

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月18日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08686

研究課題名(和文) オピオイド μ /二量体化受容体特異的な新規鎮痛薬の開発並びに臨床応用への基盤構築

研究課題名(英文) Research and development of novel mu and delta opioid receptor-specific analgesics

研究代表者

上園 保仁 (Uezono, Yasuhiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：20213340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：オピオイド μ /二量体化受容体の選択的作動薬ML335は、耐性を示さずに鎮痛効果を有することが報告された。しかし、本研究における μ /二量体化発現細胞を用いたアッセイでは、ML335は μ /受容体に対しlow efficacy、low potencyであった。そこでML335の構造をベースに100種弱の化合物合成を行いアッセイしたところ、5種の化合物がML335に比べ μ OR、ORに低親和性、かつ μ /二量体化受容体に高親和性であった。現在、同物質の特許化およびさらなる新規化合物の合成を進めている。

研究成果の概要(英文)：ML335, an opioid mu/delta heterodimer-specific agonist discovered in 2013, was reported to have analgesic effects without tolerance. However, in our assay system with mu/delta heterodimerized receptor-expressing cells, the compound seemed to have low efficacy and low potency to the mu/delta receptors. Based on the fact, we sought to construct and discover compounds that have more specific activities to the mu/delta receptors than that of ML335. In the course of screening assay with approximately 100 newly constructed compounds, we found 5 compounds out of 100 possessing higher affinity to the mu/delta receptors but lower affinity to each of mu or delta opioid receptors. We are now trying to take patents of these compounds and also have been constructing novel compounds extremely specific to the mu/delta heterodimerized opioid receptors.

研究分野：分子薬理学、疼痛学、緩和医療学

キーワード：GPCR オピオイド受容体 μ /二量体化受容体 トランスレーショナルリサーチ オピオイド耐性

1. 研究開始当初の背景

オピオイド受容体をコードする遺伝子は、 μ 、 δ 、 κ の3種類のサブタイプのみであるにもかかわらず、オピオイド製剤の薬理学特性にはさらに多様性があり、 $\mu 1$ 、 $\mu 2$ 、 $\mu 3$ 、 $\mu 4$ などのサブ・サブタイプを考えなければ説明がつかなかった。近年 GPCR にはヘテロ二量体が生体内に存在し独自の作用を有することが明らかとなり、オピオイド受容体にも μ/δ 等のヘテロ二量体が生体内に存在することが明らかとなった。この二量体化オピオイド受容体の薬理活性の特徴は、これまでの仮想サブ・サブタイプの特性を説明できるものもあり、オピオイド受容体の多様性の説明に二量体化オピオイド受容体の存在が重要と考えらえるようになってきている。

μ 受容体を完全に欠損するノックアウトマウスは、オピオイド受容体の発現に変化はないにも関わらず、選択的アゴニスト、デルトロフィン の鎮痛効果が激減する (Eur J Neurosci, 13: 153, 2001)。この事実は、生体内では μ および δ 受容体に何らかの相互作用が存在することを示唆し、ヘテロ μ/δ 二量体化オピオイド受容体の生体内での存在を強く示唆するものである。

また、モルヒネの慢性処置により、マウスの脊髄や脳内において μ/δ 受容体が増加すること (Sci Signal, 3: ra54, 2010)。さらに μ 受容体の第 1 膜貫通領域に作用し μ/δ 受容体形成を阻害するペプチドを用いることにより、モルヒネの鎮痛耐性が修飾されることが報告され (Neuron, 69: 120, 2011)、モルヒネ鎮痛耐性に μ/δ 受容体形成ならびに μ/δ 受容体シグナルが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

これまでに私たちは、 μ/δ 二量体化オピオイド受容体の形成、その局在を Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 法による可視化に成功し、さらに二量体化オピオイド受容体の活性化のみをアッセイできるシステムを開発し、 μ/δ 受容体を含む二量体化 GPCR の解析を行ってきた。加えて申請者は、 μ 、 δ 受容体をコードするベクターの改良により μ 、 δ 受容体を 1:1 で安定共発現する細胞の構築に成功した。また Gi/o 共役型オピオイド受容体の活性を 96 well プレートで迅速かつ高感度に評価できるシステム (CellKey™ システム) を樹立した。本研究では、これまでに高親和性新規 μ 、 δ 各受容体の合成に成功している北里大学藤井秀明教授の協力を得て、教授のこれまでに有しているオピオイド受容体の機能-構造連関の情報を用いて、既存の化合物に加え、ML335 分子を改良することで種々の新たな μ/δ 作動薬を作製し、これらの化合物をスクリーニングに用いる。

2. 研究の目的

オピオイド受容体は G タンパク共役型受容体 (GPCR) ファミリーに属する。GPCR は単量体としてだけでなく、ヘテロ二量体としても生体内に存在することがほぼ明らかになってきた。近年、オピオイド受容体は μ/δ 二量体化受容体 (μ/δ 受容体) を形成すること、モルヒネ慢性投与マウスの脳や脊髄では、 μ/δ 受容体が増加すること、さらに昨年、新規 μ/δ 受容体選択性作動薬 ML335 が耐性を示さずに鎮痛効果を有すること等が報告された (PNAS 110: 12072, 2013)。つまり、 μ/δ 作動薬の開発は耐性を示さない鎮痛薬の開発につながる可能性を示唆している。

申請者は、 μ 、 δ 受容体をコードするベクターを改良することで μ 、 δ 受容体を 1:1 で安定共発現する細胞の構築に成功した。また Gi/o 共役型オピオイド受容体の活性を迅速かつ高感度に評価できるシステム (CellKey™ システム) を樹立した。本研究は、数多くの新規 μ 、 δ 各受容体合成に成功している北里大学藤井秀明教授の協力を得て、これまでに集積された機能-構造連関の情報を基に ML335 の構造を改良し、あるいは全く構造の異なる新規化合物も含めて、CellKey™ システムによる μ/δ 受容体特異的鎮痛薬スクリーニングを行い、ML335 の特性を上回るより良いシーズを同定する。同定後は医薬基盤研究所の支援を得て非臨床試験を行い、さらに first in man 試験を国立がん研究センター早期・探索臨床研究センターにて行い、最終的に上市をめざすことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 評価系の確立および薬物スクリーニング
in vitro 評価で用いる 1) Halotag- μ 受容体安定発現細胞、2) T7tag- δ 受容体安定発現細胞、および 3) Halotag- μ /T7tag- δ 受容体が 1:1 で安定に発現している安定共発現細胞を用いスクリーニングを行っていく。受容体安定発現細胞並びに μ/δ が 1:1 で発現する安定細胞は、一過性発現細胞を用いた際の受容体発現のばらつきなど、評価の不安定性を与える要素を除くことができる。 μ/δ 受容体共発現細胞は、 μ 受容体、 δ 受容体が同様に発現していることを確認している。

2) スクリーニング

1) で確立した CellKey™ システムを用いて、藤井教授により提供された薬物群のスクリーニングを行い、ML335 の活性を上回る μ/δ 受容体選択的作動薬を見出す。ML335 様、アゴニスト様、 μ アゴニスト様として分類している化合物のすべてを比較し評価する。

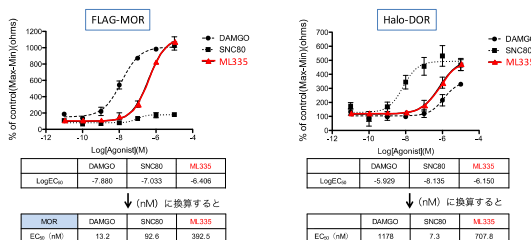
3) 見出した μ / 受容体作動薬と ML335 との構造比較、並びに結果に基づく新規 ML335 関連化合物の合成とその評価

2)にて μ / 受容体作動薬活性が認められた化合物と ML335 との構造との関連性を 3D システム予測コンピュータも用い解析し (藤井) 比較の結果より μ / 受容体作動活性に必要な官能基、配向性等の情報を抽出し、新たな化合物設計を行う。新規合成された (藤井) ML335 関連化合物を CellKey™ で評価する。2)、3)により複数の μ / 受容体作動薬をリストアップする。

4. 研究成果

近年、オピオイド受容体は生体で μ / 二量体化受容体 (μ / 受容体)を形成すること、そしてその薬物特性は単量体のものと異なることがわかってきた。その一例として、 μ / 受容体選択的作動薬が耐性を示さず鎮痛効果を有することが報告された。近年 μ / 受容体に選択性を示す部分作動薬 ML335 が化合物ライブラリースクリーニングより見出された。ML335 は鎮痛効果を示し、加えてモルヒネ鎮痛耐性を生じたマウスに対して鎮痛効果を示したことから、 μ / 受容体作動薬が鎮痛耐性を起こさない新規力テゴリーの鎮痛薬になり得ること、従ってオピオイド鎮痛耐性形成時の新たな薬物処方を提示できる可能性が考えられた。

ML335 は鎮痛効果を示し、さらにモルヒネ鎮痛耐性を生じたマウスに対しても鎮痛効果を示したことから、鎮痛耐性を起こしにくいという利点を生かし、モルヒネ鎮痛耐性が生じた際の新たな薬物処方になる可能性が考えられた。しかし当研究室で CellKey を用いた実験では、ML335 は μ / 受容体発現細胞に対し efficacy、potency は共に低く、さらに μ / 受容体に対する選択性もかなり低い(論文通りにはいかな)ことが判明した。実験系の最適化を何度も行い ML335 の活性を確認したが、報告された ML335 の特性を再現することができなかった。図 1 に μ および 受容体発現細胞を用いた ML335 の特性を示す。また図 2 に μ / 二量体化受容体を用いた ML335 の結果を示す。



SNC80 ... DOR に選択的な作動薬
 DAMGO ... SNC80程の受容体選択性はないが、MOR に選択的な作動薬
 ML335 ... MOR、DOR両者間でのEC₅₀は同等、E_{max}は各受容体選択的作動薬と同等

図1 CellKey™ システムを用いた ML335 の MOR 及び DOR に対する活性

T7-DOR+HaloTag-MOR
 発現HEK293 #32

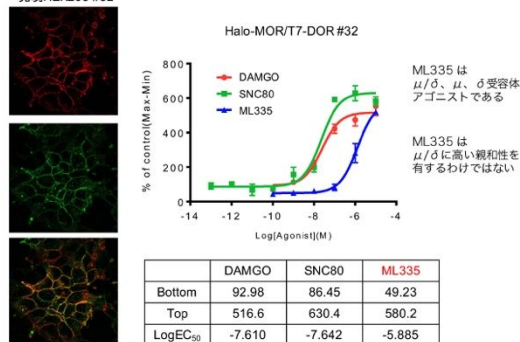


図2 Halo-MOR/T7-DOR発現細胞を用いたCellKey™ アッセイ

そこで ML335 をシーズとして 100 種に近い新たな化合物を作製し、CellKey assay を行った。その結果、5 種の化合物に、ML335 と比較し μ OR、 δ OR に親和性が低く、 μ /、ML335 を上回る親和性を有する特性が見出された (図 3、図 4)。現在、同物質の特許化の可能性について知財担当者と相談中であり、さらに同物質をシーズとする新規化合物の合成を行っているところである。

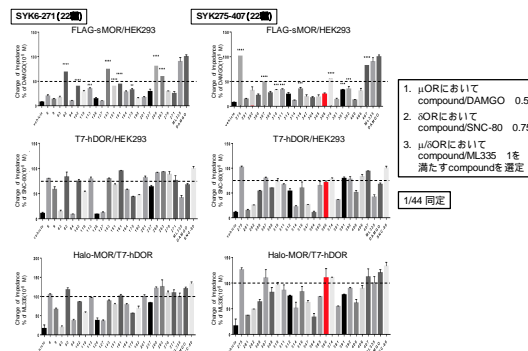


図3 Compoundsを用いたCellKey アッセイデータ

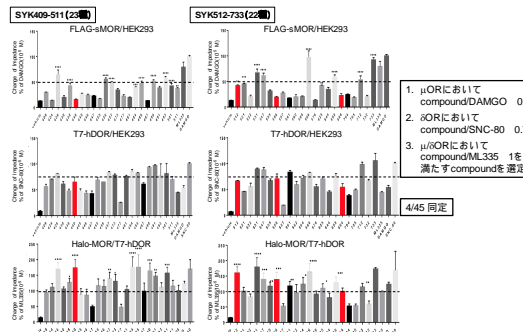


図4 Compoundsを用いたCellKey アッセイデータ

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 20 件)

- 1) Meguro Y, Miyano K, Hirayama S, Yoshida Y, Ishibashi N, Ogino T, Fujii Y, Manabe S, Eto M, Nonaka M, Fujii H, Ueta Y, Narita M, Sata N, Yada T, Uezono Y. Neuropeptide oxytocin enhances μ opioid receptor signaling as a positive allosteric modulator. *J Pharmacol Sci*, Epub ahead of print, 2018. 査読有 DOI:10.1016/j.jphs.2018.04.002
- 2) Mori T, Kuzumaki N, Arima T, Narita M, Tateishi R, Kondo T, Hamada Y, Kuwata H, Kawata M, Yamazaki M, Sugita K, Matsuzawa A, Baba K, Yamauchi T, Higashiyama K, Nonaka M, Miyano K, Uezono Y, Narita M. Usefulness for the combination of G-protein- and β -arrestin-biased ligands of μ -opioid receptors: Prevention of antinociceptive tolerance. *Mol Pain*, 13: 1-9, 2017. 査読有 DOI:10.1177/1744806917740030
- 3) Shindou H, Shiraishi S, Tokuoka SM, Takahashi Y, Harayama T, Abe T, Bando K, Miyano K, Kita Y, Uezono Y, Shimizu T. Relief from neuropathic pain by blocking of platelet-activating factor-pain loop. *FASEB J*, 31 (7): 2973-2980, 2017. 査読有 DOI:10.1096/fj.201601183R
- 4) Kajitani N, Miyano K, Okada-Tsuchioka M, Abe H, Itagaki K, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Uezono Y, Takebayashi M. Identification of lysophosphatidic acid receptor 1 in astroglial cells as a target for glial cell line-derived neurotrophic factor expression induced by antidepressants. *J Biol Chem*, 291 (53): 27364-27370, 2016. 査読有 DOI:10.1074/jbc.M116.753871
- 5) Fujitsuka N, Asakawa A, Morinaga A, Amitani MS, Amitani H, Katsuura G, Sawada Y, Sudo Y, Uezono Y, Mochiki E, Sakata I, Sakai T, Hanazaki K, Yada T, Yakabi K, Sakuma E, Ueki T, Niijima A, Nakagawa K, Okubo N, Takeda H, Asaka M, Inui A. Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1. *Mol Psychiatry*, 21 (11): 1613-1623, 2016. 査読有 DOI:10.1038/mp.2015.220
- 6) Ohbuchi K, Miyagi C, Suzuki Y, Mizuhara Y, Mizuno K, Omiya Y, Yamamoto M, Warabi E, Sudo Y, Yokoyama A, Miyano K,

Hirokawa T, Uezono Y. Ignavine: orthosteric enhancer of the μ opioid receptor. *Sci Rep*, 6: 31748, 2016. 査読有 DOI:10.1038/srep31748

- 7) Tagami K, Kashiwase Y, Yokoyama A, Nishimura H, Miyano K, Suzuki M, Shiraishi S, Matoba M, Ohe Y, Uezono Y. The atypical antipsychotic, olanzapine, potentiates ghrelin-induced receptor signaling: an in vitro study with cells expressing cloned human growth hormone secretagogue receptor. *Neuropeptides*, 58: 93-101, 2016. 査読有 DOI:10.1016/j.npep.2015.12.010
- 8) Doi S, Mori T, Uzawa N, Arima T, Takahashi T, Uchida M, Yawata A, Narita M, Uezono Y, Suzuki T, Narita M. Characterization of methadone as a β -arrestin-biased μ -opioid receptor agonist. *Mol Pain*, 12: 1744806916654146, 2016. 査読有 DOI:10.1177/1744806916654146
- 9) Hisaoka-Nakashima K, Miyano K, Matsumoto C, Kajitani N, Abe H, Okada-Tsuchioka M, Yokoyama A, Uezono Y, Morioka N, Nakata Y, Takebayashi M. Tricyclic antidepressant amitriptyline-induced glial cell line-derived neurotrophic factor production involves pertussis toxin-sensitive $G\alpha_{i/o}$ activation in astroglial cells. *J Biol Chem*, 290 (22): 13678-13691, 2015. 査読有 DOI:10.1074/jbc.M114.622415

[学会発表](計 42 件)

- 1) 上園保仁、宮野加奈子. オピオイドの効かないがん患者の疼痛に対する新規治療法確立のための基礎研究. 第 37 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2017.
- 2) 宮野加奈子、大道容子、石橋尚人、今井康太、荻野拓海、野中美希、南浩一郎、平山重人、吉澤一巳、藤井秀明、上園保仁. ヒドロモルフォンのオピオイド受容体を介した薬理学的特性の解析～既存の医療用麻薬との比較～. 第 11 回日本緩和医療薬学会年会、2017.
- 3) 上園保仁、宮野加奈子、川合田恵美、大栗宝子、佐藤汐莉、根本悦子、松出知子、西村瞳、江藤萌子、野中美希、南浩一郎、白石成二、樋上賀一、藤井秀明. 新規オピオイド系鎮痛薬ヒドロモルフォンの μ 、 κ オピオイド受容体への効果の解析と既存のオピオイド薬との比較. 第 89 回日本薬理学会年会、2016.
- 4) 上園保仁、宮野加奈子、白石成二. 本邦で用いられている医療用麻薬および hydromorphone の μ 、 κ オピオイド受容体に対する特性の解析とその比較. 第

74 回日本癌学会学術総会、2015 .

- 5) 上園保仁. 今、緩和・支持療法を必要とする方への適切な薬物療法と明日の患者のための創薬. 第 45 回日本神経精神薬理学会、2015 .

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Uezono Y, Miyano K. Pain and herbal medicine. -Effectiveness of Japanese kampo medicines on pains associated with cancer patients- In: Herbal Medicines, Methods in Pharmacology and Toxicology. Springer Science, pp. 19-36, 2016.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上園 保仁 (UEZONO, Yasuhito)
国立がん研究センター・研究所・分野長
研究者番号 : 20213340

(3)連携研究者

藤井 秀明 (FUJII, Hideaki)
北里大学・薬学部・教授
研究者番号 : 30458757