

論文の内容の要旨

論文題目 環状 KLVFF モチーフを基盤としたアミロイド β の凝集阻害剤の創製研究

新井 唯正

【背景・目的】

アルツハイマー病 (AD) は、認知機能の低下を主な症状とする代表的な認知症であり、その患者数は年々増加している。しかしながら、AD の発症メカニズムには未解明な部分が多く、根本的な治療法がない。本研究では、AD の発症に深く関わっているとされるアミロイド β ペプチド ($A\beta$) に着目した。 $A\beta$ は AD 患者脳内に老人斑として蓄積しており、その凝集体 (オリゴマー、線維) は神経毒性を示す。そこで、その凝集を阻害する分子は、AD 治療薬になり得ると考えられた (図 1)。

既存の低分子阻害剤としては、ポリフェノールや色素系化合物が主流である。これらは様々な生体分子とも相互作用することが知られており、 $A\beta$ に対する特異性が欠点と考えられる。更に、 $A\beta$ は凝集過程において立体構造がダイナミックに変化することから、阻害剤との複合体の構造が不明であり、構造ベースの論理的阻害剤設計

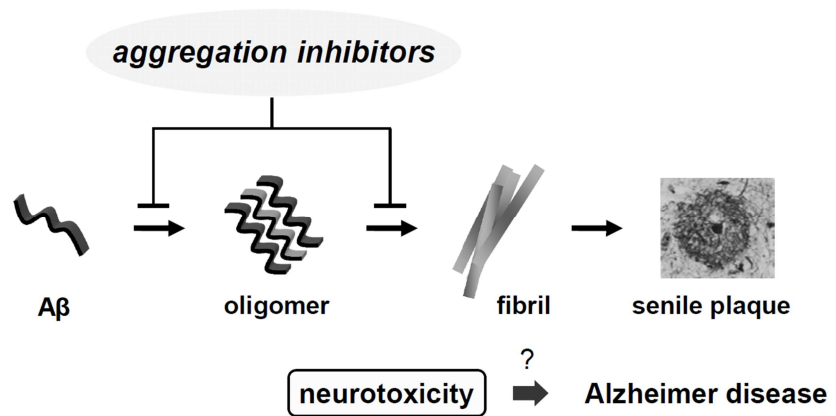


図 1 $A\beta$ の凝集をターゲットとした AD の治療戦略

が困難である。一方、 $A\beta$ の 16–20 番目の配列である Lys-Leu-Val-Phe-Phe (= KLVFF) に代表される、 $A\beta$ の部分ペプチドが全長 $A\beta$ の凝集を阻害することが知られる^[1]。 $A\beta$ 部分ペプチドは、全長 $A\beta$ の特異的な配列に結合すると考えられている。従って、 $A\beta$ の部分配列をベースとしたペプチド性阻害分子は、 $A\beta$ に対する特異性が期待できるとともに、合理的な誘導化が可能ではないかと考えた。特に KLVFF 領域は、 $A\beta$ の β -シート構造形成に重要な役割を担っているため、阻害剤としてのポテンシャルが高い可能性がある。実際、KLVFF の誘導化により見出された SEN304 は、KLVFF から 30 倍以上活性が向上している^[2]。しかしながら、ペプチド性阻害剤は元来、代謝安定性 (特に加水分解酵素に対する安定性) や細胞膜透過性が低い。

以上のような背景から本研究では、AD 治療薬の医薬リード創出を目指し、 $A\beta$ の部分配列である KLVFF をベースとした、高活性でドラッグライクな (良好な薬物動態プロファイルを示す) 凝集阻害剤の設計・合成に取り組んだ。

【結果・考察】

1. 環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフの同定

設計方針としてペプチドの環化戦略に着目した。ペプチドの環化により、活性の向上と、加水分解酵素に対する安定性及び細胞膜透過性の改善が期待できると考えたためである。加えて、阻害剤の構造を剛直にすることは、ファーマコフォア解析や A β と阻害剤との相互作用解析において有効ではないかと考えた。

KLVFF を head-to-tail で環化した環状 KLVFF **1** (= *cyclo*-[KLVFF]、図 2b)は、固相合成にてペプチド鎖を調製した後、分子内環化反応により合成した。**1** の凝集阻害活性を評価した結果、KLVFF と比べ活性が有意に向上することを見出した。なお、凝集阻害活性は、凝集に伴い生成するクロス β シート構造を認識して蛍光を放つチオフラビン T (ThT) の蛍光強度を指標とした。ここで、鎖状 KLVFF のすべてのアミノ酸を D 体へ変換すると、活性が向上するとの報告^[3]を参考とし、**1** についても同様の変換を試みた (*cyclo*-D-[KLVFF] (**2**))。その結果、

鎖状の結果とは対照的に、D-アミノ酸誘導体 **2** は、**1** と同等の活性を示した。これは両者の構造上の

類似性由来するのではないかと考え、分子モデリングソフトを用いて **1** と **2** の立体配座を比較検討した。その結果、両者の最安定構造を重ね合わせた場合、Phe の側鎖同士、および Leu と Val の側鎖同士がそれぞれ重なりうる事が分かった。従って、環状 KLVFF ではアミノ酸の側鎖構造が阻害活性発現に寄与している可能性が考えられた。そこで、この可能性について **2** のレトロインバースペプチドへの変換（アミノ酸 α 位の立体化学と配列がそれぞれすべて逆転）、側鎖構造の変換（5つのアミノ酸をそれぞれ Ala へ置換）及び立体化学の変換（5つのアミノ酸をそれぞれ対応する L-アミノ酸へ置換）により検証した。その結果、上記仮説が支持され、環状 KLVFF では、主鎖のアミド結合より Leu²、Val³、Phe⁴、Phe⁵ の4つの側鎖構造とそれらの空間的な位置関係が阻害活性発現に大きく寄与していること、すなわちファーマコフォアであることが示唆された。

2. 環状 KLVFF の凝集阻害活性向上を指向した構造修飾と凝集阻害メカニズムの解析

医薬リード創出を目指し、環状 KLVFF **2** の活性向上に取り組んだ。上記検討では、Phe 側鎖が活性発現に最も寄与していることが示唆された。そこで、**2** の Phe⁴ の β 位にもう一つフェニル基を導入したところ、有意に阻害活性が向上した (*cyclo*-D-[KLVF(β -Ph)F] (**3**)、図 3a)。**3** の EC₅₀ 値 (10 μ M の A β 1-

(a)

A β 1-42:

1 16 20 42
DAEFRHDSGYEVHHQ**KLVFF**FAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

(b)

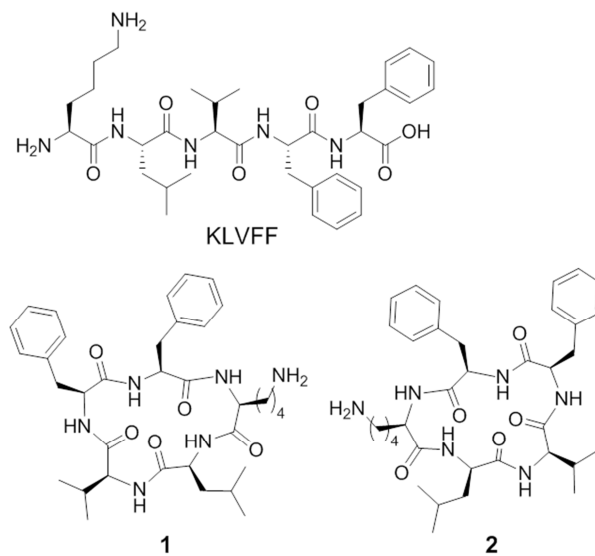


図 2 (a) A β 1-42 のアミノ酸配列; (b) 鎖状・環状 KLVFF の化学構造

42 単独の系における蛍光強度を 50% 下げるのに必要な阻害剤濃度)は 7.8 μM であり、**2** と比べ約 3 倍、KLVFF (>90 μM) と比べ 10 倍以上活性が向上している。

続いて、活性が向上した **3** を用いて 1)凝集阻害メカニズム、2)神経毒性軽減作用、3)血清中安定性についてそれぞれ精査し、医薬リードとしての可能性を検証した。まず、凝集阻害メカニズムの解析にあたり、ThT 蛍光強度の経時変化を精査した結果、off-pathway メカニズムが関与している可能性が考えられた。動的光散乱法、サイズ排除クロマトグラフィー、アミロイドオリゴマー抗体を用いたドットブロットアッセイ及び Seeding アッセイ ($\text{A}\beta$ の凝集に対するシード能評価) による検証もまた、**3** の存在による off-pathway 化学種の生成を支持した。また、原子間力顕微鏡による解析より、**3** により誘導される off-pathway 化学種は、高さ数 nm のオリゴマー粒子に相当することが分かった。更に、 $\text{A}\beta$ の神経毒性に与える影響について、ラット副腎褐色細胞腫である PC12 細胞を用いて検証した。その結果、阻害剤 **3** の添加により、 $\text{A}\beta$ の細胞毒性を軽減させることができた。以上の解析より、**3** の凝集阻害メカニズムは以下のように推定される (図 3b) ^[4]。 **3** は $\text{A}\beta$ と結合すると即座に β シート性および毒性の低い off-pathway 化学種を生成する。この off-pathway 化学種はアミロイド線維へは成長せず、高さ数 nm のオリゴマー粒子で留まる。最後に、ヒト血清中において、環状 KLVFF 誘導体 **3** の加水分解酵素に対する安定性を評価した。その結果、**3** は少なくとも 6 時間後までほとんど分解を受けなかった。以上の検討結果より、環状 KLVFF 誘導体 **3** は、AD 治療薬の有望な医薬リードになり得ると考える。

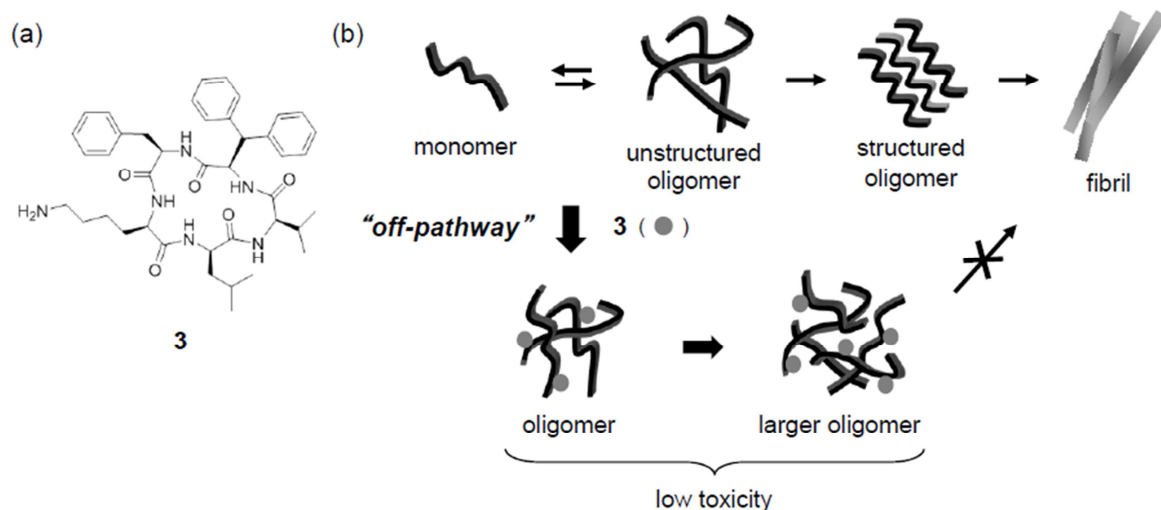


図 3 (a) 環状 KLVFF 誘導体 **3** の化学構造; (b) 推定凝集阻害メカニズム

3. 環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基にした非ペプチド性低分子凝集阻害剤の論理的創製

前項までの研究では、KLVFF を起点とし、環状 KLVFF 誘導体の設計・合成に取り組み、有望な医薬リードとなり得る **3** の創製に成功した。それでもなお、細胞膜透過性等の薬物動態面の利点を鑑みると、高活性な低分子化合物が理想的であると考えられる。そこで次に、低分子凝集阻害剤の可能性について模索した。

内因性の生理活性ペプチドにおける低分子化合物への構造展開例を参考とし、ペプチド性阻害剤のファーマコフォアをベースとした低分子阻害剤の創出を着想した。しかしながら、凝集阻害剤の分野では、著者の知る限り、このような報告例はない。これは、主鎖のアミド結合が阻害活性発現に不可欠であることに起因するのではないかと考えられる。一方、本研究で見出した環状 KLVFF は、主鎖のアミド結合が活性発現にほとんど関与しない、ユニークなファーマコフォアを有する。そこで、本フ

ファーマコフォアモチーフを基に、非ペプチド性の低分子凝集阻害剤の創製を検討することとし、新規低分子阻害剤 **4** を設計した (図 4)。すなわち、ピリジン環の 2、4、6 位にそれぞれのファーマコフォアをミミックする官能基を導入することを考案した。分子モデリングを用いた検討より、**4** と **2** のファーマコフォア部分同士が重なりうることも確認された。ピリジン誘導体 **4** は、2-クロロピリジンを出発物質とし、ピリジン 4 位への選択的なベン

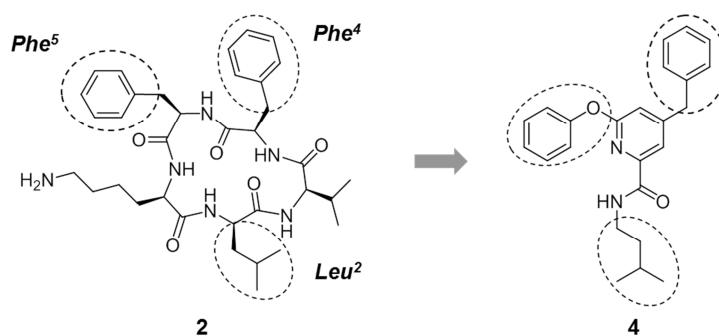


図 4 環状 KLVFF のファーマコフォアを基にした新規低分子阻害剤 **4** の設計

ンジル化反応を鍵工程する全 6 工程にて合成した。まず、ThT アッセイにて **4** の凝集阻害活性を評価した結果、濃度依存的な阻害作用を示した。更に、Sedimentation アッセイ (非凝集 A β 量を定量) においても **4** の濃度依存的な凝集阻害活性が認められた。更に、原子間力顕微鏡においても濃度依存的な線維化阻害作用が確認された。以上のように、様々な生化学アッセイにて、**4** が A β の凝集を阻害していることが確認された。加えて、**4** の更なる構造展開の結果、母核をピリジンからピリミジンに、イソペンチル基を 2-アダマンチル基に変換することにより、阻害活性を環状 KLVFF **2** とほぼ同等まで向上させることができた。以上のように、環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフを基にすることにより、A β の配列に基づく低分子阻害剤の論理的創製に成功した^[5]。

【総括】

本研究では、AD 治療薬の医薬リード創出を目指し、A β の 16–20 番目の部分フラグメント、KLVFF をベースとした、高活性でドラッグライクな凝集阻害剤の設計・合成に取り組んだ。その結果、有望な医薬リードとなり得る凝集阻害剤として、環状 KLVFF 誘導体及びピリジン/ピリミジン誘導体の創製に成功した。

【参考文献】

- [1] Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8545–8548.
- [2] Amijee, H.; Bate, C.; Williams, A.; Virdee, J.; Jeggo, R.; Spanswick, D.; Scopes, D. I. C.; Treherne, J. M.; Mazzitelli, S.; Chawner, R.; Evers, C. E.; Doig, A. J. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8338–8352.
- [3] Chalifour, R. J.; McLaughlin, R. W.; Lavoie, L.; Morissette, C.; Tremblay, N.; Boule, M.; Sarazin, P.; Stea, D.; Lacombe, D.; Tremblay, P.; Gervais, F. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34874–34881.
- [4] Arai, T.; Sasaki, D.; Araya, T.; Sato, T.; Sohma, Y.; Kanai M. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2577–2583.
- [5] (a) Arai, T.; Araya, T.; Sasaki, D.; Taniguchi, A.; Sato, T.; Sohma, Y.; Kanai M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8236–8239. (b) 新谷卓士 修士論文 (2014 年度) .