

## グリア細胞及び ATP 受容体を標的としたアカデミア創薬の 実現に向けた「グリーンファルマ研究」の取り組み

山下智大,<sup>\*,a,†</sup> 津田 誠,<sup>a,b</sup> 齊藤秀俊,<sup>a,b</sup> 井上和秀<sup>a</sup>

### Green Pharma: A New Strategy for Drug Discovery in Academia by Targeting Glial Cells and ATP Receptors

Tomohiro Yamashita,<sup>\*,a,†</sup> Makoto Tsuda,<sup>a,b</sup> Hidetoshi Tozaki-Saitoh,<sup>a,b</sup> and Kazuhide Inoue<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Molecular and System Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University; 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan; and <sup>b</sup>Department of Life Innovation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University; 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.

(Received October 24, 2017)

Neuropathic pain associated with cancer, diabetic neuropathy, and postherpetic neuralgia is a type of intractable chronic pain characterized by mechanical allodynia and abnormal pain hypersensitivity evoked by innocuous stimuli. However, this disorder has no specific treatment. We previously showed that the purinergic receptor P2X<sub>4</sub> (P2X<sub>4</sub>R), a subtype of ATP-gated nonselective cation channels, is highly upregulated in spinal microglia after peripheral nerve injury, and blocking the function of P2X<sub>4</sub>R reverses mechanical allodynia. In the present study, we screened a chemical library of 1979 clinically approved compounds (a gift from the Drug Discovery Initiative at the University of Tokyo) aimed at achieving “Eco-Pharma,” which refers to seeking new effects of existing drugs. We demonstrated that duloxetine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor, has an inhibitory effect on rat and human P2X<sub>4</sub>R. In rat primary cultured microglial cells, duloxetine also inhibited P2X<sub>4</sub>R-mediated responses. Moreover, intrathecal administration of duloxetine in a model of neuropathic pain reversed nerve injury-induced mechanical allodynia. Based on those results, we suggest that the inhibition of P2X<sub>4</sub>R expressed in microglial cells may be involved in the antiallodynic effect of duloxetine in neuropathic pain. Furthermore, in this review, we discuss a new strategy for drug discovery called “Green Pharma” (a merger of “Eco-Pharma” and “Green chemistry” and referring to the development of eco-friendly pharmaceuticals).

**Key words**—P2X<sub>4</sub> receptor; microglia; neuropathic pain; duloxetine; chemical screening; Green Pharma

#### 1. はじめに

神経障害性疼痛は、がんや糖尿病、帯状疱疹などの疾患や外科的手術に伴う、神経の損傷や機能異常により引き起こされる難治性の慢性疼痛である。これは本来痛みとして感じない触刺激を激しい痛みと感じてしまうアロディニアを主症状とする。しかしながら、既存の鎮痛薬で十分な効果を得られている

患者はわずか4人に1人という現状であることから、<sup>1)</sup> 神経障害性疼痛に対する新たな治療薬の探索及び開発は急務の課題である。

末梢神経を損傷させた神経障害性疼痛モデル動物の脊髄において、中枢の免疫担当細胞であるミクログリアは肥大化や突起の退縮などの形態学的変化及び機能分子の発現変化を伴い、神経障害性疼痛に大きく寄与することが明らかになっている。<sup>2)</sup> 筆者らは脊髄ミクログリアに著しく発現増加するP2X<sub>4</sub>受容体（イオンチャネル型ATP受容体）を特定し、P2X<sub>4</sub>受容体の機能を阻害することでアロディニア症状を寛解することを明らかにしている。<sup>3)</sup> さらにP2X<sub>4</sub>受容体の欠損マウスでは神経損傷に起因するアロディニア症状が消失することを報告している。<sup>4)</sup> このようにP2X<sub>4</sub>受容体は神経障害性疼痛発

<sup>a</sup>九州大学大学院薬学研究院薬理学分野（〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1）、<sup>b</sup>九州大学大学院薬学研究院ライフイノベーション分野（〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1）

現所属：<sup>†</sup>九州大学大学院薬学研究院グローバルヘルスケア分野（〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1）

\*e-mail: yamashita@phar.kyushu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第137年会シンポジウムS13で発表した内容を中心に記述したものである。

症に重要な役割を果たしており、P2X<sub>4</sub> 受容体拮抗薬は神経障害性疼痛への画期的な治療アプローチとなり得ることが示唆される。

有望な創薬標的が発見されても新薬として市場に出るまでに、多額の経費と十数年以上の開発期間を要することは、避けて通れない事情である。一方で、既に承認された医薬品の中から新たな薬理作用を発見し、疾患に適応させることができれば、開発費用の削減や創薬開発期間の短縮、さらに副作用による臨床試験の失敗するリスクの低減が可能となる。<sup>5)</sup> 筆者らは、有望な創薬標的の分子に対して多くの既承認薬からハイスループットスクリーニング (HTS) によりヒット化合物を見い出す試みを「エコファーマ」と称している。<sup>6)</sup> このエコファーマを実践することで基礎研究の成果をいち早く臨床応用へつなげるだけでなく、アカデミアで実施できる有効な創薬探索法の模範例となり得ることが期待できる。

そこで本稿では、既承認薬の中から P2X<sub>4</sub> 受容体の拮抗作用を持つ化合物を探索し、見つけた既承認薬がミクログリアに発現する P2X<sub>4</sub> 受容体及び神経障害性疼痛に有効性を示すかを検証した最近の研究で得られた成果を踏まえて概説する。さらに、見出した既承認薬をより強い活性を有する化合物へと進化させるために、地球環境に優しい合成技術である「グリーンケミストリー」の技術を取り入れることで「グリーンケミストリー」と「エコファーマ」を融合させた「グリーンファルマ」と名付けた新たな創薬戦略の可能性についても紹介する。

## 2. エコファーマの実現を目指した P2X<sub>4</sub> 受容体拮抗薬の探索

P2X<sub>4</sub> 受容体を標的とした拮抗薬の探索を実施することを目的に、機能的 ATP 受容体を発現していないヒト 1321N1 アストロサイトーマ細胞 (1321N1 細胞) にラット P2X<sub>4</sub> 受容体を発現させた細胞を構築した。この細胞を 96 well プレートに播種し、P2X<sub>4</sub> 受容体のアゴニストである ATP を刺激すると、HTS 機器である FDSS7000EX を用いたカルシウムイメージング法により、再現性の高いカルシウム応答が観察できた。さらに東京大学創薬機構から提供して頂いた 1979 種の既承認薬の中から、この ATP 誘発カルシウム応答を抑制する既承認薬を探索したところ、セロトニン・ノルアドレナ

Inhibition of P2X <sub>4</sub> R function	No effect on P2X <sub>4</sub> R function
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duloxetine (SNRI)</li> <li>• Paroxetine (SSRI)</li> <li>• Maprotiline (TeCA)</li> <li>• Clomipramine (TCA)</li> <li>• Amitriptyline (TCA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citalopram (SSRI)</li> <li>• Milnacipran (SNRI)</li> <li>• Mirtazapine (TeCA)</li> <li>• Bupropion (DNRI)</li> </ul>

5-HT and noradrenaline (NA) reuptake inhibitor (SNRI), Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), Tricyclic antidepressant (TCA), Tetracyclic antidepressant (TeCA), NA and dopamine reuptake inhibitor (DNRI)

Fig. 1. Comparison of the Effect of Duloxetine and Other Antidepressants on rat P2X<sub>4</sub> Receptors (rP2X<sub>4</sub>R)

Effect of duloxetine and other antidepressants (30  $\mu$ M) on ATP (10  $\mu$ M)-induced  $[Ca^{2+}]_i$  in rP2X<sub>4</sub>R-1321N1 cells measured by the FDSS7000EX system. Cells were pretreated with duloxetine and other antidepressants 10 min prior to ATP application.

リン再取り込み阻害薬 (serotonin noradrenalin reuptake inhibitor; SNRI) として知られるデュロキセチンに、その作用を見い出すことに成功した。<sup>7)</sup> まず、デュロキセチンによる P2X<sub>4</sub> 受容体に対する拮抗作用について再現性を確認したところ、濃度依存かつ強力にカルシウム応答の抑制効果を確認できた。次に単一細胞レベルで機能評価が可能なカルシウムイメージングシステム (AQUACOSMOS) を利用することで、デュロキセチンのヒト由来 P2X<sub>4</sub> 受容体に及ぼす影響を評価した。その結果、デュロキセチンはヒト P2X<sub>4</sub> 受容体においても拮抗作用が認められ、IC<sub>50</sub> 値は 1.59  $\mu$ M を示した。これよりデュロキセチンがラット及びヒト P2X<sub>4</sub> 受容体に対して強い拮抗作用を有することを明らかにした。

筆者らは、抗うつ薬の一部が P2X<sub>4</sub> 受容体の機能を抑制することを明らかにできたため、<sup>8)</sup> デュロキセチンを含めた計 9 種類の異なる作用機序の抗うつ薬について、P2X<sub>4</sub> 受容体への拮抗作用を比較した。デュロキセチンは、既に P2X<sub>4</sub> 受容体への拮抗作用が知られているパロキセチン、クロミプラミン、マプロチリン、アミトリプチリンと同様、強力な P2X<sub>4</sub> 受容体拮抗作用を有することを確認した (Fig. 1)。また SNRI に属するミルナシプラミンには P2X<sub>4</sub> 受容体への拮抗作用が認められなかった事実から、デュロキセチンは SNRI に対するファーマコフォアには依存せず、P2X<sub>4</sub> 受容体への拮抗作用を発揮することが示唆された。

## 3. ミクログリアに発現する P2X<sub>4</sub> 受容体に対するデュロキセチンの効果

神経障害性疼痛モデル動物の脊髄において、P2X<sub>4</sub> 受容体は主にミクログリアに発現しているこ

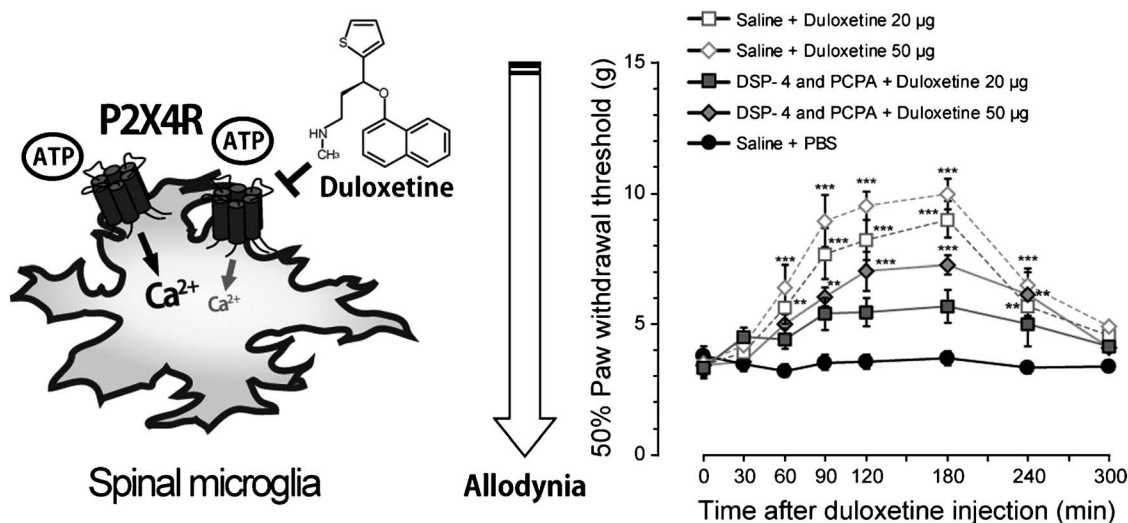


Fig. 2. Intrathecal Duloxetine Attenuates Allodynia after Peripheral Nerve Injury (PNI): Possible Involvement of Blocking P2X4R Function in Microglial Cells

The paw withdrawal threshold (grams) of mechanical stimulation by von Frey filaments was applied to the rat hindpaw after PNI. Duloxetine (20 or 50  $\mu$ g/20  $\mu$ L) or vehicle (phosphate-buffered saline, 20  $\mu$ L) was intrathecally administered to rats on day 7 post-PNI. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered once a day for 3 d from day 4 post-PNI, and DSP-4 (50 mg/kg, i.p.) was administered 3 d before PNI ( $n=5 \pm 13$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ ). Data represent mean  $\pm$  S.E.M.

とが報告されている。<sup>3)</sup>そこで、次に初代培養ミクログリア細胞に発現する P2X4 受容体を対象として、デュロキセチンの効果を検証した。ラット新生児の脳から取り出した初代培養ミクログリア細胞に ATP (50  $\mu$ M) を刺激することで、P2X4 受容体由来の成分を含むカルシウム応答が誘発される。この ATP 誘発カルシウム応答はデュロキセチンを前処置することで有意に抑制された。ミクログリアには P2X4 受容体のほかにも ATP に応答する受容体として、P2X7 受容体及び P2Y12 受容体が知られている。<sup>9)</sup>そこで、P2X7 受容体に選択性が高い作動薬である BzATP (100  $\mu$ M) による刺激で誘発するカルシウム応答について検討したところ、デュロキセチン前処置による影響はなかった。一方で P2Y12 受容体は ATP の代謝産物である ADP で強く活性化されることから、ADP (10  $\mu$ M) の刺激により誘発するカルシウム応答の影響を検討したところ、デュロキセチンの前処置により若干の抑制効果が認められた。つまりミクログリアに発現する P2Y12 受容体に対してはわずかながら抑制作用を示す可能性が考えられた。

P2X4 受容体への影響を詳しく検証するため、ATP の刺激前に P2X4 受容体をアロステリックに活性化させるイベルメクチンを併用したところ、<sup>10)</sup>著しい ATP 誘発カルシウム応答の増強が観察された。この現象は P2X4 受容体由来の成分が増大した

ためと考えられる。興味深いことに、このイベルメクチン併用により増強した ATP 誘発カルシウム応答は、デュロキセチンを前処置することで完全に消失した。これらの結果から、ミクログリアに発現する ATP 受容体の中でも、デュロキセチンは P2X4 受容体の機能に対して強く阻害することを明らかにした。

#### 4. デュロキセチンの脊髄腔内投与によるアロディニアへの有効性

デュロキセチンがミクログリアに発現する P2X4 受容体の機能に対して阻害作用を有することから、次にデュロキセチンを神経障害性疼痛モデル動物の脊髄腔内に投与することで鎮痛効果を示すか否かについて検討した。まず、神経障害性疼痛モデルラットにおいて von Frey test (軽度機械刺激) を行ったところ、末梢神経損傷後 7 日目で著しい後肢疼痛閾値の低下が認められた。そこで、デュロキセチン (20  $\mu$ g 若しくは 50  $\mu$ g) を脊髄腔内に投与したところ、投与後 180 分の時点において後肢疼痛閾値の有意な上昇が認められた。つまり、デュロキセチンを脊髄腔内投与することで、アロディニア症状を寛解することを確認した。

デュロキセチンの鎮痛効果の作用機序として、ノルアドレナリン及びセロトニントランスポーターを阻害することにより、脊髄後角の下行性抑制系を賦活化させることで鎮痛効果を示す可能性が考えられ

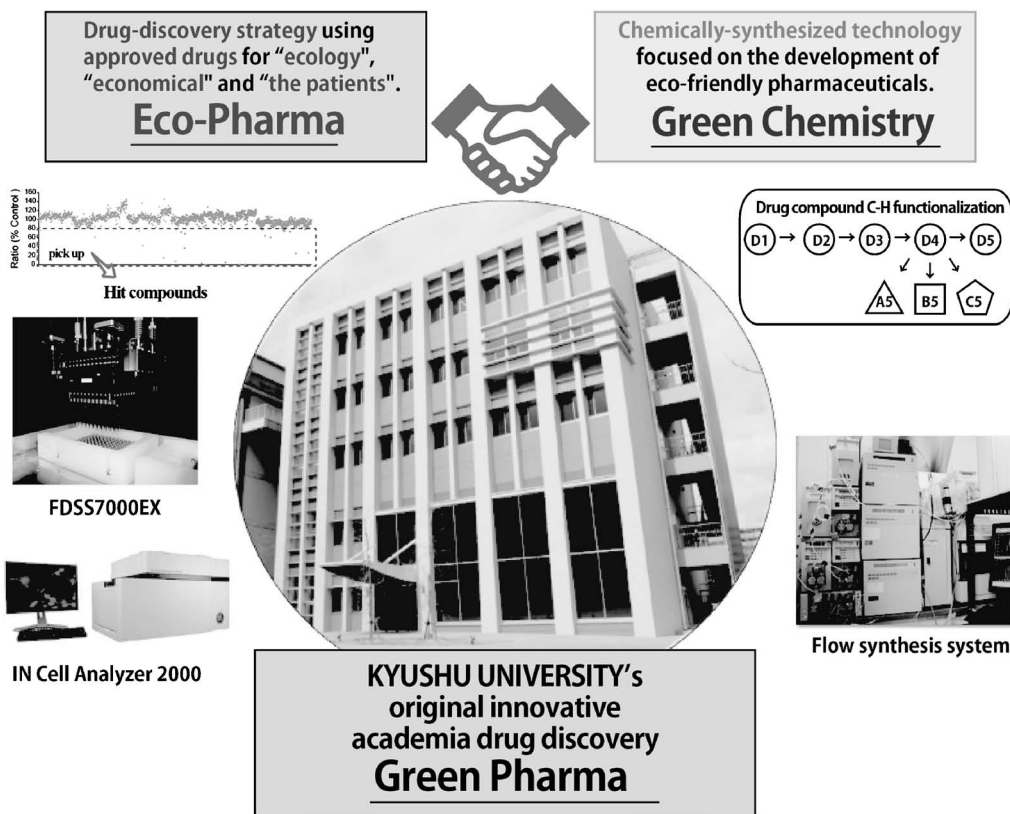


Fig. 3. Schematic Illustration of Green Pharma

る。これらの要因を排除するため、ノルアドレナリン神経に選択的に作用する神経毒である *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) によりノルアドレナリン神経を脱落させ、同時にセロトニン合成酵素阻害薬である *p*-chlorophenylalanine (PCPA) を用いることでセロトニンを枯渇させたラットにおいて、デュロキシセチンがアロディニア症状を抑えるかについて検討した。DSP-4 は神経障害性疼痛モデル動物の作製 3 日前に 1 回投与し、PCPA はモデル動物の作製 4 日後から 1 日 1 回の計 3 回投与した。末梢神経損傷後 7 日目において、DSP-4 及び PCPA を投与した動物においても、軽度機械刺激に対する後肢疼痛閾値の低下が観察され、このモデル動物にデュロキシセチンを投与したところ、効力は弱まったものの明らかな疼痛閾値の上昇が認められた (Fig. 2)。これらの結果より、デュロキシセチンにはノルアドレナリン及びセロトニントランスポーター阻害とは異なる疼痛緩和につながる作用機序が存在することを明らかにした。総合すると、デュロキシセチンにはミクログリアに発現する P2X4 受容体阻害作用に基づき、神経障害性疼痛

を寛解することが予想された。<sup>7)</sup>

##### 5. グリーンファルマ研究によるアカデミア創薬の可能性

デュロキシセチンは P2X4 受容体への強い拮抗作用を有することから、デュロキシセチンの化学構造を基にブラッシュアップすることで、有効性や選択性に優れた P2X4 受容体拮抗薬の開発、さらには神経障害性疼痛に対するより効果的な治療薬へと進化することが期待できる。それゆえ、エコファーマ研究から見出したデュロキシセチンを先行して臨床応用へと展開し、同時に強力な P2X4 受容体拮抗作用を有するデュロキシセチン誘導体を新薬として開発できれば、まさに理想的である。そこで、有機化学合成技術として省資源・省エネルギー型の環境に優しい「グリーンケミストリー」を利用して合成されたデュロキシセチン誘導体について、P2X4 受容体の拮抗作用を評価した。これまでに 70 種類以上のデュロキシセチン誘導体を評価した結果、デュロキシセチンよりも P2X4 受容体の拮抗作用が強い化合物を見出すことに成功した。この創薬戦略は P2X4 受容体の拮抗薬を化合物ライブラリーから探索するよりも

効果的であったことから、本研究よりグリーンファルマ研究の有効性が示唆された。

## 6. おわりに

本稿では、既承認薬の中から P2X4 受容体の拮抗薬として新たにデュロキセチンを発見し、デュロキセチンがミクログリアに発現する P2X4 受容体の機能を抑制し、神経障害性疼痛の寛解につながるという、エコファーマの実施例について概説した。近年、デュロキセチンは糖尿病性神経障害に伴う疼痛、線維筋痛症に伴う疼痛、慢性腰痛症に伴う疼痛そして変形性関節症に伴う疼痛など次々と適応が追加されている。しかし、すべての SNRI に属する薬剤が有効性を示すわけではないことから、本研究はデュロキセチンの慢性疼痛に対する鎮痛効果をもたらしメカニズム解明の一助になると考える。また、神経障害性疼痛は様々な要因により発症や持続することが知られていることから、P2X4 受容体の活性化が顕著な患者を選別することが可能となれば、最適な薬剤選択が実現できるだろう。さらに、デュロキセチンを人と地球に優しい創薬手法であるグリーンファルマ研究へと発展させることで、P2X4 受容体拮抗作用が高いデュロキセチン誘導体を見い出せたことから、今後、神経障害性疼痛に対する画期的な創薬開発につながることを期待される。

現在、エコファーマ及びグリーンファルマ研究は、九州大学薬学研究院の附属施設「グリーンファルマ研究所」(平成 27 年に竣工)で実施され、学内だけでなく学外の研究者も日々、有望な創薬シーズを探索し続けている。本施設では、創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業の支援により、化合物スクリーニング、最適化合成、薬物動態解析、疾患動物の薬効評価などの創薬研究支援も展開している。今後、神経障害性疼痛の治療薬だけでなく様々な難治性疾患に対する治療薬が、グリーンファルマ研究から創出することを切望する (Fig. 3)。

**謝辞** 本研究は、主に九州大学大学院薬学研究院薬理学分野において行われたものであり、本研究

を遂行するにあたり、化合物の最適化に御尽力頂いた大嶋孝志教授及び渡邊賢司特任助教に厚く御礼申し上げます。「グリーンファルマを基盤にした創薬オープンイノベーションの推進」にあたり多大なお世話になりました。大戸茂弘教授、植田 正教授、西田基宏教授、小柳 悟教授、Caaveiro Jose 准教授、松永直哉准教授に深謝致します。また、化合物ライブラリーをご提供して頂きました東京大学創薬機構に感謝申し上げます。本成果は、日本医療研究開発機構が実施する創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業及び創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業の支援により得られました。

**利益相反** 津田 誠 (日本イーライリリー株式会社からの研究助成を受領)。

## REFERENCES

- 1) Nightingale S., *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **11**, 101–102 (2012).
- 2) Beggs S., Trang T., Salter M. W., *Nat. Neurosci.*, **15**, 1068–1073 (2012).
- 3) Tsuda M., Shigemoto-Mogami Y., Koizumi S., Mizokoshi A., Kohsaka S., Salter M. W., Inoue K., *Nature*, **424**, 778–783 (2003).
- 4) Tsuda M., Kuboyama K., Inoue T., Nagata K., Tozaki-Saitoh H., Inoue K., *Mol. Pain*, **5**, 28 (2009).
- 5) Nosengo N., *Nature*, **534**, 314–316 (2016).
- 6) Inoue K., *Pain Research*, **22**, 163–169 (2007).
- 7) Yamashita T., Yamamoto S., Zhang J., Kometani M., Tomiyama D., Kohno K., Tozaki-Saitoh H., Inoue K., Tsuda M., *PLoS One*, **11**, e0165189 (2016).
- 8) Nagata K., Imai T., Yamashita T., Tsuda M., Tozaki-Saitoh H., Inoue K., *Mol. Pain*, **5**, 20 (2009).
- 9) Tsuda M., *J. Neurosci. Res.*, **95**, 1319–1329 (2017).
- 10) Khakh B., Proctor W., Dunwiddie T., Labarca C., Lester H., *J. Neurosci.*, **19**, 7289–7299 (1999).