

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870451

研究課題名(和文) 痒みの伝達におけるヘモキニン-1の役割に関する研究

研究課題名(英文) Hemokinin-1 mediates pruriceptive processing in the rat spinal cord

研究代表者

船橋 英樹 (Funahashi, Hideki)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：10404435

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)：[Leu11]-HK-1はホルマリンによる疼痛は抑制しないが、セロトニン、ヒスタミンによる引っ掻き行動は抑制し、脊髄後角第I/II層でのc-Fos発現を有意に減少させた。[Leu11]-HK-1の一部を[D-Trp]に置き換えたペプチドでは、その効果は延長した。これらは痒みのメカニズムを解明する上で役割を果たす可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that the intrathecal administration of [Leu11]-HK-1 attenuated HK-1-induced scratching and the induction of scratching behavior by 5-HT or histamine, indicating that HK-1 is a neurotransmitter or neuromodulator in pruritic processing at the level of the spinal cord. And D-tryptophan (D-Trp) prolongs the duration of effective time of [Leu11]-HK-1. Therefore, it is possible that [Leu11]-HK-1 is a valuable tool for clarifying the underlying mechanism of pruritic processing, but not nociceptive processing at the spinal level.

研究分野：精神腫瘍学

キーワード：Hemokinin-1 itch scratching

## 1. 研究開始当初の背景

ヘモキニン-1(HK-1)はタキキニンペプチドの一つであり、本学医学部の神経生物分野において、ラットの髄腔内投与による引っ掻き行動の誘発様式が他のタキキニンペプチドと異なることから HK-1 には固有の受容体が存在し、他のタキキニンペプチドとは異なる機能を有すると仮定されてきている。そこで、試みの実験として HK-1 の C 末端に Leu に置換した [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 を髄腔内に投与したところ、痒み誘発物質であるセロトニンおよびヒスタミンの皮下投与による引っ掻き行動の誘発と c-Fos 発現を抑制することを明らかにした (Funahashi ら、北米神経科学学会 2012)。また、HK-1 を構成する N-末端フラグメントペプチドを髄腔内投与するとセロトニンおよびヒスタミン誘発の引っ掻き行動の誘発が抑制されることを明らかにした (Naono-Nakayama と共著、Neuroscience 2014)。このことは、HK-1 が痒みの伝達に関与していることを示唆している。

臨床的には、近年、本邦では『がん対策基本法』の制定により、がんそのものの治療だけではなく、がんに関わる周辺症状の緩和、すなわち緩和ケア領域への注目が集まっている。研究代表者は緩和ケア領域、特に精神症状の緩和分野において臨床報告を積み重ねてきていて (船橋 2009)、痛みや痒みが精神症状の緩和分野で重要な位置を占めていることを痛感してきている。痒みの研究領域は未知の部分が多く、2007 年から本格的に研究が始まったばかりである。しかし、例えば肝臓疾患や抗がん剤による全身搔痒感の苦痛・精神的ストレスは並大抵ではない。従って、痒みの成立機序を解明することは基礎的研究としてだけでなく臨床的にも重要かつ急務の課題である。

## 2. 研究の目的

本研究は痒みの伝達機構を HK-1 を中心に末梢および脊髄レベルにおいて明らかにするものである。一般に、痒みの研究は痒み誘発物質の皮下投与による引っ掻き行動 (scratching behavior) の誘発を指標に進められ、引っ掻き回数の変化から痒みの成立に関与する物質や受容体が推測されてきた。また、痒み物質を皮下投与すると痛み刺激と同様に脊髄後角の第 I/II 層で c-Fos タンパク質の発現が上昇する。そこで、ペプチドである HK-1 のペプチド構成を変化させた合成ペプチドの効果を評価し、痒みの伝達における HK-1 の役割を明らかにすることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

① 実験には SD 系雄性ラットを用い、ソムノペンチル麻酔下で、髄腔内にカテーテルを留置する。

② 痒み誘発物質の単回投与に伴う引っ掻き行動の評価

ソムノペンチル麻酔下でラットのうなじの皮下に、痒み誘発物質であるセロトニン 0.1% 50  $\mu$ l、ヒスタミン 0.5% 50  $\mu$ l をそれぞれ注射する。投与後経時的に、引っ掻き回数を計測する。

③ 痒み誘発物質の単回投与に伴う c-Fos 発現の評価

ソムノペンチル麻酔下でラットの右後肢の皮下に、痒み誘発物質であるセロトニン 0.1% 50  $\mu$ l、ヒスタミン 0.5% 50  $\mu$ l をそれぞれ投与する。投与 2 時間後に、ソムノペンチル深麻酔下で、パラホルムアルデヒドにより灌流固定する。腰髄レベルの脊髄を取り出し、後固定後にマイクロームにより凍結切片を作成し、浮遊法で c-Fos に対する免疫染色化学(ABC 法)を施行する。

標本作製後、ラットの脊髄後角における c-Fos 陽性細胞の分布を定量的に解析し、c-Fos 発現の部位特異性を明らかにする。

発現した c-Fos 陽性細胞の観察とその定量化は顕微鏡用 CCD カメラ及びパソコンにより行う。

④ 痒み刺激に対する [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内投与の効果について c-Fos 発現による評価

HK-1 の痒みの伝達に対する関与を検討するために、[D-Trp<sup>9</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 をカテーテルから髄腔内へ投与する。5 分後に、上記 3)と同様の手法でラットの右後肢の皮下にセロトニン 0.1%、ヒスタミン 0.5%、ホルマリン 2% を注射し、2 時間後に灌流固定する。脊髓の凍結切片作製後、c-Fos に対する免疫組織化学染色を施し、c-Fos の発現を経時的に解析し、痒み刺激による c-Fos 発現に対する [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 前投与の効果を評価する。

⑤ 痒み刺激による引っ掻き行動誘発に対する [D-Trp<sup>9</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内投与の効果

生理食塩水、[D-Trp<sup>9</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 をカテーテルから髄腔内へ投与する。5 分後に、イソフルランの気化麻酔で軽く鎮静をかけたラットのうなじにクロロキンまたはヒスタミンを皮下注射し、この痒み誘発物質により誘発される引っ掻き行動の回数を計測することで、痒み物質誘発の引っ掻き行動誘発に対する [D-Trp<sup>9</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の前投与の効果について評価する。

#### 4. 研究成果

1) [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内前投与によるホルマリンテストへの影響

[Leu<sup>11</sup>]-SP の髄腔内前投与ではホルマリンの後肢皮下注射によるプリンチング行動は有意に低下したが、[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内前投与ではプリンチング行動は有意な変化を認めなかった(図 1-A)。ホルマリンテストではプリンチング行動は 2 相性を示すが、Phase I、II ともに [Leu<sup>11</sup>]-SP では有意

に低下を認めたが、[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 では有意な変化を認めなかった(図 1-B)。

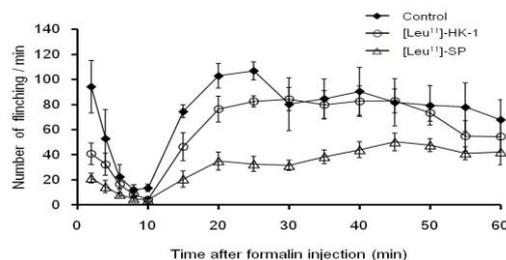


図 1-A

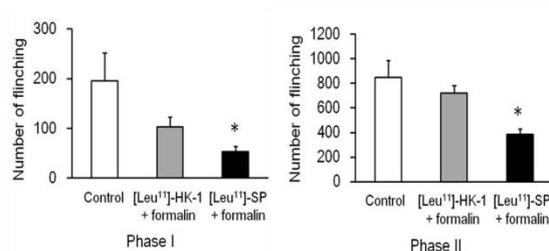


図 1-B

2) [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内前投与による搔痒誘発物質皮下投与への影響

[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内前投与後のうなじへの搔痒誘発物質の投与では、セロトニン群、ヒスタミン群いずれにおいても引っ掻き行動を有意に減少させた。[Leu<sup>11</sup>]-SP の髄腔内前投与でも、セロトニン群、ヒスタミン群いずれも引っ掻き行動を有意に減少させた(図 2)。

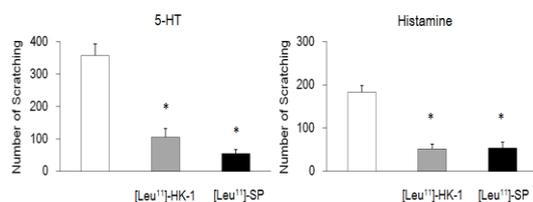


図 2

3) [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内前投与による c-Fos の発現への影響

[Leu<sup>11</sup>]-SP の髄腔内前投与ではホルマリン、セロトニン、ヒスタミンの後肢皮下注射による脊髓後角第 I/II 相の c-Fos 発現はコントロール群に比べて有意に低下したが、[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内前投与ではセロト

ニン群、ヒスタミン群のみ c-Fos 発現が低下した(図 3)。

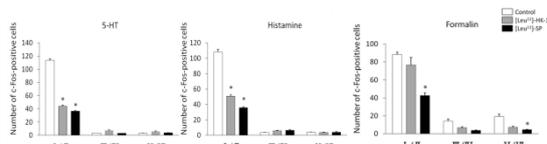


図 3

1)、2)、3)により [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 はホルマリンによる疼痛は抑制しないが、セロトニン、ヒスタミンによる引っ掻き行動は抑制する働きがあり、痒みのメカニズムを解明する上で役割を果たす可能性があることが示唆された。

4) [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 関連ペプチドの髄腔内前投与による HK-1 髄腔内投与による引っ掻き行動への影響

[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内前投与直後には HK-1 髄腔内投与による引っ掻き行動は有意に減少したが、30 分以降には優位な変化を認めなかった。[D-Trp<sup>7,9</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 では 4 時間後までは有意に引っ掻き行動を減少させた。[D-Trp<sup>7</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1、[D-Trp<sup>9</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の前投与では 24 時間後まで引っ掻き行動は有意に減少した(図 4)。

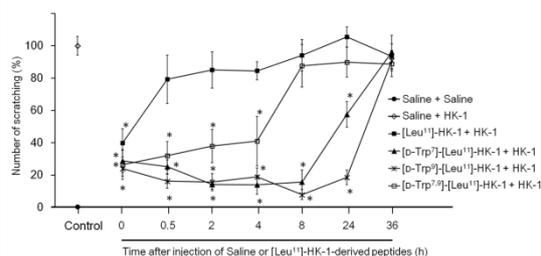


図 4

5) [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 関連ペプチドの髄腔内前投与による搔痒誘発物質の皮下注射による引っ掻き行動への影響

[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 の髄腔内前投与直後にはクロロキン、ヒスタミンのうなじへの皮下投与による引っ掻き行動は有意に減少したが、30 分以降には優位な変化を認めな

った。[D-Trp<sup>7,9</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1、[D-Trp<sup>9</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 ではいずれも 24 時間後まで引っ掻き行動は有意に減少した(図 5)。

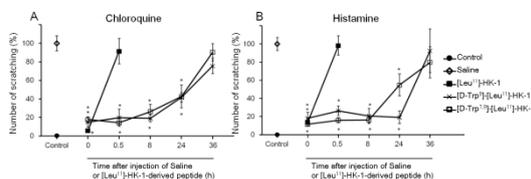


図 5

4)、5)より [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 関連ペプチドとして一部を [D-Trp] に置き換えたペプチドは [Leu<sup>11</sup>]-HK-1 に比べて効果が延長することが示唆された。今後、[D-Trp<sup>9</sup>]-[Leu<sup>11</sup>]-HK-1 などの投与経路などを検討し、抗搔痒効果について研究を続ける予定である。

## 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 3 件)

1. Funahashi H., Naono-Nakayama R., Koganemaru G., Miyahara Y., Nishimori T., Ishida Y.\*: Hemokinin-1-derived peptides have antipruritic effects in rats. Ther. Targets Neurol. Dis., 2: e704 (2015)
2. Naono-Nakayama R.\*, Ikeda T., Matsushima O., Sameshima O., Takamiya K., Funahashi H., Nishimori T.: An amino-terminal fragment of hemokinin-1 has an inhibitory effect on pruritic processing in rats. Neuroscience, 259: 172-183 (2014) [査読有]
3. Funahashi H., Naono-Nakayama R., Ebihara K., Koganemaru G., Kuramashi A., Ikeda T., Nishimori T., Ishida Y.\*: Hemokinin-1 mediates pruriceptive processing in the rat spinal cord.

Neuroscience, 277: 206-216 (2014) [査読有]

[査読有]

[学会発表] (計 3 件)

1. Funahashi H., Naono-Nakayama R., Miyahara Y., Ishida Y., Nishimori T.: [Leu11]-HK-1-derived peptides with D-Trp have longer antipruriceptive effects in rats. 45<sup>th</sup> Annual Meeting Society for Neuroscience, Chicago, USA. 2015-10-18

2. Funahashi H., Naono-Nakayama R., Miyahara Y., Ishida Y., Nishimori T.: [Leu11]-HK-1-derived peptides with D-Trp prolong antipruriceptive effects in rats. 8<sup>th</sup> World Congress on Itch, Nara, Japan. 2015-9-27

3. Naono-Nakayama R., Funahashi H., Nishimori T., Takamiya K.: Orphan receptor GPR83 mediates pruriceptive processing in the spinal cord. 8<sup>th</sup> World Congress on Itch, Nara, Japan. 2015-9-27

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船橋 英樹 ( Funahashi Hideki )

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号 : 10404435

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :