

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名：(日本語) プリン作動性化学伝達を制御する機能性脂質代謝物の同定とその分子メカニズムに基づく創薬基盤の構築
(英語) Identification of functional lipid metabolites to control purinergic chemical transmission, and the molecular mechanism-based drug discovery research.

研究開発担当者 (日本語) 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 准教授 宮地 孝明

所属 役職 氏名：(英語) Advanced Science Research Center, Department of Genomics & Proteomics. Associate Professor, Takaaki Miyaji

実施期間：平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)

開発課題名：(英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要(総括研究報告)

和文：

本研究課題は、プリン作動性化学伝達の独自の視点から、脂質代謝物の新しい生理機能とその分子メカニズムを解明し、それに基づく神経因性疼痛の革新的医療基盤の構築

を目指す。本年度は主に以下の研究成果を得た。

精製・再構成法を用いて、小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) の阻害剤を探索した結果、VNUT に対して nM レベルで阻害する化合物を同定することができた。作用メカニズムを調べると、アロステリックに VNUT を阻害することがわかった。その他の小胞型神経伝達物質トランスポーターは VNUT の 1 / 1000 以下の阻害効果しか示さなかった。

この化合物は初代培養神経細胞からの ATP 放出を低濃度で選択的かつ可逆的に抑制した。組織レベルにおいても、この化合物はプリン作動性化学伝達を制御することができた。神経因性疼痛モデルマウスにこの阻害剤を投与すると、低濃度で鎮痛効果を発揮した。既存の神経因性疼痛治療薬と薬効を比較した結果、プレガバリン、ガバペンチンよりも低濃度で鎮痛効果を発揮した。既存医薬品の代表的な副作用である眠気等は VNUT 阻害剤では観察されなかった。

神経細胞の他、炎症応答に関わる免疫細胞からの ATP 放出も VNUT 阻害剤は遮断することができた。そのため、プリン作動性化学伝達が関与する炎症性疼痛にも VNUT 阻害剤は鎮痛効果を発揮した。さらに、TNF- α や IL-6 の炎症性サイトカイン量が低下することで抗炎症効果を発揮した。既存薬と薬効を比較すると、VNUT 阻害剤は、炎症性疼痛治療薬のトラマドール（非麻薬性オピオイド）、抗炎症薬のプレドニゾロン（ステロイド）と同等の治療効果を発揮した。これらは複数の副作用が報告されているが、VNUT ノックアウトマウスではそのような表現型は観察されていない。

以上より、VNUT 特異的阻害剤を同定し、これは神経因性疼痛や炎症性疼痛等の治療効果があることを明らかにした。

英文：

To identify the potent inhibitor of vesicular nucleotide transporter (VNUT), I utilized a quantitative transport assay system involving proteoliposomes containing only purified protein. I found a potent, selective, and reversible inhibitor of VNUT. The compound inhibited VNUT-mediated ATP release at a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 15.6 nM without affecting other vesicular neurotransmitter transporters, which is mediated by allosteric modulation at the VNUT Cl⁻ binding site but not ATP binding site. A low concentration of VNUT inhibitor impaired vesicular ATP release from neurons and immune cells.

In vivo analyses revealed that VNUT inhibitor attenuates neuropathic and inflammatory pain, as well as the accompanying inflammation, in wild-type but not VNUT^{-/-} mice, without affecting basal nociception. The therapeutic effects were stronger than those of widespread drugs for neuropathic pain, such as pregabalin or gabapentin. In addition, the effects were comparable to

those of widespread drugs for inflammatory pain or inflammation, such as tramadol or prednisolone, in the therapeutic range. These existing drugs are associated with severe side effects, strongly suggesting that VNUT inhibitor is promising for the treatment of intractable diseases associated with abnormalities in purinergic transmission.

In summary, I identified a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain, as well as the accompanying inflammation.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Yamaji N., Takemoto Y., **Miyaji T.**, Mitani-Ueno N., Yoshida KT., Ma JF.

Reducing phosphorus accumulation in rice grains with an impaired transporter in the node.

Nature. 2017, 541, 92-95.

2. Takeuchi T., Harada Y., Moriyama S., Furuta K., Tanaka S., **Miyaji T.**, Omote H., Moriyama Y., Hiasa M.

Vesicular polyamine transporter mediates vesicular storage and release of polyamine from mast cells.

J. Biol. Chem. 2017, 292, 3909-3918.

3. Fujino Y., Minamizaki T., Hayashi I., Kawakami A., **Miyaji T.**, Sakurai K., Yoshioka H., Kozai K., Okada M., Yoshiko Y.

Comparative proteome analysis of wild-type and klothe-knockout mouse kidneys using a combination of MALDI-IMS and LC-MS/MS.

Proteomics Clin. Appl. 2017, DOI 10.1002/prca.201600095.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当無し

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願