

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目： 科学研究費（C）
 研究期間： 2007 年度～2008 年度
 課題番号： 19603009
 研究課題名（和文）： 新規タキキニンペプチドの疼痛系への効果に関する研究
 研究課題名（英文）： Studies on the contribution of novel tachykinin peptides to the pain system.
 研究代表者： 西森 利数
 宮崎大学・医学部・教授
 研究者番号： 20112211

研究成果の概要：

痛みの伝達にはサブスタンス P (SP) 等のペプチドが関与していることは広く知られている。最近、SP 群（タキキニンファミリー）に属する新規のペプチドとしてエンドキニンが報告された。そこで、4 種類からなるエンドキニンの機能を検討したところ、2 種類は SP と同じように興奮性を示し、残りの 2 種類は SP に対して抑制性を示すことが判明した。さらに、最後に位置するアミノ酸がこの作用に重要であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：疼痛学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学， 生理活性， 引っ掻き行動， 熱痛覚過敏， 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

タキキニンペプチドとはサブスタンス P (SP) を代表とするペプチドの総称である。SP は 11 個のアミノ酸からなるタキキニンペプチドで、そのアミノ酸配列は Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ であることが 1971 年に報告された。このタキキニンペプチドの構造的特徴は、C 末端領域に Phe-X-Gly-Leu-Met のアミノ酸配列を有し、C 末端がアミド化され NH₂ となっていることである。哺乳類におけるタキキニンペプチドとしては、1983 年に新たにニューロキニン A (NKA) 及びニューロキニン B (NKB) が報告され、合計 3 種類のタキキニンペプチドが知られるようになった。NKA と NKB は 10 個のアミノ酸からなり、両者の C 末端領域の X の位置には Phe の代わりに Val が存在するこ

とが特徴である。近年、これら 3 つのペプチドを産生する遺伝子が同定され、SP と NKA は TAC1 (PPTA) 遺伝子にコードされ、NKB は TAC3 (PPTB) 遺伝子にコードされていることが明らかとなった。また、これら 3 つのペプチドは 3 種類の膜 7 回貫通代謝型受容体に結合し、SP はニューロキニン 1 受容体 (NK1R)、NKA はニューロキニン 2 受容体 (NK2R)、NKB はニューロキニン 3 受容体 (NK3R) に対して高い親和性を示す。従って、哺乳動物においては、3 種類のタキキニンペプチドが存在し、それぞれのペプチドに対応する異なる受容体が存在し、ペプチドと受容体が一対一の関係にあることを示している。

最近、マウスの骨髄 B 細胞から新たなタキキニン遺伝子 TAC4 (PPTC) が同定され、この遺伝子には 11 個のアミノ酸からなる新規の

ペプチドがコードされ、そのペプチドはヘモキニン-1 (HK-1) と命名された。HK-1 のアミノ酸配列は Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ であり、このペプチドの C 末端領域にタキキニンペプチドとしての特徴を表す Phe-X(Try)-Glu-Leu-Met-NH₂ のアミノ酸配列を有しているため、HK-1 は哺乳動物における第 4 のタキキニンペプチドとなる。この HK-1 は SP と高い親和性を示す受容体である NK1R に対して高親和性を示す。

その後、ヒト由来の TAC4 遺伝子には 4 つのペプチド、エンドキニン A (EKA)、エンドキニン B (EKB)、エンドキニン C (EKC)、エンドキニン D (EKD) がコードされていると報告された。EKA は 47 個のアミノ酸からなり、EKB は EKA のアミノ酸配列のうち、16 番目から 21 番目のアミノ酸を欠如した 41 個のアミノ酸からなるペプチドである。EKA と EKB の C 末端領域のアミノ酸配列は Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ であり、このアミノ酸配列は SP の C 末端領域と同じアミノ酸配列であるため、これら 2 つのペプチドも新規のタキキニンペプチドと言える。この EKA と EKB の C 末端領域に共通の 10 個のアミノ酸からなる EKA/B はヒト NK1R に対して高い親和性を示す。更に、EKA と EKB の共通 C 末端領域には 11 個のアミノ酸からなるペプチドである Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ が予想され、このペプチドをヒトヘモキニン (hHK) とした。ラットやマウスの TAC4 遺伝子にはエンドキニンに対応するペプチドをコードしていないため、エンドキニンはヒト固有のタキキニンペプチドと言える。

一方、EKC と EKD は両者とも 14 個のアミノ酸からなるペプチドで、そのアミノ酸配列は Lys-Lys-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu-NH₂ と Val-Gly-Ala-Thy-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu-NH₂ である。両者を比較すると、N 末端の 2 個のアミノ酸を除いた 12 個のアミノ酸は共通であることがわかる。この 2 つのペプチドの C 末端領域のアミノ酸配列は Phe-X(Gln)-Gly-Leu-Leu-NH₂ であり、一見、タキキニンペプチドに特有のアミノ酸配列を有しているように見えるが、EKC と EKD の C 末端には Met に替わって Leu が存在している。そこで、EKC と EKD はタキキニンペプチドとは言わずタキキニン遺伝子関連ペプチドと言われている。

SP や NKA が疼痛系に関与することは広く知られているが、新たに見つけられたエンドキニンの生理活性についてはほとんど知られていない。最近の私たちの研究により、エンドキニンと疼痛系との関係が僅かではある

が明らかになりつつある。SP をラット髄腔内に投与すると痛みまたは痒みの神経行動学的指標である足引っ掻き行動と熱痛覚過敏が誘発される。そこで、HK-1 を髄腔内に投与すると、足引っ掻き行動が誘発され、この効果は NK1R アンタゴニストの前投与により消滅した。しかし、熱痛覚過敏は誘発されなかった。このことは、NK-1 が結合する受容体は NK1R に類似しているが、SP と高い親和性を示す NK1R そのものではないかもしれないことが示唆された (遠藤ら 2006)。次に、EKA/B をラットの髄腔内に投与すると SP と同様に足引っ掻き行動と熱痛覚過敏を誘発し、この効果は NK1R アゴニストの前処理で消失する。また、EKC と EKD の 12 個の共通アミノ酸配列からなる EKC/D を投与しても神経行動学的指標は変化しなかった (吉岡ら 2006)。

2. 研究の目的

これまでの研究から、新規タキキニンペプチドのうち EKA/B は SP と同様の機能を有していることを明らかにしてきたが、EKC/D の機能については何もわかっていない。そこで本研究では EKC/D の機能を明確にすることを第一義的目的とし、その結果を踏まえて次の課題を解決していくこととする。その糸口は EKC/D の C 末端には Leu が存在し、SP や EKA/B の C 末端には Met が存在することであると仮定した。従って、この C 末端に存在するアミノ酸の機能的意義を明らかにすることにより、タキキニンペプチドの構造及び機能的特徴を明らかにすることとする。

(1) SP、EKA/B、HK-1 の髄腔内投与による足引っ掻き行動の誘発に対する EKC/D の前投与の効果について検討する。

(2) SP、EKA/B の髄腔内投与による熱痛覚過敏の誘発に対する EKC/D の前投与の効果について検討する。

(3) 侵害性熱刺激に伴う脊髄後角における c-Fos タンパク発現に対する EKC/D 前投与の効果について検討する。

(4) EKC/D の C 末端にある Leu を Met に置換した [Met¹²]-EKC/D を合成し、このペプチドの髄腔内投与の効果について検討する。

(5) SP の C 末端にある Met を Leu に置換した [Leu¹¹]-SP と EKA/B の C 末端にある Met を Leu に置換した [Leu¹⁰]-EKA/B を合成し、このペプチドの髄腔内投与の効果について検討する。

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、深麻酔下で、予め 70°C の熱湯中で直径を細くしたカテーテルを後頭骨と第一頸椎の間か尾側方向

に入れ、カテーテルの先端が腰髄レベルに位置するようにし、周囲の筋肉にカテーテルを固定することで留置する。

(2) ラット髄腔内に 10^{-3} MSP、EKA/B、HK-1 を注入し、注入後 10 分間で誘発される足引っ掻き回数を測定し、この回数をそれぞれのペプチド注入で誘発される足引っ掻き行動の指標とする。次に、髄腔内に 10^{-3} MEKC/D を投与し、その 5 分または 10 分後に 10^{-3} MSP、EKA/B、HK-1 を投与し、これら 3 種のペプチド投与により誘発される足引っ掻き回数を測定することで、EKC/D 前投与の効果を評価する。

(3) ラット髄腔内に 10^{-6} MSP、EKA/B を注入し、注入 20 分後に足底から侵害性熱刺激を与え、足引っ込み反射が生じるまでの時間(潜時)を計測する。次に、髄腔内に 10^{-5} MEKC/D を投与し、その 5 分後に 10^{-6} MSP、EKA/B を投与し、投与 20 分後に足引っ込み反射が生じるまでの時間を測定することで、EKC/D 前投与の効果を評価する。

(4) 深麻酔下で、ラット髄腔内に 10^{-2} MEKC/D を注入し、その 5 分後に 52°C のお湯に足を 30 秒間浸すことで、足に侵害性熱刺激を与えたこととする。髄腔内に生理食塩水を注入したものを対照群とし、同様に侵害性熱刺激を足に与える。足に侵害性熱刺激を与えた 2 時間後にラットをホルマリンで灌流固定し、脊髄を取り出し、凍結切片作製後に c-Fos タンパクに対する免疫組織化学を施す。対照群と EKC/D 前投与群の脊髄後角における c-Fos 陽性細胞数を比較することで、痛み刺激による c-Fos タンパク発現に対する EKC/D 前投与の効果を評価する。

(5) ラット髄腔内に 10^{-6} MSP を注入し、その 20 分後に足底から侵害性熱刺激を与え、足引っ込み反射が生じるまでの時間(潜時)を計測する。次に、 10^{-6} M[Met¹²]-EKC/D をラット髄腔内に注入し、その 5 分後に 10^{-6} MSP を投与し、SP 投与 20 分後に足引っ込み反射が生じるまでの時間を測定することで、SP による熱痛覚過敏誘発に対する [Met¹²]-EKC/D の前投与の効果を評価する。また、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} M[Met¹²]-EKC/D 投与 20 分後に足底から侵害性熱刺激を与え、足引っ込み反射が生じるまでの時間を計測することで、[Met¹²]-EKC/D の単独投与の効果を評価する。更に、 10^{-6} M[Met¹²]-EKC/D を髄腔内に注入し、注入後 10 分毎に足底から侵害性熱刺激を与え、足引っ込み反射が生じるまでの時間を経時的に計測する。

(6) ラット髄腔内に 10^{-3} MSP、EKA/B を注入し、注入後 10 分間に誘発される足引っ掻き回数を測定し、この回数をそれぞれのペプチド注入で誘発される足引っ掻き行動の指標とする。次に、髄腔内に 10^{-3} M[Leu¹¹]-SP または [Leu¹⁰]-EKA/B を投与し、その 5 分後に

10^{-3} MSP または EKA/B を投与し、SP または EKA/B 投与により誘発される足引っ掻き回数を測定することで、SP または EKA/B 投与による足引っ掻き行動の誘発に対する [Leu¹¹]-SP または [Leu¹⁰]-EKA/B 前投与の効果を評価する。

(7) ラット髄腔内に 10^{-6} MSP、EKA/B を注入し、その 20 分後に足底から侵害性熱刺激を与え、足引っ込み反射が生じるまでの時間を計測する。次に、髄腔内に 10^{-6} M[Leu¹¹]-SP または [Leu¹⁰]-EKA/B を注入し、その 20 分後に足底から侵害性熱刺激を与え、足引っ込み反射が生じるまでの時間を測定することで、これらのペプチドの単独投与の効果を評価する。更に、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} M の [Leu¹¹]-SP または [Leu¹⁰]-EKA/B を髄腔内に注入し、その 5 分後に 10^{-6} MSP を投与し、SP 投与 20 分後に足底から侵害性熱刺激を与え、足引っ込み反射が生じるまでの時間を測定することで、SP による熱痛覚過敏の誘発に対する [Leu¹¹]-SP または [Leu¹⁰]-EKA/B 前投与の効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 実験(2)で、EKC/D を 5 分前に投与することで、SP または EKA/B の髄腔内投与により痛みまたは痒みの神経行動学的指標である足引っ掻き行動の回数は有意に減少した。しかし、10 分前投与では、SP または EKA/B による足引っ掻き行動の誘発に対する抑制効果は認められなかった。この結果は、SP または EKA/B による足引っ掻き行動の誘発は EKC/D の前処理により抑制されるが、その効果は 10 分以内であることを示している。

(2) 実験(3)で、実験(2)の結果を踏まえ EKC/D を 5 分前に投与すると、SP または EKA/B 投与による熱痛覚過敏(侵害性熱刺激を与え、その後足引っ込み反射が生じるまでの時間で判定)の誘発は有意に抑制されることが示された。実験(2)の結果と同様に、EKC/D は SP または EKA/B 投与による熱痛覚過敏の誘発に対して抑制効果を有することを示している。

(3) 末梢組織である足の表面に痛み刺激を与えると、腰髄後角の I/II 層と V/VI 層で c-Fos タンパクの発現が顕著に促進されることは既知の事実である。実験(4)で、侵害性熱刺激を与える 5 分前に EKC/D の髄腔内に投与したところ、c-Fos タンパクの発現は有意に抑制された。ここで、実験(2)、(3)の結果は、EKC/D が SP や EKA/B のアンタゴニストとしての機能を有していることを示し、実験(4)の結果は EKC/D が鎮痛作用を有していることを示唆している。

(4) 実験(5)で、EKC/D の SP に対する抑制効果は、[Met¹²]-EKC/D の前投与では認めら

れなかった。しかし、逆に、[Met¹²]-EKC/Dを単独投与することにより、足引っ掻き行動と熱痛覚過敏が誘発された。SP、EKA/B、[Met¹²]-EKC/DのC末端にはメチオニンが存在し、これらの全てのペプチドは髄腔内単独投与により足引っ掻き行動と熱痛覚過敏を誘発することになる。このことは、これらのペプチドのC末端にメチオニンが存在すると興奮性、ロイシンが存在するとSPのアンタゴニストになることを示唆している。この仮定に従えば、EKC/Dの抑制効果はC末端にあるロイシンに依存していると推測できる。

これらの実験で得られた結果は、Brain Research 1165(2007)71-80で発表している。

(5) これまでの推論が正しいならば、SPまたはEKA/BのC末端に存在するメチオニンをロイシンに置換した[Leu¹¹]-SPまたは[Leu¹⁰]-EKA/BはSPやEKA/Bに対して抑制効果を発揮することが予想できる。この予想を実証するために実施したのが実験(6)と実験(7)である。予想どおり、[Leu¹¹]-SPと[Leu¹⁰]-EKA/Bの単独投与では、SPまたはEKA/Bの単独投与で見られた足引っ掻き行動や熱痛覚過敏を誘発しなかった。また、[Leu¹¹]-SPと[Leu¹⁰]-EKA/Bを前投与するとSP髄腔内投与による足引っ掻き行動や熱痛覚過敏の誘発を有意に抑制した。このことは、タキキニンペプチドの機能的特徴はC末端に存在するアミノ酸がメチオニンであるか、ロイシンであるかにより支配されていることを示している。

これらの実験で得られた結果は、Biochemical and Biophysical Research Communication 378(2009)182-185で発表した。また、[Leu¹¹]-SPと[Leu¹⁰]-EKA/Bは鎮痛薬としての可能性があるので、「サブスタンスPに対するペプチド由来のアンタゴニストの開発」の名称で、現在、特許を公開している(特開2008-156312)。

【今後の展望】本実験では、EKC/Dが鎮痛作用を有していることを示し、その効果はC末端にロイシンが存在することに起因することを明らかにした。しかしながら、本実験は髄腔内にペプチドを投与し、その効果を評価してきただけで、EKC/Dが痛みの起因となる末梢組織において抑制効果を発揮するか否かは不明であり、EKC/Dを鎮痛薬の開発へと導くためには、この種の実験を欠くことはできない。また、本研究で、EKC/Dの抑制効果の持続時間は10分以内であることを明らかにした。EKC/Dを鎮痛薬として開発するには持続時間をより長くする必要があり、現在、この課題に取り組んでいるところである。

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 Naono R, Nakayama T, Ikeda T, Matsushima O, Nishimori T.

Effect of the carboxyl-terminal of endokinins on SP-induced pain-related behavior.

Biochem Biophys Res Commun., 378(2): 182-185, 2009. reviewed.

② Naono R, Nakayama T, Ikeda T, Matsushima O, Nishimori T.

Pharmacological characterization of desensitization in scratching behavior induced by intrathecal administration of hemokinin-1 in the rat.

Neuropeptides, 42(1): 47-55, 2008. reviewed.

③ Naono R, Nakayama T, Ikeda T, Matsushima O, Nishimori T.

Leucine at the carboxyl-terminal of endokinins C and D contributes to elicitation of the antagonistic effect on substance P in rat pain processing.

Brain Res., 1165: 71-80, 2007. reviewed.

[学会発表] (計6件)

① Naono R, Sunakawa N, Ikeda T, Nishimori T.

Effects of neurokinin 1 receptor knock-down by intrathecal administration of siRNA on pain processing in rats.

Society for Neuroscience, 38th Annual Meeting, 2008年11月19日, Washington DC.

② Naono R, Sunakawa N, Ikeda T, Nishimori T.

Functional interaction between the Neurokinin-1 receptor and TRP channels (TRPV1, TRPA1 and TRPM8) in the rat spinal cord.

International Association of the Study of Pain, 2008年8月19日, Glasgow.

③ Naono R, Sunakawa N, Ikeda T, Nishimori T.

Phosphorylation mediated by NK1 receptor sensitizes a TRPV1 channel and desensitizes TRPA1 and TRPM8 channels in rats.

第31回日本神経科学会, 2008年7月9日, 東京.

④ 直野留美, 砂川奈津季, 池田哲也,

西森利數.

siRNA のラット 髄腔内投与による NK1 受容体のノックダウン.

第 30 回日本疼痛学会, 2008 年 7 月 20 日, 福岡.

⑤ 砂川奈津季, 直野留美, 池田哲也,

西森利數.

NMDA・AMPA 誘発痛覚過敏に NK1 receptor と mGluR1, 5 が関与する.

第 30 回日本疼痛学会, 2008 年 7 月 20 日, 福岡.

⑥ 直野留美, 池田哲也, 西森利數.

ヘモキニン-1 誘発 desensitization の特徴.

第 29 回日本疼痛学会, 2007 年 7 月 7 日, 横浜.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

① 名称: サブスタンス P に対するペプチド由来のアンタゴニストの開発.

発明者: 西森利數

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特開 2008-156312

取得年月日: 2008 年 7 月 10 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

① 研究代表者

西森 利數 (NISHIMORI TOSHIKAZU)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 20112211

② 研究分担者 (2007 年度)

池田 哲也 (IKEDA TETSUYA)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号: 20264369

③ 連携研究者 (2008 年度)

池田 哲也 (IKEDA TETSUYA)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号: 20264369

④ 研究協力者

直野 留美 (NAONO RUMI)

日本学術振興会・特別研究員

研究者番号: 20・10851