

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：15301
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K14903
研究課題名（和文）プリン作動性化学伝達の遮断による慢性疼痛の抑制メカニズムの解明と薬学的応用

研究課題名（英文）Elucidation of chronic pain suppression mechanism by regulating purinergic chemical transmission

研究代表者
加藤 百合（Yuri, Kato）

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・特別契約職員（助教）

研究者番号：10732042
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：慢性疼痛（炎症性疼痛・神経障害性疼痛）は副作用の少ないより良い治療薬がまだ開発されていない。慢性疼痛の発症に關与するプリン作動性化学伝達の必須因子である小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）に着目した。本研究により、新たに見出したVNUT特異的阻害剤はプリン作動性化学伝達を制御し、既存の鎮痛薬と比較して慢性疼痛に対してより有効であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vivo、in vitroにおいて、VNUTを特異的に阻害することで、小胞へのATP濃縮を阻害し、プリン作動性化学伝達を制御することが可能となった。プリン作動性化学伝達は疼痛だけではなく炎症をはじめとした様々な疾患への関与が知られているため、今後、それらの治療の応用が期待できる。
また、トランスポーターを標的とした鎮痛薬は新規であり、新たな創薬標的を見いだすことができた。

研究成果の概要（英文）：Effective therapeutic drugs with few side effects are unavailable for chronic pain. Purinergic chemical transmission play an important role in chronic pain. Vesicular nucleotide transporter (VNUT) is essential molecule for this transmission. In this study, we identified VNUT specific inhibitor and investigated that this inhibitor suppressed chronic pain.

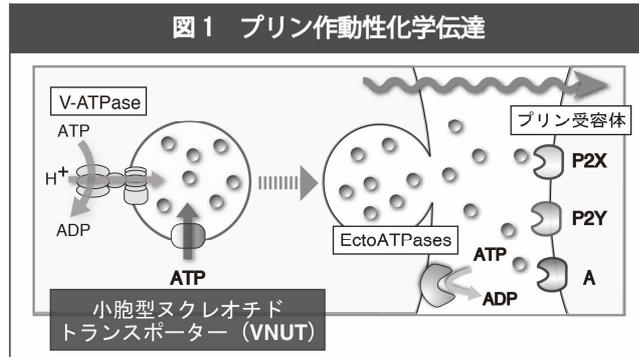
研究分野：生化学

キーワード：ATP プリン作動性化学伝達 慢性疼痛

1. 研究開始当初の背景

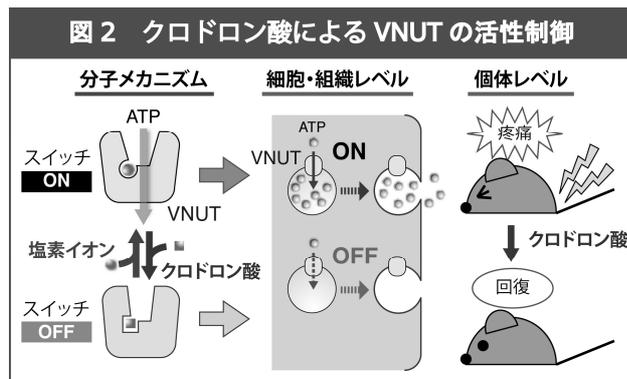
慢性疼痛は軽微なものを含めると人口の約 20%もの罹患者がいる。その医療費は年に 600 億ドルにもものぼり、毎年 100 億ドルずつ増加すると試算されている (*Nature* 535, S2-3, 2016)。このうち、神経障害性疼痛は癌、糖尿病、HIV 等による神経の障害、また、炎症性疼痛は癌、痛風、リウマチ等による末梢の炎症が原因となる耐え難い慢性疼痛であり、それぞれ異なるメカニズムで発症する。慢性疼痛にはそれぞれの原因に応じた治療が必要であるが、発症メカニズムが不明なため、副作用の少ない、より効果的な鎮痛薬が探されてきた。

慢性疼痛の発症にはプリン作動性化学伝達が必須である。プリン作動性化学伝達では、小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) が ATP を分泌小胞に濃縮し、シナプス間隙に ATP が開口放出される。放出された ATP がプリン受容体に結合することで痛みシグナルが伝達される (図 1)。プリン受容体は慢性疼痛のよい創薬標的であるが、受容体が複数存在するため、ヒトに投薬可能な各プリン受容体の特異的阻害薬の開発には至っていなかった。



そのような状況下、応募者は、ATP の小胞内充填を司る VNUT は一つのアイソフォームしかなく、VNUT KO マウスはいたって健康であったことに着目し、慢性疼痛への有効性を検討した。その結果、VNUT KO マウスは、神経障害性疼痛と炎症性疼痛、その慢性炎症が大幅に低減していることを明らかにした。さらに、VNUT には塩素イオン (ON) とケトン体 (OFF) の代謝スイッチがあることを明らかにし、このスイッチを極めて低濃度で OFF できる医薬品 (クロドロン酸) の同定に成功した (図 2)。

骨粗鬆症治療薬である第一世代のビスホスホネート製剤・クロドロン酸は骨粗鬆症治療効果も低く (VNUT 阻害効果の 1/1000)、副作用も低い特徴がある。予想通り、クロドロン酸は低濃度で ATP の開口放出を阻害し、病態モデルマウスにおいて、副作用なく、VNUT KO マウスと同じ治療効果を得ることができた (図 2)。



以上より、VNUT は幅広く慢性疼痛を抑制できる画期的な鍵分子であるといえる。クロドロン酸は骨粗鬆症治療薬として使用されていた既存医薬品であるため、新薬開発を目的として新たに VNUT を阻害する化合物を探索した。

2. 研究の目的

本研究は、応募者らが確立した独自のトランスポーター創薬の研究基盤を用いて、VNUT 阻害が有効な慢性疼痛の適応範囲を明確にし、新たな VNUT 阻害剤を探索し、安全で有効な慢性疼痛の創薬基盤の構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト VNUT を大腸菌に大量発現させ、膜画分を界面活性剤で可溶化し、アフィニティー精製した。精製 VNUT を人工膜小胞に再構成し、放射性標識した ATP を加え、VNUT 阻害候補化合

物を添加し輸送活性を測定した。見出した VNUT 阻害剤の VNUT への阻害様式を検討するために、ATP の認識部位への影響や阻害効果の可逆性を検証した。

(2) VNUT の発現が報告されている細胞において、開口放出による ATP 放出が VNUT 阻害候補化合物存在下で、抑制されるか測定した。また、刺激により放出される他の伝達物質も同時に HPLC にて測定した。

(3) これまで神経障害性疼痛では外科的に神経を損傷させる Seltzer モデル、炎症性疼痛ではカラゲニンや完全フロイントアジュバンドで炎症を惹起させるモデルの全てにおいて、VNUT 阻害は強力な鎮痛効果があることを実証した。より疾患に近い疼痛モデルで検証するため、炎症性疼痛と神経障害性疼痛の両方への寄与が考えられる抗がん剤を用いた新たな疼痛モデルマウスの系を確立した。応募者が以前に見出した VNUT 阻害剤クロドロン酸や VNUT 阻害候補化合物をこのモデルに投与して機械刺激、熱刺激による疼痛回避行動を測定し、抑制効果を検証した。

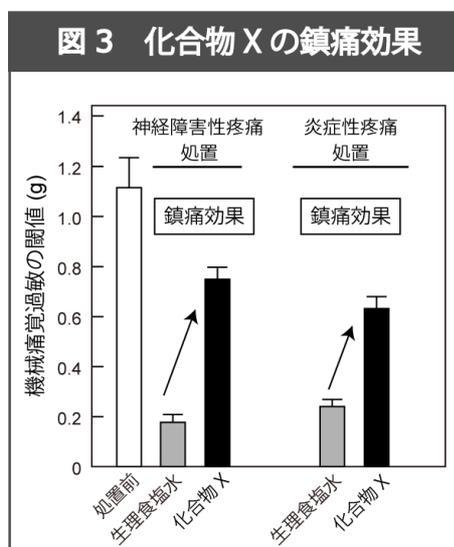
4. 研究成果

本研究により、 IC_{50} が nM オーダーの新たな VNUT 特異的阻害剤（化合物 X：論文投稿準備中）を同定した。化合物 X は VNUT のもつユニークな活性制御スイッチである塩素イオン依存性を測定した結果、塩素イオンと競合し、その阻害は可逆的であることを明らかにした。VNUT の ATP 結合部位には影響せず、VNUT の駆動力である膜電位差の形成にも影響しなかった。

次に、実際に VNUT が発現している神経細胞において化合物 X の作用を検証したところ、化合物 X は他の伝達物質に影響せずに ATP 放出のみを可逆的に抑制していることを見いだした。

最後に、Seltzer モデルや今回確立した抗がん剤由来の神経障害性疼痛モデルマウス、炎症性疼痛モデルマウスにおいても、化合物 X は既存の鎮痛薬より副作用無く強力な鎮痛効果を示した（図 3）。さらに、VNUT KO マウスにおいて化合物 X による鎮痛効果は見られなかった。

以上のことから、化合物 X は *in vitro* だけではなく *in vivo* においても VNUT を標的として作用していることが明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

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 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 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 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤百合
2. 発表標題 創薬を目指した小胞型ヌクレオチドトランスポーター特異的阻害剤の同定
3. 学会等名 トランスポーター研究会 (招待講演)
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
---------	---------