

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20310131

研究課題名（和文） アロディニア誘発にかかわる新規受容体の探索プローブの創製

研究課題名（英文） Synthesis of molecular probes for exploring the novel receptor involved in the allodynia induction

研究代表者

古田 享史（FURUTA KYOJI）

岐阜大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40173538

研究成果の概要（和文）：神経障害性疼痛の症状の一つであるアロディニアの発症にかかわる受容体を明らかにするため、生体での薬物の動態や作用部位を可視化できる探索分子の合成を行った。合成した探索分子とラットを用いた可視化実験により、大脳皮質、海馬、脊髄に探索分子が結合する部位があることを見いだした。また、アロディニアにカイニン酸型受容体が関与し、その受容体の働きを制御する薬剤がアロディニア治療薬候補になる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In order to explore a novel receptor involved in the induction of allodynia (a typical symptom of neuropathic pain), we synthesized molecular probes that enable us to visualize the site of action of drug molecules in vivo. Imaging analysis using one of the probes in rats revealed the specific accumulation of the molecule to the regions of cerebral cortex, hippocampus and spinal cord. This study also demonstrated the possible involvement of kainate-type receptor in allodynia, suggesting a drug that can modulate the function of the receptor becomes a potential candidate for the therapeutic agent for allodynia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：アロディニア、神経障害性疼痛、分子プローブ、陽電子放射画像撮影法、PET、アクロメリン酸、カイニン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛の症状の一つであるアロディニアは、通常痛みを引き起こさない触覚刺激で激痛が惹起される病態であり、有効な治療法は確立されていない。アロディニアの発症と病態維持機構は複雑・多様であり、これまでに一部が解明されたにすぎない。連携研

究者の南らはアロディニアの発生・維持機構にグルタミン酸受容体が関与することを明らかにしているが、毒キノコから単離されたグルタミン酸類縁物質、アクロメリン酸をマウス髄腔内に投与するとアロディニアが誘発されることを新たに発見した。様々な薬理的解析の結果、アクロメリン酸により活性

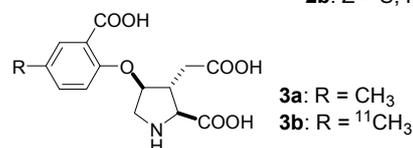
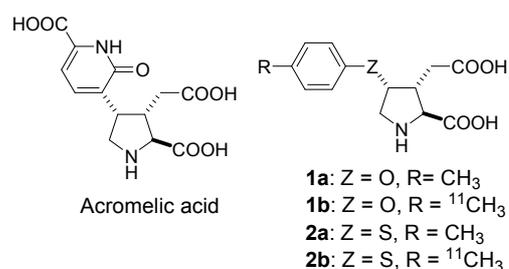
化されアロディニア誘発にかかわる新規受容体が存在するとの推察がなされた。この受容体はアロディニア治療薬開発の新たな分子標的となると考えられるが、生体での発現量は極微量で、発現組織や細胞も不明であるため、分子生物学・生化学的手法による受容体同定の試みは成功していない。

2. 研究の目的

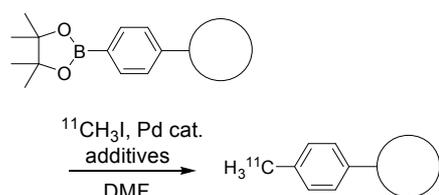
アロディニア誘発にかかわる新規受容体を探索するため、独自に開発したアゴニストおよびアンタゴニスト活性を示す化合物を基に、*in vivo*での超高感度での検出が可能な陽電子放射断層画像撮影法(PET)プローブの創製を行う。このプローブを活用して生体における化合物の作用部位を可視化し、標的受容体の発現部位を特定する。続いて、光親和性標識プローブやアフィニティプローブを合成し、PETで得られた情報をもとに、受容体発現組織や細胞を用いた標識実験を行い、標的受容体の同定をめざす。これにより、難治性の慢性神経障害性疼痛の発症・維持機構を解明し、治療薬創製に向けた分子基盤を構築することを目標とする。

3. 研究の方法

アクロメリン酸が作用する新規受容体の発現組織を *in vivo*で探索するため、独自に開発したアゴニスト (**1a**, POPA-23) およびアンタゴニスト (**2a**, PSPA-4; **3a**, aPOPA-10) を PET トレーサー (**1b**, **2b**, **3b**) 化し、イメージング解析を行う。トレーサーに導入する放射核は、化合物の構造活性相関と合成法の観点から $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$ を用いる。 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$ の導入には土居らの開発したパラジウム触媒を用いる高速メチル化法を活用することとする。



高速メチル化法:



以下に具体的な研究方法を示す。

(1) PET プローブ前駆体の合成: $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$ 基をカップリング反応で導入するための前駆体となるホウ素化合物を合成する。

(2) コールド条件での高速メチル化反応の検討: 半減期が 20 分である ^{11}C 核を導入した PET トレーサーの場合、イメージング解析に適する比放射活性を保つには、合成から精製・単離までを 40 分以内で行う必要がある。まず、コールド条件で反応条件を検討し、PET に適用可能な合成プロトコルを確立する。

(3) PET 合成装置でのトレーサー合成: 確立した合成プロトコルに従って実際の PET トレーサー合成を行う。

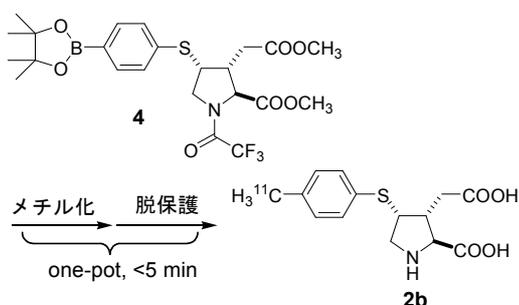
(4) ラットを用いた PET イメージング: 合成した PET トレーサーをラットに適用し、イメージング解析を行う。これにより、標的受容体の発現組織を特定する。

(5) 受容体捕獲のための分子プローブの合成: 光親和性標識プローブを合成し、PET イメージングで見いだした受容体発現組織を用いて受容体標識実験を行う。

(6) 新規受容体の同定と機能解析

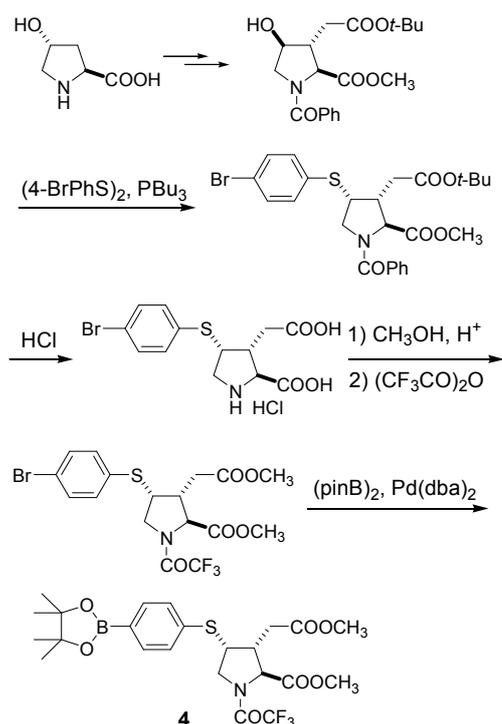
4. 研究成果

(1) 受容体探索用 PET プローブの合成を行うため、合成経路の設計を行った。PET プローブの基となるアゴニストおよびアンタゴニストはいずれもアミノ酸であり、高速メチル化反応における塩基性条件ではそれらの官能基の求核性によってメチル化反応の効率を下げる可能性が考えられる。そこで、官能基部分を保護し、メチル化後に脱保護することとした。また、短寿命の ^{11}C 核を用いるため、反応後の後処理から高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離・精製、剤形化の時間を除くと、反応に割り当てられる時間は 5 分程度となる。以上の点を考慮し、アミノ基をトリフルオロアセチル基で、カルボキシ基をメチルエステルとして保護したホウ素化合物を前駆体に使い、メチル化後にアルカリ水溶液を加えて一挙に脱保護までを行う、2 工程ワンポット合成経路を考案した(下図)。

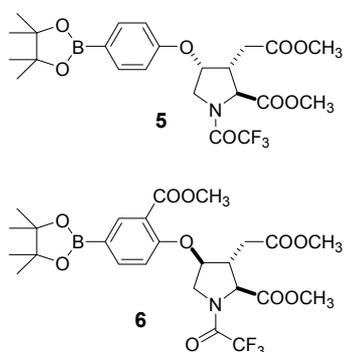


まず、PET プローブ **2b** の前駆体となるホウ素化合物 **4** を、パラジウム触媒を用いたビス(ピ

ナコラト) ジボロンとのカップリング反応を鍵反応とする以下のような経路で合成した。



同様の手法により、プローブ **1b** および **3b** の前駆体 **5** および **6** を合成した。

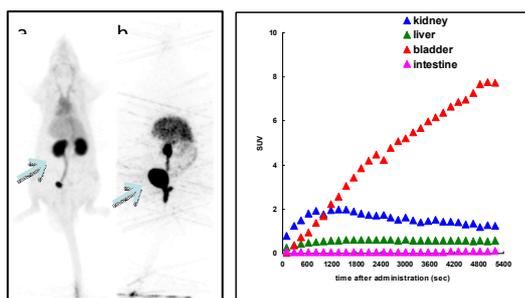


(2) 続いて、合成したホウ素化合物 **4** を用いて、コールド条件でのワンポット高速メチル化-脱保護によるプローブ合成反応の検討を行った。その結果、以下のようなプロトコールで効率よく目的物 **2a** を得ることに成功した: ホウ素体 **4**、Pd₂(dba)₃、P(o-tolyl)₃、K₂CO₃ の DMF 溶液に CH₃I を加え、100°C で 5 分間加熱、続いて、反応溶液に 2M 水酸化ナトリウム水溶液を加え 1 分間加熱する。同様の手法により、ホウ素化合物 **5** および **6** から目的とする化合物 **1a** および **3a** を、それぞれ高収率で合成することができた。以上により、PET 合成において、合成反応から精製・単離までを 40 分以内で行うプロトコールを確立することができた。

(3) 確立した PET プローブ合成プロトコールに従い、実際の PET 合成装置を使って PET トレーサーの合成を行った。PET プローブ **1b**、**2b**、**3b** のいずれも、動物を用いた PET イメージング研究に適用可能な十分な放射活性 (単離放射能 2GBq 以上) と純度 (99% 以上) を有した標識対を得ることに成功した。以下に **2b** についての合成例を示す。

サイクロトロンにより [¹¹C]CO₂ を合成し、LiAlH₄ にて還元したのちヨウ化水素酸で処理して [¹¹C]CH₃I を調製した。この [¹¹C]CH₃I を前駆体 **4**、Pd₂(dba)₃、P(o-tolyl)₃、K₂CO₃ の DMF 溶液にヘリウムガスをを使って導入し、100°C で 4 分間加熱、続いて、反応溶液に 2M 水酸化ナトリウム水溶液を加え 1 分間加熱した。反応溶液をギ酸のアセトリル溶液に移して中和した後、逆相 HPLC にて分離した。化合物 **2b** を含むフラクションを 25% アスコルビン酸水溶液を含むフラスコに集め、有機溶媒を減圧留去したのち、生理食塩水を加えて PET 試験用製剤とした。合成反応と分離・精製を含む総合成時間は 33 分であった。また、**2b** の単放射能 5.25GBq、比放射能 82GBq/μmol、崩壊補正放射化学収率が 34~43%、化学純度および放射化学純度はいずれも 99% 以上であった。

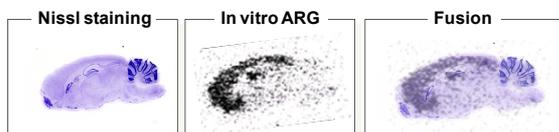
(4) 合成した PET プローブを用いてラットにおける動態イメージング解析実験を行った。アンタゴニスト型の **2b** をラットの静脈に投与し、全身スキャンを行った結果、早い段階から腎臓に集積が見られ、時間経過と共に尿路排泄されてしまい、特定の部位への集積は確認することができなかった (下図)。**3b** およびアゴニスト型の **1b** を用いた実験でも同様な結果であった。すなわち、プローブの中核移行性が低く、脳・脊髄での特異的な集積部位を評価することは不可能であった。



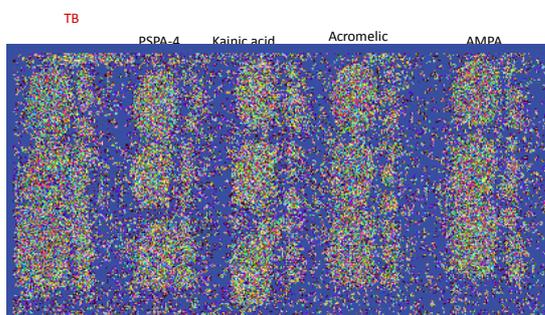
そこで、ラットの脳と脊髄切片を用いた in vitro オートラジオグラフィー (ARG) を行い、中枢系にプローブの特異的な結合部位が存在するかを検討した。その結果、プローブ **1b** および **3b** では非特異的な結合が多く、解析が困難であったが、**2b** では脳および脊髄に特異的な結合部位を見いだすことに成功した (下図)。

図の左は脳の神経細胞体を選択的に染色し

たものであり、中央がPETによるARG図、右が両者の重ね合わせである。この画像から、PETプローブは海馬及び大脳皮質に集積していることが明らかとなった。また、脊髓切片においても弱いながら**2b**の特異的な集積部位が確認できた。



次に、結合の標的分子を同定するため、グルタミン酸受容体リガンドを用いた阻害実験を行った。その結果、**2b**の結合はアクロメリン酸よりもカイニン酸によって強く阻害されることがわかった（下図）。



上記のPETイメージング結果から、化合物**2a**がカイニン酸受容体に結合して作用している可能性が考えられた。このことは、カイニン酸受容体がアロディニアの抑制に働いている可能性を示唆するものである。実際、カイニン酸を神経障害性疼痛モデルマウスに投与したところ鎮痛効果が認められた。しかし、化合物**2a**の作用濃度領域が、通常のカイニン酸リガンドの作用濃度よりもはるかに低いところにあることから、**2a**とカイニン酸が共通して結合する未同定の受容体が存在する可能性は除外できない。

(5) 今後の展望

本研究で創製に成功した受容体探索PETプローブによる実験では、アクロメリン酸により活性化されてアロディニアを誘発する新規受容体を同定するには至らなかった。受容体の発現量が極めて少なく、非特異的な結合との区別ができなかったことが理由として考えられる。今回は脳・脊髓の組織を用いたが、受容体は末梢組織に存在する可能性もあるので、四肢や皮膚の組織などを使った探索が望まれる。また、ラット以外の動物では受容体発現量が多い可能性もあるので、サルを含めた動物でのイメージングを行いたい。一方、本研究により、新たにカイニン酸受容体がアロディニアの病態制御に関与している可能

性を示すことができた。これまでカイニン酸受容体がアロディニアに関与するとの報告はなく、世界で初の、カイニン酸受容体の新機能の発見といえる。さらに、リガンドのカイニン酸がアロディニア抑制作用を示すという発見も世界初のものであり、新しい機序に基づく神経障害性疼痛治療薬開発に繋がる重要な成果であると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Synthesis of an acromelic acid A analog-based ^{11}C -labeled PET tracer for exploration of the site of action of acromelic acid A in allodynia induction. M. Kanazawa, K. Furuta, H. Doi, T. Mori, T. Minami, S. Ito, M. Suzuki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 2017-2020 (2011). 査読有り
2. Synthesis of both epimeric triacid analogs of kainic acid. H. L. Hao, P. Sun, G. X. Wang, K. Furuta, M. Suzuki, *Chin. Chem. Lett.*, **19**, 269-272 (2008). 査読有り

[学会発表] (計5件)

1. 金澤奨勝、森 智子、土居久志、伊藤誠二、南 敏明、鈴木正昭、古田享史：アロディニア誘発に関わる受容体探索のためのPETプローブの創製、日本化学会第90春季年会、2010年3月28日（大阪）。
2. 古田享史：アロディニア誘発に関わる新規受容体リガンドの創製、第8回国際バイオフォーラム、2009年7月2日（東京）。
3. 金澤奨勝、前田将秀、伊藤誠二、南 敏明、鈴木正昭、古田享史：アロディニア抑制作用を示すアクロメリン酸類縁体の創製、日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会、2009年、5月19日（神戸）。
4. 金澤奨勝、前田将秀、伊藤誠二、南 敏明、鈴木正昭、古田享史：抗アロディニア作用を示す新規アクロメリン酸類縁体の創製、日本化学会第89春季年会、2009年3月29日（千葉）。
5. K. Furuta： Novel Pyrrolidine derivatives that exert anti-allodynic activity, The Next Generation Japanese Technology Showcase, January 14, 2009 (New York).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 享史 (FURUTA KYOJI)

岐阜大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40173538

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
南 敏明 (MINAMI TOSHIAKI)
大阪医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：00257841

土居 久志 (DOI HISASHI)
理化学研究所・分子イメージング科学研究
センター・チームリーダー
研究者番号：00421818