

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590014

研究課題名(和文) 茶カテキン代謝物の合成と活性評価

研究課題名(英文) Synthesis and Activity of Tea Catechins Lactone-Metabolite

研究代表者

中島 範行 (NAKAJIMA, NORIYUKI)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：40188959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：茶カテキンの代謝物である γ -ブチロラクトン化合物14種(R体およびS体の両鏡像体7種)の合成ルートを確立し、グラムスケールで合成した。

これらを用いて、種々のガン細胞に対する増殖阻害増強効果を検討した。ガン細胞の内、白血病細胞HL-60を培養したものに、代謝分解物とEGCGを加え培養を行ったところ、単独では強い効果が得られなかったが、混合物において非常に低濃度で強い増殖阻害活性を示した。芳香環の3,5あるいは3,4,5位に水酸基を持つ化合物では、R体に比べS体の活性が高く、水酸基の位置、及び水酸基数による影響が見られた。この結果についての特許出願を行った。

研究成果の概要(英文)：Tea catechins such as epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate changes many metabolites including γ -valerolactone compounds through metabolic pathways in the human body.

Fourteen of these γ -valerolactone metabolite analogues were synthesized as the optically active authentic standards and these activities are examined. Furthermore, we found out that the mixture of EGCG (flavan-3-ol) and its metabolite γ -valerolactone compounds inhibit proliferation of HL-60 cells, human promyelocytic leukemia cells.

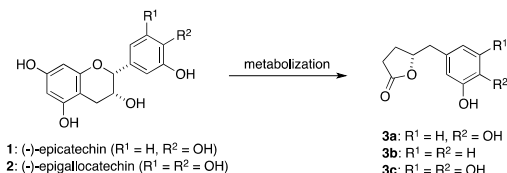
研究分野：有機合成化学

キーワード：茶カテキン 代謝物 γ -ブチロラクトン化合物 ガン細胞増殖阻害増強効果 白血病細胞HL-60

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

茶は古くから我が国で飲料として親しまれており、近年の健康食品ブームの背景からさらに注目が集まっている。茶にはカテキンと呼ばれるポリフェノールが多く含まれているが、その多くはエピカテキン(1)やエピガロカテキン(2)及びそれらの没食子酸エステルである。カテキン類は腸内細菌によって γ -ブチロラクトン(3a-3c)を含む様々な代謝物を与える。Lambartらは、 γ -ブチロラクトンのラセミ体を合成しこれらに抗がん活性があることを明らかにしている¹⁾。そこで申請者は、光学活性な γ -ブチロラクトン代謝物とその類縁ラクトン誘導体の合成し、活性の評価を行うことにした。



2. 研究の目的

茶カテキンなどの茶成分には様々な生体機能物質が含まれ、これらの機能解明がなされてきた。機能発揮のためには生体内への吸収が必要であり、また毒性評価のためにも生体内への吸収や代謝の研究は欠かすことのできないものである。茶カテキン類は、腸内菌による代謝・異化を受け、 γ -ブチロラクトン化合物に変換されるが、これらは微量にしか供給できず、立体化学や活性を検討するための必要量が確保できずにいた。申請者の研究室では、光学的に純粋な γ -ブチロラクトン化合物を化学合成し、代謝物との旋光度の比較によりその立体化学を決定した²⁾。本研究では、代謝や吸収の詳細、活性評価を検討する目的で、化学合成により γ -ブチロラクトン化合物のライブラリーを構築する。茶カテキンの作用とされる活性の本体が、茶カテキンあるいは γ -ラクトン誘導体のどちらの化合物由来なのか、カテキン類の生物活性試験の結果と比較することで明らかとする。

3. 研究の方法

(+)-カテキンや茶カテキンから得られる γ -

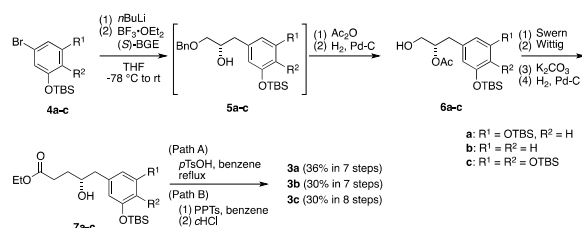
チロラクトン化合物は9種と予想され、この内、(+)-カテキン由来の3種と茶カテキン由来の5種が腸内細菌の代謝物として単離同定されている。現在までに申請者は、この内6種の合成ルートの検討を完了しており²⁾、本研究では、これらに加え、残りの3種とこれらのエナンチオマー3種に、新規な誘導体2種の8種を加えた計14種の数百ミリグラムスケールでの合成を行う。これら化合物の様々な作用(血圧上昇抑制作用、血中コレステロール調節作用、血糖値調節作用、抗酸化作用、老化抑制作用、抗突然変異作用、抗癌作用、抗菌作用、抗う蝕作用、抗アレルギー作用等)についての評価を順次行い、カテキン類との活性を比較することにより、茶カテキンの活性本体を探る。活性評価ならびに構造活性相関の精査については、共同研究先の組織や機関と連携して進める。

4. 研究成果

(1) γ -ラクトン誘導体の合成

天然型茶カテキン代謝物の合成

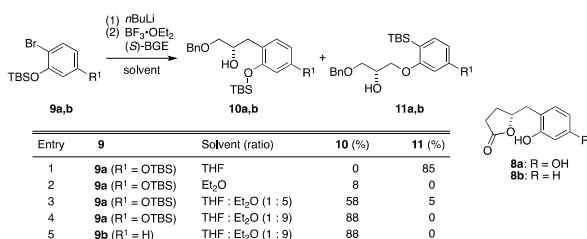
任意の位置にヒドロキシ基を有するアリールブロミド(4a-4c)を benzyl (S)-glycidyl ether ((S)-BGE) とカップリングさせた後、第二級ヒドロキシ基の保護及び Bn 基の脱保護を行い、アルコール(6a-6c)とした。これらの Swern 酸化、続く Wittig 反応を one-pot で行い、Ac 基の除去、二重結合の還元により、環化前駆体(7a-7c)とした。7a, 7b を benzene 中、トシル酸で処理するとラクトン化と脱シリル化がスムーズに進行し、対応するラクトン(3a, 3b)がそれぞれ得られた。ガロイル基を有する 7c を同条件下で反応させたところ、反応は複雑化したが、PPTs を用いてラクトン化後、希塩酸による脱シリル化を行うことで 3c の合成を達成した。



(R)-glycidyl ether を用い、同様の合成ルートに従って合成を進め、逆の立体配置を有する茶カテキン代謝物の合成も行なった。

非天然型茶カテキン代謝物の合成

2' 位にヒドロキシ基を有するラクトン代謝類縁体 (8a および 8b) の合成を行った。シリル基で保護したアリールプロミド (9a) を先と同様に THF 中で (S)-あるいは(R)-BGE と反応させたところ、目的の C-付加体 (10a) は得られず、アニオンが転位した O-付加体 (11a) のみが得られた。反応条件を精査したところ、本反応が溶媒に極めて依存的であることが明らかとなり、THF : Et₂O 比が 1:9 のときに目的の C-付加体のみが高収率で得られた。得られた 10a, 10b から、上記と同じ反応経路に従い、8a, 8b を合成した。

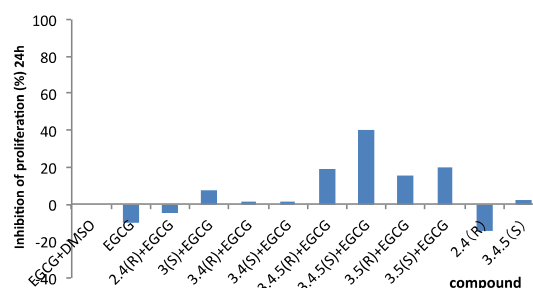


(2) ガン細胞増殖阻害増強効果の検討

ガン細胞として、白血病細胞 HL-60、子宮頸ガン細胞 HeLa S3 細胞、ヒト肺ガン細胞 A549 細胞、肝臓ガン細胞 HepG2 を培養したものに、代謝分解物と EGCG を加え培養を行ったところ、HL-60 細胞に対して EGCG が非常に低濃度で強い増殖阻害活性を示した。EGCG 単独でもガン細胞増殖抑制活性が報告されてはいるが、このとき用いた EGCG の濃度は、それ自体では活性を発揮しない濃度である。「代謝化合物」と「未代謝化合物」の混合によって、ガン細胞増殖抑制活性が増強されるという報告はこれまでになく、EGCG 等の flavan-3-ol の代謝・活性発現の解明に重要な知見だと考えている。

芳香環の 3,5 あるいは 3,4,5 位に水酸基を持つラクトン化合物では、強い阻害活性がみられた。R 体に比べ S 体の活性が高く、EGCG 添加による

HL-60 細胞への細胞増殖抑制効果は、水酸基の位置による影響、及び、水酸基の数による影響が見られた。この結果についての特許出願を行った。



Growth inhibitory activity for human leukaemic cell HL-60 by g-lactone derivatives

(3) 食品分野への応用

EGCG には、ガン細胞の増殖を特異的に抑制する効果が証明されており、単なる食品としてだけではなく、様々な分野において注目されている。EGCG 自体の活性はそれほど強くはなく、効果を期待するには大量に摂取する必要がある。しかし、「渋み・えぐみ」の強い化合物であることから、大量に添加すると味に影響を与えることが問題となっている。本発明により、EGCG の渋さを感じることもない濃度においても、ガン細胞の増殖が強く抑える効果の高い食品の開発が可能となり、また、渋み・えぐみを示す EGCG を大量に加えることなく、健康効果が得られる食品・飲料などを開発することが可能であることから、産業上の利用可能性は高いといえる。

参考文献

- 1) Lambert, J. D.; Rice, J. E.; Hong, J.; Hou, Z.; Yang, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 873.
- 2) M. Hamada *et. al.*, Synthesis of Optically Pure Lactone-Metabolites Derived From Tea Catechins. *Synthesis*, **2010**, 1512-1520.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件) 全て査読有

1. Masahiro Hamada, Takao Kishimoto, and Noriyuki Nakajima, Short and Stereocontrolled cyclic

polyglycerols Synthesis Using $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ Mediated Intermolecular Epoxide-Opening Reaction, *Heterocycles*, **2012**, 86, 1533-1539.

2. Chen Qu, Takao Kishimoto*, Masahiro Hamada and Noriyuki Nakajima. Molecular weight distributions of acetylated lignocellulosic biomasses recovered from an ionic liquid system *Holzforschung*, **2013**, DOI 10.1515/hf-2012-0192.
3. Sayaka Ishihara, Syoma Doi, Kota Harui, Taisuke Okamoto, Shuhei Okamoto, Joji Uenishi, Takashi Kawasaki, Noriyuki Nakajima, and Akiko Saito, Development of a New Synthetic Strategy For Procyanidin Dimer Condensation Using Peracetylated Electrophiles. *Heterocycles*, **2014**, 88, 1595-1602.
4. Syuhei Okamoto, Sayaka Ishihara, Taisuke Okamoto, Syoma Doi, Kota Harui, Yusuke Higashino, Takashi Kawasaki, Noriyuki Nakajima, Akiko Saito, Inhibitory activity of synthesized acetylated procyanidin B1 analogs against HeLa S3 cells proliferation, *Molecules* **2014**, 19, 1775-1785. DOI: [10.3390/molecules19021775](https://doi.org/10.3390/molecules19021775).
5. Masahiro Hamada, Shunichi Naruse, Misaki Wada, Takao Kishimoto, Noriyuki Nakajima, Synthesis of Tea Catechin Lactone Metabolite Analogues with a 2'-Hydroxyphenyl Group, *Synthesis*, **2014**, 1779-1787.
6. Takao Kishimoto, Nana Takahashi, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima, Biomimetic oxidative coupling of sinapyl acetate by silver oxide: preferential formation of β -O-4 type structures, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2015**, 63, 2277-2283, DOI: [10.1021/jf506111q](https://doi.org/10.1021/jf506111q).
7. Kazuki Mori, Yoshihiro Ayano, Yoshitomo Hamada, Taichi Hojima, Ryuta Tanaka, Yusuke Higashino, Mayu Izuno, Taisuke Okamoto, Takashi Kawasaki, Masahiro Hamada, Noriyuki Nakajima, Akiko Saito, Role of 2,3-*cis* Structure of (-)-Epicatechin-3,5-O-digallate in Inhibition of

HeLa S3 Cell Proliferation, *Nat Prod Chem., Res.*, **2015**, 3, 172. doi: 10.4172/2329-6836.1000172.

学会発表 (計 32 件)

1. 土井翔馬, 岡本修平, 泉野麻友, 春井宏太, 石原沙也加, 岡本泰輔, 植西譲二, 中島範行, 齊藤安貴子, アセチル基によって脂溶性を高めたプロアントシアニジンの合成, 新規素材探索研究会 2012, 2012.06.08 (横浜).
2. 岡本泰輔, 岡本修平, 土井翔馬, 石原沙也加, 東野雄祐, 泉野麻友, 中島範行, 齊藤安貴子, プロアントシアニジンの化学: 効率的合成法の開発ならびに化学生物学研究, 第 54 回天然物化学討論会, 2012.9.18-20(東京).
3. 成瀬俊一, 和田岬, 濱田昌弘, 岸本崇生, 中島範行, 2' 位に水酸基を有するカテキン代謝物の合成, 平成 24 年度有機合成化学北陸セミナー, 2012.10.5-6 (富山).
4. 板倉圭佑, 濱田昌弘, 岸本崇生, 中島範行, -O-4 型リグニンモデルオリゴマーの合成研究, 平成 24 年度有機合成化学北陸セミナー, 2012.10.5-6 (富山).
5. 成瀬俊一, 濱田昌弘, 岸本崇生, 中島範行, 茶カテキンラクトン代謝物の効率的合成, 北陸合同バイオシンポジウム, 2012.11.2(福井).
6. Sayaka, Ishihara, Taisuke Okamoto, Syoma Doi, Syuhei Okamoto, Yusuke Higashino, Noriyuki Nakajima, Akiko Saito, Stereoselective synthesis of proanthocyanidins, and their SAR study, IKCOC, 2012.11.12-16 (Kyoto).
7. 石原沙也加, 綾野義博, 岡本修平, 土井翔馬, 岡本泰輔, 須藤龍彦, 長田裕之, 中島範行, 齊藤安貴子, Procyanidin-B1-3,3"-di-O-gallate は EGCG と異なる作用で HeLa S3 細胞の増殖を阻害する?, 2012 年度日本農芸化学会関西支部例会 (478 回講演会), 2013.2.2 (京都).

8. 中島範行, プロシアニジンオリゴマーならびにカテキン誘導体の合成と活性, スイス・バーゼルとの創薬・製薬交流促進シンポジウム, 2013.3.08 (富山).
9. 成瀬俊一, 濱田昌弘, 岸本崇生, 中島範行, 2'位に水酸基を有する茶カテキン代謝物の合成, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3 (仙台).
10. 植西譲二, 岡本泰輔, 森口正太郎, 岡本修平, 土井翔馬, 石原沙也加, 中島範行, 齊藤安貴子, アセチル化求電子体を用いたプロアントシアニジンの合成研究, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3 (仙台).
11. 岡本修平, 石原沙也加, 岡本泰輔, 土井翔馬, 泉野麻友, 中島範行, 齊藤安貴子, プロシアニジンオリゴマーの構造-活性相関, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3 (仙台).
12. 岡本泰輔, 東野雄祐, 濱田義知, 石原沙也加, 岡本修平, 土井翔馬, 中島範行, 齊藤安貴子, プロシアニジンオリゴマーのプロープ化研究, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3 (仙台).
13. Shunichi Naruse, Takao Kishimoto, Masahiro Hamada and Noriyuki Nakajima, Synthesis of tea catechin derivatives, 23rd French-Japanese Symposium on medicinal and fine chemistry (FJS2013) 2013.5.12-15 (Nagasaki).
14. 土井翔馬, 岡本修平, 春井宏太, 石原沙也加, 岡本泰輔, 高野 祥太, 中島範行, 齊藤安貴子, プロアントシアニジンの上部ユニットをアセチル化した誘導体の合成と生物活性試験, 新規素材探索研究会 2013, 2013.06.07 (横浜).
15. 石原沙也加, 岡本修平, 土井翔馬, 岡本泰輔, 綾野義博, 中島範行, 齊藤安貴子, ガロイル基で修飾したBタイプ・プロシアニジンの細胞増殖抑制活性, 第 43 回複素環化学討論会, 2013.10.18 (岐阜).
16. 春井宏太, 岡本泰輔, 石原沙也, 加堀川敦史, 中島範行, 齊藤安貴子, プロシアニジンのプロープ合成と構造-活性相関研究, 第 43 回複素環化学討論会, 2013.10.18(岐阜).
17. 綾野義博, 森一起, 東野雄祐, 石原沙也加, 岡本修平, 中島範行, 齊藤安貴子, 脂肪鎖を導入した flavan-3-ol の HeLa S3 細胞増殖抑制活性, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3 (川崎).
18. 高野 翔太, 岡本泰輔, 法島太一, 岡本修平, 石原沙也加, 土井 翔馬, 石田匡彦, 中島範行, 齊藤安貴子, Epigallocatechin 2 量体の合成と構造-活性相関研究, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3 (川崎).
19. 春井宏太, 石原沙也加, 岡本修平, 土井 翔馬, 岡本泰輔, 奥谷浩平, 濱田義知, 中島範行, 齊藤安貴子, プロシアニジン・オリゴマー構造 - 活性相関の可視化, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3 (川崎).
20. 土井翔馬, 石原沙也加, 岡本修平, 岡本泰輔, 川崎崇, 中島範行, 齊藤安貴子, 様々なプロシアニジン・オリゴマーの選択的合成研究と細胞増殖抑制活性, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3 (川崎).
21. 東野雄祐, 森一起, 岡本泰輔, 中島範行, 齊藤安貴子, 分子内反応を用いた 4-6 縮合型 (+)-catechin 2 量体 procyanidin B6 の立体選択的合成, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3 (川崎).
22. 濱田義知, 岡本泰輔, 吉仲由之, 石原沙也加, 岡本修平, 伊藤孝太郎, 中島範行, 齊藤安貴子, 有機合成 procyanidin oligomer 2-6 量体の SARS-コロナウイルス増殖阻害活性, および, ガン細胞増殖抑制活性, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3 (川崎).
23. 小芦貴弘, 綾野義博, 野呂健太, 森一起, 東野雄祐, 法島太一, 岡本泰輔, 中島範行, 齊藤安貴子, 3 位, あるいは, 5 位に位置選択的に脂肪酸を導入した flavan-3-ol の合成と脂肪鎖の導入位置による生物活性の変化, 新規素材探索研究会 2014, 2014.6.5(横浜).

24. 綾野義博, 奥谷晃平, 富田貴之, 濱田昌弘, 中島範行, 齊藤安貴子, カテキン類の腸内細菌代謝物と EGCG の混合物は, ヒト骨髄性白血病細胞 HL-60 の増殖を強く阻害する。新規素材探索研究会 2014, 2014.06.05(横浜).
25. 森一起, 東野雄介, 岡本泰輔, 法島太一, 小芦貴弘, 中島範行, 齊藤安貴子, TBS で保護した flavan-3-ol の 5 位選択的脱保護法の開発と 5 位を利用した様々な化合物の新規合成法, 新規素材探索研究会 2014, 2014.06.05 (横浜).
26. 森一起, 綾野義博, 水品善之, 法島太一, 中島範行, 齊藤安貴子, 5 位を修飾したフラバン-3-オールの高効率合成法の開発と構造-活性相関研究, 第 8 回日本ポリフェノール学会, 2014.08.08 (東京).
27. Shunichi Naruse, Masahiro Hamada, Takao Kishimoto, Kohei Okutani, Takayuki Tomita, Syuhei Okamoto, Akiko Saito, Noriyuki Nakajima, Synthesis and Activity of γ -Valerolactones as the Tea Catechin Metabolites, ICP2014, 2014.9.2-6 (Nagoya).
28. Yusuke Higashino, Yoshitomo Hamada, Taisuke Okamoto, Syoma Doi, Sayaka Ishihara, Kazuki Mori, Shota Takano, Taich Hojima, Toru Shibazaki, Takashi Kawasaki, Noriyuki Nakajima, Akiko Saito, Stereo- and regio-controlled synthetic studies of proanthocyanidins and their inhibitory activities against cancer cell proliferation, ICP2014, 2014.9.2-6 (Nagoya).
29. Kota Harui, Yoshihiro Ayano, Syuhei Okamoto, Syoma Doi, Mayu Izuno, Atsushi Horikawa, Takahiro Koashi, Akito Yoshimi, Kenta Noro, Takashi Kawasaki, Noriyuki Nakajima, Akiko Saito, Structure-Activity-Relationship Studies of Flavan-3-ol Derivatives: Inhibitory Activity of Cancer Cell Proliferation and Antimicrobial Activity, ICP2014, 2014.9.2-6 (Nagoya).
30. Yusuke Higashino, Yoshitomo Hamada, Taisuke Okamoto, Syoma Doi, Sayaka Ishihara, Kazuki

Mori, Shota Takano, Taich Hojima, Toru Shibazaki, Takashi Kawasaki, Akiko Saito, Noriyuki Nakajima, Stereo- and regio- controlled synthesis of proanthocyanidines under intramolecular coupling method, FJS2014, 2014.9.15-17 (Lyon, France).

31. 濱田昌弘, 成瀬俊一, 和田岬, 岸本崇生, 中島範行, 2' 位に水酸基を有する茶カテキン代謝物の合成, 第 44 回複素環化学討論会, 2014.09.10-12 (札幌).
32. 東野雄祐, 綾野義博, 濱田義知, 森一起, 小芦貴弘, 泉野麻友, 春井宏太, 法島太一, 柴崎亨, 野呂健太, 奥谷晃平, 土井翔馬, 岡本修平, 石原沙也加, 岡本泰輔, 水品善之, 吉仲由之, 川崎崇, 中島範行, 齊藤安貴子, プロアントシアニジンの立体選択的合成研究を軸とした構造-活性相関研究と化学生物学研究, 第 56 回 天然有機化合物討論会, 2014.10.15-18 (高知).

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: ガン細胞増殖阻害作用増強剤とその製造方法及び食品

発明者: 中島範行, 川崎安貴子

権利者: 富山県, 川崎安貴子

種類: 特許

番号: 特願 2014-93523

出願年月日: 2014.4.30

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ: http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/nakajima/bfc/bfc_index.html

6. 研究組織

研究代表者: 中島 範行 (NAKAJIMA NORIYUKI)

富山県立大学・工学部生物工学科・教授

研究者番号: 40188959