

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14352

研究課題名(和文) 光により覚醒を制御する分子ツールの開発

研究課題名(英文) Development of novel photochemical tools to regulate wakefulness

研究代表者

斉藤 毅 (Tsuyoshi, Saitoh)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠覚醒を制御するオレキシン受容体を、外部刺激、特に光により選択的に活性化する分子ツールの開発を行った。薬物に光応答性を付与する方法として、光により共有結合開裂を引き起こすことのできる光ケージング法を採用した。独自に開発したOX2R作動薬を含む薬物候補の構造活性相関研究から、光ケージング基を導入する薬物、修飾部位を決定した。同定した修飾部位に光ケージング基を連結することでOX2R活性をマスクした光応答性OX2R作動薬を合成した。合成した分子を用いて光照射実験を行ったところ、光照射によりOX2R作動薬が放出されることが明らかになり、電気生理学実験においてもOX2R活性化に由来する変化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちが睡眠から覚醒に移行する際、どのような分子メカニズムで起きているのか、まだ誰も明らかにしていない。この謎をひもとくためには、覚醒の誘導、維持に重要な役割を果たすオレキシン受容体の機能を時空間解像度が高く正確に制御する必要がある。本研究成果は、光という外部刺激によりオレキシン受容体の機能のみを時空間選択的に制御する分子の実現可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：The development of novel photochemical tools that selectively activate orexin receptors, which physiologically regulate sleep/wakefulness was conducted. As a method for imparting photo-responsiveness to a drug, a photo caging method that can release a drug via covalent bond cleavage by photo-irradiation was adopted. Through the structure-activity relationship study of drug candidates including originally developed OX2R agonists, a candidate drug for caging and its modifiable residue were identified. The inactivated photo-responsive OX2R agonists were synthesized by conjugating a photo-caging group. Photo-irradiation experiments using the synthetic molecules revealed that OX2R agonist was released after the photo-irradiation, and electrophysiological experiments also confirmed the response resulting from OX2R activation after photo-irradiation.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：オレキシン 光ケージド薬物 睡眠覚醒 光反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オレキシン (OX) は覚醒の誘導・維持に重要な役割を担う神経ペプチドである。OX 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。OX 受容体には2つのサブタイプ (OX₁R, ₂R) が存在し、主に OX₂R が覚醒を誘導することが知られているが、覚醒の誘導・維持に関わる作用部位やその機構は未だ十分に解明されていない。

神経伝達物質の生理機能は、古典的には電気刺激や局所薬物投与より解析されるが、低い特異性、時間分解能が問題となる。この問題点を解決する方法として遺伝学的に発現したオプシンを用いる光遺伝学 (オプトジェネティクス法) が開発され、細胞種特異的な神経活動の時間分解制御が可能になった。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。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ず、また任意の神経伝達物質を選択的に放出することはできない。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、オレキシン受容系の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

本研究ではオプトジェネティクス法の問題点を解決する手法として、光化学反応により神経伝達物質を放出する「光ケージド薬物」を用いる光薬理学法に注目した。これまでに光感受性を有するイオンチャネル制御分子は多く報告されている一方、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) の制御分子の報告は少なく、生体で利用可能な光ケージド薬物の報告はない。そこで本研究では、*in vivo* でも利用可能なオレキシン受容体を標的とする光ケージド薬物の開発を目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究の目的達成に向け、OX₂R 作動薬として YNT-185 (1) および TAK compound (2) を構造テンプレートとして①光で活性を制御する OFF-ON 型オレキシン受容体作動薬の開発、②可視光応答性を有するケージング基の導入の検討を実施した。

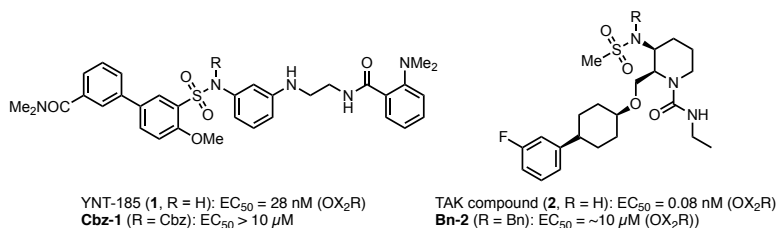


Figure 1

4. 研究成果

① 光で活性を制御する OFF-ON 型オレキシン受容体作動薬の開発

OX₂R 作動薬の構造活性相関研究から、2種類の OX₂R 作動薬共にスルホンアミド上 NH 基を置換することで OX₂R 作動活性が顕著に減弱したため、本 NH 基を光反応性官能基の導入部位として決定した (Figure 1)。微量の薬物放出を正確に評価するために、OFF-ON の活性差の大きさが重要になることから、化合物 2 を基本構造として選定した。化合物 2 の NH 基に対し、既知の光ケージング基であるニトロベラトリル (Nv) 基をアルキル化反応により連結し、Nv-2 を合成した (Scheme 1)。紫外可視吸収スペクトル測定の結果、未修飾の化合物 2 は紫外領域の 261 nm に吸収極大 ($\epsilon = 1,226 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) を示した。一方、Nv で修飾した化合物 Nv-2 は紫外領域の 348 nm に Nv 基に由来する強い極大吸収 ($\epsilon = 4,950 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) を示した (Figure 2)。

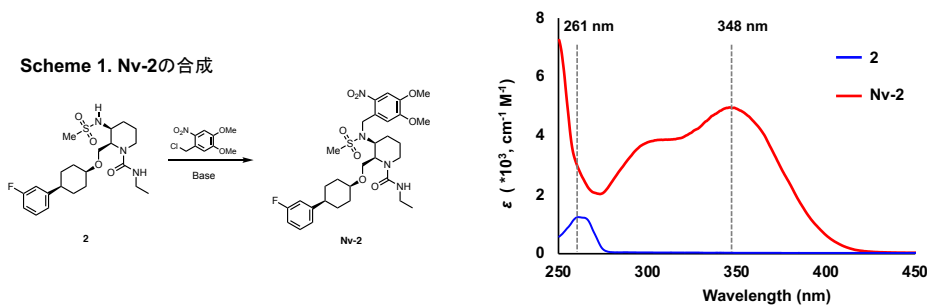
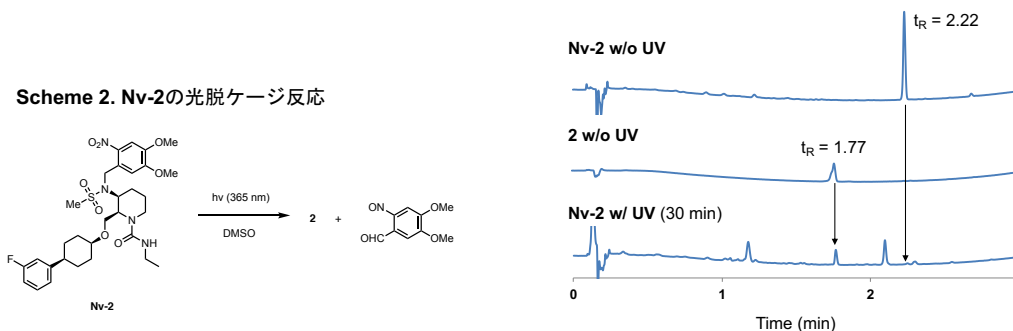


Figure 2. 2およびNv-2のUV-Visスペクトル

本結果から、**Nv-2** が良好な吸光特性を有することが推察されたことから、**Nv-2** を用いた脱ケージ反応を行った (Scheme 2)。**Nv-2** を DMSO に溶解し、365 nm の UV 光を照射し、HPLC にて反応を追跡したところ、0 min では **Nv-2** のみのピークが検出された一方で、30 min 照射したところ **Nv-2** のピークは消失し、化合物 **2** および Nv 基の光分解に由来するピークが確認された (Figure 3)。検出された **2** のピーク面積から算出した反応収率は 56%であった。



キュベット内での反応の進行が確認されたことから、**Nv-2** を用いて脳スライス切片を用いた光電気生理学実験を実施した。これまでの OX2R 作動薬 YNT-185 を用いた薬理学研究において、YNT-185 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) のヒスタミン神経細胞を活性化することが明らかになっている。そこで、TMN ヒスタミン神経を標的として電極を設置し、**Nv-2** の灌流下で細胞電位を記録した。**Nv-2** の灌流下、365 nm の光照射を開始したところ、照射後速やかに発火頻度の増加と膜電位上昇が確認された (Figure 4)。以上の結果から、**Nv-2** は光によりオレキシン受容体活性を制御する分子ツールであることが示され、本研究コンセプトの立証に成功した。

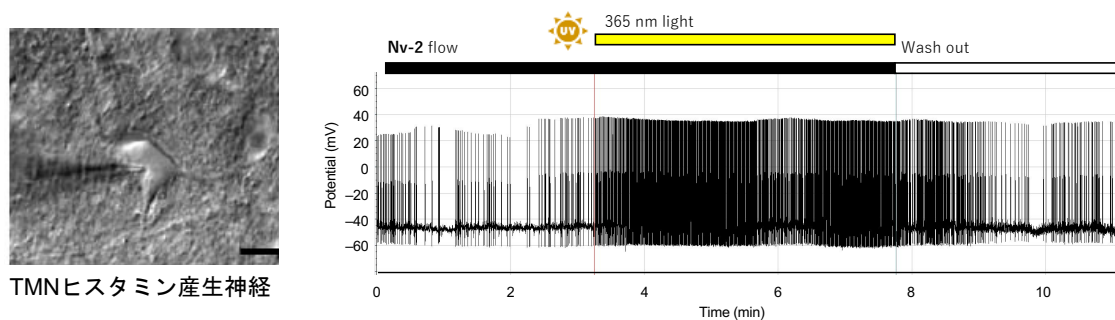


Figure 4. Nv-2を用いた光-電気生理学実験

② 可視光応答性を有するケージング基の導入の検討

前述の Nv 基の光開裂反応のために必要なエネルギーは、348 nm と紫外領域に吸収極大波長をすることから、紫外光に由来する光毒性が懸念される。また、Nv 基を始めとするニトロベンジル系ケージング基は光反応後に反応性の高いニトロソベンゼンが生成するため、副生成物が多く系が複雑化し、薬物の放出効率も低い (Figure 3)。従って、生体内に本コンセプトを実装するためには、可視光領域でよりクリーンに脱ケージできるケージング基が必要となる。そこで本研究では高反応性副生成物を生じず、400 nm 以上の可視光領域で脱ケージ可能なアリールクロマン誘導体に注目した。水溶性を担保する構造単位を導入することで独自のケージング基 **A400** をデザインし、市販のジエチルアミノクロマンを出発物質として 6 段階で合成を行った。モデル基質として安息香酸誘導体を **A400** に結合し、400 nm の光を照射し脱ケージ反応を行ったところ、わずか 30 sec の光照射で安息香酸誘導体のみを選択的に放出できることを見出した。現在、**A400** と OX₂R 作動薬 **2** のハイブリット分子の合成の検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto Naoshi, Ohruai Sayaka, Okada Takahiro, Saitoh Tsuyoshi, Kutsumura Noriki, Nagumo Yasuyuki, Irukayama-Tomobe Yoko, Ogawa Yasuhiro, Ishikawa Yukiko, Watanabe Yurie, Hayakawa Daichi, Gouda Hiroaki, Yanagisawa Masashi, Nagase Hiroshi	4. 巻 27
2. 論文標題 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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1747 ~ 1758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saitoh Tsuyoshi, Seki Kazunori, Nakajima Ryo, Yamamoto Naoshi, Kutsumura Noriki, Nagumo Yasuyuki, Irukayama-Tomobe Yoko, Ogawa Yasuhiro, Ishikawa Yukiko, Yanagisawa Masashi, Nagase Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Essential structure of orexin 1 receptor antagonist YNT-707, part V: Structure-activity relationship study of the substituents on the 17-amino group	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126893 ~ 126893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.126893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saitoh Tsuyoshi, Seki Kazunori, Nakajima Ryo, Yamamoto Naoshi, Kutsumura Noriki, Nagumo Yasuyuki, Irukayama-Tomobe Yoko, Ogawa Yasuhiro, Ishikawa Yukiko, Tanimura Ryuji, Yanagisawa Masashi, Nagase Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Essential structure of orexin 1 receptor antagonist YNT-707, Part IV: The role of D-ring in 4,5-epoxymorphinan on the orexin 1 receptor antagonistic activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2655 ~ 2658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.07.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 井岡秀二、斉藤毅、千歳洋平、Mustafa Korkutata、安部学、Michael Lazarus、長瀬博
2. 発表標題 光ケージドadenosine 2A受容体ポジティブアロステリックモジュレーターの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuyoshi Saitoh, Shuji Ioka, Mustafa Korkutata, Yohei Chitose, Manabu Abe, Michael Lazarus, Hiroshi Nagase
2. 発表標題 Development of photocaged adenosine 2A receptor activator
3. 学会等名 13th International Symposium on Organic Reactions (ISOR-13) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuyoshi Saitoh
2. 発表標題 Development of small molecules which regulate the sleep/wake cycle
3. 学会等名 The 140th Annual Meeting of the Pharmacological Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Ohrui, N. Yamamoto, T. Okada, M. Yata, T. Saitoh, N. Kutsumura, Y. Nagumo, Y. Irukayama-Tomobe, Y. Ishikawa, Y. Ogawa, Y. Watanabe, D. Hayakawa, H. Gouda, M. Yanagisawa, H. Nagase
2. 発表標題 Essential structure of orexin 1 receptor antagonist YNT-707
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	M. Amezawa, J. Horiuchi, T. Saitoh, R. Ohshita, Y. Ogawa, Y. Ishikawa, Y. Irukayama, E. Hasegawa, D. Hayakawa, Y. Watanabe, Y. Nagumo, N. Yamamoto, N. Kutsumura, H. Gouda, T. Sakurai, M. Yanagisawa, H. Nagase
2. 発表標題	Discovery of Novel Orexin Receptor Antagonists with 1,3,5-Trioxazatriquinane Skeleton
3. 学会等名	The 27th French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	S. Uchida, Y. Irukayama-Tomobe, Y. Ogawa, T. Yamaguchi, Y. Ishikawa, K. Sakurai, S. Soya, T. Saitoh, H. Nagase, M. Yanagisawa, T. Sakurai
2. 発表標題	A synthetic orexin agonist improves inflammation-induced immobility through activating the medullary raphe nucleus
3. 学会等名	Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	斉藤毅、井岡秀二、Mustafa Korkutata、千歳洋平、Kaspar Vogt、安倍学、Michael Lazarus、長瀬博
2. 発表標題	アデノシン2A受容体を標的とした新規光ケージド薬物の創製
3. 学会等名	第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	滑川由紀子、入鹿山容子、小川靖裕、石川由紀子、山口拓土、アキンデレ チト、斉藤毅、長瀬博、柳沢正史
2. 発表標題	新規低分子量オレキシン2型受容体作動薬、YNT-Xの薬理作用
3. 学会等名	第92回日本薬理学会年会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 雨澤真櫻、堀内惇平、斉藤毅、大下隆一郎、小川靖裕、石川有紀子、入鹿山容子、長谷川恵美、南雲康行、山本直司、沓村憲樹、早川大地、渡邊友里江、合田浩明、櫻井 武、柳沢正史、長瀬 博
2. 発表標題 1,3,5-Trioxazatriquinene骨格を有するトリマーの合成とオレキシン受容体拮抗活性評価
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 E. Takahashi, K. Enomoto, T. Yamaguchi, Y. Ogawa, S. Fukusumi, A. Kawai, M. Araki, T. Saitoh, Y. Nakagawa, Y. Irukayama-Tomobe, H. Shimano, H. Nagase, M. Yanagisawa
2. 発表標題 Non-peptidic Orexin receptor type-2 agonist attenuates body weight gain of high-fat fed mice
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 斉藤毅、長瀬博	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 192
3. 書名 天然物の化学 (科学のとびら64) (第5章 睡眠覚醒を制御する化学物質)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考