

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03179

研究課題名(和文) オーフアン栄養代謝物の分子標的の同定とその作用メカニズムに基づく疾患予防

研究課題名(英文) Identification of the molecular targets for orphan nutritional metabolites, and the mechanism-based preventive care

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病の予防効果がある栄養代謝物は数多く報告されているが、未だその多くの分子メカニズムは解明されていない。本研究では、独自のトランスポーター研究基盤を生かして、オーファン栄養代謝物の新たな分子標的を同定することを目的とした。その結果、プリン作動性化学伝達を司る小胞型ヌクレオチドトランスポーターを強力に阻害する栄養代謝物を複数同定することに成功した。この阻害剤はATPの開口放出を選択的に遮断することで、生活習慣病の予防・治療効果を発揮した。本研究成果はプリン作動性化学伝達を標的とした新しい生活習慣病の予防法を提案するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病は日本で2000万人の罹患者・予備軍がいるにも関わらず、副作用の少ない、有効な予防・治療薬がない。プリン作動性化学伝達は、慢性疼痛、糖尿病、脂質異常症、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝炎、アトピー性皮膚炎、アルツハイマー病、パーキンソン病等の難治性疾患の発症に関与している。そのため、本研究で得た知見は、オーファン栄養代謝物の分子標的の同定という学術的意義に加えて、生活習慣に起因する幅広い難治性疾患に対して、副作用が少なく、有効な予防法の確立に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Although there are many nutritional metabolites with preventive effects on lifestyle-related diseases, the molecular mechanism has yet to be elucidated. In this study, we aimed to identify new molecular targets for orphan nutritional metabolites by utilizing our unique assay of transporter. We identified several nutritional metabolites that strongly inhibit a vesicular nucleotide transporter to control purinergic chemical transmission. The nutritional metabolites showed preventive and therapeutic effects on lifestyle-related diseases by selectively blocking the vesicular ATP release. We propose a new preventive care of lifestyle-related diseases by blocking purinergic chemical transmission.

研究分野：膜輸送分子生物学

キーワード：栄養代謝物 化学伝達 トランスポーター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人類の食生活の歴史は、氷河期時代(250万年~1万年前)の狩猟採取による高脂質・低炭水化物食、氷河期後の農耕の開始による食物繊維を含む糖質食、産業革命(19世紀)以降の単純糖質を多く含む食事に大別される。氷河期時代に低糖質の食事でも脳のエネルギー源を十分に確保するために、当時の人類は脂質を主な炭素源とし、インスリン抵抗性を獲得した。

しかし、その代償として現代の過剰な単純糖質に適応できず、食生活が破綻すると、炎症性腸疾患や糖尿病、慢性痛等の生活習慣病を発症しやすくなった。生活習慣病は日本で2000万人の罹患者・予備軍がいるにも関わらず、副作用の少ない、有効な治療薬がなく、その市場規模は年間7兆円にものぼる。生活習慣病の克服を目指して、単純糖質の過剰摂取による有害性、脂質代謝物や食物繊維等の有用性が明らかにされているが、機能性栄養代謝物の多くは未だ分子標的が明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

我々は独自のトランスポーター(輸送体)の研究基盤を用いて、これまでに栄養代謝物の分子標的を同定してきた。これにより、神経伝達を司る小胞型神経伝達物質トランスポーターが栄養代謝物の分子標的として有望であることがわかってきた。そこで本研究課題では、分子標的が不明な栄養代謝物をオーファン栄養代謝物と定義し、小胞型神経伝達物質トランスポーターからその新たな分子標的を探索し、同定することを目的とした。

### 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

小胞型神経伝達物質トランスポーター遺伝子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、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。再構成リポソームの内外のイオン組成を任意に設定し、RI標識された神経伝達物質を加えた。2分後にSephadex G50 fineカラムにサンプルをアプライし、700 x g、2分、4分で遠心した。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RI標識された神経伝達物質(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(55 mM  $K^+$ )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、様々な伝達物質を網羅的に定量した。

#### (3) 動物試験

生活習慣病モデルマウスを用いて、栄養代謝物の有用性を検証した。このうち、神経障害性疼痛は、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ニン(1%を20  $\mu$ 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) オーファン栄養代謝物の分子標的の同定

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、強力な阻害活性を有する栄養代謝物を探索した。その結果、 $IC_{50} = 67$  nMという極めて低濃度で小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)のATP輸送を阻害する栄養代謝物を同定することができた。VNUTは分泌小胞へのATPの充填を司り、プリン作動性化学伝達の必須因子である。この栄養代謝物の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。この阻害剤は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。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阻害剤は直接的にVNUTに作用していること、また、阻害効果は可逆的であることを強く示している。

#### (2) 栄養代謝物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、GABA等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。他のモデル細胞でも同様にATPの開口放出を遮断できることを明らかにした。

### (3) 栄養代謝物による神経障害性疼痛の抑制メカニズム

神経障害性疼痛モデルマウスに同定した VNUT 阻害剤を静脈投与あるいは髄腔投与した。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障害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 阻害剤による鎮痛効果は ATP や ADP といったプリン受容体アゴニストによって消失あるいは減弱した。これは ATP の開口放出が遮断されたことで、P2X と P2Y 受容体が活性化されないため、鎮痛効果を発揮することを示している。また、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 VNUT 阻害剤を投与しても、VNUT 阻害剤の効果は全くなかった。以上の結果は同定した VNUT 阻害剤は *in vivo* でも VNUT を標的として鎮痛効果を発揮していることを強く示している。

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- $\alpha$  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。VNUT 阻害剤は生活習慣病の他の症状に対しても有効であった。

以上より、VNUT がオーファン栄養代謝物の分子標的であること、この栄養代謝物は ATP の開口放出を選択的に遮断し、慢性疼痛をはじめとする生活習慣病に有効であることをタンパク質・細胞・個体レベルで明らかにした。オーファン栄養代謝物が生活習慣病の予防効果を発揮する新しい分子メカニズムを解明し、長年の謎の一つを明らかにすることができた。プリン作動性化学伝達は慢性疼痛、糖尿病、脂質異常症、潰瘍性大腸炎、非アルコール性脂肪肝炎、アトピー性皮膚炎、アルツハイマー病、パーキンソン病等の難治性疾患の発症に関与している。本研究成果の栄養代謝物を中心に、プリン作動性化学伝達を基軸として、副作用が少なく、有効な生活習慣病の予防と治療法の確立が期待される。将来的には、健康食品 (予防) と医薬品 (治療) の両面での社会貢献が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2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 Jing Che, Naoki Yamaji, Takaaki Miyaji, Namiki Mitani-Ueno, Yuri Kato, Ren Fang Shen, Jian Feng Ma	4. 巻 61
2. 論文標題 Node-localized transporters of phosphorus essential for seed development in rice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1387-1398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa074	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------