

令和元年9月2日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08334

研究課題名(和文) TRPチャンネル拮抗作用を併せ持つ非ステロイド性消炎鎮痛薬の創薬研究

研究課題名(英文) Development of non-steroidal anti-inflammatory analgesics which have TRP channel antagonism effect

研究代表者

山川 直樹 (Yamakawa, Naoki)

就実大学・薬学部・准教授

研究者番号：20583040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非ステロイド性抗炎症薬がTRPチャンネルへ関与するという新たな仮説を検証し、新しいタイプの鎮痛薬の創製について、その可能性を探求することを目的とした。化合物の鎮痛効果はラット疼痛モデルを用いて実施し、TRPチャンネルに対する直接作用は、電気生理学的手法を用いて解析を行った。既存薬NSAIDsの芳香環を修飾したいくつかの誘導体は、非炎症性と炎症性の両方の疼痛を有意に抑制し、これらのリガンドはTRPAまたはTRPVのファミリーに属するイオンチャンネルを作動させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鎮痛薬は日常生活のみならず、歯科治療後の痛みや外科手術後の疼痛、さらには緩和医療に至るまで様々な局面で使用される。本研究は、NSAIDのイオンチャンネルとの関わりを解明し、強力かつ即効性のある新しいタイプの鎮痛薬の合成を目指す研究である。研究期間内に得られた成果は、NSAIDが新たな標的(TRPチャンネル)を介して疼痛作用をもたらすといった学術的に興味深い知見であり、医薬品開発に直結する点においても社会的貢献性が極めて高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to search the NSAIDs involved in the activation of the TRP channel and to investigate the possibility about the creation of a new type of analgesics. The analgesic effect by test compound was carried out using a rat pain models, and the direct action against the TRP channel was analyzed using electrophysiological technique. Several derivatives which modified an aromatic ring of known NSAIDs inhibit significantly both non-inflammatory and inflammatory pain. The result suggested that these ligands activate the ion channels which belong to TRPA or TRPV family.

研究分野：医歯薬学

キーワード：医薬品探索

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 痛みとイオンチャネル

痛みは、侵害受容器（一次感覚細胞）が外界からの侵害刺激を受けることにより発生し、電気信号として脊髄から視床を経て大脳皮質へ伝達される。近年、この侵害受容器にイオンチャネル（イオンを透過させる役割を持つ膜タンパク質）が深く関与していることが明らかとなり、新しいタイプの鎮痛薬を創製する上でのターゲット分子として注目されている。

(2) TRP チャネル

TRP (transient receptor potential) チャネルは、化学物質刺激や物理刺激（温度、pH、浸透圧）に応答するイオンチャネルとして知られ、全ての真核生物で発現している。TRP チャネルは、特に痛みの受容器として働くことから、鎮痛薬の新しい創薬ターゲットとして注目されている。TRP チャネルは感覚神経に特異的に発現しており、ヒトでは TRPV、TRPC、TRPM、TRPA、TRPP、TRPML の 6 つのサブファミリーに分類されている（28 種類の遺伝子が同定されている）。とりわけ、TRPV や TRPA ファミリーに属するチャネルは、刺激性の化学物質（マスタードの成分であるイソチオシアン酸アリルなど）の他、炎症時に産生される化学物質（過酸化水素やアルデヒドなど）に対して応答することが知られている。

一方、TRP チャネルは化学物質の結合に伴い、構造変化を起こすことが知られている。また、TRP チャネルは、細胞内外の物理的環境変化（温度や圧力）を感知するセンサーとしても働いている。しかしながら、代表的なサブタイプに対するいくつかの活性調節因子が見つかったものの、どのような化学構造や官能基を有する化学物質が、あるいは細胞内外の物理的環境要因が、どのような機構で TRP チャネルを開口させるのかは明らかではない。

(3) NSAIDs の鎮痛作用

アスピリンやインドメタシンに代表される非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）は優れた消炎鎮痛薬であり、世界中で最もよく処方されている医薬品の一つである。NSAIDs はシクロオキシゲナーゼ（COX）という酵素の阻害剤であり、この作用により抗炎症作用を示す（COX 依存に合成されるプロスタグランジン（PG）は炎症増悪因子である）。また、末梢組織に炎症が起こると、炎症性細胞（炎症部位に浸潤してきた好中球、マクロファージ、肥満細胞など）からブラジキニン（BK）などの内因性発痛物質が産生され、PG による痛みがさらに増強される。NSAIDs はこの PG や BK の産生を抑制することで鎮痛効果を発揮する。しかしながら、NSAIDs による鎮痛効果はオピオイド（モルヒネやコデインなどの痛覚伝導経路を直接遮断する物質）よりも弱い。

(4) NSAIDs の副作用問題

COX には二つのサブタイプ（COX-1/COX-2）が存在し、胃粘膜では主に COX-1 が、炎症部位では主に COX-2 が発現していることが知られている。従って、COX-2 に選択性を持たない一般的な NSAIDs の場合には、COX-2 阻害に伴って抗炎症作用を示すと同時に、COX-1 阻害による胃潰瘍などの消化管潰瘍（NSAID 潰瘍）を引き起こす。

一方、セレコキシブなどの胃潰瘍副作用の少ない COX-2 選択的 NSAIDs は、COX-1 由来のトロンボキサン A₂ 産生機能（血小板凝集作用）を維持したまま、COX-2 由来のプロスタサイクリン産生機能（血小板凝集抑制作用）を一方向的に阻害するため、血圧上昇や血栓形成などの心血管イベントリスクを増大させる。そのため、高血圧や心筋梗塞など心血管系にリスクファクターを有する患者への COX-2 選択的 NSAIDs の投与は慎重を要する。

2. 研究の目的

本研究では、(1) NSAIDs の鎮痛効果に着目し、NSAIDs が TRP チャネルへ関与するという新たな仮説を検証する。(2) (1)で得られた化合物と同定した TRP チャネルに対する構造活性相関を解明する。(3) 膜傷害性が弱く（胃潰瘍副作用を起こしにくい）、COX-2 に非選択的（心血管イベントリスクを増大させない）であり、かつ TRP チャネルに作用する化合物の化学構造を推測・設計・合成し、NSAIDs を基盤とする新しいタイプの鎮痛薬の創製について、その可能性を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) NSAIDs ライブラリーの構築

NSAIDs はいくつの特徴的な化学構造の骨格に基づき分類されるが、作用時間の短いものから長いもの、消炎・解熱・鎮痛作用のバランス、COX に対する親和性と選択性、血中半減期の長いものや短いものなど、NSAIDs の薬理作用の程度は様々である。そこで本研究では、まず国内外で市販されている既存薬 NSAIDs のライブラリーを構築した。その際、原薬が入手不可能な化合物については、入手可能な原料を用いて有機合成を行った。

(2) 鎮痛作用の網羅的解析

次に、(1)で構築した NSAIDs ライブラリーを用い、小動物（ラット）を用いた鎮痛効果の検討を行った。具体的には、炎症性の疼痛モデル（ホルマリン試験、アジュバントモデル、カラゲニンモデル）と非炎症性の疼痛モデル（Randall Selitto 法、Tail pinch 法）のラットを作

成し、NSAIDs がもたらす鎮痛効果について網羅的な解析を行った。その際、特に侵害受容性疼痛に対して抑制作用を示すものを重要視し、TRP チャンネルへの関与について可能性が高い化合物として、(3)の研究対象とした。

(3) 電気生理学的測定

一般に、細胞膜に発現しているイオンチャンネルの活性を調べる方法として、パッチクランプ法（イオンチャンネルの挙動を調べるための電気生理学的な手法）が知られている。パッチクランプ法では、細胞膜にガラス管でできた微小ピペット（パッチ電極）を密着させてイオンチャンネルを介して流れるイオン電流を測定することによりイオンチャンネルの活性を調べることができる。そこで、TRP チャンネルをヒト胎児腎細胞 293 細胞（Human Embryonic Kidney cells 293; HEK293）またはチャイニーズハムスター卵巣細胞（Chinese Hamster Ovary; CHO）に一過性に過剰発現させ、(2)の研究で TRP チャンネルへの関与が極めて疑わしい化合物の電気抵抗の変化を Single-channel 法または Whole-cell 法を用いて測定した。その際、特に痛みとの関連性が高い TRPV や TRPA ファミリーに属するチャンネルについて重点的に検討を行った。

(4) フィルター結合アッセイ

化合物とイオンチャンネルとの結合親和性を調べる方法として、フィルター結合アッセイ法が知られている。具体的には、フィルター上にタンパク質をトラップし、結合している放射標識したリガンドを定量する方法である。そこで、(2)または(3)の研究で特に顕著な効果を示したリガンドについて、放射性標識化合物を作成し、ニトロセルロースフィルターにリガンドと相互作用させた膜タンパク質を吸着させ、液体シンチレーション計測法により定量を行った。なお、放射性標識化合物の作成とフィルター結合アッセイの実験は、化合物の取扱いと研究設備の都合上、専門業者への外部委託により実施した。

(5) カルシウムイオン流入測定

一般に TRP チャンネルは、カルシウムイオンを透過させることで情報伝達を担うことが知られている。また、近年、カルシウムイオンプローブや光学機器の技術的な進歩により、細胞内カルシウムイオンのイメージングは容易となり、各種カルシウムイオンのプローブが市販されている。そこで、TRP チャンネルを CHO 細胞に発現させ、(2)または(3)の研究で特に顕著な効果を示したリガンド依存のカルシウム流入を、細胞内カルシウムイオンをカルシウム蛍光プローブと蛍光マクロプレートリーダーを用いて解析した。

(6) 構造活性相関の解析

同定した TRP チャンネルに対する構造活性相関を解明する目的で、(2)または(3)の研究で特に顕著な効果を示したリガンドについて、その周辺化合物の合成を行い、イオンチャンネル依存の鎮痛作用を示す化合物の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 鎮痛作用の強い NSAIDs の抽出

国内外から入手した既存薬 NSAIDs について、炎症性及び非炎症性の疼痛モデルラットを用いて鎮痛効果の網羅的な解析を行った。しかしながら、非炎症性の疼痛を有意に抑制する NSAIDs はほぼ皆無であったため、既存薬 NSAIDs の中から TRP チャンネルへ関与する化合物を抽出することを断念した。一方で、研究代表者は、過去の研究において既存薬 NSAIDs に化学的な修飾を施した誘導体のサブライブラリーを構築している。そこで本研究では、このサブライブラリーの化合物について鎮痛効果を調べたところ、既存薬 NSAIDs の芳香環をフッ素で修飾した化合物が非炎症性と非炎症性の両方の疼痛を有意に抑制することを発見した。このことは、投与した化合物の疼痛抑制が TRP チャンネルを介した応答である可能性が示唆された。

(2) イオンチャンネルの同定

既存薬 NSAIDs の TRP チャンネルへ関与は極めて可能性が低いと判断し、(1)で発見された化合物が標的とする TRP チャンネルについて、更なる検討を進めた。その結果、この化合物は特に痛みとの関連性が高い TRPA1 と TRPV1 に対して直接作用を示した。このことは、この化合物がイオンチャンネルを介して非炎症性疼痛を抑制していることが示唆され、炎症性メディエータとして知られる PGE₂ の透過性の亢進も抑制しなかった。しかしながら、フィルター結合アッセイとカルシウムイオンの流入測定においては、この化合物が TRPA1 と TRPV1 を作動させることを裏付ける有意なシグナルを捉えることができなかった。

なお、TRPA 及び TRPV のファミリーに属する他のイオンチャンネルについても同様の検討を行う予定であったが、これらに関しては研究期間内に実験を行っていない。

(3) 構造活性相関

TRPA1 と TRPV1 への関与が疑わしい(1)で発見された化合物をリード化合物とする誘導体合成を行い、鎮痛効果と電気生理学的測定のスクリーニングを実施したところ、分子の芳香環を種々の官能基で修飾したいくつかの誘導体（物質特許申請の都合上、化合物名は公表していない）

がリード化合物と類似の挙動を示した。また、リード化合物が非炎症性の疼痛に抑制作用を示すためには、芳香環に結合した官能基の種類と位置に依存することが分かり、分子全体の立体構造と芳香環の電子密度を制御することが薬理活性の向上に繋がることが示唆された。

なお、リード化合物と類似の挙動を示す誘導体についても、フィルター結合アッセイとカルシウムイオン流入測定を実施する予定であったが、これらに関しては各実験における条件検討が長期に及ぶと判断し、研究期間内に実験を行っていない。

痛みとの関連が深い TRPA1 または TRPV1 は新たな鎮痛薬の創製ターゲットとして注目されている。本研究では、NSAIDs が TRP チャネルへ関与するという仮説のもと、動物実験及び電気生理学的手法を用いて TRP チャネルへ関与するリガンドを検証し、有機合成化学的手法により NSAIDs の新たな創薬についてその可能性を見出した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Teita Asano, Tomoki Hattori, Ken-ichiro Tanaka, Naoki Yamakawa, Shintaro Suemasu, Shuji Aida, Marika Kataoka, Tohru Mizushima, Mitsuko Takenaga, Antinociception by fluoro-loxoprofen, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with less ulcerogenic effects, in rat models of inflammatory pain. European Journal of Pharmacology, 査読有, 844:253-258, 2019.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.12.008

Naoki Yamakawa and Ken-Ichiro Tanaka, Yasunobu Yamashita, Teita Asano, Yuki Kanda, Ayaka Takafuji, Masahiro Kawahara, Mitsuko Takenaga, Yoshifumi Fukunishi, Tohru Mizushima, Identification of Mepenzolate Derivatives With Long-Acting Bronchodilatory Activity. Frontiers in Pharmacology, 査読有, 9: eCollection, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.00344

〔学会発表〕(計 3 件)

杉本早紀, 浅野帝太, 山川直樹, フルオロロキソプロフェン異性体の合成と薬理活性の評価, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年.

Naoki Yamakawa and Takashi Katsu, Cytotoxic effects of aspirin derivatives modified with halogen, ASEAN-JAPAN Genome Medicine Reserch Promotion Conference, 2018 年.

橋本千聡, 谷田滉季, 山川直樹, ハロゲン修飾されたアスピリン誘導体の膜傷害作用, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山川直樹 (YAMAKAWA, NAOKI)

就実大学・薬学部

研究者番号: 20583040

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。