

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06951

研究課題名(和文) 合成化学を基盤としたアルツハイマー病治療薬のリード探索

研究課題名(英文) Lead discovery for Alzheimer's disease through synthetic organic chemistry

研究代表者

小林 健一 (KOBAYASHI, Kenichi)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：30639282

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)：1. アミロイド (A) 凝集阻害剤のリード探索を目指し、高度に官能基化された  $\beta$ -ラクタム含有天然物の合成研究を行い、talaramide A、rubrobramide、berkeleyamide D、euvesperin AとBの全合成に成功した。合成した天然物のうち、berkeleyamide DはA 凝集阻害活性を示した。また、L-755,807の構造活性相関研究の結果、A 凝集阻害活性には疎水性炭素鎖と水溶性官能基の組み合わせが重要であることを明らかにした。

2. 尿素骨格を含むBACE1阻害活性化合物をリード化合物として誘導体合成を行い、高活性なN,N-ジブチルアミド誘導体を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. talaramide A、rubrobramide、及び、euvesperin AとBの合成については初のエナンチオ選択的な合成例であり、学術的なインパクトは非常に大きい。また、スピロ構造のberkeleyamide DがA 凝集阻害活性を示したことや、L-755,807の構造活性相関研究からファーマコフォアを解明できたことは、天然物をリードとしたA 凝集阻害剤の開発における重要な知見である。

2. 尿素骨格を含む高活性なBACE1阻害剤の創製に成功し、マウスを用いた活性評価においてもある程度の効果を確認できたため、アルツハイマー病治療薬の開発に繋がる成果と期待される。

研究成果の概要(英文)：1. Toward lead discovery of inhibitors of A aggregation, total synthesis of the  $\beta$ -lactam-containing natural products including talaramide A, rubrobramide, berkeleyamide D, and euvesperins A and B were achieved. Among the synthetic natural products, only berkeleyamide D with a spirocyclic skeleton showed moderate inhibitory activity against A aggregation. In addition, structure-activity relationship (SAR) studies of L-755,807 analogs revealed that a combination of a hydrophobic carbon chain and a terminal hydrophilic functional group is important for A aggregation inhibitory activity.

2. SAR studies of BACE1 inhibitors with a urea functional group led to a discovery of a highly active N,N-dibutylamide derivative.

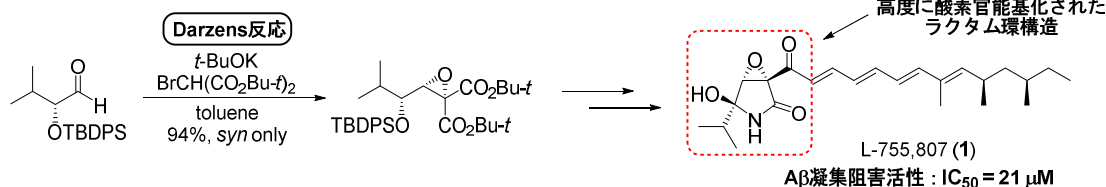
研究分野：有機合成化学、創薬化学

キーワード：天然物合成 構造活性相関 アルツハイマー病 アミロイド 凝集阻害剤 BACE1阻害剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

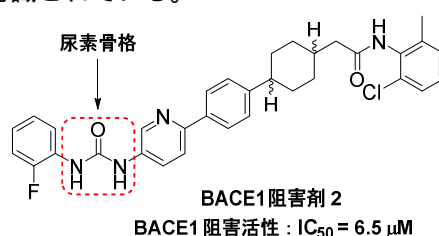
1. 研究開始当初の背景

(1) 高度に酸素官能基化された  $\beta$ -ラクタム構造を有する天然物は、多様な生物活性を示すことから医薬品開発のためのリード化合物として注目され、多くの有機合成化学者の全合成ターゲットとされてきた。申請者はこれら天然物の特徴的な化学構造と生物活性に興味を持ち、全合成と生物活性評価を行ってきた。その中で、申請者らが独自に開発したジアステレオ選択的な Darzens 反応<sup>1</sup>を鍵反応として、L-755,807 の初の全合成に成功した。<sup>2</sup> また、プラジキニン B2 受容体拮抗作用物質として単離されたこの天然物が、強力なアミロイド (A $\beta$ )凝集阻害作用を有することを新たに見出した。<sup>3,4</sup> A $\beta$  はアルツハイマー病の原因タンパク質と考えられているため、A $\beta$  の凝集を阻害する物質はアルツハイマー病の治療薬候補として期待される。



(2) BACE1 は A $\beta$  前駆体タンパク質から A $\beta$  が産生される際に働く酵素である。アルツハイマー病の発症は、A $\beta$  の異常な蓄積が原因の一つと考えられているため、BACE1 阻害剤はアルツハイマー病の治療薬開発のための重要な標的酵素として認識されている。

申請者は以前、右に示す尿素構造を有する多環式の BACE1 阻害活性化合物を見出した。この化合物は、培養細胞を用いたアッセイにおいても活性を示したことから有望なリード化合物であり、構造活性相関を明らかにすることで、より高活性な誘導体の創製が期待される。また、アルツハイマー病治療薬の開発に向け、疾患モデルマウスを用いた評価にも興味もたれる。



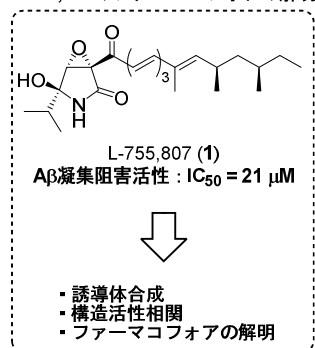
2. 研究の目的

- (1) L-755,807 に類似した  $\beta$ -ラクタム含有天然物を網羅的に全合成し、それらの A $\beta$  凝集阻害活性を評価する。また、医薬品リードとして期待される L-755,807 のファーマコフォア解明に向けた構造活性相関研究を行う。
- (2) 上記の BACE1 阻害活性化合物をリード化合物として各種誘導体合成を行い、構造活性相関を明らかにし、より高活性な誘導体の創製を目指す。また、合成した BACE1 阻害活性化合物がアルツハイマー病モデルマウスにおいて効果があるか検討する。

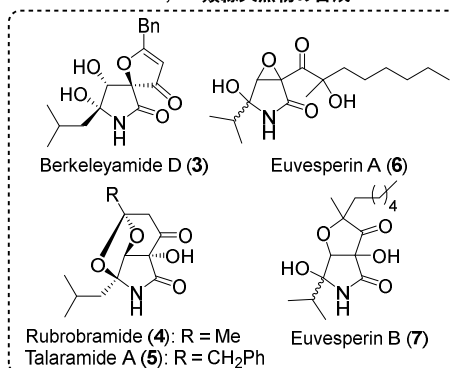
3. 研究の方法

- (1) 以前開発したジアステレオ選択的な Darzens 反応の生成物であるエポキシジエステルを共通中間体として、L-755,807 の類縁天然物である berkeleyamide D、rubrobramide、talaramide A、euvesperin A 及び B の全合成を行う。また、L-755,807 のファーマコフォアを解明するため、各種誘導体を合成して A $\beta$  凝集阻害活性を評価する。

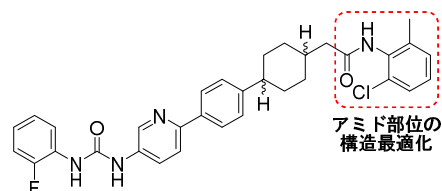
L-755,807のファーマコフォアの解明



L-755,807類縁天然物の合成



- (2) 申請者が見出した BACE1 阻害剤の基本骨格は、右に示すような尿素構造、4 個の環構造、及び末端アミドから成る。そこで、これらの個別最適化により活性の向上を目指す。本研究ではまず、誘導体化が容易な末端のアミド部位に関する誘導体を多数合成し、BACE1 阻害活性を評価する。

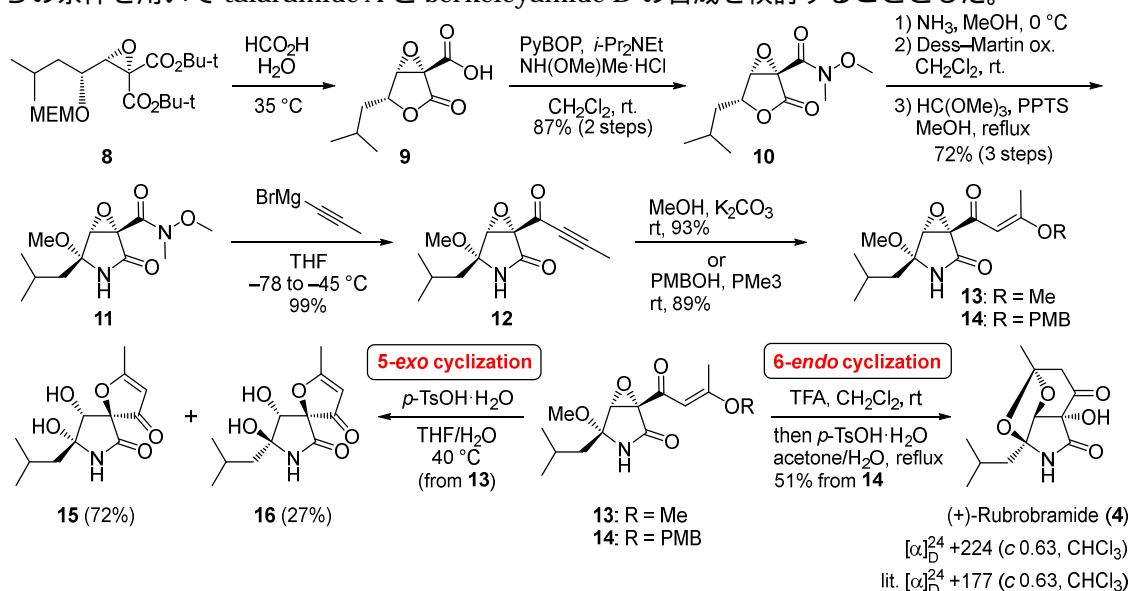


#### 4. 研究成果

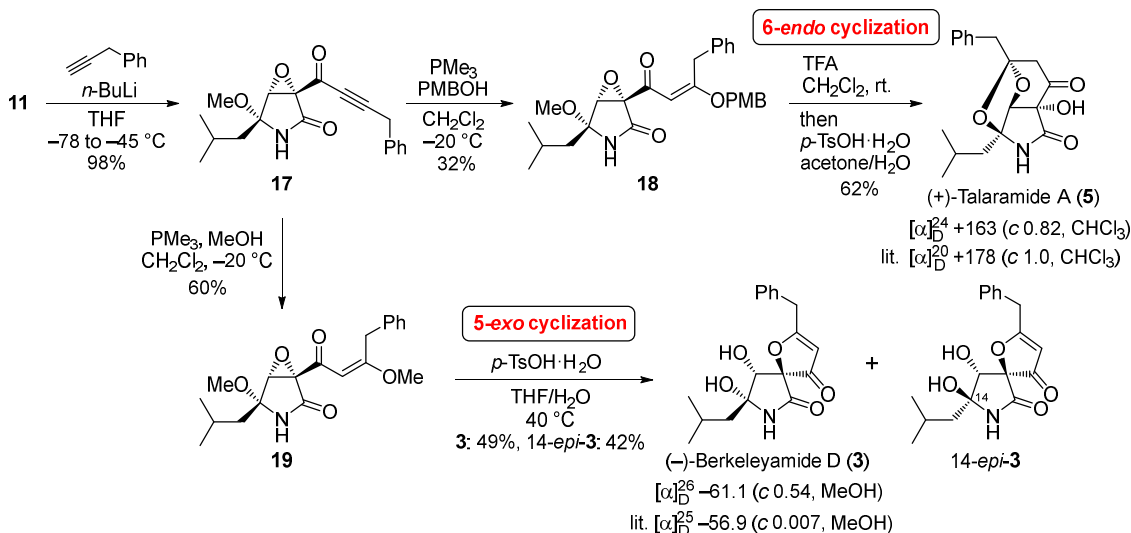
##### Berkeleyamide D、Rubrobramide、Talaramide A の全合成

Darzens 反応生成物 **8** をギ酸で処理することで MEM 基と *t*-ブチル基の脱保護を行うと、同時にラクトン化が進行してモノカルボン酸 **9** が得られた。PyBOP を用いて Weinreb アミド化して **10** とした後、アンモニアでラクトンを開環させた。Dess-Martin 酸化でヘミアミナルとした後、メタノール溶媒中 HC(OMe)<sub>3</sub> と PPTS で処理することでアミナル **11** へと変換した。得られたアミナル **11** に Grignard 試薬を作用させることでイノン **12** を合成した後、メタノールまたは PMBOH を 1,4-付加させることでビニロガスエステル **13** 及び **14** に導いた。

続いて、**13** の 6-*endo* 環化による (+)-rubrobramide への変換を種々検討した結果、3 当量の *p*-TsOH · H<sub>2</sub>O で処理することで (+)-rubrobramide を収率 40% で得ることができた。ビニロガスエステル部位が脱保護されやすい基質 **14** を用いて 6-*endo* 環化を再度検討した結果、10 当量の TFA と反応させた後、アセトン/水の混合溶媒中 1 当量の *p*-TsOH · H<sub>2</sub>O で処理すると、rubrobramide の収率が 51% まで向上した。以上により、(+)-rubrobramide の初のエナンチオ選択的な全合成を達成した。一方、ビニロガスエステル **13** を THF/水の混合溶媒中 *p*-TsOH · H<sub>2</sub>O で処理すると、5-*exo* 環化が進行してスピロ構造を有する化合物 **15** 及び **16** が高収率で得られた。6-*endo* 環化及び 5-*exo* 環化をそれぞれ選択的に進行させる条件を見出したため、これらの条件を用いて talaramide A と berkeleyamide D の合成を検討することとした。



先に合成したアミナル **11** にリチウムアセチドを反応させてイノン **17** とした後、PMBOH を 1,4-付加させてビニロガスエステル **18** とした。(+)-Rubrobramide の合成を参考に 6-*endo* 環化を行い、(+)-talaramide A の初のエナンチオ選択的な全合成を達成した。一方、**17** から誘導したビニロガスエステル **19** を THF/水の混合溶媒中 *p*-TsOH · H<sub>2</sub>O で処理すると、期待したとおり 5-*exo* 環化が進行して、(-)-berkeleyamide D とその 14-*epi* 体を得ることに成功した。

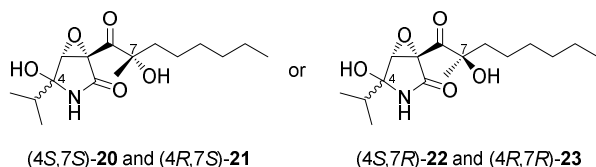


合成した天然物とその誘導体のアミロイド凝集阻害活性を測定したところ、3 環性構造の rubrobramide と talaramide A は全く活性を示さなかった。一方、スピロ構造を有する berkeleyamide D、その 14-*epi* 体、化合物 **15** 及び **16** は中程度ながら活性を示すことが明らかとなった。<sup>5</sup>

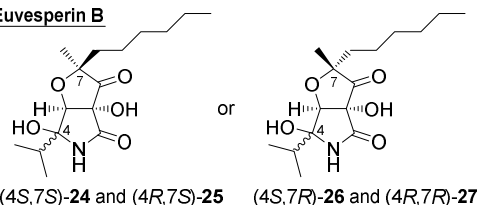
## Euvesperin A 及び B の全合成

Euvesperin A 及び B は、C-4 位に関するジアステレオマー混合物として報告されているが、それ以外の不斉中心の立体配置は不明である。そこで類縁天然物の立体配置を参考に、euvesperin A と B をそれぞれ以下に示す構造と推定して全合成研究を行った。

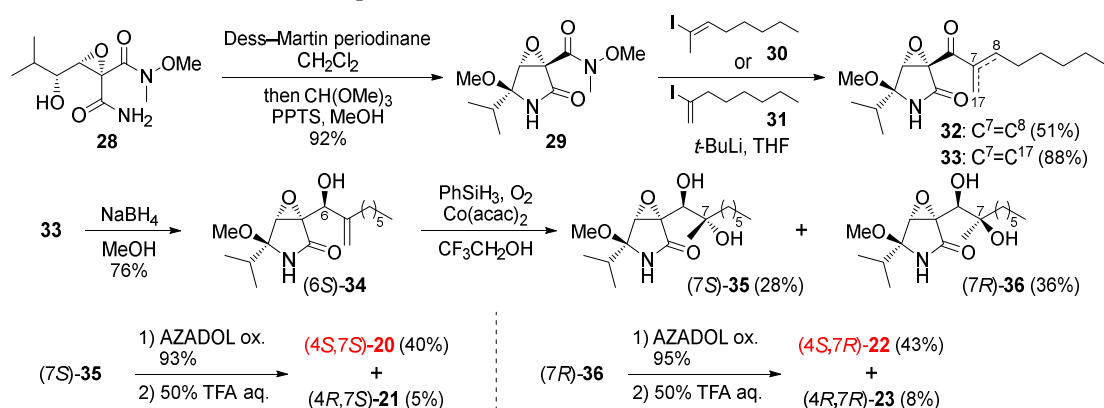
### Euvesperin A



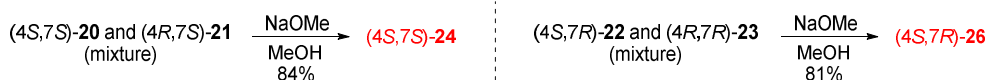
### Euvesperin B



L-755,807 の合成中間体 **28** を、Dess-Martin 酸化とアミナル化により **29** へと誘導した後、ビニルリチウム種を反応させて **32** 及び **33** を合成した。高収率で得られた **33** のエノン部位を 1,2-還元して得られる (6S)-**34** に対して向山水和反応を行ったところ、(7S)-**35** と (7R)-**36** を分離ができた。ジオール **35** 及び **36** をそれぞれ酸化と加水分解を行い、euvesperin A の推定構造 **20** ~ **23** を合成することに成功した。合成した化合物と天然物の NMR スペクトルを比較した結果、当初の予想に反して、**20** と **22** が euvesperin A と一致することが判明した。Euvesperin A の推定生合成も考慮し、euvesperin A は **20** と **22** のエナンチオマーの混合物と考えている。

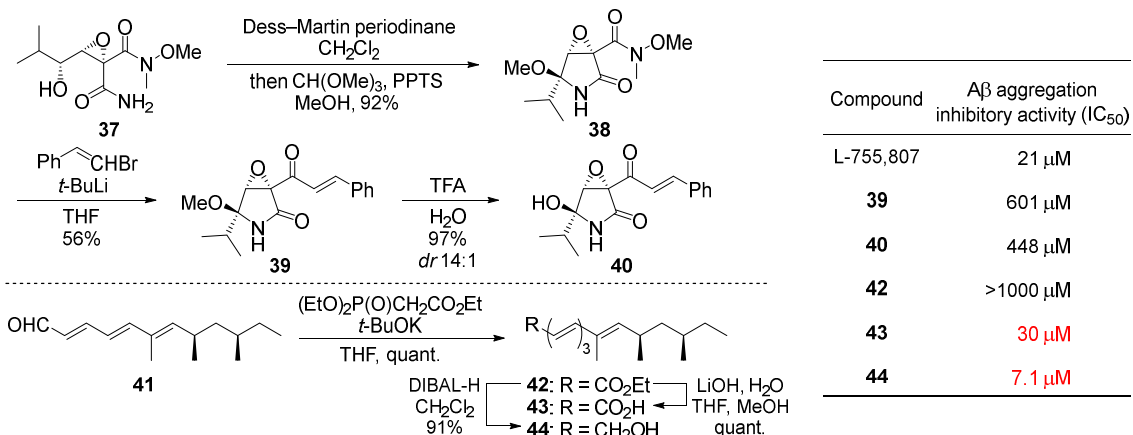


合成した **20** ~ **23** を用いて euvesperin B の推定構造への変換を行った。化合物 **20** と **21** の混合物を塩基で処理すると、**24** が単一のジアステレオマーとして得られた。同様に、**22** と **23** の混合物からは **26** が得られた。**24** と **26** の NMR スペクトルは、euvesperin B の各異性体と完全に一致した。Euvesperin B は euvesperin A から生合成されると考えられるため、euvesperin B は **24** と **26** のエナンチオマーの混合物であると推測される。なお、euvesperin A と B はいずれもアミロイド凝集阻害活性を示さなかった。



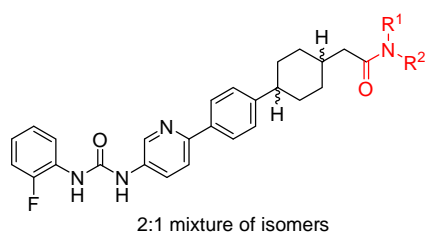
## L-755,807 のファーマコフォア解明に向けた構造活性相関研究

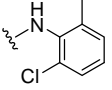
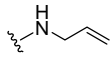
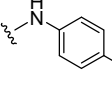
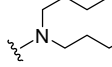
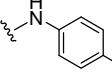
アミロイド凝集阻害活性を示す L-755,807 のファーマコフォア解明に向けて、構造活性相関研究を行った。天然物の環部に相当する **39** と **40**、側鎖部に相当する **42** ~ **44** のアミロイド凝集阻害活性を評価した結果、**39** と **40** は天然物より活性が大きく低下したが、**43** は天然物と同程度、**44** は天然物の 3 倍程度強い活性を示した。この結果から、アミロイド凝集阻害活性の発現には、疎水性の炭素鎖と末端の水溶性官能基の組み合わせが重要であることが判明した。<sup>6</sup>



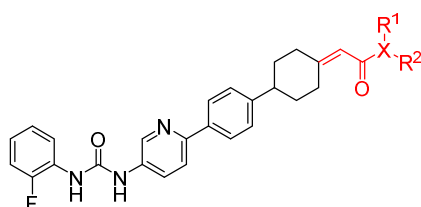
## BACE1 阻害活性化合物の創薬研究

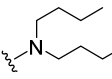
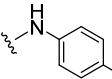
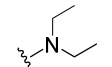
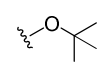
申請者が以前見出した BACE1 阻害活性化合物 **2** をリード化合物とし、末端のアミド部位に関する誘導体 **45** ~ **48** を合成して活性評価した結果、*N,N*-ジブチルアミド体 **48** が **2** よりも 25 倍程度活性が増強した。



Compound	IC <sub>50</sub>	Compound	IC <sub>50</sub>
	<b>2</b> 6.5 μM		<b>47</b> 3.5 μM
	<b>45</b> 2.4 μM		<b>48</b> 0.27 μM
	<b>46</b> 1.6 μM		

上記の **2** 及び **45** ~ **48** は、合成の都合上いずれも 2:1 のジアステレオマー混合物であった。そこで、ジアステレオマーが生じない不飽和型の誘導体 **49** ~ **52** を合成・活性評価したところ、こちらも *N,N*-ジブチルアミド体 **49** が最も強い活性を示した。なお、*tert*-ブチルエステル体 **52** も強い活性が保持された。



Compound	IC <sub>50</sub>	Compound	IC <sub>50</sub>
	<b>49</b> 0.73 μM		<b>51</b> 1.1 μM
	<b>50</b> 1.1 μM		<b>52</b> 8.3 μM

合成した 9 化合物のうち、*in vitro* では *N,N*-ジブチルアミド体 **48** が最も強い活性を示したが、培養細胞系では *N*-アリルアミド体 **47** に BACE1 阻害活性がみられたため、**47** を有望なリード化合物としてさらに検討を進めた。化合物 **47** はシクロヘキサン環部に関する 2:1 のジアステレオマー混合物であったため、まず両ジアステレオマーの活性値に差があるかを検証するため、両ジアステレオマーの立体選択的な合成を検討したが合成には至らなかった。そこで最終生成物での分離条件を種々検討したところ、ジアステレオマーの分離に成功した。

化合物 **47** の両ジアステレオマーの BACE1 阻害活性を評価した結果、活性に 10 倍程度の差があることが明らかとなり、シクロヘキサン環部の立体化学が活性に大きな影響を与えることが分かった。また、3 カ月齢のアルツハイマーモデルマウスを用いて **47** の活性評価を行った結果、アミロイドベータの蓄積が低減することを確認できた。しかし、効果を示す個体と示さない個体があったため、統計的に有意差があるかを判断するには、個体数を増やしての検討が必要と考えられる。

## 参考文献

- Efficient Synthesis of *syn*- $\alpha$ -alkoxy Epoxide via a Diastereoselective Darzens Reaction  
Tanaka III, K.; Kobayashi, K.; Kogen, H. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 2062-2067.
- Total Synthesis of (-)-L-755,807: Establishment of Relative and Absolute Configurations  
Tanaka III, K.; Kobayashi, K.; Kogen, H. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1920-1923.
- Total Synthesis, Stereochemical Assignment, and Biological Evaluation of L-755,807  
Tanaka III, K.; Honma, Y.; Yamaguchi, C.; Aoki, L.; Saito, M.; Suzuki, M.; Arahata, K.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Kobayashi, K.; Kogen, H. *Tetrahedron* **2019**, *75*, 1085-1097.
- Total Synthesis and Amyloid  $\beta$  Aggregation Inhibitory Activity of (-)-L-755,807  
Tanaka III, K.; Kobayashi, K.; Kogen, H. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2019**, *77*, 673-683.
- Enantioselective Total Synthesis of (+)-Rubrobramide, (+)-Talaramide A, and (-)-Berkeleyamide D by a Skeletal Diversification Strategy  
Tanaka III, K.; Kobayashi, K.; Kogen, H. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 9780-9783.
- Studies toward Identifying the Pharmacophore of L-755,807 for Amyloid- $\beta$  Aggregation Inhibitory Activity  
Kobayashi, K.; Tanaka III, K.; Honma, Y.; Suzuki, M.; Kogen, H. *Heterocycles* **2019**, *98*, 1769-1776.

## 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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Yuki, Nishizono Naozumi, Kobayashi Daisuke, Yoshimura Teruki, Wada Keiji, Kobayashi Kenichi, Oda Kazuaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives as selective CYP2A6 inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 129206 ~ 129206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2023.129206	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 -
1. 著者名 Kobayashi Kenichi, Kogen Hiroshi, Tamura Osamu	4. 巻 80
2. 論文標題 Total Synthesis of Phaeosphaerides with STAT3 Inhibitory Activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 755 ~ 765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.80.755	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 -
1. 著者名 Suzuki Momoko, Ogawa Ryuichi, Echizen Hiroto, Kogen Hiroshi, Kobayashi Kenichi	4. 巻 45
2. 論文標題 Concise synthesis of the major metabolite M8 from ticagrelor and simultaneous determination of ticagrelor and M8 by a novel LC/MS method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 716 ~ 720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1747519821991993	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 -
1. 著者名 Tanaka Kosaku, Kobayashi Kenichi, Kogen Hiroshi	4. 巻 57
2. 論文標題 Enantioselective total synthesis of (+)-rubrobramide, (+)-talaramide A, and (-)-berkeleyamide D by a skeletal diversification strategy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 9780 ~ 9783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cc04290d	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 -

1. 著者名 Tanaka Kosaku III, Kogen Hiroshi, Kobayashi Kenichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Highly Oxidized $\beta$ -Lactam-containing Natural Products: Total Synthesis and Biological Evaluation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/REV-20-944	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木桃子、小林健一
2. 発表標題 抗真菌活性物質natalamycin Aの全合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会 (札幌)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平山裕一郎、松永征宏、深尾文香、小林健一
2. 発表標題 STAT3阻害天然物phaeosphaeride類の構造活性相関とケミカルバイオロジー研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会 (札幌)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中耕作三世、小林健一、古源寛
2. 発表標題 環化形式の制御による(+)-rubrobramide、(+)-talaramide A、及び(-)-berkeleyamide全合成
3. 学会等名 日本薬学会関東支部大会 (横浜)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木桃子、小林健一
2. 発表標題 抗真菌活性物質natalamycin Aの全合成研究
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2022年夏季研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木桃子、小林健一
2. 発表標題 Natalamycin Aの全合成研究
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第149回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松村建治、倉林七海宏、古源寛、小林健一
2. 発表標題 アルベカシン耐性MRSAに対する耐性解除物質biverlactone類の合成研究
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口由基、長谷川凌平、水落 潤、平山裕一郎、小林健一
2. 発表標題 クマリン誘導体のアロマトラーゼ阻害に関する構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会（広島）
4. 発表年 2021年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kogen Hiroshi、Kobayashi Kenichi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 260
3. 書名 Advances in Chemistry Research. Volume 66	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道医療大学薬学部 創薬化学講座（薬化学）HP <a href="http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/course-guide/course/pharm/yakkagaku/top/">http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/course-guide/course/pharm/yakkagaku/top/</a>
---

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------