

令和元年5月31日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19216

研究課題名(和文) 鎮痛耐性能の低い μ -ヘテロダイマー受容体選択的な作動活性を示す新規鎮痛薬の創出

研究課題名(英文) Discovery of novel mu-delta opioid receptor agonistic analgesics with low analgesic tolerance

研究代表者

平山 重人(Hirayama, Shigeto)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：40565842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室が保有する化合物ライブラリーから200化合物を選定し、スクリーニングを行った結果、ML335と同等もしくはそれ以上の μ -受容体作動活性を示した化合物を80個見出した。さらにヒット化合物の中から μ -受容体に対し高い作動活性を示し、かつ μ 受容体および δ 受容体に対する作動活性が低い9化合物を選び、 μ -受容体に対する濃度反応曲線を作成した。その結果、ML335と比較し、より強力な μ -受容体作動薬としてSYK424、SYK555、SYK556、SYK564、SYK664の5化合物を見出すことが出来た。しかし、ヒット化合物の効果的な改良および鎮痛作用の確認には至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緩和医療の現場では、モルヒネを含むオピオイド鎮痛薬の長期使用による鎮痛耐性が問題となっており、オピオイドの増量、オピオイドスイッチングおよび鎮痛補助薬の併用にて対応しているものの、治療効果が十分である例は必ずしも多くない。先行研究より μ -受容体作動薬が鎮痛耐性を形成しない強力な鎮痛薬になり得ることが示されており、本研究で見出された強力な μ -受容体作動薬は現状のオピオイド鎮痛薬の問題点の1つを解決する一助になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tested the activities of 200 compounds in our compound library for the μ -OR, δ -OR, and κ -OR receptors (ORs). The 80 compounds showed higher activities for the μ -OR than ML335, which is a representative μ -OR agonist. Furthermore, we evaluated concentration-response relationships for the μ -OR of the 9 compounds within the 80 compounds, which showed not only high μ -OR activities but also low δ -OR and κ -OR activities. As a result, SYK424, SYK555, SYK556, SYK564, and SYK664 exhibited more potencies than ML335. Although we found hit compounds as novel μ -OR agonists, we did not complete optimization of the hit compounds and assessment of their antinociceptive effects.

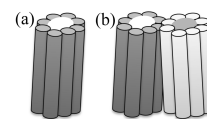
研究分野：創薬化学

キーワード：オピオイド 鎮痛薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オピオイド受容体には μ 、 δ 、 κ の 3 つのタイプが存在する。1999 年以降、オピオイド受容体がモノマー(単量体、(a))としてだけでなく、ヘテロダイマー (μ - δ など、(b))を形成すること、また、ヘテロダイマーはそれぞれのモノマーとは異なる薬理特性を有することが報告された (*Nature*, 1999, 399, 697.; *PNAS*, 2011, 108, 5098.)。この事実は、これからの新規薬物の開発にはモノマーのみならず、ヘテロダイマー受容体もその標的として考慮する必要があることを示している。また、緩和医療の現場では、モルヒネを含むオピオイド鎮痛薬の長期使用による鎮痛耐性が問題になっており、オピオイドの増量、オピオイドスイッチおよび鎮痛補助薬の併用にて対応しているものの、満足のいく治療効果を得られていない場合がある。さらに最近、代表的な μ 作動性鎮痛薬である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が報告され (*Sci. Signal.*, 2010, 3, ra54.)、モルヒネ鎮痛耐性には μ - δ 受容体形成が重要な役割を果たしている事が示唆された。一方、30 万化合物以上の化合物ライブラリーのランダムスクリーニングより、 μ - δ 受容体に対し、ある程度の選択性を示す作動薬 ML335 が見出されている (*PNAS*, 2013, 110, 12072.)。この ML335 はマウス tail-flick 試験において鎮痛効果を示し、さらに鎮痛耐性を形成せず、モルヒネ鎮痛耐性マウスに対しても鎮痛効果を示した。この結果は μ - δ 受容体作動薬が鎮痛耐性を形成しない強力な鎮痛薬になり得ること、さらにモルヒネ鎮痛耐性形成時にも鎮痛効果を十分に発揮できることを示している。しかし、ML335 は μ - δ 受容体に対し、*in vitro* において efficacy、potency 共に低く、加えて μ - δ 受容体選択性も十分とは言えない。ML335 が臨床開発のステージに上がっていない中、ML335 を上回る作動活性、 μ - δ 受容体選択性および鎮痛作用を有する化合物を見出せば、現在臨床使用されているオピオイド鎮痛薬以上に良好な疼痛コントロールを可能とする鎮痛耐性を発現しない薬物の創出に繋がるだけでなく、 μ - δ 受容体を含むヘテロダイマー受容体の生体内における機能解析に重要なツールになると考えられる。



2. 研究の目的

本研究では μ - δ 受容体活性を選択的に評価できるアッセイ系を用い、所属研究室が有するオピオイド化合物の中から新規 μ - δ 受容体作動薬シーズを見出す。さらに化合物の構造情報を抽出、解析し、シーズの改良を行い、鎮痛効果を指標に新規 μ - δ 受容体作動性鎮痛薬を創出することを目的とする。

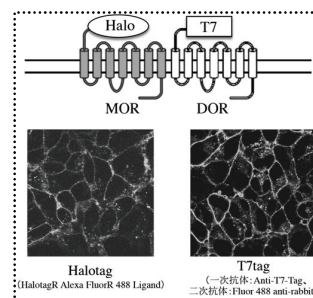
3. 研究の方法

所属研究室所有の化合物ライブラリーの分類分け

自ら行った ML335 の *in vitro* における検討結果に基づき、作動活性が認められている化合物を 3 群に分類する。具体的には ML335 と δ/μ 比が近い (約 3 から 10 倍) μ 受容体選択性を有する化合物群 (A 群)、 δ/μ 比が約 0.2 から 3 倍未満である非選択的な化合物群 (B 群) および μ/δ 比が約 5 倍以上の δ 受容体選択的な化合物群 (C 群) と分類する。ML335 の特徴から 3 群の中で A 群が最重要化合物群と考えられ、A 群の化合物評価を優先的に行うが、B および C 群についても評価対象とする。

化合物のスクリーニング方法

スクリーニングは国立がん研究センター研究所がん患者病態生理学研究分野上園保仁分野長の協力の下、Halotag- μ 受容体安定発現細胞、T7tag- δ 受容体安定発現細胞、および Halotag- μ と T7tag- δ 受容体が 1:1 で安定に発現しているヘテロダイマー細胞を使用する。これらの安定発現細胞の使用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。また、 μ 、 δ 受容体を 1:1 で発現するヘテロダイマー細胞に関しては抗体による可視化実験により μ 受容体、 δ 受容体がほぼ同率で発現していることをすでに確認している(右図)。



分類した化合物はハイスループット性の高い CellKey™ system を用いてスクリーニングを行う。CellKey™ system は生細胞内外の高周波に対する電気抵抗変化を測定することにより、薬剤添加前後の細胞の形態変化をリアルタイムでモニターし受容体応答やシグナル伝達を解析するシステムであり (*J. Pharmacol. Sci.*, 2014, 126, 302)、試薬などを全く使用せず受容体の高感度なアッセイが可能であるという特徴を有する。なお、CellKey™ system によるスクリーニングが困難と判断された場合、所属研究室の現有施設で行うことが可能な [³⁵S]GTP γ S 結合試験を用いて検討する。

スクリーニング時の各受容体の標準作動薬として μ 受容体作動薬として DAMGO、 δ 受容体作動薬として DPDPE および μ - δ 受容体作動薬として ML335 を使用する。また各受容体の拮抗薬として μ 受容体拮抗薬 β -FNA、 δ 受容体拮抗薬 NTI を使用し、 μ - δ 受容体拮抗薬は開発されていないため μ - δ 受容体抗体を用い、見出された μ - δ 受容体作動薬が μ - δ 受容体を介し活性を示すことを再度確認する。

なお、所属研究室にて合成された新規化合物についても前述の基準に従い分類し、随時評価対象化合物とする。

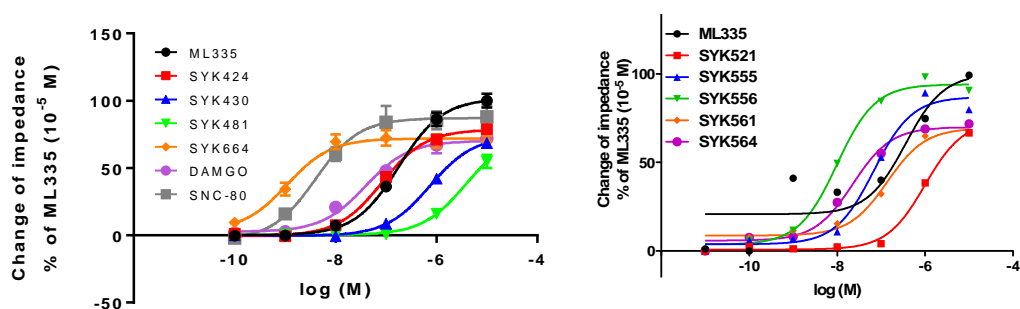
μ-δ 受容体作動薬の構造的特徴の抽出と解析および化合物の改良と評価

スクリーニングで見出された μ-δ 受容体作動薬同士および ML335 との構造を比較し、μ-δ 受容体作動薬に必要な官能基、空間配置等の情報を抽出し、解析する。解析した結果を基に新たな化合物の設計・合成を行い評価し、化合物を改良する。

なお、化合物情報の解析および化合物の改良は北里大学薬学部生命薬化学研究室の藤井秀明教授の協力の下、行う予定である。

4. 研究成果

所属研究室保有の化合物 200 個を 1 または 10 μM において評価した結果、ML335 と同等もしくはそれ以上の μ-δ 受容体作動活性を示した化合物を 80 個見出した。μ-δ 受容体作動活性を示す化合物の構造的特徴としてモルヒナン骨格の C 環の上方、より近い空間に芳香環を有することがあげられた。また、μ 受容体に対して拮抗作用を示す傾向にある 17 位窒素にシクロプロピルメチル基を有する誘導体においても強力な μ-δ 受容体作動活性を示すことが見出された。さらにシクロプロピルメチル基を有する化合物は μ 受容体作動活性が弱い傾向にあり、μ 受容体を介した副作用を軽減できる可能性が考えられる。さらにヒットした化合物の中から μ-δ 受容体作動活性が ML335 に対して 75% 以上、μ 受容体作動活性が DAMGO に対して 50% 以下 δ 受容体作動活性が SNC80 に対して 75% 以下の条件を満たした化合物である以下の 9 つを用いて μ-δ 受容体に対する作動活性の濃度反応曲線を作成した。



その結果、ML335 と比較し、より強力な μ-δ 受容体作動薬として SYK424, SYK555, SYK556, SYK564, SYK664 を見出すことが出来た。

さらに上記のスクリーニング結果から得られた情報を用いて新規モルヒナン誘導体を合成した。新規合成したモルヒナン誘導体はこれまで評価した化合物よりも母骨格の環のより上方に芳香環を配することが出来る異なる 2 つの母骨格を有する化合物を計 8 つ合成した。いずれの化合物も現在、評価中である。また、スクリーニングより見出した μ-δ 受容体作動薬 SYK664 の共頭位の水素をヒドロキシ基に変換した化合物を合成し、評価したところ、μ、δ、μ-δ 受容体、いずれの受容体に対してもほぼ同等の活性を示した。共頭位に水素を有する化合物の合成はヒドロキシ基を有する化合物の合成と比較し、工程数が増えるため、ヒドロキシ基を有する化合物が十分な活性を有することが示されたことは新規化合物合成の簡略化においてとても重要な情報が得られた。

さらに ML335 の構造の中でどの部位が μ-δ 受容体作動活性発現に重要なかを解明するために新規 ML335 誘導体の合成にも着手し、21 種合成した。ML335 の芳香環に異なるアミド基やヒドロキシ基、メトキシ基を導入した 12 種を評価した結果、ヒドロキシ基や、メトキシ基よりもアミド基を有する方が良く、さらに第 3 級アミド基よりも第 2 級アミド基を有する化合物の方がより強力な活性を有することが分かった。また、ML335 のエステル部位をアルコールやアルデヒドの還元した化合物、アルコール体をアセチル化した化合物、さらに炭素鎖 4 つの直鎖に変換した化合物など計 9 つ合成し、評価を行った。その結果、いずれの化合物も μ-δ 受容体に対してほぼ同等の活性を有していた。今回の変換範囲ではエステル部位は μ-δ 受容体作動活性に影響を及ぼさないことが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- 1) Ishikawa K, Karaki F, Tayama K, Higashi E, Hirayama S, Itoh K, Fujii H, C-Homomorphinan Derivatives as Lead Compounds to Obtain Safer and More Clinically Useful Analgesics. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017** 65, 920-929.
- 2) Watanabe Y, Hayashida K, Saito D, Takahashi T, Sakai J, Nakata E, Kanda T, Iwai T, Hirayama S, Fujii H, Yamakawa T, Nagase H Design and synthesis of novel δ opioid receptor agonists with an azatricyclodecane skeleton for improving blood-brain barrier penetration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, 27, 3495-3498.
- 3) Hayashida K, Hirayama S, Iwai T, Watanabe Y, Takahashi T, Sakai J, Nakata E, Yamakawa T, Fujii H, Nagase H Novel delta opioid receptor agonists with oxazatricyclodecane structure showing potent agonistic activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, 27, 2742-2745.
- 4) Ishikawa K, Mochizuki Y, Hirayama S, Nemoto T, Nagai K, Itoh K, Fujii H Synthesis and

evaluation of novel opioid ligands with a C-homomorphinan skeleton. *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24, 2199-2205.

〔学会発表〕(計7件)

- 1) μ - δ オピオイド受容体ヘテロダイマー選択的作用薬創出を志向した CYM51010 誘導体合成
渡邊 彩花, 高橋 直樹, 染谷 僚人, 松嶋 あおば, 石橋 尚人, 平山 重人, 宮野 加奈子,
伊藤 謙乃介, 上園 保仁, 藤井 秀明 日本薬学会第 139 年会
- 2) δ オピオイド受容体インバースアゴニストを志向した N-置換基の検討 岩松千晴, 早川大地,
河野友美, 柴崎麻莉恵, 東永華, 平山重人, 合田浩明, 藤井秀明 第 36 回メディシナルケ
ミストリーシンポジウム
- 3) δ オピオイド受容体インバースアゴニストを志向した N-置換基の検討 岩松千晴, 早川大地,
河野友美, 柴崎麻莉恵, 東永華, 平山重人, 合田浩明, 藤井秀明 第 62 回日本薬学会関東
支部大会
- 4) δ オピオイド受容体インバースアゴニストを志向した N-置換基の検討 岩松千晴, 早川大地,
河野友美, 柴崎麻莉恵, 東永華, 平山重人, 合田浩明, 藤井秀明 第48回複素環化学討論会
- 5) Development of Novel Delta Opioid Receptor Inverse Agonists and Their Antitussive Effects
Hirayama S, Higashi E, Nikaido J, Nemoto T, Ikeda H, Kamei J, Fujii H. 18th World Congress of
Basic and Clinical Pharmacology
- 6) モルヒネの 3 次元構造をもとに設計された新規化合物の各オピオイド受容体に対するアゴ
ニスト活性の解析 - CellKey™ システムによる細胞アッセイを用いて - 染谷僚人, 芦沢夏
鈴, 江藤萌子, 平山重人, 伊藤謙之介, 宇津美秋, 野中美希, 宮野加奈子, 藤井秀明, 上
園保仁 第 138 回日本薬理学会関東部会

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 藤井 秀明

ローマ字氏名: Hideaki Fujii

研究協力者氏名: 上園 保仁

ローマ字氏名: Yasuhito Uezono

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。