

令和元年6月12日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05098

研究課題名(和文)新規オレキシンリガンドの創出と薬理作用の解明

研究課題名(英文)Development of novel orexin ligand and its pharmacological activity

研究代表者

長瀬 博(Nagase, Hiroshi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・特命教授

研究者番号：70383651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、睡眠・覚醒サイクルや摂食の調節メカニズムを制御するオレキシン神経系の真の機能解明を目的として、オレキシン受容体作動薬、特にOX1R選択的作動薬の取得を目指した創薬研究を行った。一般に受容体の作動薬と拮抗薬は類似の構造を有することが多いことから、我々の独自に開発したモルヒナン骨格を有するOX1R拮抗薬YNT-707から新たにOX1R作動薬を設計する検討を行った。YNT-707の拮抗活性並びに受容体親和性に起因する構造単位を調査すべく構造活性相関研究を実施し、特徴的な2つのファーマコフォアと、その空間配置が高いOX1R選択性に起因していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オレキシンは睡眠と覚醒のサイクルや摂食行動の制御に関与する生体内神経ペプチドであり、OX1RとOX2Rに作用する。特に、覚醒の制御に関してはOX2Rの機能が重要であると報告されており、OX2R選択的作動薬は睡眠疾患ナルコレプシーの治療薬として期待されている。一方、OX1Rに関しては薬物依存や疼痛緩和等に関与すると考えられているが、これらはオレキシンペプチドを用いた研究報告によるものであり、受容体自体の機能や薬理作用についてはほとんど何も分かっていない。OX1Rの真の機能解明のためにも、OX1R選択的な作動薬や拮抗薬の開発研究は意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at the development of novel orexin receptor agonists, especially OX1R selective agonists, to understand the function of the orexinergic system in the regulations of sleep/wake cycles and food intake. Since agonists and antagonists often have similar structures, we planned to design OX1R agonists from the structure of OX1R antagonist YNT-707, which has our uniquely developed morphinan skeleton. The structure-activity relationship studies of YNT-707 clarified the structural units responsible for the antagonist activity of YNT-707 as well as receptor affinity, and we found that the unique conformation of two pharmacophores is essential for the high OX1R selectivity.

研究分野：創薬化学

キーワード：オレキシン オピオイド モルヒナン 作動薬 拮抗薬

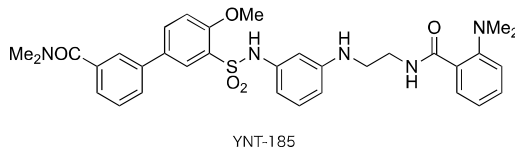
1. 研究開始当初の背景

オレキシン、オレキシン受容体

オレキシンは、分担研究者である柳沢・櫻井らにより発見された神経ペプチドであり、覚醒維持および摂食行動の制御について数多く報告されている。オレキシン受容体には OX_1R と OX_2R の2つのサブタイプがあり、 OX_1R は依存や鎮痛、 OX_2R は覚醒維持に重要な役割を果たすが、その詳細な機構については未だ明らかとなっていない。また、遺伝学的研究から、オレキシンおよび OX_2R 欠損マウスがナルコレプシー様症状を発症すること、さらにオレキシン欠損マウスへのオレキシンの補充によりその症状が改善することから、 OX_2R 作動薬はナルコレプシー治療に有効であると期待されている。また、 OX_1R はオピオイドやアルコール、ニコチンといった薬物の依存形成や抗がん剤に伴う全身疼痛の緩和に関与する。しかしながら、これらの報告はいずれも非選択的内因性ペプチドであるオレキシンA及びBを用いた研究が主であり、正確な薬理効果の解明には選択的作動薬の開発が望まれている。また、オレキシンを医薬品として応用する場合、オレキシンはペプチドであるため血液脳関門を透過できず、血中安定性も低いため、全身投与が極めて困難である。

オレキシン受容体を標的とした薬物

オレキシン受容体を標的とした薬物の開発状況としては、睡眠導入薬としてのオレキシン受容体拮抗薬の開発が精力的になされ、2014年には米国メルク社から OX_1R/OX_2R 非選択的拮抗薬が睡眠導入薬として発売された。また、多くの大学、製薬企業からも受容体選択的、非選択的拮抗薬が報告されている。しかしながら、その選択性は10~100倍程度と十分ではないため、それぞれの受容体に極めて選択性の高い低分子拮抗薬の開発が強く望まれている。一方、作動薬としては、ペプチドを基盤とした研究が盛んに行われているが、低分子 OX_2R 作動薬としてはベンゾイミダゾール誘導体や1,4-ナフトキノン誘導体が知られているのみであり、これらの化合物の作動活性は極めて低い。最近我々は、世界に先駆けて *in vivo* で薬効を示す低分子 OX_2R 選択的作動薬 YNT-185 ($EC_{50} = 28 \text{ nM}$ for OX_2R) の設計・合成に成功している。YNT-185は、水溶性であり、腹腔内投与実験において顕著にナルコレプシー症状を改善する結果を得ている。しかしながら、 OX_1R の作動薬はオレキシンの発見から21年経過する今なお、いずれの大学、企業からも報告が無く、その開発が強く望まれている。



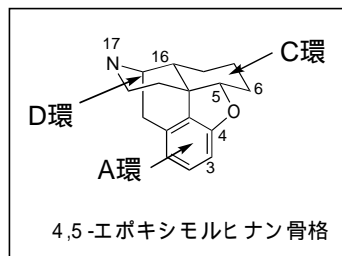
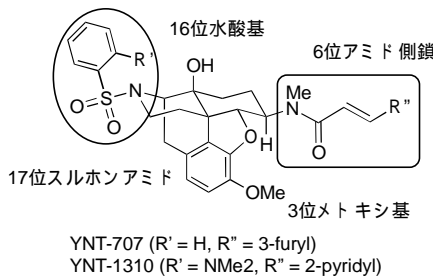
2. 研究の目的

本研究では、オレキシンの真の機能解明に向け、新規オレキシン受容体作動薬、特に未だ見出されていない OX_1R 選択的作動薬の開発を目指し研究を行った。

3. 研究の方法

我々の開発した OX_2R 選択的作動薬 YNT-185 の構造より誘導した化合物群は、いずれも高い OX_2R 選択性を有していたことから、 OX_2R 作動薬の構造中に OX_1R に親和性のある異なる構造を導入することができれば OX_1R 作動活性が発現すると考えられる。我々は、これまでの一連のオレキシン受容体リガンドの探索研究の過程で、モルヒネ構造を有する κ オピオイド受容体作動薬ナルフラフィンが OX_1R に選択的な拮抗活性を有することを見出しており、構造最適化をすることでオピオイド受容体には親和性を示さず、高い OX_1R 選択的拮抗活性を有する YNT-707 や YNT-1310 を見出した (右図)。

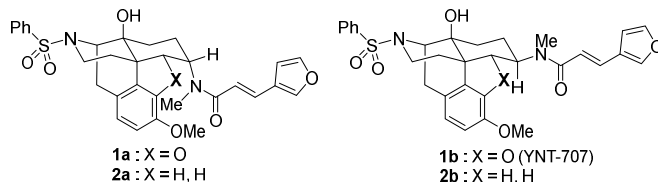
YNT-707 は特徴的な 4,5-エポキシモルヒナン骨格を有しており、モルヒナン骨格上の 17 位にベンゼンスルホンアミド基、16 位に水酸基、6 位に末端に複素環を有するアミド側鎖、3 位にメトキシ基の4つの官能基を有する。そのため、モルヒナン骨格はこれら4つの官能基を OX_1R に作用するように適切に配置することに役立っていると考えられる。そのため、YNT-707 の構造のうち OX_1R 結合に必要な構造、特に各官能基およびその配向が活性に及ぼす影響を知ることができれば、 OX_1R 作動薬の分子設計に有用な情報が得られると考えた。そこで、各種誘導体を設計、合成し、オレキシン受容体過剰発現細胞を用いた *in vitro* アッセイ系にて活性を評価することとした。



4. 研究成果

YNT-707 の必須構造の検討 1 4,5-エポキシ環の影響の考察

4,5-エポキシ環の有無と拮抗作用の関係に着目すると、6 β 誘導体においては 4,5-エポキシモルヒナン骨格を有する YNT-707 (**1b**) ($K_i = 8.14$ nM for OX₁R) がモルヒナン骨格を有する誘導体 **2b** ($K_i = 31.6$ nM for OX₁R) よりもわずかに拮抗作用が強かった。一方、6 α 誘導体では、4,5-エポキシモルヒナン骨格を有する誘導体 **1a** ($K_i = 849$ nM for OX₁R) よりもモルヒナン骨格を有する誘導体 **2a** ($K_i = 11.2$ nM for OX₁R, $K_i = 294$ nM for OX₂R) の方が、OX₁R に対する拮抗作用は向上しており、さらに OX₂R に対して弱い拮抗作用がみられた。この結果から、4,5-エポキシ環の有無と 6 位の立体化学は拮抗作用に密接に関係しており、特に 4,5-エポキシ環を有する場合には 6 位の立体化学が 6 β であることが拮抗活性を維持するために重要と考えられる。

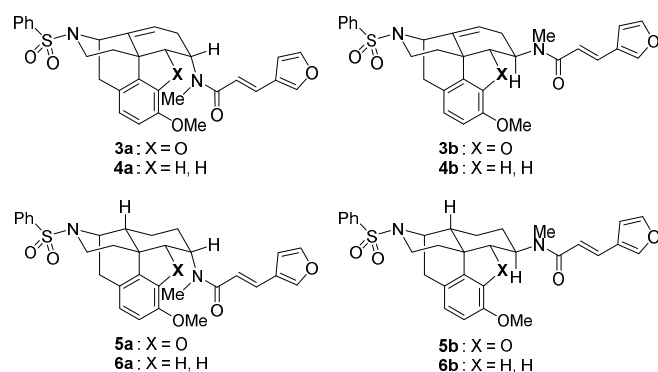


YNT-707 の必須構造の検討 2 14 位水酸基の影響の考察

14 位水酸基が拮抗作用に与える影響を明らかにするため、まず 4,5-エポキシモルヒナン骨格を有する 14-脱水体および 14-H 体を合成した。その結果、6 β 誘導体では 14-OH 体 **1b** (YNT-707) よりも 14-脱水体 **3b** ($K_i = 2.06$ nM for OX₁R) および 14-H 体 **5b** ($K_i = 1.97$ nM for OX₁R) の拮抗作用がわずかに向上していた。一方、6 α 誘導体では 14-OH 体 **1a** ($K_i = 849$ nM for OX₁R) よりも 14-H 体 **5a** ($K_i = 187$ nM for OX₁R) の拮抗作用が向上しており、さらに 14-脱水体 **3a** ($K_i = 17.8$ nM for OX₁R, $K_i = 123$ nM for OX₂R) では、OX₁R 拮抗活性の大幅な向上と共に OX₂R に対する活性も見られた。

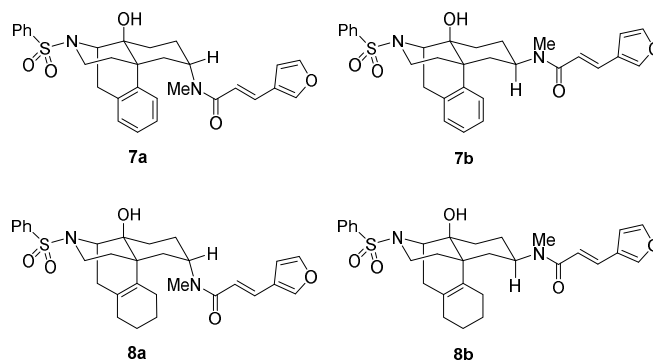
モルヒナン骨格を有する 6 β 誘導体では、14-OH 体 **2b** ($K_i = 31.6$ nM for OX₁R)、14-脱水体 **4b** ($K_i = 5.89$ nM for OX₁R) および 14-H 体 **6b** ($K_i = 5.51$ nM for OX₁R) という結果が得られ、4,5-エポキシモルヒナン誘導体の場合と同様の傾向がみられた。一方、6 α 誘導体では 14-OH 体 **2a** ($K_i = 11.2$ nM for OX₁R, $K_i = 294$ nM for OX₂R) よりも 14-H 体 **6a** ($K_i = 4.34$ nM for OX₁R, $K_i = 79.9$ nM for OX₂R) の拮抗作用が向上していたが、14-脱水体 **4a** ($K_i = 502$ nM for OX₁R) では大幅に OX₁R 拮抗作用が減弱し、OX₂R 拮抗作用もほとんど見られなかった。

以上の結果を CAMDAS (Conformational Analyzer with Molecular Dynamic And Sampling) プログラムによる配座解析の結果と照らし合わせると、6 位側鎖が C 環下方に伸長し、17 位ベンゼンスルホニル基が D 環上方に配置することが活性向上の鍵であることが示唆された。



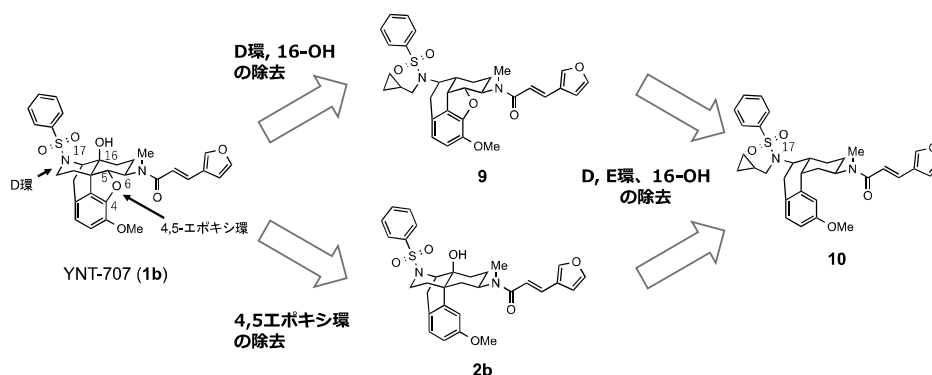
YNT-707 の必須構造の検討 3 3 位メトキシ基およびベンゼン環の影響の考察

3 位メトキシ基を除去した 3-H 体およびベンゼン環を還元した 3-メチレン体を合成し、その活性を比較したところ、6 α 誘導体と 6 β 誘導体で顕著な差がみられた。すなわち、6 α 誘導体では 3-OMe 体 **1a** ($K_i = 11.2$ nM for OX₁R, $K_i = 294$ nM for OX₂R)、3-H 体 **7a** ($K_i = 9.35$ nM for OX₁R, $K_i = 173$ nM for OX₂R) および 3-メチレン体 **8a** ($K_i = 7.45$ nM for OX₁R, $K_i = 91.9$ nM for OX₁R) では拮抗作用に大きな差は見られなかったが、6 β 誘導体では OX₂R に対する拮抗作用はほとんど観察されず、OX₁R においても 3-OMe 体 **1b** ($K_i = 31.6$ nM for OX₁R) よりも 3-H 体 **7b** ($K_i = 461$ nM for OX₁R) の拮抗作用が減弱していた。さらに 3-メチレン体 **8b** ではほとんど拮抗作用がみられなかった。この結果から、3 位メトキシ基および A 環 (ベンゼン環) は、6 β 誘導体の拮抗作用に必須であると考えられる。



YNT-707 の必須構造の検討 4 モルヒナン骨格 D 環の影響の考察

～ の研究で、YNT-707 (**1b**) の OX_1R 拮抗活性はモルヒネ構造に起因しており、モルヒネ構造はファーマコフォアとして機能するスルホンアミド構造とアミド側鎖構造を適切に配置するために機能していることが示唆された。そこで、これら 2 つのファーマコフォアの配向に關与するモルヒナン骨格上 D 環と 4,5-エポキシ環を除去した誘導体 **9**, **10** を合成し、その活性を調査した。一方の環を除去した誘導体は、環を除去しても十分な活性を有することがわかり、また両方の環を除去したでは活性は減弱するものの、 $1.3 \mu\text{M}$ の活性が保持されることを明らかとした。この結果を考察するために誘導体の配座解析を行ったところ、YNT-707 より環を除去することでそれぞれのファーマコフォアの自由度が向上し、特にスルホンアミド部位の配座固定が OX_1R 拮抗作用に重要な役割を果たしていることがわかった。



以上の結果を踏まえ、今後 OX_2R 作動薬の構造中に、YNT-707 のスルホンアミド部位の配座を再現できる構造を導入することで OX_1R 作動薬の開発を行っていく予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 39 件)

- N. Yamamoto, S. Ohruai, T. Okada, 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 III: Role of the 14-hydroxy and the 3-methoxy groups in antagonistic activity toward the orexin 1 receptor in YNT-707 derivatives lacking the 4,5-epoxy ring”
Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 27, No. 8, pp. 1747–1758, **2019**.
- 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**.
- 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**.
- N. Kutsumura, Y. Koyama, Y. Suzuki, K.-I. Tominaga, N. Yamamoto, T. Saitoh, Y. Nagumo, H. Nagase*
“Favorskii-Type Rearrangement of the 4,5-Epoxymorphinan Skeleton”
Organic Letters, Vol. 20, No. 6, pp. 1559–1562, **2018**.
- H. Nagase*, N. Yamamoto, M. Yata, S. Ohruai, T. Okada, T. Saitoh, N. Kutsumura, Y. Nagumo, Y.

- Irukayama-Tomobe, 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**.
6. 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**.
7. 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**.
8. N. Yamamoto, T. Okada, Y. Harada, N. Kutsumura, S. Imaide, T. Saitoh, H. Fujii, H. Nagase*
 “The application of a specific morphinan template to the synthesis of galanthamine”
Tetrahedron, Vol. 73, No. 39, pp. 5751–5758, **2017**.

他 3 1 件

〔学会発表〕(計 9 4 件)

1. 長瀬博
 “睡眠・覚醒の謎に挑む～睡眠病の治療薬を目指して～”
 くすり与健康 2018 春季講演会(日本薬学会関東支部・市民講座)(招待講演) 2018 年
2. Hiroshi Nagase
 “Design and synthesis of orexin receptor selective ligands”
 26th French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry (招待講演) 2017 年
3. Hiroshi Nagase
 “Design and Synthesis of Orexin 2 Receptor Agonists”
 Tsukuba Global Science Week 2016 (招待講演) 2016 年
4. 長瀬博
 “オレキシン受容体リガンドの探索研究”
 小野薬品工業株式会社水無瀬研究所 創薬研究に関する講演会(招待講演) 2016 年
5. 長瀬博、永原崇志、斉藤毅、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
 “オレキシン 2 受容体作動薬の設計・合成”
 第 36 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(招待講演) 2016 年

他 8 9 件

〔図書〕(計 8 件)

1. 斉藤毅、長瀬博
 “第 5 章 睡眠覚醒を制御する化学物質”
 上村大輔(編), 天然物の化学 II, 東京化学同人, pp. 29-36, **2018**.

他 7 件

〔産業財産権〕

出願状況(計 4 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、斉藤毅、柳沢正史、入鹿山容子
 権利者: 筑波大学、ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス・システム
 種類: 特許
 番号: 特願 2017-238093
 出願年: 2017 年
 国内外の別: 国内

他 3 件

取得状況(計 1 件)

名称: MORPHINAN DERIVATIVE AND MEDICAL USAGE THEREOF
 発明者: 長瀬博、山本直司、入鹿山容子、斉藤毅、柳沢正史、南雲康行
 権利者: 東レ株式会社
 種類: 特許

番号：WO2017073710A1

取得年：2017年

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ：<http://nagase.wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 (2016年度)

研究分担者氏名：柳沢 正史

ローマ字氏名：Yanagisawa Masashi

所属研究機関名：筑波大学

部局名：国際統合睡眠医科学研究機構

職名：教授

研究者番号 (8桁)：20202369

(2) 研究分担者 (2016 - 2018年度)

研究分担者氏名：桜井 武

ローマ字氏名：Sakurai Takeshi

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：教授

研究者番号 (8桁)：60251055

(3) 研究分担者 (2016 - 2018年度)

研究分担者氏名：斉藤 毅

ローマ字氏名：Saitoh Tsuyoshi

所属研究機関名：筑波大学

部局名：国際統合睡眠医科学研究機構

職名：助教

研究者番号 (8桁)：80609933

(4) 研究分担者 (2017 - 2018年度)

研究分担者氏名：入鹿山 容子

ローマ字氏名：Irukayama Yoko

所属研究機関名：筑波大学

部局名：国際統合睡眠医科学研究機構

職名：研究員

研究者番号 (8桁)：90312834

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、研究者個人に帰属されます。