

令和元年5月28日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07709

研究課題名(和文) アミロイドペプチドの凝集阻害ならびに検出を目的としたクルクミン誘導体の創製

研究課題名(英文) Design, synthesis and evaluation of curcumin analogues toward amyloid peptide aggregation inhibition and detection

研究代表者

今野 博行 (Konno, Hiroyuki)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：50325247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド凝集阻害を目指したクルクミン誘導体の構造活性相関研究を行った。フェノール水酸基とスパーサーの最適化によってC5-モノケトンタイプの誘導体AY1319を創製した。AY1319は高い水溶性とアミロイド凝集阻害能、低い細胞毒性、さらに高いラジカル捕捉能も有していた。またTEM測定から崩壊した凝集体はナノロッド構造を形成していることも明らかにした。一方で、アミロイド凝集体に結合し蛍光を発するMe-CURを創製した。アミロイド凝集体検出能を持ち、ThTよりも高感度であった。AY1319とMe-CURはアミロイドに対する結合部位が異なることでそれぞれの役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は認知機能の低下を伴う脳神経変性疾患であり、患者数は増加の一途をたどっている。世界中で治療薬開発が試みられているにも関わらず根本治療薬はない。筆者は食物由来クルクミンに治療効果が示されて以来、治療薬としての可能性を試みてきた。結果的に難水溶性物質を薬物動態可能な状態まで水溶性を向上させることに成功した。同時にアミロイドβ凝集体の阻害能の向上にも成功している。一方でアミロイドβ凝集体の蛍光検出にも成功している。臨床応用には道半ばであるが、人類の福祉に貢献すべく一歩を踏み出せたと考えている。

研究成果の概要(英文)：A structure activity relationship study of curcumin analogues for the inhibition of amyloid β -ta aggregation is investigated. We optimized the o-phenol and olefin spacer and resulted in the identification of the C5-monoketone type curcumin analogue AY1319, which exhibited potent anti-amyloid β -ta aggregation activity, sufficient water solubility, and low cytotoxicity. Inhibited amyloid β -ta aggregation lead to nanorod-like fragments by TEM analysis. On the other hand, we found that curcumin analogues with the fluorescence property instead of non-inhibition of amyloid β -ta fibrils. Me-CUR shows excellent fluorescence, especially higher than ThT, in the presence of amyloid β -ta fibrils. These results suggest that Me-CUR can become a useful in vitro amyloid fluorescence sensor for diagnosis of Alzheimer's disease. The docking simulation showed that Me-CUR located in the inner site of amyloid β -ta fibrils and AY1319 located in the outer site.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アミロイド 凝集阻害剤 蛍光検出剤 クルクミン 水溶性 細胞毒性 ラジカルスカベンジャー
ドッキングシミュレーション

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、製薬業界をはじめ多くの研究機関でアルツハイマー病薬の開発が盛んである。アルツハイマー病を引き起こす原因はアミロイド前駆体蛋白質から生成するアミロイド β が高度に凝集したもの(老人斑)であり、これが脳の機能低下を招くと考えられている。よって、これらの阻害剤は根本治療薬として期待されているが、今だ臨床では用いられていない。2004年小野らはウコンの主成分であるクルクミンに強力なアミロイド β 凝集阻害、凝集解離作用があることを報告した。これはクルクミンがアルツハイマー病治療薬候補として注目されるきっかけになった。

クルクミンには抗酸化作用、抗炎症作用、抗菌活性、抗腫瘍活性など様々な効果が報告され、また肝機能を回復させる効果も知られており健康食品、特定保健用食品、サプリメントとして多数市販されている。しかしながらその効果を臨床研究では証明することができず、さらに分子レベルで解析した報告例は皆無である。その理由の一つにクルクミンの難水溶性が挙げられる。クルクミンは水や有機溶媒にほとんど溶解しないため、その解析が非常に困難であり研究の進展を妨げていた。そのためクルクミンを溶解させる試みとしてグルコースや胆汁酸などを連結した化合物が報告され成果を挙げている。しかしながらこれらは構造を大きく変化させており標的蛋白質、生体膜などとの相互作用を正確に解析することが困難になるというデメリットがある。

そこで筆者は現在までクルクミン構造を大きく変化させず水溶性を向上させる取り組みを行ってきた。特にクルクミン構造の特性について調査し、化学合成を駆使することで様々な誘導体を得、評価した。その結果、ベンゼン環に存在する水酸基の配置を移動させることが水溶性向上に高い効果があることを見出し、天然クルクミンの1000倍の水溶性を持つ水溶性クルクミン(HYCUR)の開発に成功した。本化合物は強力なアミロイド β 凝集阻害能、ラジカル消去活性も有していた(Endo, H.; Konno, H. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 5621-5626.)。またアミロイド β 産生関連酵素BACE1に対する阻害能も有していた(Konno, H. & Akaji, K. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 685-690.)。以上からクルクミン骨格にはアルツハイマー病根本治療薬の重要な2つの標的を阻害しうる可能性が見出され有望なリード化合物候補になり得ることを証明することができた(Figure 1)。

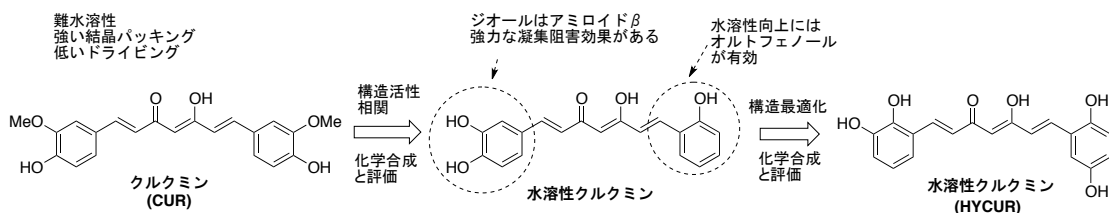


Figure 1. クルクミンから導かれた誘導体

さらに、本研究の過程で凝集体を阻害(解離)させずに結合し、蛍光を発する現象を観察した。フェノール性水酸基をメチルエーテル化した誘導体(MECUR)には凝集阻害能が全くないが、それに留まらず強い蛍光能を有していた。アミロイド結合性蛍光試薬として代表的なものにチオフラビンT(ThT)があげられるが、これは β シートを多く含む蛋白質やアミロイド化した変性蛋白質などにも蛍光性を示すことが知られている。

2. 研究の目的

アミロイド β 凝集阻害剤として水溶性クルクミンの構造活性相関を行う。ベンゼン環上の水酸基の数、配置などについては多くの知見を得ていることから、さらに2つのベンゼン環を結ぶスペーサー部分について最適化を行うことにした。特にスペーサーを短くした時の挙動について詳細に検討する。また細胞内への移行、膜透過性、血中での安定性とラジカル消去能なども合わせて行う。さらにアミロイド結合性(蛍光発光性)分子の最適化を行う。変性蛋白質とペプチド性の構造制御情報を正確に計測できる化合物の分子構造を見極めたいと考えている。またクルクミン様化合物の阻害あるいは凝集結合様式の詳細はまだ未解決であることからアミロイド β とクルクミンの結合様式をクロスリンク剤の導入で解析する。現時点でアミロイド β の凝集量を計測する指示薬として利用可能である。研究用試薬としては十分な性能を有している。本課題を遂行することで将来的にはキット化されたアルツハイマー病診断薬としての利用への期待から物質選択性(蛋白質、核酸、脂質、糖鎖など)について詳細な検討を行う

3. 研究の方法

A. 水溶性クルクミン誘導体の分子設計、合成と構造活性相関

現在までに得られた知見をもとにクルクミン誘導体の設計を行った。2つのベンゼン環を結ぶスペーサーは通常はC7であり、過去に様々な試みを行っている。今回はスペーサーの長さをC6、C5さらにC3とした。それぞれ設計した化合物の合成は、ボロン酸を用いたアルドール反応、塩基条件下のアルドール反応を鍵反応に行った。得られた化合物はアミロイド β 凝集阻害活性試験、水溶性試験、細胞毒性試験、ラジカル消去能実験、CDスペクトル測定によるアミロ

イドβの二次構造予測、TEM 測定による物性調査、分子力場計算による安定配座解析、ドッキングシミュレーションなど多方面から行い評価した。

B. アミロイドβ検出を指向した取り組み

一方で蛍光発光性クルクミンについても同様の合成法で行い、評価方法も上記に従った。ThT 試験は ThT を用いない状態での試験、血清 (FBS) を用いた蛍光検出実験を合わせて行った。

C. クルクミンとクロスリンク剤との連結によるアミロイドβ結合部位の特定

クルクミンを用いてクロスリンク実験を行い、アミロイドβとのUV照射によるクロスリンクを行った。さらにクルクミン二量化実験も行った (Figure 2)。

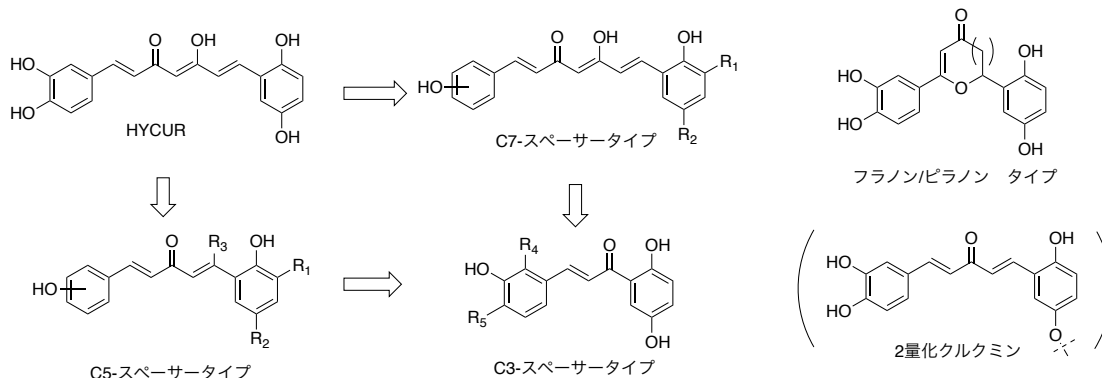


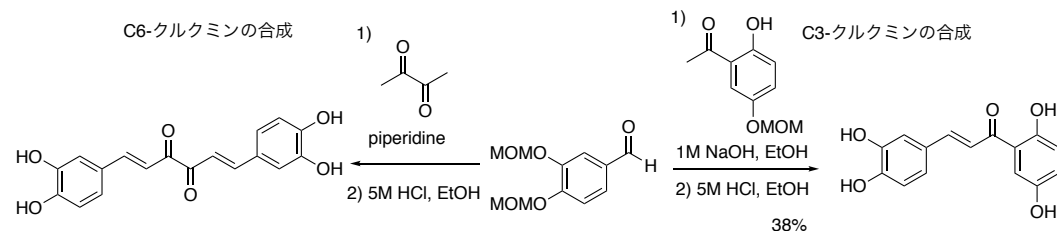
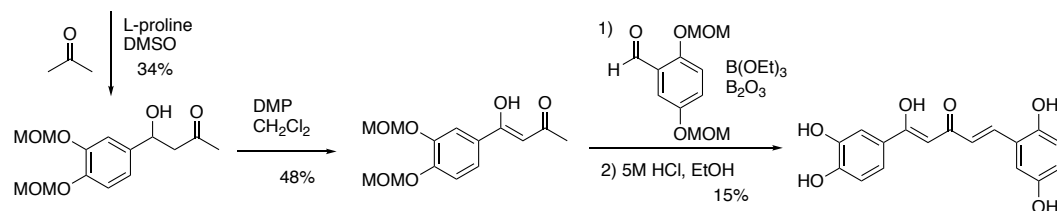
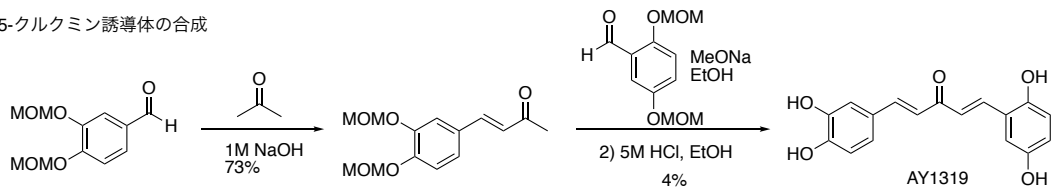
Figure 2. 分子設計されたクルクミン誘導體

4. 研究成果

C7 並びに C5 スペーサーを有する誘導體の合成では、ホウ素酸を用いた Pabon アルドール縮合を選択し、最適な条件検討によって設計した分子を 40 種類程度得ることに成功した。様々なフェノール水酸基を有するベンズアルデヒド誘導體を用いたため反応性、収率には大きな変化がみられた。極端に収率が低い場合には水酸基を MOM エーテルとして保護することで、反応性の低下を防いだ。

次に過去に例のない C6 スペーサーを有する誘導體の合成を検討した。2,3-ブタジオンとベンズアルデヒド誘導體のアルドール縮合を試みた所、望む化合物を得ることができたものの、低収率であった。そこで、2,3-ブタジオンの一方のケトンにジメチルケタールとして保護したブタノン誘導體を作成し、それを用いてアルドール縮合を行った。その結果、中程度の収率を与えることがわかった。また、本反応はフェノール性水酸基を保護した時のみ、反応が円滑に進行することもわかった。この方法を用いて 8 種の C6 クルクミン誘導體を合成した。また、脱保護時に酸性条件に付すと分子内環化反応が進行し、フラン誘導體が一举に構築されることも合わせて見出した。C3 スペーサーを有する誘導體、すなわちカルコン誘導體については過去に合成例があり、塩基性条件下アルドール反応を行い高収率で望む誘導體に導くことができた (Scheme 1)。

C5-クルクミン誘導體の合成



Scheme 1. クルクミン誘導體の合成

次に合成した分子の水溶性試験、アミロイドβ凝集体阻害実験を行った。その結果、アミロ

イド凝集体阻害と水溶性にはあまり相関がないことを明らかにした。よって薬物動態の面から水溶性の高い化合物を薬剤候補として選択することが可能となり、アルツハイマー病治療薬としても可能性が開けたと考えている。特に C5-モノケトンならびに C5-ジケトン(2,5,3',4'-テトラヒドロシキジフェニル)誘導体がよい結果を与えた。一方で、C6-ジケトン誘導体については水溶性の顕著な低下が見られ、アミロイドβ凝集体阻害効果もほとんど見受けられなかった。これは分子中間部に位置する 1,2-ジケトンが反発し、分子全体の平面性が崩れたことに起因するものと結論づけた。C3-モノケトン誘導体については水溶性は改善されるものの、アミロイドβ凝集体阻害効果は示さなかった (Figure 3)。

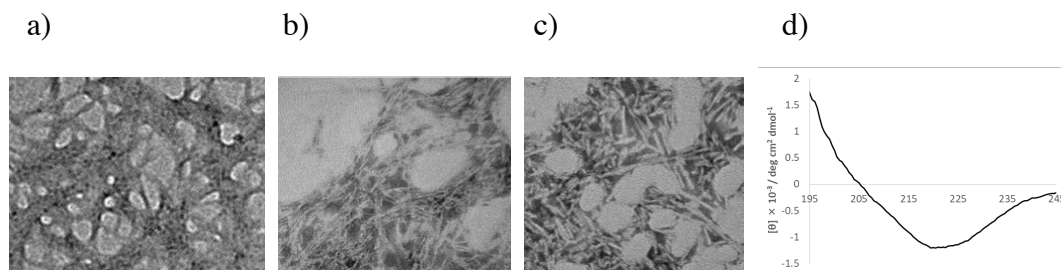


Figure 3. (a-c) Negative-staining TEM images of Aβ aggregation after 20 h incubation. (a) Aβ alone. (b) Aβ aggregation with ThT. (c) Aβ nanorod-like structure with AY1319. (d) CD spectrum of Aβ nanorod-like structure with AY1319.

フラン誘導体に強力な凝集阻害効果を見出すことができた。この結果は、過去の報告のあった誘導体に類似する結果であり、再現性の面も証明された形になった。最後にメチルクルクミンを用いたアミロイドβ凝集体の検出実験を行った。蛍光顕微鏡観察において、60 nM という高感度な検出能を有することがわかり、あらためてクルクミン誘導体のアミロイドβへの高い親和性が証明された (Figure 4)。

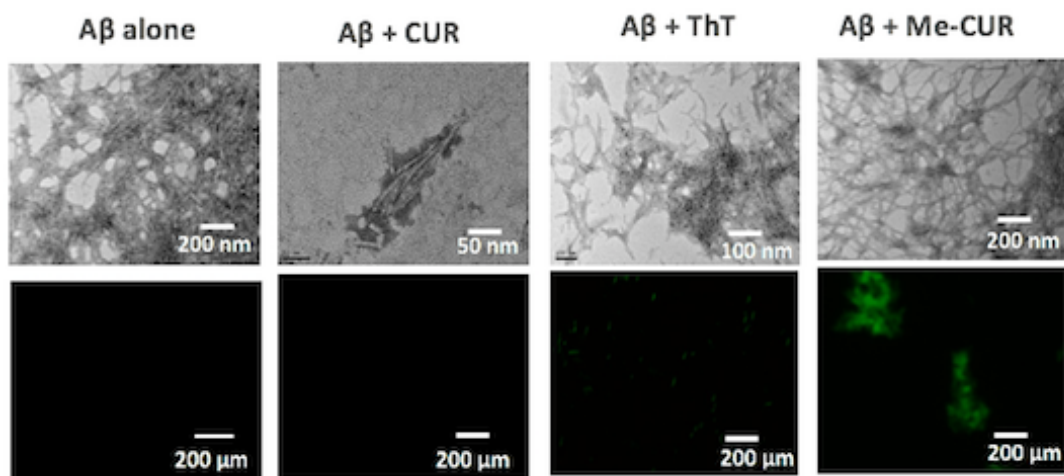


Figure 4. (upper) Negative-staining TEM images of Aβ aggregation after 20 h incubation; (lower) Fluorescence images of Aβ aggregation after 20 h incubation.

上記誘導体の神経細胞 PC12 に対する毒性試験では、水溶性の向上が毒性を低下させることがわかった。しかしながら、望む化合物が必ずしも細胞毒性が低いわけではなく評価を難しくさせることとなった。活性酸素除去試験においても同様であり、水溶性の向上が活性酸素除去能を極端に向上させた。水中、血中での分子安定度は天然クルクミンを凌駕する結果も得られた。以上の結果から AY1319 がもっとも物性に優れたクルクミン誘導体であると結論づけた (25 μM アミロイドβ凝集阻害率 100%, 1 μM AY1319; 水溶性 271 μM, クルクミンの 1390 倍; PC12 細胞に対する細胞毒性 CC₅₀ = 59 μM; DPPH ラジカル消去活性 IC₅₀ = 13 μM)。

Figure 5 ならびに 6 にはドッキングシミュレーションの結果を記載した。水溶性クルクミンでありアミロイドβ凝集阻害剤である AY1319 はアミロイドβの親水側に結合し、蛍光発光性クルクミン Me-CUR や ThT は疎水側に結合しているという結果が得られた。この結果は、これまで得てきた実験結果を支持するものであり、過去の報告との一致を見ることができ論理的に説明もつくこととなった (Figure 5, 6)。

さらに、クルクミン誘導体二量分子の設計、合成を行った。スペーサーにはポリエチレングリコール 3 量体ならびにグルタル酸アミド誘導体を選択した。一方でクルクミンには過去の結果から天然クルクミン、水溶性クルクミン、C5-クルクミン (AY1319) を選んだ。これら

をスパーサーを介してカップリングし、7つの二量分子誘導体の合成に成功した。次にこれらのアミロイドβ凝集阻害実験を行ったところ、いずれも対応するクルクミン誘導体単体よりも若干活性が低下することがわかった。先のシミュレーションからスパーサーの導入位置がポイントになることが理解されていたが、その結果がそのまま現れることとなった。次に、フラノン骨格の設計を行った。本誘導体はクルクミンが植物内、あるいは生体に摂取された後に構造変換を起こすことで生成する微量成分である。筆者はクルクミンの多様な生物活性の一部はこの代謝過程にあるとの仮説を立て、分子設計を行った。合成ではアルドール縮合と分子内マイケル不可反応が連続的に進行する条件を見出し、ワンポットで望む骨格を入手する方法論を確立した。今後の評価に期待する。

一方で、アミロイドβとのクロスリンクに結合アミノ酸残基の特定、血中でのクルクミン誘導体の薬物動態、蛍光検出実験など試みたもののいずれも望む結果を得ることはできなかった。

以上、アミロイドβ凝集阻害剤水溶性クルクミンならびに蛍光発光性クルクミンの創製に成功した。実用化に向けてさらなる構造展開、物性の向上が待たれる。

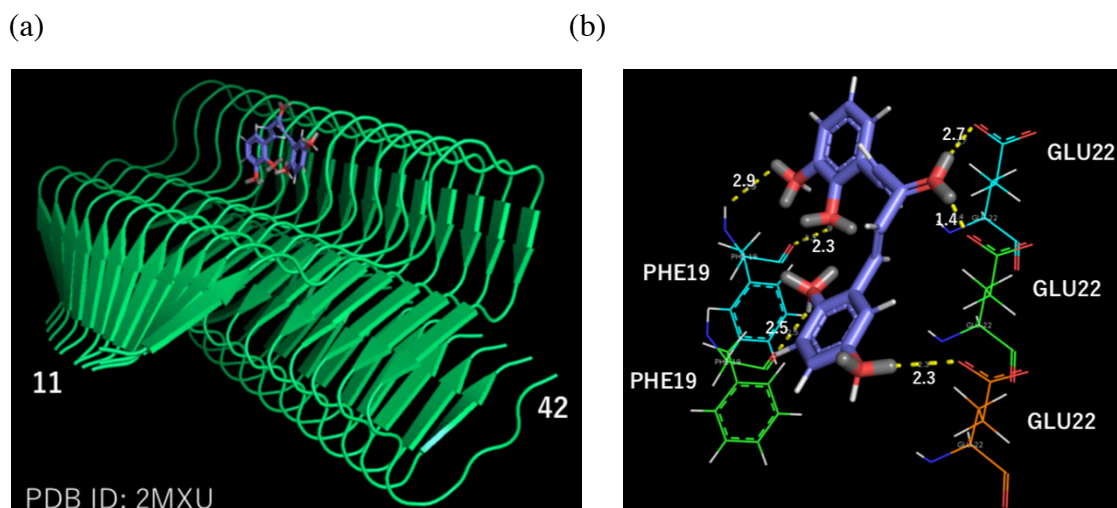


Figure 5. (a) Binding pose of AY1319 in the Aβ fibrils; (b) Detailed view of the docked AY1319 structure and the interacting amino acid moieties within the binding site of Aβ fibrils.

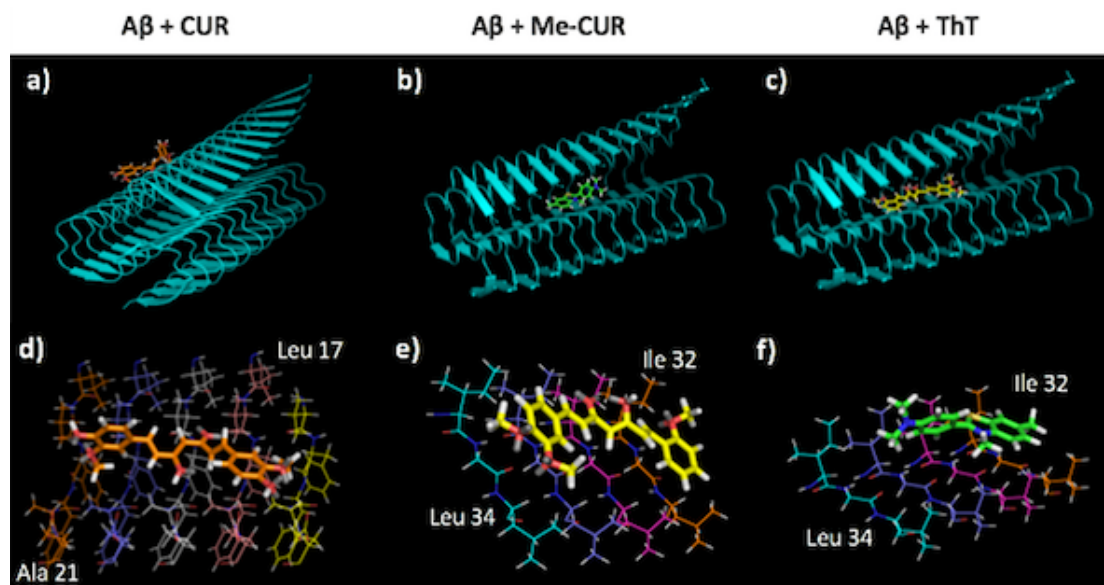


Figure 6. (a,d) Binding pose of CUR in the Aβ fibrils; (b,e) Binding pose of Me-CUR in the Aβ fibrils; (c,f) Binding pose of ThT in the Aβ fibrils.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- Hotsumi, M.; Tajiri, M.; Nikaido, Y.; Sato, T.; Makabe, K.; Konno, H. Design, synthesis, and evaluation of a water soluble C5-monoketone type curcumin analogue as a potent amyloid β aggregation inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* submitted. (査読有)
- Sato, T.; Hotsumi, M.; Makabe, K.; Konno, H. Design, synthesis and evaluation of curcumin-based fluorescent probes for the detection of Aβ fibrils. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28, 3520-3525.

DOI10.1016/j.bmcl.2018.10.002 (査読有)

3. Sato, T.; Hotsumi, M; Konno, H. Design and synthesis of curcumin analogues as probe for A β fibrils. *Peptide Science* **2018**, in press. (査読有)
4. Sato, T.; Nikaido, Y.; Yamada, R.; Konno, H. Design and synthesis of curcumin analogues as probe for A β fibrils. *Peptide Science* **2016, 2017**, 201-202. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

1. ○穂積 真由美, 佐藤 多記, 田尻 美理, 今野 博行, ON/OFF 機構により蛍光を制御する A β 凝集体検出のための新規クルクミン型蛍光プローブの探索, 第 26 回山形分子生物学セミナー (2018 年 11 月 10 日, 山形市, 山形大学医学部)
2. ○佐藤多記, 穂積真由美, 今野博行, Development of curcumin analogues: detection of A β fibrils and its aggregation inhibition. 第 54 回ペプチド討論会 (2017 年 11 月 20-22 日, 堺市, 大阪府立大学)
3. ○穂積真由美, 佐藤多記, 二階堂由莉, 今野博行, 水溶性と A β 凝集阻害効果を合わせ持つクルクミン誘導体の探索, 認知症を知る若手研究者の集まり (2017 年 7 月 29-30 日, 大津市, 湯の宿木もれび)
4. ○佐藤多記, 二階堂由莉, 穂積真由美, 照屋健太, 今野博行, A β 凝集体特異的に結合し機能を発揮するクルクミン誘導体の開発, 認知症を知る若手研究者の集まり (2017 年 7 月 29-30 日, 大津市, 湯の宿木もれび)
5. ○今野博行, 二階堂由莉, 佐藤多記, アミロイド β 凝集体に特異的に結合するクルクミン様物質の開発, 日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017 年 3 月 18-20 日, 京都市, 京都女子大学)
6. ○今野博行, 二階堂由莉, 佐藤多記, アミロイド β 凝集体に特異的に結合するクルクミン様物質の開発, 第 24 回山形分子生物学セミナー (2016 年 12 月 3 日, 鶴岡市, 山形大学農学部)
7. ○佐藤多記, 二階堂由莉, 今野博行, アミロイド β 凝集体を検出するクルクミン型蛍光プローブの開発. 第 53 回ペプチド討論会 (2016 年 10 月 26-28 日, 京都市, 京都テルサ)
8. ○佐藤多記, 二階堂由莉, 山田亮, 今野博行, A β 凝集体検出色素クルクミンアナログの開発, 第 48 回若手ペプチド夏の勉強会 (2016 年 7 月 31 日-8 月 2 日, 八王子市, 大学セミナーハウス)
9. ○佐藤多記, 二階堂由莉, 山田亮, 今野博行, A β 凝集体特異的に結合し蛍光を発するクルクミン誘導体の開発, 認知症を知る若手研究者の集まり (2016 年 7 月 30-31 日, 高崎市, ニューサンピア高崎)
10. ○二階堂由莉, 佐藤多記, 今野博行, Amyloid β に特異的に結合し構造制御するクルクミン様物質の開発, 第 27 回万有仙台シンポジウム (2016 年 6 月 28 日, 仙台市, 仙台国際センター)
11. ○今野博行, Amyloid β に特異的に結合し構造制御するクルクミン様物質の開発, 日本食品科学工学会年会 (2016 年 8 月 26 日, 名古屋市, 名城大学) 招待講演

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: クルクミン誘導体

発明者: 今野博行

権利者: 山形大学

種類: 特許

番号: 2017-033516

出願年: 2017

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

1. 「くすりの種を見つけよう！」が夢ナビライブ HP に紹介された, <http://yumenavi.info/lecture.aspx?SearchMod=10&SerKbn=X&ProId=HTML&Page=1&GNKCD=g007941&From=YL>, 2016 年 6 月 13 日.
2. ホームページ等
Konno group at Yamagata University <http://www.bioorg.yz.yamagata-u.ac.jp>
山形大学研究者総覧 <http://www.yudb.kj.yamagata-u.ac.jp>

6. 研究組織

本研究は個人研究であるため共同研究者、研究分担者は存在しない。

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。