

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型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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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と産業応用についての検討を行った。また、代表的な天然抗酸化剤であるレスベラトロールとカテキンの構造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、多様な生理活性を有している天然抗酸化剤の構造に着目して、これらの構造を医薬品シーズとした新しい生活習慣病の予防または治療薬の開発を行う。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法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を行い、事業化の可能性のある成分について製剤化を行う。さらに安定供給が可能な抗酸化物質については、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することによって、事業化の可能性のある植物エキスの検討を行った。また、製剤化についても検討した。

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

2-1) 水酸基の付加位置および数の異なるレス

ベラトロール誘導体の合成と生物活性

レスベラトロールのスチルベン骨格は二種類のフェノール誘導体に分けることができる。それぞれ水酸基の付加位置および数の異なるフェノール誘導体を出発原料として用いて目的とするレスベラトロール誘導体を合成した。合成した化合物は PPAR α および γ に対する活性化能、おおよび遺伝毒性（小核および姉妹染色分体誘発能）について解析した。

2-2) レスベラトロールの抗酸化能の増強を目的とした誘導化と生物活性

抗酸化活性の増強を目的とした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を用いて速度論的解析を行った。また、染色体異常についても解析した。

3) カテキンをシーズとした新型抗酸化剤の開発

3-1) 平面型カテキン誘導体の合成

カテキンにアセトン、またはアルキル鎖を有するケトンを反応させてカテキンの立体構造を平面に固定化した平面型カテキン誘導体を合成した。

3-2) 平面型カテキンの抗酸化能の評価

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 を用いて解析した。

3-3) 平面型カテキンの細胞増殖阻害作用

がん細胞に対する細胞増殖阻害能を解析した。また阻害機構についても解析を行った。

(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) 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）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。

また抗酸化成分の製剤化について検討を行った結果、茶葉の乳酸発酵によってカテキン高含有原料を得ることが可能となり食物繊維と混合した製剤を作成した。レスベラトロールについてはボルドー地方の葡萄の新芽からの抽出物を利用して製剤化を行った。

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

2-1) 水酸基の付加位置および数の異なるレスベラトロール誘導体の合成と生物活性

レスベラトロール（3,5,4'-トリヒドロキシトランススチルベン）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。本研究では水酸基の付加位置および数の異なるレスベラトロール誘導体を合成して PPAR に対する作用および遺伝毒性に関する構造活性相関を明らかにした。その結果、レスベラトロールの 4 位の水酸基が PPAR- γ を、また、レスベラトロールの 4 位の水酸基を 3 位に置換すると PPAR- α を活性化することがわかった。一方、レスベラトロールは *in vitro* で遺伝毒性(小核および姉妹染色分体)を誘発することが明らかとなり、構造活性相関から 4 位の水酸基が染色体異常に関係していることがわかった。

2-2) レスベラトロールの抗酸化能の増強を目的とした誘導化

安全で強力な抗酸化作用を有する生活習慣病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 5 種類合成した。抗酸化活性を解析した結果、メチル基の導入によってガルビノキシルラジカルに対するレスベラトロールの水素移動反応速度(ラジカル消去能)は飛躍的に増強した。染色体異常の誘発能はメチル基の導入によって大きく低下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

3-1) 平面型カテキン誘導体の合成

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せることが可能である。本研究では平面型カテキンの体内への吸収効率を増加させる為に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誘導

体はカテキンにアルキル鎖を有するケトン(アセトン、3-ペンタノン、4-ヘプタノン、5-ノナノン、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)を反応させて合成した。

3-2) 平面型カテキンの抗酸化能の評価

DPPH ラジカルおよび AAPH 由来のペルオキシラジカルに対する平面型カテキン誘導体の抗酸化能を測定した。その結果、アルキル側鎖が長くなるに従ってラジカル消去能が増加し、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も同様の結果となった。

3-3) 平面型カテキンの細胞増殖阻害作用

がん細胞(U937 及び HL60)に対する細胞増殖阻害作用を解析した。その結果、平面型カテキンは天然カテキンと比べて強力にがん細胞の増殖を阻害することがわかった。また、アルキル側鎖が長いほど強力な増殖阻害効果を示した。

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。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要求される。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。

また、本研究では天然抗酸化物を医薬品サイズとした創薬開発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とその生物活性について検討した。その結果、レスベラトロールの遺伝毒性は4位の水酸基を3位に置換すると大きく軽減されることがわかった。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と考えられた。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にラジカル消去能が飛躍的に増加した。また、遺伝毒性（染色体異常）がレスベラトロールと比べて大きく軽減されることから、安全性の高い優れた抗酸化剤であることが予測された。今後は細胞や動物レベルで有効性と安全性を明らかにすることによって産業応用の可能性について検討する予定である。

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への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性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。興味深いことに合成した平面型カテキン誘導体はアルキル側鎖の電子効果によって抗酸化活性も増強していること、また、がん細胞に対して強力な増殖抑制効果を示すことが明らかとなり、脂溶性平面型カテキン誘導体が癌の予防物質として優れていることがわかった。

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、以下の成果が得られた。

- 1) 可食植物約16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て事業化の可能性のある植物エキス2種を選別した。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) 緑茶成分カテキンと葡萄果皮に含まれているレスベラトロールについて、メタボリックシンドロームの予防物質としての事業化を目的とした、これらの天然抗酸化成分の資源確保および製剤化を行った。
- 3) レスベラトロールについて遺伝毒性に関する構造活性相関を明らかにした。さらに、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レスベラトロールのメチル誘導体を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、また遺伝毒性は大きく低下し

ていることがわかった。

- 4) 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に固定化し、さらに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とがん細胞増殖阻害作用を示すことがわかった。

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 catechin 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) 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)
- 3) 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).
- 4) 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