

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆宇	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間 正充 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森 静志 …… 1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾 和人 …… 1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野 泰雄 …… 1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田 康文 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

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、優れた抗酸化効果と安全性の高いレスベラトロール誘導体の開発および、カテキンおよびレスベラトロールの製材設計を行った。

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。今年度は、葡萄果皮に含まれ、近年多彩な薬理活性（脂質過酸化の抑制、制癌作用、抗炎症作用等）が明らかとなった抗酸化物質レスベラトロールについて、遺伝毒性を明らかにするとともに、毒性の軽減と抗酸化能の増強を目的とした誘導体の合成を行った。また、代表的な天然抗酸化物質について、その摂取形態を考案するとともに、保健指導の一助として活用できるモニター方法を調査し、これらの組み合わせる方法について考察することとした。

B. 研究方法

1) レスベラトロールの遺伝毒性の解析と新規抗酸化物質の開発

遺伝毒性の解析は、CHL細胞にレスベラトロールおよびその類縁体を添加して細胞培養を行い、姉妹染色分体交換(SCE)を観察した。ま

た、新規抗酸化物質としてレスベラトロール誘導体の合成を Wittig-Honer 反応を利用して行い、活性酸素のモデル化合物であるガルビノキシルラジカルに対する消去反応速度と染色体異常の解析を行った。

2) 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

植物調査、資源確保については資源所有者からのヒアリングあるいは製品購入等により行った。機能性成分の評価についてはバイオインフォーマティクス的手法を用い、網羅的な条件検索を行った。安全性については毒性データベース検索を実施した。また、肥満の成因やモデル化に対する最新技術、ならびに糖尿病への移行をモニタリングするバイオマーカーの開発動向についての調査・ヒアリングを行い、有望な方法について調査ならびに試験のプランニングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は確立した細胞を用いるため、倫理上の問題はない。また、各研究機関の安全管理規定および実験室廃棄物処理要領に則って実験を行った。

C. 研究結果

1) レスベラトロールの遺伝毒性の解析と新規抗酸化物質の開発

レスベラトロールの遺伝毒性を明らかにする目的でレスベラトロールおよびレスベラトロールの水酸基の数および位置が異なる類縁体について姉妹染色分体交換試験を行った。その結果、レスベラトロールは高頻度に姉妹染色分体交換(SCE)を誘発した。類縁体についても同様の試験を行った結果、レスベラトロールと同様に 4'位に水酸基をもつ 3,4'-ジヒドロキシスチルベン、4-ヒドロキシスチルベ

ンは強力な SCE を誘発した。一方、4'位に水酸基を有していない 3,5-ジヒドロキシスチルベン、3,3'-ジヒドロキシスチルベンおよび 3-ヒドロキシスチルベンは SCE 誘発能を示さなかった。

次に、レスベラトロールの抗酸化活性の増強と遺伝毒性の軽減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 5 種類を合成して、活性酸素に対するラジカル消去能の解析と遺伝毒性について検討を行った。その結果、レスベラトロールのガルビノキシルラジカルに対する消去反応速度定数(k_{off})は $4.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であるのに対して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のラジカル消去反応速度定数(k_{off})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の k_{off} 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、CHL 細胞に対する染色体異常試験を行い、遺伝毒性について検討を行った結果、レスベラトロールは高頻度に染色体異常を誘発するのに対して、4'のオルト位(3'位)にメチル基を導入した化合物の染色体異常の頻度は大きく低下し、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の染色体異常は殆どみられなかった。

2) 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

昨年度の研究で、ポリフェノール分解酵素を阻害してカテキンの抗酸化作用を増強し、さらに PPAR γ に結合して脂肪燃焼を促進する可能性がある天然成分として変形トリテルペノイド(ヒルチン)を同定したが、その後の調査・ヒアリングの結果、ヒルチンはケニア産の木材 *Turrea abyssinica* (Meliaceae 属)

から同定された情報しか見いだされなかったため、現状での産業応用は困難であり、他の代替資源を探する必要があった。現在、Meliaceae 属の中で食経験がある植物を中心に調査し、台湾にてお茶として使われているチャンチンを候補として成分解析を行っている。

また、脂肪細胞に作用する抗酸化物質として、カテキンならびにレスベラトロールを選定したが、カテキン含有製剤についてはすでに広く産業応用されている反面、レスベラトロールに関してはまだ高含有量製品は国内販売されていない。本研究では、開発段階のものも含め、オリジナリティの高い原料を調査、ヒアリングした結果、カテキンについては緑茶を乳酸菌にて発酵して茶葉の風味を改善し結果的にカテキン含量を高めた原料を見出した。そこで本原料に便通改善作用のある食物繊維と混合して打錠した食品を試作した。また、フランスのボルドー地方にてブドウの新芽から抽出したレスベラトロールを高含量する原料を見出した。本原料から抽出したレスベラトロールは他の原料、賦形剤などを混合してソフトカプセル製剤に加工した。

D. 考察

本研究では、天然植物抽出物から生活習慣病や老化の予防に有効な化学物質の探索と天然抗酸化物をシーズとした予防化学物質の開発、および抗酸化成分を医薬品およびそれを含む機能性食品を利用する為の有効性と安全性の的確な評価手法の開発を目的としている。

1) レスベラトロールの遺伝毒性の解析と新規抗酸化物質の開発

レスベラトロールは近年、生活習慣病の予防効果が期待される様々な生物活性が明らかとなり、サプリメントや医療への利用が多い

に期待される天然ポリフェノールである。今回、レスベラトロールの遺伝毒性について構造活性相関について検討を行ったところ、レスベラトロールの4'位の水酸基がSCEを高頻度に誘発することがわかった。これは我々が以前明らかにしたDNA切断活性に関する構造活性相関と同様の結果であり、抗酸化活性の本体である4'位の水酸基は遺伝毒性の発現にも重要であることが明らかとなった。

そこで、次に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したレスベラトロール誘導体を合成し、抗酸化作用と遺伝毒性について検討を行った。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。

メチル誘導体の合成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て部分合成を行い、それらをWittig-Honer反応によって縮合させることによって合成した。

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。

また、染色体異常試験の結果、レスベラトロールは高頻度に染色体異常を誘発するのに対して、4'位水酸基のオルト位にメチル基が導入されると染色体異常の頻度は大きく低下することがわかった。レスベラトロールは4'位の

水酸基がリボヌクレオチドレダクターゼの活性中心にあるチロシルラジカルを消去することによって DNA の de novo 合成が阻害され、その結果、染色体異常を誘発する。レスベラトロールのメチル誘導体が染色体異常を誘発しないのは、4'位の水酸基によるチロシルラジカルの消去がメチル基の立体障害によって進行しないことが考えられる。今後は変異原性試験等、様々な毒性試験も行って安全性評価を行うとともに、細胞や動物レベルでの抗酸化効果を明らかにして、メチル誘導体の有効性と産業応用の可能性について検討する予定である。

2) 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

生活習慣病の成因に内臓脂肪の蓄積、さらにインスリン抵抗性の獲得や動脈硬化があることは周知の事実であるが、病気への移行を抑制する食品素材についてはまだ十分に学問として確立されていない状況である。本研究で試作したカテキン製剤は、カテキンによって食後の糖や脂質の吸収を和らげる作用とともに、余分な糖質や脂質を排便とともに放出させることから、最終的に内臓脂肪の蓄積抑制作用が得られるのではないかと推定している。また、肥満、メタボリックシンドロームの予防食品としての利用を考えて作成したレスベラトロールのソフトカプセル製剤については、安全性を九州大学高木らによる 80HdG 法により検討中であり、製剤の安定性については日本薬局方の製剤試験に準拠した方法で確認中である。

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) レスベラトロールの遺伝毒性に関する構造活性相関を解析した結果 4'位の水酸基が遺伝毒性に関係していることが明らかとなった。そこで、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て、水酸基のオルト位にメチル基を導入した誘導体を 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し、また染色体異常の頻度が大きく低下することがわかった。

2) 脂肪細胞に影響を与える抗酸化物質として注目されているカテキンならびにレスベラトロールを産業応用すべく、これらの天然抗酸化成分を含む原料を用いて製剤設計を行った。さらに本製剤の肥満効果を評価しうる新たなモニタリング技術を調査し、これらを組み合わせた生活習慣病予防技術について考察した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Fukuhara, S. Oikawa, N. Hakota, Y. Sakai, Y. Hiraku, T. Shoda, S. Saito, N. Miyata, S. Kawanishi, H. Okuda, 9-Nitroanthracene derivative as a precursor of anthraquinone for photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.* in press.

2) W. Hakamata, I. Nakanishi, Y. Masuda, T. Shimizu, H. Higuchi, Y. Nakamura, T. Oku, S. Saito, S. Urano, T. Ozawa, N. Ikota, N. Miyata, H. Okuda, K. Fukuhara, Planar catechin analogues with alkyl side chains, as a potent

antioxidant and an α -glucosidase inhibitor, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6524-6525 (2006).

3) K Fukuhara, A planar vatechin analogue as a new type of synthetic antioxidant, *Genes and Environment*, **28**, 41-47(2006).

4) K. Fukuhara, M. Nagakawa, I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, S. Urano, S. Fukuzumi, T. Ozawa, N. Ikota, M. Mochizuki, N. Miyata, H. Okuda, Structural Basis for DNA Cleaving-Activity of Resveratrol on the Presence of Cu(II), *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 1437 - 1443 (2006).

2. 学会発表

1) 福原 潔, 中西郁夫, 松岡厚子, 松村友博, 本田幸子, 林美貴子, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 斎藤慎一, 奥田晴宏, 新規抗酸化剤の開発 - レスベラトロールのメチル誘導体 -, 日本薬学会第127年会、富山 (2007, 3).

2) 川島知憲, 中西郁夫, 薬丸晴子, 乳井美奈子, Sushma Manda, 大久保 敬, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 福住俊一, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 安西和紀, 分子内に塩基性部位を有する新規ビタミンE誘導体の合成とラジカル消去活性評価, 第18回ビタミンE研究会、長崎(2007, 1)

3) 福原 潔, 中西郁夫, 松岡厚子, 松村友博, 本田幸子, 林美貴子, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 斎藤慎一, 奥田晴宏, 抗酸化作用の増強と遺伝毒性の軽減を目的としたレスベラトロール誘導体の開発, 日本環境変異原学会第35回大会、大阪(2006, 11)

4) 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保 敬, 川島知憲, Sushma Manda, 金澤秀子, 永澤秀子, 堀 均, 奥田晴宏, 福原 潔, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 福住俊一, 安西和紀 アルテピリンCおよびその誘導体のクミルペルオキシラジカル消去活性, 日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第30回大会, 東京(2006, 9).

5) K. Fukuhara, I. Nakanishi, T. Kawashima, A. Tada, H. Yakumaru, K. Ohkubo, H. Kanazawa, S. Urano, H. Okuda, N. Miyata, K. Anzai, T. Ozawa, S. Fukuzumi and N. Ikota, Synthesis, Radical-Scavenging Activity, and Redox Behavior of Planar Catechin Derivatives, XIII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Switzerland(2006, 8).

6) 福原 潔, 中西郁夫, 松村友博, 斎藤慎一, 宮田直樹, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, レスベラトロールをシーズとした新規抗酸化剤の開発, 第28回日本フリーラジカル学会学術集会, 三重(2006, 5).

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。

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル(小伝馬町駅前)4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社