

論文の内容の要旨

氏名：蔣 文君

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：マクロファージ活性化抑制作用を持つフラボノイドの創製

1. はじめに

マクロファージの過剰な活性化は、様々な疾患に直接的・間接的に関与する。我々はフラボノイドが持つマクロファージの過剰な活性化を緩和する効果に着目し、構造活性相関解析とともに合成研究を行った。

フラボノイドは高等植物に広く分布する芳香族化合物の一種で、これらの化合物は、桂皮酸類と3分子のマロニル CoA が縮合して生合成され、炭素数 15 を基本骨格とする。フラボン類、フラボノール類、フラバノン類、フラバノール類、イソフラボン類、アントシアニン類などが知られている。生合成の過程を反映し、5位、7位、4'位に水酸基を有するフラボノイドが多い。基本骨格としては2位と3位間が二重結合であるクロメン系化合物と単結合のクロマン系化合物分けられる (図 1)。

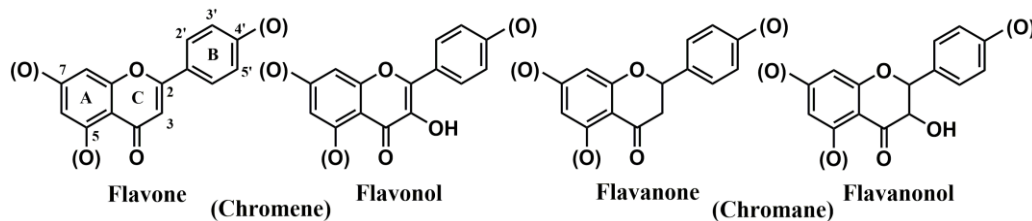


図 1. フラボノイドの構造

フラボノイドには、抗酸化、抗炎症、抗アレルギー、瀉下、利尿、エストロゲン様作用など多彩な生理活性が報告されている。一方、単球、リンパ球とともに慢性炎症に深くかかわるマクロファージは、がん、動脈硬化症、肥満、アルツハイマー病や老化にも関与しているといわれている。マクロファージは、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) や一酸化窒素 (NO)、プロスタグランジン、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターロイキン (IL-1, 6, 12) やケモカインなど多くのケミカルメディエーターを分泌して防御的な免疫反応を誘導する。しかしマクロファージが過度に活性化すると、自己免疫疾患、動脈硬化性疾患、発がん、神経性疾患などを引き起こす。メタボリックシンドロームとも深く関与しており、内臓脂肪組織に浸潤したマクロファージは、肥大化した脂肪細胞と共に炎症性サイトカインを分泌し、動脈硬化性疾患や2型糖尿病発症のリスク要因になっている。

フラボノイドには、酸化ストレス抑制作用も知られている。生体組織の酸化還元状態が乱されると、過氧化物やフリーラジカルなどの活性酸素種が産生され、蛋白質、細胞膜のリン脂質や DNA が傷害される。アテローム動脈硬化症、パーキンソン病、狭心症、心筋梗塞、アルツハイマー病など様々な疾患が引き起こされる。

以上の観点から、大根谷らは刺激されたマクロファージ様 RAW 264.7 細胞が放出する NO の量をマクロファージ活性化の指標として、その抑制作用

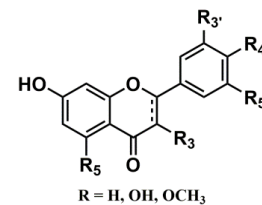


表 1. フラボノイドの構造と NO 産生抑制活性

No.	C ₂ -C ₃	R ₃	R ₅	R _{3'} ,R _{5'}	R _{4''}	IC ₅₀ (μ M)
1	D	H	OH	OCH ₃	OH	8
2	D	OH	OH	H	OH	15
3	D	OH	H	OH	OCH ₃	14
4	D	OH	H	OH	OH	42
5	D	OH	H	OCH ₃	OH	63
6	D	H	OH	H	OH	14
7	S	H	OH	OH	H	14
8	S	H	OH	H	OH	60
9	S	H	H	OH	OH	>100
10	S	OH	H	OCH ₃	OH	>100
11	S	OH	H	OH	OH	>100
12	S	OH	H	OH	OCH ₃	>100
13	S	OH	OH	H	OH	>100

D: double bond, S: single bond.

用を持つ物質を探索してきた。その研究過程で中国産生薬雲南槐 (*Sophora yunnanensis*) や圣地紅景天 (*Rhodiola sacra*) から得られたフラボノイドは、B 環上の酸素官能基が対称的な位置に置換している ($R_3' = R_5'$) という特徴をもっていた (表 1)。

本研究では、まず最初に、(i) 雲南槐と圣地紅景天由来の 13 化合物の構造活性相関を Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) 法で解析した。その結果、回帰性・予測性に良好な構造活性相関モデルを得ることができ、3'位の置換基の重要性とともに B 環の静電ポテンシャルが、NO 産生抑制活性に大きな影響を持つことが示唆された。次に、(ii) この CoMFA モデルにより、強い活性を持つと予測されたフラボンを合成した。さらに、フラバノールを基本骨格に選び、(iii) B 環置換基の構造最適化を行い、(iv) 次いで B 環を 2',3'-dihydroxyphenyl 環に固定して、A/C 環の置換基の影響についても検討した。フラバノールを構造活性相関研究のための基本骨格とした理由は (a) 天然由来のフラバノールには NO 産生抑制活性を示す例が極端に少ない、(b) フラバノールは不斉中心 (C2,C3) をもち、化学合成によって一対のエナンチオマーが得られ、これらをキラル分離すれば、立体異性体の活性も評価できることに着目したからである。これらの検討から、(2*R*,3*R*) 異性体がフラバノールの NO 産生抑制活性をもち、フラボン類は細胞内の標的分子と相互作用することが示唆された。また生合成機構上、多くのフラボノイド類に保存されている 4'位の水酸基は NO 産生抑制活性には不利に働くという意外な構造活性相関も明らかになった。

2. 結果

2.1. 三次元定量的構造活性相関

CoMFA は、リガンド分子に対する受容体あるいは標的分子を想定して、リガンド分子の三次元構造に基づいて構造と活性の間の相関を解析する手法である。雲南槐及び圣地紅景天由来フラボノイド類 (1~13) の NO 産生抑制活性について解析したところ、図 2 に示す CoMFA モデルが構築された。図中 1~6 で示す領域は化合物の分子体積が活性に影響を与える領域を示し、A~D で示す領域は化合物との静電相互作用が活性に影響を与える領域を示している。静電領域 A と B がフラボノイドの NO 産生抑制活性に最も寄与が大きい領域であった。

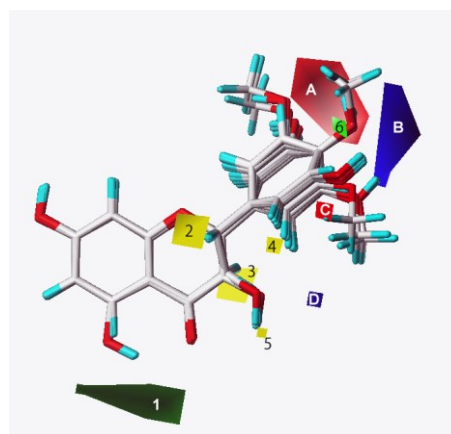


図 2. CoMFA モデル

2.2. CoMFA モデルの予測力の検証：高活性フラボンの合成

この QSAR モデルを利用して、フラボンの仮想化合物ライブラリーから高い活性が予測された構造を選び、その中から合成原料が入手容易であった 5 個のフラボンを合成した (表 2)。3'-*O*-Methyl Diosmetin (18d) ($IC_{50} = 5.0 \mu M$) と apometzgerin (18e) ($IC_{50} = 6.9 \mu M$) は化合物 1~13 よりも強い NO 産生抑制活性を示した。

2.3. 5,7-Dihydroxyflavanonol の B 環置換基の最適化

B 環の置換基に多様性を持たせた 19 個の 5,7-dihydroxyflavanonol を合成した。そのうち、16 化合物では (2*R*,3*R*) 異性体と (2*S*,3*S*) 異性体をキラル分離することができた。これらの化合物について、NO 産生抑制試験と DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去試験を実施した (表 3)。エナンチオマーを単離できた全ての化合物において、(2*R*,3*R*)-異性体と (2*S*,3*S*)-異性体の間では、ラジカル消去能については差が見られなかったが、NO 産生抑制活性にはエナンチオマー間に活性強度の差が認められた (図 3)。(2*R*,3*R*)-配置は天然フラバノールに一般的な立体配置であるが、(2*S*,3*S*)-異性体よりも強い抑制効果を示した。(2*R*,3*R*)-2',3'-dihydroxy 体 (23a) に最も強い抑制活性があった ($IC_{50} = 70 \mu M$)。フラバノールの B 環がオルトヒドロキノン (23a, 23c) またはパラヒドロキノン (23b) の場合はラジカル消去活性が強かった。

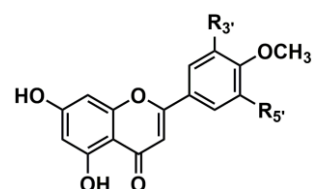


表 2. 合成したフラボン類の構造と NO 産生抑制活性

Compound	R_3'	R_5'	$IC_{50} (\mu M)$
Acacetin (18a)	H	H	27.7
Diosmetin (18b)	OH	H	16.7
4'- <i>O</i> -Methyltricetin (18c)	OH	OH	37.0
3'- <i>O</i> -Methyl Diosmetin (18d)	OCH ₃	H	5.0
Apometzgerin (18e)	OCH ₃	OH	6.9

陽性対照: Kaempferol, $IC_{50} = 13 \mu M$.

表 3. 5,7-Dihydroxyflavanonol 類の構造と活性

Substitution in the B ring	NO 産生抑制活性		ラジカル消去活性	
	IC ₅₀ (μM)		EC ₅₀ (μM)	
	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)
23a (2',3'-OH)	70	>100	12.5	13.5
23b (2',5'-OH)	>100	>100	24.5	25.4
23c (3',4'-OH)	>100	>100	13.9	12.6

以下の化合物は NO 産生抑制ならびラジカル消去ともに活性がない (IC₅₀/EC₅₀ > 100 μM)

23d no substitution, **23e** (2'-OH), **23f** (3'-OH), **23g** (4'-OH), **23h** (2',6'-OH), **23i** (2',4'-OH), **23j** (3',5'-OH), **23k** (2'-OCH₃), **23l** (3'-OCH₃), **23m** (4'-OCH₃), **23n** (2',6'-OCH₃), **23o** (2',3'-OCH₃), **23p** (2',4'-OCH₃), **23q** (2',5'-OCH₃), **23r** (3',4'-OCH₃), **23s** (3',5'-OCH₃)

陽性対照: Kaempferol, IC₅₀ = 13 μM (NO 産生抑制活性); Gallic acid, EC₅₀ = 10-12 μM (ラジカル消去活性).

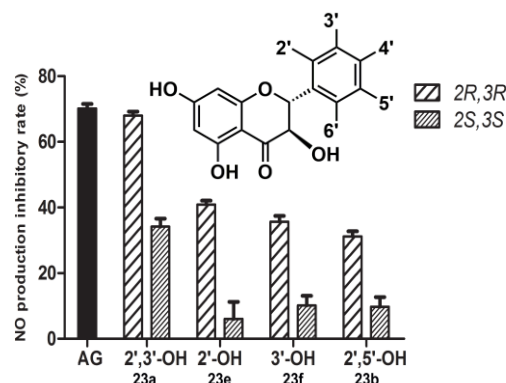


図 3. 5,7-Dihydroxyflavanonols エナンチオマー体の NO 産生抑制. 終濃度は 100 μM. Aminoguanidine hydrochloride (AG)を陽性対照とした.

2.4. 2',3'-Dihydroxyphenyl 環を B 環とするフラバノールの A 環置換基の最適化

B 環を 2.3 節で見出した 2',3'-dihydroxyphenyl 環に固定して、A 環の水酸基の置換位置が異なるフラバノールを合成した。NO 産生抑制活性については A 環 7 位又は 7,8 位に水酸基を有する化合物に強い NO 産生抑制作用が認められた (表 4)。特に 2',3',7-trihydroxyflavanonol (**23w**) と 2',3',7,8-tetrahydroxyflavanonol (**23x**) は、NO 産生抑制活性について明確な立体特異性を示した (図 4)。対照的に、5 位又は 6 位に水酸基を持つフラバノール (**23u**, **23v**) では立体異性体間で NO 産生抑制活性の差は小さかった。一方、ラジカル消去活性については、A 環又は B 環にオルトヒドロキノンを持つ化合物 (**23a**, **23x**) の活性が高かった。特に(2*R*,3*R*)-2',3',7,8-tetrahydroxyflavanonol (**23x**) の NO 産生抑制活性 (IC₅₀ = 17 μM) と DPPH ラジカル消去活性 (EC₅₀ = 7.2 μM) はともに合成した誘導体の中で最も強かった。

表 4. 2',3'-Dihydroxyflavanonol 類の構造と活性

Substitution in the A ring	NO 産生抑制活性		ラジカル消去活性	
	IC ₅₀ (μM)		EC ₅₀ (μM)	
	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)
23t no substitution	>100	>100	12.6	12.8
23u (5-OH)	78	>100	13.0	13.1
23v (6-OH)	>100	>100	16.7	16.9
23w (7-OH)	71	>100	12.3	12.5
23x (7,8-OH)	17	>100	7.2	7.7

陽性対照: Kaempferol, IC₅₀ = 13 μM (NO 産生抑制活性); Gallic acid, EC₅₀ = 10-12 μM (ラジカル消去活性).

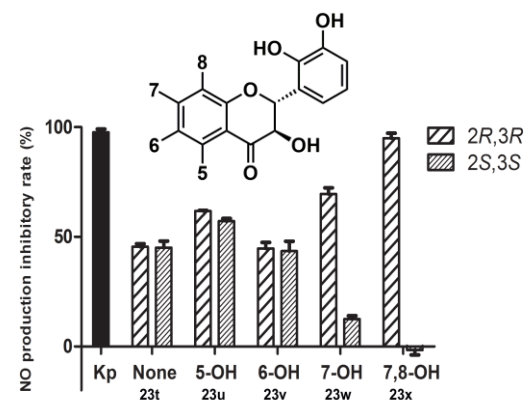


図 4. 2',3'-Dihydroxyflavanonols エナンチオマー体の NO 産生抑制率. 終濃度は 100 μM. Kaempferol (Kp) を陽性対照とした.

3. 考察

本研究は、フラボノイドの NO 産生抑制活性に関する構造活性相関を誘導体の化学合成により検討したものである。まず、天然物由来フラボノイドの構造活性相関 (CoMFA) を解明した。この CoMFA モデルに基づいてデザインしたフラボンの活性は天然物を上回る NO 産生抑制活性を示した。フラボノイドの NO 産生抑制活性は、B 環の静電的な性質の影響が非常に大きかった。そこで NO 産生抑制活性を示す例が稀なフラバノール骨格を母核に選び、NO 産生抑制活性の付与を目的として誘導体の合成を行った。まず、5,7-dihydroxyflavanonol を基本骨格として、B 環の置換基を変化させた誘導体の中から強い活性を示した 2',3'-dihydroxy 体 (**23a**) が得られた。さらに A 環置換基の影響について調べるため、B 環を 2',3'-OH に固定した 10 化合物を合成したところ、3 つの誘導体 (**23u**, **23w**, **23x**) が活性を示した (現在さらに、12 化合物を追加合成している)。この 3 つの中で 2',3',7,8-tetrahydroxyflavanonol (**23x**) の NO 産生抑制 IC₅₀ は 17 μM であり、フラバノール類としては強い活性を示すものである。フラバノールの NO 産生抑制活性は立体特

異的であることから、生体内標的分子の存在が示唆される。またフラボン類の抗酸化活性指標として広く用いられている DPPH ラジカル消去活性には立体特異性がなく、還元力が強いヒドロキノン部分構造があれば、活性が認められた。DPPH 法はフラボンの化学反応性を反映すると考えられてきたが、それを裏付ける結果となった。CoMFA モデルは、B 環の 4'位水酸基の存在は活性に不利と予測していたが、本合成研究により、この意外な構造活性相関を実験的に証明できた。フラボノイドは低毒性の化合物であるが、そのまま医薬品になった例はない。将来、本研究を発展させ、新しい基本骨格をもつ NO 産生抑制活性化合物の設計を行いたい。

4. 実験

4.1. Griess 法による NO 産生評価

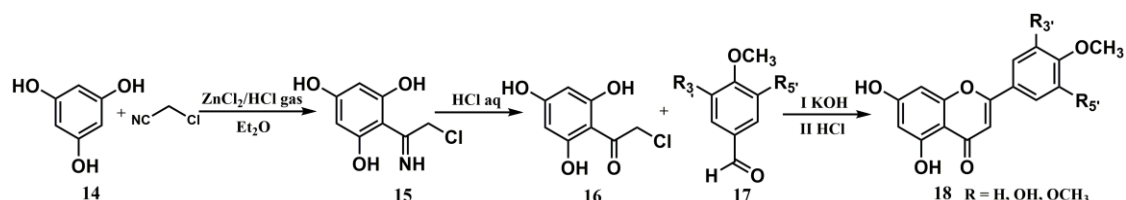
マクロファージ様細胞 RAW264.7 に LPS 及び被験化合物を加え、16 時間培養後、上清中の NO₂ 量を Griess 法により測定し、NO 産生抑制率を求めた。

4.2. DPPH ラジカル消去試験

被験化合物溶液に、DPPH 試液を加え、暗所・常温に 30 分放置。OD 517 nm にて測定した。

4.3. フラボン類の合成

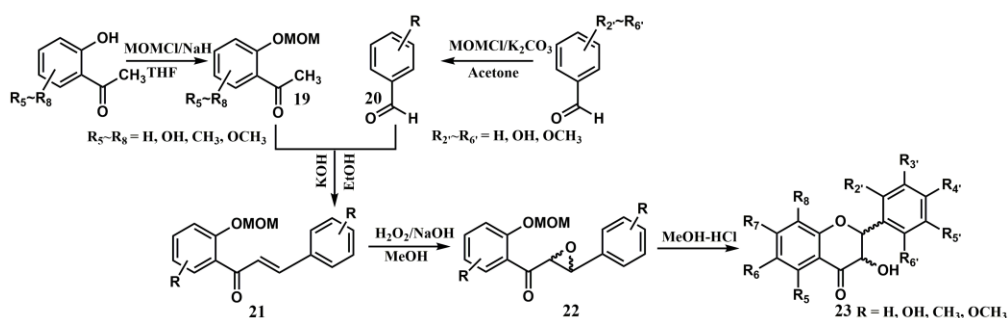
フロログルシノール (14) とクロロアセトニトリルを、塩化亜鉛を触媒として、塩酸ガス気流下に反応させ、中間体のイミン塩 (15) を得た。次いで 15 を加水分解し、中間体 2',4',6'-trihydroxy-2-chloroacetophenone (16) を合成した。このアセトフェノンに各種ベンズアルデヒド (17) を脱水縮合させ、塩酸で閉環してフラボン誘導体 (18a-18e) を合成した (反応式 1)。



反応式 1. フラボン類の合成

4.4. フラバノール類の合成

水酸基を MOMO で保護したアセトフェノン (19) とベンズアルデヒド (20) を、アルカリ性条件下で脱水縮合して、カルコン誘導体 (21) を合成した。カルコン誘導体は過酸化水素でエポキシ化した (22)。メタノール塩酸試薬で MOMO 基を外して閉環させ、フラバノール類 (23a-23x) を合成した (反応式 2)。この合成フラバノール類はラセミ混合物であることからキラルカラムを用い、一対のエナンチオマー (2R,3R)-体及び (2S,3S)-体を分離し、これらの絶対構造は円二色性 (CD) スペクトルにより決定した。



反応式 2. フラバノール類の合成

5. 原著論文

- Jiang W.-J., Ishiuchi K., Furukawa M., Takamiya T., Kitanaka S., Iijima H., *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 6922-6929 (2015).
- Jiang W.-J., Daikonya A., Ohkawara M., Nemoto T., Noritake R., Takamiya T., Kitanaka S., Iijima H., *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 779-788 (2017).