

塩素イオンバランスの破綻によって発症する神経障害性疼痛の新規経路の同定とその分子メカニズムに基づく疼痛制御

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

概要 神経障害性疼痛は神経障害により引き起こされる耐え難い慢性疼痛であり、プリン作動性化学伝達が制御する。小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)は ATP の小胞内充填を司り、プリン作動性化学伝達の必須因子である。VNUT の ATP 輸送は塩素イオンによりアロステリックに活性化され、その活性化を脂質代謝物が可逆的に阻害する。この代謝スイッチを OFF することで、ATP 放出が遮断され、神経障害性疼痛を初めとする生活習慣病の要因が大幅に改善される。神経障害性疼痛では塩素イオンエクスポーターの機能低下により、細胞内塩素イオン濃度が上昇するため、我々のこれまでの研究成果は、この細胞内の塩素イオンバランスの異常が ATP 放出を亢進させ、神経障害性疼痛を増悪させていることを示唆している。

本研究では、この仮説を実証して、塩素イオンバランスの破綻によって発症する神経障害性疼痛の新規経路を同定し、塩素イオンバランスの制御に基づく神経障害性疼痛の新しい創薬基盤の構築を目指した。昨年度に精製・再構成法によるトランスポーターの輸送活性評価技術を用いて、塩素イオン依存的にヒト VNUT を強力に阻害する機能性脂質代謝物を同定した。この脂質代謝物は神経細胞からの ATP 放出を選択的に遮断し、既存医薬品よりも副作用が少なく、強力に神経障害性疼痛を抑制した。神経細胞の塩素イオンインポーター阻害剤や塩素イオンエクスポーター促進剤はそれぞれ神経障害性疼痛を緩和すること、また、塩素イオン依存的な VNUT 阻害剤との併用により、その薬効が大幅に増強することを明らかにした。VNUT 遺伝子を破壊した神経障害性疼痛モデルマウスには塩素イオンインポーター阻害剤や塩素イオンエクスポーター促進剤は無効であったため、細胞内塩素イオン濃度の上昇が ATP 放出を増強することが示唆された。以上より、VNUT の代謝スイッチは塩素イオンバランスの変化を感知することで生体の恒常性維持に関わっており、塩素イオンバランスの正常化と VNUT の代謝スイッチの OFF は神経障害性疼痛の改善に重要であることを明らかにした。この新規経路は神経障害性疼痛の有望な創薬標的になると期待される。

1. 研究目的

神経障害性疼痛は、糖尿病、がん、ウイルス感染、ヘルニア等の神経障害により引き起こされる耐え難い慢性疼痛であり、プリン作動性化学伝達が制御する。疼痛管理は Quality of Life の観点から重要であるが、慢性疼痛に対する副作用の少ない、効果的な治療薬はない。その医療費も莫大であることから、医学・薬学的だけでなく、経済的にも早急に解決すべき課題である¹⁻³⁾。

プリン作動性化学伝達において、神経はシナプス小胞に ATP を濃縮し、上流からの刺激に応じて開口放出する。放出された ATP はプリン受容体に結合することで下流に情報伝達する⁴⁾。このうち、小胞型ヌクレオチドトランスポーター(Vesicular Nucleotide Transporter: VNUT)は ATP の小胞内充填を司り、プリン作動性化学伝達の必須因子である^{5,6)}。

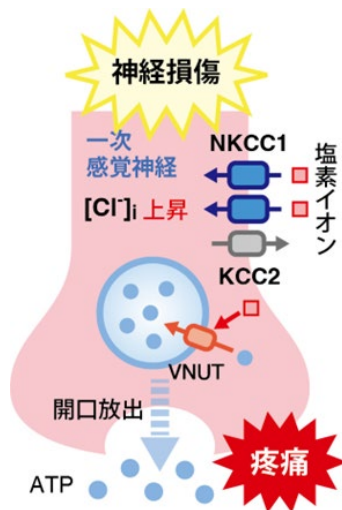


図1 塩素イオンバランスの異常による疼痛発症

VNUT の ATP 輸送は塩素イオンによりアロステリックに活性化され、塩素イオンによる活性化を抑制することで、ATP 放出が遮断され、神経障害性疼痛をはじめとする生活習慣病の要因が大幅に改善される^{7,8)}。神経障害性疼痛では塩素イオンエクスポーター (K^+-Cl^- cotransporter 2: KCC2) の機能低下により、細胞内塩素イオン濃度が上昇するため^{9,10)}、我々のこれまでの研究成果は、この細胞内の塩素イオンバランスの異常が ATP 放出を亢進させ、神経障害性疼痛を増悪させていることを示唆している(図1)。

本研究では、この仮説を実証するために、プリン作動性化学伝達における塩素イオンの代謝スイッチの役割を明らかにするために、ヒト VNUT の代謝スイッチを選択的かつ強力に OFF する脂質代謝物を同定した¹¹⁾

本研究では、塩素イオンバランスの破綻によって発症する神経障害性疼痛の新規経路を同定し、その分子メカニズムに基づく神経障害性疼痛の制御を研究目的とした。

2. 研究方法

2.1 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。

2.2 再構成人工膜小胞の 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 μ M 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 μ M [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。

2.3 神経細胞からの ATP 放出遮断効果の評価

海馬神経細胞を初代培養し、これを Krebs-Ringer にてプレインキュベーションした。高カリウムの脱分極刺激を反応開始とし、20 分後に上清を回収した。上清中の ATP はルンフェラーゼ法にて定量した。同時に放出される神経伝達物質は蛍光標識・UHPLC 法にて定量した。

2.4 神経障害性疼痛の評価

パクリタキセル (抗がん剤) をマウスに腹腔内投与した。1 - 3 日で疼痛が発症し、その後、この疼痛は緩やかに軽減した。パクリタキセル投与から 3 日後 (最大値) に機械痛覚過敏を von Frey 試験により評価した。阻害剤は試験開始前に静脈注射した。

3. 研究結果

VNUT を阻害する代謝物を精製・再構成法を用いて探索した。その結果、代表的なオメガ3系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のエイコサペンタエン酸 (EPA) が $IC_{50} = 67$ nM という極めて低濃度で VNUT を阻害することを見出した。構造活性相関より、炭素鎖が 20-22、二重結合が 4-5 個のオメガ3系 PUFA に強力な VNUT 阻害効果があった。オメガ3系多価不飽和脂肪酸の代表例であるドコサヘキサエン酸やオメガ6系多価不飽和脂肪酸のアラキドン酸は VNUT を強く阻害しなかった。EPA プロドラッグのエステル体のままでは VNUT 阻害活性は減弱した。EPA 代謝物も同様に評価したところ、HEPE, DiHETE, EpETE にも強力な VNUT 阻害活性があった。18-HEPE から産生される炎症を収束する脂質メディエーターのレゾルビン E1 にも VNUT 阻害効果はあったが、EPA ほど強力な阻害効果ではなかった。

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検討した結果、EPA 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。また、事前に VNUT と EPA を混合し、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。以上より、EPA 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を明らかにした。

EPA の有効性と選択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。EPA を添加することで ATP 放出は完全に阻害された。同時に、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸、抑制性アミノ酸の GABA やグリシンの開口放出は有意に低下しなかった。グルタミン酸やアスパラギン酸を輸送する小胞型神経伝達物質トランスポーターは VNUT と同じ SLC17 トランスポーターファミリーに属するため、EPA の VNUT 阻害作用は選択性が高いといえる。この細胞には塩素イオントランスポーター (NKCC1 と KCC2) が発現していることを RT-PCR 法で確認した。

パクリタキセル (抗がん剤) による神経障害性疼痛の病態モデルマウスを作製し、EPA の有効性を検討した。抗がん剤による治療において、半数以上の患者さんは半年以内に神経障害を引き起こすことが臨床的課題となっている。この野生型マウスは機械痛覚過敏を3日後に引き起こした。このマウスに EPA を静脈投与すると、強力な鎮痛効果を発揮した。その一方で、通常のマウスでは EPA は無効であった。病態モデルマウスにプリン受容体のアゴニストである ATP や ADP を髄腔に投与すると、EPA による鎮痛効果が消失した。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 EPA は無効であることを明らかにした。さらに、この代謝物は神経障害性疼痛治療薬のプレガバリンやデュロキセチンよりも強い鎮痛効果を示した一方で、それらの副作用は観察されなかった。この他、EPA は VNUT を標的に、坐骨神経部分結紮による神経障害性疼痛、神経障害によるインスリン抵抗性、カラゲニン誘発性炎症性疼痛にも有効な改善効果を発揮した。以上より、EPA は VNUT を標的に神経障害性疼痛をはじめとする複数の生活習慣病の要因を改善できることを明らかにした。

NKCC1 阻害剤を腹腔投与すると、パクリタキセルによる神経障害性疼痛が緩和した。また、EPA を同時に投与すると、その鎮痛効果が増大することを見出した。このこと

は神経障害性疼痛の発症に塩素イオンによる VNUT の活性化が寄与することを示唆している。

4. 考察

我々は、VNUT の塩素イオンによるアロステリックな活性化を選択的に阻害する生理的な代謝物を同定し、*in vivo* で神経障害性疼痛に有効であることを明らかにした。VNUT には塩素イオン (ON) と脂質代謝物 (OFF) の代謝スイッチがあり、EPA による既存薬効と比べても 100 倍以上強力に阻害した¹¹⁾。EPA は VNUT の主要な生理的調節因子として機能すると考えられ、また、VNUT の代謝スイッチを解析するための強力なツールになるといえる。本研究成果は、塩素イオンバランスの破綻によって発症する神経障害性疼痛の新規経路になると期待される。

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、EPA は 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。

また、神経障害性疼痛に対する副作用なく、有効な治療薬は未だ開発されていない。EPA は既存薬のプレガバリンやデュロキセチンよりも有効であり、また、ヒトへの安全性も実証されているため、VNUT の塩素イオンによるアロステリックな活性化機構は神経障害性疼痛の新しい創薬標的になると期待できる。

5. 今後の課題

プリン作動性化学伝達は、神経障害性や炎症性疼痛の他にも、血糖や血中脂質、血液凝固等の制御、炎症応答等に関与しており、生活習慣病の発症に重要である。VNUT 特異的阻害剤は生活習慣病の画期的な予防・治療薬になると考えられる。今後、この代謝物の適応範囲を幅広く調べ、それぞれの病変部において、この作用機序の普遍性を検討する。

VNUT の塩素イオンによるアロステリック活性化機構を標的に、神経障害性疼痛を改善できる可能性を示唆することができたが、まだ細胞レベルでこの分子機構を明らかにできていない。細胞内の塩素イオン測定系も確立したため、細胞内塩素イオンと ATP の開口放出との関連を細胞レベルで明らかにする。また、神経細胞の塩素イオン濃度の上昇により、GABA 作動性神経が抑制性から興奮性

に転じると報告されている⁹⁾。EPA は GABA の開口放出は阻害しなかった。今後は、神経障害性疼痛にプリン作動性化学伝達の遮断効果と興奮性の GABA 作動性化学伝達がどの程度、寄与するのか詳細に検討する必要がある。

6. 文献

- 1) Harirforoosh S., Asghar W. & Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 16(5), 821–847 (2013)
- 2) Woolf C. J. Mu and delta opioid receptors diverge. *Cell* 137(6), 987–988 (2009)
- 3) Holmes D. The pain drain. *Nature* 535(7611), S2–S3 (2016)
- 4) Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797 (2007)
- 5) 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)
- 6) Miyaji T., Sawada K., Omote H., Moriyama Y. Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *J. Biol. Chem.* 286, 42881–42887 (2011)
- 7) 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)
- 8) Kato Y. et al. Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 114(31), E6297–E6305 (2017)
- 9) Coull J. A. M. et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438(7070), 1017–1021 (2005)
- 10) Gagnon M. et al. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nat. Med.* 19(11), 1524–1528 (2013)
- 11) Kato Y. et al. Vesicular nucleotide transporter is a molecular target of eicosapentaenoic acid for neuropathic and inflammatory pain treatment. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 119(30), e2122158119 (2022)

Pain Control through Modulation of the Regulatory Mechanism of Purinergic Chemical Transmission by Manipulating Cl⁻ Balance

Takaaki Miyaji

Okayama University

Summary

Neuropathic pain is chronic pain associated with diabetes, cancer, viral infections, and hernias, and mediated by abnormalities in purinergic chemical transmission. Vesicular nucleotide transporter (VNUT) is responsible for vesicular ATP storage, and is essential for purinergic chemical transmission. We found that ATP transport activity is driven by membrane potential ($\Delta\psi$), and is allosterically regulated by Cl⁻. In neuropathic pain, neuronal Cl⁻ concentrations increase with decreases in Cl⁻ exporter expression. Therefore, we hypothesized that a Cl⁻ imbalance would enhance vesicular ATP release, exacerbating neuropathic pain.

In this study, we aimed to demonstrate a new pathological mechanism of neuropathic pain mediated by Cl⁻ imbalance, and its effect on purinergic chemical transmission. *In vitro* analysis using proteoliposomes containing only purified human VNUT protein showed that omega-3 polyunsaturated fatty acids such as, eicosapentaenoic acid (EPA), inhibit ATP uptake at an IC₅₀ of 67 nM, which acts as an allosteric modulator through competition with Cl⁻. EPA selectively inhibited vesicular ATP release from neurons, which express plasma membrane-type Cl⁻ importer and exporter. *In vivo*, we examined the effects of EPA on neuropathic pain using wild type and *VNUT*^{-/-} mice. EPA attenuated paclitaxel-induced neuropathic pain without affecting basal pain perception in wild type but not *VNUT*^{-/-} mice. The analgesic effect against neuropathic pain was stronger than that of pregabalin or duloxetine, widely used analgesics for neuropathic pain. Cl⁻ importer inhibition attenuates paclitaxel-induced neuropathic pain, and combined inhibition of VNUT and Cl⁻ importer enhanced the analgesic effect against neuropathic pain. These results strongly suggest that VNUT senses Cl⁻ imbalance underlying neuropathy, and vesicular ATP release exacerbates neuropathic pain. As therapeutic analgesic agents with few side effects have yet to be developed, EPA represents a new nutrient-based drug candidate for neuropathic pain that displays few side effects.