

天然抗酸化剤を利用した創薬化学

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部

研究者 福原 潔

研究要旨 天然抗酸化物質の生活習慣病に対する予防効果に着目して、可食植物からの抗酸化成分の探索、及び、葡萄果皮に含まれているレスベラトロールと代表的なフラボノイド系抗酸化物質であるカテキンを医薬品シーズとした誘導化を行った。

分担研究者

持田製薬新規事業グループ 鈴木 聡

A. 研究目的

死亡原因の上位を占める生活習慣病のリスクに対応するためには、早期発見、早期治療とともに一次予防を充実させて疾病の発症を抑制または遅延させることが必要である。ビタミン C や E、またカテキンなどの天然抗酸化剤などは代表的な一次予防物質として知られている。しかしながらラジカル消去能や体内への吸収効率に問題があるために十分な効果は認められていない。また、健康食品ブームの中でよく使用されている「抗酸化」という機能性コンセプトについても本当に生活習慣病の予防に貢献し得るのか、あるいはそれらの過剰摂取による危険性はないのか、などの疑問に対する科学的な実証例はすくない。本研究は、天然抗酸化物質の生活習慣病に対する予防効果に着目して、広く国民に信頼される有効性・安全性をもった特定保健用食品、あるいは生活習慣病の予防または治療に有効な医薬品の開発に資する研究を行う。具体的には可食植物からの抗酸化成分の探索とその評価方法ならびに品質評価方の明確化を行う

とともに、抗酸化成分の有効性、安全性の評価手法を開発する。また、本手法を用いることによって可食成分からの新規抗酸化成分の探索、および安定供給が可能な天然資源としての抗酸化物質を利用して疾病の治療および予防目的に応じた誘導化をおこない、医療への利用が可能な新しい予防物質を開発する。

B. 研究方法

1) 可食植物からの抗酸化成分の探索と有効性、安全性の評価

可食植物の資源確保、抗酸化成分を含む植物エキスの製造方法、植物エキスに含まれる抗酸化成分及び機能性成分の分析方法ならびに品質確保の方法、植物エキスの機能性試験及び安全性試験の選択方法について調査し、実施した。

2) レスベラトロールをシーズとした新型抗酸化剤の開発

レスベラトロールは構造を二種類のフェノール誘導体に分けることができる。それぞれメチル基が付加したフェノール誘導体の水酸基をベンジルで保護した後、Wittig-Honer 反応によって縮合させてレスベラトロール骨格を合成後、ルイス酸で脱保護を行い、レスベラ

トロールのメチル誘導体を合成した。抗酸化能は活性酸素のモデル化合物としてガルビノキシルラジカル (G•) を用い、レスベラトロール誘導体と反応させた時の G• の 428nm の吸収の減少から速度論的解析を行った。

3) カテキンをシーズとした新型抗酸化剤の開発

カテキンにアセトン、またはアルキル鎖を有するケトンと反応させて平面型カテキン誘導体を合成した。抗酸化能は DPPH ラジカルを用いた紫外可視分光光度法および AAPH 由来のペルオキシラジカルを用いた化学発光法によって解析した。酸化的 DNA 損傷反応に対する防護作用は pBR322DNA を用いて、平面型カテキン誘導体存在下、Fenton 反応系でのヒドロキシルラジカルによる DNA 側鎖切断反応をアガロースゲル電気泳動で解析して調べた。また、アルカリ条件下、酸素への電子移動反応速度を解析することによって安全性を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は人および動物、またそれらから採取した試料を用いないため倫理面では問題ない。

C. 研究結果

1) 可食植物からの抗酸化成分の探索と有効性、安全性の評価

市販の植物抽出物 (約 10 種) ならびに独自に調整した植物抽出物 (約 6 種) を出発原料とし、創薬対象となりそうなポリフェノール成分の選定を試みた。ポリフェノールの抽出法に関しては乾燥原料よりエタノール抽出、HP20 による樹脂精製を基本とすることができた。しかし、その抽出物の収量やポリフェノール含量は高低があり、また各植物に特徴的な共雑物が含まれてくるため、水溶性や色、味などの食品機能に関する個性が引き出されて来た。

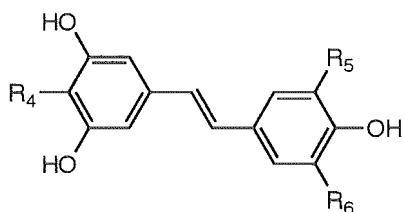
ポリフェノール含量ならびに抗酸化能の測定結果から、カテキンを含む緑茶のほか、フラボノイドやレスベラトロールを含む赤ブドウ葉抽出物、タンニンを含む柿皮抽出物等に優れた抗酸化能を見出した。

レスベラトロールや没食子酸はコーヒーなどに含まれるカフェ酸と同じフェノール系水溶性タンニン成分である。これらは資源確保が可能であり、水溶液での抗酸化力も強く、食経験も十分にあることから、今後これらの効能、安全性を検証し創薬への足かがりを得ることも可能であろうと思われた。

しかし、天然物を製造原料とする場合、抽出法の如何においては重金属の混入や抗酸化物質のプロオキシダント化による過酸化水素の発生などを起す可能性も知られており、こうしたポリフェノール原料の製造法と品質管理法については更なる安全性を同時に確立する必要があると認識された。

2) レスベラトロールをシーズとした新型抗酸化剤の開発

レスベラトロール 1 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、抗炎症作用等) が明らかとなり生活習慣病の予防物質として注目されている。我々はレスベラトロールの人への影響を検討した結果、in vitro で染色体異常、小核および姉妹染色分体交換を濃度的に誘発することを見いだした。本研究では安全で強力な抗酸化作用を有する生活習慣病の予防物質の開発を目的としてレスベラトロールの水酸基のオルト位にメチル基が導入された誘導体を合成した。合成方法: レスベラトロールの構造を 3,5-ジヒドロキシ誘導体と 4-ヒドロキシ誘導体の二つに分け、それぞれのリン酸エステル体とアルデヒド体を合成後、Wittig-honer 反応でトランス型の二重結合を形成させて合成した。



- 1: $R_1 = R_2 = R_3 = H$
 2: $R_1 = R_2 = H, R_3 = CH_3$
 3: $R_1 = H, R_2 = R_3 = CH_3$
 6: $R_1 = CH_3, R_2 = R_3 = H$
 4: $R_1 = R_2 = CH_3, R_3 = H$
 5: $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$

図 1. レスベラトロールおよび
そのメチル誘導体

ラジカル消去能：ラジカル消去能について速度論的解析を行う為、活性酸素のモデル化合物として比較的安定なガルビノキシルラジカル ($G\cdot$) を用いて検討した。その結果、レスベラトロール誘導体から $G\cdot$ への水素移動反応速度定数 (k_{HT}) は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 は $5.7 \times 10^1 M^{-1}s^{-1}$ 、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 は $1.5 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$ 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 4 の k_{HT} は $2.4 \times 10^1 M^{-1}s^{-1}$ 、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 4 の 3' 位がメチル化された化合物 5 の k_{HT} は $1.6 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$ 、3' 位と 5' 位がメチル化された化合物 6 の k_{HT} は $2.0 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$ 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。

3) カテキンをシーズとした新型抗酸化剤 の開発

我々が開発したカテキンの立体構造の平面固定化反応はカテキンの抗酸化力を大幅に増強されることが可能である。一方カテキンは水溶性の為、体内への吸収効率はかなり低い。そこでアルキル鎖を導入した脂溶性平面型カテキンを合成し、動脈硬化や脳梗塞の発症に関係する脂質ペルオキシラジカルに対する消去能と DNA の酸化的損傷反応に対する防御作用を解析した。脂溶性平面型カテキンの合成：カテキンと 3 当量の対称ケトン (アセトン、3-ペンタノン、4-ヘプタノン、5-ノナン、6-ウンデカノン、7-トリデカノン、8-ペンタデカノン、9-ヘプタデカノン) の THF 溶液に、1 当量の TMSOTf を加えて平面型カテキン誘導体を収率 33%~89% で合成した。ラジカル消去能の解析：アセトニトリル中、平面型カテキン誘導体から DPPH ラジカルに対する水素移動反応速度を解析した結果、アルキル

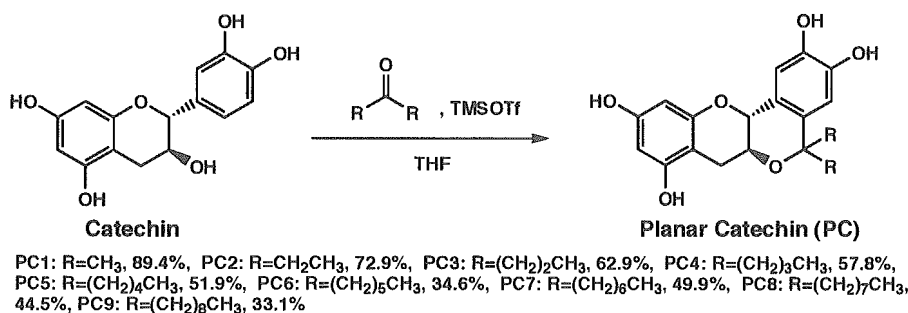


図 2. 脂溶性平面型カテキン誘導体の合成

側鎖が長くなるに従ってラジカル消去能が増加し (C1 < C2 < C3), C3-C6 はほぼ同程度の強力なラジカル消去能を示した。一方、リン酸緩衝液中、AAPH 由来ペルオキシラジカルに対するラジカル消去能は、アルキル側鎖が長くなるに従ってラジカル消去能が増強し、C3, C4で最も強力なラジカル消去能を示した。しかし、さらに側鎖が長くなるとラジカル消去能の低下がみられた。また、ヒドロキシルラジカル(Fenton 反応)による酸化的 DNA 損傷反応に対する防御作用は C4, C5 で最も強くみられた。安全性の評価：抗酸化剤の毒性評価法として塩基性条件下における酸素への電子移動反応を解析した。C1 を嫌気性条件下、メトキシドアニオンを加えて C1 のジアニオン体を生成させ、さらに分子状酸素を導入すると酸素への電子移動反応が進行する。この反応について速度論的解析を行った結果、酸素への電子移動速度定数(k_{et})を $2.8 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と決定した。カテキンの場合、対応するジアニオンから O_2 への k_{et} は $5.6 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であることから、塩基性条件下では C1 はカテキンと比べて活性酸素生成能が低く安全性の高い抗酸化剤であることがわかった。

D. 考察

天然植物抽出物から生活習慣病や老化の予防目的とした抗酸化成分を明らかにし、有用な抗酸化成分を予防化学物質として医療の現場に利用したり、機能性食品成分として利用する為には安全性と有効性に関する的確な評価手法を開発することが必要である。また、植物抽出物を機能性食品成分として利用する為には、製造過程や保存状態による品質保持や共雑物の影響、特に重金属の混入などの影響を常に考慮することが必要である。重金属などの微量成分は抗酸化成分の安全性にも大きく影響することが予測される。従って資源確

保から抽出方法、保存方法等、製品として市場に出回るまでの全ての過程において安全性が保証された品質管理法を確立することが必要である。本研究では各種植物成分を原料として有用な抗酸化成分を探索し、効能、安全性を検証して創薬に結びつけるためには、資源確保、抽出方法、成分測定、安全性試験、効能試験、製剤化等についてある一定の手法を確立し、評価を進めていくことが必要であると考えられた。

本研究では天然抗酸化物を医薬品シーズとしての創薬開発を行う手法の確立に資する研究として、代表的な天然抗酸化物質であるレスベラトロールとカテキンの誘導化を検討した。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の為ラジカル消去能が飛躍的に増加した。また、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 6 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。

天然型フラボノイドを様々な疾病の予防および治療目的として利用する為には、ラジカル消去能の増強、細胞膜透過性(脂溶性)の向上、また、ラジカル傷害を引き起こす部位に特異的に移行できる分子標的剤としての機能が必要である。我々はカテキンの平面固定化

反応を利用することによって、これらの問題を全て解決することが可能と考えた。すなわち、1)天然型フラボノイドの平面構造を固定化することによるラジカル消去能の増加、また、2)平面固定化の際、アセトンの代わりにアルキル側鎖を有したケトンを導入することによる膜透過性の向上、3)ケトンに標的部位に高親和的な置換基を導入することによる分子標的剤としての誘導化が可能である。そこで本研究では長さの異なるアルキル側鎖を導入して脂溶性を向上させた平面型カテキン誘導体を合成した。興味深いことにルミノール法を用いて活性酸素種として AAPH 由来ペルオキシラジカルに対するラジカル消去能を測定した結果、アルキル側鎖が長くなるに従ってラジカル消去能も増強し、R = C3, C4 で最も強力なラジカル消去能を示した。また、有機窒素ラジカル (DPPH) に対するラジカル消去能も同様の傾向を示した。以上の結果はヒドロキシルラジカルによる酸化的 DNA 損傷反応に対する防御作用が R = C4, C5 で最も強く見られた結果と相関しており、平面型カテキンへのアルキル側鎖の導入は脂溶性の向上とともにラジカル消去能の制御にも有効であることがわかった。

E. 結論

天然抗酸化物質の生活習慣病に対する予防効果に着目して、広く国民に信頼される有効性・安全性をもった特定保健用食品、あるいは生活習慣病の予防または治療に有効な医薬品の開発に資する研究を行い、今年度は以下の成果が得られた。

- 1) 可食植物約 6 種の未利用部位から含水エタノール抽出、樹脂精製を経てポリフェノール分画を調整した。抗酸化能 (DPPH、ESR など) を指標とし、①収率がよいこと

(>3%)、②生活習慣病の予防に関する機能性 in Vivo スクリーニング試験 (糖負荷試験、中性脂肪負荷試験)、③食品の機能性 (水溶性、味覚) に優れること、④資源確保が可能であること等の観点から事業化の可能性のある植物エキス 2 種を選別できた。選別したエキスは主要成分として水溶性タンニンとして分類されるカフェ酸誘導体と没食子酸を各々含み、またうち一種にはカテキンに構造が似たフラボノイド配糖体を含むことがわかった。

- 2) 葡萄果皮に含まれている天然抗酸化剤レスベラトロールの抗酸化活性と遺伝毒性との構造活性相関に注目し、毒性の軽減と抗酸化能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を有するメチルレスベラトロール誘導体を 5 種類新規に合成した。その抗酸化活性はレスベラトロールと比べて飛躍的に増強していることがわかった。
- 3) 代表的な天然フラボノイドであるカテキンを医薬品シーズとして抗酸化能の増強と体内への吸収効率の向上を目的とした誘導化を検討し、カテキンの立体構造の平面固定化反応を利用してアルキル鎖が導入された脂溶性平面型カテキン誘導体を合成した。本化合物は天然カテキンと比べて強力な抗酸化活性を有し、またアルキル鎖の長さによって抗酸化活性と脂溶性を調節できることがわかった。

F. 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. Fuikuhara, 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) M. Murata, S. Ohnishi, K. Seike, K. Fukuhara, N. Miyata and S. Kawanishi, Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 1750 – 1756 (2004).

4) N. Sera, H. Tokiwa, H. Utsumi, S. Sasaki, K. Fukuhara, N. Miyata, Association between Chemical properties and oxidative damage due to nitrophenanthrenes and their related compounds in primary rat hepatocytes, *Polycycl. Aromat. Comp.*, **24**, 487 – 500 (2004)

5) 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).

6) 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).

7) A. Matsuoka, C. Lundin, F. Johansson, M. Sahlin, K. Fukuhara, B-M Sjoberg, D. Jenssen, A. Onfelt, Correlation of sister chromatid

exchange formation through homologous recombination with ribonucleotide reductase inhibition, *Mutat. Res.* **547**, 101-107(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 Phenoxy 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, Novemer 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, Novemer 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, Novemer 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, 菓丸晴子, 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、浦野四郎、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、浦野四郎、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- 嫌気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)

G. 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。