カテキンプローブの効率的合成と分子イメージングによる動態解析

Efficient Synthesis of Catechin Probe and its Molecular Imaging

静岡県立大学　薬学部　医薬品製造化学教室　教授 **菅　敏幸**、助教 **浅川　倫宏**
Toshiyuki Kan (Pofessor), Tomohiro Asakawa (Assistant Pofessor)
School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

静岡県立大学　薬学部　医薬生命化学教室　教授 **奥　直人**、助教 **清水　広介**
Naoto Oku (Pofessor), Kosuke Shimizu (Assistant Pofessor)
School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

浜松ホトニクス(株)中央研究所 **塚田　秀夫**
Hideo Tsukada
Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K. K.

1. はじめに

近所のスーパーのお茶売り場には、「インフルエンザ予防：緑茶でうがいをしましょう」と書かれたポスターが、同僚の顔写真付きで貼られている。たしかに、緑茶のカテキン類はインフルエンザウイルスの感染を阻害することが証明されている。また、静岡特産の「緑茶」を多く飲む土地の人はガンや糖尿病になりにくいと言われ、その有効成分であるエピガロカテキンガレート（以下、EGCg）（図1中、化合物**1**）は抗ガン作用や抗菌活性作用などの多彩な生理活性を有していることも古くから知られている。そのため、EGCgの抗ウイルス作用、抗菌作用研究あるいは、がん細胞の増殖抑制作用に代表される様々な生理作用研究は盛んに行われてきた。しかし、EGCgの生体内や細胞での詳細な動態解明研究例は少なかった。我々は、カテキンに目印を付けたプローブ分子を合成することにより、生理的条件下での動態解明が可能になると考え、研究に着手した。さて、菅らの研究室では2005年の赴任後より、カテキン類の合成研究を開始していた。その過程で、図1に示すA環部に水酸基の無いデオキシEGCG（以下、DOEGCg）（**2**）が**1**とほぼ同等のインフルエンザウイルス増殖抑制活性を有することを明らかにした[1]。さらに、その結果を基にして種々のプローブユニットの導入が可能となる第一級アミン含有の側鎖を有する(−)-アミノペンチルデオキシEGCG（以下、(−)-APDOEGCg）（**3**）を設計、合成した[2]。プローブ前駆体となる**3**はフェノール性水酸基を保護することなく、様々なプローブユニットの導入が可能であった。特に、蛍光発色団（Tokyo Green）と連結

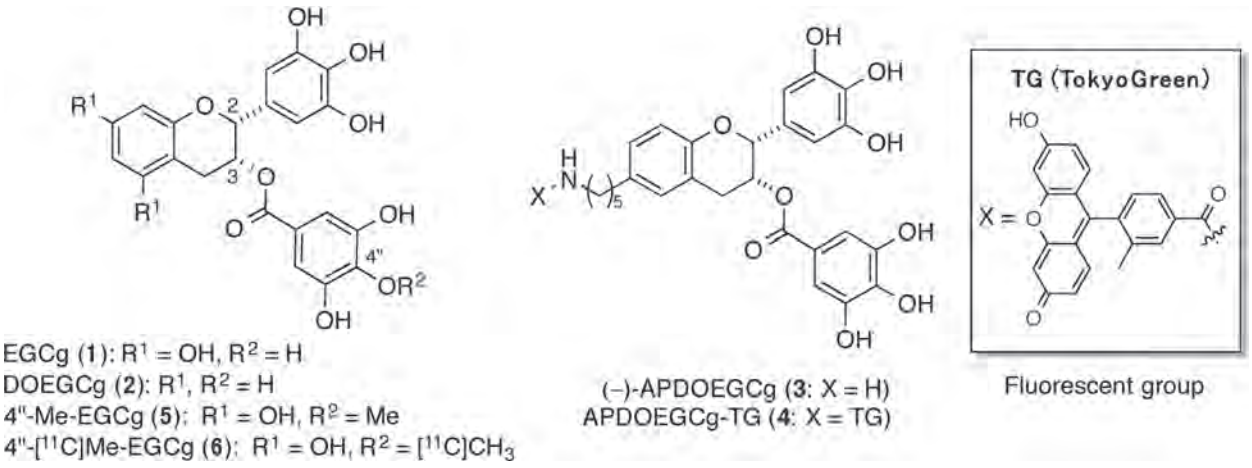

図1 エピガロカテキンガレート（**1**）とその誘導体の構造

することで蛍光プローブ（以下、APDOEGCg-TG）（**4**）を合成し、ヒト臍帯静脈内皮細胞（以下、HUVEC）におけるEGCg-TGの細胞内動態を解析した。また、独自に開発したニトロベンゼンスルホニル（以下、Ns）基[3]をフェノール性水酸基の保護基として用いることにより、EGCgの水酸基に位置選択的にメチル基を導入する方法を開発した[4]。さらに、この方法により合成したメチル化EGCg（**5**）を指標とすることで、**1**から^{11}Cメチル化EGCg（**6**）の迅速合成を達成し、ラットへの経口と静脈内投与によるポジトロン断層（PET）解析に成功した。

2. カテキン蛍光プローブ

これまでの我々の合成の知見[6]を基にすることで、2位と3位の立体化学を制御して4つの異性体を作り分けることが可能となった。図2で示したように、まず、A-環部**7**とB-環部**8**をJulia-Kocienski反応により連結しトランスオレフィン体**9**を得た。引き続く、リンカー部分となる側鎖は**9**への鈴木−宮浦反応により導入した。さらに、側鎖末端の窒素官能基は、筆者らが開発したNsアミド[7]との光延反応により導入した。次に、AD-mix-βにより光学活性ジオールとした後、没食子酸を導入した。本反応では、位置選択的なエステルは得られなかったが、2位と3位の混合物のまま塩基処理すると転位反応が進行し、立体障害の小さい3位の水酸基がエステル化された共通中間体**11**へと収束した。続いて、鍵となる**11**からのピラン環の構築は、隣接基関与を利用することでシス・トランスの両異性体を選択的に構築可能となった。すなわち、**11**に酸を作用さ

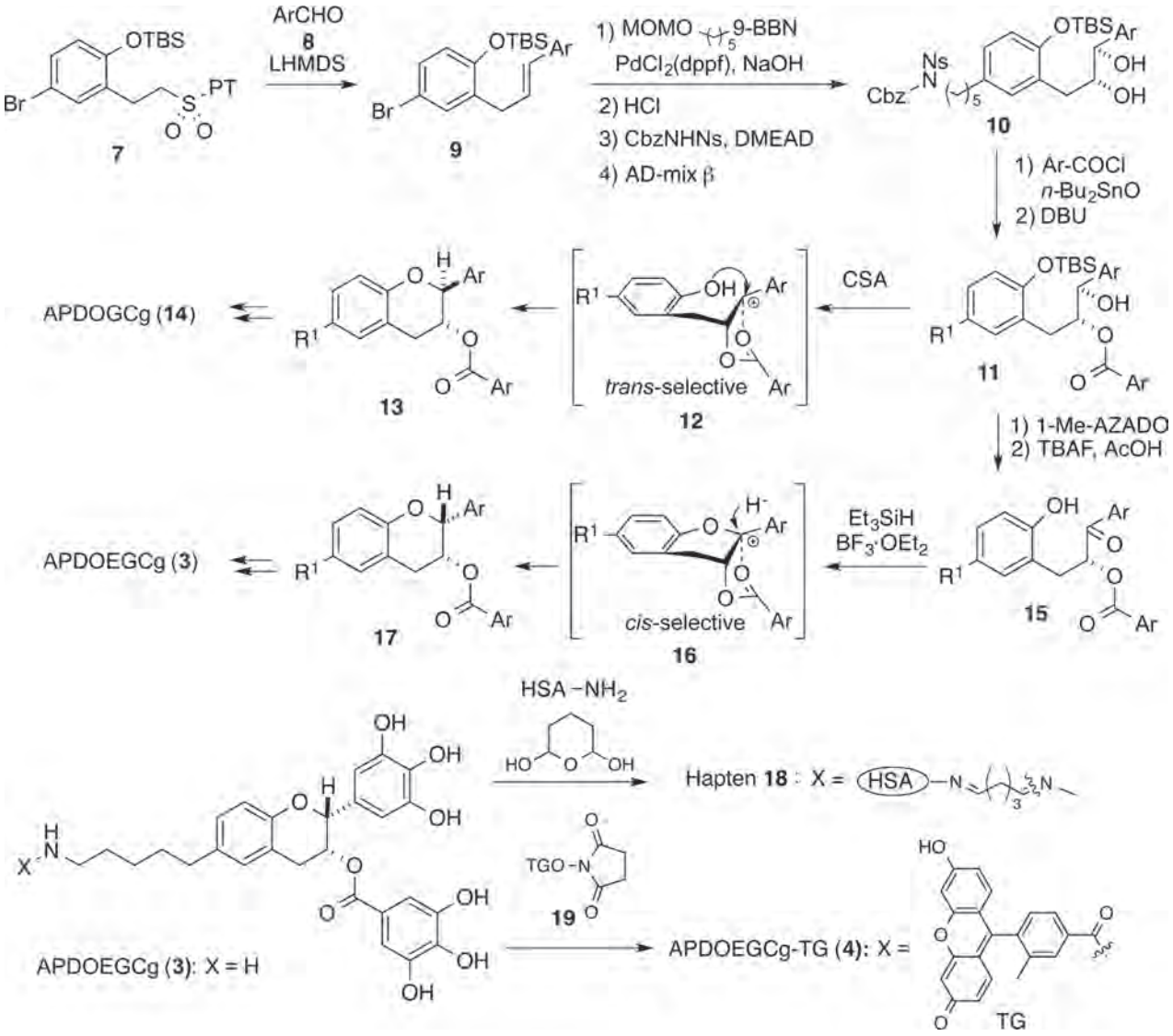

図2 APDOEGCg（3）の合成とプローブ分子への変換

せるとキノンメチド中間体**12**を経由した環化が進行し、トランスのジヒドロベンゾピラン環**13**が得られた。一方、**11**を酸化してケトン**15**にした後、三フッ化ホウ素−ジエチルエーテル錯体(BF_3・OEt_2)存在下でトリエチルシラン(Et_3SiH)を作用させると中間体**16**を経由して、ガロイル基の反対側からヒドリドの攻撃が進行しシス体のピラン**17**を構築した。同様の隣接基関与を利用したピラン環のシス・トランス選択的構築は、糖のC-グリコシル化反応で報告されている[8]。さらに、窒素上のNs基をチオフェノール(PhSH)にて脱保護した後、ベンジル(Bn)とカルボベンジルオキシ(Cbz)基を水素添加反応により同時に除去し、プローブ前駆体となる**3**を合成した。得られた**3**は、天然物の**1**や合成品の**2**より、さらに強いインフルエンザ感染阻害活性を有していることが明らかとなり[2]、A環部の修飾によって活性が失われていないことも確認した。また、この**3**は、フェノール性水酸基を保護することなく、様々なプローブユニットの導入が可能な特徴を有している。まず、グルタルアルデヒドをリンカーとしたキャリアータンパク質(ヒト血清アルブミン:HSA)と結合を行い、ハプテン**18**を合成した。この**18**を抗原としてマウスに免疫することで、モノクローナル抗体の作製にも成功した。次に、蛍光プローブの合成では、多くの既存の蛍光発色団の中から合成が容易なTokyo Green(TG)[9]を選択した。**3**のアミノ基の高い反応性を利用することで、フェノール性水酸基を保護することなくTG-活性エステル**19**とのアミド化反応が進行しAPDOEGCg-TG(**4**)が得られた。また、本合成方法は高極性なプローブ合成に煩雑な精製操作を必要としない特徴も有している。

次にTokyo Greenで標識した**4**を用いてHUVECにおける**4**の細胞内動態を解析した[4]。図3に示したように、**4**はドット状に細胞に取り込まれ、時間と共に蛍光強度が増強した。また37℃、24時間のインキュベーションで細胞質に広く分布していた。このことからカテキンはエンドソームに取り込まれ、細胞質に広がることが示唆されるが、細胞質全体に広がってはいないので、その詳細についてはさらなる検討が必要である。なお、4℃のインキュベーションでは、37℃のインキュベーションでみられる強い蛍光は観察されなかったことから、エンドサイトーシスによる**4**の取り込みが示唆された。さらに遊離のTGを用いた場合には**4**のような強い蛍光は観察されず、またその分布は一部アクチンと共局在していた(図3)。遊離のTGの分布が**4**の細胞内動態とかなり異なることから、**4**の細胞内分布はEGCgの分布を反映している可能性が大きいと考えられる。

3. カテキンPETプローブ

「べにふうき」とよばれる茶は、含有するメチル化EGCg(**5**)に強力な抗アレルギー活性を有しているため、花粉症に有効な茶として大きな注目を集めている。当研究室では、これまでのカテキン類合成の知見と、独自に開発したNs基[3]をフェノール性水酸基の保護基として用いることで、以下のメチル化EGCgの合成を達成した[4]。図4に示したように、まず、没食子酸エステル**20**の3位と4位への選択的なメチル基の導入を行った。**20**に炭酸リチウム存在下、ヨウ化メチルを作用させると最も反応性の高い4位選択的にメチル基が導入される。一方、ホウ酸存在下にて反応を行うと、カテコールのホウ酸エステルの架橋中間体を経由して、3位選択的にメチル化反応が進行した。これらメチル基を導入した没食子酸の2つのフェノール性水酸基をNs基にて保護した後、カルボン酸へと変換して**22**と**25**を合成した。さらに、安価かつ容易に得られるカテキンのNs保護体**26**と**22**と**25**の縮合は円滑に進行し、**27**と**28**が得られた。さらにチオフェノールと炭酸セシウムを作用させると、エステルの分解や2位のエピメリ化が進行することなく、Ns基の除去が進行し**5**と**29**の合成を達成した。また、同様の手法にてB-環の水酸基にも区別してメチル基の導入が可能となった。

さて、PET解析はガン診断にも使われる、リアルタイムかつ三次元でイメージング可能な有効な方法である。しかし、ポジトロン放出核種の^{11}Cの半減期が20分と短時間であるため迅速なプローブ合成が強く求められている。そこで、合成した^{12}Cメチル化EGCg(**5**)を指標に、短時間での**1**への^{11}Cメチル基の導入を試みた。種々条件を検討した結果、図5に示すように、*n*-Bu_4NOHを塩基として用いジメチルスルホキシド(DMSO)中、ヨウ化メチルを作用させると、D環ガレート部4位に選択的なメチル化が進行し、3分で終了した。引き続く、高速クロマトグラフィー(HPLC)による短時間での単離精製は、アスコルビン酸を添加することで達成した。本メチル化と単離精製の条件を浜松ホトニクスのホットラボにて実施することで、^{11}Cメチル化EGCg(**6**)の高速合成に成功した。

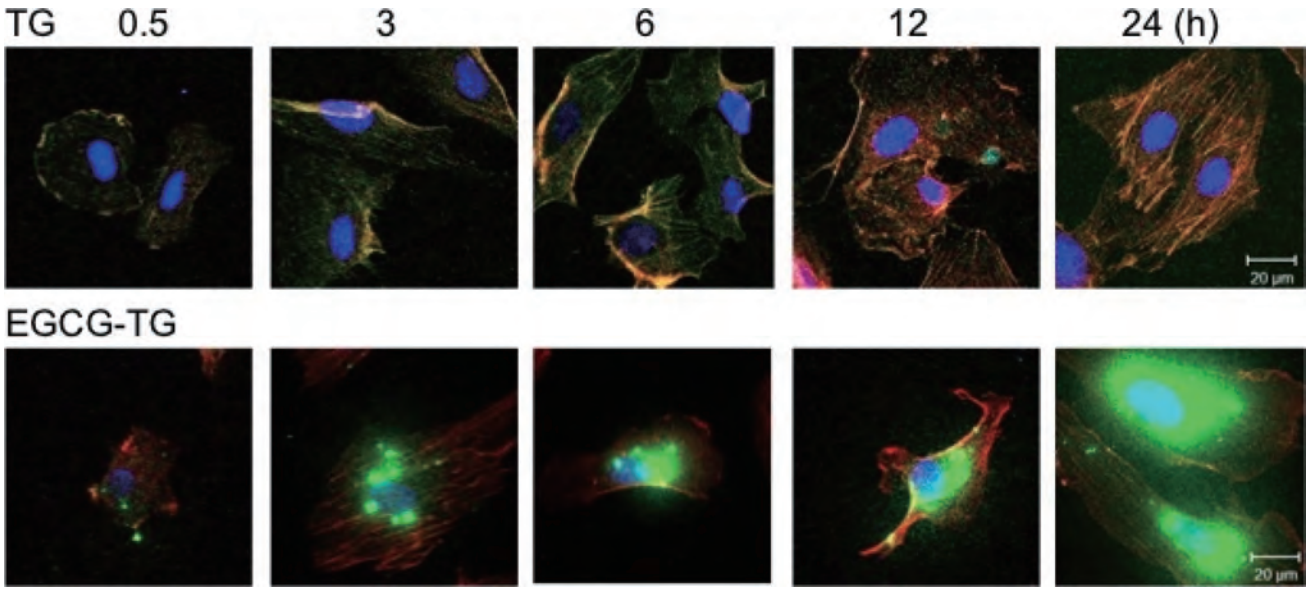

図3 HUVECとTGやAPDOEGCg-TG（**4**）との複合体
HUVECを1μMのTG（上段）またはAPDOEGCg-TG（**4**）（下段、緑色）と37℃でインキュベートし、細胞固定後にローダミン／パロイジン（赤色）およびDAPI（青色）によりアクチン及び核の染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて確認。

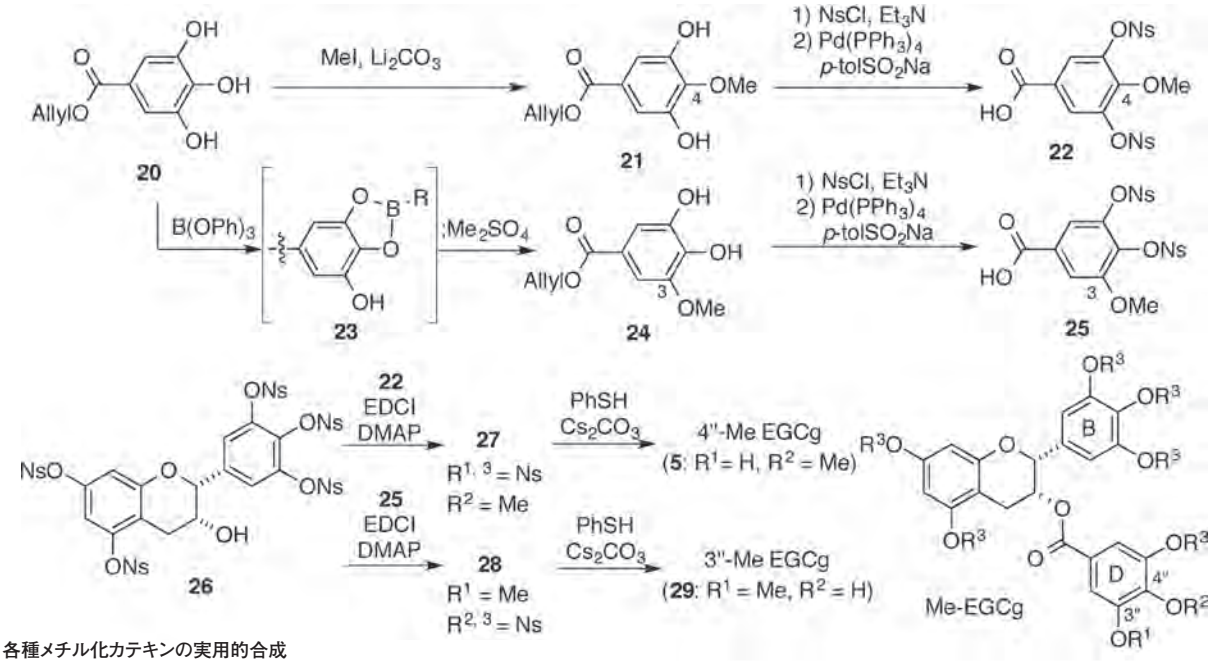

図4 各種メチル化カテキンの実用的合成

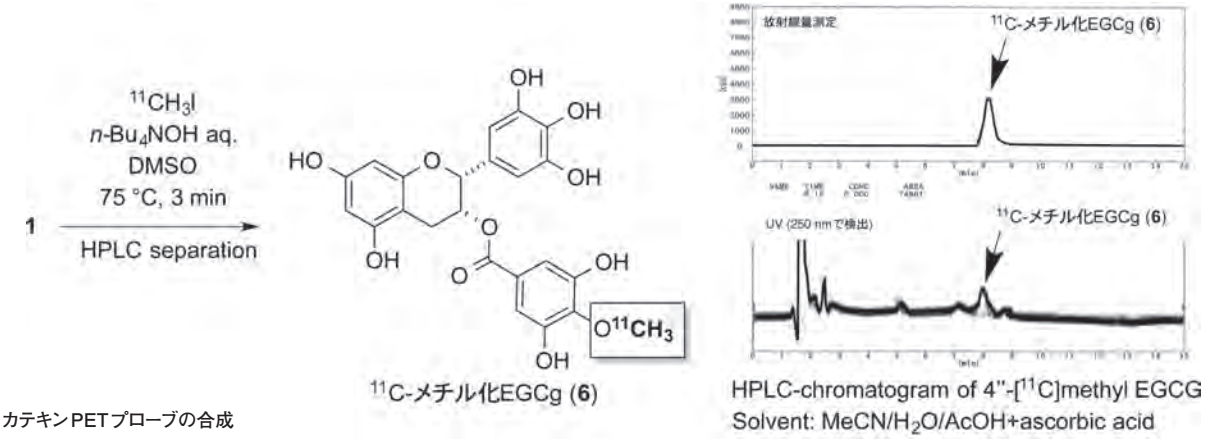

図5 カテキンPETプローブの合成

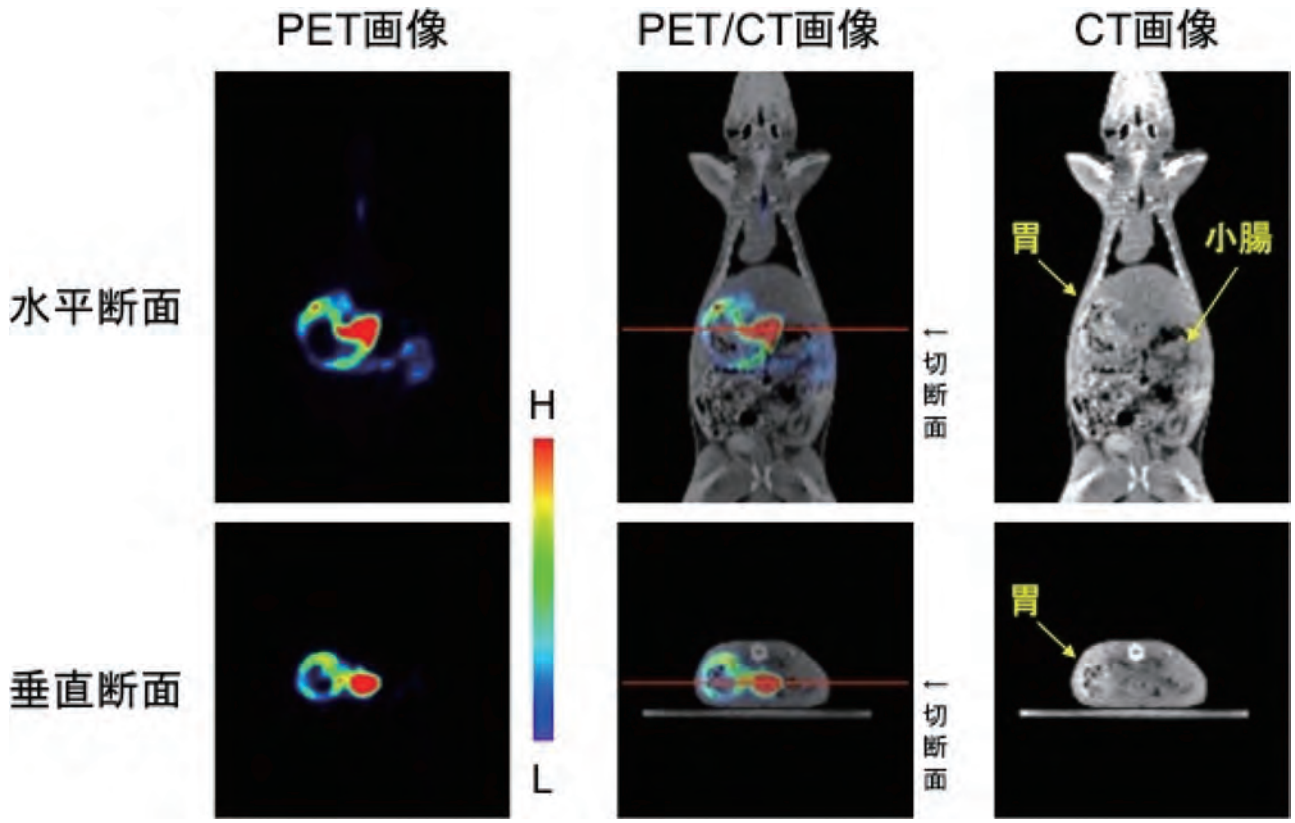

図6 ^{11}Cメチル化EGCg(**6**)をラット経口投与後の5－15分の集積画像

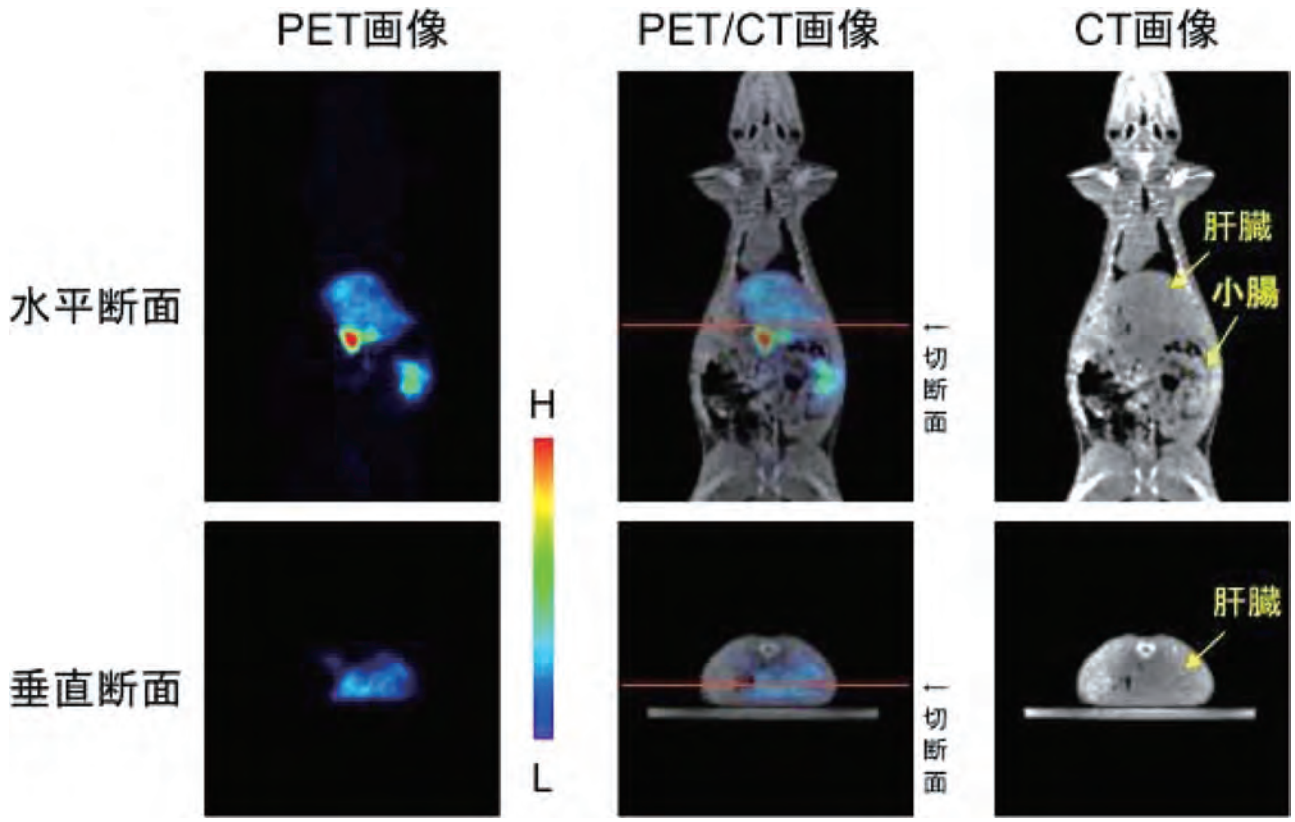

図7 ^{11}Cメチル化EGCg(**6**)をラット尾静脈内投与後の5－15分の集積画像

引き続き、合成した**6**を普通飼育したラットに経口投与し、その動態を測定した。図6は、投与後5－15分の集積画像を示している。**6**は胃に滞留し、徐々に小腸に移行する様子が観察された。別にラット(n=4)を用意し、投与1時間後に解剖して定量的解析を行ったところ、約40%の放射活性が胃から回収され、約10%の放射活性が小腸から回収された。体内に吸収された**6**はごく少量と考えられることから、その分布を画像から判断することは難しい。そこで放射活性から定量的解析を行ったところ、放射活性の約0.1%が肝臓から回収され、血中からも全量の10分の1程度が回収された。このことは**6**の一部が吸収され肝臓で代謝されることを示唆している。また腎臓からは約0.05%の放射活性が回収された。

経口投与後の動態解析結果をさらに裏付けるために、次に**6**を静脈内に投与し、血中の**6**がどのように分布し代謝されるかを検討した。図7は、投与後5－15分の集積画像を示している。**6**の放射活性は主に肝臓で観察された。投与5分後及び1時間後に解剖して得られた定量的解析結果では、放射活性回収の絶対量は異なるものの経口投与後と類似の体内組織分布パターンを示したことから、経口投与で吸収された**6**が、血中から肝臓に移行して代謝されることを示唆した。さらに、**6**の静脈内投与後のPET画像変化を追うと、肝臓から小腸に放射活性が移行する様子が観察され、投与30分後には小腸の放射活性が肝臓よりはるかに高くなるという像が観察された。すなわちEGCg(正確にはガロイル基あるいはガロイル基に結合したメトキシ基)は、肝臓で代謝された後に、速やかに胆汁中に排泄されることが強く示唆された。

4. おわりに

以上、述べてきたように蛍光標識カテキンの細胞内動態の可視化、およびPETを用いることでカテキンの吸収と体内分布を可視化することに成功した。我々は、機能性を有する他の食品成分の体内動態PET解析にも成功しており[10]、PETを用いて食品成分の体内動態を可視化する分子イメージング技術は、食品成分の機能性を解明する上で、非常に貴重なデータとなると確信している。本稿では^{11}Cメチル化EGCg(**6**)を用いて経口投与時と、カテキン摂取後の動態を知るために静脈内投与の実験を行った。また、種々の食品等の摂取時にカテキン吸収がどのように変化するかを調べるなど応用範囲は広く、本研究は今後のカテキン研究や機能性食品成分の研究の発展に大きく貢献するものと考えている。

謝辞

本研究は、文部科学省「21世紀COEプログラム：先導的健康長寿学術研究推進拠点」と「グローバルCOEプログラム：健康長寿科学教育研究の戦略的新展開」のプロジェクトとして開始された。日頃より叱咤激励いただいた元拠点リーダーの木苗直秀教授(静岡県立大学学長)に深謝します。さらに、本研究は「独立行政法人科学技術振興機構の地域結集型研究開発プログラム：静岡発　世界を結ぶ新世代茶飲料と素材の開発」の支援も受けました。ご指導頂いた企業化統括の原征彦客員教授と代表研究者の中山勉教授に感謝します。また、本研究が世界に誇れる「静岡のお茶」に貢献できれば、著者らにとっての大きな喜びです。

参考文献

1) Furuta, T.; Hirooka, Y.; Abe, A.; Sugata, Y.; Ueda, M.; Murakami, K.; Suzuki, T.; Tanaka, K.; Kan, T. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007, 17, 3095-3098.

2) Yoshida, A.; Hirooka, Y.; Sugata, Y.; Nitta, M.; Manabe, T.; Ido, S.; Murakami, K.; Saha, R. K.; Suzuki, T.; Ohshima, M.; Yoshida, A.; Itoh, K.; Shimizu, K.; Oku, N.; Furuta, T.; Asakawa, T.; Wakimoto, T.; Kan, T. Chem. Commun. 2011, 47, 1794-1796.

3) Kan, T.; Fukuyama, T. Chem. Commun. 2004, 40, 353-359.

4) Aihara, Y.; Yoshida, A.; Furuta, T.; Wakimoto, T.; Akizawa, T.; Konishi, M.; Kan. T. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 45, 4171-4174.

5) Piyaviriyakul, S.; Shimizu, K.; Asakawa, T.; Kan, T.; Siripong, P.; Oku, N. Biol. Pharm. Bull. 2011, 34, 396-400.

6) Hirooka, Y.; Nitta, M.; Furuta, T.; Kan, T. Synlett. 2008, 3234-3238.

7) Fukuyama, T.; Cheung, M .; Kan, T. Synlett. 1999, 1301-1303.

8) Lewis, M.D.; Cha, J.K.; Kishi, Y. J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 4976-4978.

9) Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose K.; Nagano, T. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 4888-4894.

10) Asakawa, T.; Hiza, A.; Nakayama, M.; Inai, M.; Oyama, D.; Koide, H.; Shimizu, K.; Wakimoto, T.; Harada, N.; Tsukada, H.; Oku, N.; Kan, T. Chem. Commun. 2011, 47, 2868-2870.