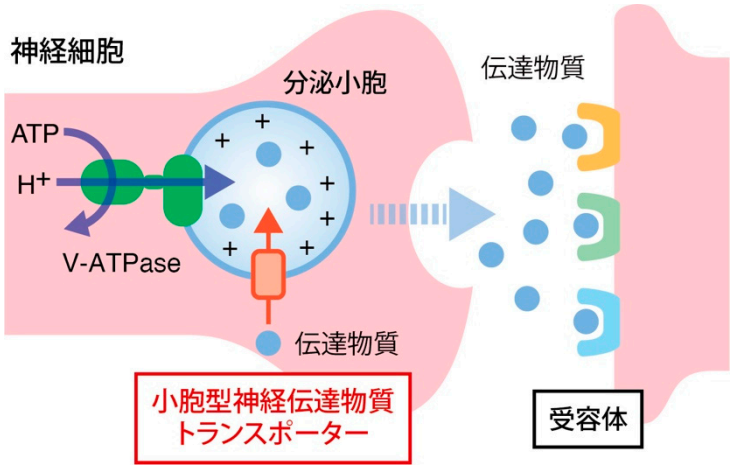
154　トランスポーター創薬を指向した化学伝達の制御	宮地　孝明

【目的】神経障害性疼痛と炎症性疼痛の発症にはグルタミン酸とプリン作動性化学伝達が関与する。小胞型グルタミン酸トランスポーター（VGLUT）と小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）は、それぞれの伝達物質の小胞内充填と放出を司り、化学伝達に必須である。これらトランスポーターは慢性疼痛の良い創薬標的になると期待されるが、小胞型神経伝達物質トランスポーターの良い輸送活性測定法がなかったため、特異的かつ安全な創薬シーズはほとんど見つかっていなかった。そこで我々は、独自のトランスポーターの研究基盤を活かして、これら小胞型神経伝達物質トランスポーターの特異的阻害剤を同定し、ケミカルバイオロジーによる化学伝達の制御システムを構築することを本研究の目的とした。

【方法】VNUT と VGLUT を大腸菌あるいは昆虫細胞に大量発現させ、膜画分を界面活性剤で可溶化、アフィニティー精製し、これを人工膜小胞（リポソーム）に再構成した。再構成リポソームを用いて、バリノマイシン誘導による膜電位依存的な ATP あるいはグルタミン酸輸送活性を測定し、有効な阻害剤を探索した。神経細胞からの脱分極刺激による伝達物質の開口放出を定量し、細胞レベルでの阻害剤の効果を検証した。神経障害性疼痛と炎症性疼痛モデルマウスに阻害剤を静脈投与し、von Frey 試験により機械痛覚過敏を評価した。

【結果】精製・再構成法により小胞型神経伝達物質トランスポーターの阻害剤を探索した結果、nM レベルという極めて低濃度で VNUT の ATP 輸送を阻害する化合物を複数同定することができた。この VNUT 阻害効果は塩素イオン依存的かつ可逆的であった。また、グルタミン酸輸送活性を ON と OFF できる新しい制御因子の同定に成功した。同定した VNUT 阻害剤は、神経細胞からのグルタミン酸や GABA 等の伝達物質の開口放出に影響することなく、ATP の開口放出を選択的に阻害した。VNUT 阻害剤は神経障害性疼痛と炎症性疼痛に既存の鎮痛薬より有効かつ副作用なく鎮痛効果を発揮し、正常なマウスの知覚には影響しなかった。*VNUT* ノックアウトマウスにはこの VNUT 阻害剤は無効であったことから、*in vivo* でも VNUT を標的として鎮痛効果を発揮したと結論した。以上より、トランスポーターを標的とした化学伝達の新しい制御システムを構築することができた。本研究成果はトランスポーター標的型の新しい鎮痛薬の開発に繋がると期待される。

小胞型神経伝達物質トランスポーターの役割



154. トランスポーター創薬を指向した化学伝達の制御

宮地　孝明

岡山大学 自然生命科学研究支援センター ゲノム・プロテオーム解析部門

Key words：トランスポーター創薬，化学伝達，ATP，グルタミン酸，小胞型神経伝達物質トランスポーター

緒　言

慢性疼痛は軽微なものも含めると人口の 20〜25%もの罹患者がいる。その医療費は年に 600 億ドルにものぼり、毎年 100 億ドルずつ増加すると試算されている［1］。このうち、神経障害性疼痛は癌、糖尿病、ヒト免疫不全ウイルス（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がたい慢性疼痛である。疼痛管理は Quality of Life の観点から重要であるが、副作用の少ない、効果的な治療薬はこれまでにない。

神経障害性疼痛と炎症性疼痛の発症にはグルタミン酸とプリン作動性化学伝達が関与する［2, 3］。一連の仕組みは、神経・内分泌細胞の分泌小胞に伝達物質を濃縮・開口放出し、これが受容体に結合することで、シグナル伝達されている。このうち、小胞型神経伝達物質トランスポーターは伝達物質の小胞内充填と放出を司り、化学伝達に必須である。これまで多くの研究者が受容体の特異的阻害剤の開発に取り組んできたが、受容体が複数存在するため、特異的かつ安全な医薬品の開発はほとんど進んでいなかった。また、小胞型神経伝達物質トランスポーターには良い輸送活性測定法がなかったため、その研究開発もほとんど進んでいなかった。

我々や共同研究者らは、真核生物トランスポーターを大腸菌あるいは昆虫細胞に発現させ、膜画分を界面活性剤で可溶化、アフィニティー精製し、これを人工膜小胞（リポソーム）に再構成する方法を確立した［4］。この方法は夾雑物なくトランスポーター単体の機能を高感度で定量的に評価することができるため、他のスクリーニング系では見出すことができなかった新しい阻害剤の同定が期待できる。この方法を用いて、小胞型グルタミン酸トランスポーター（VGLUT）と小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）は塩素イオンにより輸送活性がアロステリックに活性化され、その活性化を代謝物であるケトン体が可逆的に阻害するという、代謝スイッチがあることを見出した［5，6］。このスイッチを選択的にオフすることができれば、画期的なトランスポーター創薬の研究基盤を構築することができる。

そこで、独自のトランスポーターの研究基盤を活かして、この代謝スイッチを特異的に制御する阻害剤を同定することを本研究目的とした。本研究において、複数の VNUT 特異的阻害剤を同定し、これは神経障害性疼痛や炎症性疼痛に有効であることを見出した。また、VGLUT の機能を調節できる制御因子を同定することができた。これらの研究成果は、脳研究の新しい研究ツールの開発、また、神経障害性・炎症性疼痛の新しい創薬シーズの開発に繋がると期待される。

方　法

1. 小胞型神経伝達物質トランスポーターの輸送活性測定

VNUT あるいは VGLUT を含むプラスミドを大腸菌に導入、あるいは、バキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、それぞれ大量発現させた。膜画分を界面活性剤にて可溶化し、可溶性画分を Ni-NTA アフィニティー精製した。精製 タンパク質をリポソームに凍結融解希釈法にて再構成した。

再構成リポソーム内を 150 mM Na^+、外を 150 mM K^+にし、2 μM バリノマイシン（K^+イオノファ）を加え、内側が正の膜電位差を形成させた。10 mM Cl^-存在下で 100 μM [^{3}H]-ATP あるいは 100 μM [^{3}H]-グルタミン酸を加え、

2 分後に Sephadex G50 fine カラムにアプライし、700 g、2 分、4℃で遠心した。液体シンチレーションカウンターでリポソーム内に取り込まれた[^{3}H]-ATP あるいは[^{3}H]-グルタミン酸（溶出液）を定量した。

2. 神経細胞からの伝達物質放出の定量

海馬初代培養神経細胞を Krebs-Ringer にてプレインキュベーションし、高カリウム（55 mM K^+）で脱分極刺激した。20 分後に上清を回収し、ルシフェラーゼ発光法にて ATP を定量し、蛍光標識体の超高速液体クロマトグラフィーにてグルタミン酸や GABA 等を一斉定量した。

3. 疼痛試験

神経障害性疼痛は、雄の C57BL/6 マウスの坐骨神経を部分結紮し（Seltzer 法）、10 日後の機械痛覚過敏を von Frey 試験により評価した。炎症性疼痛は、雄の C57BL/6 マウスの後肢の裏にカラゲニン（1%を 20 μL）を投与し、4 時間後に機械痛覚過敏を von Frey 試験により評価した。生理食塩水あるいは投与化合物は、試験開始前に静脈注射した。

結　果

1.　小胞型神経伝達物質トランスポーター阻害剤の探索

精製・再構成法による小胞型神経伝達物質トランスポーターの機能評価系を用いて、それぞれの阻害剤を探索した。その結果、nM レベルという極めて低濃度で VNUT の ATP 輸送を阻害する化合物を複数同定することができた（図 1a）。それぞれの骨格を有する化合物ごとに構造活性相関を調べ、VNUT を阻害するために必要な化学構造を明らかにした。最も阻害活性の強い阻害剤 X は VNUT の駆動力である膜電位差の形成には全く影響しなかった。高濃度（100 mM Cl^-）の塩素イオン条件では VNUT 阻害効果は消失した（図 1b）。また、阻害剤 X と VNUT を予め混合した後に洗浄すると、VNUT 阻害効果は消失した（図 1c）。これらの結果は、VNUT 阻害効果が塩素イオン依存的かつ可逆的であることを強く示唆している。

一方、VGLUT のグルタミン酸輸送を阻害する化合物を探索したところ、グルタミン酸輸送活性を調節できる新たな制御因子 Y を同定した。制御因子 Y の有無によりグルタミン酸輸送活性は可逆的に機能調節されることがわかった。

2.　ケミカルバイオロジーによる伝達物質の開口放出の遮断

海馬初代培養神経細胞は ATP やグルタミン酸を開口放出するモデル細胞の一つである。高カリウムの Krebs-Ringer のみに比べて、VNUT 阻害剤 X を含む高カリウムの Krebs-Ringer で神経細胞を処理すると、ATP の開口放出は完全に阻害された（図 2）。一方、VNUT 阻害剤 X は興奮性アミノ酸であるグルタミン酸やアスパラギン酸、抑制性アミノ酸である GABA やグリシンの開口放出はほとんど阻害しなかった。VNUT 阻害剤 X は ATP の開口放出を選択的に阻害していた。別の骨格を有する VNUT 阻害剤も評価したところ、同様に、ATP の開口放出を選択的に阻害することを明らかにした。

3.　ケミカルバイオロジーによる疼痛制御

Seltzer 法による神経障害性疼痛モデルマウスに VNUT 阻害剤 X を静脈投与した。その結果、低用量（1 mg/kg）で強力な鎮痛効果を発揮した。正常なマウスに VNUT 阻害剤 X は全く影響しなかった。これは VNUT 阻害剤 X が正常な感覚には影響することなく、病変部位の慢性疼痛を改善できることを強く示唆している。この鎮痛効果を既存の鎮痛薬と比較したところ、汎用されている神経障害性疼痛治療薬のプレガバリンやガバペンチン等よりも、副作用なく有効に鎮痛効果を発揮することを明らかにした。*VNUT* ノックアウトマウスは痛みを感じにくくなっており、このマウスに VNUT 阻害剤 X を投与しても、VNUT 阻害剤 X の効果は全くなかった。これは *in vivo* でも VNUT 阻害剤 X は VNUT を標的として鎮痛効果を発揮しているといえる。

また、カラゲニン誘発性炎症性疼痛を同様に評価したところ、VNUT 阻害剤 X は有効な鎮痛効果を発揮した。この鎮痛効果は非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）よりも有効であった。この他に同定した VNUT 阻害剤を用いて神経障害性疼痛と炎症性疼痛モデルマウスで評価しても、同様に強力な鎮痛効果を発揮した。

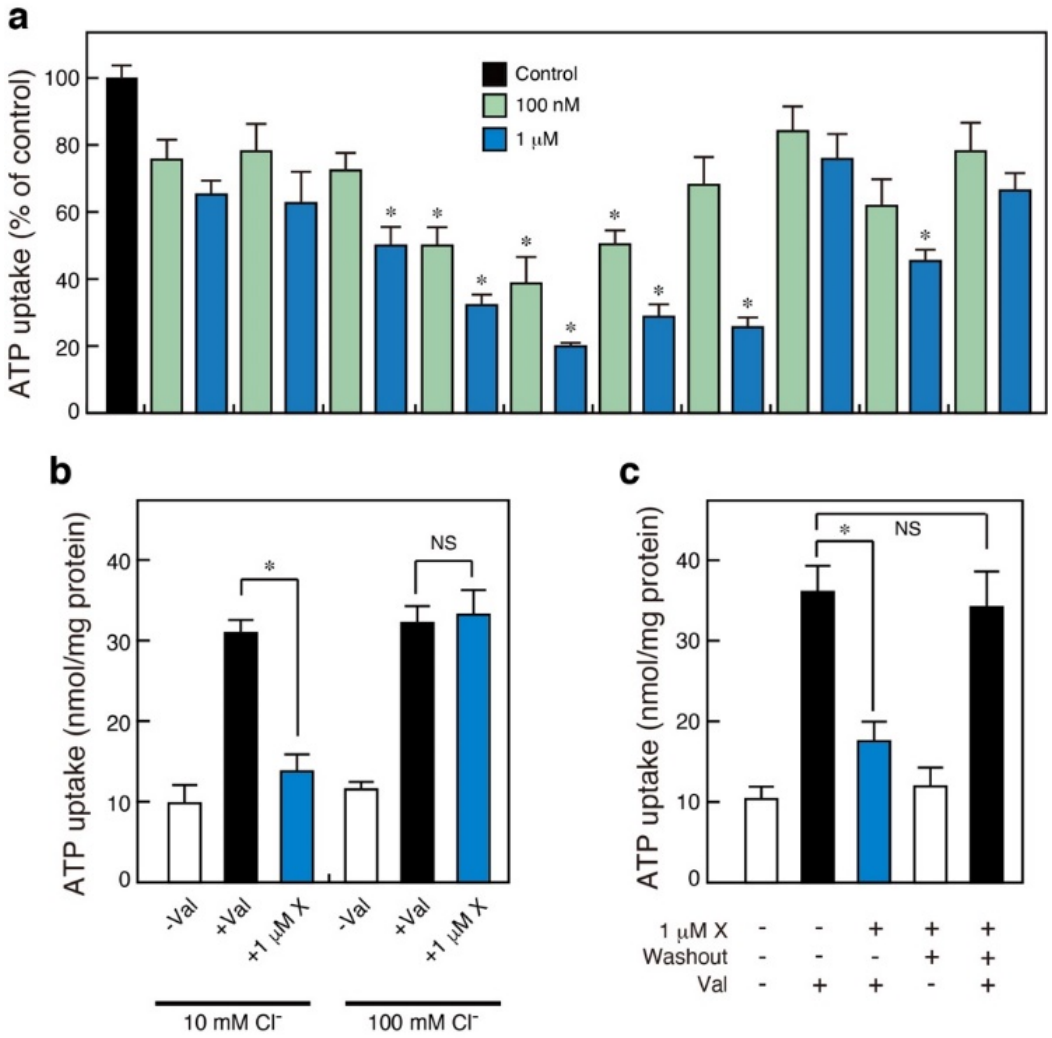


図 1. VNUT 阻害剤の同定とその作用機序

a) リポソーム内を 150 mM Na^+、5 mM Mg^{2+}、外を 150 mM K^+、5 mM Mg^{2+}、10 mM Cl^-にして、100 μM ATP と 2 μM バリノマイシンを加え、2 分間、27℃でインキュベートした。候補化合物を終濃度 100 nM（緑）と 1 μM（青）になるように調製し、阻害効果を評価した。コントロール（黒）は候補化合物の非添加群である。

b) 10 mM Cl^-あるいは 100 mM Cl^-存在下で、ATP 輸送活性に対する 1 μM VNUT 阻害剤 X の効果を評価した。反応開始後、2 分間、27℃でインキュベートした。Val：バリノマイシン。

c) 1 μM VNUT 阻害剤 X を処理した後に VNUT プロテオリポソームを洗浄し（Washout＋）、ATP 輸送活性を評価した。反応開始後、2 分間、27℃でインキュベートした。

統計学的有意差は Student's t 検定、あるいは、ANOVA 検定後に Dunnett 検定を用いて算出した。*$p<0.05$、NS：not significant で示した。

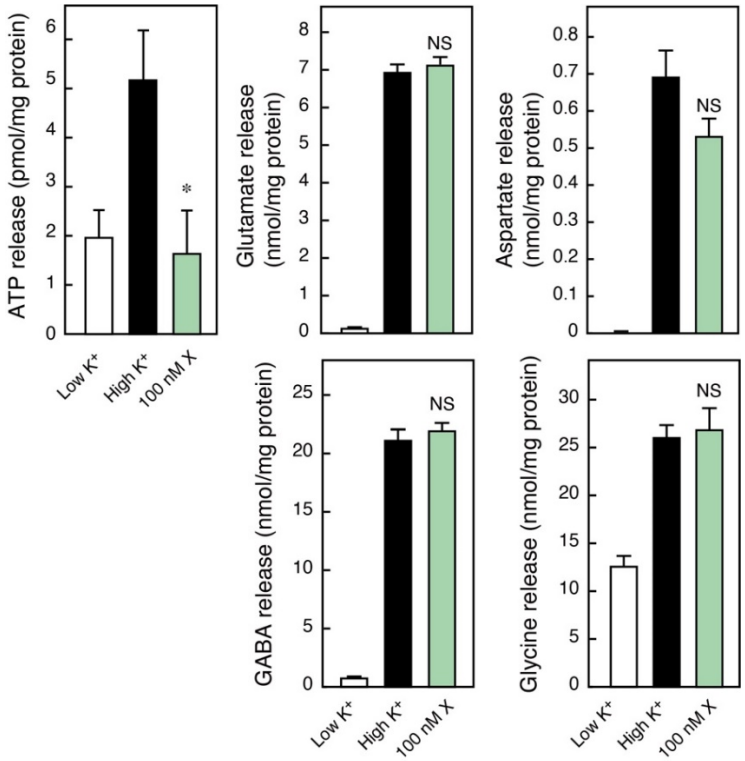


図 2. VNUT 阻害剤は ATP の開口放出を選択的に阻害する

海馬神経初代培養細胞を 100 nM VNUT 阻害剤 X で処理し、高カリウムの脱分極刺激による ATP、グルタミン酸、アスパラギン酸、GABA、グリシンの開口放出を定量した。刺激開始後、20 分間、37℃でインキュベートした。統計学的有意差は Student's t 検定を用いて算出した。

*p＜0.05、NS：not significant で示した。

考　察

プリン作動性やグルタミン酸作動性化学伝達は慢性疼痛の発症に重要であることから、有望な創薬標的といえる。これまでトランスポーターの良い輸送活性評価系がなかったため、トランスポーター創薬を指向した化学伝達の制御に関する研究は未開拓の研究分野であった。

我々や共同研究者らはこれまでに VNUT を同定し、神経障害性疼痛、炎症性疼痛と慢性炎症の発症に VNUT が重要であること、VNUT を阻害することで、外見上には影響なく、慢性疼痛が改善することを明らかにした［6, 7］。本研究以外にも、骨粗鬆症治療薬の第一世代ビスホスホネート製剤クロドロン酸が VNUT 特異的阻害剤であり、VNUT 依存的に慢性疼痛を改善できることを明らかにしてきた［6］。本研究では、これまでと全く化学構造の異なる複数の化合物から強力な VNUT 阻害剤を同定し、いずれも強力な鎮痛効果を発揮することを明らかにした。複数のタイプの阻害剤を用いることで、オフターゲット効果を可能な限り排除した薬理学的検討が可能になった。また、クロドロン酸は既存医薬品であるため、その体内動態とヒトへの安全性はすでに実証されている。今後、ヒトに投与可能な VNUT 阻害剤が神経障害性疼痛や炎症性疼痛の画期的な新薬になると期待される。

一方、*VGLUT* ノックアウトマウスも慢性疼痛を発症しにくいことが報告されているが［3, 8］、VGLUT 阻害剤の鎮痛薬としての有効性はまだほとんど明らかになっていない。我々は、この機能を調節できる新たな制御因子を同定することができた。ケミカルバイオロジーによるグルタミン酸放出の制御が鎮痛薬の開発に有効か、今後、更なる検証が必要である。また、小胞型神経伝達物質トランスポーターの機能調節により細胞間隙の伝達物質の量をコントロールし、疼痛制御できたことから、他の小胞型神経伝達物質トランスポーターの特異的阻害剤を同定していくことで、新たな脳研究ツールを提供できると期待される。

謝　辞

本研究に至る過程においてご指導・ご助言下さりました森山芳則先生、表弘志先生、また、ご協力頂きました皆様に深く感謝申し上げます。*VNUT* ノックアウトマウスは味の素株式会社、トランスポーター発現プラスミドは Nathan Nelson 先生（テルアビブ大学）にご提供頂きました。

文　献

1） Holmes D. The pain drain. Nature 2016 Jul 14;535(7611):S2-3. PMID: 27410529 DOI: 10.1038/535S2a

2） Masuda T. et al. Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. Nat Commun. 2016 Aug 12;7:12529. PMID: 27515581 DOI: 10.1038/ncomms12529

3） Seal RP. et al. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. Nature 2009 Dec 3;462(7273):651-5 Epub 2009 Nov 15. PMID: 19915548 DOI: 10.1038/nature08505

4） Omote H. et al. Structure, function, and drug interactions of neurotransmitter transporters in the postgenomic era. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2016;56:385-402. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26514205 DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124816

5） Juge N. et al. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. Neuron 2010 Oct 6;68(1):99-112. PMID: 20920794 DOI: 10.1016/j.neuron.2010.09.002

6） Kato Y. et al. Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. Proc Natl Acad Sci USA. 2017 Aug 1;114(31):E6297-E6305. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28720702 DOI: 10.1073/pnas.1704847114.

7） Sawada K. et al. Identification of a vesicular nucleotide transporter. Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Apr 15;105(15):5683-6. Epub 2008 Mar 28. PMID: 18375752 DOI: 10.1073/pnas.0800141105

8） Scherrer G. et al. VGLUT2 expression in primary afferent neurons is essential for normal acute pain and injury-induced heat hypersensitivity. Proc Natl Acad Sci USA. 2010 Dec 21;107(51):22296-22301. Epub 2010 Dec 6. PMID: 21135246 DOI: 10.1073/pnas.1013413108