

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590156

研究課題名(和文) ギンコライドグルコースプロドラックの創製とその作用および体内動態の検証

研究課題名(英文) Synthesis of glycosylated derivatives of ginkgolides and in vivo evaluation of those pharmacokinetics

研究代表者

石井 英樹 (Ishii, Hideki)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：80425610

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)：イチョウ葉エキスのアルツハイマーや痴呆などへの効能はギンコライド類に起因すると言われているがギンコライド類の脂溶性が低いため細胞への取り込みが悪く、in vivoではそれほど高い活性が得られず、劇的な治療効果が発揮されず、評価が二分している。本研究ではギンコライド類の作用を引き出すため、グルコーストランスポーターを利用したギンコライド類のプロドラック化を目指し、ギンコライドにグルコースを適当なリンカーを介して結合させることで脳への取り込みが促進されることを期待し分子設計を行った。また設計したギンコライド誘導体の生体内動態は短寿命放射性核種で標識した誘導体を合成し評価することを計画した。

研究成果の概要(英文)：It is said that the effect to Alzheimer or dementia of the ginkgo biloba is caused by ginkgolides, but an evaluation halves that because of the low lipophilicity of ginkgolides, the dramatic curative effect were not observed in the most of cases. In order to overcome these problems, we planned the synthesis of glycosylated which might promote the uptake of ginkgolides to the brain through glucose transporter. In addition, we planned that the in vivo dynamics of the ginkgolide derivatives which we designed composed a short-life radionuclide-labeled derivative and evaluated it.

研究分野：有機化学

キーワード：天然物 プロドラック PET プローブ ギンコライド

1. 研究開始当初の背景

イチョウ葉エキスは、記憶力の減退や抗鬱、めまい、耳鳴、痴呆の治療に有効であり、ドイツをはじめ世界 55 カ国では EGb-761 の商標で医薬品として扱われているが、我が国では有効成分が立証できていないために健康食品として販売されている。ギンゴライド類は、このイチョウ葉エキス EGb-761 の主要含有成分であり、6 つの 5 員環が組み合わさったかご型構造骨格を有する。水酸基の置換位置および数が異なるギンゴライド A, B, C, J, M(順に, GA, GB, GC, GJ, GM)が発見されている(図 1)。GB および GC はイオンチャネルの制御因子であるグリシンおよび GABA 受容体のアンタゴニストであり、GB は脳、腎臓、肝臓に主に発現している血小板活性化因子受容体 (PAFR) に強く結合し、血小板凝集阻害作用を示すことが知られている。最近、ラット PIT モデル^注 を用いた *in vivo* 評価において、GB は脳梗塞の進行を顕著に抑えることがわかった。申請者は、このようなギンゴライドの脳神経細胞保護作用を明らかにするべく、GB を短寿命放射性核種 ¹⁸F でラベル化し(図 1)、この PET プローブをラットの尾静脈へ注射したところ、GB の脳内移行性はほとんど観測されず、ギンゴライドの脳機能改善作用と体内動態との間にディレンマに陥った。一方、反応性に富む 10 位水酸基をエーテル構造に変換すると、PAFR に対する結合活性が 10 倍増強され、また、この化合物を ¹¹C ラベル化し、生体内挙動を解析するとともに GB に比べて顕著な脳移行性が観測された。ところが、この GB 誘導体の脳梗塞の進行抑制効果は示されなかった。最近、新たにギンゴライドの脳神経細胞保護作用機構として、Mg²⁺ が介在するグルタミン酸誘導により Ca²⁺ 流入および神経細胞死が抑制されることが示された。

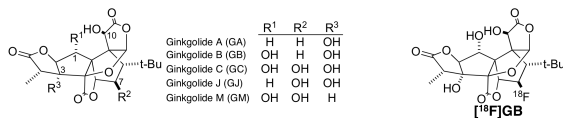


図 1. イチョウの葉エキスから抽出されるギンゴライド類の構造と ¹⁸F-ラベル化ギンゴライド。

2. 研究の目的

一般的に天然化合物は、グリコシド結合により化合物の特性および体内動態に影響を与えるとされている。とくに脳を標的とした場合には、血液と脳との間を隔てる血液脳関門(BBB)の透過性が問題になる。BBB には、脳のエネルギー源となるグルコースや必須アミノ酸などの輸送系や神経伝達物質代謝物の排出系のほか、生体内異物や内在性物質を排出する P 糖タンパク質な

どの多様な輸送および排出ポンプが存在する。このような薬物の通過制限を避けるように、(1)薬剤の脂溶性を高める、(2)輸送系の基質特異性を活用する、(3)脳毛細血管内皮細胞に発現するトランスフェリン受容体の抗体を用いることにより、脳内へ薬物輸送される。本研究では、脳内移行性基質(キャリアー分子)として D-グルコースを化学的に GB に修飾したプロドラッグの手法を取り入れることにした。ここでは、脳内へ移行したのち、糖代謝、加水分解反応を受けてプロドラッグから活性体が再生することを期待した(図 2)。ギンゴライドのグルコースプロドラッグを創製し、独自の高速化学反応に基づく PET プローブ化により脳内動態を解析して脳内移行性物質の探索を行う。合わせて、薬物の脳内移行性と病態の改善効果との因果関係を明らかにすることを目指した。



図 2. ギンゴライドの脳内輸送のためのプロドラッグの設計

3. 研究の方法

(1)グルコースプロドラッグモデルの脳内移行性の評価

(1-1)グルコースプロドラッグモデルの ¹¹C ラベル化用前駆体の合成

プロドラッグの連結結合(リンカー)の加水分解による薬剤の再生のされやすさを考慮して、グルコース 1 位のヘミアセタール水酸基、6 位の一級水酸基を利用して薬剤を結合することにした。また、グルコース 3 位水酸基に薬剤を導入しても糖代謝が阻害されないと予想されることから、3 位水酸基も候補に挙げた。ここで目的とするグルコース部位の脳内移行性機能の評価のために、グルコース分子内にある水酸基の一つを、薬剤にみまてた *p*-メチルベンジル基で代謝的に安定なエーテル結合により修飾した化合物をグルコースプロドラッグモデルとした(図 3)。

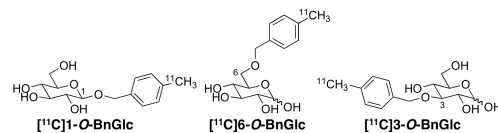


図 3. 脳内移行性を評価するための ¹¹C ラベルグルコースプロドラッグモデルの構造。

グルコースの 1 位、6 位、および 3

位水酸基への *p*-メチルベンジル置換体（コールド体）は以下の方法により合成される。

- 1 位置換体（1-*O*-BnGlc）の合成：グルコースのペンタアセテート保護体からソフトルイス酸を触媒にして *p*-メチルベンジルアルコールを導入し，脱保護反応で処理して 1-*O*-BnGlc が合成される。
- 6 位置換体（6-*O*-BnGlc）の合成：グルコースの 4 および 6 位水酸基を *p*-メチルベンジリデン化したのち，4 位選択的に還元して 6-*O*-BnGlc が合成される。
- 3 位置換体（3-*O*-BnGlc）の合成：1,2:5,6-*D*-*O*-イソプロピリデン- α -*D*-グルコフラノースを出発原料にして *p*-メチルベンジルアルコキシドを作用させ，脱保護反応により処理して 3-*O*-BnGlc が合成される。

¹¹C ラベル化用前駆体は，*p*-メチルベンジルアルコールの代わりに *p*-プロモベンジルアルコールを用い，同様な方法で各臭素化体を合成し，Pd(0)錯体を用いてトリプチルスズ基あるいはピナコールボロン基に置換して合成される。

(1-2) グルコース水酸基の保護および脱保護を組み合わせた高速 C-メチル化法による ¹¹C ラベル化と脳内移行性の評価 (1-1) で合成した標識前駆体を用いて，高速 C-メチル化反応および脱保護反応を組み合わせた標識合成を行う。すでに，コールド条件で効率的に反応が進行する合成法を確立している。グルコースプロドラッグモデルの脳内移行性の評価には，浜松ホトニクス（株）で開発された小動物を被験対象としたプランナーブジトロンイメージング装置を活用する。本装置は，少量の放射能（5-15 MBq）で解像度の良い画像が得られるという特徴があり，迅速な *in vivo* における薬剤の BBB 透過特性が評価できると同時に，薬剤の体内動態や分布および体内代謝の測定が可能である。

(2) ギンゴライドのグルコースプロドラッグの合成と機能評価

(2-1) ギンゴライドグルコースプロドラッグの合成

すでに確立されているギンゴライド種の単離方法にしたがい，市販のイチヨウの葉抽出エキスから各ギンゴライドを単離・精製する。ギンゴライド基本構造中の 10 位水酸基は反応性に富むことに着目して，グリコシド結合によりグルコースと連結させる。(1-2) のグルコースプロドラッグモデルの脳内移行性の評価に基づき，ギンゴライドを連結させる

グルコース水酸基の位置を選択する。3 あるいは 6 位水酸基が遊離のグルコースを調整し，そのアルコール活性体を塩基性条件下ギンゴライドに作用させ，脱保護反応を行うことによりギンゴライドのグルコースプロドラッグが合成される。

(2-2) グルコースプロドラッグの加水分解速度の測定とギンゴライドの再生の検証

ギンゴライドは低 UV 吸収性であるため，測定感度を高くするために蛍光標識グルコース 2-NBDG^{注2} を活用し，ギンゴライドの蛍光標識グルコースプロドラッグを別途合成する。ギンゴライドの蛍光標識グルコースプロドラッグを，(グルコース 3 あるいは 6 位水酸基置換体の場合は) リン酸緩衝液中，あるいは (グルコース 1 位ヘミアセタール水酸基置換体の場合は) β -ガラクトシターゼ酵素存在下，37 °C でインキュベーションし，安定性を測定する。

(2-3) ギンゴライドのグルコースプロドラッグの ¹⁸F ラベル化と体内動態解析

ギンゴライドは，強塩基性条件下では 7 位水酸基が選択的に反応する性質を利用して，グルコース水酸基を保護したギンゴライドのプロドラッグからトリフラート体標識前駆体を合成する^{文献4}。¹⁸F の求核的置換反応と脱保護反応との組み合わせにより，目的とする ¹⁸F ラベル体を合成する。得られた PET プローブを用いて，小動物用プランナーイメージング装置および中形サル用 PET 装置を用いて，*in vivo* における動態評価を行う。なお，動物 PET 実験は，理化学研究所の倫理運営規則にしたがう。

(2-4) ギンゴライドのグルコースプロドラッグの神経変性疾患実験用モデル動物による疾患改善効果の評価

ギンゴライド B およびそのフッ素化誘導体のグルコースプロドラッグの，脳梗塞 PIT モデルによる *in vivo* 活性評価を行う。生体内動態との整合性を考察する。

4. 研究成果

プロドラッグの連結結合（リンカー）の加水分解による薬剤の再生のされやすさを考慮して，グルコース 1 位のヘミアセタール水酸基，6 位の一級水酸基を利用して薬剤を結合することにした。また，グルコース 3 位水酸基に薬剤を導入しても糖代謝が阻害されないと予想されることから，3 位水酸基も候補に挙げた。ここで目的とするグルコース部位の脳内移行性機能の評価のために，グルコース分子内にある水酸基の一つを薬剤にみたとた *p*-メチルベンジル基で代謝的に

安定なエーテル結合により修飾した化合物をグルコースプロドラッグモデルとした。グルコースの1位, 6位, および3位水酸基へのp-メチルベンジル置換体(コールド体)は以下の方法により合成を試みた。

1位置換体(1-O-BnGlc)の合成: グルコースのペンタアセテート保護体からソフトルイス酸を触媒にしてp-メチルベンジルアルコールを導入し, 脱保護反応で処理して1-O-BnGlcが合成できた。6位置換体

(6-O-BnGlc)の合成: グルコースの4および6位水酸基をp-メチルベンジリデン3位置換体(3-O-BnGlc)の合成できた。:

1,2:5,6-D-O-イソプロピリデン-D-グルコフラノースを出発原料にしてp-メチルベンジルアルコキシドを作用させ, 脱保護反応により処理して3-O-BnGlcを合成した。

グルコース誘導体の合成に成功したので, 次に¹¹Cラベル化用前駆体を行った。前駆体の構造としてはp-メチルベンジルアルコールの代わりにp-プロモベンジルアルコールを用いて同様な方法で臭素化体を合成し, Pd(0)錯体を用いて臭素をピナコールボロン酸エステル基に置換した。

現在, 合成した前駆体を用いて¹²Cヨウ化メチルを用いた高速メチル化反応の検討を行っている。最適化条件が見つかり次第¹¹Cヨウ化メチルを用いた標識化を行い, 動物での動態を評価する予定である。

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 3件)

- 1) Hideki Ishii, Katsuyuki Minegishi, Koutaro Nagatsu, Ming-Rong Zhang, "Pd(0)-mediated [¹¹C]carbonylation of aryl and heteroaryl boronic acid pinacol esters with [¹¹C]carbon monoxide under ambient conditions and a facile process for the conversion of [carbonyl-¹¹C] esters to [carbonyl-¹¹C]amides", *Tetrahedron*, **2015**, *71*, 1588-1596.
- 2) Masaaki Suzuki, Misato Takashima-Hirano, Hideki Ishii, Chika Watanabe, Kengo Sumi, Hiroko Koyama, Hisashi Doi, "Synthesis of ¹¹C-labeled retinoic acid, [¹¹C]ATRA, via an alkenylboron precursor by Pd(0)-mediated rapid C-[¹¹C]methylation", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 3622-3625.
- 3) Misato Takashima-Hirano, Hideki Ishii, Masaaki Suzuki, "Synthesis of [¹¹C]Am80 via novel Pd(0)-mediated rapid [¹¹C]carbonylation using aryl-boronate and [¹¹C]carbon monoxide", *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 804-807.

[学会発表](計 5件)

- 1) Hideki Ishii, Hiroshi Mizuma, Hirotaka Onoe, Masaaki Suzuki, "Synthesis of 6-deoxy-10-[¹⁸F]-Ginkgolide B as a PET probe for *in vivo* study", 21st Winter Fluorine Conference, St. Pete Beach, Florida, USA, January 13-18, 2013.
- 2) Misato Takashima-Hirano, Hideki Ishii, Masaaki Suzuki "Efficient synthesis of [¹¹C]Am80, a PET probe for a retinoic acid receptor, via a novel rapid Pd⁰-mediated methoxy[¹¹C]carbonylation using boronic acid ester and [¹¹C]carbon monoxide in MeOH-DMF under atmospheric pressure", World Molecular Imaging Congress 2012, Dublin, Ireland, September 5 - 8, 2012.
- 3) Hideki Ishii, Emi Sekito, Hiroko Koyama, Kyoji Hagiwara, Tomoyuki Miura, Guangai Xue, Yoshie Hashimoto, Genta Kitahara, Yoko Aida, Masaaki Suzuki, "SAR studies of hematoxylin derivatives as a novel class of anti-HIV-1 agents and its photoaffinity studies using bis-azido functionalized probe", 13th Tetrahedron Symposium, Amsterdam, The Netherlands, June 26 - 29, 2012.
- 4) 萩原 恭二, 村上 知行, 石井 英樹, 竹嶋 伸之輔, 近藤 恭光, 本田 香織, 長田 裕之, 横田(恒次) 恭子, 鈴木 正昭, 間 陽子, 「アクセサリータンパク質 Vpr の核移行を標的にしたマクロファージに対する新規 HIV-1 阻害剤の最適化研究」, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 神奈川県(パシフィコ横浜), 2014年, 11月11日
- 5) 石井英樹, 高島好聖, 鈴木正昭, 「新規PETプローブ炭素11標識レチノイドの合成」第23回日本レチノイド研究会学術集会, 米子, 鳥取, 2012年10月19日

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 英樹 (Ishii Hideki)

国立研究開発法人 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・分子認識研究プログラム・主任研究員

研究者番号：80425610

(2) 研究分担者

古山 浩子 (Koyama Hiroko)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50402160