

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590136

研究課題名(和文)再生医療を志向した幹細胞分化を誘導する化合物の創製と脳神経変性疾患治療薬への応用

研究課題名(英文) Synthesis of new compounds inducing potent and selective differentiation from neural stem cells into neurons

研究代表者

須原 義智 (Suhara, Yoshitomo)

芝浦工業大学・システム工学部・教授

研究者番号：30297171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、失われた脳神経を再生させるという考え方に基づき、脳神経の素となる脳神経幹細胞を脳神経細胞(ニューロン)へ強力に分化させる作用をもつ低分子化合物の開発を行った。その結果、脂溶性ビタミンのひとつであるビタミンKがニューロン選択的に分化を誘導することを見出し、その側鎖部分を系統的に修飾することによって、天然のビタミンKより強い分化誘導活性をもつ化合物の創製を行うことに成功した。現在はこれらの化合物の作用機序を検討し、得られた情報を基にしてin vivoレベルで効果のある化合物の創製を目指している。

研究成果の概要(英文)：We synthesized new compounds, which have selective differentiation activity from neuronal progenitor cells into neurons in vitro. The result of the assay exhibited vitamin K analogues introduced m-methylphenyl group at the omega-terminal position had the most potent activity, which was twice as much as control. This finding indicated that it will be possible to obtain much more potent compounds with modification of vitamin K. Now we are going to investigate the functional mechanism of the compounds.

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：脳神経幹細胞 ニューロン 分化誘導 ビタミンK 誘導体 合成 メナキノン-4 再生医療

1. 研究開始当初の背景

現在患者数が 300 万人にものぼり、30 年後には 1000 万人に達すると推計されているアルツハイマー病は、神経系の破綻を引き起こし身体能力すべてに甚大な影響を与えるため、その発症を予防・治療する方法が切望されている。しかし、現在の臨床現場で使用されている薬剤は、僅かに病状の進行を遅らせるなど治療効果の低いものしか存在していない。

アルツハイマー病は、アミロイドベータ(A β)と呼ばれるタンパク質が加齢と共に脳内に蓄積し、脳神経細胞(ニューロン)が変性・死滅してしまうのが主要原因と考えられている。そのため、アルツハイマー病の患者は健康人に比べてニューロンの著しい減少が見られ、特に記憶能力を司る海馬に萎縮が認められる。これまでに世界中で A β の生成および蓄積阻害をターゲットとした薬剤が根本治療薬の候補として開発されてきた。しかし、いずれも臨床試験段階で重篤な副作用により頓挫してしまったため、根本的な治療法は未だ見つかっていないのが現状である。また、一旦アルツハイマー病を発症してしまうと、すでにニューロンの多くが失われているために、A β を除去しても記憶障害などの症状は回復しないことも報告されている。

2. 研究の目的

このような様々な試みに対して我々は、最近益々注目されている「再生医療」の観点から、アルツハイマー病患者の「失われたニューロン」を再生させ、「脳を正常な状態に戻す」という新たな治療法を開発することを目標に研究を行っている。脳神経系の細胞は、神経伝達を担うニューロンと支持細胞として働くグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト)から構成される。これらの細胞は、脳の複雑な高次構造の中で時間的かつ空間的に高度な遺伝子制御を受けて未分化の神経幹細胞から増殖・分化し、感覚(知覚)や運動に関わる脳の高次機能を制御している。我々は脳神経の素となる脳神経幹細胞から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「低分子化合物」によって選択的にニューロンへ制御・誘導することを目指している。脳神経幹細胞は高齢者にも存在することが確認されている。したがって、このような化合物が創製できれば「失われたニューロンを再生させる」ことが可能であり、アルツハイマー病をはじめ各種の脳神経変性疾患に有効な治療薬に応用できると考えている。

脳内にはニューロステロイドと呼ばれる生理活性リガンドが多く存在しているが、脂溶性ビタミンであるビタミン A、D、E、K も高濃度に存在し、これらの特異的受容体も脳組織全域で発現していることが明らかにされている。したがって、脂溶性ビタミン類は脳神経機能の維持に重要な役割を果たし

ている可能性が高い。事実、すでに我々はビタミン K が、マウス大脳由来の脳神経幹細胞を用いた評価系で細胞毒性が無く、かつニューロン選択的な分化誘導作用をもつことを見出している。しかし、医薬品の候補化合物としては活性が弱いのが課題となっている。そこでビタミン K と同様に元々脳内に存在し、極めて多様かつ強力な生理作用を示すレチノイド(ビタミン A)や活性型ビタミン D $_3$ に着目した。すなわち、これらの化学構造と我々が見出した活性化化合物の構造を融合した新しい化合物を合成して、より強い神経分化誘導作用を有する誘導体を創製することを考案した。

我々のこれまでの知見では、脳内に内在する脂溶性ビタミン類の活性は側鎖部分に起因するが多かったため、それらの生物活性は側鎖部分を構成する不飽和アルキル鎖を有する化合物に集約できると考えている。また、創薬にたどり着くまでにはできるだけ多くの化合物の構造と生物活性の関係を明らかにする必要があるため、周辺の化合物を一度に短時間で合成する方法が必要である。そこでまず、ニューロンへの分化を誘導すると考えられる不飽和アルキル鎖をもつ化合物をコンビナトリアルケミストリーの手法を用いて系統的に多数合成し、化合物ライブラリーを構築する。次にニューロンへの分化誘導作用について、High-Throughput Screening により高活性化合物を絞り込むことで、再生医療としての観点からアルツハイマー病治療薬のシーズとなりうる化合物を探索する。さらにその作用タンパク質を明らかにし、作用発現のメカニズムを解析していく。以上により、研究期間内にコントロールの 100 倍以上の分化誘導活性を有し、アルツハイマー病治療薬の候補となりうる化合物の開発を目指す。

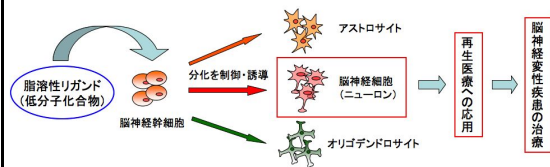


図 1. 脳神経幹細胞からニューロンへの分化を制御・誘導する低分子化合物の開発

3. 研究の方法

(1) 脂溶性リガンドの化合物ライブラリーの構築。

まず、上記のように脳内に多く存在し、ニューロンへの分化誘導作用を有することが明らかにされたビタミン K をヒントにして化合物を設計・合成する。即ち、ビタミン K の構造をアルキル側鎖部分と環部分に分けて、それぞれを修飾した誘導体を組み合わせることで合成を行う。このとき、系統的な合成手法を利用して短時間に多数の誘導体を合成する方法を開発し、化合物群(化合物ライブラリー)を構築する。

(2) ビタミン K 誘導体の生物活性評価。

上記において得られた化合物は、簡便な生物活性評価法によって生理活性を評価する。具体的な方法としては、マウス胎仔大脳由来の神経幹細胞を用いて、以下に示す方法でニューロンへの分化誘導活性を測定する。マウス胎児の大脳を摘出し、神経幹細胞を抽出する。神経幹細胞を播種して24時間培養後、各種ビタミン K 誘導体を添加して4日間培養する。これにニューロン特異的に認識する抗原である MAP2 を添加し、さらに二次抗体としてこの抗体を特異的に認識する蛍光標識した抗体を加えて蛍光免疫染色を行う。この蛍光を共焦点レーザー顕微鏡によってニューロンへの分化を観察する。これとは別に、の細胞を回収して mRNA を抽出し、PCR 法によって MAP2 と β -actin の発現量を測定する (図 2)。

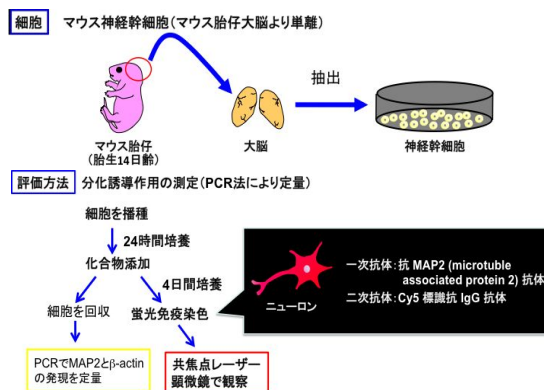


図 2. マウス胎仔大脳由来の神経幹細胞を用いたニューロンへの分化誘導活性の検討

(3) さらに高活性を示す化合物を得るための検討。

(1) および (2) で得られた化学構造と生物活性の関係から、活性化合物のどの部分が生物活性に重要なのかを解析する (ファーマコフォア解析) (図 3)。さらに、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、元々のビタミン K と比較して 1000 倍以上強い分化誘導活性を有する化合物を目指す。

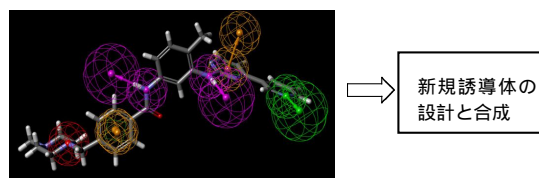


図 3. ファーマコフォアモデルの構築と新規誘導体の設計

(4) ビタミン K 化合物の分化誘導作用のメカニズム解析 (作用発現に参与するタンパク

質の解析)。

他研究機関との共同研究により、上記 (1) ~ (3) により化合物ライブラリーから選別された高活性化合物を用いて、どのようなタンパク質に作用しているのか解析し、作用メカニズムを明らかにする。分化誘導作用のメカニズムについては、これまでに Wnt シグナルや PKA を介する経路が報告されている他はほとんど明らかになっていない。しかし、我々の新規の高活性化合物を用いることにより新たな経路が見つかる可能性がある。

4. 研究成果

今回我々は、ビタミン K を構成する環部分と側鎖部分に分け、特に側鎖の末端部に各種の官能基を導入した化合物を合成した。誘導体は、脳が脂溶性の物質から構成されていることから、様々な脂溶性の官能基を導入した化合物を合成することにした。

具体的な合成方法は図 4 に示す方法で行った。まず、ゲラニルアセテート (11a) およびファルネシルアセテート (11b) を出発原料とし、末端部分に水酸基を導入した後、テトラヒドロピラン (THP) 基により保護し、12a および 12b とした。次に、アセチル基を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液によるアルカリ加水分解によって 13a および 13b とした。13a および 13b に様々なベンゼン環化合物のグリニャール試薬を反応させることにより、側鎖末端部分にベンゼン環化合物を導入した化合物 14a および 14b を合成した。これらの側鎖部分とナフトキノン環をもつビタミン K₃ (15) をルイス酸である三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体存在下でカップリングさせて、目的とするビタミン K 誘導体 1-10 を得た。

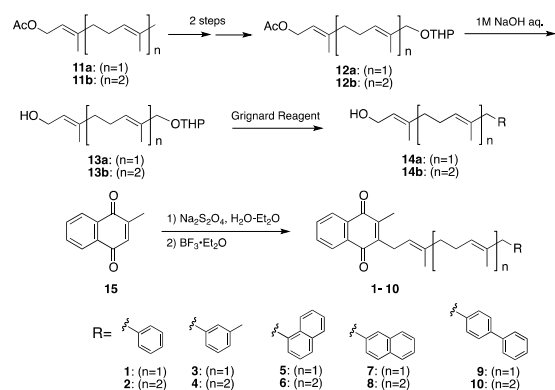
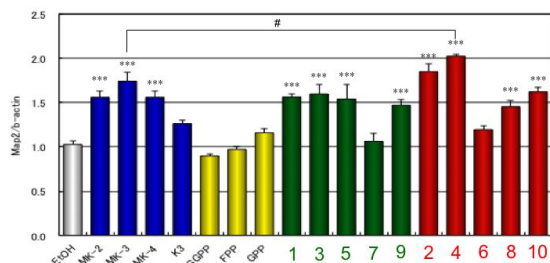


図 4 側鎖末端に脂溶性の官能基をもつビタミン K 誘導体の合成方法

これらの誘導体について、マウス胎仔大脳由来の脳神経前駆細胞からニューロンへの分化誘導活性を調べた。図 5 にニューロンへの分化誘導活性を比較した結果を示す。ビタミン K 同族体のひとつであるメナキノン-2 (MK-2) の修飾体は緑で、メナキノン-3 (MK-3) の修飾体は赤で示している。この結果、天然のビタミン K を含め、コントロー

ルに比べてほとんどの誘導体で有意な活性の上昇がみられた。一方、MK-2を誘導体化しても元のMK-2と比較して活性の上昇はみられなかったが、MK-3の側鎖末端にメチルフェニル基を導入した**4**は元のMK-3と比較して有意に活性の上昇がみられた。



Cells were treated with new vitamin K₂ analogues as well as natural homologues at 1.0 × 10⁻⁶ M. The histogram data are expressed as the means obtained from three independent experiments; the error bars indicate the SD. Significant difference: ***, p < 0.001, between EtOH and compounds (by Dunnett's t-test); #, p < 0.1 between MK-3 and MP3 (by Student's t test).

図5 ビタミンK誘導体のニューロンへの分化誘導活性

そこで次に我々は、側鎖末端部分に導入したフェニル基に結合するアルキル基の分化誘導活性に与える影響を調べた。目的とする誘導体は図4と同様の方法で行い、メナキノンの側鎖末端に結合させたフェニル基に、メチル基を1~3つ導入した各種の化合物を合成した(図6)。

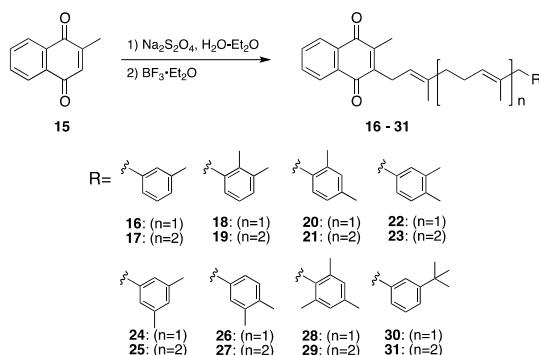


図6 新規誘導体の合成

これらの化合物群について、図2による分化誘導活性を測定した結果、*m*位にメチル基を二つ有する誘導体**16**が最も強い活性を示した。すなわち、側鎖イソプレノ構造の繰り返し数とベンゼン環に結合したメチル基をはじめとしたアルキル基が、ニューロンへの分化誘導活性に影響を及ぼすことが明らかとなった。

今後はさらに構造変換をした誘導体の検討を行い、より強力な分化誘導活性をもつ化合物を得るとともに、それらの分化誘導作用のメカニズムを調べ、さらにニューロンへの強力な分化誘導作用をもつ化合物を創製する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

HIROTA, Y.; TSUGAWA, N.; NAKAGAWA,

K.; SUHARA, Y.; UCHINO, Y.; TAKEUCHI, A.; SAWADA, N.; KAMAO, M.; WADA, A.; OKITSU, T.; OKANO, T. Menadione (vitamin K₃) is not only a catabolic product of oral phyloquinone (vitamin K₁) in the intestine but also a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K₂) in rats. *J. Biol. Chem.* 288(46), 33071-33080, 2013. 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M113.477356

EDSON, K.; PRASAD, B.; UNADKAT, J.; SUHARA, Y.; OKANO, T.; GUENGERICH, F.; RETTIE, A. Cytochrome P450-Dependent Catabolism of Vitamin K: ω-Hydroxylation Catalyzed by Human CYP4F2 and CYP4F11. *Biochemistry* 52(46), 8276-85, 2013. 査読有

DOI: 10.1021/bi401208m

LI, Q.; QI, J.; WU, Y.; KIYOTA, H.; TANAKA, K.; SUHARA, Y.; OHRUI, H.; SUZUKI, Y.; VAVRICKA, C. J.; GAO, G. F. Functional and structural analysis of influenza virus neuraminidase N₃ offers further insight into the mechanisms of oseltamivir resistance. *J. Virol.* 87 (16), 10016-10024, 2013. 査読有

DOI: 10.1128/JVI.01129-13

SUHARA, Y.; HANADA, N.; OKITSU, T.; SAKAI, M.; WATANABE, M.; NAKAGAWA, K.; WADA, A.; TAKEDA, K.; TAKAHASHI, K.; TOKIWA, H.; OKANO, T. Structure-Activity Relationship of Novel Menaquinone-4 Analogues: Modification of the Side Chain Affects their Biological Activities. *J. Med. Chem.* 55, 1553-1558, 2012. 査読有

DOI: 10.1021/jm2013166

中川公恵; 廣田佳久; 澤田夏美; 内野由理; 須原義智; 岡野登志夫 ビタミンK₂(メナキノ-4)生合成酵素の発見 *ビタミン* 86, 441-443, 2012. 査読有

須原義智; 渡辺雅人; 中川公恵; 和田昭盛; 武田収功; 高橋和彦; 岡野登志夫 側鎖末端部を修飾した新規ビタミンK誘導体の合成と核内受容体SXRを介した転写活性の検討 *ビタミン* 85, 493-498, 2012. 査読有

須原義智; 元吉沙也加; 廣田佳久; 澤田夏美; 中川公恵; 常盤広明; 岡野登志夫. 核内受容体SXR (Steroid and Xenobiotic Receptor)のアゴニスト活性を持つ新規ビタミンK誘導体の合成と構造活性相関の検討. *薬学雑誌* 132(8), 881-886, 2012. 査読有

SUHARA, Y.; WATANABE, M.; MOTOYOSHI, S.; NAKAGAWA, K.; WADA, A.; TAKEDA, K.; TAKAHASHI, K.; TOKIWA, H.; OKANO, T. Elucidation of Nuclear Receptor SXR-mediated Transcriptional Activity of New Vitamin K

Analogues: Insight into the Biological Role of Side Chain Part of Vitamin K. *J. Med. Chem.* 54, 4918-4922, 2011. 査読有

DOI: 10.1021/jm200201k

SUHARA, Y.; WATANABE, M.; NAKAGAWA, K.; WADA, A.; ITO T.; TAKEDA, K.; TAKAHASHI, K.; OKANO, T. Synthesis of Novel Vitamin K₂ Analogues with Modification at the ω-Terminal Position and their Biological Evaluation as Potent Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) Agonists. *J. Med. Chem.* 54, 4269-4273, 2011. 査読有

DOI: 10.1021/jm200025f

須原義智; 和田昭盛; 中川公恵; 鎌尾まや; 津川尚子; 岡野登志夫 化学的アプローチによるビタミンKの生理作用の解析と生理活性物質への応用. *ビタミン*, 85, 271-279, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

須原義智, 廣田佳久, 坂根里枝, 中川公恵, 和田昭盛, 岡野登志夫 「ニューロンへの分化誘導作用を有する新規ビタミンK誘導体の構造活性相関の検討」第31回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2013年11月20日~22日, 広島

坂根里枝, 大西創, 須原義智 「側鎖末端にヘテロ原子を導入したビタミンK誘導体の合成と生物活性評価」日本ビタミン学会第66回大会, 2013年6月13日~14日, 兵庫

須原義智, 廣田佳久, 高橋良知, 高野博庸, 池田翔, 和田昭盛, 中川公恵, 岡野登志夫 「ニューロンへの分化を誘導する新規ビタミンK誘導体の開発」日本ビタミン学会第65回大会, 2013年5月16日~17日, 東京

須原義智, 廣田佳久, 高橋良知, 高野博庸, 池田翔, 和田昭盛, 中川公恵, 岡野登志夫 「脳神経幹細胞からニューロンへの分化を誘導する新規ビタミンK誘導体の合成」日本薬学会第133年会 2013年3月27日~30日, 横浜

須原義智, 廣田佳久, 中川公恵, 和田昭盛, 岡野登志夫 「ニューロンへの分化を誘導する新規ビタミンK誘導体の創製」第30回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2012年11月28日~30日, 東京

須原義智, 廣田佳久, 中川公恵, 和田昭盛, 岡野登志夫 「ニューロンへの分化を誘導する新規ビタミンK誘導体の合成と構造活性相関の検討」日本ビタミン学会第64回大会, 2012年6月22日~23日, 岐阜

須原義智; 渡辺雅人; 中川公恵; 和田昭盛; 武田収功; 高橋和彦; 岡野登志夫 「側鎖末端部を修飾したビタミンK誘導体の合成と核内受容体 SXR を介し

た転写活性の検討」日本ビタミン学会第63回大会, 2011年6月4日~5日, 広島

〔図書〕(計1件)

岡野登志夫 編 須原義智 他 医薬ジャーナル社, 改訂版 ビタミンDと疾患, 医薬ジャーナル社, 246, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sic.shibaura-it.ac.jp/~suhara>

6. 研究組織

(1) 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