

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22600008

研究課題名（和文）新規タキキニンペプチドの構造と機能に関する研究

研究課題名（英文） Study on structure and function of novel tachykinin peptides

研究代表者

西森 利数（NISHIMORI TOSHIKAZU）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：20112211

研究成果の概要（和文）：新規タキキニンペプチドに属するエンドキニンのうち、エンドキニン C/D は痛み刺激に対して抑制効果を示す。そこで、このペプチドの一部のアミノ酸を D 型に置換したところ、これまでのペプチドよりも抑制効果時間が顕著に延長した。また、他の新規タキキニンペプチドであるヘモキニン-1 は既存のタキキニンペプチドとは異なり、髄腔内投与により熱痛覚過敏を誘発しない。これはヘモキニン-1 の N 末端領域を構成する 3 つのアミノ酸に起因していた。

研究成果の概要（英文）：Endokinins are novel tachykinin peptides, in which endokinin C/D (EKC/D) has the inhibitory effect on noxious stimulation. Replacement of EKC/D with D-type amino acid remarkably extended this effect. Also, intrathecal administration of hemokinin-1, another novel tachykinin peptide, did not induce thermal hyperalgesia. This effect of hemokinin-1 was caused by 3 amino acids consisting of N-terminal region of this peptide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：疼痛、ペプチド、脊髄、神経薬理

### 1. 研究開始当初の背景

タキキニンペプチドとは、ペプチドの C 末端領域に Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-amide のアミノ酸配列をもつペプチドの総称で、その代表がサブスタンス P (SP) である。ほ乳類においては、さらにニューロキニン A とニューロキニン B が知られ、哺乳類におけるタキキニンペプチドは 3 種類しか存在しないとされてきた。しかし、2000 年に、これまでのタキキニンペプチドと共通のアミノ酸配列をもつ新規のペプチドが同定され、ヘモキニン-

1 と命名された。さらに、2003 年にはヒトの遺伝子から新規タキキニンペプチドとしてエンドキニン A、エンドキニン B、エンドキニン C、エンドキニン D が同定された。エンドキニン A と B の C 末端領域はタキキニンペプチドに共通のアミノ酸配列を持つため、タキキニンペプチドと言えるが、エンドキニン C と D の C 末端は Met の代わりに Leu となっているところからこれらのペプチドはタキキニン関連ペプチドと言われてきた。このように 2000 年以降、新たなタキキニンペプチ

ドが次々と報告されてきているのにもかかわらず、これら新規タキキニンペプチドと疼痛との関係に関する報告は我々の研究報告以外にほとんどないのが現状である。そこで、これまで報告してきた我々の研究実績に基づき本研究を展開していく事とした。

タキキニンペプチドの代表は SP であるので、我々は SP の髄腔内投与の実験に広く用いられてきた神経行動学的指標を用いて研究を行ってきた。SP の髄腔内投与により疼痛関連行動と熱痛覚過敏が誘発されることはよく知られている。そこで、新規タキキニンペプチドである HK-1 を髄腔内投与したところ、SP と同様に疼痛関連行動は誘発されたが、熱痛覚過敏は誘発されなかった (2006 年)。このことは、HK-1 はタキキニンペプチドに属しながら、SP とは薬理学的特徴が異なることを示している。

次に、エンドキニン C と D に共通の 12 個のアミノ酸からなるペプチドを EKC/D と命名し、このペプチドを前投与したところ、SP の髄腔内投与による疼痛関連行動や熱痛覚過敏の誘発が抑制されることを見つけた (2007 年)。この論文には更に新たな示唆が含まれている。SP の C 末端は Met であり、EKC/D の C 末端は Leu である。この C 末端のアミノ酸の違いが機能的差異を生み出すか否かを確かめるために、EKC/D の C 末端を Met に置換した [12Met]-EKC/D を合成し、髄腔内に投与したところ疼痛関連行動と熱痛覚過敏を誘発し、EKC/D の抑制効果は消滅した。このことは、SP と EKC/D の機能的差異は C 末端に Met があるか、Leu があるかに起因していることを示している。そこで、この仮説をさらに補強するために、SP の C 末端の Met を Leu に置換した [11Leu]-SP を合成し、髄腔内に投与したところ SP による疼痛関連行動と熱痛覚過敏の誘発を抑制した (2009 年)。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果を踏まえ、次の 2 点を明らかにするために、本研究を進める。

(1) EKC/D の抑制効果の機序をアミノ酸レベルで解明すると同時に、このペプチドをトランスレーショナルリサーチへと展開するために、EKC/D の N 末端から 1 個ずつアミノ酸を少なくしたペプチドを合成し、それぞれのペプチドの抑制効果を評価することで、EKC/D の抑制効果に寄与しているアミノ酸を明らかにする。一般に、L 型アミノ酸からなるペプチドの一部のアミノ酸を D 型アミノ酸に置換すると生体内において分解が遅れ、そのペプチドの効果時間が延長すると言われている。そこで、EKC/D を構成するアミノ酸の一部を D 型アミノ酸に置換したペプチドを合成し、最も効果時間の長い EKC/D 由来のペプチドを同定する。

(2) SP の髄腔内投与では熱痛覚過敏を誘発するが、HK-1 にその効果が無い。その原因は HK-1 を構成するアミノ酸にあると仮定し、SP と HK-1 の C 末端領域からなる断片ペプチド、SP と HK-1 の間でのキメラペプチド、1 個または 2 個のアミノ酸だけを置換したペプチド等を合成し、これらのペプチドの髄腔内投与により熱痛覚過敏が誘発されるか否かを検討することにより、HK-1 において熱痛覚過敏の誘発に関与するアミノ酸を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 実験材料には SD 系雄ラットを用い、髄腔内にペプチドを注入するために、予め 70℃ の熱湯中で直径を細くしたカテーテル (PE10) を後頭骨と第一頸椎の間から尾側方向に入れ、留置した。一週間の回復期を経た時点で、運動障害等の神経障害を伴わないものだけを実験に用いた。

(2) EKC/D を構成するアミノ酸の一部を D 型アミノ酸に置換したペプチドの痛みの系における薬理学的効果を明らかにするため、SP、SP 受容体のアンタゴニストである Spantide I、エンドキニン C と D の共通アミノ酸配列からなる EKC/D、EKC/D の 8 位または 10 位の位置のアミノ酸を D 型アミノ酸、D-Trp に置換した [D-Trp8]-EKC/D、[D-Trp10]-EKC/D、[D-Trp8, 10]-EKC/D、さらに EKC/D の N 末端から 1 個ずつアミノ酸を除いた EKC/D 由来のペプチドを合成または購入し、留置しているカテーテルを通じてラット髄腔内に投与した。最初に、EKC/D または [D-Trp]-EKC/D の前投与の効果を SP または HK-1 の髄腔内投与による疼痛関連行動の誘発に対する効果として評価した。EKC/D の前投与が SP 誘発の疼痛関連行動を抑制することはすでに報告しているが、Spantide I および [D-Trp]-EKC/D の前投与の効果時間の詳細については知られていないので、3 種の [D-Trp]-EKC/D および Spantide I の前投与の効果時間に注目して実験を実施した。さらに、3 種の [D-Trp]-EKC/D のうちで最も効果時間の長かった [D-Trp10]-EKC/D の N 末端から 1 個ずつアミノ酸を短くした数種のペプチドを合成し、それぞれのペプチドおよび Spanide I の前投与の効果を SP の髄腔内投与による熱痛覚過敏と足引掻き行動の誘発、ホルマリンの足底への注射によるフリッキング行動と脊髄における c-Fos タンパク質の発現および足底へのカラギナン注射による炎症誘発に対する効果を指標にして評価することで、[D-Trp]-EKC/D の薬理学的特性を明らかにした。

(3) 次に、SP とは異なり HK-1 の髄腔内投与が熱痛覚過敏を誘発しない理由を明らかにするため、SP、HK-1、SP と HK-1 由来のフラグメントペプチド、SP と HK-1 との間での

キメラペプチドを合成し、それぞれのペプチドを留置したカテーテルを介して髄腔内に投与した後、足底に対する侵害性熱刺激により足引っ込み反射が生じるまでの潜時を測定することで、それぞれのペプチドが熱痛覚過敏を誘発するか否かを明らかにした。最初に、SP または NK-1 を髄腔内に投与し、侵害性熱刺激により足引っ込み反射が生じるまでの潜時を測定し、これまでの報告の確認実験を行った。次に、SP と HK-1 を構成するアミノ酸配列の共通性に基づき、N 末端領域を 1-5 番目までのアミノ酸とし、C 末端領域を 6-11 番目までのアミノ酸として、SP および HK-1 の N 末端領域フラグメントペプチドと C 末端領域フラグメントペプチドを合成し、これらのペプチドの髄腔内投与後の侵害性熱刺激に対する足引っ込み反射の潜時を測定した。さらに、SP と HK-1 の間でキメラペプチドを合成した。例えば、C 末端領域は SP 由来、N 末端領域は HK-1 由来のキメラペプチドである。他はその逆で N 末端領域は HK-1 由来、C 末端領域は SP 由来のキメラペプチドである。これらのキメラペプチドを髄腔内に投与し、熱痛覚過敏が誘発されない領域が C 末端領域に存在するのか N 末端領域に存在するかを明らかにした。C 末端領域が関与している場合には、SP を HK-1 の間で 1 個のアミノ酸だけが異なるので、そのアミノ酸 1 個を他のペプチド由来のアミノ酸に置換することで、このアミノ酸が熱痛覚過敏の誘発に関わっている事を明らかにすることができる。一方、N 末端領域が熱痛覚過敏の誘発に関わっている場合には、SP と HK-1 の N 末端領域の間でのキメラペプチドおよび数個のアミノ酸だけを他のペプチド由来のアミノ酸と置換したキメラペプチドを合成し、それらのペプチドの熱痛覚過敏の誘発に関する解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 前半の研究で得られた結果は「EKC/D 由来ペプチドの痛みと炎症における薬理的特性」として論文にまとめた。

① 実験 1 は、SP の髄腔内投与による引き掻き行動誘発に対する EKC/D、[D-Trp8]-EKC/D、[D-Trp10]-EKC/D、[D-Trp8, 10]-EKC/D および代表的な SP 受容体のアンタゴニストである Spantide I の前投与の効果について検討したものである。EKC/D の前投与の効果に関しては、投与 30 分後では抑制効果が認められたが、1 時間後にはその効果は消失していた。同様に、[D-Trp8, 10]-EKC/D の前投与でも、30 分後には抑制効果が認められたが、1 時間後にはその効果が消失していた。一方、[D-Trp8]-EKC/D と [D-Trp10]-EKC/D の前投与に関しては、投与 18 時間後まで抑制効果が認められ、投与 24 時間後にはその効果は消

失していた。抑制効果の程度も EKC/D や [D-Trp8, 10]-EKC/D と比べて、著しく顕著であった。これまで SP 由来の SP 受容体アンタゴニストとして報告されてきた Spantide I の抑制効果は、投与 5 分後までしか認められなかった。この Spantide I には D 型アミノ酸が 3 個存在している。これまで暗黙の認識として、普通の生物は D 型アミノ酸を利用しないので、ペプチドの中に D 型アミノ酸が存在すると分解は遅くなり、D 型アミノ酸の数が多ければそのペプチドは分解されにくいと考えられてきた。本研究で得られた結果は、D 型アミノ酸が存在すると分解が遅れるというこれまでの概念は支持したが、D 型アミノ酸の数に関してはこれまでの認識を覆すもので、D 型アミノ酸が多くなれば、その効果は短くなり、1 個の D 型アミノ酸の場合が最も効果時間が長くなることを示した。本研究で示したように D 型アミノ酸 1 個の場合の効果時間が最も顕著であるということは、D 型アミノ酸に置換したペプチドを作製し、その効果について検討している科学者に対して、一つの指針を提示したこととなる。

② 同様な結果が SP 誘発の熱痛覚過敏に対しても観察できた。既に知られているように SP を髄腔内に投与すると、足底への侵害性熱刺激に対する足引っ込み反射に要する潜時が短くなった。そこで、[D-Trp8, 10]-EKC/D、[D-Trp8]-EKC/D および [D-Trp10]-EKC/D の投与 4 時間後に SP を投与し、足引っ込み反射が生じるまでの潜時を測定したところ、上記 3 つのペプチドの前投与で有意に潜時は回復した。さらに、8 時間後では [D-Trp8]-EKC/D と [D-Trp10]-EKC/D の抑制効果は持続していたが、[D-Trp8, 10]-EKC/D の前投与の効果は消滅していた。この結果は、D 型アミノ酸が 1 個の EKC/D 由来のペプチドの方が熱痛覚過敏の誘発に対する効果時間が長いことを示し、引き掻き行動で得られた①の結果を支持した。

③ 次に、[D-Trp10]-EKC/D の N 末端から 1 個ずつアミノ酸を除いた [D-Trp10]-EKC/D 由来のペプチドを合成し、その効果について検討した。N 末端から 3 個アミノ酸を除いた [D-Trp10]-EKC/D(4-12) の効果はもとの [D-Trp10]-EKC/D とほぼ同じであった。4 個、5 個と N 末端からアミノ酸を除いても有意な抑制効果を示したが、その抑制効果は除くアミノ酸の数に比例して弱まり、8 個除くとその抑制効果は殆ど認められなくなった。このことは、[D-Trp10]-EKC/D 由来のペプチドが抑制効果をもたらすために必要な特定のアミノ酸は存在せず、抑制効果の程度は N 末端からのアミノ酸の数に依存することを示している。

④ この仮説が痛みの系に対しても適用できるか否かを検証するために、ホルマリント

ストを実施した。ホルマリンテストとは、ホルマリン溶液を足底に注射した後に見られる足を払いのける行動（フリンチング）を回数で評価し、数が多いと痛みの程度が強いとされている。N末端から3個アミノ酸を除いた [D-Trp10]-EKC/D(4-12)、[D-Trp10]-EKC/D(6-12)、[D-Trp10]-EKC/D(8-12) と Spantide I の前処理の効果について比較したところ、[D-Trp10]-EKC/D(4-12)の抑制効果が最大で、その抑制効果はN末端からのアミノ酸が減少するにつれて弱まり、[D-Trp10]-EKC/D(8-12)と Spantide I の効果はほぼ同じであった。

⑤ さらに、痛みの刺激により脊髄後角で発現することが知られている c-Fos タンパク質発現に対するこれらのペプチドの前処理の効果について検討したところ、これらの EKC/D 由来のペプチドはホルマリン誘発の脊髄後角の I/II 層における c-Fos 発現を有意に抑制した。

⑥ また、カラギナン誘発の炎症に対するこれらのペプチドの前処理の効果についても検討した。炎症を足体積の増加と足引っ込め反射の潜時で評価したところ、これまでの結果と同様に、N末端からのアミノ酸の数が多いほど炎症に対する抑制効果は顕著であり、これらの [D-Trp]-EKC/D は炎症に伴う足体積の増加と熱痛覚過敏も有意に抑制した。一方、Spantide I は炎症に対する抑制効果を示さなかった。

これらの結果をまとめると、EKC/D の鎮痛・抗炎症効果は既知の SP 受容体アンタゴニストである Spantide I よりもかなり優れ、従来考えられていたよりも少ないアミノ酸からなるペプチドでも同様の効果を示した。このことはこのペプチドをトランスレーションリサーチへと展開するうえで非常に有利な点である。

(2) 後半の実験で得られた結果は「ヘモキニン-1 の N 末端領域による熱痛覚過敏誘発の調節」として論文にまとめた。

① 従来の報告と同じように、SP を髄腔内投与すると侵害性熱刺激による足引っ込め反射の潜時が減少した。このことは SP の髄腔内投与が熱痛覚過敏を誘発することを示している。一方、HK-1 の髄腔内投与では熱痛覚過敏は誘発されなかった。

② N末端領域は SP、C末端領域は HK-1 からなるキメラペプチドである SP(1-5)/HK-1 を合成し、髄腔内に投与したところ熱痛覚過敏を誘発したが、逆にN末端領域が HK-1、C末端領域が SP からなる HK-1(1-5)/SP は熱痛覚過敏を誘発しなかった。また、C末端領域からなるフラグメントペプチドである SP(6-11)と HK-1(6-11)は熱痛覚過敏を誘発した。これらの結果を一緒にすると、HK-1 が

熱痛覚過敏を誘発できないのは、このペプチドの C 末端領域ではなく、N 末端領域にその原因があることが示唆された。

③ そこで、N末端領域の一部が SP 由来になるように合成したキメラペプチドである SP(1-2)/HK-1、SP(1-3)/HK-1 および SP(1-4)/HK-1 を髄腔内投与したところ全て熱痛覚過敏を誘発した。②の実験から、SP(1-5)/HK-1 は熱痛覚過敏を誘発することが示されているので、HK-1 由来の 3/4/5、4/5 及び 5 のアミノ酸構成では熱痛覚過敏の誘発を抑制できないことを示し、HK-1 の 1 番目と 2 番目のアミノ酸が熱痛覚過敏の誘発を調節していることを示唆した。

④ そこで、N末端の 1 番目から 2 番目だけを HK-1 由来とした HK-1(1-2)/SP、1 番目から 3 番目までを HK-1 由来とした HK-1(1-3)/SP、1 番から 4 番目までを HK-1 由来とした HK-1(1-4)/SP を髄腔内投与したところ全て熱痛覚過敏を誘発した。②の実験から、HK-1(1-5)/SP は熱痛覚過敏を誘発しないことが示されているので、HK-1 由来の 1/2、1/2/3 及び 1/2/3/4 のアミノ酸構成では熱痛覚過敏の誘発を抑制できないことを示し、5 番目のアミノ酸が熱痛覚過敏の誘発を調節していることを示唆した。

⑤ そこで、1 番目のアミノ酸と 2 番目のアミノ酸および 5 番目のアミノ酸を HK-1 由来とした HK-1(1-2,5)/SP を髄腔内投与したところ熱痛覚過敏を誘発した。そこで、1 番目から 3 番目のアミノ酸と 5 番目のアミノ酸が HK-1 由来の HK-1(1-3,5)/SP を髄腔内投与したところ熱痛覚過敏を誘発した。最後に、1 番目と 2 番目、4 番目と 5 番目のアミノ酸を HK-1 由来とした HK-1(1-2,4-5)/SP を髄腔内投与したところ、熱痛覚過敏は誘発しなかった。SP と HK-1 の 1 番目のアミノ酸は共通で Arg である。従って、HK-1 が熱痛覚過敏を誘発しない要因となるアミノ酸は 2 番目、4 番目と 5 番目のアミノ酸が揃ったときに初めて熱痛覚過敏が誘発されなくなると考えることができる。

HK-1 の生体における機能は大部分が不明のままである。本研究により、HK-1 を構成する個々のアミノ酸レベルでの研究が進展したことは、HK-1 を対象として研究を進めている国内外の研究者に与える影響は計り知れないものがあると考えている。

## 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 6 件)

(1) Nishimori T, Naono-Nakayama R, Ikeda T.  
New tachykinin peptides and nociception.  
Jpn dent sci rev., 49:27-34, 2012.

reviewed  
http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2012.11.002

(2)Naono-Nakayama R, Sunakawa N, Ikeda T,  
Matsushima O, Nishimori T.  
Pharmacological characteristics of  
endokinin C/D-derived peptides in  
nociceptive and inflammatory processing  
in rats.  
Peptides, 32(12):2407-2417, 2011.  
reviewed  
DOI:10.1016/j.peptides.2011.10.009.

(3)Naono-Nakayama R, Sunakawa N, Ikeda T,  
Nishimori T.  
Knockdown of the tachykinin neurokinin 1  
receptor by intrathecal administration of  
small interfering RNA in rats.  
Eur J Pharmacol., 670(2-3):448-457, 2011.  
reviewed  
DOI:10.1016/j.ejphar.2011.09.035.

(4)Naono-Nakayama R, Sunakawa N, Ikeda T,  
Matsushima O, Nishimori T.  
Subcutaneous injection of endokinin C/D  
attenuates carrageenan-induced  
inflammation.  
Peptides, 31(9):1767-1771, 2010.  
reviewed  
DOI:10.1016/j.peptides.2010.05.019.

(5)Sunakawa N, Naono R, Ikeda T,  
Matsushima O, Sakoda S, Nishimori T.  
The amino-terminal region of hemokinin-1  
regulates the induction of thermal  
hyperalgesia in rats.  
Neuropeptides, 44(3):273-278, 2010.  
reviewed  
DOI:10.1016/j.npep.2010.01.003.

(6)Nakayama T, Naono R, Ikeda T, Nishimori T.  
NMDA and AMPA receptors contribute  
to the maintenance of substance P-induced  
thermal hyperalgesia.  
Neurosci Res., 67(1):18-24, 2010.  
reviewed  
DOI:10.1016/j.neures.2010.01.006.

[学会発表] (計2件)

(1)Naono-Nakayama R, Ikeda T, Takamiya K,  
Sameshima H, Nishimori T.  
Effect of a fragment peptide derived from  
hemokinin-1 on histamine- or  
serotonin-induced scratching.  
Society for Neuroscience, 42th Annual

Meeting, 2012年10月13日～17日, New  
Orleans, USA.

(2)中山-直野留美, 池田哲也, 西森利数.  
疼痛およびかゆみに対するヘモキニン-1由来  
フラグメントペプチドの効果.  
第34回日本神経科学学会, 2011年9月17日,  
横浜.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

(1)名称: エンドキニンC/D由来のペプチド  
発明者: 西森利数  
権利者: 同上  
種類: 特許権  
番号: PCT/JP2010/059203  
出願年月日: 2010年12月9日  
国内外の別: 外国

(2)名称: ヘモキニン-1受容体及びヘモキ  
ニン-1由来ペプチド  
発明者: 西森利数  
権利者: 同上  
種類: 特許権  
番号: PCT/JP2011/069178  
出願年月日: 2012年3月1日  
国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1)研究代表者

西森 利数 ( NISHIMORI TOSHIKAZU )  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号: 20112211

(2)研究分担者

池田 哲也 ( IKEDA TETSUYA )  
宮崎大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20264369

(3)研究協力者

中山 留美 ( NAKAYAMA RUMI )  
宮崎大学・医学部・研究員  
研究者番号: 00609034