

平成21年 4月21日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590104
 研究課題名（和文） NMDA受容体拮抗薬メマンチン誘導体の合成と作用機作の解明
 研究課題名（英文） Synthesis and mechanism of action of NMDA inhibitor memantine derivatives
 研究代表者
 浜名 洋（HAMANA HIROSHI）
 千葉科学大学・薬学部・教授
 研究者番号：00383472

研究成果の概要：

抗アルツハイマー病（AD）治療薬として承認され、欧米で使用されているメマンチン（1-アミノ-3,5-ジメチルアダマンタン）に着目し、アダマンタンの4つの橋頭位にアミノ基と複数のアルキル基を導入する反応を検討し、3つのアルキル基とアミノ基を導入したメマンチン誘導体の一般合成法を確立することができた。併せてアダマンタンの橋頭位にアミノ基、水酸基、ニトロ基などの導入法も検討した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目 薬学・創薬化学

キーワード：アルツハイマー病、パーキンソン病、メマンチン、アダマンタン、NMDA受容体、

1. 研究開始当初の背景

高神経変性疾患は、中枢神経系の神経細胞が徐々に変性して細胞死に陥る進行性疾患であり、アルツハイマー病（AD）やパーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）などが知られているが、ADが占める割合は大きく、AD治療薬の開発に対する社会の期待は大きい。認知症の患者数は我国で150万人、全世界では2500万人と推定されている。30年後には現在の3倍にまで増加すると思われる、予防・治療法の開発が急務である。神

経変性疾患の中でも、ADは認知症の過半数を占める最大の原因疾患であることから治療法の開発が急務であり、世界中で活発な研究が行われている。現在日本ではアセチルコリンエステラーゼ阻害薬として、アリセプトが承認されている。アセチルコリンエステラーゼ阻害薬以外ではNMDA受容体拮抗薬であるメマンチンが承認されており、欧米で抗AD治療薬として使用されている（日本では現在申請中）。メマンチンとアリセプト両薬の併用による上乗せ効果も示唆されている。

しかし、メマンチン後のバックアップ抗 AD 薬として、アダマンタン骨格の一部を開裂させたネラミキサが米国で Phase III 臨床試験中であったが、統計的に有効な効果を示さなかったことが明らかになった。この臨床試験は中等度から重度の AD 患者、415 例を対象とする 6 ヶ月に及ぶ二重盲検で、最も頻繁に使われているアセチルコリンエステラーゼ阻害剤との併用療法であったが、引き続き本剤の単独療法としての開発を継続することが報告されている（米国製薬業界週報、2004 年 9 月 3 日）。一方で、AD 病の原因と考えられている $A\beta$ の蓄積に関与している APP 切断酵素である α 、 γ -セクレターゼ阻害薬の開発も活発に行われており既にいくつかの新しい治療薬が開発され、欧米を中心として臨床試験が実施されているが問題点も多い。 γ -セクレターゼは Notch などの蛋白質の切断にも関与しており、阻害することにより、免疫異常などの重篤な副作用の原因となることが判明し、APP の γ -セクレターゼのみを切断する APP 特異的阻害剤の開発が必要であり、いまだ問題点も多い。我々は NMDA 受容体拮抗薬の中では、唯一実際に抗 AD 治療薬として使用されており、かつ誘導体の報告例も少ないメマンチンに着目した。メマンチンは日本では承認申請中であるが、記憶・学習に関与する神経伝達物質、グルタミン酸の受容体 *N*-methyl *D*-aspartate (NMDA) 受容体に対する拮抗薬である。しかしながらより強い NMDA 拮抗作用を持つ MK-801 は統合失調症を引き起こすために使用されていない。メマンチン、MK801 とともに脳内ドーパミン放出を増加させるが、MK-801 は神経毒性を有する。それに対して、メマンチンは過剰なグルタミン酸放出に対して保護作用を示すことが判明している。メマンチンはアダマンタンの 4 つの橋頭位にアミノ基と 2 個のメチル基を有しているが、アダマンタンの橋頭位の化学修飾法が限られており、メマンチン誘導体合成の報告は極めて少ない。架橋位にアミノ基をもち、3 個の橋頭位に種々のアルキル基が置換したアダマンタン誘導体の合成法を検討し、NMDA 受容体との結合活性をメマンチンと比較することにより、新規な抗 AD 治療薬の開発を目指すことを目的として検討した。結果として 20 種類のメマンチン誘導体の合成を行い、その活性評価を行った。

1-ブロモアダマンタンの Grignard 反応、アルキルリチウムの反応を詳細に検討し、アダマンタンの橋頭位へのアルキル基の導入反応を種々検討した結果、一般的なアルキル

基の導入方法を確立することができた。併せて活性化化合物の構造の最適化を行うためにアダマンタンの橋頭位への種々の官能基の導入方法についても検討した。その結果、アダマンタンの橋頭位に臭素、水酸基、ニト基を直接導入することができることが明らかとなった。NMDA 受容体に対する拮抗作用を MK-801 と比較し、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} など金属イオンの影響について、作用機作を中心として詳細に検討し、 Ca^{2+} の有無によって MK801 とメマンチンとで受容体の結合部位が異なることが判明した。現在、リード化合物の選択中である。□

メマンチンの基本骨格であるアダマンタンは非常に対称性の高いトリシクロ構造のために橋頭位への置換基の導入に克服すべき問題点が残っている。構造上通常の S_N2 反応は進行不可能であり、 S_N1 反応に関してもトリシクロ構造のために平面構造の第三級のカルボカチオンの生成が困難と予想される。アダマンタンにおける置換反応の報告もいくつかあるが、系統的には検討されていない。一方、アダマンチルアニオン、アダマンチルラジカルについてもいくつかの報告があるが、アダマンタンの架橋位の炭素-水素結合は他の第三級とは異なり、特殊な化学的性質を持っているとも考えられる。新規 AD 薬として、メマンチン後のバックアップ化合物開発の観点からも、アダマンタンの化学を系統的に検討し、種々のメマンチン誘導体の合成法を確立することは極めて意義があるものと思われる。

2. 研究の目的

AD 治療薬として欧米で認可されているメマンチン(1-アミノ-3,5-ジメチルアダマンタン)に着目し、その誘導体の報告が極めて少ないことから、アダマンタン骨格の橋頭位にメチル以外のアルキル基を導入した化合物の合成法の確立を行い、種々のアルキルアダマンタン誘導体を合成し、NMDA 受容体結合測定により、新規な抗 AD 薬の開発を目指す。一方、アルキル基を有しないアマンタジン(1-アミノアダマンタン)は黒質線条体からのドーパミン放出を促し、パーキンソン病 (PD) の症状を改善する治療薬として用いられているが、他方でインフルエンザウィルスの M2 蛋白を阻害し、ウィルスが脱殻することを抑制し、ウィルス粒子が構成できなくなる活性を併せ持つことから、A 型インフルエンザ治療薬としても使用されていたが、A/H3N2 型において耐性ウィルスが検出され、米国では使用しないよう緊急勧告が出されている。またメマンチン、アマンタジン以外にも、アダマンタン骨格を有する種々の化合物が生理活性を示すとの報告¹⁾があり、蛋白質構造中にアダマンタン程度の大きさを認

識する脂溶性ポケットが存在することが示唆されている。これらを踏まえて1-アミノ-アルキルアダマンタン誘導体の合成法を確立することは新規抗AD薬の開発とともに、新しい生理活性物質を見出すことも期待できると考えた。2006年、2007年度の研究からアダマンタン骨格の1位にメチルアミノ基を導入した化合物を合成し、NMDA受容体リガンド結合測定法により活性を評価したところ、メマンチンの1/20程度の活性、アマンタジンの1/4程度の受容体結合活性があることが明らかになった。1昨年度は、20種類ほどのアダマンタン骨格を持つメマンチン誘導体の合成を達成し、その活性評価を行ってきた。アダマンタン骨格の1位に導入したメチルアミノ基の末端アミノ基を修飾した場合はNMDA受容体リガンド結合測定法による活性は大幅に低下し、アダマンタン骨格の2位にメチルアミノ基を導入した場合やその末端アミノ基を修飾した場合にはNMDA受容体リガンド結合測定法による活性が非常に弱くなることも明らかとなった。すなわちアダマンタンの橋頭位にアルキル基とアミノ基が共存することが活性発現に不可欠なことが判明した。

この結果を踏まえて、研究最終年度にあたる昨年度は、1-ハロアダマンタンのGrignard反応を用いたアダマンタンの橋頭位へのアルキル基の導入反応を検討し、1~3個のアルキル基の導入法を確立することに成功した。この手法を用いることで、誘導体合成法を確立できたといえよう。さらに、メマンチンの作用機序の検討も詳細に検討し、NMDA受容体への結合において、Ca²⁺イオン濃度が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、アダマンタンの橋頭位に臭素、水酸基、ニトロ基の簡便な導入法についても検討し、これらの新たに得られた知見を利用して、アダマンタン骨格をもつアルツハイマー病治療薬のみならず、新規生理活性物質創製に展開したい。

3. 研究の方法

・アマンタジン、メマンチン等アダマンタン誘導体の簡便合成法を確立する。それらの中でもアダマンタンの橋頭位に複数個のアルキル基が置換した1-アミノアダマンタンの合成について検討する。まず、1-ブロモアダマンタンのGrignard反応による架橋位へのアルキル基の導入反応を精査する。本反応の基本となる1-ブロモアダマンタンのGrignard反応はP. von R. Schleyer, J. E. Duboisらの報告があるが²⁾、封管を用いる反応であること、MeMgBrについての報告が主で他のGrignard試薬(たとえばEtMgBr)では低収率であることや攪拌を行わずにマグネシウム金属の表面で反応させる必要が

あるなどの束縛があり、1-アルキルアダマンタンの実用的な合成法としては問題点が多く詳細な検討を行う。

・架橋位へのアミノ基導入は1-ブロモアダマンタンを調整し、ブロモ基をアミノ基に変換することとした。ブロム化反応は、直接臭素による反応³⁾、Lewis酸の存在下での臭素との反応⁴⁾さらにMicroreactorを利用したラジカル反応が⁵⁾報告されているが、一般性はきわめて低い。アダマンタンの直接ブロム化反応、加水分解による1-アダマンタノールへの変換、ついでRitter反応によって目的の1-アミノ-アルキルアダマンタンを合成した。

・アダマンタンの橋頭位への種々の官能基導入反応として、臭素以外に水酸基およびニトロ基の直接導入法の検討を行った。

・これらの知見をもとに、合成した種々のアダマンタン誘導体の活性をMK-801を標準物質とするMDA受容体リガンド結合実験により評価する。

4. 研究成果

・1-ハロアダマンタンから1-アダマンタンGrignard試薬の調整については上記のように問題点が多く、合成反応としては実用的ではない。J. E. Duboisらの方法にて調整したアダマンチルGrignard試薬はアルデヒドへの付加反応は進行するが、アルキルハライドとのカップリング反応は進行しない。そこでGrignard試薬と1-ハロアダマンタンとのカップリング反応を検討した。本カップリング反応はエーテル系溶媒を使用せず、調整したGrignard試薬中のエーテルを塩化メチレンに置換するとカップリング反応が進行すると報告されている⁶⁾。しかしながら反応条件を詳細に検討した結果、Ar気流下、固体のブロモアダマンタンにMeMgBrのエーテル溶液を90°Cで滴下するという特殊な条件下で1-メチルアダマンタンが高収率で生成することが判明した。反応は、Grignard試薬を加える際の温度を調整することにより、エチル、プロピル、アリルGrignard試薬も反応するが、vinyl Grignard試薬やメチルリチウムのようなアルキルリチウム試薬は全く反応せず、原料回収に終わることが明らかとなった。アリル基の導入が可能になったことから多様な官能基を有する誘導体の合成へと展開できる。

・臭素の導入に関しては、アダマンタンをBr₂と無溶媒で90°Cに加熱することにより1-ブロムアダマンタンが生成するとの報告があるが³⁾、反応条件や封管中での反応を検討した結果、1-ブロモ-3-アルキルアダマンタン、1-ブロモ-3,5-ジアルキルアダマンタン、1-ブロモ-3,5,7-トリアルキルアダマンタンを対応するアルキルアダマンタンから収率よく合成する方法を確立することができた。これら

のブロモ体を加水分解することにより対応する1-ヒドロキシ-3-アルキルアダマンタン、1-ヒドロキシ-3,5-ジアルキルアダマンタン、1-ヒドロキシ-3,5,7-トリアルキルアダマンタンが生成する。またブロモ化反応における反応時間、温度を調整することによって、たとえば1-メチルアダマンタンから1,3-ジブロモ-5-メチルアダマンタンが高収率で生成することから、導入する臭素の数もコントロールできることが判明した。1-ブロムアダマンタンは硝酸銀存在下で塩基性条件化の加水分解反応により、1-アダマンタノールに変換した。

・一方、アダマンタンの橋頭位に直接水酸基を導入する方法として、シリカゲルにまぶした無置換のアダマンタンに固相で無溶媒でオゾンを作用させることにより生成が可能であるが⁷⁾アルキルアダマンタンでは反応が進行せず、種々のアルキルアダマンタンでは橋頭位に直接水酸基を導入することは困難であった。また最近、benzoxathiazine、urea・H₂O₂、Ar₂Se₂を利用した触媒的水酸化反応の報告もあるが⁸⁾一般性、実用性に乏しい。種々反応を検討した結果、アダマンタンにMCPBAを塩化メチレン中で作用させることにより1-ヒドロシアアダマンタンが高収率で生成することが明らかとなった。本反応は三級のC-H結合に高選択的に進行し、種々のアルキルアダマンタンでも同様に進行することから、アダマンタンあるいはアルキルアダマンタンに直接水酸基を導入する実用的な反応である。

・アダマンタンの橋頭位に直接窒素を導入する反応としてアダマンタンをAlCl₃の存在下で塩化メチレンまたはクロロホルム中でニトリルのRitter反応を利用する方法が報告されているが⁹⁾、本反応は無置換のアダマンタンの場合にのみ有効で、アルキルアダマンタンでは進行しなせず、反応の適応範囲は極めて狭い。しかしながら1-アダマンタノールは酸性硫酸酸性下でニトリルのRitter反応が容易に進行し、種々の1-N-アシルアダマンタンが生成し、次いで酸性条件下の加水分解反応で1-アミノアダマンタンを得ることができる。さらにアダマンタンに直接窒素を導入する反応を種々検討した結果、アダマンタンを塩化メチレン中ニトロニウムテトラフルオロボレート (NO₂⁺BF₄⁻) と加熱することによって1-ニトロアダマンタンが高収率で生成することが判明した。ニトロアダマンタンのからアミノアダマンタンへの還元反応、種々のアルキルアダマンタンとニトロニウムテトラフルオロボレートの反応および本反応機構について現在更に検討中である。

・NMDA受容体チャネルの [3H]MK-801結合部位に対するMK-801自体とメマンチンの作用を調べた。NMDA受容体結合に影響する

ことが報告されているイオン類の影響を検討したところ、Mg²⁺イオンは標識化合物の結合に影響を与えなかったが、Ca²⁺イオンは結合を若干増強した。また、MK-801による結合阻害はCa²⁺イオンによる影響を確認できなかったのに対してメマンチンによる結合阻害はCa²⁺イオンによりほぼ解消されることが分かった。Scatchard解析によるとCa²⁺の作用はメマンチン結合に競合的であり、1mMのCa²⁺イオンは [3H] MK-801の親和力にはほとんど影響せず、メマンチンの親和力を約1/3に低下させることを見出した。この結果はNMDA受容体に対するMK-801とメマンチンの結合様式が異なることと、メマンチンがCa²⁺とチャネルの相互作用をする部位に結合していることを示唆している。MK-801はアルツハイマー病患者に認容されないのに対し、メマンチンは治療に用いられている。NMDA受容体への結合様式の違いが2つの化合物の臨床での有用性の違いを反映しているとすれば、Ca²⁺イオンの作用は新規化合物の治療薬としての有効性チェックに用いることができるかもしれない。メマンチンの作用機作も詳細に検討し、NMDA受容体への結合において、Ca²⁺イオン濃度が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。文献

1) a) Tsu, H., et. al., *J. Med. Chem.* 49, 373, 2006, b) Augeri, D., J., et. al., *J. Med. Chem.* 47, 5025, 2004, c) Ciannini, R., et. al., *J. Med. Chem.* 46, 909, 2003, d) Stern, H., M., et. al., *Nature Chemical biology* 1, 366, 2005, e) Horvath, A., et. al., *J. Med. Chem.* 47, 4268, 2004, f) Richards, M., L., et. al., *J. Med. Chem.* 47, 6451, 2004, g) Buck, I., M., et. al., *J. Med. Chem.* 48, 6803, 2005

2) a) Ōsawa, E., et. al., *J. Org. Chem.* 36, 205 (1971) b) Molle, G., et. al., *J. Org. Chem.* 47, 4120 (1982)

3) Stetter, H., et. al., *Chem. Ber.* 92, 1629 (1959)

4) Maison, W., et. al., *Org. Lett.*, 6, 4567 (2004)

5) Fukuyama, T., et. al., *Org. Lett.*, 10, 533 (2008)

6) Ohno, M., et. al., *J. Org. Chem.*, 53, 729 (1988)

7) Cohen, Z., et. al., *Org. Synth. Coll. Vol.* 6, 43 (1988)

8) Brodsky, B. H., et. al., *J. Amer. Chem. Soc.* 127, 15391 (2005)

9) G. A. Olah, et. al., *Synthesis*, 1992, 1090

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 1 件）

①M. Fujimoto, H. Iida, T. Homma, I. Kimura, M. Mori and H. Hamana, “Ca²⁺ Inhibits the Association of Memantine with N-Methyl-D-aspartate (NMDA) Receptor-Gated Ion Channels”, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **31(9)**, 1813-1815 (2008).

生物活性と構造の相関関係は現時点では公表していない。特許にするために必要な薬理効果に関して構造活性相関のデータが不足しており、どこまで特許に含めるか決定していない。これら特許請求範囲が定まり次第順次公表する予定である。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜名洋 (HAMANA HIROSHI)
千葉科学大学・薬学部・教授
研究者番号：00383472

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤本正文 (FUJIMOTO MASAFUMI)
千葉科学大学・薬学部・教授
研究者番号：30406798
飯田博一 (IIDA HIROKAZU)
千葉科学大学・薬学部・講師
研究者番号：10335797