

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460153

研究課題名(和文) アミロイド を標的としたアルツハイマー病治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of amyloid beta C-terminal motifs conjugated with phenolic antioxidant

研究代表者

福原 潔 (Fukuhara, Kiyoshi)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：70189968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の予防・治療薬の開発を目的として、高い凝集能を有するアミロイド 1-42のC末端ペプチドモチーフ(A_{n-42})に抗酸化物質としてビタミンEまたはカフェ酸の芳香環部分(Tx、Ca)を付加させた化合物(TxA_{n-42}、CaA_{n-42})を設計・合成した。これらの化合物はA₁₋₄₂の凝集を強く抑制した。また、凝集によって引き起こされる酸化ストレスと神経細胞毒性を強く抑制した。これらの化合物は新しいアルツハイマー病の予防・治療薬のシーズとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aggregation pathway of β -amyloid (A_n) is a key target to prevent the onset of Alzheimer's diseases (AD). The aggregation of the 42-mer peptides (A₄₂) induces the oxidative stress which is related to neurotoxicity. We synthesized A₄₂ C-terminal motifs (A_{n-42}) conjugated to the antioxidant trolox (Tx) or caffeic acid (Ca). These compounds showed anti-aggregation activities toward A₄₂. The most potent inhibitory activity was found in Tx-A₃₆₋₄₂ and Ca-A₃₈₋₄₂. Protective effects against A₄₂ induced neurotoxicity was also shown by Tx-A₃₆₋₄₂ and CaA₃₈₋₄₂. These compounds demonstrated potent antioxidative activities toward A₄₂-induced intracellular ROS generation. Finally, conjugating C-terminal motif to Trolox and caffeic acid is proved to be crucial for the protective effects on A_n-induced neurotoxicity. TxA₃₆₋₄₂ and CaA₃₈₋₄₂ may be a starting point for the future development of drugs that prevent neurotoxicity and deposition of A_n in the brain of AD.

研究分野：創薬化学

キーワード：アルツハイマー病治療薬 アミロイド 抗酸化物質 トロロックス カフェ酸

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)患者の脳内に高発現しているアミロイドタンパク質(A₁₋₄₂)は、通常のタンパク質と比べて高い凝集能を示し、アミロイド繊維からなる老人斑を形成して大脳皮質に沈着する。このアミロイド繊維の生成過程で大量発生する活性酸素が神経細胞毒性や血管障害の原因となることが近年明らかとなっている。従って、A₁₋₄₂の凝集阻害とアミロイド繊維から発生する活性酸素を除去できればADの予防と治療が可能である。クルクミンなどのフェノール性天然抗酸化物質にA₁₋₄₂凝集阻害作用があることが報告された。我々はA₁₋₄₂の凝集を阻害し、さらにアミロイド繊維から発生する活性酸素を除去することができればアルツハイマー病の予防と治療が可能になると考え、A₁₋₄₂の凝集と神経細胞毒性を抑制する物質としてカテキンにプレニル基を有する化合物を開発した(特許出願 2011-183246号)。しかしながら、本化合物を含め、臨床で有効な作用を示す化合物は未だ開発されていない。

2. 研究の目的

A₁₋₄₂には、40のアミノ酸からなるペプチド(A₁₋₄₀)およびC末端にさらに二つのアミノ酸(Ileu-Ala)が増えた42のアミノ酸からなるペプチド(A₁₋₄₂)がある。A₁₋₄₂の方が凝集しやすく、神経細胞毒性も高い。本研究では、A₁₋₄₂からのアミロイド繊維の生成抑制作用と活性酸素除去作用によってADによる神経細胞毒性を抑制する化合物の開発を目的として、高い凝集能を有するA₁₋₄₂のC末端フラグメント(A_{n-42})に抗酸化物質を付加させた化合物の設計・合成を行い、神経細胞毒性に対する抑制作用を明らかにする。

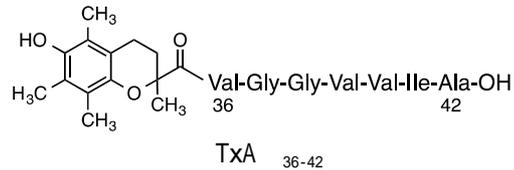
3. 研究の方法

- (1) 化合物の合成: A₁₋₄₂のC末端フラグメントとしては、凝集性と神経毒性が問題となっているA₁₋₄₂のC-末端フラグメントを用いた。フェノール性抗酸化物質の部分はトコフェロールの芳香環部分のTrolox(Tx)およびカフェ酸(Ca)を用いた。化合物の合成は、Fmoc法による固相合成を用いて、C末端のアミノ酸を有するFmoc-Ala-Wang樹脂から伸張していき、最後にフェノール性抗酸化物質を付加させた。樹脂からの切り出しを行った後、分取用HPLCで精製した。
- (2) A₁₋₄₂凝集阻害作用: チオフラビンT法を用いて、A₁₋₄₂の凝集反応に対する化合物の阻害効果を明らかにした。
- (3) 神経細胞毒性抑制作用: ヒト神経芽腫細胞SHSY-5YへのA₁₋₄₂の毒性に対する化合物の抑制作用を明らかにした。

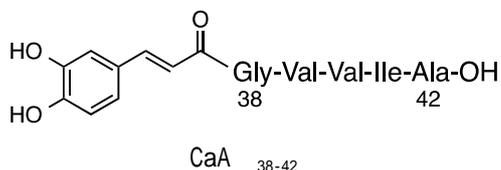
4. 研究成果

A₁₋₄₂の34番目、36番目、および38番目から42番目のアミノ酸からなるペプチドモチーフ(A₃₄₋₄₂, A₃₆₋₄₂, A₃₈₋₄₂)にTxを結

合させた化合物(TxA₃₄₋₄₂, TxA₃₆₋₄₂, TxA₃₈₋₄₂)を合成し、A₁₋₄₂の凝集に対する阻害効果を検討した。その結果、TxA₃₄₋₄₂, TxA₃₆₋₄₂はA₁₋₄₂の凝集を有意に抑制するのに対して、TxA₃₈₋₄₂の凝集抑制効果はほとんど見られなかった。一方、Txを結合させていないペプチドモチーフのみ(A₃₄₋₄₂, A₃₆₋₄₂)では凝集抑制効果がみられないことから、TxはA₁₋₄₂とのπ-相互作用および-CH相互作用によってペプチドモチーフの選択的な結合親和性を増強させていることが示唆された。神経細胞の培養系にA₁₋₄₂を添加すると毒性が現れて細胞増殖が大きく低下する。この系に事前にTxA₃₆₋₄₂を添加しておくことによりA₁₋₄₂による細胞毒性は大きく軽減された。A₁₋₄₂は凝集過程で活性酸素が大量に発生する。また、A₁₋₄₂の凝集で生成するアミロイド繊維はミトコンドリア障害によるアポトーシスを誘導するがその過程で酸化ストレスの関与が明らかとなっている。そこで、細胞内での活性酸素の生成を確認したところ、A₁₋₄₂で処理した神経細胞は細胞内で活性酸素が大量に発生するが、TxA₃₆₋₄₂を添加すると発生する活性酸素の量は大きく低下した。以上、TxA₃₆₋₄₂はA₁₋₄₂の凝集を阻害することで細胞内の活性酸素を除去して神経細胞毒性を抑制することが明らかとなった。



A₁₋₄₂のC末端ペプチドモチーフと抗酸化物質との共役化合物がA₁₋₄₂に由来する毒性の予防に有効なことから、次に我々は抗酸化物質をビタミンEのフェノール部分から他の化合物に変えた様々な誘導体を合成し、そのA₁₋₄₂凝集抑制作用と細胞毒性の抑制作用について検討を行った。その結果、コーヒーに含まれるポリフェノールの一種であるカフェ酸(Ca)をC末端ペプチドモチーフに共役した化合物が強力なA₁₋₄₂凝集阻害作用と神経細胞毒性抑制作用を示すことを明らかにした。Caの芳香環部分のカテコール構造はカテキンなどのフラボノイドに共通する抗酸化作用に特徴的な構造であり、近年、A₁₋₄₂の凝集に対して阻害作用を示すことが報告されている。実際、CaはA₁₋₄₂の凝集を有意に抑制するが、A₁₋₄₂の38番目から42番目のアミノ酸からなるペプチドモチーフ(A₃₈₋₄₂)をCaに結合させた化合物(CaA₃₈₋₄₂)はさらに強力な凝集抑制作用を示した。A₁₋₄₂による神経細胞毒性に対しても、CaA₃₈₋₄₂はCaによりも低濃度で強力に細胞毒性を抑制し、また、細胞内で発生する酸化ストレスをほぼ完全に抑制した。



以上、A₁₋₄₂のC末端ペプチドモチーフとフェノール性抗酸化物質との共役化合物は、Aの凝集阻害作用と神経細胞内の酸化ストレス抑制作用によってアルツハイマー病における神経細胞毒性を強力に抑制することを明らかにした。これらの化合物をリードとした新しいアルツハイマー病の予防・治療薬への発展が期待される。

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 8 件)

1. M. Mizuno, I. Nakanishi, K. Matsumoto, K. Fukuhara, Enhanced radical scavenging activity of a procyanidin B3 analogue comprised of a dimer of planar catechin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有, 27, 5010-5013 (2017), DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.10.007
2. H. Kumamoto, M. Fukano, S. Imoto, S. Kohgo, Y. Odanaka, M. Amano, N. Kuwata-Higashi, H. Mitsuya, K. Haraguchi, K. Fukuhara, A novel entecavir analogue constructing with a spiro[2,4]heptane core structure in the ablycon moiety: its synthesis and evaluation for antihepatitis B virus activity, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acid*, 査読有, 36, 463-473 (2017) DOI: 10.1080/15257770.2017.1322209
3. K. Fukuhara, A. Ohno, R. Hanajiri, A metabolic study on the biochemical effects of chiral illegal drugs in rats using 1H-NMR spectroscopy, *Yakugaku Zasshi*, 査読有, 137, 1147-1154 (2017) DOI: 10.1248/yakushi.17-00046.
4. K. Imai, I. Nakanishi, K. Ohkuho, Y. Ohba, T. Ara, M. Mizuno, S. Fukuzumi, K. Matsumoto, K. Fukuhara, Synthesis of methylated quercetin analogues for enhancement of radical-scavenging activity, *RSC Adv.* 査読有, 7, 17968-17979 (2017) DOI: 10.1039/C7RA02329D
5. M. Mizuno, I. Nakanishi, S. Matsubayashi, K. Imai, T. Arai, K. Matsumoto, K. Fukuhara, Synthesis and antioxidant activity of a procyanidin B3 analogue, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有, 27, 1041-1044 (2017) DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.12.067
6. T. Arai, A. Ohno, K. Mori, H. Kuwata, M. Mizuno, K. Imai, S. Hara, M. Shibamura, M. Kurihara, N. Miyata, H. Nakagawa, K. Fukuhara, Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by caffeic acid-conjugated amyloid- β C-terminal peptides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有, 26, 5468-5471 (2016) DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.10.027
7. T. Arai, A. Ohno, K. Mori, T. Kakizawa, H. Kuwata, T. Ozawa, M. Shibamura, S. Hara, S. Ishida, M. Kurihara, N. Miyata, H. Nakagawa, K. Fukuhara, Design, synthesis and evaluation of Trolox-conjugated amyloid- β C-terminal peptides for therapeutic intervention in an in vitro model of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.* 査読有, 24, 4138-4143 (2016) DOI: 10.1016/j.bmc.2016.06.057
8. I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, M. Kamibayashi, Y. Yoshihashi, K. Matsumoto, K. Fukuhara, K. Terada, S. Itoh, T. Ozawa, S. Fukuzumi, Solubilisation of a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in water by β -cyclodextrin to evaluate the radical scavenging activity of antioxidants in aqueous media, *Chem. Comm.* 査読有, 51, 8311-8314 (2015) DOI: 10.1039/c5cc02236c

[学会発表](計 16 件)

1. 水野美麗, 阿部眞優奈, 生澤瑞希, 福原 潔, カテキンのプロオキシダント効果: キノン代謝を経由する活性酸素毒性の解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 名古屋(2018, 3)
2. 水野美麗, 森 一憲, 中西郁夫, 松本謙一郎, 柴沼質子, 福原 潔, アミロイドによる神経細胞毒性を抑制するプロアントシアニジン誘導体の開発, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 名古屋(2018, 3)
3. 大野彰子, 山田隆志, 能美健彦, 福原 潔, 広瀬明彦, *In silico* を用いたニトロアレールの変異原性評価: ニトロ基の還元特性と立体構造, 日本環境変異学会第 46 回大会, 東京(2017, 11)
4. 水野美麗, 森 一憲, 中西郁夫, 松本謙一郎, 柴沼質子, 福原 潔, アミロイド凝集阻害作用を有するプロアントシアニジン誘導体の創製, 第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 名古屋 (2017, 11)
5. 水野美麗, 森 一憲, 中西郁夫, 松本謙一郎, 柴沼質子, 福原 潔, アミロイドによる神経細胞毒性を抑制するプロアントシアニジン誘導体の開発, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都(2017, 3)
6. 福原 潔, 荒井卓也, 大野彰子, 森 一憲, 柴沼質子, 宮田直樹, 中川秀彦, アルツハイマー病治療薬を目指したアミロイドのC末端ペプチドモチーフを有す

- るフェノール性抗酸化剤の開発, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都(2017, 3)
7. 水野美麗, 中西郁夫, 森 一憲, 柴沼質子, 松本謙一郎, 福原 潔, アルツハイマー病治療薬を目指したプロアントシアニジン誘導体の開発, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, つくば (2016, 11)
 8. 荒井卓也, 大野彰子, 栗原正明, 宮田直樹, 中川秀彦, 福原 潔, アミロイドの C 末端モチーフを有する新規アルツハイマー病治療薬の開発, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, つくば (2016, 11)
 9. 水野美麗, 川村綾乃, 中西郁夫, 松本謙一郎, 福原 潔, 動脈硬化治療薬を目指したプロアントシアニジン誘導体の開発, 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 仙台(2016, 8)
 10. 荒井卓也, 大野彰子, 森 一憲, 柿澤多恵子, 石田誠一, 桑田 浩, 小澤俊彦, 原俊太郎, 柴沼質子, 栗原正明, 宮田直樹, 中川秀彦, 福原 潔, A の C 末端モチーフを含有したトロロックス誘導体による A の細胞毒性および酸化ストレスの制御, 日本薬学会第 136 年会, 横浜 (2016, 3)
 11. 今井耕平, 中西郁夫, 松林智子, 小田中友紀, 松本謙一郎, 福原 潔, 放射線がん治療に有用な新規ケルセチン誘導体の合成, 日本薬学会第 136 年会, 横浜 (2016, 3)
 12. 水野美麗, 川村綾乃, 大石菜摘, 根本徳子, 小森公陽, 中西郁夫, 松本謙一郎, 福原 潔, 動脈硬化治療薬を目指したプロアントシアニジン誘導体の開発, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 千葉(2015, 11)
 13. 水野美麗, 小森公陽, 根本徳子, 大石菜摘, 中西郁夫, 松本 謙一郎, 福原 潔, LOX-1 結合阻害作用を有するプロアントシアニジン誘導体の開発, 第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会, 鹿児島(2015, 6)
 14. 荒井卓也, 大野彰子, 須賀真里奈, 栗原正明, 小澤俊彦, 宮田直樹, 中川秀彦, 福原 潔, 新規アルツハイマー病治療薬の開発を目指した A β ₁₋₄₂ の C 末端モチーフ含有ジヒドロカフェ酸誘導体の合成, 第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会, 鹿児島(2015, 6)
 15. 水野美麗, 小森公陽, 根本徳子, 中西郁夫, 松林智子, 小田中友紀, 松本謙一郎, 福原 潔, LOX-1 を創薬標的としたプロアントシアニジン誘導体の開発, 日本薬学会第 135 年会, 神戸(2015, 3)
 16. 今井耕平, 中西郁夫, 大場友祐, 松林智子, 小田中友紀, 松本謙一郎, 福原 潔, ラジカル消去活性増強を目的とした C-メチルケルセチン誘導体の合成, 日本薬学

会第 135 年会, 神戸(2015,3)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

1. 名称: 新規スチルベン誘導体
 発明者: 福原 潔, 熊本浩樹, 樋口明弘, 坪田一男
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特許願 2014-174387
 出願年月日: 平成 24 年 8 月 28 日
 国内外の別: 国内
2. 名称: 新規スチルベン誘導体を有効成分とする角結膜疾患又は老視の予防及び/又は治療剤
 発明者: 樋口明弘, 坪田一男, 福原 潔
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特許願 2014-174332
 出願年月日: 平成 24 年 8 月 28 日
 国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福原 潔 (FUKUHARA, Kiyoshi)
 昭和大学・薬学部・教授
 研究者番号: 7 0 1 8 9 9 6 8

(2) 連携研究者

大野 彰子 (OHNO Akiko)
 国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部・主任研究官
 研究者番号: 7 0 3 5 6 2 3 6