

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16502

研究課題名(和文) 制御化合物から紐解くかゆみ伝達におけるMrgprの役割そして創薬への応用

研究課題名(英文) Unravelling the role of MRGPRs in itch transmission using activity compounds acquired by drug screening and the potential for drug discovery

研究代表者

山下 智大 (Yamashita, Tomohiro)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：30645635

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)：ハイスループットスクリーニング技術と化合物ライブラリーを駆使して、他のMRGPRsに影響を与えずに選択的にMRGPRA3を活性化する化合物Xを同定した。マウスへの化合物Xの投与は、痛みを伴わずにヒスタミン非依存的な引っ掻き行動を増加させた。さらに、化合物Xによって誘発される引っ掻き行動は、MRGPRA3を発現する一次求心性ニューロンの選択的除去によって抑制された。また化合物X誘発のかゆみは、脊髄においてかゆみ伝達に不可欠なガストリン放出ペプチド受容体を介することを明らかにした。さらに、MRGPRA3またはMRGPC11に対するアンタゴニストも発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

かゆみメカニズムの全容解明やかゆみを制御する薬の開発には、かゆみシグナルを末梢から脊髄に伝達する各種分子の働きや役割のさらなる理解が必要である。

本研究ではハイスループットスクリーニング技術と幅広い化合物ライブラリーを駆使することで、新たなMRGPRA3アゴニストとして化合物Xを見出し、この化合物Xの行動評価を行った結果、ヒスタミン非依存的なかゆみ行動を誘発することが分かった。

MRGPRA3を介するかゆみの伝達経路や潜在能力を明らかにした本研究成果は、かゆみメカニズムの一端を明らかにし、さらには新たな止痒薬の開発に貢献することも期待されるため、学術的意義や社会的意義が高いと考えら

研究成果の概要(英文)：Using high-throughput screening technologies and chemical compound libraries, we identified compound X as being the one that selectively activates MRGPRA3 with efficacy compared to chloroquine and also without affecting other MRGPRs. Intradermal injection of compound X in mice increased prurceptive scratching behavior in a histamine-independent manner and did not produce nociceptive wiping behavior. Further, we showed that compound X-induced itch is mediated by the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), which is essential for itch transmission. We also found compounds with antagonists against MRGPRA3 or MRGPC11.

研究分野：創薬薬理学

キーワード：かゆみ DRG 創薬探索 MRGPRA3 MRGPC11 ドラッグリポジショニング エコファーマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Mas 関連 G タンパク質共役受容体 (MRGPR) ファミリーに分類される MRGPRA3 を発現する一次求心性神経はかゆみシグナルを皮膚から脊髄へと伝達する神経サブセットである。抗マリアリヤ薬であるクロロキンはこの MRGPRA3 を活性化させることでかゆみを誘発することが報告されているが、MRGPRA3 を活性化させるには高濃度が必要なことや非選択的な作用を発揮することから、MRGPRA3 の果たす生理学的役割を理解するにはさらなる分子機構の解明が必要である。また MRGPRA3 をはじめとする各種 MRGPRs は末梢神経系に豊富に発現しているが、内因性リガンドやアンタゴニストが不明であるため、MRGPRs を直接的に制御することにより、かゆみ伝達機構にどのような影響を及ぼすかは未だ明確には解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、ハイスループットスクリーニング技術を駆使することで、既存薬ライブラリーなどの中から MRGPRA3 を選択的かつ強力に活性化する化合物および MRGPRA3 や MRGPC11 の機能を阻害する化合物を取得し、その新たな制御化合物を新たな切り口として MRGPR が関わるかゆみのメカニズムを紐解く。さらには画期的な創薬シーズの発見につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ハイスループットスクリーニング法による Ca^{2+} イメージング法

カルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP6s を発現したヒトアストロサイトマ由来 1321N1 細胞 (1321N1-GCaMP6s) にマウス MRGPRA3 もしくはマウス MRGPC11 を安定発現させた細胞を 96 ウェルプレートに播種し、培養した。翌日、HBSS-HEPES バッファーに置換後、FDSS7000EX を用いて細胞内 Ca^{2+} による蛍光強度を計測した。測定開始して 20 秒後に調製した化合物 (最終濃度 10 μ M) を処置し、さらに 5 分後に MRGPRA3 作動薬のクロロキンはしくは MRGPC11 作動薬の BAM8-22 を処置した。化合物ライブラリーとしてまずプレストウィック天然物ライブラリー (319 化合物) および FDA 承認薬ライブラリー (765 化合物) を評価した。さらに食品関連化合物ライブラリーや承認薬ライブラリーなどを用い、計 3,875 化合物を評価した。ヒット化合物の再評価および濃度依存的な評価には 1321N1 細胞に各種 MRGPRs を安定発現させた細胞を 96 ウェルプレートに播種し培養後、翌日、 Ca^{2+} 蛍光プローブ Fura-2 AM をローディングし、FDSS7000EX を用いて細胞内 Ca^{2+} による蛍光強度を計測した。

(2) TGF α Shedding Assay (TGF α 切断アッセイ) による MRGPRs 機能評価

HEK293細胞に各種MRGPRsの発現プラスミドベクターをリポフェクション法 (ポリエチレンジイミン) により遺伝子導入した。翌日、細胞を剥がしてからHBSS-HEPESバッファーで懸濁し、96ウェルプレートに播種した (細胞プレート)。30分後、リガンドをウェルあたり10 μ Lずつ添加した。1時間の培養ののち、培養上清を別の96ウェルプレートに移した (培養上清プレート)。細胞プレートと培養上清プレートにp-ニトロフェニルリン酸 (p-NPP) 溶液を加え、添加直後および1時間の反応ののち、プレート対応吸光度計により波長405 nmにおける吸光度を測定した。

(3) 使用動物

本実験では、C57BL/6J 雄性マウス、MrgprA3-GFP-Creマウス、ROSA26-DTRマウス、GRPRノックアウトマウスおよびGRPR-eGFP マウスを用いた。動物は、恒温・恒湿および明暗12時間周期 (明期: 8時から20時) の条件下で飼育した。固形飼料および水は自由に摂取できるようにした。すべての実験過程は、九州大学における動物実験関連法令に従って行った。

(4) 化合物投与によるかゆみ行動および痛み行動の評価

8-12 週齢のマウスの頬部または上背部皮膚を投与前日までに剃毛した。同部位へ調製した薬物を皮内投与し、測定用チャンバー (直径 11 cm \times 高さ 18 cm) にマウスを入れ、投与部位に対する 30 分間のかゆみ行動をビデオ撮影し、回数を計測した。かゆみ行動は後肢を投与部位まで引き上げ、引っ掻きの上下運動の後、後肢を再び床に戻すまでの一連の行動を 1 回のかゆみ行動として計測した。ヒスタミン受容体アンタゴニストであるクロルフェニラミンは皮内投与 30 分前に腹腔内投与した。痛み行動は前肢で投与部位を拭う行動を 1 回の痛み行動として計測した。

(5) DRG 組織の急性単離および Ca^{2+} イメージング

ウイルス (AAV-GCaMP6s) 投与後 3-4 週後のマウスにウレタンを腹腔内投与し、翻尾反応の消失を確認した。第 1-第 7 頸部脊髄 (C1-7) 上部の皮膚を切開し、C1-7 脊椎にかけて椎弓除去を行った後、第 2-第 7 頸部脊髄 (後根神経節を含む) を取り出し、氷冷して予め 95% 酸素、5% 二酸化炭素混合ガスを通気させておいたスクロース aCSF 中に移した。スクロース aCSF 中で前根、後根及び脊髄神経を残した状態で第 3、第 4 頸部脊髄後根神経節を単離した。単離した DRG 組

織は 95% 酸素、5% 二酸化炭素混合ガスを通気した aCSF 中に移し、30 分以上室温で静置した。その後、DRG を記録チャンパー上に移し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510) を使用して観察を行った

(6) 免疫組織染色法

ウレタン麻酔下、翻尾反射の消失を確認した後に、前日に剃毛したマウスの後背部左側に薬物を皮内投与した。投与から 30 分後に心臓から 4% paraformaldehyde 溶液を還流し、続いて頸部脊髄を摘出し、単離した脊髄を同溶液中で 4 時間浸漬固定した。その後、冷 30% スクロース溶液中で組織を 48 時間保存し、O.T.C compound に包埋した。クライオスタットを用いて 30 μm の組織切片 (C4-5) を作製し、組織洗浄および、blocking 後、一次抗体反応を 48 時間行った。一次抗体は、抗 pERK 抗体は 1000 倍、抗 NeuN 抗体は 2000 倍、抗 IB4 抗体は 1000 倍、抗 GFP 抗体は 2000 倍希釈で使用した。反応終了後、組織洗浄を行い、蛍光標識した二次抗体を用い暗所で反応を行った。切片の観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた (LSM700)。

4 . 研究成果

(1) MRGPRA3 および MRGPC11 に対するアゴニストおよびアンタゴニストの探索

カルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP6s および MRGPRA3 もしくは MRGPC11 を安定発現させた細胞株に対して、MRGPRA3 を活性化するクロロキニンもしくは MRGPC11 を活性化する BAM8-22 を処置することで、各細胞株においてのみ細胞内 Ca^{2+} 応答が上昇すること確認した。そこで、ハイスループットスクリーニング法によりまず 1,084 化合物を評価したところ、アルカロイドの一種である化合物 X の処置時に MRGPRA3 発現細胞でのみ Ca^{2+} 応答が上昇することを確認した。さらなる化合物スクリーニングを実施したところ、各々の受容体もしくは両受容体を活性化する化合物や、MRGPRA3 の機能を阻害する化合物 A (アドレナリン受容体拮抗薬に分類) および MRGPC11 の機能を阻害する化合物 B (天然に存在する有機化合物) も見出した。

(2) MRGPRA3 へのアゴニスト活性を有する化合物 X の評価

カルシウム蛍光色素 fura 2-AM を用いることで、MRGPRA3 に対して化合物 X を処置した際の EC_{50} 値は 13.6 μM であることを確認した。また異なる GPCR の評価法である $\text{TGF}\alpha$ 切断アッセイを用いても、化合物 X は MRGPRA3 に応答を示し、クロロキニンよりも低濃度で活性化することを確認した (Fig. 1)。次に化合物 X の選択性を確認するため、11 種類の MRGPRs への作用を確認したところ、ヒト MRGPRX1 も含めた他の MRGPRs に対して化合物 X 処置により細胞内 Ca^{2+} 応答は誘発されなかった。

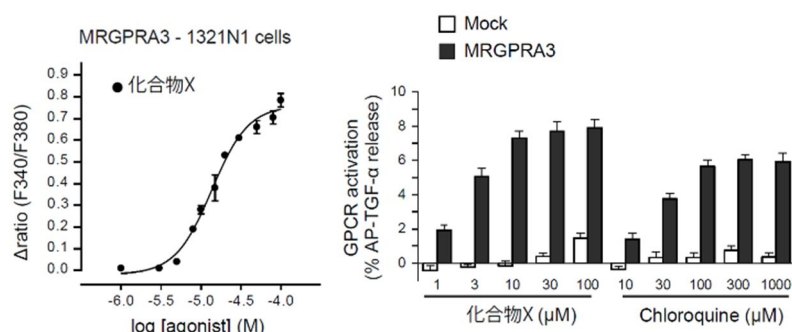


Fig.1 MRGPRA3 に対する化合物 X の効果
(左: Ca^{2+} イメージング、右: $\text{TGF}\alpha$ 切断アッセイ)

(3) 化合物 X の DRG ニューロンへの作用

化合物 X が DRG ニューロンに内在的に発現する MRGPRA3 に作用するか検討すべく、初代培養 DRG 神経細胞および急性単離 DRG ニューロンに対する化合物 X 刺激による細胞内 Ca^{2+} 応答の変化を検討した。その結果、どちらの実験系においてもクロロキニンに感受性のある DRG ニューロンに対して化合物 X が高い応答性を示した。

(4) 化合物 X のかゆみ行動への効果

かゆみ行動に対する化合物 X の効果を検証するため、マウスの上背部皮膚に化合物 X を皮内投与したところ、用量依存的に引っ掻き行動回数の増加が認められた (Fig.2)。一方で化合物 X による引っ掻き行動回数は、同量のクロロキニンによる引っ掻き行動回数に比べ少なかった。同様にマウスの頬部への化合物 X の皮内投与により、引っ掻き行動回数の増加が認められたが、痛み関連行動とされる前足で頬を拭う行動は認められなかった。また、抗ヒスタミン薬であるクロルフェニラミンの前投与により、化合物 X で惹起される引っ掻き行動は抑制されなかった。

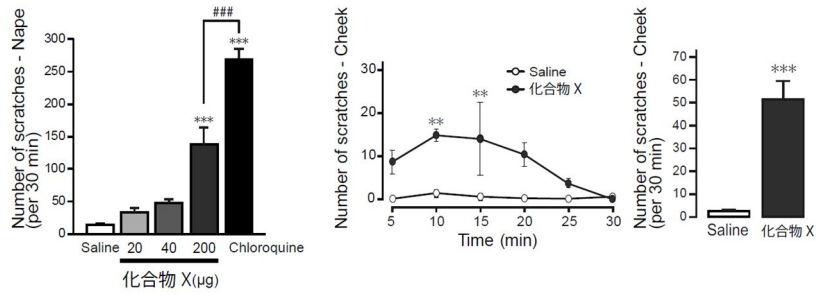


Fig.2 化合物 X 投与によるかゆみ行動
(左：上背部投与での引っ掻き行動、右：頬部投与での引っ掻き行動)

(5) 化合物 X による末梢および脊髄でのかゆみ伝達経路の検証

化合物 X が MRGPRA3 発現神経を介しているかを確認するため、ROSA26-DTR マウスと Mrgpra3-Cre マウスを掛け合わせて Mrgpra3-Cre;ROSA26-DTR マウスを作製し、ジフテリア毒素を処理することで選択的に MRGPRA3 発現神経を除去した。このマウスに化合物 X を処置したところ、対照群と比較して引っ掻き行動回数が有意に抑制された。脊髄後角においてかゆみの特異的伝達分子であるガストリン放出ペプチド (GRP) およびその受容体 GRPR の関与を検証するため、Grpr 欠損マウスの上背部への化合物 X の皮内投与を評価したところ、野生型マウスに比べ引っ掻き行動回数が有意に抑制した。さらに免疫組織染色により、化合物 X 投与後の脊髄後角において、神経興奮のマーカであるリン酸化 ERK (pERK) を観察した結果、pERK の発現量が脊髄後角表層の神経細胞で著しく亢進した。そして pERK 陽性神経細胞の一部は GRPR 陽性細胞と共同在を示すことを観察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita Tomohiro, Kamikaseda Sawako, Tanaka Aya, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Caaveiro Jose M. M., Inoue Kazuhide, Tsuda Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 New Inhibitory Effects of Cilnidipine on Microglial P2X7 Receptors and IL-1 Release: An Involvement in its Alleviating Effect on Neuropathic Pain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 434 ~ 434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10020434	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomohiro Yamashita（山下智大）
2. 発表標題 Discovery of a new MrgprA3 agonist and evaluation of its effect for itch sensation（新規MrgprA3アゴニストの発見およびかゆみ感覚に対するその評価）
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会（誌上開催）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Tomohiro Yamashita
2. 発表標題 Therapeutic approach for the treatment of neuropathic pain by the inhibition of microglial P2X7 receptors from among approved drugs
3. 学会等名 PURINES 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Tomohiro Yamashita（山下智大）
2. 発表標題 A newly discovered MRGPRA3 agonist by high-throughput screening induces scratching behaviors
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会（福岡）
4. 発表年 2021年～2022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
---------	---------