

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18590105
 研究課題名（和文） アスコルビン酸を規範とする新規抗酸化活性化合物の創製
 研究課題名（英文） Development of new-type antioxidant based on the structure of ascorbic acid.
 研究代表者 高橋 恭子（TAKAHASHI KYOKO）
 慶應義塾大学・薬学部・助教
 研究社番号：90255381

研究成果の概要：

新規骨格を有する抗酸化剤の創製を目指し、アスコルビン酸および脳保護薬エダラボンの活性発現部位と等価な構造を有する 2,2 ユ-pyridoin 類、acyl-indanone 類をデザイン・合成した。新規誘導体の多くは良好なラジカル消去活性を示した。一部は細胞内の酸化ストレス軽減効果とそれに伴う細胞の保護効果を有することから、基盤とした既存の活性化合物を上回る、高活性の抗酸化剤と成り得る。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	500,000	150,000	650,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	300,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：抗酸化活性、酸化ストレス、エダラボン アスコルビン酸、尿酸

1. 研究開始当初の背景

活性酸素は、本来生体の防御反応に必須の化合物であるが、生成と消去のバランスが崩れて活性酸素過剰となると、多種の疾病を誘発する。特に細胞膜に存在する不飽和脂肪酸は非常に活性酸素の影響を受けやすく、生成する脂質過酸化物は高い反応性を有し、生体内において DNA や酵素などの

高分子活性成分や組織を損傷し、がん、アレルギー性疾患などを招く。また、脂質過酸化物は局所より血中に流出し、血管病変をはじめとする二次的病変の原因となることも知られている。糖尿病の合併症、腎不全の合併症、ショック時の多臓器不全などはその代表である。活性酸素を除去する抗酸化物質は重要視され、食品やサプリメント

トにも機能を求められているが、抗酸化活性を主作用として認可されている医薬品はエダラボン（ラジカット TM）のみである。エダラボンは虚血再灌流障害の軽減を主作用とする脳保護薬として用いられるが、ALS（筋萎縮性側索硬化症）治療薬としての有効性など広範な活性も見出され、抗酸化活性化合物の医薬品としての有用性を示している。

2. 研究の目的

既存の抗酸化活性化合物のほとんどは活性部位としてフェノール性水酸基を有し、その水溶性の高さから脂質膜における脂質過酸化抑制効果は必ずしも高くない。申請者は、細胞膜および細胞内に到達してその機能を効果的に発現できる脂溶性低分子抗酸化化合物の探索とその医薬品としての開発を目指している。高い活性のみではなく、吸収や代謝をより向上させ、副効用発現を軽減するために、新規リード化合物の創出と、その構造活性相関を明らかにすることが必要である。本研究ではリード化合物の候補として、アスコルビン酸の抗酸化機能発現部位である電子吸引性置換基と共役したエンジオール構造を導入した化合物を標的とした。ハイブリッドさせる骨格にはステロイド骨格、ベンゾインもしくはピリドイン骨格を基本とした。エダラボンの活性発現部位と等価である α, β -ジカルボニル化合物とのハイブリッドも視野に入れて研究を開始した。将来的にはリード化合物の最適化により医薬品として利用可能な化合物に到達することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化合物のデザインと合成

本研究ではエンジオールもしくはその等

価体である α -ヒドロキシカルボニル、または α, β -ジカルボニル基を有する化合物を新規にデザインし、合成した。電子求引性基との共役は活性発現部位であるエンジオールのアニオン型を安定化するために必須と考えられるが、過剰な電子密度の低下はアニオンの還元力の低下を促し、消去活性を低下させる危険性が高い。生理的条件下におけるこのバランスをコントロールすることが鍵となる。平面的骨格は共役安定化に有利と考えられる。また官能基導入によるバランスのコントロールにも多様な手法を用いることができる。新規化合物の合成には高効率な合成計画を用いたが、個別の反応の収率の最適化等は割愛して最短で目的物に到達することを優先した。

(2) 抗酸化活性の評価

化学的活性試験法としてヒドロキシドラジカル又は安定なラジカルである DPPH(2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl)に対するラジカル消去能、および脂質過酸化抑制能を紫外可視吸光光度計により測定し、評価した。また、ラジカル消去活性と構造との相関を評価するに当たって必要な物性値として、サイクリックボルタンメトリーによる酸化電位測定を行い、アニオン化の指標として pKa、脂質膜への親和性の指標として脂溶性も実測、もしくは計算により算出した。水素ラジカル生成エネルギーの指標として結合解離エネルギーを算出し、ラジカル消去メカニズムの考察の一助とした。

先述の化学的な活性試験法は一部に生体成分を用いるものの、主に化合物とラジカル種との反応を評価したものであり、実際に *in vivo* においても化合物の抗酸化活性が有効であるかどうかを直接反映しない場合もある。最終的には虚血再灌流モデルなど

の疾患モデル動物を用いた実験を行うことが理想であるが、活性に薬物動態の影響が加わってくることで結果に曖昧さを残す可能性がある。そこで、完全に *in vivo* ではないものの、生体に近い系において比較的直接化合物の抗酸化活性を評価する実験として、ヒト前骨髄球性白血病株 (HL-60) 培養細胞系における酸化ストレス抑制効果を測定した。同時に、細胞内の ROS 量の増減を評価するため、細胞内 ROS 感受性の蛍光プローブである 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて細胞内 ROS の消去活性を測定した。

4. 研究成果

(1) α -pyridoin 類縁体および関連化合物の合成と活性評価

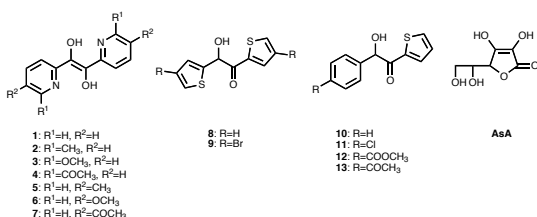


Fig. 1 2,2'-pyrdoin 類、2,2'-thenoin 類、benzthienoin 類、および AsA の構造

高い抗酸化活性を持つアスコルビン酸 (AsA) の活性発現部位と等価な構造を有する α -pyridoin **1** および誘導体 (**2**~**7**)、2,2'-thenoin 類 (**8,9**) が高い抗酸化活性を有することを明らかにした (Fig.1)。特に高い脂質過酸化阻害効果を示した **5** と **6**、および pyrdoin 類よりも金属存在下でのプロオキシダント効果の低い 2,2'-thenoin (**8**) は、新規抗酸化剤のリード化合物となる可能性が示された。そこで新規化合物として非対称類縁体である benzthienoin 類 (**10-13**) を新規に合成し抗酸化活性を比較すると共に、一連の化合物の酸化ストレスに対する細胞保護効果の評価した。

DPPH ラジカル消去活性を比較したところ benzthienoin 類 **10-13** の活性は、2,2'-pyrdoin 類の 1/1000 以下であり、エンジオールの隣接位はともに芳香複素環であることが有利であると示された。プロオキシダント効果の測定により、**1** および **5** による \cdot OH 生成量は AsA と同様に濃度依存的に増加したが、**6** は 20 μ M 程度まで、**3** は 3 μ M においても \cdot OH 生成が少なかった。**8** および **10-13** の \cdot OH 生成量は **1** や AsA の約 1/4 であった。さらに脂質過酸化抑制効果および脂溶性、水溶液中における安定性も比較検討した。

細胞系における酸化ストレス抑制効果を比較するため、**1-13** の HL-60 細胞に対する毒性を評価し、**9** を除き 60-100 μ M、24 h の曝露では毒性を示さないことを確認した。次に H₂O₂ による酸化ストレス条件下での細胞保護効果を検討したところ、**1,8** は AsA とほぼ同等の効果であったが、2,2'-pyrdoin 類 **3, 5, 6** は AsA よりも有意に細胞生存率を上昇させた。一方 benzthienoin 類 **11** が若干の効果を示したほかは有意な活性は示さなかった (Fig. 2)。

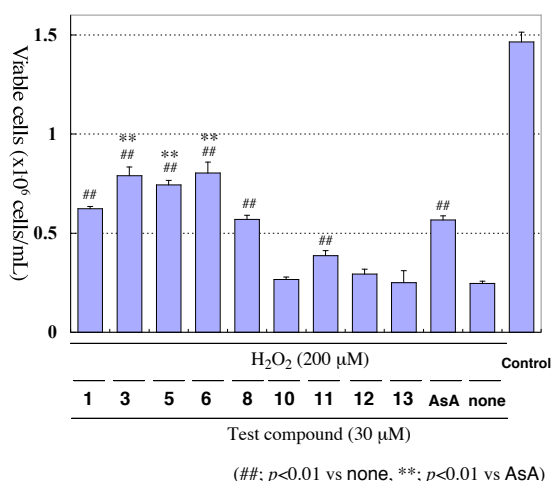


Fig. 2 細胞保護効果

DCFH-DA を用いた細胞内 ROS 消去活性測定において、細胞保護効果の高い **3, 5, 6** は

ほぼ control と同程度のレベルの活性を示したが、**1** の活性は低かった。**8** は AsA とほぼ同程度の細胞内 ROS 除去活性を示したが、benzthienoin 類 **10-13** には有意な効果はみられなかった。**8** は DPPH のように比較的安定性の高いラジカルに対しての反応性は低いものの、生体分子の酸化に対しては比較的優れた抗酸化活性を示すものと考えられる。

以上の結果より、細胞系で毒性発現することなく優れた抗酸化活性を発揮する **3**、**5**、**6**、**8** が、新規な抗酸化医薬品のリード化合物として有望であることを見出した。

(2) 1,3-cyclopentanedione および関連化合物の合成と活性評価

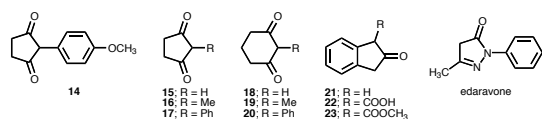


Fig. 4 1,3-cycloalkanedione 類、2-indanon 類、および edaravone の構造

従来の抗酸化剤研究では、主にフェノール性水酸基やエンジオール構造を有する化合物が注目されてきた。一方脳保護薬のエダラボンは、エノラートがラジカル種を一電子還元し、自らは安定なラジカルとなる優れた抗酸化剤である。当講座ではエダラボンの骨格を規範とし、1,3-cyclopentanedione を基本骨格とした誘導体をデザイン・合成し、その抗酸化活性を検討した結果、特に 2-(4-methoxyphenyl)-1,3-cyclopentanedione (**14**) がエタノール中においてエダラボンと同程度の DPPH ラジカル除去活性を有することを見出した。しかし、この活性は中性条件では活性が消失した。エダラボン等のラジカル除去機構はエノラートアニオンを介する一電子供与によると考えられ、活性の発

現には、pKa が適度であること、エノラートアニオンの還元力が高いことが求められる。そこで、中性条件における活性の発現と構造活性相関の解明を目的として β-ジケトン **15-20**、および 2-indanone (**21**) と α-ケトカルボン酸 **22**、α-ケトエステル **23** に着目しラジカル除去活性、pKa、酸化還元電位を比較した(Fig. 4)。

これらの化合物の中で β-ジケトン **19** は弱いながらも中性条件下で DPPH ラジカル除去活性を示したことから、ベンゼン環を含まない新しいタイプの抗酸化剤の基本骨格となりうることが示された。また α-ケトエステル **23** はエダラボンの約 2 倍の DPPH ラジカル除去活性を示し、脂質過酸化抑制効果もエダラボンと同程度であった。α-ケトエステル **23** の pKa 値は 6.31 とエダラボン (7.11) に近く、アニオンの過度の安定化を抑えたことが有利に働いたと考えられる。

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 1 件)

- ① 2,2'-Pyridoin derivatives protect HL-60 cells against oxidative stress、Masashi Hatanaka、Chiho Nishizawa、Kyoko Takahashi、Shigeo Nakamura、Tadahiko Mashino、Bioorg Med Chem Lett、18、2008、5290-5293、査読有。

[学会発表] (計 9 件)

- ① 横川めぐみ、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、2-アセチルインダノン類の抗酸化活性、日本薬学会第129年会、2009年3月28日、京都
- ② 柿木智宏、安田大輔、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、新規尿酸アナログの抗酸

化活性と構造活性相関、日本薬学会第129年会、2009年3月28日、京都

- ③ 柿木智宏、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、抗酸化活性を有する尿酸誘導体の合成と構造活性相関、酸化ストレスに対する細胞保護効果、第27回メディシナルケミストリーシンポジウム、2008年11月27日、大阪
- ④ 横川めぐみ、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、2-アリアル-13-ジカルボニル化合物の抗酸化活性、第52回日本薬学会関東支部大会、2008/10/04、東京
- ⑤ 高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、 β -ケトエステル構造を有する新規抗酸化剤、日本酸化ストレス学会 第61回学術集会、2008年6月19日、京都
- ⑥ 柿木智宏、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、尿酸類縁体の抗酸化活性における構造活性相関、日本薬学会第128年会、2008年3月26日、横浜
- ⑦ 西野優希、松本麻里子、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、アルコキシカルボニル-2-インダノン骨格を有する抗酸化化合物の探索、日本薬学会第128年会、2008年3月26日、横浜
- ⑧ 柿木智宏、松本麻里子、横川めぐみ、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、尿酸の抗酸化活性発現部位の決定、第22回日本酸化ストレス学会、2007年12月13日、東京
- ⑨ 畑中雅史、西澤千穂、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、22'-Pyridoin 類縁体の細胞系における酸化ストレス抑制効果と水溶液中における安定性の検討、第29回日本フリーラジカル学会学術集会 日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第31回大会、2007年6月8日、名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 恭子 (TAKAHASHI KYOKO)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究社番号：90255381

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし