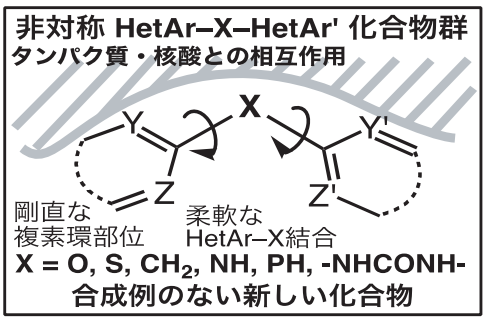
2　新規な認知機能改善薬探索のための分子設計法の開発	有澤　美枝子

【目的】人類の健康増進に深く関係する医薬品等の生物活性物質の開発や、医療を支える機能性材料のための物質供給法の開発が求められている。特に認知症は、認知機能障害を主症状とする疾患であり、2050 年に全世界の認知症患者数は 1 億 3 千人を超えると推計されている。そのため、脳疾患とその進行に伴い発症する多岐に渡る周辺症状に応答できる医薬品が切望されている。ところで合成医薬品の開発では、高度で精密な生物機能の発現と調節の観点から、窒素・酸素・イオウ・リン等のヘテロ hi 原子を空間的に適切な位置に導入した複素環化合物が広く用いられている。ここでは、炭素で形成される分子骨格の適切な位置にヘテロ原子を配置する分子設計法と有機合成法が重要である。特にヒット化合物からリード化合物を探索する方法として 1）優れた活性と物性、2）特許性の観点から新規構造化合物の取得、3）系統的で多様な誘導体合成、4）短段階大量供給が可能であること等を満たす展開可能基本構造の設計が重要であると考えた。本研究では、展開可能基本構造として、多様な活性化合物を系統的かつ効率的に合成する目的で、生体親和性が極めて高い非対称ビス複素環 HetAr–X–HetAr’構造に着目する。ここでは、候補薬剤が脳内で薬効を発現するために、血液と脳を隔てる血液脳関門（Blood Brain Barrier：BBB）と呼ばれる脳特有のバリア機構を透過する必要がある。従って、脳疾患改善薬の開発研究では、新規な分子設計および分子骨格を有し適切な薬効を発現する薬剤の開発と、BBB 透過性を有することが重要になる。

【方法】既存の医薬品の privileged structure として、ジフェニルメタン構造 Ar–CH_2–Ar’ が汎用されている。この芳香環 Ar 基は剛直な構造であり、一方でリンカー部の sp^2 C–sp^3C 結合が自由回転して擬ヘリックス構造を含む多様なコンフォメーションをとる。従って、分子のコンフォメーションを変化させて、タンパク質や核酸のような生体高分子の表面構造に合わせて特異的に結合して生物活性を発現すると考えた。この考えに基づき、Ar 基を複素環 HetAr 基で置換した非対称ビス複素環 HetAr–X–HetAr’ 化合物は、多様な生物活性の発現に利用できると期待した。本研究では、脳疾患改善効果を有する新規化合物の創生を志向して、ロジウム触媒を用いる複素環交換反応を開発して、本方法で得られる新規物質の機能評価を行うことにした。加えて、複素環と同様にヘテロ元素を多数含有する生体親和性の高い構造として、ペプチド誘導体に着目した新しい化学修飾法の開発を実施した。

【結果】非対称 HetAr–X–HetAr’ 化合物の効率的な合成法として、ロジウム触媒を利用した非対称複素環ウレア HetAr–NHCONH–HetAr’ 化合物の新規合成法を開発した。次いで、一方の複素環をステロイド骨格に置換した非対称複素環ステロイド Steroid–X–HetAr 誘導体の合成法を確立した。加えて、高次構造を損なうことなく機能を付与する化学修飾法として、無保護ペプチド中のシスチン S–S 結合に直接官能基を挿入するロジウム触媒的な化学修飾法を開発した。これらの合成法を利用すると多数の新規化合物を簡便に提供できるので、系統的な生物活性評価が可能である。実際に本手法で合成した新規化合物を用いて脳機能改善効果を評価した結果、*in vivo* で活性を示す新規構造の化合物を見出した。これらの成果をまとめて特許出願した。

非対称ビス複素環化合物群 HetAr–X–HetAr’ の合成と生物活性



2. 新規な認知機能改善薬探索のための分子設計法の開発

有澤　美枝子

九州大学 大学院農学研究院 農業薬剤化学研究室

Key words：非対称ビス複素環化合物，ロジウム触媒，複素環交換反応，無保護ペプチドジスルフィド，認知機能改善効果

緒　言

認知症は、認知機能障害を主症状とする疾患であり、2050 年に全世界の認知症患者数は 1 億 3 千人を超えると推計されている。進行状況に応じて周辺症状であるうつ症状、不安症状、攻撃性症状などの精神機能障害の出現が報告されている。近年、青年期のナルコレプシー病や幼少期の注意欠如／多動障害（ADHD）症も脳機能低下による症状と報告されている。即ち、脳疾患とその進行に伴い発症する多岐に渡る周辺症状に応答できる医薬品が切望されている。

ところで合成医薬品の開発では、高度で精密な生物機能の発現と調節の観点から、窒素・酸素・イオウ・リン等のヘテロ原子を空間的に適切な位置に導入した複素環化合物が広く用いられている。ここでは、炭素で形成される分子骨格の適切な位置にヘテロ原子を配置する分子設計法と有機合成法が重要である。これまでに我々は、安価なイオウ単体の直接利用法・塩基を使わない省エネルギー反応・可逆反応による有機ヘテロ元素化合物の合成法・水中均一系触媒反応による合成ペプチドの化学修飾法などの新しい合成法を開発した［1］。このような開発研究は有機化合物の新しい現象と機能の発見につながることから学術的な意義も高い。これらの成果を基に、本研究では、新規性の高い含複素環骨格を構築して、特異な機能を発現する生物活性化合物の開発研究に展開する。ここでは、候補薬剤が脳内で薬効を発現するために、血液と脳を隔てる血液脳関門（Blood Brain Barrier：BBB）と呼ばれる脳特有のバリア機構を透過する必要がある。従って、脳疾患改善薬の開発研究では、新規な分子設計および分子骨格による効果のある薬剤の開発と、BBB 透過性を有することが重要になる。

方　法

本研究では、ジフェニルメタン構造 Ar–CH_2–Ar’ は既存の医薬品の privileged structure として汎用されていることに着目した。この芳香環 Ar 基は剛直な環構造であり、一方でリンカー部の sp^2C–spC 結合が自由回転して擬ヘリックス構造を含む多様なコンフォメーションをとる。従って、分子のコンフォメーションを変化させて、タンパク質や核酸のような生体高分子の表面構造に合わせて特異的に結合して生物活性を発現すると考えた。この考えに基づき、Ar 基を複素環 HetAr 基で置換した非対称ビス複素環 HetAr–X–HetAr’ 化合物は多様な生物活性の発現に利用できると期待した。ここでは、1 原子 –X–または 3 原子リンカー –XCOY–を組み合わせることもできる。しかし、これまでに非対称 HetAr–X–HetAr’ 化合物は、効率的な合成法がないためにほとんど利用されていなかった。最近我々は、非対称 HetAr–X–HetAr’ 化合物 （X = O, S, CH_2など）を合成する新しい方法論として、遷移金属触媒によって二つの有機複素環の結合切断と交換を行う合成法を開発した（図 1）［2］。新反応は、従来法では容易に得られない新規構造と機能を提供できる利点がある。

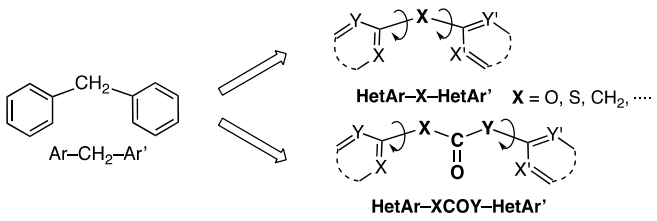


図 1. 非対称ビス複素環 HetAr–X–HetAr' / HetAr–XCOY–HetAr' 化合物

本研究では、脳疾患改善効果を有する新規化合物の創生を志向して、3 原子リンカーとしてウレアリンカーを有する非対称ビス複素環ウレア HetAr–NHCONH–HetAr' 化合物のロジウム触媒新規合成法の開発研究を実施した。また、一方の複素環をステロイド骨格に置換した多様な化合物の合成にロジウム触媒を利用できることも示した。続いて、複素環と同様にヘテロ元素を多数含有する生体親和性の高い構造として、ペプチド誘導体に着目した研究を行った。本研究で得られた新規化合物を利用して、脳疾患改善効果に関する評価研究を実施した。

結果および考察

1. 非対称ビス複素環ウレア HetAr-NHCONH-HetAr' 化合物のロジウム触媒合成と平衡制御

ビス芳香族ウレア Ar-NHCONH-Ar' 化合物は、水素結合可能な二つの NH 基を有するので、タンパク質や核酸等の生体高分子との相互作用が期待でき医薬品の基幹構造として重要である。本研究では、非対称ビス複素環ウレア HetAr–NHCONH–HetAr' 化合物のロジウム触媒合成法として、2 種の対称複素環ウレア化合物間で HetArNH–CO 結合の切断交換による簡便な合成法を開発した［3］。非対称 HetAr-NHCONH-HetAr' 化合物の基質適用範囲の広い効率的な合成法は報告されていない。

$RhH(PPh_3)_4$ 触媒（5 mol%）と 1,2-ビスジフェニルホスフィノベンゼン（dppBz, 10 mol%）存在下、*N,N'*-ビス（4-メトキシ-2-ピリジル）ウレア **1** と等モル量の *N,N'*-ビス（4,6-ジメチル-ピリミジン-2-イル）ウレア **2** をトルエン中加熱還流下 3 時間反応させると、非対称ウレア **3** を収率 85%で与えた（図 2）。得られた非対称ウレア **3** をロジウム触媒条件下で再度反応させると、二種の対称ウレア **1** と **2** を与えたことから、本反応は逆反応が進行する平衡反応系である。等モル量の **1** と **2** をジメチルスルホキシド（DMSO）溶媒中で反応させると、**3** は収率 48%で得られた。即ち、トルエン中ピリミジルウレア誘導体を反応させると、基質を過剰に利用しなくても非対称ウレア **3** を効率的に与え、平衡が生成系に偏ることが分かった。

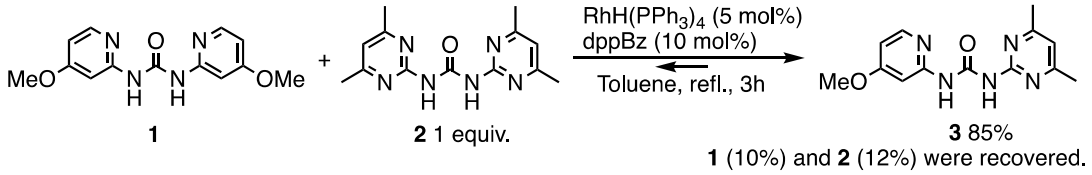


図 2. ロジウム触媒複素環交換反応による非対称ウレア合成とトルエン溶媒中での平衡移動

平衡移動の原因を調べるため、動的光散乱法（DLS）によるトルエン中での見かけの粒子径の測定と X 線結晶構造解析を行なった。その結果、1 mM のトルエン溶液中 90℃で測定を行うと、**1**、**2**、**3** の粒子径はそれぞれ、1 nm 以下、6 nm、50 nm であり、非対称ビス複素環ウレア 3 の粒子径は対称ビス複素環ウレア **1** および **2** よりも大きいことがわかった（図 3a）。一方で 1 mM の DMSO 溶液中 90℃での測定では、**3** の粒子径は 1 nm 以下であった。この結果から **3** は非プロトン性極性溶媒である DMSO 中では会合せず、無極性溶媒であるトルエン中で会合することがわかった。即ち、無極性溶媒中でのウレアの会合が、反応系の平衡移動に寄与する。

更に、**3** のトルエン中での会合様式を明らかにする目的で X 線結晶構造解析を行なった。その結果 **3** は分子内および分子間水素結合による平面で剛直な二量体構造を形成しやすく、分子間で π スタック会合していることが分かった（図 3b）。このため平衡が移動し、非対称ウレア **3** を高収率で与えたと考えられる。

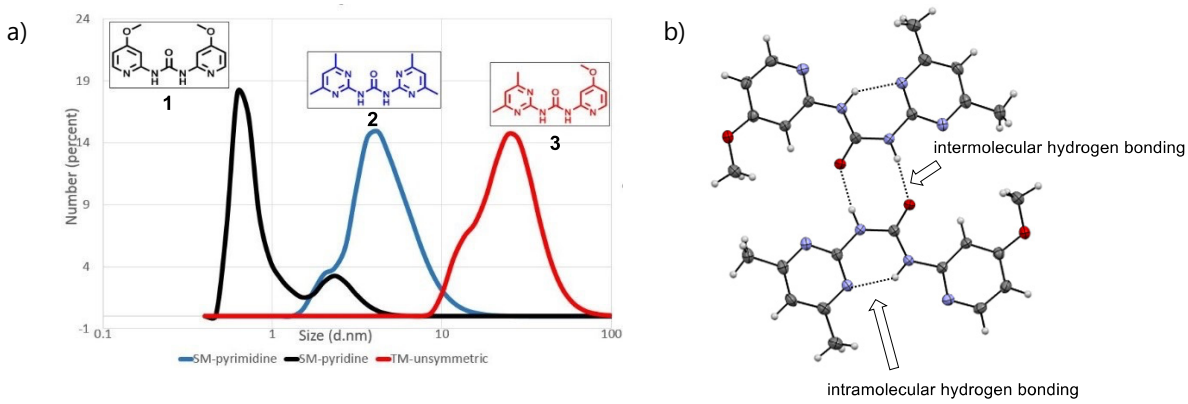


図 3. 動的光散乱法（DLS）による分析と X 線結晶構造解析
a） トルエン中での化合物 **1**、**2**、**3** の DLS 分析。
b） 化合物 **3** の X 線結晶構造解析。

本反応は、ロジウム触媒の添加のみで、比較的容易に合成可能な 2 種の対称複素環ウレア化合物間で複素環交換反応を行える点が特徴で、多様な 5 員環および 6 員環複素環を導入可能であることが分かった。本法は平衡反応であるが、基質の構造を工夫すると会合挙動による平衡制御が可能で、基質を過剰に用いることなく効率的に目的物を合成できた。

2. ステロイド骨格を含有する Steroid–X–HetAr 誘導体のロジウム触媒合成

ロジウム触媒複素環交換反応を利用して非対称 HetAr–X–HetAr' 化合物の合成が可能である。ここでは、剛直な複素環部と柔軟なリンカー部を併せ持つ構造が生体高分子との高い親和性を示すと考えている。そこで、非対称 HetAr–X–HetAr' 化合物の一方の複素環を、同様に剛直な骨格であるステロイド骨格に置換することを考えた。従来のステロイド誘導体の開発は、立体選択的な合成法の開発であったり、骨格の修飾を行う例が多い。複素環とステロイド骨格を一原子リンカーで連結した Steroid–X–HetAr 化合物の合成例はほとんどない。ここでは、イオウリンカーで連結した複素環チオステロイド Steroid–S–HetAr 化合物の合成に着目した。このような新規複素環ステロイド Steroid–X–HetAr 化合物群は、脂溶性が高く BBB 透過性が期待できる。

Wilson の方法に従って、*S*-ベンゾイルチオ化された 17β ステロイドを合成した。$RhH(PPh_3)_4$（10 mol%）、dppBz（20 mol%）存在下、*S*-ベンゾイルチオ化-17β-ステロイドと 4,6-ジフェニル-2-（4-クロロフェノキシ）トリアジン（1 equiv.）をクロロベンゼン中 6 時間加熱還流させると、17β-（4,6-ジフェニル-2-トリアジル）チオ化生成物が収率 81%で得られた（図 4）。6 員環および 5 員環複素環いずれも導入可能である［4］。最近同手法は、アミンリンカー（X = NH）を有する Steroid–X–HetAr 誘導体の合成に適用できることを示した。ロジウム触媒を用いると多様な非対称ビス複素環化合物群およびその類縁体の合成が可能である。新規合成法の開発と利用は、これまでに合成されていない新規化合物を提供できる特徴がある。

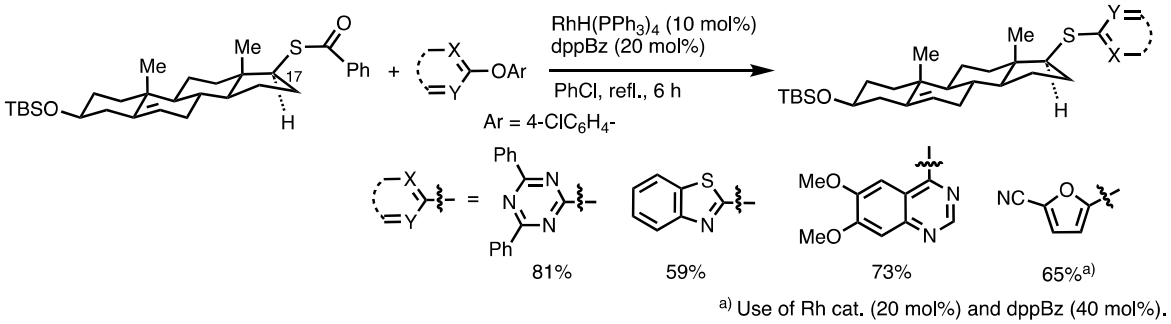


図 4. ロジウム触媒複素環交換反応による Steroid–X–HetAr 化合物の合成

3. ロジウム触媒を用いる無保護ペプチドジスルフィドの化学修飾法の開発

前述の研究に加えて本研究では、複素環と同様にヘテロ元素を多数含有する生体親和性の高い構造としてペプチド誘導体に着目した。具体的には、無保護ペプチド中のシスチンジスルフィド S–S 結合の化学修飾に関する研究を実施した。

タンパク質は、特定の一次配列を持つペプチドが複雑に折りたたまれた構造を有し、これが多様な機能を発現する。この三次元構造を形成するにあたって、可逆的なシスチンジスルフィド形成が大きな役割を担う。従って、タンパク質中のジスルフィド結合の化学修飾は、新しい生物活性の発現のために重要であり、新しい方法論の開発が望まれている。しかし、無保護ペプチド中のシスチンジスルフィド S–S 結合を直接化学修飾した例はない。これは、ジスルフィド S–S 結合が低極性で強固な共有結合であることが理由である。

先に我々は、ロジウム触媒を用いると、低極性シスチンジスルフィド S–S 結合の切断と交換が可能であることを見出した［1］。本研究では、ロジウム触媒存在下、無保護シスチンジスルフィド S–S 結合を活性化して、S–S 結合間に直接官能基を挿入する新しい化学修飾法を検討した。

1）無保護ペプチドジスルフィドへのロジウム触媒パーフルオロアレーン挿入反応

無保護ペプチドジスルフィド S–S 結合間にパーフルオロアリール基を挿入する反応は、比較的強固で小さい架橋を導入できるため、高次構造を損なうことなく安定性の向上と機能の付与が可能である。我々は、ロジウム触媒存在下無保護ペプチドジスルフィドをパーフルオロアレーンと反応させると、S–S 結合間に直接パーフルオロアリール基を挿入できることを明らかにした［5］。

$RhH(PPh_3)_4$ 触媒（20 mol%）、dppBz 配位子（40 mol%）、トリフェニルホスフィン（0.5 eq.）存在下、酸化型グルタチオンとパーフルオロベンゼン（4 eq.）を DMSO 中 70℃で 12 時間反応させると、グルタチオンの S–S 結合間にアリール基が挿入した生成物が収率 86%で得られた（図 5）。反応は無塩基条件下進行し、還元型グルタチオン S–H 結合の副生は確認されなかった。本法は、多様なアミノ酸残基を有する無保護ペプチドジスルフィドに適用可能で、ペプチド S–S 結合を直接アリール化した初めての例である。

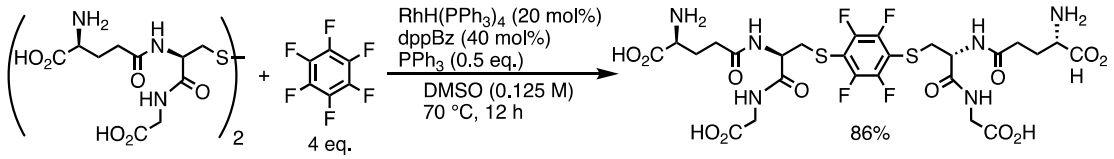


図 5. 無保護グルタチオンジスルフィドへのロジウム触媒パーフルオロアレーン挿入反応

2）イオウ挿入反応による無保護ペプチドポリスルフィドのロジウム触媒合成法

イオウ原子が複数連結したペプチドポリスルフィド類は、シグナル伝達機能や抗酸化機能を有する超イオウ化学種として近年注目されている。安定な有機ジスルフィドとは異なり、有機ポリスルフィド（RSS$_n$SR）は生細胞中で比較的不安定で、共存する求核試薬、求電子試薬および還元／酸化剤と反応して、転移、組換え、伸長、酸化・還元、分解等を起こすことが知られている。従って、多様なペプチドポリスルフィド誘導体を合成して化学的および生物学的特性を調べることは、生体内機能を明らかにする重要な方法である。しかし、これらの効率合成法は知られていない。我々は、ロジウム触媒を用いてイオウ単体 S_8 中のイオウ原子を無保護ペプチド S–S 結合間に挿入する反応を開発した［6］。

RhH(PPh$_3$)$_4$ 触媒と dppv 配位子存在下、無保護ペプチドジスルフィドとイオウ単体を含水溶媒中で反応させると、S–S 結合間にイオウ原子が挿入してポリスルフィド化合物を効率的に与えることを見出した（図 6）。本反応は、入手および取扱い容易な単体イオウを利用できる利点がある。ペプチドトリスルフィドとテトラスルフィドは、逆相クロマトグラフィーによって容易に単離できた。多様なアミノ酸残基を有する無保護ペプチドジスルフィドに適用可能で、ペプチド S–S 結合をイオウ単体を利用して直接触媒的にポリスルフィド化した初めての例である。本反応はグラムスケール合成にも適用できた。

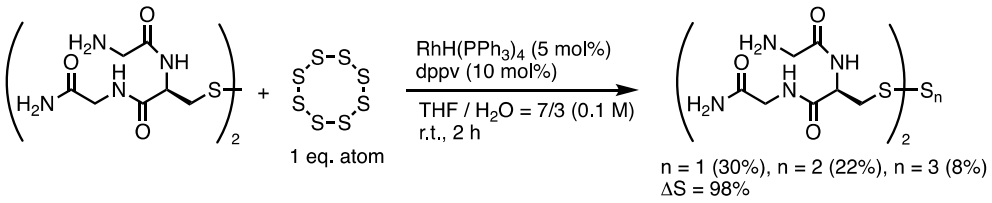


図 6. イオウ挿入反応による無保護ペプチドポリスルフィドのロジウム触媒合成

これまでに、ペプチドチオールの水中酸化反応［7］およびペプチドジスルフィドの水中リン酸化反応［8］を見出しており、ロジウム触媒による無保護ペプチドジスルフィドの化学修飾法は、多様な新規化学修飾ペプチド群の簡便な提供を可能にした。

4. 新規化合物群を利用した認知機能改善に関する評価

本研究では、ロジウム触媒法を利用することによって、新規で多様な非対称ビス複素環化合物 HetAr–X–HetAr’（X=1 または 3 原子リンカー）や生体親和性の高い化学修飾ペプチド誘導体を簡便に合成できることを示した。これらの合成方法論を利用して多数の新規化合物を簡便に提供できるので、系統的な生物活性評価が可能である。一連の研究で得られた新規化合物を用いて認知機能改善効果を探索した結果、本合成化合物群の中から、*in vivo* で活性を示す新規構造の化合物を見出すことに成功した。即ち、新規な分子骨格と BBB 透過性を併せ持つ薬剤の開発を行うことができた。これらの成果をまとめて特許出願した［9］。適切な分子設計と新規な合成方法論の開発によって、生体高分子との親和性が高く生体膜透過性を有する医農薬品開発のための優れたシード化合物を見出せることを示した。

謝　辞

本研究は、九州大学大学院農学研究院農業薬剤化学研究室にて行われた成果であり、実験を実施頂いた学生に感謝いたします。また、一部の成果は前任の東北大学大学院薬学研究科で見出された内容であり、本研究に携わって頂いた全ての皆様に感謝申し上げます。加えて、本研究で得られた新規化合物の機能評価は、本研究の共同研究者である北海道大学大学院医学研究院の吉川雄朗教授、東北大学大学院薬学研究科医薬品開発研究

センターの森口茂樹准教授および稲垣良助教に実施頂いた成果であり、心より感謝申し上げます。また、本研究を進めるにあたり多大なるご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Review: Arisawa, M., Yamaguchi, M. Rhodium-Catalyzed Synthesis of Organosulfur Compounds Involving S-S Bond Cleavage of Disulfides and Sulfur. Molecules, 2020 Aug 7;25(16):3595. PMID: 32784672, DOI: 10.3390/molecules25163595

2） Review: Arisawa, M. Development of Biostimulants and Pharmaceuticals Using Synthetic Heavy-Heteroatom Organic Compounds. J. of SJWS, 2022, 22, 69-79. DOI:10.5939/sjws.220014

3） Arisawa, M., Mizuno, T., Nozawa-Kumada , K., Itto-Nakama, K., Furuta, M., Tanii, S. Rhodium-Catalyzed Synthesis of Unsymmetric Di(heteroaryl)ureas Involving an Equilibrium Shift. Org Lett. 2021, Dec 17;23(24):9382-9386. PMID: 34851119. DOI: 10.1021/acs.orglett.1c03485.

4） Arisawa, M., Nakai, K., Yamada, T., Suzuki, R. Yamaguchi, M. Synthesis of Cycloalkyl/steroidal Heteroaryl Sulfides Using Rhodium-Catalyzed Heteroaryl Exchange Reaction. Heterocycles, 2020, 100, 104-118. DOI: 10.3987/COM-19-14147

5） Fukumoto, K., Yazaki, M., Arisawa, M. Rhodium-catalyzed Insertion Reaction of Perfluoroarenes into Unprotected Peptide Disulfides. Asian J. Org. Chem. 2022 Jul 11, e202200340, DOI: org/10.1002/ajoc.202200340

6） Fukumoto, K., Yazaki, M., Arisawa, M. Rhodium-Catalyzed Synthesis of Peptide Polysulfides by Insertion of Sulfur into Unprotected Peptide Disulfides. Org. Lett. 2022, Nov 11;24(44):8176-8179. PMID: 36317884. DOI: 10.1021/acs.orglett.2c03257

7） Arisawa, M., Fukumoto, K., Yamaguchi, M. Rhodium-Catalyzed Oxidation of Unprotected Peptide Thiols to Disulfides with Oxygen in Water. ACS Catal. 2020, Dec. 7;10, 15060–15064. DOI: org/10.1021/acscatal.0c04799

8） Arisawa, M., Fukumoto, K., Yamaguchi, M. Rhodium-catalyzed phosphorylation reaction of water-soluble disulfides using hypodiphosphoric acid tetraalkyl esters in water. RSC Adv. 2020 Apr 1; 10(23): 13820–13823. PMID: 35492965. DOI: 10.1039/d0ra02377a

9） Inagaki, R., Moriguchi, S., Arisawa, M. Patent No. PCT JP2023-8382; Arisawa, M., Yoshikawa, T. Patent No. PCT/JP2022-9571.