

平成21年6月5日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590113  
 研究課題名（和文） 生体の酸化的障害に対する防護化合物の開発研究  
 研究課題名（英文） Studies on Development of Protective Compounds against Oxidative Damages  
 研究代表者  
 伊古田暢夫（IKOTA NOBUO）  
 就実大学・薬学部・教授  
 研究者番号：80159649

研究成果の概要：抗酸化能を高め、副作用の少ない抗酸化剤、特にポリフェノール類の探索・開発とその抗酸化機構の解明を行い、新規レスベラトロール誘導体を開発しそのラジカル消去機構を電子移動と引き続きプロトン移動による機構であることを明らかにした。また放射線防護剤の開発を、被ばく後の酸化的障害の回復という観点から行い、ミネラル含有熱処置酵母とトコフェロール、およびトコトリエノールのN,N-ジメチルグリシンエステル誘導体が被ばく後の障害回復に有効であることを見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,600,000	780,000	3,380,000
20年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：酸化的ストレス、酸化的障害、生理活性物質、放射線防護剤、有機化学

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの抗酸化剤の開発は、活性酸素や活性窒素などの消去能という点に重点をおいて研究されている。ポリフェノール類は、抗酸化能が増大すると、反面、活性酸素などを生成して副作用を引き起こす場合があるなど、抗酸化能が強く、副作用の少ない物質の開発が求められている。一方、医療による放

射線被ばくや事故による高線量放射線被ばくによる生体の酸化的障害も問題になっており、放射線防護剤の開発は重要な課題である。しかし、放射線被ばくによる生体障害を予防、および治療するための薬剤で実用化されている物質は少なく、特に被ばく後に投与して有効な防護剤の開発が望まれていた。

## 2. 研究の目的

抗酸化能を高め、副作用の少ない抗酸化物質の探索・開発を目的とし、特に放射線障害からの回復を目指した防護剤の開発、ならびに、抗酸化機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

スーパーオキシドやヒドロキシルラジカルなどの消去化合物の探索には、合成化合物の消去能評価に DMP0 (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) を用いる ESR (電子スピン共鳴装置) スピントラッピング法を用いた。またガルビノキシラジカルの消去に関しては紫外・可視分光学的方法にて行った。ペルオキシラジカル消去に関してはクメンペルオキシドラジカルの消去を直接 ESR で測定した。染色体異常実験は CHL (Chinese hamster lung) 細胞を用いて行った。また高線量の放射線に対する防護能の評価には、マウスを使用し、薬剤投与の前後に 7-8Gy の放射線を照射し、その後 30 日間の生存率を調べることによりその防護能を評価した。

### 4. 研究成果

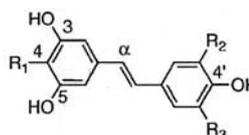
#### 1. 活性酸素消去剤の探索・開発

合成抗酸化剤として、トロロックスとビタミン C 誘導体をエステル結合した化合物(I)、カフェイン酸にシステアミンをアミド結合させた化合物(II)、 $\alpha$ -リポ酸にビタミン C 誘導体をエステル結合した化合物(III)、トロロックスにシステイン誘導体を結合させた化合物(IV, V)などを用いた。消去能評価は DMP0 を用いる ESR スピントラッピング法にて行い、コントロールの付加体のピーク強度を半分にする濃度 IC<sub>50</sub> を求めた。ポジティブコントロールとしてトロロックスを選んだ(O<sub>2</sub>に対して、0.4mM、OH・に対して、1mM)。消去能はそれぞれ以下の通りであった。I : 1.72mM、0.08mM、II : 10mM、0.3mM、III : 0.008mM、0.03mM IV : 0.648mM、0.023mM、V : 0.23mM、0.022mM。

#### 2. ポリフェノール類のラジカル消去機構の解明

レスベラトロールのラジカル消去機構については、ガルビノキシラジカルとの反応を分光学的に解析した。レスベラトロールはガルビノキシラジカルを消去するが、この反応において、マグネシウムイオンを添加すると、その消去速度は著しく増加した。これは、レスベラトロールから 1 電子が移動したガルビノキシイオンをマグネシウムイオンが安定化するためであり、それに続くプロトン移動の 2 段階機構によりラジカルを消去する電子移動であることを明らかにした。

#### 3. 新規ポリフェノール類の開発



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
レスベラトロール	H	H	H
3'-メチルレスベラトロール	H	CH <sub>3</sub>	H
3',5'-ジメチルレスベラトロール	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
4-メチルレスベラトロール	CH <sub>3</sub>	H	H
3',4'-ジメチルレスベラトロール	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
3',4,5'-トリメチルレスベラトロール	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

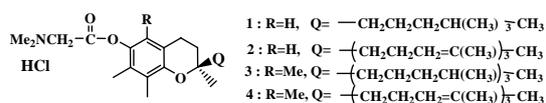
抗酸化剤として知られているポリフェノールであるレスベラトロールの抗酸化能の増強、ならびに毒性軽減のため構造変換 (特に芳香環に電子供与性基であるメチル基の導入) を行い、抗酸化能と毒性に及ぼす影響を調べた。メチル基を 3 個導入した 3',4,5'-トリメチルレスベラトロールのガルビノキシル (galvinoxyl) ラジカルに対する消去速度は、レスベラトロールの約 60 倍速かった。また遺伝子毒性 (genotoxicity) として、染色体異常をチャイニーズハムスター培養細胞を用いて行くと (濃度 20 μg/ml、48 時間処理)、レスベラトロールそのものでは約 50% の染色体異常が見られるが、3',4,5'-トリメチル体では数パーセントと激減し、メチル基の導入は、抗酸化能を増強する作用と、

毒性の軽減に寄与することが判明した。

#### 4. 放射線防護剤の探索・開発

放射線防護剤について既にニトロキシド類、スピントラップ剤、ラジカット、TM G (水溶性ビタミン E 誘導体)、亜鉛含有熱処理酵母、 $\gamma$ -TDMG ( $\gamma$ -Tocopheryl *N,N*-dimethylglycinate) などについて報告した。今回、さらに銅 (5%)、マンガン (5%)、セレン (0.2%) などのミネラルを含有する熱処理酵母についての評価と、亜鉛含有酵母の防護機構の検討、および  $\gamma$ -TDMG 関連物質の評価をマウスを用いて行った。10 週齢の雄性 C3H マウス (体重 25-28 g) に 7.5Gy の X 線を全身照射し、30 日生存率から防護剤の活性を評価した。投与群は各種ミネラル含有酵母 (0.5% メチルセルロース溶液に懸濁) を照射前、または後に腹腔に投与し (100 mg/kg)、対照群は 0.5% メチルセルロース溶液を腹腔に投与した。Cu 酵母、Mn 酵母、Se 酵母を照射 30 分前に 100 mg/kg を腹腔内投与した 30 日生存率は各 89 % (n=26)、68 % (n=25)、63 % (n=30) であり (コントロール: 8 % (n=65))、照射直後投与では、各 91 % (n=33)、81 % (n=37)、75 % (n=47) であった。Zn 酵母の投与量依存性を、照射直後で調べると 50-100 mg/kg で高い生存率が得られた。Zn 酵母の照射後 4 時間後投与で 70%、24 時間後投与で約 30% と有効であった。亜鉛含有酵母の防護機構を明らかにするために、内因性脾臓コロニー測定を行うと、照射直後に Zn 酵母投与により内因性脾臓コロニー数が 4 倍程度増加し、作用機構として生き残った骨髄幹細胞の賦活化が考えられる。また、照射後 Zn 酵母投与時の骨髄における発現プロファイルを解析すると、*Edn1* などの血管系分子の発現が亢進し、一方、炎症関連分子の発現を抑制した。さらに骨髄の出血抑制と骨髄細胞増殖が見られ、骨髄細胞に対する直接的防護作用というより、

骨髄マトリックスにおける血管系の保護、抗炎症作用が大きく関与していることが示された。 $\gamma$ -TDMG の防護作用について、さらに検討し、照射 24 時間後に腹腔投与 (100 mg/kg) しても、30 日生存率は 40 % であった (コントロール、7%)。また皮下投与した場合も有効であった。 $\alpha$ -トコフェロール、 $\alpha$ -または  $\gamma$ -トコトリエノールの照射直後、腹腔投与 (100 mg/kg) した 30 日生存率は各 85, 91, 85% と、いずれも高い防護効果を示した。



#### 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 18 件)

1. Hidehiko Nakagawa, Nobuko Komai, Mitsuko Takusagawa, Yuri Miura, Tosifusa Toda, Naoki Miyata, Toshihiko Ozawa, and Nobuo Ikota, Nitration of Specific Tyrosine Residues of Cytochrome c is Associated with Caspase-cascade Inactivation. *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 15-20 (2007).
2. Ikuo Nakanishi, Kumiko Kawaguchi, Kei Ohkubo, Tomonori Kawashima, Sushma Manda, Hideko Kanazawa, Keizo Takeshita, Kazunori Anzai, Toshihiko Ozawa, Shunichi Fukuzumi, and Nobuo Ikota, Scandium Ion-accelerated Scavenging Reaction of Cumylperoxyl Radical by a Cyclic Nitroxyl Radical via Electron Transfer. *Chem. Lett.*, **36**, 378-379 (2007).
3. Sushma Manda, Ikuo Nakanishi, Kei Ohkubo, Tomonori Kawashima, Ken-ichiro Matsumoto, Toshihiko Ozawa, Shunichi Fukuzumi, Nobuo Ikota, and Kazunori Anzai, Effect of Solvent Polarity on the One-Electron Oxidation of Cyclic Nitroxyl Radicals. *Chem. Lett.*, **36**, 914-915 (2007).
4. K. Matsumoto, M. Narazaki, H. Ikehira, K.

- Anzai, N. Ikota, Comparisons of EPR imaging and T<sub>1</sub>-weighted MRI for Efficient Detection of Nitroxyl Contrast Agents. *J. Magn. Reson.*, **187**, 155-162 (2007).
5. Nobuko Akiyama, Ikuo Nakanishi, Kei Ohkubo, Kazue Satoh, Koichiro Tsuchiya, Takeshi Nishikawa, Shunichi Fukuzumi, Nobuo Ikota, Toshihiko Ozawa, Masafumi Tsujimoto, and Shunji Natori, A Long-Lived o-Semiquinone Radical Anion is Formed from N--alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxy-phenylalanine (5-S-GAD), an Insect-derived Antibacterial Substance. *J. Biochem.*, **142**, 41-48 (2007).
6. Ikuo Nakanishi, Tomokazu Shimada, Kei Ohkubo, Sushma Manda, Takehiko Shimizu, Shiro Urano, Haruhiro Okuda, Naoki Miyata, Toshihiko Ozawa, Kazunori Anzai, Shunichi Fukuzumi, Nobuo Ikota, and Kiyoshi Fukuhara, Involvement of Electron Transfer in the Radical-Scavenging Reaction of Resveratrol. *Chem. Lett.*, **36**, 1276-1277 (2007).
7. Sushma Manda, Ikuo Nakanishi, Kei Ohkubo, Haruko Yakumaru, Ken-ichiro Matsumoto, Toshihiko Ozawa, Nobuo Ikota, Shunichi Fukuzumi, and Kazunori Anzai, Nitroxyl radicals: Electrochemical redox behaviour and structure-activity relationships, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 3951-3955, 2007.
8. K. Matsumoto, H. Yakumaru, M. Narazaki, H. Nakagawa, K. Anzai, H.I. kehira, N. Ikota, Modification of Nitroxyl Contrast Agents with Multiple Spins and Their Proton T<sub>1</sub> Relaxivity. *Magn. Reson. Imaging*, **26**, 117-121 (2008).
9. Kiyoshi Fukuhara, Ikuo Nakanishi, Atsuko Matsuoka, Tomohiro Matsumura, S. Honda, M. Hayashi, Y. Matsuda, Toshihiko Ozawa, Shinichi Saito, Nobuo Ikota, and Haruhiro Okuda, Effect of Methyl Substitution on Antioxidative Property and Genotoxicity of Resveratrol. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 282-287 (2008)
10. Kouichi Nakagawa, Nobuo Ikota, and Yukio Sato, Heavy-ion Induced Scrose and L- $\alpha$ -Alanine Radicals Investigated by EPR, *Appl. Magn. Reson*, **33**, 111-116 (2008).
11. Kouichi Nakagawa, Nobuo Ikota, and Kazunori Anzai., Scrose radical-production cross section regarding heavy-ion irradiation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **63**, 1384-1387 (2008).
12. Sushma Manda, Ikuo Nakanishi, Kei Ohkubo, Yoshihiro Uto, Tomonori Kawashima, Kiyoshi Fukuhara, Haruhiro Okuda, Hitoshi Hori, Toshihiko Ozawa, Nobuo Ikota, Shunichi Fukuzumi, and Kazunori Anzai, Enhanced Radical-Scavenging Activity of Naturally-Oriented Artepillin C Derivatives, *Chem. Commun.*, 626-628, 2008.
13. Kazunori Anzai, Nobuo Ikota, Megumi Ueno, Minako Nyui, Tsutomu V. Kagiya, Heat-Treated Mineral-Yeast as a Potent Post-irradiation Radioprotector, *J. Radiat. Res.*, **49**, 425-430 (2008).
14. Suzuki, T., Ida, K., Uchibe, S., Inukai, M., Reaction of 2'-deoxycytidine with peroxy nitrite in the presence of ammonium bromide. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 5164-5170, 2008
15. Suzuki, T., Fukai, T., Seki, Y., Inukai, M. Acetylation to amino group on guanosine induced by nitric oxide in acetonitrile under aerobic conditions. *Chem. Pharm. Bull.* **57**, 89-91, 2009.
16. Suzuki, T., Iwakura, K., Takashima, Y., Kasajima, N., Inukai, M., Formation of diazoate intermediate upon nitrous acid and nitric

oxide treatment of 2'-deoxyadenosine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 788–791, 2009

17. Suzuki, T., Moriwaki, N., Kurokawa, K., Inukai, M. Effects of bromide upon reaction of nucleosides with hydrogen peroxide induced by ultraviolet light. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* in press.

18. Suzuki, T., Naka, A., Kimura H. Effects of uric acid on nitrosation of N-acetylcysteine by diethylamine NONOate and N-acetyl-N-nitrosotryptophan. *Chem. Pharm. Bull.* in press.

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 安西 和紀、上野 恵美、乳井 美奈子、薬丸 晴子、中西 郁夫、上田 順市、伊古田 暢夫、鍵谷 勤、X 線照射後腹腔内投与でマウス骨髄死を防護するミネラル含有酵母、第 1 回日本放射線防護研究会、2007. 05. 20、京大会館(京都)

2. 安西 和紀、上野 恵美、稲野 宏志、小野田 眞、伊古田 暢夫、鍵谷 勤、X 線によるマウス骨髄死およびラット乳腺腫瘍発生対する水溶性ビタミン E 誘導 tocopherol monoglucoside (TMG) の防護効果、第 1 回日本放射線防護研究会、2007. 05. 20、京大会館(京都)

3. 中西 郁夫、大久保 敬、宇都 義浩、川島 知憲、M a n d a S u s h m a、福原 潔、奥田 晴宏、堀 均、伊古田 暢夫、福住 俊一、安西 和紀、小澤 俊彦、天然フェノール性抗酸化物質を基本骨格にした新規抗酸化物質の開発、第 7 回 AOB 研究会、2007. 06. 01、台大醫院國際會議中心(台北市)

4. 福原 潔、中西 郁夫、小澤 俊彦、伊古田 暢夫、宮田 直樹、奥田 晴宏、抗酸化成分レスベラトロールのラジカル消去活性の増強と遺伝毒性の軽減、第 40 回酸

化反応討論会、2007. 11. 17、奈良女子大学文学部南棟 2 階 218 教室(奈良県奈良市)

5. 福原 潔、中西 郁夫、小原 美紀、大久保 敬、川島 知憲、小澤 俊彦、伊古田 暢夫、安西 和紀、福住 俊一、宮田 直樹、斎藤 慎一、奥田 晴宏、分子内にリジン部位を有する平面型カテキン誘導体のラジカル消去反応、第 22 回生体機能関連化学シンポジウム、2007. 09. 28、東北大学多元物質科学研究所(宮城県仙台市)

6. 中西 郁夫、島田 知一、大久保 敬、M a n d a S u s h m a、清水健彦、浦野四郎、奥田晴宏、宮田直樹、小澤俊彦、安西和紀、福住俊一、伊古田暢夫、福原潔、プロトン共役電子移動を経由するレスベラトロールのラジカル消去反応、日本薬学会第 128 年会、2008. 03. 26、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

7. 安西 和紀、上野 恵美、伊古田 暢夫、高田 二郎、 $\gamma$ -TDMG による被曝マウスの骨髄死抑制、第 2 回日本放射線防護(生体防御)研究会、2008. 06. 01、京大会館(京都市)

8. 安西 和紀、伊古田 暢夫、上野 恵美、乳井 美奈子、鍵谷 勤、ミネラル酵母の放射線防護効果、第 2 回日本放射線防護(生体防御)研究会、2008. 06. 01、京大会館(京都市)

9. 中西 郁夫、宇都 義浩、大久保 敬、M a n d a S u s h m a、松本 謙一郎、永澤 秀子、堀 均、福原 潔、奥田 晴宏、伊古田 暢夫、福住 俊一、安西 和紀、小澤 俊彦、天然抗酸化物質の生合成前駆体およびその類縁体のラジカル消去活性、第 8 回 AOB 研究会、2008. 06. 13、御殿山ガーデン ホテルラフォーレ東京(東京都品川区)

10. 上野 恵美、岩川 眞由美、今留 香

織、今井 高志、明石 真言、伊古田 暢夫、安西 和紀、骨髄に対する放射線防護剤、加熱処理亜鉛酵母の防護作用の解明—マウスモデルを用いたマイクロアレイ発現解析—、第 38 回放射線による制癌シンポジウムおよび第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、2008. 06. 20、ホテル日航高知旭ロイヤル(高知市)

1 1. 稲見 圭子、中西 郁夫、大久保 敬、福原 潔、奥田 晴宏、伊古田 暢夫、福住 俊一、小澤 俊彦、安西 和紀、望月 正隆、ラジカル消去活性の増強を目的としたビタミン E 誘導体の開発、第 20 回ビタミン E 研究会、2009. 01. 24、奈良県文化会館(奈良県奈良市)

1 2. 中西 郁夫、大久保 敬、宇都 義浩、川島 知憲、松本 謙一郎、M a n d a S u s h m a、堀 均、福原 潔、奥田 晴宏、伊古田 暢夫、福住 俊一、小澤 俊彦、安西 和紀、アルテピリン C およびその誘導体のラジカル消去反応における構造活性相関、第 47 回電子スピンスイェンス学会年会、2008. 10. 01、九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)

1 3. 中西 郁夫、大久保 敬、宇都 義浩、川島 知憲、M a n d a S u s h m a、堀 均、福原 潔、奥田 晴宏、小澤 俊彦、伊古田 暢夫、福住 俊一、安西 和紀、ブラジル産プロポリスに含まれるフェノール性抗酸化物質およびその誘導体のラジカル消去活性、第 41 回酸化反応討論会、2008. 11. 27、九州大学西新プラザ(福岡県福岡市)

1 4. 中西 郁夫、乳井 美奈子、薬丸 晴子、大久保 敬、川島 知憲、福原 潔、奥田 晴宏、稲見 圭子、福住 俊一、伊古田 暢夫、小澤 俊彦、安西 和紀、放射線防護剤を指向した分子内に塩基性部

位を有する新規ビタミン E 誘導体の開発、日本環境変異原学会第 37 回大会(JEMS 2008)、2008. 12. 04、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

1 5. 中西 郁夫、宇都 義浩、大久保 敬、川島 知憲、松本 謙一郎、M a n d a S u s h m a、堀 均、福原 潔、奥田 晴宏、伊古田暢夫、小澤俊彦、安西和紀、ブラジル産プロポリスに含まれるフェノール性抗酸化物質およびその誘導体のラジカル消去機構、日本薬学会第 129 年会、2009. 03. 26、国立京都国際会館(京都府京都市)

1 6 . Ikuo Nakanishi, Kei Ohkubo, Yoshihiro Uto, Tomonori Kawashima, Sushma Manda, Kiyoshi Fukuhara, Haruhiro Okuda, Hitoshi Hori, Nobuo Ikota, Shunichi Fukuzumi, Toshihiko Ozawa, Kazunori Anzai, One-Step Hydrogen Atom Transfer in Radical-Scavenging Reactions by Artepillin C Derivatives Enhanced by Electron-Donating Groups、15th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM)、2008. 11. 19、Indianapolis Marriott Downtown. 他

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊古田 暢夫(IKOTA NOBUO)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号 80159649

### (2) 連携研究者

鈴木 利典(SUZUKI TOSHINORI)

就実大学・薬学部・准教授

研究者番号 70356137

### (3)連携研究者

中西 郁夫(NAKANISHI IKUO)

放射線医学総合研究所・粒子線生物研究グループ・主任研究員

研究者番号 90368697