

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670058

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の治癒をめざした化合物の設計と合成

研究課題名(英文) Design and synthesis of a compound targeting amyloid beta aiming at the cure of Alzheimer's disease

研究代表者

大塚 雅巳 (Otsuka, Masami)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬学系)・教授

研究者番号：40126008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳内でアミロイド (A $\beta$ ) が凝集しアルツハイマー病を発症させるというアミロイド仮説にもとづき、アルツハイマー病の治癒をめざした化合物の設計と合成を行うことが本研究の目的である。シナプスの末端から放出される亜鉛によりA $\beta$  の凝集が促進されることが知られている。またscyllo-イノシトールはA $\beta$  の凝集を阻害することが知られている。従って、亜鉛を捕捉除去する化合物とscyllo-イノシトールを併用するとA $\beta$  の凝集が抑制されると期待される。本研究では研究代表者らが開発した亜鉛キレーターをscyllo-イノシトールにリンカーを介して連結した化合物の合成研究を行った。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study is to design and synthesis of a compound aiming at the cure of Alzheimer's disease based on the amyloid hypothesis that the aggregation of amyloid beta (Ab) in the brain is the main cause of Alzheimer's disease. It is known that zinc released from synaptic termini accelerate the aggregation of Ab. It is also known that scyllo-inositol inhibit the Ab aggregation. Therefore, combination of zinc-binding compound and scyllo-inositol would suppress the Ab aggregation. The present study aimed at the synthesis of an artificial compound comprising zinc chelator and scyllo-inositol.

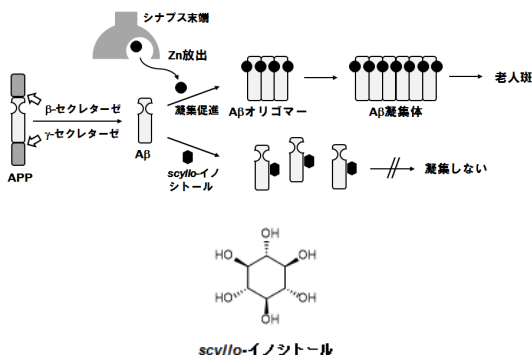
研究分野：医薬品化学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 亜鉛キレーター scyllo-イノシトール

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は認知機能が次第に低下していく神経変性疾患である。アルツハイマー病患者ではアセチルコリンの活性が低下するというコリン仮説にもとづき、画期的なアセチルコリンエステラーゼ阻害剤ドネペジルが開発されている。しかしドネペジルは認知機能を改善する対症療法薬として成功したもので、アルツハイマー病が治癒するわけではない。本研究はアミロイド仮説にもとづき、アルツハイマー病の治癒をめざした化合物の設計と合成に関する研究を行う。

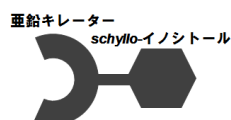
アミロイド仮説は脳内でアミロイドβ(Aβ)が凝集しアルツハイマー病を発症させるというものである。Aβは40~42のアミノ酸からなるペプチドで、前駆物質APP(amyloid-β protein precursor)がβおよびγセクレターゼにより切断されて作られる。このAβは分子間で平行βシートを形成することによって凝集するが、ニューロンの近傍でシナプスの末端から放出される亜鉛によりAβの凝集が促進されることが知られている(S. L. Sensi et al., Nature Review Neurosci., 10, 780, 2009)。一方、Aβの凝集を阻害する物質が探索され、scyllo-イノシトールが見出された。scyllo-イノシトールはAβの16番目から22番目のβシート形成領域に結合し、Aβの凝集を阻害することが報告されている(G. Li et al., J. Phys. Chem B, 113, 6603, 2013)。



研究代表者らはAβの凝集を亜鉛が促進し、scyllo-イノシトールが阻害することに着目し、Aβの凝集を阻害する新規化合物の設計と合成を考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では亜鉛キレーターとscyllo-イノシトールを連結した化合物を合成し、Aβの凝集阻害を検討する。本化合物はイノシトール部位でAβのβシートに結合する一方、亜鉛キレーター部位で亜鉛をトラップし、Aβの凝集を解離する機能が期待される。



アルツハイマー病治療戦略として亜鉛除去とscyllo-イノシトールの両面からのアプ

ローチはこれまでになく、両者の組み合わせた研究は本研究が初めてである。本研究により、アミロイド仮説に基づきアルツハイマー病を治癒させる医薬への基礎が得られると期待される。

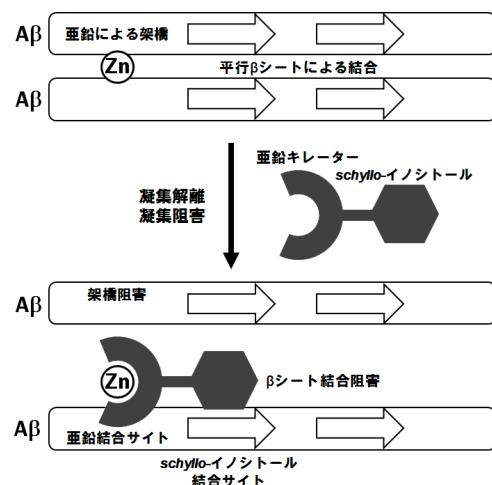
アミロイド仮説でアルツハイマー病の原因とされるAβの凝集はLys16からGlu22の領域を含む幾つかの領域で分子間平行βシートを形成することによって引き起こされる。scyllo-イノシトールはLys16からGlu22の領域に結合し分子間平行βシートの形成を妨げることによってAβの凝集を阻害する。一方、シナプス末端から放出された亜鉛はAβ分子間のAsp1、His6、His13、His14の残基を架橋することによって凝集を促進する。



ここで重要なことは、亜鉛結合部位とscyllo-イノシトール結合部位は隣接しているということである。これまでは、亜鉛によるAβ凝集促進とscyllo-イノシトールによる凝集阻害は、別個の現象としてそれぞれ独立に研究されてきた。この両者をリンクさせてAβの凝集阻害の戦略を構築するところが本研究の斬新な点である。



本研究では亜鉛キレーター部位とscyllo-イノシトールを連結した化合物を合成する。本化合物は下図のように(1)scyllo-イノシトール部位でLys16-Glu22の領域に結合して分子間平行βシートの形成を妨げると同時に、(2)キレーター部位を隣接の亜鉛部位の近傍に運び、隣接するAβ間を架橋する亜鉛を取り除く。これによりAβの凝集を解除、阻害することが期待される。

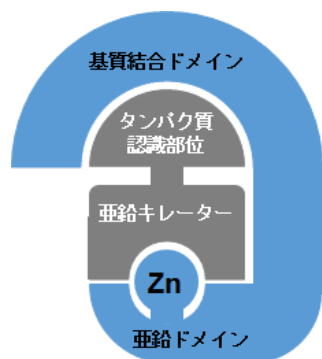


以上のように、*scyllo*-イノシトールによる凝集阻害と、凝集促進作用をもつ亜鉛の除去という2つの作用を同時に起こそうとする点が、本研究の斬新性である。研究代表者らは、過去10年間の研究で、亜鉛キレーターと親和性部位の連結というアプローチで種々の亜鉛蛋白質の機能阻害に成功しており、本研究はチャレンジ性が高いが、それを乗り越えるに足る知見と方法論の蓄積を持っている。

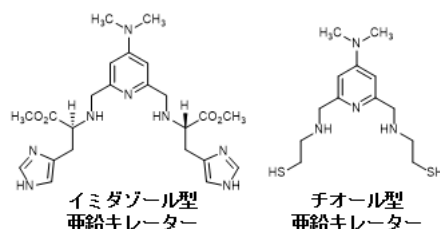
現在アルツハイマー病の治療に用いられている薬物は、コリンエステラーゼ阻害薬（ドネペジル、ガランタミン、リバスチグミン）とMNDA阻害薬（メマンチン）で、どちらも神経伝達を改善し、認知症の症状を軽減させ進行を遅らせる対症療法薬である。本研究が成功すれば、アルツハイマー病の原因である $\beta$ の凝集を妨げることができ、根治療法の基礎につながるものである。これまでのアルツハイマー病治療薬はコリン仮説に基づいたものであるのに対して、本研究はアミロイド仮説に基づいて展開するもので、新しい原理の発展をめざしている。よって、卓越した効果が期待できると考える。

### 3. 研究の方法

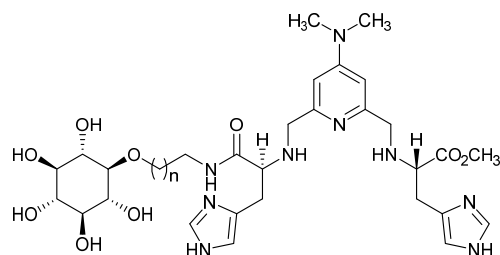
研究代表者らはこれまで、ピリジン環に金属キレート性側鎖を導入した人工キレーターの亜鉛蛋白質阻害剤としての有用性を明らかにしてきた。人工キレーターにナフチル基を導入した化合物が亜鉛酵素ファルネシルトランスフェラーゼを阻害し、Ras発現がん細胞に対して強い抗がん活性を示すことを見出した (Bioorg. Med. Chem. Lett., 13, 1523, 2003.)。これは下図のように、キレーター部位が亜鉛に結合する一方、ナフチル基が蛋白質の基質結合ドメインを特異的に認識したためと考えられる。この研究はさらに、第二世代のファルネシルトランスフェラーゼ阻害化合物、ADAMファミリーメタロプロテアーゼ阻害などに展開し、亜鉛キレーターと蛋白質認識部位の組み合わせによる亜鉛蛋白質阻害剤の分子設計の汎用性を実証してきた。



研究代表者がこれまでに開発した亜鉛キレーターはイミダゾール型とチオール型の2種類に大別される (J. Med. Chem., 38, 3264, 1995; J. Med. Chem., 39, 503, 1996; Bioorg. Med. Chem., 5, 205, 1997.)。

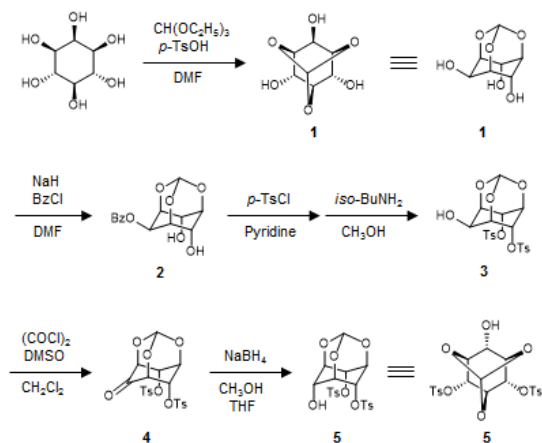
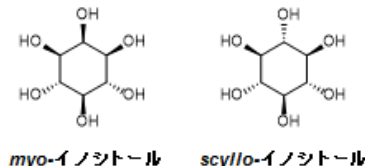


本研究では、イミダゾール型キレーターに *scyllo*-イノシトールを結合させた化合物を合成する。



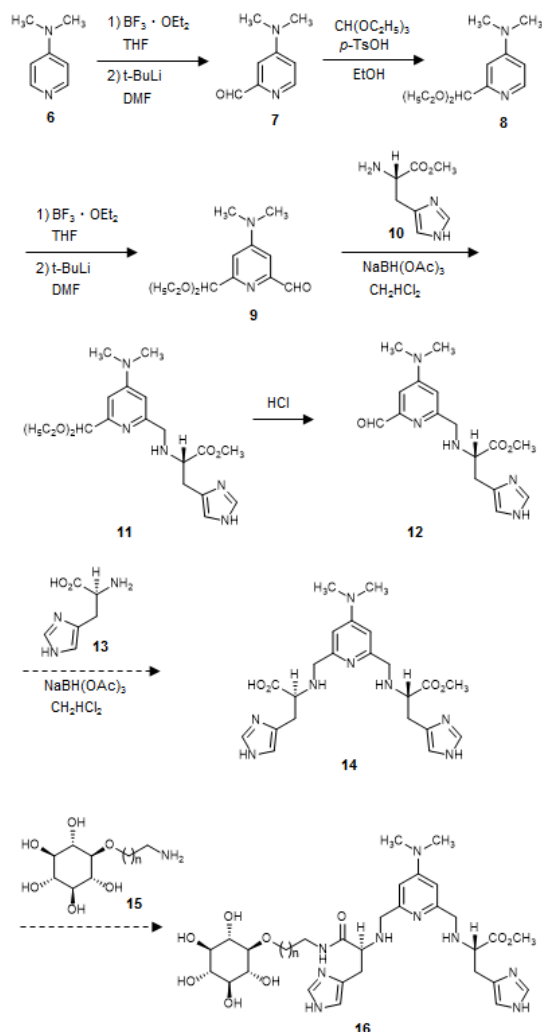
### 4. 研究成果

はじめに *scyllo*-イノシトール部分の合成を検討した。イノシトールには9つの立体異性体が存在するが、*scyllo*-イノシトールは最も入手容易な *myo*-イノシトールの2位の立体化学が異なる異性体である。そこで本研究では *myo*-イノシトールの2位の立体化学を反転させることにより *scyllo*-イノシトールとした。



すなわち、*myo*-イノシトールをオルトギ酸トリエチルと反応させ、1、3、5位のヒドロキシル基をオルトエステルとした化合物1を94%の収率で得た。次いで2位のヒドロキシル基をベンゾイル基で保護した化合物2を24%の収率で得た。化合物2の2つの遊離のヒドロキシル基をトシル基にて保護、2位のベンゾイル基を除去した化合物3を37%の収

率で得た。化合物 **3** のヒドロキシル基を酸化して 69% の収率で得られるケトン **4** を還元して 2 位の立体化学を反転させ、*scyllo*-イノシトール誘導体 **5** を 85% の収率で得た。



亜鉛キレーター部位の合成は以下のように行った。4-ジメチルアミノピリジン **6** にホルミル基を導入し、さらにアセタール化を行い化合物 **8** を 84% の収率で得た。これに更にホルミル基を導入してアルデヒド **9** を 61% の収率で得た。このアルデヒドにヒスチジンメチルエステル **10** を還元的アミノ化により導入し、化合物 **11** を 62% の収率で得た。これを酸で加水分解してアルデヒド **12** を得た。これに 2 つ目のヒスチジン **13** を導入し、対称的構造をもつ亜鉛キレーター **14** とする。さきに合成した *scyllo*-イノシトール誘導体 **5** にリンカーを連結して得られる化合物 **15** を化合物 **14** に連結することにより、目的とする化合物 **16** を得る。

## 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 7 件)

Masahiro Kamo, Hiroshi Tateishi, Ryoko Koga, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka,

Mikako Fujita "Synthesis of the biotinylated anti-HIV compound BMMP and the target identification study" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 26, 43-45, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.036>

Muhammed Karabacak, Mehlika Dilek Altıntop, Halil İbrahim Ciftçi, Ryoko Koga, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Ahmet Özdemir "Synthesis and Evaluation of New Pyrazoline Derivatives as Potential Anticancer Agents" *Molecules*, 査読有, 20, 19066-19084, 2015; DOI:10.3390/molecules201019066.

Taha F. S. Ali, Kana Iwamaru, Halil Ibrahim Ciftci, Ryoko Koga, Masahiro Matsumoto, Yasunori Oba, Hiromasa Kurosaki, Mikako Fujita, Yoshinari Okamoto, Kazuo Umezawa, Mitsuyoshi Nakao, Takuichiro Hide, Keishi Makino, Jun-ichi Kuratsu, Mohamed Abdel-Aziz, Gamal El-Din A. A. Abu-Rahma, Eman A. M. Beshr, Masami Otsuka "Novel metal chelating molecules with anticancer activity. Striking effect of the imidazole substitution of the histidine-pyridine-histidine system." *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 23, 5476-5482, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.044>

Satomi Ida, Kana Iwamaru, Mikako Fujita, Yoshinari Okamoto, Yuri Kudo; Hiromasa Kurosaki, Masami Otsuka "L-Histidyl-glycyl-glycyl-L-histidine. Amino-acid structuring of the bleomycin-type pentadentate metal-binding environment capable of efficient double-strand cleavage of plasmid DNA" *Bioorg. Chem.*, 査読有, 62, 8-14, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.06.007>

Halil Ibrahim Ciftci, Haruna Fujino, Ryoko Koga, Minami Yamamoto, Sogo Kawamura, Hiroshi Tateishi, Yasumasa Iwatani, Masami Otsuka, Mikako Fujita "Mutational analysis of HIV-2Vpx shows that proline residue 109 in the poly-proline motif regulates degradation of SAMHD1" *FEBS Letters*, 査読有, 589 (13), 1505-1514, 4 June 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet2>

015.04.038

Hiroshi Tateishi, Kensaku Anraku, Ryoko Koga, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka "Design and synthesis of lipid-coupled inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate derivatives exhibiting high-affinity binding for HIV-1 MA domain." *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有, 12(27), 5006-5022, 2014. DOI: 10.1039/C4OB00350K

Ariko Miyake, Mikako Fujita, Haruna Fujino, Ryoko Koga, Sogo Kawamura, Masami Otsuka, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Yosuke Sakai, Naoya Doi, Masako Nomaguchi, Akio Adachi, and Yasuyuki Miyazaki "Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation" *Journal of General Virology*, 査読有, 195: 179-189, 2014. DOI:10.1099/vir.0.057364-0

〔学会発表〕(計8件)

立石大、門出和精、村尾直樹、古賀涼子、林祐也、東大志、本山敬一、有馬英俊、安楽健作、藤田美歌子、大塚雅巳 Gag蛋白質を標的とした細胞死誘導型新規抗 HIV 薬の開発研究 日本薬学会第 136 年会 (パシフィコ横浜) 2016.03.29.

Mohamed Radwan, Ryoko Koga, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka Synthesis and applications of biotinylated zinc binding SN1 日本薬学会第 136 年会 (パシフィコ横浜) 2016.03.28.

立石大、門出和精、村尾直樹、古賀涼子、林祐也、東大志、本山敬一、有馬英俊、安楽健作、藤田美歌子、大塚雅巳 Pr55Gag 蛋白質を標的とした新規抗 HIV 剤の開発研究 第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム (幕張国際研修センター) 2015.11.25.

Mikako Fujita, Hiroshi Tateishi, Kazuaki Monde, Naoki Murao, Yuya Hayashi, Taishi Higashi, Keiichi Motoyama, Hidetoshi Arima, Kensaku Anraku, Masami Otsuka New strategy to suppress HIV release by a PI(4,5)P2 mimic 第63回日本ウイルス学会学術集会(福岡国際会議場)2015.11.22.

Ali Taha, 岩丸佳奈, Cifti Halil, 古賀涼子、黒崎博雅、藤田美歌子、岡本良成、秀拓一郎、牧野敬史、倉津純一、中尾光善、梅澤一夫、Abdel-Aziz Mohamed、Abuo-Rahma Gamal El-Din、Reshr Eman、

大塚雅巳 Novel metal chelating molecules with anticancer activity 日本薬学会第 135 年会 (神戸国際会議場) 2015.3.28.

立石大、安楽健作、村尾直樹、門出和精、原田信志、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳 新規 HIV-1 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体の創製 日本薬学会第 135 年会 (神戸国際会議場) 2015.3.28.

立石大、安楽健作、村尾直樹、古賀涼子、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子 HIV-1 放出阻害を目指したイノシトールリン脂質誘導体の創製 第 28 回日本エイズ学会学術集会 (大阪国際会議場) 2014.12.05.

安楽健作、立石大、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳 HIV-1 MA 蛋白質とホスファチジルイノシトール 4,5-2 リン酸との結合部位を標的とした抗 HIV 薬の設計と合成 第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム (神戸国際会議場) 2014.11.26.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: HSP70 を誘導する金属キレーター  
発明者: 藤田美歌子、大塚雅巳、黒崎博雅、タハ ファロウク シェハタ アリ、平尚未  
種類: 特許出願  
番号: 2015-41082  
出願年月日: 2015 年 3 月 3 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.medphas.kumamoto-u.ac.jp/research/bunya/60.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚雅巳 (OTSUKA MASAMI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号: 40126008

(2) 連携研究者

藤田美歌子 (FUJITA)  
熊本大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 00322256

(3) 連携研究者

岡本良成 (OKAMOTO YOSHINARI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号: 20194409

