

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08032

研究課題名(和文) 多機能なポリメトキシフラボン類の活性分離と標的への送達を指向した合成戦略の展開

研究課題名(英文) Synthetic study on polymethoxyflavones: separation and enhancing of their biological activities

研究代表者

忍足 鉄太 (Oshitari, Tetsuta)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：00279043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：柑橘類に含まれるポリメトキシフラボン類は抗炎症作用、癌の転移抑制作用、認知症改善作用など、さまざまな生理活性を有することが知られている。我々はポリメトキシフラボン類が、主として病態において細胞外マトリックスのリモデリングに関わる酵素であるマトリックスメタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9) の産生を抑制することに着目し、この酵素が関与する主要な疾患である後発白内障、糖尿病網膜症、癌の血管新生などの病態の治療や予防への応用を念頭に、活性の分離や増強を視野に入れた構造活性相関研究を行った。また、ポリメトキシフラボン類がMMP-9の産生を抑制がERKやPI3-Aktを介する機構であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Over the past two decades, increasing attention has been given to polymethoxyflavones (PMFs) because of their diverse bioactivities such as anticancer, antiinflammatory, antidiabetic, and neurotrophic activities. We demonstrated that nobiletin isolated from citrus plants attenuated MMP-9 enzymatic activity through the suppression of transcription for MMP-9 gene and augmentation of TIMP-1 production in retinal Mueller cells. Nobiletin regulated MMP-9 gene expression and TIMP-1 by inhibiting the PI3 K/Akt signaling pathway. We also observed the augmentation of inhibitory action against MMP-9 activity by 4'-demethylnobiletin. We believe that the enhancement of inhibitory action against MMP-9 activity by 4'-demethylnobiletin is through the dual inhibition on Erk1/2 and Akt phosphorylation. The SAR studies revealed that, for the enhancement of inhibitory action against MMP-9 enzymatic activity, demethylation at position 4' in B-ring was a key structural modification in Mueller cells.

研究分野：医薬品化学、有機合成化学

キーワード：ポリメトキシフラボン 後発白内障 糖尿病網膜症 構造活性相関 MMP-9

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 柑橘類の果皮に含まれるポリメトキシフラボン(PMF)は抗炎症作用、癌の転移抑制作用、認知障害改善作用など、興味深い生理活性を示すことから近年とみに注目されてきた。しかし、入手が容易な化合物の種類は限られており、構造活性相関研究を行うには合成化学者の関与が不可欠である。本研究は、本学部薬物治療学教室の小佐野教授から後発白内障や糖尿病網膜症の薬物治療の研究の一環として、代表的な PMF であるノビレチンの活性代謝物の合成を依頼されたことに端を発する。

(2) PMF の合成法は近年報告されたものでも本質的にはロビンソンらが 1940 年代に報告した古典的な手法の延長の域を出ず、高度に酸素官能基化された A 環部位の合成やフラボンの骨格構築には改善すべき点が多い。また、ノビレチンやタンゲレチンなど入手が容易な天然物については様々な生理活性が報告されているものの、構造変換が容易でないためか、多数の類縁体での構造活性相関研究はほとんど行われていなかった。したがって、収束的 (= 多段階を経由せず) 且つ、発散的な (= 後期の工程で反応剤を替えるだけで多様な生成物が得られる) PMF の新規合成法の開発によって、系統的な構造活性相関研究を展開できると考えた。当研究室では 3,4,5-トリメトキシ安息香酸を出発原料にして高度に酸素官能基化された A 環の合成等価体を得る方法を新たに開発し、これを用いてノビレチンの活性代謝物や類縁体を合成し、ヒト水晶体上皮細胞における MMP-9 の産生抑制活性を中心に構造活性相関研究を行った。

## 2. 研究の目的

(1) ヒト水晶体上皮細胞以外に、ヒト網膜ミュラー細胞においても MMP-9 の産生抑制を示すことを確認し、後発白内障のみならず、糖尿病網膜症の予防や治療への応用に向けても構造活性相関研究を行う。

(2) ポリメトキシフラボン類が小胞体ストレスによって誘導されるアポトーシスを抑制する効果についても確認するとともに、MMP-9 の産生抑制の機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 従来のフラボン類の合成法の多くは A 環等価体と B 環等価体の連結後に多段階を経て C 環を閉環するものであるが、多数の類縁体を合成する必要がある構造活性相関研究にはそぐわない。そこで、種々の B 環等価体から短工程でポリメトキシフラボンを与える新規合成法の開発を試みた。まず A/C 環の等価体であるカルボン酸塩化物に B 環部分を含むフェニルアセチレン等価体をクロスカップリングによって導入してか

ら C 環を閉環する手法を検討した。結果的には、クロスカップリングの工程が低収率に留まったり、生成したケトンに対してさらに付加反応が進行したりするなど、反応の制御が難しく、このルートは断念せざるを得なかった。そのため、本課題採択前に確立していた A 環構築法を援用して各種の PMF 誘導体の合成を行った。

(2) ヒト水晶体上皮細胞のほかに、糖尿病網膜症の治療薬や予防薬としての応用を念頭にヒト網膜ミュラー細胞においても MMP 産生抑制活性を評価した。また、MMP 産生抑制の作用機序の解明や、PMF による小胞体ストレス誘導性アポトーシスの制御についても検証した。

(3) 水晶体上皮細胞のほかに、糖尿病網膜症の治療薬や予防薬としての応用を念頭にヒト網膜ミュラー細胞においても MMP 産生抑制活性を評価した。また、MMP 産生抑制の作用機序の解明や、PMF による小胞体ストレス誘導性アポトーシスの制御についても検証した。

## 4. 研究成果

(1) B 環部分の構造を種々変換することにより、ヒト水晶体上皮細胞における MMP 産生抑制活性に関してノビレチンの活性を凌駕する複数の化合物を見出した。これらの化合物による水晶体上皮細胞の増殖抑制活性については本課題採択前に報告してきたが、ヒト網膜ミュラー細胞においても MMP 産生抑制活性を示すことを実証することができた。

(2) また、ポリメトキシフラボン類が小胞体ストレスによって誘導されるアポトーシスを抑制する効果についても確認した。

(3) ノビレチンの代謝物が、ホルボールエステル(PMA)によって誘導される PI3 キナーゼの一種である Akt のリン酸化を抑制する一方で、ERK、p38、JNK1 などの Map キナーゼのリン酸化には殆ど影響を及ぼさないことを見出した。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

田畑英嗣、米田哲也、田坂知彦、伊藤繁和、忍足鉄太、高橋秀依、夏苺英昭、  
Stereochemistry of *N*-benzoyl  
5-substituted-1-benzazepines revisited:  
Synthesis of the conformationally biased  
derivatives and revision of the reported  
structures,  
The Journal of Organic Chemistry、査読有  
り、81巻、2016、3136-3148。  
DOI:10.1021/acs.joc.5b02900

Yoshiki Miyata, Terumasa Nagase,  
Yoshiya Katsura, Hideyo Takahashi,  
Hideaki Natsugari, Tetsuta Oshitari,  
Hiroshi Kosano、In vitro studies on  
nobiletin isolated from citrus plants and  
the bioactive metabolites, inhibitory  
action against gelatinase enzymatic  
activity and the molecular mechanism in  
human retinal Mueller cell line、  
Biomedicine & Pharmacotherapy、査読有  
り、93巻、2017、70-80。  
DOI:10.1016/j.biopha.2017.06.017

[学会発表](計7件)

宮田佳樹、忍足鉄太、奥山祐司、嶋田新、  
高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、  
網膜ミュラー細胞におけるフラボノイドに  
よるマトリックスメタロプロテアーゼ産生  
機構と構造活性相関に関する研究、  
第35回日本眼薬理学会、2015年9月5日、  
ソラシティカンファレンスセンター(東京)

宮田佳樹、忍足鉄太、嶋田新、高橋秀依、  
夏苺英昭、小佐野博史、  
新規フラボン誘導体による白内障予防へ向  
けた構造活性相関研究、  
第54回日本白内障学会、2015年9月15日、  
ミッドランドスクエア(名古屋)

宮田佳樹、忍足鉄太、平田葵、嶋田新、高  
橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、  
白内障関連転写因子 NF- $\kappa$ B に対するフラボ  
ノイドの効果、  
第55回日本白内障学会、2016年7月29日、  
いわて県民情報交流センター(盛岡)

宮田佳樹、忍足鉄太、嶋田新、高橋秀依、  
夏苺英昭、小佐野博史、  
MMP-9 阻害活性の増強につながるポリメト  
キシフラボンの構造特性とメカニズムの検  
討、

第54回日本白内障学会総会、2016年9月10  
日、帝京大学板橋キャンパス(東京)

宮田佳樹、高橋秀依、夏苺英昭、忍足鉄太、  
嶋田新、小佐野博史、  
小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおけ  
るポリメトキシフラボン類のMueller細胞保  
護機構に関する研究、  
第37日本眼薬理学会、2017年9月1日、高  
山市民文化会館(高山)

宮田佳樹、高橋秀依、夏苺英昭、忍足鉄太、  
嶋田新、小佐野博史、  
ミュラー細胞を標的としたポリメトキシフ  
ラボン類による網膜症予防に向けた基礎研  
究、  
The 10<sup>th</sup> Retina Research Meeting、2017年  
12月9日、JPタワーホール&カンファレン  
ス(東京)

宮田佳樹、高橋秀依、夏苺英昭、忍足鉄太、  
小佐野博史、  
Structure-activity relationship study using  
novel polymethoxylated flavones for  
regulation of oxidative stress-mediated  
dysfunction in lens epithelial cells、  
The 5<sup>th</sup> International Conference of the  
Lens、2017年12月14日、Kailua Kona  
(Hawaii)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等:該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

忍足 鉄太(Oshitari, Tetsuta)  
帝京大学・薬学部・教授

研究者番号: 00279043

(2)研究分担者

小佐野 博史(Kosano, Hiroshi)  
帝京大学・薬学部・教授

研究者番号: 40246020

(3)連携研究者

宮田 佳樹 (Miyata, Yoshiki)  
帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：20433881

田畑 英嗣 (Tabata, Hidetsugu)  
帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：80445634