

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590133

研究課題名(和文) オピオイド 受容体サブタイプと受容体ダイマーの関連の解明

研究課題名(英文) Investigation of the relationship between opioid kappa receptor subtype and receptor dimerization

研究代表者

藤井 秀明 (Fujii, Hideaki)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：30458757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が構築した 作動薬の3Dファーマコフォーモデルに基づき、結合様式1, 3, および4に属する化合物を合成し、オピオイド受容体に対する結合親和性および作動活性を検討した。その結果、結合能および活性の強さには差は認められたが、いずれの化合物も 受容体選択的な結合性および 作動活性を示した。化合物の結合様式が作動活性評価に用いたCellKey System™の検出波形に影響するかを検討したが、影響は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：On the basis of our 3D pharmacophore model of kappa agonists, compounds belonging to the binding mode 1, 3, or 4 were synthesized and their binding affinities and agonistic activities for the opioid receptors were evaluated. The test compounds showed selective binding abilities and agonistic activities for the kappa receptor although the strengths of bindings and activities depended on the structure. The binding modes of the compounds were not observed to affect the impedance patterns detected by CellKey System™ which was used in the functional assays.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計 受容体ダイマー オピオイド 作動薬 ファーマコフォー

1. 研究開始当初の背景

古くからオピオイド受容体にはサブタイプ(1~3)の存在が提唱されてきたが、その存在は明らかにされていない。近年、オピオイド受容体をはじめ様々な受容体はダイマーとしても存在し、かつ機能することが見出され、オピオイド受容体ダイマーとサブタイプの関連が示唆されているが未だ統一した見解は得られていない。一方、我々が構築した作動薬の3Dファーマコフォーモデルによると、結合様式は4種存在し、結合様式1~3に属する化合物は、各々3、1、および2作動薬に分類されるものであったことから、今まで提唱されてきた受容体サブタイプは作動薬の結合様式に起因する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) 各結合様式に該当する化合物を設計・合成し、受容体への結合性の有無、作動活性の発現を確認する。

(2) 設計・合成した各結合様式に属する化合物の作動作用が、提唱されているサブタイプ(1~3)に相当するかを検証する。

(3) オピオイドリガンドの活性評価にCellKey System™ (評価対象細胞に人為的な操作を加える必要が無く、かつ標識化合物の必要の無いラベルフリー-セルベースアッセイ系)が利用できることを検証する。

(4) 設計・合成した各結合様式に属する化合物のオピオイド受容体ダイマーに対する作用を評価し、結合様式とオピオイド受容体ダイマーの関係および/または受容体サブタイプとオピオイド受容体ダイマーの関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) 各結合様式に属する化合物を設計・合成する。結合様式1および2に属する化合物としては、既知化合物であるTRK-820およびU-50,488H、U-69,593を用いる。結合様式3に属する化合物としては、TRK-820のフェノール部分を除去したデカヒドロイソキノリン誘導体、およびフェノール部分をシクロヘキセン環に変換した化合物を合成する。結合様式4に属する化合物としては、TRK-820のN-ペルフルオロアルキル誘導体(窒素置換基としてペルフルオロアルキル基を導入することにより、窒素の塩基性を大きく低下させる)を合成する。設計・合成した化合物のオピオイド受容体に対する受容体結合能は、受容体結合実験により評価し、作動活性については、³⁵S]GTPγS結合実験および/またはCellKey System™により評価する。

(2) サブタイプへの作用については、1サブタイプに親和性が高いとされるU-69,593、

2サブタイプに親和性が高いとされるプレマゾシンのトリチウム標識体を用い、受容体結合実験により検討する。なお、3サブタイプに関してはTRK-820が高親和性を示すとされているが、トリチウム標識体が入手できないため、受容体結合実験によるサブタイプの検討からは除外することにする。また、作動活性の観点からは、CellKey System™により検出される電気抵抗性の変化パターン(作動活性に相当する)が各結合様式に属する化合物により影響されるかどうかを検討する。

(3) 複数の化合物の作動活性をCellKey System™、³⁵S]GTPγS結合実験、およびcAMP評価系にて評価し、作動活性を比較する。3つの作動活性評価系の結果を比較することにより、評価対象細胞に人為的な操作を加える必要が無く、かつ標識化合物の必要の無いラベルフリー-セルベースアッセイ系であるCellKey System™をオピオイドリガンドの活性評価に用いることができるかを検討する。

(4) 2種のタイプ(例えばμタイプとκタイプ)の受容体を共発現させることにより、オピオイド受容体ダイマー(先の例では、μ受容体とκ受容体のヘテロダイマーが含まれる)を発現した細胞系を樹立し、これを用いて化合物評価を行う。化合物の受容体ダイマーに対する作用の評価は、主に、標識化合物を用いる必要の無いCellKey System™を用いて行い、得られた結果と(1)および(2)で得られた結果とを比較することにより、結合様式とオピオイド受容体ダイマーの関係および/または受容体サブタイプとオピオイド受容体ダイマーの関係を検討する。

4. 研究成果

(1) 作動薬の3Dファーマコフォーモデルが提唱している4種の結合様式は図1に示す通りである。結合様式1および2に属する化合物としては、既知化合物であるTRK-820およびU-50,488H、U-69,593を用いた(図2)。

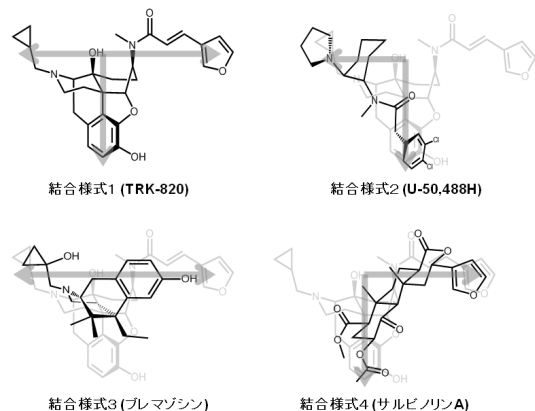


図1. 作動薬の3Dファーマコフォーモデルによる4種の結合様式

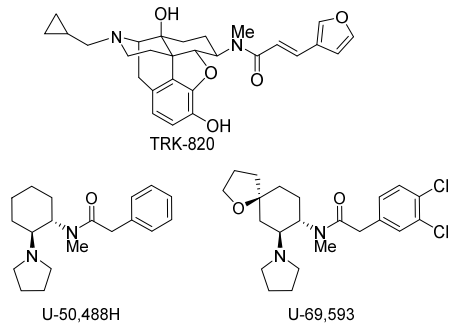


図 2 . TRK-820、U-50,488H、および U-69,593 の構造

結合様式 3 に属する化合物の設計・合成
TRK-820 のフェノール部分を除去したデカヒドロイソキノリン誘導体 (化合物 1) およびフェノール部分をシクロヘキセン環に変換した化合物 (化合物 2) を設計・合成した (図 3)。

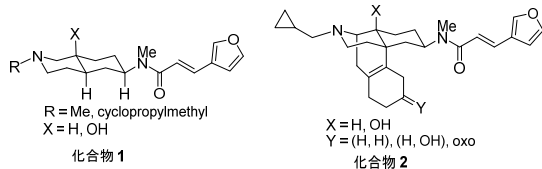


図 3 . 化合物 1 および 2 の構造

結合様式 4 に属する化合物の設計・合成
TRK-820 の *N*-ペルフルオロアルキル誘導体を設計・合成した (図 4)。TRK-820 の窒素置換基 (シクロプロピルメチル基) をペルフルオロアルキル基に変換することにより、窒素の塩基性を大きく低減させた化合物である。

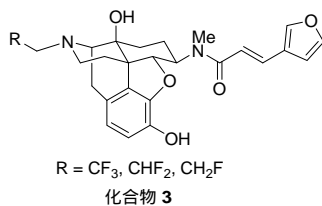


図 4 . 化合物 3 の構造

各結合様式を持つ化合物のオピオイド受容体結合実験

受容体結合実験の結果、以下のことが明らかとなった。

(1) 化合物 1 (R=シクロプロピルメチル) は K_i 値が 2 桁 μM オーダーと非常に弱い (TRK-820 の μ 受容体に対する結合親和性は $K_i = 0.178 \text{ nM}$) 受容体に結合し、受容体選択性を示した。

(2) 化合物 2 は置換基 Y の種類に大きく影響されるが、 $K_i = 0.451 \sim 14.5 \text{ nM}$ で 受容体

に結合し、 μ 受容体に対する 受容体選択性は TRK-820 よりも高かった。これは、シクロヘキセン環がベンゼン環の代替と成り得る事を示唆する結果であった。

(3) 化合物 2 において、Y = (H, H), oxo の場合に比べて Y = (H, OH) の場合には明らかに 受容体に対する結合親和性の向上が認められ、モルヒナン骨格におけるフェノール性ヒドロキシ基は、水素結合受容性基としてではなく水素結合供与性基として働いていることが示唆された。また、ヒドロキシ基の立体配置は受容体結合能に影響しなかった。

(4) 化合物 3 の結合親和性は TRK-820 と比較して 3~26 倍低下したが 受容体に結合し、受容体選択性は TRK-820 よりも大きく向上した。

上記の結果の中で特に注目すべきは、(1) と (2) である。2012 年に μ 、 δ 、および κ 受容体と各受容体タイプに選択的な拮抗薬との複合体の X-線構造解析結果が報告された。それによると、モルヒナン骨格のフェノール環と受容体との間に π - π 相互作用は認められず、受容体には脂溶性ポケットが存在している事が示された。(3) の結果は、X-線構造解析の結果に一致するものと考えられる。すなわち、シクロヘキセン環は受容体と疎水性相互作用していると考えられる。また X-線構造解析によると、フェノール性ヒドロキシ基は水分子を介して受容体と水素結合を形成している。(4) の結果において、ヒドロキシ基の立体配置が受容体結合能に影響しなかったのは、水分子を介した水素結合が存在しているためと思われる。

各結合様式を持つ化合物のオピオイド作動活性評価

作動活性は、CellKey SystemTM または [³⁵S]GTP γ S 結合実験により評価した。CellKey SystemTM による作動活性評価は κ 受容体に対してのみ実施済みで μ および δ 受容体に対しては未実施 (現在検討中) であるため κ 選択性のについての議論は出来ないが、 κ 作動活性 (efficacy および potency) は、 κ 受容体親和性とほぼ平行に変化した。TRK-820 のフェノール部分を持たない化合物 1 は TRK-820 の持つファーマコフォアの一部を欠く化合物であり作動活性を示さない可能性もあったが、作動活性を示した。これらの結果は、我々が構築した 作動薬の 3D ファーマコフォアモデルの正しさを支持していると考えられる。

(2) 当初、 μ 作動薬とされる U-69,593 および δ 作動薬とされるプレマゾシンのトリチウム標識化合物を用い、受容体結合実験により サブタイプの検討を行うことを計画していた。しかし、[³H] プレマゾシンが販売中止となり、国内では入手できなくなってしまったため、受容体結合実験による サブタイプの検討は出来なかった。

替わりに、CellKey System™ により検出される電気抵抗性の変化パターンによるサブタイプの検討を行った。CellKey System™ はGタンパク結合型受容体に結合しているGタンパク質の種類(Gs、Gi、およびGq)により検出される電気抵抗のパターンが異なることが知られている。しかし、今のところGi型(オピオイド受容体に結合するGタンパク質はGi)の電気抵抗性の変化パターンしか観察されていない(図5)。CellKey System™ を用いた評価ではヒト受容体発現細胞を用いたが、クローニングされた受容体は1型であるとの報告もある。今後、受容体の分布が多いことが知られている生物組織(例えば、モルモット小脳)等を用いて検討する必要があるが、今のところ、化合物による電気抵抗性の変化パターンの差は観察されていない。

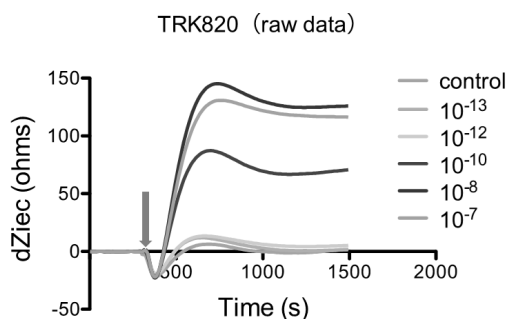


図5. 種々の濃度のTRK-820を添加した時のCellKey System™ により検出される電気抵抗性の変化パターン

(3) CellKey System™、³⁵S]GTPγS 結合実験、およびcAMP評価系にて得られた作動活性の比較は、作動薬である化合物4(図6)を用いて行った。これは、化合物1~3の合成が達成できる前に、先行して本検討を開始したからである。

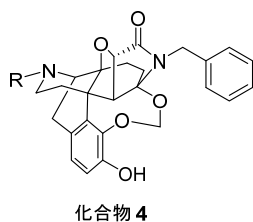


図6. 化合物4の構造

SYK-40(4: R = シクロプロピルメチル)およびSYK-89(4: R = メチル)の作動活性をCellKey System™、³⁵S]GTPγS 結合実験、およびcAMP評価系にて評価して得られた用量反応曲線を図7に示す。Efficacy(縦軸、用量反応曲線が上方に達するほどefficacyは高い)およびpotency(横軸、用量反応曲線が左にシフトするほどpotencyは高い)の絶対値は、各評価系により異なった。従って、各々の評

価系により得られた作動活性の値を直接比較する事は出来ない。しかし、SYK-40の方がpotencyが高く(用量反応曲線が左にシフトしている)、SYK-89の方がefficacyが高い(用量反応曲線がより上方に達している)という傾向は一致した。すなわち、³⁵S]GTPγS 結合実験やcAMP評価系と同様、CellKey System™ を用いて得られた作動活性を基に構造活性相関研究が可能である。

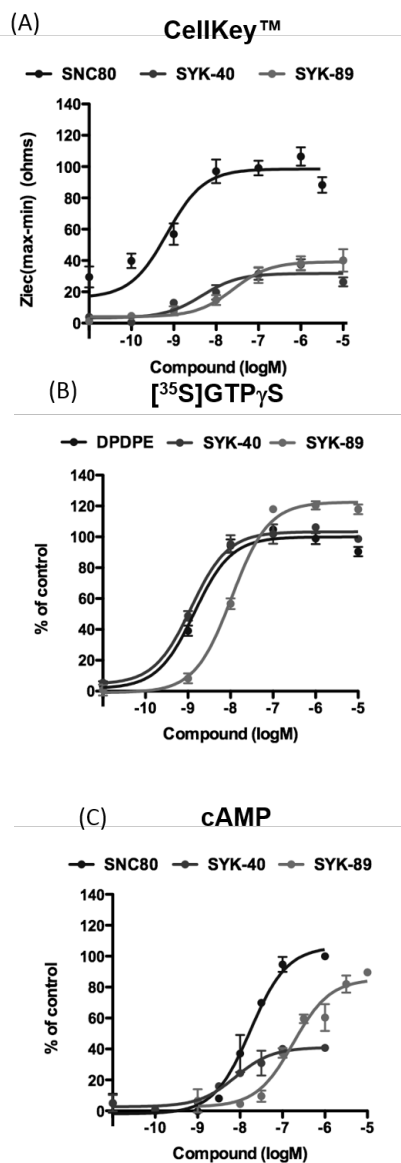


図7. CellKey System™、³⁵S]GTPγS 結合実験、およびcAMP評価系にて評価したSYK-40およびSYK-89の作動活性の用量反応曲線。SNC80およびDPDPEは、作動薬の標準化合物として用いた。

(4) 2種のタイプを共発現させることによるオピオイド受容体ダイマーを発現した細胞系については、研究期間内に樹立することは出来なかった。現在も樹立を目指して検討を継続しているところである。

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 6件)

Fujii, H.; Hayashida, K.; Saitoh, A.; Yokoyama, A.; Hirayama, S.; Iwai, T.; Nakata, E.; Nemoto, T.; Sudo, Y.; Uezono, Y.; Yamada, M.; Nagase, H. Novel Delta Opioid Receptor Agonists with Oxazatricyclodecane Structure. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 368–372. DOI: org/10.1021/ml400491k, 査読あり.

Nagase, H.; Fujii, H. Essential Structure of the κ Opioid Receptor Agonist Nalfurafine for Binding to the κ Receptor. *Curr. Pharmaceut. Des.* **2013**, *19*, 7400–7414. DOI: 10.2174/138161281942140105162601, 査読あり.

Nemoto, T.; Hirayama, S.; Iwai, T.; Yamamoto, N.; Harada, Y.; Wada, N.; Tomatsu, M.; Ishihara, M.; Fujii, H.; Nagase, H. The effect of 17-*N* substituents on the activity of the opioid κ receptor in nalfurafine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 268–272. DOI: org/10.1016/j.bmcl.2012.10.100, 査読あり.

Fujii, H.; Imaide, S.; Hirayama, S.; Nemoto, T.; Gouda, H.; Hirono, S.; Nagase, H. Essential structure of opioid κ receptor agonist nalfurafine for binding to the κ receptor 3: Synthesis of decahydro(iminoethano)phenanthrene derivatives with an oxygen functionality at the 3-position and their pharmacologies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7711–7714. DOI: org/10.1016/j.bmcl.2012.09.101, 査読あり.

Nagase, H.; Imaide, S.; Hirayama, S.; Nemoto, T.; Fujii, H. Essential structure of opioid κ receptor agonist nalfurafine for binding to the κ receptor 2: Synthesis of decahydro(iminoethano)phenanthrene derivatives and their pharmacologies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5071–5074. DOI: org/10.1016/j.bmcl.2012.05.122, 査読あり.

Nagase, H.; Imaide, S.; Yamada, T.; Hirayama, S.; Nemoto, T.; Yamaotsu, N.; Hirono, S.; Fujii, H. Essential structure of opioid κ receptor agonist nalfurafine for binding to κ receptor 1: Synthesis of decahydroisoquinoline derivatives and their

pharmacologies. *Chem. Pharm. Bull.* **2012**, *60*, 945–948. DOI: org/10.1248/cpb.c12-00336, 査読あり.

〔学会発表〕(計 4件)

藤井秀明、今出慧海、横山明信、須藤結香、平山重人、岩井孝志、山田貴明、根本徹、上園保仁、長瀬博、CellKey™システムを用いた作動活性評価とそれに基づく選択的オピオイド受容体作動薬ナルフラフィンの必須構造の検討、日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本.

藤井秀明、林田康平、渡邊義一、齊藤大祐、高橋俊弘、酒井潤一、田中恵理子、神田貴史、岩井孝志、平山重人、根本徹、山川富雄、長瀬博、オキサアザトリシクロデカン骨格を有する新規オピオイド受容体作動薬の設計と合成、およびその薬理作用2、第33回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2013年9月7日、神戸.

横山明信、須藤結香、宮野加奈子、鈴木雅美、白石成二、平山重人、林田康平、藤井秀明、酒井潤一、神田貴史、中田恵理子、長瀬博、樋上賀一、上園保仁、CellKey™ systemを用いた新規オピオイド受容体特異的アゴニストの開発及びスクリーニング、第86回日本薬理学会年会、2013年3月22日、福岡.

藤井秀明、林田康平、平山重人、岩井孝志、根本徹、酒井潤一、神田貴史、中田恵理子、上園保仁、長瀬博、オキサアザトリシクロデカン骨格を有する新規オピオイド受容体作動薬の設計と合成、およびその薬理作用、第32回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2012年9月16日、東京.

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(3)連携研究者

長瀬 博 (NAGASE, Hiroshi)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・教授
研究者番号：70383651

上園 保仁 (UEZONO, Yasuhito)
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・部長
研究者番号：20213340

平山 重人 (HIRAYAMA, Shigeto)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：40565842