

論文の内容の要旨

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

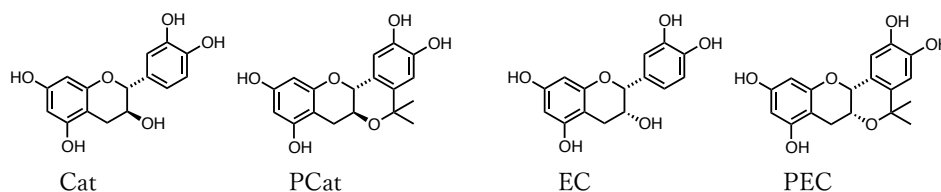
1. 目的

天然抗酸化物質は、高い抗酸化作用のみならず多様な生理活性を有することが知られている。resveratrol がその一例で、抗酸化作用だけでなく抗がん作用や抗糖尿病作用など多岐にわたる生理活性を有しており、サプリメントとして市場に流通している。この他にも、天然抗酸化物質を主成分として健康増進を謳ったサプリメントが多く販売されているが、いずれも治療効果を示すに十分な活性を示さず、医薬品としての実用化は難しい。多くのフェノール性抗酸化物質は分子内に自由回転できる結合軸を有しており、立体構造の自由度の高さが生体応答に影響することが示唆される。我々は分子内の自由回転を制御することで、創薬標的となる生体分子への親和性を高めることが可能ではないかと考えた。本研究では、catechin 類の立体構造固定化に有用な環固定化反応を開発した。また本反応を用いて、catechin と同様のフラバン骨格を有し多様な生理活性を持つ silibinin、proanthocyanidin (procyanidin B3) の分子内自由回転を制御した化合物を合成した。これらの化合物について生物活性の評価を行い、フェノール性抗酸化物質の立体構造固定化反応の創薬化学における有用性を明らかにした。

2. フェノール性抗酸化物質の立体構造固定化

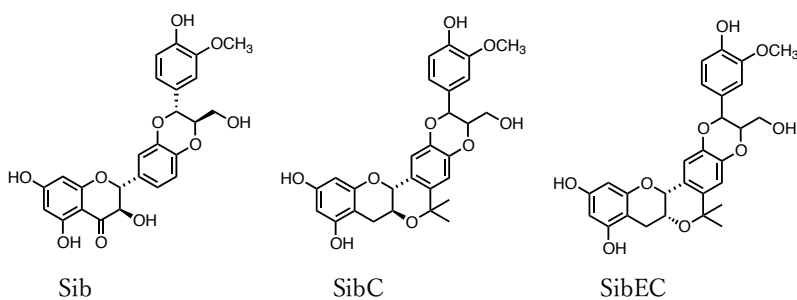
catechin 類の環固定化反応

(+)-catechin(Cat)を THF に溶解し、TMSOTf 存在下、acetone を反応させたところ、カテコール構造が固定化された化合物(PCat)を定量的に得ることができた。Cat のエピ体である (-)-epicatechin(EC)についても同様の方法で環固定化体(PEC)を合成できた。合成した各化合物の最安定化構造を DFT 法で算出したところ、PCat は分子全体の平面性が非常に高く、一方 PEC は分子全体が折れ曲がった構造をとることが明らかとなった。



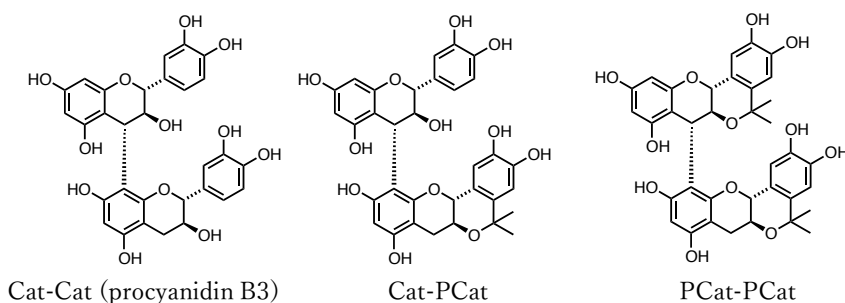
silibinin(Sib)の環固定化

Sib の分子内自由回転を制御するために、PCat 及び PEC の導入を試みた。合成は以下の通りである。vanillin を出発物質として、Wittig 反応によりエステル側鎖を導入した。これを LAH 還元によりアルコール体へと変換したのち、PCat および PEC を炭酸銀を用いた酸化的カップリング反応により縮合し、SibC 及び SibEC を合成した。最安定化構造を算出したところ、Sib に PCat を導入した SibC は分子全体の平面性が非常に高まり、PEC を導入した SibEC は平面性が乏しい結果となった。



procyanidin B3 の環固定化

本研究では血液脳関門への透過性を考慮して、(+)-catechin の二量体である procyanidin B3(Cat-Cat)に着目し、一方及び両方の分子内自由回転を制御した Cat-PCat, PCat-PCat を設計した。Saito A.らによって報告された procyanidin B3 の合成方法¹ 及び PCat の合成方法に倣って、Cat-PCat, PCat-PCat を合成した。これらの最安定化構造は、分子内を環化することで catechin 2 分子のカテコール同士が水素結合を形成して、分子全体がコンパクトにまとまること が明らかとなった。



3. 抗酸化活性

活性酸素のモデル化合物であるガルビノキシラジカルに対する各化合物のラジカル消去反応について速度論的解析を行った。その結果 catechin 類の環固定化反応により、ラジカル消去活性が大幅に増強した。Cat と比較して EC の方が高い抗酸化活性を有しているが、環固定化体についても同様に PCat より PEC の方が高い活性を示した。また、Cat-Cat 誘導体においても環固定化することでラジカル消去活性が増強した。

次に、 $\bullet\text{OH}$ に対する消去作用を ESR スピントラップ法により解析し、 $\bullet\text{OH}$ による DNA 酸化的傷害の抑制作用についてアガロース電気泳動法により検討した。この結果、catechin 誘導体と Sib 誘導体は環固定化反応により、 $\bullet\text{OH}$ 消去作用が増強した。一方、 $\bullet\text{OH}$ による DNA 酸化的損傷は化合物間による差がほぼ認められなかった。Sib 誘導体は catechin 誘導体や Cat-Cat 誘導体と比べて弱い抗酸化活性を示した。これは分子内にカテコール構造を有していないのが原因と考えられる。catechin 誘導体や Cat-Cat 誘導体の抗酸化活性が増強した要因として、環固定化反応の際に導入されたアルキル基の電子供与作用によって、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。実際、HOMO は環を固定化するとカテコール構造に局在することが示された。

4. α -グルコシダーゼ阻害活性

catechin 類、Sib は糖尿病に対する予防作用が報告されている²が、詳細な機序は不明瞭な部分が多い。本研究では糖尿病の創薬標的となる α -グルコシダーゼに対する各化合物の阻害活性を測定し、IC₅₀ 値を算出した。その結果、環固定化反応により分子内の自由回転を制御しかつ分子全体の平面性が高い SibC が最も阻害活性が高いことが明らかとなった。この阻害活性と立体構造の相関を明らかにすべく、本研究で使用した基質である *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (PNP-G) の最安定化構造を算出した。その結果、PNP-G の立体配置と類似した構造を有する化合物において活性が増強していることが示唆された。

	Cat	EC	PCat	PEC	Sib	SibC	SibEC	Cat-Cat	Cat-PCat	PCat-PCat
IC ₅₀ (μ M)	>100	>100	73.1	54.1	16.0	2.4	28.1	33.8	6.4	5.4

5. がん細胞増殖抑制作用

catechin 類や Sib のがん細胞増殖抑制作用が報告されている。^{3,4}そこで本研究ではヒト乳がん(MCF-7)やヒト結腸腺がん(HCT116)に対する各化合物の細胞増殖抑制作用を検討した。各化合物 25, 50 μ M を細胞に添加して、48 時間後の細胞生存率を MTT assay により評価した。その結果、Cat-Cat とその誘導体には顕著な細胞毒性は観察されず、分子全体の平面性が高い SibC に強力な抑制作用が観察された。分子全体の平面性が高く細胞増殖抑制作用を有する化合物として、微小管阻害薬であるバクリタキセル、DNA インタカレーターとして作用するエチジウムブロミドが知られている。そこでこれらと同様の作用を SibC が有すると予測し、細胞周期への影響を検討した。その結果 G1 期での停止作用が確認されたことにより、予測とは異なった機序が考えられる。

6. アミロイド β (A β) に対する作用

アルツハイマー病の一因に、A β 凝集による老人斑の形成があげられる。この凝集を阻害する化合物として多くのポリフェノールが報告されている。⁵ A β 凝集に対する各化合物の阻害作用を、Thioflavin T 法を用いて検討した。各化合物 10~20 μ M に対して、A β ₁₋₄₂ 20 μ M を添加し、それらの蛍光強度を継時的に測定した。Sib 誘導体は、分子全体の平面性が高い SibC に顕著な凝集阻害活性が確認された。二量体である Cat-Cat とその誘導体についても、環固定化反応によって阻害活性が増強した。単量体である Cat, PCat についても検討したところ、PCat の方が阻害活性が強く、二量体の方がさらに強力な阻害活性を示した。次に、強い阻害活性が見られた化合物について、A β ₁₋₄₂ の凝集過程で形成される β シート構造に対する各化合物の作用を明らかにすべく、円二色性スペクトルを測定して解析した。その結果、いずれも A β ₁₋₄₂ による β -シート構造の形成を阻害していることが明らかとなった。

A β 凝集において産生される凝集塊およびその過程で発生する活性酸素は、神経細胞を傷害してアルツハイマー病の症状が進展する。A β ₁₋₄₂ 凝集による神経細胞毒性に対する各化合物の抑制作用を、ヒト神経芽細胞種である SH-SY5Y を用いて評価した。Sib 誘導体は低濃度から細胞毒性が観察されたことにより、A β ₁₋₄₂ (20 μ M) で惹起した神経細胞毒性の抑制に十分な濃度での

実験を行うことができなかった。一方、Cat-Cat と Cat-PCat については $A\beta_{1-42}$ (15 μM) による神経細胞毒性に対して 40 μM 添加することで完全な抑制作用を示し、PCat-PCat については 20 μM で完全に抑制した。環固定化によって、 $A\beta$ 凝集阻害作用およびその過程で発生する活性酸素の消去作用が増強したため、神経細胞毒性を強力に抑制したと考えられる。

7. 結論

本研究において、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なった。その結果、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し、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、環固定化体は化合物の剛直性、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。

参考文献

1. 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.
2. 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.
3. Yang, C. S.; Wang, H., Cancer Preventive Activities of Tea Catechins. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2016**, *21* (12).
4. 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.
5. Freysson, 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.