

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590147

研究課題名(和文)アルツハイマー病治療薬を指向したアミロイドベータ凝集・繊維化阻害剤の開発

研究課題名(英文)Development of amyloid beta aggregation inhibitor for therapeutics of Alzheimer disease

研究代表者

鈴木 英治 (SUZUKI, Hideharu)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：40187753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：A β の凝集を抑える化合物がADの予防、さらに凝集体を分解する化合物があれば治療薬になり得るというコンセプトに基づき研究した。このような化合物としてA β 認識構造に水溶性官能基を導入したものを合成し、凝集阻害活性を調べた。特に2,5-diarylbenzofuranのA環およびD環上にフェノール性水酸基を導入した誘導体は強い活性を示し、いったん線維化したA β を断片化、溶解する性質も有しAD治療薬として期待できることがわかった。水酸基数と凝集・繊維化阻害活性は明らかに相関し、Log P=4に近い化合物ほど活性が強かった。分子量、Log P値から血液・脳関門通過が期待できる化合物群を見出した。

研究成果の概要(英文)：We thought aggregation inhibitor of amyloid beta would be a prophylactic agent for Alzheimer diseases, furthermore disrupting compound for the aggregation, it would be a therapeutic medication. To inhibit Amyloid- β (A β) aggregation/fibril formation, we have found a concept that an A β -recognition compound attached to the hydrophilic moiety act as a strong A β -aggregation inhibitor. Many phenolic derivatives of 2, 5-diarylbenzofuran are synthesized according to our concept. Some poly-hydric phenol derivatives showed strong activities for A β aggregation and fibril formation inhibitory activity and dissociation activity for A β fibrils and aggregates. These activities are obviously related to the number of hydroxyl groups in the structures. Viewing from the Log P values of structures, the compounds having around Log P=4 values are showed the most strong activities. From the molecular weight and Log P values, these strong inhibitors would be expected to cross the BBB.

研究分野：医薬品化学

キーワード：アルツハイマー アミロイドベータ 凝集阻害剤 繊維化阻害剤 ベンゾフラン グルコサミン酸 多価フェノール 有機合成

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病 (AD) の根源的な治療薬はいまだ見出されていない。AD の根源的な治療薬開発の主流は、前駆体 (APP) からの Aβ 生成阻害 (β-, γ-セクレターゼ阻害剤開発) に向けられていたが、副作用等によりほとんどの化合物が開発中止になっている。

(2) さらにアミロイドカスケード仮説では、80 歳で AD 発症を仮定した時、Aβ の蓄積 (老人斑) は 50 歳からすでに始まっており、70 歳で τ タンパクの蓄積、認知障害をきたすとされ、神経細胞の消失、痴呆へと進行する。AD は長年変化と言う特徴を有し、治療的には痴呆発現段階では遅すぎることになると考えられる。

(3) 一方、Aβ モノマーに毒性はなく、凝集・線維化したもの、もしくはその途中段階であるオリゴマーが神経細胞毒性を示すとされている。

2. 研究の目的

Aβ の凝集/線維化は、主に疎水性相互作用並びに π-πstacking が関与していると考えられている。従って、Aβ と高い親和性を持つ構造に親水性基を導入すれば凝集/線維化阻害が可能であると考えられる。既に我々は凝集認識部位 KLVFF に各種親水性部位を結合した凝集阻害剤を合成し、最も強い凝集阻害活性を持つ KLVFF(EEX)₃ (E=Glu, X=aminoethoxy ethoxy acetic acid)を見出している (Okuno, H.; Suzuki, H. et. al. *Chemical Biology & Drug Design* **2007**, 69, 356-361.)。この Aβ に対する線維化阻害作用は TEM による観察と *in vitro* 培養細胞実験、さらに APP-Tg マウスに対する脳内アミロイド斑形成抑制作用から、その妥当性も立証している。

しかし KLVFF(EEX)₃ のような分子量 1800 以上のペプチド化合物では、血液脳関門の通過性、体内での安定性など実際の医薬品を指向した場合に多くの問題点があった。

そこで次のステップとして、同様の機能を持ちながら、実際に治療薬となりうるような低分子化合物を数グループに分けてデザインし、それらの合成研究を行うこととした。さらに、いったん凝集・線維化した Aβ に対するスクリーニングを実施し、将来の治療薬開発に繋がる、線維化した Aβ を断片化もしくは完全に溶解出来る化合物を見出すことも目的とした。

実際にこの性質を持った血液-脳関門を通過出来る化合物が出来れば、Aβ 凝集阻害剤によるアルツハイマー病治療薬という我々のコンセプト自体の評価、さらに生物学的ツールとして実際に Aβ 凝集体を溶解することにより、脳細胞および脳の機能が改善されるか等の治療薬につながる大変貴重な情報を得ることが出来、さらに実際の治療薬へのリード化合物となりうると思われる。

3. 研究の方法

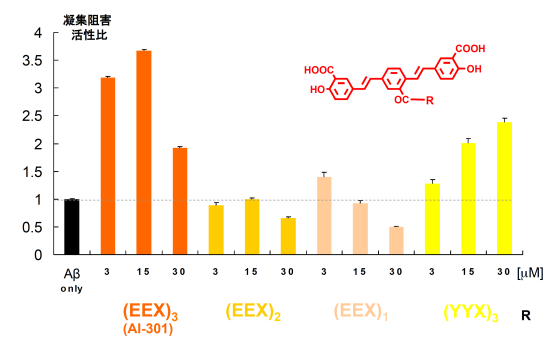
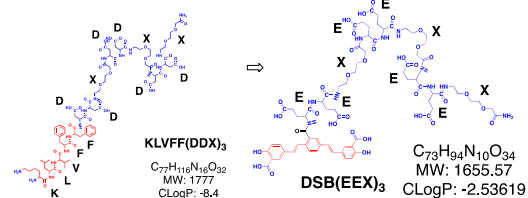
(1) 神経細胞毒を示す Aβ 凝集体は β シート構造を有するので、それを特異的に認識する distyrylbenzene (DSB) および 2-arylbenzofuran (BF) 各種誘導体を合成し、凝集阻害剤の分子認識部位として用いる。そこに静電的性質を備えた親水性部分と化学結合した新規 Aβ 凝集阻害剤候補化合物の合成を行う。凝集阻害活性部位は親水性と静電性バランスを考慮した一連の誘導体を用いる。親水性部位として生体毒性の恐れが少ないと予想されるアミノ酸類やポリフェノール、X (aminoethoxy ethoxy acetic acid) さらに血液脳関門を通過する糖誘導体を選択した。

(2) *in vivo* 評価のための条件としての、生体内での安定性および血液脳関門問題をクリアするための条件・方策等を考慮する (例えば、凝集阻害剤設計段階での log P 値を 2 から 4 程度にするなど)、合成化合物の Thioflavin T による Aβ 線維化/凝集阻害作用を測定した。

4. 研究成果

(1) DSB + (EEX)_n 誘導体¹¹⁾

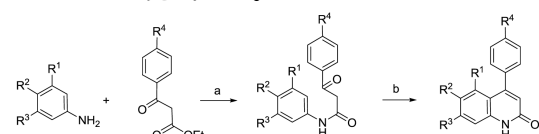
前述の KLVFF(EEX)₃ の Aβ 認識部位を非ペプチド性の DSB に変えた誘導体を合成、その Aβ 凝集阻害活性を IMR32 (ヒト神経芽細胞由来) に対する Aβ 毒性減弱作用で測定した。



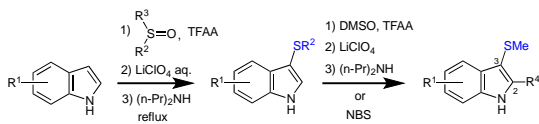
その結果、DSB(EEX)₃ は Aβ₁₋₄₀ の IMR32 に対する毒性減弱効果が非常に強いことが判明した。

(2) キノリノン誘導体⁹⁾

天然物の合成研究中に下記の 4-アリルキノリノン誘導体にも強い Aβ 凝集阻害作用があることを見出した。



(3) 各種チオインドール誘導体の合成研究⁷⁾



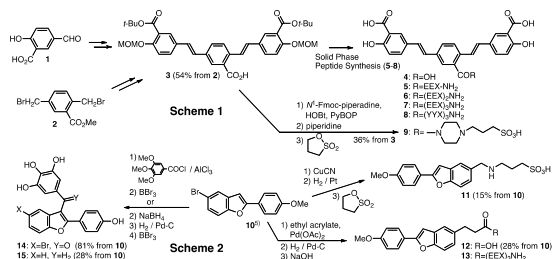
これらには強い Aβ 親和性が見られたが、Aβ 凝集阻害作用は特に強くなかった。

(4) 各種ヘテロ環誘導体の合成研究^{1,2,4-6,8,10)}

各種ヘテロ環の合成研究を行った。得られた化合物を試験したところ、多くのヘテロ環誘導体に Aβ 親和性があったが、Aβ 凝集阻害作用は強くなかった。得られた結果は凝集阻害剤の分子設計上、大いに参考になった。

(5) 分子認識部位の検討

Aβ 残基の一部である疎水性 KLVFF (Lys-Leu-Val-Phe-Phe) に親水基 EEX (Glu-Glu-X, X: NH₂((CH₂)₂O)₂CH₂COOH) を結合した KLVFF(EEX)₃ を合成し assay した結果、Aβ 線維形成阻害作用を示した。²⁾ さらに本構造を参考に、Aβ と高い親和性が報告されている 1,4-distyrylbenzene³⁾ を基本構造に変更し、数種親水基を導入した化合物 5-8 を合成した。その中で 7 は、Aβ 添加による IMR-32 殺細胞試験で細胞生存率が高く、APP-Tg マウスにおいて脳内アミロイド斑形成抑制作⁴⁾ を認めた。



7 の構造相関から、より親水性が高く、体内動態、例えば脳内移行性等を考慮しつつ、低分子で親水性を高めた化合物を合成することとし、まず 1,4-distyrylbenzene (DSB) 誘導体 3 のカルボン酸にピペラジン基を導入後、propane sulfone との分子内置換反応により γ-アミノスルホン酸誘導体 9 を合成した。(Scheme 1)

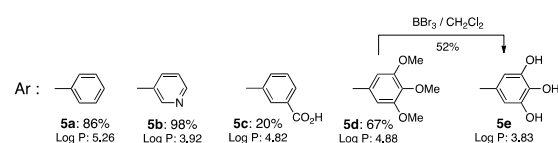
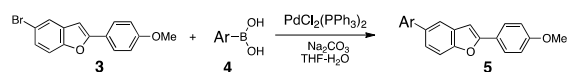
次に、Aβ と強い親和性が知られている 2-フェニルベンゾフラン⁵⁾ 骨格に γ-アミノスルホン酸を導入した 11 を合成した。また固相ペプチド合成法で親水性アミノ酸等を側鎖に導入可能な 12 を合成し、13 を得た。

一方、ポリフェノール類のアルツハイマー病への効果に着目し、アミロイドイメージング剤の母核として Aβ 凝集体との強い親和性が知られている 2-アリールベンゾフラン骨格の 3 位にトリヒドロキシベンゾイル基を導入した化合物 14, 15 も合成した。それらの中から最も強い活性を持つ化合物として、2-フェニルベンゾフランの多価フェノール誘導体 14, 15 を見出した。(Scheme 2)

(6) 2-フェニルベンゾフランの多価フェノール誘導体の構造最適化

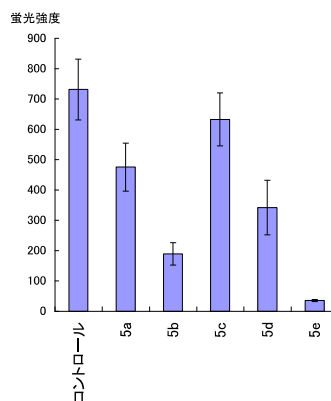
(5) の結果を踏まえ、脳内移行性等の体内動態を考慮した低分子で親水性の高い阻害剤の創製を目的とし、各種官能基を親水性部位として組み込んだ 2, 5-ジアリールベンゾフラン誘導体 5 を合成することとした。

3 への Suzuki カップリングにより、5 位へ各種アリール基を導入した化合物 5a-5e の合成に成功した。これらの Thioflavin T を用いた定量的な Aβ 凝集/繊維化阻害活性および Aβ 繊維溶解活性を調べた。

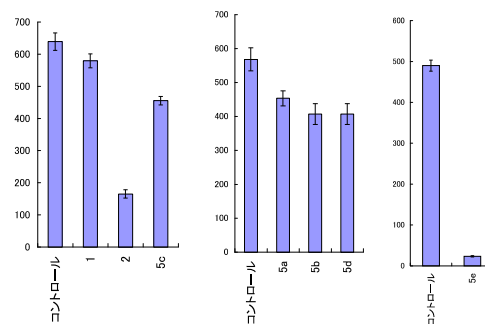


脂溶性の 5a, 5d およびカルボン酸 5c にはほぼ活性がなかったが、水溶性のピリジン誘導体 5b、トリヒドロキシフェニル体 5e には強い Aβ 凝集/繊維化阻害活性が見られた。次に強い Aβ 凝集/繊維化阻害活性を示す化合物 1, 2 および 5a-5e について、一旦生成した Aβ(1-40) 繊維に対する溶解作用をスクリーニングした。

Aβ 繊維化阻害作用 (Aβ₁₋₄₂)

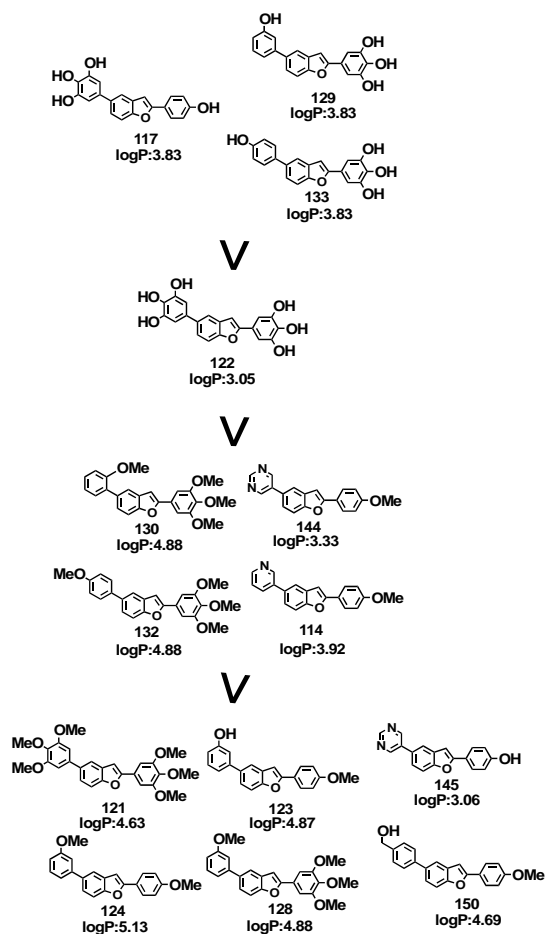


Aβ 繊維に対する溶解作用 (Aβ₁₋₄₀)



その結果 5e は我々が現在までに合成した化合物中で最も強い Aβ 繊維溶解作用を持つことが明らかになった。またこの繊維溶解過

程は、TEM で直接観察することにより証明出来た。我々のコンセプト (Aβ 認識部位 + 水溶性部位 = 凝集阻害剤) に従いながら大幅な低分子量化に成功し、非常に強い Aβ 凝集/繊維化阻害作用および Aβ 繊維溶解作用を持つ新規阻害剤 **5e** を見いだした。**5e** の Log P 値は 3.83 で、BBB を通過し脳内移行が期待できる。そこでこれらの誘導体を多数合成し、その活性と Log P の関係を調べた。下記に Aβ 凝集・繊維化阻害活性を示した化合物についての構造と活性の強さのランクを示す。



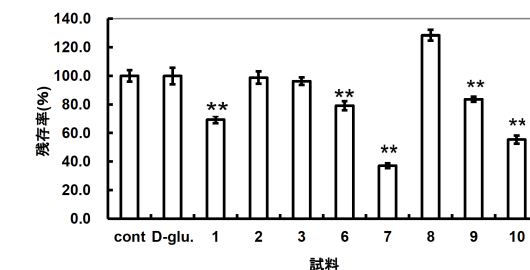
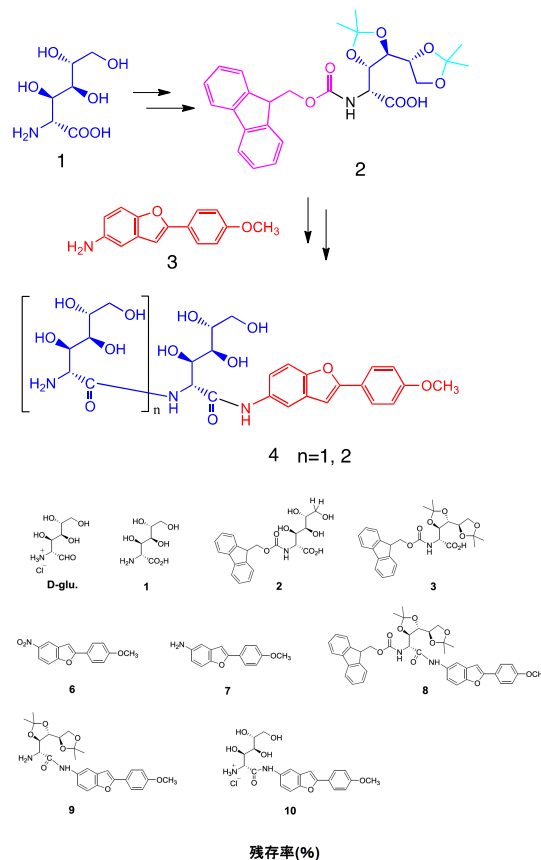
水酸基を持つ化合物の活性が強く、相当するメトキシ体は活性が弱かった。特に興味深いのは水酸基が 4 つの **117**、**129**、**133** は、水酸基が 6 つの **122** より強い活性を示した。したがって水酸基の数と凝集・線維化阻害活性には明らかな相関があるが、脂溶性と親水性のバランスが大切なことが明らかになった。

次にこれら化合物の Aβ 繊維溶解活性を測定したところ、凝集・線維化阻害活性との間にかなりの相関が見られたが、フェノール性水酸基を持たない誘導体にはほとんど溶解活性はないことが分かった。化合物の Log P 値に着目すると、Log P=4 に近い化合物ほど強い活性を示すことが分かった。**117**、**129**、**133** は分子量および Log P 値から血液 - 脳関門の通過も期待できる化合物であった。

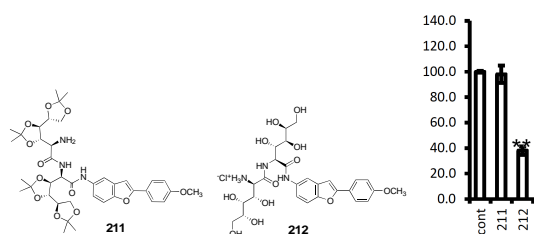
(7) 糖を水溶性ユニットとした誘導体：
2-フェニルベンゾフラン + グルコサミン酸

誘導体の合成と活性

次に 2-フェニルベンゾフランをアミロイド β の認識部位とし、そこに水溶性部位として糖誘導体を結合させた化合物を着想した。しかし、天然物等に見られる通常の糖誘導体 (配糖体) はアノメリック炭素上でのアセタール誘導体であり、酸の存在下で容易に切断されてしまう。そこで我々はより加水分解されにくい糖との結合様式としてアミド結合誘導体を考えた。D-Glucosamic acid **1** は D-glucosamine hydrochloride より誘導された糖誘導体であるが、同時にアミノ酸でもあるため、そのアミノ基およびカルボキシル基が、各々アミド結合で他の分子と結合することが可能である。しかし、分子中に 4 つの -OH 基および -NH₂ 基を含むため、アミド結合誘導体の合成に用いる際にはこれらの官能基の保護が必要となる。そこで我々はアミノ基を Fmoc (fluorenylmethyloxycarbonyl)、ヒドロキシ基を acetone などで保護した D-glucosamic acid 保護体 **2** を合成し、これを用いて、下図に示したようにアミロイド β 認識部位を持つ誘導体 **4** を合成した。



※D-Glu. : D-(+)-glucosamine hydrochloride



これら化合物の $\text{A}\beta$ 繊維溶解活性を測定したところ、凝集・線維化阻害活性との間にかなりの相関が見られた。すなわち保護体 **8**, **9**, **211** にはほとんど活性が無いのに対し、mono-Glucosamic acid 体 **10** は 70%、di-Glucosamic acid 体 **212** は約 40%の $\text{A}\beta$ 繊維の残存率を示し、糖鎖の長さに依存して活性が強まっていることが証明された。結果として D-Glucosamic acid も水溶性ユニットとして非常に有効であることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Benzoyl methyl phosphates as efficient reagents in the one-pot tandem approach for the synthesis of 2-phenylbenzimidazoles in water. Hikawa, Hidemasa; Imani, Maki; Suzuki, Hideharu; Yokoyama, Yuusaku; Azumaya, Isao, *RSC Advances* **2014**, 4(8), 3768-3773. DOI: 10.1039/C3RA46749J (査読有)

Au(III)/TPPMS-Catalyzed Benzoylation of Indoles with Benzylic Alcohols in Water. Hikawa, Hidemasa; Suzuki, Hideharu; Azumaya, Isao, *J. Org. Chem.* **2013**, 78(23), 12128-12135. DOI: 10.1021/jo402151g(査読有)

Synthesis of VIP-lipopeptide using a new linker to modify liposomes: towards the development of a drug delivery system for active targeting. Masaka, Toru; Matsuda, Takuya; Li, Yingpeng; Koide, Yuki; Takami, Akira; Yano, Kenji; Imai, Ryosuke; Ichihara, Risa; Yagi, Nobuhiro; Suzuki, Hideharu; Hikawa Hidemasa, Terada Katsuhide, Yokoyama Yuusaku., *Chem. Pharm. Bull.*, **2013**, 61(11), 1184-1187. https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/61/1/61_c13-00518/_article (査読有)

N-Benzoylation/Benzylic C-H Amidation Cascade by the (η^3 -Benzyl) palladium System in Aqueous Media: An Effective Pathway for the Direct Construction of 3-Phenyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides. Hidemasa Hikawa, Naoya Matsuda, Hideharu Suzuki, Yuusaku Yokoyama, Isao Azumaya, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 2308 - 2320. DOI: 10.1002/adsc.201300317 (査読有)

Chemoselective Benzoylation of Unprotected Anthranilic Acids with

Benzhydryl Alcohols by Water-Soluble Au(III)/TPPMS in Water. Hikawa, Hidemasa; Suzuki, Hideharu; Yokoyama, Yuusaku; Azumaya, Isao, *J. Org. Chem.*, **2013**, 78(13), 6714-6720. doi: 10.1021/jo401064f (査読有)

Mechanistic Studies for Synthesis of Bis(indolyl)methanes: Pd-Catalyzed C-H Activation of Indole-Carboxylic Acids with Benzyl Alcohols in Water. Hidemasa Hikawa, Hideharu Suzuki, Yuusaku Yokoyama and Isao Azumaya, *Catalysts* **2013**, 3(2), 486-500; DOI:10.3390/catal3020486 (査読有)

A Practical Regioselective Synthesis of Alkylthio- or Arylthioindoles without the Use of Smelly Compounds Such as Thiols. Hamashima, T.; Mori, Y.; Sawada, K.; Kasahara, Y.; Murayama, D.; Kamei, Y.; Okuno, H.; Yokoyama, Y.; Suzuki, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, 61(3), 292-303. https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/61/3/61_c12-00882/_article (査読有)

Synthesis and biological evaluation of novel tryptoline derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors. Tanaka, Minoru; Li, Xin; Hikawa, Hidemasa; Suzuki, Takafumi; Tsutsumi, Katsuhiko; Sato, Masashi; Takikawa, Osamu; Suzuki, Hideharu; Yokoyama, Yuusaku, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21(5), 1159-1165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.12.028> (査読有)

SYNTHESIS AND EVALUATION OF 4-ARYL-2(1H)-QUINOLINONES AS POTENT AMYLOID β FIBRILLOGENESIS INHIBITORS. Shimokawa, Y.; Nakakoshi, M.; Saito, S.; Suzuki, H.; Yokoyama, Y.; Ishigami, A.; Nishioka, H.; Tsubuki, M. *Heterocycles*, **2012**, 85(8), 1933-1940. DOI: 10.3987/COM-12-12506 (査読有)

Pd-Catalyzed Benzylic C-H Amidation with Benzyl Alcohols in Water: A Strategy To Construct Quinazolinones. Hidemasa Hikawa, Yukari Ino, Hideharu Suzuki, Yuusaku Yokoyama *J. Org. Chem.*, **2012**, 77 (16), 7046-7051. dx.doi.org/10.1021/jo301282n (査読有)

Development of a New Distyrylbenzene-Derivative Amyloid- β -aggregation and Fibril Formation Inhibitor. Suzuki, H.; Ishigami, A.; Orimoto, A.; Matsuyama, A.; Handa, S.; Maruyama, N.; Yokoyama, Y.; Okuno, H.; Nakakoshi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2012**, 60(9), 1164-1170. https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/60/9/60_c12-00365/_article (査読有)

〔学会発表〕(計 15 件)

紅藻ソゾノハナ由来の抗菌物質 MC 5~MC 8 の全合成と抗菌活性: 亀井勇統, 濱島利彦, 鈴木英治, 平成 27 年度日本水産学会春季大会 961 平成 27 年 3 月 30 日「東京海洋大学・品川キャンパス(東京都・品川区)」

水中での Au(III)TPPMS 触媒を用いたインドールのベンジル化反応: 氷川英正, 鈴木英治, 東屋功, 第 40 回反応と合成の進歩シンポジウム 1P-57 平成 26 年 11 月 10 日「東北大学川内萩ホール(宮城県・仙台市)」

新規 A β 凝集阻害剤の開発: 2-フェニルベンゾフランのホスホン酸誘導体: 町野有望, 丸山慧, 田中晴希, 中越雅道, 津吹政可, 氷川英正, 鈴木英治, 東屋功, 日本薬学会第 134 年会 29amS-041 平成 26 年 3 月 29 日「熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)」

アルツハイマー病治療薬を目的としたアミロイド β 凝集阻害剤の開発: D-Glucosamic acid を親水部位とするベンゾフラン誘導体の合成: 角田まりえ, 町野有望, 丸山慧, 田中晴希, 中越雅道, 津吹政可, 氷川英正, 鈴木英治, 東屋功, 日本薬学会第 134 年会 29amS-042 平成 26 年 3 月 29 日「熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)」

グリセリンの不斉アシル化反応: 内田有華, 深山翔太, 氷川英正, 鈴木英治, 横山祐作, 東屋功(東邦大薬) 日本薬学会第 134 年会 29pmM-229 平成 26 年 3 月 29 日「熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)」

水中での Pd 触媒を用いたアニリンのベンジル化: 泉京江, 井野友加里, 氷川英正, 鈴木英治, 横山祐作, 東屋功, 日本薬学会第 134 年会 29pmM-228 平成 26 年 3 月 29 日「熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)」

水中での π -ベンジル Pd を用いた N-ベンジル化/ベンジル位 C-H アミド化連続反応: 氷川英正, 松田直也, 鈴木英治, 横山祐作, 東屋功, 日本薬学会第 134 年会 29pmM-227 平成 26 年 3 月 29 日「熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)」

インドールを含む芳香族スルホンアミドの結晶構造中に見られる特徴的な分子間相互作用: 前埜伊沙恵, 片桐幸輔, 氷川英正, 鈴木英治, 横山祐作, 東屋功, 日本薬学会第 134 年会 29pmM-202 平成 26 年 3 月 29 日「熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)」

アントラセン骨格をもつポロン酸誘導体の結晶構造および蛍光特性: 佐藤ひかり, 枅飛雄真, 氷川英正, 鈴木英治, 東屋功, 日本薬学会第 134 年会 29pmM-200 平成 26 年 3 月 29 日「熊本市総合体育館(熊本県・熊本

市)」

フェニルアントラセン誘導体の蛍光特性に関する研究: 謝晨, 枅飛雄真, 氷川英正, 鈴木英治, 東屋功, 日本薬学会第 134 年会 29pmM-199 平成 26 年 3 月 29 日「熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)」

D-グルコサミンから Fmoc 固相ペプチド合成に適した D-グルコサミン酸保護体の合成: 丸山慧, 田中晴希, 小倉有季奈, 松山明弘, 氷川英正, 横山祐作, 鈴木英治, 日本薬学会第 133 年会 28amA-586 平成 25 年 3 月 28 日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

Echinosulfone A の全合成研究: 村山大介, 濱島利彦, 池上蘭, 森善昭, 氷川英正, 横山祐作, 鈴木英治, 日本薬学会第 133 年会 30pmA-482 平成 25 年 3 月 30 日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

水溶液中でのグリセリンと MBP の不斉アシル化反応の検討: 深山翔太, 氷川英正, 鈴木英治, 横山祐作, 日本薬学会第 133 年会 30amA-658 平成 25 年 3 月 30 日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

アミロイド β 凝集阻害・繊維溶解作用をもつジアリルベンゾフラン誘導体: 鈴木英治, 矢島聖也, 山口勇樹, 佐々木雄大, 中越雅道, 石神昭人, 津吹政可, 横山祐作, 第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集 2P-50 平成 24 年 11 月 29 日「タワーホール船堀(東京都・江戸川区)」

アルツハイマー病治療薬を目的としたアミロイドベータ凝集阻害剤の開発: 2, 5-ジアリールベンゾフランの多価フェノール誘導体: 鈴木英治, 矢島聖也, 中越雅道, 津吹政可, 石神昭人, 氷川英正, 横山祐作, 日本薬学会第 132 年会 31E09-pm10s 平成 24 年 3 月 31 日「北海道大学(北海道・札幌市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 英治 (SUZUKI, Hideharu)
帝京平成大学・薬学部・教授
研究者番号: 40187753

(2) 研究分担者

石神 昭人 (ISHIGAMI, Akihito)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長
研究者番号: 50270658