

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15309

研究課題名（和文）新しい疼痛制御分子「リン脂質生合成酵素」を標的にしたドラッグリポジショニング研究

研究課題名（英文）Drug repositioning research targeting new pain control molecules, lysophospholipid acyltransferases

研究代表者

山本 将大（YAMAMOTO, Shota）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・特任研究員

研究者番号：50825693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：神経障害性疼痛は、触刺激でさえも激しい痛みとして感じてしまう病的な慢性疼痛疾患である。申請者は近年、生体膜の主要構成成分であるリン脂質の多様性を形成する責任酵素リゾリン脂質アシル転移酵素ファミリーのうち、LPCAT2およびLPCAT3が神経障害性疼痛病態に関わる可能性を見出していた。本研究では、どの細胞種に発現するLPCAT2やLPCAT3が神経障害性疼痛病態に重要であるかを明らかにした。さらに、既承認医薬品ライブラリーを用いた阻害薬スクリーニングによってLPCAT2やLPCAT3阻害薬を探索し、複数の新規阻害薬候補を見出した。今後の新しい鎮痛薬開発の足がかりとなると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜リン脂質の多様性の生理・病態学的な意義についてはブラックボックスである。本研究では、神経障害性疼痛病態に対して、リン脂質生合成酵素が重要な役割を果たすことを明らかにした。また、リン脂質生合成酵素を標的にしたドラッグリポジショニング研究を遂行し、阻害剤となりうる候補化合物を複数見出した。リン脂質生合成酵素が疼痛疾患に関わる詳細なメカニズムや阻害剤候補化合物の更なる検証が必要ではあるが、今後のリン脂質多様性の生物学、および、新規鎮痛薬開発の足がかりとなる成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Neuropathic pain is a pathological chronic pain disorder in which even tactile stimuli are felt as pain. We have recently discovered that LPCAT2 and LPCAT3, the enzymes responsible for shaping the diversity of phospholipids, may be involved in the pathogenesis of neuropathic pain. In this study, we have identified which cell types in the nervous systems expresses LPCAT2 and LPCAT3, which are important in the development of neuropathic pain. Furthermore, we explored LPCAT2 and LPCAT3 inhibitors by screening using a library of approved drugs, and found several new inhibitor candidates. We hope that these findings will lead to the development of new analgesics in the future.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ドラッグリポジショニング 神経障害性疼痛 リン脂質生合成酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん、糖尿病、ウイルス感染や自己免疫疾患などに起因する神経系組織の損傷は、モルヒネでさえも奏功しない神経障害性疼痛の引き金となる。神経障害性疼痛は世界人口の 7-10% に影響し、患者の生活の質を低下させるだけでなく世界経済にも損失を生み出す (Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17002.)。しかし、その発症と慢性化メカニズムには不明な点が多く、未だ有効な治療薬は存在しない。

すべての細胞膜とオルガネラ膜の主要成分であるグリセロリン脂質は直接的に遺伝子にコードされておらず、様々な酵素タンパク質による化学反応を経て制御される代謝物である。化学構造等の多様性から 1000 種類以上の分子種が存在し、組織や細胞種によって膜リン脂質の組成は異なり、外的環境の変化や病態時にも変動することが知られている。また、更なる酵素反応による代謝物の一部は脂質メディエーターとして多彩な生理機能を発揮する (Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(5):281-296.)。申請者は近年、生体において膜リン脂質多様性を制御する責任酵素群であるリゾリン脂質アシル転移酵素 (LPLATs) ファミリーのうち、LPCAT2 および LPCAT3 の欠損マウスで神経障害性疼痛の症状が軽減する可能性を見出した。LPCAT2 は炎症性のリン脂質メディエーターである血小板活性化因子 PAF の生合成酵素、LPCAT3 はアラキドン酸やリノール酸などのオメガ 6 系脂肪酸を含有するリン脂質の生合成酵素である。

本研究では、神経障害性疼痛病態における LPCAT2 および LPCAT3 の役割の解析、および、既承認医薬品ライブラリーを用いた LPCAT2 および LPCAT3 の阻害薬スクリーニングを実施し、神経障害性疼痛に対する新しい治療薬候補の探索を行う。難治性疼痛に“今”苦しむ患者へ迅速に研究成果を還元することを目指す。

### 2. 研究の目的

神経障害性疼痛への関与が考えられるリゾリン脂質アシル転移酵素 LPCAT2 および LPCAT3 に着目する。それぞれの欠損マウスを用いて疼痛への関与を詳細に検証する。さらに、すでにヒトでの安全性や体内動態など多くのエビデンスが確立済みである既承認医薬品の中から、LPCAT2 や LPCAT3 の阻害薬を探索する。本研究から得られる成果を基に、LPCAT2 や LPCAT3 阻害作用を有する既承認医薬品を『神経障害性疼痛の新規治療薬』として臨床へ迅速に還元することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) LPCAT2 欠損マウス、LPCAT3 欠損マウスの解析

LPCAT2 の解析では、マクロファージ/ミクログリア特異的に CreERT2 を発現する Cx3cr1<sup>CreERT2</sup> マウスを用いる。LPCAT3 の解析では、Cx3cr1<sup>CreERT2</sup> マウスに加えて、DRG neuron 特異的な Cre マウス (Advillin<sup>Cre</sup>)、サテライトグリア/アストロサイト特異的な Cre マウス (Gfap-Cre) を用いる。上記マウスを用いて、末梢神経損傷による神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、疼痛行動解析、脂質分析等を行う。

#### (2) 既承認医薬品ライブラリーを用いた LPCAT2 や LPCAT3 の阻害薬スクリーニング

上述の通り、LPCAT2 はリン脂質メディエーター-PAF、LPCAT3 はアラキドン酸含有リン脂質をそれぞれ特徴的に合成する。そこで、合成量に比例して蛍光強度が増大する簡便な反応系を用いて、各酵素活性を評価する (Tarui M et al., J Lipid Res. 2014.)

##### [1 次スクリーニング]

特許切れの既存薬 1509 種で構成された化合物ライブラリーおよび上記評価系を利用し、LPCAT2/LPCAT3、それぞれの特異的阻害薬候補を探索する。

##### [2 次スクリーニング]

選別した候補薬物の濃度依存性を確認する。阻害活性が強いものから順に、培養細胞を用いた阻害作用の検証を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) LPCAT2 欠損マウス、LPCAT3 欠損マウスの解析

免疫組織染色の結果、LPCAT2 は末梢神経系ではマクロファージ、サテライトグリア、シュワン細胞に発現していた。中枢神経系においては、ミクログリア、オリゴデンドロサイトに発現が認められた。細胞あたりのシグナル強度が最も強く観察されたマクロファージ/ミクログリアに発現する LPCAT2 に着目し、マクロファージ/ミクログリア特異的な LPCAT2 欠損マウスを作製した。本マウスでは、神経障害性疼痛モデル作製時に認められる DRG および脊髄における PAF 量の増加が抑制され、疼痛症状も緩和した。つまり、神経損傷後にマクロファージやミクログリアに発現する LPCAT2 が産生する PAF が疼痛の発症に重要であることが明らかになった。

神経損傷後には、DRG においてアラキドン酸含有リン脂質が増加することを見出している。

Lpcat3 mRNA の発現局在の解析から、神経細胞や非神経細胞に広範に発現することが明らかになった。さらに、神経細胞の中でも、疼痛に関わることが知られる小型神経細胞に選択的に高発現していた。そこで、DRG neuron 特異的、サテライトグリア特異的、マクロファージ特異的な LPCAT3 欠損マウスをそれぞれ作製して解析を進めた。疼痛行動解析から、DRG neuron 特異的およびサテライトグリア特異的な Lpcat3 欠損マウスで疼痛症状が軽減した一方で、マクロファージ特異的欠損マウスはコントロール型マウスと同程度の疼痛症状を発症した。以上より、神経損傷後には DRG neuron やサテライトグリアに発現する LPCAT3 が疼痛発症に重要な役割を果たすことが示唆された。

## (2) 既承認医薬品ライブラリーを用いた LPCAT2 や LPCAT3 の阻害薬スクリーニング

LPCAT2 の阻害薬候補として、酵素活性を指標としたハイスループットスクリーニング（1次スクリーニング）で 43 化合物を選定した。その後、低濃度でも強い阻害活性を示す 4 化合物を選択し、詳細な酵素活性測定を実施した。その結果、4 化合物すべてにおいて既存の LPCAT2 阻害剤 TSI-01 よりも低濃度の IC<sub>50</sub> が得られた。続いて上記 4 化合物について培養細胞系での評価を実施した。RAW264.7 細胞に化合物を前処理したところ、3 化合物では ATP 刺激による PAF 産生量を部分的に抑制できたが、TSI-01 と比較して抑制効果は弱かった。

LPCAT3 の阻害薬候補の探索では、1 次スクリーニングにおいて 1509 から 61 化合物を選定した。2 次スクリーニングにおいて、低濃度でも阻害活性を発揮した 8 化合物をさらに選定し、IC<sub>50</sub> を算出した。既存の LPCAT3 の非特異的な阻害剤であるチメロサールの IC<sub>50</sub> が 0.375 μM であったのに対し、4 化合物は 3.1-7.4 μM、残り 4 化合物が 0.40-0.87 μM の IC<sub>50</sub> であった。そこで、最も IC<sub>50</sub> の低い化合物について、培養細胞系でさらに評価を行ったが、チメロサールがアラキドン酸含有リン脂質の新規合成を阻害したのに対し、候補化合物では阻害活性は認められなかった。

本研究の結果から、神経損傷後には、①DRG マクロファージや脊髄ミクログリアが産生する PAF が疼痛発症に重要な役割を果たすこと、さらに、②DRG においてアラキドン酸含有リン脂質が増加し、知覚神経やサテライトグリアに発現する LPCAT3 がその増加や疼痛発症に必要であることが明らかになった。また、ドラッグリポジショニング研究としては、細胞を用いた検証において既存の非特異的もしくは難水溶性の阻害剤との比較で、より効果的な阻害剤の発見には至らなかったものの、試験管レベルでは強力な阻害剤を複数見出すことができた。今後は、細胞内への透過性が高い化合物の選定や、より広範なライブラリーからの探索を含め、新しい阻害薬の探索を継続する必要がある。病態時における“脂質の質”の変化を切り口に研究を進め、我々の“生活の質”改善へ繋げる成果を創出したい。

## 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 1件）

1. 著者名 Zhang Wei, Matsukane Ryosuke, Egashira Nobuaki, Tsuchiya Yuichi, Fu Rao, Yamamoto Shota, Hirota Takeshi, Ieiri Ichiro	4. 巻 449
2. 論文標題 Neuroprotective effects of ibudilast against tacrolimus induced neurotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 116112 ~ 116112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2022.116112	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 Yamamoto Shota, Hashidate-Yoshida Tomomi, Shimizu Takao, Shindou Hideo	4. 巻 3
2. 論文標題 Profiling of fatty acid metabolism in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pain Research	6. 最初と最後の頁 3:948689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpain.2022.948689	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 Hoshino Yoko, Okuno Toshiaki, Saigusa Daisuke, Kano Kuniyuki, Yamamoto Shota, Shindou Hideo, Aoki Junken, Uchida Kanji, Yokomizo Takehiko, Ito Nobuko	4. 巻 36
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid receptor $\alpha_3$ antagonist inhibits the activation of satellite glial cells and reduces acute nociceptive responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101678R	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 Yamamoto Shota, Egashira Nobuaki	4. 巻 28
2. 論文標題 Lipid signaling in chemotherapy-induced peripheral neuropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Toxicology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cotox.2021.08.007	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 Egashira Nobuaki, Goto Yu, Takahashi Ryota, Iba Hikari, Yamamoto Shota, Watanabe Takuya, Kubota Kaori, Kawashiri Takehiro, Taniguchi Chise, Katsurabayashi Shutaro, Iwasaki Katsunori	4. 巻 147
2. 論文標題 Ibudilast suppresses oxaliplatin-induced mechanical allodynia and neurodegeneration in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 114 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.06.004	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山本将大, 清水孝雄, 進藤英雄
2. 発表標題 Role of arachidonic acid-containing phospholipids in neuropathic pain.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamamoto S, Hashidate-Yoshida T, Shimizu T, Shindou H
2. 発表標題 Macrophage/microglia-produced platelet-activating factor contribute to the development of neuropathic pain.
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本将大, 吉田(橋立)智美, 清水孝雄, 進藤英雄
2. 発表標題 末梢神経損傷時に増加するPAFの産生細胞特定と疼痛への関与
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
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
---------	---------