

令和元年6月12日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13259

研究課題名(和文) BNTX誘導体の抗トリコモナス活性発現メカニズムの解明、及び、構造活性相関研究

研究課題名(英文) Elucidation of an action mechanism of BNTX derivatives toward antitrichomonal activity and the structure activity relationship

研究代表者

沓村 憲樹 (KUTSUMURA, Noriki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

研究者番号：00439241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オピオイド受容体拮抗薬7-ベンジリデンナルトレキソン(BNTX)が抗トリコモナス活性を有する事を見出した。そこで、その活性発現の作用機序の解明を目的として本研究を実施した。様々なBNTX誘導体を合成し、それらの抗トリコモナス活性とオピオイド受容体との結合親和性を評価・比較した結果、抗トリコモナス活性とオピオイド受容体との親和性にはそれほど相関が無い事が分かった。一方、BNTX誘導体の共役二重結合は、抗マラリア活性と同様に抗トリコモナス活性発現に重要な因子である事を確認した。また、BNTX誘導体合成の過程で4,5-エポキシモルヒナン化合物に特有な新規Favorskii型転位反応を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリコモナス症は、*T. vaginalis*という原虫によって引き起こされる性感染症の一つで、毎年世界で1億人以上の新規感染者が報告されている。我が国ではメトロニダゾールが第一選択薬として用いられているが、近年は耐性株も報告されており、新規作用機序の治療薬の開発が望まれている。本研究で見出したBNTX誘導体は中程度の抗トリコモナス活性を有しており、トリコモナスの抗酸化系を阻害するという新しい活性発現メカニズムが提案された。実際、メトロニダゾールは*T. vaginalis*にもリスザルの*T. mobilensis*にも殺活性を示したが、BNTX誘導体は*T. vaginalis*にのみ殺活性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted with the aim of clarifying the action mechanism of antitrichomonal activity of 7-benzylidenenaltrexone (BNTX) derivatives, which are known as delta-opioid receptor antagonists. A variety of BNTX derivatives were synthesized, and then, their antitrichomonal activity and opioid receptor binding affinity were evaluated. As a result, it was found that there was not much correlation between the antitrichomonal activity and the affinity of the opioid receptor. On the other hand, it was confirmed that the conjugated double bond in BNTX derivatives was an important factor for the expression of antitrichomonal activity as well as antimalarial activity. In addition, a novel Favorskii-type rearrangement reaction of the 4,5-epoxymorphinan compounds was discovered in the process of synthesis of BNTX derivatives.

研究分野：有機合成化学

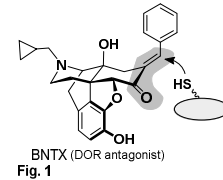
キーワード：抗トリコモナス活性 構造活性相関 オピオイド 原虫感染症治療薬 BNTX チオール捕捉能 Favorskii型転位 4,5-エポキシモルヒナン

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

1. 研究開始当初の背景

トリコモナス症は、*T. vaginalis* という原虫によって引き起こされる性感染症の一つで、毎年世界で1億人以上の新規感染者が報告されている。トリコモナス症に感染すると尿道炎、膣炎、子宮頸管炎等を発症させ、さらには他の嫌気性菌（淋菌等）との複合感染を誘発し重篤化することも多い。また、妊婦の早期破水や流産、HIVの感染リスクが増大することも知られている。トリコモナス症に対する既存薬としては、メトロニダゾールが最も一般的であるが、耐性株の出現が近年報告されており、これに代わる新規作用機序を持つ特効薬の開発が望まれている。

最近我々は、 δ オピオイド受容体 (DOR) 拮抗薬である 7-ベンジリデンナルトレキソン (BNTX、Fig. 1) 及びその誘導体が抗トリコモナス活性を有することを見出し、その作用機序の解明を目指すとともに、構造活性相関研究を通じて既存薬に匹敵する様な活性化化合物の開発を目的として研究を開始した。当初、活性発現の鍵は、**①**「BNTXの分子構造中のマイケルアクセプターによるチオール基捕捉作用」と**②**「DOR拮抗作用」の両要因が複合的に関与しているものと作業仮説を立てた。しかし、30検体ほどのBNTX誘導体を合成してそれらの抗トリコモナス活性試験とオピオイド受容体結合試験を実施したところ、**①**の要因としてチオール基を捕捉する不飽和二重結合の関与は確認できたものの、**②**の要因と活性発現にはそれほど大きな相関関係はみられなかった。



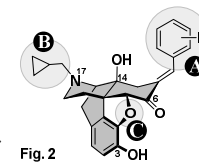
2. 研究の目的

上記のこれまでの研究結果をもとに、さらなるBNTX誘導体の構造活性相関情報を蓄積することで、過去に合成したおよそ30検体のBNTX誘導体に共通して確認された抗トリコモナス活性の発現メカニズムを探索する。また、我々の抗トリコモナス活性試験では、BNTXの IC_{50} 値は21.7 μ Mであったが、本研究を通じて、既存薬メトロニダゾール ($IC_{50} = 5.2 \mu$ M) よりも高活性なリード化合物の開発へと繋げることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) BNTX誘導体の合成

これまでのBNTX誘導体の構造変換部位は主にベンジリデン部位の変換(A)のみであったため、本研究では17位室素上の置換基の変換(B)や剛直な分子骨格の形成要因の一つであるテトラヒドロフラン環の除去(C)等、変換箇所を定めて誘導体合成を行った (Fig. 2)。ベンジリデン部位を変換した誘導体は、市販のナルトレキソン塩酸塩を出発原料として、各種アルデヒドをペリリジン存在下、シールドチューブ内で加熱することで合成した。また、17位室素上の置換基を変換した誘導体やテトラヒドロフラン環を除去した誘導体についても、適宜、既知の方法を利用して合成した。また、一部のBNTX誘導体の不飽和共役二重結合 (Fig. 1) を還元した誘導体や、3位フェノール性水酸基をメチルエーテル化した誘導体も合成した。前者は抗トリコモナス活性と**①**「チオール基捕捉作用」の相関を検討するための化合物であり、後者は抗トリコモナス活性と**②**「DOR拮抗作用 (広義では、オピオイド受容体との親和性)」を検討するための化合物である。さらに、既知の合成法を利用することで、いくつかの各種非ペプチド性オピオイドリガンドも用意した。



(2) (1) で合成した BNTX 誘導体の抗トリコモナス活性試験

合成した全てのBNTX誘導体、及び、関連化合物について、既報に従って抗トリコモナス活性試験を実施した。Diamond's TYI-S-33 培地を用いて *T. vaginalis* を培養し、これに各種誘導体を加えて 37°C で 48 時間培養した後、それぞれの培養状態及び被験化合物の効果を倒立顕微鏡にて観察した。対照群には生理食塩水を用いた。それぞれの被験化合物について、同濃度の3つの検体サンプル全てにおいて虫体を認めない濃度の最低濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とした。また、50% 阻害濃度 (IC_{50}) については、ノイバウアー血球計測板を用いて各サンプルの虫体数を計数し、阻害 - 濃度曲線から算出した。さらに、他のトリコモナス種 *T. mobilensis* における活性についても同様に検討を行った。

(3) 抗トリコモナス活性試験を実施した被験化合物へのオピオイド受容体結合試験

抗トリコモナス活性の値が強弱様々な化合物について、それらのオピオイド受容体結合試験を行った。ヒトの μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体 (MOR, DOR, KOR) を安定発現させた Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を細胞膜標本とし、 $[^3H]$ -DAMGO、 $[^3H]$ -DPDPE、 $[^3H]$ -U69,593 をそれぞれ各種オピオイド受容体への放射性リガンドとして用いた。上記被験化合物についてそれぞれ、MOR、DOR、KOR との結合親和性を評価し、また、一部の化合物については $[^{35}S]$ GTP γ S 試験も実施した。

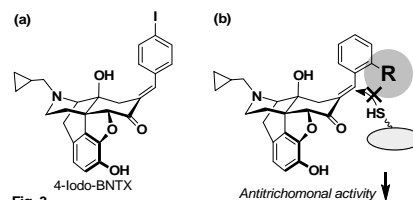
4. 研究成果

(1) BNTX 誘導体の合成と新奇転位反応の発見

以前我々が開発した新奇 BNTX 誘導体合成法に従い、ベンジリデン部位を種々変換した誘導体を約 80 種合成した。また、BNTX の 3 位フェノール性水酸基をメチルエーテル化した化合物、共役二重結合を還元した化合物、そして 3 位をメチルエーテル化かつ共役二重結合を還元した化合物等、薬理評価を比較するための約 30 種の関連化合物も合成した。なお、ベンジリデン部位を変換した誘導体合成の過程で予期せぬ興味深い新奇転位反応が進行することを見出したため、この転位反応についても別途研究を展開した。これについては 4 - (3) にて後述する。

(2) 各種薬理活性試験の結果

まず、合成した全ての化合物について抗トリコモナス活性試験を実施し、最小発育阻止濃度 (MIC) を調べた。また、MIC = 40 μM よりも高活性な誘導体については IC₅₀ 値も算出した。その結果、既存薬メトロニダゾール (MIC = 10 μM , IC₅₀ = 5.2 μM) には及ばないものの、その半程度程度の活性を有する化合物として 4-iodo-BNTX (MIC = 20 μM , IC₅₀ = 10.5 μM) を見出すことに成功した (Fig. 3a)。



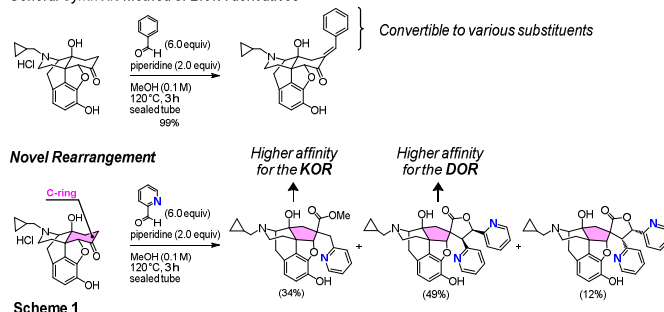
一方、ベンジリデン部位の置換基を種々検討した結果、共役二重結合部位の反応性を低下させるような高高い置換基を有する誘導体は、抗トリコモナス活性が著しく低下する傾向があった (Fig. 3b)。また、それらのオピオイド受容体への結合親和性についても評価・比較を行ったところ、BNTX 誘導体の抗トリコモナス活性は、MOR、DOR、KOR、いずれのオピオイド受容体との親和性とも相関が見られないことが分かった。本研究と関連の深い研究、「BNTX 誘導体による薬剤耐性マラリアの耐性解除活性 (Miyata, Y. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4710. Miyata, Y. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5174.)」においては、研究背景に記述した要因 ①と②が複合的に関与していると考察されていたが、本研究結果は、抗トリコモナス活性においては要因②は関与せず、要因①のみが関与していることを示唆している。また、各種オピオイドリガンドについても抗トリコモナス活性試験を行った結果、BNTX 誘導体の中心骨格、すなわち、③「モルヒナン骨格自体が活性発現に関与する構造である」という新たな情報も得ることができた。具体的には、同じ DOR 作動薬でもモルヒナン骨格を持たない SNC-80 や、ペプチドリガンド DPDPE、deltorphan II は全く抗トリコモナス活性を示さなかったが、モルヒナン骨格を有する KNT-127 は MIC = 80 μM の活性を示した。また同様に、モルヒナン骨格を有する MOR 拮抗薬ナルトレキソンや β -FNA、KOR 作動薬ナルフラフィン、いずれも MIC = 80 μM の活性を示した。さらに異なるトリコモナス種で活性試験を行った結果、既存薬は *T. vaginalis* にも *T. mobilensis* にも強力な殺活性を示したが、その一方で、BNTX や 4-iodo-BNTX は *T. mobilensis* に対してほとんど活性を示さなかった。これは、BNTX 誘導体の活性発現機序が既存薬とは異なっている可能性を示唆する、大変興味深い結果である。

以上を総括すると、耐性が出ている既存薬とは異なる作用機序の抗トリコモナス薬の開発研究において、チオール基を捕捉するような共役二重結合等の官能基を有するモルヒナン分子は、非常に有用なリード化合物として期待できる。

(3) 新奇転位反応の発見と反応機構の解明

BNTX 誘導体合成の過程で、ナルトレキソンと縮合させるアルデヒドとして 2-ピリジンカルボキシアルデヒドを作用させた時のみ、モルヒナン骨格の C 環が 5 員環に縮小する新奇転位反応が進行することを見出した (Scheme 1)。このように C-ノルモルヒナン骨格を市販化合物から 1 工程で誘導できる反応は過去に例が無く、またその転位生成体もオピオイド受容体に対して非常に興味深い活性と選択性を示したため、この反応機構の解明を目的とした研究も実施した。転位反応が進行する基質条件や反応の条件について詳細な検討を行い、さらに反応系中の赤外吸収スペクトルを測定することで、本反応がモルヒナン骨格に特異的な Favorskii 型の転位反応であることを解明した。オピオイド受容体は、モルヒネに代表される鎮痛効果をはじめとして様々な薬理作用に関与することが知られているが、本結果はオピオイド受容体と相互作用するモルヒナン分子の新たな反応知見として今後役立つものである。

General Synthetic Method of BNTX derivatives



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. 沓村憲樹、長瀬博
“モルヒナン骨格の特異な反応とその骨格を利用した活性アルカロイドの合成”
有機合成化学協会誌, **2018**, 76, 914-921.
DOI: 10.5059/yukigoseikyokaishi.76.914
2. Kutsumura, N.; Koyama, Y.; Suzuki, Y.; Tominaga, K.; Yamamoto, N.; Saitoh, T.; Nagumo, Y.; Nagase, H.
“Favorskii-Type Rearrangement of the 4,5-Epoxymorphinan Skeleton”
Organic Letters, **2018**, 20, 1559-1562.
DOI: 10.1021/acs.orglett.8b00288
3. Kutsumura, N.; Koyama, Y.; Nagumo, Y.; Nakajima, R.; Miyata, Y.; Yamamoto, N.; Saitoh, T.; Yoshida, N.; Iwata, S.; Nagase, H.
“Antitrichomonal activity of δ opioid receptor antagonists, 7-benzylidenenaltrexone derivatives”
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2017**, 25, 4375-4383.
DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.026

他 15 件

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 沓村憲樹
“大学における創薬化学を考える”
東京理科大学 卒業研究 C 特別講義、2018 年
2. 前田健汰、大類彩、南雲康行、山本直司、斉藤毅、沓村憲樹、長瀬博
“14-アミノナルトレキソン誘導体の異常転位反応”
第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム、2018 年
3. 大類彩、前田健汰、南雲康行、山本直司、斉藤毅、沓村憲樹、長瀬博
“14-アミノナルトレキソン誘導体の異常転位反応”
第 48 回複素環化学討論会、2018 年
4. 小山恭章、沓村憲樹、鈴木優子、富永健一、山本直司、斉藤毅、南雲康行、長瀬博
“4,5-エポキシモルヒナンにおける Favorskii 型転位反応の研究”
第 48 回複素環化学討論会、2018 年
5. 宮田善之、吉田菜穂子、長瀬博、藤井秀明、沓村憲樹、永富良一、仲村健二郎、馬島敏郎
“クロロキン耐性マラリアに対する耐性克服剤としての BNTX”
第 72 回日本体力医学会大会、2017 年
6. 鈴木優子、沓村憲樹、小山恭章、南雲康行、斉藤毅、山本直司、長瀬博
“BNTX 誘導体合成における新奇転位反応の発見とその反応機構の解明”
第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017 年

他 14 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 長瀬博、沓村憲樹
“第 20 章 オピオイドのドラッグデザインと医薬品開発” (pp. 403-419)
アルカロイドの科学 ~ 生物活性を生み出す物質の探索から創薬の実際まで ~
化学同人 (高山廣光 編) 2017 年 8 月 10 日発行 (ISBN: 9784759814187)

他 1 件

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構 (WPI-IIIS)

長瀬研究室 (創薬化学)

<http://nagase.wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/>

6 . 研究組織

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。