

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19489

研究課題名（和文）トランスポーター創薬を指向した化学伝達制御法の新戦略

研究課題名（英文）A novel strategy to control of chemical transmission for transporter-targeted drug discovery

研究代表者

宮地 孝明（Miyaji, Takaaki）

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・研究教授

研究者番号：40550314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：神経因性疼痛と炎症性疼痛は、様々な疾患により引き起こされる耐え難い慢性疼痛であるが、副作用の少ない、効果的な鎮痛薬はこれまでにない。本研究課題では、トランスポーター創薬を目指して、痛みを司る化学伝達の新たな制御法の構築を目的とした。我々は、小胞型神経伝達物質トランスポーターの特異的阻害剤を複数同定することができた。この阻害剤は伝達物質の開口放出を選択的に遮断することで、神経因性疼痛と炎症性疼痛に対して、既存医薬品より有効かつ副作用なく鎮痛効果を発揮した。これら化合物は神経因性疼痛や炎症性疼痛の新しい創薬シーズになると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疼痛管理はQuality of Lifeの観点から重要であるが、副作用の少ない、効果的な鎮痛薬はこれまでにない。本研究により、化学伝達を司るトランスポーターの選択的阻害剤を同定し、既存の鎮痛薬よりも副作用なく、強力に鎮痛効果を発揮することを見出した。これら阻害剤は神経因性疼痛や炎症性疼痛の新しい創薬シーズになると期待される。

研究成果の概要（英文）：Although neuropathic and inflammatory pain are unbearable chronic pain by various diseases, effective analgesics with few side effects have yet to be developed. In this study, we aimed to establish the control system of chemical transmission for transporter-targeted drug discovery. We identified several selective inhibitors of vesicular chemical transmitter transporter, which were more effective for chronic pain with few side effects than existing drugs. These compounds are expected to become new drug candidates for neuropathic and inflammatory pain.

研究分野：膜輸送分子生物学

キーワード：トランスポーター 化学伝達 ATP グルタミン酸 疼痛 トランスポーター創薬 小胞型神経伝達物質 トランスポーター

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は軽微なものも含めると人口の20-25%もの罹患者がいる。その医療費は年に600億ドルにもものぼり、毎年100億ドルずつ増加すると試算されている。このうち、神経因性疼痛は癌、糖尿病、HIV等による神経の障害、また、炎症性疼痛は癌、痛風、リウマチ等による末梢の炎症が原因となる耐え難い慢性疼痛である。疼痛管理はQuality of Lifeの観点から重要であるが、副作用の少ない、効果的な治療薬はこれまでにない。

神経因性と炎症性疼痛の発症にはグルタミン酸とプリン作動性化学伝達が関与する。神経細胞は分泌小胞に伝達物質を濃縮・開口放出し、放出された伝達物質が受容体に結合することで、シグナルを下流に伝達する。このうち、小胞型神経伝達物質トランスポーターは伝達物質の小胞内充填を司り、化学伝達に必須である(図1)。グルタミン酸やATPの過剰放出は、慢性疼痛を引き起こすため、小胞型神経伝達物質トランスポーターはその良い創薬標的になると期待されるが、トランスポーターの良い輸送活性測定法がなかったため、ほとんど創薬研究は進んでいなかった。一方で、放出された伝達物質によるシグナル伝達を遮断するために、多くの研究者が受容体の特異的阻害剤の開発にも取り組んできたが、受容体が複数存在するため、特異的かつ安全な鎮痛薬は開発ほとんど開発されていなかった。

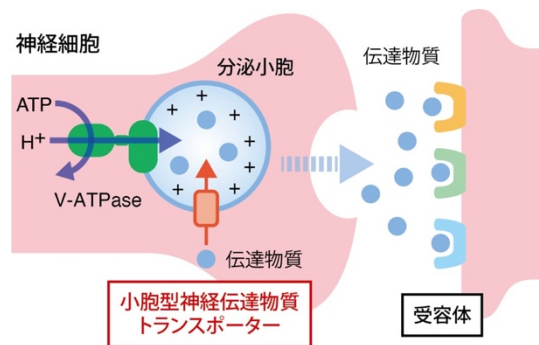


図1 小胞型神経伝達物質トランスポーターの役割

我々や共同研究者らは、真核生物トランスポーターを大腸菌あるいは昆虫細胞に発現させ、膜画分を界面活性剤で可溶化、アフィニティー精製し、これを人工膜小胞(リポソーム)に再構成する方法を確立した。この方法は夾雑物なくトランスポーター単体の機能を高感度で定量的に評価することができるため、他のスクリーニング系では見出すことができなかった新しい阻害剤の同定が期待できる。この方法を用いて、小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)と小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)は塩素イオンにより輸送活性がアロステリックに活性化され、その活性化を代謝物であるケトン体が可逆的に阻害するという、代謝スイッチがあることを見出した。このスイッチを選択的にオフすることができれば、画期的な創薬シーズになると期待される。

2. 研究の目的

小胞型神経伝達物質トランスポーターの特異的阻害剤は、神経科学の新しい研究ツールの開発、また、神経因性・炎症性疼痛の新しい創薬シーズの開発に繋がると期待されるが、その開発には未だ至っていない。本研究では、小胞型神経伝達物質トランスポーターの輸送機能を選択的に制御できる阻害剤の開発に挑戦し、神経因性・炎症性疼痛における新しいトランスポーター創薬基盤の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 小胞型神経伝達物質トランスポーターの輸送活性測定

VNUTあるいはVGLUTを含むプラスミドを大腸菌に導入、あるいは、バキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、それぞれ大量発現させた。膜画分を界面活性剤にて可溶化し、可溶性画分をNi-NTAアフィニティー精製した。精製タンパク質をリポソームに凍結融解希釈法にて再構成した。再構成リポソーム内を150mM Na⁺、外を150mM K⁺にし、2μMバリノマイシン(K⁺イオノファ)を加え、内側が正の膜電位差を形成させた。10mM Cl⁻存在下で100μM [³H]-ATPあるいは100μM [³H]-グルタミン酸を加え、2分後にSephadex G50 fineカラムにアプライし、700xg、2分、4°Cで遠心した。液体シンチレーションカウンターでリポソーム内に取り込まれた[³H]-ATPあるいは[³H]-グルタミン酸(溶出液)を定量した。

(2) 神経細胞からの伝達物質の定量

海馬初代培養神経細胞をKrebs-Ringerにてプレインキュベーションし、高カリウム(55mM K⁺)で脱分極刺激した。20分後に上清を回収し、同一サンプルを用いて、ルシフェラーゼ発光法にてATPを定量し、蛍光標識体の超高速液体クロマトグラフィーにてグルタミン酸やGABA等を一斉定量した。

(3) 疼痛試験

神経因性疼痛は、雄のC57BL/6マウスの坐骨神経を部分結紮し(Seltzer法)、10日後の機械痛覚過敏をvon Frey試験により評価した。炎症性疼痛は、雄のC57BL/6マウスの後肢の裏にカラ

ゲンニン (1%を 20 μ L) を投与し、4 時間後に熱痛覚過敏を Plantar 試験、機械痛覚過敏を von Frey 試験により評価した。生理食塩水あるいは投与化合物は、試験開始前に静脈注射した。

4. 研究成果

(1) 小胞型神経伝達物質トランスポーター阻害剤の同定

精製・再構成法による小胞型神経伝達物質トランスポーターの機能評価系を用いて、それぞれの阻害剤を探索した。その結果、nM レベルという極めて低濃度で VNUT の ATP 輸送を阻害する化合物を複数同定することができた。それぞれの骨格を有する化合物ごとに構造活性相関を調べ、VNUT を阻害するために必要な化学構造を明らかにした。いずれの化学構造を有する阻害剤も VNUT の駆動力である膜電位差の形成には全く影響しなかった。高濃度 (100 mM Cl) の塩素イオン条件では VNUT 阻害効果は消失した。また、VNUT 阻害剤と VNUT タンパク質を予め混合した後に洗浄すると、ATP 輸送阻害活性は消失した。以上の結果は、この VNUT 阻害効果は塩素イオン依存的かつ可逆であることを強く示している (骨粗しょう症治療薬である第一世代ビスホスホネート製剤のクロドロン酸による VNUT 阻害効果について図 2 に示す)。

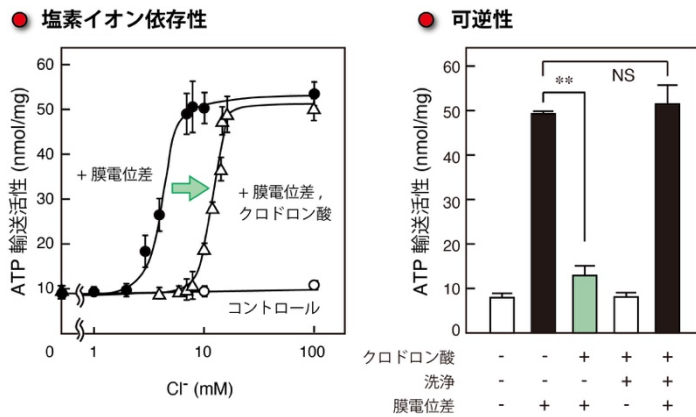


図 2 VNUT 阻害剤の同定とその作用機序

VGLUT のグルタミン酸輸送を阻害する化合物を探索したところ、グルタミン酸輸送活性を調節できる新たな制御因子を同定した。この制御因子の有無によりグルタミン酸輸送活性は可逆的に機能調節されることがわかった。

VGLUT のグルタミン酸輸送を阻害する化合物を探索したところ、グルタミン酸輸送活性を調節できる新たな制御因子を同定した。この制御因子の有無によりグルタミン酸輸送活性は可逆的に機能調節されることがわかった。

(2) ケミカルバイオロジーによる伝達物質の開口放出遮断

海馬初代培養神経細胞は ATP やグルタミン酸を開口放出するモデル細胞の一つである。高カリウムの Krebs-Ringer のみに比べて、VNUT 阻害剤を含む高カリウムの Krebs-Ringer で神経細胞を処理すると、ATP の開口放出は

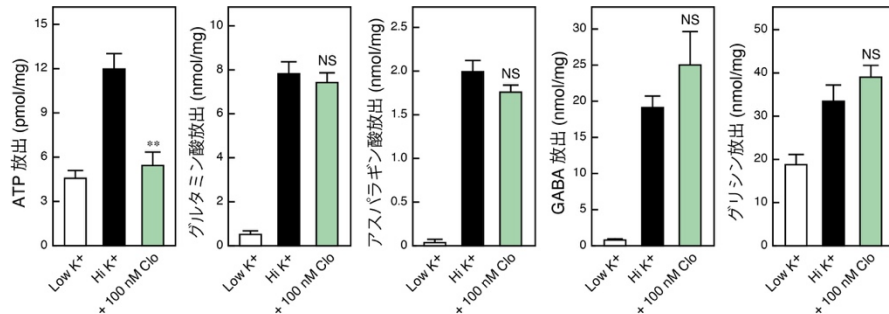


図 3 VNUT 阻害剤は ATP の放出を選択的に遮断する

完全に阻害された。一方で、VNUT 阻害剤は興奮性アミノ酸であるグルタミン酸やアスパラギン酸、抑制性アミノ酸である GABA やグリシンの開口放出はほとんど阻害しなかった (クロドロン酸による神経細胞からの ATP 放出の選択的遮断効果について図 3 に示す)。また、クロドロン酸はミクログリアや好中球、単球ライン化細胞からの ATP 放出も完全に阻害していた。クロドロン酸による VNUT 阻害効果は既存薬効の骨吸収抑制作用 (食食細胞である破骨細胞のアポトーシス) よりも 1000 倍強力であった。クロドロン酸のリポソーム製剤はミクログリアや単球ライン化細胞の食食細胞に多量に取り込まれ、アポトーシスを引き起こしたが、これらの細胞や神経細胞はクロドロン酸のみでは全くアポトーシスしなかった。以上より、VNUT 阻害効果は既存薬効よりも十分強力であった。

(3) ケミカルバイオロジーによる疼痛制御

神経因性疼痛モデルマウス (Seltzer 法) に同定した VNUT 阻害剤を静脈投与した。その結果、低用量で強力な鎮痛効果を発揮した。正常なマウスに VNUT 阻害剤は全く影響しなかった。これは VNUT 阻害剤が正常な感覚に影響することなく、病変部位の慢性疼痛を改善できることを強く示唆している。この鎮痛効果を既存の鎮痛薬と比較したところ、汎用されている神経因性疼痛治療薬のプレガバリンやガバペンチン等よりも、副作用なく有効に鎮痛効果を発揮することを明らかにした。VNUT ノックアウトマウスは痛みを感じにくくなっており、これらのマウスに同定した VNUT 阻害剤を投与しても、VNUT 阻害剤の効果は全くなかった。これは *in vivo* でも

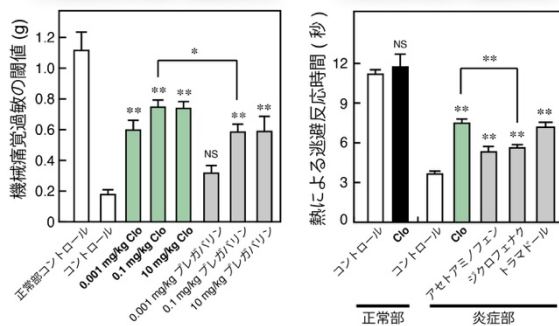
VNUT 阻害剤は VNUT を標的として鎮痛効果を発揮していることを示している。

また、カラゲニン誘発性炎症性疼痛を同様に評価したところ、VNUT 阻害剤は強力な鎮痛効果を発揮した。この鎮痛効果は非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) よりも有効であった。さらに、血中サイトカインを定量すると、TNF- α や IL-6 といった炎症性サイトカインの血中量が著しく低減しており、VNUT 阻害剤は強力な抗炎症効果があることを見出した (クロドロン酸による鎮痛効果と抗炎症効果について図 4 に示す)。

以上より、小胞型神経伝達物質トランスポーターの特異的阻害剤を同定し、この阻害剤は伝達物質の放出を選択的に遮断し、慢性疼痛に有効であることを明らかにした。複数の VNUT 阻害剤はいずれも強力な鎮痛効果を発揮した。複数のタイプの阻害剤を用いることで、オフターゲット効果を可能な限り排除した薬理的検討が可能になったといえる。また、同定した VNUT 特異的阻害剤の一つは既存医薬品であり、その体内動態とヒトへの安全性はすでに実証されているため、ドラッグリポジショニングによる創薬応用が期待される。

また、我々は VGLUT の機能を調節できる新たな制御因子を同定することができたが、今後、ケミカルバイオロジーによるグルタミン酸放出の制御が鎮痛薬の開発に有効か、検証する必要があるといえる。本研究において、小胞型神経伝達物質トランスポーターの機能調節によりシナプス間隙の伝達物質の量をコントロールし、疼痛制御できたことから、今後、他の小胞型神経伝達物質トランスポーターの特異的阻害剤を同定していくことで、神経科学分野の新たな研究ツールや創薬シーズを提供できると期待される。

● 神経因性疼痛の鎮痛効果 ● 炎症性疼痛の鎮痛効果



● 慢性炎症の抗炎症効果

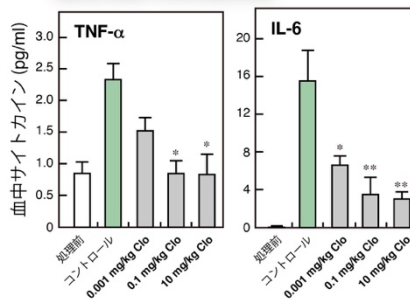


図 4 VNUT 阻害剤は慢性疼痛に有効である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nagarathinam Kumar, Nakada-Nakura Yoshiko, Parthier Christoph, Terada Tohru, Juge Narinobu, Jaenecke Frank, Liu Kehong, Hotta Yunhon, Miyaji Takaaki, Omote Hiroshi, Iwata So, Nomura Norimichi, Stubbs Milton T., Tanabe Mikio	4. 巻 9
2. 論文標題 Outward open conformation of a Major Facilitator Superfamily multidrug/H+ antiporter provides insights into switching mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06306-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 宮地 孝明	4. 巻 90
2. 論文標題 トランスポーターを標的としたプリン作動性化学伝達の特異的遮断薬の同定	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 706-710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮地 孝明	4. 巻 36
2. 論文標題 小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 673-675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami M., Juge N., Kato Y., Omote H., Moriyama Y., Miyaji T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Efficient mass spectral analysis of active transporters overexpressed in Escherichia coli.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Proteome Res.	6. 最初と最後の頁 1108-1119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.7b00777	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Y., Kato Y., Miyaji T., Omote H., Moriyama Y., Hiasa M.	4. 巻 293
2. 論文標題 Vesicular nucleotide transporter mediates ATP release and migration in neutrophils.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 3770-3779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.810168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Y., Hiasa M., Ichikawa R., Hasuzawa N., Kadowaki A., Iwatsuki K., Shima K., Endo Y., Kitahara Y., Inoue T., Nomura M., Omote H., Moriyama Y., Miyaji T.	4. 巻 114
2. 論文標題 Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. Natl Acad. Sci. USA.	6. 最初と最後の頁 E6297-E6305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1704847114. (2017)	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyachi H., Moriyama S., Kusakizako T., Kumazaki K., Ito K., Dohmae N., Nishizawa T., Miyaji T., Moriyama Y., Ishitani R., Nureki O.	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis for xenobiotics extrusion by eukaryotic MATE transporter.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01541-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujino Y., Minamizaki T., Hayashi I., Kawakami A., Miyaji T., Sakurai K., Yoshioka H., Kozai K., Okada M., Yoshiko Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparative proteome analysis of wild-type and klotho-knockout mouse kidneys using a combination of MALDI-IMS and LC-MS/MS.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proteomics Clin. Appl.	6. 最初と最後の頁 7-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prca.201600095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 宮地 孝明
2. 発表標題 トランスポーター創薬を指向した化学伝達の制御
3. 学会等名 Onco-Cardiology Seminar (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大杉 健剛, 加藤 百合, 原田 結加, 樹下 成信, 宮地 孝明
2. 発表標題 小胞型ヌクレオチドトランスポーター特異的阻害剤は化学療法誘発性神経障害性疼痛を抑制する
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 百合, 大杉 健剛, 原田 結加, 樹下 成信, 宮地 孝明
2. 発表標題 小胞型ヌクレオチドトランスポーター阻害剤は神経障害性と炎症性疼痛を抑制する
3. 学会等名 2019年度文部科学省新学術領域研究 若手研究支援基盤形成 「先端モデル動物支援プラットフォーム」 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuri Kato, Takaaki Miyaji
2. 発表標題 Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain.
3. 学会等名 BioMedical Transporters (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮地 孝明
2. 発表標題 プリン作動性化学伝達を標的としたトランスポーター創薬研究
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤百合、日浅未来、市川玲子、蓮澤 奈央、門脇敦志、岩槻健、島和弘、遠藤康男、北原吉朗、井上剛、野村 政壽、表弘志、森山芳則、宮地孝明
2. 発表標題 神経因性・炎症性疼痛に有効な小胞型ヌクレオチドトランスポーターの特異的阻害剤の同定
3. 学会等名 第60回脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮地孝明
2. 発表標題 小胞型ヌクレオチドトランスポーターの特異的阻害剤の同定と神経因性・炎症性疼痛への応用
3. 学会等名 痛み研究会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮地孝明
2. 発表標題 脂質代謝物によるプリン作動性化学伝達の制御とその応用
3. 学会等名 ConBio2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤 百合、日浅 未来、市川 玲子、蓮澤 奈央、門脇 敦史、岩槻 健、島 和弘、遠藤 康男、北原 吉郎、井上 剛、野村 政壽、表 弘志、森山 芳則、宮地 孝明
2. 発表標題 骨粗鬆症治療薬クロドロン酸は小胞型ヌクレオチドトランスポーターを標的として慢性疼痛を改善する
3. 学会等名 ConBio2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮地孝明
2. 発表標題 VNUT特異的阻害剤の開発とその薬学的応用
3. 学会等名 アステラス病態代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮地孝明
2. 発表標題 プリン作動性化学伝達を標的としたトランスポーター創薬
3. 学会等名 日本薬学会関東支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮地孝明
2. 発表標題 ほ乳類の小胞型ポリアミントランスポーターの同定とその役割
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----