

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15143

研究課題名(和文)新規脳保護薬の創製

研究課題名(英文)Development of a novel brain protectant

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)・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): 脳梗塞が起こった虚血脳に血流が再開すると酸素フリーラジカルが急増し、脂質過酸化が促進される結果、過酸化脂質から細胞毒性アルデヒドHNEが生成する。本研究はHNEを不活化することで脳保護薬を創製することを目的とする。

カルノシンの誘導体を各種合成し、HNEの結合消去、HNEによる細胞死の抑制、スナネズミの脳虚血モデルにおける神経細胞死の抑制を起こす化合物CNNを得た。現在のところ脳保護薬はラジカル消去剤のエダラボン一剤のみであり、本研究はエダラボンとは作用機序を異にする新しい脳保護薬の創製につながるものである。

研究成果の概要(英文): Cerebral ischemia generates oxygen free radical that induces lipid peroxidation of cerebral cell membrane to produce HNE that is toxic to cerebral nerve cells. The present research aimed at the development of a brain protecting drug that inactivates HNE. It was known that Carnosine (CAR) quenches HNE to form cyclic adduct. Histidine Hydrazide (HH) is also known to produce the similar adduct.

We now designed a compound named CNN that could form bicyclic HNE adduct that seems more stable compared with CAR or HH. CNN was found to quench HNE much more efficiently compared with CAR or HH. CNN rescued the death of PC-12 cell induced by HNE. CNN is effective by ip administration. CNN rescued the hippocampal CA1 cell death of transient cerebral ischemia model of Mongolian gerbil whereas HH did not. We developed CNN that efficiently inactivates neurotoxic HNE, the end-product of the lipid peroxidation.

研究分野：生体機能分子合成学

キーワード：脳保護薬 HNE

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞においては、発病直後の急性期における対応が予後を大きく左右する。脳梗塞中心部では血流が途絶え、神経細胞死が起こるが、その周囲部分（ペナンプラ）は血行が中程度で放置すると細胞死に至る。脳保護薬は急性期のペナンプラを細胞死から救うもので、極めて重要である。しかし世界的にみても、脳保護薬は我が国で開発されたエダラボンのみである。

脳梗塞が起こった虚血脳が再開通すると多量の酸素が流入するため、ペナンプラ部位に酸素フリーラジカルが急増する。すると脳神経細胞の細胞膜の脂質過酸化が起こり、細胞毒性をもったアルデヒド HNE が生成して脳梗塞が増悪する。

脳保護薬がエダラボン一剤しかない現状において、新たな脳保護薬を開発することが強く望まれていた。

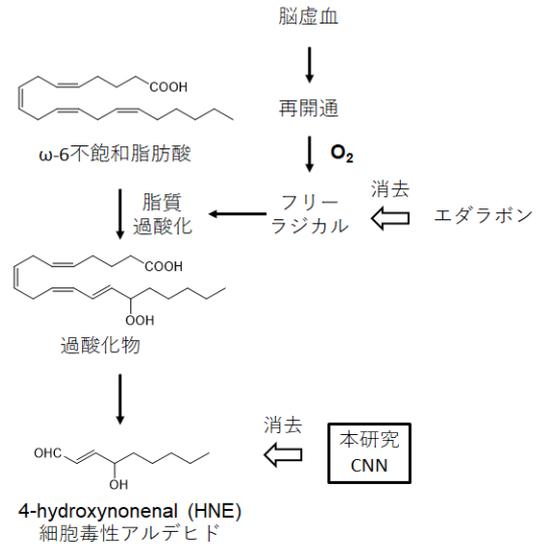
2. 研究の目的

脳保護薬エダラボンは、脳梗塞急性期に脳内に生ずるフリーラジカルを消去する脳移行性低分子化合物である。本研究は、脂質過酸化により生成する細胞毒性アルデヒド HNE を不活化するメカニズムで脳保護を行う新規化合物を創製するものである。具体的にはジペプチドであるカルノシンをリード化合物として誘導体の分子設計を行う。

脳虚血の再灌流で爆発的に生成する酸素フリーラジカルは脳神経細胞膜に存在する -6 脂肪酸の脂質過酸化を起こし、生成する過酸化物は神経毒性アルデヒド HNE となる。HNE は不飽和アルデヒド構造を持っているため、二重結合部位とアルデヒドでタンパク質中のリシンなどのアミノ酸残基を架橋することによって細胞機能を阻害する。

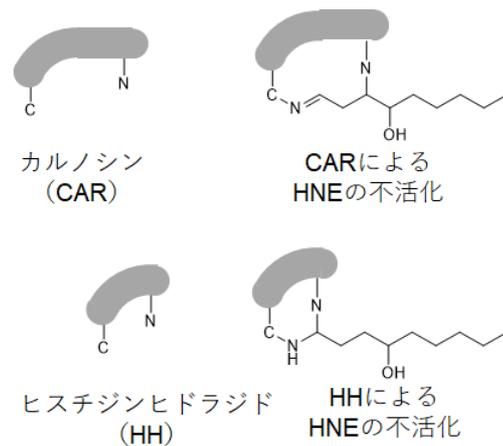
既存脳保護薬エダラボンは脳虚血の際に生成する活性酸素ラジカルを消去するものであるが、本研究では脂質過酸化の最終生成

物である HNE を消去する化合物を得ることを目的とした。

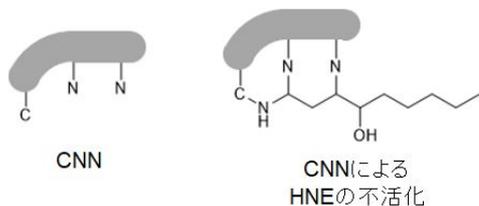


3. 研究の方法

HNE を消去する化合物としてカルノシン (CAR) およびヒスチジンヒドラジド (HH) が知られていた。これらは C および N の反応性基をもち、HNE と環状付加物を形成する。



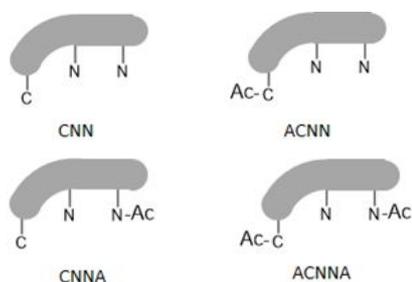
本研究では C、N および N の 3 つの反応性基をもち HNE と二環性の付加物を形成し得る化合物 CNN を設計した。CAR および HH が単環性付加物を形成するのに対し、CNN はより強固な二環性付加物を形成することから、活性の増強が期待された。



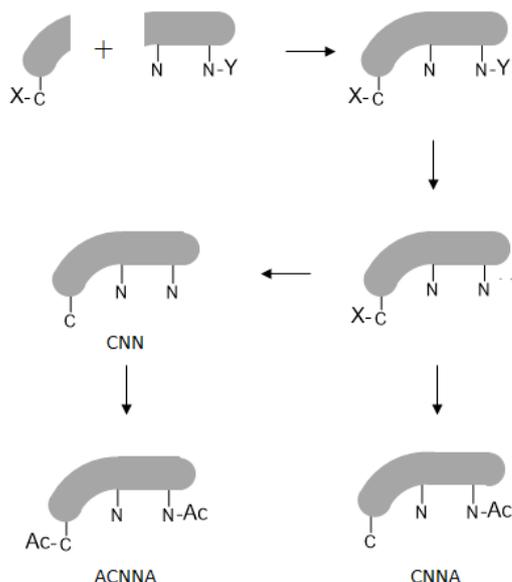
本研究では CNN およびその誘導体を各種合成し、HNE の結合消去、HNE による細胞死の抑制、スナネズミの脳虚血モデルにおける神経細胞死の抑制を検討した。

4 . 研究成果

本研究では CNN およびその C、N、N をアセチル基によりマスクした 3 化合物、合計 4 化合物を設計した。



これらの化合物は下のように、各フラグメントを結合させ、保護基を着脱して合成した。



CNN が HNE を消去する化学反応としての反応性を検討した。CNN とその誘導体をリン酸緩衝液(pH 7.4) 中 37°C にて HNE とインキュベートし、逆相 HPLC で分析したところ、CNN の HNE 消去活性が最も高かった。アセチル基を導入すると活性が低下すること、および CNN は CAR より相当程度活性が強いことから C と N の重要性が示された。1 時間後に CNN と HH により消去された HNE なほぼ同等だが、30 分後をみると CNN により消去された HNE の方が HH により消去された HNE より格段に多かった。

HNE による細胞死に対する CNN の効果を検討したところ、CNN は HNE による PC-12 細胞の細胞死を救済した。

スナネズミの一過性脳虚血に対する CNN の効果を検討したところ、CNN(腹腔内投与)はスナネズミ一過性脳虚血における海馬 CA1 細胞の細胞死を救済した。一方 HH はこれを救済しなかった。

現在のところ脳保護薬はラジカル消去剤のエダラボン一剤のみであり、本研究はエダラボンとは作用機序を異にする新しい脳保護薬の創製につながるものである。

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 10 件)

Vu Huy Luong, Takenao Chino, Noritaka Oyama, Takashi Matsushita, Yoko Sasaki, Dai Ogura, Shin-ichiro Niwa, Tanima Biswas, Akiyuki Hamasaki, Mikako Fujita, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Hironobu Ihn, Minoru Hasegawa, Blockade of TGF- β /Smad signaling by the small compound, HPH-15, ameliorates experimental skin fibrosis. *Arthritis Research & Therapy*, 査読有, 20, 46, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1534-y>

Halil Ibrahim Ciftci, Safiye Emirdag Ozturk, Taha F. S. Ali, Mohamed O. Radwan, Hiroshi Tateishi, Ryoko Koga, Mustafa Can, Masami Otsuka, Mikako Fujita, The First Pentacyclic Tripenoid Gypsogenin Derivative Having Anti-ABL1 Kinase and Anti-Chronic Myelogenous Leukemia

Activities. Biol. Pharm. Bull., 査読有, 41 (5) 570-574, 2018. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00902>

Mehlika Dilek Altintop, Halil Ibrahim Ciftci, Mohamed O. Radwan, Belgin Sever, Zafer Asim Kaplancikli, Taha F.S. Ali, Ryoko Koga, Mikako Fujita, Masami Otsuka, Ahmet Ozdemir, Design, synthesis and biological evaluation of novel 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential antitumor agents against chronic myelogenous leukemia. Striking effect of nitrothiazole moiety. *Molecules*, 査読有, 23 (1), 59, 2018. Doi: 10.3390/molecules23010059

Ryoko Koga, Minami Yamamoto, Halil Ciftci, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Introduction of H2C2-type zinc-binding residues to HIV-2 Vpr increases its expression level. *FEBS OpenBio*, 査読有, 8 (1), 146-153, 2018. doi:10.1002/2211-5463.12358

Ryoko Koga, Mohamed O. Radwan, Tomohiko Ejima, Yosuke Kanemaru, Hiroshi Tateishi, Taha F. S. Ali, Halil Ibrahim Ciftci, Yuri Shibata, Yuu Taguchi, Jun-ichiro Inoue, Masami Otsuka, Mikako Fujita, A Dithiol Compound Binds To The Zinc Finger Protein TRAF6 and Suppresses Its Ubiquitination. *ChemMedChem*, 査読有, 12 (23), 1935-1941, 2017. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700399>

Ayumi Tanaka, Mohamed O. Radwan, Akiyuki Hamasaki, Asumi Ejima, Emiko Obata, Ryoko Koga, Hiroshi Tateishi, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Mitsuyoshi Nakao, Kazuo Umezawa, Fuyuhiko Tamanoi, Masami Otsuka, A novel inhibitor of farnesyltransferase with a zinc site recognition moiety and a farnesyl group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, 27 (16), 3862-3866, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.047>

Mohamed A. Ibrahim, Abir T. El-Alfy, Kelly Ezel, Mohamed O. Radwan, Abbas G. Shilabin, Anna J. Kochanowska-Karamyan, Howaida I. Abd-Alla, Masami Otsuka, Mark T. Hama, Marine Inspired 2-(5-Halo-1H-indol-3-yl)-N,N-Dimethyleth anamines As Modulators of Serotonin Receptors: An Example Illustrating the Power of Bromine as part of the Uniquely Marine Chemical Space. *Marine Drugs*, 査読有, 15 (8), 248, 2017. doi:10.3390/md15080248.

Minami Yamamoto, Ryoko Koga, Haruna Fujino, Kazunori Shimagaki, Halil Ibrahim Ciftci, Masahiro Kamo, Hiroshi Tateishi, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Role of

zinc binding site of HIV-2 Vpx prevents instability and dysfunction of the protein. *J. General Virol.*, 査読有, 98 (2), 275-283, 2017. 10.1099/jgv.0.000701

Hiroshi Tateishi, Kazuaki Monde, Kensaku Anraku, Ryoko Koga, Yuya Hayashi, Halil Ibrahim Ciftci, Hasan DeMirici, Taishi Higashi, Keiichi Motoyama, Hidetoshi Arima, Masami Otsuka, Mikako Fujita, A clue to non-toxic strategy to HIV eradication: "Lock-in and apoptosis". *Scientific Reports*, 査読有, 8957, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-09129-w

Nilufer Bayrak, Hatice Yildirim, Amac Fatih Tuyun, Emel Mataraci Kara, Berna Ozbek Celik, Girish Kumar Gupta, Halil I. Ciftci, Mikako Fujita, Masami Otsuka, Hamid R. Nasiri, Synthesis, Computational Study, and Evaluation of in vitro Antimicrobial, Antibiofilm, and Anticancer Activities of New Sulfanyl Aminonaphthoquinone Derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*, 査読有, 14 (6), 647-661, 2017. <https://doi.org/10.2174/157018081406170606155530>

〔学会発表〕(計 18 件)

日本薬学会第137年会(2018.3.26. 金沢、TKP金沢カンファレンスセンター) Tanima Biswas, Taha Farouk Shehata Ali, 平尚未、古賀涼子、森美晴、岡本良成、藤田美歌子、折戸公彦、野口慶、三好淳子、森岡基浩、大塚雅巳 HNEを標的とした新規脳保護薬

The 4th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (2018.3.17. 熊本大学薬学部宮本記念館) Halil I Ciftci, Mohamed O Radwan, Masami Otsuka, Mikako Fujita. Kinase Inhibitory Activity of Glycyrrhetic Acid

The 4th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (2018.3.17. 熊本大学薬学部宮本記念館) Mikako Fujita. HIV study aiming at elucidation of viral evolution tactics and development of a way for eradication

The 4th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (2018.3.17. 熊本大学薬学部宮本記念館) Masami Otsuka. Zinc Proteins as Drug Targets

第40回日本分子生物学会年会 (2017.12.7. 神戸ポートアイランド) Halilibrahim Ciftci, Hiroshi Tateishi, Kotaro Koiwai, Ryoko Koga, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda. Structural basis of inositol phosphates recognition in the HIV-1 gag matrix

第31回日本エイズ学会学術集会 (2017.11.25. 中野サンプラザ・コングレスクエア中野) Halil I. Ciftci, Hiroshi Tateishi, Kotaro Koiwai, Ryoko Koga, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda. Structural Basis of HIV-1 Gag Matrix Targeting by IP6 Derivative

第31回日本エイズ学会学術集会 (2017.11.25. 中野サンプラザ・コングレスクエア中野) 島垣和功、古賀涼子、Halil Ibrahim Ciftci、大塚雅巳、山口佳宏、藤田美歌子 HIV-2 Vpxのポリプロリンモチーフの役割

第35回メディシナルケミストリーシンポジウム(2017.10.26. 名古屋大学豊田講堂) Mohamed O. Radwan, Ryoko Koga, Tomohiko Ejima, Yosuke Kanemaru, Hiroshi Tateishi, Taha F. S. Ali, Halil I Ciftci, Yuri Shibata, Yuu Taguchi, Jun-ichiro Inoue, Masami Otsuka, Mikako Fujita TRAF6 polyubiquitination interruption by a low molecular weight zinc chelator

第35回メディシナルケミストリーシンポジウム(2017.10.26. 名古屋大学豊田講堂)立石大、門出和精、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 ウイルス蛋白質蓄積によりアポトーシスを誘導する新規抗HIV薬の創製

第65回日本ウイルス学会学術集会 (2017.10.24. 大阪国際会議場) Ryoko Koga, Minami Yamamoto, Hiroshi Tateishi, Halilibrahim Ciftci, Masami Otsuka, Mikako Fujita, HIV-2 Vpx/Vpr蛋白質の発現量は亜鉛結合によって制御されている Expression Level of HIV-2 Vpx/Vpr Proteins is Regulated by their Zinc Binding

第65回日本ウイルス学会学術集会 (2017.10.24. 大阪国際会議場) Halilibrahim Ciftci, Hiroshi Tateishi, Kotaro Koiwai, Ryoko Koga, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Structural Basis of the Interaction between HIV-1 Gag Matrix and IP6 – Toward the Development of IP6

Turkish-Japanese Workshop on Bioorganic Medicinal Chemistry and Natural Products (2017.09.14. トルコ Eskisehir, Anadol University Congress Center Red Hall, 09.14.) Mikako Fujita, Host Factor vs Virus: Characters of Viral Restriction Proteins and Anti-viral Strategy

Turkish-Japanese Workshop on Bioorganic Medicinal Chemistry and Natural Products (2017.09.14. トルコ Eskisehir, Anadol University Congress Center Red Hall) Masami Otsuka Bleomycin Revisited: Man-Made Bleomycin with New Function “Surgical

Operation” of a Drug Molecule

The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences(2017.09.12. トラブゾン、トルコ、Hilton Garden Inn Trabzon) Mohamed Osman Radwan, Taha F. S. Ali, Halil Ibrahim Ciftci, Ryoko Koga, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka New Sirt2 Inhibitor based on S-Trityl-L-cysteins scaffold

The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences(2017.09.11. トラブゾン、トルコ、Hilton Garden Inn Trabzon) Masami Otsuka From Natural Bleomycin to Man-Made Bleomycin

The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences(2017.09.11. トラブゾン、トルコ、Hilton Garden Inn Trabzon) Halil Ibrahim Ciftci, Hiroshi Tateishi, Kotaro Koiwai, Ryoko Koga, Fumiaki Yumoto, Toshiya Senda, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Structural Basis of Targeting HIV-Gag Matrix – Towards Finding a Cure for HIV Infection

The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences(2017.09.11. トラブゾン、トルコ、Hilton Garden Inn Trabzon) Ryoko Koga, Minami Yamamoto, Haruna Fujino, Kazunori Shimagaki, Halil Ibrahim Ciftci, Masahiro Kamo, Hiroshi Tateishi, Masami Otsuka, Mikako Fujita Zinc-Binding State of HIV-2 VPX/VPR Regulates

The 22nd Congress of European Hematology Association (2017.06. 22.~06.27. マドリード、スペイン) Nao Nishimura, Mohamed O. Osman, Masayuki Amano, Shinya Endo, Shikiko Ueno, Nina Ueno, Hiro Tatetsu, Hitoyuki Hata, Yoshinari Okamoto, Masao Matsuoka, Masami Otsuka, Yutaka Okuno Novel Compound, OSSSL_325096, Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells through VCP Inhibition

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学大学院薬学教育部 生体機能分子合成学分野

http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunsi_gouseiHP/index.html

熊本大学大学院生命科学研究部 生体機能分子合成学分野

<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 Mikako)
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