

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19590112

研究課題名(和文) エンドモルフィン骨格に基づくオピオイド受容体アゴニスト・アンタゴニストの設計

研究課題名(英文) Design of agonists and antagonists for opioid receptors based on the structures of endomorphins

研究代表者

津田 裕子 (TSUDA YUKO)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：11098478

研究成果の概要(和文)：エンドモルフィン-2(EM-2: H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂)の配列を基に、Tyr¹とPro²を置換した誘導体を合成した。それらの中で、[Dmt¹, D-Pip²]EM-2は最も強力にmu-オピオイド受容体に結合した(IC₅₀=0.21 nM)。さらにすべての誘導体がmu-アゴニスト活性を示した。[Dmt¹, L-Pip²]EM-2はmu-選択的なアゴニストであるのに対して、[Dmt¹, Aze²]EM-2はmu-/delta-アゴニスト活性を示すという興味ある結果を得た。溶液中で[Dmt¹, Aze²]EM-2はcis-trans体が共存しており、cis体が優位に存在していた。cis体では折れ曲がり構造が多く観察され、生物学的活性を示す化合物のコンフォメーションについてさらに検討中である。

研究成果の概要(英文)：We synthesized the [2',6'-Dimethyl-L-tyrosine¹]endomorphin 2 (EM-2) analogues containing proline mimics. Among them, [Dmt¹, L-Pip²]EM-2 was potent and selective mu-agonist, while [Dmt¹, Aze²]EM-2 was mu/delta-agonist. [Dmt¹, Aze²]EM-2 had a cis/trans equilibrium of ratio 2:1 and cis conformer was predominant in both DMSO or H₂O. The cis [Dmt¹, Aze²]EM-2 conformers took folded form. The further conformational analyses of the analogues are in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,064	510,000	2,210,064
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,064	840,000	3,640,064

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：エンドモルフィン, オピオイド受容体, 酵素安定性, コンフォメーション解析, 分子設計

1. 研究開始当初の背景
「痛み」は人類にとって耐え難い苦痛のひとつである。ガン性疼痛および皮膚移植や水痘一

帯状発疹発症後の激しい痛みを抑えるために、モルヒネやその類縁体が広く用いられている。

しかしながら、モルヒネやその類縁体は重篤な副作用を伴い、呼吸中枢抑制作用、消化管の平滑筋緊張、耽溺性、耐性などが知られている。強度の痛みをもたらすガン末期、帯状発疹による痛みなど多くの分野で、副作用を軽減した鎮痛薬の開発が強く要請されている。患者の生活の質(Quality of Life, QOL)を高めることは社会的要請である。申請者はこのような社会的要請に応えるべく、「より副作用を軽減した鎮痛薬」の開発を目指して、 μ -オピオイド受容体に選択的なアゴニストおよびアンタゴニストの創製を最終目的として本研究を実施した。

2. 研究の目的

1997年、ヒト脳下垂体より単離されたエンドモルフィン(EM)類は、内因性オピオイドペプチドのなかで μ -オピオイド受容体に最も高い親和性を示すばかりでなく、 μ -オピオイド受容体を介して強力な鎮痛効果を発現することが示された(Zadina JE et al; *Nature*, **1997**, *386*, 499-502)。このペプチドのアミノ酸配列をもとに、 μ -オピオイド受容体に選択的で高い親和性を有する新規ペプチドを得ることを目的とした。本研究に先立ち、親和性と選択性を高めるために、EMの構成アミノ酸の「鎮痛活性発現への寄与」を検討し、EMの小分子化やカルボキシ基側の修飾、構成アミノ酸の非天然型アミノ酸への置換に取り組んできた。EM-2はH-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂の構造を有しており、EM-2の1位のTyrを2',6'-dimethyl-L-tyrosine (Dmt)で置換した[Dmt¹]EM-2はEM-2の約5倍高い μ -オピオイド受容体親和性を示すことを我々はすでに明らかにしていた(Okada Y. et al; *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 1983-1994)。本研究においては、これまでの研究成果を踏まえ、2位Proの「鎮痛活性発現への寄与」を検討し、Proの置換を行い、 μ -オピオイド受容体に選択的なアゴニストおよびアンタゴニストを得ることを第一の目的とした。経口投与可能な分子を得ることも大きな課題であるので、脳血液関門(BBB)を透過できるような分子設計について検討することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分子設計と合成

- ① [Dmt¹]EM-2の2位ProのPro類似体への変換：[Dmt¹]EM-2の2位のProをPro類似体へ変換した。新規化合物のオピオイド受容体に対する結合能力を評価し、さらに新規化合物の生物学的活性を明らかにした。
- ② [Dmt¹]EM-2の2位Proのピペラジン誘導体

等への変換：[Dmt¹]EM-2の2位のProを、ピペラジン誘導体を含む環状ジペプチドに変換した。新規化合物のオピオイド受容体に対する結合能力を評価し、さらに新規化合物の生物学的活性を明らかにした。

- ③ 脳血液関門(BBB)を透過できる分子のデザイン：我々はすでに、2',6'-Dimethyl-L-tyrosine (Dmt)単体はオピオイド受容体に強く結合するにもかかわらず、生物学的活性や鎮痛効果をほとんど示さないことを報告した(Fujita Y et al; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 2005, 599-602)。一方、Dmtをピラジノン環上の2個のアミノ基で架橋したDmt二量体は経口投与により鎮痛活性を示すことを報告している(Jinsmaa Y et al; *J. Med. Chem.*, **47**, 2004, 2599-2610)。これらの発見は、ピラジノン環が分子にBBBを透過する性質を付与する可能性を示唆したので、3位および6位に1~4個のメチレン鎖をもつアミノ基を有するピラジノン環で架橋したDmt二量体を合成した。

(2) 化合物の生物学的評価

- ① 化合物のオピオイド受容体に対する結合活性の評価：ラット脳シナプス分画膜を使用し、トリチウムラベルしたDAMGO (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol), DPDPE [cyclic(Tyr-Pen-Gly-Phe-Pen)]を用いて、それぞれ、 μ -, δ -受容体における競合拮抗実験を行い、K_i値をもとめて、親和性の指標とした。
- ② 化合物の生物学的活性の評価： μ -受容体が優勢に発現しているモルモット回腸標本を用いたGPI assay, ならびに δ -受容体が優勢に発現しているマウス輸精管標本を用いたMVD assayによって、化合物がアゴニストとして作用するのか、アンタゴニストとして作用するのかを評価した。
- ③ [Dmt¹]EM-2、[Dmt¹, Aze²]EM-2のラット脳ホモジネート(シナプトソーム画分)に対する安定性の検討：ラット脳ホモジネート溶液(20 mM, pH 7.4)とEM-2、[Aze²]EM-2もしくは[Dmt¹, Aze²]EM-2とを37°Cでインキュベートし、それら化合物の安定性を、HPLCで経時的に検討した。

- (4) [Dmt¹]endomorphin-2(EM-2) [Dmt¹, Aze²]EM-2の中でのコンフォメーション解析(Aze, azetidino-2-carboxylic acid)：1D ¹H-NMRスペクトル, 2Dスペクトル(COSY, OCOSY and ROESY)をDMSOおよび軽水中(pH 5.20-5.25)で測定した。得られた距離情報を基に、シュミレーテッド・アニーリング法を用いて、ペプチドの溶液中での立体構造を構築した。得

られたコンフォーマについて再びエネルギーの最適化を行って、溶液中での構造を構築した。

4. 研究成果

(1) Dmt二量体の合成: 2', 6' -dimethyl-L-tyrosine (Dmt)をピラジノン環で架橋したDmt二量体を合成した。ピラジノン環3位および6位のメチレン鎖数 m , n は使用するアミノ酸によって(Lys: 4, Orn: 3, diamino-butylic acid: 2, diaminopropionic acid: 1)変更することができる。目的とするメチレン側鎖を持つピラジノン環とDmtの組み合わせにより, μ -オピオイド受容体に対して強い親和性と *in vitro*における強い生物活性を有する化合物を得ることが出来た。さらに, これら化合物群をマウスに経口投与すると鎮痛効果を示すことを明らかにした。ピラジノン環を導入することにより, 経口投与可能なオピオイドを得ることができることを明らかにしたのは意義深い。

(2) [Dmt¹]EM-2 の2位Proをピペラジン誘導体で置換した化合物の合成: ピペラジン誘導体としてフェニルアラニン2分子をエチレンで架橋後環化して得られるピペラジノン(*c*[Phe-Phe])を用い, EM-2誘導体を合成した。H-Dmt-*c*[Phe-Phe]-Phe-NH₂は[Dmt¹]EM-2の約40%の μ -オピオイド受容体に対する親和性を示すことを明らかにした。フェニルアラニン2分子による環化は, 受容体結合能, 生物活性の向上に期待したほど寄与しないことが明らかになり, これ以降の分子設計に指針を与えた。

(3) [Xaa²]EM-2および[Dmt¹, Xaa²]EM-2の生物学的活性の検討: piperidine-4-carboxylic acid (Pip)を含む誘導体以外は μ -オピオイド受容体にnMのオーダーで強く結合した。Dmt誘導体はTyr誘導体に比べおよそ10倍強い結合を示した。一方, δ -受容体に対してTyr誘導体は弱い結合しか示さず, Dmt誘導体はnMのオーダーで強く結合した。その中で[Dmt¹, D-Pip²]EM-2は最も強力に μ -オピオイド受容体に結合した(IC₅₀=0.21 nM)。さらにすべての誘導体が μ -アゴニスト活性を示した。[Dmt¹, L-Pip²]EM-2は μ -選択的なアゴニストであるのに対して, [Dmt¹, Aze²]EM-2は μ -/ δ -アゴニスト活性を示すという興味ある結果を得た。これは, Pro²の構造変換が生物学的活性の選択性にかかわっていることを示しており, 今後の分子設計に示唆を与える

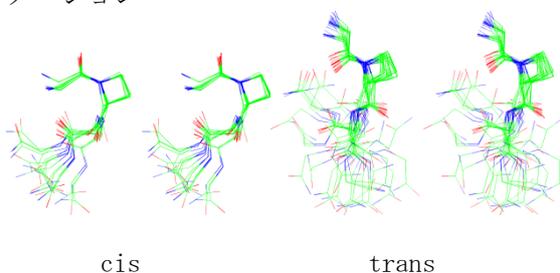
ものである。

表. EM-2類似体のオピオイド受容体における生物学的活性

	Binding Activity (IC ₅₀ : nM) ^a		Functional Bioactivity (IC ₅₀ : nM)	
	μ - ^b	δ - ^c	μ - ^d	δ - ^e
EM-2	8.65	>10,000	5.79	344
[Dmt ¹]EM-2	0.35	367	0.07	1.87
[Ac,c ²]EM-2	1.55	4,100	21.7	>10,000
[Dmt ¹ , Ac,c ²]EM-2	0.32	69	0.38	2.41
[Pip(4) ²]EM-2	143	>10,000	213	>10,000
[L-Pip(2) ²]EM-2	2.13	7,720	24.9	>10,000
[D-Pip(2) ²]EM-2	7.61	1,250	200	5,055
[Aze ²]EM-2	2.09	>10,000	35.4	>10,000
[Dmt ¹ , Pip(4) ²]EM-2	0.41	31	6.39	>10,000
[Dmt ¹ , L-Pip(2) ²]EM-2	0.41	70	0.42	>10,000
[Dmt ¹ , D-Pip(2) ²]EM-2	0.21	15.9	5.77	9.12
[Dmt ¹ , Aze ²]EM-2	4.04	355	1.29	5.75

(4) [Dmt¹]EM-2および[Dmt¹, Aze²]EM-2の溶液中でのコンフォメーション: NMRで得られた距離情報を基に, ペプチドの溶液中での立体構造を構築した。EM-2のDMSO中でのcis/transの存在比は1:2で, trans体が優位に存在した。この存在比は軽水中でもほぼ同等であった。これに対して, [Dmt¹]EM-2, [Dmt¹, Aze²]EM-2においてはcis/transの存在比は2:1で, cis体が優位に存在していた。さらにcis体, trans体とも直線構造と折れ曲がり構造が混在していたが, cis体では折れ曲がり構造が多く観察された。生体内で受容体に結合する際, どのようなコンフォメーションをとっているかは今後検討を継続する予定である。

図. [Dmt¹, Aze²]EM-2のDMSO中におけるコンフォメーション



(5) [Dmt¹]EM-2, [Dmt¹, Aze²]EM-2のラット脳ホモジネート (シナプトソーム画分) に対する安定性の検討: EM-2をラット脳ホモジネート溶液 (20 mM, pH 7.4), 37°Cでインキュベートすると200分後にはほぼ70%に消失したのに対して, [Dmt¹]EM-2, [Dmt¹, Aze²]EM-2は200分後には90%分解せず残っており, ラット脳ホモジネート溶液に対し安定なことが示された。

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 14 件)

- ① Tsuda, Y., Miyazaki, A., Yamada, T., Isozaki, K., Shimohigashi, Y., Ambo, A., Sasaki, Y., Minoura, K., In, Y., Ishida, T., Okada, Y. Structural studies of [2,6-dimethyl-L-tyrosine¹] endomorphin-2 analogues containing proline mimics. *Peptide Science 2008*, Proceedings of the 45th Japanese Peptide Symposium, Edited by Nomizu, M., The Japanese Peptide Society, Minoh, **2008**, p227-228. 査読あり
- ② Miyazaki, A., Tsuda, Y., Fukushima, S., Yokoi, T., Vantus, T., Bokonyi, G., Szabo, E., Horvath, A., Keri, G., Okada Y. New cyclic somatostatin analogues containing a pyrazinone ring: Importance of Tyr for antiproliferative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 6199-6201. 査読あり
- ③ Miyazaki, A., Tsuda, Y., Fukushima, S., Yokoi, T., Vantus, T., Bokonyi, G., Szabo, E., Horvath, A., Keri, G., Okada Y. Synthesis of somatostatin analogues containing C-terminal adamantane and their antiproliferative properties. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 5121-5124. 査読あり
- ④ Tsuda, Y., Miyazaki, A., Yamada, T., Isozaki, K., Shimohigashi, Y., Ambo, A., Sasaki, Y., Okada, Y. Synthesis of endomorphin-2 analogues containing piperidinecarboxylic acid (Pip) and 2-azetidincarboxylic acid (Aze). *Peptide Science 2007*, Proceedings of the 44th Japanese Peptide Symposium, Edited by Aimoto, S. and Ono, S., The Japanese Peptide Society, Minoh, **2008**, p267-268. 査読あり
- ⑤ Shiotani, K., Miyazaki A., Li, T., Tsuda, Y., Yokoi, T., Ambo, A., Sasaki, Y., Bryant, S. D., Jinsmaa, Y., Lazarus, L. H., Okada, Y., Synthesis of opioidmimetics, 3-[H-Dmt-NH(CH₂)_(n)]-6-[H-Dmt-NH(CH₂)_(n)]-2 (1*H*)-pyrazinones, and studies on structure-activity relationships. *Med. Chem.*, **2007**, *3*, 583-598. 査読あり
- ⑥ Shiotani, K., Li, T., Miyazaki, A., Tsuda, Y., Yokoi, T., Ambo, A., Sasaki, Y., Bryant, S. D., Lazarus, L. H., Okada, Y. Design and synthesis of opioidmimetics containing 2',6'-dimethyl-L-tyrosine and a pyrazinone-ring platform. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 5768-5771. 査読あり
- ⑦ Marczak, E. D., Jinsmaa, Y., Li, T., Bryant, S. D., Tsuda, Y., Okada, Y., Lazarus, L. H. [N-Allyl-Dm¹] Endomorphins are {micro}-opioid receptor antagonists lacking inverse agonist properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2007**, *323*, 374-380. 査読あり
- ⑧ Li, T., Shiotani, K., Miyazaki, A., Tsuda, Y., Ambo, A., Sasaki, Y., Jinsmaa, Y., Marczak, E., Bryant, S. D., Lazarus, L. H., Okada, Y. Bifunctional [2',6'-dimethyl-L-tyrosine¹] endomorphin-2 analogues substituted at position 3 with alkylated phenylalanine derivatives yield potent mixed mu-agonist/delta-antagonist and dual mu-agonist/delta-agonist opioid ligands. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 2753-2766. 査読あり
- ⑨ Tsuda, Y., Kawakami, T., Fujita, Y., Yamada, T., Isozaki, K., Shimohigashi, Y., Lazarus, L. H., Okada, Y. Synthesis and biological profiles of endomorphin-2 analogues containing a conformationally constrained moiety. *Peptides 2006*, Proceedings of the 29th European Peptide Symposium, Edited by Rolka, K., Rekoaski, P., and Silberring, J., KENES International, Geneva, Switzerland, **2007**, p128-129. 査読なし
- ⑩ Yamada, T., Hakogi, S., Iino, M., Murashima, T., Miyazawa, T., Tsuda, Y., Kawakami, T., Okada, Y., Isozaki, K., Shimohigashi, T. Synthesis and binding activities for the opioid receptors of endomorphin and morphiceptin analogs containing conformationally constrained 1-aminocyclohexane-1-carboxylic acids. *Peptides 2006*, Proceedings of the 29th European Peptide Symposium, Edited by Rolka, K., Rekoaski, P., and Silberring, J., KENES International, Geneva, Switzerland, **2007**, p668-669. 査読なし
- [学会発表] (計 27 件)
- ① 津田裕子, 安保明博, 佐々木友亮, 箕浦克彦, 尹康子, 石田寿昌, 岡田芳男: プロリンミミックを含む [2',6'-dimethyl-L-tyrosine¹] endomorphin 2 類似体の酵素安定性とコ

ンフォメーションの検討, 日本薬学会第130年会, 2010年3月28日~30日, 岡山.

- ② 津田裕子, 宮崎杏奈, 山田隆巳, 磯崎要, 下東康幸, 安保明博, 佐々木有亮, 箕浦克彦, 尹康子, 石田寿昌, 岡田芳男: Synthesis and biological activities of endomorphin-2 analogues containing Pro mimics, 第30回 European Peptide Symposium, Helsinki, Finland, 2008年8月31日~9月5日.
- ③ 津田裕子: Synthesis and biological activities of endomorphin-2 analogues containing proline mimics, II Workshop "From Endogenous Systems to Medicines", Warsaw, Poland, 2008年9月6日.
- ④ 津田裕子, 宮崎杏奈, 山田隆巳, 磯崎要, 下東康幸, 安保明博, 佐々木有亮, 箕浦克彦, 尹康子, 石田寿昌, 岡田芳男: プロリンミミックを含む [2',6'-dimethyl-L-tyrosine¹] endomorphin-2 類似体のコンフォメーション解析, 第45回ペプチド討論会, 東京, 2008年10月29日~31日.
- ⑤ 津田裕子, 宮崎杏奈, 山田隆巳, 磯崎要, 下東康幸, 安保明博, 佐々木有亮, 岡田芳男: ピペリジンカルボン酸またはアゼチジンカルボン酸を含むエンドモルフィン-2 類似体の合成, 第44回ペプチド討論会, 富山, 2007年11月7日~9日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 新規なオピオイド誘導體

発明者: 岡田芳男, 津田裕子, 横井利夫

権利者: 帝国製薬株式会社

種類: 特許

番号: (登録 No.) 4467985

取得年月日: 2010.03.05

国内外の別: 日本

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 裕子 (TSUDA YUKO)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号: 10098478

(2) 研究分担者

横井 利夫 (YUKOI TOSHIO)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号: 50122255

岡田 芳男 (OKADA YOSHIO)

神戸学院大学・食品薬品総合科学研究科・

教授

研究者番号: 60068236

以上

