

令和元年6月20日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20037

研究課題名(和文) 磁性ビーズを用いたアセトアミノフェンの鎮痛機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the new target proteins of acetaminophen using high-performance magnetic nano beads

研究代表者

清澤 研吉 (Kenkichi, Kiyosawa)

信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用)

研究者番号：50624772

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)：アセトアミノフェンは副作用の少ない解熱鎮痛薬として使用されている薬剤である。しかしその作用機序は未だに不明である。そこでアセトアミノフェンの薬剤標的タンパクを網羅的に探索し作用機序解明を目指した。アセトアミノフェン合成物とHeLa細胞破碎液を結合反応させ、磁性分離によりタンパクを抽出しアセトアミノフェンと結合するタンパクを同定した。得られた標的タンパクは体温の恒常性に関与するGSK-3であった。そこで発熱モデルを用いてアセトアミノフェンの解熱効果を確認した結果、アセトアミノフェンはGSK-3を抑制することで解熱作用を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アセトアミノフェンの作用機序を解明するためにアセトアミノフェンが結合する標的タンパクを同定した結果、体温の恒常性に関与するGSK-3が同定された。アセトアミノフェンが有する解熱効果の一部はGSK-3の阻害作用によるものである可能性が示唆された。本研究結果からGSK-3を阻害することで新たな解熱薬が開発される可能性があるといえる。

研究成果の概要(英文)：Paracetamol (PARA) is an antipyretic and analgesic medicine widely used in many countries. However, the precise molecular targets of PARA and the mechanisms of antipyretic and analgesic effects by PARA have not been fully clarified yet. The PARA-compound and HeLa cell lysate were bound and reacted. A band of the proteins bound to PARA-immobilized beads was GSK-3, which is involved in body temperature homeostasis. The protein was stained with the antibody of GSK-3 by Western Blotting. Luminescent signals, which is correlated with the amount of GSK-3 activity, significantly decreased with increasing dose of PARA. These results indicate that PARA binds GSK-3 and inhibits its activity at clinically relevant concentrations.

研究分野：麻酔

キーワード：アセトアミノフェン 解熱

1. 研究開始当初の背景

(1) アセトアミノフェンは副作用や相互作用が少ない鎮痛薬として知られている。周術期のみならず緩和医療、ペインクリニックなど様々な場面で広く使用されており、多角的鎮痛の重要な役割を担っている。これまでの報告では、アセトアミノフェンは肝臓で代謝されると **p-アミノフェノール** となり、中枢神経においてアラキドン酸と結合し **AM404** へと代謝される。この代謝産物にも鎮痛効果があることが知られている (**Christophe Mallet et al., Pain, 2008**)。この代謝産物の鎮痛メカニズムとして、

中枢でのシクロオキシゲナーゼ(COX)の阻害 (**Vane et al., Nature New Biology, 1971**)

iNOS の抑制 (**Godfrey et al., European Journal of Pharmacology, 2000**)

カンナビノイド受容体の活性化 (**Hogestatt et al., Journal of Biological Chemistry, 2005**)

5HT 受容体の活性化(**Pini et al., European Journal of Pharmacology, 1996**)

が関与していると考えられている。しかし、アセトアミノフェンの詳細な作用機序については、いまだ明らかになっていない。

(2) 機能性ナノ磁性微粒子を用いた薬剤の標的となるタンパクを同定する手法が開発されたことで、様々な領域で薬剤の標的となるタンパク質が同定されるようになった。その結果、薬剤の作用や副作用のメカニズムを明らかにすることができるようになった。この方法を用いてアセトアミノフェンのターゲットタンパクを同定することができれば、従来の消炎鎮痛剤のような副作用を持たない新たな鎮痛薬の開発ができるようになる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

(1) アセトアミノフェンは古くから様々な場面で使用されてきた解熱鎮痛薬である。にもかかわらず、アセトアミノフェンの鎮痛作用のメカニズムは解明できていない。過去の報告では、受容体拮抗薬や酵素阻害薬を投与することで、アセトアミノフェンの持つ鎮痛効果の減弱を評価することで鎮痛メカニズムの解明が試みられてきた。しかし、このような方法ではアセトアミノフェンの作用起点や、どのような経路を介して鎮痛作用を発揮しているかを明らかにすることは出来なかった。

(2) アセトアミノフェンも他の薬剤と同様にタンパク(受容体、酵素)に結合することでその鎮痛効果を発揮すると考えた。しかし、アセトアミノフェンのターゲットとなるタンパクは多岐にわたることが予想され、従来の方法では標的タンパクを明らかにすることが困難であった。このような薬剤の作用メカニズムを明らかにするためには薬剤が作用しうるタンパクを網羅的に探索する手法が必要であった。そのような中で、機能性ナノ磁性微粒子(図1)を用いて薬剤標的タンパクを網羅的に探索することが可能となり、さまざまな薬剤の作用機序が明らかとなってきた。本研究の目的はこの手法を用いて、

アセトアミノフェンの標的タンパクを明らかにする

アセトアミノフェンの鎮痛メカニズムを明らかにする

新たな鎮痛薬の開発を目指す

ことである。

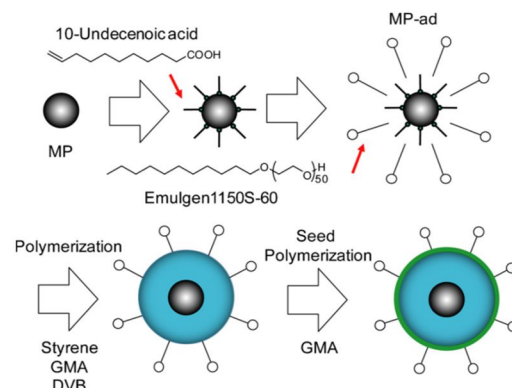


図1. 機能性ナノ磁性微粒子

3. 研究の方法

アセトアミノフェンの非活性化部位に磁性ビーズを固定化した化合物 (Acet-1) を合成し、アセトアミノフェンと細胞タンパクとのアフィニティ精製に用いた。手術後痛モデルラットを用いてこの化合物がアセトアミノフェンと同様の鎮痛効果を有することを確認した。

神経細胞株を破碎した細胞破碎液とリガンド固定化ビーズ (Acet-1) を混合し結合反応させた。混合液の磁性分離を行いバッファーによる塩溶出、加熱処理による加熱溶出を行い、溶出サンプルを電気泳動し単離されたタンパクの解析を行った。抽出されたタンパクの中からより特異的にリガンドと結合しているタンパクを絞り込み、LC / MS / MS分析にかけてタンパク質を検索し候補タンパク質をタンパク質データベースと照らし合わせ同定した。得られた標的タンパクは体温の恒常性に関与するタンパクキナーゼであることが判明した。アセトアミノフェンのタンパクキナーゼへの影響はATP測定法によるキナーゼアッセイを用いて評価した。体温調節に関する実験を行うため、イースト菌を用いて発熱モデルのラットを作成し、アセトアミノフェンと阻害薬を用いて直腸温による体温変化を調査した。

4. 研究成果

細胞破碎液を用いた実験から、アセトアミノフェンと結合するタンパクはGSK-3 であることが判明した。そこでATP測定法によるGSK-3 キナーゼアッセイを行ったところ、アセトアミノフェンは用量依存性にGSK-3 活性を抑制することが判明した。そこでイースト菌を用いて発熱モデルを作成し、GSK-3 活性化薬単剤投与群、GSK-3 活性化薬 + アセトアミノフェン投与群、アセトアミノフェン単剤投与群、生食 (Control) 群にわけそれぞれの薬剤を投与したところ、アセトアミノフェン単剤投与群では解熱効果が見られたのに対し、GSK-3 活性化薬 + アセトアミノフェン投与群で解熱効果が減弱した。アセトアミノフェンにおける解熱作用の一部にGSK-3 の抑制を介した作用が関係していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Ryusuke Tanaka, M.D., Satoshi Tanaka, M.D., Ph. D., Kenkichi Kiyosawa, M.D., Mikito Kawamata, M.D Identification of Glycogen Synthase Kinase-3 as a potential target molecule of paracetamol by using magnetic nano beads. Euroanesthesia 2019.Vienna, Austria

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：川真田 樹人
ローマ字氏名：Mikito Kawamata

研究協力者氏名：半田 宏
ローマ字氏名：Hiroshi Handa

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。