

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590113

研究課題名(和文) 脂溶性リガンドから構築する脳神経変性疾患治療薬を目指した新規リード化合物の創製

研究課題名(英文) Synthesis of new analogues based on fat-soluble vitamins and biological evaluation as therapeutic agents for degenerative disease of the brain

研究代表者

須原 義智 (SUHARA YOSHITOMO)

横浜薬科大学・環境科学研究室・准教授

研究者番号：30297171

研究成果の概要(和文)：我々は脂溶性ビタミン類の中でも特にビタミン K に着目して脳神経変性疾患の治療薬となりうるリード化合物の探索を行った。ビタミン K 同族体のひとつであるメナキノン-4 (MK-4) は、体内で生合成されてあらゆる組織に高濃度に存在しているため、MK-4 の生合成反応は脳神経変性疾患治療薬を開発する上で重要なターゲットのひとつになると考えられる。そこでまず、脳神経変性疾患の治療薬となりうるリード化合物を創製していく一助として、ビタミン K の蛍光標識体や重水素標識体を合成して、MK-4 への変換のメカニズムを解明すると同時に変換効率の高い化合物の探索を行った。また、ビタミン K の側鎖部分を修飾した化合物を合成し、マウス大脳由来神経幹細胞からニューロンへの分化誘導作用や核内受容体 Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) を介した転写活性を検討した。

研究成果の概要(英文)：We focused on vitamin K analogues among fat-soluble vitamins to explore therapeutic agents for degenerative disease of brain. It has been clarified that menaquinone-4 (MK-4), one of the vitamin K homologues, is biosynthesized in a living body and accumulated to the various tissues. MK-4 also protected oligodendrocyte precursors and immature fetal cortical neurons from oxidative injury, independent of the vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylative reaction. Therefore, MK-4 should play an important role for a living body, especially in brain. On the basis of these findings, we evaluated the biological action of vitamin K homologues with chemical techniques using fluorescent labeled and deuterated labeled analogues. Furthermore, we also synthesized new vitamin K analogues and evaluated biological activities such as their differentiation-inducing activity from stem cells to neuron and gene transcription through the steroid and xenobiotic receptor (SXR).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：創薬化学

科研費の分科・細目：6804

キーワード：脂溶性ビタミン、再生医療、脳神経変性疾患、治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

平均寿命が世界一となり、急速な高齢社会を迎えている我国では、がん、骨疾患、神経

疾患、心疾患、アレルギー疾患などの加齢性疾患の罹患数が急増している。中でも、21世紀における主要疾患の一つに脳疾患があげ

られ、益々複雑化するストレス社会と相俟って脳機能障害の原因究明と治療効果の向上が急務になっている。特にアルツハイマー病をはじめとする脳神経変性疾患は、統合記憶システムとして生物の生命活動に必須である神経系の破綻を引き起こし、身体能力すべてに甚大な影響を与えるため、その発症を予防・治療する方法が切望されている。

最近になって、脂溶性ビタミンであるビタミン A や E が *in vitro* で脳神経細胞に対して様々な作用を示すことが報告された。一方、我々はマウス由来の脳神経細胞を用いた実験から、ビタミン K が酸化ストレスからの保護作用を有しており、さらに脳神経前駆細胞からニューロンへの分化を促進することを明らかにした。そこでこれらの知見を基にして、脂溶性ビタミン類の構造を基にした脂溶性リガンドライブラリーを作成し、新規の脳神経変性疾患治療薬のシーズとなりうる誘導体の開発を行う研究を計画した。

## 2. 研究の目的

一般に、脂溶性ビタミンはほとんどが繰り返し構造を有する不飽和アルキル鎖を持っている。我々は、脂溶性ビタミン類が有する様々な生理作用の多くは、このアルキル鎖に由来するのではないかと考えている。事実、ビタミン A や E、K では、それぞれ側鎖の繰り返し構造の異なる異性体が存在し、それらは全く異なる生物活性を示すことが明らかとなっている。一方、脂溶性ビタミンの誘導体研究では、側鎖部分を修飾し、生理活性の増強を狙った化合物が多数報告され、医薬品化されたものも多数存在する。我々はこの不飽和アルキル鎖を脂溶性ビタミン類の共通構造として捉え、構造活性相関の研究を行うことにより生物活性をコントロールし、全く新しい生理活性物質を得られるのではないかと考えた。そこで、脂溶性ビタミンの中でも特にビタミン K に着目し、その側鎖として存在するイソプレノイドの繰り返し単位を変化させたり末端の官能基を修飾した化合物を、芳香環化合物と組み合わせて合成して生物活性を調べた。また、ビタミン K の脳神経に対する作用メカニズムを調べる一環として、重水素標識体を合成してビタミン K 同族体のひとつであるメナキノン-4 (MK-4) の生合成メカニズムを検討した。また核内受容体 Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) を介した転写活性も併せて検討した。

## 3. 研究の方法

(1) ビタミン K の細胞内分布と MK-4 の生合成反応の検討。 合成した蛍光標識体を MG-63 細胞に添加して、経時変化と共に細胞内の蛍光を観察することにより、ビタミン K の細胞内分布を観察した。また、各種のビ

タミン K 同族体は生体内において MK-4 へ変換される現象を化学的に考察した。即ち、ビタミン K の重水素標識体を合成して MG-63 細胞および HepG2 細胞に添加し、48 時間後に細胞内のビタミン K を抽出した。次に、LC-APCI-MS/MS で細胞内に含まれていた重水素化 MK-4 を定量することにより、細胞内での MK-4 への変換量を定量した。

(2) 脂溶性リガンド化合物ライブラリーの構築。 我々は、脳内に多く存在し、脳神経保護作用を有することが報告されている脂溶性ビタミン類の中でも特にビタミン K の構造をヒントにして、化合物を設計・合成した。即ち、ビタミン K を構成するアルキル側鎖部分と環部分に分けて検討し、それぞれを修飾した誘導体を組み合わせて合成を行った。まず、メナキノン類の側鎖部分においては、末端に水酸基、アルデヒド基、フェニル基などの官能基を導入した誘導体を合成した。さらに、イソプレノ側鎖をナフトキノンの 2 位と 3 位に導入した誘導体も合成して化合物ライブラリーを作製した。

(3) 合成した化合物の生物活性評価の検討。 上記において得られた化合物は、細胞を用いたスクリーニングによる生物活性評価を行った。生物活性は以下のような評価を行った。  
① 脳神経前駆細胞からニューロンへの分化誘導活性の検討：マウス胎仔大脳由来細胞をガラスボトムカルチャーディッシュに播種し、24 時間培養した後、合成したリガンドを添加して 7 日間培養した。パラホルムアルデヒドによって細胞を固定化し、特異表面抗原認識蛍光抗体を用いて、ニューロンおよびアストロサイトへの分化を蛍光顕微鏡によって観察した。この蛍光を定量して分化誘導活性を評価した。このとき、細胞の突起伸長についても観察した。  
② 核内受容体 SXR を介した転写活性の検討：HepG2 細胞に SXR-GAL4 および CYP3A4 プロモーターを介して転写活性を測定できる系を確立し、合成した各種ビタミン K 誘導体による転写活性を検討した。

## 4. 研究成果

(1) ビタミン K の蛍光標識体の合成と細胞内分布の検討。 ビタミン K には様々な同族体が存在し、天然では植物由来のビタミン K<sub>1</sub> (フィロキノロン: PK) (1) と菌類由来のビタミン K<sub>2</sub> (メナキノン類: MK-n) (2) に大別される (図 1)。これまでに、ビタミン K は細胞内のどの部分に局在して作用を発現するのかが明らかにされていなかった。また、ビタミン K は分子内に自家蛍光を示すナフトキノンを持っているが、その蛍光は非常に弱く、細胞に添加可能な濃度では蛍光による細胞

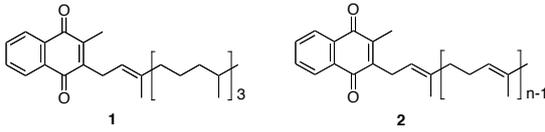


図1. ビタミン K<sub>1</sub> (1) とビタミン K<sub>2</sub> (2) の構造

内での局在は観察できなかった。そこで、ビタミン K の分子構造中に蛍光物質を導入した化合物を合成して実験に用いることにした。ここでビタミン K を蛍光標識する際に問題となるのは、蛍光物質をビタミン K 分子内のどの部分に導入するのが良いのかという点であった。今回は様々な知見から、ビタミン K の生物活性に重要であると考えられる側鎖部分から最も遠いナフトキノン環の7位の部分に蛍光物質を導入することにした。合成方法は図2のように、2-メチル-1,4-ナフトキノン誘導体 (5) を出発原料にして、7位にアルデヒド基を導入した 8 とした後、Wittig 反応および接触還元によってエチルカルボン酸体(11)とすることにより、ナフトキノン環の7位の部分にリンカーを導入したビタミン K<sub>3</sub> 誘導体(13)を合成した。この中間体に側鎖部分を結合させた後、最後に市販の蛍光物質である FITC をアミド結合させて FITC-PK (3) と FITC-MK-4 (4) を得た。この化合物についてビタミン K の補酵素活性を測定したところ、PK に比べて約 10% の補酵素活性が保持されていることがわかった。そこで、この化合物を細胞に添加し、経時変化を追って細胞内での蛍光の局在を調べた。蛍光標識体の細胞への添加実験は、シャーレの底にスライドガラスを密着させて、そこに MG-63 細胞を播種した。細胞の定着を確認後、比較対照群としてコントロール、FITC のみを添加したもの、そして 1 $\mu$ M の 3 を添加したものをそれぞれ作成し、タイムコースをとってスライドガラス上の細胞を固定化した後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞内の蛍光を観察した。この結果、コントロールと FITC のみを添加したものでは細胞内の蛍光は観察されなかったのに対し、3 では経時変化と共に細胞に吸収され、細胞内の蛍光が増加しているのがわかった。次に FITC-MK-4 (4) との比較では、PK に比べて細胞内の蛍光が早い時間で増加していることから、吸収されやすいことが明らかとなった。この傾向は、重水素標識体の吸収と同じであり、ビタミン K の性質を保持していることが確認できた。次に細胞に取り込まれた FITC-PK (3) は細胞内のどの部分に集積しているのかを確かめるため、市販の ER-Tracker Red を用いて小胞体やゴルジ体を蛍光染色して調べた。このとき、ER-Tracker Red と FITC の励起波長と蛍光波長は互いに異なるため、それぞれの発する蛍光は重なりあわないことを確認した。これら

の観察結果を重ね合わせると、互いの蛍光部分は完全に重なり、さらに拡大した画像から、小胞体の中に FITC-PK (3) が点在していることが確認できた。したがって、ビタミン K は主に  $\gamma$ -カルボキシレーションが行われている小胞体膜に近い小胞体に集積していることが明らかになった。この蛍光標識体を用いることで、今後細胞のみならず、組織レベルでのビタミン K の局在を調べることができるとと思われる。

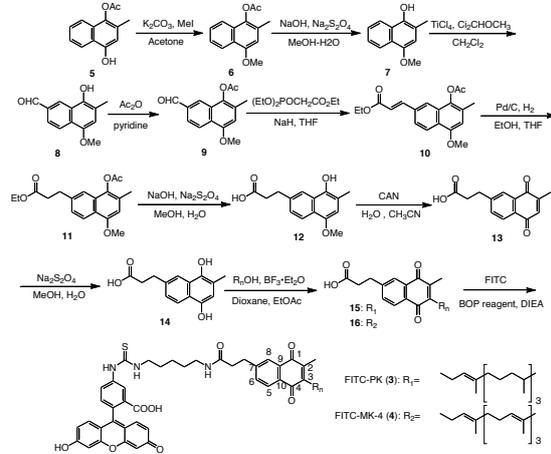


図2. ビタミン K の蛍光標識体の合成

(2) 重水素標識体の合成と MK-4 への変換の検討。組織内に存在する MK-4 は、摂取されたビタミン K の側鎖部分が、メバロン酸経路で生合成されたゲラニルゲラニル側鎖と入れ替わることにより体内で生合成される説が唱えられてきたが、これまでに科学的な証明はなされていなかった。そこで我々は、図3に示すように、ナフトキノン環を重水素で標識した PK-d<sub>7</sub> (17) と MK-4-d<sub>7</sub> (18) をそれぞれ合成して、実際にマウスに投与することで MK-4 への生合成を調べた。これら化合物の合成方法は、まず、市販の重水素標識された 2-メチル-1,4-ナフトキノン-d<sub>8</sub> (K<sub>3</sub>-d<sub>8</sub>) (19) を出発原料として用い、10% ハイドロサルファイトナトリウム水溶液とジエチルエーテルの二層系で還元してヒドロキノン体 (20) とした。その後、側鎖部分となるフィトールもしくはゲラニルゲラニオールと共に酢酸

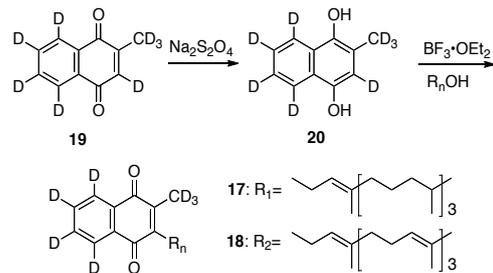


図3. ビタミン K の重水素標識体の合成

エチル/1,4-ジオキサン(1:1)の溶液に溶解させ、触媒量の  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  を加えて  $60^\circ\text{C}$  で反応させることで、**17** と **18** を簡便に得ることができた。これら誘導体のうち、**17** をマウスに経口投与して 48 時間後に各臓器を摘出し、それらの中に含まれているビタミン K 誘導体を抽出した。抽出液を濃縮後、LC-APCI-MS/MS によって測定した結果、マウスの脳をはじめとする各組織において **18** が検出された。また、NMR から **MK-4** に変換している事実が確かめられた。このように、生体内には存在しない重水素標識体を用いて **17** から **18** への変換が観察できたことにより、**MK-4** は各組織で生合成されて蓄積されていることが証明された。

さらに我々は、各種ビタミン K 同族体の重水素標識体を合成して、細胞に添加することにより **MK-4** への変換率を調べた。その結果、イソプレン側鎖部分の繰り返し単位が短い程変換率が高く、特に側鎖部分の環に最も近い位置にある二重結合が重要であることが明らかとなった。

### (3) 脂溶性リガンド化合物ライブラリーの構築と生物活性の検討。

① **ビタミン K 誘導体の合成**。我々はビタミン K の構造特異性を検討する目的で、ビタミン K 同族体のナフトキノン骨格に同じイソプレン側鎖を対称に導入した誘導体と側鎖末端部分を修飾した誘導体を合成した。イソプレン側鎖を対称に導入した誘導体は、図 3 に示すように、1,4-ナフトキノンを出発原料として、10% 水溶液で還元した後、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体を触媒として、ナフトキノン骨格の 2 位と 3 位に同一のイソプレン側鎖を対称に導入した新規ビタミン K 誘導体 (**21**)-(**25**) を合成した (図 4)。

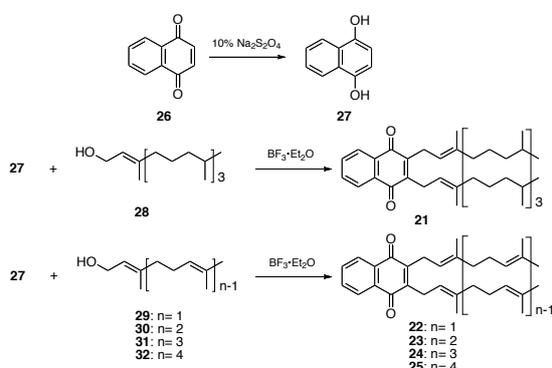


図 4. 側鎖部分を二つ導入した誘導体の合成

また、側鎖末端部分を修飾した誘導体は、側鎖部分としてイソプレン単位の異なるゲラニルアセテート、ファルネシルアセテート、ゲラニルゲラニルアセテートをそれぞれ出

発原料に用いた。それらの側鎖末端に水酸基を導入した後、テトラヒドロピラン(THP)基で保護して **36a** および **36b** とし、アセチル基の脱保護を行い **37a** および **37b** とし、 $\omega$  位に水酸基を導入したビタミン K<sub>2</sub> 誘導体の合成に用いた。また、**37a** および **37b** にフェニルマグネシウムブロミドを反応させることで、 $\omega$  位にフェニル基を導入した側鎖部分 **38a** および **38b** を合成した。これらの側鎖部分を 2-メチル-1,4-ナフトキノンとカップリングさせて、目的とするフェニル基を有する誘導体 (**33**) および (**34**) を合成することができた (図 5)。一方、側鎖末端に水酸基を導入した誘導体は **37a** および **37b** を用いて同様の方法で得ることができた。

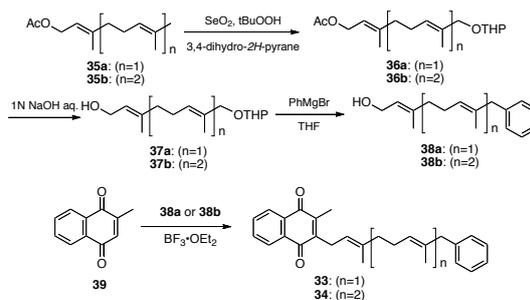


図 5. 側鎖末端部を修飾した誘導体の合成

② **核内受容体 SXR を介した転写活性の検討**。ビタミン K 同族体の中で特にメナキノン-4 は、核内受容体の SXR と結合し、遺伝子の発現を誘導することが明らかにされている。そこで合成した化合物群に関して、SXR を直接介した転写活性 (SXR-GAL4 による転写活性) および標的遺伝子に対する転写活性を調べた (CYP3A4 プロモーターを介した転写活性)。SXR-GAL4 を介した転写活性では、メナキノン類ではともに **MK-3** が最も高い活性を示したのに対し、側鎖を二つ導入した誘導体では **23** が最も高い活性を示した (図 6)。

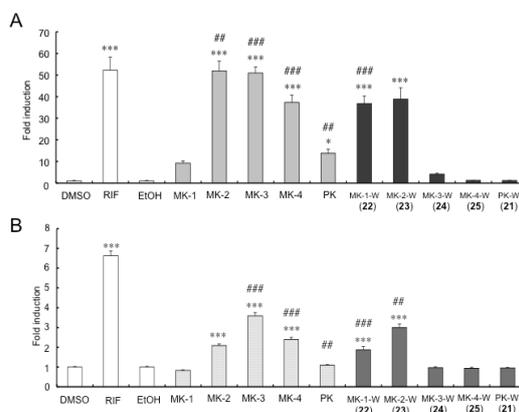


図 6. 側鎖を二つ導入した誘導体およびメナキノン類による、SXR-GAL4 (A) および CYP3A4 プロモーターの応答領域 (B) を介し

たルシフェラーゼアッセイによる転写活性の測定結果

Significant differences between control group and each compounds group: \*\*\*,  $p < 0.001$  (by Dunnett's test). Significant differences between the MK-n group and the MK-n-W group: ###,  $p < 0.001$ ; ##,  $p < 0.01$  (by Student's  $t$  test).

一方、側鎖末端に官能基を導入した誘導体については、水酸基を導入した化合物 (MK-2-OH~MK-4-OH)ではメナキノン類と比較して活性が低下した。しかし、フェニル基を導入した化合物 **33**、**34** では活性が著しく上昇し、特に **34** では SXR のアゴニストとして知られているリファンピシシ(RIF)と同等の転写活性を有することが明らかとなった (図7)。したがって、ビタミン K の側鎖末端に疎水性の官能基を導入すると、SXR アゴニストとしての活性が上昇することが明らかとなった。

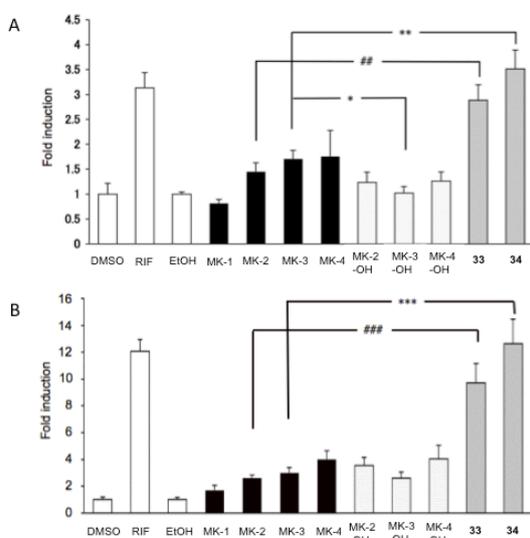


図7. 側鎖末端に官能基を導入した誘導体およびメナキノン類による、SXR-GAL4 (A) および CYP3A4 プロモーターの応答領域(B) を介したルシフェラーゼアッセイによる転写活性の測定結果

Significant difference: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  (by Student's  $t$  test).

③ 脳神経幹細胞のニューロンへの分化誘導活性の検討。メナキノン類 (MK-1、MK-2、MK-3、MK-4)、および化合物 **21-25** をリガンドとして、脳神経幹細胞からニューロンへの分化誘導活性を調べた。プレリミナリーな結果として、分化誘導活性は側鎖部分の長さに依存していることが明らかとなった。また、ビタミン K の側鎖部分に疎水性の官能基を

導入することで、より強力な活性を有することも明らかとなった。今後、この知見を基にさらなる誘導体を合成して、さらに活性の強い誘導体を探索することにより、脳神経変性疾患の治療薬のシーズとなりうる化合物を見つけ出すことが可能であるものと思われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

① 須原義智、和田昭盛、中川公恵、鎌尾まや、津川尚子、岡野登志夫、化学的アプローチによるビタミン K の生理作用の解析と生理活性物質への応用、ビタミン、査読有、印刷中

② Suhara, Y.; Watanabe, M.; Motoyoshi, S.; Nakagawa, K.; Wada, A.; Takeda, K.; Takahashi, K.; Tokiwa, H.; Okano, T. Synthesis of new vitamin K analogues as steroid and xenobiotic receptor (SXR) agonists: Insight into the biological role of the side chain part of vitamin K. *J. Med. Chem.* 査読有 in press.

③ Suhara, Y.; Watanabe, M.; Nakagawa, K.; Wada, A.; Ito, Y.; Takeda, K.; Takahashi, K.; Okano, T. Synthesis of novel vitamin K<sub>2</sub> analogues with modification at the ω-terminal position and their biological evaluation as potent steroid and xenobiotic receptor (SXR) agonists. *J. Med. Chem.* 査読有 in press.

④ Nakagawa, K.; Hirota, Y.; Sawada, N.; Yuge, N.; Watanabe, M.; Uchino, Y.; Okuda, N.; Shimomura, Y.; Suhara, Y.; Okano, T. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* 査読有 468, 117-121, 2010.

⑤ Wada, A.; Wang, F.; Suhara, Y.; Yamano, Y.; Okitsu, T.; Nakagawa, K.; Okano, T. Efficient synthesis and biological evaluation of demethyl geranylgeranoic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有 18(16), 5795-806, 2010.

⑥ Suhara, Y.; Wada, A.; Tachibana, Y.; Watanabe, M.; Nakamura, K.; Nakagawa, K.; Okano, T. Structure-activity relationships in the conversion of vitamin K analogues into menaquinone-4. Substrates essential to the synthesis of menaquinone-4 in cultured human cell lines. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有 18(9), 3116-3124, 2010.

⑦ Saito, N.; Suhara, Y.; Abe, D.; Kusudo, T.; Ohta, M.; Yasuda, K.; Sakaki, T.; Honzawa, S.; Fujishima, T.; Kittaka, A. Synthesis of 2 $\alpha$ -propoxy-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and comparison of its metabolism by human CYP24A1 and rat CYP24A1. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有 17(13), 4296-4301, 2009.

⑧ Suhara, Y.; Wada, A.; Okano, T. Elucidation of the mechanism producing menaquinone-4 in osteoblastic cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 査読有 19(4), 1054-1057, 2009.

⑨ Suhara, Y.; Abe, S.; Murakami, A.; Shimomura, Y.; Nakagawa, K.; Kamao, M.; Tsugawa, N.; Okano, T. Synthesis and development of biologically Active fluorescent-labeled vitamin K analogues and monitoring of their subcellular distribution. *Tetrahedron* 査読有 64, 8789-8796, 2008.

〔学会発表〕(計8件)

① 須原義智、渡辺雅人、的場瞳、手塚量太、古川南、伊藤陽一、中川公恵、和田昭盛、武田収功、高橋和彦、岡野登志夫、側鎖末端に官能基を有する新規ビタミン K 誘導体の合成と核内受容体 SXR を介した転写活性の検討、日本薬学会 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月 31 日

② 須原義智、渡辺雅人、元吉沙也加、中川公恵、和田昭盛、常盤広明、岡野登志夫、新規ビタミン K 誘導体の核内受容体 SXR を介した転写活性の検討、第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム (京都) 2010 年 11 月 17 日

③ 須原義智、武田収功、白木洋、高橋和彦、 $\beta$ -アミノ酸から構築する人工コラーゲンの創製、第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム—ライフサイエンスを志向した理論、反応および合成— (名古屋) 2010 年 11 月 1 日

④ 須原義智、渡辺雅人、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、核内受容体 SXR に作用する新規ビタミン K 誘導体の合成と活性評価、第 54 回日本薬学会支部大会 (東京) 2010 年 10 月 2 日

⑤ 須原義智、中川公恵、和田昭盛、武田収功、高橋和彦、岡野登志夫、化学的アプローチによるビタミン K の生理作用の解析と新規生理活性物質への応用、第 52 回天然有機化合物討論会 (静岡) 2010 年 9 月 29 日

⑥ 須原義智、渡辺雅人、中川公恵、和田昭盛、高橋和彦、岡野登志夫、新規ビタミン K

誘導体による核内受容体 SXR を介した転写活性の検討、日本ビタミン学会第 62 回大会 (盛岡) 2010 年 6 月 11 日

⑦ 須原義智、武田収功、白木洋、高橋和彦、再生医療を指向した  $\beta$ -アミノ酸から構築する人工コラーゲンの創製、日本薬学会第 130 年会 (岡山) 2010 年 3 月 28 日

⑧ 須原義智、和田昭盛、中村佳奈恵、渡辺雅人、岡野登志夫、メナキノン-4 への変換に関するビタミン K 誘導体の構造活性相関の検討、日本薬学会第 129 年会 (京都) 2009 年 3 月 26 日

〔図書〕(計1件)

① 森論史、江澤郁子、廣田孝子、鈴木隆雄、岡野登志夫、須原義智 他、骨の健康と栄養科学大事典、西村書店、242-251、2009.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.hamayaku.jp/teacher/te\\_65.html](http://www.hamayaku.jp/teacher/te_65.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須原 義智 (SUHARA YOSHITOMO)

横浜薬科大学・環境科学研究室・准教授

研究者番号：30297171