討した。その結果、catechin が環固定化されることにより E 環と B 環が水素結合によって構造がコンパクトにまとまることがわかった(Figure 43)。Sib 誘導体では分子全体の平面性が阻害活性に関与していたが、PA 誘導体については分子全体がコンパクトにまとまって活性中心へ作用しやすく、環固定化部位と活性中心との親和性が高くなることで阻害活性が増強したと推察される。

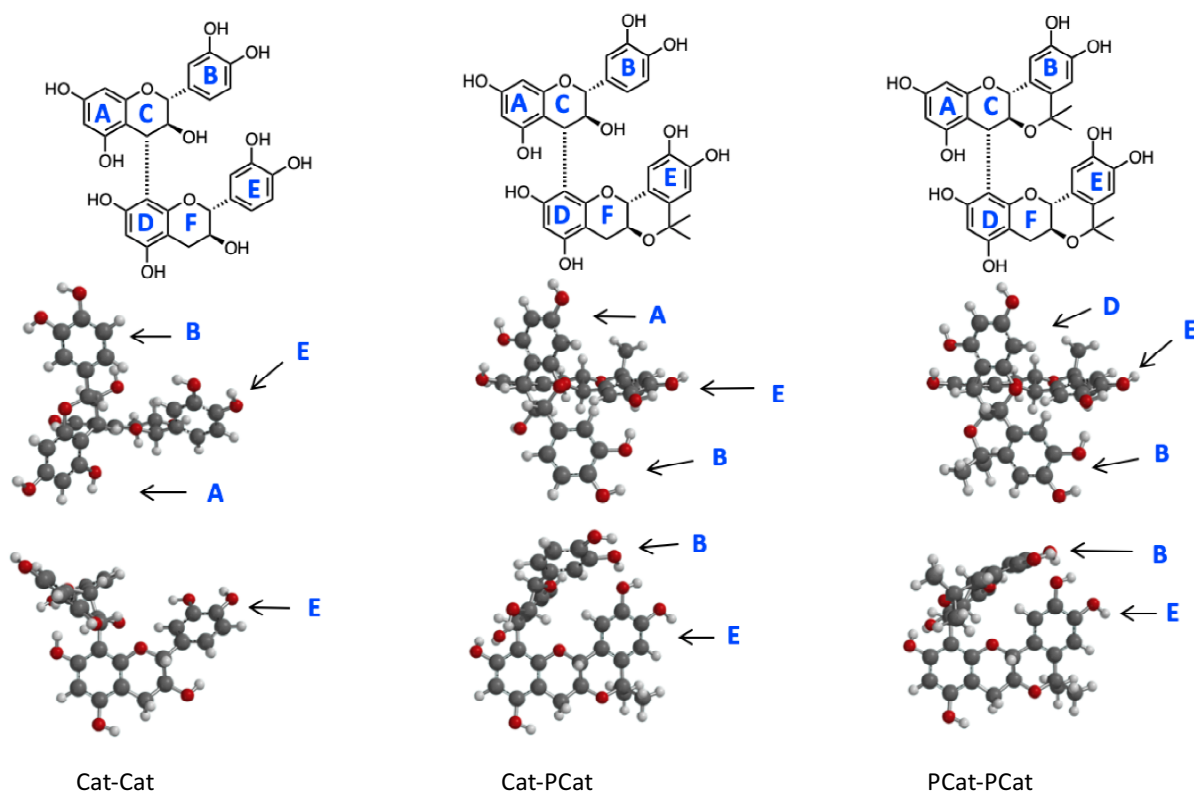


Figure 43. 各化合物の最安定化構造

(4-6) A β を標的とした活性評価

(4-6-1) A β 凝集阻害作用

第 2 節と同様の Th-T 法で、蛍光強度を 12 時間、継時的に測定して阻害活性を評価した。各化合物 (Cat-Cat(**12**), Cat-PCat(**16**), PCat-PCat(**18**), Cat, PCat(**1**)) 20 μ M 及び A β 20 μ M を添加し、0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 時間後の蛍光強度を測定した。単量体(Cat, PCat(**1**))では、どちらも 4 時間以降より蛍光強度が減少し、特に立体構造を固定化した PCat(**1**)の方が大きく減少した(Figure 44)。A β の凝集が完了する 4 時間の時点では化合物間での差は見られず、それ以降に見られたことからこれらには脱凝集作用を有することが考えられる。

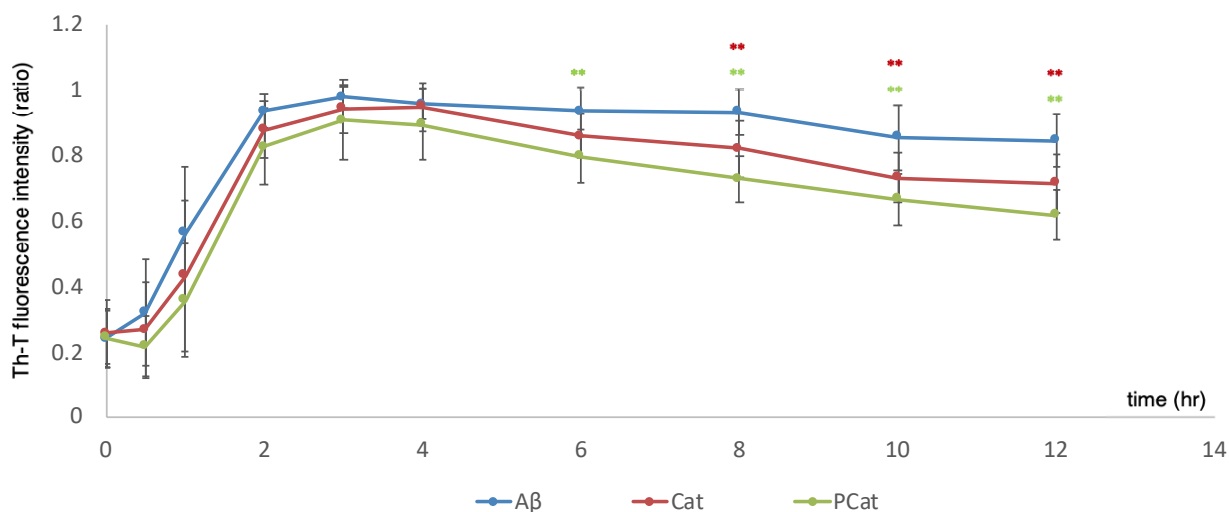


Figure 44. Cat, PCat(**1**) (単量体)の A β 凝集阻害活性

次に二量体(Cat-Cat(**12**), Cat-PCat(**16**), PCat-PCat(**18**))の A β 凝集阻害活性について検討した。単量体とは異なっていずれも反応開始直後から A β 凝集を阻害しており、特に両方の立体構造を固定化した PCat-PCat(**18**)に強力な阻害活性が認められた(Figure 45)。この結果から単量体と比べて二量体の方が産生される凝集塊が少なく、特に PCat-PCat(**18**)が強力な阻害活性を有することが明らかとなった。

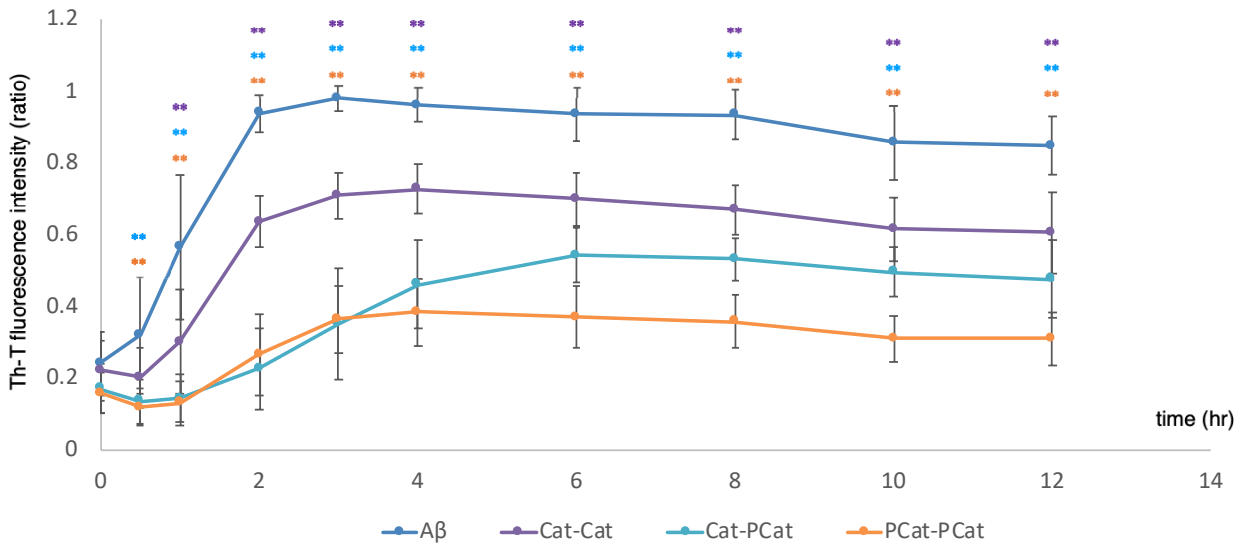


Figure 45. PA 誘導体(二量体)の A β 凝集阻害活性

次に各二量体(Cat-Cat(**12**), Cat-PCat(**16**), PCat-PCat(**18**)) $43\mu\text{M}$ と $A\beta$ $17\mu\text{M}$ を混和し約 4 時間 37°C でインキュベーションし、CD を測定した。その結果、 $A\beta$ に対し $A\beta$ +Cat-PCat(**16**), $A\beta$ +PCat-PCat(**18**)において 218nm 付近の極大吸収が著しく減少していることがわかった (Figure 46)。分子内の自由回転を制御した化合物において、 $A\beta$ 凝集による β シート構造の形成を阻害していることがわかった。

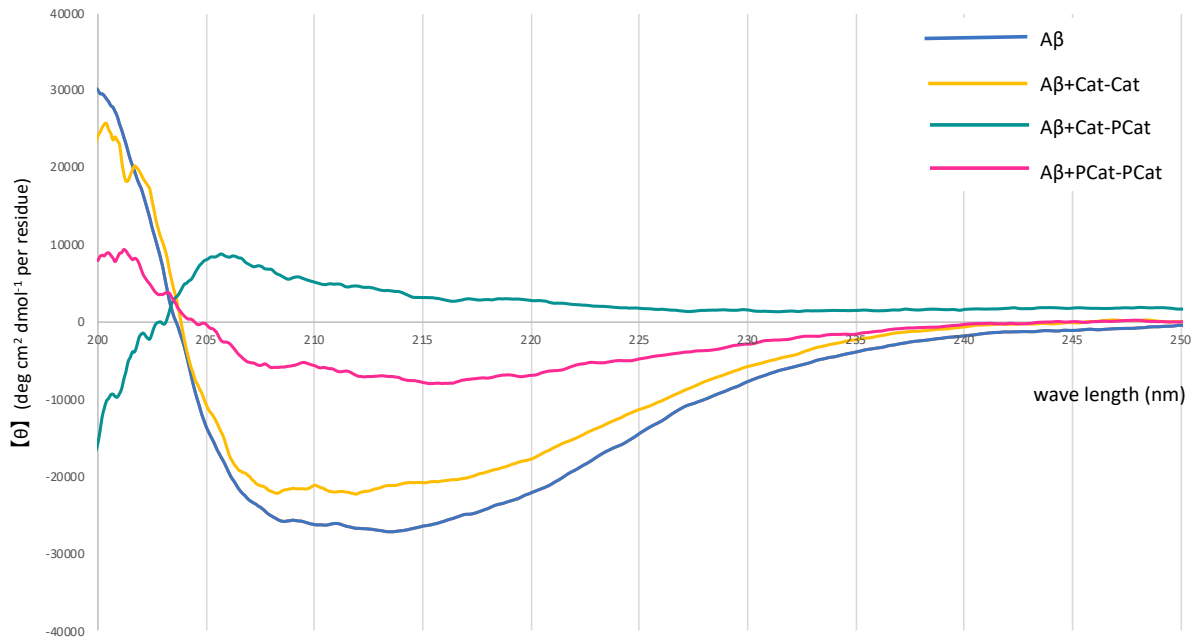


Figure 46. $A\beta$ および $A\beta$ +PA 誘導体における円二色性スペクトル

さらに Th-T 法と同一条件の反応液を 48 時間インキュベーションし、 $A\beta$ 単独の凝集塊及び $A\beta$ 凝集阻害作用が最も高かった PCat-PCat(**18**)を添加した場合の凝集塊を透過電子顕微鏡(TEM)で観察した。Figure 47 の結果から凝集塊の密度が PCat-PCat(**18**)の添加で大幅に低下したことが確認でき、 $A\beta$ の線維化を抑制していることが明らかとなった。またこの作用は SibC(**5**)よりも強力であることが観察できた。

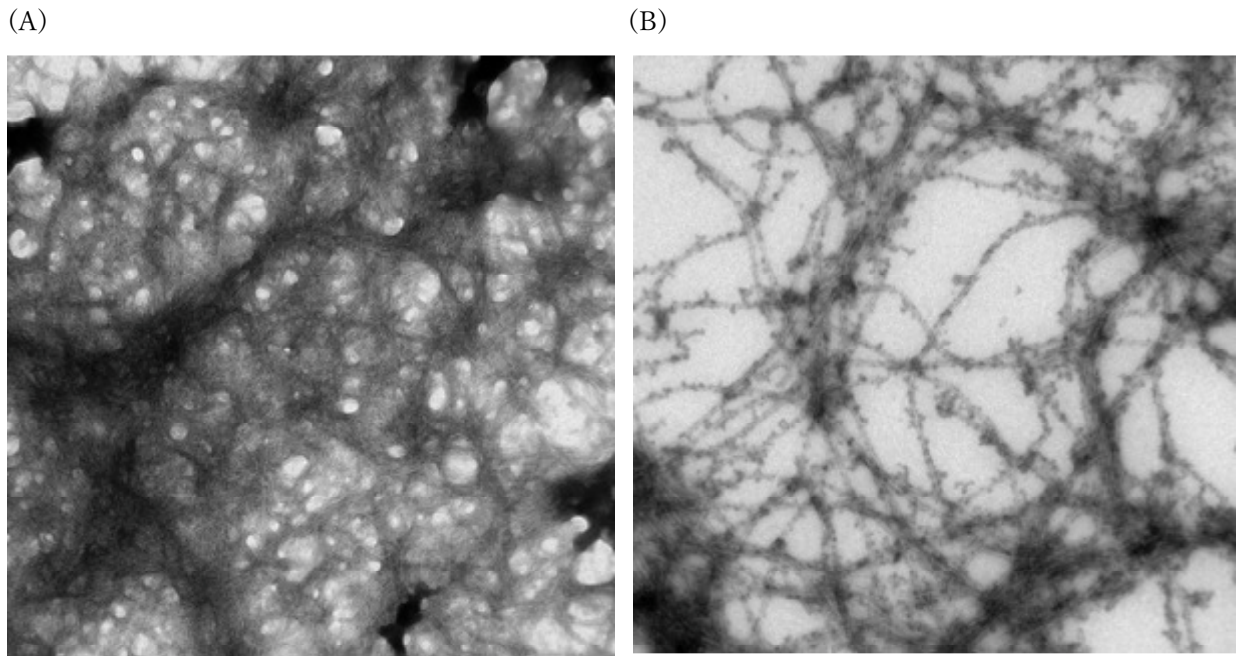


Figure 47. TEM を用いた観察写真 (A) $A\beta$, (B) $A\beta$ +PCat-PCat(**18**)

$A\beta$ は分子内でターン構造を形成することで凝集が開始し、このターン構造を不安定化することによって $A\beta$ 凝集阻害作用を示す化合物が報告されている。これら化合物の最安定化構造は、catechin 分子が環固定化されることにより E 環と B 環が水素結合によって構造がコンパクトにまとまるため、分子全体の平面性は決して高くない。本化合物の構造がコンパクトにまとまっていることから、 $A\beta$ 凝集阻害機構としては $A\beta$ の C 末端との疎水性相互作用ではなく、ターン構造近傍への作用が予測される。

(4-6-2) A β による神経細胞毒性に対する化合物の抑制作用

ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞を用いて、A β による神経細胞毒性に対する PA 誘導体の抑制効果を検討した。はじめに各化合物の細胞毒性を確認したところ、Cat-Cat(**12**)は約 500 μ M, Cat-PCat(**16**), PCat-PCat(**18**)は約 100 μ M まで細胞毒性が観察されなかった(Figure 48)。Sib 誘導体とは異なって、A β による神経細胞毒性に対する抑制作用に PA 誘導体の細胞毒性は大きく影響しないことが予測される。

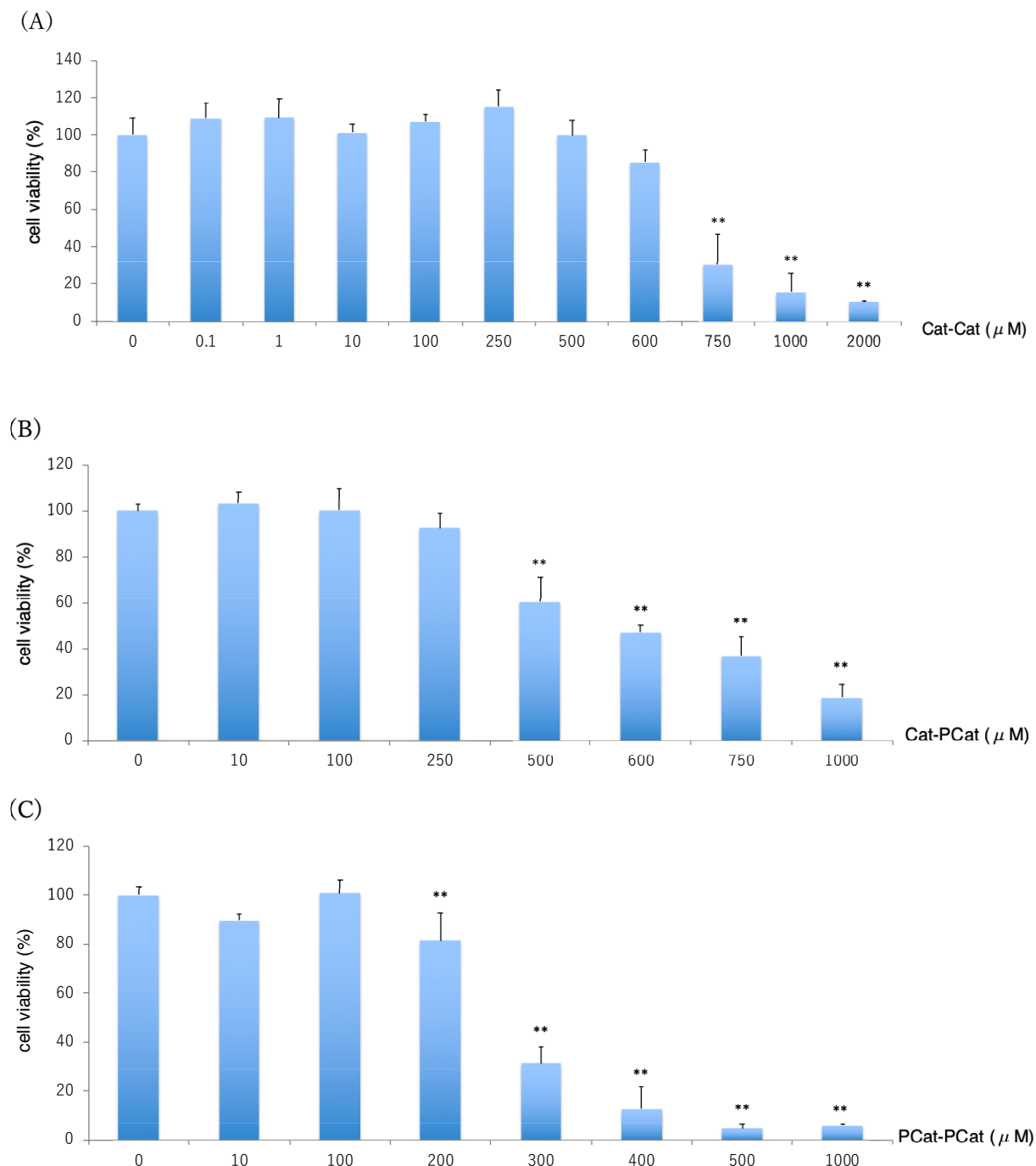


Figure 48. SH-SY5Y における化合物の細胞毒性
(A) Cat-Cat(**12**), (B) Cat-PCat(**16**), (C) PCat-PCat(**18**)

そこで各化合物 10,20, 40 μ M を添加し、A β 15 μ M を添加して惹起させた細胞傷害に対する各化合物の抑制作用を検討した。その結果、Cat-Cat(**12**), Cat-PCat(**16**)は 40 μ M, PCat-PCat(**18**)は 20 μ M の場合に細胞毒性を完全に抑制した(Figure 49)。PCat-PCat(**18**)は A β 凝集阻害活性および抗酸化活性が非常に高いことから、A β の凝集阻害および凝集過程で生じた ROS の消去作用によって神経細胞保護作用が増強したと考えられる。

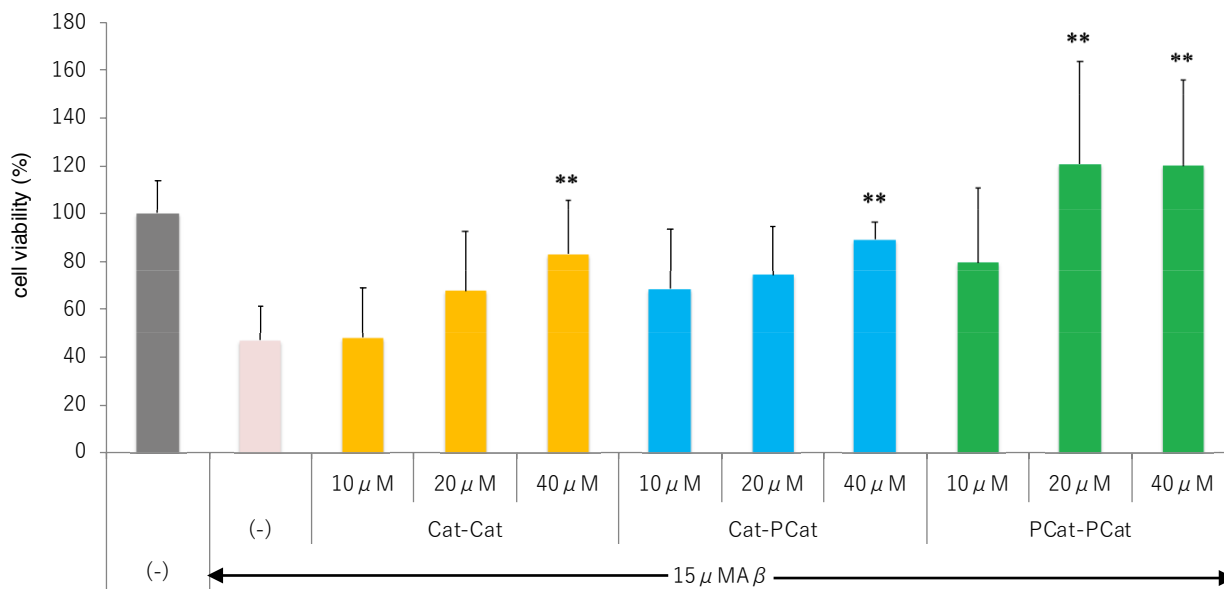


Figure 49. A β による神経細胞毒性に対する各化合物の抑制作用

(4-7) 小括

本節では(+)-catechin の二量体である procyanidin B3(Cat-Cat, **12**)の分子内自由回転を制御すべく、一方および両方の catechin 分子の環を固定化した Cat-PCat(**16**), PCat-PCat(**18**)を合成した。これらの生物活性を評価したところ、特に両方の立体構造を環固定化した PCat-PCat(**18**)については大半の活性が大幅に増強した。本結果より、catechin の平面固定化による自由回転の制御は、単量体だけでなく二量体においても生物活性の増強に有効なことが明らかとなった。catechin の重合体は様々な生物活性を示すとともに細胞毒性が低い。したがって、様々な重合体を本反応を用いて立体構造を固定化することで、安全性の高い医薬品への候補化合物になり得ることが示唆された。

5. 結論

本研究では、フラバン骨格を有する天然ポリフェノールの生物活性増強に有効な構造修飾法として、環を固定化して自由回転を制御する方法を開発した。また本方法による立体構造の固定化反応の創薬化学への有用性を明らかにすることを目的として、天然 catechin 類と分子内にフラバン骨格を有する silibinin および catechin の二量体の立体構造を固定化した化合物を合成しその生物活性の評価を行った。

第2節では oxa-Pictet–Spengler 反応を応用した catechin 類の立体構造固定化反応を開発した。本反応を利用して(+)-catechin および(-)-epicatechin の立体構造固定化反応を行い、良好な収率で PCat(**1**), PEC(**2**)が得られた。これらの活性を評価した結果、抗酸化活性と α -グルコシダーゼ阻害活性が増強した。抗酸化活性の増強については、環固定化反応の際に導入されたアルキル側鎖による電子供与能の増強によるものだと考えられる。 α -グルコシダーゼに対しては、立体構造を固定化した PCat(**1**)と PEC(**2**)の芳香環とヒドロキシ基が活性中心の結合部位に適切に位置していることで親和性が増強し強力な阻害活性を示したと推察される。

第3節では silibinin の分子内自由回転を制御すべく、フラバン骨格を PCat(**1**)および PEC(**2**)に導入した SibC(**5**), SibEC(**6**)を合成した。分子全体の平面性が高い SibC(**5**)において一部の生物活性が増強し、PA 誘導体とは異なりがん細胞増殖抑制作用が顕著に認められた。しかしがん細胞を標的とした場合は、比較的弱い活性となるため、今後は更に強力ながん細胞増殖抑制作用を目指した化合物の設計が必要である。この結果から分子全体の平面性が、生物活性の増強に寄与していることが示唆された。抗酸化活性については、Sib とその誘導体いずれもカテコール構造を有さないことにより、立体構造を固定化しても catechin 誘導体と比較して抗酸化活性が弱いことが考えられる。

第4節では(+)-catechin の二量体である procyanidin B3(Cat-Cat, **12**)の分子内自由回転を制御すべく、一方および両方の catechin 分子を環固定化した Cat-PCat(**16**), PCat-PCat(**18**)を合成した。これらの生物活性を評価したところ、特に両方の立体構造を環固定化したものについては大半の活性が大幅に増強した。本結果より、catechin の重合体についても分子内の catechin 構造を平面に固定化して自由回転を制御することが、各種活性の増強に有効なことが明らかとなった。catechin 重合体は細胞毒性が低いことから、本反応を用いて立体構造を固定化することで安全性の高い医薬品への候補化合物になり得ることが示唆された。

本研究の結果より、フラバン骨格を有する天然ポリフェノールの分子内自由回転を制御することは、各種活性の増強に有用であることが明らかとなった。受容体や標的分子と結合する際に化合物は誘導適合を起こすことが知られている。しかし、分子内を環固定化することで安定性が増すと、誘導適合による活性よりも標的部位との親和性の向上によって活性が増強したと考えられる。加えて安定性が増強することで、エントロピーが減少して標的部位への結合能が高まったことも挙げられる。また化合物の剛直性、平面性、対称性が向上したことにより、脂溶性が増強して標的部位との疎水性相互作用が増強したと考えられる。本研究で開発した分子内環固定化反応は β -アリアルエチルアルコールを有する化合物に対して有効であることから、フラバン骨格以外の構造を有する天然物にも応用が可能である。本反応を利用することで、天然化合物から新たな創薬への可能性が期待される。

Experimental section

General

Unless otherwise noted, all commercially available compounds were used as provided without further purification. Solvents for chromatography were technical grade, and acetonitrile for antioxidant activity measurements was analytical grade. The reactions were monitored by thin-layer chromatography carried out on silica gel plates (TLC silica 60 F254, 0.25 mm, Merck). Column chromatography was performed using silica gel 60 (63-210 μm , KANTO CHEMICALS). The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded with JEOL JNMAL-400 (400 MHz) NMR and Varian 600 MHz NMR spectrometer, using CDCl_3 , CD_3OD , acetone- d_6 or DMSO- d_6 as the solvent and internal reference. High- and low-resolution mass spectra were measured with a JMS-700V (JEOL) under positive FAB conditions. Compound **3**, **4**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12** were synthesized according to the procedure of previous reports.^{46, 47}

Thioflavin-T (Th-T) and 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) were purchased from Sigma-Aldrich Inc. $\text{A}\beta_{1-42}$ (a hydrochloride salt) was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. $\text{A}\beta_{1-42}$ (a trifluoroacetic acid salt) was purchased from Peptide Institute Inc. Prior to experiments, $\text{A}\beta_{1-42}$ was completely dissolved in HFIP using sonication. After dispensing solution into appropriate volumes, the solvent was evaporated and the resultant $\text{A}\beta_{1-42}$ was stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ before usage. Reagents for cell culture were used provided without further purification.

Synthesis of PCat, EPC

(6a*S*,12a*R*)-5,5-dimethyl-5,6a,7,12a-tetrahydroisochromeno[4,3-*b*]chromene-2,3,8,10-tetraol (PCat, **1)**

To the solution of 2.0 g of (+)-catechin (6.89 mmol) and 2.03 mL of acetone (27.56 mmol), in 63 mL of dry THF at -10°C , 1.87 mL of TMSOTf (10.33 mmol) was slowly added. After stirring for 1h at -10°C , 100 mL of sat. NaHCO_3 was added to the reaction mixture and the product was extracted with AcOEt, washed with brine, and then dried over Na_2SO_4 . The resulted residue was evaporated to remove solvent, and was subsequently subjected to a column chromatography over silica gel (200-300 mesh) with toluene / acetone / MeOH (7 : 3 : 0.4) as eluent to give 2.09 g (92% yield) of PCat (**1**) as white solid. ^1H NMR (400MHz, acetone- d_6) δ 7.07 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.05 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz), 5.97 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz), 4.45 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 9.5$ Hz), 3.82 (m, 1H), 2.96 (dd, 1H, $J = 6.0$, 15.0 Hz), 2.49 (dd, 1H, $J = 11.0$, 15.0 Hz), 1.51 (s, 3H), 1.45 (s, 3H); ^{13}C NMR (acetone- d_6) δ 157.5, 157.0, 156.3, 144.5, 135.3, 125.1, 113.0, 112.3, 101.1, 96.5, 96.0, 76.1, 74.1, 67.2, 32.0, 28.5, 28.1; MS (ESI $^+$) m/z 331 (M+H) $^+$

(6a*R*,12a*R*)-5,5-dimethyl-5,6a,7,12a-tetrahydroisochromeno[4,3-*b*]chromene-2,3,8,10-tetraol (PEC, **2)**

To the solution of 415 mg of (-)-epicatechin (1.43 mmol) and 0.42 mL of acetone (5.72 mmol), in 60 mL of dry THF at -20°C , 0.31 mL of TMSOTf (1.72 mmol) was slowly added. After stirring for 14h at -20°C , 50 mL of sat. NaHCO_3 was added to the reaction mixture and the product was extracted with AcOEt, washed with brine, and then dried over Na_2SO_4 . The resulted residue was evaporated to remove solvent, and was subsequently subjected to a column chromatography over silica gel (200-300 mesh) with toluene / acetone / MeOH (7 : 3 : 1) as eluent to give 368 mg (78% yield) of PEC (**2**) as white solid. ^1H NMR (400MHz, acetone- d_6) δ 6.82 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.98 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 5.77 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 4.49 (br s, 1H), 3.65(m, 1H), 2.88 (dd, 1H, $J = 5.2$ Hz, $J = 17.6$ Hz), 2.78 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 18.4$ Hz), 1.46 (s, 3H), 1.37 (s, 3H); ^{13}C NMR (acetone- d_6) δ 156.7, 156.6, 156.0, 146.2, 143.6, 135.4, 124.0, 116.6, 112.1, 98.6, 95.2, 94.9, 75.1, 70.5, 63.6, 31.3, 27.3, 25.6; mp 184-190 $^{\circ}\text{C}$; MS (ESI $^+$) m/z 331 (M+H) $^+$.

Synthesis of SibC (5), SibEC (6)

(7a*S*,13a*R*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-6,6-dimethyl-2,3,6,7a,8,13a-hexahydro-[1,4]dioxino[2',3':6,7]isochromeno[4,3-*b*]chromene-9,11-diol (SibC, 5)

To a mixture of 0.83 g of Ag₂CO₃ (3.0 mmol), PCat (**1**) (0.72 g, 2.0 mmol) and coniferol (**4**) (0.72 g, 4.0 mmol) in a dry flask was added, 90 mL of dry acetone and 24 mL of dry benzene under argon atmosphere. The reaction was stirred at 55°C for 22 h. The reaction mixture was filtrated and was evaporated to remove solvent. The resulted residue was subsequently subjected to a column chromatography over silica gel (200-300 mesh) with CHCl₃ / EtOAc / CH₃CO₂H (50 : 20 : 0.25) as eluent. The combined fractions were then washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated to give 694.5 mg (66% yield) of SibC (**5**) as white solid. ¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ9.36 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.86 (dd, 1H, *J* = 1.8, 8.4 Hz), 6.84 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 6.77 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 5.94 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.47 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 4.15 (m, 1H), 3.78 (ddd, 1H, *J* = 5.4, 8.4, 11.4Hz), 3.76 (s, 3H), 3.51 (m, 1H), 3.33 (m, 1H), 2.83 (dd, 1H, *J* = 5.6, 15.2 Hz), 2.33 (dd, 1H, *J* = 10.8, 15.2 Hz), 1.48 (s, 3H), 1.45 (s, 3H); MS (ESI⁺) *m/z* 509 (M+H)⁺.

(7a*R*,13a*R*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-6,6-dimethyl-2,3,6,7a,8,13a-hexahydro-[1,4]dioxino[2',3':6,7]isochromeno[4,3-*b*]chromene-9,11-diol (SibEC, 6)

To a mixture of 0.41 g of Ag₂CO₃ (1.5 mmol), PEC (**2**) (0.33 g, 1.0 mmol) and coniferol (**4**) (0.36 g, 2.0 mmol) in a dry flask was added, 45 mL of dry acetone and 12 mL of dry benzene under argon atmosphere. The reaction was stirred at 55-60°C for 20 h. The reaction mixture was filtrated and was evaporated to remove solvent. The resulted residue was subsequently subjected to a column chromatography over silica gel (200-300 mesh) with CHCl₃ / EtOAc / CH₃CO₂H (50 : 20 : 0.25) as eluent. The combined fractions were then washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated to give 215.7 mg (41% yield) of SibEC (**6**) as white solid. ¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ9.56 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.88 (dd, 1H, *J* = 1.8, 8.4 Hz), 6.83 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 6.75 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 5.78 (s, 1H), 5.58 (s, 1H), 4.89 (s, 1H), 4.86 (m, 1H), 4.51 (br s, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.65 (m, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 2.80 (dd, 1H, *J* = 5.2, 17.6 Hz), 2.65 (dd, 1H, *J* = 1.6, 18.4 Hz), 1.44 (s, 3H), 1.35 (s, 3H); MS (ESI⁺) *m/z* 509 (M+H)⁺.

Synthesis of Cat-PCat (16)

(6a*S*,12a*R*)-2,3,8,10-tetrakis(benzyloxy)-5,5-dimethyl-5,6a,7,12a-tetrahydroisochromeno[4,3-*b*]chromene (13)

To a solution of **1** (1.65 g, 5.0 mmol) and benzyl bromide (2.97 mL, 5.0 mmol) in dry DMF (50 mL), K₂CO₃ (3.26 g, 5.0 mmol) was added. After stirring overnight at rt, K₂CO₃ was filtered off. The filtrate was diluted with AcOEt, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated. Purification by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂: MeOH = 20 : 1) to give **13** as a white powder (2.73 g, 79.0%): ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.45 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 2.48 (m, 1H), 2.94 (m, 1H), 3.79 (m, 1H), 4.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.07 (br s, 4H), 5.14 (br s, 4H), 6.27 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.25~7.52 (m, 20H); MS (ESI⁺) *m/z* 691 (M+H)⁺.

(2*R*,3*S*,4*S*)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-((6a*S*,12a*R*)-2,3,8,10-tetrakis(benzyloxy)-5,5-dimethyl-5,6a,7,12a-tetrahydroisochromeno[4,3-*b*]chromen-11-yl)chroman-3-yl acetate (14)

To a solution of **13** (1.81 g, 2.62 mmol) and **9** (0.44 g, 0.58 mmol) in dry CH₂Cl₂ (90 mL) under argon atmosphere was added TMSOTf (0.127 mL, 0.697 mmol) at -80°C. After the resulting mixture had been stirred for 10 minutes, quenched with sat. NaHCO₃ (10 mL). The mixture was diluted with CHCl₃. The organic layer was washed with water and sat. NaHCO₃, dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified with silica gel chromatography (toluene : AcOEt = 16 : 1) to give **14** (0.75 g, 94 %): ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.49 – 6.79 (43H, m), 6.67 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 6.60 (0.37H, s), 6.57 (0.63H, s), 6.27 (0.63H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.18 (0.63H, s), 6.16 (0.63H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.06 (0.37H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.04 (0.37H, d, *J* = 2.4 Hz), 5.97 (0.37H, s), 5.38 – 4.48 (19.37H, m), 3.79 (0.37H, ddd, *J* = 6.0, 9.0 and 10.8 Hz), 3.53 (0.63H, ddd, *J* = 6.0, 9.0 and 10.8 Hz), 3.18 (0.37H, dd, *J* = 6.0 and 15.6 Hz), 3.07 (0.63H, d, *J* = 9.0 Hz), 2.96 (0.63H, dd, *J* = 6.0 and 15.6 Hz), 2.67 (0.37H, dd, *J* = 10.8 and 15.6 Hz), 2.25 (0.63H, dd, *J* = 10.8 and 15.6 Hz), 1.56 (1.11H, s), 1.55 (1.89H, s), 1.51 (1.11H, s), 1.49 (1.11, s), 1.42 (1.89H, s), 1.39 (1.89H, s); High resolution-FAB: *m/z* calcd for C₈₉H₇₉O₁₂ [M+H]⁺: 1381.5672; found: 1381.5793.

(2*R*,3*S*,4*S*)-5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-4-((6a*S*,12a*R*)-2,3,8,10-tetrakis(benzyloxy)-5,5-dimethyl-5,6a,7,12a-tetrahydroisochromeno[4,3-*b*]chromen-11-yl)chroman-3-ol (15)

To a solution of **14** (0.42 g, 0.30 mmol) in dry toluene (20 mL) and MeOH (40 mL) under argon atmosphere was added K₂CO₃ (0.84 g, 6.1 mmol) and stirred for 14 days. The reaction mixture was diluted with AcOEt, and then adjusted pH to 5 - 7 with 1 N HCl. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified with silica gel chromatography (toluene : AcOEt = 15 : 1) to give **15**. (60 %, 0.24 g): ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.50 – 6.76 (44H, m), 6.57 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 6.48 (0.48H, s), 6.43 (0.52H, s), 6.24 (0.52H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.13 (0.52H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.01 (0.48H, d, *J* = 2.4 Hz), 5.82 (0.48H, d, *J* = 2.4 Hz), 5.25 – 4.43 (20.96H, m), 4.16 (0.52H, ddd, *J* = 7.2, 8.4 and 9.6 Hz), 3.64 (0.48H, ddd, *J* = 6.0, 9.6 and 10.5 Hz), 3.58 (0.52H, ddd, *J* = 6.0, 9.0 and 10.5 Hz), 3.07 (0.48H, dd, *J* = 6.0 and 15.6 Hz), 2.98 (0.52H, d, *J* = 9.0 Hz), 2.79 (0.52H, dd, *J* = 6.0 and 15.6 Hz), 2.48 (0.48H, dd, *J* = 10.5 and 15.6 Hz), 2.17 (0.52H, dd, *J* = 10.5 and 15.6 Hz), 1.44 (1.56H, s), 1.42 (1.56H, s), 1.37 (1.44H, s), 1.36 (1.44, s); High resolution-FAB: *m/z* calcd for C₃₃H₃₁O₁₂ [M+H]⁺: 619.1816; found: 619.1827.

(6a*S*,12a*R*)-11-((2*R*,3*S*,4*S*)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychroman-4-yl)-5,5-dimethyl-5,6a,7,12a-tetrahydroisochromeno[4,3-*b*]chromene-2,3,8,10-tetraol (16)

A solution of **15** (195 mg, 0.15 mmol) in THF /MeOH /H₂O (20 /1 /1, 22 mL) was hydrogenated in the presence of 20 % Pd(OH)₂/C (33mg) at room temperature. After stirring for 21 h, the catalyst was filtered through Celite. The solvent was concentrated and recrystallized from AcOEt and CH₂Cl₂ mixture to give **1** (56 mg, 60 %): ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.10 – 8.70 (6 H, br), 8.50 (1H, s), 8.43 (1H, s), 7.14 (1H, s), 6.83 (1H, s), 6.66 (2H, s), 6.54 (1H, s), 5.87 (1H, s), 5.71 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 5.62 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 4.47 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 4.35 (1H, ddd, *J* = 7.2, 9.0 and 9.6 Hz), 4.26 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 4.20 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 3.84 (1H, ddd, *J* = 6.6, 9.0 and 10.2 Hz), 2.82 (1H, dd, *J* = 6.6 and 15.6 Hz), 2.34 (1H, dd, *J* = 10.2 and 15.6 Hz), 1.47 (3H, s), 1.41 (3H, s); ¹³C δ NMR 157.55, 156.62, 155.64, 155.17, 153.64, 153.56, 144.98, 144.94, 144.84, 143.94, 133.81, 131.12, 126.69, 123.73, 119.63, 115.05, 111.92, 109.91, 106.81(×2), 99.21, 96.37, 96.13, 94.04, 82.97, 81.08, 73.22, 71.00, 66.33, 37.56, 31.81, 28.17, 28.12; High resolution-FAB: *m/z* calcd for C₃₃H₃₁O₁₂ [M+H]⁺: 619.1816; found: 619.1827.

Synthesis of PCat-PCat (18)

(6a*S*,6'a*S*,7*S*,12a*R*,12'a*R*)-2,2',3,3',8,8',10,10'-octakis(benzyloxy)-5,5,5',5'-tetramethyl-5,5',6a,6'a,7,7',12a,12'a-octahydro-7,11'-biisochromeno[4,3-*b*]chromene (17)

Method 1: TMSOTf (20 μL, 0.10 mmol) was added to a solution of **11** (55 mg, 0.04 mmol) and acetone (25 μL, 0.32 mmol) in dry THF (2 mL) under argon atmosphere at -20°C. The reaction mixture was stirred for 1 h, and then 1.2 eq of TMSOTf was added three times every hour. After the reaction was complete, as monitored by TLC, the mixture was extracted with AcOEt, and the combined organic layer was then washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by silica gel chromatography (toluene: AcOEt = 30:1) to yield **17** (50 mg, 80%).

Method 2: TMSOTf (24 μL, 0.12 mmol) was added to a solution of **15** (108 mg, 0.08 mmol) and acetone (24 μL, 0.32 mmol) in dry THF (4 mL) under argon atmosphere at -20°C. The reaction mixture was stirred for 1 h, followed by addition of 1.5, 3.0, and 3.0 eq of TMSOTf every hour (for 3 h), and the addition of 4.0 eq of acetone an hour later. After the reaction was complete, as monitored by TLC, the mixture was extracted with AcOEt, and the combined organic layer was then washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by silica gel chromatography (toluene:AcOEt = 30:1) to yield **17** (67 mg, 60%).

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆, 25°C): (two rotamers: maj/min 62:38): δ = 7.56-6.89 (m, Ar-H), 6.98 (s, B/E-H, min), 6.91 (s, B/E-H, min), 6.65 (s, B/E-H, min), 6.57 (s, B/E-H, maj), 6.56 (s, B/E-H, maj), 6.54 (s, B/E-H, maj), 6.43 (s, B/E-H, maj), 6.49 (s, B/E-H, min), 6.39 (d, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, 6/8A-H, min), 6.31 (d, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, 6/8A-H, maj), 6.20 (d, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, 6/8A-H, maj), 6.07 (s, 6D-H, maj), 6.06 (d, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, 6/8A-H, min), 6.00 (s, 6D-H, min), 5.43-4.33 (m, CH₂Bn, 2/3/4C-H, maj and min), 4.38 (d, *J*_{2,3} = 9.0 Hz, 2F-H, min), 3.70 (m, 3F-H, maj and min), 3.16 (dd, *J*_{4α,β} and *J*_{3,4β} = 15.6 and 6.3 Hz, 4Fβ-H, min), 3.08 (d, *J*_{2,3} = 9.0 Hz, 2F-H, maj), 3.01 (dd, *J*_{4α,β} and *J*_{3,4β} = 15.6 and 6.3 Hz, 4Fβ-H, maj), 2.58 (dd, *J*_{4α,β} and *J*_{3,4α} = 15.6 and 10.2 Hz, 4Fα-H, min), 2.26 (dd, *J*_{4α,β} and *J*_{3,4β} = 15.6 and 10.2 Hz, 4Fα-H, maj), 1.57, 1.43, 1.42, and 1.26 (s, 12H, CH₃, maj), 1.43, 1.42, 1.25 and 1.13 (s, 12H, CH₃, min).

6a*S*,6'a*S*,7*S*,12a*R*,12'a*R*)-5,5,5',5'-tetramethyl-5,5',6a,6'a,7,7',12a,12'a-octahydro-[7,11'-biisochromeno[4,3-*b*]chromen]-2,2',3,3',8,8',10,10'-octaol (18)

A solution of **17** (60 mg, 0.04 mmol) in THF:MeOH:H₂O = 20:1:1 (8 mL) was hydrogenated at room temperature in the presence of 20% Pd(OH)₂/C (18 mg). After stirring for 6 h until the reaction was complete, as monitored by TLC, the catalyst was filtered through Celite, washed with THF, and the solvent was evaporated to yield **17** (45 mg, 70%). ¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆, 25°C): (two rotamers: maj/min 61:39): δ = 9.12-7.84 (brs, Ar-OH), 8.56 (s, Ar-OH), 8.47 (s, Ar-OH), 7.09 (s, B/E-H, maj), 7.05 (s, B/E-H, min), 6.94 (s, B/E-H, maj), 6.92 (s, B/E-H, min), 6.54 (s, B/E-H, maj), 6.86 (s, B/E-H, min), 6.47 (s, B/E-H, maj), 6.40 (s, B/E-H, min), 6.04 (s, 6D-H, min), 5.89 (d, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, 6/8A-H, min), 5.85 (s, 6D-H, maj), 5.76 (d, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, 6/8A-H, maj), 5.74 (d, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, 6/8A-H, maj), 5.63 (d, *J*_{6,8} = 2.4 Hz, 6/8A-H, min), 4.67 (dd, *J*_{3,4} and *J*_{2,3} = 9.0

and 9.6 Hz, 3C-H, maj), 4.54 (d, $J_{3,4/2,3} = 9.0$ Hz, 2/4C-H, maj), 4.47-4.42 (m, 2C-H, 3C-H, 4C-H, min), 4.40 (d, $J_{3,4/2,3} = 9.6$ Hz, 2/4C-H, maj), 4.24 (d, $J_{2,3} = 9.0$ Hz, 2F-H, maj), 4.10 (d, $J_{2,3} = 9.0$ Hz, 2F-H, min), 3.89 (ddd, $J_{2,3,3,4\alpha}$ and $3,4\beta} = 9.0, 10.2$ and 76.6 Hz, 3F-H, maj), 3.51 (ddd, $J_{2,3,3,4\alpha}$ and $3,4\beta} = 9.0, 10.2$ and 6.6 Hz, 3F-H, min), 2.85 (dd, $J_{4\alpha,\beta}$ and $3,4\beta} = 15.6$ and 6.6 Hz, 4F β -H, maj), 2.77 (dd, $J_{4\alpha,\beta}$ and $3,4\beta} = 15.6$ and 6.6 Hz, 4F β -H, min), 2.27 (dd, $J_{4\alpha,\beta}$ and $3,4\alpha} = 15.6$ and 10.2 Hz, 4F α -H, maj), 2.21 (dd, $J_{4\alpha,\beta}$ and $3,4\alpha} = 15.6$ and 10.2 Hz, 4F α -H, min), 1.49, 1.40, 1.26 and 1.18 (s, 12H, CH₃, maj), 1.34, 1.26, 1.25 and 1.13 (s, 12H, CH₃, min) ppm. HRMS: calcd. for C₃₆H₃₅O₁₂ [M+H]⁺: 659.2129 found 659.2160.

Calculation methods

Ionization potentials (IPs) and the orbital composition of their highest occupied molecular orbitals (HOMOs) were calculated by density functional theory (DFT) methods with B3LYP exchange-correlation functional and the 6-31G(d) basis set using the procedure embedded in Wavefunction (Irvine, CA, U.S.A) Spartan 14. During the calculation, intramolecular hydrogen bond (IHB) was considered to give the most stable conformation of each molecule. IP was obtained by the difference of energy between parent molecule and its cation radical formed by one electron transfer reaction.

Determination of GO• radical scavenging activity

Since the phenoxyl radical generated in the reaction of phenolic antioxidant with radical readily reacts with molecular oxygen, the reaction was carried out under strictly deaerated condition. A continuous flow of argon gas was bubbled through an acetonitrile solution (3.0 mL) containing GO• (4.0×10^{-6} mol dm⁻³) in a square quartz cuvette with a glass tube neck for 10 min. Air was prevented from leaking into the neck of the cuvette with rubber septum. An aliquot of phenolic antioxidant (antioxidant was maintained at more than 10-fold excess to the GO• concentration.), which was dissolved in deaerated acetonitrile, was added to the cuvette with a microsyringe to initiate the reaction with GO•. UV-vis spectral changes associated with the reaction were monitored using an Agilent 8453 photodiode array spectrometer. The rate of the GO• scavenging reaction for each compound was determined by monitoring the absorbance change of GO• at 428 nm ($\epsilon = 1.32 \times 10^5$ mol dm⁻³ cm⁻¹) using a stopped flow technique on a UNISOKU RSP-1000-02NM spectrophotometer. The pseudo first-order rate constants (K_{obs}) were determined by a least-squares curve fit. The first-order plots of $\ln(A - A_\infty)$ versus time (where A and A ∞ denote the absorbance at the reaction time and the final absorbance, respectively) were linear until three or more half-lives, with a correlation coefficient $q > 0.999$.

ESR measurements to detect •OH generated from Fenton reaction

The sample containing 60 μ L of Milli-Q, 30 μ L of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4), 75 μ L of an appropriate concentration of chemicals, 75 μ L of 8 mM FeCl₃, 5 μ L of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) and 60 μ L of 500 mM H₂O₂ was introduced into a quartz flat cell which was placed in the cavity. ESR spectra were recorded on an ESR spectrometer JEOL JES-FR30EX under the following conditions: modulation frequency, 100 kHz; modulation amplitude, 10 G; scan time, 1 min; microwave power, 4 mW; center field, 3360.50 G; and microwave frequency, 9.394 GHz. The scavenging effect of the chemical was evaluated on the basis of the peak height of DMPO-OH radical determined after normalization with the Mn²⁺ reference peak as follows: Scavenging effect (%) = $(h_0 - h_x) / h_0 \times 100$ where h_0 and h_x are the height of the second peak in the ESR spectrum of DMPO-OH spin adduct of the blank and the sample, respectively.

Assay for DNA strand breaks induced by ¹O₂

The effects of novel derivatives on DNA strand breakage were measured in terms of the conversion of supercoiled pBR322 plasmid DNA to the open circular and linear forms. Reaction were carried out in 20 μ L (total volume) of 200 mM Na cacodylate buffer, pH 7.2, containing pBR322 DNA (0.05 μ g/ μ L), 100 μ M rose bengal, and each derivatives. The reaction was started by irradiating light. After irradiating for 10 min, the reaction mixture was then treated with 5 μ L of loading buffer (100 mM TBE buffer, containing 30% glycerol, 0.1% bromophenol blue) and

applied to 1% agarose gel. Horizontal gel electrophoresis was carried out in 50mM TBE buffer, containing 0.1% ethidium bromide. The gels were destained in water for 30min, and photographed with UV transillumination.

Assay for DNA strand breaks induced by •OH

The effects of novel derivatives on DNA strand breakage were measured in terms of the conversion of supercoiled pBR322 plasmid DNA to the open circular and linear forms. Reaction were carried out in 25 μ L (total volume) of phosphate buffer, pH 7.4, containing pBR322 DNA (0.05 μ g/ μ L), 1.57 μ M FeCl₃-EDTA, 63 μ M hypoxanthine, 0.0025U xanthine oxidase and each derivatives. The reaction was started by adding xanthine oxidase, after incubation at 37°C for 15min the reaction mixture was then treated with 5 μ L of loading buffer(100mM TBE buffer, pH8.3, containing 30% glycerol, 0.1% bromophenol blue) and applied to 1% agarose gel. Horizontal gel electrophoresis was carried out in 50mM TBE buffer, containing 0.1% ethidium bromide. The gels were destained in water for 30min, and photographed with UV transillumination.

Assay for α -glucosidase inhibitory activity

The α -glucosidase inhibitory activity was determined by a partial modification of the procedure reported by Matsui *et al.*⁴⁸ The reaction for *S. cerevisiae* α -glucosidase consisted of 900 μ L of 1.11mM 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (PNP-G) in 100mM potassium phosphate buffer (pH7.0), 50 μ L of flavonoid in DMSO and Milli Q and 50 μ L of enzyme solution. After incubation for 20 min at 37°C, the absorbance of 4-nitrophenol released from PNP-G at 405nm was measured.

The concentration of inhibitors required for inhibiting 50% of α -glucosidase activity under the assay conditions was defined as the IC₅₀ value. The IC₅₀ value was measured graphically by a plot of percent inhibition versus log of the test compound.

Thioflavin-T(Th-T) fluorescence assay for inhibition of A β ₁₋₄₂ self-aggregation

A Th-T fluorescence was employed to assess the abilities of the synthesized compounds to inhibit the aggregation of A β ₁₋₄₂. Dispensed A β ₁₋₄₂ (a trifluoroacetic acid salt) was dissolved in 0.3% NH₄OH at 1mM using sonication. The test compounds were prepared at 2mM in DMSO. 25 μ L of 0.2M phosphate buffer (pH 7.4), 64 μ L of Milli Q, 5 μ L of 2.0M NaCl solution, 2 μ L of test compounds and 100 μ L of 20 μ M Th-T in Gly-NaOH buffer (pH9.0) were added in microfuge tubes in order. Then added 4 μ L of A β ₁₋₄₂ solution and 196 μ L of mixture in microfuge tubes in 96-well plate (Non-binding μ Clear, 96well black-microplate, Gbo), incubated at 37°C. After 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8,10, 12h, the fluorescence intensity was measured at 450nm excitation and 485nm emission using Varioskan LUX (Thermo Fischer SCIENTIFIC). Before every measurement, 96-well plate was shaken for 15 seconds.

Circular Dichroism (CD)

The secondary structure of A β ₁₋₄₂ was estimated by CD spectrometry using a 0.1-mm quartz cell (JASCO). Dispensed A β ₁₋₄₂ (a trifluoroacetic acid salt) was dissolved in 0.3% NH₄OH at 200 μ M using sonication, and the test compounds were prepared at 200 μ M in acetonitrile and Milli-Q.

100 μ L of 0.2M phosphate buffer (pH 7.4), 200 μ L of Milli-Q, 20 μ L of 2.0M NaCl solution, 100 μ L of test compounds solution and 40 μ L of A β ₁₋₄₂ solution were added in microfuge tubes in order, then incubated at 37°C. After 4h, an aliquot was loaded into the quartz cell, and CD spectra were recorded at 190-250 nm. The spectra of A β ₁₋₄₂ mutants are shown after subtraction of the spectrum for vehicle alone, and those in the presence of test compounds are shown after subtraction of the spectrum for test compounds alone.

Transmission electron microscopy (TEM)

The aggregates of A β ₁₋₄₂ after 48h incubation were examined under a transmission electron microscope. A β ₁₋₄₂ solution with or without PCat-PCat(**18**) was prepared as described in Th-T assay and incubated at 37°C for 48h. After centrifugation at 4°C for 10 min, the supernatant was removed from the pellets and gently mixed. The suspensions were applied to a film and dried in air before negatively stained for a few minutes, with 2% uranyl acetate. The aggregates were examined with transmission electron microscope (Hitachi, H7600).

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm standard deviation (SD). Differences between samples and paired controls were analyzed using the two-tailed Student's *t*-test. *P* < 0.01 was considered statistically significant. In multiple comparisons, data were analyzed using one-way ANOVA with *post hoc* Dunnett or Bonferroni tests to identify data sets that differed from control data.

Cell culture

Cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), Lonza (Walkersville, MD, USA) or RIKEN BioResource Research Center (Tsukuba, Japan) and maintained according to the instruction. (Table 9) Human mammary epithelial cells (HMEC) were purchased from Lonza (Walkersville, MD, USA) and cultured according to the procedure.⁴⁹ They were grown in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

origin	cell line	cell bank	culture method
breast cancer	MCF-7	ATCC [®] HTB-22 TM	DMEM (1.0 g/L glucose), 10% FBS
colon cancer	HCT116	RCB2979	DMEM (4.5 g/L glucose), 10% FBS
neuroblastoma	SH-SY5Y	ATCC [®] CRL-2266 TM	DMEM/ Ham's F12, 10% FBS

Table 9. List of cancer cell lines.

Cytotoxicity of novel derivatives and their protective effect against A β ₁₋₄₂ neurotoxicity

Cell viability was determined using MTT assay or calcein-AM. Briefly, cells were plated at 10,000-20,000 cells per well on 96-well plates and incubated overnight in CO₂ incubator to allow for attachment. After treatment with compounds in the presence and absence of A β , cells were incubated for 48 hr in CO₂ incubator. Cell viability was determined using WST-8 (DOJINDO) or Cell Counting Kit-F (DOJINDO) according to the manufacturer's instructions.

Assay for cell cycle of cancer cells

After treatment of compounds for 48 h, cells were washed with PBS, and fixed with 70% EtOH in PBS for 10 min. Cells were washed with PBS and incubated with PI (40 μ g/mL) and RNase (0.1 mg/mL) for 30 min with protection from light at 37°C. After washing, images were acquired for DNA content analysis with CQ1 quantitative confocal image cytometer. (Yokogawa Electric Corporation) The DNA histograms were obtained and analyzed in terms of cell cycle distribution with Cellpathfinder analysis software. (Yokogawa Electric Corporation)

Flow cytometry

This assay was demonstrated according to the procedure for the paper of Ishikawa *et al.*⁴⁹

参考文献

1. Okamura, K.; Tsubokawa, T.; Johshita, H.; Miyazaki, H.; Shiokawa, Y., Edaravone, a free radical scavenger, attenuates cerebral infarction and hemorrhagic infarction in rats with hyperglycemia. *Neurol Res* **2014**, *36* (1), 65-9.
2. Xing, L.; Zhang, H.; Qi, R.; Tsao, R.; Mine, Y., Recent Advances in the Understanding of the Health Benefits and Molecular Mechanisms Associated with Green Tea Polyphenols. *J Agric Food Chem* **2019**, *67* (4), 1029-1043.
3. Jin, T.; Song, Z.; Weng, J.; Fantus, I. G., Curcumin and other dietary polyphenols: potential mechanisms of metabolic actions and therapy for diabetes and obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2018**, *314* (3), E201-e205.
4. Sharma, A.; Kaur, M.; Katnoria, J. K.; Nagpal, A. K., Polyphenols in Food: Cancer Prevention and Apoptosis Induction. *Curr Med Chem* **2018**, *25* (36), 4740-4757.
5. Rodriguez-Garcia, C.; Sanchez-Quesada, C.; J, J. G., Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants (Basel)* **2019**, *8* (5).
6. Dunn, S.; Vohra, Ravinder S.; Murphy, Jane E.; Homer-Vanniasinkam, S.; Walker, John H.; Ponnambalam, S., The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease. *Biochemical Journal* **2008**, *409* (2), 349-355.
7. Nagase, M.; Hirose, S.; Sawamura, T.; Masaki, T.; Fujita, T., Enhanced Expression of Endothelial Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor (LOX-1) in Hypertensive Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *237* (3), 496-498.
8. Chen, H.; Li, D.; Sawamura, T.; Inoue, K.; Mehta, J. L., Upregulation of LOX-1 Expression in Aorta of Hypercholesterolemic Rabbits: Modulation by Losartan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, *276* (3), 1100-1104.
9. Chen, M.; Nagase, M.; Fujita, T.; Narumiya, S.; Masaki, T.; Sawamura, T., Diabetes Enhances Lectin-like Oxidized LDL Receptor-1 (LOX-1) Expression in the Vascular Endothelium: Possible Role of LOX-1 Ligand and AGE. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *287* (4), 962-968.
10. Chen, M.; Kakutani, M.; Minami, M.; Kataoka, H.; Kume, N.; Narumiya, S.; Kita, T.; Masaki, T.; Sawamura, T., Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, *20* (4), 1107-15.
11. YOSHIDA, H.; KONDRATENKO, N.; GREEN, S.; STEINBERG, D.; QUEHENBERGER, O., Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochemical Journal* **1998**, *334* (1), 9-13.
12. Chen, M.; Kakutani, M.; Naruko, T.; Ueda, M.; Narumiya, S.; Masaki, T.; Sawamura, T., Activation-Dependent Surface Expression of LOX-1 in Human Platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *282* (1), 153-158.
13. Chen, X., Role of intraoperative transesophageal echocardiography in coronary artery bypass grafting. *Journal of Nanjing Medical University* **2007**, *21* (1), 1-7.
14. Nishizuka, T.; Fujita, Y.; Sato, Y.; Nakano, A.; Kakino, A.; Ohshima, S.; Kanda, T.; Yoshimoto, R.; Sawamura, T., Procyranidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **2011**, *87* (3), 104-113.
15. Barage, S. H.; Sonawane, K. D., Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **2015**, *52*, 1-18.
16. Bui, T. T.; Nguyen, T. H., Natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* **2017**, *28* (5), 413-423.

17. Freyssin, A.; Page, G.; Fauconneau, B.; Rioux Bilan, A., Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases. *Neural Regen Res* **2018**, *13* (6), 955-961.
18. Curti, V.; Di Lorenzo, A.; Dacrema, M.; Xiao, J.; Nabavi, S. M.; Daglia, M., In vitro polyphenol effects on apoptosis: An update of literature data. *Seminars in Cancer Biology* **2017**, *46*, 119-131.
19. Qadir, M. I.; Naqvi, S. T.; Muhammad, S. A., Curcumin: a Polyphenol with Molecular Targets for Cancer Control. *Asian Pac J Cancer Prev* **2016**, *17* (6), 2735-9.
20. Yang, C. S.; Wang, H., Cancer Preventive Activities of Tea Catechins. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2016**, *21* (12).
21. Hogan, F. S.; Krishnegowda, N. K.; Mikhailova, M.; Kahlenberg, M. S., Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *J Surg Res* **2007**, *143* (1), 58-65.
22. Xu, J. C.; Zhou, X. P.; Wang, X. A.; Xu, M. D.; Chen, T.; Chen, T. Y.; Zhou, P. H.; Zhang, Y. Q., Cordycepin Induces Apoptosis and G2/M Phase Arrest through the ERK Pathways in Esophageal Cancer Cells. *J Cancer* **2019**, *10* (11), 2415-2424.
23. Guasch-Ferre, M.; Merino, J.; Sun, Q.; Fito, M.; Salas-Salvado, J., Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, 6723931.
24. Park, K. D.; Cho, S. J., Synthesis and antimicrobial activities of 3-O-alkyl analogues of (+)-catechin: improvement of stability and proposed action mechanism. *Eur J Med Chem* **2010**, *45* (3), 1028-33.
25. Song, J. M.; Park, K. D.; Lee, K. H.; Byun, Y. H.; Park, J. H.; Kim, S. H.; Kim, J. H.; Seong, B. L., Biological evaluation of anti-influenza viral activity of semi-synthetic catechin derivatives. *Antiviral Research* **2007**, *76* (2), 178-185.
26. Hayes, C. J.; Whittaker, B. P.; Watson, S. A.; Grabowska, A. M., Synthesis and preliminary anticancer activity studies of C4 and C8-modified derivatives of catechin gallate (CG) and epicatechin gallate (ECG). *J Org Chem* **2006**, *71* (26), 9701-12.
27. Dutta, S.; Basak, A.; Dasgupta, S., Synthesis and ribonuclease A inhibition activity of resorcinol and phloroglucinol derivatives of catechin and epicatechin: Importance of hydroxyl groups. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (17), 6538-6546.
28. Ohmori, K.; Ushimaru, N.; Suzuki, K., Oligomeric catechins: an enabling synthetic strategy by orthogonal activation and C(8) protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (33), 12002-7.
29. Kajiya, K.; Hojo, H.; Suzuki, M.; Nanjo, F.; Kumazawa, S.; Nakayama, T., Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their interaction with a model membrane. *J Agric Food Chem* **2004**, *52* (6), 1514-9.
30. Grzesik, M.; Naparło, K.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartosz, I., Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food chemistry* **2018**, *241*, 480-492.
31. Meena, K. P.; Vijayakumar, M. R.; Dwibedy, P. S., Catechin-loaded Eudragit microparticles for the management of diabetes: formulation, characterization and in vivo evaluation of antidiabetic efficacy. *Journal of microencapsulation* **2017**, *34* (4), 342-350.
32. Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W., Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92* (17), 5216-8.
33. 寺尾 純., 生体における一重項酸素の生成と消去—酸化ストレスとの関わりを考える—。 *ビタミン* **2016**, *90* (11), 525-536.
34. Alasmary, F. A. S.; Alnahdi, F. S.; Ben Bacha, A.; El-Araby, A. M.; Moubayed, N.; Alafeefy, A. M.; El-Araby, M. E., New quinoxalinone inhibitors targeting secreted phospholipase A2 and alpha-glucosidase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2017**, *32* (1), 1143-1151.

35. Duan, S.; Guan, X.; Lin, R.; Liu, X.; Yan, Y.; Lin, R.; Zhang, T.; Chen, X.; Huang, J.; Sun, X.; Li, Q.; Fang, S.; Xu, J.; Yao, Z.; Gu, H., Silibinin inhibits acetylcholinesterase activity and amyloid beta peptide aggregation: a dual-target drug for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **2015**, *36* (5), 1792-807.
36. Lu, P.; Mamiya, T.; Lu, L. L.; Mouri, A.; Zou, L.; Nagai, T.; Hiramatsu, M.; Ikejima, T.; Nabeshima, T., Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *British journal of pharmacology* **2009**, *157* (7), 1270-7.
37. Yang, L. X.; Huang, K. X.; Li, H. B.; Gong, J. X.; Wang, F.; Feng, Y. B.; Tao, Q. F.; Wu, Y. H.; Li, X. K.; Wu, X. M.; Zeng, S.; Spencer, S.; Zhao, Y.; Qu, J., Design, synthesis, and examination of neuron protective properties of alkenylated and amidated dehydro-silybin derivatives. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52* (23), 7732-52.
38. Antus, S.; Gottsegen, á.; Baitz-Gács, E.; Bauer, R.; Seligmann, O.; Wagner, H., Regioselective Synthesis of 2-and 3-Aryl-1,4-benzodioxanes. *Liebigs Annalen der Chemie* **1989**, *1989* (12), 1147-1151.
39. Yin, F.; Liu, J.; Ji, X.; Wang, Y.; Zidichouski, J.; Zhang, J., Silibinin: a novel inhibitor of Abeta aggregation. *Neurochemistry international* **2011**, *58* (3), 399-403.
40. Sciacca, M. F. M.; Romanucci, V.; Zarrelli, A.; Monaco, I.; Lolicato, F.; Spinella, N.; Galati, C.; Grasso, G.; D'Urso, L.; Romeo, M.; Diomede, L.; Salmona, M.; Bongiorno, C.; Di Fabio, G.; La Rosa, C.; Milardi, D., Inhibition of Abeta Amyloid Growth and Toxicity by Silybins: The Crucial Role of Stereochemistry. *ACS Chem Neurosci* **2017**, *8* (8), 1767-1778.
41. Si, L.; Liu, W.; Hayashi, T.; Ji, Y.; Fu, J.; Nie, Y.; Mizuno, K.; Hattori, S.; Onodera, S.; Ikejima, T., Silibinin-induced apoptosis of breast cancer cells involves mitochondrial impairment. *Arch Biochem Biophys* **2019**, *671*, 42-51.
42. Bagchi, D.; Garg, A.; Krohn, R. L.; Bagchi, M.; Tran, M. X.; Stohs, S. J., Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **1997**, *95* (2), 179-89.
43. Jia, Z.; Song, Z.; Zhao, Y.; Wang, X.; Liu, P., Grape seed proanthocyanidin extract protects human lens epithelial cells from oxidative stress via reducing NF- κ B and MAPK protein expression. *Molecular Vision* **2011**, *17*, 210-217.
44. Lian, Q.; Nie, Y.; Zhang, X.; Tan, B.; Cao, H.; Chen, W.; Gao, W.; Chen, J.; Liang, Z.; Lai, H.; Huang, S.; Xu, Y.; Jiang, W.; Huang, P., Effects of grape seed proanthocyanidin on Alzheimer's disease in vitro and in vivo. *Exp Ther Med* **2016**, *12* (3), 1681-1692.
45. Saito, A.; Nakajima, N.; Tanaka, A.; Ubukata, M., Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 2: Stereoselective gram-scale synthesis of procyanidin-B3. *Tetrahedron* **2002**, *58* (39), 7829-7837.
46. Mizuno, M.; Nakanishi, I.; Matsumoto, K. I.; Fukuhara, K., Enhanced radical scavenging activity of a procyanidin B3 analogue comprised of a dimer of planar catechin. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2017**, *27* (22), 5010-5013.
47. Mizuno, M.; Nakanishi, I.; Matsubayashi, S.; Imai, K.; Arai, T.; Matsumoto, K. I.; Fukuhara, K., Synthesis and antioxidant activity of a procyanidin B3 analogue. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2017**, *27* (4), 1041-1044.
48. Matsui, T.; Yoshimoto, C.; Osajima, K.; Oki, T.; Osajima, Y., In Vitro Survey of α -Glucosidase Inhibitory Food Components. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1996**, *60* (12), 2019-2022.
49. Ishikawa, F.; Ushida, K.; Mori, K.; Shibamura, M., Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line under atypical focal adhesion kinase signaling. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1619.

謝辞

本研究を行うにあたり、実験の細部にわたり直接的なご指導、ご鞭撻を賜りました昭和大学薬学部薬品製造化学部門 福原潔教授に感謝いたします。

東京大学薬学部での学位取得の機会を与えていただき、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学定量生命科学研究所 橋本祐一教授に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、生物試験に関して細部にわたるご指導・ご助言を賜りました昭和大学薬学部 腫瘍細胞生物学部門 森一憲講師、柴沼質子教授に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、抗酸化活性の速度論的解析についてご指導・ご助言を賜りました国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部 中西郁夫博士、松本謙一郎博士に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、CD 測定についてご指導・ご助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 出水庸介博士、三澤隆史博士に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、TEM を用いた $A\beta$ 繊維の撮影についてご指導・ご助言を賜りました昭和大学医学部 電子顕微鏡室 高木孝士講師に感謝いたします。

最後に研究活動を行うにあたり、ご指導・ご助言を賜りました昭和大学薬学部 薬品製造化学部門 太田公規准教授、研究活動を支えていただきました当研究室に配属された学部学生に感謝いたします。

令和元年 11 月 13 日

水野美麗