

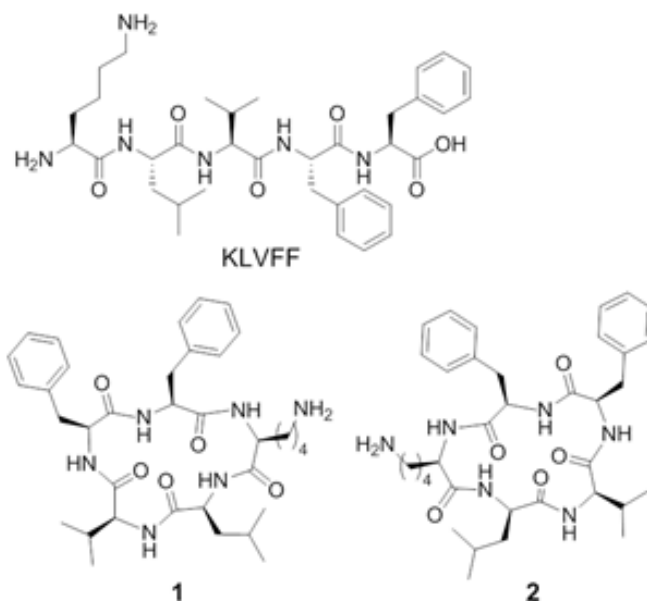
審査の結果の要旨

氏名 新井 唯正

新井唯正は、「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」というタイトルで、アルツハイマー病治療薬の医薬リード創出を目指し、アミロイドβペプチド (Aβ) 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凝集阻害剤の設計・合成に取り組んだ。その結果、主に以下の3種類の研究テーマにおいて、顕著な業績を挙げた。

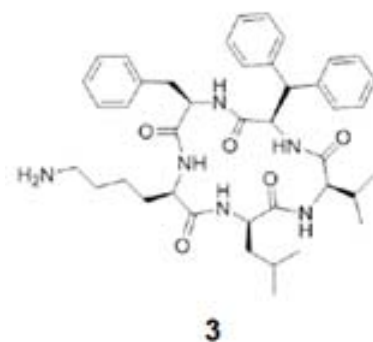
1. 環状 KLVFF のファーマコフォアモチーフの同定

Aβ凝集阻害剤の分子設計方針として、加水分解酵素に対する安定性や細胞膜透過性の改善を期待して、ペプチドの環化戦略に着目した。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 Aβ と阻害剤との相互作用解析において有効であるものと期待した。弱い Aβ凝集活性を示す既存の KLVFF を head-to-tail で環化した環状 KLVFF **1** (= *cyclo*-[KLVFF]) を合成し、そ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。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に由来するものと考え、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ということが分かった。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と同定した。



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

続いて、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**))。

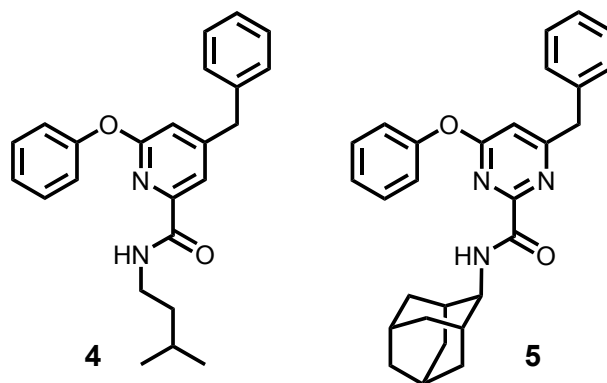


(3)。3のEC₅₀値は7.8 μMであり、2と比べ約3倍、KLVFF (>90 μM) と比べ10倍以上活性が向上した。活性が向上した3を用いて1)凝集阻害メカニズム、2)神経毒性軽減作用、3)血清中安定性についてそれぞれ精査し、医薬リードとしての可能性を検証した。まず、凝集阻害メカニズムの解析にあたり、ThT 蛍光強度の経時変化を精査した結果、off-pathway メカニズムが関与している可能性が考えられた。動的光散乱法、サイズ排除クロマトグラフィー、アミロイドオリゴマー抗体を用いたドットブロットアッセイ及び Seeding アッセイ (Aβ の凝集に対するシード能評価) による検証もまた、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、Aβ 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、Aβ 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を以下のように推定した。3はAβ 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。

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られる。

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

3つ目の研究として、3の構造を基にその低分子化を試み、新規低分子阻害剤 4 を設計した。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や3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。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 Aβ 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。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 (化合物 5)。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、Aβ の配列に基づく低分子阻害剤の論理的創製に成功した。



以上の業績は、医薬化学における顕著な貢献になりうるものと評価され、博士 (薬科学) の授与に値するものと判断した。