

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790120

研究課題名（和文）PKC-ε選択的活性化による新規抗認知症治療剤創製と新規ターゲット探索

研究課題名（英文）Development and mechanistic study of novel anti-Alzheimer's disease drugs with PKC-ε selective activation

研究代表者 清水 忠 (SHIMIZU TADASHI)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：40509022

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、リパーゼの光学分割を鍵として *in vivo* 実験に供し得る量の合成に対応可能な光学活性 DCP-LA の合成に成功し、*in vivo* においても、 $\alpha,\beta$ -DCP-LA が高い活性を持つことを明らかとした。さらに、市販の化合物から容易に合成できる新規誘導体 HUHS2002 および抗炎症薬インドメタシンが DCP-LA と同様の薬理活性を有することを明らかとした。さらに、光学活性 DCP-LA を用いたターゲット探索研究により、有望なターゲット蛋白質候補の同定に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

We have already synthetic route for the preparation of all of the four isomers of enantiomerically pure DCP-LA employing lipase-mediated resolution method, and found the most active stereoisomers. However, first synthetic route was difficult for gram-scale synthesis of optically active DCP-LA. In this research, we have developed synthetic route for gram-scale preparation of all of the four isomers of enantiomerically pure DCP-LA, and found the most active stereoisomers *in vivo* system. In addition, we found that novel free fatty acid derivative HUHS2002 activated  $\alpha 7$  ACh receptor responses. Furthermore, we identified some candidates of target protein of DCP-LA with affinity chromatography methods.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 総計      | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

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：医薬品化学、PKC-ε、認知症治療剤、DCP-LA、構造活性相関、ターゲット探索

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 抗認知症治療剤創製に向けた光学活性 DCP-LA 創出 高齢化時代の現代において認知症治療は、患者本人の苦しみだけでなく家族負担も大きく、創薬研究が解決しなければならない重要課題のひとつである。これまで、我が国で開発されたアリセプトなどの薬剤が臨床現場において一定の有効性を示してきているが、残念ながら患者ニーズを十分満足しているとは言い難い現状であ

る。

共同研究者の田中、西崎らはアラキドン酸、リノール酸などの生理活性脂肪酸による海馬領域におけるシナプス伝達長期増強作用 (long-term potentiation, LTP) に着目し、DCP-LA (dicyclopopyl linolic acid) 創製に成功し、各種認知症モデルにおける有効性を確認することに成功している。また、西崎らの研究により、DCP-LA (ラセミ体) は世界で初めての PKC-ε 選択活性化剤であること

が明らかとなっている。また、DCP-LA は細胞レベルでは、シナプス前終末における $\alpha 7\text{ACh}$  受容体反応を増大し、およびそれに引き続いたシナプス間隙へのグルタミン酸放出量増大作用を有することも明らかとなっている。しかし、DCP-LA が構造的に 4 種類の光学活性体混合物（ラセミ体）であることから、光学活性体の分割合成が急務であった。

## （2）PKC 活性化メカニズム解明と抗認知症

PKC は 1977 年に神戸大学・西塚等によって発見された Ser/Thr リン酸化酵素で、広範な生物反応において重要な働きを行っていることが知られている。PKC は一般にジアシルグリセロール (DG) および  $\text{Ca}^{2+}$  などによって活性化されるが、遊離脂肪酸によっても活性化されることが知られている。しかし、一般に生理活性脂肪酸あるいは飽和脂肪酸による PKC 活性化は、PKC サブタイプ (conventional タイプ:  $\alpha$ ,  $\beta\text{I}$ ,  $\beta\text{II}$ ,  $\gamma$ , novel タイプ:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ , atypical タイプ:  $\xi$ ,  $\lambda/\iota$ ) 選択性はほとんど無いことが知られており、上述の DCP-LA の PKC- $\epsilon$  選択性は興味深い性質である。

一方、Bryostatins は抗がん剤として開発が進む非選択的 PKC 活性化剤であるが、近年臨床上の記憶促進作用が明らかにされ、PKC 活性化と抗認知症効果との関係に注目が集まっている。しかし、PKC は一般に基質特異性が低い kinase であるため、記憶促進に関与する分子内メカニズムは未解決な課題である。GFP 融合蛋白質を用いた研究から、生理活性脂肪酸によって活性化された PKC は、脂肪酸構造特異的に translocate する細胞 organs が異なることが知られているが、田中らはラセミ体 DCP-LA 固定化アフィニティ樹脂を用いた研究から、DCP-LA 特異的結合タンパク質として、シナプス前終末における神経伝達物質含有小胞体放出 (膜融合) に重要なタンパク質の同定に成功しており、PKC による抗認知症効果と神経伝達物質放出メカニズムとの関係、および創薬ターゲットとしての当該蛋白質との関係に注目が集まっている。

我々は H20-21 科研費 (若手研究スタートアップ) 研究により、4 種の DCP-LA 分割合成に成功し、ある光学異性体のみで PKC- $\epsilon$  活性化能があることを突き止めていた。しかし、現行合成ルートでは、特定の光学異性 DCP-LA の大量合成が困難であること、および構造活性相関取得に向けた誘導体合成に不向きであることから、その改良合成法の開拓が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究は以下の 3 点に焦点を絞り、研究を開始した。

### （1）光学活性 DCP-LA 大量合成法の開拓

第一合成ルートは 16 ステップからなり、効率的な合成ルートではない (total yield=1.0%)。そのため、光学活性 DCP-LA 体の効率的な合成ルートを構築し、*in vivo* 薬理評価を充分に行えるサンプル量を合成する計画である。そして、*in vivo* を中心とした抗認知症モデル実験、および安全性評価を行

い、光学的にも単一でかつ抗認知症モデルで有効な DCP-LA を特定し、新たな抗認知症治療薬物 (あるいはシード) を創出することにある。また、同時に他の 3 種類の光学異性体合成も行い、*in vitro* における PKC- $\epsilon$  活性化作用と *in vivo* における抗認知症効果との関係を明確にする計画を立てた。

### （2）誘導体合成および構造活性相関研究

DCP-LA 関連誘導体合成は上述の合成的制限から、ほとんど行われていない。そこで、(1) で開発予定の合成ルートを活用し、今後の創薬研究に必要な構造活性相関を明らかにし、DCP-LA を凌ぐ新規化合物創出を目指す計画であった。

### （3）ターゲット探索

これまでの検討からラセミ体 DCP-LA は PKC- $\epsilon$  を選択的に活性化することが知られているが、活性型 PKC- $\epsilon$  が基質とする蛋白質をはじめ、抗認知症効果を担うターゲット蛋白質は未確定のままである。これまでの情報から、DCP-LA は PKC- $\epsilon$  の酵素的な活性化と共に、その translocation にも関与し、抗認知症効果に向けたシグナルにも関与している可能性が示唆されている。事実、PKC 活性化に必要なと考える COOH 基を介し固定化され、PKC との結合能を消失していると考えられるアフィニティ樹脂を用いた検討から、膜融合に重要なタンパク質 NSF が特異的結合蛋白質として同定されている。PKC- $\epsilon$  を選択的に活性化する光学活性 DCP-LA に関する *in vivo* 抗認知症効果について得られていないが、脂肪酸アルキル部位のわずかな構造変化 (シクロプロパン環の立体構造) による特異的結合蛋白質の違いを明確にすることによって、より詳細なメカニズム解明が進むものと期待している。一般に、単なる膜アンカー構造と考えられることが多い脂肪酸アルキル構造に関する特異的認識機構が明らかになれば、新たな抗認知症治療剤開拓研究に貢献できるだけでなく、生理活性脂肪酸の薬理効果解明にも貢献できるものと期待した。

## 3. 研究の方法

本研究は大きく次の 3 つのステップから構成された。

### （1）光学活性 DCP-LA 大量合成法の開拓

現行法は大量合成に適しておらず実験室レベルでは mg 合成が限界であった。そこで、2010 年度において、大量合成に適した合成法の開拓を目指した。具体的には、lipase を用いた選択的 acyl 化、および選択的脱 acyl 化反応の組み合わせを用いた方法を用い、*in vivo* 評価を行うに必要なとされる量の光学活性 DCP-LA の合成を行った。なお、薬理評価は共同研究者・西崎教授 (兵庫医科大学) に依頼し、各種抗認知症モデル実験を実施した。

### （2）誘導体合成および構造活性相関研究

第 2 ステップでは第 1 ステップで確立した 4 種の光学活性シクロプロパン誘導体合成法を用い、4 種類の高純度 DCP-LA 光学活性体の合成と薬理評

価を2008年度後半および2009年度中盤まで行った。

### (3) ターゲット探索

第3ステップでは4種類のDCP-LA光学活性体を研究代表者の所属する研究室で開発された新規アフィニティ樹脂に固定化し、各誘導体特異的な結合蛋白質の同定を2011年度後半～2012年度で検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 光学活性 DCP-LA 大量合成法の開拓

本研究計画では、当初の目的通りに2010年度中にlipaseを用いた選択的acyl化法を用いることで、*in vivo*での活性試験が可能な量の光学活性DCP-LAを取得可能なルートの構築に成功した。

当初、2010年度前半では、計画した合成ルート検討では、目的の絶対立体化学を有する鍵中間体を取得することには成功したが、鍵中間体への側鎖導入において収率の向上が見られず、精製に困難を来す問題が生じたため、本ルートでの合成を断念した。

そこで、2010年度後半において現行ルートの収率・選択性を改善した合成ルートを確認し、目的とする4種類の光学活性DCP-LAを*in vivo*での活性試験が可能な量の光学活性DCP-LAを取得可能なルートの構築に成功した。共同研究者の西崎らのグループに評価を依頼した結果、ラット脳海馬スライスを用いたグルタミン酸、ドーパミン、セロトニンの放出活性を調べたところ、全ての異性体が活性を有し、*in vivo*においても $\alpha,\beta$ -DCP-LAが最も高い活性を持つことを明らかとした<sup>9)</sup>。さらに、認知症モデルマウスにおいても一定の有効性を示すことが明らかとなった<sup>9)</sup>。

### (2) 誘導体合成および構造活性相関研究

本研究計画では、当初の目的通り、DCP-LAと同様の活性を有し、リノール酸およびDCP-LAの構造を簡略化した合成容易な新規誘導体HUHS2002を見出すことができた。

2011年度前半において、(1)で確立した合成ルートを用いて種々の誘導体合成を行うと同時に、リノール酸およびDCP-LAの構造を簡略化した市販化合物から3工程で合成可能な化合物の探索を行った結果、HUHS2002がDCP-LAと同様にラットの海馬モデルにおいて、シナプス前終末における $\alpha 7$ Ach受容体反応を増大する活性を有することを見出した。さらに、共同研究者の西崎らのグループにより、HUHS2002の薬理活性発現はDCP-LAとは異なりPKC- $\epsilon$ の活性化せず、PP1およびCaMKIIを介したメカニズムであることが明らかとなった<sup>2), 5)</sup>。

さらに、本研究の過程において、2011年度後半において、抗炎症薬のインドメタシンがDCP-LAと同様の活性を有することを見出し、今後の構造活性相関研究において、新たな抗認知症活性を有する化合物の創出の可能性を示した<sup>3), 4)</sup>。

### (3) ターゲット探索

本研究計画においては、当初の目的通り、光学

活性DCP-LAを固定したアフィニティ樹脂を合成し、活性型PKC- $\epsilon$ が基質とするDCP-LAの特異的結合タンパク質の同定に成功した。

2011年度後半より、光学活性DCP-LAのアフィニティ樹脂合成に着手し、ターゲット探索を行った結果、4種類の光学活性体で特異的結合タンパク質に差がみられた。現在は、Biacoreおよび分子生物学的アプローチにより、ターゲット候補と考えられる数種類のタンパク質の検証を進めている。

## 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13件:すべて査読有)

- ① Effects of Newly Synthesized DCP-LA-Phospholipids on Protein Kinase C and Protein Phosphatases. T. Kanno, A. Tsuchiya, T. Shimizu, S. Nakao, A. Tanaka, T. Nishizaki, *Cell. Physiol. Biochem.* **2013**, *31*, 555-564.
- ② Regulation of GluA1 AMPA Receptor through PKC Phosphorylation Induced by Free Fatty Acid Derivative HUHS2002. T. Nishimoto, T. Kanno, T. Shimizu, A. Tanaka, T. Nishizaki, *Lipids* **2013**, *43*, 23-28.
- ③ Indomethacin Serves as a Potential Inhibitor of Protein Phosphatases. T. Kanno, A. Tsuchiya, T. Shimizu, A. Tanaka, T. Nishizaki, *Cell. Physiol. Biochem.* **2012**, *30*, 1014-1022.
- ④ Novel Indomethacin Action: Selective and Direct Activation of Protein Kinase C- $\epsilon$ . T. Kanno, A. Tsuchiya, T. Shimizu, A. Tanaka, T. Nishizaki, *Cell. Physiol. Biochem.* **2012**, *30*, 771-777.
- ⑤ Free Fatty Acid Derivative HUHS2002 Potentiates  $\alpha 7$  ACh Receptor Responses Through Indirect Activation of CaMKII. T. Kanno, T. Shimizu, A. Tanaka, T. Nishimoto, T. Nishizaki, *Lipids* **2012**, *49*, 865-871.
- ⑥ 8-[2-(2-Pentyl-Cyclopropylmethyl)-Cyclopropyl]-Octanoic Acid and Its Diastereomers Improve Age-Related Cognitive Deterioration. T. Kanno, T. Yaguchi, T. Shimizu, A. Tanaka, T. Nishizaki, *Lipids* **2012**, *47*, 687-695.
- ⑦ Synthetic Route to Optically Pure Norcantharidin Analog NCA-01, a Highly Selective Protein Phosphatase 2B inhibitor, and Its Derivatives. T. Shimizu, M. Iizuka, H. Matsukura, D. Hashizume, M. Sodeoka, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 1221-1230.

- ⑧ Indomethacin Enhances Learning and Memory Potential by Interacting with CaMKII. T. Kanno, T. Yaguchi, T. Nagata, **T. Shimizu**, A. Tanaka, T. Nishizaki, *J. Cell Physiol.* **2012**, 227, 919-926.
- ⑨  $\alpha$ ,  $\beta$ -DCP-LA Selectivity Activates PKC- $\epsilon$  and Stimulates Neurotransmitter Release with the Highest Potency among 4 Diastereomers. **T. Shimizu**, T. Kanno, A. Tanaka, T. Nishizaki, *Cell. Physiol. Biochem.* **2011**, 27, 149-158.
- ⑩ Formal [6+4] cycloaddition of a dicobalt acetylene complex with furan derivatives. K. Dota, **T. Shimizu**, S. Hasegawa, M. Miyashita, K. Tanino, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 910-912.
- ⑪ Selective elution of target protein from affinity resins by a simple reductant with a thiol group. M. Mabuchi, M. Haramura, **T. Shimizu**, T. Nishizaki, A. Tanaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 7361-7364.
- ⑫ Total synthesis of furanone B. Construction of a hydroazulene skeleton via a novel [5 + 2] cycloaddition reaction of silyloxyallene. K. Mitachi, T. Yamamoto, F. Kondo, **T. Shimizu**, M. Miyashita, K. Tanino, *Chem. Lett.* **2010**, 39, 630-632.
- ⑬ Cyclooctanone synthesis via a formal [6+2] cycloaddition reaction of a dicobalt acetylene complex. K. Mitachi, **T. Shimizu**, M. Miyashita, K. Tanino, *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 3983-3986.

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Synthesis and Evaluation of optically active DCP-LA as a PKC- $\epsilon$  selective activator (Oral presentation). **T. Shimizu**, M. Mabuchi, T. Kanno, T. Nishizaki, A. Tanaka, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. 1, Dec., 2011, Tokyo

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者 清水 忠 (SHIMIZU TADASHI)  
兵庫医療大学・薬学部・助教  
研究者番号：40509022