

## 小胞型ヌクレオチドトランスポーターの特異的阻害剤による血糖制御

宮地 孝明

岡山大学自然生命科学研究支援センター

**概要** 小胞型ヌクレオチドトランスポーター (Vesicular Nucleotide Transporter; VNUT) は分泌小胞内への ATP の充填装置であり、プリン作動性化学伝達の必須因子である。ATP 輸送は膜電位差により駆動され、塩素イオンによりアロステリックに活性化される。また、VNUT ノックアウトマウスは、外見上の大きな変化がないにもかかわらず、インスリン抵抗性の向上により、耐糖能が改善し、生活習慣病の要因が改善されていた。これは、VNUT の特異的阻害剤が生活習慣病の良い治療薬になることを示唆している。

そこで、この阻害剤を探索した結果、 $IC_{50}$  が 15.6 nM という極めて低濃度で VNUT を阻害する化合物を同定した。興味深いことに、この阻害剤は、他の小胞型神経伝達物質トランスポーターを阻害することなく、VNUT の塩素イオンによるアロステリック活性化を可逆的に阻害した。この化合物は細胞からの ATP 放出も選択的、かつ、可逆的に阻害した。血糖調節に加え、炎症性疼痛に対するこの化合物の有効性を評価したところ、VNUT 特異的阻害剤は、第一選択薬である NSAIDs (非ステロイド性抗炎症薬) よりも強力な鎮痛効果を示したが、VNUT ノックアウトマウスでは無効であった。この化合物により、マウスの耐糖能が改善し、血糖値の低下、インスリン分泌の上昇が観察された。

以上より、*in vivo* でも有効な VNUT 特異的阻害剤を同定した。この化合物は、非病変部には影響することなく、血糖制御をはじめ、疼痛や炎症も制御できることを明らかにした。VNUT 特異的阻害剤は、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。

### 1. 研究目的

プリン作動性化学伝達は、血圧や血糖などの代謝調節、痛覚などの感覚受容等を制御している<sup>(1)</sup>。この化学伝達の開始点となるのが小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) である (図 1)。我々はこのトランスポーターを世界に先駆け同定し、脳の神経細胞、副腎のクロマフィン細胞、膵臓の  $\beta$  細胞を含む神経・内分泌系において重要な働きをしていることを明らかにした<sup>(2-4)</sup>。興味深いことに、VNUT ノックアウトマウスは、外見上の大きな変化がないにもかかわらず、インスリン分泌とインスリン抵抗性の向上により、耐糖能が改善し、生活習慣病で問題となる要因が改善されていた<sup>(4)</sup>。高血糖やインスリン抵抗性は、脳梗塞や心筋梗塞などの生活習慣病の主要な発症リスクを大きく上昇させるため、VNUT 特異的阻害剤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。

我々は、VNUT を含む SLC17 型トランスポーター群は塩素イオンによるアロステリックな活性制御スイッチがあることを見だし、さらに、このスイッチを可逆的に阻害できる代謝物、ケトン体を同定した<sup>(5,6)</sup>。このアロステリックな活性制御スイッチを *in vivo* で制御できる VNUT 特異的阻害

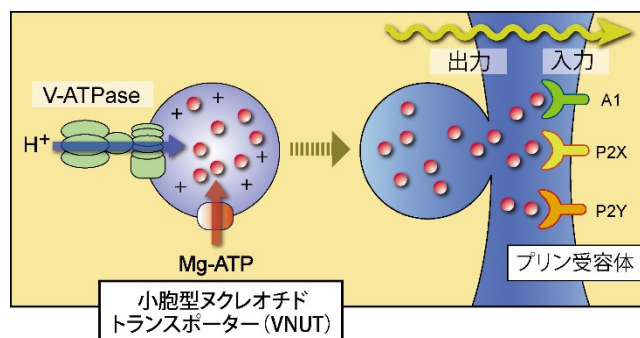


図 1. プリン作動性化学伝達

剤を同定できれば、生活習慣病治療の良いリード化合物になると考えた。

## 2. 研究方法

### VNUT の精製・再構成<sup>(7)</sup>

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、 $\alpha$ -ヘリックス構造を持つ可溶性タンパク質である YbeL ( $\beta$ ) 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。

### 再構成人工膜小胞の ATP 輸送活性測定<sup>(7)</sup>

再構成人工膜小胞内を 150 mM Na<sup>+</sup>、外を 150 mM K<sup>+</sup> にし、2  $\mu$ M バリノマイシン (K<sup>+</sup>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  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-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  $\mu$ 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 [<sup>3</sup>H]-ATP (溶出液) を定量した。

### 膜電位差測定<sup>(7)</sup>

上記と同様の方法にて再構成し、1  $\mu$ M オキサノール V (膜電位差測定用蛍光指示薬) を加えた。2  $\mu$ M バリノマイシンを添加し、形成された膜電位差を蛍光分光光度

計にて蛍光クエンチングとして測定した。

### 炎症性疼痛の評価

Complete Freund's adjuvant (CFA, 起炎物質) をマウスの左後肢に皮下注射した。1 - 3 日で浮腫ができ、その後、この浮腫は緩やかに軽減する。CFA 投与から 3 日と 14 日後に熱痛覚過敏と機械痛覚過敏をそれぞれプランター試験と von Frey 試験により評価した。阻害剤は試験開始の 1 時間前に静脈注射した。

### グルコース負荷試験

18 時間絶食したマウスに、2 g/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量を測定した。阻害剤は試験の 1 時間前に 50 mg/kg で静脈注射した。血糖値とインスリン量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. 研究結果

VNUT 特異的阻害剤を精製・再構成法を用いて探索した。その結果、IC<sub>50</sub> = 15.6 nM という極めて低濃度で VNUT を阻害できる化合物を同定することに成功した (論文未発表のため、化合物 X と記載する)。そ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、いずれも阻害効果は VNUT の 1/1,000 以下であった (図 2)。

これら阻害剤が VNUT に直接的に作用していることを

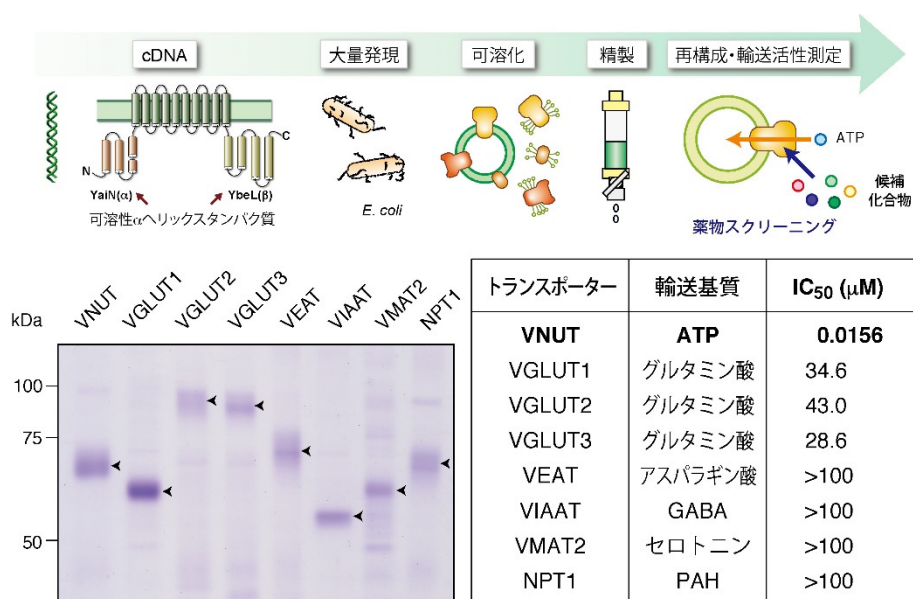


図 2. VNUT 特異的阻害剤の同定

示すために、駆動力の膜電位差を測定した。その結果、化合物 X を過剰に加えても膜電位差は全く影響を受けなかった。次に、VNUT の塩素イオンのアロステリック活性化に影響するか評価した。その結果、化合物 X は塩素イオンと競合的に ATP 輸送活性を阻害することを明らかにした。化合物 X の添加によって、ヒル係数は変わらなかった (図 3 上)。ATP 結合部位への影響も評価したが、化合物 X は ATP 結合部位とは競合しなかった。さらに、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 (図 3 上)。以上より、化合物 X は VNUT の塩素イオン依存性に可逆的に影響することで阻害する、いわゆるアロステリック薬剤であることがわかった。

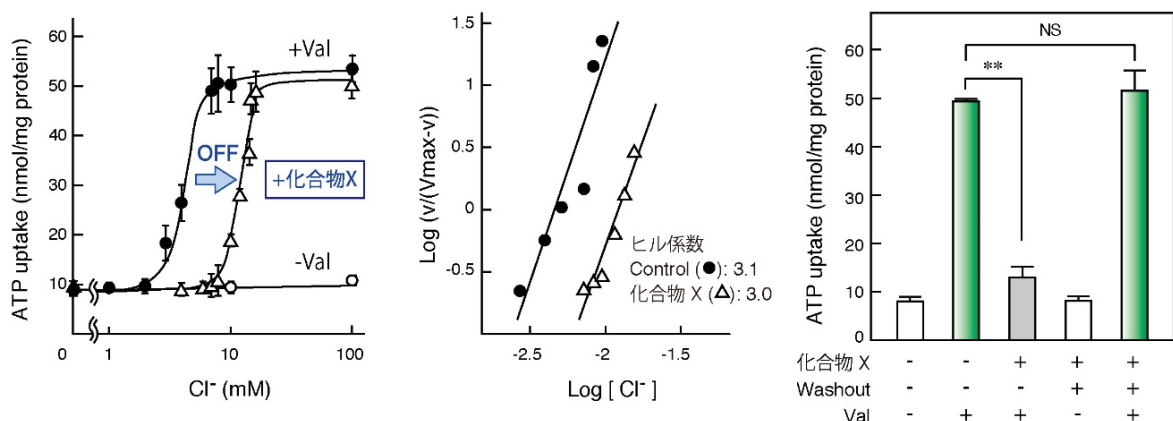
化合物 X の有効性を細胞レベルでも評価した。神経細胞は分泌小胞内に ATP を蓄積し、脱分極刺激により ATP などの伝達物質を開口放出する。化合物 X を添加

することで ATP 放出は完全に阻害された (図 3 下)。この阻害効果は、可逆的であった。同時に、化合物 X を高濃度にしてもグルタミン酸放出は全く阻害されなかった。

プリン作動性化学伝達に関与し、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の治療を目的として、血糖調節に加え、炎症性疼痛に対する有効性を評価した。

CFA による炎症性疼痛の病態モデルマウスを作製した。この野生型マウスは機械と熱の痛覚過敏を引き起こした。このマウスに化合物 X を静脈注射すると、強力な鎮痛効果を示した (図 4)。その一方で、非炎症部位では化合物 X は無効であった。また、VNUT ノックアウトマウスでも疼痛が減弱すること、このマウスに化合物 X は無効であることを明らかにした。さらに、この化合物は鎮痛薬の第一選択薬であるアセトアミノフェンやジクロフェナク (NSAIDs) よりも強い鎮痛効果を示した。

### <化合物 X は可逆的なアロステリック VNUT 阻害剤である>



### <化合物 X は ATP 開口放出を選択的に阻害する>

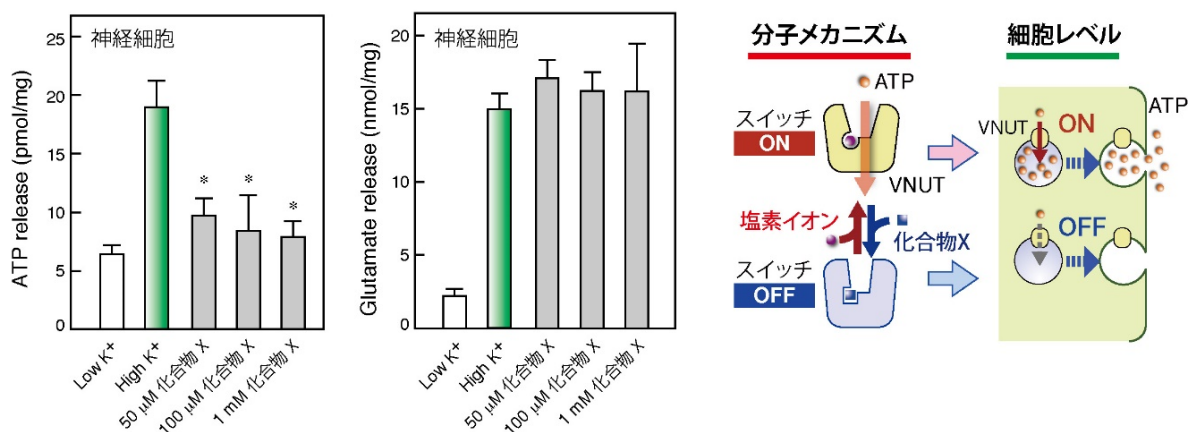
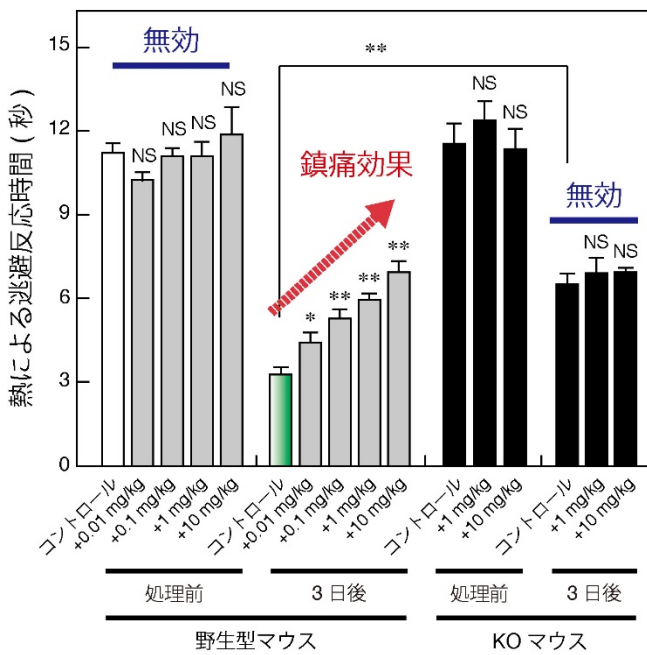


図 3. VNUT 特異的阻害剤はアロステリック薬剤である

### 熱痛覚過敏 (CFA 慢性炎症モデル)



### 機械痛覚過敏 (CFA 慢性炎症モデル)

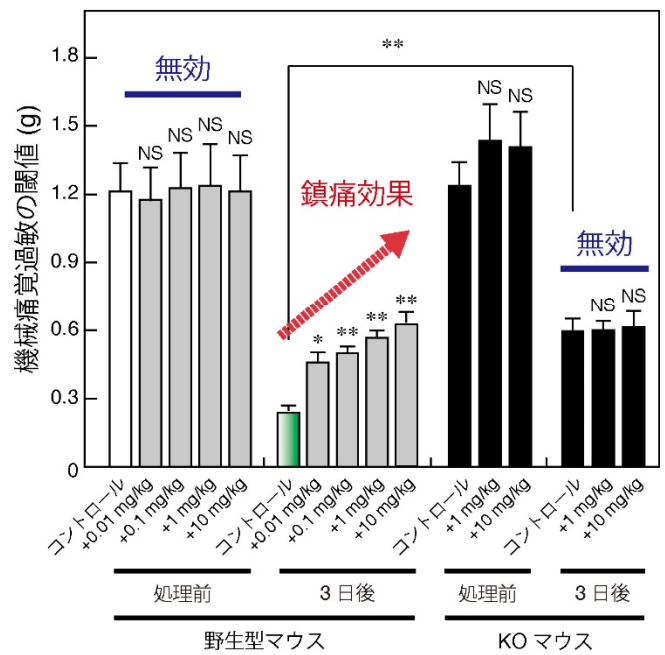


図 4. VNUT 特異的阻害剤は炎症性疼痛を抑制した

興味深いことに、VNUT ノックアウトマウスは野生型マウスと比べて、CFA による後肢の浮腫が低減していることを見いだした。化合物 X を野生型マウスに投与しても、浮腫が低減したが、VNUT ノックアウトマウスではこの効果は見られなかった。すなわち、化合物 X は VNUT を阻害することで、鎮痛効果のみならず抗炎症効果があることがわかった。カラゲニンによる急性炎症の病態モデルマウスでも、浮腫が低減した。この時の血中サイトカインを定量すると、TNF- $\alpha$  や IL-6 のような炎症性サイトカイン分泌が完全に阻害されていた(図 5)。以上より、化合物 X は VNUT を阻害し、サイトカイン量を低下させることで、抗炎症効果があることを明らかにした。

最後に、VNUT 特異的阻害剤が血糖制御できるか調べるために、グルコース負荷試験を実施した。血糖値と血中インスリン量を時間依存的に測定したところ、化合物 X を事前に静脈注射することで、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。興味深いことに、血糖値やインスリン量のベースラインは変わらなかったため、低血糖などの副作用は少ないと考えられる。

### 4. 考察

我々は *in vivo* でも有効な VNUT 特異的阻害剤を同定

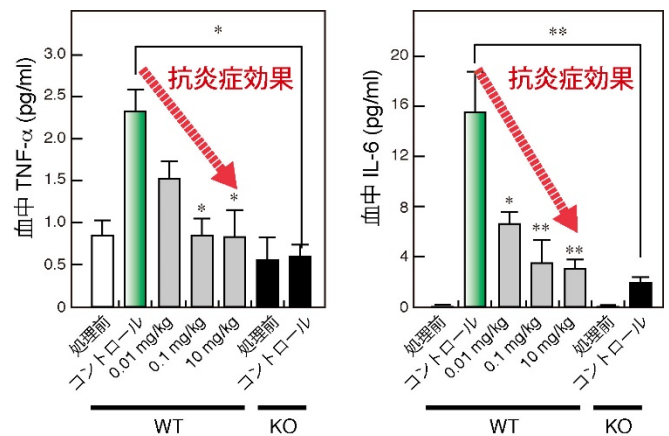


図 5. VNUT 特異的阻害剤は血中サイトカイン量を抑制した

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<sup>(5)</sup>、VNUT だけを選択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ケミカルバイオロジーにより制御することで、プリン作動性化学伝達に関わる血糖制御をはじめ、疼痛や炎症も制御できることを明らかにした。いずれもこの化合物はベースラインに影響しなかったことから、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。

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、新薬の開発期間の短縮、研究開発コストを低減等が期待される。VNUT の阻害効果は、既知の薬効よりも 1,000 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. 今後の課題

プリン作動性化学伝達は、糖尿病や炎症性疼痛の他にも、様々な疾患の発症に関与する。VNUT 特異的阻害剤はそれらの疾患の改善効果があると考えられる。今後、この化合物の適応範囲を幅広く調べる必要がある。

また、VNUT 阻害により、疾患の改善効果があることを見い出したが、受容体以降のシグナルカスケードを明らかにしたいと考えている。今後、ATP 放出がなくなることで、どの細胞内シグナルカスケードが遮断されるのかを検討する予定である。

## 6. 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)

7) Kato Y., Omote H., Miyaji T. Inhibitors of ATP release inhibit vesicular nucleotide transporter. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 1688-1691 (2013)

## The Glycemia Control by a Specific Inhibitor of Vesicular Nucleotide Transporter

Takaaki Miyaji

Okayama University

### Summary

Vesicular nucleotide transporter (VNUT) is responsible for vesicular storage of ATP, and is essential for purinergic chemical transmission. ATP transport activity is driven by the membrane potential ( $\Delta\psi$ ), and allosterically regulated by  $\text{Cl}^-$ . *VNUT<sup>-/-</sup>* mice showed improvement of the major factors involved in lifestyle-related diseases despite no change in phenotype. Therefore, specific inhibitors of VNUT may be useful lead compounds for the development of therapeutic drugs.

Extensive screening identified a specific inhibitor of VNUT with  $\text{IC}_{50}$  of 15.6 nM, which acts as an allosteric modulator through competition with  $\text{Cl}^-$ . The compound selectively and reversibly inhibited vesicular ATP release from ATP-releasing cells. *In vivo*, we examined the effects of VNUT inhibitor on glycemia control and inflammatory pain using wild-type and *VNUT<sup>-/-</sup>* mice. The VNUT inhibitor attenuated chronic nociceptive pain and inflammation without affecting basal pain perception in wild-type but not *VNUT<sup>-/-</sup>* mice. The analgesic effect against chronic inflammatory pain was stronger than that of acetaminophen (a widely used NSAID) and diclofenac (a strong NSAID in clinical use). The VNUT inhibitor showed enhanced glucose tolerance and insulin secretion after oral injection of glucose.

In summary, we identified a specific inhibitor of VNUT that relieves hyperglycemia, inflammatory pain and chronic inflammation without affecting baseline levels. The specific inhibitor of VNUT may represent a new drug for lifestyle-related disease with few side effects.