

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15993

研究課題名（和文）細胞特異的なプリン作動性化学伝達の出力系の生理的意義の解明と応用

研究課題名（英文）Elucidation of the physiological significance of cell-specific purinergic chemical transmission

研究代表者

加藤 百合（Kato, Yuri）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10732042

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）：プリン作動性化学伝達は疼痛を始め多彩な生理作用との関連が報告されている。プリン作動性化学伝達の出力系であるATPの小胞内蓄積を司る小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）に着目し、慢性疼痛の発症メカニズムを解明し、組織におけるプリン作動性化学伝達の生理的意義を明らかにすることを目的とした。さらに、VNUT阻害剤を探索し、副作用の少ない、分子標的型の新規医薬品の開発を目指した。本研究により新たに必須脂肪酸のエイコサペンタエン酸がVNUTを選択的に阻害し、ATP放出を制御し、慢性疼痛を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで必須脂肪酸の一つであるEPAは鎮痛効果をもつことが知られていたが、その標的分子は不明であった。今回、新たにEPAがVNUTを標的として慢性疼痛を抑制することを見出した。これらのことから、鎮痛薬についてトランスポーターを標的とした新たな治療戦略を提案することができた。

研究成果の概要（英文）：Purinergic chemical transmission has been reported to be associated with a wide variety of physiological effects, including pain. We focused on vesicular nucleotide transporter (VNUT), which controls the accumulation of ATP in synaptic vesicles. The aim of the project was to elucidate the pathogenesis of chronic pain and to clarify the physiological significance of purinergic chemical transmission in tissues. Furthermore, we explored VNUT inhibitors and aimed to develop novel, molecularly targeted drugs with fewer side effects. This study revealed that eicosapentaenoic acid, an essential fatty acid, selectively inhibits VNUT, regulates ATP release, and suppresses chronic pain.

研究分野：生化学

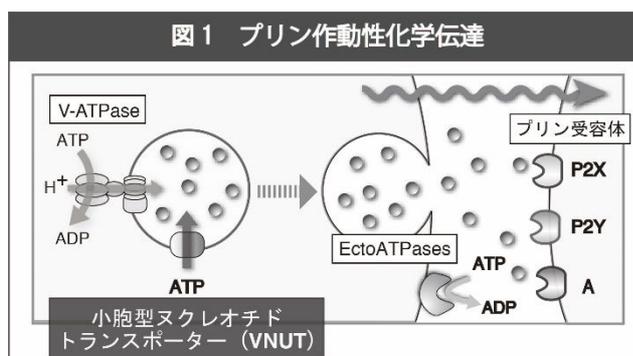
キーワード：ATP プリン作動性化学伝達 慢性疼痛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

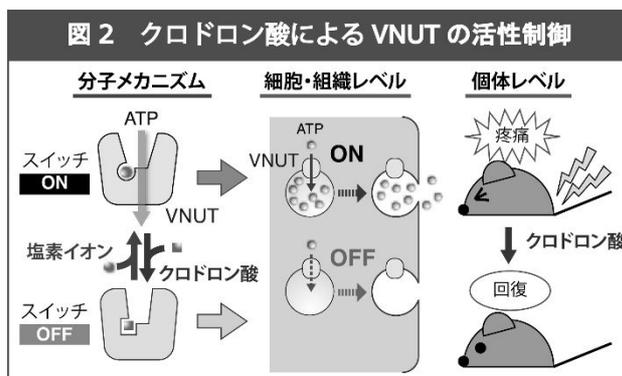
### 1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛のうち神経障害性疼痛は癌、糖尿病、HIV 等による神経の障害、また、炎症性疼痛は癌、痛風、リウマチ等による末梢の炎症が原因となる耐え難い慢性疼痛であり、それぞれ異なるメカニズムで発症する。慢性疼痛の患者数は多いものの、それぞれの原因に応じた治療が必要であり、発症メカニズムが不明なため、副作用の少ないより効果的な鎮痛薬が探されてきた。

慢性疼痛の発症にはヌクレオチドを伝達物質とするプリン作動性化学伝達が必須である。プリン作動性化学伝達では、小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) が ATP を分泌小胞に濃縮し、シナプス間隙に ATP が開口放出される。放出された ATP がプリン受容体に結合することで痛みシグナルが伝達される(図 1)。神経障害性疼痛には、脊髄の神経細胞、ミクログリアの P2X<sub>4</sub> や P2Y<sub>12</sub> 受容体が関与し、一方で、炎症性疼痛には、ミクログリアの P2X<sub>7</sub> 受容体や前シナプスの P2X<sub>2/3</sub> 受容体が関与する。シナプスのプリン受容体は神経興奮を引き起こし、ミクログリアのプリン受容体は炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ や IL-6)により神経炎症を引き起こすことで、慢性痛を増悪する(*J Diabetes Investig.* 7, 17-26, 2016)。これらプリン受容体は慢性疼痛の良い創薬標的であるが、受容体が複数存在するため、ヒトに投薬可能なプリン受容体の特異的阻害薬の開発には至っていない。



以前の研究で、骨粗鬆症治療薬クロドロン酸が VNUT を標的として神経障害性疼痛・炎症性疼痛に対して鎮痛効果を発揮することを見いだした(図 2)。このことから、VNUT は幅広く慢性疼痛を抑制できる有用な標的であると言える。しかしながら、同定した VNUT 選択的阻害剤クロドロン酸は既存医薬品であるため、新薬開発を目的として新たに VNUT を阻害する化合物を探索した。そこで、心血管保護効果、抗炎症効果によって、慢性疼痛、慢性炎症、高脂血症や動脈硬化、糖尿病などに有効であることが報告されていた必須脂肪酸に着目した。このうち、EPA はシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害することで、炎症促進や発痛増強作用を持つプロスタグランジンの産生を抑制することが報告されていた。しかしながら、神経障害性疼痛に EPA は有効であるにも関わらず、COX-2 阻害剤では神経障害性疼痛に対して薬効がみられにくいなどの矛盾点があった。そのため、従来の EPA の分子標的では薬理効果を説明するのは困難であった。応募者は EPA の分子標的は VNUT ではないかと仮説を立てた。



### 2. 研究の目的

本研究は、応募者らが確立した精製・再構成による普遍的な輸送活性測定系を用いて、既承認薬ではなく新たな VNUT 阻害剤を探索し、VNUT を標的とした安全で有効な慢性疼痛の創薬基盤の構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

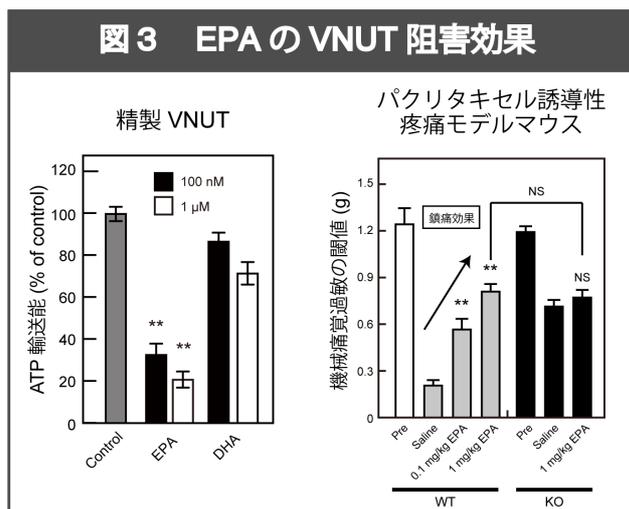
1) ヒト VNUT を大腸菌に大量発現させ、膜画分を界面活性剤で可溶化し、アフィニティー精製した。精製 VNUT を人工膜小胞に再構成し、放射性標識した ATP を加え、EPA を始めとした様々な不飽和脂肪酸を添加し輸送活性を測定した。次に VNUT への阻害様式を検討するために、ATP の認識部位への影響や阻害効果の可逆性を検証した。

2) VNUT の発現が報告されている神経細胞において、EPA 存在下で開口放出による ATP 放出量を測定した。また、刺激により放出される他の伝達物質も同時に HPLC にて測定した。

3) 炎症性疼痛と神経障害性疼痛の両方への寄与が考えられる抗がん剤パクリタキセル誘導性疼痛モデルマウスや外科的に神経を損傷させる Seltzer モデルマウスを用いて、機械刺激、熱刺激による疼痛回避行動における EPA の効果を検証した。

#### 4. 研究成果

本研究により、 $IC_{50}$  が 67nM と低濃度で EPA は VNUT を選択的に阻害することを見出した(Kato Y. *et al.* PNAS 2022)。また EPA の代謝物においても VNUT 阻害効果がみられた。興味深いことに、EPA と同様に必須脂肪酸として知られる DHA の VNUT による ATP 輸送能の阻害効果は弱かった(図 3)。EPA の阻害様式を検証するために、VNUT のもつユニークな活性制御スイッチである塩素イオン依存性を測定した結果、EPA は塩素イオンと競合し、その阻害は可逆的であることを明らかにした。さらに、VNUT の駆動力である膜電位差の形成にも影響しなかった。



次に、実際に VNUT が発現している神経細胞において EPA の作用を検証したところ、EPA は他の伝達物質に影響せずに ATP 放出のみを可逆的に抑制していることを見いだした。

最後に、抗がん剤誘導性神経障害性疼痛モデルマウス、Seltzer モデルマウス、炎症性疼痛モデルマウスにおいて、EPA の鎮痛効果を検証した結果、既存の鎮痛薬より副作用無く強力な鎮痛効果を示した。VNUT 欠損マウスでは各種モデルにおいて EPA による鎮痛効果は見られなかった(図 3)。野生型マウスにおいてパクリタキセル投与 3 日後に疼痛が最大になるが、VNUT KO マウスでは 8 日後に最大になった。疼痛も野生型マウスより VNUT KO マウスの方が有意に小さいことから、VNUT 阻害が神経障害性疼痛の予防に寄与することが明らかになった。さらに、疼痛モデルマウスの脊髄に発痛物質となる ATP、ADP を投与すると、EPA による鎮痛効果が抑制された。このことは、脊髄のミクログリアにあるプリン受容体の活性化により神経性障害性疼痛が引き起こされるという、これまでの報告によく一致している。

これらのことから、長らく不明であった必須脂肪酸の EPA の鎮痛効果は VNUT が標的であることを明らかにした。

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 Kato Yuri, Ohsugi Kengo, Fukuno Yuto, Iwatsuki Ken, Harada Yuika, Miyaji Takaaki	4. 巻 119
2. 論文標題 Vesicular nucleotide transporter is a molecular target of eicosapentaenoic acid for neuropathic and inflammatory pain treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2122158119	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福野雄斗、加藤百合、大杉健剛、岩槻健、原田結加、宮地孝明
2. 発表標題 エイコサペンタエン酸が神経障害性疼痛を抑制する分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤百合、大杉健剛、福野雄斗、岩槻健、原田結加、宮地孝明
2. 発表標題 小胞型ヌクレオチドトランスポーターは神経障害性や炎症性疼痛治療のためのEPAの分子標的である
3. 学会等名 痛み研究会2022
4. 発表年 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
---------	---------