

VNUT 特異的阻害剤の開発とその薬学的応用

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

宮地 孝明

1. はじめに

神経・内分泌細胞は分泌小胞に充填した ATP を開口放出し、プリン受容体を介して情報を伝達する。これがプリン作動性化学伝達であり、血圧や血糖等の代謝調節、痛覚等の感覚受容、学習・記憶等の高次精神活動、炎症応答や血液凝固といった多彩な生理作用を制御する（文献1）。しかし、これまでに得られた結果は、全て受容体とそれ以降のシグナルカスケードの研究成果に基づくものであり、ATP の小胞内充填とその放出機構はほとんどわかっていなかった。

こうした状況下、我々は真核生物のトランスポーターを機能解析できる普遍的な方法を開発し、ATP を分泌小胞に充填する小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）を同定した（文献2, 3）。VNUT の発見により ATP 放出機構を解析するための強力かつ有効な膜分子が誕生した。VNUT は、脳の神経細胞、副腎のクロマフィン細胞、膵臓のβ細胞を含む神経・内分泌系の分泌小胞に局在していた。VNUT ノックアウトマウスでは、ATP の小胞内充填とその放出がなくなり、その結果、大きな外見上の変化がないにも関わらず、インスリン分泌とインスリン抵抗性の向上により、血糖値が低下し、生活習慣病で問題となる要因が改善されていた（文献4）。

また、我々は、VNUTは塩素イオンによる活性制御スイッチがあり（文献5, 6）、さらに、この制御スイッチを特異的かつ可逆的に阻害できる画期的な化合物を同定することに成功した（以下、化合物Xと表記）。この化合物はヒトに毒性がないことがすでに知られており、低濃度でプリン作動性化学伝達を制御することができる。高血糖やインスリン抵抗性は、脳梗塞や心筋梗塞などの主要な生活習慣病の発症リスクを大きく上昇させるため、化合物Xは糖尿病を含む生活習慣病の治療薬になると期待できる。本研究の目的は、この化合物の有用性をタンパク質・細胞・個体レベルで証明し、生活習慣病治療薬としてのリード化合物を見いだすことである。

2. 方法

1) VNUTの精製・再構成

ヒトVNUTのN末端とC末端領域にアフィニティー精製するためのヒスタグと、αヘリックス構造を持つ可溶性タンパク質であるYbeL (β) を付加したプラスミドを大腸菌に導入し、VNUTを大量発現させた。膜画分を1.5% Fos-choline 14 (界面活性剤) にて可溶化し、可溶性画分をNi-NTAアフィニティーカラムにて精製した。精製VNUTを人工膜小胞に凍結融解希釈法にて再構成した。

2) VNUTのATP輸送活性測定

再構成人工膜小胞内を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。これに100 μM [³H] ATPを加え、インキュベーション後にSephadex G50 fine カラムにアプライし、700 x g、2分、4°Cで遠心した。液体シンチレーションカウンターにて小胞内に取り込まれた[³H] ATP (溶出液) を定量した。

3) 神経細胞からのATP放出の定量

海馬神経の初代培養細胞をKrebs-Ringerにてプレインキュベーションし、高カリウムによる脱分極刺激した。20分後に上清を回収し、ルシフェラーゼ法にてATP、HPLC法にてグルタミン酸を定量した。

4) 疼痛の鎮痛試験

炎症性疼痛は、Complete Freund's adjuvant (CFA) あるいはカラゲニンをマウスの左後肢に皮下注射し、熱痛覚過敏と機械痛覚過敏をそれぞれplantar試験と von Frey試験により評価した。一方、神経因性疼痛は、大腿部の坐骨神経を部分結紮し (Seltzer法)、機械痛覚過敏を評価した。化合物は試験開始の1時間前に静脈注射した。

5) グルコース負荷試験

18時間絶食したマウスに、2g/kg グルコースを経口投与し、経時的な血糖値と血中インスリン値を測定した。化合物は試験の1時間前に静脈注射した。血糖値とインスリン値はそれぞれグルテストセンサーとELISA kitにより定量した。

3. 結果

我々が開発したトランスポーターの輸送活性評価法を用いて、化合物XのVNUTへの阻害様式を生化学的に

検討した。その結果、化合物Xは $IC_{50}=15.6$ nMという極めて低濃度でVNUTを阻害し、その阻害効果は塩素イオンと競合的であり、ATPとは競合しなかった。また、事前にVNUTと化合物Xをインキュベーションし、洗浄後、ATP輸送活性を測定すると、この阻害効果は完全に回復した。阻害効果の選択性を評価するために、その他の小胞型神経伝達物質トランスポーター、VNUTが属するSLC17型トランスポーターに対する阻害効果を評価したが、いずれも全く阻害しないか、阻害したとしてもVNUTの1/1000以下の阻害効果であった。

化合物Xの有効性を細胞レベルで評価した。神経細胞は分泌小胞内にATPを蓄積し、脱分極刺激によりATPなどの伝達物質を開口放出する。100 nMという低濃度の化合物Xを添加するだけでATP放出は完全に阻害され、この阻害効果は可逆的であった。一方で、化合物Xはグルタミン酸放出を全く阻害しなかった。

プリン作動性化学伝達が関与し、副作用の少ない効果的な治療薬が開発されていない疾患治療を目的として、炎症性・神経因性疼痛、血糖制御に対する化合物Xの有効性を評価した。その結果、化合物Xは低用量で炎症性・神経因性疼痛に対して強力な鎮痛効果を発揮した。その一方で、非病変部位では全く鎮痛効果はなかった。VNUTノックアウトマウスでは、この鎮痛効果は完全に消失していた。興味深いことに、臨床で汎用される神経因性疼痛治療薬、プレガバリンよりも化合物Xは強い神経因性疼痛の治療効果を発揮した。プレガバリンは薬効の強さに応じて、強い眠気を引き起こしたが、化合物Xではそのような副作用は観察されなかった。

また、炎症性疼痛を発症したVNUTノックアウトマウスは、野生型に比べ浮腫が小さいことを明らかにした。炎症性疼痛を発症した野生型マウスに化合物Xを投与すると、カラゲニンとCFAによる浮腫が小さくなった。これは化合物Xが免疫細胞からのATP分泌を阻害することで、血中の炎症性サイトカインが著しく低下するためであることを明らかにした。

最後に、グルコース負荷試験により血糖値と血中インスリン値を時間依存的に測定したところ、化合物Xを投与することで、インスリン分泌が上昇し、耐糖能が改善することを明らかにした。この時、血糖値や血中インスリン値のベースラインは変わらなかった。これらの効果は、VNUTノックアウトマウスと同じであった(文献4)。

4. 考察

我々は *in vivo* でも有効な VNUT 特異的阻害剤を同定することに成功した。本研究は、ケミカルバイオロジーによる小胞型神経伝達物質トランスポーターの制御により、化学伝達を *in vivo* で選択的にコントロールした最初の報告である。SLC17 型トランスポーター群はいずれも塩素イオンによるアロステリック活性化機構を有するが、VNUT だけを選択的かつ可逆的に阻害することができた。これは、それぞれの塩素イオンの活性化スイッチの構造が少しずつ異なることを示しており、他の SLC17 型トランスポーターの選択的な制御も可能であると考えられる。

VNUT の塩素イオン活性化スイッチを制御することで、プリン作動性化学伝達が関わる疼痛や炎症、血糖を制御できることを明らかにした。この化合物は非病変部位に影響せず、既存医薬品より強力であったことから、副作用の少ない画期的な生活習慣病の治療薬になると期待される。また、プリン作動性化学伝達はこの他、様々な難治性疾患にも関与していることが報告されているため、VNUT 阻害剤は幅広い医薬品展開が期待できる。特に、神経因性疼痛を合併した糖尿病(糖尿病性神経因性疼痛)に対して VNUT 阻害剤は、鎮痛作用、血糖低下作用、インスリン分泌促進作用、インスリン抵抗性改善作用、抗炎症作用等が期待できる。これほど多くの治療効果を発揮する医薬品は他に例がない。

この化合物はすでに異なる疾患で医薬品として承認されているため、ヒトに対する安全性が実証され、薬物動態もわかっている。既存医薬品の中から、新しい薬効を見いだす手法はドラッグリポジショニングと呼ばれ、薬の開発期間の短縮、研究開発コストやリスクの低減等が期待されている。VNUTの阻害効果は、既知の薬効よりも1000倍以上強力であったため、ドラッグリポジショニングによる新しい治療戦略を提供することができる。

5. 参考文献

1) Burnstock G.

Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission.
Physiol. Rev. **87**, 659-797 (2007)

2) Sawada K., Echigo N., Juge N., Miyaji T., Otsuka M., Omote H., Yamamoto A., Moriyama Y.

Identification of a vesicular nucleotide transporter.
Proc. Natl Acad. Sci. USA **105**, 5683-5686 (2008)

3) Miyaji T., Sawada K., Omote H., Moriyama Y.

Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter.
J. Biol. Chem. **286**, 42881-42887 (2011)

4) Sakamoto S., Miyaji T., Hiasa M., Ichikawa R., Iwatsuki K., Shibata A., Uneyama H., Takayanagi R., Yamamoto A., Omote H., Nomura M., Moriyama Y.

Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity.
Sci. Rep. **4**, DOI:10.1038/srep06689 (2014)

5) Juge N., Gray J.A., Omote H., Miyaji T., Inoue T., Hara C., Uneyama H., Edwards R.H., Nicoll R.A., Moriyama Y.

Metabolic control of vesicular glutamate transport and release.
Neuron **68**, 99-112 (2010)

6) Hiasa M., Togawa N., Miyaji T., Omote H., Yamamoto A., Moriyama Y.

Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets.
Physiol. Rep. **2**, DOI: 10.14814/phy2.12034 (2014)