

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05710

研究課題名(和文) 薬剤耐性マラリアの耐性を解除するモルフィナン化合物の創製とチオール基捕捉能の影響

研究課題名(英文) Synthesis of morphinan compounds having drug-resistance reversal activity against drug-resistant malaria and the influence of thiol group-trapping ability

研究代表者

沓村 憲樹 (Kutsumura, Noriki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・教授

研究者番号：00439241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、モルヒナン骨格を有するBNTX誘導体が薬剤耐性マラリアの耐性解除作用や抗トリコモナス活性を有する事を見出し、これらの作用機序には化合物の不飽和二重結合による生体内チオール捕捉能が関与していると推測した。この仮説を実験的に証明する為、チオール捕捉能とクロロキン耐性マラリア殺活性との構造活性相関研究を行った。その結果、抗マラリア活性の強いモルヒナンほどチオール捕捉能も強い傾向にある事を確認した。本結果は、チオール捕捉能を抗マラリア活性評価の一次スクリーニングとして利用できる可能性を示唆している。さらに、モルヒナン骨格における新規転位反応や興味深い生物活性も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア撲滅のため、新規作用機序を持つ薬物開発は多くの製薬企業や大学の創薬研究機関で行われており、本提案研究と同様に、原虫の生息する赤血球内のグルタチオン濃度の制御を鍵とした研究も少なくない。しかし、直接グルタチオンそのものを標的とした研究報告はごく一部であり、しかもドラッグライクな構造であるモルヒナン骨格を基盤とする抗原虫薬の開発研究は報告例が無く、本研究の推進には大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：We have reported that BNTX derivatives containing a morphinan moiety have drug-resistance reversing effect in Plasmodium chabaudi and antitrichomonal activities, and speculated that the thiol group-trapping ability in vivo of the unsaturated double bond in the compounds is involved in these mechanisms of action. To experimentally prove this hypothesis, a structure-activity relationship study was conducted between thiol-group trapping ability and in vitro chloroquine-resistant antimalarial activities. As a result, we have found that the morphinan with stronger antimalarial activity tends to have stronger thiol group-trapping activity. These results suggest that the thiol group-trapping ability in the morphinan-lead compounds might be used as a primary screening for evaluation of antimalarial activity. In addition, we also discovered novel rearrangement reactions in the morphinan skeleton and the resulting product's intriguing biological activities.

研究分野：創薬化学

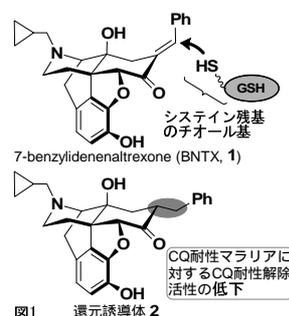
キーワード：モルヒナン オピオイド グルタチオン チオール捕捉能 抗マラリア 抗トリコモナス 耐性解除  
構造活性相関

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

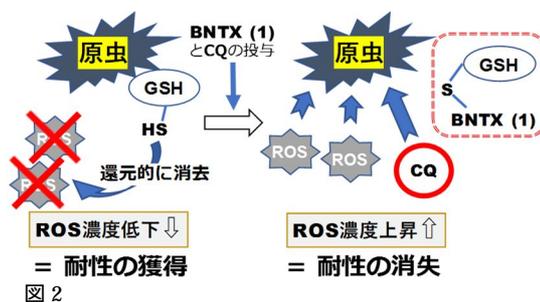
我々は以前、クロロキン (CQ) 耐性の熱帯熱マラリアに感染させたマウスに対して、オピオイド受容体拮抗薬 BNTX (1) と CQ を併用投与するとマラリア原虫が死滅する (CQ 耐性マラリアへの耐性の解除活性が発現する) ことを見出した<sup>1</sup>。また、1 の共役二重結合を還元した誘導体 2 の耐性解除活性が低下したことから、1 の共役二重結合は活性発現に重要であり、宿主のグルタチオン (GSH) のチオール基と共有結合を形成しているのではないかと考えた (図 1)<sup>2</sup>。



酸化ストレスの多い赤血球内で生存・増殖するマラリア原虫は、宿主の GSH を利用することで活性酸素種 (ROS) を還元して打ち消し、常に酸化ストレスを抑制している (耐性を獲得する)<sup>3</sup>。この環境に 1 を投与すると、1 が原虫より先に GSH と結合し、その結果、一時的に赤血球内の ROS 濃度が上昇し、CQ の抗マラリア活性も加わった相乗効果が耐性原虫の死滅に繋がったのではないかと考察した。一方、我々は、マラリアに限らず感染性原虫の多くは、宿主体内で寄生適応を獲得するためにそれぞれ独自の酸化ストレス回避システムを構築していることに着目し、トリコモナス感染症の原因である *T. vaginalis* に対しても 1 の適用を検討した。その結果、1 は単独でもある程度の殺トリコモナス活性を有しており (市販薬のメトロニダゾールの最少発育阻止濃度 (MIC) = 10  $\mu$ M、1 の MIC = 40  $\mu$ M)、予想通り、マラリアの時と同様にその活性発現には共役二重結合の存在が重要であることを見出した<sup>4,5</sup>。

### 2. 研究の目的

前項にて記述したように、1 はマラリア治療においてもトリコモナス治療においても有望なヒット化合物であった。ゆえに、それらに共通して効果を示した作用機序、1 の分子内の共役二重結合と原虫の持つ酸化ストレス回避システムとの関連を明らかにし、原虫感染症の重要な課題である薬物耐性を克服するような新しい作用機序のリード化合物の創製を目指す。そのため本研究では、「共役二重結合を有する 1 が、感染性原虫に独自の酸化ストレス回避システムを阻害することで抗原虫活性を発現する」という考察、特にマラリアにおいては「原虫が GSH を利用して ROS を還元的に消去する前に、1 が GSH と結合することで赤血球中の ROS 濃度を上昇させる (図 2)」という仮説を立証することを目的とする。



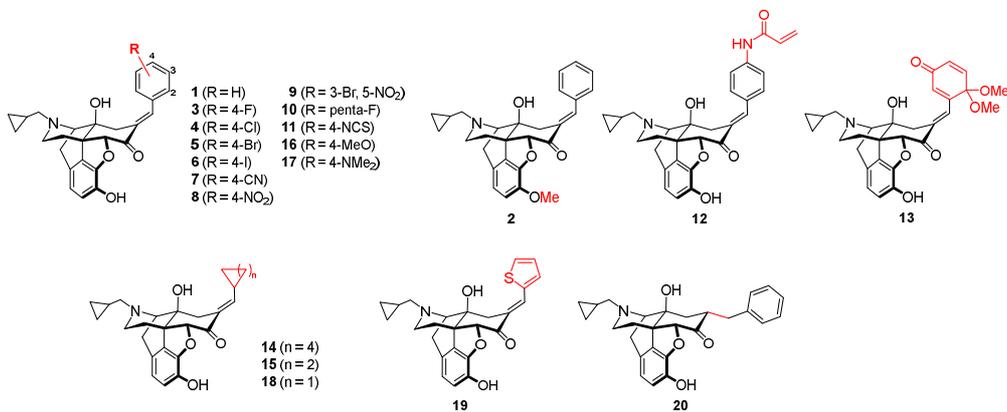
### 3. 研究の方法

本研究ではまず、被験化合物の GSH との反応性と、*in vitro* でのマラリア活性との相関関係を検討することから始めた。被験化合物と GSH の反応性を定量的に評価する方法としては、20 種の BNTX 誘導体を合成し、それぞれの誘導体をメタノール中、プロパンチオールやシステイン保護体と 37 度で反応させ、UPLC と NMR 測定により時間経過に伴う原料の消失比、または、チオール付加体の生成比を計測した ( )。一方、北里研究所熱帯病研究センターにて、我々の化合物の抗マラリア活性 (IC<sub>50</sub> 値) を評価した。既存薬のアルテミシニン、CQ と活性を比較した。抗マラリア活性を評価するために、CQ 耐性マラリア株 K1 および感受性株 FCR3 を用いた ( )。また、K1 株へ被験化合物 12.5  $\mu$ g/mL を投与した時の阻害率 (K1 の死滅率) も評価した。

### 4. 研究成果

BNTX (1) および関連する誘導体 2 ~ 20 をそれぞれ別途合成し、それらを 4 mM の重 DMSO 溶液とした。そして、37 度でプロパンチオールを添加して温度を一定に保ち、一定時間ごとに原料である BNTX 誘導体の残存率を NMR で算出した (ビニルプロトンまたは 4 位のプロトンの積分値より算出した)。プロパンチオールの当量については 3 当量 (12 mM) を用いて実施した。正常なヒト赤血球内のグルタチオン濃度は、個人差もあるが、一般的には 0.4 ~ 3.0 mM と報告されている。しかし、1 当量 (4.0 mM) では本実験におけるチオール付加反応の進行は非常に遅かったため、各誘導体のチオール基捕捉能を比較するには不十分であると考えて 3 当量で実施した。表 1 には、20 種類の化合物の 1 日後、2 日後のグルタチオン残存率をまとめた。

表 1. The residual rate of the derivatives 1–20 after 1 or 2 days.



Compound	Residual rate (%)		Compound	Residual rate (%)	
	1 day	2 days		1 day	2 days
1 <sup>c</sup>	40.2	38.7 <sup>b</sup>	11 <sup>a</sup>	35.1	14.0
2 <sup>c</sup>	36.0	34.1 <sup>b</sup>	12 <sup>c</sup>	54.9	53.2
3 <sup>c</sup>	70.0	56.0	13 <sup>c</sup>	45.8	38.6
4 <sup>c</sup>	46.4	36.3	14 <sup>c</sup>	25.3	16.2
5 <sup>c</sup>	41.8	31.2	15 <sup>c</sup>	6.8	6.0
6 <sup>c</sup>	51.3	40.1	16 <sup>c</sup>	79.0	66.8
7 <sup>c</sup>	24.6	17.7	17 <sup>c</sup>	90.0	88.3
8 <sup>c</sup>	15.6	10.3	18 <sup>c</sup>	82.6	80.2
9 <sup>c</sup>	6.7	6.3	19 <sup>c</sup>	90.9	83.8
10 <sup>c</sup>	36.6	24.8	20 <sup>c</sup>	97.9	89.8

<sup>a</sup> hydrochloride. <sup>b</sup> 2.5 days later. <sup>c</sup> tartrate.

また、これらの 20 種の被験化合物に対して、CQ 耐性マラリア株 K1 および感受性株 FCR3 を用いて抗マラリア活性の評価を行った。その結果、耐性株 K1 に対しては、ジメチルアミノ体 17 を除いて IC<sub>50</sub> = 1.22 ~ 11.53 μg/mL で抗マラリア活性を示した。また、感受性株 FCR3 に対しては、17 と還元体 20 を除いて IC<sub>50</sub> = 1.14 ~ 8.16 μg/mL で抗マラリア活性を示した。これらの結果、抗マラリア活性とチオール捕捉能をまとめたものが図 3 である。

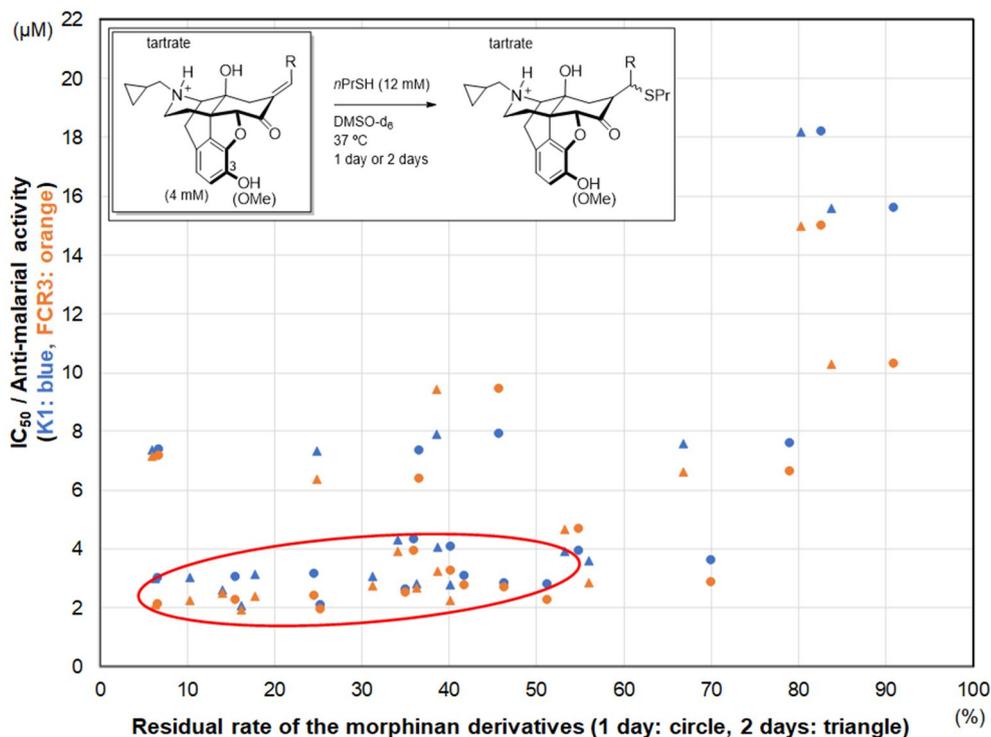


図 3 BNTX 誘導体の抗マラリア活性とチオール捕捉能の相関

図3は、20種の各種 BNTX 誘導体 (4 mM) とプロパンチオール (12 mM) をそれぞれ 37 度で混合し、1 日後 (○) および 2 日後 ( ) の原料の残存率を縦軸に、対応する BNTX 誘導体のマラリア K1 株 (青色) および FCR3 (オレンジ色) への IC<sub>50</sub> を横軸にプロットしたものである。チオール捕捉能が高い BNTX 誘導体ほど抗マラリア活性が強く (赤色楕円で囲った部分)、逆に、チオール捕捉能が低い BNTX 誘導体ほど抗マラリア活性が弱い傾向を顕著に示した分布図となっており、我々の当初の仮説を支持する結果であると言える。この実験事実は、BNTX 誘導体の抗マラリア活性や抗トリコモナス活性を評価する上で、BNTX 誘導体のチオール基の化学的な捕捉能の検討は、ある程度信頼性のある 1 次スクリーニングになり得る可能性を示すものである。本結果については、Molecules にて論文報告した。

また、この研究で用いる BNTX 誘導体合成の過程で、モルヒナン骨格上に特異的な新規転位反応を見出した。反応条件を精査し、反応機構の解明を試みた結果、その新規反応は分子状酸素を介した Baeyer-Villiger 型酸化反応および Ireland-Claisen 転位反応が連続的に進行したものであることを見出した。また、合成した誘導体の中には、鎮痛効果に關与するオピオイド受容体や睡眠・覚醒に關与するオレキシン受容体に作用する化合物も副次的に見出すことにも成功した。これらの結果についても、Bioorg. Med. Chem. Lett.誌にて論文報告した。

#### <参考文献>

- <sup>1</sup>Nagase, H. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4710-4712. <sup>2</sup>Nagase, H. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5174-5176. <sup>3a</sup>van Veen, H. W. *et al. Int. J. Antimicrob. Ag.* **2003**, *22*, 301-317. <sup>3b</sup>Su, X. *et al. J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 7687-7696. <sup>4a</sup>Nagase, H. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4890-4892. <sup>4b</sup> 科研費若手研究 (B) 15K16553. <sup>5a</sup>Nagase, H. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4375-4383. <sup>5b</sup> 科研費若手研究 (B) 17K13259.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Koki, Yamamoto Naoshi, Ishikawa Yukiko, Irukayama-Tomobe Yoko, Tanimura Ryuji, Saitoh Tsuyoshi, Nagumo Yasuyuki, Kutsumura Noriki, Yanagisawa Masashi, Nagase Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Effect of removal of the 14-hydroxy group on the affinity of the 4,5-epoxymorphinan derivatives for orexin and opioid receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128527 ~ 128527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128527	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Koki, Kutsumura Noriki, Yamamoto Naoshi, Nagumo Yasuyuki, Saitoh Tsuyoshi, Ishikawa Yukiko, Irukayama-Tomobe Yoko, Tanimura Ryuji, Yanagisawa Masashi, Nagase Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Essential structure of orexin 1 receptor antagonist YNT-707: Conversion of the 16-cyclopropylmethyl group to the 16-sulfonamide group in d-nor-nalfurafine derivatives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128550 ~ 128550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128550	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagumo Yasuyuki, Kato Koki, Iio Keita, Saitoh Tsuyoshi, Kutsumura Noriki, Yamamoto Naoshi, Ishikawa Yukiko, Irukayama-Tomobe Yoko, Ogawa Yasuhiro, Baba Takeshi, Tanimura Ryuji, Yanagisawa Masashi, Nagase Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Discovery of attenuation effect of orexin 1 receptor to aversion of nalfurafine: Synthesis and evaluation of D-nor-nalfurafine derivatives and analyses of the three active conformations of nalfurafine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127360 ~ 127360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2020.127360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hino Tsubasa, Kutsumura Noriki, Saitoh Tsuyoshi, Yamamoto Naoshi, Nagumo Yasuyuki, Mogi Yuzo, Watanabe Yoshikazu, Nagase Hiroshi	4. 巻 63
2. 論文標題 Novel Baeyer-Villiger-type oxidation of 4,5-epoxymorphinan derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 152714 ~ 152714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2020.152714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長瀬 博、沓村 憲樹	4. 巻 56
2. 論文標題 中枢性難治性そう痒症治療薬の開発とかゆみの作用機序	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 846 ~ 850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.9_846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kutsumura Noriki, Koyama Yasuaki, Saitoh Tsuyoshi, Yamamoto Naoshi, Nagumo Yasuyuki, Miyata Yoshiyuki, Hokari Rei, Ishiyama Aki, Iwatsuki Masato, Otoguro Kazuhiko, Omura Satoshi, Nagase Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Structure-Activity Relationship between Thiol Group-Trapping Ability of Morphinan Compounds with a Michael Acceptor and Anti-Plasmodium falciparum Activities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1112 ~ 1112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25051112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 沓村憲樹
2. 発表標題 薬を創る
3. 学会等名 東京理科大学大学院理学研究科「化学特別講義」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本奈津美、斉藤毅、石川有紀子、徳田明久、日野翼、山本直司、南雲康行、沓村憲樹、柳沢正史、長瀬博
2. 発表標題 17-N-フルオロアルキルナルフラフィン誘導体の合成と薬理評価
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳田明久、南雲康行、片山璃沙子、上田壮志、上園保仁、山本直司、斉藤毅、沓村憲樹、長瀬博
2. 発表標題 オピオイド受容体作動薬間における痙攣作用発現差異の分子機序検討
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤光貴、山本直司、斉藤毅、南雲康行、入鹿山容子、石川有紀子、沓村憲樹、柳沢正史、長瀬博
2. 発表標題 ナルフラフィンD環縮環誘導体の設計・合成及びその薬理評価
3. 学会等名 第49回複素環化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 雨澤真櫻、斉藤毅、山本直司、沓村憲樹、南雲康行、石川有紀子、入鹿山容子、柳沢正史、長瀬博
2. 発表標題 1,3,5-Trioxazatriquinane骨格を用いたオレキシン受容体作動薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野翼、渡邊義一、茂木雄三、斉藤毅、山本直司、南雲康行、沓村憲樹、長瀬博
2. 発表標題 モルヒナン誘導体の酸素を用いた新規転位反応とその反応機構の検討
3. 学会等名 第43回有機電子移動化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日野翼、渡邊義一、茂木雄三、斉藤毅、南雲康行、山本直司、沓村憲樹、長瀬博
2. 発表標題 メルヒナン誘導体の酸素を用いた新規転位反応とその反応機構の検討
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沓村憲樹
2. 発表標題 ピシナルジプロミドの基質特異的な脱離反応に関する研究と天然物合成への応用
3. 学会等名 令和元年度第2回天然物化学セミナー特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------