

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05754

研究課題名(和文) ニューロンを再生して脳機能を回復させる神経分化誘導物質の創製

研究課題名(英文) Development of a neuronal differentiation inducer that regenerates neurons and recovers brain function

研究代表者

須原 義智 (Suhara, Yoshitomo)

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：30297171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は幹細胞の神経細胞(ニューロン)への分化を強力に誘導する低分子の「神経分化誘導物質」を創出することを目標としている。我々はリード化合物としてビタミンKを見出し、その側鎖末端部分に脂溶性の官能基を結合させた化合物が、天然より強い分化誘導作用をもつことを明らかにしてきた。その知見を基にして、医薬シーズになり得る強力な活性化化合物を得るために、新たなビタミンK誘導体を設計・合成してin vitro試験でスクリーニングを行った。その結果、天然のビタミンKの中で最も強い分化誘導作用を示すMK-3と比較して、約2倍の活性を示す化合物を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、遺伝子導入を必要とせず、化合物による神経再生が可能であることにある。これにより、現在のiPS細胞による神経再生研究の課題とされている遺伝子導入によるがん化などの副作用を回避することができ、治療法の開発に向けた可能性が高まる。また、現在までに発見されている神経再生化合物はわずかであり、本研究で発見された化合物は脳神経の修復・再生に応用できる可能性がある。更に、超高齢化社会を迎える我が国において、脳疾患患者の治療法開発に貢献することが、社会的意義も大きいと言える。本研究成果は、神経再生の新たなアプローチを提供し、脳疾患の治療法の開発に大きな貢献をすることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to obtain small molecule 'neuronal differentiation inducers' that strongly induce the differentiation of stem cells into neuronal cells. We have discovered vitamin K as a lead compound and have shown that a compound with a fat-soluble functional group bound to the end of its side chain has a more potent differentiation-inducing effect than natural compounds. Based on these findings, we designed and synthesized new vitamin K derivatives and screening was carried out in vitro to obtain potent active compounds. As a result, we found a compound that exhibited approximately twice as much activity as MK-3, which exhibits the strongest differentiation-inducing activity among natural vitamin K.

研究分野：創薬化学

キーワード：ビタミンK メナキノン 神経分化誘導 幹細胞 ニューロン 神経変性疾患 再生医療 脳疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の脳梗塞を含む脳血管疾患の患者数は118万人に達し、その治療・介護にかかる年間医療費は1兆7730億円にもものぼることが報告されている。これらの疾患により引き起こされるマヒや失語症、記憶障害などの脳機能の障害は、脳神経の壊死が原因であり、元の状態に回復させる有効な治療法は見つかっていない。また現在、人工多能性幹細胞(iPS細胞)による神経再生の研究が国内外で行われているが、遺伝子導入によるがん化などの副作用が課題で、病気の治療に使うには10年以上かかるとされている。現在までに体内で神経再生を可能とする化合物は見つかっていない。しかし、iPS細胞から筋細胞や特定の細胞に分化させることができる「レチノイン酸」などの化合物がわずかであるが発見されており、本研究で見出す化合物によって神経再生は可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、最近益々注目されている「再生医療」の観点から、「失われた脳神経の再生」を目指しつつ、「脳を正常な状態に戻す」ための新たな治療法の開発を目標に基礎研究を行うものである。申請者は、脳神経の素となる脳神経幹細胞から脳神経細胞(ニューロン)への分化を、従来の遺伝子導入によらず、安全性の高い低分子の神経分化誘導物質によって誘導し、脳神経を修復・再生することを目指している(図1)。脳神経幹細胞は成人にも存在することが確認されている。そのため、このような化合物を創製できれば、成人の脳神経をも再生させることが可能であり、脳梗塞やパーキンソン病をはじめとした各種の脳機能の障害に対する治療法に応用できると考えている。

申請者は「ビタミンK」がマウス胎仔大脳由来の脳神経幹細胞をニューロンへ分化させる作用をもつことを見出し、誘導体化により活性の向上を果たした[J Med Chem, 2015]。しかし、EC₅₀値は数~数十μMであり、一般に医薬品のシーズになりうるnMレベルに引き上げるには、活性をさらに100倍以上向上させる必要がある。また細胞レベルのみならず、個体(動物)レベルにおいても有効な化合物を創出する必要がある。最近我々はトランスクリプトーム解析や阻害剤を用いた実験により、ビタミンKの神経分化誘導作用に関係する標的タンパク質は、脳内の代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)である可能性を突き止めた。代謝型グルタミン酸受容体は脳神経系に広く発現し、記憶や学習に関連しており、精神疾患の治療薬の標的分子としても注目されている。そこで、mGluR1に強く作用する化合物の創製も考慮に入れて研究を行うことにした。

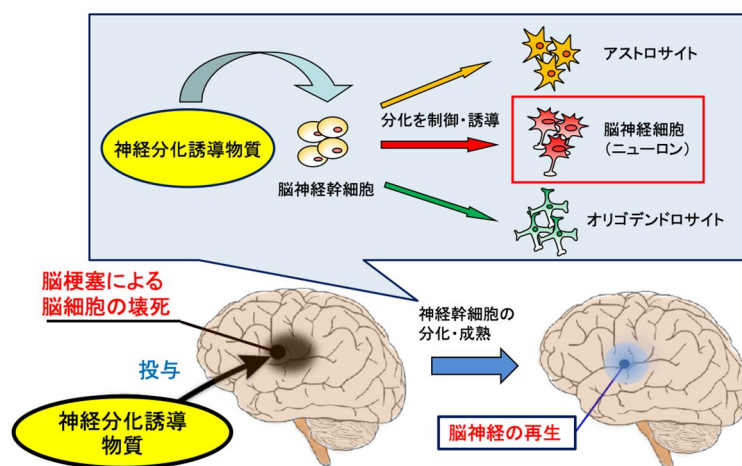


図1. 脳神経の再生・修復を促す神経分化誘導物質の創製

3. 研究の方法

(1) 分化誘導活性を示すビタミンK誘導体を簡便に合成する方法の確立

申請者がこれまでに見出した分化誘導活性をもつビタミンK誘導体の知見を基にして、側鎖末端に様々な置換基を導入した誘導体を合成し、新規の化合物ライブラリーを構築する。このとき、ビタミンKを環部分と側鎖部分に分けて、それぞれを出来るだけ簡便に合成する方法を確立する。

(2) 低分子化合物ライブラリー構築と高活性を示す化合物の選別

上記で確立した手法を用いて、低分子化合物ライブラリーの構築を加速する。また、化合物ライブラリーの分化誘導活性を評価するために、高効率なHigh-Throughput Screening法を用いる。細胞はマウス胎仔大脳由来の脳神経幹細胞を用いる。具体的な評価方法として、分化したニューロンの表面に特異的に発現するタンパク質(MAP2: Microtubule-Associated Protein 2)を認識する一次抗体と蛍光標識した二次抗体を用いて、化合物がどのくらい分化を促進したのか

を PCR もしくは細胞表面の蛍光強度によって測定する。得られた結果から活性化化合物を選別し、高活性を示す化合物を見出す。

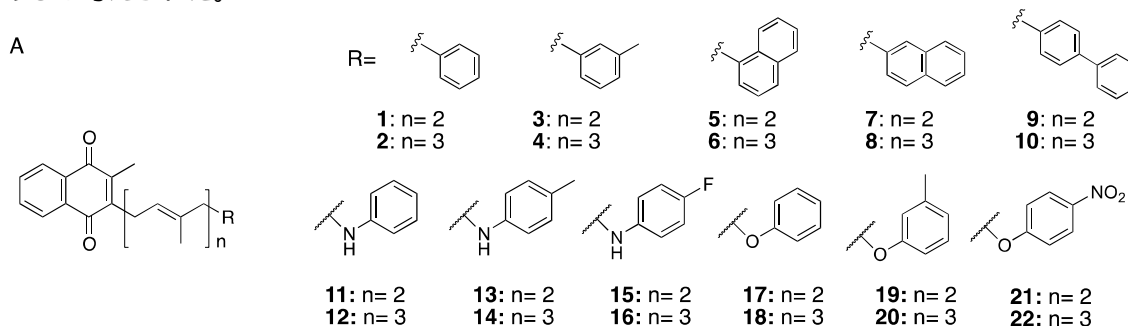
(3) より高活性を示す化合物を得るための考察と検証

上記で得られた結果から、化合物のどの部分が生物活性に重要なのかを、「ファーマコフォア解析」により考察する。次に、化合物の三次元構造と電子配置の関係を表す「ファーマコフォアモデル」を計算化学の手法により構築する。その情報を基にして新たな誘導体を設計し、さらに強い分化誘導活性を有する化合物を目指す。

4. 研究成果

これまでに我々は、側鎖末端に各種の芳香環を導入したビタミン K 誘導体 1-10 を合成し、フェニル基や *m*-メチルフェニル基をもつ化合物 1-4 が天然のビタミン K に比べて強い神経分化誘導作用をもつことを見出した。この知見を基に我々は、作用タンパク質との相互作用を期待して、側鎖末端にヘテロ原子を介し芳香環を導入したビタミン K 誘導体 11-22 を合成した (図 3 A)。その結果、ヘテロ原子とフェニル基に導入した置換基の神経分化誘導活性に及ぼす影響が明らかとなった。

次に、化合物 3 及び 4 の側鎖末端のフェニル基に結合しているメチル基が及ぼす影響を調べるために、メチル基が複数結合したフェニル基を導入した化合物を合成した (図 3 B)。興味深いことに、*tert*-ブチル基をもつ化合物 28 と 34 は最も強い分化誘導活性を有していたが、化合物 23 と 25 は反対にコントロール群より分化を抑制することが明らかとなった。すなわち、ビタミン K を基盤とした誘導体は、側鎖末端に導入した置換基により幹細胞分化を制御できる可能性があると考えられた。



B

	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
23:	1	CH ₃	CH ₃	H	H	H
24:	1	CH ₃	H	CH ₃	H	H
25:	1	H	CH ₃	CH ₃	H	H
26:	1	H	CH ₃	H	CH ₃	H
27:	1	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃
28:	1	H	^t Bu	H	H	H
29:	2	CH ₃	CH ₃	H	H	H
30:	2	CH ₃	H	CH ₃	H	H
31:	2	H	CH ₃	CH ₃	H	H
32:	2	H	CH ₃	H	CH ₃	H
33:	2	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃
34:	2	H	^t Bu	H	H	H

そこで、これらの化合物の知見を基に、新規化合物となるメナキノン類の側鎖末端に第二級アミンを介して主にシクロアルカンを結合させた化合物と上記の化合物 3 のベンゼン環に結合したメチル基をオクチル基まで伸長した化合物を合成した。シクロアルカンを導入した化合物の合成方法は、メナキノノン-2 を出発原料として、側鎖末端を二酸化セレンによりアルコールに変換し、さらに二酸化マンガンによりアルデヒドに酸化したものを共通中間体とした。このアルデヒド中間体にシクロアルキルアミンを還元のアミノ化反応によりカップリングさせて、目的とする化合物を得ることができた。シクロアルカンは、三員環のシクロプロピル基、四員環のシクロブチル基、五員環のシクロペンチル基、六員環のシクロヘキシル基、及びフェニル基の合計 5 種類を導入することに成功した。一方、化合物 3 の側鎖末端のアルキル基を伸長した誘導体は、*n*-ブチル基、*n*-ヘキシル基、*n*-オクチル基をグリニャール反応によって導入し合成することができた。

これら合成した化合物のうちシクロアルカンを持つ誘導体について、マウス胎仔大脳由来の神経肝細胞を用いてニューロンへの分化誘導作用を調べた。その結果、いずれの化合物も天然のビタミン K 同族体である MK-2 や MK-3 より約 2 倍活性が高く、フェニル、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン順に活性が増加することが明らかになった (論文作成中)。これは当研究室でこれまで合成してきた誘導体の中で最も活性が高い化合物であった。

もう一方のアルキル基を伸長した誘導体の分化誘導活性については現在検討中である。

今後はシクロアルカンやアルキル基以外に、さらに側鎖末端の脂溶性や電子の偏りなどの化学的性質を変化させたビタミンK誘導体をデザイン・合成し、神経幹細胞のニューロンへの分化誘導活性を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chen Xuejie, Furukawa Natsuko, Jin Da Yun, Liu Yizhou, Stafford Darrel W., Williams Craig M., Suhara Yoshitomo, Tie Jian Ke	4. 巻 1
2. 論文標題 Naturally occurring UBIAD1 mutations differentially affect menaquinone biosynthesis and vitamin K dependent carboxylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Chen Xuejie, Liu Yizhou, Furukawa Natsuko, Jin Da Yun, Paul Savage G., Stafford Darrel W., Suhara Yoshitomo, Williams Craig M., Tie Jian Ke	4. 巻 19
2. 論文標題 A novel vitamin K derived anticoagulant tolerant to genetic variations of vitamin K epoxide reductase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 689 ~ 700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.15209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Furukawa Natsuko, Chen Xuejie, Asano Satoshi, Matsumoto Marina, Wu Yuxin, Murata Kohei, Takeuchi Atsuko, Tode Chisato, Homma Taiki, Koharazawa Ryohto, Usami Kouki, Tie Jian-Ke, Hirota Yoshihisa, Suhara Yoshitomo	4. 巻 1276
2. 論文標題 Synthesis of new vitamin K derivatives with a ketone group at the C-1 position of the side chain and their conversion to menaquinone-4	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Structure	6. 最初と最後の頁 134614 ~ 134614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molstruc.2022.134614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshimura Hiroshi, Hirota Yoshihisa, Soda Seiya, Okazeri Mayu, Takagi Yuta, Takeuchi Atsuko, Tode Chisato, Kamao Maya, Osakabe Naomi, Suhara Yoshitomo	4. 巻 30
2. 論文標題 Study on structure?activity relationship of vitamin K derivatives: Conversion of the naphthoquinone part into another aromatic ring and evaluation of their neuronal differentiation-inducing activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127059 ~ 127059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2020.127059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 本間大暉、岡本実佳、馬場昌範、須原義智
2. 発表標題 抗SARS-CoV-2活性を有する脂溶性ビタミン誘導体の創製
3. 学会等名 第27回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間大暉、岡本実佳、馬場昌範、須原義智
2. 発表標題 抗ウイルス活性を有する新規ビタミン誘導体の研究
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間大暉、岡本実佳、馬場昌範、須原義智
2. 発表標題 脂溶性ビタミンを基にした新型コロナウイルスSARS-CoV-2の増殖抑制作用を有する化合物の探索
3. 学会等名 第64回天然物有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間大暉、呉 雨馨、廣田 佳久、須原 義智
2. 発表標題 神経細胞への分化を誘導する新規ビタミンK誘導体の合成
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小原沢諒人、廣田佳久、須原義智
2. 発表標題 抗ウイルス作用を有するビタミンK3誘導体の合成
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小原沢諒人、早川真由、廣田佳久、須原義智
2. 発表標題 ビタミンKとその誘導体の抗3CLprotease活性の評価
3. 学会等名 第27回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川 奈津子、Jian-Ke Tie、浅野公志、呉雨馨、廣田佳久、須原義智
2. 発表標題 -glutamyl carboxylase に対する補酵素活性を高めたビタミン K 誘導体の創製
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 呉雨馨、古川奈津子、鈴木章平、新井佑、須原義智、廣田佳久
2. 発表標題 GGCX活性上昇を目指したビタミンK誘導体による神経分化能の評価
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川奈津子、Jian-Ke Tie、浅野公志、呉雨馨、鈴木章平、廣田佳久、須原義智
2. 発表標題 ビタミンK依存性タンパク質に対するカルボキシル化活性を強めるビタミンK誘導体の合成
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小原沢諒人、岡本実佳、本間大暉、早川真由、廣田佳久、馬場昌範、須原義智
2. 発表標題 抗SARS-CoV-2 活性を有するビタミンK 誘導体の創製
3. 学会等名 日本ビタミン学会第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇佐美昂紀、古川奈津子、須原義智
2. 発表標題 GGCX阻害活性を有するビタミンK誘導体の創製
3. 学会等名 日本ビタミン学会第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小原沢 諒人、早川 真由、宮崎 琴音、廣田 佳久、須原 義智
2. 発表標題 抗ウイルス作用を有するビタミンK誘導体の創製
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本間大暉、岡本 実佳、馬場 昌範、須原 義智
2. 発表標題 脂溶性ビタミンを基にした新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の増殖抑制作用を有する化合物の探索
3. 学会等名 第64回 天然有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間大暉、岡本実佳、馬場昌範、須原義智
2. 発表標題 抗ウイルス活性を有する新規ビタミン誘導体の研究
3. 学会等名 第66回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小原沢諒人、廣田佳久、須原義智
2. 発表標題 抗ウイルス作用を有するビタミン K3 誘導体の合成
3. 学会等名 第66回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Natsuko Furukawa, Satoshi Asano, Erina Matsumoto, Yoshihisa Hirota, and Yoshitomo Suhara
2. 発表標題 Synthesis of Vitamin K Derivatives with High Conversion Rates to Menaquinone-4
3. 学会等名 SEATUC 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間大暉、岡本実佳、馬場昌範、須原義智
2. 発表標題 抗ウイルス活性を有する新規ビタミン誘導体の研究
3. 学会等名 日本ビタミン学会第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間 大暉、呉 雨馨、廣田 佳久、須原 義智
2. 発表標題 神経細胞への分化を誘導する新規ビタミンK誘導体の合成
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川奈津子、Jian-Ke Tie、須原義智
2. 発表標題 ビタミンK依存性タンパク質に対するカルボキシル化活性を調節する誘導体の合成
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間大暉、呉雨馨、廣田 佳久、須原 義智
2. 発表標題 神経細胞への分化を誘導する新規ビタミンK誘導体の合成
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 望遥、伊東 優貴、佐野 翔、渡辺 紗代、廣田 佳久、須原義智
2. 発表標題 結合タンパク質を蛍光標識するビタミンK誘導体の合成
3. 学会等名 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須原義智
2. 発表標題 ビタミンKの誘導体化による新規生理活性物質の探索
3. 学会等名 国際ビタミンK2シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shinya Fujii, Yoshitomo Suhara, Hiroyuki Kagechika	4. 発行年 2022年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 116
3. 書名 Vitamin K - Recent Topics on the Biology and Chemistry	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗SARS-CoV-2剤及び化合物の使用	発明者 須原義智、岡本実佳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-070303号	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科 創薬化学研究室
https://suhara-lab.org

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	廣田 佳久 (Hirota Yoshihisa)	芝浦工業大学・システム理工学部・准教授 (32619)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of North Carolina			
英国	University of Portsmouth			