

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460734

研究課題名(和文)新規ビタミンE誘導体の放射線防御薬としての創製研究

研究課題名(英文)Synthesis and radioprotective activity of new vitamin E derivatives

研究代表者

稲見 圭子(Keiko, Inami)

東京理科大学・薬学部薬学科・准教授

研究者番号：00271247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんの放射線治療の向上を目指して、放射線照射による正常組織の損傷を抑制するために、放射線照射で生成するフリーラジカルを消去する放射線防御薬を開発することを目的とした。そこで生体内に存在するビタミンEのラジカル消去作用に着目し、ビタミンEを基本構造にもつ新規ビタミンE類縁体を合成した。合成したビタミンE類縁体について、ラジカル消去作用における構造活性相関を詳細に検討し、ビタミンEよりも高いラジカル消去作用をもつ化合物の創製に至った。さらに放射線防御薬のスクリーニング結果より、新規ビタミンE類縁体の放射線防御薬としての可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Radiotherapy is a method of cancer treatment based on destruction of malignant cells by ionizing radiation. Radiation therapy causes adverse effects that can be severe and cause permanent damages to the patient. Radioprotective agents are necessary for minimizing the severity and duration of toxicities associated with radiation therapy. The adverse toxicity was thought to be resulted from reactive oxygen species, which generated by the excitation of water molecules by radiation.

We focused on the radical scavenging function of vitamin E. Vitamin E derivatives were newly synthesized, and their radical scavenging activities were evaluated. Some of the vitamin E derivatives showed higher galvinoxyl and hydroxyl radical scavenging activities than vitamin E. In high-throughput screening for radioprotectors using rat thymocytes, some of the vitamin E derivatives showed the radio protecting activity. Therefore the vitamin E derivatives can be candidates as radioprotective agents.

研究分野：有機化学

キーワード：ビタミンE 6-クロマノール ラジカル捕捉 放射線防御 ベンゾクロマノール

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 選択的にがん細胞を死滅させることで高度な医療を提供することができるようになり、放射線治療は増加する傾向にある。実際には、がん細胞に対して数ミリ単位で照射位置の設定が可能となり、照射感度が飛躍的に向上した。しかし、より高線量の放射線をごん細胞に照射する場合には、正常細胞への損傷が副作用を誘発し治療域の限界となっている。放射線の間接作用で生成する活性酸素種が、生体内物質と反応して細胞障害を引き起こすことが、副作用の原因の一つと考えられている。放射線治療の効果を高めるためには、正常な組織の損傷を抑制する放射線防御薬を創製することは重要な課題である。

(2) 米国では放射線治療や化学療法の防御を目的としたアミフォスチン (2-[(3-amino-propyl)amino]ethanethiophosphate) が唯一認可されているが、毒性が強く臨床的な使用には限度が設けられている。

日本では化学的な放射線防御薬としてエダラボン (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) の有用性が示された。エダラボンは脳梗塞直後に投与され、再灌流時に生成する活性酸素種を消去して脳障害を防ぐ目的で、脳賦活薬として臨床で用いられている。つまり、活性酸素種を消去する作用をもつ化合物が、放射線防御薬となる可能性が示された。

### 2. 研究の目的

放射線の間接的な作用で生成する活性酸素種を消去することで、放射線防御薬の創製を目指す。ビタミン E は生体内に存在する抗酸化物質であることから、ビタミン E の基本骨格を基盤にした抗酸化剤の開発は、毒性が少なく、かつ強いラジカル消去作用をもつ薬の開発につながる。本研究では、ビタミン E の基本骨格である 6-クロマノールを化学修飾することで、高いラジカル消去作用をもつ放射線防御薬の候補化合物の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

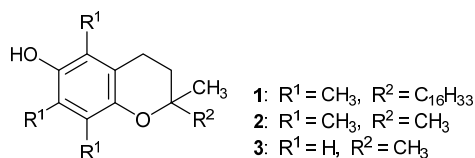
新規ビタミン E 類縁体をデザインし、合成経路を確立した。合成した類縁体について、ラジカル消去作用における構造活性相関を詳細に検討した。さらに、ビタミン E 類縁体の放射線防御薬としての有用性を検討した。

- (1) 新規ビタミン E 類縁体のデザインと合成
- (2) 合成化合物のラジカル消去作用の測定
- (3) 合成化合物の放射線防御薬としてのスクリーニング系を用いた評価

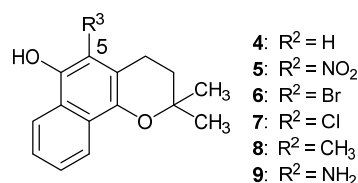
### 4. 研究成果

(1) 新規ビタミン E 類縁体のデザインと合成  
 ビタミン E (1) のフィチル側鎖は膜脂質への保持に寄与しているが、*in vitro* では抗酸化活性に影響がないことから、phytyl 側鎖を

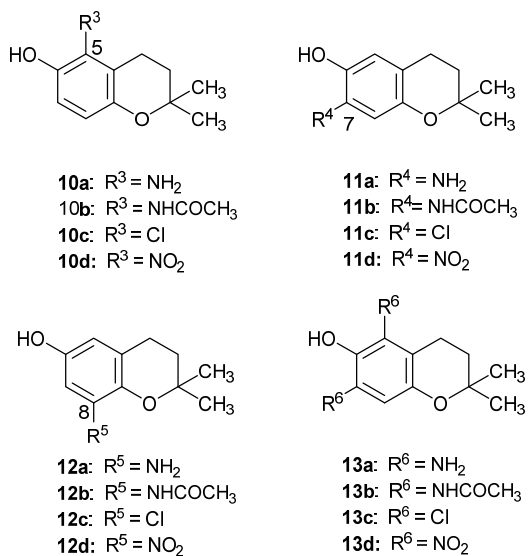
methyl 基に変えた 2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノール (2) 類縁体を規範とし、基本構造である 2,2-ジメチル-6-クロマノール (3) の構造変化におけるラジカル消去作用への影響を詳細に検討した。



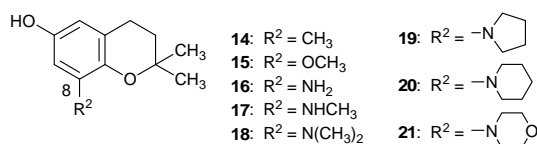
本研究では、クロマン環の電子系を拡大させたベンゾ[h]クロマノール環に電子供与基 (NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) および電子求引基 (Br, Cl, NO<sub>2</sub>) を導入した化合物を合成した (化合物 4~9)。



さらに、クロマン環の 5, 7, 8 位あるいは 5, 7 位に電子供与基 (NH<sub>2</sub>, NHCOCH<sub>3</sub>) および電子求引基 (Cl, NO<sub>2</sub>) を導入した化合物を合成した (化合物 10~13)。



細胞への適用を考慮し、高いラジカル消去作用と共に高い安定性をもつ化合物の創製を目的として、8 位に置換基を導入した 6-クロマノール類を新たに合成した。これまでの結果から、アミノ基を導入した 6-クロマノール類に高いラジカル消去活性があったため、窒素含有置換基に着目してメチルアミノ基、ジメチルアミノ基、ピロリジン基、ピペリジン基、モルホリン基を導入した新規 6-クロマノール類を合成した (化合物 14~21)。



多くの新規ビタミン E 類縁体の合成に成功し、ベンゾクロマノール類およびクロマノール類のそれぞれの合成経路を確立することができた。

(2) 合成化合物のラジカル消去作用の測定

ラジカル消去作用におけるビタミン E 類縁体の構造活性相関を詳細に検討するために、合成したビタミン E 類縁体について有機溶媒中におけるガルビノキシルラジカル消去作用を測定して、二次反応速度定数を算出した。

Table 1 ベンゾクロマノール類(4~9)とガルビノキシルラジカルとの二次反応速度定数

Compound	$k (\times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})^a$
1	126.9
2	116.8
3	1.6
4	346.0
5	118.4
6	214.8
7	208.0
8	382.0
9	2678.8

<sup>a</sup> 化合物 (2.5 μM) とガルビノキシルラジカル (2.5 μM) との反応

対照化合物である 1~3 と比較すると、電子系を拡大したベンゾクロマノール類は、ラジカル消去活性が上昇した。さらにその活性は、導入した置換基の電子供与性の強さと比例した。

Table 2 置換基および置換位置の違いによるクロマノール類 (10~13) とガルビノキシルラジカルとの二次反応速度定数

Compound	$k (\times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})^b$
1	5.57
2	4.87
3	3.40

(続)

(続)

10a	508.40
10b	8.31
10c	1.00
11d	0.31
11a	486.10
11b	9.14
11c	1.00
11d	0.33
12a	2.40
12b	3.97
12c	0.45
12d	0.23
13a	6.13
13b	8.59
13c	1.82
13d	0.30

<sup>b</sup> 擬一次反応条件を用いた測定

置換基によるラジカル消去活性は NH<sub>2</sub> > NHCOCH<sub>3</sub> > Cl > NO<sub>2</sub> であり、置換位置の違いによる影響はジオルト>オルト>メタ置換体であった。さらに横軸にハメット・タフトの σ 値、縦軸にラジカル消去活性の対数をプロットしたところ、いずれの置換位置についても傾きが負の直線を得た。以上の結果より、ラジカル消去活性は置換基の電子効果に影響され、電子供与基の導入で消去活性が上昇することが分かった。また、置換位置の違いで直線の傾きを比較するとメタ>オルト>ジオルト置換体となったことから、フェノール性水酸基のオルト位に電子供与基を導入することで、置換基の共鳴効果によってラジカル消去活性が上昇することを明らかにした。

さらに電子スピン共鳴装置を用いた研究では、オルト位にアミノ基を導入した化合物では中間体ラジカルを検出したことから、生成した中間体ラジカルがアミノ基の共鳴効果によって安定化することでラジカル消去活性が上昇することを証明した。

オルト位に置換基を導入することでラジカル消去活性が上昇したが、化合物が不安定であり取扱いに制限がある。細胞への適応を考え、8 位に置換基を導入した化合物の安定性が高かったことに着目し、新規 8 位置換クロマノール類のラジカル消去作用を評価した。

Table 3 8 位置換クロマノール類 (14~21) とガルビノキシルラジカルとの二次反応速度定数

Compound	$k (\times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})^a$
14	3.2
15	26.0
16	405.2
17	3185.6
18	412.8
19	7170.0
20	1173.6
21	169.6

<sup>a</sup> 化合物 (2.5  $\mu\text{M}$ ) とガルビノキシルラジカル (2.5  $\mu\text{M}$ ) との反応

窒素含有置換基を導入した化合物のラジカル消去作用は、ピロリジン基>メチルアミノ基>ピペリジン基>アミノ基>ジメチルアミノ基>モルホリン基をもつ 6-クロマノールの順であった。ピロリジン基をもつ 6-クロマノールについてビタミン E と比較すると、約 55 倍も活性が上昇した。

また、水溶液中におけるヒドロキシルラジカルに対する消去作用では、ピロリジン基、メチルアミノ基、アミノ基をもつ 6-クロマノールで高いヒドロキシルラジカル消去活性を示した。

以上の結果より、有機溶媒中あるいは水溶液中のいずれの条件においても、ビタミン E よりも優れたラジカル消去作用をもつ新規化合物を合成することができた。

### (3) 合成化合物の放射線防御薬としてのスクリーニング系を用いた評価

ラット胸腺細胞を用いた放射線防御薬のハイスループットスクリーニング系が報告されている。(E. Sekine-Suzuki *et al.*, *Anal. Chem.*, 2013) 培養したラット胸腺細胞に 2 Gy 照射して、その直後 5%CO<sub>2</sub>存在下、37 °C で 4 時間培養した後に細胞サイズを測定する。実際には、細胞サイズから死細胞の割合を測定し、死細胞の割合が減少することで、放射線防御作用の強さを評価している。ビタミン E 類縁体の放射線防御薬としての可能性を検討するために、基本構造をもつアセチル保護した化合物 (1-OAc, 2-OAc, 3-OAc) についてスクリーニング系を用いて評価した。その結果から、アセチル保護した 2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノール (2-OAc) とアセチル保護した 2,2-ジメチル-6-クロマノール (3-OAc) が放射線による細胞死を抑制したことから、6-クロマノール類の放射線防御薬としての可能性を初めて明らかにした。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 11 件)

Y. Okayama, M. Harada, M. Morita, M. Mochizuki, K. Inami, Synthesis and radical scavenging activity of substituted benzo[h]chromanols, *Heterocycles*, 査読有, 94 (5), 2017, 865–878

DOI : 10.3987/COM-17-13671

K. Inami, M. Takada, M. Nagata, T. Higashi, M. Mochizuki, The mutagenic mechanism of oxygenated alkylhydrazones occurs through alkyl radicals and alkyldiazonium ions, *Toxicol. Res.*, 査読有, 6, 2017, 173–178

DOI : 10.1039/C6TX00430J

K. Inami, Y. Mine, J. Tatsuzaki, C. Mori, M. Mochizuki, Isolation and characterization of antimutagenic components of *Glycyrrhiza aspera* against *N*-methyl-*N*-nitrosourea, *Genes and Environ.*, 査読有, 39 (5), 2017, 1–7

DOI : 10.1186/s41021-016-0068-2

K. Inami, Y. Mine, Y. Kojo, S. Tanaka, S. Ishikawa, M. Mochizuki, Antimutagenic components in *Glycyrrhiza* against *N*-methyl-*N*-nitrosourea in the Ames assay, *Nat. Prod. Res.*, 査読有, 31 (6), 2017, 691–695

DOI : 10.1080/14786419.2016.1212031

S. Nomura, K. Inami, M. Mochizuki, Antioxidant activity of ascorbic acid analogs containing a nitrogen atom in the ring, *Heterocycles*, 査読有, 92 (4), 2016, 680–687

DOI : 10.3987/COM-16-13410

S. Nomura, K. Inami, M. Mochizuki, Radical scavenging activity of ascorbic acid analogs containing a carbonyl conjugated ene-diol structure, *Heterocycles*, 査読有, 92 (1), 2016, 86–101

DOI : 10.3987/COM-15-13366

K. Inami, Y. Ono, S. Kondo, I. Nakanishi, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, M. Mochizuki, Effect of alkyl group on transnitrosation of *N*-nitrosothiazolidine thiocarboxamides, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 23, 2015, 6733–6739

DOI : 10.1016/j.bmc.2015.09.008

K. Inami, J. Shiino, S. Hagiwara, K.

Takeda, M. Mochizuki, Transnitrosation of non-mutagenic *N*-nitrosoproline forms mutagenic *N*-nitroso-*N*-methylurea, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 23, 2015, 3297–3302  
DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.058

K. Inami, M. Suzuki, A. Shimizu, M. Furukawa, M. Morita, M. Mochizuki, Substituent effect on the radical scavenging activity of 6-chromanol derivatives, *RSC Adv.*, 査読有, 4, 2014, 43882–43889  
DOI: 10.1039/c4ra05782a

J. Tatsuzaki, Y. Jinwei, Y. Kojo, Y. Mine, S. Ishikawa, M. Mochizuki, K. Inami, Antimutagenicity screening of extracts from medicinal and edible plants against *N*-methyl-*N*-nitrosourea by the Ames assay, *Genes and Environ.*, 査読有, 36 (2), 2014, 39–46  
DOI: org/10.3123/jemsge.2014.007

K. Inami, M. Takada, K. Itoh, S. Ishikawa, M. Mochizuki, Assessment of the antimutagenic effects of aqueous extracts from herbal medicines against *N*-nitroso-*N*-alkylureas induced mutagenicity using the *umu* test, *Genes and Environ.*, 査読有, 36 (2), 2014, 33–38  
DOI: org/10.3123/jemsge.2014.003

[学会発表](計 30 件)

岡山 祐大, 稲見 圭子, 望月 正隆, 含窒素置換基を有する 8 置換 6-chromanol 類の合成とラジカル消去活性の評価, 第 137 年会 日本薬学会, 仙台 (仙台国際センターほか), 2017 年 3 月 24 日 ~ 27 日.

原田 和也, 稲見 圭子, 望月 正隆, 伸長したイミダゾール群を導入したアクリジン類の合成と DNA 結合能への影響, 第 137 年会 日本薬学会, 仙台 (仙台国際センターほか), 2017 年 3 月 24 日 ~ 27 日.

渡辺 舞, 稲見 圭子, 望月 正隆, 膀胱発がん性 *N*-butyl-*N*-(carboxypropyl)-nitrosamine の酸化反応系で生成する直接の変異原の同定, 第 137 年会 日本薬学会, 仙台 (仙台国際センターほか), 2017 年 3 月 24 日 ~ 27 日.

木根 菜摘, 稲見 圭子, 望月 正隆, チオール基あるいはチオアミド基をもつ環状含硫 *N*-ニトロソ化合物の合成と一酸化窒素移動能, 第 137 年会 日本薬学会, 仙台 (仙台国際センターほか), 2017 年 3 月 24 日 ~ 27 日.

前田 直紀, 稲見 圭子, 望月 正隆, 活性酸素種により *N*-ニトロソモルホリンから生成する変異原物質の推定構造, 第 137 年会 日本薬学会, 仙台 (仙台国際センターほか), 2017 年 3 月 24 日 ~ 27 日.

南 博方, 稲見 圭子, 望月 正隆, Dihydrobenzofuran 骨格をもつ新規抗酸化剤の合成とラジカル捕捉作用, 第 137 年会 日本薬学会, 仙台 (仙台国際センターほか), 2017 年 3 月 24 日 ~ 27 日.

渡辺 舞, 稲見 圭子, 望月 正隆, Formation of direct mutagen of selective urinary bladder carcinogenic *N*-butyl-*N*-(carboxypropyl)nitrosamine by oxidation systems, 日本環境変異原学会 第 45 回大会, つくば (つくば国際センター), 2016 年 11 月 17 日 ~ 18 日.

前田 直紀, 稲見 圭子, 望月 正隆, Mutagenic activation of cyclic *N*-nitrosomorpholine by reactive oxygen species, 日本環境変異原学会 第 45 回大会, つくば (つくば国際センター), 2016 年 11 月 17 日 ~ 18 日.

稲見 圭子, 望月 正隆, 発がん性 *N*-methyl-*N*-nitrosourea に対する生薬抽出物の抗変異原性, 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜 (横浜パシフィコ), 2016 年 10 月 6 日 ~ 8 日.

岡山 祐大, 稲見 圭子, 望月 正隆, 新規抗酸化性 6-chromanol 類のラジカル消去活性に及ぼす骨格と置換基の違い, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京 (東京大学), 2016 年 9 月 17 日.

原田 和也, 稲見 圭子, 望月 正隆, マイナグループバインダーを導入したビスハロメチルアクリジン類の合成と活性, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京 (東京大学), 2016 年 9 月 17 日.

渡辺 舞, 稲見 圭子, 望月 正隆, 酸化的代謝モデル系による *N*-alkyl-*N*-(carboxymethyl)nitrosamines 類の DNA 損傷性, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2016 年 9 月 17 日.

澄田 大輔, 稲見 圭子, 望月 正隆, -ハロカルボニル基および -ハロアセトアミド基を導入した直鎖状化合物の合成とクロスリンク活性の評価, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京 (東京大学), 2016 年 9 月 17 日.

前田 直紀, 稲見 圭子, 望月 正隆, 活性酸素種による環状 *N*-ニトロソ化合物の活

性化, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京 (東京大学), 2016 年 9 月 17 日.

岡山 祐大, 稲見 圭子, 望月 正隆, 新規抗酸化性 benzochromanol 類の置換基導入によるラジカル消去活性への影響, 日本薬学会 第 136 年会, 横浜 (横浜パシフィコ), 2016 年 3 月 27 日 ~ 29 日.

野村 昌吾, 稲見 圭子, 望月 正隆, 五員環を維持したアスコルビン酸類縁体のラジカル消去活性と酸化電位, 日本薬学会 第 136 年会, 横浜 (横浜パシフィコ), 2016 年 3 月 27 日 ~ 29 日.

原田 和也, 稲見 圭子, 望月 正隆, ハロメチル基を導入したアクリジン誘導体の DNA クロスリンク・インターカレート活性におよぼす置換位置の影響, 日本薬学会 第 136 年会, 横浜 (横浜パシフィコ), 2016 年 3 月 27 日 ~ 29 日.

小暮 智紀, 稲見 圭子, 望月 正隆, 塩基配列選択性を有するポリピロールアミドとビス( $\alpha$ -ハロカルボニル)基を導入した鎖状クロスリンク剤の合成および活性, 日本薬学会 第 136 年会, 横浜 (横浜パシフィコ), 2016 年 3 月 27 日 ~ 29 日.

小池 真悠理, 渡辺 舞, 稲見 圭子, 望月 正隆,  $\omega$ -Carboxyalkylnitrosamine 類の変異原性発現, 日本環境変異原学会 第 44 回大会, 福岡 (九州大学), 2015 年 11 月 27 日 ~ 28 日.

稲見 圭子, 望月 正隆, Selective formation of *S*-nitrosoglutathione from *N*-nitrosothioprolin analogues, 第 74 回日本癌学会総会, 名古屋 (名古屋国際会議場), 2015 年 10 月 8 日 ~ 10 日.

- ②① 野村 昌吾, 稲見 圭子, 望月 正隆, 5 員環状アスコルビン酸類縁体のラジカル捕捉活性と酸化電位, 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 船橋 (日本大学), 2015 年 9 月 12 日.
- ②② 渡辺 舞, 稲見 圭子, 望月 正隆, 酸化的代謝モデル系によるカルボキシアルキルニトロサミン類の変異原性発現とその作用機構解析, 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 船橋 (日本大学), 2015 年 9 月 12 日.
- ②③ 小暮 智紀, 稲見 圭子, 望月 正隆,  $\alpha$ -ハロカルボニル基を導入したクロロリンク剤の合成と DNA との反応機構の解析, 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 船橋 (日本大学), 2015 年 9 月 12 日.
- ②④ 鈴木 真梨子, 稲見 圭子, 望月 正隆,

6-Chromanol 類の 8 位置換体の合成と抗酸化活性評価, 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 船橋 (日本大学), 2015 年 9 月 12 日.

- ②⑤ 岡山 祐大, 稲見 圭子, 望月 正隆, Benzochroman 骨格をもつ新規抗酸化剤の合成と活性評価, 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 船橋 (日本大学), 2015 年 9 月 12 日.
- ②⑥ 沼尻 隼弥, 稲見 圭子, 望月 正隆, *N*-ニトロソジアルキルアミンの活性化におけるニトロソ基移動反応の関与, 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 船橋 (日本大学), 2015 年 9 月 12 日.
- ②⑦ 原田 和也, 稲見 圭子, 望月 正隆, ハロメチル基を導入したアクリジン誘導体の DNA クロスリンク・インターカレート剤, 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 船橋 (日本大学), 2015 年 9 月 12 日.
- ②⑧ 野村 昌吾, 稲見 圭子, 望月 正隆, 環内に窒素原子を含むアスコルビン酸類縁体の抗酸化活性上昇の検討, 日本薬学会 第 135 年会, 神戸 (神戸薬科大学), 2015 年 3 月 25 日 ~ 28 日.
- ②⑨ 林 緑人, 稲見 圭子, 望月 正隆, Dihydrobenzofuran 骨格を有する新規抗酸化剤のラジカル捕捉活性, 第 58 回日本薬学会関東支部大会, 町田 (昭和薬科大学), 2014 年 10 月 4 日.
- ③⑩ 野村 昌吾, 稲見 圭子, 望月 正隆, 環内に窒素原子を含むアスコルビン酸類縁体の合成と抗酸化活性, 第 58 回日本薬学会関東支部大会, 町田 (昭和薬科大学), 2014 年 10 月 4 日.

〔その他〕  
ホームページ等  
[https://www.tus.ac.jp/fac\\_grad/p/achievement.php?5c93](https://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/achievement.php?5c93)

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
稲見 圭子 (INAMI, Keiko)  
東京理科大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 00271247
- (2) 研究分担者  
望月 正隆 (MOCHIZUKI, Masataka)  
東京理科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 10072414