

令和元年5月21日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08325

研究課題名(和文) アルツハイマー病患者の脳神経再生を志向した安全性の高い神経分化誘導物質の創製

研究課題名(英文) Synthesis and exploring of neuronal differentiation-inducing agents for regeneration of neurons

研究代表者

須原 義智 (Suhara, Yoshitomo)

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：30297171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では再生医療で行われている幹細胞からニューロンへの分化を従来の遺伝子導入によらず、低分子の「神経分化誘導物質」によって制御することを目指した。申請者はこれまでに、ニューロンへの分化を誘導する化合物としてビタミンKを見出している。そこで、この化学構造を基にして、作用発現に重要であると予想される置換基を導入し、強い分化誘導作用を有する誘導体を探索した。その結果、幾つかの強い分化誘導能を有する化合物と共に、分化を抑制する興味深い活性をもつ化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、アルツハイマー病をはじめとした神経変性疾患の治療薬の開発が世界中で行われているが、そのほとんどは原因物質と考えられているアミロイド タンパク質を消去する薬剤であり、全て臨床試験段階で頓挫しているのが現状である。それに対して我々の研究は、失われた脳神経を「再生させる」ことを目標にして、神経幹細胞からニューロンへの分化を誘導する神経分化誘導物質の開発を行うことを目標にしている。今回の研究成果から、ニューロンへの分化誘導活性を高めた幾つかの化合物を見出しており、さらに活性を高めることができれば全く新しい視点からの治療法を提案できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to control the differentiation activity of progenitor cells into neurons with a small molecule "neural differentiation inducer" instead of a conventional gene transfer. We have already found vitamin K had differentiation-inducing activity into neurons. Based on the chemical structure of vitamin K, a substituent predicted to be important for the expression of action was introduced to study for derivatives having a strong differentiation-inducing activity. As a result, we found a compound having an interesting activity to suppress differentiation as well as a compound having strong differentiation-inducing activity.

研究分野：創薬化学

キーワード：ビタミンK 分化誘導 脳神経 再生医療 低分子化合物 神経分化誘導物質 ニューロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、アミロイドベータ (A β) と呼ばれるタンパク質が加齢と共に脳内に蓄積し、脳神経細胞 (ニューロン) が変性・死滅してしまうのが主要原因と考えられている。そのため、アルツハイマー病の患者には健常人に比べてニューロンの著しい減少が見られ、特に記憶能力を司る海馬に萎縮が認められる。これまでに世界中で A β の生成および蓄積阻害をターゲットとした薬剤が根本治療薬の候補として開発されてきた。しかし、いずれも臨床試験の段階で効果がないか重篤な副作用により頓挫してしまったため、根本的な治療法は未だ見つかっていないのが現状である。一旦アルツハイマー病を発症してしまうと、すでにニューロンの多くが失われているために、A β を除去しても記憶障害などの症状は回復しないことも報告されており、治療薬の開発は困難を極めている。

2. 研究の目的

申請者は、最近益々注目されている「再生医療」の観点から、アルツハイマー病患者の「脳神経の再生」を目指しつつ、「脳を正常な状態に戻す」ための新たな治療法を開発することを目指し研究を行っている。脳神経系の細胞は、神経伝達を担うニューロンと支持細胞として働くグリア細胞 (アストロサイト、オリゴデンドロサイト) から構成される。これらの細胞は、脳の複雑な高次構造の中で時間的かつ空間的に高度な遺伝子制御を受けて未分化の神経幹細胞から増殖・分化し、感覚 (知覚) や運動に関わる脳の高次機能を制御している。申請者は、脳神経の素となる脳神経幹細胞からニューロンへの分化を、従来の遺伝子導入によらず、安全性の高い低分子の神経分化誘導物質によって選択的に制御・誘導することを目指している。脳神経幹細胞は高齢者にも存在することが確認されていることから、このような化合物が創製できれば高齢者のニューロンをも再生させることが可能であり、アルツハイマー病をはじめ各種の脳神経変性疾患に有効な治療薬に応用できると考えている (図 1)。

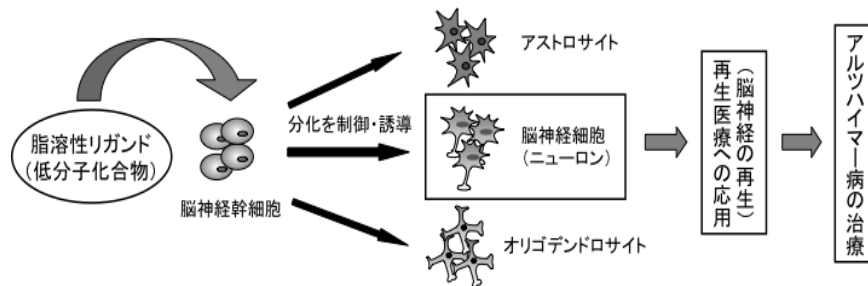


図 1 . ニューロンへの分化を誘導する神経分化誘導物質の開発

脳内には生理活性リガンドが多く存在しているが、ビタミン K も高濃度に存在し、その特異的受容体も脳組織全域で発現していることが明らかにされている。また申請者らにより、ビタミン K は脳内でも生合成されていることが証明されたため、脳神経機能の維持に重要な役割を果たしている可能性が高い。事実すでに申請者らは、ビタミン K がマウス大脳由来の脳神経幹細胞をニューロンへ選択的に分化させる作用をもつことを見出している。さらに、ビタミン K の側鎖末端部に様々な置換基を導入した誘導体を合成し、同様の評価系で細胞毒性が無く、天然のビタミン K と比較して約 2 倍のニューロン選択的な分化誘導作用をもつ誘導体 SIT-101 および SIT-102 を得た (図 2) 。しかし、医薬品の候補化合物に応用するには活性をさらに強力にする必要がある。そこで、安全性が高くかつ強い神経分化誘導作用を有する新たな誘導体の創製を本研究の目的とした。

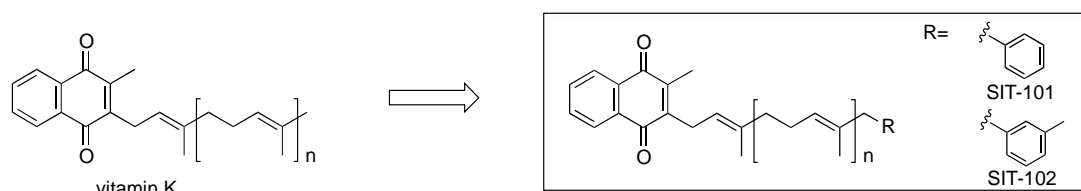


図 2 . 申請者が見出したニューロンへの分化を選択的に誘導するビタミン K 誘導体

ビタミンKをはじめ、既に報告されている分化誘導作用を有するいくつかの化合物はイソプレレン構造やヘテロ環を有している。そのため、強い分化誘導作用をもつ化合物は、それらを含む化合物に集約できると考えている。また、創薬にたどり着くまでには、できるだけ多くの化合物の化学構造と生物活性の関係を明らかにする必要があることから、本研究では主に以下の3点について検討することにした。

- (1) イソプレレン構造やヘテロ環を有しニューロンへの分化を誘導すると予想される化合物群を系統的に合成して、化合物ライブラリーを構築する。
- (2) (1)で構築した化合物ライブラリーについて Screening を行い、ニューロンへの強い分化誘導作用活性を示す化合物を選別する。
- (3) 計算化学の手法により(2)で得られた化合物のファーマコフォアを検討し、さらに強い分化誘導作用を示す化合物を設計する。

以上の工程を実走させれば、上記の我々の実績から、研究期間内に活性値を天然体に比べて飛躍的に押し上げることは十分可能であると考えた。

3. 研究の方法

(1) 分化誘導活性を示すビタミンK誘導体を簡便に合成する方法の確立

申請者がこれまでに見出した分化誘導活性をもつビタミンK誘導体の知見を基にして、すでに明らかにされている神経分化を誘導する化合物の部分構造を融合した誘導体を合成し、新規の化合物ライブラリーを構築する。このとき、ビタミンKを環部分と側鎖部分に分けて、それぞれを出来るだけ簡便に合成する方法を確立する。

(2) 低分子化合物ライブラリー構築の加速と高活性を示す化合物の選別

上記で確立した手法を用いて、低分子化合物ライブラリーの構築を加速する。また、化合物ライブラリーの分化誘導活性を評価するために、高効率な High-Throughput Screening 法を用いる。細胞はマウス胎仔大脳由来の脳神経幹細胞を用いる。具体的な評価方法として、分化したニューロンの表面に特異的に発現するタンパク質 (MAP2) を認識する一次抗体と蛍光標識した二次抗体を用いて、化合物がどのくらい分化を促進したのかを PCR もしくは細胞表面の蛍光強度によって測定する。得られた結果から活性化化合物を選別し高活性を示す化合物を見出す。

(3) さらに高活性を示す化合物を得るための考察

上記(2)で得られた化学構造と分化誘導活性の関係から、高活性化化合物のどの部分が生物活性に重要なのかをファーマコフォア解析により考察する。さらに、化合物の三次元構造と電子配置の関係を表すファーマコフォアモデルを計算化学の手法により構築する。その情報を基にして新たな誘導体を設計し、さらに強い分化誘導活性を有する化合物を目指す。

(4) 作用発現に関与するタンパク質の高効率解析手法の確立と評価

上記(2)により化合物ライブラリーから得られた高活性化化合物について、どのようなタンパク質に作用しているのかを、アフィニティークロマトグラフィーを用いた pull-down 法により分離・精製して明らかにする。その後、このタンパク質から高活性化化合物が示す分化誘導作用の作用メカニズムを解明する。

(5) 低分子化合物ライブラリーの拡充

引き続き低分子化合物ライブラリーの拡充を行い、さらに高活性を示す可能性のある化合物群の合成を行う。

(6) 作用発現に関するタンパク質による神経分化誘導物質の探索

神経分化誘導作用の発現に関係するタンパク質について、強く結合する化合物をそれまでに構築した化合物ライブラリーから探索する。得られた化合物が実際に強い神経分化誘導作用をもつのかを活性評価して確かめる。

4. 研究成果

これまでに我々は、側鎖末端に各種の芳香環を導入したビタミン K 誘導体 **1-10** を合成し、フェニル基や *m*-メチルフェニル基をもつ化合物 **1-4** が天然のビタミン K に比べて強い神経分化誘導作用をもつことを見出した。この知見を基に我々は、作用タンパク質との相互作用を期待して、側鎖末端にヘテロ原子を介し芳香環を導入したビタミン K 誘導体 **11-22** を合成した (図 3 A)。その結果、ヘテロ原子とフェニル基に導入した置換基の神経分化誘導活性に及ぼす影響が明らかとなった。

次に、化合物 **3** 及び **4** の側鎖末端のフェニル基に結合しているメチル基が及ぼす影響を調べるために、メチル基が複数結合したフェニル基を導入した化合物を合成した (図 3 B)。興味深いことに、*tert*-ブチル基をもつ化合物 **28** と **34** は最も強い分化誘導活性を有していたが、化合物 **23** と **25** は反対にコントロール群より分化を抑制することが明らかとなった。すなわち、ビタミン K を基盤とした誘導体は、側鎖末端に導入した置換基により幹細胞分化を制御できる可能性があると考えられた。

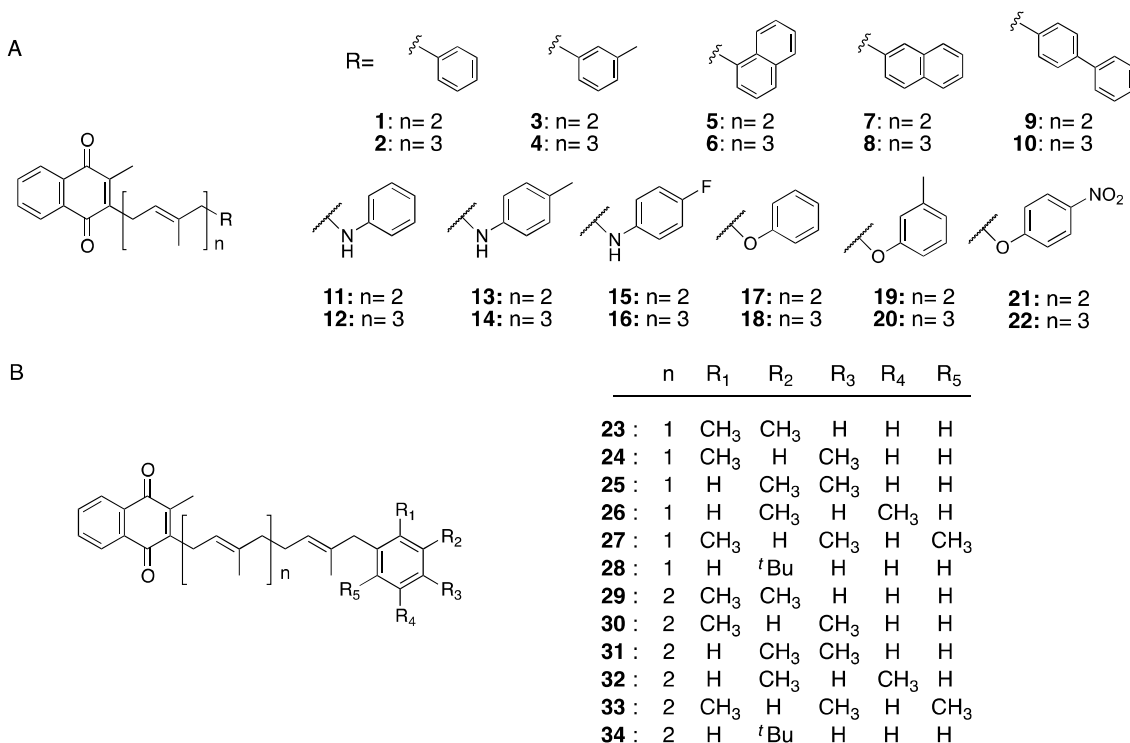


図 3 . 側鎖末端を修飾したビタミン K 誘導体

現在は、これらのビタミン K 誘導体がどのような作用メカニズムで幹細胞の分化を誘導するのかを解明するために、その作用タンパク質を同定するツールとなる標識化合物を合成して解析している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. 須原義智; 廣田佳久 ビタミンK研究のパラダイムシフト (吸収・代謝から新たな生物活性まで) 化学と生物 56, 26-32, **2018**.
2. Sakane, R.; Kimura, K.; Hirota, Y.; Ishizawa, M.; Takagi, Y.; Wada, A.; Kuwahara, S.; Makishima, M.; Suhara, Y.* Synthesis of novel vitamin K derivatives with alkylated phenyl groups introduced at the ω-terminal side chain and evaluation of their neural differentiation activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27(21), 4881-4884, **2017**.

3. Kamao, M.; Hirota, Y.; Suhara, Y.; Tsugawa, N.; Nakagawa, K.; Okano, T.; Hasegawa, H. Determination of Menadione by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Pseudo Multiple Reaction Monitoring. *Anal. Sci.* 33(7), 863-867, **2017**.
4. Kimura, K.; Hirota, Y.; Kuwahara, S.; Takeuchi, A.; Tode, C.; Wada, A.; Osakabe, N.; Suhara, Y.* Synthesis of Novel Synthetic Vitamin K Analogues Prepared by Introduction of a Heteroatom and a Phenyl Group That Induce Highly Selective Neuronal Differentiation of Neuronal Progenitor Cells. *J. Med. Chem.* 60(6), 2591-2596, **2017**.
5. Ikeda, M.; Ueda-Wakagi, M.; Hayashibara, K.; Kitano, R.; Kawase, M.; Kaihatsu, K.; Kato, N.; Suhara, Y.; Osakabe, N.; Ashida, H. Substitution at the C-3 Position of Catechins Has an Influence on the Binding Affinities against Serum Albumin. *Molecules*, 22(2), E314, **2017**.
6. Hirota, Y.; Nakagawa, K.; Mimatsu, S.; Sawada, N.; Sasaki, T.; Kubodera, N.; Kamao, M.; Tsugawa, N.; Suhara, Y.; Okano, T. Nongenomic effects of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ on cartilage formation deduced from comparisons between Cyp27b1 and VDR knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483 (1), 359-365, **2017**.
7. Saito, A.; Nakazato, R.; Suhara, Y.; Shibata, M.; Fukui, T.; Ishii, T.; Asanuma, T.; Mochizuki, K.; Nakayama, T.; Osakabe, N. The impact of theaflavins on systemic-and microcirculation alterations: The murine and randomized feasibility trials. *J. Nutr. Biochem.* 107-114, **2016**.

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 伊東優貴、廣田佳久、中川公恵、須原義智：ビタミン K 結合タンパク質を蛍光標識する新規プローブの合成、第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2018 年 11 月 28 日 (ポスター発表)
2. 伊東優貴、廣田佳久、中川公恵、須原義智：結合タンパク質の解明を目指した新規蛍光プローブの合成、第 60 回天然有機化合物討論会、2018 年 9 月 27 日 (ポスター発表)
3. 佐藤大輝、廣田佳久、須原義智：レチノイン酸の側鎖構造を模倣したニューロンへの分化誘導活性を有する新規ビタミン K 誘導体の合成、第 62 回日本薬学会関東支部大会、2018 年 9 月 15 日 (口頭発表)
4. 高田希望、廣田佳久、須原義智：ビタミン K 結合タンパク質の同定を目指したビオチン標識ビタミン K 誘導体の合成、第 62 回日本薬学会関東支部大会、2018 年 9 月 15 日 (ポスター発表)
5. 曾田靖也、吉村広志、高木勇太、廣田佳久、須原義智：ニューロンへの分化誘導作用の増強を指向したビタミン K の環構造に関する検討、第 62 回日本薬学会関東支部大会、2018 年 9 月 15 日 (ポスター発表)
6. 伊東優貴、廣田佳久、須原義智：Synthesis of novel fluorescent probes to elucidate vitamin K binding protein、ACS Fall National Meeting 2018、2018 年 8 月 21 日 (ポスター発表)
7. 高田希望、廣田佳久、須原義智：ビオチン標識ビタミン K 誘導体の合成およびビタミン K 特異的結合タンパク質の探索、日本ビタミン学会第 69 回大会、2018 年 6 月 23 日 (口頭発表)
8. 伊東優貴、廣田佳久、中川公恵、須原義智：新規ビタミン K 蛍光プローブの合成およびビタミン K 結合タンパク質の解析、日本ビタミン学会第 69 回大会、2018 年 6 月 23 日 (口頭発表)
9. 佐藤大輝、廣田佳久、須原義智：側鎖にレチノイン酸の共役構造を有する新規ビタミン K 誘導体の合成、日本ビタミン学会第 69 回大会、2018 年 6 月 23 日 (口頭発表)
10. 高田希望、廣田佳久、須原義智：ビタミン K 作用タンパク質の同定を目指したビオチン標識ビタミン K 誘導体の合成、第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017 年 9 月 16 日 (口頭発表)

11. 伊東優貴、廣田佳久、須原義智：ビタミン K 結合タンパク質の解明を目指した新規蛍光プローブの合成、第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017 年 9 月 16 日（ポスター発表）
12. 伊東優貴、廣田佳久、須原義智：ビタミン K 結合タンパク質の解明を目指した新規蛍光プローブの合成、日本ビタミン学会第 69 回大会、2017 年 6 月 10 日（口頭発表）
13. 佐藤大輝、木村キミト、廣田佳久、和田昭盛、須原義智：ニューロンへの分化誘導活性を有するヘテロ原子を誘導したビタミン K 誘導体の合成、日本ビタミン学会第 69 回大会、2017 年 6 月 10 日（口頭発表）
14. 中川公恵、泰井麻由奈、横田衣利、原香織、三宅智子、澤田夏美、須原義智、岡野登志夫、長谷川潤：脳神経特異的ビタミン K₂ 合成酵素 UBIAD1 欠損マウスの脳機能解析、日本ビタミン学会第 69 回大会、2017 年 6 月 9 日（口頭発表）
15. 廣田佳久、中川公恵、須原義智、岡野登志夫：ビタミン K₁ 水素付加物 (2',3'-PKH₂) の代謝機構、日本ビタミン学会第 69 回大会、2017 年 6 月 10 日（口頭発表）
16. 木村キミト、廣田佳久、須原義智：神経幹細胞をニューロンへ高選択的に分化誘導する分子内にヘテロ原子をもつ新規ビタミン K 誘導体の合成、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日（ポスター発表）
17. 廣田佳久、中川公恵、須原義智、岡野登志夫：水素添加したビタミン K₁ (2',3'-PKH₂) の代謝機構、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日（ポスター発表）
18. 中川公恵、原香織、三宅智子、泰井麻由奈、横田衣利、澤田夏美、須原義智、長谷川潤、岡野登志夫：脳神経特異的ビタミン K₂ 合成酵素 UBIAD1 欠損マウスの表現型解析、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日（ポスター発表）
19. 須原 義智、木村 キミト、廣田 佳久：神経分化誘導作用をもつ新規ビタミン K 誘導体の創製 第 31 回日本酸化ストレス学会関東支部会、2016 年 12 月 17 日（口頭発表）
20. 木村キミト、廣田佳久、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智：ニューロンへの分化を高選択的に誘導する新規メナキノン誘導体の合成、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2016 年 12 月 1 日（ポスター発表）
21. 木村キミト、廣田佳久、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智：側鎖末端にヘテロ原子を導入した新規ビタミン K 誘導体の合成と神経分化誘導作用の検討、第 60 回日本薬学会関東支部大会、2016 年 9 月 17 日（ポスター発表）
22. 木村キミト、廣田佳久、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智：分子内にヘテロ原子を導入した新規ビタミン K 誘導体の神経分化誘導作用の検討、第 58 回天然有機化合物討論会、2016 年 9 月 14 日（ポスター発表）
23. 木村キミト、廣田佳久、坂根里枝、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智：ビタミン K の側鎖末端を修飾した誘導体の合成と核内受容体 SXR に対する転写活性の検討、日本ビタミン学会第 68 回大会、2016 年 6 月 17 日（口頭発表）
24. 吉村広志、廣田佳久、中川公恵、岡野登志夫、須原義智：二本の側鎖とその末端にフェニル基を導入した新規ビタミン K 誘導体の合成、日本ビタミン学会第 68 回大会、2016 年 6 月 17 日（口頭発表）
25. 中川公恵、澤田夏美、木本貴士、須原義智、岡野登志夫：ビタミン K₂ 合成酵素 UBIAD1 の脳神経系における機能解析、日本ビタミン学会第 68 回大会、2016 年 6 月 17 日（口頭発表）
26. 須原義智：ビタミン K の新規生理活性物質への応用、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日（シンポジウム）
27. 木村キミト、廣田佳久、坂根里枝、岡田歩美、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智：側鎖末端を修飾したビタミン K 誘導体の合成と標的タンパク質との相互作用の検討、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日（ポスター発表）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。