

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310154

研究課題名(和文)アロディニアの発生機構解明に向けたカイノイド型分子プローブの創製

研究課題名(英文) Design and synthesis of kainoid-type molecular probes for elucidation of the mechanism of allodynia induction

研究代表者

古田 享史 (FURUTA, Kyoji)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40173538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛の主症状であるアロディニアの発生・維持機構に関わる新規受容体を同定することを目的に、カイノイド型化合物を設計し、その合成を行った。カイノイドのピロリジン環骨格に結合した置換基を選択的に構造修飾する手法を確立し、様々な構造のカイノイド類縁体を容易に合成することが可能となった。また、合成したカイノイドのアロディニア活性とグルタミン酸受容体結合能を評価した結果、いくつかの有望化合物を見出すことができた。さらに、カイニン酸受容体の新たな活性化経路が存在する可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Several kainoid-type analogs were designed and synthesized for the purpose of identifying a novel receptor involved in the induction and maintenance of allodynia, a major symptom of neuropathic pain. Efficient synthetic methods to selectively modify the individual substituents attached to the pyrrolidine-ring skeleton of kainoids were established, making it possible to easily prepare kainoid analogs with a variety of substituents. Evaluation of the synthetic kainoids for allodynia-inducing/suppressing activity and binding affinity for glutamate receptors specified some promising analogs as biochemical tools. The existence of a novel activation mechanism of kainate receptor was also suggested.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アロディニア 神経障害性疼痛 アクロメリン酸 カイノイド 分子プローブ グルタミン酸受容体

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

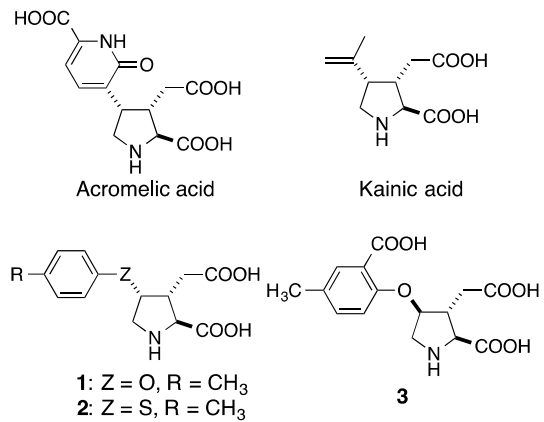
神経障害性疼痛は非ステロイド性抗炎症薬やオピオイドなどの鎮痛剤に抵抗性を示し、有効な治療法のない難治性の疾患である。現在、治療薬創製に向けて分子機構の解析研究が進められているが、関与するシグナル分子や受容体は複雑・多様であり、これまでにその一部が解明されたにすぎない。連携研究者の南らは、神経障害性疼痛の主症状の一つであるアロディニアの発生・維持機構にグルタミン酸-NO が関与するサイクル機構を世界で初めて提唱したが、最近、毒茸の成分であるアクロメリン酸がアロディニアを誘発することを発見した。アクロメリン酸は分子骨格中にグルタミン酸構造を内包しており、グルタミン酸受容体に結合するが、薬理学的解析から、アクロメリン酸に特異的な新規受容体が存在するものと推察された。そこで、本研究代表者は受容体発現組織を探索するため、アクロメリン酸の構造をもとに様々な分子プローブを合成し、解析を行った。その結果、アクロメリン酸によって活性化されアロディニアを誘発する受容体はDRGニューロンに存在し、カイニン酸型と考えられるが、既知の受容体アンタゴニストとの親和性が低く、受容体構成サブユニットやリガンド結合様式が異なる新規受容体であるものと結論した。しかし、標的受容体の同定には至っておらず、その実体は未だ不明である。

2. 研究の目的

アクロメリン酸によって活性化され、アロディニア誘発に関わる新規受容体を同定し、その機能およびシグナル経路を解明することを目的とする。さらに、神経障害性疼痛治療薬への応用に向けて、アロディニア抑制にのみ特異的に働き、副作用を示さない化合物の創製をめざす。受容体の同定及び機能解析には特異的なアゴニスト/アンタゴニストが有用な分子ツールとなる。まず、本研究者がこれまでに開発したカイノイド化合物を基に、既存のグルタミン酸受容体に結合せず、新規受容体への特異性の高い化合物を設計・合成する。続いて、これら化合物を機能性分子プローブ化して活用することにより、アロディニアの誘発に関わる新規受容体の同定をめざす。

3. 研究の方法

これまでの研究で、強力なアゴニスト活性を示す1、アンタゴニスト活性を示す2および3を開発している。いずれも骨格ピロリジン環の4位に芳香環型置換基を有しており、その僅かな構造変化が活性に大きく影響することがわかっている。まず、これら化合物を部位ごとに構造修飾し、アロディニア活性およびグルタミン酸受容体結合能の評価を行う。さらに、未検討であった4位置換基の非芳香環型類縁体を設計・合成する。続いて、プロファイルの良い化合物を放射性プローブや光親和性標識プローブなどの分子プローブへと展開し、受容体探索実験を行う。



以下に具体的な研究方法を示す。

(1)新規カイノイドの設計と合成：ピロリジン環4位のベンゼン環上への置換基の導入、2位および3位置換基の変換、4位をアルキル/アルケニル/アルキニル基を含むエーテル/チオエーテル/アミン型に変換などを行う。

(2)化合物の活性評価：化合物をマウス髄腔内投与し、アロディニア誘発および抑制活性を評価する。

(3)グルタミン酸受容体への結合評価：マウスの脳および脊髄切片を作製し、 $[^3\text{H}]$ カイニン酸などを用いて結合実験を行う。上記(2)の結果と併せて、最適化合物の設計・合成にフィードバックする。

(4)分子プローブの作製：評価結果で良好な活性および標的特異性を示した化合物を基に光親和性標識プローブを合成する。また、動態イメージングに向けてPET(陽電子放射断層画像撮影法)プローブ化する。

(5)受容体同定実験：健常マウス、アクロメリン酸処理によるアロディニアモデル、神経障害性疼痛モデルマウスやその組織切片、培養組織に適用して標的受容体の検索を行う。

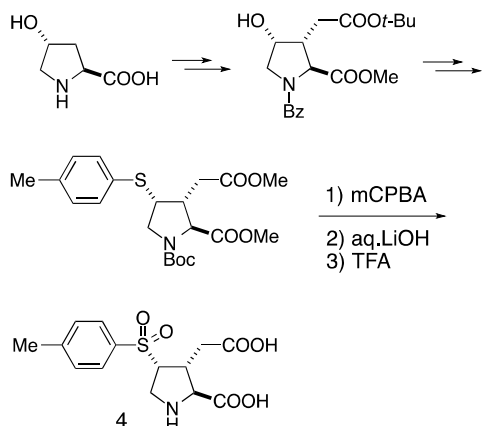
(6)PETイメージング：PETトレーサーによりin vivoでの集積部位の全身検索を行う。

(7)鎮痛効果の検討：神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、創製した化合物を投与して鎮痛効果を検討する。

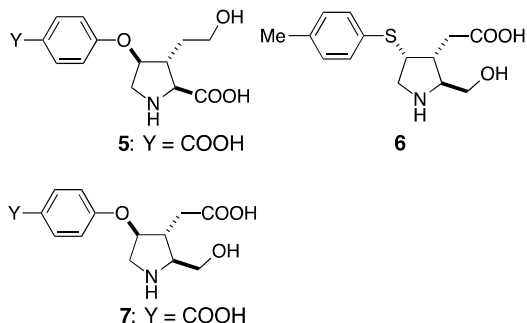
4. 研究成果

アクロメリン酸の構造を基に創製した化合物1~3の構造修飾体と、カイニン酸を基にした新規カイノイド分子を設計し、合成に成功した。まず、2のピロリジン環4位のアリーールチオ基について、ベンゼン環上オルト位へ置換基を導入し、回転障害によるコンフォメーション固定化を狙った誘導体を合成したが、アロディニア抑制、誘発作用ともに活性が減弱した。次に、イオウ原子を酸化してスルホンとした化合物4を合成して活性を評価したところ、アクロメリン酸誘発アロディニアを強く抑制すること、また、高用量でもアロディニア誘発活性が現れないこと、既存のグルタミン酸受容体への結合性が低いことなどがわかった。しかし、神経障害性疼痛モデルの一つであるマウス Chung モデルに

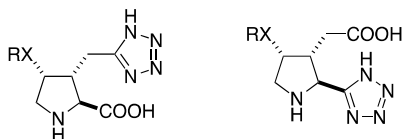
対しては鎮痛効果を示さず、抗アロディニア効果を示す 2 とは異なる結果が得られた。



さらに、ピロリジン環 2 位及び 3 位を修飾した化合物を設計・合成し、アロディニア活性を評価した。その結果、各カルボキシ基を還元した誘導体 5 および 6 がアクロメリン酸以上の強いアロディニア誘発活性を示すこと、2 位カルボキシ基を還元した 7 が低用量でアクロメリン酸誘発アロディニアを強力に抑制することなどが明らかとなった。しかし、7 は高用量ではアロディニア誘発作用を示したことから、複数の標的に作用している可能性が考えられた。

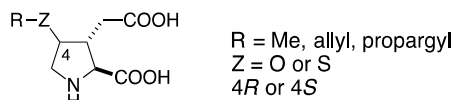


一方、側鎖構造を単純化した化合物では、エーテル型が強いアロディニア誘発作用を示したのに対し、チオエーテル型化合物は 4 位の立体化学の違いによりアロディニア誘発と抑制の相反する活性を示すグループに分かれた。また、2 位、3 位のカルボキシ基を選択的に加水分解することにより、アミド、ニトリル、さらにはカルボキシ基の生物学的等価体であるテトラゾールなどに変換する手法を確立した。

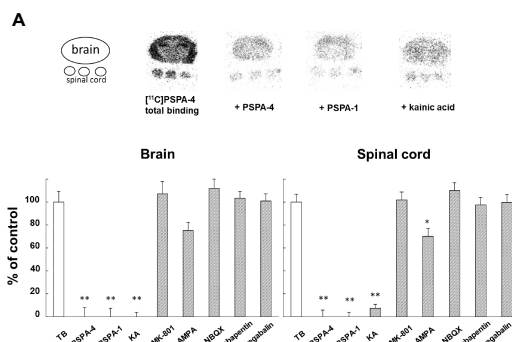


次に、カイニン酸型化合物について、ピロリジン環 4 位にメチル、アリル、プロパルギルエーテル基およびメチルチオエーテル基を導入した化合物の合成に成功した。これら化合物のマウス髄腔内投与によるアロディニア作用と神経障害性疼痛モデルにおける鎮痛作用の検証実験を行ったが、活性の傾向については先行化合物との大きな差異は認

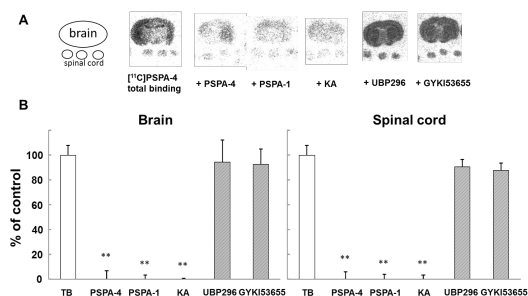
められなかった。以上の結果から、4 位周辺の構造は嵩高い場合には結合能に影響するが、ある程度以下の容積の場合には影響が少ないこと、一方で受容体活性化能には重要な役割を果たしている可能性が推察された。



続いて、化合物 2 の PET プローブである $[^{11}\text{C}]$ PSPA-4 を合成し、トリチウム標識カイニン酸 $[^3\text{H}]$ KA とともにラット脳および脊髄後角組織切片を用いた詳細な *in vitro* オートラジオグラフィ解析を行った。その結果、 $[^{11}\text{C}]$ PSPA-4 と $[^3\text{H}]$ KA の結合領域が一致することを見いだした。このことから 2 はカイニン酸受容体に結合している可能性が考えられた。しかし、 $[^{11}\text{C}]$ PSPA-4 の結合はカイニン酸により阻害されるものの、既存のカイニン酸受容体アンタゴニストで阻害されないことがわかった。



さらに、高用量の 2 により発現するアロディニア誘発作用はカイニン酸受容体サブユニットの GluK1 アンタゴニストおよび GluK1/2 アンタゴニストでは抑制されないが、GluK3 および GluK2/3 アンタゴニストによって抑制されることが明らかとなった。この矛盾する結果については、カイニン酸受容体アンタゴニストの受容体親和性の低さに起因する可能性も考えられる。また、GluK1 サブユニットが発現する DRG ニューロンを用いたカルシウム応答実験の結果、カイニン酸より 2 の方が細胞内カルシウムの上昇作用が大きいことが明らかとなった。以上の結果より、2 は低用量ではアクロメリン酸によるアロディニア誘発作用を競合的に抑制し、高用量ではアロディニアを誘発するが、アクロメリン酸やカイニン酸受容体とは異なる新規受容体を標的とするか、既存のカイニン酸受容体



アンタゴニストでは阻害されないカイニン酸受容体活性化経路を経ている可能性が示唆された。

本研究ではアクロメリン酸と異なる活性プロファイルを持つ新規カイノイドを創製することに成功し、アロディニア誘発に関わる新たな受容体もしくは受容体活性化機構が存在する可能性を見いだすことができた。しかし、わずかな構造の違いにより活性が変化することから、完全な標的特異性を持つ化合物を創製するには至らず、受容体の同定に結びつけることはできなかった。一方で、アロディニアの制御に関わる新規受容体の探索分子ツールとなりうる有望な化合物を創製し、様々なカイノイド化合物を合成するための合成手法を確立することができた。これらの知見はカイノイド型グルタミン酸受容体リガンドの設計に役立つものと考えている。以上、本研究の成果はグルタミン酸受容体に関わるアロディニアの発生・維持機構の解明に寄与するものであり、難治性の神経障害性疼痛治療薬開発に繋がるものと期待される。

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 1件)

1. The action site of the synthetic kainoid (2*S*,3*R*,4*R*)-3-carboxymethyl-4-(4-methylphenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-4), an analogue of Japanese mushroom poison acromelic acid, for allodynia (tactile pain).

S. Miyazaki, T. Minami, H. Mizunuma, M. Kanazawa, H. Doi, S. Matsumura, J. Lu, H. Onoe, K. Furuta, M. Suzuki, S. Ito, *Eur. J. Pharmacol.*, **710**, 120-127 (2013). 査読有り IF 2.778

[学会発表](計 1件)

1. 小岩大智, 金澤奨勝, 宮崎信一郎, 水間広, 土居久志, 尾上浩隆, 鈴木正昭, 南敏明, 伊藤誠二, 古田享史: アクロメリン酸類縁体の PET プローブ化, 第 44 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 一般研究発表会, 2013 年 11 月 3 日, 静岡大学(静岡県・浜松市).

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・ライフサイエンス技術基盤
研究センター・チームリーダー
研究者番号: 00421818