

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590146

研究課題名(和文) 眼疾患の薬物治療への応用を志向したフラボン類の合成及び構造活性相関研究

研究課題名(英文) Synthesis and structure-activity relationships of polymethoxyflavones aimed at application to medical therapy of eye disease

研究代表者

忍足 鉄太(Oshitari, Tetsuta)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：00279043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ノビレチンに代表されるポリメトキシフラボンは柑橘類の果皮に豊富に含まれるものだが、多様な生理活性を示すことから近年、とみに注目されている。我々はこれらの化合物が、後発白内障や糖尿病網膜症の発症に関わる酵素MMP-9の産生を抑制することに着目し、ノビレチンの代謝物やさまざまな類縁体の効率的な合成法の開発を行った。その結果、得られた幾つかの化合物はヒト水晶体上皮細胞株においてノビレチンを凌駕するMMP-9の産生抑制活性を有することが明らかになった。また、ノビレチンの類縁体が水晶体上皮細胞の増殖抑制活性を有すること、ヒト網膜ミュラー細胞においてもMMP-9の産生抑制活性を有することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Over the past two decades, increasing attention has been given to polymethoxyflavones (PMFs). Among them, nobiletin, one of the most abundant PMFs in citrus peel, has been of particular interest and its diverse properties beneficial to health have been reported by many research groups. However, systematic studies on the structure-activity relationships of PMFs have not been widely reported, with a few exceptions. We succeeded in developing a new synthetic method for nobiletin metabolites and congeners, which involves easier access to the highly oxygenated A-ring moiety. The synthesized PMFs showed potent inhibitory activity against pro-matrix metalloproteinase(MMP)-9 production on lens epithelial cells (LECs). Since MMP-9 expression plays an important role in various pathological states including cataract, tumor metastasis, etc., these compounds could be potent lead for chemotherapeutic agents for the treatment of those diseases.

研究分野：有機合成化学

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

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) 2002 年の厚生科学研究報告によれば、「現在のところ、白内障の薬物療法に関して十分な科学的根拠をもつ薬物はない」とされており、白内障の治療には専ら眼内レンズ挿入による外科的処置が施され、薬物療法はほとんどなされない。しかし、挿入された眼内レンズ表面には術後に水晶体上皮細胞の異常な増殖が高頻度で起こるため(後発白内障)高齢化社会における後発白内障の予防は喫緊の課題となりつつある。PMF は白内障の薬物療法に役立つと期待される生理活性物質の一つでもある。これらは、細胞内外でコラーゲンを分解する働きを担う酵素 MMP-9 の産生を抑制する。そのため、白内障以外にも関節リウマチ、糖尿病網膜症、癌の転移など様々な病態に密接に関わる酵素であることが知られており、医薬化学上の標的としても興味深い。

(3) 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。

2. 研究の目的

(1) 上述の観点から研究代表者の専門分野である合成化学を基盤として新規フラボン骨格構築法を開発し、それに基づき多様な PMF 誘導体を合成し、ヒト水晶体上皮細胞における MMP-9 の産生抑制活性を評価して構造活性相関研究を推進する。

(2) その上で、PMF の眼疾患の臨床への応用を目指して血液網膜関門透過性の高い類縁体の合成を行い、生理活性を評価する。

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、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) 血液網膜関門透過性を評価するためには生理活性に大きな影響を与えない箇所に脂溶性の高い置換基を導入しておく必要がある。そのための予備的検討として、A 環の 5 位や 7 位が脱メチル化された誘導体を合成し、LDH アッセイにより細胞毒性を、ゼラチンザイモグラフィ法により MMP の産生抑制活性を評価した。

(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) C 環部分の構造変換により、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。これらの化合物の中には、水晶体上皮細胞の増殖抑制活性を示すものも含まれた。後発白内障とは、白内障の外科的治療(眼内レンズの挿入)の後に高頻度で発症する後遺症であり、手術時に取り残した水晶体上皮細胞が術後に異常に増殖することに端を発し、水晶体後嚢への浸潤と上皮間葉移行を経て発症する病態である。本課題採択前に PMF 類縁体が浸潤の過程で作用する MMP-9 の産生を抑制することは報告してきたが、本研究により PMF 類縁体が水晶体上皮細胞の増殖についても抑制することを実証することができた。これは PMF による後発白内障の(予防も含めた)薬物治療の可能性を裏付けるものである。この成果は次項の論文(速報)にて公表した。

(2) 市販のシリング酸を原料として用いることによって、A 環 7 位が脱メチル化されたノビレチン代謝物の合成に成功した。この

化合物自体にはノビレチンを凌ぐ生理活性は見られなかったが、A 環 7 位の水酸基に炭素数の異なるアルキル鎖を導入することによって血液網膜関門透過性を評価するための足掛かりを確保することができたと考えている。眼疾患の治療薬を経口投与する場合、血液網膜関門を通過できるか否かが重要なポイントとなる。その意味で、5-デメチル体や 7-デメチル体をもとに系統的な類縁体合成を行えるようになったことは大きな一歩である。

(3)PMF が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することにより、糖尿病網膜症の予防や治療への応用の可能性を示した。この他、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も確認した。

(4)ノビレチンが、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。全容解明までの道のりは遠いが、MMP-9 の産生抑制の作用機序も少しずつ明らかになりつつある。

(5)本課題の研究期間全体を振り返ると、類縁体の効率的な合成法の開発やアッセイ系の確立などの基礎研究に存外に時間がかかったため、当初予定していた臨床応用への展開に十分には踏み込めなかったものの、QOL を著しく損なう眼疾患に対する予防も含めた薬物治療への展開のために必要な化学的知見や薬理学的知見のかなりの部分を蓄積することができたと考えている。

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)

嶋田新、宮田佳樹、小佐野博史、Type I Collagen Accelerates the Spreading of Lens Epithelial Cells through the Expression and Activation of Matrix Metalloproteinases、Current Eye Research、査読有り、39 巻、2014、460-471。
DOI:10.3109/02713683.2013.853194

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、Polymethoxyflavones as agents that prevent formation of cataract: Nobiletin congeners show potent growth inhibitory effects in human lens epithelial cells、Bioorganic and Medicinal Chemistry

Letters、査読有り、23 巻、2013、183-187。
DOI:10.1016/j.bmcl.2012.10.133

〔課題採択前に発表した関連論文〕(計 2 件)
忍足鉄太、奥山祐司、宮田佳樹、小佐野博史、高橋秀依、夏苺英昭、B-Ring-modified and/or 5-demethylated nobiletin congeners: Inhibitory activity against pro-MMP-9 production、Bioorganic and Medicinal Chemistry、査読有り、21 巻、2011、7085-7092。
DOI: 10.1016/j.bmc.2011.10.001

忍足鉄太、奥山祐司、宮田佳樹、小佐野博史、高橋秀依、夏苺英昭、Nobiletin metabolites: Synthesis and inhibitory activity against matrix metalloproteinase-9 production、Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters、査読有り、21 巻、2011、4540-4544。
DOI:10.1016/j.bmcl.2011.05.121

〔学会発表〕(計 16 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、新規フラボン誘導体のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害活性に関する構造活性相関、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県神戸市)

宮田佳樹、忍足鉄太、嶋田新、高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、糖尿病網膜症における新規マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬の研究開発、第 7 回 Retinal Research Meeting、2014 年 11 月 22 日、JP タワーホール&カンファレンス(東京都千代田区)

宮田佳樹、忍足鉄太、嶋田新、高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、Non-toxic polymethoxyflavones for prevention of posterior capsular opacification、13th Congress of International Society of Ocular Toxicology 2014、2014 年 10 月 9 日、金沢文化ホール(石川県金沢市)

宮田佳樹、忍足鉄太、嶋田新、高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、新規フラボノイド誘導体の合成と水晶体上皮細胞における構造活性相関研究、第 53 回日本白内障学会総会、2014 年 9 月 27 日、TKP ガーデンシティ品川(東京都港区)

宮田佳樹、忍足鉄太、奥山祐司、渡部和幸、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小胞体ストレス誘導性アポトーシスに対するフラボノイドの抑制効果、第 34 日本眼薬理学会、2014 年 9 月 14 日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

忍足鉄太、奥山祐司、荒木拓嗣、宮田佳樹、嶋田新、小佐野博史、高橋秀依、夏苺英昭、6-Demethylnobiletin 及び 7-Demethylnobiletin の合成研究、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

宮田佳樹、忍足鉄太、奥山祐司、増田晴菜、渡部和幸、嶋田新、高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、ポリメトキシフラボンによる小胞体ストレス誘導性アポトーシスの制御機構、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

宮田佳樹、忍足鉄太、嶋田新、高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、Inhibitory action of newly-synthesized polymethoxyflavones against matrix metalloproteinase in human lens epithelial cells、International Conference of Lens、2014 年 1 月 22 日、ハワイ(アメリカ合衆国)

宮田佳樹、忍足鉄太、嶋田新、高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、水晶体上皮細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ産生に対する新規フラボノイド化合物の抑制効果、第 40 回水晶体研究会、2014 年 1 月 11 日、ホテルコスモスクエア国際交流センター(大阪府大阪市)

宮田佳樹、忍足鉄太、嶋田新、高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、網膜ミュラー細胞を標的とした新規フラボノイド化合物のライブラリーを基盤とする創薬研究、第 6 回 Retinal Research Meeting、2013 年 11 月 30 日、JP タワーホール&カンファレンス(東京都千代田区)

忍足鉄太、奥山祐司、荒木拓嗣、宮田佳樹、嶋田新、小佐野博史、高橋秀依、夏苺英昭、A 環部位に水酸基を有するノビレチン代謝物の合成研究、第 39 回反応と合成の進歩シンポジウム、2013 年 11 月 6 日、九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)

宮田佳樹、忍足鉄太、奥山祐司、高澤峻磨、嶋田新、高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、水晶体上皮細胞に対するフラボノイド化合物の増殖抑制効果、第 52 回日本白内障学会総会、2013 年 6 月 27 日、シェラトン・グランデ・トーキョーベイホテル(千葉県浦安市)

宮田佳樹、杉田祐子、忍足鉄太、奥山祐司、武川香織、嶋田新、高橋秀依、夏苺英昭、小佐野博史、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害能を指標とした新規フラボノイド化合物の糖尿病網膜症予防薬としての有用性評価、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

忍足鉄太、宮田佳樹、奥山祐司、小佐野博史、高橋秀依、夏苺英昭、ポリメトキシフラボン類の合成とヒト水晶体上皮細胞の増殖抑制活性、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

忍足鉄太、宮田佳樹、奥山祐司、小佐野博史、高橋秀依、夏苺英昭、Nobiletin 誘導体の構造活性相関研究、第 39 回反応と合成の進歩シンポジウム、2012 年 11 月 6 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

宮田佳樹、忍足鉄太、奥山祐司、高橋秀依、夏苺英昭、嶋田新、小佐野博史、フラボノイド化合物による後発白内障予防効果とその分子機構、第 51 回日本白内障学会総会、2012 年 6 月 15 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔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・准教授

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, Yoshiaki)
帝京大学・薬学部・講師

研究者番号: 20433881

田畑 英嗣(Tabata, Hidetsugu)
帝京大学・薬学部・助教

研究者番号: 80445634