

題 目 「オレキシシン 2 受容体選択的作動薬の設計・合成」

1. 背景・目的

オレキシシンはオレキシシン A (OXA) およびオレキシシン B (OXB)、あるいはヒポクレチン 1 およびヒポクレチン 2 として知られており、視床下部外側野とその周辺の特定のニューロンに発現する内因性神経ペプチドであり、2 つの G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であるオレキシシン 1 受容体 (OX1R) およびオレキシシン 2 受容体 (OX2R) と結合する¹⁾。オレキシシンは共通の前駆体であるプレプロオレキシシン (プレプロヒポクレチンとも呼ばれる) から生成される。プレプロオレキシシンの mRNA は異なるクローニング方法から視床下部外側野において高発現する転写産物として発見された^{2,3)}。OXA は 33 個のアミノ酸からなるペプチドであり、分子内に 2 対のジスルフィド架橋を有し、OX1R と OX2R に同等の活性を持つ。一方、OXB は 28 個のアミノ酸からなる直線型ペプチドであり、OX1R と比較し、10 倍程度高い OX2R 活性を持つ。

オレキシシンの主な生理機能は睡眠と覚醒を制御することである。OX2R 遺伝子を欠損したイヌ⁴⁾とプレプロオレキシシン KO マウス⁵⁾の研究結果から、オレキシシンはカタプレキシーを伴うナルコレプシー (以下、ナルコレプシー／カタプレキシーと略す) と強い関係性があることが示唆されている。ナルコレプシー／カタプレキシーは以下の症状を示す慢性神経疾患である。(1) レム (REM) 睡眠 (rapid eye movement sleep) の異常による日中の耐え難い眠気および睡眠発作、(2) カタプレキシー (情動性脱力発作) を有するレム睡眠関連性疾患、(3) 入眠時幻覚、および (4) 入眠時における麻痺である⁶⁾。マウスのナルコレプシーフェノタイプアッセイ (表現系評価) において、OX1R／OX2R のダブル KO マウスの場合、プレプロオレキシシン KO マウスと同様の重度のナルコレプシー症状を引き起こし、OX2RKO マウスの場合は、中等度のナルコレプシー症状を引き起こすことが見出された⁷⁾。さらに OX1RKO マウスでは睡眠および覚醒に大きな異常が確認されなかった⁸⁾ことから、OX1R より OX2R の方が睡眠・覚醒の制御に主要な役割を担っており、OX2R を介したシグナル伝達がナルコレプシー／カタプレキシーに強く関与することが示唆された。さらに、OX1R 選択的阻害薬は OX2R 選択的阻害薬、あるいは OX1R／OX2R dual 阻害薬と比較し、睡眠の効果が弱いことも OX2R が睡眠・覚醒の制御に対し、特に重要であることを意味している⁹⁾。

ヒトのナルコレプシー／カタプレキシーにおいては、90%以上の患者に髄液中のオレキシシン濃度が著しく低下していることが知られている^{10, 11)}。この現象は視床下部外側野におけるオレキシシンニューロンの欠損に起因する^{12, 13)}ものであり、自己免疫の異常が原因

である可能性が示唆されている¹⁴⁾。これらの報告はヒトのナルコレプシー／カタプレキシーはオレキシン欠損症であり、オレキシシンシグナル伝達（特に **OX2R** シグナル伝達）の補充が治療法として有効であることを支持している。マウスのナルコレプシー／カタプレキシーフェノタイプを用いる実験において、遺伝子置換やオレキシン投与により症状が改善したことから、オレキシンがナルコレプシーの治療に有効であることが確立されたと言える¹⁵⁻¹⁷⁾。しかし、オレキシンはペプチドであり、血液脳関門（Blood-brain barrier）の透過能が非常に低い^{18, 19)}ため、医薬として用いることは困難である。一方、低分子 **OX2R** 作動薬はペプチドであるオレキシンと比べ、中枢移行性が高いことが予期されるため、ナルコレプシー／カタプレキシーだけではなく、日中の耐え難い眠気を伴う他の疾患に対しても、脳室内にオレキシシンを投与した場合と同等の薬理効果を期待できる^{15, 20, 21)}。

上記を踏まえ、当研究チームでは既に低分子 **OX2R** 作動薬の探索を開始し、ヒト **OX2R** 発現 CHO 細胞に対し、化合物ライブラリーによる High throughput screening を実施し（約 250, 000 化合物）、4 個のヒット化合物を見出している。本研究では、4 個のヒット化合物の中で、多くの既存のオレキシン拮抗薬の鍵官能基であるスルホンアミド結合²²⁾に注目した。スルホンアミド基は $\text{SO}_2\text{-N}$ の結合がカルボキシアミド基の CO-N 結合と異なり、回転が可能であり、受容体結合の際に配向に制限が少ないため、高い確率で受容体との結合が可能となる。この仮説に基づき、スルホンアミド基を有する化合物 **1** の構造を基に、高い **OX2R** 作動活性を有する化合物を創出することに着手した。

2. 本論²⁴⁾

2.1. ビフェニルスルホンアミド骨格を有する **OX2R** 作動性化合物 **14** の創出

ヒット化合物 **1** がスルホンアミド基と 2 つの芳香環（A 環、B 環）を持ち、A 環と B 環がリンカーを介し、適切な距離を有している点に着目し、まずリンカーを中心とした構造変換を開始した（図 1）。具体的には、第三級のスルホンアミド（Type I）と第二級のスルホンアミド（Type II）誘導体の合成である。Type I では活性が消失したが、Type II の **2**～**4** に弱い活性があったことから、スルホンアミド基のプロトンが活性に重要であると仮定して、Type II 化合物の最適化を進めた。その結果、1,2-フェニレンジアミン構造を有する **4** に活性が発現し、さらに、1,2-フェニレンジアミン構造の位置異性体である **5** および **6** は活性が向上し、NFAT-ルシフェラーゼアッセイのみならず、カルシウムアッセイにおいても活性が認められた。このことはリガンドが GPCR である **OX2R** に結合することで、**OX2R** に共役する Gq/11 α サブユニットがエフェクターを介して細胞内シグナル（IP₃ 上昇：カルシウムアッセイにより検証）を誘導する。続いて種々の転写因子を活性化し、レポーター遺伝子の発現（NFAT-ルシフェラーゼアッセイにより検証）を誘導することを示唆する²³⁾。そこでこれらのアッセイ系で最も活性の高い **5** をリード化合物と定め、さらなる活性の向上を目指すこととした。

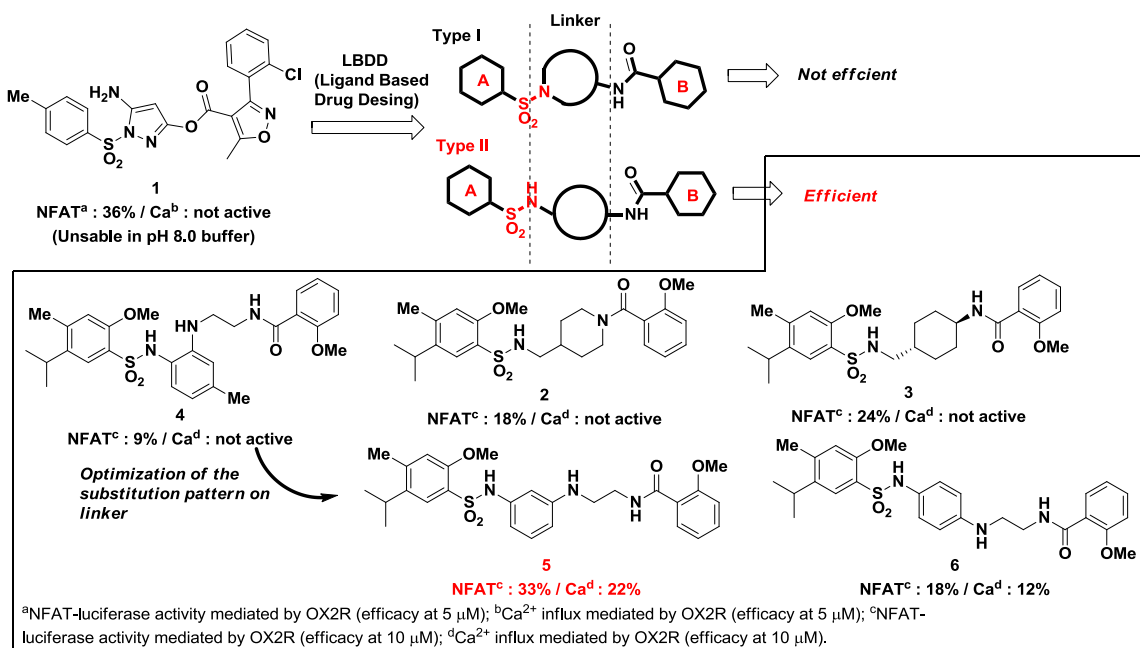


図 1 リード化合物 **5** の創出過程

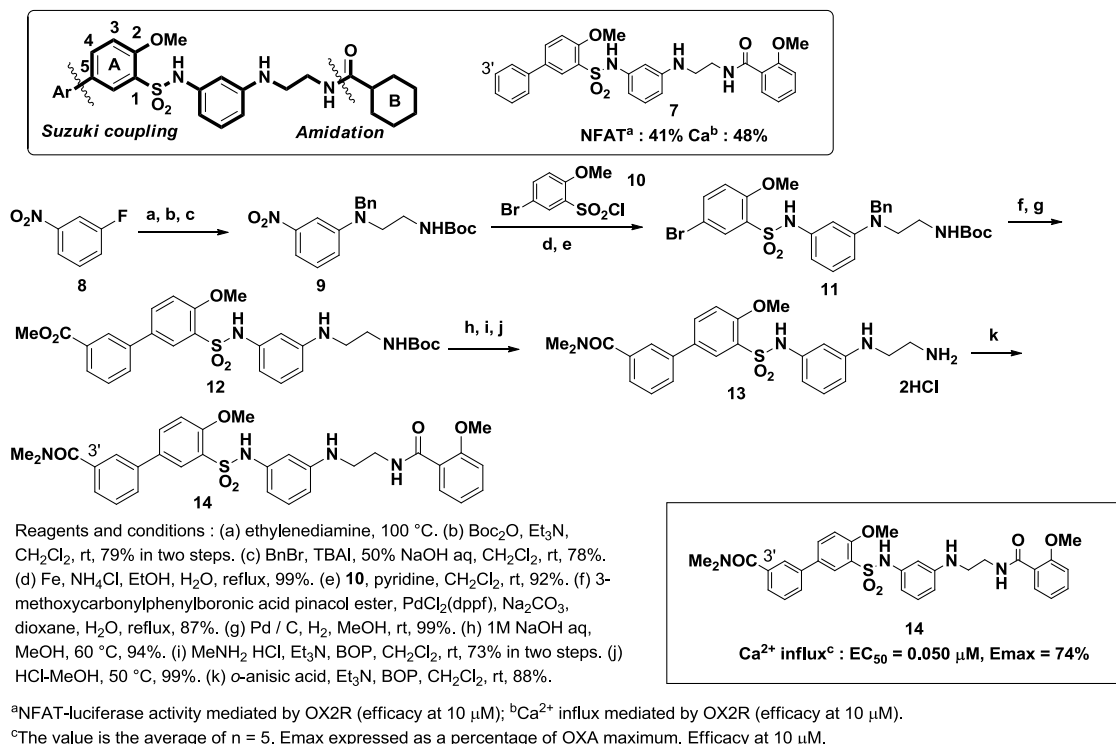


図 2 高い OX2R 作動性活性を有する **14** の合成スキーム

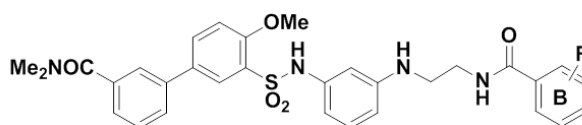
ヒット化合物 **5** のイソプロピル基 (A 環の 5 位) をベンゼン環に置換し、4 位のメチル基を除去した **7** の活性が飛躍的に向上したため、A 環部位をビフェニル基に固定し 5 位の Ar 上の置換基を検討することとした。その結果、特に 3' 位に置換基を有する化合物群において NFAT-ルシフェラーゼアッセイおよびカルシウムアッセイの両方で活性の向上が認められるようになった (図 2)。種々検討の結果、3'位にジメチルカルバモイル基を有する **14** ($EC_{50} = 0.050 \mu M$, $E_{max} = 74\%$) を見出した。これらの誘導体の合成方法を図 2 に示す (代表例として **14** の合成法を掲載)。短段階で容易に種々の化合物を合成するため、中間体 **11** を様々な化合物に誘導化するための拠点とし、汎用性の高い鈴木カップリング反応を行い、続いて脱保護後、アミド化することにより種々の化合物を合成した。

2.2. OX2R 選択的作動薬 **19** および **22** (YNT-185) の創出

前節で述べたように 3'位のジメチルカルバモイル誘導体 **14** に飛躍的活性が向上したため、以後は、3'位はジメチルカルバモイル基に固定して、B 環の置換基を検討した。

表 1 に **14** の B 環上置換基変換の結果得られた活性比較を示す。上述の合成法 (図 2) に従い、中間体 **13** から一段階 (アミド化) で種々の化合物を合成した。化合物 **14** の B 環からメトキシ基を除去した **15** は活性が消失したため、B 環上の置換基の必要性が予想された。そこで、次に、B 環におけるメトキシ基の置換位置を検討した。3 位にメトキシ基を導入した場合、活性 (potency) が僅かに向上し、 E_{max} が低下した (**16**, $EC_{50} = 0.033 \mu M$, $E_{max} = 54\%$) が、4 位に導入した場合、 E_{max} は向上したが、活性が大きく低下した (**17**, $EC_{50} = 1.047 \mu M$, $E_{max} = 94\%$)。次に B 環上の 2 位および 3 位での他の置換基変換を検討した。その結果、B 環の 3 位にメチル基を導入した場合、高い活性および高い E_{max} が認められた (**19**, $EC_{50} = 0.023 \mu M$, $E_{max} = 98\%$)。表 1 に示す化合物中、**14**, **16**, **19**, および **20** は高い活性を有するだけでなく、OX1R と比較し、70 倍以上の高い OX2R 選択性を示した。中でも、**19** は最も活性が高く、かつ OX2R 選択的な完全作動性を有していた。

Ca²⁺ influx^a



compd	R	OX2R		OX1R		selectivity
		EC ₅₀ (μM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (%)	OX1R/OX2R ^e
15	H	> 10	ND ^b	NT ^c	NT ^c	NC ^d
14	2-OMe	0.050	74	5.227	46	105
16	3-OMe	0.033	54	9.248	49	280
17	4-OMe	1.047	94	NT ^c	NT ^c	NC ^d
18	2-Me	0.800	85	NT ^c	NT ^c	NC ^d
19	3-Me	0.023	98	1.616	100	70
20	2-Cl	0.031	90	6.134	50	198
21	3-Cl	0.094	78	5.720	73	60

^aThe value is the average of n = 5. OXA EC₅₀(OX1R) = 1.5 nM. EC₅₀(OX2R) = 1.0 nM. E_{max} expressed as a percentage of OXA maximum. ^bND = not detected. ^cNT = not tested. ^dNC = not calculated. ^eEC₅₀(OX1R) / EC₅₀(OX2R).

表 1 化合物 **14** の B 環の置換基変換と活性変化

19 は *in vivo* 活性を検討する上で十分な活性を有すると考え、野生マウスおよび OX1R / OX2R ダブル KO マウスを用いる睡眠・覚醒試験 (*in vivo* 試験) を試みた。しかし、**19** は難水溶性であったため、モデル動物への投与が不可能であった。種々、可溶化の検討を行った結果、**19** と同等の活性ポテンシャルを持ち、且つ塩化することで水溶性が向上した **22** (YNT-185) が得られた。そこで、この **22** 用いて *in vivo* 試験を実施した。その結果、用量依存的に覚醒効果があり、さらに 260 nM の **22** を脳室内投与した場合、53 分の起床時間の増加を確認できた。このことは 3.0 nM のオレキシン A を投与した場合とほぼ同等の起床時間の増加(58 分)¹⁶⁾であり、低分子 OX2R 作動薬が内因性ペプチドであるオレキシンと同様の薬効ポテンシャルを有する可能性があることを示唆する。なお、この覚醒効果は腹腔内投与でも得られており、**22** は血液能関門の透過が可能であることも確認している。しかし、この詳細は柳沢教授の今後の発表のため今回は割愛する。

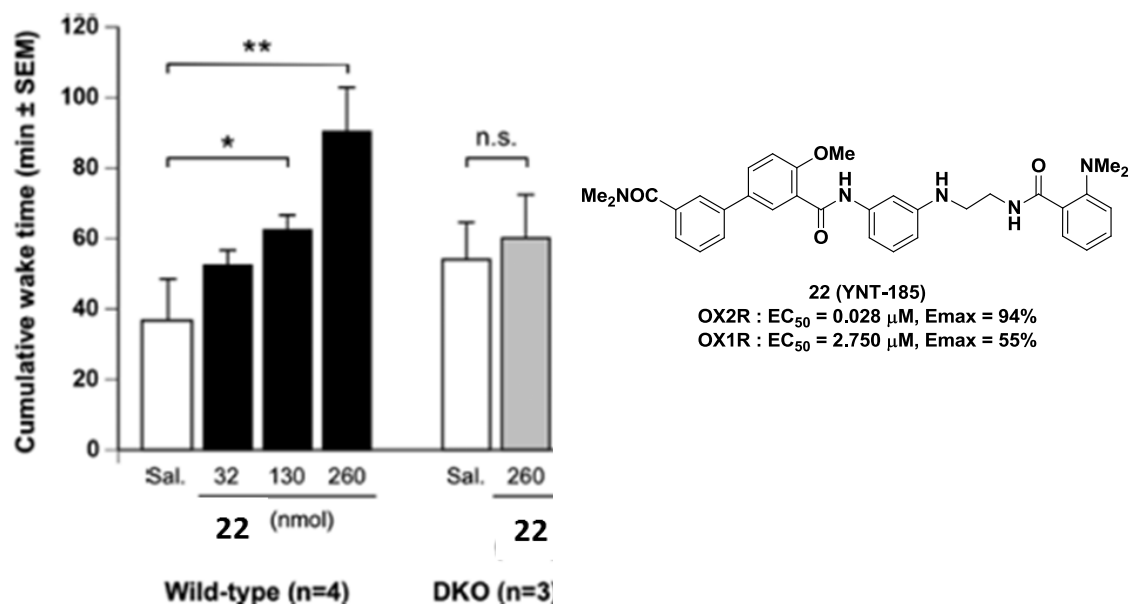


図 3 化合物 22 (YNT-185)の脳室内投与によるマウス睡眠・覚醒試験結果

2.3. Docking study による構造活性相関の考察

最近、dual OX1R/OX2R 阻害薬である Suvorexant とヒト OX2R の共結晶 X 線構造解析により、ヒト OX2R の構造が解明された²⁵⁾。そこでこの X 線結晶構造を用い、19 と OX2R の Docking study を行った。図 4 左図のように、19 は OX2R の結合部位に位置し、ジメチルカルバモイル基と N324 (transmembrane helix 5, TM5) が水素結合し、19 のエチレンジアミン部位の窒素と C210 (TM3) も水素結合している。さらに、19 のビフェニル部分構造は OX2R が形成する疎水性ポケットに収まっていることが示された。

次に OX2R に結合する Suvorexant と 19 の重ね合わせを行った (図 4 右図)。以前の報告²³⁾にあるように、Suvorexant は蹄鉄のように OX2R の結合部位に位置し、7 員環構造が OX2R の TM5 および TM6 方面に立体的に張り出している。一方、19 は TM5 および TM6 方面には伸張しておらず、その周辺にある程度の空間が認知できる。これらのことにより、OX2R に化合物が結合し、併せてこの空間に TM5 および TM6 が可動する場合、作動性が認められ (アゴニスト)、可動が阻害される場合、拮抗活性が認められる (アンタゴニスト) ことが推察される。

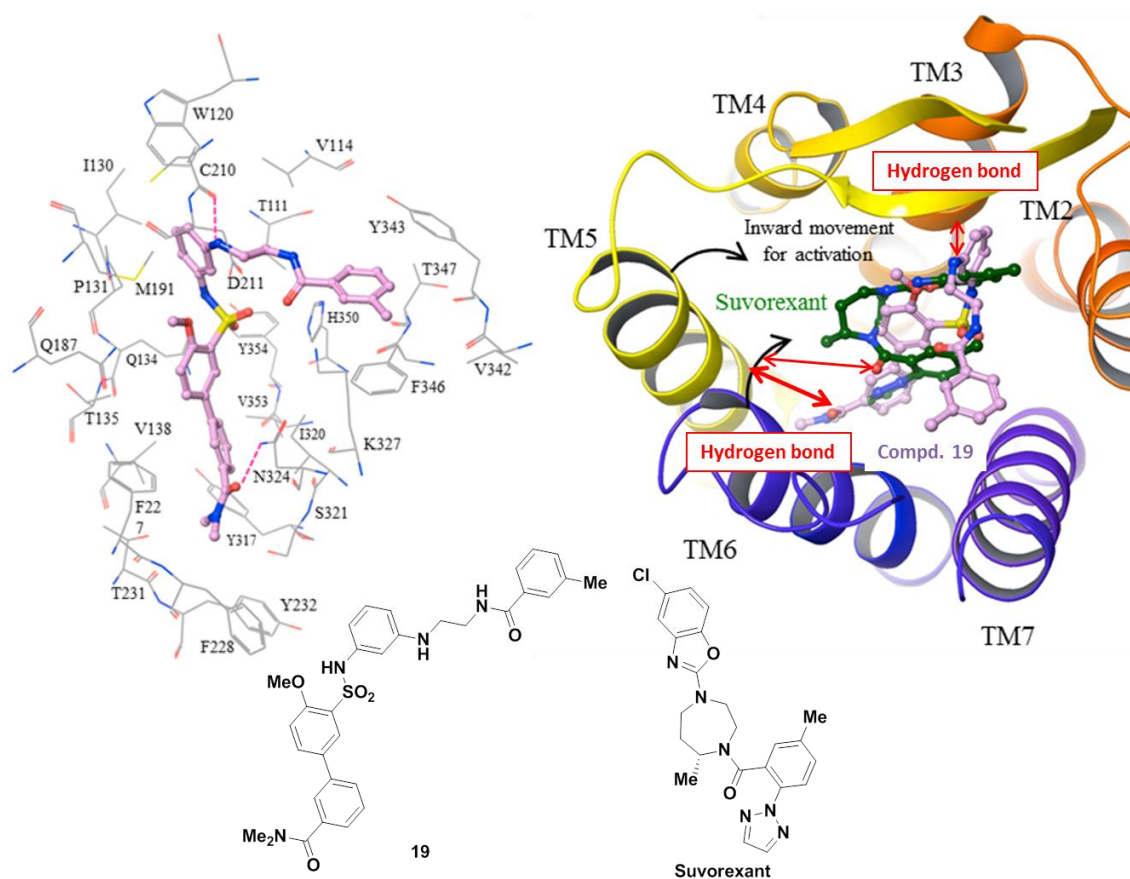


図4 化合物 **19** と OX2R の Docking study 結果 (左図)、
および化合物 **19** と Suvorexant との重ね合わせモデル (右図)

19 のスルホンアミド基の役割を検討するため、**19** のスルホンアミド基をカルボキシアミド基へ変換したところ、活性が完全に消失した (**23**, OX2R、OX1R 共に not active, 図 5)。このことから、当初から注目していたスルホンアミド基もまた活性にとって非常に重要な官能基の一つであることが明らかとなった。このことは上記 Docking study によっても支持される。すなわち、Docking study (図 4 左図) では **19** が OX2R と結合する際に、スルホンアミド基の周りで屈折した配座をとっており、この配座が結合に最適配座と考えられる。しかし、この屈折配座は **23** ではアミド共役のためアミド結合の周りの回転が制限され、スルホンアミド基の場合のような屈折配座が困難となり、OX2R の活性ポケットに適合できないと考えられる。この議論は OX2R とスルホンアミド **19** の結合エネルギーがカルボキシアミド誘導体 **23** と比較して 6.10 kcal/mol 低いことでも支持される。²⁴⁾

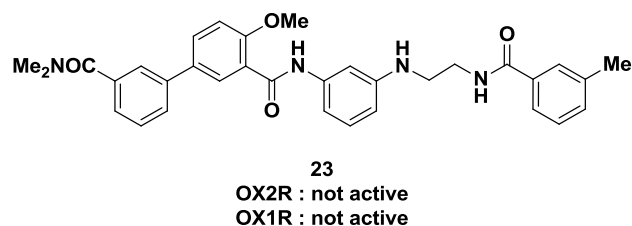


図 5 アミド誘導体 23

3. 総括

本研究においては、4 個のヒット化合物の中のスルホンアミド基を有する化合物 **1** に注目し、1, 000 以上の化合物を合成した。合成した化合物をヒト OX2R 発現 CHO 細胞に対し、NFAT-ルシフェラーゼアッセイおよびカルシウムアッセイを実施し、スルホンアミド骨格を有するリード化合物 **5** を見出した。この化合物の A, B 環を化学修飾した。その結果、世界で初めて最も活性が高く、かつ OX2R 選択的な完全作動性を示す低分子化合物 **19** を創出した。さらに *in vivo* 活性の検討のため **19** と同等の活性ポテンシャルを持ち、且つ塩化することで水溶性が向上した **22** (YNR-185) に導き、*in vivo* 試験を実施したところ、有意な覚醒効果を確認できた。以上の結果は今後の低分子オレキシン作動薬ばかりでなくオレキシン受容体全体の研究に対し、多大な影響を与えることが期待される。

References

- 1) Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R. M.; Tanaka, H.; Williams, S. C.; Richardson, J. A.; Kozlowski, G. P.; Wilson, S.; Arch, J. R.; Buckingham, R. E.; Haynes, A. C.; Carr, S. A.; Annan, R. S.; McNulty, D. E.; Liu, W. S.; Terrett, J. A.; Elshourbagy, N. A.; Bergsma, D. J.; Yanagisawa, M. *Cell* **1998**, *92*, 573.
- 2) de Lecea, L.; Kilduff, T. S.; Peyron, C.; Gao, X.; Foye, P. E.; Danielson, P. E.; Fukuhara, C.; Battenberg, E. L.; Gautvik, V. T.; Bartlett, F. S., 2nd; Frankel, W. N.; van den Pol, A. N.; Bloom, F. E.; Gautvik, K. M.; Sutcliffe, J. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 322.
- 3) Sakurai, T. Orexin and orexin receptors. In *Hypocretins: Integrators of Physiological Functions*; de Lecea, L., Sutcliffe, J. G., Eds.; *Springer: New York*, **2005**; pp 13.
- 4) Lin, L.; Faraco, F.; Li, R.; Kadotani, H.; Rogers, W.; Lin, X.; Qiu, X.; de Jong, P. J.; Nishino, S.; Mignot, E. *Cell* **1999**, *98*, 365.
- 5) Chemelli, R. M.; Willie, J. T.; Sinton, C. M.; Elmquist, J. K.; Scammell, T.; Lee, C.; Richardson, J. A.; Williams, S. C.; Xiong, Y.; Kisanuki, Y.; Fitch, T. E.; Nakazato, M.; Hammer, R. E.; Saper, C. B.; Yanagisawa, M. *Cell* **1999**, *98*, 437.

- 6) Dauvilliers, Y.; Arnulf, I.; Mignot, E. *Lancet* **2007**, *369*, 499.
- 7) Willie, J. T.; Chemelli, R. M.; Sinton, C. M.; Tokita, S.; Williams, S. C.; Kisanuki, Y. Y.; Marcus, J. N.; Lee, C.; Elmquist, J. K.; Kohlmeier, K. A.; Leonard, C. S.; Richardson, J. A.; Hammer, R. E.; Yanagisawa, M. *Neuron* **2003**, *38*, 715.
- 8) Hasegawa, E.; Yanagisawa, M.; Sakurai, T.; Mieda, M. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 604.
- 9) (a) Boss, C.; Roch, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2875. (b) Lebold, T. P.; Bonaventure, P.; Shireman, B. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4761. (c) Boss, C.; Brisbare-Roch, C.; Jenck, F. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 891.
- 10) Nishino, S.; Ripley, B.; Overeem, S.; Lammers, G. J.; Mignot, E. *Lancet* **2000**, *355*, 39.
- 11) Kubota, H.; Kanbayashi, T.; Tanabe, Y.; Ito, M.; Takanashi, J.; Kohno, Y.; Shimizu, T. *Sleep* **2003**, *26*, 555.
- 12) Peyron, C.; Faraco, J.; Rogers, W.; Ripley, B.; Overeem, S.; Charnay, Y.; Nevsimalova, S.; Aldrich, M.; Reynolds, D.; Albin, R.; Li, R.; Hungs, M.; Pedrazzoli, M.; Padigar, M.; Kucherlapati, M.; Fan, J.; Maki, R.; Lammers, G. J.; Bouras, C.; Kucherlapati, R.; Nishino, S.; Mignot, E. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 991.
- 13) Thannickal, T. C.; Moore, R. Y.; Nienhuis, R.; Ramanathan, L.; Gulyani, S.; Aldrich, M.; Cornford, M.; Siegel, J. M. *Neuron* **2000**, *27*, 469.
- 14) Mahlios, J.; De la Herrán-Arita, A. K.; Mignot, E. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2013**, *23*, 767.
- 15) Mieda, M.; Willie, J. T.; Hara, J.; Sinton, C. M.; Sakurai, T.; Yanagisawa, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 4649.
- 16) Liu, M.; Thankachan, S.; Kaur, S.; Begum, S.; Blanco-Centurion, C.; Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Neve, R.; Shiromani, P. J. *Eur. J. Neurosci.* **2008**, *28*, 1382.
- 17) Blanco-Centurion, C.; Liu, M.; Konadhode, R.; Pelluru, D.; Shiromani, P. J. *Sleep* **2013**, *36*, 31.
- 18) Kastin, A. J.; Akerstrom, V. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 219.
- 19) Fujiki, N.; Yoshida, Y.; Ripley, B.; Mignot, E.; Nishino, S. *Sleep* **2003**, *26*, 953.
- 20) Vogel, V.; Sanchez, C.; Jennum, P. *J. Neurosci. Methods* **2002**, *118*, 89.
- 21) Mieda, M.; Hasegawa, E.; Kisanuki, Y. Y.; Sinton, C. M.; Yanagisawa, M.; Sakurai, T. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 6518.
- 22) Aissaoui, H.; Koberstein, R.; Zumbunn, C.; Gatfield, J.; Brisbare-Roch, C.; Jenck, F.; Treiber, A.; Boss, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5729.
- 23) (a) Violin, J. D.; Crombie, A. L.; Soergel, D. G.; Lark, M. W. *Trends Pharmacol Sci.* **2014**, *35*, 434. (b) DeWire, S. M.; Ahn, S.; Lefkowitz, R. J.; Sheno, S.K. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*, 483.

- 24) Nagahara, T.; Saitoh, T.; Kutsumura, N.; Irukayama-Tomobe, Y.; Ogawa, Y.; Kuroda, D.; Gouda, H.; Kumagai, H.; Fujii, H.; Yanagisawa, M.; Nagase, H. *J. Med. Chem.* **2015**, *in press*. (DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00988)
- 25) Yin, J.; Mobarec, J. C.; Kolb, P.; Rosenbaum, D. M. *Nature* **2015**, *519*, 247.