

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16557

研究課題名(和文) 光により睡眠・摂食を制御する分子ツールの開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular tool for controlling sleep/wake cycle and feeding behavior

研究代表者

斉藤 毅 (SAITOH, Tsuyoshi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：80609933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、「オレキシン神経伝達機構を作用部位・時間分解能を確保して解析解明するための分子ツールの開発」を目的として、光により活性のon、offを制御できる光応答機能を付与した分子の開発を行うものである。研究期間内に、オレキシン受容体作動薬の開発を行い、その脳内作用部位の探索を行った。また、オレキシン受容体作動薬の構造活性相関研究を基に光感受性官能基を導入した光ケージド薬物を開発し、脳切片を用いた電気生理学実験を行った。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this project is to develop novel molecular tool for controlling sleep/wake cycle and feeding behavior. Especially, we employed photo-caging technique to control the orexin agonist activity with light. Our main discoveries are the followings; 1) We discovered novel potent and selective orexin 2 receptor agonist YNT-185 and explored the target brain region of this molecule. 2) We designed and synthesized photo-caged orexin receptor agonist based on the structure-activity relationship study of orexin receptor agonist. 3) The caged molecule was investigated the photoresponsibility and electrophysiological response.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：オレキシン 睡眠覚醒 光ケージド化合物 作動薬

1. 研究開始当初の背景

オレキシンは、1998年に柳沢・桜井らによって見出された神経ペプチドであり、2つのGタンパク質共役型受容体(GPCR)であるオレキシン1受容体(OX₁R)およびオレキシン2受容体(OX₂R)に作用することで覚醒の維持や摂食の調節など様々な生理的役割を担っている¹。オレキシンを産生する神経は、視床下部外側野に局在し、脳の広い範囲に投射している。特に、モノアミンおよびコリン作動性神経核に強い投射がみられ、オレキシンはそれらを介して睡眠・覚醒や摂食調節を行っているものと考えられる²。主にOX₂Rが覚醒を誘導することは知られているが、覚醒や摂食を制御している部位と受容体がもたらす神経伝達は大部分が未だ解明されていない³。

神経伝達物質の生理的役割を調査する研究では、古典的には電気刺激や局所薬物投与が用いられてきたが、部位特異性が低く時間分解能が悪いといった問題点がある。この問題点を解決する方法として、最近オプトジェネティクス法が開発され、部位・細胞種特異的な神経活動の時間分解制御とそれに伴う行動変化を観察できるようになった⁴。オプトジェネティクス法は、例えばオレキシン産生神経にロドプシンを発現したマウスを作成し、観察部位に挿入した光ファイバーで照射することで任意の時間で神経活動を制御できる⁵。しかし、これはオレキシン産生細胞全体への介入となるため、個々のオレキシン作用部位(投射部位)に特化した介入は行えないという問題点があった。そのため、リガンド産生細胞ではなくリガンド自体にロドプシンと同様の機能を導入したケミカルプローブが開発されれば、オレキシン系のオプトジェネティクス実験を強力に補完する実験系となると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、オレキシン受容体の活性を光によって制御するケミカルツールの開発を目的とし、オレキシン受容体リガンドに光応答性官能基として光ケージング基を導入したケミカルプローブを開発し、その基礎物性評価を行うものである。研究開始当初、オレキシン受容体リガンドのうち、拮抗薬は勢力的に開発されていたものの、作動薬は報告がなかった。そのため、まずはオレキシン受容体作動薬の開発を初期目標として設定した。

3. 研究の方法

研究目的達成に向け、まず基盤となる①オレキシン受容体リガンドの創製を行うこととした。また、得られたリガンドの②構造活性相関研究を実施することで光応答性官能基を導入する部位を探索し、③光応答性薬物の開発と基礎物性評価を行った。

4. 研究成果

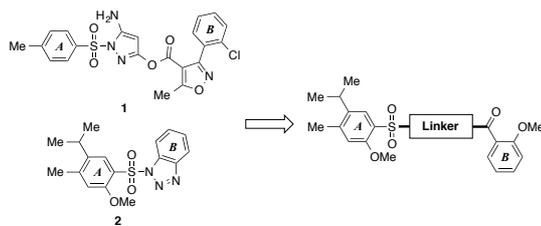
① オレキシン受容体リガンドの創製

1) OX₂R 選択的作動薬の開発

OX₂R 作動活性を指標としたハイスループットスクリーニング (HTS) を実施し、アリアルスルホンアミド構造を有する2つのHTSヒット化合物 **1**, **2** を見出した (表1 左上)。**1**, **2** のOX₂R 作動活性は、オレキシンAの活性を100%とした際、レポーターアッセイ (NFATアッセイ) でそれぞれ36%、43%であったが、カルシウムアッセイでは活性を確認することは出来なかった。そのため、化合物 **1** および **2** を基盤として、作動活性の向上を目指したHit to Lead 研究を展開した。

HTS ヒット化合物に共通するアリアルスルホンアミド構造は、アミド構造に比べ回転自由度が高く平面性が低いため、置換基を三次元的に配置することが可能である。そのため研究代表者らは、本コア構造を基盤とした構造変換を行うこととした。まず、アリスルホンアミド (A環) と末端芳香環 (B環) を保持し、両環の配置に重要と考えられるリンカー構造の探索を行った (表1)。その結果、リンカー構造として *m*-フェニレンジアミン-エチレンジアミン構造を有する化合物 **9** において顕著な転写活性の増強を示し、またこれまでに確認されなかったカルシウムアッセイにおいても活性が発現することが分かった (NFAT: 33%, Ca²⁺: 22%)。そこで、本構造をリンカーとして固定し、続いてA環およびB環上の置換基の最適化を行った。

表1. リンカー構造の最適化



Type	Cmpd	Linker structure	NFAT assay ^a (% of OXA)	Ca ²⁺ assay ^b (% of OXA)
I	3		N.A. ^c	N.A. ^c
	4		N.A. ^c	N.A. ^c
	5		N.A. ^c	N.A. ^c
II	6		18	N.A. ^c
	7		24	N.A. ^c
	8 (o-)		9	N.A. ^c
	9 (m-)		33	22
	10 (p-)		18	12

^a NFAT-Luciferase activity mediated by OX₂R (efficacy at 10 μM); ^bCa²⁺ influx mediated by OX₂R (efficacy at 10 μM); ^cNot active.

アリールスルホンアミド A 環上の置換基について、4'位メチル基を除去し、イソプロピル基を種々変換したところ、3'位に *m*-ジメチルアミノカルバモイルベンゼンを置換すると顕著に活性が向上することが分かった (11, EC₅₀ = 50 nM for OX₂R, E_{max} = 74%)。続いて、B 環上の置換基について最適化を行ったところ、*o*-メトキシ基をジメチルアミノ基に置換することで OX₂R 選択的に完全作動活性を示す YNT-185 を見出すことに成功した (EC₅₀ = 23 nM for OX₂R, E_{max} = 98%)。YNT-185 は、塩酸を 2 当量用いて塩化することで 2 塩酸塩 (YNT-185·2HCl) を形成し、高い水溶性を示した (1.3 M in saline)。

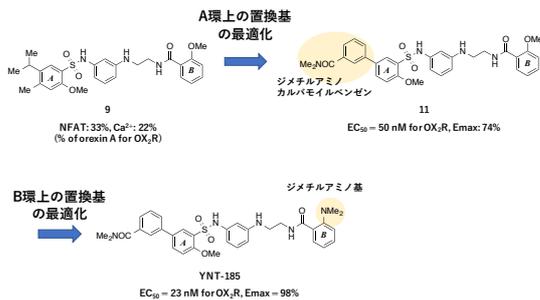


図 1. 化合物 9 からの構造最適化

2) YNT-185 の薬理作用と電気生理学実験

YNT-185·2HCl を用いて、マウスにおける覚醒誘導効果を調べたところ、腹腔内投与 (40 mg/kg) において、顕著な覚醒誘導、維持効果を示した (図 2)。一方で、オレキシン受容体を欠損したマウスでは、覚醒の誘導、維持作用は見られなかった。

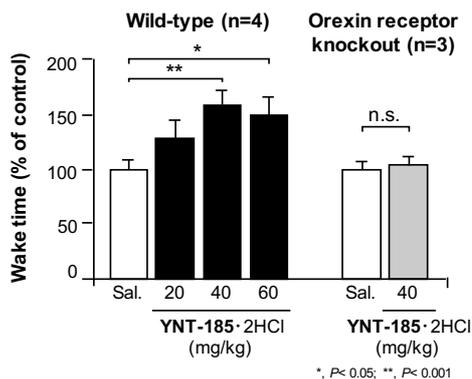


図 2. YNT-185 腹腔内投与における覚醒効果

続いて、脳内での作用を検討するために、マウス脳切片を用いた電気生理学実験を行った。電気記録する神経細胞としては、覚醒に関与することが知られる、視床下部結節乳頭体核 (TMN) のヒスタミン神経を選定した。灌流液中に YNT-185 を加えた際の神経発火頻度を観察したところ、オレキシン A 添加時と同様に顕著な発火頻度の増加が観察された (図 3)。また、この作用は OX₂R 選択的拮抗薬である EMPA を添加した際に抑制されたこと

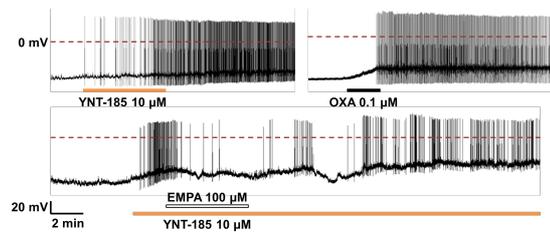


図 3. OX₂R 作動薬が TMN ヒスタミン神経の発火に与える影響

から、実際の脳内においても YNT-185 が OX₂R に対して作用していることが強く示唆された。

② OX₂R 作動薬の構造活性相関

続いて、光反応性官能基の導入部位を探索するために、YNT-185 の構造活性相関研究を実施した。光反応性官能基は、極性官能基上に導入する必要があるため、まずは置換可能な 2 つのアミノ基に対してカーバメート保護基 (R¹, R²) を導入することでその影響を調査した (図 4)。その結果、アニリン上 R² への官能基導入は活性に影響を与えない一方、スルホンアミド基上 R¹ に置換基を導入した際に、劇的な活性の減弱が見られた。

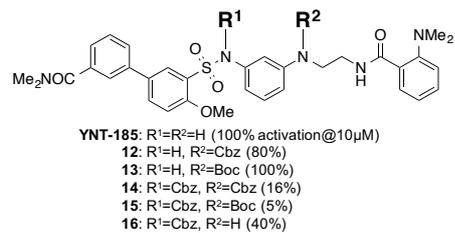


図 4. 置換基導入による活性の変化

OX₂R と YNT-185 類縁体のドッキングシミュレーションから、ビフェニル構造は結合ポケットの深部に位置すると考えられており、スルホンアミド部位もポケット中部の狭い領域に位置している (図 5)。そのため、スルホンアミド基上に置換基を導入することで活性の顕著な現象が起こったものと推察される。一方で、アニリン部位はポケットの外側に位

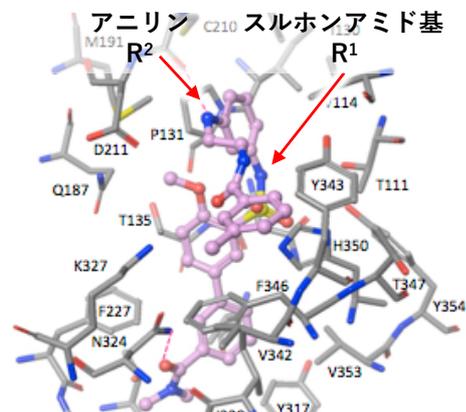


図 5. OX₂R と作動薬のドッキングシミュレーション

置しており、十分な空間を有しているため、アニリン上の置換基導入は活性に影響しなかったものと考えられる。以上の結果を基に、光反応性官能基の導入位置はスルホンアミド基上に決定した。

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 10 件)

査読あり (6 件)

1. S. Toyama, N. Shimoyama, Y. Tagaito, H. Nagase, T. Saitoh, M. Yanagisawa, M. Shimoyama, Non-peptide orexin-2 receptor agonist attenuates morphine-induced sedative effects in rats, *Anesthesiology*, Vol. 128, No. 5, pp. 992–1003, 2018, doi:10.1097/ALN.0000000000002161
2. S. Ohruai, N. Yamamoto, T. Saitoh, N. Kutsumura, Y. Nagumo, Y. Irukayama-Tomobe, Y. Ogawa, Y. Ishikawa, Y. Watanabe, D. Hayakawa, H. Gouda, M. Yanagisawa, H. Nagase, Essential structure of orexin 1 receptor antagonist YNT-707, Part II: Drastic effect of the 14-hydroxy group on the orexin 1 receptor antagonistic activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 28, No. 4, pp. 774–777, 2018, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.12.069
3. N. Yamamoto, S. Ohruai, T. Okada, M. Yata, T. Saitoh, N. Kutsumura, Y. Nagumo, Y. Irukayama-Tomobe, Y. Ogawa, Y. Ishikawa, Y. Watanabe, D. Hayakawa, H. Gouda, M. Yanagisawa, H. Nagase, Essential structure of orexin 1 receptor antagonist YNT-707: Part I Role of the 4,5-epoxy ring for binding with orexin 1 receptor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 27, No. 17, pp. 4176–4179, 2017, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.07.011
4. Y. Irukayama-Tomobe, Y. Ogawa, H. Tominaga, Y. Ishikawa, N. Hosokawa, S. Ambai, Y. Kawabe, S. Uchida, R. Nakajima, T. Saitoh, T. Kanda, K. Vogt, T. Sakurai, H. Nagase, M. Yanagisawa, A non-peptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 114, No. 22, pp. 5731–5736, 2017, doi: 10.1073/pnas.1700499114
5. H. Nagase, N. Yamamoto, M. Yata, S. Ohruai, T. Okada, T. Saitoh, N. Kutsumura, Y. Nagumo, Y. Irukayama, Y. Ishikawa, Y. Ogawa, S. Hirayama, D. Kuroda, Y. Watanabe, H. Gouda, M. Yanagisawa, Design and Synthesis of Potent and Highly

Selective Orexin 1 Receptor Antagonists with a Morphinan Skeleton and their Pharmacologies, *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 60, No. 3, pp. 1018–1040, 2017, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01418

6. T. Nagahara, T. Saitoh, N. Kutsumura, Y. Irukayama-Tomobe, Y. Ogawa, D. Kuroda, H. Gouda, H. Kumagai, H. Fujii, M. Yanagisawa, H. Nagase, Design and Synthesis of Non-Peptide, Selective Orexin Receptor 2 Agonists, *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 58, No. 20, pp. 7931–7937, 2015, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00988

査読なし (4 件)

7. 斉藤毅, 長瀬博、オレキシン研究の進展と新規受容体作動薬の創製、バイオサイエンスとインダストリー(B&I), 第 76 巻, 第 2 号, pp. 127-129, 2018.
8. 斉藤毅, 入鹿山容子, 柳沢正史, 長瀬博、IIIS 発ナルコレプシー治療薬開発に向けた取り組み、なるこ, 第 34 号, pp. 8–10, 2017.(日本ナルコレプシー協会 創立 50 周年記念号)
9. 斉藤毅, 長瀬博、睡眠覚醒を制御する世界初の分子: オレキシン 2 受容体作動薬 YNT-185 の創製、和光純薬時報, 第 84 巻, 第 3 号, pp. 2–5, 2016.
10. 斉藤毅, 長瀬博、低分子オレキシン受容体アゴニストの創製、MEDCHEM NEWS, 第 26 巻, 第 7 号, pp. 90–96, 2016.

[学会発表] (計 11 件)

1. 山本直司、大類彩、岡田卓大、谷田誠浩、斉藤毅、杓村憲樹、南雲康行、入鹿山容子、小川靖裕、石川有紀子、平山重人、渡辺友里恵、早川大地、合田浩明、柳沢正史、長瀬博、モルヒナン骨格を有するオレキシン 1 受容体 (OX1R) の特異的拮抗薬の設計・合成と OX1R 結合の活性立体配座、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2017 年 10 月 (名古屋)
2. (招待) 斉藤毅、睡眠覚醒を標的とする創薬研究、第 4 回次世代の有機化学・広島シンポジウム、2017 年 10 月 (広島)
3. 大類彩、山本直司、岡田卓大、谷田誠浩、斉藤毅、杓村憲樹、南雲康行、入鹿山容子、石川有紀子、小川靖裕、渡辺友里恵、早川大地、合田浩明、柳沢正史、長瀬博、オレキシン 1 受容体拮抗薬 YNT-707 の必須構造部位検討、第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017 年 9 月 (東京)
4. 大類彩、山本直司、岡田卓大、谷田誠浩、斉藤毅、杓村憲樹、南雲康行、入鹿山容子、石川有紀子、小川靖裕、渡辺友里恵、早川大地、合田浩明、柳沢正史、長瀬博、オレキシン 1 受容体拮抗薬 YNT-707 の

- 必須構造部位検討、第 61 回日本薬学会
関東支部大会、2017 年 9 月（東京）
5. 大類彩、山本直司、谷田誠浩、岡田卓大、斉藤毅、杓村憲樹、南雲康行、入鹿山容子、石川有紀子、小川靖裕、平山重人、柳沢正史、長瀬博、モルヒナン骨格を有するオレキシン 1 受容体選択的拮抗薬の設計・合成とその薬理作用、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2016 年 11 月（つくば市）
 6. （招待）斉藤毅、オレキシン 2 受容体作動薬 YNT-185 の創製、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム MCS サテライトセッション：次世代を担う研究者による「MCS 優秀賞」受賞講演、2016 年 11 月（つくば）
 7. （招待）斉藤毅、低分子オレキシン受容体アゴニストの創製、第 60 回日本薬学会 関東支部大会、2016 年 9 月（東京）
 8. T. Saitoh, T. Nagahara, N. Kutsumura, Y. Irukayama, Y. Ogawa, D. Kuroda, H. Gouda, H. Fujii, M. Yanagisawa, H. Nagase, Development of non-peptide orexin receptor agonists for controlling sleep/wake cycle, 日本化学会第 96 春季年会 2016、2016 年 3 月（京田辺市）
 9. T. Saitoh, T. Nagahara, N. Kutsumura, Y. Irukayama, Y. Ogawa, H. Fujii, M. Yanagisawa, H. Nagase, Discovery of novel orexin receptor agonists for controlling sleep/awake cycle, Pacificchem 2015, Dec. 2015, Honolulu, USA
 10. 山本直司、大類彩、岡田卓大、斉藤毅、入鹿山容子、小川靖裕、石川有紀子、柳沢正史、長瀬博、オレキシン 1 受容体選択的拮抗薬の設計・合成、第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2015 年 11 月（千葉）
 11. 斉藤毅、永原崇志、杓村憲樹、入鹿山容子、小川靖裕、黒田大祐、合田浩明、藤井秀明、柳沢正史、長瀬博、低分子オレキシン受容体アゴニストの創製、第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2015 年 11 月（千葉）

〔産業財産権〕

出願状況（計 3 件）

名称：スルホンアミド誘導体またはその薬学的に許容される酸付加塩

発明者：長瀬博、柳沢正史、斉藤毅、杓村憲樹、入鹿山容子

権利者：筑波大学

種類：特許

番号：特願 2015-119785

出願年月日：2015 年 6 月 12 日

国内外の別：国内

名称：鎮痛薬による眠気予防または治療薬

発明者：長瀬博、柳沢正史、斉藤毅、下山恵美

権利者：筑波大学

種類：特許

番号：特願 2017-235529

取得年月日：2017 年 12 月 7 日

国内外の別：国内

名称：鎮痛薬による眠気予防または治療薬

発明者：長瀬博、斉藤毅、柳沢正史、入鹿山容子

権利者：筑波大学

種類：特許

番号：特願 2017-238093

取得年月日：2017 年 12 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構

長瀬研究室（創薬化学）

<http://nagase.wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 毅 (SAITOH, Tsuyoshi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・

助教

研究者番号：80609933