

氏名	宮崎 信一郎
(ふりがな)	(みやざき しんいちろう)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 25 年 1 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	The action site of the synthetic kainoid (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-carboxymethyl-4-(4-methylphenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-4), an analogue of Japanese mushroom poison acromelic acid, for allodynia (tactile pain) (アクロメリン酸誘導体 PSPA-4 のアロディニアに対する作用部位の検討)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 宮 武 伸 一 教授 佐 浦 隆 一

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

痛みは、生理的な痛み(侵害性疼痛)、炎症性疼痛および神経障害性疼痛に大別される。神経障害性疼痛は、神経の損傷や虚血に起因する痛みで、自発痛、痛覚過敏反応、アロディニア(触覚刺激で誘発される激しい痛み)の症状からなり、難治性で、既存の治療法に抵抗性を示すため、その病態の解明と新たな治療法の開発が望まれている。

日本固有の毒茸であるドクササコ(*Clitocybe acromelalga*)を摂取すると、四肢末端に灼熱痛とアロディニアが出現し、1カ月以上も持続することが知られている。ドクササコから抽出されたアクロメリン酸Aを、マウスの脊髄内に投与すると、アロディニアが惹起される。また、アクロメリン酸誘導体

(2*S*,3*R*,4*R*)-3-carboxymethyl-4-(phenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-1)は、ア

クロメリン酸A惹起のアロディニアをグルタミン酸受容体 - 一酸化窒素の経路を介し、用量依存性に抑制する。グルタミン酸は、興奮性神経伝達物質であり、その受容体はイオンチャンネル型受容体とメタボトロピック型受容体に大別される。イオンチャンネル型は N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体、non-NMDA 受容体 [α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA 型) およびカイニン酸型] に分類される。アクロメリン酸Aは、カイニン酸と類似構造を持ち、カイニン酸と同様にnon-NMDA受容体に作用すると考えられている。しかし、アクロメリン酸A惹起のアロディニアが、non-NMDA受容体拮抗薬で抑制できないこと、アクロメリン酸Aやアクロメリン酸誘導体 PSPA-1の作用部位が不明であることから、「アクロメリン酸が特異的に作用する受容体が存在する」との仮説にいたった。

申請者らは、放射線同位体 ^{14}C で標識が可能な新規のアクロメリン酸誘導体 (2*S*,3*R*,4*R*)-3-carboxymethyl-4-(4-methylphenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-4) を合成し、PSPA-4 の神経障害性疼痛に対する効果、in vitro autoradiography (in vitro ARG) 法による作用結合部位の同定、後根神経節 (DRG) のカルシウムイメージング法を用いて、以下の知見を得た。

《方 法》

アロディニアテスト : PSPA-4 をマウスの脊髄腔内に投与し、触覚刺激を加え、アロディニアを 0~2 (0: 無反応、1: 軽度の啼泣、2: 激しい啼泣または逃避) の 3 段階で評価した。また、アクロメリン酸 A 惹起のアロディニアに対する PSPA-4 の効果を検討した。

in vitro ARG 法 : ラットの脳、脊髄切片を使用し、 ^{14}C PSPA-4 および ^3H カイニン酸を用いた in vitro ARG 法で、PSPA-4 およびカイニン酸の結合部位の同定を検討した。また、グルタミン酸受容体作動薬、拮抗薬を用いた結合阻害実験を行い、PSPA-4 が結合する受容体の同定を行った。

カルシウムイメージング法：マウスの後根神経節（DRG）の培養細胞を用いて、カルシウムイメージング法を行った。DRGにおけるPSPA-4とカイニン酸による細胞内カルシウム濃度を測定した。

《結果》

アロディニアテスト：PSPA-4は、高用量でアロディニア誘発作用を有し、一方、低用量では、PSPA-1と同様にアクロメリン酸A惹起のアロディニアを抑制した。PSPA-4惹起のアロディニアは、カイニン酸受容体拮抗薬1-(4-aminophenyl)-3-methylcarbonyl-4-methyl-3,4-dihydro-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine (GYKI53655)によって抑制された。

in vitro ARG法： $[^{11}\text{C}]$ PSPA-4は、ラットの脳、特に海馬、尾状核被殻、皮質および脊髄全体に結合した。 $[^{11}\text{C}]$ PSPA-4の結合は、PSPA-1、PSPA-4、カイニン酸で阻害されたが、GYKI53655では、阻害されなかった。 $[^3\text{H}]$ カイニン酸の結合部位は、 $[^{11}\text{C}]$ PSPA-4と類似し、脊髄では、後角に強い結合を認めた。その結合は、PSPA-1、PSPA-4で阻害された。

カルシウムイメージング法：PSPA-4はDRG培養細胞内のカルシウム濃度を上昇(27.9 ± 12.7%)させ、カイニン酸(9.5 ± 4.0%)とは異なる反応を示した。また、カイニン酸受容体の脱感作を阻害させる concanavalin A で前処置を行うと、PSPA-4による細胞内カルシウム濃度の上昇は減弱した。

《考察》

アクロメリン酸誘導体のPSPA-4は、アロディニア誘発作用と抗アロディニア作用の2つの効果を有していた。in vitro ARG法により、 $[^{11}\text{C}]$ PSPA-4の結合部位は、脳・脊髄で $[^3\text{H}]$ カイニン酸と類似しており、またその結合はカイニン酸、PSPA-1の存在下で阻害された。一方で $[^3\text{H}]$ カイニン酸の結合は、PSPA-4、PSPA-1の存在下で阻害されたことより、PSPA-4は、カイニン酸受容体に結合していることが示唆された。

近年、カイニン酸受容体が痛みの伝達に深く関与していることが明らかにされている。カイニン酸受容体は、GluK 1 から GluK 5 までのサブユニットから構成される。GluK 1 受容体拮抗薬 MSVIII-19 は、神経障害性疼痛などの慢性痛や急性痛に効果があると報告されている。PSPA-4 惹起のアロディニアは、カイニン酸受容体サブユニット GluK 2/3 および GluK 3 の拮抗薬である GYKI53655 によって抑制されたが、*in vitro* ARG 法では、^[11C]PSPA-4 の結合を阻害できなかった。これは、PSPA-4 の解離定数 163.9 nM に比べ、GYKI53655 のカイニン酸受容体サブユニット GluK 2/3 および GluK 3 に対する親和性が低いことによると考えられた。

DRG は、主にカイニン酸受容体サブユニット GluK 1 が発現しているが、カイニン酸によるカルシウム透過性の反応は低い。一方で、PSPA-4 はカイニン酸とは異なり、カルシウムの透過性を上昇させるアゴニスト活性を示したため、PSPA-4 は既知のカイニン酸受容体とは異なる経路でアロディニアに関与していることが示唆された。

今回の結果で、PSPA-4 は、アロディニア誘発作用と抗アロディニア作用の二面性を有し、脳・脊髄でカイニン酸受容体に結合することが示唆された。一方で、PSPA-4 は、DRG においてカイニン酸とは異なる反応を示した。NMDA、AMPA 受容体に比較し、カイニン酸受容体の役割の解明は遅れているが、今回の結果より PSPA-4 は、アクロメリン酸 A の作用メカニズムの解明だけでなく、中枢神経および末梢神経での痛みの伝達機構の解明に寄与する可能性を秘めている。

(様式 6)

論文審査結果の要旨

日本固有の毒茸であるドクササコから抽出されたアクロメリン酸Aを、マウスの脊髄内に投与すると、触覚刺激で誘発される激しい痛み（アロディニア）が惹起される。また、アクロメリン酸誘導体のPSPA-1は、アクロメリン酸A惹起の神経障害性様疼痛をグルタミン酸受容体 - 一酸化窒素の経路を介し、用量依存性に抑制する。アクロメリン酸Aは、カイニン酸と類似構造を持ち、カイニン酸と同様にnon-NMDA受容体に作用すると考えられているが、その作用部位は不明である。

申請者は、放射線同位体 ^{11}C で標識が可能な新規のアクロメリン酸誘導体 PSPA-4 を合成し、PSPA-4 の神経障害性疼痛に対する効果、*in vitro* autoradiography (*in vitro* ARG) 法および後根神経節 (DRG) のカルシウムイメージング法を用いて、以下の知見を得た。

- ① アクロメリン酸誘導体の PSPA-4 は、アロディニア誘発作用と抗アロディニア作用の 2 つの効果を有していた。
- ② [^{11}C]PSPA-4 の結合部位は、脳・脊髄で [^3H]カイニン酸と類似しており、またその結合はカイニン酸、PSPA-1 の存在下で阻害された。一方で [^3H]カイニン酸の結合は、PSPA-4、PSPA-1 の存在下で阻害された。
- ③ 後根神経節培養細胞を用いたカルシウムイメージング法において、PSPA-4 はカルシウムの透過性を上昇させ、カイニン酸とは異なる活性を示した。

これらの知見より、申請者は、新規のアクロメリン酸誘導体 PSPA-4 が既知のカイニン酸受容体とは異なる経路でアロディニアに関与していることを明らかにし、PSPA-4 はアクロメリン酸 A の作用メカニズムの解明だけではなく、NMDA、AMPA 受容体に比較し解明が遅れているカイニン酸受容体を介した中枢神経および末梢神経での痛みの伝達機構の解明に寄与する可能性を示した。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

European Journal of Pharmacology 710(1-3): 120-127, 2013

