

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460152

研究課題名(和文) モルヒネ非感受性オピオイド $\mu$ 受容体スプライスバリエント選択的な作動薬の創製研究研究課題名(英文) Development of selective agonists for the morphine-insensitive opioid  $\mu$  receptor splice variants

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Amidino-TAPAが作用するモルヒネ非感受性オピオイド $\mu$ 受容体スプライスバリエントに選択的な非ペプチド性作動薬の創出を志向し、ファーマコフォアの同定を試みた。メサドンをテンプレートにした検討では設計化合物が作動活性(鎮痛作用)を示さず、amidino-TAPAのPhe残基が重要であるという仮説の検証はできなかった。また、仮説に基づき設計・合成したモルヒナン誘導体の評価においては、鎮痛作用評価を行う基準(受容体に対する低親和性)をクリアできた化合物が1化合物のみであり、目的とする化合物の取得には至っていない。これらを達成するためには、in vitro評価系の構築が重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To develop nonpeptidic agonists selective for the morphine-insensitive opioid  $\mu$  receptor splice variants with which peptidic agonist amidino-TAPA can interact, we attempted to identify the pharmacophore for the splice variants. As a designed compound based on the methadone structure did not show any agonistic activities (antinociceptive effects), a working hypothesis that the Phe residue in amidino-TAPA would play an important role in eliciting its activities was not confirmed. The compounds evaluated in in vivo assays must have low or no binding affinities for the kappa receptor. Although we designed and synthesized several morphinan derivatives, only one compound among the synthesized ones fulfilled the criterion. Therefore, we have not yet found selective agonists. To achieve our investigation aims, we think that it is important to newly construct an in vitro assay which can evaluate the binding affinities and/or activities of the tested compounds for the splice variants.

研究分野：医歯薬学

キーワード：スプライスバリエント オピオイド  $\mu$ 受容体

1. 研究開始当初の背景

モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬は主にオピオイドμ受容体を介して作用を発現するが、鎮痛作用だけでなく副作用に関して個人差が大きく、1種の受容体で説明することは困難であった。1993年にオピオイドμ受容体がクローニングされ、その後複数のオピオイドμ受容体スプライズバリエーション(μ受容体遺伝子から選択的スプライシングにより生成する複数の異なったμ受容体。以下、SVと略する)が報告された。オピオイドμ受容体を介した多様な薬理作用はSVにより説明できると期待されたが、代表的なμ受容体作動薬であるモルヒネが作用するモルヒネ感受性型と作用しないモルヒネ非感受性型の2種のSVに大別されるにとどまり、オピオイドμ受容体SVに関する研究は下火になっていった。

最近、櫻田・溝口らによりペプチド性のμ受容体作動薬 amidino-TAPA が、モルヒネ非感受性オピオイドμ受容体SVに作用することが見出された。更に、amidino-TAPAは、神経因性疼痛のようなモルヒネが効果を示しにくい疼痛に対しても有効であり、モルヒネの重篤な副作用の一つである依存性を示しにくいことが明らかにされた(図1)。これらの結果は、amidino-TAPAが作用するモルヒネ非感受性オピオイドμ受容体SVは、有望な創薬標的であることを期待させるものであった。しかし、モルヒネ非感受性オピオイドμ受容体SVを介した薬理作用の詳細な検討のためには、amidino-TAPAはペプチド性であるため経口投与における効果が弱い、amidino-TAPAはモルヒネ非感受性ばかりでなくモルヒネ感受性のオピオイドμ受容体SVにも作用し選択性が乏しい(図1)という問題点があった。

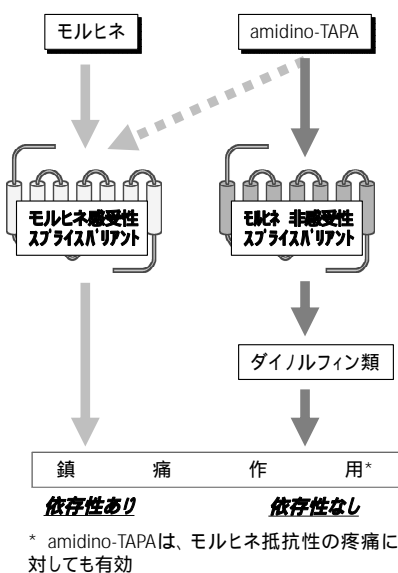


図1. モルヒネおよび amidino-TAPA による鎮痛作用の概念図

2. 研究の目的

(1) Amidino-TAPA 様の作用を示すペプチド性化合物の構造の比較から(図2)、櫻田・溝口らにより、「amidino-TAPA がモルヒネ非感受性オピオイドμ受容体SVに作用するためには、N-末端の Tyr 残基と3番目の Phe 残基が重要である」という作業仮説が立案されている。この作業仮説を検証する。

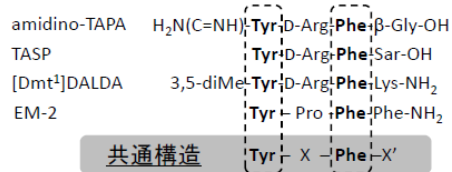


図2. Amidino-TAPA 様の作用を示すペプチド性化合物の共通構造

(2) N-末端の Tyr 残基に相当する構造としてモルヒナン骨格を選択し(図3)、3番目の Phe 残基に相当する Ph 基を有する置換基をモルヒナン骨格に導入した誘導体を合成し、amidino-TAPA が作用するモルヒネ非感受性オピオイドμ受容体SVに対する構造活性相関を検討する。

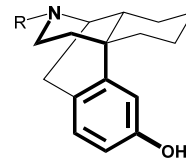


図3. モルヒナン骨格と N-末端 Tyr 残基に相当する部分(太線部)

(3) 前項の検討において得られた amidino-TAPA が作用するモルヒネ非感受性オピオイドμ受容体SVに作用するモルヒナン誘導体に対し、オピオイド受容体タイプ選択性を向上させる誘導化(今までの研究から得た構造活性相関情報に基づいた誘導化)を行い、amidino-TAPA が作用するモルヒネ非感受性オピオイドμ受容体SVに対する選択性の向上にも適用できるか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 非ペプチド性μ受容体作動薬であるメサドン(図4)も、amidino-TAPA 様の作用を示す(櫻田・溝口未発表データ)。「amidino-TAPA がモルヒネ非感受性オピオイドμ受容体SVに作用するためには、N-末端の Tyr 残基と3番目の Phe 残基が重要である」という作業仮説の検証は、メサドンを用いて行う。

メサドン(図4)とモルヒナン(図3)の構造を比較すると、太線で示した部分が Tyr 構造に相当すると考えられる。従って、破線で示した円内の Ph 基が3番目の Phe 残基に相当していると推測される。作業仮説を検証するために、図4の破線で示した円内の Ph 基を除去した化合物を合成する。単純に Ph 基のみを除去すると不斉炭素が2個になりジ

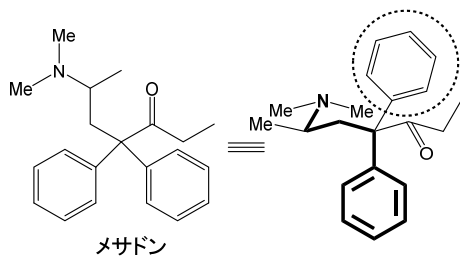


図 4. メサドンの構造

アステレオマーが生じるため、同時に窒素の位の Me 基も除去 (図 5. 破線四角部) した化合物 1 を合成し、その活性を評価する。

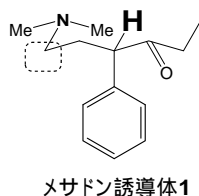


図 5. 設計化合物 1 の構造

(2) 3 番目の Phe 残基を模した Ph 基を有する置換基を導入したモルヒナン誘導体 2 (図 6) を合成し、その活性を評価し、構造活性相関を検討する。合成の際原料として用いるナルトレキソンの窒素置換基はシクロプロピルメチル (CPM) 基であるが、一般に *N*-CPM のモルヒナン誘導体は  $\mu$  受容体拮抗薬であり、*N*-Me 誘導体は  $\mu$  受容体作動薬であることが知られている。ここで言う  $\mu$  受容体はモルヒネ感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV にあたり、同様の構造活性相関がモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV に当てはまかどうかは不明であるが、窒素置換基としては、Me 基と CPM 基の 2 種の誘導体を合成することにする。

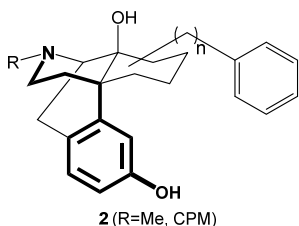
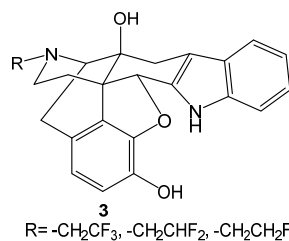


図 6. 設計したモルヒナン誘導体 2 の構造

(3) 過去の構造活性相関研究より、窒素置換基をフッ素化されたエチル基に変換する、またはベンゼン環をシクロヘキセン環に変換すると、オピオイド受容体タイプ選択性が向上するという知見を得ている (図 7)。前項目の検討により得られたモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV に作用する誘導体に対し上記の誘導体化を行い、モルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV に対する選択性が向上するかを検討する。



R = -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F

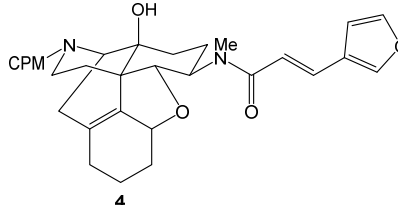


図 7. オピオイド受容体タイプ選択性が向上した例

(4) 今のところ、amidino-TAPA が作用するモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV に対する *in vitro* 評価系は存在しない。そのため、化合物の評価は、鎮痛作用を指標とした *in vivo* 実験を実施する必要がある。しかし、amidino-TAPA のモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV を介した作用機序には、受容体作動性の内因性オピオイドペプチドであるダイノルフィン類の分泌が含まれることが知られている。このため、評価化合物が受容体作動活性または受容体拮抗活性を持つと正しい評価の妨げとなる。このため、まずオピオイド受容体結合実験を実施し、受容体に高親和性を示す化合物は *in vivo* 評価の対象から除外する。 $\mu$  受容体と受容体の結合親和性 ( $K_i$  値) 比が 10 倍以上であることを *in vivo* 評価の対象とすることの基準とする。しかし、オピオイド受容体結合実験により評価できる  $\mu$  受容体は、モルヒネ感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV であるため、 $\mu$  受容体に対する結合親和性が低い化合物であっても、受容体に対する結合親和性が十分に低い場合は、*in vivo* 評価の対象とする。

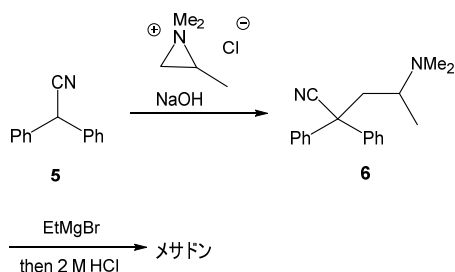
*In vivo* 評価では、まず鎮痛作用の有無により作動薬であるかどうかを評価する。鎮痛作用を示した化合物 (作動薬) については、選択的受容体拮抗薬である nor-BNI を前処置して評価化合物の鎮痛作用を評価する、およびダイノルフィン類の前駆体であるプロダイノルフィンを欠損させた遺伝子改変マウスを用いて評価化合物の鎮痛作用を評価するという 2 つの手法により、ダイノルフィン類の遊離が起こっているかどうかの確認を行い、amidino-TAPA 型の作用を評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) Phe 残基の重要性の検証

###### メサドン誘導体 1 の合成と評価

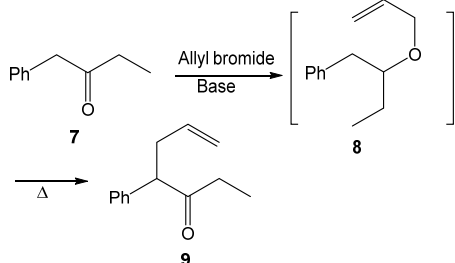
メサドンの合成法 (スキーム 1) に従い、メサドン誘導体 1 の合成を試みた。すなわち、ジフェニルアセトニトリル (5) をフェニルア



スキーム 1. 既知のメサドン合成経路

セトニトリルに変更し、種々の塩基存在下、種々の求電子剤との反応を検討したが、原料回収に終わるか、複雑な混合物となり目的化合物はほとんど得られなかった。

種々反応経路を検討した結果、*o*-アリル化に続く Claisen 転位を鍵反応とする合成経路 (スキーム 2) を採用することにより、設計したメサドン誘導体 1 を合成した。



スキーム 2. メサドン誘導体 1 合成の鍵反応

まず、メサドン誘導体 1 のオピオイド受容体結合実験を実施した。その結果、 $K_i(\mu) = 604.5 \text{ nM}$ ,  $K_i(\kappa) = 515.9 \text{ nM}$ ,  $K_i(\sigma) = 167.0 \text{ nM}$  であり (メサドンの文献値:  $K_i(\mu) = 0.72 \text{ nM}$ ,  $K_i(\kappa) > 1,000 \text{ nM}$ ,  $K_i(\sigma) > 1,000 \text{ nM}$ )、 $\kappa$  受容体に対する親和性は比較的良かったため、*in vivo* 評価を実施することにした。なお、本評価系に用いている  $\mu$  受容体はモルヒネ感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV にあたるため、大きな  $K_i(\mu)$  値を示したという結果は、amidino-TAPA が作用するモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV に対する結合親和性が低いことを意味するものではない。

次に *in vivo* での鎮痛作用を評価するためにメサドン誘導体 1 をマウスに皮下投与 (20, 100 mg/kg) し tail-flick 試験を実施したが、鎮痛作用は観察されなかった。このことから、メサドン誘導体 1 はモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV 作動活性を示さない、またはモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV に親和性を示さない (結合しない) のいずれかであると考えられ、Ph 基の重要性を検証することはできなかった。

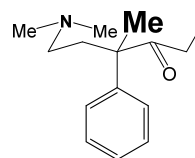
メサドン誘導体 1 が、事実上、モルヒネ感受性、非感受性の両方の SV に作用しなかったという結果は予想外のものであった。この原因として、次の 2 つを仮説として立案した。  
・Ph 基を除去したことにより化合物の自由度が大きくなりすぎたため、受容体と相互作用可能な立体配座をとる確率が大きく低下した

(作業仮説 1)。

・化合物設計の際、ジアステレオマーの存在を避けるため Ph 基と同時に Me 基も除去したが、除去した Me 基はメサドンにおいてマジックメチル効果 (1 個の Me 基を導入することにより、化合物の活性が数倍から数百倍向上する現象) を有していた (作業仮説 2)。

作業仮説 1 の検証

作業仮説 1 を検証する目的で、メサドン誘導体 10 を設計した。

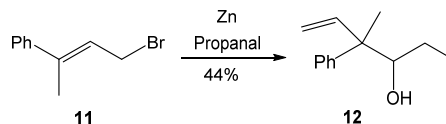


メサドン誘導体 10

図 8. 設計化合物 10 の構造

メサドン誘導体 10 についてもメサドン誘導体 1 と同手法にて合成することを試みた。しかし、鍵反応である *o*-アリル化に続く Claisen 転位の段階において目的とする第四級炭素中心を有する化合物の生成が確認できたと同時に、位置異性体が副生成物として得られた (生成比は、約 8:1)。これらの位置異性体は分離精製することができず、混合物のまま先の反応に進むと反応系が更に複雑化してしまつたため、本経路による合成は断念した。

メサドン誘導体 10 は第四級炭素中心を有するため、第四級炭素中心の構築法が鍵となると考え、種々検討した結果、プレニル型の有機金属試薬を用いることにより達成することができた。具体的には亜鉛試薬を用い、収率 44% と改善の余地は残すものの、単一生成物として第四級炭素中心を有する化合物 12 を合成することに成功した (スキーム 3)。その後、数段階の工程を経て、メサドン誘導体 10 を合成した。メサドン誘導体 10 はオピオイド受容体結合実験において、いずれのタイプの受容体にも結合親和性を示さなかったため ( $K_i > 10,000 \text{ nM}$ )、今後 *in vivo* 評価を実施する予定である。



スキーム 3. プレニル型亜鉛試薬を用いた第四級炭素の構築

作業仮説 2 の検証

作業仮説 2 を検証する目的で、ノルメサドン (メサドンから窒素  $\alpha$  位に存在する Me 基を除去した化合物) を、メサドンの合成法 (スキーム 1) に従い合成した。今後評価する予定である。

(2) 当初は Phe 基の重要性を検証した後、モルヒナン誘導体 2 (図 6) の合成に取りかかる予定であったが、メサドン誘導体 1 の合成に予想以上の時間がかかったため、Phe 基は重要であるという作業仮説に基づき、合成に着手した。

モルヒナン化合物の反応性を考慮すると、図 9 に示した 4、5、6、または 7 位に Ph 基を有する置換基の導入が可能であると考えられる。そのうち、比較的導入が簡単であると考えられた 4 位および 6 位への置換基導入に着手した。

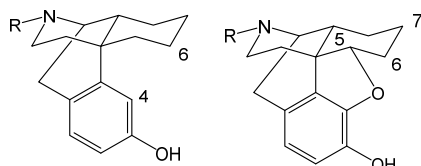


図 9. 置換基の導入が可能と考えられる位置 (数字はモルヒナン骨格のナンバリングによる)

#### 4-置換モルヒナン誘導体の合成

図 10 に示した化合物 13 を設計した。置換基  $R^1$  としては、3. (2) 項に示した理由により Me 基と CPM 基、置換基  $R^2$  としては、Ph 基、OPh 基、OBn 基、およびフェネチルオキシ基とすることを計画した。 $R^2$  が OPh 基、OBn 基、およびフェネチルオキシ基の場合は、原料であるナルトレキソンより既知法により導ける中間体 14 を用いることにより、容易に合成できた。 $R^2$  が OBn 基の場合、3 位を脱保護してフェノール性 OH 基に変換する段階に

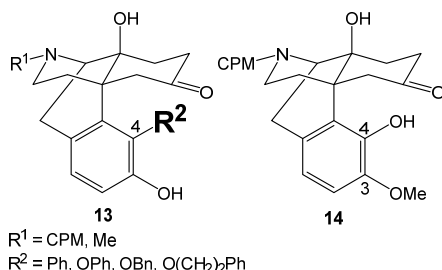


図 10. 設計化合物 13 と重要中間体 14

において、Bn 基の 4 位から 3 位へ転位することが認められた。このため保護基の検討を行った結果、保護基として *p*-メトキシベンジル基を用いることにより、ベンジル基が転位することなく脱保護を行うことができた。

$R^2$  が Ph 基である化合物は、4 位をトリフラート化した後クロスカップリング反応を行うことにより、合成することを検討している。反応条件を最適化する必要があるが、Stille カップリングを行うことにより、4 位への Ph 基の導入が可能であるという結果が得られている。

$R^1$  が Me 基である化合物については、ナルトレキソンの CPM 基を既知法に従い Me 基に変換し、合成を実施した。評価結果を表 1 に示す。 $R^1$  が CPM 基の化合物はいずれも受

容体結合親和性が高かったため、*in vivo* 評価は行わなかった。唯一化合物 13d のみが受容体結合親和性が低かったため、*in vivo* 評価を実施することにした。現在評価中である。

表 1. 化合物 13 のオピオイド受容体結合実験結果 ( $K_i$  値の単位は nM)

	13a	13b	13c	13d
$R^1$	CPM	CPM	CPM	Me
$R^2$	OPh	OBn	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Ph	OPh
$K_i$ ( $\mu$ )	59.5	7.58	13.2	23.8
$K_i$ ( )	604	286	164	434
$K_i$ ( )	4.75	2.87	5.75	523

#### 4-置換モルヒナン誘導体の合成

図 11 に示したように、ナルトレキソンは 6 位にケトンを持つため、Grignard 反応剤と容易に反応するよう見える。しかし、ナルトレキソン骨格を持つ化合物では、14-OH 基が 6 位ケトンを攻撃してヘミアセタール構造になることがある、また 7-アキシャル水素を脱プロトン化しエノラートアニオンを生成しやすいという反応性が知られている (スキーム 4)。Grignard 反応剤を用いた反応は強塩基条件下となるため、これらの反応性が懸念された。実際に PhMgBr を用いて反応を検討したところ、原料は残存し、目的とする Ph 付加体はほとんど得られなかった。添加物、14-OH 基の保護基等を種々検討した結果、14-OH 基を Bn 基で保護することにより、Ph 付加体が 69% で得られることが明らかとなった。今後は、6 位に Ph 基を有する置換基を導入したモルヒナン誘導体についても合成し、評価していく予定である。

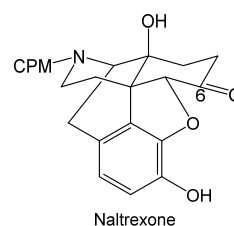
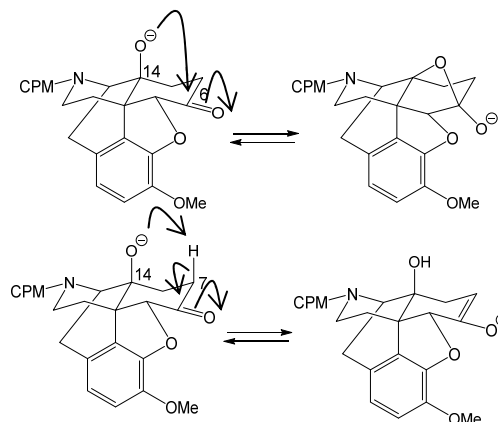


図 11. ナルトレキソンの構造



スキーム 4. ナルトレキソン骨格における特徴的な反応性

(3) 現在のところ amidino-TAPA が作用するモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV に作用するモルヒナン誘導体を見出せていないため、図 7 に示したようなオピオイド受容体タイプ選択性が向上した誘導体は実施していない。

#### (4) 評価系の問題点

合成し、amidino-TAPA 様の作用の有無を確認できた化合物数は、当初予定よりもかなり少ない結果となってしまった。これには、2つの原因があると考えている。

1 つ目は、合成すべき化合物量がある程度必要であったことである。3. (4) に示したように、amidino-TAPA が作用するモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV に対する作用を評価する *in vitro* 評価系が存在しないため、*in vivo* 評価により化合物が amidino-TAPA 様の作用を示すかどうかを評価する必要があった。*In vivo* 評価により化合物が amidino-TAPA 様の作用を示すかどうかを正確に評価するためには、化合物量が少なくとも 20 mg 程度は必要となったため、化合物合成に用いる反応は一定以上の収率である必要があり、生成物が複雑な混合物となった場合に、精製により目的物のみを単離するという戦略が取りにくかったことが挙げられる。

2 つ目は、モルヒナン誘導体において、予想以上に  $\kappa$  受容体に結合親和性を示す化合物が多く、*in vivo* 評価まで進めなかった点が挙げられる。

今後、効率的に研究を進めるためには、*in vitro* 評価系、少なくとも amidino-TAPA が作用するモルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体 SV に対する受容体結合試験系を構築することが必須になると考えられる。

#### 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 1 件)

藤井秀明、平山重人、オピオイド受容体スプライスバリエント、ペインクリニック、2017, 38, S194-S200. (総説), 査読なし。

[学会発表](計 8 件)

本城綾香、平山重人、唐木文霞、伊藤謙之介、藤井秀明、モルヒネ非感受性オピオイド  $\mu$  受容体スプライスバリエント選択的作動薬を志向したモルヒナン誘導体の合成、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日、仙台。

鈴木あずさ、唐木文霞、平山重人、伊藤謙之介、藤井秀明、モルヒネ非感受性スプライスバリエントに選択的な作動薬の創製を志向したメサドン誘導体の合成、第 47 回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2016 年 11 月 5 日、豊橋。

鈴木あずさ、唐木文霞、平山重人、伊藤謙之介、藤井秀明、モルヒネ非感受性スプライスバリエントに選択的な作動薬の創製を志向したメサドン誘導体の合成、第 60 回日本薬学会関東支部大会、2016 年 9 月 17 日、東京。

鈴木あずさ、唐木文霞、平山重人、伊藤謙之介、藤井秀明、モルヒネ非感受性スプライスバリエントに選択的な作動薬の創製を志向したメサドン誘導体の合成、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、横浜。

鈴木あずさ、平山重人、伊藤謙之介、藤井秀明、モルヒネ非感受性スプライスバリエントに選択的な作動薬の創製を志向したメサドン誘導体の合成、第 70 回記念有機合成化学協会関東支部シンポジウム、2015 年 11 月 21 日、長岡。

鈴木あずさ、平山重人、伊藤謙之介、藤井秀明、モルヒネ非感受性スプライスバリエントに選択的な作動薬の創製を志向したメサドン誘導体の合成、第 9 回北里化学シンポジウム、2015 年 9 月 26 日、東京。

鈴木あずさ、平山重人、伊藤謙之介、藤井秀明、モルヒネ非感受性スプライスバリエントに選択的な作動薬の創製を志向したメサドン誘導体の合成、第 59 回日本薬学会関東支部大会、2015 年 9 月 12 日、船橋。

鈴木あずさ、木浦和哉、平山重人、伊藤謙之介、藤井秀明、モルヒネ非感受性スプライスバリエントに選択的な作動薬の創製を志向したメサドン誘導体の合成、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸。

#### 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

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

櫻田 忍 (SAKURADA, Shinobu)  
東北医科薬科大学・薬学部・客員教授  
研究者番号：30075816

溝口 広一 (MIZOGUCHI, Hirokazu)  
東北医科薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：30360069