

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390408  
 研究課題名（和文） 逆行性軸索輸送を利用した細胞膜透過性ペプチドによる難治性疼痛治療薬の開発  
 研究課題名（英文） Development of a cell-penetrating peptide, transported retrogradely in the axon, for treatment of uncontrolled pain  
 研究代表者  
 廣瀬 宗孝（HIROSE MUNETAKA）  
 福井大学・医学部・准教授  
 研究者番号：50275228

研究成果の概要（和文）：強い痛みに対して、現在の医学における治療方法は限られています。そこで、痛みを起こす物質の中の1つである神経成長因子の作用を抑制する、新しい薬物の開発が必要です。この研究では、神経成長因子の作用を抑制するペプチド(IPTRK3)を開発し、痛みの動物モデルを用いて、IPTRK3が強い痛みを抑えることを明らかにしました。IPTRK3は、新しい痛みの治療薬になるかもしれません。

研究成果の概要（英文）：There are limited varieties of conventional medical therapeutics for the management of severe pain. Therefore novel drugs to inhibit the effect of nerve growth factor, which is one of agents to cause pain, are needed. In this study, we developed a peptide to inhibit the effect of nerve growth factor, and revealed that this peptide, IPTRK3, suppressed severe pain state using animal model of pain. IPTRK3 would be a candidate for new pain killer.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野：麻酔蘇生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔蘇生学

キーワード：炎症性疼痛、細胞膜透過性ペプチド、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、神経成長因子、疼痛治療学、TrkA、慢性痛

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 人間の痛みは「不快な感覚および情動体験」であり、病態生理の側面から分類すると、「侵害受容痛」、「神経障害痛」、「心因痛」に分けられる。現在はこれらの痛みに対して、非ステロイド性抗炎症薬、オピオイド、抗う

つ薬、抗てんかん薬、局所麻酔薬、神経ブロック、脊髄刺激電極など様々な治療法を用いることで、これまで緩和できなかった多くの痛みが抑制できるようになってきた。しかしどのような治療法を用いても抑制できない難治性の痛みが、術後痛、がん性痛、外傷後痛

などにおいて、依然として多く残されているのが現状であり、新たな治療方法の開発が望まれている。

(2) 近年、痛みのメカニズムに関する研究は飛躍的に進歩した。多くのサイトカイン、神経伝達物質、細胞内タンパクなどが痛みのメカニズムに関与していることが明らかとなり、現在の難治性痛の原因の一つとして、これらの様々なメカニズムを十分に抑制できないことが考えられる。この中でも、局所の炎症部位や神経損傷部位で産生されるNerve Growth Factor (NGF)は、神経末端にあるNGFの高親和性細胞膜受容体であるTrkAと共に痛み治療のターゲットとして注目されている。NGFで活性化されたTrkAは、痛みの末梢性感作を引き起こすと共に、軸索内に取り込まれて逆行性に後根神経節まで輸送され、様々な神経細胞内のシグナルを活性化することにより、侵害受容痛の中枢性感作や神経障害痛のメカニズムとして非常に重要な役割を持つことが明らかになった。

(3) このNGFのTrkAを介したシグナルを抑制する薬剤として現在、国内外では抗NGF抗体やNGF-TrkA結合阻害薬などの開発が行われている。しかしこれらの薬剤は細胞外での作用に限られるため、侵害受容痛の末梢性感作を抑制する短時間の効果は認められるものの、難治性の痛みの原因となる侵害受容痛の中枢性感作や神経障害痛では十分な効果が認められない可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) TrkAの活性化ループ (666 SRDIYSTDYR 676) に作用するアミノ酸配列を決定する。リコンビナントTrkAを用いたin vitroの実験系で、TrkA活性を抑制するペプチドのアミノ酸配列を決める。

(2) 次に細胞膜透過性を亢進させる側鎖を、上記で決定したペプチドに結合した細胞膜透過性ペプチドを作成し、in vivoにおけるNGFによる反応 (PC12細胞における神経突起伸長作用やTrkAの細胞内情報伝達系の解析など) を抑制するアミノ酸配列を決定する。決定した細胞膜透過性ペプチドに蛍光色素を結合させ、神経細胞における細胞膜透過性を確認する。これにより TrkA 活性抑制ペプチド (inhibitory peptide of TrkA activity : IPTRK) の構造を決める。

(3) 動物の侵害受容痛モデルと神経障害痛モデルを作成し、治療薬の候補となるIPTRKの効果を検討する (皮下投与、腹腔内投与、くも膜下投与など)。鎮痛作用のあるIPTRKが神経末梢に投与された場合、逆行性軸索輸送によ

りTrkAと共に後根神経節へ輸送されることを明らかにする。

(4) 決定したIPTRKをラットに大量投与し、その毒性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) TrkA活性を抑制するアミノ酸配列 (TrkA活性抑制部位) の候補を、TrkAの活性化ループのアミノ酸配列を参考にして決めた (図1A)。この部位に、細胞膜透過性を亢進させる Tat ペプチドを結合させて、細胞内で作用するペプチドを作成した。Tat ペプチドと TrkA 活性抑制部位の間には、可動性が非常に高いε-アミノカプロン酸 (X) を挿入して、TrkA 活性抑制ペプチド (IPTRK) の候補を作成した。図1Bは、コントロール(C)の Tat ペプチドのみを含む3つの IPTRK の候補を示す。ペプチドの作成は外部委託で行った。

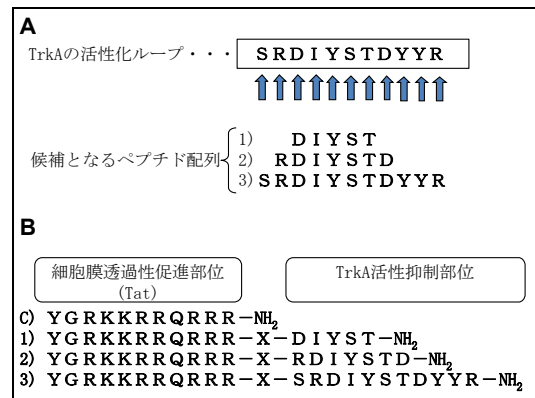


図1 A: TrkA 活性抑制部位の候補。 B: TrkA 活性抑制ペプチド (IPTRK) の候補

これらのペプチドの in vitro での TrkA 活性に対する効果を、リコンビナント TrkA を用いたスクリーニングキット (TrkA Kinase Assay/Inhibitor Screening Kit, Cyclex) を用いて検討し、候補となるペプチド配列 (図1B) の中で、最も低濃度で抑制作用を示すペプチドを明らかにした。

また他の受容体型チロシンキナーゼであるインスリン受容体 (insulin receptor) と上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) の、チロシンキナーゼ活性に対する影響を、in vitro で検討した。

(2) 次に NGF 刺激で神経突起伸長作用を示す PC12 細胞を用いて、IPTRK の神経突起伸長作用に及ぼす影響を検討した。また NGF 刺激による細胞全体のチロシンリン酸化の増加に及ぼす影響も検討した。

(3) IPTRK の PC12 細胞に対する細胞障害作用を検討するため、LDH 放出量を測定した。

(4) ここまでの実験で、TrkA 活性を効果的に抑制する IPTRK は、YGRKKRRQRRR -x- SRDIYSTDYR-NH2 であることが明らかとなり、IPTRK3 と命名した。IPTRK3 に蛍光色素 FITC を結合させ、PC12 細胞における細胞膜透過性の確認を行った。

(5) NGF は PC12 細胞の TrkA に結合すると細胞膜上の TrkA が二量体を形成してお互いの細胞内のチロシン残基を自己リン酸化する。また NGF 刺激により、細胞内の transient receptor potential vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) channels の発現が増加する。そこで、NGF 刺激による TrkA 自己リン酸化と TRPV1 発現に及ぼす、IPTRK3 の影響を調査した。

(6) ラット足底部皮下へ NGF を注入すると、熱刺激に対する疼痛過敏が生じる。IPTRK3 (8mM) を NGF と同時に皮下注入し、疼痛過敏に対する IPTRK3 の効果を検討した。

(7) FITC でラベルした IPTRK3 を NGF と共にラット足底部に皮下注射し、坐骨神経の軸索と後根神経節における TrkA と FITC-IPTRK3 の二重染色を行った。

(8) ラット足底部に完全フロイトアジュバント (CFA) を皮下注入し、侵害受容痛モデルを作成した。CFA 投与 2 時間後に、同じ部位に IPTRK3 (10mM) を皮下注射し、熱刺激と機械刺激による疼痛過敏に対する効果を検討した。また後根神経節細胞内の TrkA と TRPV1 の発現を調査した。

(9) マウス坐骨神経の一部を損傷して、神経障害痛を生じる Seltzer モデルを作成した。モデル作成 1 週間後に、IPTRK3 を腹腔内投与し、熱刺激と機械刺激による疼痛過敏に対する効果を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) IPTRK3 は、in vitro での TrkA 活性を、 $30 \mu\text{M}$  以上で有意に抑制した (図 2A)。また設計した何れの IPTRK も、インスリン受容体と上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor; EGFR) の活性を抑制しなかった (図 2B)。

(2) IPTRK3 は、NGF 刺激による細胞全体のチロシンリン酸化の増加を抑制し (図 3A)、PC12 細胞の神経突起伸長作用を抑制した (図 3B)。

(3) IPTRK3 の細胞障害性は  $300 \mu\text{M}$  で認められたが、 $60 \mu\text{M}$  以下では見られなかった (図 4A)。

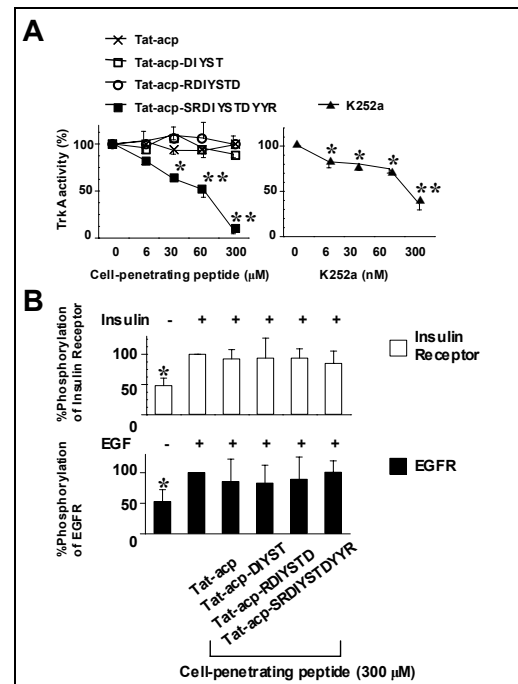


図 2 A: IPTRK によるリコンビナント TrkA 活性の抑制作用. B: インスリン受容体と上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor; EGFR) のチロシンキナーゼ活性に及ぼす IPTRK の影響

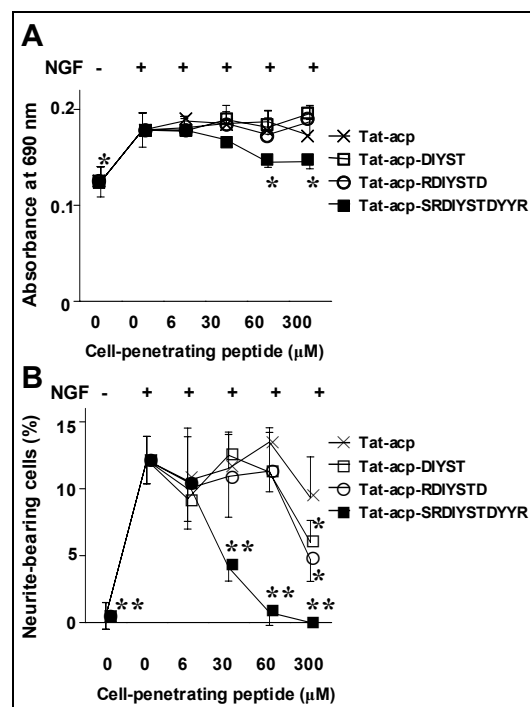


図 3 A: NGF 刺激による細胞全体のチロシンリン酸化の増加に対する IPTRK の影響. B: NGF 刺激による PC12 細胞における神経突起伸長作用に対する IPTRK の影響.

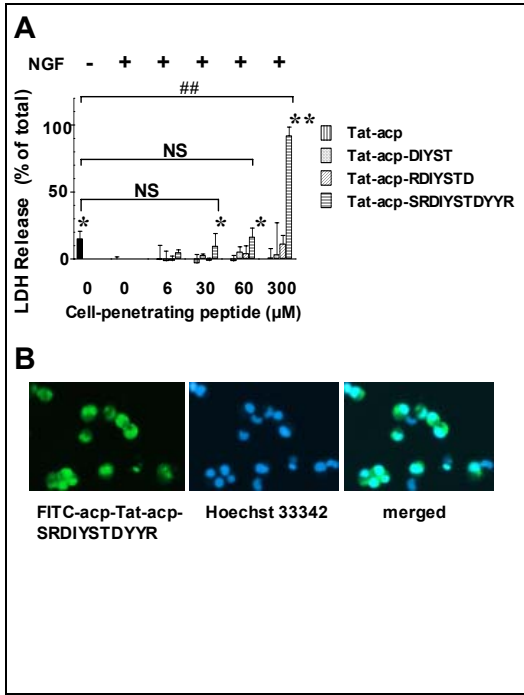


図4 A: IPTRKのPC12細胞における細胞障害性. B: FITCでラベルしたIPTRK3(緑色)とHoechst33342の二重染色.

(4) FITCでラベルした6µMのIPTRK3は、10分後に79%の細胞内に取り込まれた(図4B).

(5) IPTRK3は、NGF刺激に伴うTrkA自己リン酸化とTRPV1発現を有意に抑制した(図5).

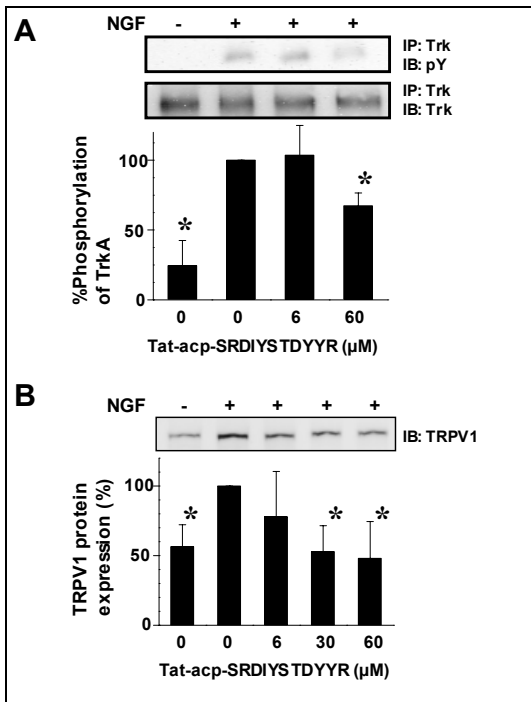


図5 A: NGF刺激に伴うTrkA自己リン酸化. B: NGF刺激に伴うTRPV1発現.

(6) ラット足底部皮下へ注入したNGFによる熱刺激疼痛過敏を、同時に皮下投与したIPTRK3は抑制した(図6).

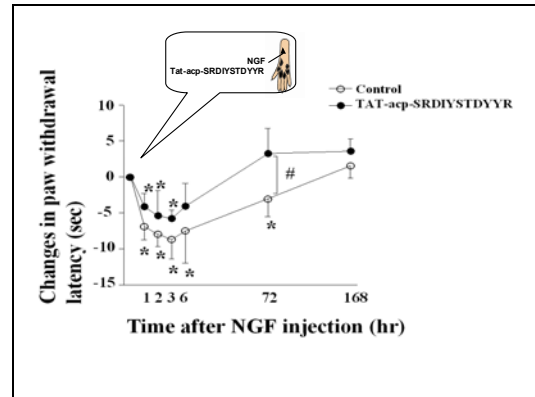


図6 ラット足底部皮下へ注入したNGFによる熱刺激疼痛過敏に対するIPTRK3の効果

(7) ラット足底部皮下へ注入したTrkAとFITC-IPTRK3は、逆行性軸索輸送により、後根神経節細胞まで運ばれる可能性が示された(図7).

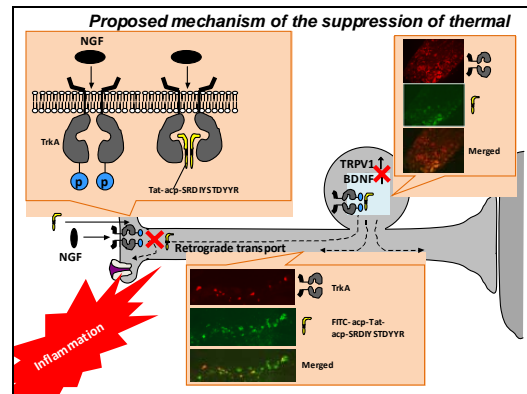


図7 FITCでラベルしたIPTRK3とTrkAの逆行性軸索輸送. 軸索内と後根神経節細胞における二重染色.

(8) ラット足底部に完全フロイトアジュバント(CFA)を皮下注入し、侵害受容痛モデルを作成し、CFA投与2時間後に、同じ部位にIPTRK3(10mM)を皮下注射した。IPTRK3は熱刺激と機械刺激による両方の疼痛過敏を抑制した(図8, 9)。またIPTRK3はCFA注入後の後根神経節細胞内のTrkAの発現には影響がなかったが、TRPV1の発現を有意に抑制した(図10)。

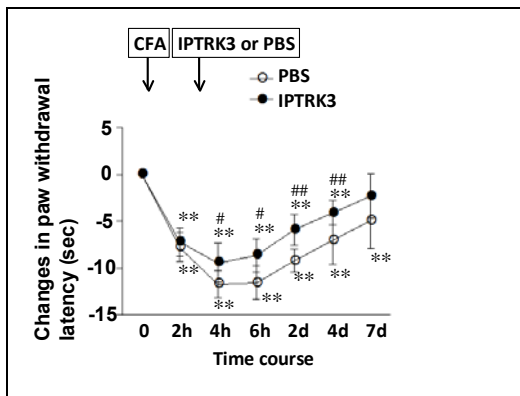


図8 完全フロイトアジュバントによるラット侵害受容痛モデルにおける IPTRK3 (10mM) の熱刺激疼痛過敏に対する効果.

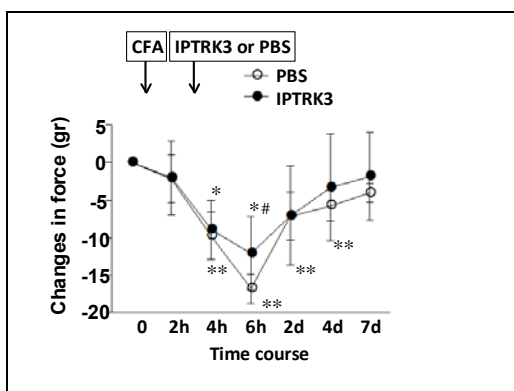


図9 完全フロイトアジュバントによるラット侵害受容痛モデルにおける IPTRK3 (10mM) の機械刺激疼痛過敏に対する効果.

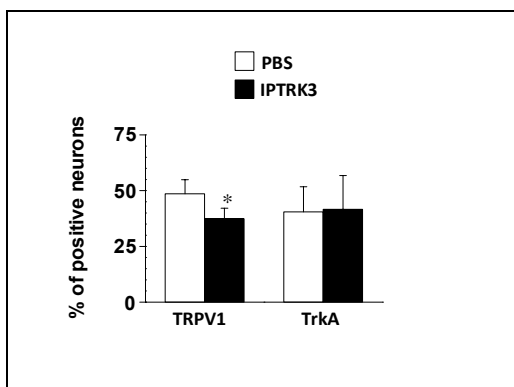


図10 完全フロイトアジュバントによるラット侵害受容痛モデルにおける IPTRK3 (10mM) の後根神経節細胞内 TrkA 発現と TRPV1 発現に対する効果.

(9) マウス神経障害痛モデル (Seltzer モデル) による熱刺激疼痛過敏と機械刺激疼痛過敏を、腹腔内投与した IPTRK3 は、共に有意に抑制した (未発表)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

- ① 廣瀬宗孝、田畑麻里、坂井美賀子、関久美子、松木悠佳、慢性非がん性疼痛患者における嗜癮を予防するための長期オピオイド療法、ペインクリニック、査読有、31 巻、221-224、2010
- ② 廣瀬宗孝、鎮痛補助薬が必要であった一例～疼痛コントロールに難渋した多発性骨髄腫～、JPAP Ai 査読無、1 巻、6、2009
- ③ Kato M, Abe M, Kuroda Y, Hirose M, Nakano M, Handa T: Synthetic pentapeptides inhibiting autophosphorylation of insulin receptor in a non-ATP-competitive mechanism. J Pept Sci 査読有、15巻、327-36、2009
- ④ Abe M, Kuroda Y, Hirose M, Kato M, Murakami M, Watanabe Y, Nakano M, Handa T: Inhibition of autophosphorylation of epidermal growth factor receptor by a small peptide not employing an ATP-competitive mechanism. Biopolymers 査読有、89 巻、40-51、2008
- ⑤ Tsugita K, Hirose M, Murata E, Iho S. General anaesthesia and TrkA mRNA in peripheral blood mononuclear cells. Eur J Anaesthesiol 査読有、25 巻、1032-1033、2008
- ⑥ Matsuki Y, Hirose M, Nakano A, Sarasawa K, Hamada T. Cluster headache with Brugada electrocardiogram pattern. J Headache Pain 査読有、9 巻、249-251、2008
- ⑦ Hirose M, Takatori M, Kuroda Y, Abe M, Murata E, Isada T, Ueda K, Shigemi K, Shibasaki M, Shimizu F, Hirata M, Fukazawa K, Sakaguchi M, Kageyama K, Tanaka Y. Effect of synthetic cell-penetrating peptide on TrkA activity in PC12 cells. J Pharmacol Sci 査読有、106 巻、107-113、2008
- ⑧ 廣瀬宗孝、重見研司、細川豊史、深澤圭太、慢性非がん性疼痛患者におけるオピオイドによる嗜癮、ペインクリニック、査読有、28 巻、1511-1514、2007

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① 廣瀬宗孝、坂井美賀子、松木悠佳、

Neuropathic pain の症状から予測するガバペンチンの臨床効果、日本ペインクリニック学会第 43 回大会、名古屋、2009. 7. 18

② 廣瀬宗孝、肢端紅痛症と考えられた 1 症例、第 1 回福井疼痛懇話会、福井、2008. 10. 10

③ 廣瀬宗孝、上田康陽、清水久美子、次田佳代、松木悠佳、重見研司、TrkA キナーゼ活性を抑制する細胞膜透過性合成ペプチドによる疼痛治療薬の開発、日本麻酔科学会第 55 回学術集会、横浜、2008. 6. 12

④ Hirose M, Ueda K, Murata E, Kuroda Y, Abe M, Shimizu K, Tsugita K, Matsuki Y, Shigemi K: A novel synthetic cell-penetrating peptide directly inhibits TrkA activity and suppresses heat hyperalgesia caused by nerve growth factor. 13th International Pain Clinic Congress, World Society of Pain Clinicians 2008, Seoul, Korea, 2008. 5. 31

⑤ 廣瀬宗孝、坂井美賀子、松木悠佳、佐藤倫祥、清水久美子、次田佳代、三田建一郎、信川泰成、田畑麻里、石本雅幸、上田雅史、重見研司、慢性非がん性疼痛における神経因性疼痛に対するリン酸コデインの効果、日本ペインクリニック学会第 15 回北陸地方会、金沢、2008. 3. 15

⑥ Hirose M, Takatori M, Kuroda Y, Abe M, Shibasaki M: Synthetic Peptide Inhibiting TrkA Activity Suppresses Long-Lasting Hyperalgesia Induced by NGF. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists, San Francisco, U. S. A., 2007. 10. 15

⑦ 廣瀬宗孝、細川豊史、深澤圭太、慢性非がん性疼痛に対するオピオイド治療における嗜癖の評価、日本ペインクリニック学会第 41 回大会、横浜、2007. 7. 7

⑧ 廣瀬宗孝、高取真由美、柴崎雅志、阪口雅洋、影山京子、田中義文、逆行性軸索輸送を利用した細胞膜透過性合成ペプチドによる疼痛の中枢性感作の抑制、日本麻酔科学会第 54 回学術集会、札幌、2007. 5. 31

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：合成ペプチドを用いた良性および悪性腫瘍治療薬

発明者：廣瀬宗孝

黒田義弘

権利者：福井大学

種類：特許

番号：特許 2008-166570

出願年月日：20 年 6 月 25 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 宗孝 (HIROSE MUNETAKA)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：50275228

(2) 研究協力者

村田 恵理 (MURATA ERI)

福井大学・医学部・教務補佐員

上田 康陽 (UEDA KOYO)

福井大学・医学部・大学院生

Weiyang Ma

福井大学・医学部・外国人研究者