



## 【研究背景】

アルツハイマー病は脳の萎縮とともに認知機能の低下を引き起こす、進行性の神経変性疾患であり、その患者数は年々増加している。その病理学的特徴である老人斑はアミロイドβ (Aβ)の凝集体を主な構成成分としていることから、Aβの凝集がアルツハイマー病発症に強く関与しているとする「アミロイド仮説」が唱えられている。所属研究室ではAβが疎水的な相互作用によって凝集することに着目して、Aβに対する光酸素化触媒を開発し、その酸素化により凝集性や毒性を低減させることに成功している<sup>1,2,3</sup>。しかしながら *in vivo* 反応への応用は手術を介した侵襲的な手法に限られており、アルツハイマー病治療に向けては未だ課題を残している。そこで私は *in vivo* 反応に適用可能な新規光酸素化触媒の開発に着手した。

## 【方法】

光酸素化触媒を *in vivo* 反応へと適用するためには、① 高いAβ選択性 ② 組織透過性の高い長波長光 (>600 nm)による励起 ③ 高い血液脳関門(BBB: Blood-Brain Barrier)透過能の三点すべてを満たしている必要がある。しかしながら現在までに所属研究室で開発された触媒は、Aβへの選択性発現及び長波長光の吸収を志向した結果、分子が巨大になり BBB 透過能が低くなってしまっていた。そのため、コンパクトな分子でありながら長波長光を吸収し、さらに高Aβ選択性につながるスイッチ ON/OFF 機構を持つ触媒設計が求められる。

そこで私は、アゾベンゼン-ホウ素錯体 **1** に着目した。田中・中條らは、**1** が低分子量(242)ながらトルエン中で最大吸収波長を 479 nm に持ち、またその特異な構造から凝集誘起発光(AIE: Aggregation-Induced Emission)の性質をもつことを報告している<sup>4</sup>。すなわち **1** は、希薄溶液中では光励起により折れ曲がった構造を取ることによってエネルギーを消費し発光特性を示さないのに対し、凝集状態ではその構造変化を取れないために発光特性を発現するようになる(Figure 1A)。私は、アゾベンゼン-ホウ素錯体の AIE 特性を Aβ選択的な光酸素化触媒へと応用できるのではないかと考えた。すなわち、本骨格によって、凝集アミロイド非存在下では折れ曲がった構造を取れるために酸素化活性を示さず、凝集アミロイドと結合したときのみ折れ曲がりやが抑えられ活性を示すスイッチ ON/OFF

機構を触媒へ与えることとした(Figure 1B)。さらに触媒の構造展開を行い組織透過性の高い長波長光を吸収する触媒を開発できれば、静脈内投与および外部からの照射による生体内 Aβの光酸素化が達成できるのではないかと考えた。

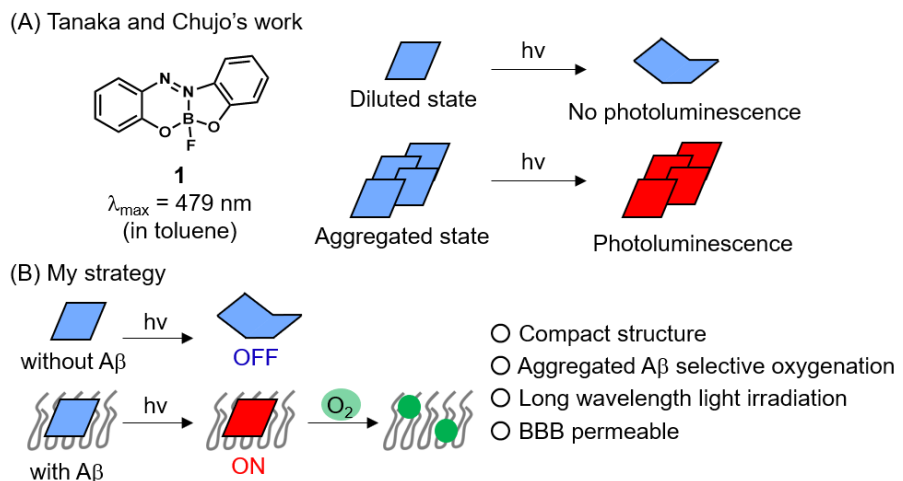


Figure 1: Research strategy

## 【結果】

そこでまず、**1** を母骨格とした A $\beta$  選択的光酸化触媒として **2** を設計した(Figure 2)。触媒の長波長光の吸収を期待して **1** のホウ素上のフッ素をより強い電子求引基であるトリフルオロメチル基に置換し、さらに電子ドナーであるジアルキルアミノ基を導入している。加えて、溶解性の向上を志向したトリアルキルアミノ基、重原子効果による項間交差の加速を志向したブロモ基も同時に導入した。その結果、**2** はリン酸バッファー中で最大吸収波長を 580 nm に持ち、組織透過性の高い 600 nm の光に対しても十分な吸収を示した。そこで 595 nm の光を用いて凝集 A $\beta$  に対する酸化反応を検討したところ、反応は円滑に進行した(Figure 3A)。また、トリプトファンやチロシン、ヒスチジン、メチオニンなどを持つオフターゲットペプチドを用いて選択性を評価したところ、A $\beta$  では 73% の収率にて反応が進行した条件において他のペプチドでは収率が 4% 以下にとどまっており、**2** が高い選択性にて A $\beta$  の酸化反応を進行させることが示された(Figure 3B)。一方で、クロス $\beta$ シート構造を持つアミロイドであるアミリン、 $\alpha$ -シヌクレイン、インシュリンにおいても、凝集状態のペプチドに対して酸化が進行したことから、**2** がクロス $\beta$ シート構造を認識し反応している可能性が示唆された。

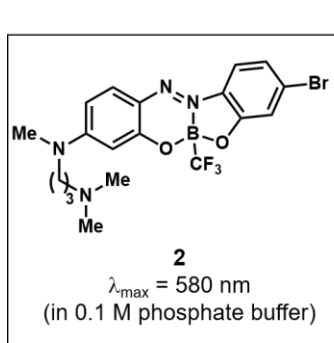


Figure 2: New catalyst

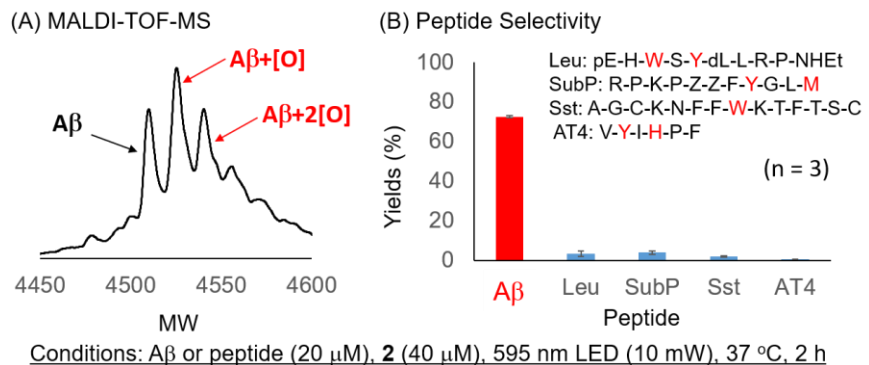


Figure 3: A $\beta$  photooxygenation and peptide selectivity

次に、**2** のスイッチ ON/OFF 機構について詳細に調べることにした。まず、**2** の凝集 A $\beta$  存在下および非存在下における蛍光スペクトラムの変化を調べた。その結果、**2** は凝集 A $\beta$  存在下でのみ蛍光を示すことが明らかになった(Figure 4A)。さらに一重項酸素についても、凝集 A $\beta$  存在下でのみ生成することを確認した。これらの結果から、**2** が凝集 A $\beta$  と結合することで、蛍光発光および項間交差を介した一重項酸素の生成が促進されている可能性が示唆された。そこで次に、その構造的な原因を追究するために、密度汎関数法を用いて基底状態および励起状態における構造の最適化を行った(Figure 4B)。その結果、基底状態ではアゾベンゼン構造の C-N-N-C の二面角が  $164^{\circ}$  と比較的平面性の高い構造を取るのに対して、励起状態では二面角が  $149^{\circ}$  と若干折れ曲がった構造を取っていることが予測された。以上の結果から、溶液中の **2** の励起状態の緩和にはこの折れ

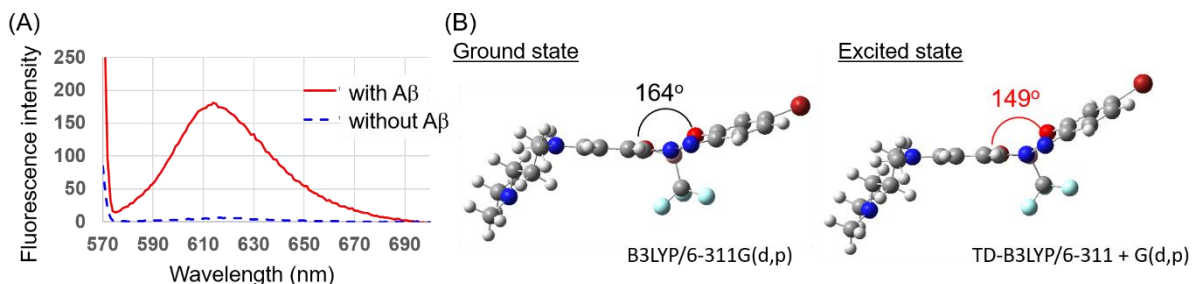


Figure 4: (A) Fluorescence spectra of **2** (B) Optimized structure of **2** in the ground state and excited state

曲がった構造が関与していると考えられ、Figure 1B で示すように凝集 A $\beta$  と結合することでその動きが抑制され A $\beta$  選択的に酸素化活性を発現しているのではないかと考察している。

続いて、*in vivo* 反応への応用を目指し、触媒の BBB 透過能を調べた。マウスを用いて、触媒を静脈内投与した後の脳内存在量を評価した。その結果、以前に報告していた<sup>23</sup>光酸素化触媒 **3**, **4** と比較して十分に高い BBB 透過能を示し、投与 60 分後には投与量の 1.55% の量が脳から回収された (Table 1)。現在報告されている A $\beta$  プロブと同等の透過率であったことから、高い割合で BBB を透過していると考えられる。

catalyst	Time after injection		
	10 min	60 min	1 day
<b>2</b>	0.58 $\pm$ 0.11%	1.55 $\pm$ 0.15%	0.92 $\pm$ 0.08%
<b>3</b>	N.D.	N.D.	---
<b>4</b>	0.037 $\pm$ 0.002%	0.034 $\pm$ 0.028%	N.D.

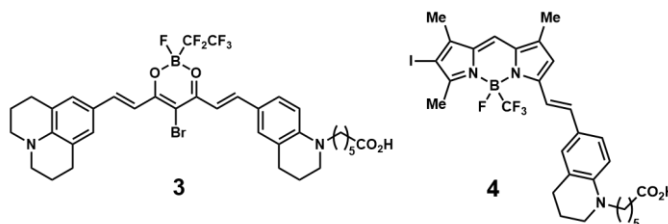


Table 1: BBB permeability of each catalyst

そこで、静脈内投与および外部からの光照射のスキームによる酸素化活性を評価することとした。11 ヶ月齢のアルツハイマー病モデルマウスに触媒を静脈内投与し、その 60 分後に 600 nm の光を照射した。この操作を 5 回繰り返す、マウスの海馬由来サンプルをウエスタンブロットティング法にて評価した。その結果、触媒投与・光照射を行ったマウス (レーン 1~3) において触媒のみを投与したマウス (レーン 4~6) と比較して酸素化による生成物と考えられる二量体が強く検出された (Figure 5)。以上から、触媒 **2** は *in vivo* 系において A $\beta$  の光酸素化を進行させていることが示唆された。

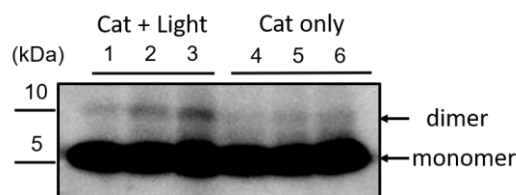


Figure 5: A $\beta$  photooxygenation *in vivo*

## 【総括・展望】

アルツハイマー病治療に向け、従来とは異なるスイッチ機構を持つ光酸素化触媒を設計することで、① 高い A $\beta$  選択性 ② 組織透過性の高い長波長光による励起 ③ 高い BBB 透過能の三点すべてを満たす触媒を開発した。これらの特徴を生かし、*in vivo* 系にて非侵襲的手法 (静脈内投与および外部からの光照射) による A $\beta$  の脳内酸素化に成功した。現在、ダイマー以外の A $\beta$  の酸素付加体の同定、および A $\beta$  の凝集抑制や代謝促進によるアルツハイマー病予防・治療に向けた研究を行っている。

## 【引用文献】

- (1) Taniguchi, A.; Shimizu, Y.; Oisaki, K.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 974. (2) Ni, J.; Taniguchi, A.; Ozawa, S.; Hori, Y.; Kuninobu, Y.; Saito, T.; Saido, T. C.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Chem* **2018**, *4*, 807. (3) (a) 清水裕介, 東京大学修士論文, 2016 (b) Suzuki, T.; Hori, Y.; Sawazaki, T.; Shimizu, Y.; Nemoto, Y.; Taniguchi, A.; Ozawa, S.; Sohma, Y.; Kanai, M.; Tomita, T. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 6165. (4) Gon, M.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6546.