

博士論文

新規鎮痛薬の開発を目指した
小胞型ヌクレオチドトランスポーター特異的阻害剤の研究

平成 30 年 3 月

加藤 百合

岡山大学大学院
医歯薬学総合研究科
博士後期課程

目次

略語表	1
第一章 序章	4
第二章 実験方法	12
第三章 結果	30
第四章 考察・展望	57
引用文献	64
謝辞	69

略語表

AppCCl ₂ p	adenosine-5'-(β,γ-dichloromethylene)triphosphate
ATP	adenosine triphosphate
BL	baseline latency
Bp	base pair
Bq	becquerel
BSA	bovine serum albumin
Ca ²⁺	calcium ion
CBB	coomassie brilliant blue
CCCP	carbonyl cyabide 3-chlorophenylhydrazone
cDNA	complementary DNA
Da	dalton
DDW	double distilled water
dNTP	deoxynucleotide 5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
DTM	decyl-β-D-thiomaltoside
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HEPES	<i>N</i> -(2-hydroxyethyl)piperadine- <i>N'</i> -2-ethansulfonic acid
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HPLC	high performance liquid chromatography
IL-6	interleukin-6
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
K ⁺	potassium ion
LB	Luria-Bertani
LPS	lipopolysaccharide
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
M.O.I	multiplicity of infection
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
MPE	maximal possible effect

NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cysteine
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NPT	Na ⁺ dependent phosphate cotransporter
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drug
O.D.	optical density
OPA	o-phthalaldehyde
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PL	latency after drug injection
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
RI	radioisotope
RT	room temperature
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sf 9	spodoptera frugiperda 9
SLC	solute carrier
SOC	super optimal broth with catabolite repression
TB	terrific broth
TCA	trichloroacetic acid
TeNT	tetanus toxin
TNF- α	tumor necrosis factor α
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
Val	valinomycin
VEAT	vesicular excitatory amino acid transporter
VGLUT	vesicular glutamate transporter
VIAAT	vesicular inhibitory amino acid transporter
VMAT	vesicular monoamine transporter
VNUT	vesicular nucleotide transporter

アミノ酸の一文字表記

G	glycine	Q	glutamine
A	alanine	H	histidine
V	valine	K	lysine
L	leucine	R	arginine
I	isoleucine	C	cysteine
S	serine	M	methionine
T	threonine	F	phenylalanine
D	aspartic acid	Y	tyrosine
N	asparagine	W	tryptophan
E	glutamic acid	P	proline

DNA の一文字表記

A	adenine	G	guanine
T	thymine	C	cytosine

第一章 序論

慢性疼痛はさまざまな要因によって発症する長期間持続する疼痛であり、軽微なものを含めると人口の 20-25%もの罹患者がいる (1,2)。その医療費は、全米では年間で 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。慢性疼痛は、炎症性疼痛、神経因性疼痛、心因性疼痛の 3 つに分類され、このうち、炎症性疼痛は癌、痛風、リウマチなどによる末梢の炎症が原因で疼痛を引き起こす。神経因性疼痛は糖尿病の合併症の一つとしても広く知られ、他には癌の浸潤、癌治療やウイルス感染などにより神経が障害され引き起こされる耐え難い疼痛である。炎症性疼痛の治療にはアセトアミノフェンやジクロフェナクをはじめとした NSAIDs が用いられるが、肝障害、胃腸障害、腎障害などの副作用が報告されている (3)。また、神経因性疼痛では主にプレガバリンやガバペンチンなどが用いられるが、眠気、傾眠、吐き気といった副作用が報告されている (4)。これらの治療薬で鎮痛効果が得られなかった場合は、トラマドール、モルヒネといったオピオイド系の医薬品を使用するが、これらはさらに、呼吸抑制、錯乱・せん妄などの重篤な副作用をもたらすことが問題視されている (5,6)。疼痛の管理は臨床上重要な課題であり、副作用の少ない、より効果的な鎮痛薬の開発が強く望まれていた。

ATP などのヌクレオチドを伝達物質とするプリン作動性化学伝達は、疼痛の発症に重要な役割を果たす (図 1) (7)。小胞型ヌクレオチドトランスポーター (Vesicular nucleotide transporter, VNUT/SLC17A9) により分泌小胞内に ATP が蓄積され、神経障害や慢性炎症などの刺激により ATP は開口放出される (出力系) (8)。放出された ATP や Ecto-ATPase による ATP 分解物である ADP、AMP、アデノシンが P2X 受容体、P2Y 受容体、P1 受容体に結合することで、シグナルが制御される (入力系)。疼痛は、末梢組織での熱や機械刺激、免疫細胞から放出されるサイトカインなどにより侵害受容器が活性化されることや末梢神経が障害されることで一次感覚神経にシグナルが伝達される (図 2)。その後、脊髄の神経終末では、小胞型グルタミン酸トランスポーター (Vesicular glutamate transporter, VGLUT) や VNUT によってシナプス小胞に濃縮された、疼痛のシグナル伝達物質であるグルタミン酸や ATP が開口放出される (図 2)。放出されたグルタミン酸や ATP はポストシナプス側の各受容体を活性化させる。二次感覚神経にシグナルを伝達し、脊髄視床路を上行し一次体性感覚野に投射され、痛みを感じる (図 2) (7,9,10)。このうち、ATP は神経終末から放出後、近傍にあるミクログリアのプリン受容体を活性化させ、サイトカインの放出を促し痛覚過

敏を引き起こし、また、プレシナプス側に発現している P2X₃ 受容体や P2X_{2/3} 受容体にオートクライン的に作用することでグルタミン酸の放出を促進する (7,11)。

VNUT は 12 回膜貫通構造をしており (図 3) (8)、V-ATPase によって形成される正の膜電位差を駆動力として二価金属カチオンと ATP のキレート体を輸送する (11)。また、塩素イオンが存在しないと活性化されず、塩素イオンにより輸送は活性化され、その活性は生体内の代謝物であるケトン体によって制御されるというユニークな特性を持つ (図 4) (8,13)。代表的な ATP 含有小胞である副腎クロマフィン顆粒において、VNUT ノックアウトマウスでは ATP の小胞内輸送とその開口放出が完全に消失していたことから、VNUT はプリン作動性化学伝達に重要であることが明らかになった (14)。また、VNUT ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して外見上大きな変化はなく、食事量、飲水量、体重、運動量などにも変化はみられなかった (14)。神経因性疼痛処置を施した VNUT ノックアウトマウスは同じ処置をした野生型マウスと比較して、痛みへの回避行動をとるまでの閾値が上昇しており (15)、神経因性疼痛の発症に脊髄の神経にある VNUT が関与することが報告された (15-17)。以上より、VNUT 特異的阻害剤は副作用が少ない、効果的な鎮痛薬になると期待できる。

これまでの基礎研究・臨床研究から、骨粗鬆症の第 1 選択薬であるビスホスホネート系薬剤には炎症性・神経因性疼痛に対して鎮痛効果があることが報告されていた (18-19)。しかしながら、これらの鎮痛効果は本来の薬効である破骨細胞のアポトーシスによる骨吸収抑制作用とは独立して引き起こされることが明らかになっており (20)、その詳細な作用機序は長らく不明であった。ビスホスホネート系薬剤は骨格に P-C-P 構造を持っており (図 5a)、側鎖の違いから窒素を含まない第 1 世代、窒素を含む第 2 世代、第 3 世代に分けられている (図 5b)。また、世代によって作用機序が異なる。第 1 世代は破骨細胞に取り込まれ、ATP のリン酸基に組み込まれ非加水分解性の ATP 類似体を形成して、ミトコンドリア内膜の ADP/ATP 転移酵素を阻害し、アポトーシスを誘導する (図 6a) (21)。第 2 世代、第 3 世代は、破骨細胞に取り込まれ、メバロン酸経路におけるファネシル 2 リン酸合成酵素を阻害することにより、下流で起こるタンパク質のプレニル化を阻害し、アポトーシスを誘導する (図 6b) (22)。世代が上がる程、骨吸収抑制効果は上昇、つまり、治療効果は高くなるが、顎骨壊死などの副作用の報告もされている (23-26)。そのため、骨吸収抑制効果が弱く副作用の

少ない第1世代は、新規の鎮痛薬になりうると期待されていた。

VNUT ノックアウトマウスの表現型とビスホスホネート系薬剤が示す神経因性疼痛を含む様々な疼痛への鎮痛効果が類似していた。そこで、プリン作動性化学伝達に着目し、第1世代のビスホスホネート系薬剤の標的分子を同定し、鎮痛効果の作用機序を明らかにすることを本研究の目的とした。本研究では、第1世代のビスホスホネート系薬剤のうち、クロドロン酸がVNUT 特異的阻害剤であること、また、クロドロン酸がVNUT を標的として神経因性疼痛だけではなく炎症性疼痛や慢性炎症も抑制できることを明らかにした。

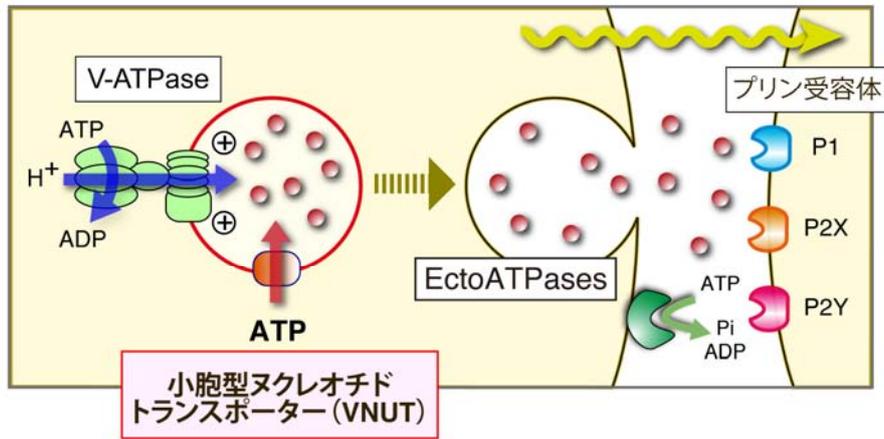


図1 プリン作動性化学伝達 (7,8)

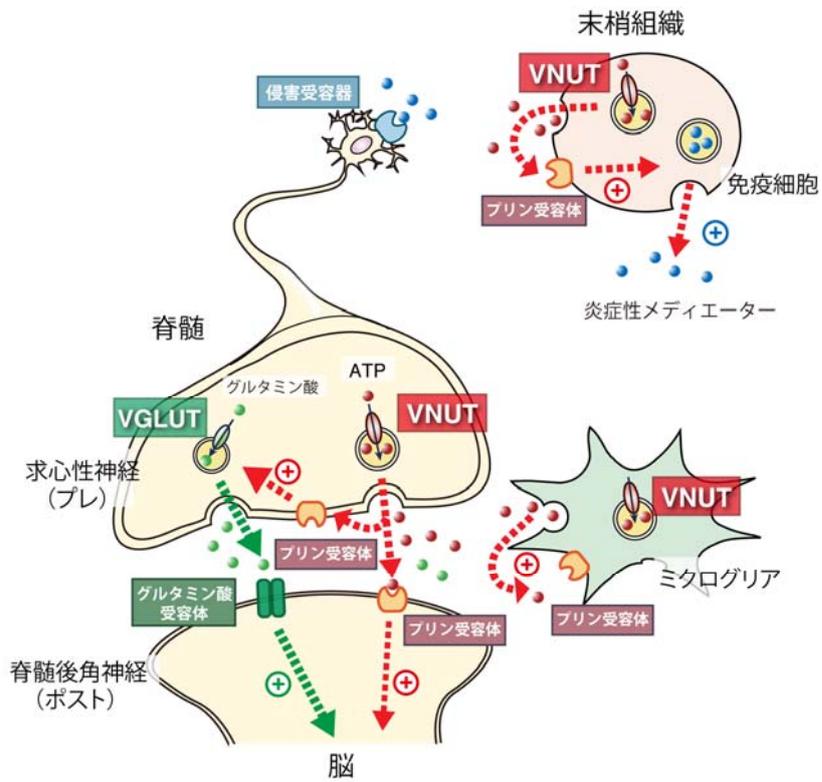


図2 疼痛の伝達経路 (7,9)

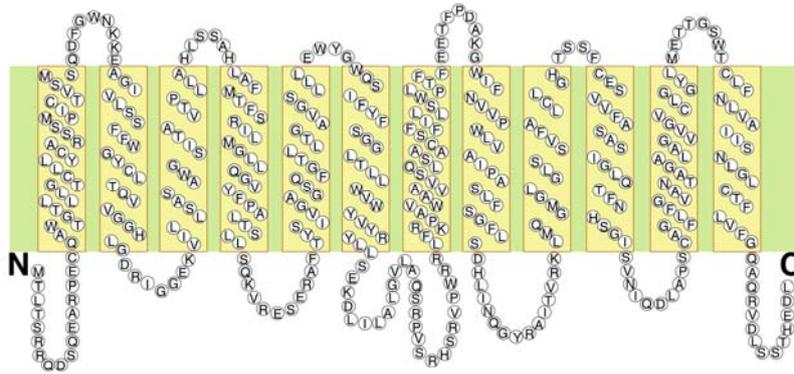


図 3 VNUT の推定二次構造 (8)

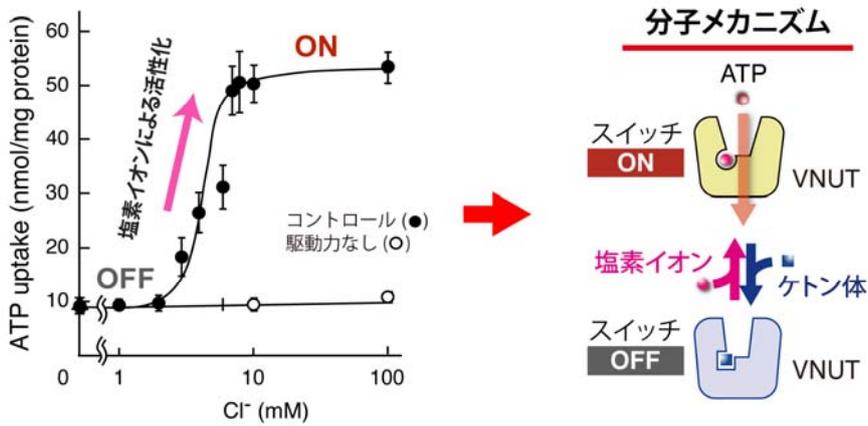


図 4 VNUT の塩素イオン依存性 (8,13)

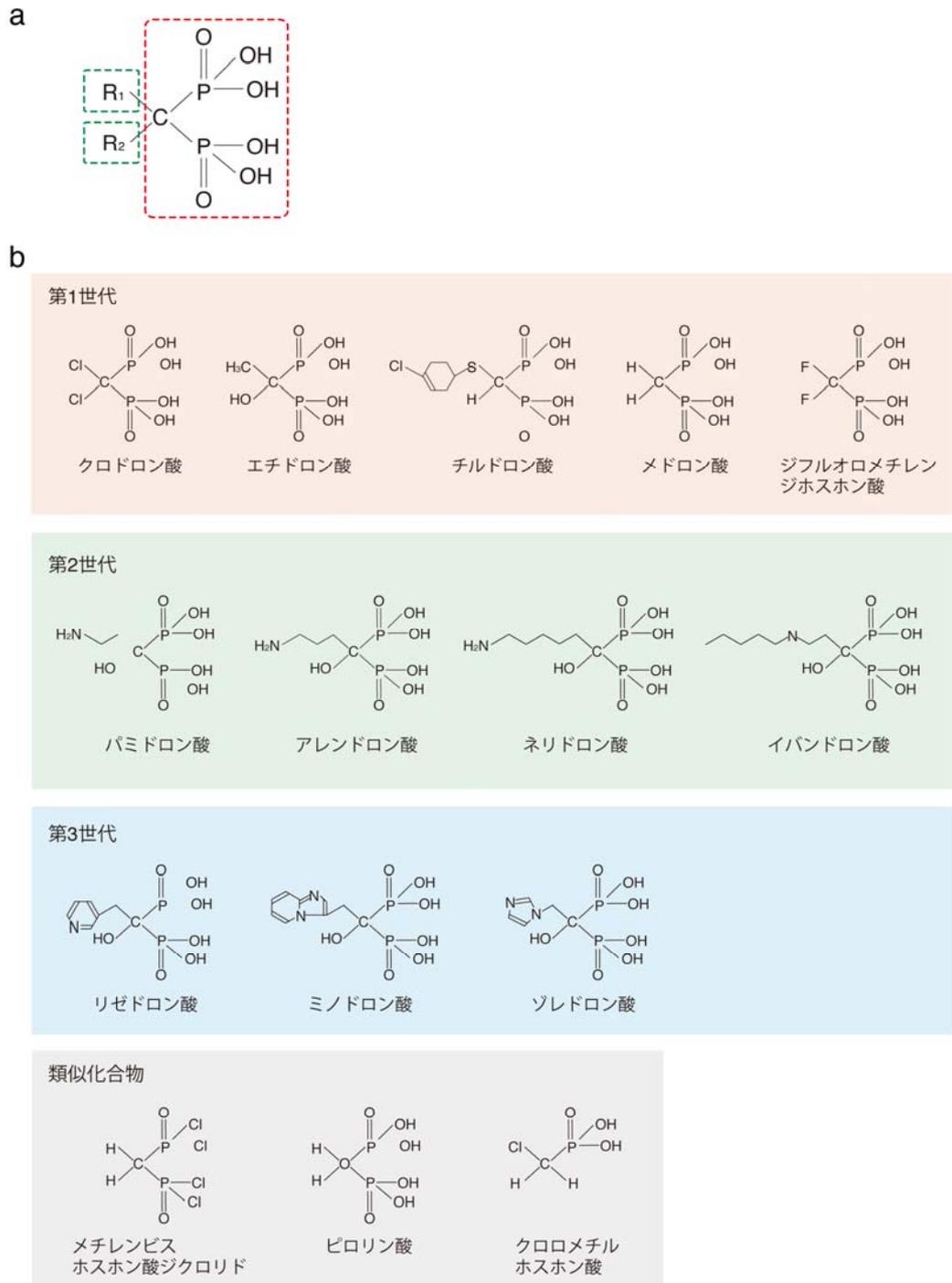
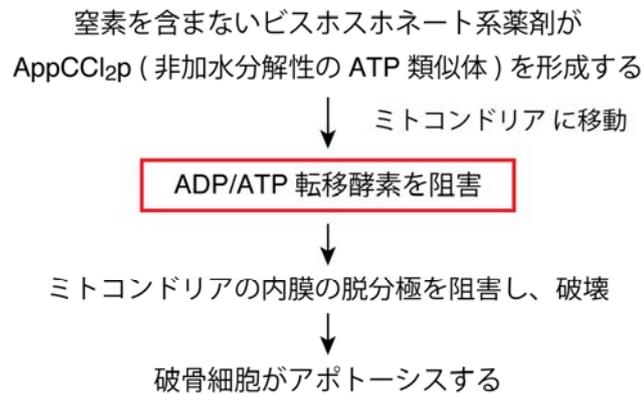


図 5 a: ビスホスホネート系薬剤の基本骨格

b: 代表的なビスホスホネート系薬剤とその類似化合物

a



b

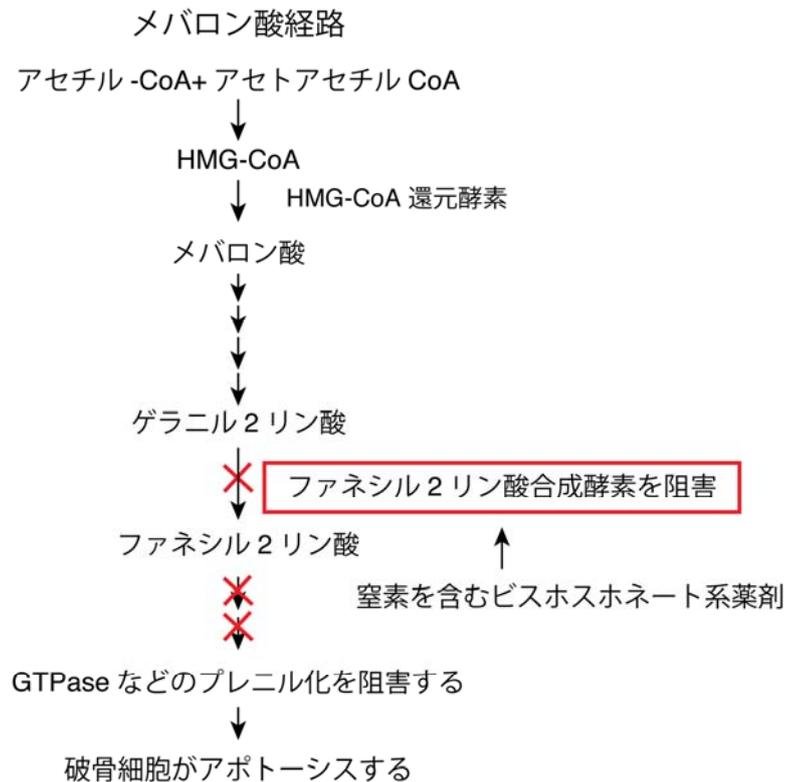


図 6 a: 第 1 世代のビスホスホネート系薬剤の骨吸収抑制メカニズム (21)

b: 第 2,3 世代のビスホスホネート系薬剤の骨吸収抑制メカニズム (22)

第二章 実験方法

cDNA

Human VNUT (Accession No. NM001302643.1) (27)、rat VGLUT1 (Accession No. NM053859.2) (12)、rat VGLUT2 (Accession No. NM053427.1) (12)、human VGLUT3 (Accession No. NM001145288.1) (12)、mouse VEAT (Accession No. NM172773) (12)、mouse VIAAT (Accession No. BC052020) (28)、mouse VMAT2 (Accession No. NM013031.1) (12)、mouse NPT1 (Accession No. NM001170638.1) (29) の cDNA を PCR にて増幅し、使用した。本研究に使用したベクターに組み込んだ上記の cDNA は、全てシーケンスが正しいことを確認した。

大腸菌を用いた各種トランスポーターの精製

1) 大腸菌精製用のプラスミド作製

市販のベクターである pET28a(+) の N 末、C 末に α 、 β と呼ばれる可溶性 α ヘリックスタンパク質を付加させたベクターを用いた (27,30)。pET28a(+) には N 末、C 末にそれぞれ 6×His タグがついている。In-Fusion HD Cloning Kit (TAKARA) を用いて VNUT、VGLUT3、VEAT、NPT1 の cDNA をベクターである β -pET28a(+)- β に、VGLUT2 の cDNA を β -pET28a(+)- α に組換えた。目的の cDNA を増幅した PCR 産物 1 μ L と β -pET28a(+)- β または β -pET28a(+)- α を 2 μ L、5×In-Fusion HD Enzyme Premix を 2 μ L、Cloning Enhancer を 1 μ L と滅菌した蒸留水を 4 μ L を混合した。37°C で 15 分加温した後、さらに 50°C で 15 分間加温し、氷上に静置した。その後、各遺伝子を DH5 α 株に形質転換した。

2) ミニプレップ法

Miniprep kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを回収した。DH5 α 株に形質転換し、培養後 LB 寒天培地に生えてきたコロニーから採取した大腸菌をカナマイシン 30 μ g/mL を含む LB 培地 [1%(w/v) Bacto tryptone、0.5%(w/v) Bacto yeast extract、1%(w/v) 塩化ナトリウム] にて培養した。その後、遠心分離して大腸菌を回収し、反応液 1 を 250 μ L 混和した。そこへ反応液 2 を 250 μ L 混和し、2 分間静置した。さらに、反応液 3 を 350 μ L 混和し、2 分間静置した。遠心分離 (16,400×g、1 分、RT) し、上清を QA1 prep spin colum に取り、再度遠心分離 (16,400×g、1 分、RT) した。その後、流出液を捨て、反応液 4 を 750 μ L 添加して、遠心分離 (16,400×g、1 分、RT) し、流出液を捨て、再び遠心分離 (16,400×g、1 分、RT) した。その後、カラムに溶出液を 50 μ L 添加して、1 分間放置し、遠心分離 (18,900×g、1 分、RT) した。採取したサンプルを各ベクターに組み込まれ

たプラスミドとした。

3) トランスポーターの発現と精製

各遺伝子形質転換した C43 株をカナマイシン 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含んだ TB 培地 [1.33%(w/v) Bacto trypton、2.66 %(w/v) Bacto yeast extract、0.44 %(v/v) グリセロール、17 mM リン酸 2 水素カリウム、55 mM リン酸水素 2 カリウム] 1 L 中において、O.D.₆₀₀ が 0.6~0.8 になるまで 37 °C で培養し、IPTG (終濃度 1 mM) を混ぜ、その後 18°C で 16 時間培養した。培養液を、遠心分離 (2,800×g、15 分、4°C) して上清を取り除いた。これを破碎溶液 [20 mM MOPS/Tris pH 7.0、300 mM スクロース、2 mM PMSF、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ペプスタチン A、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ロイペプチン] 40 mL 中に懸濁し、SONICS 社 VC-505 にて超音波処理 (125 W、30 秒×8 回) し、遠心分離 (5,856×g、5 分、4 °C) した。この上清を回収し、遠心分離 (160,000×g、1 時間、4 °C) して、得られた沈殿物を膜画分とした。この膜画分を 10 mg/mL になるように、可溶化液 [70 mM Tris/HCl pH 8.0、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化カリウム、15%(v/v) グリセロール] にて懸濁し、終濃度が 1.5%(w/v) になるように Fos-choline-14 (Affymetrix) を混和しホモジナイズして、20 分間氷上で放置した。その後、遠心分離 (160,000×g、1 時間、4°C) して、その上清を可溶性画分とした。この可溶性画分を Ni-NTA super flow レジン (QIAGEN) に攪拌しながら吸着 (2 時間、4 °C) させた。これを 10 mL の洗浄溶液 1 [70 mM Tris/HCl pH 8.0、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化カリウム、15%(v/v) グリセロール、2 mM PMSF、0.1 %(w/v) Fos-choline-14] で洗浄し、次に 20 mL の洗浄溶液 2 [70 mM Tris/HCl pH 8.0、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化カリウム、15%(v/v) グリセロール、20 mM イミダゾール、2 mM PMSF、0.1 %(w/v) DTM] で洗浄した。最後に、3 mL の溶出液 [20 mM Tris/HCl pH 8.0、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化カリウム、20%(v/v) グリセロール、250 mM イミダゾール、2 mM PMSF、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ペプスタチン A、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ロイペプチン、0.1%(w/v) DTM] にて各トランスポーターを溶出した。

昆虫細胞を用いた各種トランスポーターの精製

1) 昆虫細胞発現用プラスミドへの組換え

Invitrogen のプロトコールを参照し、VGLUT1、VIAAT、VMAT2 の cDNA を用いて、昆虫細胞発現用プラスミドを GATEWAY SYSTEM (Invitrogen) によって

作製した。LR recombination により、エントリーベクターpENTR (Invitrogen) から発現ベクターpDEST10 (Invitrogen) に目的の遺伝子を組換えた。pDEST10 は N 末に 6×His タグのついた昆虫細胞発現用ベクターである。pENTR-VGLUT1、pENTR-VIAAT、pENTR-VMAT2 をそれぞれ pDEST10、LR クロナーゼと混合し、加温 (1 時間、25°C) した。Proteinase K 処理 (終濃度 0.4 mg/mL) を 37°C、10 分間した後、この反応液を DH5 α 株にヒートショック法にて導入した。このプラスミドをミニプレップ法によって得た後、得られたプラスミドは制限酵素処理、及び、上流の組換え部位のシーケンスを読むことにより確認した。

さらに、DH10Bac (組換えバキュロウイルス作製用コンピテントセル) での Tn7 トランスポゼースによる組換え反応を行った。DH10Bac と pDEST10-VGLUT1、pDEST10-VIAAT、pDEST10-VMAT2 をヒートショック法 (30 秒間、42°C) によって導入し、SOC 培地を 10 倍量混ぜ、加温 (4 時間、37°C) した。これを 50 μ g/mL カナマイシン、7 μ g/mL ゲンタマイシンと 10 μ g/mL テトラサイクリンを含んだ LB 寒天培地にまき、加温 (一晚、37°C) した。この時、IPTG と X-gal をプレートにまいておく。組換えが起こると、 β ガラクトシダーゼが欠損し、コロニーが青く染まらない。組換えが起こらないと、 β ガラクトシダーゼによりコロニーが青く染まる。よって、白いコロニーからミニプレップ法によってそれぞれバクミド-VGLUT1、バクミド-VIAAT、バクミド-VMAT2 を回収した。

2) ミニプレップ法 (バクミド用)

大腸菌を Solution1 [50 mM グルコース、25 mM Tris/HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0] 200 μ l で懸濁し、Solution2 [0.2 M 水酸化ナトリウム、1%(w/v) SDS] を 200 μ l 混和し、室温で 5 分間静置した。Solution3 [3 M 酢酸カリウム、11.5%(v/v) 酢酸] を 200 μ l 混和し、4°C で 10 分間静置した。遠心分離 (18,000 \times g、15 分、4°C) し、上清を回収して、等量のイソプロパノールを混合した。転倒混和し、氷上で 10 分間静置した。遠心分離 (18,000 \times g、15 min、4°C) し、上清を除き、70%エタノールで 2 回洗浄した。TE 溶液 [10 mM Tris/HCl pH 8.0、1 mM EDTA] を無菌的に混ぜ、4°C で保存した。

3) 昆虫細胞の培養

ウイルス作製に使用した Sf9 細胞は complete TMN-FH 培地を用い、タンパク質精製に使用する High Five 細胞は Express five SFM 培地を用いて 27°C で培養

し、pass 30 まで、かつ、継代し始めてから 3 ヶ月以内のものまで実験に使用した。

・ Complete TMN-FH 培地の組成

Grace's Insect Medium (GIBCO)、10% FBS、0.35 mg/mL 炭酸水素ナトリウム、4 g/L Yeastlate (GIBCO)、3.3 mg/mL lactalbumin hydrolysate (GIBCO)、100 units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、0.25 µg/mL ファンギゾン、pH 6.1

・ High Five 細胞培養用培地の組成

Express Five SFM (GIBCO)、18 mM L-グルタミン、10 µg/mL ゲンタマイシン、pH 6.1

4) 組換えウイルスの作製

組換えウイルスは Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いて作製した(詳細は Invitrogen のプロトコールを参照)。Sf9 細胞を 9×10^5 cells/3.5 cm dish でまいた。細胞が dish に定着後、培地を 0.35 mg/mL 炭酸水素ナトリウムを含んだ Grace's Insect Medium に交換した。バクミド 1 µg と cellfectin 6 µl を用い、リポフェクション法にてトランスフェクションした。27°C、5 時間加温後、complete TMN-FH 培地に交換し、感染兆候が見られるまで数日培養した。感染兆候が見られたら、培地を回収し、遠心分離 (500×g、5 分、4°C) した。上清のみを回収し、これを P1 ウイルスとした。P1 ウイルスは PCR 法にて確認した。

5) 単離したウイルスの確認

P1 ウイルス液 100 µl を 20 % (w/v) PEG/2.5 M NaCl 100 µl と混合し、室温で 30 分間静置した。遠心分離 (18,000×g、10 分、室温) し、上清を除いた。沈殿した DNA を 80 µl の滅菌蒸留水に溶かし、Proteinase K 処理 (終濃度 0.5 mg/mL) した。中性フェノール/クロロホルム (1:1) にて抽出し、上清をエタノール沈殿し、ウイルス DNA を得た。

6) ハイタイターウイルスの作製

Sf9 細胞を 6×10^6 cells/75 cm² フラスコでまき、定着後、P1 ウイルス液を 100 µL ずつ混和した。加温後 (96 時間、27°C)、培養液を回収し、遠心分離 (500×g、5 分、4°C) した。上清を回収し、これをハイタイターウイルスとした。

7) ウイルス力価の規定と感染

プラークアッセイ法によって、ウイルスの力価を測定した Sf9 細胞を 6×10^6 cells/10 cm dish でまき (50 % コンフルエント)、10 倍段階希釈したウイルス液 3 mL を混ぜ、振とう (1 時間、室温) した。Complete TMN-FH : 4% SeaPlaque Agarose=3 : 1 となるように混合し、42°C で加温した。Dish の培地を除いた後、これを 10 mL 重層した。アガロースが固まったら、27°C で 7~10 日間密閉して培養した。出来たプラークを計数し、ウイルス液 1 mL あたりの力価を算出した。この時、20~50 個のプラークが形成された dish を計数する。この力価から M.O.I. を計算し、M.O.I と感染時間をふって最適条件を決定した。

8) トランスポーターの発現と精製

VGLUT1、VIAAT では High Five 細胞を 5×10^6 cells/10 cm dish、VMAT2 の精製では Sf9 細胞を 6×10^6 cells/10 cm dish でまき、作製したウイルスを感染させ、各細胞培養用培地に交換後、27°C で培養した。VGLUT1、VIAAT では 48 時間後、VMAT2 では 72 時間後に細胞をセルスクレーパーで回収し、遠心分離 (700×g、10 分、4°C) して上清を除いた。これを破砕溶液 [20 mM Tris/HCl pH 8.0、100 mM 酢酸ナトリウム、10%(v/v) グリセロール、0.5 mM DTT、10 µg/mL ペプスタチン A、10 µg/mL ロイペプチン] で懸濁し、遠心分離 (700×g、10 分、4°C) して上清を除いた。これを再び破砕用液で懸濁し、SONICS 社 VC-505 にて超音波処理 (125 W、30 秒×8 回) した後、遠心分離 (480×g、10 分、4°C) した。この上清を回収し、遠心分離 (160,000×g、1 時間、4°C) して、得られた沈殿物を膜画分とした。この膜画分に可溶化液 [20 mM Tris/HCl pH 8.0、2%(w/v) オクチルグルコシド (同仁化学)、10%グリセロール、10 µg/mL ペプスタチン A、10 µg/mL ロイペプチン] を混和し、遠心分離 (260,000×g、30 分、4°C) し、その上清を可溶化画分とした。この可溶化画分を Ni-NTA super flow レジン (QIAGEN) に攪拌しながら吸着 (4 時間、4°C) させた。これを 10 mL の洗浄溶液 [20 mM MOPS/Tris pH 7.0、1%(w/v) オクチルグルコシド、20%グリセロール、4 mM イミダゾール、10 µg/mL ペプスタチン A、10 µg/mL ロイペプチン] で洗浄し、次いで、3 mL の洗浄溶液に終濃度 500 mM 塩化ナトリウムを添加して洗浄した。再度、10 mL の洗浄溶液で洗浄し、イミダゾールを 60 mM にした溶出液 3 mL にて各トランスポーターを溶出した。

リポソームの調製

大豆の phosphatidylcholine に溶液 [20 mM MOPS/Tris pH 7.0、1 mM DTT] を 10 mg/mL になるように混和した。SONICS 社 VC-505 にて、サンプルを氷冷しながら超音波処理 (125 W、30 秒×3 回) し、液が澄明で均一となるまで破砕した。

トランスポーターの再構成

精製したトランスポーター (VNUT、VGLUT1、VGLUT2、VGLUT3、VEAT、VIAAT、NPT1) 20 μ g をリポソーム 550 μ g に混合し、-80 $^{\circ}$ C にて 15 分静置し、凍結した。その後、迅速に解凍し、再構成溶液 [20 mM MOPS/Tris pH 7.0、100 mM 酢酸ナトリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、0.5 μ M DTT] にて 60 倍希釈し、遠心分離 (200,000 \times g、1 時間、4 $^{\circ}$ C) した。沈殿物を再構成溶液 200 μ L にて懸濁し、再構成プロテオリポソームを得た。精製した VMAT2、20 μ g をリポソーム 550 μ g に混合し、-80 $^{\circ}$ C にて 15 分静置し、凍結した。その後、迅速に解凍し、再構成溶液 [40 mM MES/Tris pH 5.7、150 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、0.5 μ M DTT] にて 60 倍希釈し、遠心分離 (200,000 \times g、1 時間、4 $^{\circ}$ C) した。沈殿物を再構成溶液 200 μ L にて懸濁し、再構成プロテオリポソームを得た。

トランスポーターの輸送活性測定

反応液 [20 mM MOPS/Tris pH 7.0、140 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、10 mM 塩化カリウム] を 27 $^{\circ}$ C にて加温した。各トランスポーターの基質を終濃度 100 μ M になるように [3 H]-ATP (0.5 MBq/ μ mol; PerkinElmer)、[2,3- 3 H]L-glutamate (0.5 MBq/ μ mol; PerkinElmer)、[2,3- 3 H]L-aspartate (0.5 MBq/ μ mol; PerkinElmer)、[2,3- 3 H]GABA (0.5 MBq/ μ mol; PerkinElmer)、*p*-[glycyl-2- 3 H] *p*-aminohippuric acid (0.5 MBq/ μ mol; PerkinElmer) を混ぜ、さらに終濃度 2 μ M になるようにバリノマイシン (SIGMA) を混和した。これに再構成プロテオリポソーム (VNUT、VGLUT1、VGLUT2、VGLUT3、VEAT、VIAAT、NPT1) を 1/20 倍量混ぜ、反応開始とした。130 μ L ずつサンプル液 (0.3 μ g の精製トランスポーターが含まれている) を取り、Sephadex G-50 fine スピнкаラム (GE ヘルスケア) にアプライし、遠心分離 (700 \times g、2 分、4 $^{\circ}$ C) した。その溶出液をクリアゾル 3 mL に混ぜ、中に含まれる放射能 (リポソーム内に取り込まれた基質に相当する) を液体シンチレーションカウンター (TriCarb2800TRs PerkinElmer) によ

り計測した。

反応液 [20 mM MOPS/Tris pH 7.5、140 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、10 mM 塩化カリウム] を 27 °C で加温し、終濃度 10 μ M になるように [2-³H]serotonin (0.5 MBq/ μ mol; PerkinElmer) を混和した。これに VMAT2 を再構成したプロテオリポソームを 1/20 倍量混ぜ、反応開始とした。130 μ L ずつサンプル液 (0.3 μ g の精製 VMAT2 が含まれている) を取り、Sephadex G-50 fine スピンカラム (GE ヘルスケア) にアプライし、遠心分離 (700 \times g、2 分、4°C) した。その溶出液をクリアズル 3 mL に混ぜ、中に含まれる放射能 (リポソーム内に取り込まれたセロトニンに相当する) を液体シンチレーションカウンター (TriCarb2800TRs PerkinElmer) により計測した。

CBB 染色法

精製トランスポーター 5 μ g にサンプル調整液 [1%(w/v) SDS、10%(v/v) 2-mercaptoethanol、50%(v/v) グリセロール、0.3%(w/v) EDTA、6%(v/v) Tris-HCl、1.0 mg/mL bromophenol blue] を混ぜ、10 % SDS-PAGE にて電気泳動した。泳動後のゲルを CBB 染色液 [5%(v/v) 酢酸、50%(v/v) メタノール、0.25%(w/v) CBB] で 10 分間振とうし、固定液 [10%(v/v) 酢酸、20%(v/v) メタノール] で 1 時間振とうした。その後、脱色液 [7%(v/v) 酢酸、5%(v/v) メタノール] で随時、液を交換しながら脱色した。

再構成プロテオリポソームの膜電位測定

K⁺輸送による膜電位の形成は、リポソーム内部が正電荷を帯びることに伴う oxonol-V (SIGMA) の蛍光の消失 (クエンチング) によって測定した。蛍光は日立蛍光光度計を用い、励起波長 580 nm、蛍光波長 640 nm にて測定した。前述の方法により、作製したプロテオリポソームと反応液 [20 mM MOPS/Tris pH 7.0、140 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、10 mM 塩化カリウム] に終濃度 1 μ M となるように Oxonol-V を混和した。蛍光が安定したら測定を開始した。測定開始から 1 分後に終濃度 2 μ M となるようにバリノマイシンを混ぜて内側が正の膜電位差を生じさせ、反応開始した。反応開始 2 分後に終濃度 2 μ M となるように CCCP (SIGMA) を混ぜ、 $\Delta\psi$ と Δ pH を消失させることで反応終止とした。

ATP 結合実験

過去に報告されている ATP 結合部位の光親和性標識法を応用した (31)。氷上にて遮光し、50 μ L の反応液 [20 mM MOPS/Tris pH 7.4、50 mM 酢酸カリウム、2 mM 酢酸マグネシウム、10 mM 塩化カリウム、0.1%(w/v) DTM] に精製 VNUT 4 μ g と終濃度 20 μ M になるように Biotin-11-ATP (PerkinElmer) を混和する。氷上で 3 分間加温し、上記の試料に 254 nm の UV ランプを 10 分間照射する。クロスリンク反応を止めるために、サンプル調整液 [1%(w/v) SDS、10%(v/v) 2-mercaptoethanol、50%(v/v) グリセロール、0.3%(w/v) EDTA、6%(v/v) Tris-HCl、1.0 mg/mL bromophenol blue] をサンプルに混和し、10% SDS-PAGE にて電気泳動した。泳動後、抗ストレプトアビジン抗体 (SIGMA) を用いてイムノブロット法にて VNUT に結合した Biotin-11-ATP を検出した。

ラット胎児・海馬神経細胞とアストロサイトの初代培養

神経細胞、アストロサイトの初代培養は文献に従って行った (32-34)。妊娠 17 日目の Wistar 系 ST ラット (清水実験材料) から子宮を取り出し、ハンクス (+) 液で洗浄し、胎児を取り出した。胎児から脳を単離し、顕微鏡を用いて海馬を単離した。海馬を 0.25%(v/v) トリプシン (GIBCO)、0.01(v/v) % DNase1 (Roche) を含むハンクス (+) 液で振とうしながら加温 (15 分間、37°C) した。DMEM 培地 30 mL を混和し、反応を止め、遠心分離 (120 \times g、5 分、室温) した。上清をアスピレーターで除き、DMEM 培地 30 mL を混和して軽く懸濁し、遠心分離 (120 \times g、5 分、室温) 後再び上清を除いた。神経細胞は Neurobasal 培地 30 mL、アストロサイトは DMEM 培地 30 mL で懸濁し、遠心分離 (120 \times g、5 分、室温) した。神経細胞は、上清を除き Neurobasal 培地に懸濁し、5 μ g/mL ラミニン (GIBCO)、10 μ g/mL ポリ-L-リジン (SIGMA) コートした dish に 2.0×10^5 cells/3.5 cm dish になるようにまいた。アストロサイトも、上清を除き DMEM 培地に懸濁し、何もコートしていない dish に 4.5×10^6 cells/10 cm dish になるようにまいた。その後、5%CO₂ と 37°C という条件下で実験使用時まで培養した。

・ハンクス (+) 液の組成

ハンクス (GIBCO)、1.26 mM 塩化カルシウム、0.4 mM 塩化マグネシウム、0.49 mM 硫酸マグネシウム、4.17 mM 炭酸水素ナトリウム、5.6 mM D-グルコース

・DMEM 培地の組成

DMEM (GIBCO)、10% FBS、55 μ g/L ピルビン酸ナトリウム、1.8 g/L 炭酸水素ナトリウム、25 mM HEPES/NaOH pH 7.4、100 units/mL ペニシリン (GIBCO)、100 μ g/mL ストレプトマイシン (GIBCO)、0.25 μ g/mL ファンギゾン (GIBCO)

・ Neurobasal 培地の組成

Neurobasal medium (GIBCO)、B27 supplement (GIBCO)、0.5 mM L-グルタミン、100 units/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、0.25 μ g/mL ファンギゾン

ラット胎児・大脳皮質ミクログリアの初代培養

妊娠 17 日目の Wister 系 ST ラット (清水実験材料) から子宮を取り出し、ハanks (+) 液で洗浄し、胎児を取り出した。胎児から脳を単離し、顕微鏡を用いて大脳皮質を単離した。大脳皮質を 0.25%(v/v) トリプシン (GIBCO)、0.01%(v/v) DNase1 (ロシュ) を含むハanks (+) 液で振とうしながら加温 (15 分間、37°C) した。DMEM 培地 30 mL を混和し、反応を止め、遠心分離 (120 \times g、5 分、室温) した。上清をアスピレーターで除き、DMEM 培地 30 mL を混和して軽く懸濁した。遠心分離 (120 \times g、5 分、室温) 後、上清を除き、DMEM 培地 30 mL で再度懸濁し、遠心分離 (120 \times g、5 分、室温) した。その後、上清を除き 7.0 $\times 10^6$ cells/75 cm² flask になるように DMEM 培地で懸濁し、5 μ g/mL ポリ-L-リジン (SIGMA) コートしたフラスコにて培養した。2、3 日に一度、培地を交換し、フラスコ底面にアストロサイトがシート状になるまで (約 10 日間)、5% CO₂ と 37°C という条件下で培養した。

アストロサイトの継代

初代培養して約 10 日目に、アストロサイトは継代可能である。まず、dish の培地を除去し、細胞表面を軽くハanks (-) 液 (ハanks (GIBCO) のみ) で洗った。37°C に加温したハanks (-) 液に終濃度が 0.1% トリプシン (GIBCO) と 1 mM EDTA-2Na を混ぜたトリプシン消化液を作製し、dish に 2 mL/dish で添加し、1~2 分置いた。その後、細胞が消化され、はがれてきたら、DMEM 培地を 8 mL/dish 加え、トリプシン消化反応を止めた。ピペッティングで細胞をはがして回収し、遠心分離 (120 \times g、5 分、室温) した。上清を除き、DMEM 培地で懸濁し、dish に 2.0 $\times 10^5$ cells/3.5 cm dish になるようにまいた。

ミクログリアの回収

初代培養して約 10 日後にアストロサイトが底面でシート状になったフラスコを、30 分間室温で振とうした。その後、ミクログリアが含まれた上清を回収し、遠心分離 (120×g、5 分、室温) 後、上清を除き、DMEM 培地で実験に応じた細胞濃度になるように懸濁した。上清を回収したフラスコは、再度 DMEM 培地を足し、5%CO₂、37°C という条件下で再度培養した。ミクログリアは、1 枚のフラスコから複数回は回収可能であるため、この操作を行った。

神経細胞とアストロサイトからの ATP、グルタミン酸放出

初代培養後 12~14 日経過した神経細胞と継代後 48 時間のアストロサイトを用いて実験した。まず、培地を除去し、クレブス液にて数回細胞を洗い、クレブス液で 3 時間、5%CO₂ と 37°C という条件下で加温した。その後、高カリウム液を添加し、20 分間 5%CO₂ と 37°C という条件下で加温し、細胞から放出された ATP とグルタミン酸が含まれている上清を回収した。

・クレブス液の組成

128 mM 塩化ナトリウム、1.9 mM 塩化カリウム、1.2 mM リン酸 2 水素カリウム、1.3 mM 硫酸マグネシウム、26 mM 重炭酸ナトリウム、10 mM D-グルコース、10 mM HEPES/NaOH pH7.4、2.4 mM 塩化カルシウム、0.2%(w/v) BSA

・高カリウム液の組成

75 mM 塩化ナトリウム、55 mM 塩化カリウム、1.2 mM リン酸 2 水素カリウム、1.3 mM 硫酸マグネシウム、26 mM 重炭酸ナトリウム、10 mM D-グルコース、10 mM HEPES/NaOH pH7.4、2.4 mM 塩化カルシウム、0.2%(w/v) BSA

ミクログリアからの ATP 放出

ミクログリアは 1.0×10^4 cells/well になるように 96 穴プレートにまいた。24 時間後に実験した。まず、培地を除去し、クレブス液にて数回洗い、クレブス液で 3 時間、5%CO₂ と 37°C という条件下で加温した。その後、クレブス液にて数回洗い、終濃度が 5 μM になるように A23184 (SIGMA) をクレブス液に混ぜ、5 分間 5%CO₂ と 37°C という条件下で加温し、細胞から放出された ATP が含まれている上清を回収した。

放出された ATP の定量

試料中の ATP の定量は、ATP bioluminescent assay kit (SIGMA) を用いた。ATP assay mix dilution buffer : ATP assay mix が 14:1 になるように混和し、試料 100 μ l に対して上記の溶液を 100 μ l 混ぜ、Varioskan flash (ThermoScientific) を用いて発光を測定した。

放出されたグルタミン酸の定量

試料中のグルタミン酸の定量は、HPLC を用いた。

L-7100 型ポンプ (HITACHI) と逆相カラム (SHISEIDO: CAPCELL PAC C₁₈ TYPE MG 4.6 mmI.D.×250 mm) を使用し、移動層は A 液 [50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5]、B 液 [100% メタノール]、流速を 0.9 mL/min とした。A 液および B 液の変則直線濃度勾配は、

0-7 min	A 液	95%	B 液	5%
7-8 min	A 液	95 - 80%	B 液	5 -20%
8-17 min	A 液	80%	B 液	20%
17-18 min	A 液	80 -10%	B 液	20 -90%
18-25 min	A 液	10%	B 液	90%
25-30 min	A 液	10 -95%	B 液	90 -5%
30-45 min	A 液	95%	B 液	5%

とした。検出器は L-7480 型蛍光検出器 (HITACHI) を用い、励起波長 340 nm、蛍光波長 450 nm とした。計測結果はインテグレーター (807-IT : Jasco) によりクロマトグラムとして得た。得られたクロマトグラムのピーク面積からグルタミン酸の量を算出した。

サンプルの誘導体化には *o*-フタルアルデヒド (OPA : 和光純薬) と (N-アセチル-L-システイン (NAC : 和光純薬) を用いた。1 mL の メタノールに 20 mg の OPA を溶解し、それに 10 mg NAC を混ぜ、これを OPA/NAC solution とした。900 μ L の 0.4 M ホウ酸緩衝液 pH 10.5 と 100 μ L の OPA/NAC solution を混合し、誘導体化試薬を調製した。タンパク質を除くために、回収した試料に終濃度が 5% になるように TCA を混ぜ、氷上に 10 分以上静置後、遠心分離 (16,400×g、1 分、4°C) し、回収した上清を HPLC にて測定した。20 μ L の回収した上清または 20 μ L のスタンダードと 5 μ L の内部標準物質である 10 μ M L-ホモシステイン酸 (SIGMA)、そして 75 μ L の誘導体化試薬と混合し、室温で 2 分反応させた後、

カラムに注入した。

神経細胞、アストロサイトへのアレンドロン酸の輸送活性測定

初代培養後 12~14 日経過した神経細胞と継代後 48 時間のアストロサイトを用いて実験した。まず、培地を除去し、反応液 1 [128 mM 塩化ナトリウム、2 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウム、10 mM HEPES/Tris pH7.4] にて 2 回細胞を洗い、反応液 1 で各細胞を 20 分間 37°C で加温した。その後、反応液 2 [128 mM 塩化ナトリウムまたは 256 mM スクロース、2 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウム、10 mM HEPES/Tris pH7.4] 2 回細胞を洗った。

反応液 2 に終濃度が 10 μ M になるように [14 C]-アレンドロン酸 (0.5 MBq/ μ mol; Moravek) を添加し、作製した RI 標識したアレンドロン酸の入った反応液 2 にて細胞を 10 分間 37°C で加温した。加温後、RI 標識したアレンドロン酸の入っていない反応液 2 にて 3 回細胞を洗った。Dish に接着している細胞をはがすために、1% SDS を添加し静置後、セルスクレーパーを用いて、細胞を回収した。その回収液をクリアゾル 9 mL に混ぜ、中に含まれる放射能 (細胞内に取り込まれたアレンドロン酸に相当する) を液体シンチレーションカウンターにより計測した。

神経細胞とアストロサイトにおけるリン酸トランスポーターの RT-PCR

初代培養後 12~14 日経過した神経細胞と継代後 48 時間のアストロサイトを用いて、ISOGEN kit (ニッポンジーン) を使用してトータル RNA を回収した。PrimeScript RT Reagent kit (TAKARA) を用いて、トータル RNA から cDNA を逆転写した。逆転写反応産物に PCR 反応液 (0.4 μ M センス・アンチセンスプライマー、SYBR Premix Extaq II、ROX reference Dye (TAKARA) を混ぜ、PCR 反応には StepOnePlus (Applied Biosystems) を用い、60°C で 30 秒間、95°C で 15 秒間 (35 サイクル) 反応させた。ポジティブコントロールにはハウスキーピング遺伝子である GAPDH を用いた。目的産物の増幅に用いたプライマーとその増幅産物 (bp) は以下に記した。PCR 反応産物に loading buffer (TAKARA) を混ぜ、5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後のゲルを ethidium bromide で 15 分間染色した後、UV にてシグナルを検出した。

SLC20A1 (bp)
 センス 5'-GTGTAGTGACCCTGAAGCAAGC-3'
 アンチセンス 5'-GCCACACAGCAGAACCAAACA-3'

SLC20A2 (bp)
 センス 5'-AATGGTCGGCTCAGCGGTC-3'
 アンチセンス 5'-GATATGAACCAGGAGGCAACGATC-3'

SLC34A1 (bp)
 センス 5'-GTCAAGGACTCATTGTGGGTGC-3'
 アンチセンス 5'-ACTGGAGATGGCATAGGTGGTT-3'

SLC34A2 (bp)
 センス 5'-TGGTTGCCTCCTCCTTGCTG-3'
 アンチセンス 5'-ATGCCCTTCTGAACTCATTTCTGTC-3'

SLC34A3 (bp)
 センス 5'-GCTGTGAAGACCGTTATCAATGC-3'
 アンチセンス 5'-ACAATGGCTGCCGTGAAGAC-3'

GAPDH (bp)
 センス 5'-ACTTTGTGAAGCTCATTTCTGGT-3'
 アンチセンス 5'-TCTCTTGCTCTCAGTATCCTTGCTG-3'

THP-1 細胞からの ATP 放出

ヒト単球のライン化細胞である THP-1 細胞を JCRB より購入した。THP-1 細胞は RPMI1640 培地で、5%CO₂、37°C という条件下で実験使用時まで培養した。まず、培地を除去し、細胞をクレブス液にて数回洗い、クレブス液で懸濁し、1.0 × 10⁶ cells/tube になるようにまいた。細胞を 3 時間、5%CO₂ と 37°C という条件下で加温した。その後、10 μg/mL LPS (Sigma Aldrich) を添加し、5%CO₂、37°C 10 分間加温し、細胞から放出された ATP が含まれている上清を回収した。

・ RPMI1640 培地の組成

RPMI1640 (GIBCO)、10%(v/v) FBS、100 units/mL ペニシリン (GIBCO)、100 μg/mL ストレプトマイシン (GIBCO)、0.25 μg/mL ファンギゾン (GIBCO)

THP-1 細胞へのアレンドロン酸の輸送活性測定

THP-1 細胞の培地を除去し、反応液 1 [128 mM 塩化ナトリウム、2 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウム、10 mM HEPES/Tris pH7.4] にて 2 回細胞を洗い、反応液 1 で各細胞を 20 分間 37°C で加温した。その後、反応液 2 [128 mM 塩化ナトリウムまたは 256 mM スクロース、2 mM 塩化カリウム、1 mM 塩化マグネシウム、10 mM HEPES/Tris pH7.4] 2 回細胞を洗った。

反応液 2 に終濃度が 10 μ M になるように [14 C]-アレンドロン酸 (0.5 MBq/ μ mol; Moravek) を添加し、作製した RI 標識したアレンドロン酸の入った反応液 2 にて細胞を 10 分間 37°C で加温した。その後、RI 標識したアレンドロン酸の入っていない反応液 2 にて 3 回細胞を洗った。その回収液をクリアゾル 9 mL に混ぜ、中に含まれる放射能 (細胞内に取り込まれたアレンドロン酸に相当する) を液体シンチレーションカウンターにより計測した。

THP-1 細胞の細胞死測定

培地を除去し、FBS を含んでいない RPMI1640 培地にて細胞を数回洗い、この培地で懸濁し、dish に 2.0×10^5 cells/3.5 cm dish になるようにまいた。培地中にクロドロン酸 2 ナトリウムまたはクロドロン酸内包リポソームを混ぜ、24 時間、5%CO₂ と 37°C という条件下で加温した。その後、細胞を遠心分離 (120×g、5 分、RT) し回収して、上清を除去し、ペレットを Stain Buffer (Becton Dickinson) にて懸濁した。再度、遠心分離 (120×g、5 分、RT) し、上清を除去後、ペレットを 0.5 mL の Stain Buffer にて懸濁した。ポジティブコントロールとして UV を 10 分間細胞に照射し、細胞死を誘導させた。Propidium Iodide Staining Solution (Becton Dickinson) を細胞懸濁液に混ぜ、10 分間反応させた。その後、各サンプルの死んだ細胞の割合 (ヨウ化プロピジウム陽性) を MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec) を用いて解析した。

動物実験

動物実験は岡山大学と味の素株式会社動物倫理委員会のガイドラインに従った。C57BL/6 マウスは清水実験材料株式会社にて購入した。VNUT^{-/-} マウスは味の素株式会社に提供して頂いた (13)。

慢性の炎症性疼痛モデルは、C57BL/6 マウス (オス、22-30 g) の左後肢の裏に 1% カラゲニン (SIGMA) 20 μ L、もしくは 1 mg/mL complete Freund's adjuvant (CFA; SIGMA) をハミルトン製マイクロシリンジ (100 μ L) と 27 ゲージの注

射針を用いて注射した。神経因性疼痛モデルには、外科的処置による神経障害の内、比較的手技が容易でマウスにも応用が可能な Seltzer モデルを選択した (35)。Seltzer モデルマウスは、マウスをイソフルランにて吸入麻酔後、左後肢を切開し、坐骨神経の中樞側をナイロン糸で部分結紮し、再度縫合して作製した (35)。マウスに投与する化合物は全て生理食塩水に溶かし調整した。実験にはクロドロン酸 2 ナトリウムを使用しており、以後クロドロン酸と表記する。

疼痛試験

• Plantar test

Plantar test は文献に従い行った (36)。実験前に C57BL/6 マウス (オス、22-30 g) をアクリル製の観察用チャンバー (14.0×17.0×11.0 cm) に移し、約 1 時間置いて馴化させた。熱痛覚過敏測定は Hargreaves radiant heat apparatus (Ugo basile) を使用した。熱源は可動式であり、各マウスの炎症の起きている左後肢の裏に可動式レーザーをあて、マウスが痛みを感じ、逃避行動 (足を熱源から離す) をとるまでの時間を自動で測定した。組織へのダメージを防ぐために plantar test の cut-off タイムを 20 秒とした。1 度足の裏にレーザーをあてたマウスには、少なくとも 5 分はインターバルをおいて再び同様の実験を行った。同じマウスで 3~4 回測定し、その値の平均値を結果とした。クロドロン酸は実験 1 時間前にマウスに尾静脈注射した。その際、クロドロン酸の容量は 100 µL/10g body weight で注射した。また、%MPE (投与前と比較した投与後の最大効果) は以下の様に計算した。

$$\%MPE = (PL - BL2) / (BL1 - BL2) \times 100$$

BL1: 炎症を起こす前のマウスの plantar test の値

BL2: 炎症発症後で薬物を投与していないマウスの plantar test の値

PL: 炎症発症後で薬物を投与したマウスの plantar test の値

• Von Frey test

Von Frey test は文献に従い行った (37)。実験前に C57BL/6 マウス (オス、22-30 g) を床が金属製のメッシュになっているチャンバー (10.0×16.0×9.0 cm) に移し、約 1 時間置いて馴化させた。機械刺激による痛覚過敏は、マウスの左後肢の裏に von Frey フィラメント (0.04-2.0 g; Aesthesio) を垂直に進め軽く屈曲する

まで押しつけ、5 秒間そこで押し続けた際のマウスの逃避行動の有無により測定した。刺激した足をフィラメントから逃げる様に離す反応を逃避行動と見なし、陽性とした。また、フィラメントで刺激した際に、マウスが歩き出した場合は、判別不可能として実験をやり直した。逃避行動閾値は up and down method を用いて評価し、文献を参考に算出した。まず、中程度の刺激となる 0.40 g のフィラメントから実験を開始した。0.40 g のフィラメントで逃避行動が見られた場合は、次に弱い刺激となる 0.16 g で実験を行い、見られなかった場合は、次に強い刺激となる 0.60 g で実験を行った。始めて陽性と陰性が入れ替わる、もしくは陰性と陽性が入れ替わったときから後 4 回実験を行い、合計で 6 回実験を行った。クロドロン酸は実験 1 時間前にマウスに尾静脈注射した。その際、クロドロン酸の容量は 100 μ L/10g body weight で注射した。

浮腫と炎症の評価方法

カラゲニン、CFA によって引き起こされた左後肢の浮腫の厚みをデジタルノギスにて測定した。カラゲニン投与 1 時間前にクロドロン酸など薬剤を尾静脈投与し、カラゲニン投与 4 時間後に浮腫サイズを測定した。CFA 投与 1 日前にあらかじめ薬剤を尾静脈投与し、CFA 投与後、1 日 1 回皮下に各化合物を連投し続け 3、14 日後の浮腫を測定した。

病理組織学的に炎症を観察するために、炎症患部のヘマトキシリン-エオシン染色を行った。まず、左後肢を固定用 PBS 溶液 (4%(w/v) パラホルムアルデヒド) に 1 日浸け、2 日目に脱灰用 PBS 溶液 (19%(w/v) EDTA) に交換し、1 週間適宜脱灰用 PBS 溶液を交換した。その後、サンプルの脱水を行い、クライオスタット (Leica) を用い 10 μ m の厚みでカットした。マイヤーヘマトキシリン溶液で染色した後、1%(v/v) エオシン Y 溶液で染色した。その後、サンプルを Mount-Quick (大道産業) にて包埋し、Biozero microscope (Keyence) を用いて観察した。組織学的解析は BZ-X Analyzer software (Keyence) を用いて行った。

血清中のサイトカイン定量

採血後、血液を室温で 1 時間静置し、遠心分離 (900 \times g、15 分、RT) して血清を回収した。血清中のサイトカインの定量には cytometric bead array enhanced sensitivity flex set system を用いた mouse enhanced sensitivity Flex kit (Becton Dickinson) を使用した。回収した血清を assay diluent にて 3 倍希釈し、計 50 μ L

作製し、目的のサイトカインを認識する Mix Beads を 20 μ L ずつ混和し、軽く攪拌後室温で遮光し、2 時間反応させる。各 Mix Beads を認識する A 液を 20 μ L ずつ混ぜ、軽く攪拌後室温で遮光し、2 時間反応させる。余分な A 液を洗い流すために洗浄液を 1 mL 混和後、遠心分離 (200 \times g、5 分、RT) し、Mix Beads を吸わない様に上清を除去し、A を認識する B 液を 100 μ L ずつ混ぜ、軽く攪拌後室温で遮光し、1 時間反応させる。余分な B 液を洗い流すために洗浄液を 1 mL 混和し、攪拌後、遠心分離 (200 \times g、5 分、RT) し、上清を 100 μ L 残して除去する。洗浄液を各 300 μ L 混ぜ再懸濁し、サンプルを作製した。サンプル中のビーズの測定は MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec) にて行った。

血球細胞の細胞死測定

マウスの尾より採血し、血液と Lysing Buffer (Becton Dickinson) を混和後遮光し、室温で 15 分間静置し溶血させた。遠心分離 (200 \times g、5 分、RT) し、上清を除去し、ペレットを Stain Buffer (Becton Dickinson) にて懸濁した。再び、遠心分離 (200 \times g、5 分、RT) し、ペレットを 0.5 mL の Stain Buffer にて懸濁した。ポジティブコントロールとして UV を 10 分間細胞に照射し、細胞死を誘導させた。FC レセプターをブロックするために、細胞懸濁液に Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Becton Dickinson) を添加し、4 $^{\circ}$ C で 15 分間加温した。その後、マクロファージを標識する BV421 Rat Anti-Mouse F4/80 (Becton Dickinson) もしくは BV421 Rat IgG2a, κ Isotype Control (Becton Dickinson) を添加し、遮光して 4 $^{\circ}$ C で、40 分間加温した。Stain Buffer を添加し、攪拌後、遠心分離 (300g、5 分、RT) し、上清を除去した。ペレットを Stain Buffer にて懸濁し、上記の操作を再度行った。上清を除去し、ペレットを Stain Buffer にて再懸濁して、Propidium Iodide Staining Solution (Becton Dickinson) を細胞懸濁液に混ぜ、10 分間反応させた。その後、各サンプルの死んだ細胞の割合 (ヨウ化プロピジウム陽性) を MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec) を用いて解析した。

データ解析

全ての実験は、n=3~13 である。統計学的有意差は、ANOVA 検定後に Dunnett 検定もしくは Tukey 検定を用いて算出した。それぞれの検定は、GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software) を用いて行った。NS は有意差なし、* P<0.05、**P<0.01 である。

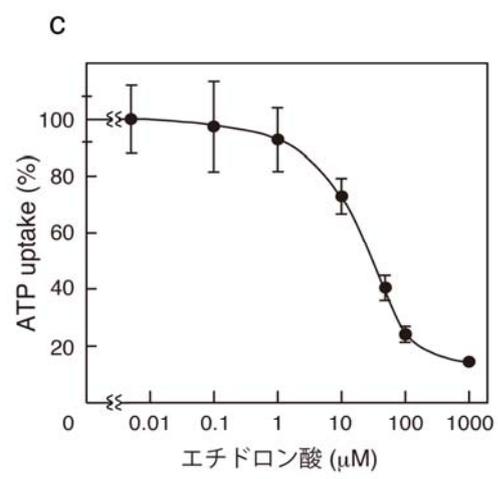
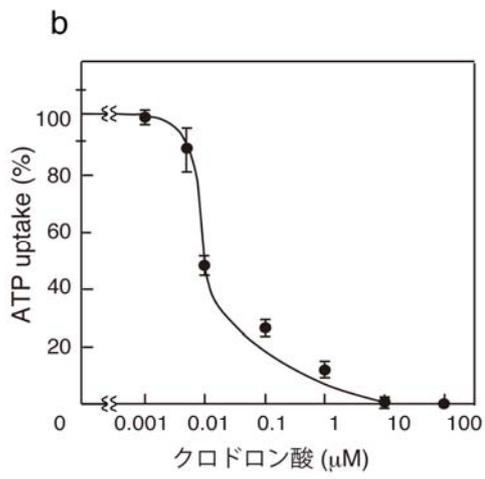
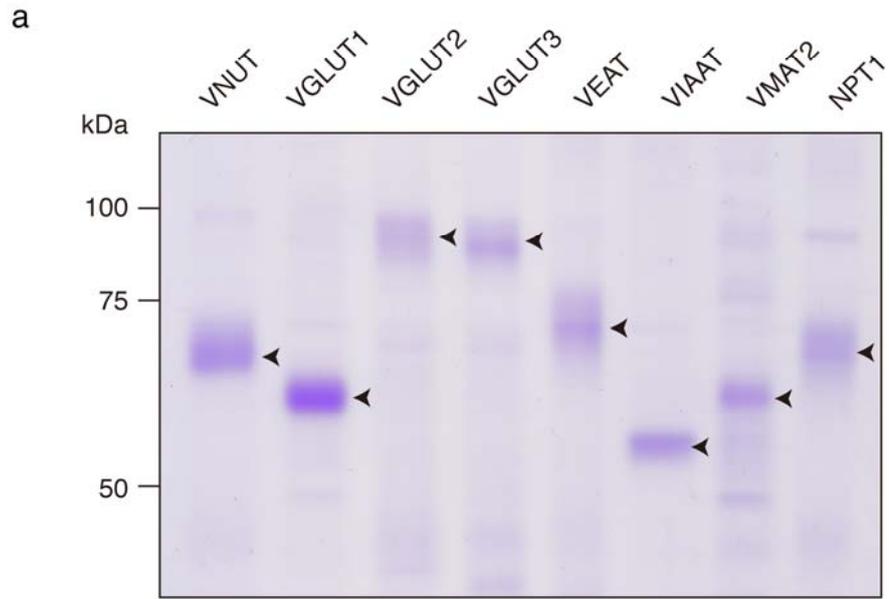
第三章 結果

第一節 VNUT 特異的阻害剤の同定

クロドロン酸は VNUT 特異的阻害剤である

第 1 世代のビスホスホネート系薬剤の標的分子を同定するために、各種小胞型神経伝達物質トランスポーター（小胞型ヌクレオチドトランスポーター: VNUT、小胞型グルタミン酸トランスポーター: VGLUT、小胞型興奮性アミノ酸トランスポーター: VEAT、小胞型抑制性アミノ酸トランスポーター: VIAAT、小胞型モノアミントランスポーター: VMAT）、SLC17 ファミリーの一つである Na⁺ 依存性リン酸トランスポーター1 (NPT1) を精製した。VNUT、VGLUT2、VGLUT3、VEAT、NPT1 は大腸菌を用いて、VGLUT1、VIAAT、VMAT2 は昆虫細胞を用いて精製した。これらの精製画分を SDS-PAGE し、CBB 染色した結果、各トランスポーターの推定分子量付近に主要なシグナルが観察されたため、これらが精製できていることを確認した。(図 7a)。

精製したトランスポーターを人工膜小胞に再構成し、第 1 世代のビスホスホネート系薬剤であるクロドロン酸、エチドロン酸を各濃度で反応液に混和し、基質の輸送阻害効果を測定した。その結果を用い、カレイダグラフにて IC₅₀ を算出した。VNUT の ATP 輸送活性に対してクロドロン酸の IC₅₀ は 15.6 nM、エチドロン酸の IC₅₀ は 20.8 μM であった (図 7b,c)。VGLUT1、VGLUT2 と VGLUT3 のグルタミン酸輸送活性に対してクロドロン酸の IC₅₀ はそれぞれ 34.6 μM、43.0 μM、28.6 μM であり、エチドロン酸の IC₅₀ はそれぞれ 78.6 μM、32.8 μM、6.30 μM であった (図 7d)。これら以外のトランスポーターでは両化合物とも阻害効果は検出されなかった (図 7d)。



d

トランスポーター	基質	IC ₅₀ (μM)	
		クロドロン酸	エチドロン酸
VNUT	ATP	0.0156	20.8
VGLUT1	グルタミン酸	34.6	78.6
VGLUT2	グルタミン酸	43.0	32.8
VGLUT3	グルタミン酸	28.6	6.30
VEAT	アスパラギン酸	> 100	> 100
VIAAT	GABA	> 100	> 100
VMAT2	セロトニン	> 100	> 100
NPT1	パラアミノ馬尿酸	> 100	> 100

図7 クロドロン酸はVNUTを強力に阻害する

a: 精製した各種トランスポーター (5 μg) を 10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、CBB 染色した。推定分子量の目的のシグナルを矢頭で示している。生理的条件である細胞内塩素イオン 10 mM 存在下で各種トランスポーターにおける
b: クロドロン酸、c: エチドロン酸の基質の輸送阻害効果を測定した (2分) (n=4-12)。
d: 同条件での各種トランスポーターにおけるクロドロン酸とエチドロン酸の基質の輸送阻害効果を測定した (2分)。測定結果は、50% 阻害効果 (IC₅₀) で示した (n=3-12)。

他のビスホスホネート系薬剤とその類似化合物の VNUT の ATP 輸送活性に対する阻害効果を調べた。第 1 世代はチルドロン酸、メドロン酸、ジフルオロメチレンジホスホン酸（未承認）、第二世代はパミドロン酸、アレンドロン酸、ネリドロン酸、イバンドロン酸、第三世代はリゼドロン酸、ミノドロン酸、ゾレドロン酸、類似化合物としてメチレンビスホスホン酸ジクロリド（未承認）、クロロメチルホスホン酸（未承認）を用いた（図 8）。その結果、クロドロン酸と同程度の阻害作用を示す VNUT 阻害剤は同定されなかった。ミノドロン酸、ジフルオロメチレンジホスホン酸、メチレンビスホスホン酸ジクロリド、メドロン酸、エチドロン酸やイバンドロン酸において VNUT の ATP 輸送活性に対する弱いもしくは中程度の阻害効果が見られ、その他の化合物において阻害効果は見られなかった。

以上の結果から、第 1 世代ビスホスホネート系薬剤のクロドロン酸のみが VNUT を低濃度で特異的に阻害することを見出した。

化合物名	VNUTに対するIC ₅₀ (μM)	骨吸収抑制効果
クロドロン酸	0.0156	+
エチドロン酸	20.8	+
チルドロン酸	>100	+
メドロン酸	7.52	+
ジフルオロメチレン ジホスホン酸	1.51	NT
パミドロン酸	>100	++
アレンドロン酸	>100	+++
ネリドロン酸	>100	++++
イバンドロン酸	22.7	++++
リセドロン酸	>100	++++
ミノドロン酸	0.267	++++
ゾレドロン酸	>100	++++
メチレンビス ホスホン酸ジクロリド	1.81	NT
ピロリン酸	>100	-
クロロメチル ホスホン酸	>100	NT

図8 クロドロン酸がVNUTを一番強力に阻害する

精製したVNUTを再構成したリポソームを用い、駆動力をかけ、各化合物存在下でのATP輸送活性を測定した(2分)。測定結果は50%阻害効果(IC₅₀)で示した(n=3-13)。骨吸収抑制効果は以下の様に示した(20,26)。-,無し;+,弱い;++,中程度;+++,強い;++++,とても強い;NT,未試験。橙色は第1世代、緑色は第2世代、青色は第3世代、灰色は類似化合物を示す。

クロドロン酸は VNUT の塩素イオンとケトン体の制御スイッチを可逆的に抑制する

VNUT の ATP 輸送活性に対するクロドロン酸の阻害様式を検証した。

・クロドロン酸は膜電位形成に影響しない

VNUT の駆動力である正の膜電位差の形成にクロドロン酸が影響していないか実験した。膜電位感受性試薬 oxonol-V を用いて蛍光クエンチングを測定することで、バリノマイシン存在下の K^+ 透過によって生じる膜電位差を測定した。2分後にプロトンイオノフォアである CCCP を混ぜて、反応停止とした。コントロールのクエンチングの程度を 100 % として、100 μ M クロドロン酸を混和した場合のクエンチング度合いを数値化すると 96.9 % となり、有意な差は見られなかった (図 9a)。このことから、クロドロン酸は膜電位形成に影響しないことがわかった。

・クロドロン酸は VNUT の塩素イオン依存性の親和性を下げる

VNUT の塩素イオン要求性に対する影響を調べた。VNUT は、2 mM 塩素イオン存在下では ATP 輸送活性は見られず、3~7 mM 塩素イオン存在下で急激に活性が上昇し、8 mM 付近で輸送活性はプラトーに達した (図 9b)。また、膜電位差が形成されていないと塩素イオン濃度を変えても輸送活性は見られなかった。100 nM クロドロン酸を添加すると、ATP 輸送活性が高濃度の塩素イオン側にシフトした。ヒル係数を算出した結果、コントロールでは 3.1 と強い正の協同性が見られた (図 9c)。100 nM クロドロン酸を添加しても、ほとんどヒル係数に変化はなかった (図 9c)。このことから、クロドロン酸が VNUT の塩素イオン親和性を低下させることが明らかになった。

・VNUT への ATP 結合にクロドロン酸は影響しない

ビオチン標識 ATP の光親和性標識法により、VNUT の ATP 結合に対するクロドロン酸の影響を調べた。ストレプトアビジン抗体を用いて VNUT に結合したビオチン-ATP を検出した。サンプルに UV 照射した場合、VNUT の分子量 (73 kDa) にシグナルを検出し、UV 照射をしなかったサンプルではほとんどシグナルは検出されなかった。また、光親和性標識法による VNUT の基質特異性は既に報告されている ATP 輸送活性測定時の基質特異性とほとんど同様であった (図 9d)。第 1 世代であるクロドロン酸、エチドロン酸を添加してもシグナルが

検出されたことから、これらは VNUT の ATP 結合に影響しないことを見いだした (図 9d)。さらに、SLC17 ファミリーのトランスポーターにおいて、塩素イオンと競合するケトン体や類似化合物のアセト酢酸、グリオキシル酸を加えても (13, 38)、シグナルが変化しなかったことから、ビスホスホネート系薬剤と同様に VNUT の ATP 結合には影響しないことがわかった。

・クロドロン酸の VNUT への結合は可逆的である

VNUT に対するクロドロン酸の結合様式の可逆性を検証した。精製した VNUT と 1 μ M クロドロン酸を予め反応させ、約 100 倍量の再構成溶液にて希釈し、洗浄した後に駆動力をかけ、ATP 輸送活性を測定した。その結果、完全に活性が回復したことから、クロドロン酸は可逆的に VNUT を阻害していることがわかった (図 9e)。

クロドロン酸存在下で VNUT の輸送活性が阻害され、高濃度の塩素イオン存在下ではこの阻害効果が見られないことから、クロドロン酸は VNUT の塩素イオン依存性に作用するアロステリックな制御因子であり、またクロドロン酸と反応させた VNUT を洗浄することで活性が回復したことから、阻害効果は可逆的であることを明らかにした。

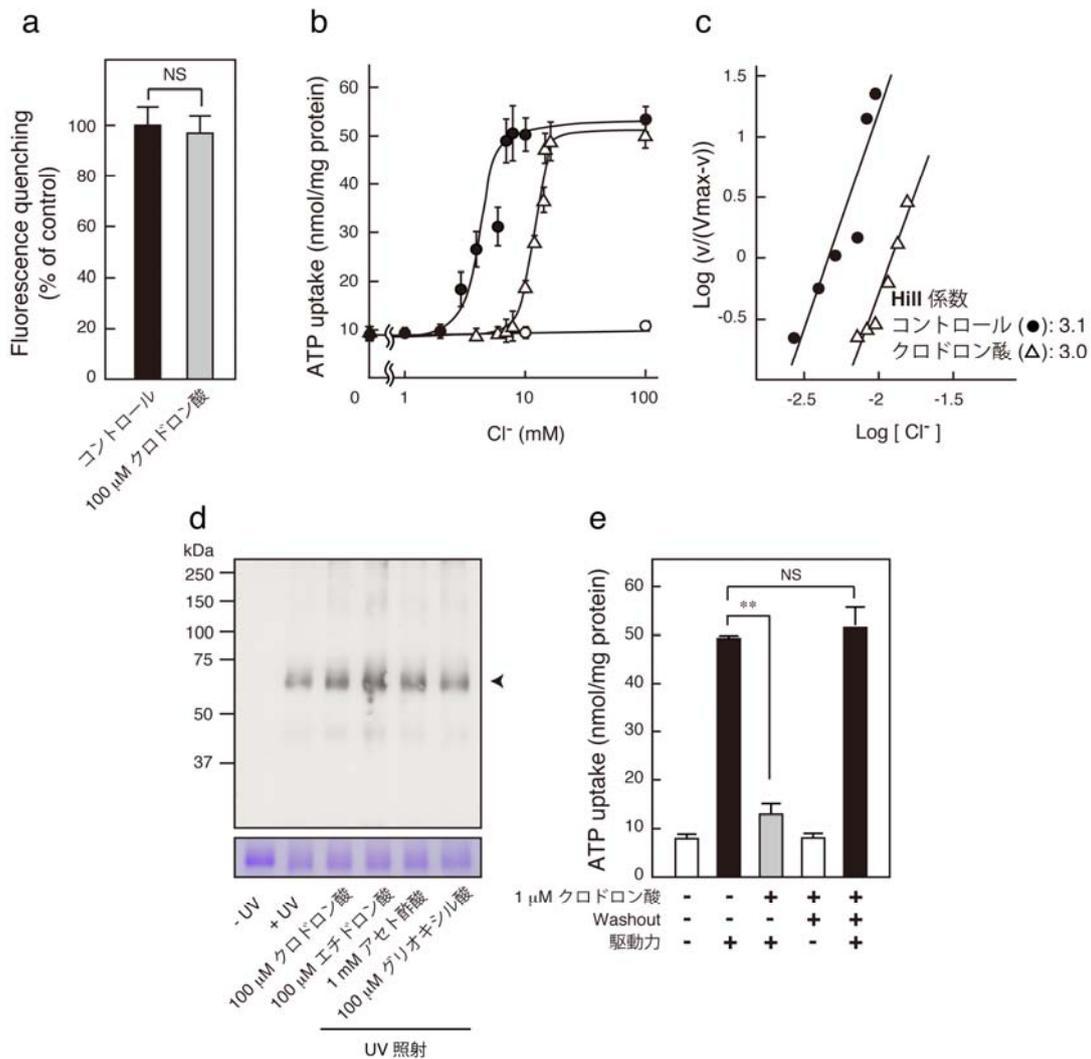


図9 クロドロン酸はVNUTの塩素イオンとケトン体の制御スイッチを可逆的に抑制する

a: 100 μM クロドロン酸存在・非存在下での、バリノマイシンによって形成された膜電位差の変化を、Oxonol-Vを用いて測定した(2分)。反応開始からCCCPを混ぜて反応停止し、クロドロン酸非存在下での蛍光クエンチングを100%として、クロドロン酸存在下での蛍光クエンチングを算出した(n=7-8)。b: 各塩素イオン濃度で100 nMクロドロン酸存在下(Δ)、非存在下(●)、駆動力なし(c)の条件でATP輸送活性を測定した(1分)(n=3-12)。c: 100 nMクロドロン酸存在・非存在下でのATP輸送活性のヒル係数を図8bより算出した。d: (上段)様々な化合物存在下で精製VNUT(4 μg)を用いて、UVを照射しビオチン-11-ATPを結合させた。矢頭はVNUTのシグナルを示している。(下段)各試料を10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、CBB染色した。e: VNUTを再構成したリポソームと1 μM クロドロン酸を反応させて洗浄し、ATP輸送活性を測定した(n=4-8)。値は平均値 \pm 標準誤差で示した。
 **p < 0.01, NSは有意差なし; one-way ANOVAにより多重検定後、Tukey検定を用い有意差を検定した。

第二節 細胞レベルでのクロドロン酸の効果

クロドロン酸は神経細胞やミクログリアからの ATP 放出を阻害する

細胞レベルでクロドロン酸が VNUT を特異的かつ可逆的に阻害するか検証した。中枢神経系において神経細胞、アストロサイトやミクログリアから VNUT の ATP 開口放出機構が報告されている (14, 39-42)。そこで、ラットの胎児の海馬から神経細胞とアストロサイトを、同じく胎児の脳皮質からミクログリアをそれぞれ初代培養して実験に用いた。神経細胞とアストロサイトは高濃度の K^+ による、ミクログリアは Ca^{2+} イオノフォアである A23187 による刺激で開口放出を誘導し、細胞から放出された ATP やグルタミン酸量を測定した。神経細胞では、*in vitro* で骨吸収抑制効果が観察される濃度より低い 100 nM クロドロン酸存在下でバックグラウンドレベルまで ATP 放出量が減少し、ATP 放出がほぼ完全に阻害されていた (図 10a) (42)。神経細胞に 100 nM クロドロン酸を予め混和し、加温しておき、その後クロドロン酸を含まない溶液で 24 時間加温することで洗浄し、 K^+ 刺激をした。その結果、クロドロン酸による ATP 放出阻害効果が見られず、完全に回復した (図 10a)。また、同時に測定したグルタミン酸は 1 μ M クロドロン酸を混和してもコントロールと有意な差は見られなかった (図 10b)。

これまでの研究から、アストロサイトには小胞を介した開口放出や細胞膜上のチャネルを介した放出といった複数の ATP 放出経路が報告されている (7,38)。開口放出阻害剤であるテタヌス毒素 (TeNT)、 Ca^{2+} をキレートする EGTA や EGTA-AM を混ぜた溶液にてアストロサイトを加温し、同様に K^+ 刺激をした結果、ATP 放出がほぼ完全に阻害されたことから (33)、アストロサイトからの ATP 放出は、過去の報告と同様に、分泌小胞による開口放出経路だといえる (図 10c)。しかし、アストロサイトは神経細胞とは異なり 1 μ M クロドロン酸を混和しても ATP、グルタミン酸放出は阻害されなかった (図 10c,d)。ミクログリアでは、開口放出阻害剤であるボツリヌス毒素や細胞透過性の Ca^{2+} キレート剤である *O,O'*-bis(2-aminophenyl)ethylenglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid-AM によって ATP 放出が阻害され、 Ca^{2+} 依存的な開口放出であることが報告されていた (40)。そこで、クロドロン酸を混和した溶液でミクログリアを加温し、A23187 にて刺激すると神経細胞と同様に低濃度で ATP 放出が阻害された (図 10e)。

これらのことから、クロドロン酸はミクログリアにおいて ATP 放出を抑制し、神経細胞では可逆的に ATP 放出を抑制することを明らかにした。

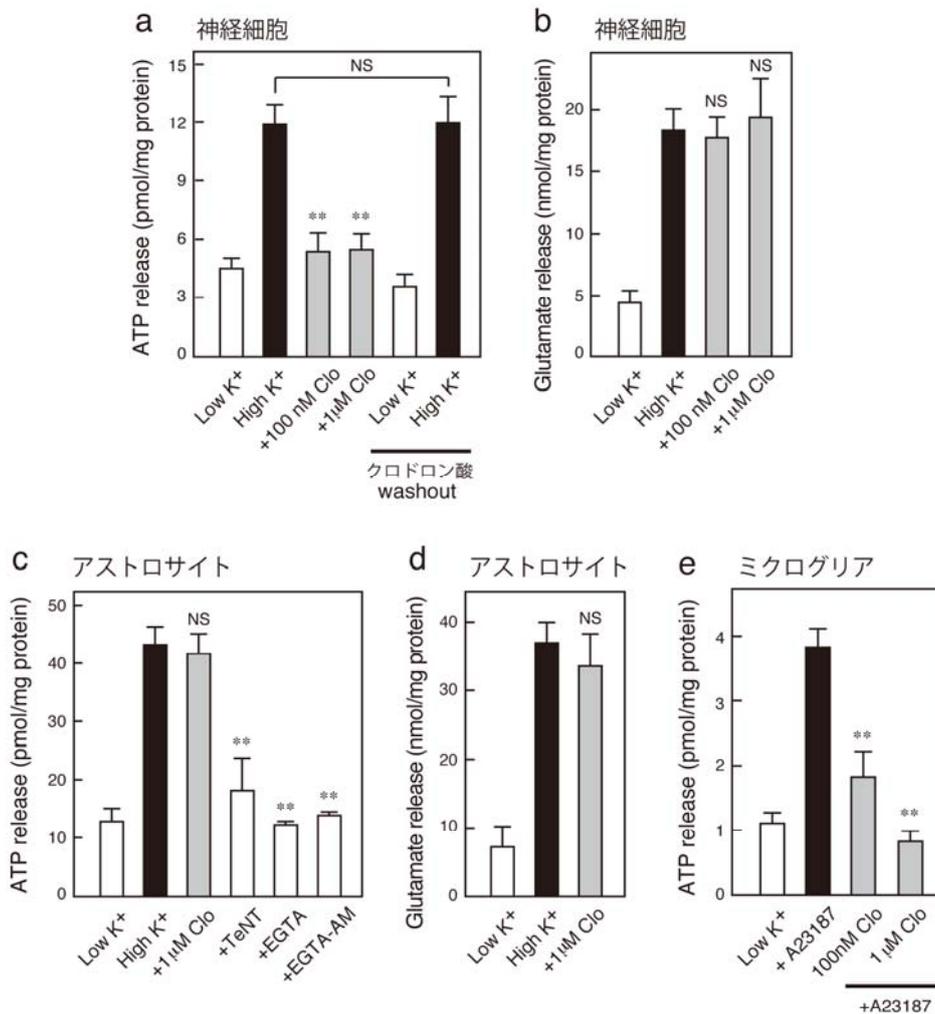


図 10 クロドロン酸は神経細胞やミクログリアからの ATP 放出を阻害する

a: 神経細胞において高 KCl 刺激により放出された ATP、b: グルタミン酸量をクロドロン酸非存在下 (黒色)・存在下 (灰色) で測定した。また、washout 実験は 100 nM クロドロン酸とあらかじめ培養しておき、その後 24 時間培地にて洗浄し測定した (n=4-8)。
 c: アストロサイトにおいて高 KCl 刺激により放出された ATP、d: グルタミン酸量をクロドロン酸非存在下 (黒色)・存在下 (灰色) で測定した。また、15 μg/mL TeNT、1 mM EGTA、50 μM EGTA-AM (白色) 存在下で ATP 放出量を測定した (n=3-8)。
 e: ミクログリアから Ca⁺ 依存的に放出された ATP 量をクロドロン酸非存在下 (黒色)、存在下 (灰色) で測定した (n=4-5)。
 値は平均値 ± 標準誤差で示した。**p < 0.01, NS は有意差なし; one-way ANOVA により多重検定後、a は Tukey 検定を、b,c,d,e は Dunnett 検定を用い有意差を検定した。

神経細胞において Na⁺依存的にアレンドロン酸は取り込まれる

神経細胞とアストロサイトにおけるクロドロン酸の阻害効果の違いについて、クロドロン酸の取り込み経路に着目し、検証した。購入可能な放射線標識したビスホスホネート系薬剤のアレンドロン酸を用いて細胞への輸送活性を測定した。その結果、神経細胞では Na^+ 依存的にビスホスホネート系薬剤の輸送活性が見られた(図 11a)。さらに、神経細胞への輸送活性は、クロドロン酸や無機リンによって完全に阻害された(図 11a)。一方で、アストロサイトにおけるビスホスホネート系薬剤の輸送活性は神経細胞の約 2%しか見られず、 Na^+ 依存的な取り込みも見られなかった(図 11a)。

神経細胞では Na^+ 依存的にビスホスホネート系薬剤アレンドロン酸は取り込まれるがアストロサイトでは取り込まれなかったことから、このことが神経細胞とアストロサイトでのクロドロン酸による ATP 放出の阻害効果の違いを決定している可能性が示唆された。

アレンドロン酸は Na^+ 依存的なリン酸トランスポーターにおいて、細胞内に取り込まれることが推測された。そこで、現在報告されている Na^+ 依存的リン酸トランスポーターである、SLC20 ファミリーと SLC34 ファミリーの神経細胞とアストロサイトにおける発現を RT-PCR 法にて解析した(43)。その結果、SLC20A1、SLC20A2 は神経細胞、アストロサイト両方にバンドが検出され、SLC34A1、SLC34A2、SLC34A3 は両方の細胞にてバンドは検出されず、神経細胞に特異的な Na^+ 依存的リン酸トランスポーターは検出されなかった(図 11b)。

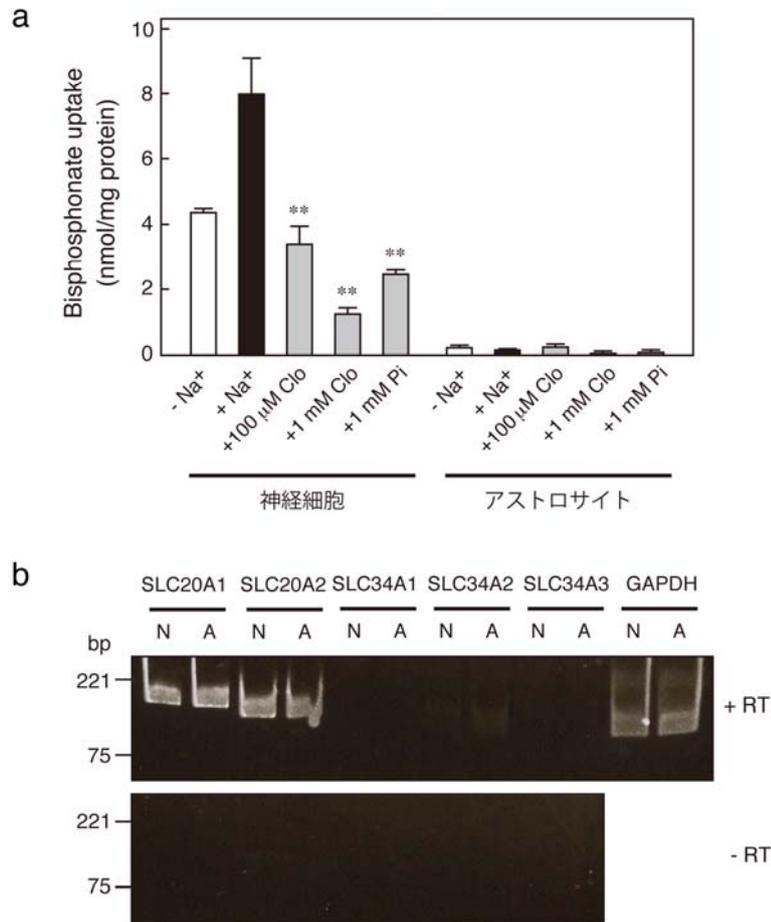


図 11 神経細胞において Na⁺ 依存的にアレンドロン酸は取り込まれる

a: 神経細胞、アストロサイトにおいて Na⁺ 依存的に取り込まれるアレンドロン酸量をクロドロン酸非存在下 (黒色)、クロドロン酸・無機リン存在下 (灰色) で測定した (n=4-6)。
 b: 神経細胞 (N)、アストロサイト (A) における SLC20 ファミリーと SLC34 ファミリーの発現を RT-PCR 法にて解析した。(上段) RT 後、(下段) RT なしの結果を示した。各遺伝子の PCR 産物は *SLC20A1* (186 bp)、*SLC20A2* (168 bp)、*SLC34A1* (180 bp)、*SLC34A2* (132 bp)、*SLC34A3* (131 bp)、*GAPDH* (138 bp) にシグナルが検出される。値は平均値 ± 標準誤差で示した。**p < 0.01; one-way ANOVA により多重検定後、Dunnett 検定を用い有意差を検定した。

第三節 クロドロン酸は慢性疼痛・炎症を抑制する

慢性疼痛処置（炎症性疼痛・神経因性疼痛）を施した野生型マウスと VNUT ノックアウトマウスを用いてクロドロン酸による鎮痛効果を検証した。炎症性疼痛モデルマウスの作製には、発痛物質であるカラゲニン、complete Freund's adjuvant (CFA) を用いた。神経因性疼痛モデルには、Seltzer モデルを選択した。左後肢の坐骨神経を部分結紮することで、神経に障害を与え、脊髄のミクログリアの P2X₄ 受容体や p38 経路が活性化し、炎症性サイトカインの放出が促進され痛覚過敏が生じると考えられる (9,35)。

クロドロン酸は VNUT を標的として炎症性疼痛を抑制する

・カラゲニン誘導炎症性疼痛モデル

カラゲニンをマウスの後肢の裏に投与し、4 時間後に後肢の裏の炎症部位へ熱刺激 (plantar test)、機械刺激 (von Frey test) をし、マウスの回避行動を取るまでの閾値 (秒、g) を測定した。また、各実験 1 時間前に 0.1、1、10 mg/kg クロドロン酸を静脈投与し、同様に閾値を測定した。

その結果、VNUT ノックアウトマウスのコントロール群は野生型のコントロール群と比較すると熱刺激、機械刺激ともに閾値が高く、痛みを感じにくくなっていることが明らかになった (図 12a,b)。さらに、VNUT ノックアウトマウスにクロドロン酸を投与しても、閾値の変化は見られなかった (図 12a,b)。野生型マウスではコントロール群と比較するとクロドロン酸投与群の方が熱刺激で約 40%、機械刺激でも約 40% 閾値が増加していた (図 12a,b)。また、クロドロン酸の投与量の上昇に伴って、閾値の上昇が見られた (図 12a,b)。カラゲニン投与前 (定常状態) では野生型のコントロール群とクロドロン酸を投与した群とでは閾値に有意差は見られなかった (図 12c,d)。

クロドロン酸による痛覚過敏への抑制効果を比較するために、同じ第 1 世代のビスホスホネート系薬剤であるエチドロン酸、一般的に広く使用される鎮痛薬であるアセトアミノフェン、NSAIDs の中で一番鎮痛効果が強いジクロフェナクを各 10 mg/kg、非麻薬性の弱オピオイドであるトラマドールを臨床投与量である 0.1、1 mg/kg で投与し、同様の実験を行った。その結果、タンパク質レベルで VNUT 阻害効果の弱かったエチドロン酸では熱刺激、機械刺激ともに閾値の上昇はほとんど見られなかった (図 12e,f)。アセトアミノフェン、ジクロフェナ

クによる痛覚過敏の抑制効果より、クロドロン酸の方が強く、熱刺激に対してトラマドールとクロドロン酸による痛覚過敏の抑制効果はほぼ同等であり、機械刺激に関してはトラマドールの方が効果は高い傾向が得られた（図 12e,f）。

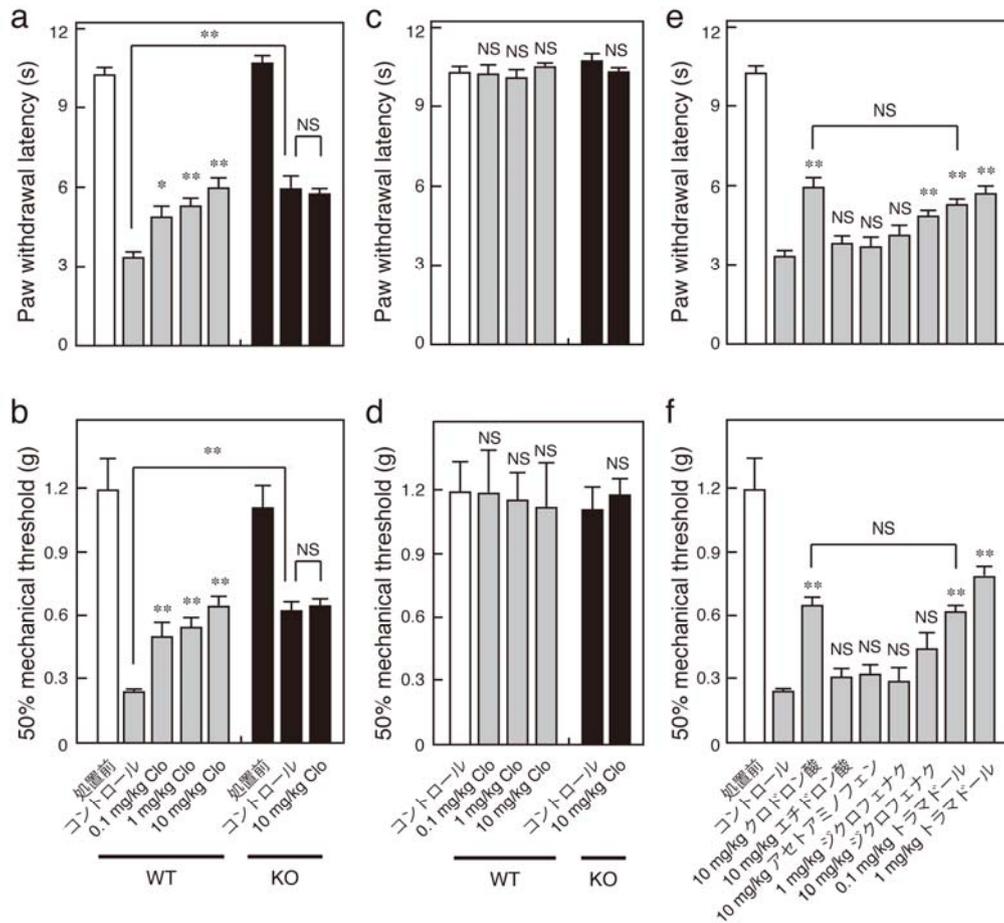


図 12 クロドロン酸は VNUT を標的としてカラゲニン誘導炎症性疼痛を抑制する

a,b: カラゲニン投与後、c,d: 投与前にそれぞれ生理食塩水、クロドロン酸を投与した野生型マウス (白・灰色)、VNUT ノックアウトマウス (黒色) における熱刺激、機械刺激における回避行動を測定した (n=5-6 匹)。e,f: 様々な化合物を投与し (灰色)、回避行動を測定した (n=5-7 匹)。値は平均値 ± 標準誤差で示した。*p < 0.05, **p < 0.01, NS は有意差なし; one-way ANOVA により多重検定後、one-way ANOVA により多重検定後、Tukey 検定を用い有意差を検定した。

・ CFA 誘導炎症性疼痛モデル

CFA による痛みは数週間から 1 ヶ月程度持続することが知られており、CFA をマウスの後肢の裏に投与し、それぞれ投与 3 日目と 14 日目に患部へ熱刺激 (plantar test)、機械刺激 (von Frey test) をし、マウスの逃避行動を取るまでの閾値 (秒、g) を測定した。また、各実験 1 時間前に 0.01、0.1、1、10 mg/kg クロドロン酸を静脈投与し、同様に閾値を測定した。CFA 投与前から投与後 14 日まで、マウスの体重に変化は見られなかった。

その結果、VNUT ノックアウトマウスのコントロール群は野生型のコントロール群と比較すると熱刺激、機械刺激ともに閾値が高く、痛みを感じにくくなっていた (図 13a,b)。また、VNUT ノックアウトマウスにクロドロン酸を投与しても、閾値の変化は見られなかった (図 13a,b)。CFA 投与 3 日目、14 日目の野生型ではコントロール群と比較するとクロドロン酸投与群の方が熱刺激では約 50%、機械刺激では約 40%閾値が増加していた (図 13a,b)。また、クロドロン酸の投与量の上昇に伴い、閾値の上昇が見られた (図 13a,b)。

クロドロン酸による痛覚過敏への抑制効果を比較するために、エチドロン酸、アセトアミノフェン、ジクロフェナクを各 10 mg/kg 投与し、同様の実験を行った。その結果、エチドロン酸では熱刺激、機械刺激ともに生理食塩水投与群 (コントロール群) と比べて、閾値の上昇はほとんど見られなかった (図 13c,d)。アセトアミノフェン、ジクロフェナクによる痛覚過敏の抑制効果より、クロドロン酸の方が強い傾向が見られた (図 13c,d)。これらの結果は、カラゲニン誘導炎症性疼痛モデルの結果と同様であった。

以上のことから、慢性の炎症性疼痛に VNUT が関与しており、クロドロン酸は VNUT を標的として既存薬より強い痛覚過敏の抑制効果を発揮することを明らかにした。

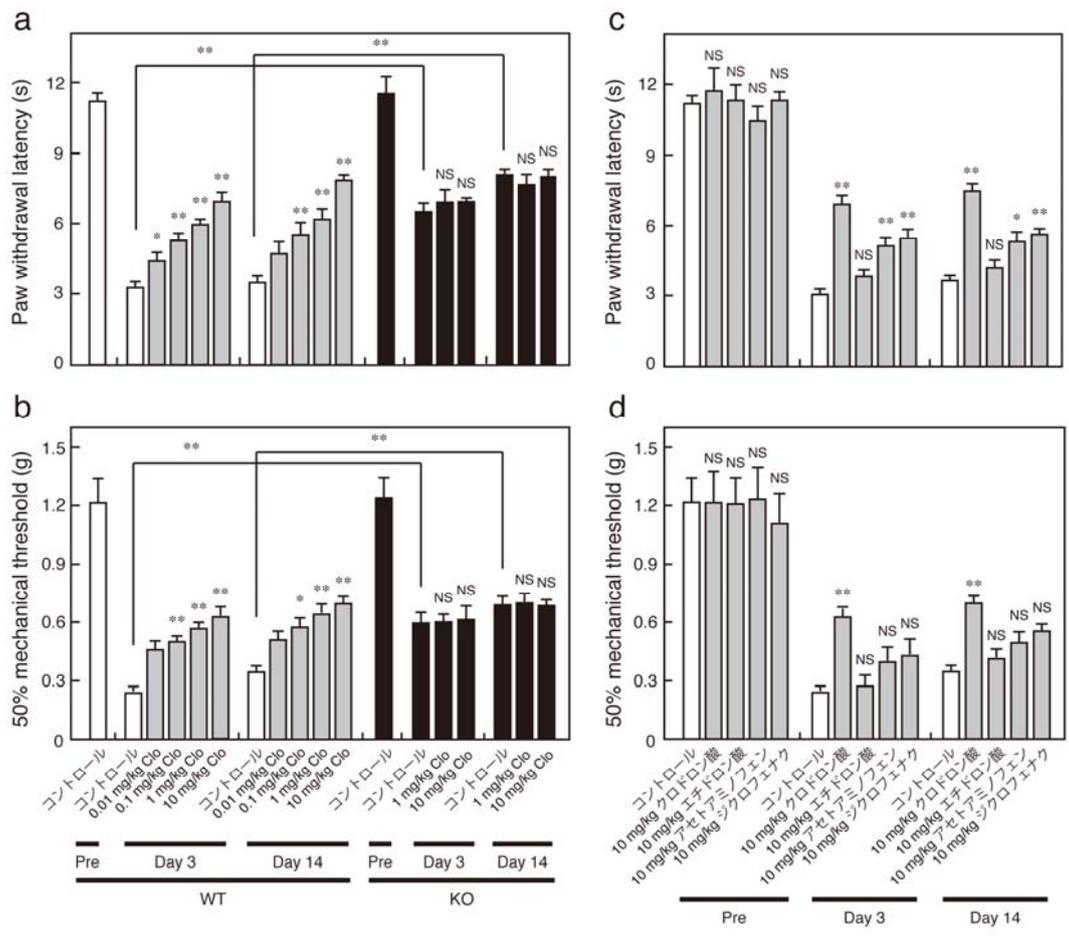


図 13 クロドロン酸は VNUT を標的として CFA 誘導炎症性疼痛を抑制する

CFA 投与 3・14 日後 (a,b) の疼痛試験 1 時間前に、それぞれ生理食塩水、クロドロン酸を投与した野生型マウス (白・灰色)、VNUT ノックアウトマウス (黒色) における熱刺激、機械刺激における回避行動を測定した (n=9-11 匹)。c,d: 様々な化合物を投与し (灰色)、回避行動を測定した (n=8-10 匹)。値は平均値 ± 標準誤差で示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS は有意差なし; one-way ANOVA により多重検定後、Tukey 検定を用い有意差を検定した。

クロドロン酸は VNUT を標的として抗炎症効果を発揮する

カラゲニンや CFA をマウスの後肢に投与すると患部に浮腫を形成する。この浮腫を野生型と VNUT ノックアウトマウスで比較すると、VNUT ノックアウトマウスは野生型マウスより有意に浮腫が抑制されていることを見いだした (図 14c)。こうした炎症応答には、免疫細胞からの炎症性メディエーターの放出が関与している (44)。最近の研究より、ヒト単球のライン化細胞である THP-1 細胞に VNUT が発現しており、LPS 刺激による ATP 放出が VNUT 由来であること、そして開口放出された ATP が炎症性メディエーターの放出に関与することが報告された (45)。これらのことから、VNUT を標的として抗炎症効果を発揮していると推測し、検証した。

・ ATP 放出の免疫系モデル細胞：ヒト単球ライン化細胞

THP-1 細胞からの ATP 放出に対するクロドロン酸の効果を検証した。LPS 刺激により放出された ATP が、クロドロン酸が存在するとコントロールレベルまで低下した (図 14a)。THP-1 細胞にビスホスホネート系薬剤が取り込まれるかを検証するために、放射線標識したビスホスホネート系薬剤のアレンドロン酸の細胞への輸送活性を測定した。その結果、神経細胞と同様に、Na⁺依存的なビスホスホネート系薬剤の輸送活性が見られ、この輸送活性はクロドロン酸や無機リンによって完全に阻害された (図 14b)。

・カラゲニン誘導慢性炎症モデル

野生型、VNUT ノックアウトマウスにあらかじめコントロールとして生理食塩水とクロドロン酸、その他の化合物を静脈投与した。その 1 時間後に左後肢の裏にカラゲニンを投与し、2 時間後に炎症性メディエーターを測定するため採血し、浮腫の厚みが最大になるカラゲニン投与から 4 時間後に浮腫のサイズをデジタルノギスで測定した。野生型マウスではクロドロン酸を投与すると、コントロールと比較して有意に浮腫の厚みが小さくなっていることが明らかになった (図 14c,d)。一方で、同じ第 1 世代のエチドロン酸ではそのような効果は見られなかった。ジクロフェナクもまた同様であった (図 14d)。抗炎症薬として使用されるステロイド剤のヒドロコルチコイド、プレドニゾロンを臨床使用量で投与すると、コントロールと比較して有意に浮腫の厚みは低下しており、クロドロン酸を投与した結果と同程度であった (図 14d)。VNUT ノックアウトマウス

では、野生型マウスのコントロールと比較して約 30%浮腫サイズが減少していた (図 14d)。

カラゲニンによって誘導された血清中の炎症性メディエーターをビーズアレイ法にて定量した。その結果、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) とインターロイキン-6 (IL-6) が検出された (図 14e,f)。クロドロン酸を投与すると血中の TNF- α と IL-6 量が顕著に減少していた (図 14e,f)。VNUT ノックアウトマウスでも、野生型マウスのコントロール群と比較すると血中の TNF- α と IL-6 量が顕著に減少していることがわかった。これらの効果はエチドロン酸には見られなかった (図 14e,f)。

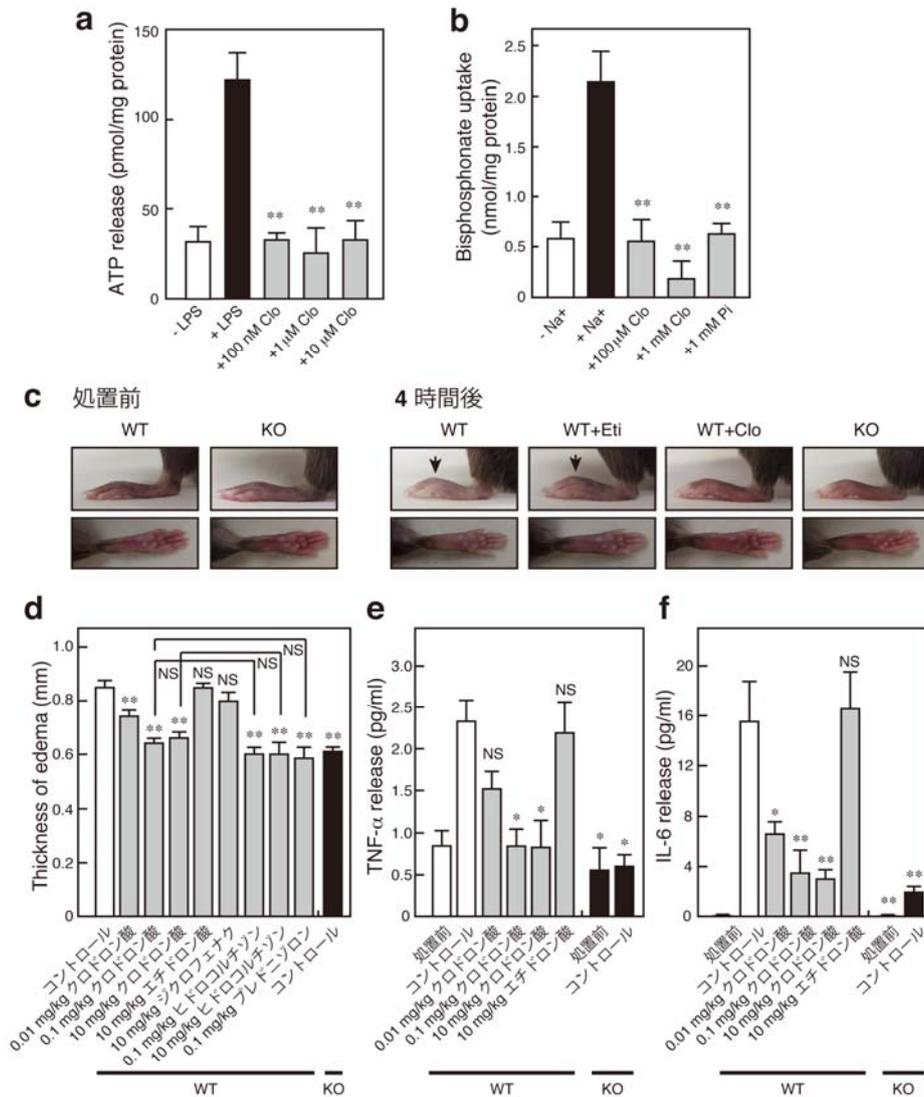


図 14 クロドロン酸は VNUT を標的として抗炎症効果を発揮する

a: LPS 刺激により THP-1 細胞から放出された ATP 量をクロドロン酸非存在下 (黒色)、存在下 (灰色) で測定した (n=4-6)。b: THP-1 細胞に取り込まれるアレンドロン酸量をクロドロン酸非存在下 (黒色)、クロドロン酸・無機リン存在下 (灰色) で測定した (n=3-5)。c: 生理食塩水 (白色) や様々な化合物 (灰色) を投与し、カラゲニン投与 4 時間後の野生型、VNUT ノックアウトマウス (黒色) の後肢を撮影した。矢頭は浮腫を示している。d: カラゲニン投与によって生じた浮腫を測定した (n=5-11 匹)。e, f: 生理食塩水、クロドロン酸、エチドロン酸を投与し、カラゲニン投与 2 時間後の野生型、VNUT ノックアウトマウスにおける血清中のサイトカイン量を測定した (n=3-5 匹)。値は平均値 ± 標準誤差で示した。*p < 0.05, **p < 0.01, NS は有意差なし; one-way ANOVA により多重検定後、a, b, e, f は Dunnett 検定を、d は Tukey 検定を用い有意差を検定した。

・ CFA 誘導慢性炎症モデル

野生型、VNUT ノックアウトマウスともに CFA 投与後 3 日目、14 日目の浮腫の厚みを測定した。生理食塩水、10 mg/kg クロドロン酸、エチドロン酸を CFA 投与 1 時間前に静脈投与し、CFA 投与 1 日後から 14 日目まで皮下注射し連投した。CFA 投与前から投与後 14 日目まで、マウスの体重に変化は見られなかった。その結果、エチドロン酸を投与してもコントロールと有意な差は見られなかったが、クロドロン酸を投与すると浮腫サイズが有意に減少していた (図 15a,b)。さらに、野生型マウスと比較すると VNUT ノックアウトマウスでは浮腫の厚みが 3 日目ではコントロールの約 75%に、14 日目では約 65%まで減少していた (図 15a,b)。クロドロン酸を投与しても VNUT ノックアウトマウスでは厚みに変化は見られなかった (図 15a,b)。また、CFA 投与 3 日後のマウスの患部をヘマトキシリン-エオジン染色した結果、病理組織学的な特徴である炎症の起きている患部での免疫細胞 (主にリンパ球やマクロファージ) の浸潤が野生型では広範囲に渡って見られるが、VNUT ノックアウトマウスではその程度が減少していた (図 15c)。

以上のことから、クロドロン酸は VNUT に作用し、炎症性疼痛の抑制だけでなく、炎症性メディエーター放出を抑制し、抗炎症効果も発揮することを明らかにした。

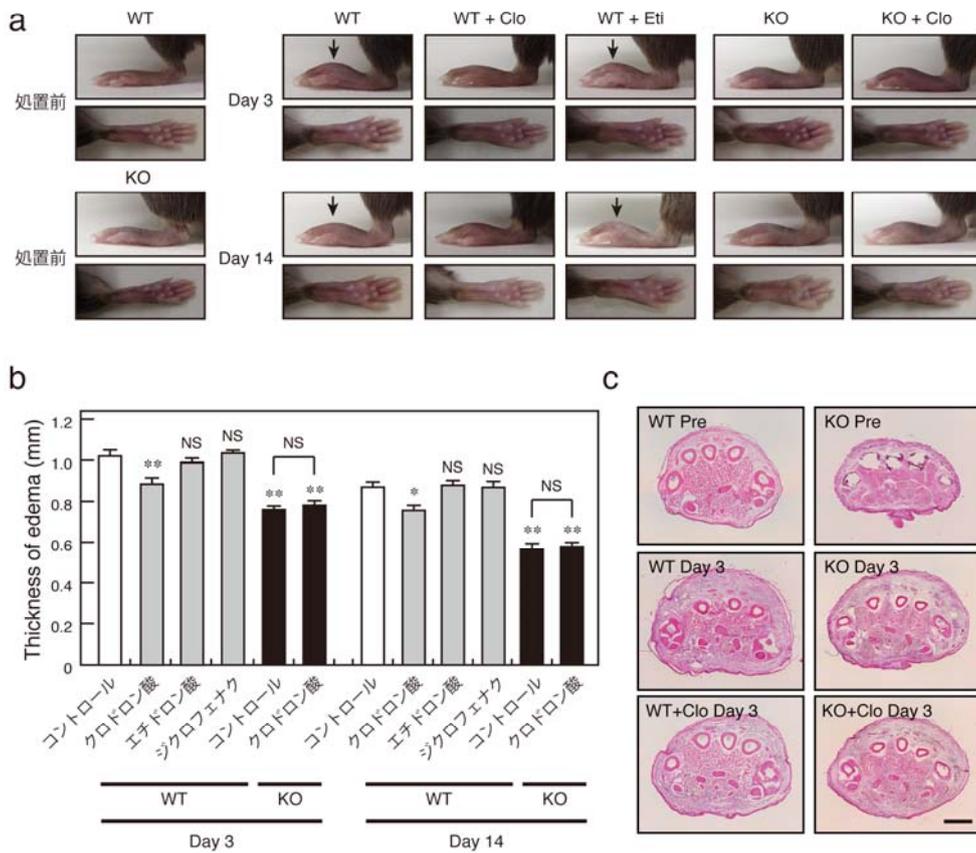


図 15 クロドロン酸は VNUT を標的として CFA 誘導慢性炎症を抑制する

a: 生理食塩水や 10 mg/kg の様々な化合物を投与し、CFA 投与 3・14 日後の野生型、VNUT ノックアウトマウスの後肢を撮影した。矢頭は浮腫を示している。b: CFA 投与によって生じた浮腫を測定した (n=9-10 匹)。c: 野生型、VNUT ノックアウトマウスに生理食塩水とクロドロン酸を連日皮下注射し、CFA 投与 3 日後の後肢の切片をヘマトキシリン-エオジン染色した。(bar: 1 mm) 値は平均値 ± 標準誤差で示した。*p < 0.05,**p < 0.01, NS は有意差なし; one-way ANOVA により多重検定後、Tukey 検定を用い有意差を検定した。

クロドロン酸は VNUT を標的として神経因性疼痛を抑制する

・坐骨神経部分結紮による神経因性疼痛モデル（Seltzer モデル）

神経因性疼痛モデルマウスに生理食塩水、クロドロン酸を投与し、1 時間後に機械刺激（von Frey test）をした。その結果、炎症性疼痛で用いたクロドロン酸より少ない投与量で約 60%の閾値の上昇が見られた（図 16a）。VNUT ノックアウトマウスでは、炎症性疼痛モデルマウスの結果と同様に、野生型マウスのコントロール群と比較して有意に閾値が高くなり、痛みが感じにくくなっていた（図 16a）。また、VNUT ノックアウトマウスにクロドロン酸を投与しても、コントロール群と比較して閾値に変化は見られなかった（図 16a）。

神経因性疼痛治療薬であるプレガバリン、ガバペンチンや鎮痛効果が報告されているビスホスホネート系薬剤であるエチドロン酸、アレンドロン酸、パミドロン酸（18,20）とクロドロン酸による効果を比較した。エチドロン酸、アレンドロン酸を投与しても閾値の上昇は見られず、パミドロン酸では閾値の上昇は見られたが、クロドロン酸による方が高かった（図 16b）。神経因性疼痛モデルマウスにおけるクロドロン酸の鎮痛効果の時間依存性をプレガバリン、ガバペンチンと比較して測定した結果、クロドロン酸の最大薬効はプレガバリンとほぼ同等であるが、クロドロン酸は投与 1 時間後でもプレガバリンより有効な鎮痛効果を示した（図 16c）。また、持続効果もクロドロン酸の方が高かったが、1 週間以内に元の閾値まで戻っていた（図 16c）。ガバペンチンはこれまでの報告通りプレガバリンの薬効より弱かった（図 16c）（4）。

これらのことから、VNUT を標的としてクロドロン酸は神経因性疼痛を抑制することを明らかにした。

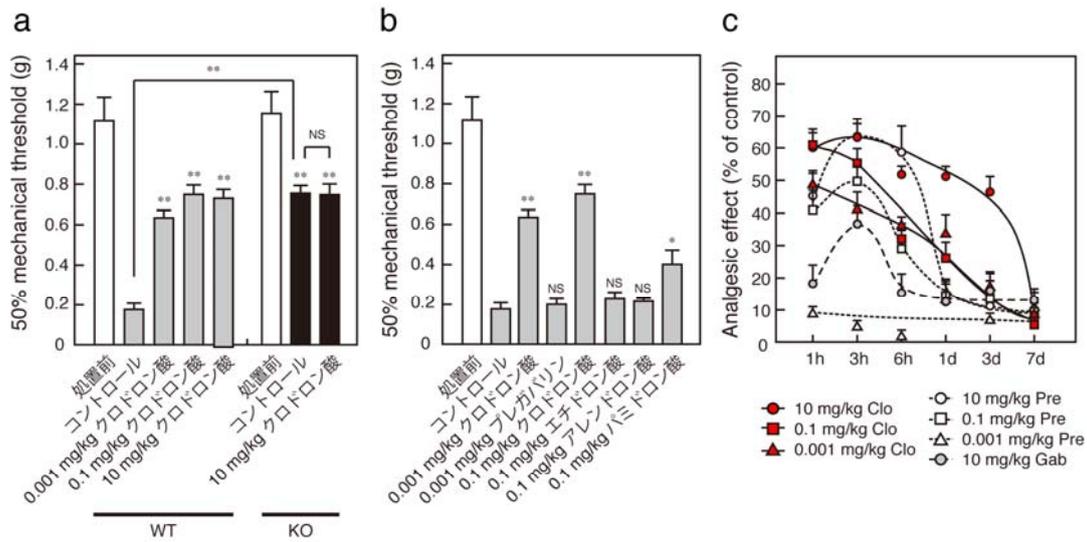


図 16 クロドロン酸は VNUT を標的として神経因性疼痛を抑制する

a: 手術 10 日後に野生型、VNUT ノックアウトマウス（黒色）に生理食塩水（白色）、クロドロン酸（灰色）を投与して、1 時間後に機械刺激による回避行動を測定した (n=7 匹)。b: 様々な化合物を投与し（灰色）、回避行動を測定した (n=7 匹)。c: 生理食塩水、クロドロン酸 (Clo)、プレガバリン (Pre)、ガバペンチン (Gab) を野生型マウスに投与して、経時的に回避行動を測定した (n=6-10 匹)。値は平均値 ± 標準誤差で示した。*p < 0.05, **p < 0.01, NS は有意差なし; one-way ANOVA により多重検定後、a は Tukey 検定を、b は Dunnett 検定を用い有意差を検定した。

VNUT を阻害する濃度ではクロドロン酸は既存薬効である細胞死を誘導しない

最近の研究から、クロドロン酸内包リポソームは特異的にマクロファージに取り込まれて、マクロファージの枯渇作用を引き起こすことが知られている(45)。そのため、クロドロン酸を取り込んだマクロファージの枯渇作用が鎮痛・抗炎症効果に参与しているか検証した。

10 mg/kg のクロドロン酸を投与したマウスから採血し、回収した全血球細胞とそのうちのマクロファージにおいて PI 陽性の細胞数を測定した。ポジティブコントロールとして、回収した血球細胞に UV を 10 分間照射して、アポトーシスを誘導させた。その結果、生理食塩水を投与したコントロール群とクロドロン酸投与群では血球細胞 (図 17a)、マクロファージ (図 17b) の細胞死の誘導に有意な差は見られなかった。

また、THP-1 細胞でも細胞死の誘導作用を検討した結果、クロドロン酸存在下では、コントロールと比較して PI 陽性の細胞数に有意な差は見られなかったが、クロドロン酸内包リポソーム存在下では約 8 割以上の細胞が PI 陽性であった (図 17c)。

以上より、VNUT の阻害効果が認められる濃度では、マクロファージの細胞死は生じないことから、クロドロン酸がマクロファージの枯渇を介して鎮痛・抗炎症効果を発揮する可能性は否定された。

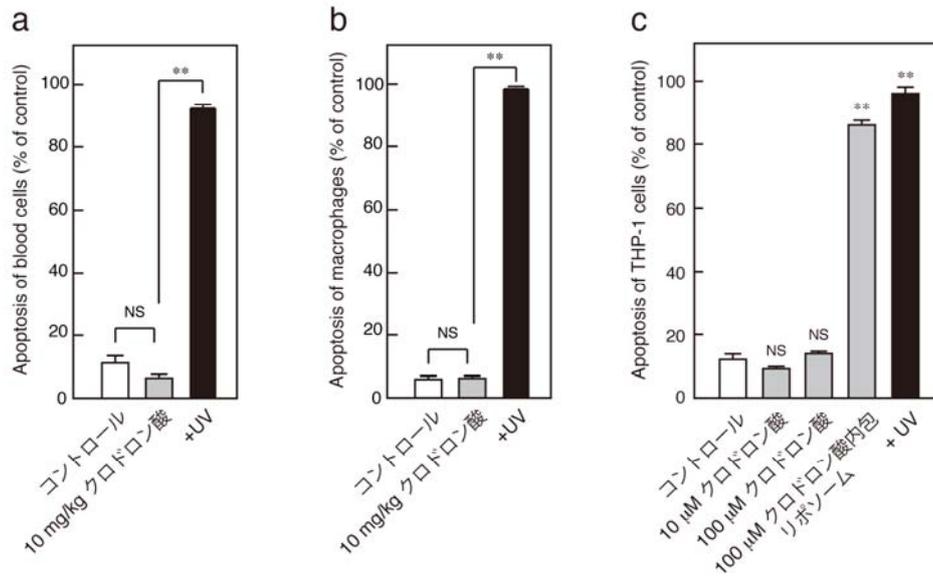


図 17 クロドロン酸は既存薬効である細胞死を誘導しない

野生型マウスに生理食塩水とクロドロン酸を投与した 1 時間後に採血し、回収した a: 血球細胞、b: マクロファージの死細胞数を測定した (n=3-5 匹)。c: THP-1 細胞をクロドロン酸、クロドロン酸内包リボソーム存在下で 24 時間培養し、死細胞数を測定した (n=5-7)。値は平均値 ± 標準誤差で示した。*p < 0.05, **p < 0.01, NS は有意差なし; one-way ANOVA により多重検定後、Dunnett 検定を用い有意差を検定した。

第四章 考察・展望

考察

塩素イオン依存性は SLC17 ファミリーに属するトランスポーターのユニークな特徴である (13,38)。その内の 1 つである VNUT の塩素イオンによる活性化は脂質代謝物であるアセト酢酸、グリオキシル酸などのケトン体やケト酸において可逆的、かつ、競合的に制御されている (38)。つまり、このアニオンスイッチは生体内の代謝を反映して、プリン作動性化学伝達を制御していると言える。しかし、ケトン体は体内で代謝されてしまう上に、SLC17 ファミリーのトランスポーター間で高い特異性を持たないため、VNUT 特異的阻害剤として用いるには困難であった (38)。今回、1 アッセイあたり、約 30 nM の精製 VNUT を用いているため、クロドロン酸の 15.6 nM という 50%阻害濃度は、VNUT とクロドロン酸がほぼ 1:1 の濃度比で反応していることを示している (図 7b)。IC₅₀ が 15.6 nM というのは、この実験系での検出限界であるため、実際の VNUT に対するクロドロン酸の IC₅₀ はより低い可能性が示唆される (図 7b)。さらに、クロドロン酸存在下で VNUT の輸送活性が阻害され、高濃度の塩素イオン存在下ではこの阻害効果が見られなかったことから、クロドロン酸は塩素イオンと競合し VNUT を阻害していると考えられる (図 9b)。塩素イオンによる活性制御は哺乳類や植物まで SLC17 ファミリーに広く保存されているが (47)、クロドロン酸は VNUT のもつ塩素イオン依存性のアロステリック制御因子であることを明らかにした。クロドロン酸は生体内では代謝されず、可逆的、かつ、選択的に VNUT を阻害することから、代謝物であるケトン体とは異なり、非代謝物によってプリン作動性化学伝達を制御することが可能となった。

ビスホスホネート系薬剤による VNUT の活性阻害の結果から、クロドロン酸の側鎖の塩素が VNUT の塩素イオン結合部位へ結合し (8)、ビスホスホネート系薬剤の基本骨格がこの結合の親和性を上げていると考えられる (図 4a,b 図 8)。VNUT は塩素だけではなく同じハロゲンの臭素存在下においても同様に活性化されるが、フッ素では約 3 割しか活性化されない (8)。そのため、側鎖がフッ素であるジフルオロメチレンジホスホン酸では、VNUT 阻害効果は見られるが、クロドロン酸程強く阻害しなかったと考えられる。市販されていなかったため実験ができなかったが、側鎖が臭素の化合物があれば、クロドロン酸と同等の結果になると推測できる。この構造活性相関をより明確に議論するためには、今後さらに VNUT の構造を解析していく必要がある。

シナプス小胞は刺激によって細胞膜と融合し、内容物が開口放出されるが、キス・アンド・ランと呼ばれる不完全な放出経路もある (48)。これは小胞と細胞膜が接着し、貫通したギャップ結合様のチャンネルが形成され、濃縮されていた神経伝達物質がシナプス間隙に放出される現象である (48)。クロドロン酸によって ATP 放出量がコントロールレベルまで減少したのは (図 10a)、クロドロン酸を混ぜたクレブス液であらかじめ細胞を培養している 3 時間内に、キス・アンド・ランなどの放出経路によって小胞内に既に濃縮されていた ATP が培養上清に放出されており、クロドロン酸が VNUT を阻害することで小胞内への新たな ATP 再充填が抑制されたためだと推測される。

ビスホスホネート系薬剤を取り込む候補トランスポーターは、神経細胞特異的に発現し、アストロサイトには発現していない細胞膜型の Na⁺依存的なリン酸トランスポーターであると考えられた。しかし、RT-PCR の結果から、既存のリン酸トランスポーターである SLC20 ファミリーは神経細胞、アストロサイトに発現しており、SLC34 ファミリーは両方の細胞に発現していなかった。このことから、ビスホスホネート系薬剤トランスポーターは、Na⁺依存的な新規リン酸トランスポーター、あるいは、全く別のトランスポーターであると考えられる。VNUT は小胞上に発現しているため、VNUT を抑制するためには阻害剤が細胞に取り込まれることが重要である。本研究では、市販されているアレンドロン酸を使用した。今後は放射性標識したクロドロン酸を合成し、細胞膜型のクロドロン酸トランスポーターの特性とその実体を明らかにしていく必要がある。

VNUT 阻害剤と VNUT ノックアウトマウスを用いて、主に二つの VNUT の表現型を明らかにした。第一に、VNUT は *in vivo* で病理的な神経因性・炎症性疼痛に関与していた (図 12,13,16)。炎症性疼痛に用いられるトラマドールの臨床使用濃度での治療効果とクロドロン酸による効果を比較すると、ほぼ同等であった (図 12)。トラマドールには重篤な副作用があるが (5,6)、VNUT ノックアウトマウスには、外見上、野生型と大きな変化は見つかっていない (13)。VNUT 遺伝子を欠損すると定常時の痛覚には影響せず、炎症の程度が弱くなるが、慢性の痛覚過敏のうち、約 40~50%が VNUT の寄与によることを明らかにした。これらの結果は、病態下での脊髄の VNUT 遺伝子発現量が有意に上昇する報告と一致している (15,16)。さらに、神経因性疼痛においてはアストロサイトやミクログリアではなく、脊髄後角神経の VNUT が重要な役割を担っていることが報告

された (14)。これらのことから、神経細胞に取り込まれたクロドロン酸は、ATP の小胞内蓄積とその放出を阻害することで、神経因性疼痛に対して鎮痛効果を示したと考えられる (図 10,16)。慢性疼痛処置を施した VNUT ノックアウトマウスで観察される疼痛は、VNUT 以外の経路によるものと考えられる。VNUT ノックアウトマウスでは、末梢組織からの刺激により、グルタミン酸やサブスタンス P が脊髄の神経終末から放出され、ポストシナプスにあるグルタミン酸受容体、ニューロキニン受容体を活性化することで、疼痛を引き起こしていると考えられる (9,49)。

第 1 世代のクロドロン酸と比較して、第 2 世代のアレンドロン酸、パミドロン酸は骨吸収抑制効果が高いが、VNUT 阻害効果は弱い (図 8)。また、神経因性疼痛モデルマウスにおいてパミドロン酸はクロドロン酸程ではないが閾値の上昇を示した (図 16b)。このことから、クロドロン酸は VNUT を阻害することによって、アレンドロン酸は骨吸収抑制効果も含めた VNUT 阻害以外の経路で鎮痛効果をもたらしていると推測できる。また、VNUT ノックアウトマウスでの解析が必要だが、パミドロン酸はおそらく VNUT ではなく、骨吸収抑制効果と神経因性疼痛に関与する何らかの分子を標的に鎮痛効果を示すと考えられる。

また、神経因性疼痛治療薬であるプレガバリン、ガバペンチンと鎮痛効果を比較すると、クロドロン酸の方が高く、長期間効果が持続することが明らかになった (図 16)。効果が長期間持続するのは、体内で代謝されないクロドロン酸が神経細胞に取り込まれ、その後排出されるまでに時間がかかり、細胞内でクロドロン酸が長期間残存しているためではないかと推測している。

神経因性疼痛と炎症性疼痛の両方に VNUT は関与していたことから、VNUT 特異的阻害剤が幅広い疼痛に対して使用可能であり、より効果的な鎮痛薬として慢性疼痛患者に役立つと期待できる。将来的には、まだ不明である炎症性疼痛における脊髄後角の感覚神経終末に発現している VNUT の役割を明らかにする必要があると考えている。

第二に、*in vivo* で VNUT が免疫応答に関与していることを明らかにした (図 14,15)。VNUT は単球、マクロファージや T 細胞などの免疫細胞の分泌顆粒に発現しており、ATP の小胞濃縮と ATP 放出を担っていることが報告されていた (46,50)。放出された ATP や分解された ADP やアデノシンが免疫細胞に発現しているプリン受容体にオートクライン的、パラクライン的に結合し、炎症性メデ

ィエーターの放出を促し、その結果炎症が引き起こされる (46,51)。クロドロン酸により THP-1 細胞からの LPS 刺激による ATP 放出が完全に阻害された (図 14a)。クロドロン酸を投与すると VNUT が発現しているマクロファージや T 細胞から主に放出される炎症性メディエーターの TNF- α や IL-6 の血中量の減少が見られた (図 14e,f)。VNUT ノックアウトマウスで TNF- α や IL-6 の血中量が低下しているのは、VNUT が欠損しているため ATP が顆粒中に濃縮されず、ATP 放出量が減少し、免疫細胞に発現しているプリン受容体が活性化されず、サイトカイン放出が促進されなかったためと考えられる。これらのことから、VNUT が病理的な疼痛・炎症発症の鍵となる重要な分子であり、VNUT を阻害することが病状を改善するためには必須であることを明らかにした。近年、マクロファージが M1 と M2 に分類されるように、免疫細胞には多数の亜群が報告されている (52,53)。今後は、具体的にどの細胞における VNUT の寄与が炎症において重要なのか解析する必要があると考えている。

以上の結果より、第 1 世代のビスホスホネート系薬剤・クロドロン酸は VNUT 特異的阻害剤であること、またクロドロン酸は VNUT を標的として鎮痛・抗炎症効果を発揮することを明らかにした。

展望

クロドロン酸は現在でも多数の国で骨疾患治療薬として臨床で使用されており、ヒトへの安全性は既に確認されている (18)。既存薬から新しい薬効を見出す手法をドラッグリポジショニングという。ドラッグリポジショニングは、新規の医薬品開発にかかる膨大なコストや時間、リスクを抑えることができる。ドラッグリポジショニングにより、クロドロン酸は non-opioid/steroid、かつ、トランスポーター標的型の新規鎮痛薬・抗炎症薬の開発に繋がることが期待される。特に骨疾患に関わる疼痛では、骨疾患治療薬と鎮痛薬を別々に服用せずに、クロドロン酸でその両方を抑制でき、鎮痛薬の過剰投与や長期服用による腎障害などの副作用を軽減できる可能性がある。しかしながら、骨疾患以外の慢性疼痛や疾患にクロドロン酸を臨床使用する場合は、今後、長期投与によってクロドロン酸が骨に与える影響を検証していく必要があるだろう。

VNUT ノックアウトマウスでは、ATP の開口放出が阻害されることで、高血糖やインスリン感受性が改善していた (13)。これまでの研究成果から、VNUT はインスリン分泌顆粒に発現しており、高グルコース刺激でインスリンとともに ATP が開口放出される (13)。放出された ATP は膵臓β細胞のプリン受容体を活性化させ、インスリンの分泌がネガティブフィードバックされ、その結果、高血糖が抑制されると考えられている (13)。代表的な糖尿病治療法としてインスリン注射やスルホニル尿素薬によるインスリン分泌促進効果があげられるが、長期間持続すると膵臓β細胞の負担となり機能が低下する (54)。今後検討する必要があるが、クロドロン酸による VNUT 阻害は、膵臓β細胞にあるプリン受容体によって、インスリン分泌がネガティブフィードバックされているのを解除するため、直接的なインスリン分泌促進よりも膵臓β細胞の負担は少ない可能性も考えられる。さらに、糖尿病の原因である高血糖やインスリン抵抗性、炎症、合併症である神経因性疼痛などにもクロドロン酸は有効であるため、新しい糖尿病治療薬としても期待できる。これらの糖尿病由来の幅広い症状を標的とした薬剤や治療法はいまだ確立されていないため、今後、クロドロン酸の臨床における適応範囲を明確にしていきたいと考えている。

また、代表的な慢性の自己免疫疾患である関節リウマチ患者では、免疫細胞から炎症性メディエーター分泌が慢性的に行われ、炎症、疼痛、関節の骨変異といった症状を示す (55)。実際に、関節リウマチ患者において血中の TNF- α や IL-6 量が上昇しており、本研究の結果からクロドロン酸を用いることでこれらの症状を抑える可能性が考えられる。クロドロン酸は VNUT を阻害することでサイトカインの上昇だけではなく、疼痛も抑制することができるため、関節リウマチの慢性炎症に伴う疼痛もまたクロドロン酸で同時に緩和できると推測している。さらに、現在の関節リウマチ治療で使用されている抗体医薬品は、効果は著しいものの、非常に高価である。今後、抗体医薬品による治療効果とクロドロン酸による効果を比較する必要はあるが、価格に関してクロドロン酸は既に承認されている医薬品であるため抗体医薬品より安価に提供できると考えられる。

VNUT は神経だけではなく肝臓、腸など全身に広く発現している (8)。これらの臓器ではプリン作動性化学伝達がアルツハイマー病や、非アルコール性脂肪性肝炎、炎症性腸疾患などの炎症性疾患に関与していることが報告されている (8,55,56)。アルツハイマー病は主にコリンエステラーゼ阻害薬が治療に用いられるが、下痢、吐き気など消化器系の副作用が生じる (57)。非アルコール性脂

肪性肝炎は年々患者数が増大しており、近年盛んに研究が行われているが、有効な治療薬が存在せず、運動・食事療法に頼っている (58)。また、炎症性腸疾患は再燃と寛解を繰り返す慢性の難治性疾患であり、抗 TNF- α 抗体製剤の投与や腸の炎症を抑制する薬物療法が行われているが、治療には炎症の鎮静化だけではなく寛解期の維持も必要とされている (59)。これらの疾患に対して VNUT 特異的阻害剤は、副作用が少なく治療効果がえられるのではないかと期待している。

引用文献

1. Gold MS, Gebhart GF (2010) Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat. Med.* **16**: 1248–1257.
2. Tsuda M, Inoue K, Salter MW (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in ‘small’ glia. *Trend Neurosci.* **28**: 101–107.
3. Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F (2013) Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **16**: 821–847.
4. Jensen TS, Madsen CS, Finnerup NB (2009) Pharmacology and treatment of neuropathic pains. *Curr. Opin. Neurol.* **22**: 467–474.
5. Woolf CJ (2009) μ and δ opioid receptors diverge. *Cell* **137**: 987–988.
6. Porreca F, Ossipov MH (2009) Nausea and vomiting side effects with opioid analgesics during treatment of chronic pain: mechanisms, implications and management options. *Pain Med.* **10**: 654–662.
7. Burnstock G (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**: 575–590.
8. Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**: 5683–5686.
9. Burnstock G (2009) Purinergic receptors and pain. *Curr. Pharm. Des.* **15**: 1717–1735.
10. Vierck CJ, Whitsel BL, Favorov OV, Brown AW, Tommerdahl M (2013) The role of primary somatosensory cortex in the coding of pain. *Pain* **154**: 334–344
11. Tsuda M (2016) Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *J. Diabetes. Investig.* **7**: 17–26
12. Miyaji T, Sawada K, Omote H, Moriyama Y (2011) Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *J. Biol. Chem.* **286**: 42881–42887.
13. Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C, Uneyama H, Edwards RH, Nicoll RA, Moriyama Y (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* **68**: 99–112.
14. Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K, Shibata A, Uneyama H, Takayanagi R, Yamamoto A, Omote H, Nomura M, Moriyama Y (2014) Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and

- increase insulin sensitivity. *Sci. Rep.* **4**: 6689.
15. Masuda T, Ozono Y, Mikuriya S, Kohro Y, Tozaki-Saitoh K, Iwatsuki K, Uneyama H, Ichikawa R, Salter MW, Tsuda M, Inoue K (2016) Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat. Commun.* **7**: 12529.
 16. Nishida K, Nomura Y, Kawamori K, Moriyama Y, Nagasawa K (2014) Expression profile of vesicular nucleotide transporter (VNUT, SLC17A9) in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* **579**: 75–79.
 17. Jung J, Shin YH, Konishi H, Lee SJ, Kiyama H (2013) Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**: 488–493.
 18. Brunner F, Schmid A, Kissling R, Held U, Bachmann LM (2009) Bisphosphonates for the therapy of complex regional pain syndrome 1 – systematic review. *Eur. J. Pain* **13**: 17–21.
 19. Costa L, Major PP (2009) Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **6**: 163–174.
 20. Kim S, Seiryu M, Okada S, Kuroishi T, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y (2013) Analgesic effects of the non-nitrogen-containing bisphosphonates etidronate and clodronate, independent of anti-resorptive effects on bone. *Eur. J. Pharmacol.* **699**: 14–22.
 21. Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Napankangas JP, Ylitalo KV, Monkkonen J, Rogers MJ, Azhayev A, Vaananen HK, Hassinen IE (2002) Further insight into mechanism of action of Clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol. Pharmacol.* **61**: 1255–1262
 22. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ (1998) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding protein. *J. Bone Miner Res.* **13**: 581–589
 23. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J (2011) Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* **49**: 34–41.
 24. Pazianas M, Abrahamsen B (2011) Safety of bisphosphonates. *Bone* **49**: 103–110.

25. Muratore M, Quarta E, Grimaldi A, Calcagnile F, Quarta L (2011) Clinical utility of clodronate in the prevention and management of osteoporosis in patients intolerant of oral bisphosphonates. *Drug Des. Devel. Ther.* **5**: 445–454.
26. Dominguez LJ, Di Bella G, Belvedere M, Barbagallo M (2011) Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates. *Biogerontology* **12**: 397-408.
27. Kato Y, Omote H, Miyaji T (2013) Inhibitors of ATP release inhibit vesicular nucleotide transporters. *Biol. Pharm. Bull.* **36**: 1688-1691
28. Juge N, Muroyama A, Hiasa M, Omote H, Moriyama Y (2009) Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl⁻/γ-aminobutyrate co-transporter. *J. Biol. Chem.* **284**: 35073–35078.
29. Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H, Moriyama Y (2010) Type 1 sodium-dependent phosphate transuporter (SLC17A1 protein) is a Cl⁻-dependent urate export. *J. Biol. Chem.* **285**: 26107–26113.
30. Leviatan S, Sawada K, Moriyama Y, Nelson N (2010) Combinatorial method for overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **285**: 23548–23556.
31. Shimada-Shimizu N, Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S (2013) Evidence that Na⁺/H⁺ exchanger 1 is an ATP-binding protein. *FEBS J.* **280**: 1430-1442
32. Banker GA, Cowan WM (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* **126**: 397–442.
33. Larsson M, Sawada K, Moriand C, Hiasa M, Ormel L, Moriyama Y, Gundersen V (2012) Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cereb. Cortex* **22**: 1203-1214.
34. Hiasa M, Miyaji T, Haruna Y, Takeuchi T, Harada Y, Moriyama S, Yamamoto A, Omote H, Moriyama Y (2014) Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Sci. Rep.* **30**: 6836
35. Seltzer Z, Dubuner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorder produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**: 450–456.
36. Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, Serhan CN, Ji RR (2010) Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat. Med.* **16**: 592–597.

37. Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**: 441–462.
38. Hiasa M, Togawa N, Miyaji T, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y (2014) Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol. Rep.* **2**: e12034.
39. Oya M, Kitaguchi T, Yanagihara Y, Numano R, Takeyama M, Ikematsu K, Tsuboi T (2013) Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**: 141-151.
40. Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, Shibata K, Shinozaki Y, Kasai H, Moriishi K, Moriyama Y, Koizumi S (2013) Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* **61**: 1320–1330.
41. Shinozaki Y, Nomura M, Iwatsuki K, Moriyama Y, Gachet C, Koizumi S (2014) Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Sci. Rep.* **4**: 4329.
42. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ (1993) Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J. Clin. Invest.* **91**: 2004–2011.
43. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H (2013) Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol. Aspects. Med.* **34**: 386–395.
44. Marchand F, Perretti M, MacMahon SB (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**: 521–532.
45. Sakaki H, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S (2013) Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y₁₁ receptor. *PLoS One* **8**: e59778.
46. Rogers MJ, Chilton KM, Coxon FP, Lawry J, Smith MO, Suri S Russell RG (1996) Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells *in vitro* by a nitric oxide-independent mechanism. *J. Bone Miner. Res.* **11**: 1482–1491.
47. Miyaji T, Kuromori T, Takeuchi Y, Yamaji N, Yokosho K, Shimazawa A, Sugimoto E, Omote H, Ma JF, Shinozaki K, Moriyama Y (2015) AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* **6**: 5928.
48. He L, Wu LG (2007) The debate on the kiss-and-run fusion at synapses. *Trends Neurosci.* **30**: 447-455.

49. Tlwari V, Guan Y, Raja SN (2014) Modulating the delicate glial-neuronal interactions in neuropathic pain: promises and potential caveats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **45**: 19-27.
50. Tokunaga A, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S (2010) Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *J. Biol. Chem.* **285**: 17406–17416.
51. Cekic C, Linden J (2016) Purinergic regulation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **16**: 177–192.
52. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends. Immunol.* **23**: 549-555.
53. Palmer DC, Restifo NP (2009) Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends. Immunol.* **30**: 592-602.
54. Takahashi A, Nagashima K, Hamasaki A, Kuwamura N, Kawasaki Y, Ikeda H, Yamada Y, Inagaki N, Seino Y. (2007) Sulfonylurea glinide reduce insulin content, functional expression of K(ATP) channels, and accelerate apoptotic beta-cell death in the chronic phase. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **77**: 343-350
55. McWilliams DF, Walsh DA (2017) Pain mechanisms in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **107**: 94-107.
56. Burnstock G (2017) Purinergic signaling: therapeutic developments. *Front. Pharmacol.* **8**: 661.
57. Sadowsky CH, Galvin JE (2012) Guidelines for the management of cognitive and behavioral problems in dementia. *J. Am. Board. Fam. Med.* **25**: 350-366
58. Neuschwander-Tetri BA (2017) Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med.* **15**: 45
59. Thomas A, Lodhia N (2014) Advanced therapy for inflammatory bowel disease: a guide for the primary care physician. *J. Am. Board. Fam. Med.* **27**: 411-420

謝辭

終始、有益な御指導、御教授を賜りました生体膜生化学研究室 表弘志准教授並びに、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 宮地孝明准教授に謹んで感謝いたします。

形態学的な実験に関してご協力頂きました生体膜生化学研究室 日浅未来助教、また様々な御助言をくださいました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 樹下成信助教に深く感謝いたします。

VNUT KO マウスや測定機器類を提供して下さいました味の素株式会社イノベーション研究所の市川玲子博士、岩槻健博士、北原吉郎博士に深く感謝いたします。

実験に関してご助言、ご協力頂きました、久留米大学・内科学講座の野村政壽教授、九州大学・医学部・蓮澤奈央さんに深く感謝いたします。

実験に関してご助言、ご協力頂きました、生物物理化学研究室の井上剛准教授、門脇敦志さんに深く感謝いたします。

疼痛実験についてご指導頂きました、東北大学・歯学部・口腔分子制御研究室の遠藤康男講師、島和弘博士に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたりご協力頂きました、当研究室の皆様にご心より感謝いたします。

最後に、御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました森山芳則教授に謹んで感謝いたします。