

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

蔣 文君, 飯島 洋

日本大学薬学部生体機能化学研究室

千葉県船橋市習志野台 7-7-1

「研究の概要」

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[1]。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に分けられる(図1)。

フラボノイドには、抗炎症[2-4]、抗酸化[5,6]、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

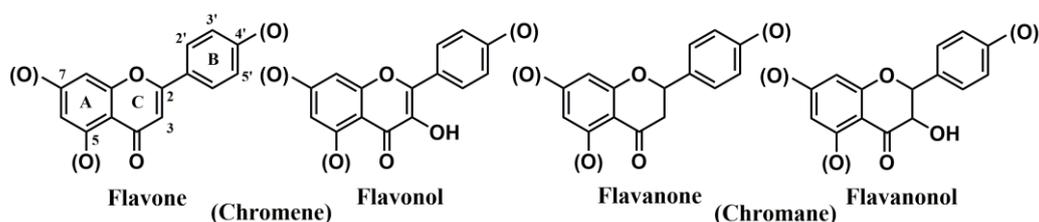


図 1. フラボノイドの構造

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、過酸化物質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、その抑制作用を持つ物質を探索してきた[7]。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。

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对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。

「方法」

雲南槐及び圣地紅景天由来13個のフラボノイド類のNO産生抑制活性について解析し、CoMFAモデルを構築した。このCoMFA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個のフラボン合成した。

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*)異性体のキラル分離に成功し、活性の立体特性を検討した。

B環を2',3'-dihydroxyphenyl環に固定して、A環の水酸基の置換位置が異なる13個フラバノールを合成した。うち9化合物はエナンチオマーを分離した。

抗酸化実験には、DPPHラジカル消去試験を行った。被験化合物溶液に、DPPH試液を加え、暗所・常温に30分放置後、517nmにおける吸光度を測定した。マクロファージ活性化抑制作用はGriess法で評価を行った。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。

「結果と考察」

CoMFAモデルによりデザインされたフラボンを実際に合成した。3'-*O*-Methyldiosmetin (**18d**)(IC₅₀= 5.0 μM) と apometzgerin (**18e**) (IC₅₀= 6.9 μM) は最初の13個化合物よりも強いNO産生抑制活性を示した。

フラボノイドのB環の置換基の配置は、マクロファージのNO産生抑制活性について大きい影響を与えることが判った。まずA環を5,7-dihydroxyflavanonolに固定して、19個の誘導体を合成した。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。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。(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 (図2)。

次に B 環に 2',3'-dihydroxy を固定し、A 環の多様な置換基を持つフラバノールを 13 個合成した。9 種化合物では(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。NO 産生抑制活性については 7 位に水酸基を持つ 23w、あるいは 7, 8 位に水酸基を持つ 23x では立体特異性が認められた。23w の NO 産生抑制活性は強くはなく、その IC₅₀ は 70 μM であった。7 位に加えて 8 位に水酸基があると立体特異性ととも抑制活性も高くなった。6 位メトキシ体である化合物 24 は低活性だが、7 位にメトキシ基を加えた 6,7-dimethoxy 体 26 では立体特異性ととも活性も上がった。以上より、7 位置換基の存在が活性に重要であると考えられる。7-methoxy 体 25 は高い阻害活性を示すが、阻害に関する立体特異性は小さかった。この 7-methoxy 体にさらに 8 位に水酸基を導入した化合物 27 では立体特異性が向上した。2',3'-dihydroxyflavanonol に関しては、7 位の置換基が活性に必要であり、7 位に加えて 6 位または 8 位にさらに置換基が加わると立体特異性が高くなった(図 3)。

化合物が立体特異的な阻害作用を示すことから、フラボンの NO 産生抑制には標的分子の存在が示唆される。また、23x は今後の研究において、有用なプローブ分子となり得ると期待できる。

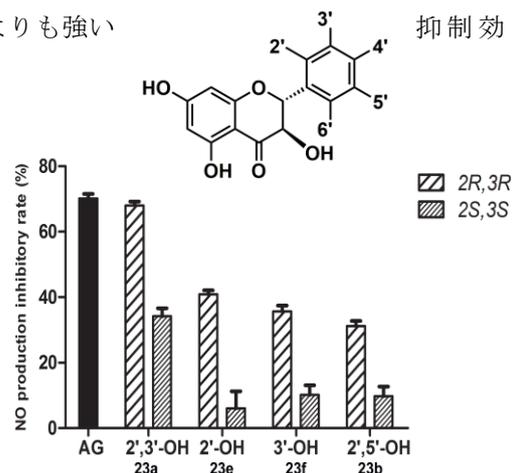


図 2. 5,7-Dihydroxyflavanonols エナンチオマー一体の NO 産生抑制. 終濃度は 100 μM. Aminoguanidine hydrochloride (AG)を陽性対照とした。

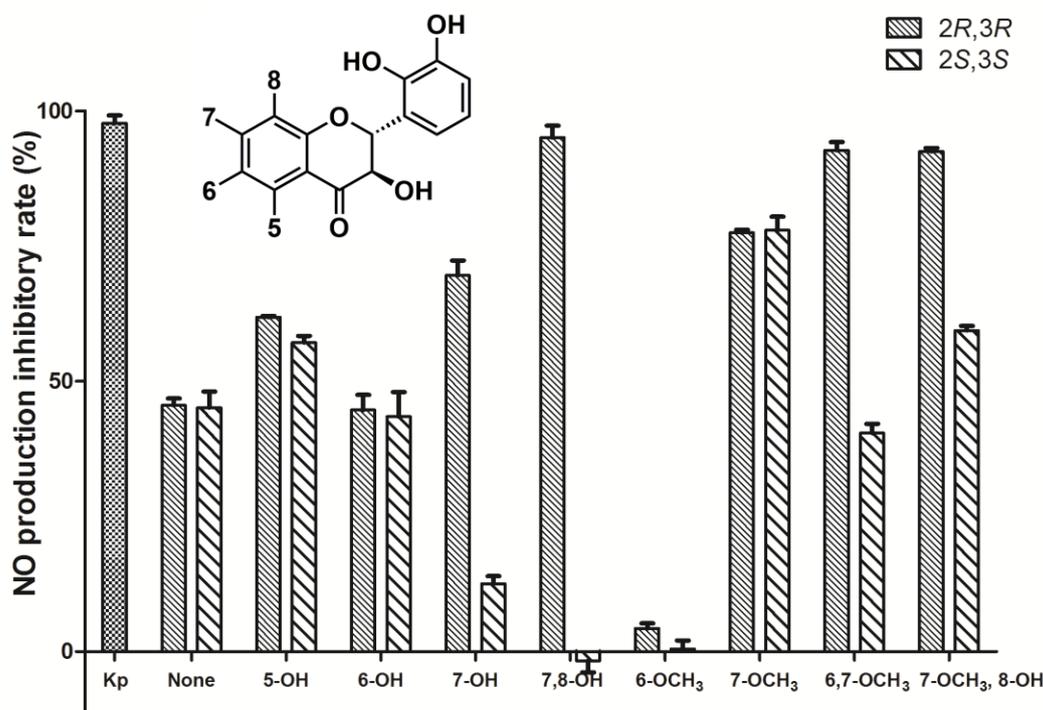


図 3. 2',3'-Dihydroxyflavanonols エナンチオマー一体の NO 産生抑制. 終濃度は 100 μM. Kaempferol (Kp)を陽性対照とした。

参考論文

1. Koirala, N.; Thuan N. H.; Ghimire G. P.; Thang D. V.; Sohng J. K. Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. *Enzyme Microb Tech.* **2016**, *86*, 103-116.
2. Yamamoto, Y.; Gaynor, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 135-142.
3. Cazarolli, L. H.; Zanatta, L.; Alberton, E. H.; Figueiredo, MS.; Folador, P.; Damazio, R. G, Pissolatti, M. G.; Silva, F. R. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1429-1440.
4. Osadebe, P. O.; Okoye, F. B. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 19-24.
5. Schuier, M.; Sies, H.; Illek, B.; Fischer, H. Cocoa-related flavonoids inhibit CFTR-mediated chloride transport across T84 human colon epithelia. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2320-2325.
6. Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *96*, 67-202.
7. Daikonya, A.; Kitanaka, S. Polyphenols from *Sophora yunnanensis*, and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1567-1569.

原著論文

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