

- Honzawa, Hitoshi Takayanagi, Toshiro Kozono, Masahiko Matsumoto, Masayuki Ohmori, Naoki Miyata, Hiroaki Takayama, Atsushi Kittaka, *J. Org. Chem.*, **69**(22), 7463-7471(2004).
- 14) Internal harmonization of names, structures and chemical names of drugs listed in Japanese pharmacopoeia III, Naoki Miyata, Tetsuya Nakano, Nana Kawasaki, Uchida Eriko, Haruko Taki, Shikiko Hasegawa, Michiko Yamamoto, *Iyakuhin Kenkyu*, **35**(12), 627-637 (2004).
- 15) Polyhydroxyfullerenes as neuro-protectants, Naoki Miyata, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2004) 9 pp. CODEN: JKXXAF JP 2004231595.
- 16) NO-release ability and DNA-damage activity of aromatic N-nitroso compounds, Masayuki Tanno, Shoko Sueyoshi, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, Haruhiro Okuda, *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, **122**, 10-15 (2004).
2. 関連する学会発表
(2004.4-2005.3)
- 1) 活性窒素修飾によるシクロムCの α シヌクレイン重合反応活性の亢進、中川秀彦, 中島朝子, 伊古田暢夫, 宮田直樹, 小澤俊彦, 第26回日本フリーラジカル学術集会、山形、2004年、6月24日。
- 2) N-オキシドの化学嫌氣的条件下でのヒドロキシラジカルの生成とDNA切断活性、福原 潔, 中西郁夫, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 宮田直樹, 奥田晴宏, Sydney M. Hecht, 第26回日本フリーラジカル学術集会、山形、2004年、6月24日。
- 3) 脂溶性平面型カテキン誘導体の合成と抗酸化能、福原 潔, 中西郁夫, 袴田 航, 川島知憲, 今井耕平, 金澤秀子, 浦野四朗, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, 第26回日本フリーラジカル学術集会、山形、2004年、6月25日。
- 4) 新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の設計・合成と酵素活性評価、松浦梓、長野友紀、鈴木孝禎、幸田光復、宮田直樹、第50回日本薬学会東海支部大会、名古屋、2004年、7月3日。
- 5) ペプチドN末端へのフラレン導入試薬の合成、津元裕樹、幸田光復、宮田直樹、第50回日本薬学会東海支部大会、名古屋、2004年、7月3日。
- 6) Synthesis and Biological Activity of Thio-Based Small Molecule Inhibitors of Human Histone Deacetylases, Takayoshi Suzuki, Akiyasu Kouketsu, Azusa Matuura, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, 15th Conference on Organic Chemistry (IUPAC ICOS-15), Nagoya, August, 3, 2004.
- 7) Gene expression profiles in liver of thiazolidinedione-treated mice and consideration on mechanisms for troglitazone hepatotoxicity, Y. Luan, R. Palanisamy, A. Kohara, S. Ninomiya, N. Miyata, M. Honma, T. Yamaguchi and T. Suzuki, Toxicogenomics International Forum 2004, Kyoto, October, 12-13, 2004.
- 8) 新規非ヒドロキサム酸系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の設計と合成、鈴木孝禎、松浦 梓、額額章泰、中川秀彦、宮田直樹、第30回反応と合成の進歩シンポジウム、札幌、2004年、10月20日

- 9) ニトロベンゼン構造を有する光誘起一酸化窒素発生剤の開発, 長江 修、加藤友香、鈴木孝禎、中川秀彦、福原 潔、宮田直樹、第 30 回反応と合成の進歩シンポジウム、札幌、2004 年、10 月 20 日。
- 10) 新規非ヒドロキサム酸系ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の設計、合成と生物活性評価, 鈴木孝禎、長野友紀、瀨瀬章泰、松浦梓、中川秀彦、宮田直樹、第 23 回メディカルケミストリーシンポジウム、つくば、2004 年、11 月 24 日。
- 11) 光誘起型 NO 発生剤としてのニトロベンゼン誘導体の創製, 加藤友香、長江修、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、名古屋大学 COE プログラム第 2 回有機化学若手研究会、名古屋、2004 年 11 月 26 日。
- 12) チオール系ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の合成と活性評価, 瀨瀬章泰、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、名古屋大学 COE プログラム第 2 回有機化学若手研究会、名古屋、2004 年 11 月 26 日。
- 13) 質量分析を用いたタンパク質の同定と相対的定量のための N 末端修飾試薬の開発, 津元裕樹、田口良、幸田光復、宮田直樹、名古屋大学 COE プログラム第 2 回有機化学若手研究会、名古屋、2004 年 11 月 26 日。
- 14) 緑黄色野菜抽出物による 8-OH-dG の抑制効果, 世良暢之、福原潔、常磐寛、内海英雄、佐々木茂貴、中西洋一、宮田直樹、嵯峨井勝、第 33 回日本環境変異学会、長崎、2004 年、11 月 30 日。
- 15) 多価イオンによるリポソーム相分離現象を利用したリン脂質極性基酸化障害のモデル化と各種抗酸化剤の評価, 永坂憲、中川秀彦、藤代真紀子、伊古田暢夫、小澤俊彦、宮田直樹、第 51 回日本薬学会東海支部例会、静岡、12 月 4 日。
- 16) DNA メチル化阻害能を有す Zebularine 誘導体の合成と活性評価, 稲葉健介、鈴木孝禎、中川秀彦、幸田光復、宮田直樹、第 51 回日本薬学会東海支部例会、静岡、12 月 4 日。
- 17) ガンを治す薬 -夢の制ガン剤の開発- 宮田直樹、名古屋市民大学・大学連携講座、名古屋、12 月 8 日。
- 18) Synthesis of amine labeling reagents containing C60 moiety for MALDI-TOF MS analysis, Hiroki Tsumoto, Katsumasa Takahashi, Kohfuku Koda, Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, The 28th Fullerene-Nanotubes General Symposium, January 7-9, Nagoya, Aichi.
- 19) Effects of hydrophilic substitution of C60 on O₂-[•] generating activity, Hiroto Kaga, Kiyoshi Fujii, Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, The 28th Fullerene-Nanotubes General Symposium, January 7-9, Nagoya, Aichi.
- 20) Fenton 反応における鉄キレート剤の効果について, 李 林香、阿部芳廣、金川聖忠、増野匡彦、西川隆、望月正隆、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31。
- 21) 樹脂結合型フラウレンを用いたアミン修飾反応, 津元裕樹、高橋克昌、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31。
- 22) ペプチドの MALDI-TOF MS 分析のためのフラウレン導入試薬の合成と有用性の評価, 高橋克昌、津元裕樹、幸田光復、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125

- 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 23) リン脂質極性基酸化障害とリポソーム相分離現象を利用した各種抗酸化剤の評価、永坂憲、中川秀彦、津元裕樹、藤代真紀子、伊古田暢夫、小澤俊彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 24) リン脂質極性基の酸化障害を防御する抗酸化剤の開発、大山亮、中川秀彦、鈴木孝禎、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 25) $O_2\cdot$ -発生能の向上を指向した水溶性 C_{60} 誘導体の合成、加賀寛人、津元裕樹、藤井清、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 26) C_{60} フラーレンの包接を目的とした修飾シクロデキストリンの合成と包接体の活性評価、川原翔、津元裕樹、加賀寛人、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 27) 光活性型 NOドナーとしてのニトロベンゼン誘導体の合成と活性評価、加藤友香、鈴木孝禎、中川秀彦、福原潔、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 28) チオール系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の癌細胞増殖抑制作用、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 29) チオール系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の構造活性相関研究、瀨瀬章泰、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 30) チオール系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬のプロドラッグ化研究、久川伸也、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 31) ヒストン脱アセチル化酵素を阻害する非ヒドロキサム酸系化合物の創製、松浦梓、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 32) Zebularine をモデルとした DNAメチル化酵素阻害剤の開発、稲葉健介、鈴木孝禎、中川秀彦、幸田光復、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 33) PPAR γ アゴニスト作用をもつ 3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]propanoic acid の構造修飾と活性評価、白井伸也、藤枝広樹、江藤一摩、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 34) 天然フラボノイドの立体構造固定による抗酸化作用の増強、福原 潔、中西郁夫、今井耕平、川島知憲、袴田 航、増田 雄、奥 忠武、金澤秀子、浦野四郎、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.

E. 健康危険情報

登録および登録予定、共になし。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：構造修飾した薬剤の合成・薬剤の構造と
遺伝子発現パターンの相関の解析

分担研究者 奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長
研究協力者 福原 潔 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部第1室長

研究要旨

薬剤暴露時の遺伝子発現パターンの変化から安全性の高い薬剤を創製する為には、適切な構造修飾法を確立する必要がある。本研究では乳がん治療薬タモキシフェンを取りあげ、簡易合成法を確立して毒性の軽減を目的とした誘導化を行い、誘導体の毒性を評価した。今年度は活性型タモキシフェンである4位水酸化体と共通するヒドロキシスチルベン骨格を有している天然抗酸化剤レスベラトロールを取りあげ、毒性軽減と抗酸化能の増強を目的としたメチル誘導体を5種類合成した。合成した化合物の抗酸化能はメチル基の超共役作用によってレスベラトロールと比べて非常に強く、メチル基の付加位置と数によって異なる抗酸化能を示した。レスベラトロールの水酸基が関係する遺伝毒性は、オルト位にメチル基を導入すると立体障害によって軽減することが予測される。従って、これらの化合物はメチル基の導入部位によって抗酸化活性と毒性の制御が可能であり、毒性発現に関わる遺伝子発現パターンの解析研究の候補化合物として適用可能であることがわかった。

A. 研究目的

本研究事業では薬剤暴露時における遺伝子発現パターンの変化から安全性の高い医薬品を創製するための基本技術の開発を目的としている。分担研究者の奥田は網羅的遺伝子発現解析による毒性と遺伝子発現の相関から得られた構造化学情報を基にして薬剤の構造修飾を行い、安全性の高い薬剤を開発することを目的として研究を実施してきた。平成14年度および15年度は乳がんに対する化学療法の第1選択薬として用いられているタモキシフェンを

取りあげ、毒性と遺伝子発現との構造活性相関の検討に資するデータベースを構築する為にタモキシフェン誘導体の合成を行った。さらに合成したタモキシフェン誘導体については酸化的DNA損傷能およびBHK細胞増殖阻害活性を検討した結果、誘導体の毒性はタモキシフェンおよび、その活性本体(4-ヒドロキシタモキシフェン)とほぼ同程度であることがわかった。今年度は、タモキシフェンと同様のスチルベン骨格を有する天然抗酸化剤として、生活習慣病の予防および細胞寿命の延命効

果等で話題となっているレスベラトロールをとりあげ、毒性と遺伝子発現との構造活性相関の検討に資する誘導体の合成を行う。

レスベラトロールは葡萄果皮に含まれている天然抗酸化剤であり、近年その多彩な薬理活性(脂質過酸化の抑制、制癌作用、抗炎症作用、エストロゲン活性等)が次々と明らかになった。特にがん発症の三段階(イニシエーション、プロモーション、プログレッション)のいずれの過程にも作用することからがん予防物質として注目を集めている。また、レスベラトロールは2003年には酵母においてNAD⁺依存性蛋白質脱アセチル化酵素であるSir2を刺激することでDNAの安定性を増大させ、細胞寿命を70%延長させる効果があることが報告された。これはレスベラトロールによって刺激されたSir2が脂肪調節因子PPAR- γ の働きを抑制してカロリー制限と同様の効果をあらわすことによる。一方、レスベラトロール

は従来のフラボノイド系ポリフェノールやビタミンEと同様に水酸基からの水素移動反応によって活性酸素や脂質ペルオキシラジカルを消去する。生活習慣病の発症や進行の予防にはこの抗酸化機構も大きく関与していることも明らかとなっている。

既に我々は、レスベラトロールの毒性については、*in vitro*で染色体異常、小核および姉妹染色分体交換を濃度依存的に誘発することを見出し、側鎖水酸基に関する構造活性相関を探るうちに、4'位の水酸基がレスベラトロールの遺伝毒性に必須であることを明らかにしている。また、その分子作用機構は、すべての生物に必須でDNAの合成および修復において中心的役割を果たす酵素 ribonucleotide reductase を阻害することであることをみいだした。これは4'位の水酸基が酵素の活性中心におけるラジカル転移を抑制することによる。このように、レスベラトロールの水酸基はラジカル消去活性の

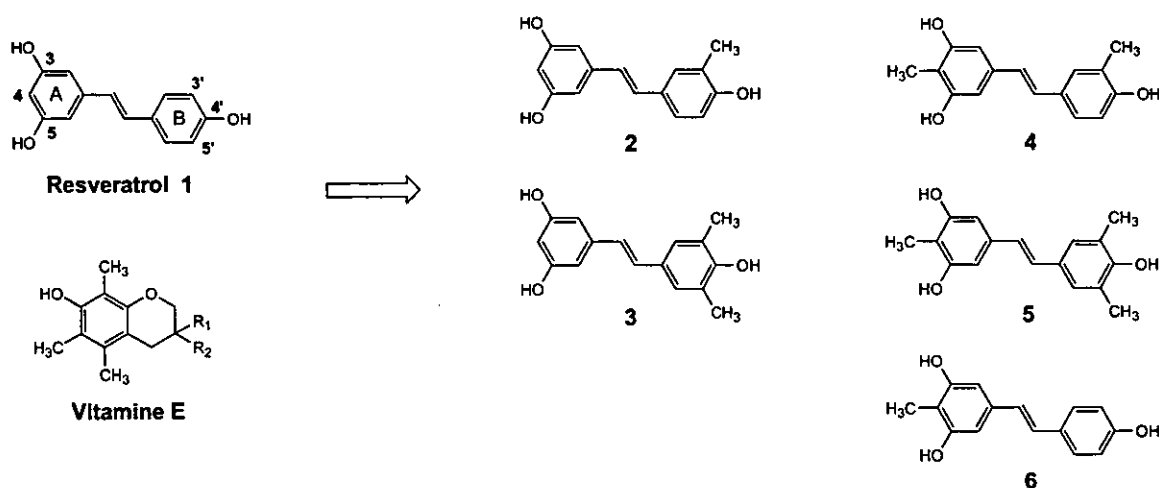


図1 レスベラトロールのメチル誘導体

本体ではあるが、毒性の発現にも深く関与していることが推定される。

本研究では毒性の軽減とラジカル消去活性の増強を目的とした誘導体として水酸基のオルト位にメチル基が導入された誘導体の合成を検討した。すなわち、レスベラトロールにメチル基が導入されると酵素や様々なシグナル伝達に関わる生体高分子との結合がメチル基の立体障害によって阻害され、毒性が軽減されることが推定される。また、ビタミンEと類似の構造を有するレスベラトロールのメチル誘導体は、メチル基の超共役作用によってラジカル消去能が増強されることも予測される。そこで、本研究ではレスベラトロールの水酸基のオルト位にメチル基を導入したレスベラトロール誘導体5種類の合成と抗酸化作用について検討を行った。

B. 研究方法

(倫理面への配慮) 本研究の最終的な目標はヒト肝培養細胞を用いてタモキシフェン誘導体暴露時の遺伝子発現を検討することであるが、今回はタモキシフェンと共通の構造を有するレスベラトロールについて毒性軽減を目的とした誘導体実験であるため、倫理面で配慮すべき事項はない。

1. 試薬・測定機器

4-ベンジルオキシ-3, 5-ジメチルベンズアルデヒドはAlfa Aesar社より、また、4-ヒドロキシ-3-メチルベンズアルデヒドはAldrich社より購入した。他の試薬はすべて、試薬一級あるいは特級を使用した。また、NMRはVarian

Mercury 400-NMRを用いて測定した。

2. レスベラトロールのメチル誘導体の合成

3, 5-ビスベンジルオキシベンジルフオホニックアシッド ジエチルエステル 7 の合成

3, 5-ジベンジルオキシベンジルブロミド 8 を亜リン酸トリエチルに溶解後、ヨウ化テトラ-n-ブチルアンモニウムを添加して100℃で5時間、加熱攪拌した。さらに、室温で一晩攪拌した後、過剰の亜リン酸トリエチルを減圧留去して化合物7を得た。

3, 5-ジヒドロキシ-4-メチルベンゾイックアシッド メチルエステル 9 の合成

3, 5-ジヒドロキシ-4-メチル安息香酸 10 のメタノール溶液に硫酸を少量添加後、一晩室温で攪拌した。反応混合物を氷水に移し、酢酸エチルを加えた後、炭酸水素ナトリウムを加えて中性にした。酢酸エチル層は飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒ヘキサン:酢酸エチル=1:1)により精製し、化合物9を得た。

3, 5-ビスベンジルオキシ-4-メチルベンゾイックアシッド メチルエステル 11 の合成

化合物9のジメチルホルムアミド溶解に無水炭酸カリウムを加えて1時間攪拌後、ベンジルブロミドを滴下した。一晩攪拌後、反応混合物を氷水に移し、多量のジクロロメタンで抽出し

た。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水して、溶媒を減圧留去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=1：1）により精製し、化合物 11 を得た。

3, 5-ビスベンジルオキシ-4-メチルベンジルアルコール 12 の合成

アルゴン気流下、無水ジエチルエーテルに水素化アルミニウムリチウムを加えた後、化合物 11 の無水ジエチルエーテル溶液を滴下漏斗を使って少量ずつ滴下した。4 時間室温で攪拌後、2-プロパノール、10%水酸化カリウム水溶液を少量ずつ加えて過剰の水素化アルミニウムリチウムを分解した。酢酸エチルで洗い込みながら吸引濾過後、反応溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒を減圧留去した。さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ジクロロメタン：メタノール=10：1）により精製して化合物 11 を得た。

3, 5-ビスベンジルオキシ-4-メチルベンジルブロミド 13 の合成

アルゴン気流下、化合物 12 のジクロロメタン溶液に滴下漏斗で三臭化リンを少量ずつ滴下した。氷浴中で1時間、さらに室温で1時間攪拌した後、反応混合物を氷水に移し、ジクロロメタン抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒を減圧留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=1：1）により精製して化合物 13 を得た。

3, 5-ビスベンジルオキシ-4-メチルベンジルフォスフォニックアシッド ジエチルエステル 14 の合成

化合物 13 を亜リン酸トリエチルに溶解後、ヨウ化テトラ-n-ブチルアンモニウムを添加し、100℃で5時間、加熱攪拌した。さらに、室温で一晩攪拌した後、過剰の亜リン酸トリエチルを減圧留去して化合物 14 を得た。

4-ベンジルオキシ-3-メチルベンズアルデヒド 15 の合成

4-ヒドロキシ-3-メチルベンズアルデヒド 16 のジメチルホルムアミド溶液に、無水炭酸カリウムを加えて1時間攪拌した後、ベンジルブロミドを滴下した。さらに一晩攪拌した後、反応混合物を氷水に移し、ジクロロメタン抽出した。有機層は飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒を減圧蒸留した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：酢酸エチル=2：1）により化合物 15 を単離精製した。

1-[4-ベンジルオキシ-3-メチルフェニル]-2-[3, 5-ビス(ベンジルオキシ)フェニル]エテン 17 の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 7 を THF に溶液を滴下した。30分攪拌後、化合物 15 の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、

溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 17 を単離精製した。

1-(4-ベンジルオキシ-3, 5-ジメチルフェニル) -2- (3, 5-ビスベンジルオキシフェニル) エテン 18 の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 7 を THF に溶液を滴下した。30 分攪拌後、化合物 4-ベンジルオキシ-3, 5-ジメチルベンズアルデヒド 19 の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 18 を単離精製した。

1-(4-ベンジルオキシフェニル) -2-(3, 5-ビスベンジルオキシ-4-メチルフェニル) エテン 20 の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 14 を THF に溶液を滴下した。30 分攪拌後、化合物 4-ベンジルオキシ-3, 5-ベンズアルデヒド 21 の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキ

サン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 20 を単離精製した。

1-(4-ベンジルオキシ-3-メチルフェニル) -2- (3, 5-ビスベンジルオキシ-4-メチルフェニル) エテン 21 の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 14 を THF に溶液を滴下した。30 分攪拌後、化合物 15 の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 21 を単離精製した。

1-(4-ベンジルオキシ-3, 5-ジメチルフェニル) -2- (3, 5-ビスベンジルオキシ-4-メチルフェニル) エテン 22 の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 14 を THF に溶液を滴下した。30 分攪拌後、化合物 19 の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 22 を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシ-3-メチルフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシフェニル)エテン 2 の合成

アルゴン気流下、化合物 17 のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて5分間攪拌後、塩化アルミニウム(Ⅲ)を加えて、0℃で一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)により化合物 2 を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシフェニル)エテン 3 の合成

アルゴン気流下、化合物 18 のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて5分間攪拌後、塩化アルミニウム(Ⅲ)を加えて、0℃で一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)により化合物 3 を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシ-4-メチルフェニル)エテン

6 の合成

アルゴン気流下、化合物 20 のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて5分間攪拌後、塩化アルミニウム(Ⅲ)を加えて、0℃で一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)により化合物 6 を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシ-3-メチルフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシ-4-メチルフェニル)エテン 4 の合成

アルゴン気流下、化合物 21 のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて5分間攪拌後、塩化アルミニウム(Ⅲ)を加えて、0℃で一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)により化合物 4 を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシ-4-メチルフェニル)エテン 5 の合成

アルゴン気流下、化合物 22 のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて5分間攪拌後、塩化アルミニウム(III)を加えて、0℃で一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した

後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー（展開溶媒 ジクロロメタン：メタノール＝10：1）により化合物 22 を単離精製した。

3. ラジカル消去反応の速度論的解析

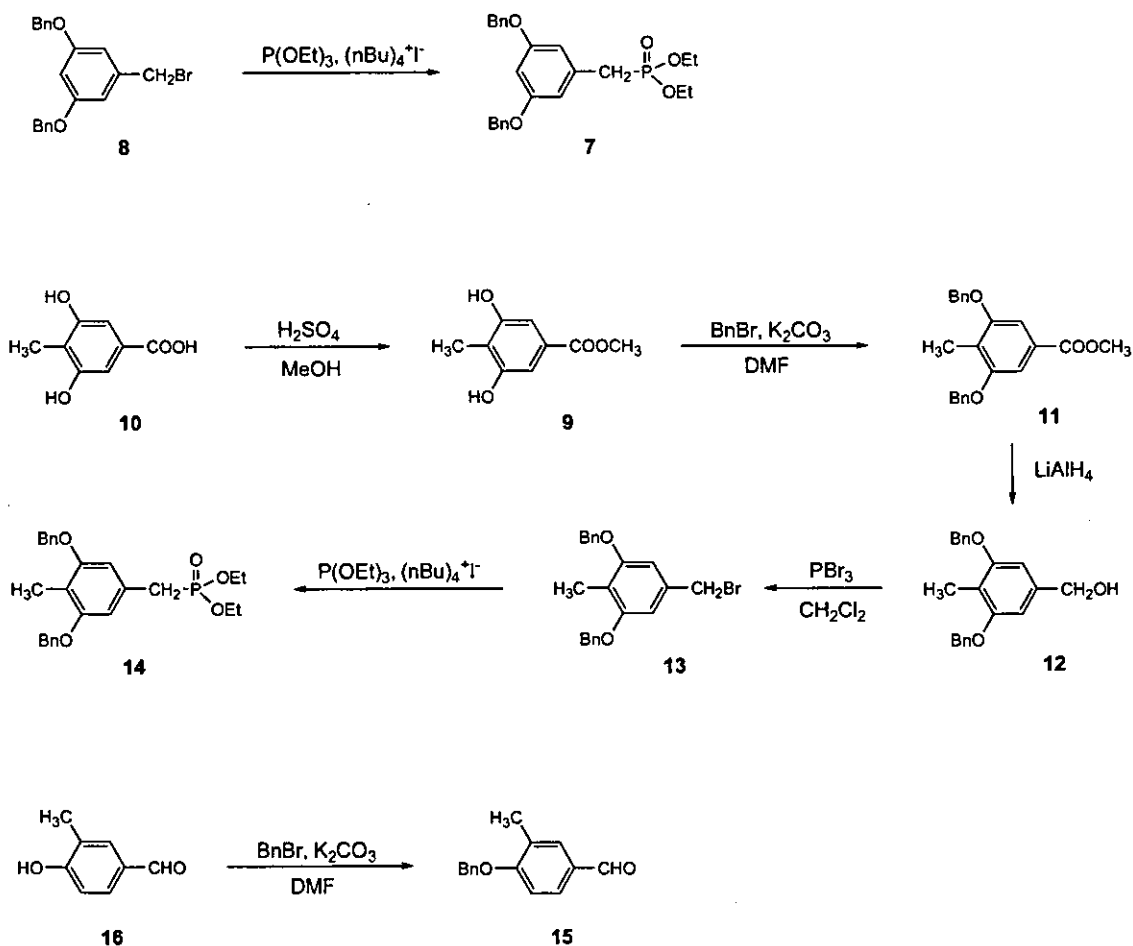


図2. メチルレスベラトロールの合成法 その1

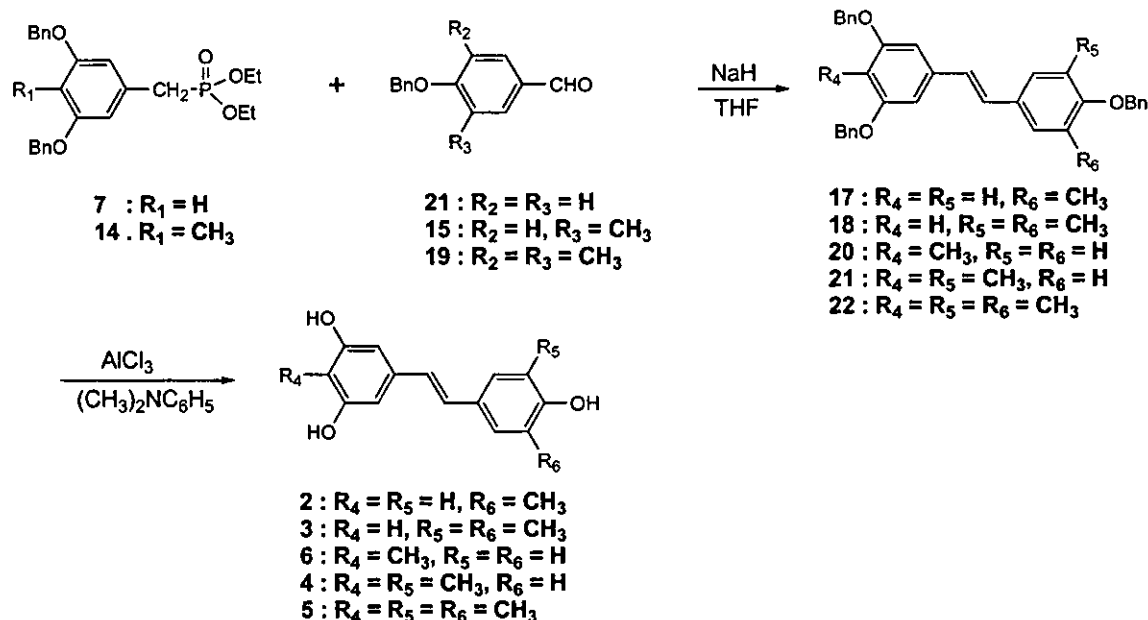


図2. メチルレスベラトロールの合成法 その2

石英セル(光路長1 cm)にgalvinoxyl (G) (2.4×10^{-6} M)のアセトニトリル溶液3 mLを入れ、10分間アルゴンバブルすることにより、酸素を除去した。一方、レスベラトロール誘導体の適当な濃度のアセトニトリル溶液を別途調製し、同様にアルゴンバブルにより酸素を除去した。室温(298 K)で、溶媒であるアセトニトリルによりブランクスペクトルを測定してあるHewlett-Packard 8453フォトダイオード・アレー分光光度計のkineticモードで、攪拌子を用いて攪拌しながらG溶液に、G濃度に対して10倍濃度以上になるように適当量の1-3溶液をマイクロシリンジを用いて加えた。擬一次速度定数(k_{obs})はApple社のMacintoshパーソナルコンピュータ上で、KaleidaGraphを用い、最小2乗法により行った。 $\ln(A_{\infty} - A)$ vs t の擬一次プロットは $\rho > 0.999$ の係数で3半減

期以上、直線フィットできた。

C. 研究結果

1) レスベラトロールのメチル誘導体の合成

合成計画：レスベラトロールはスチルベン誘導体であるため、スチルベン骨格のオレフィン部分で構造をA環(3,5-ジヒドロキシ誘導体)とB環(4-ヒドロキシ誘導体)の二つに分け、A環をリン酸エステル体、B環をアルデヒド体にそれぞれを合成した後、Wittig-Honer反応でトランス型の二重結合を形成させる。反応の過程で水酸基はベンジル基で保護し、最後にルイス酸で脱保護を行う。

合成方法：A環としてはビスベンジルオキシベンジルリン酸エステル7とその4-メチル体14を合成して用いた。化合物7は市販のプロム体8を亜リン酸トリエチルによってリン酸化

して合成した。化合物 14 は 3, 5-ジヒドロキシ-4-メチル安息香酸 10 をメチルエステル化した後、水酸基をベンジルで保護して化合物 11 とした。さらに化合物 11 は LiAlH_4 でエステルを還元してアルコールに変換、 PBr_3 によるブロム化後、亜リン酸トリエチルによってリン酸化して化合物 14 を合成した。B 環としては市販の 4-ベンジルオキシベンズアルデヒドとその 3, 5-ジメチル体、および 4-ヒドロキシ-3-メチルベンズアルデヒドをベンジル化した化合物 15 を用いた。次に合成した A 環および B 環を Wittig-Honer 反応によって縮合させてスチルベン骨格を合成した。反応生成物のスチルベン構造はオレフィンの水素のカップリング定数が大きい ($J = >14\text{Hz}$) ことからトランス異性体であることを確認した。ベンジル基の脱保護は AlCl_3 を用いて行った。本合成法を用いることにより化合物 2 ~ 6 を総収率 20 ~ 50 % で得ることができた。なお、これらは全て新規化合物である。

2) ラジカル消去反応の速度論的解析

合成したレスベラトロールのメチル誘導体およびレスベラトロールの活性酸素に対するラジカル消去能の解析を行った。ヒドロキシルラジカルや脂質ペルオキシルラジカルは抗酸化剤に対する反応性が非常に高いため、抗酸化剤のラジカル消去能についての速度論的解析は非常に困難である。そこで、活性酸素のモデル化合物として比較的安定な Galvinoxyl radical ($\text{G}\cdot$) を用いて化合物のラジカル消去能を解析

した。嫌気性条件下、 $\text{G}\cdot$ のアセトニトリル溶液にレスベラトロール 1 を加えると 428nm の吸収が減少した。この反応を 1 の濃度を $\text{G}\cdot$ の 10 倍以上で行うと、428nm の吸収は擬一次反応で減少することがわかった。そこで、1 の濃度を変えて求めた k_{obs} から、1 から $\text{G}\cdot$ への水素移動反応速度定数 (k_{HT}) を $4.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と決定した。次に化合物 2 ~ 6 についても同様の方法で k_{HT} を求めた。その結果、レスベラトロールの 4' 位の水酸基のオルト位 (3' 位) にメチル基を導入した化合物 2 の k_{HT} は $5.7 \times 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、両方のオルト位 (3' および 4' 位) にメチル基を導入した化合物 3 の k_{HT} は $1.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、メチル基の導入でラジカル消去能が顕著に増強されることがわかった。また、化合物 6 の k_{HT} は $2.4 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、であることからレスベラトロールの 3 位と 5 位の水酸基の間のメチル基も抗酸化活性を増強させることがわかった。さらに化合物 6 の 3' 位がメチル化された化合物 4 の k_{HT} は $1.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、3' 位と 5' 位がメチル化された化合物 5 の k_{HT} は $2.0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、水酸基のオルト位へのメチル基の数が増える程、抗酸化活性が増強することがわかった。

D. 考察

タモキシフェンは 4 位が水酸化されて抗エストロゲン作用を示す一方、活性型タモキシフェンと同様のスチルベン構造を有しているレスベラトロールの 4' 位の水酸基は抗酸化活性の本体であるとともに、毒性発現にも大きく関係していることがわかっている。本研

究ではレスベラトロールの抗酸化活性の増強および毒性軽減を目的として4'位のオルト位にメチル基を導入したレスベラトロール誘導体を合成した。レスベラトロールはスチルベン構造のオレフィン部分で構造をA環とB環の二つのベンゼン誘導体に分けることができる。今回はA環としてレスベラトロール骨格の3,5-ジヒドロキシ誘導体およびそのメチル体を合成し、B環としては4-ヒドロキシ誘導体とその3-メチル体および3,5-ジメチル体を合成し、それぞれをWittig-Honer反応によって反応させることによって、レスベラトロールと5種類のメチル誘導体を合成することに成功した。

これらの化合物のガルビノキシルラジカルに対する抗酸化活性を解析した。これら誘導体の抗酸化能はメチル基の付加位置と数によって異なるが、3'位のメチル誘導体2はレスベラトロールの14倍のラジカル消去能を示すなど、いずれの誘導体もメチル基の超共役作用によってレスベラトロールよりも強い抗酸化能を示し、メチル基の導入は抗酸化活性の増強に有効であることがわかった。

カテキンおよびケルセチンのガルビノキシルラジカルに対する k_{off} は、それぞれ $3.9 \times 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と $4.7 \times 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であることからレスベラトロールのメチル誘導体の抗酸化力は代表的な天然抗酸化剤よりも強力であり、特に化合物5はカテキンのラジカル消去能の増強を目的として合成した平面型カテキン($k_{\text{off}} = 1.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)よりも強力なラジカル消去能を示すことから非常に優れた抗酸化剤であるこ

とがわかった。

レスベラトロールの4'位の水酸基の位置異性体である3,5,3'-トリヒドロキシスチルベンは遺伝毒性が大きく低下する。しかしながら抗酸化能も殆ど消失してしまうことから、毒性軽減の為にはレスベラトロールの水酸基の付加位置を維持した形での誘導化が必要である。今回合成した化合物2~6は4'位の水酸基のオルト位にメチル基が導入されている為、4'位の水酸基のDNAや毒性発現に関係しているレセプター分子との相互作用が弱くなることによって毒性が軽減されることが予測される。特に化合物3と5は毒性発現にも関係している4'位水酸基がオルト位(3'-および5'-)のメチル基に挟まれていることから、安全な優れた抗酸化剤であることが予測された。今後は遺伝子発現パターンを解析することによって遺伝子レベルでの評価をおこない、毒性軽減を目的とした修飾法としてメチル誘導化の有効性について検討する予定である。

タモキシフェンはエチル基の硫酸抱合体がグアニンと共有結合することが肝癌誘発性に関与していると考えられているが、一方、4位の水酸化体がさらに酸化された3,4-ジヒドロキシ体およびそのキノン酸化体が活性酸素を発生したり、DNA等の生体高分子と共有結合することによって毒性を発現することも予測される。このような毒性を軽減させる為にはレスベラトロールと同様に水酸基のオルト位のメチル化が有効であることが予測される。今後、タモキシフェンについても4位の水酸化体のオルトメチル化体を合成し、毒

性軽減の為の薬剤修飾法としてのメチル化法の有効性について、遺伝子発現パターンを解析して検討する予定である。

E. 結論

天然抗酸化剤レスベラトロールはH14及びH15年度にとりあげたタモキシフェンの活性型と共通のスチルベン骨格を有している。そこで今年度はレスベラトロールの毒性軽減と抗酸化能の増強を目的とした誘導化を行った。

誘導化法としてはビタミンEの構造を参考にして水酸基のオルト位へのメチル基の導入を検討し、Wittig-Honer反応によってメチルレスベラトロールを新規に5種類合成した。抗酸化能を解析した結果、レスベラトロールの4'位水酸基のオルト位にメチル基を導入すると抗酸化能が飛躍的に増強することがわかった。特に4,3',5'-トリメチルレスベラトロールの抗酸化活性は非常に強力であり、本化合物は毒性発現にも関係している4'位水酸基がオルト位(3'-および5'-)のメチル基に挟まれていることから、安全な優れた抗酸化剤であることが予測された。

以上、レスベラトロールはメチル基の導入によって抗酸化活性と毒性を制御できることが可能であり、安全性の高い薬剤開発に資する遺伝子発現パターンの解析研究の候補化合物として利用可能である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, K. Inami, M. Mochizuki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, and N. Ikota, Electron-Transfer Mechanism in Radical-Scavenging Reactions by a Vitamin E Model in a Protic Medium, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 626 – 629 (2005).
- 2) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Fukuhara, H. Kanazawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, T. Ozawa, and N. Ikota, Water-accelerated radical-scavenging reaction of (+)-catechin in an aprotic medium, *ITE Lett. Batt. New Tech. Med.*, 5, 585 - 588 (2004).
- 3) I. Nakanishi, S. Matsumoto, K. Ohkubo, K. Fukuhara, H. Okuda, K. Inami, M. Mochizuki, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, N. Ikota, EPR study on stable magnesium complexes of phenoxyl radicals derived from a vitamin E model and its deuterated derivatives, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 77, 1741-1744(2004).
- 4) I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara, A planar catechin analogue having a more negative oxidation potential than (+)-catechin as an electron-transfer antioxidant against a peroxy radical, *Chem. Res. Toxicol.*, 17, 26-31(2004).
- 5) Okada E., Komazawa Y., Kurihara, M., Inoue H., Miyata N., Okuda H., Tsuchiya T., and Yamakoshi Y., Synthesis of C60 derivatives for photoaffinity labeling. *Tetrahedron Lett.*, 45, 527-529 (2004).

2. 学会発表

- 1) 福原 潔, 中西郁夫, 今井耕平, 川島知憲, 袴田 航, 増田 雄, 奥 忠武, 金澤秀子,

- 浦野四郎, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, 天然フラボノイドの立体構造固定による抗酸化作用の増強、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心 (2005, 3)
- 2) 川村義彦, 石井明子, 川崎ナナ, 浦野四郎, 川西 徹, 奥田晴宏, 福原 潔, 平面型カテキンの細胞増殖阻害作用、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心 (2005, 3)
 - 3) 中西郁夫, 川島知憲, 薬丸晴子, 福原 潔, 金澤秀子, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, カテキンによるラジカル消去反応は水によって加速される、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心 (2005, 3)
 - 4) 中西郁夫, 川島知憲, 大久保 敬, 福原 潔, 金澤秀子, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, 塩基存在下におけるビタミン E 類縁体のラジカル消去反応、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心 (2005, 3)
 - 5) 中西郁夫, 薬丸晴子, 川島知憲, 大久保 敬, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, 分子内にピリジン骨格を有するビタミン E 誘導体の合成とラジカル消去活性、日本化学会第 85 春季年会, 神奈川大学 (2005, 3)
 - 6) 中西郁夫, 川島知憲, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, ビタミン E 類縁体によるラジカル消去反応に対する塩基触媒作用、第 16 回ビタミン E 研究会, 山口 (2005, 1)
 - 7) 福原 潔, 中西郁夫, 今井耕平, 川村義彦, 小原美紀, 松村友博, 川島知憲, 金澤秀子, 斎藤慎一, 浦野四郎, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, 生活習慣病の予防および治療物質としての平面型カテキン誘導体の可能性、第 19 回日本フリーラジカル学会関東支部会, 共立女子大 (2004, 12)
 - 8) 中西郁夫, 川島知憲, 大久保 敬, 福原 潔, 金澤秀子, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, 抗酸化剤のラジカル消去反応における塩基触媒作用、第 19 回日本フリーラジカル学会関東支部会, 共立女子大 (2004, 12)
 - 9) I. Nakanishi, S. Matsumoto, K. Ohkubo, K. Fukuhara, H. Okuda, K. Inami, M. Mochizuki, S. Itoh, S. Fukuzumi, N. Ikota, and T. Ozawa, ESR Study on Stable Magnesium Complexes of the Phenoxyl Radicals Derived from a Vitamin E Model and Its Deuterated Derivatives, 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), St. Thomas, US Virgin Islands, November 17-21 (2004)
 - 10) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, H. Okuda, T. Ozawa, S. Fukuzumi, K. Fukuhara, and N. Ikota, Solvent Effect on the Mechanism of Radical-Scavenging Reactions of a Vitamin E Analogue, 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), St. Thomas, US Virgin Islands, November 17-21 (2004)
 - 11) I. Nakanishi, N. Ikota, T. Kawashima, H. Yakumaru, H. Kanazawa, H. Okuda, Kazunori A., T. Ozawa, and K. Fukuhara, Radical-Scavenging Activities of Lipophilic Planar Catechin Derivatives, 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), St. Thomas, US Virgin Islands, November 17-21 (2004)
 - 12) 福原 潔, 中西郁夫, 大久保 敬, 飯塚優子, 稲見圭子, 望月正隆, 福住俊一, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, フェノール性抗酸化剤のラジカル消去機構、第 33 回日本環境変異原学会、第 18 回日本動物実験代替法学会合同大会, 長崎 (2004, 11)
 - 13) 福原 潔, 中西郁夫, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, Sidney M. Hecht, N-オキシド化合物からの活性酸素生成機構の解析、

- 第 37 回酸化反応討論会, 大阪 (2004, 11)
- 14) 中西郁夫, 川島知憲, 大久保 敬, 薬丸晴子, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, フェノール性抗酸化剤の酸化反応に対する溶媒効果, 第 37 回酸化反応討論会, 大阪 (2004, 11)
- 15) 福原 潔, 中西郁夫, 川島知憲, 金澤秀子, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, 平面型カテキン誘導体の抗酸化能の解析, 第 43 回電子スピンサイエンス学会年会, 東京 (2004, 11)
- 16) 福原 潔, 中西郁夫, 袴田 航, 川島知憲, 今井耕平, 金澤秀子, 浦野四朗, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, がん予防を目的とした天然カテキンの誘導化, 第 11 回日本がん予防研究会, 東京 (2004, 7)
- 17) 福原 潔, 中西郁夫, 袴田 航, 川島知憲, 今井耕平, 金澤秀子, 浦野四朗, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, 脂溶性平面型カテキン誘導体の合成と抗酸化能, 第 26 回日本フリーラジカル学会, 山形 (2004, 6)
- 18) 福原 潔, 中西郁夫, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 宮田直樹, 奥田晴宏, Sydney M. Hecht, N-オキシドの化学-嫌氣的条件下でのヒドロキシルラジカルの生成と DNA 切断活性-, 第 26 回日本フリーラジカル学会, 山形 (2004, 6)
- 19) 中西郁夫, 川島知憲, 宇都義浩, 大久保 敬, 薬丸晴子, 田草川光子, 金澤秀子, 奥田晴宏, 福原 潔, 小澤俊彦, 永沢秀子, 福住俊一, 堀 均, 伊古田暢夫, アルテピリン C によるラジカル消去反応の速度論的解析, 第 26 回日本フリーラジカル学会, 山形 (2004, 6)

H. 知的財産権の出願・登録状況
登録および登録予定共になし。

厚生労働科学研究費補助金(萌芽的医療技術推進研究事業)

分担研究報告書

分担研究課題:実験動物データのヒトへの外挿を目指した基本手法の確立・プロテオーム解析への応用

分担研究者 鈴木 孝昌

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長

研究要旨

Affymetrix 社製 GeneChip を用いて、遺伝子傷害性物質にてヒト培養細胞を処理した場合、およびグリタゾン系糖尿病治療薬又は乳癌治療薬タモキシフェン誘導体にてマウスを処理した際の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。遺伝子傷害性物質に関する検討では、昨年度までの検討で得られた指標遺伝子に関して定量的 RT-PCR 法にてチップデータとの再現性の確認を行うとともに、用量および経時変化に関する検討を行った。その結果、GeneChip 解析では変化が見られなかった薬剤も異なる用量またはタイミングにおいて変化を示す例が見られ、用量、経時変化を広く検討する重要性が示された。

グリタゾン系化合物に関する検討においては、昨年度に加え、さらに低用量における作用を追加解析した。その結果から、3種のグリタゾン系化合物に共通して変化する遺伝子およびトログリタゾンのみに特徴的に変化する遺伝子を選びだした。前者には既知の変化を含め脂肪酸代謝に関わる遺伝子群が多く含まれ、後者にはミトコンドリアの機能関連遺伝子および酸化的傷害、アポトーシス関連遺伝子に変化が見られた。この結果より、グリタゾン系糖尿病治療薬に共通して起こりうる副作用として、脂肪酸代謝の亢進による脂肪肝の悪化が考えられ、さらにトログリタゾンにおいては、ミトコンドリアの酸化的傷害に起因する肝細胞のアポトーシスが誘発されることにより重篤な肝障害が起こったと予想される。

タモキシフェン誘導体に関する検討においては、作用未知の合成誘導体を含めて肝臓および子宮における遺伝子発現変化を検討した。その結果、合成誘導体では子宮肥大作用が弱く、遺伝子傷害に関する遺伝子の変化も少ない傾向がみられたが、肝臓における特徴的な代謝酵素の誘導も認められた。エストロゲンレセプター(ER)誘導性遺伝子の多くに変化が見られたが、その内容は誘導体間でバリエーションが見られた。以上の結果は、タモキシフェン誘導体の微妙な構造に差異により、ER およびコファクターとの相互作用が変化し、異なる生体作用をもたらす事を物語っており、その予測に遺伝子発現変化が指標となることが示唆された。

グリタゾン系化合物およびタモキシフェン誘導体に関しては、分担研究者が同じ化

合物を *in vitro* でヒト培養肝細胞に処理して同様の検討を行っており、我々のマウスのデータと比較をするためのデータ解析法を樹立し、両者の直接比較を可能とした。その結果、全体として両者の相関性はあまり良くなく、共通して変化を示す遺伝子は少なかった。ヒトとマウスという種差に加え、*in vitro* と *in vivo* という環境の違いが大きく影響していると考えられる。今回の検討で得られた発現データはすべてデータ解析ソフト GeneSpring を用いてデータベース化を行い、任意の実験間の比較が可能な状態として提供可能となった。

研究協力者

押澤 正 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
主任研究官

樂 洋 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
流動研究員

小原有広 国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部
研究官

A. 研究目的

遺伝子発現解析手法を用いて毒性の予測を行うトキシコジェノミクスは、従来のクラシカルな毒性試験にて予測できなかった臨床試験等における実際のヒトでの毒性の予測に大きく貢献することが期待されている。本研究班では、ヒトでの毒性を予測する系として、よりヒトに近い実験材料であるプライマリーヒト肝・腎細胞を用い、*in vitro* における曝露による発現の変化を検討している。プライマリー細胞においては、ある程度の代謝酵素活性を維持するなど、通常の株化細胞に比べるとより生体内に近い状況で試験をすることが可能であるが、*in vitro* の実験であるが故の限界も有ると予想される。*In vitro* と *in vivo* における作用の違いを検討する上でも、*in vivo* での動

物を使ったデータを蓄積し、両者を比較することは重要である。そこで、グリタゾン系糖尿病治療薬および乳癌治療薬タモキシフェン誘導体に関して、マウス個体を使って肝臓における遺伝子発現解析を行い、*in vitro* でのヒトプライマリー肝細胞を使った結果との比較を行なう事を目的とした。これにより、ヒトとマウスの種差および *in vitro* と *in vivo* の比較に関して考察を加えた。また、遺伝子傷害性物質に関しては、昨年度までにヒトリンパ腫細胞 TK6 を用いた *in vitro* の試験系により得られた遺伝子傷害性に起因して変化する遺伝子を用いて、定量的 RT-PCR による詳細な検討を行い、その有用性に関して検討することを目的とした。

最後に、今回の検討で得られた発現データは膨大な量に上るが、データ解析ソフトの力を借りてこれらを効率的に解析するため、すべてのデータをデータベース化するとともに、異なる種間のデータのブリッジを行うための解析システムの構築を試みた。

B. 研究方法

1. 遺伝子発現変化の解析

1-1 遺伝子傷害性物質による遺伝子発現の解析

ヒトリンパ腫由来の細胞株である TK6 細胞を用い、対数増殖期において各種遺伝子傷害性物質にて 1 時間処理および 4 時間処理し、薬物を洗い除いた後、あるいは 4 時間処理後薬物を洗い除きさらに 4 時間培養を続けた後、Total RNA を細胞より抽出した。この際に用いた薬物の処理濃度を以下に示す。

(処理濃度)

- ・ Ethylmethanesulfonate(EMS)
25, 50, 100 µg/ml
- ・ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)
0.0025, 0.005, 0.01 µg/ml
- ・ Ethylnitrosourea
5, 10, 20 µg/ml
- ・ Paraquat
75, 150, 300 µg/ml
- ・ Potassium Bromate (KBrO₃)
1.25, 2.5, 5 mM

得られた Total RNA を用いて以下に示す方法により定量的 RT-PCR 解析を行い、遺伝子発現量を比較した。

1-2 定量的 RT-PCR 法

昨年度の GeneChip による検討より選択した遺伝子を表 1 に示す。これらの遺伝子の mRNA 配列に特異的な PCR プライマーおよび TaqMan プロブを購入し (AB 社)、RT-PCR 用試薬として使用した。細胞より Qiagen 社 RNeasy キットを用いて total RNA を抽出し、Reverse transcriptase に

よる逆転写反応により cDNA を合成した。そして、遺伝子ごとにデザインされた TaqMan 試薬と TaqMan Universal PCR Master Mix を加え、ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System リアルタイム PCR 装置 (AB 社) を用いて cDNA の増幅を行い、増幅に伴う TaqMan プロブの分解による蛍光の発色をリアルタイムに測定することにより遺伝子の増幅をモニターし、その増幅速度より mRNA の存在量の相対比を算出した。

1-3 マウスに対するグリタゾン系化合物の処理および肝臓と腎臓 RNA 試料の調製

一群 3 匹の雄 C57BL6 マウスに対し、トログリタゾン、ロジグリタゾン、ピオグリタゾンを 20 および 200mg/kg で、単回腹腔内投与を行い、1, 4, 24, 72 時間後にマウスを解剖し、肝臓および腎臓を摘出し、直ちに、RLT バッファー中にスライスした臓器を保存した。個体ごとに保存した臓器を TRIzol 溶液中にてホモジナイズし、total RNA の抽出を行った後、RNeasy mini キット (Qiagen) を用いて精製を行った。

1-4 cRNA の調製とハイブリダイゼーション

各群 3 匹の個体から得られた total RNA を混合し、その 5µg を用いて、reverse transcriptase により cDNA を合成した。この際、プライマーとして、T7 プロモーターを結合させた poly dT を用いることにより、引き続き T7RNA polymerase による転写を行い、増幅された cRNA を合成した。cRNA 合成時にビオチンラベル化 dNTP を用いて標

識した。これを断片化したのち、45度にて16時間 GeneChip にハイブリさせた。

1-5 チップの洗浄、ラベル化とスキャナーによるシグナルの検出

ハイブリ溶液を除いた後、Affymetrix社の GeneChip 用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン-フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip 専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。

1-6 チップイメージの解析

チップイメージを GeneChip 用データ解析ソフト Microarray Suite にて解析し、数値化するとともに、パーフェクトマッチおよびミスマッチプローブ間の蛍光強度比か Presense/Marginal/Absence の判定を行った。その後、GeneSpring ソフトウェアにデータを取り込み、標準化を行った後、コントロール群と処理群の発現比を算出した

1-7 タモキシフェン誘導体によるマウス肝臓および子宮の遺伝子発現変化の解析

一群3匹の7週令の雌 C57BL6 マウスに対し、タモキシフェンおよびその誘導体である 4-hydroxytamoxifen(4-OH)、toremifen (Tre)、desethyltamoxifen (ΔC_2H_4) 40mg/kg を単回強制経口投与した。4 および 24 時間後にマウスより肝臓と子宮を回収し、個体ごとに臓器を RNA later 溶液(Qiagen)中に保存した。肝臓は個体ごと、子宮は3匹の臓器をプールしてホモジナイズし、RNeasy mini キット(Qiagen)を用いて定法に従い

totalRNA を単離した。GeneChip による解析には、プールした total RNA を用いて解析を行った。

1-8 GeneChip データの解析法

GeneChip より得られた蛍光イメージより Microarray Suite(Affymetrix)ソフトウェアにて数値化を行い、各遺伝子プローブごとの発現強度である Average Difference 値 (Raw intensity) および Affymetrix 社の標準判定法による遺伝子の存在に関する判定 (P: presence, M: marginal A: absence) を行った。この際、チップごとの染色度合いの差を補正するため、各チップにおける Raw intensity の中間値を"100"に設定し、チップごとの蛍光強度補正を行った。こうして得られた発現強度のデータを発現解析ソフトである GeneSpring (Silicon Genetics 社) にインポートし、各種解析を行った。発現変化を示した遺伝子の選択においては、各データポイントあたり1チップのみを使用したため統計的手法が使用できず、その代わりに遺伝子発現強度に応じて有意水準を変化させる独自の Step-wise 選択法を以前より開発してきたが、今年度においてはその最終形として、回帰曲線を用いた intensity-dependent selection 法を完成させ、解析に用いた。

1-9 遺伝子発現データベースの構築とマウスおよびヒト GeneChip データの直接比較解析法の開発

各 GeneChip から得られた Raw intensity データを、GeneSpring へインポートし、全データを GeneChip の種類ごとに分類してデータベース化した。これによ