

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06943

研究課題名(和文)薬物依存性の無い強力鎮痛薬の創製研究

研究課題名(英文)Development of Potent Analgesics without Drug Dependence

研究代表者

藤井 秀明 (Fujii, Hideaki)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：30458757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬物依存性の無い鎮痛薬の創製を志向し、amidino-TAPA(ATAPA)が作用するモルヒネが作用しない μ オピオイド受容体スプライスバリエント(MRP非感受性SV)作動薬の創出を試みた。ATAPAが作用するMRP非感受性SVに対するin vitro作動活性評価系の構築を試みたが、今のところ評価系の構築には至っていない。代替法として受容体結合実験の構築にも取り組み、現在、基本的な実験条件の問題点が明確化したところである。

既に見出しているリード化合物SYK-823を基に、4、5、または6位にフェニル基を有する置換基を導入したモルヒナン化合物を設計・合成し、目標化合物候補4種を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物依存性等の副作用の無い強力鎮痛薬の開発は医療上の重要な課題である。また、オピオイド鎮痛薬の過剰摂取による死亡例の急増(オピオイド・クライシスと称される)が、欧米をはじめ世界的に社会問題化している。よって本研究課題の解決は、重篤な疼痛に苦しむ患者はもとより医療従事者にも福音をもたらすばかりでなく、オピオイド・クライシスと称される社会問題に対する解決につながることを期待できる。

また、本研究の標的タンパク質は、通常7回膜貫通型であるGタンパク共役受容体(GPCR)にもかかわらず6回膜貫通型のものを含んでおり、研究がほとんど進んでいない6回膜貫通型GPCRの研究に光を当てるものである。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop agonists for the morphine-insensitive mu opioid receptor splice variants (MRP-insensitive SV), which amidino-TAPA interact with, as potent analgesics without drug dependence. At first, we attempted to develop an in vitro functional assay system for the MRP-insensitive SV but the attempt is not complete at present. Therefore, we conducted to develop the binding assay system for the MRP-insensitive SV as an alternative to the functional assay. The attempt to optimize the assay conditions revealed the critical factors to improve the assay system.

Based on the lead compound SYK-823, we designed and synthesized several morphinan derivatives with the substituent bearing phenyl group at the 4, 5, or 6-position to find four potential compounds.

研究分野：創薬科学

キーワード：オピオイド μ 受容体 スプライスバリエント

1. 研究開始当初の背景

モルヒネに代表されるオピオイド鎮痛薬(主に、 μ オピオイド受容体(MOR)に作用する作動薬)は強力な鎮痛作用を示す反面、薬物依存性の他、便秘、呼吸抑制、鎮痛耐性等の副作用も併せ持つ。しかし、オピオイド以外の作用機序による鎮痛作用は十分とは言えず、オピオイド鎮痛薬は重篤な疼痛の制御に必要不可欠な薬剤として臨床的に広く用いられている。従って、薬物依存性等の副作用の無い強力鎮痛薬の開発は医療上の重要な課題である。

共同研究者である溝口らにより見出された ATAPA (amidino-TAPA, amidino-Tyr - D-Arg - Phe - β -Ala - OH) は、強力な鎮痛作用を示し、MOR 作動薬でありながら薬物依存性を示さない興味深い化合物である。MOR には複数のスプライスバリエーション(ここでは、同じ遺伝子から生成する異なった種類の受容体のこと。以下 SV と略す)が存在し、モルヒネが作用する SV (Morphine-sensitive μ receptor splice variant. 以下、MRP 感受性 SV と略す)と作用しない SV (以下、MRP 非感受性 SV と略す)の2つに大別できる。溝口らの先行研究により、代表的な MOR 作動薬であるモルヒネと ATAPA では μ 受容体 SV 選択性が異なることが明らかにされている。すなわち、i) ATAPA は、MRP 感受性、非感受性両方の SV に作用するが、MRP 非感受性 SV を介して脊髄において内因性オピオイドペプチドであるダイノルフィン類(受容体(KOR)作動薬)を放出して鎮痛作用を示す(図1) ii) モルヒネは、MRP 感受性 SV を介して鎮痛作用を示し、脊髄におけるダイノルフィン類の放出は認められない(図1) iii) ATAPA は、MRP 非感受性 SV のうち少なくとも MOR-1J、MOR-1K、および MOR-1L と呼ばれる SV に作用し、ATAPA に特徴的な薬理作用の発現には MOR-1L を介した作用が重要であると考えられる(溝口ら未発表データ)

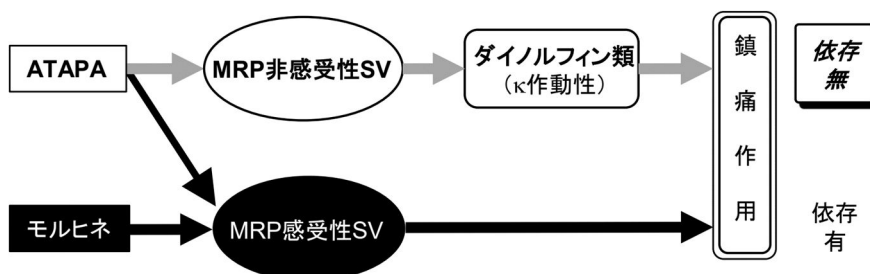


図1. ATAPA およびモルヒネによる鎮痛作用の概念図

従って、ATAPA が作用する MRP 非感受性 SV は、薬物依存性の無い強力鎮痛薬の有望な標的分子と考えられる。一方、ATAPA には、経口投与した場合、鎮痛作用は大きく減弱する(一般にペプチド性化合物は吸収性に乏しく、代謝安定性も低い場合が多く、経口活性は無くなるまたは大きく減弱する)という問題点が存在する。申請者はこの問題点を解決するため、非ペプチド性の ATAPA 様作用を示す化合物創製を目標として、ATAPA 様の作用発現には ATAPA が持つ N 末端の Tyr 残基に加えて3番目の Phe 残基が重要であるという独自の作業仮説を立て、Phe³ 残基を模倣したフェニル基を有する側鎖を導入したモルヒナン誘導体(モルヒナン構造には Tyr¹ 構造が内在されている)を設計・合成してきた。そして、ATAPA が作用する MRP 非感受性 SV に作用する作動薬として SYK-823 を見出した。しかし SYK-823 は、予想に反し薬物依存性を示した。この結果および上記の知見 iii) から、SYK-823 は MOR-1L に対する作用が弱い可能性が示唆される。しかし、化合物の SV 選択性や、鎮痛作用、薬物依存性、便秘の発現に MOR-1J、MOR-1K、および MOR-1L がどのように関与しているかは不明である。

2. 研究の目的

最終的な目的は、薬物依存性等の副作用のない鎮痛薬開発を志向して、ATAPA が作用する MRP 非感受性 SV 選択的、かつ経口投与可能な非ペプチド性作動薬を創製することである。このために本研究では、ATAPA および SYK-823 の MRP 非感受性 SV 選択性を明らかにし、鎮痛作用、薬物依存性、便秘の発現に関与する MRP 非感受性 SV を解明することを目的とする。具体的には、MRP 非感受性 SV に対する *in vitro* 評価系を構築し(今のところ、ATAPA 様作用を有するか否かは、動物を用いた鎮痛実験を実施するしか評価法がない) SYK-823 の MRP 非感受性 SV (MOR-1J、MOR-1K、および MOR-1L) の選択性を明らかにするとともに、MOR-1J、MOR-1K、および/または MOR-1L に選択的な化合物を創出することで、鎮痛作用、薬物依存性、便秘の発現に MOR-1J、MOR-1K、および MOR-1L がどのように関与しているかを解明することである。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 評価系の構築について

ATAPA が作用することが解明されている3種の MRP 非感受性 SV (MOR-1J、MOR-1K、および MOR-1L)のうち、MOR-1J は7回膜貫通型であるが、MOR-1K および MOR-1L は6回膜貫通

型である。6回膜貫通型のSVは単独では機能せず何らかの受容体とヘテロ二量体を形成し、その機能を発現していると考えられるが、生体内におけるMRP非感受性SVとヘテロ二量体を形成する相手の受容体は不明である。MOR-1K、MOR-1Lとは異なる6回膜貫通型のMOR-SVについては、ノシセプチン受容体またはアドレナリン₂受容体と共発現させ受容体結合実験を実施したという報告例があるため、6回膜貫通型のMOR-SVとノシセプチン受容体またはアドレナリン₂受容体を共発現させ、評価系の構築を試みる。

次善の策としては、IBNtxA(6回膜貫通型のMOR-SVに作用すると報告されている化合物。ATAPAが作用する6回膜貫通型のMOR-SVと同じであるかどうかは不明である)の結合部位に対する結合実験の実施法に準じた方法により、ATAPAの結合部位に対する結合実験の構築を試みる。具体的には、動物由来の膜標本を用いて、MRP型の選択的MORリガンド(MRP感受性SVに結合する)選択的受容体(DOR)リガンド、および選択的KORリガンド存在下におけるATAPAの結合部位を検出する方法を検討する。

(2) ATAPAの標識化合物の合成について

ATAPAの標識化合物は、*in vitro*評価系構築の際に必須の化合物となる。標識するために用いる放射性同位体としては³Hや¹²⁵Iがポピュラーであるが、半減期の長い³Hを用いることにした。まずは、ベンゼン環上にハロゲンをもつATAPA誘導体を用い、重水素化することにより標識の反応条件を検討する。見出した反応条件により、³Hにより標識されたATAPAを委託合成することとする。

(3) 新規化合物の合成について

SYK-823は、4位にフェニルアルキル基を有するモルヒナン誘導体である。そこで、SYK-823誘導体として、4位に異なる置換基を有するモルヒナン誘導体を設計・合成する。また、5位または6位にフェニル基を有する置換基を導入したモルヒナン誘導体を設計・合成する。さらに、SYK-823のフェニル基が受容体と相互作用しているのか脂溶性相互作用をしているのかを検討する目的で、フェニル基を生物学的等価体に変換した化合物についても設計・合成する。

4. 研究成果

(1) *in vitro*評価系の構築について

ATAPAが作用することが解明されている3種のマウスMRP非感受性SV(mMOR-1J、mMOR-1K、およびmMOR-1L)の発現を試みる予定であったが、mMOR-1KおよびmMOR-1Lのコーディング領域に関する情報が得られなかった。このため、共発現を試みる前に、mMOR-1(MRPが作用する、いわゆる通常のマウスMOR)の全長cDNAを用いての発現を試みた。しかし発現を試みた細胞に対して³Hdiprenorphine(MOR、DOR、およびKOR全てに結合する標識化合物)を用いた受容体結合実験を実施したところ、³Hdiprenorphineの結合が認められなかった。この原因として、mMOR-1自身が発現していない、またはmMOR-1が発現しているが細胞膜への移行が正常に起こっておらず³Hdiprenorphineの結合が確認できなかったの2通り考えられた。そこで、発現を試みた細胞の細胞内にmMOR-1のmRNAが存在しているかどうかについてRT-PCR法により検討した。その結果mMOR-1のmRNAは確認できず、mMOR-1自身が発現していないと考えられた。mMOR-1が発現しなかったのは開始コドン前に非翻訳領域があるためではないかと考え、非翻訳領域を除去したcDNAを用いたところ、mMOR-1の発現が確認できた。本検討は予想以上に難航したため、研究期間の途中から、次善の策としてのIBNtxAの結合部位に対する結合実験の実施法に準じた方法の検討についても着手した。検討に先立ち、小脳を除いたマウス全脳の前駆体を用い、委託合成した³HATAPA(詳細は、次項参照)による受容体結合実験を実施し、検討に用いることができることを確認した。次に、実験条件を最適化するために、種々のタンパク量および標識化合物の濃度において検討した。その結果、³HATAPAによる比放射活性は観察できるものの、MRP型の選択的MORリガンド、選択的DORリガンド、および選択的KORリガンド存在下におけるATAPAの結合部位を検出するにはSN比が不十分であると考えられた。SN比を改善するためにはより多くのタンパク量を用いることが最善であると予想され、今後さらに実験条件をつめる必要がある。

(2) ATAPAの標識化合物の合成について

まず、標識体の前駆体にあたるプロモ化されたATAPA(amidino-Tyr-D-Arg-p-Br-Phe-β-Ala-OH)は、定法のペプチド合成法に従い合成した。次に重水素(D₂)を用いて水素添加反応を行い、プロモ基の重水素化を検討した。Pd触媒を用いる一般的な反応条件において重水素化は進行した。質量分析よりATAPAより+1のシグナルのみが観察され+2や+3のシグナルは観察されなかったことから、軽水素-重水素置換反応は起こらず選択的に臭素-重水素置換反応が進行したと考えられた。委託合成により、本反応条件を用いてプロモ化されたATAPAのトリチウム化を実施した。委託合成したATAPAの³H標識体は、受容体結合実験に用いることが可能であることを確認した(前項参照)。

(3) 新規化合物の合成について

4 位置換体合成の検討

SYK-823のメチレン鎖長を伸長/短縮した誘導体を設計・合成した。メチレン鎖長を短縮した誘導体の一つとして、4位に直接フェニル基が置換した化合物(ピフェニル体)の合成をStilleカップリングにより試みた。しかし目的とするピフェニル体は全く得られず、予期しなかったケトンの4位が酸素官能基化された化合物が得られた。ケトン4位の酸素官能基化については、報

告例はあるもののその数は少なく有用な反応になる可能性があるため、本研究とは別テーマとして検討を進めている。

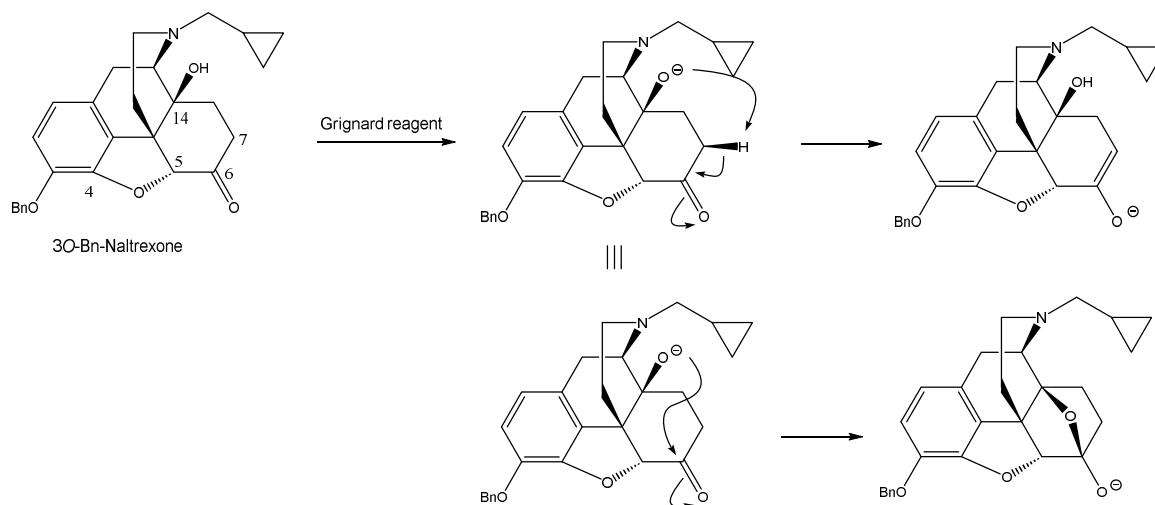
また、フェニル基の生物学的等価体としてイソプロピル基を選択し、SYK-823 およびその類縁体のフェニル基をイソプロピルに置き換えた化合物を設計・合成した。

5 位置換体合成の検討

テバインの5位プロトンは、強塩基により脱プロトン化できることが知られている。これを参考に、テバイン構造を有する誘導体を *tert*-BuLi により処理した後臭化ベンジルで処理しベンジル化を試みたところ、5-ベンジル体が得られた。しかし収率は2%程度と非常に低かったため、5位置換体の検討はこれ以上行わなかった。

6 位置換体合成の検討

フェノール性ヒドロキシ基をベンジル基で保護したナルトレキソン誘導体(3O-Bn-ナルトレキソン)を原料に、6位にフェニル基を有する置換基導入を検討した。当初、6位ケトンに足掛かりに Grignard 反応剤を用いることで容易に置換基導入できると考えていたが、反応はほとんど進行しなかった。フェニル Grignard を用い、種々の反応温度、反応時間、Grignard 反応剤の当量数等について検討を行ったが、改善は見られなかった。この原因として、まず Grignard 反応剤が塩基として働き14-ヒドロキシが脱プロトン化されてアルコキシドとなり、これが7位プロトンを脱プロトン化してエノラートアニオンが生じる(ナルトレキソンは、非常にエノール化しやすい化合物として知られている) または生じたアルコキシドイオンが6位ケトンを攻撃してしまう(14-ヒドロキシ基による6位ケトンの求核攻撃の反応例も知られている)ため、Grignard 反応が進行しなかったと推測した(下の反応式参照)。そこで、14-ヒドロキシ基をベンジル基で保護したところ、予想通りに Grignard 反応が進行した。この方法を用いて種々のフェニル基を有する置換基を導入した。Grignard 反応による生成物は第三級アルコールであるが、それを脱水することによりオレフィン体、そのオレフィン体を還元することにより6位に官能基を持たない6-(フェニルアルキル)体を合成した。



当初は、構築した *in vitro* 評価系により合成した化合物を評価する予定だったが、評価系の構築が達成できていないため、SYK-823 を見出した時の評価方法を用いることとした。すなわち、i) オピオイド受容体結合実験において、MOR と KOR の親和性 (K_i 値) 比が 10 倍以上の化合物を選択する(これは、ATAPA が脊髄においてダイノルフィン類(KOR 作動薬)を遊離し、その作用を発現するためである) ii) 選択した化合物を野生型マウスに投与して、鎮痛作用の有無を確認する、iii) 野生型マウスで鎮痛作用を示した化合物をプロダイノルフィン欠損マウス(ダイノルフィン類を産生できない遺伝子改変マウス)に投与し、鎮痛作用を評価することにした。現時点では、4化合物が KOR に対する親和性が低く、*in vivo* 評価に供する化合物の候補であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丹羽淳一、本城綾香、米澤 佑、平山重人、唐木文霞、伊藤謙之介、溝口広一、藤井秀明
2. 発表標題 モルヒネ非感受性 μ オピオイド受容体スプライスバリエント選択的作動薬を志向したモルヒナン誘導体の合成
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------