

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659690

研究課題名(和文)ニューロペプチドSの鎮痛作用に関する研究

研究課題名(英文)Study on analgesic effects of neuropeptide S

研究代表者

廣田 和美(Hirota, Kazuyoshi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20238413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニューロペプチドS(NPS)ニューロンは、青斑核(LC)に隣接した部位に起始し、覚醒を増強することから、LCに作用してノルアドレナリン(NA)下行性抑制系を活性化して鎮痛作用も発現する可能性があると考えた。研究の結果、大脳皮質スライス標本を用いたin vitroの研究では、NPSをスライスに暴露させてもNA放出は認めなかった。しかし、In vivoの研究では、NPSはホットプレートテストで鎮痛作用を示した。さらにDSP4によりLC-NA神経を破壊すると、破壊度に比例してNPSの鎮痛作用は減弱したことから、NPSの鎮痛作用はLC-NA下行性抑制系を一部介していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：As neuropeptide S (NPS) containing neurons are existed in the locus coeruleus (LC) area that plays crucial role in the descending anti-nociceptive system, we hypothesized that NPS may interact LC-noradrenergic (NA) neuron to produce analgesia. In in vitro study, NPS did not evoke NA release from rat cerebrocortical slices. However, in in vivo study, icv NPS significantly prolonged percentage of maximum possible effect (%MPE) of reaction time of hot plate latency. The depletion of LC-NA neuron by DSP4 inhibited the NPS effect on the hot plate latency. In addition, there was a significant correlation between NA content of the cerebral cortex and %MPE. Therefore, NPS produced its analgesic effect, in part, by activation of the LC-NA descending anti-nociceptive system.

研究分野：麻酔科学

キーワード：ニューロペプチドS 鎮痛 ラット 神経生理活性物質 ノルアドレナリン 青斑核

### 1. 研究開始当初の背景

2004年にReinscheidら(1)によって発見されたニューロペプチドS(NPS)ニューロンは、青斑核(LC)に隣接した部位に起始するため、LCへの作用があると考えられる。LCの活動と覚醒、不安、疼痛との関連は既に検証されている。NPSが青斑核に直接作用するかは証明されていないものの、NPSが覚醒を増強し抗不安作用を有することは報告されている(2)。覚醒に関しては、我々は最近NPSを脳室内投与する事でケタミンおよびチオペンタールの麻酔時間を短縮させ、逆にNPS拮抗薬を投与するとこれら麻酔時間が延長することを報告した(3)。さらに他施設の最近の研究などで、NPSシステムの異常がパニック障害に関連する可能性が示唆されている(4)。しかし鎮痛作用に関しては、Wangらのグループ(5, 6)が報告したのみである。ただし、LCに作用するオレキシン(OX)も覚醒を促し鎮痛作用を有するため、NPSも鎮痛作用を有する可能性がある。しかも最近、NPSはOX神経を活性化する事が報告された(7)。しかし、我々の海外の共同研究グループであるイタリアのCaloらグループは、マウスを実験動物として大脳皮質の前頭連合野においてNPSは選択的にノルアドレナリン(NA)の放出を抑制したと報告した(8)。NA神経は鎮痛に係る神経であるが、NPSがこれらを抑制するという事は、NPSを投与する事で疼痛過敏が生じる可能性がある。特に大脳皮質へのNA神経の投射は全てLCから起こっているため、下行性抑制系も抑制する可能性がある。

### 2. 研究の目的

近年発見されたNPSのニューロンは、LCに隣接した部位に起始する。NPSは覚醒を増強し不安を除くという変わった特徴を持ち、NPSシステムの異常とパニック障害の関連も最近言われている。LCは、覚醒、不安の他、疼痛に対しても関与する。青斑核に作用するOXも覚醒を促し鎮痛作用を有するため、NPSも鎮痛作用を有する可能性があり、実際1研究グループからのみであるが、鎮痛作用を示唆する報告がある。患者は痛みが強くなると、とても冷静ではいられなくなるため、抗不安かつ鎮痛作用を有するNPSは、疼痛患者、特に急性疼痛患者やがん性疼痛患者に有効と考えられる。よって、今回の研究でNPSの鎮痛作用をOX-NA神経を含めた下行性抑制系に働くLC-NA神経から検討した。

### 3. 研究の方法

#### In vitro 研究

体重250-350gのSprague Dawley (SD)ラットを実験動物とした。

#### 1. ラット大脳皮質標本でのNPSのNA放出

#### に及ぼす効果

SDラットを頸椎脱臼による安楽死後、断頭し脳組織を摘出した。氷上で大脳皮質を分離し、tissue chopperにより1.0×0.35×0.35 mmの大きさの大脳皮質スライスを作成した。作成後スライス(5-7 mg protein)を1 mlのKrebs溶液で満たされた試験管内に入れた。各試験管内のKrebs溶液中のスライス標本と共に、NPS  $10^{-10}$ ~ $10^{-5}$  Mを加えてインキュベーションした。放出されたNA量を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いて測定した。この他に、各種覚醒系神経伝達物質も測定した。

#### 2. ラット大脳皮質標本でのNPSの高K<sup>+</sup>誘発性NA放出に及ぼす効果

大脳皮質スライス(5-7 mg protein)を1 mlのKrebs溶液で満たされた試験管内に入れた。各試験管内のKrebs溶液中のスライス標本と共に、K<sup>+</sup> 25mMとNPS  $10^{-12}$ ~ $10^{-8}$  Mを加えてインキュベーションした。放出されたNA量を、HPLC法を用いて測定した。

#### 3. ラット大脳皮質標本でのOXA誘発性NA放出に対するNPS抑制効果

各試験管内のKrebs溶液中のスライス標本と共に、NPS  $10^{-12}$ ~ $10^{-7}$  MおよびOXA  $10^{-7}$  Mを加えてインキュベーションした。放出されたNA量を、HPLC法を用いて測定した。有意な反応が認められた場合は、その反応がNPS受容体を介した反応であるかどうか見極めるために、NPS受容体拮抗薬である[D-Cys(tBu)<sup>5</sup>]NPSにより拮抗されるか確認することとした。

#### In vivo の研究

体重300-400gのSDラットを実験動物とした。

#### 1. NPSのTail flickおよびHot-plateテストに及ぼす影響

Tail flickテストでは、ラットの尾に投射熱刺激を加え、掉尾反射を指標として、逃避反射の潜時を測定した。投射熱は3-4秒で逃避が起こる程度に設定した。また、組織障害防ぐ意味で、cut-off潜時を10秒とした。Hot-plateテストでは、ラットを50℃の熱版上に置き、足をなめる、立ち上がる、飛び跳ねるなどの逃避行動が生じるまでの潜時を測定した。Tail flickテストおよびHot-plateテストの潜時を、NPS 0、1、3.3、10 nmol脳室内に投与後10分毎に経時的に潜時を測定した。鎮痛の評価は、percent maximum possible effect (%MPE = [処置後測定値-処置前測定値]/[cut-off値-処置前測定値]×100%)で行った。

#### 2. LC由来NA神経破壊ラットでのNPSのTail flick及びHot-plateテストに及ぼす影響

DSP4 50 mg/kg腹腔内投与によりLC-NA作動性神経の大部分を破壊した。投与10日後にNPS投与後のTail flick及びHot-plateテストの潜時を測定し、LC-NA神経破壊がNPSの効果

にどう影響するか検討した。また、潜時測定後に断頭して、大脳皮質内 NA 含有量を測定し、NPS の効果の変化と相関があるか検討した。

#### 4. 研究成果

##### In vitro 研究

##### 1. ラット大脳皮質標本での NPS の NA 放出に及ぼす効果

大脳皮質スライス標本と共に、NPS( $10^{-10} \sim 10^{-5}$  M)を加えてインキュベーションし、放出された NA 量を、測定したが、NPS による NA 放出は認めなかった。またその他の覚醒系の神経伝達物質であるグルタメート、ドーパミン、ヒスタミン、アセチルコリンの放出も測定したが、何れも NPS による放出促進は認めなかった。

##### 2. ラット大脳皮質標本での NPS の高 $K^+$ 誘発性 NA 放出に及ぼす効果

大脳皮質スライス標本と共に、 $K^+$  25 mM と NPS  $10^{-12} \sim 10^{-8}$  M を加えて、 $K^+$  刺激により放出された NA 量が、NPS により変化するかを見たが、全く変化しなかった。つまり、NPS は、高  $K^+$  誘発性 NA 放出を抑制しなかった。

##### 3. OXA 誘発性 NA 放出に対する NPS 抑制効果

各試験管内の Krebs 溶液中のスライス標本と共に、NPS  $10^{-12} \sim 10^{-7}$  M および OXA  $10^{-7}$  M を加えてインキュベーションし、放出された NA 量を、HPLC 法を用いて測定したが、NPS によって OXA 誘発性 NA 放出は抑制されなかった。

##### In vivo の研究

##### 1. NPS の Tail flick および Hot-plate テストに及ぼす影響

まず、Tail-flick テストでは NPS 10nmol icv 投与でも、潜時は変化しなかった(図 1)。このため、研究 2 では Tail-flick テストは行わないこととした。

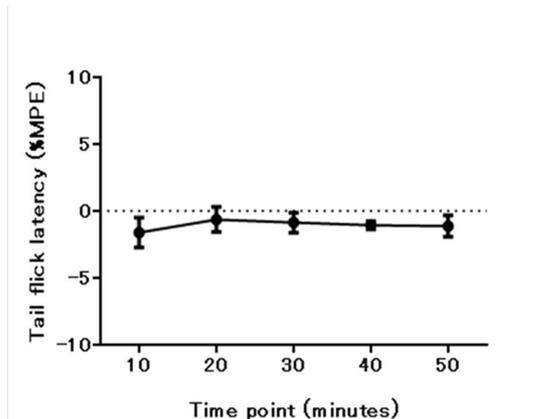


図 1.

次に Hot-plate テストでは、NPS 0 (投与前:

$-11.8 \pm 36.6$  vs 投与 30 分後:  $-4.6 \pm 47.2$ )、1 ( $2.1 \pm 15.4$  vs  $-13.5 \pm 52.8$ )、3.3 ( $11.6 \pm 20.9$  vs  $-5.2 \pm 26.7$ ) nmol 脳室内投与では有意な %MPE の変化は認められなかったが、10 nmol 投与で 30 分後に有意な変化を認めた ( $8.7 \pm 18.8$  vs  $40.3 \pm 43.1$ ) (図 2)。

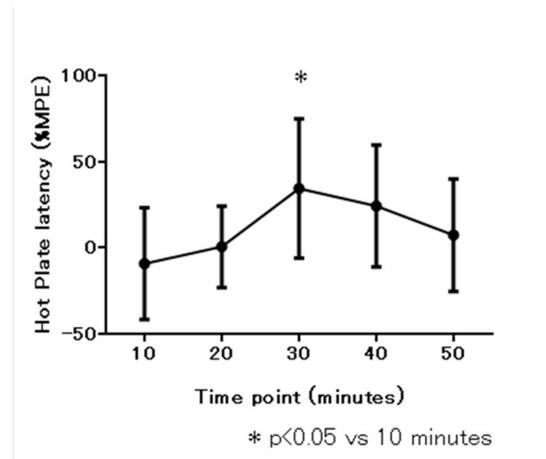


図 2

##### 2. LC 由来 NA 神経破壊ラットでの NPS の Tail flick 及び Hot-plate テストに及ぼす影響

DSP4 50 mg/kg 腹腔内投与により LC-NA 作動性神経は有意に破壊された。大脳皮質の NA 神経は LC 由来であるが、大脳皮質の NA 含有量は生食投与群では  $15.4 \pm 8.2$  (pg/mg wet tissue) であったのに対し、DSP4 投与群では  $6.0 \pm 5.3$  (pg/mg wet tissue) と平均で 60% 以上破壊された(図 3)。

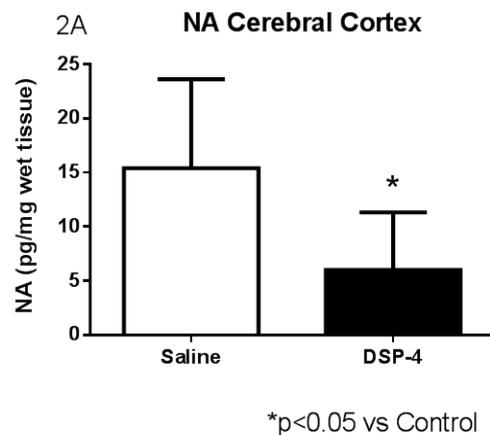


図 3

この LC-NA 神経破壊により Hot-plate テストでの NPS icv による潜時の延長は有意に抑制され、%MPE はコントロール群で  $40.3 \pm 43.1$  であったのに対し、DSP4 投与群では  $-11.7 \pm 12.7$  であった。さらに、大脳皮質の NA 含有量と %MPE-時間曲線下面積 (AUC) との間に有意な相関が認められた ( $p = 0.017$ ,  $r^2 = 0.346$ , 図 4)。

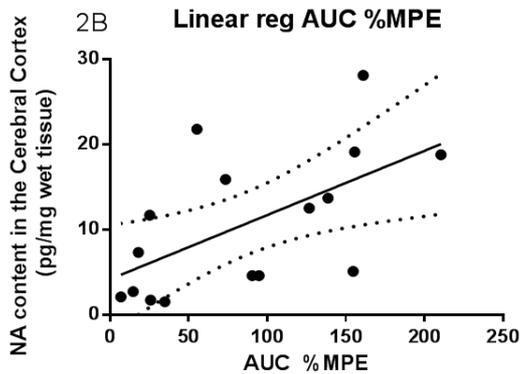


図 4

以上より、NPS は LC-NA 神経を介して鎮痛作用を発現していることが示唆された。

#### 引用文献

1. Xu YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, Brucher FA, Zeng J, Ly NK, Henriksen SJ, de Lecea L, Civelli O. Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* 2004; 43: 487-97.
2. Reinscheid RK, Xu YL. Neuropeptide S as a novel arousal promoting peptide transmitter. *FEBS J* 2005; 272: 5689-93.
3. Kushikata T, Yoshida H, Kudo M, Salvadori S, Calò G, Hirota K. The effects of neuropeptide S on general anesthesia in rats. *Anesth Analg* 2011; 112: 845-9.
4. Pape HC, Jüngling K, Seidenbecher T, Lesting J, Reinscheid RK. Neuropeptide S: a transmitter system in the brain regulating fear and anxiety. *Neuropharmacology* 2010; 58: 29-34.
5. Li W, Chang M, Peng YL, Gao YH, Zhang JN, Han RW, Wang R. Neuropeptide S produces antinociceptive effects at the supraspinal level in mice. *Regul Pept* 2009; 156: 90-5.
6. Peng YL, Zhang JN, Chang M, Li W, Han RW, Wang R. Effects of central neuropeptide S in the mouse formalin test. *Peptides* 2010; 31: 1878-83.
7. Kallupi M, Cannella N, Economidou D, Ubaldi M, Ruggeri B, Weiss F, Massi M, Marugan J, Heilig M, Bonnavion P, de Lecea L, Ciccocioppo R. Neuropeptide S facilitates cue-induced relapse to cocaine seeking through activation of the hypothalamic hypocretin system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 19567-72.
8. Raiteri L, Luccini E, Romei C, Salvadori S, Calò G. Neuropeptide S selectively inhibits the release of 5-HT and noradrenaline from mouse frontal cortex nerve endings. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 474-81.

#### 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 現在投稿中 1 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

現在のところなし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

廣田 和美 (HIROTA Kazuyoshi)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20238413

##### (2) 研究分担者

櫛方 哲也 (KUSHIKATA Tetsuya)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80250603

##### (3) 研究分担者

工藤 隆司 (KUDO Takashi) (途中辞退)  
弘前大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40613352