

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K14960  
研究課題名(和文) 新規なサブタイプ選択的阻害薬の創製による脳内GABAトランスポーター機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of neural GABA transporter function by developing novel subtype-selective inhibitors

研究代表者  
南 雅文(MINAMI, Masabumi)  
北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：20243040  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：GABAトランスポーターのBGT-1サブタイプに選択的な阻害薬候補である化合物Bは、尾懸垂試験において抗うつ作用を有することが示めされた。GABA受容体に対する作用を検討したところ、GABAA受容体に対して高い結合親和性を有し、アゴニストとして作用することが示された。GABAB受容体には結合しなかった。以上より、化合物Bの抗うつ作用は、BGT-1阻害活性、または、BGT-1阻害活性とGABAA受容体アゴニスト活性の複合的な作用によることが示唆された。GABA受容体に作用せず、BGT-1のみを阻害する化合物を得るため新たに4種類の化合物を合成したが、いずれもBGT-1阻害作用を示さなかった。

研究成果の概要(英文)：Compound B, a candidate of the selective inhibitor for the BGT-1 subtype of the GABA transporters, showed an antidepressant effect in the tail suspension test. This compound showed high binding affinity and agonistic activity on GABAA receptors. It did not bind to GABAB receptors. These results suggested that the antidepressant effect of the compound B is due to the inhibition of BGT-1 or the combined action of BGT-1 inhibition and GABAA receptor activation. In order to obtain a compound which does not act on GABA receptors but inhibits BGT-1 selectively, four compounds were newly synthesized. However, none of them showed BGT-1 inhibitory effect.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳・神経 薬理学 有機化学 GABA トランスポーター 創薬

## 1. 研究開始当初の背景

GABA は、中枢神経系における主要な抑制性神経伝達物質であり、不安、てんかん、抑うつなどの種々の神経系疾患に關与することが知られている。GABA トランスポーター (GAT) はシナプスでの GABA 濃度制御により GABA 神経情報伝達の調節を担っていると考えられ、これまでに GAT-1、2、3 および BGT-1 の 4 種が同定されている。GABA 受容体アゴニストおよびベンゾジアゼピン結合部位アゴニストは GABA 神経情報伝達を促進する作用を有し、特に、ベンゾジアゼピン類は種々の神経系疾患の治療に用いられている。同様に GABA 神経情報伝達を促進する作用を有すると考えられる GAT 阻害薬は、受容体に作用する薬物とは異なる作用機序・作用特性を有する新規創薬シーズになりうる。これまでに神経細胞発現型の GAT-1 を選択的に阻害する tiagabine (Gabitril®) が開発され、欧米では抗痙攣薬として市販されており、さらに、不安障害に対する有効性や、慢性疼痛に対する鎮痛効果も報告されている。一方、グリア細胞に発現が多い GAT-2、GAT-3 および BGT-1 に対して高選択性を有する阻害薬は十分でなく、これらサブタイプの生理的・病態生理的役割については不明な点が多い。申請者らはこれまでに、GABA の立体配座制御を行った化合物をリード化合物として種々の化合物を合成、その活性評価を行うことで、GAT-3/BGT-1 に高選択性の化合物 A を見出し、化合物 A がマウスにおいて抗痙攣作用を有することを明らかとした (Bioorg Med Chem, 21:4938-50 (2013))。さらに最近、化合物 A の構造改変を進め、BGT-1 に高選択性を有する化合物 B を創製した (ACS Med Chem Lett, 5:889-93 (2014))。

## 2. 研究の目的

すでに得ている化合物 B に加え、グリア細胞発現型の GAT-2、GAT-3 および BGT-1 に対して高選択性を有する阻害薬を創製する。GABA トランスポーター発現細胞を用いた取り込み実験に加え、GABA 受容体に対する結合親和性の検討などにより、化合物の薬理学的特性を明らかにする。さらに、行動薬理学的解析により GAT 各サブタイプの中枢神経系における役割を明らかにし、創薬標的分子としての有用性を評価する。

## 3. 研究の方法

## (1) 使用動物

8 週齢の雄性 ICR マウスまたは 11-12 週齢の雄性 BALB/c マウス (日本 SLC, 浜松) を用いた。動物は、室温が  $23 \pm 1$ 、明暗周期が 12 時間 (明期; 7:00-19:00, 暗期; 19:00-7:00)、摂食・飲水が自由に行える室内環境下で飼育した。なお、実験はすべて「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定 (平成 19 年 4 月 1 日)」及び「動物実験に

関する日本薬理学会指針」を遵守し、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の審査・承認を得て行った。

(2) 受容体結合実験  
膜画分の調整

ICR マウスを断頭し、小脳と嗅球を除く全脳を取り出し、液体窒素で凍結後 -80 で保存した。GABA<sub>A</sub> 受容体結合実験では、保存していた脳組織に sucrose 溶液 (0.32 M, pH 7.4) を加えてホモジナイズし、30,000 × g、4、30 分間遠心し、ペレットを超純水で洗浄、再懸濁した。再び 30,000 × g、4、30 分間遠心し、Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) で再懸濁して -80 で一晩保存した。翌日、30,000 × g、4、30 分間遠心し、Tris-HCl buffer での再懸濁と遠心を 3 回繰り返して、懸濁液の蛋白質濃度が 125 μg/ml になるように調整した。GABA<sub>B</sub> 受容体結合実験では、脳組織に Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) を加えてホモジナイズし、20,000 × g、4、30 分間遠心し、ペレットを Tris-HCl buffer で洗浄、再懸濁した。懸濁液を 20,000 × g、4、25 分間遠心して得られたペレットについて、Tris-HCl buffer での洗浄、再懸濁を 2 回繰り返して、さらに 20,000 × g、4、30 分間遠心して得られた最終ペレットを -20 で一晩保存した。翌日、ペレットを Tris-HCl buffer で再懸濁した後、20,000 × g、4、25 分間遠心し、懸濁液のタンパク質濃度が 200 μg/ml になるように調整した。

## 受容体結合実験

[<sup>3</sup>H] ムシモール (35.6 または 36.9 Ci/mmol) の GABA<sub>A</sub> 受容体に対する解離定数  $K_d$  値と最大結合量  $B_{max}$  値を算出するため、膜画分懸濁液に各濃度の [<sup>3</sup>H] ムシモールを添加し 4、45 分間インキュベートして飽和結合実験を行った結果、 $K_d = 15.2 \pm 2.8$  nM、 $B_{max} = 2260 \pm 370$  fmol / mg protein を得た。さらに、[<sup>3</sup>H] CGP-54626 (30 Ci/mmol) の GABA<sub>B</sub> 受容体に対する  $K_d$  値と  $B_{max}$  値を求めため、膜画分懸濁液に各濃度の [<sup>3</sup>H] CGP-54626 を添加し 23、20 分間インキュベートして飽和結合実験を行った結果、 $K_d = 4.46 \pm 0.50$  nM、 $B_{max} = 2495 \pm 392$  fmol / mg protein を得た。競合的結合阻害実験においては、膜画分懸濁液に [<sup>3</sup>H] ムシモール (15.2 nM) または [<sup>3</sup>H] CGP-54626 (4.5 nM) を添加し、さらに各濃度の化合物 B を加えた溶液中で、4、45 分間または 23、20 分間インキュベーションした。インキュベート後、Tris-HCl buffer を加え、Whatman GF/C フィルター (ワットマンジャパン, 東京) に流し込み急速濾過した。フィルターに 3 mL のクリアゾルを加え、翌日液体シンチレーションカウンターで測定した。 $K_i$  値は、Cheng-Prusoff 式より算出した。

## 統計処理

阻害率を検討する際は、データは特異的な結合量を 100% として、平均値 ± 標準誤差で表

した。また、 $IC_{50}$  値は解析ソフト Prism 5 (Graphpad Software Inc, LA Jolla, CA, USA) を用いて算出し、データは平均値と 95% 信頼区間で表した。競合的結合阻害実験における  $K_i$  値の算出は one-site binding model を用いて、解析ソフト Prism 5 により行った。

### (3) 電気生理学的解析

#### BNST を含むスライスの作成

イソフルランで麻酔したマウスを断頭し、脳を素早く取り出して 95%  $O_2$  / 5%  $CO_2$  で通気した氷冷 cutting solution (NMDG based cutting solution; (mM) : NMDG 92, HEPES 20,  $CaCl_2$  0.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10, KCl 2.5,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  1.25, Thiourea 2, sodium ascorbate 5, sodium pyruvate 3, N-acetyl-L-cysteine (NAC) 12,  $NaHCO_3$  30, glucose 25, pH 7.3 - 7.4) に浸した。次に、脳ブロックから BNST (bed nucleus of the stria terminalis; 境界条床核) を含む 250  $\mu m$  の冠状断スライスを切り出した。続いて、95%  $O_2$  / 5%  $CO_2$  で通気したおよそ 34 の cutting solution で 12 分、室温の holding ACSF (Modified HEPES holding ACSF; (mM) : NaCl 92, HEPES 20,  $CaCl_2$  2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2, KCl 2.5,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  1.25, Thiourea 2, sodium ascorbate 5, sodium pyruvate 3, N-acetyl-L-cysteine (NAC) 12,  $NaHCO_3$  30, glucose 25) で 60 分以上インキュベーションした後に実験に使用した。

#### Whole-cell patch clamp 法

研究用ステージ固定式顕微鏡 (BX-51WI, Olympus, 東京) 上に記録チャンバーを置き、95%  $O_2$  / 5%  $CO_2$  で通気したおよそ 34 の recording solution ((mM) : NaCl 119,  $CaCl_2$  2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2, KCl 2.5,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  1.25,  $NaHCO_3$  24, glucose 12.5) を流速 2-2.5 mL/min で灌流させた。この記録チャンバーに脳スライスを置き、赤外線 CCD カメラ (model IR-1000, Dage-MTI, Michigan City, IN) を使用して可視化した BNST 神経細胞から Whole-cell 記録を行った。記録電極はガラスキャピラリー (GC150F-10, HARVARD APPARATUS Co., Natick, MA) から プラ - (Model P-1000, Sutter Instrument, Novato, CA) を使用して作製し、内液 (mM) : KOH 150,  $MgCl_2$  2, KCl 10, EGTA 0.2,  $Na_2ATP$  2,  $Na_2GTP$  0.3, HEPES 10, spermine 0.1, 0.2% biocytin) で満たしたときに抵抗値が 5-10 M になるものを実験に使用した。実験データの記録と解析には Multiclamp 700B amplifier および pClamp10 software (Molecular Devices, Foster City, CA) を使用した。

#### Holding current の測定

ボルテージクランプ法を用いて、薬物処置による外向き電流を計測した。CNQX (10  $\mu M$ )、AP-5 (50  $\mu M$ )、TTX (500 nM)、SNAP-5114 (10  $\mu M$ ) 存在下で膜電位を +10 mV に固定した。膜電位が安定した時点で  $\mu$ シモール (3  $\mu M$ )

を 3 分間処置し、holding current の変化を 10 分間観察した。その後、同様に化合物 B (30  $\mu M$ ) を処置し、holding current を 10 分間観察した。

#### 統計処理

電気生理学的解析において、薬物適用前後の比較には Paired *t*-test を使用した。

### (4) 行動薬理学的解析

#### 薬物の側脳室内投与

抱水クロラル (40 mg/kg, i.p.) 麻酔下、マウスを脳定位固定装置に固定して頭蓋表面を露出させた後、ガイドカニューレ (25 G, 外径; 0.5 mm, 内径; 0.22 mm) を片側に挿入し、歯科用セメント (UNIFAST, GC, 東京) により固定した。ガイドカニューレの先端位置は、側脳室の 3.0 mm 上方 (bregma より AP; -0.3 mm, L; 1.0 mm, DV; 2.0 mm) となるようにした。ガイドカニューレ留置後、少なくとも 5 日間の回復期間の後、行動試験に使用した。各薬物は、血液脳関門透過性の影響を除外するため、側脳室内投与を行った。使用薬物は  $\mu$ シモール 及び化合物 B の二種類で、いずれも PBS に溶解した。コントロール群には PBS を投与した。各薬物及び PBS の側脳室内投与は、インジェクションカニューレ (33G, 外径; 0.2 mm, 内径; 0.08 mm) をガイドカニューレ内へ挿入することにより行った。インジェクションカニューレ先端は、ガイドカニューレ先端から 3 mm の位置 (DV; 5 mm) となるようにした。また、インジェクションカニューレはポリエチレンチューブ (PE8, 夏目製作所, 東京) を介してマイクロインジェクションポンプ (HARVARD APPARATUS, MA, USA) に接続し、投与速度 2.5  $\mu l/min$  で 2 分間かけて、片側に 5  $\mu l/side$  投与した。なお、薬液逆流防止のため、投与後さらに 1 分経過した後にインジェクションカニューレを抜き取った。

#### 尾懸垂試験 (Tail suspension test; TST)

抗うつ作用は、尾懸垂試験を用いて評価した。実験室に 30 分以上静置して馴化させた後に薬物投与を行い、15 分後に尾懸垂試験を行った。尾懸垂試験では、マウスの尾の先端から 1 cm の部分に粘着テープを巻きつけ、測定装置 (室町機械, 東京) 天井の尾固定部に張り付けて床から 30 cm の高さで逆さ吊りにした。マウスは初め逃避行動を示すが、やがて抵抗することをやめる無動状態が認められるようになる。無動時間が長くなるほど抑うつが強いと考えられるため、無動時間の短縮を抗うつ効果の指標として評価を行った。無動時間は自動解析装置により 6 分間計測し、評価には試験開始 1 分から 6 分間の 5 分間の無動時間を用いた。

#### 組織化学的解析

行動実験終了後、マウスを頸椎脱臼・断頭した後ただちに全脳を摘出し、ドライアイス粉末を用いて凍結させた。Cryostat にて冠状切片 (50  $\mu m$ ) を作製し、薬物投与部位周辺の

切片をスライドガラスに貼り付け、2.5% thionin acetate 溶液で染色した後、アルコール系 (50、70、90、100% EtOH) および xylene に通し、封入剤 NEW M・X (60% xylene) により封入した。その後、光学顕微鏡で観察 ( $\times 40$ ) し、側脳室外への投与が確認された個体は、統計処理から除外した。

#### 統計処理

データはすべて mean  $\pm$  SEM で表した。尾懸垂試験における無動時間の評価は、one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test により行い、5%の危機率で有意差を判定した。

#### (5) GABA 取り込み阻害実験

GAT を発現した CHO 細胞を  $2.5 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で 24 well plate に播種し、約 48 時間培養した後に実験に用いた。細胞を KRH buffer (Krebs-Ringer HEPES buffer; (mM) : HEPES 25, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, Glucose 10, NaCl 120, pH 7.4) で 37、5 分間プレインキュベーションした。KRH buffer に 500 nM GABA (495 nM GABA + 5 nM [<sup>3</sup>H]GABA (92.1 Ci/mmol)) を添加し、さらに 100  $\mu$ M の新規合成 GABA アナログ又は GAT 阻害薬を加えた溶液中で 37、20 分間インキュベーションした後に、溶液を吸引除去し氷冷した PBS で洗浄する事で反応を停止した。0.3% Triton-X により細胞を破壊し、3mL のクリアゾルを加え、この細胞破壊液中の [<sup>3</sup>H]GABA 量を液体シンチレーションカウンターで測定した。さらに、BCA protein assay kit を用いて蛋白定量を行った。非特異的な取り込み及び結合は KRH buffer 中の NaCl を除き、かわりに 120 mM choline chloride を加えた溶液中でインキュベートすることで求めた。また、測定データより IC<sub>50</sub> 値を算出し、取り込み阻害活性の指標とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 化合物 B の GABA<sub>A</sub> 受容体、GABA<sub>B</sub> 受容体に対する結合親和性

GABA の構造を基に合成した化合物 B は、GABA 受容体に対する作用を有する可能性が考えられた。そこで、化合物 B の GABA<sub>A</sub> 受容体および GABA<sub>B</sub> 受容体に対する結合親和性を検討した。競合的結合阻害実験より、化合物 B は GABA<sub>A</sub> 受容体に対する K<sub>i</sub> 値が 0.35  $\mu$ M と、GABA<sub>A</sub> 受容体に対して高い結合親和性を示した。一方、GABA<sub>B</sub> 受容体に対する K<sub>i</sub> 値は >100  $\mu$ M であり、化合物 B は GABA<sub>B</sub> 受容体に対しては結合親和性を示さないことが明らかになった。

##### (2) 化合物 B の GABA<sub>A</sub> 受容体に対するアゴニスト作用

化合物 B が GABA<sub>A</sub> 受容体に対して、アゴニストあるいはアンタゴニストのどちらの作用を有しているかを評価するため、ホールセル

パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析を行った。ボルテージクランプ法を用いて、BALB/c マウスより作製した脳スライスに ムシモール (3  $\mu$ M) または化合物 B (30  $\mu$ M) を処置した際の holding current の変化を、GABA<sub>A</sub> 受容体に対する作用の指標とした。ムシモールを処置したところ、外向き電流が観察された (図 1)。この外向き電流は、GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニストである SR-95531 (10  $\mu$ M) を同時に処置することで抑えられた (data not shown)。よって、ムシモール処置により観察された外向き電流は、GABA<sub>A</sub> 受容体を介した Cl<sup>-</sup> イオンの流入によるものだと考えられる。化合物 B を細胞に適用することによっても外向き電流が観察され (図 1)。この外向き電流についても、SR-95531 (10  $\mu$ M) 同時処置により抑制された (data not shown)。以上の結果より、化合物 B は、GABA<sub>A</sub> 受容体に対してアゴニストとして作用することが示唆された。

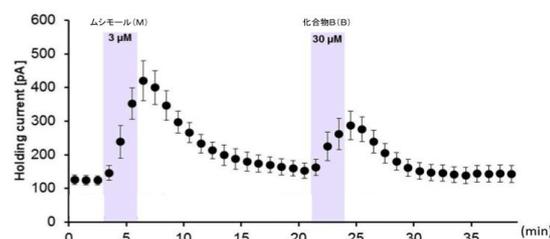


図 1 ムシモールおよび化合物 B による holding current の変化

##### (3) 化合物 B およびムシモールの抗うつ作用

化合物 B のうつ様行動に対する作用に関して、尾懸垂試験を用いて検討した。化合物 B は GABA<sub>A</sub> 受容体に対するアゴニスト活性を有するため、ムシモールにおいても同様の検討を行った。化合物 B とムシモールの GABA<sub>A</sub> 受容体に対する K<sub>i</sub> 値の比より算出し、ムシモールを 0.1, 0.3, 1, 3, 10 ng、化合物 B を 1.5, 5, 15, 50, 150 ng とした。ムシモール投与群はコントロール群と比較して、いずれの投与群においても抗うつ作用の指標となる無動時間に有意な差は認められなかった (図 2)。

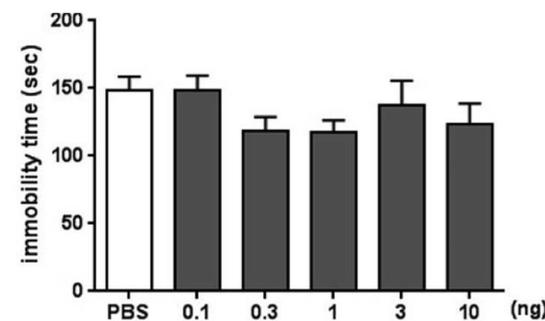


図 2 尾懸垂試験によるムシモールの抗うつ作用評価

一方、化合物 B は、5-150 ng 投与群におい

て、有意な無動時間の減少がみられ、抗うつ作用を有していることが示唆された(図3)

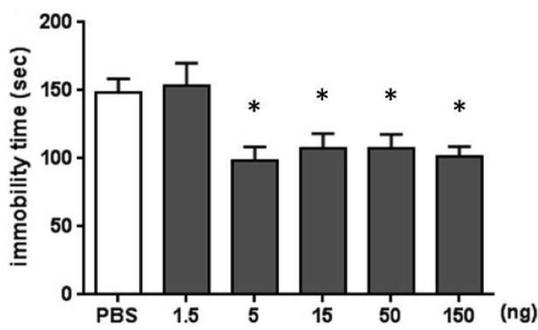


図3 尾懸垂試験による化合物Bの抗うつ作用評価

以上より、化合物Bの抗うつ作用は、BGT-1阻害活性、あるいはBGT-1阻害活性とGABA<sub>A</sub>受容体アゴニスト活性の複合的な作用に起因している可能性が考えられた。しかし、化合物Bとムシモールを用いた検討だけでは、化合物Bの抗うつ作用がBGT-1阻害だけによるのか、GABA<sub>A</sub>受容体活性化との複合的な作用によるのかを評価することは困難である。そこで、BGT-1の役割についてさらなる検討を行っていくため、BGT-1に対する選択性を高めた化合物の創製を試みた。

(4) 新規化合物合成と薬理活性評価  
BGT-1に対し、より選択的な化合物の獲得を目的として、化合物Bの構造をもとに、新たに4化合物を合成した。GAT-1、2、3およびBGT-1を発現する細胞株を用いてGABA取り込みに対する阻害効果を検討したところ、いずれの化合物もGABA取り込み阻害活性を示さなかった。

#### <引用文献>

Nakada K, Yoshikawa M, Ide S, Suemasa A, Kawamura S, Kobayashi T, Masuda E, Ito Y, Hayakawa W, Katayama T, Yamada S, Arisawa M, Minami M, Shuto S, Cyclopropane-based conformational restriction of GABA by a stereochemical diversity-oriented strategy: Identification of an efficient lead for potent inhibitors of GABA transports. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 2013, 4938-4950

Kobayashi T, Suemasa A, Igawa A, Ide S, Fukuda H, Abe H, Arisawa M, Minami M, Shuto S, Conformationally restricted GABA with bicycle [3.1.0]hexane backbone as the first highly selective BGT-1 inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.*, 5, 2014, 889-893

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計2件)

佐藤孝行、井川ありさ、圓山智嘉史、末政亮大、小林嵩明、有澤光弘、井手聡一郎、周東智、南雅文、新規GABAトランスポーター阻害薬候補化合物の薬理活性評価、日本薬学会 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2016、2016年8月24日、東北大学(宮城県・仙台市)

佐藤孝行、井川ありさ、圓山智嘉史、末政亮大、小林嵩明、有澤光弘、井手聡一郎、周東智、南雅文、GABAトランスポーターサブタイプ特異的な新規阻害薬候補化合物の薬理活性評価、日本薬学会第136年会、2016年3月26日~2016年3月29日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[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  
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
南 雅文(MINAMI, Masabumi)  
北海道大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号: 20243040

(3) 連携研究者  
周東 智(SHUTO, Satoshi)  
北海道大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号: 70241346