

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07165

研究課題名(和文) 神経因性疼痛治療薬としての新規抗分解性脂肪酸アミド化合物の創製

研究課題名(英文) Development of novel fatty acid amide compounds having resistance to degradation as therapeutic drugs for neuropathic pain

研究代表者

芳地 一 (Houchi, Hitoshi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：00219156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：パルミトイルエタノールアミド(PEA)は、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体PPARの活性化などを介して抗炎症・鎮痛作用を示す脂質化合物である。本研究では、PEAの抗分解性改変体を優れた難治疼痛治療薬として応用することを目指して以下の知見を得た。すなわち、(1) 酸性セラミダーゼが体内でPEAの加水分解に関与することを見出し、(2) PEA改変体のPPAR 活性化能の構造活性相関を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として、まず、セラミドを加水分解する酵素として認識されてきた酸性セラミダーゼを、PEAの新規加水分解酵素として同定したことが挙げられる。さらに、PEAの改変体のPPAR 活性化能に関して構造活性相関を示したことも学術的意義を有する。社会的意義は、神経因性疼痛などの難治疼痛の新規治療薬としてPEA誘導体を応用する上で有用な知見となることである。

研究成果の概要(英文)：Palmitoylethanolamide is a lipid mediator that exerts anti-inflammatory and analgesic actions through activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). The goal of the present study is the application of antidegradable PEA derivatives to superior therapeutic agents for intractable pain, and here we revealed (1) the involvement of acid ceramidase in the hydrolysis of PEA in the body and (2) the structure-activity relationship of PEA derivatives on the PPAR-activating ability.

研究分野：医療薬学

キーワード：疼痛 炎症 脂質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は、癌や物理的刺激による末梢・中枢神経の損傷や機能的障害により誘発され、長期間持続する難治性の疼痛である。その病態生理には不明な点が多く、非ステロイド性抗炎症薬などの従来の鎮痛薬に強い抵抗性を示し、新規鎮痛薬の開発が望まれている。

パルミトイルエタノールアミド(PEA)は長鎖脂肪酸であるパルミチン酸とエタノールアミンが縮合した構造を持ち、*N*-アシルエタノールアミンのひとつに分類される脂肪酸アミド化合物である。PEAは核内受容体であるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 PPAR $\alpha$  に対するアゴニスト作用や、内因性カンナビノイド受容体リガンドであるアナンダミドの分解を抑制する作用など複数の機構により抗炎症・鎮痛作用を発揮する。本化合物は神経因性ないしは炎症性疼痛の緩和にある程度有効なサプリメント・特定医療目的食品として既に欧米で販売されており、さらに医薬品としての開発も進められている。ところが、PEAは体内で遊離脂肪酸であるパルミチン酸とエタノールアミンに速やかに加水分解され、本薬物の有効性を低下させる一因となっている。本加水分解反応を触媒する酵素として、脂肪酸アミド加水分解酵素と *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼがよく知られ、さらに酸性セラミダーゼも関与する可能性が示唆されていたが詳細は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、PEAの化学構造の改変により、加水分解酵素によって分解されにくく強力な新規抗分解性化合物を創製することである。本目的を達成するには、PEAの体内における加水分解機構を確定させる必要がある。そこでまず、セラミドを加水分解するリソソーム酵素として知られる酸性セラミダーゼが、PEAに対する新規加水分解酵素であることを確立した。さらに、種々のPEA改変体について、抗炎症・鎮痛作用の基盤となる PPAR $\alpha$  活性化能に関する構造活性相関を検討し、より作用の強い化合物のデザインを試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 精製酵素を用いた酸性セラミダーゼの PEA に対する加水分解活性の検討

N末端に FLAG タグを付加したヒト酸性セラミダーゼを、リポフェクション法によりヒト腎臓 HEK293T 細胞に過剰発現させた。72時間後に培養上清を回収し、抗 FLAG 抗体 M2 アガロースを用いて酸性セラミダーゼの前駆体を精製した。溶出には FLAG ペプチドを使用した。37度で6時間 pH 4.5 で処理することで自己触媒によるペプチド鎖の限定分解を誘導し、酸性セラミダーゼの活性体に変換した。<sup>14</sup>C 標識基質である C16 セラミドと PEA は、それぞれスフィンゴシンとエタノールアミンを <sup>14</sup>C 標識パルミチン酸と化学的に縮合させることで調製した。酸性セラミダーゼの精製標品を、これらの <sup>14</sup>C 標識基質と 37度で1時間、pH 4.5 で反応させた。脂質を抽出した後、薄層クロマトグラフィーにより生成物である <sup>14</sup>C 標識パルミチン酸を分離し、画像解析により定量した基質と生成物の放射能強度から加水分解活性を算出した。

#### (2) 培養細胞における酸性セラミダーゼの過剰発現および発現抑制による検討

ヒト酸性セラミダーゼおよび *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼを、リポフェクション法によりヒト腎臓 HEK293 細胞に過剰発現させた。24時間後から 0.2  $\mu$ M の脂肪酸アミド加水分解酵素阻害薬 URB597 で処理し、さらに24時間培養した。細胞を回収し、その一部を用いて Bradford 法により蛋白定量を行った。残りの細胞を用いて Bligh-Dyer 法の変法により脂質を抽出し、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS/MS 分析) により PEA レベルを分析した。発現抑制にはヒト前立腺 LNCaP 細胞を用い、リポフェクション法により酸性セラミダーゼ、*N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼ、もしくはその両者の siRNA (標的遺伝子当たり 20 nM) を導入した。72時間後に細胞を回収し、HEK293 細胞と同様の方法で蛋白定量と PEA レベルの分析を行った。

#### (3) PEA 改変体の PPAR $\alpha$ 活性化能の検討

種々の PEA の構造改変体を有機合成した。PEA のパルミチン酸部分をオレイン酸あるいはステアリン酸に、あるいはエタノール部分をプロパノール、ブタノール、1,3-プロパンジオールに改変し、12通りの組み合わせとした。また、それぞれのアセチル化体についても合成した。ヒト子宮頸癌 HeLa 細胞を 96 穴プレート上に培養し、PPAR $\alpha$  酵母転写因子 GAL4 遺伝子と GAL4 調節ルシフェラーゼレポーター遺伝子を、活性炭処理胎仔ウシ血清の存在下でリポフェクション法により導入した。48時間後から 30  $\mu$ M の PEA 構造改変体で24時間処理し、基質を添加して蛍光プレートリーダーを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 精製酵素を用いた酸性セラミダーゼのPEAに対する加水分解活性の検討

酸性セラミダーゼの精製標品はPEAに対して、同種の脂肪酸を有するC16セラミド(*N*-パルミトイルスフィンゴシン)より5.3倍高い活性を示した(図1A)。さらに、当該標品は脂肪酸種の異なる他の*N*-アシルエタノールアミンに対しても加水分解活性を有していた。従って、これまでセラミドを分解する酵素と考えられてきた酸性セラミダーゼが、PEAなどの*N*-アシルエタノールアミンの加水分解に関わることが無細胞反応系の検討により示唆された。

##### (2) 培養細胞における酸性セラミダーゼの過剰発現および発現抑制による検討

HEK293細胞に酸性セラミダーゼを過剰発現させたところ、コントロール細胞と比較して細胞内PEAレベルは33%に減少した(図1B)。この減少効果は陽性対照として用いた*N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼの値(40%)に匹敵するものであった。従って、過剰発現させた酸性セラミダーゼは細胞内でPEAを加水分解することが明らかとなった。次に内在性の酸性セラミダーゼの当該活性を検討するために、本酵素の発現レベルが高いヒト前立腺LNCaP細胞を用いた。siRNA法により内在性の酸性セラミダーゼの発現を抑制したところ、細胞内PEAレベルは2.4倍に上昇傾向を示した(図1C)。この上昇効果は陽性対照である*N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼの発現抑制による値(2.0倍)に匹敵し、さらに、両酵素を発現抑制させると2.9倍とさらなる上昇が得られた。これらの結果から、酸性セラミダーゼはPEA加水分解活性を有することが細胞レベルの検討により明らかとなった。

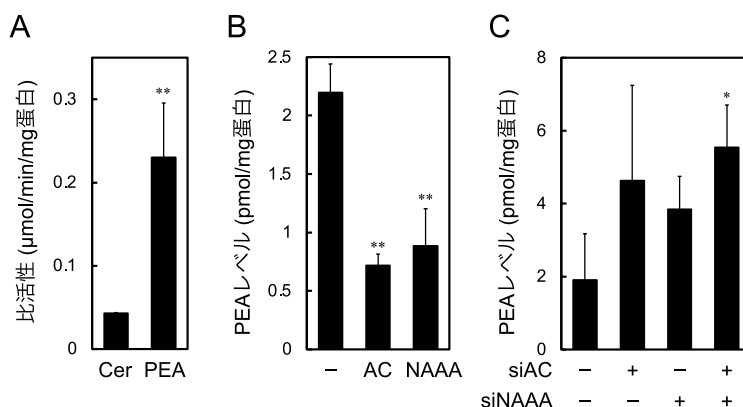


図1 PEAの加水分解に対する酸性セラミダーゼ(AC)の関与  
 A, 精製組換えACのC16セラミド(Cer)およびPEAに対する加水分解活性; B, HEK293細胞のPEAレベルに対するACおよび*N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼ(NAAA)の過剰発現の効果; C, LNCaP細胞のPEAレベルに対するAC (siAC)およびNAAA (siNAAA)の発現抑制の効果  
 Means  $\pm$  SD (n = 3-6); \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01

##### (3) PEA 改変体のPPAR $\alpha$ 活性化能の検討

30  $\mu\text{M}$  のPEAおよび種々のPEA改変体(図2A)のPPAR $\alpha$ 活性化能を、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として用いて評価した(図2B)。PEA(P-1)のPPAR $\alpha$ 活性化能は1.4倍であったが、エタノール部分の炭素鎖を1炭素あるいは2炭素延長した化合物P-2およびP-3では約2倍と増大した。一方、PEA(P-1)のパルミチン酸部分をオレイン酸に変更したO-1では2.6倍に達した。O-1のエタノール部分の炭素鎖を同様に1炭素あるいは2炭素延長した化合物(O-2およびオレオイルブタノールアミド(OBA, O-3))でもO-1と同等の活性化能が保持されていた。PEA(P-1)のパルミチン酸部分をステアリン酸に変更したS-1では低値であり、炭素鎖を延長しても効果はなかった。また、P-1, O-1, S-1ともエタノール部分を1,3-プロパンジオールにすることで分枝させたが活性化能は低値であった(P-4, O-4, S-4)。次に、これらの化合物のヒドロキシ基をアセチル化したところ、活性化能には影響を与えなかったが、溶媒への溶解性が改善した。またOBA(O-3)の濃度依存性についても確認した。以上のようにPEA改変体のPPAR $\alpha$ 活性化能における構造活性相関を明らかとした。今後、本検討で高いPPAR $\alpha$ 活性化能を示したOBAあるいはそのアセチル化体をリード化合物として、より優れた薬物を創製したい。

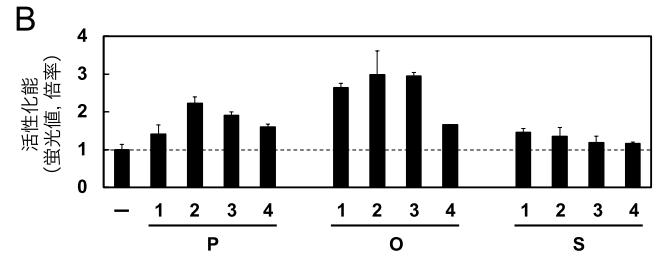
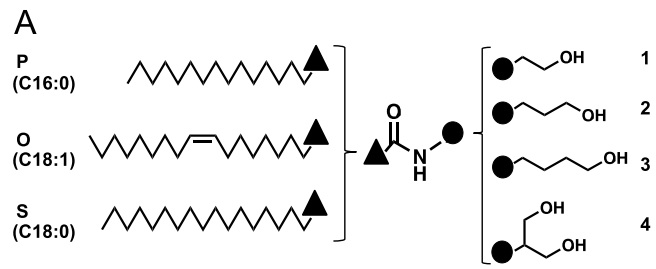


図2 30  $\mu$ Mにおける種々のPEA改変体(A)のPPAR $\alpha$ 活性化能(B)  
Means  $\pm$  SD (n = 3)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuboi Kazuhito, Tai Tatsuya, Yamashita Ryouhei, Ali Hanif, Watanabe Takashi, Uyama Toru, Okamoto Yoko, Kitakaze Keisuke, Takenouchi Yasuhiro, Go Shinji, Rahman Iffat Ara Sonia, Houchi Hitoshi, Tanaka Tamotsu, Okamoto Yasuo, Tokumura Akira, Matsuda Junko, Ueda Natsuo	4. 巻 1866
2. 論文標題 Involvement of acid ceramidase in the degradation of bioactive N-acylethanolamines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2021.158972	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 Taniai Tomohiko, Shirai Yoshihiro, Shimada Yohta, Hamura Ryoga, Yanagaki Mitsuru, Takada Naoki, Horiuchi Takashi, Haruki Koichiro, Furukawa Kenei, Uwagawa Tadashi, Tsuboi Kazuhito, Okamoto Yasuo, Shimada Shu, Tanaka Shinji, Ohashi Toya, Ikegami Toru	4. 巻 112
2. 論文標題 Inhibition of acid ceramidase elicits mitochondrial dysfunction and oxidative stress in pancreatic cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4570 ~ 4579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15123	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 -

1. 著者名 Guo Yiman, Uyama Toru, Rahman S. M. Khaledur, Sikder Mohammad Mamun, Hussain Zahir, Tsuboi Kazuhito, Miyake Minoru, Ueda Natsuo	4. 巻 26
2. 論文標題 Involvement of the Isoform of cPLA2 in the Biosynthesis of Bioactive N-Acylethanolamines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26175213	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 -

1. 著者名 Kitakaze Keisuke, Tsuboi Kazuhito, Tsuda Maho, Takenouchi Yasuhiro, Ishimaru Hironobu, Okamoto Yasuo	4. 巻 62
2. 論文標題 Development of a selective fluorescence-based enzyme assay for glycerophosphodiesterase family members GDE4 and GDE7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlir.2021.100141	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 -

1. 著者名 坪井 一人、宇山 徹、上田 夏生	4. 巻 92
2. 論文標題 N-アシルエタノールアミンの機能と生合成機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 666 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920666	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tsuboi K, Tai T, Yamashita R, Ali H, Watanabe T, Uyama T, Okamoto Y, Kitakaze K, Takenouchi Y, Go S, Rahman IAS, Houchi H, Tanaka T, Okamoto Y, Tokumura A, Matsuda J, and Ueda N
2. 発表標題 Role of acid ceramidase in the hydrolysis of anti-inflammatory and anorexic N-acylethanolamines
3. 学会等名 Experimental Biology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yiman Guo, 宇山徹, S. M. Khaledur Rahman, Mohammad Mamun Sikder, Zahir Hussain, 坪井一人, 三宅実, 上田夏生
2. 発表標題 N-アシルエタノールアミン生合成におけるcPLA2ファミリーの関与
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郭一満, 宇山徹, Rahman S. M. Khaledur, Sikder Mohammad Mamun, Hussain Zahir, 坪井一人, 三宅実, 上田夏生
2. 発表標題 Involvement of isoform of cPLA2 in the biosynthesis of N-acylethanolamine
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪井一人, 渡邊昂, 北風圭介, 竹之内康広, 松田純子, 岡本安雄
2. 発表標題 サポシンDノックアウトマウスを用いた酸性セラミダーゼのN-アシルエタノールアミン加水分解活性の検討
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北風圭介, 坪井一人, 津田真帆, 竹之内康広, 石丸浩靖, 岡本安雄
2. 発表標題 蛍光法によるグリセロホスホジエステラーゼGDE4およびGDE7活性の測定
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪井一人, 渡邊昂, 北風圭介, 竹之内康広, 松田純子, 岡本安雄
2. 発表標題 抗炎症・食欲抑制性脂質メディエーターであるN-アシルエタノールアミンの酸性セラミダーゼによる加水分解: サポシンDノックアウトマウスを用いた検討
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北風圭介, 坪井一人, 津田真帆, 竹之内康広, 石丸浩靖, 岡本安雄
2. 発表標題 グリセロホスホジエステラーゼGDE4およびGDE7活性測定の簡便法開発と阻害剤探索
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪井一人, 渡邊昂, 北風圭介, 竹之内康広, 松田純子, 岡本安雄
2. 発表標題 酸性セラミダーゼによる抗炎症・食欲抑制性メディエーターN-アシルエタノールアミンの加水分解: サボシンD欠損マウスの臓器を用いた検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪井一人, 田井達也, 山下量平, 宇山徹, 岡本蓉子, 郷慎司, 渡邊悦子, Iffat Ara Sonia Rahman, 芳地一, 田中保, 岡本安雄, 徳村彰, 松田純子, 上田夏生
2. 発表標題 N-アシルエタノールアミンの加水分解における内在性酸性セラミダーゼの関与
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇山徹, Smriti Sultana Binte Mustafiz, 森戸克弥, 高橋尚子, 川合克久, Zahir Hussain, 坪井一人, 荒木伸一, 山本圭, 田中保, 上田夏生
2. 発表標題 N-アシル-ホスファチジルエタノールアミンの生成におけるcPLA2 の細胞内基質の検討
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇山徹, Binte Mustafiz Smriti Sultana, 森戸克弥, 高橋尚子, 川合克久, Hussain Zahir, 坪井一人, 荒木伸一, 山本圭, 田中保, 上田夏生
2. 発表標題 バイオフィクターであるN-アシルエタノールアミンの生合成に関わるcPLA2 の機能解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 坪井一人, 田井達也, 山下量平, 宇山徹, 岡本蓉子, 郷慎司, 渡邊悦子, Iffat Ara Sonia Rahman, 芳地一, 田中保, 岡本安雄, 徳村彰, 松田純子, 上田夏生
2. 発表標題 抗炎症・食欲抑制性脂質メディエーターであるN-アシルエタノールアミンの酸性セラミダーゼによる細胞・組織内での加水分解
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Tani ai, Yoshihiro Shirai, Yohta Shimada, Ryoga Hamura, Mitsuru Yanagaki, Naoki Takada, Kazuhito Tsuboi, Yasuo Okamoto, Toya Ohashi, Katsuhiko Yanaga
2. 発表標題 Inhibition of sphingolipid metabolism has ceramide-induced anti-tumor effect on pancreatic cancer cells
3. 学会等名 Clinical Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坪井一人, 田井達也, 山下量平, 宇山 徹, 岡本蓉子, 郷 慎司, 渡邊悦子, Iffat Ara Sonia Rahman, 芳地 一, 田中 保, 岡本安雄, 徳村 彰, 松田純子, 上田夏生
2. 発表標題 抗炎症・食欲抑制性メディエーターであるN-アシルエタノールアミンの酸性セラミダーゼによる加水分解
3. 学会等名 第32回創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪井一人, 田井達也, 山下量平, 宇山 徹, 岡本蓉子, 郷 慎司, 渡邊悦子, ラフマン イッフアット アラ ソニア, 芳地 一, 田中 保, 岡本安雄, 徳村 彰, 松田純子, 上田夏生
2. 発表標題 抗炎症・食欲抑制作用を有する脂質メディエーターであるN-アシルエタノールアミンの分解における酸性セラミダーゼの役割
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坪井一人, 田井達也, 山下量平, 宇山 徹, 岡本蓉子, 郷 慎司, 渡邊悦子, Rahman Iffat Ara Sonia, 芳地 一, 田中 保, 岡本安雄, 徳村 彰, 松田純子, 上田夏生
2. 発表標題 酸性セラミダーゼは抗炎症・食欲抑制性メディエーターであるN-アシルエタノールアミンを生体内で加水分解する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tsuboi K, Uyama T, Ueda N	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 472
3. 書名 Inhibition of NAPE-PLD activity by natural compounds and synthetic drugs, and its biological relevance, Drug Discovery Series No. 76. New tools to interrogate endocannabinoid signalling- from natural compounds to synthetic drugs; pp301-336	

〔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
研究分担者	坪井 一人  (Tsuboi Kazuhito)  (80346642)	川崎医科大学・医学部・准教授   (35303)	
研究分担者	竹之内 康広  (Takenouchi Yasuhiro)  (30582233)	川崎医科大学・医学部・助教   (35303)	
研究分担者	山野 由美子  (Yamano Yumiko)  (50208831)	神戸薬科大学・薬学部・教授   (34512)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	小坂 信二  (Kosaka Shinji)  (70861102)	香川大学・医学部附属病院・教授    (16201)	

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