

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390297

研究課題名(和文)細胞膜透過性ペプチドを用いたがん性疼痛治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel cell-penetrating peptides for treatment of cancer pain

研究代表者

廣瀬 宗孝 (HIROSE, Munetaka)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：50275228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円、(間接経費) 4,020,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞やがん細胞にはTrkAというタンパク質が存在し、痛みやがん細胞の増殖に関係することが知られている。これまでの研究でTrkAの作用を抑制するIPTRK3という薬剤を開発し、動物実験で鎮痛作用をもつことを明らかにした。本研究では、さらに4つの薬剤(IPTRK4, IPTRK5, IPTRK6, IPTRK7)のTrkAに対する効果を検討し、がん細胞の増殖およびがん性疼痛に対する効果を検討した。そしてIPTRK3とIPTRK5ががん細胞の増殖抑制効果とがん性疼痛に対する鎮痛作用を同時に持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：TrkA, a protein locating at neuron or malignant cells, is known to have a relation to pain and proliferation of cancer cells. My previous studies revealed that IPTRK3, a novel inhibitor of TrkA activity which I developed, suppresses pain in rodents. In this study, I synthesized 4 more peptides (IPTRK4, IPTRK5, IPTRK6, IPTRK7) and examined their effect on TrkA activity, followed by the investigation of their effect on either proliferation of cancer cell or cancer pain in rodents. Both IPTRK3 and IPTRK5 showed antiproliferative effect on cancer together with suppressive effect on cancer pain.

研究分野：医歯薬学

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：がん性疼痛 細胞膜透過性ペプチド 神経成長因子 鎮痛薬 疼痛管理学 TrkA

1. 研究開始当初の背景

現在の本邦における死因の第1位は悪性新生物であり、がん疼痛で苦しむ人々の約5~10%は、未だ十分な除痛が得られていないのが現状である。その原因の一つは、痛み体験は多数の化学物質が関与しており、現在の鎮痛薬と鎮痛補助薬では、すべての関与をカバーできないことである。これらの化学物質の中で、神経成長因子(nerve growth factor; NGF)とその高親和性受容体のTrkAは、侵害受容痛と神経障害痛の発症に関わるだけでなく、ある種のがん細胞の増殖にも関与することが知られている。そこでTrkAをターゲットにした薬剤は、末梢神経に作用することで鎮痛効果をもたらし、がん細胞に作用することでその増殖を抑制するダブルの効果が期待できる全く新しいがん疼痛治療薬となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究代表者は侵害受容痛と神経障害痛を抑制する新しい細胞膜透過性ペプチドのIPTRK3を開発してきた。本研究では、このペプチドが、がん疼痛モデル動物において、腫瘍増殖抑制効果とがん疼痛抑制効果の両作用をもつことをin vivoで明らかにする。また全く新しいがん疼痛治療薬として臨床応用するために、よりアミノ酸配列の短いペプチドを開発することで生産コストを低くすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) TrkAの活性化ループのアミノ酸配列(GDFGMSRDIYSTDYRVGGRTMLPIR)から選別したアミノ酸配列と、細胞膜透過性を促進させる作用をもつペプチド(YGRKKRRQRRR)をリンカーで結合させた新たなペプチドを作成する。

(2) IPTRK3と新しく作成したペプチドを用いて、TrkA活性に対する影響、およびTrkAを発現するがん細胞の増殖能に及ぼす影響などについて、invitroおよび細胞培養実験で明らかにする。

(3) ペプチドが増殖抑制効果を示すがん細胞を用いて、がん疼痛モデルをマウスで作成する。ペプチドによるがん疼痛抑制作用と腫瘍増殖抑制作用を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 以下のIPTRK3と4種類の新規ペプチ

ド(IPTRK4, IPTRK5, IPTRK6, IPTRK7)の作成を行った(図1)。

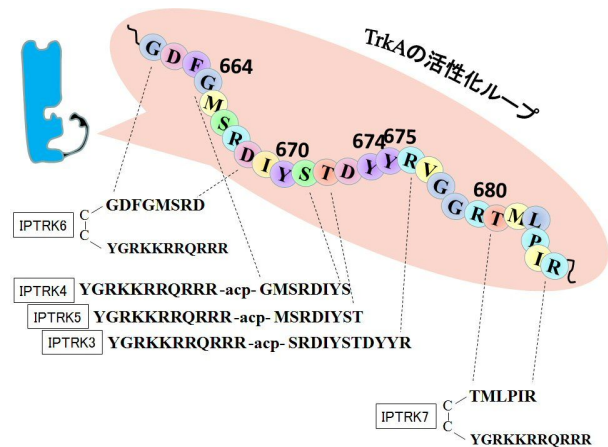


図1 細胞膜透過性ペプチドの作成

(2) これらのペプチドを用いて、リコンビナントTrkAを用いたキナーゼアッセイと、マウス悪性黒色腫細胞株(B16-F1細胞)におけるこれらのペプチドの増殖抑制効果を検討した。

キナーゼアッセイでは、IPTRK3は100μMで有意にTrkA活性を抑制したが、IPTRK4とIPTRK5は、より低濃度の1μMで有意に活性を抑制した(図2)。

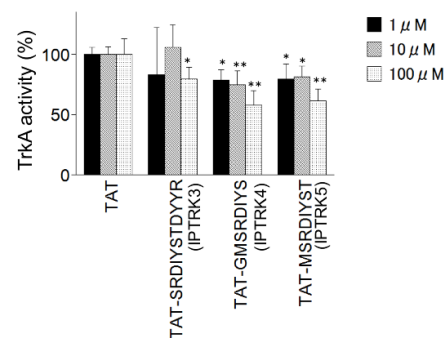


図2 IPTRK3, IPTRK4, IPTRK5の recombinant TrkA 活性に及ぼす影響

IPTRK6とIPTRK7は、TrkA活性を抑制しなかった(図3)。

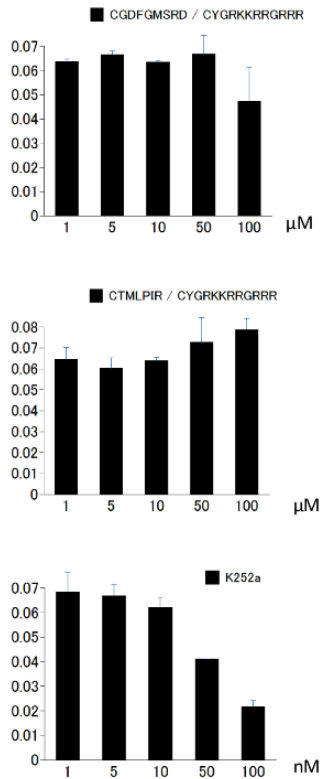


図3 IPTRK6 (上段), IPTRK7 (中段) の recombinant TrkA 活性に及ぼす影響

(3) FITC でラベルしたペプチドを用いて、B16-F1 細胞における IPTRK3, IPTRK4, IPTRK5 の細胞膜透過性を確認 (図 4c) し、また TrkA 抗体を用いて、B16-F1 細胞における TrkA の存在を確認した (図 4a, b)。

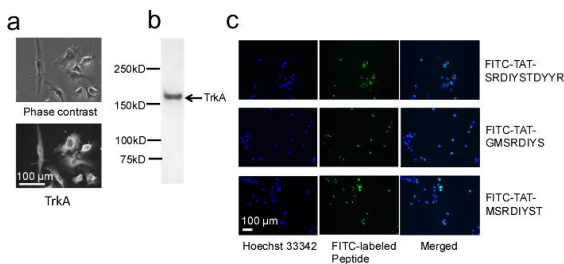


図4 a, b: B16-F1 細胞における TrkA の存在 c: ペプチド透過性

(4) NGF 刺激による細胞増殖と TrkA チロシンリン酸化に対するこれらのペプチドの効果を検討したところ、IPTRK5 が最も強く抑制

することが明らかとなった (図 5、図 6)。

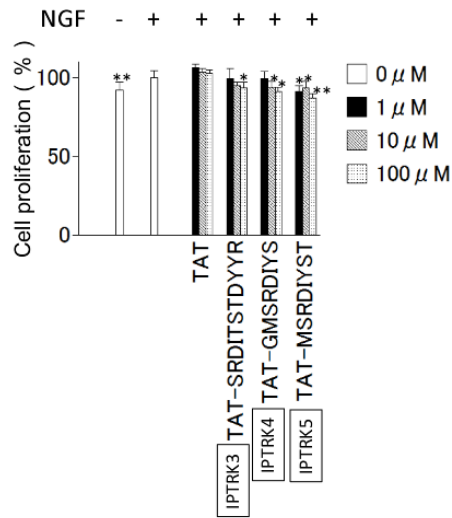


図5 ペプチドの NGF 刺激による B16-F1 細胞の細胞増殖に及ぼす影響

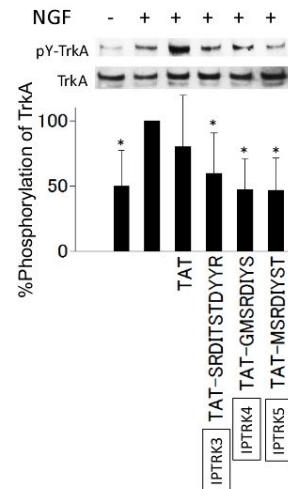


図6 ペプチドの NGF 刺激による B16-F1 細胞の TrkA チロシンリン酸化に及ぼす影響

(5) IPTRK3 および IPTRK5 のマウスメラノーマ細胞 (B16-F1) を移植したマウスにおけるがん性痛に対する効果を検討した。方法は、C57BL/6J マウスの左足底皮下に B16-F1 細胞を移植したマウスメラノーマモデルを作成し、移植後 5 日から 9 日目までペプチドを毎日 1 回腹腔内投与し、痛み反応 (機械刺激過敏反応) と足容量を計測した。IPTRK3 と IPTRK5 は共に、マウスメラノーマモデルにお

ける痛み反応と足容量の増加を有意に抑制した(図7)。

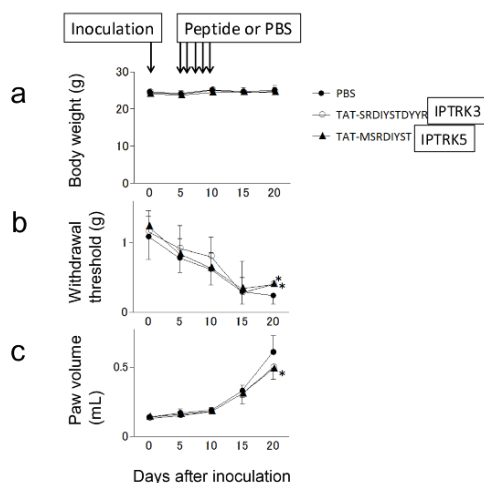


図7 B16-F1 細胞を移植したマウスの機械刺激過敏反応と足容量の変化

(6) IPTRK3 の TrkA 以外のプロテインキナーゼにおける酵素活性抑制作用を明らかにするため、プロファイリングアッセイを行った。酵素活性部位の構造が類似している TrkB, TrkC の酵素活性も同様に抑制することが明らかとなった(図8)。しかし Erk や PKC、PKC など TrkA の細胞内情報伝達系の下流に存在するプロテインキナーゼ活性も強く抑制することが明らかとなった(図8)。

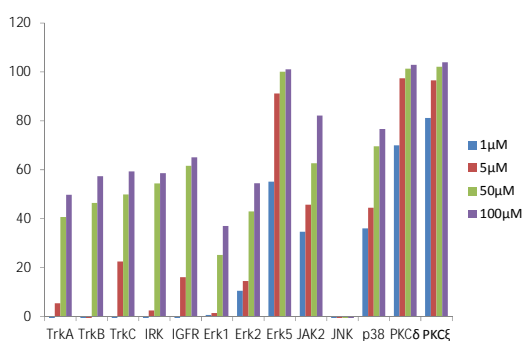


図8 IPTRK3 のプロファイリングアッセイ

(7) まとめ

IPTRK3 と IPTRK5 は TrkA 活性を抑制すると同時に、下流の情報伝達系も抑制することにより、鎮痛作用と腫瘍増殖抑制効果を来す可能性が示唆された。

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11件)

1) 廣瀬宗孝: 新規鎮痛薬の研究開発. 兵庫医科大学医学会雑誌、査読なし、2013; 38: 39-43

2) 廣瀬宗孝: 周術期インスリン抵抗性の病態生理. 臨床麻酔、査読なし、2013: 37; 747-753

3) Kuroda Y, Kato-Kogoe N, Tasaki E, Murata M, Ueda K, Abe M, Miyamoto K, Nakase I, Futaki S, Tohyama Y, Hirose M. Oligopeptides derived from autophosphorylation sites of EGF receptor suppress EGF-stimulated responses in human lung carcinoma A549 cells. Eur J Pharmacol, 査読あり, 2013; 698: 87-94

4) Tabata M, Murata E, Ueda K, Kato-Kogoe N, Kuroda Y, Hirose M. Effects of TrkA inhibitory peptide on cancer-induced pain in a mouse melanoma model. J Anesth, 査読あり, 26: 545-551, 2012.

5) Hirose M, Tabata M, Sakai M, Takeuchi K. Anatomical distribution of striated pattern of contrast mediaduring conventional chemical lumbar sympathectomy using X-ray fluoroscopic guidance. Pain Practice, 査読あり, 12: 331-332, 2012

6) 廣瀬宗孝、田畑麻里、坂井美賀子 : 慢性非がん性痛患者における長期オピオイド療法による依存と嗜癖. 日本ペインクリニック学会誌、査読なし、2011; 18: 25-33

7) Ma W-Y, Murata E, Ueda K, Kuroda Y, Cao M-H, Abe M, Shigemi K, Hirose M. A synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses neuropathic pain in mice. J Pharmacol Sci, 査読あり、114: 79-84; 2010

8) Ueda K, Hirose M, Murata E, Takatori M, Ueda M, Ikeda H, Shigemi K. Local

administration of a synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses inflammatory pain in rats. J Pharmacol Sci, 査読あり、112: 438-443, 2010

9) Shimizu K, Hirose M, Takamura K, Goi T, Yamaguchi A, Morioka K, Mikami S, Ichikawa T, Shigemi K. Effect of anaesthesia maintained with sevoflurane and propofol on surgical site infection after elective open gastrointestinal surgery. J Hosp Infect, 査読あり、74, 129-136, 2010

10) 廣瀬宗孝、田畑麻理、坂井美賀子、重見研司：慢性非がん性痛患者におけるオピオイド嗜癖。ペインクリニック、査読あり、2010; 31: 1440-1448

11) 廣瀬宗孝、坂井美賀子、松木悠佳、田畑麻里、関久美子、重見研司：神経障害性疼痛の症状から予測するガバペンチンの鎮痛効果。日本ペインクリニック学会誌、査読あり、17: 134-140, 2010

〔学会発表〕(計 15 件)

1) 廣瀬宗孝。教育講演「術後難治性疼痛に対する麻酔科医の戦略」。日本麻酔科学会関西地方会、大阪、2013.9.7

2) 廣瀬宗孝。特別講演「NGF/TrkA 系と痛みについて」。第 21 回甲信疼痛治療研究会、山梨、2013.6.29

3) Hirose M, Iwayama S, Murata E, Sonoda S, Tatara T, Tabata M. Novel TrkA inhibitory peptides suppress pain induced by tumor. Euroanaesthesia, Barcelona 2013.6.2

4) 廣瀬宗孝。慢性非特異的腰痛における薬物療法。第 5 回オープンスパインミーティング、京都、2012.9.8

5) 廣瀬宗孝、仲宗根ありさ、飯藤美紗子、山崎康夫、野土信司、田中義文。C-アーム透

視下コーンビーム CT を用いた腰部交感神経節ブロックにおける“ひげ画像”の検討。日本臨床麻酔学会 第 31 回大会、沖縄、2011.11.4

6) 廣瀬宗孝。非がん性疼痛における長期オピオイド療法の嗜癖。- シンポジウム がん患者の精神的苦痛とその緩和。第 21 回日本臨床精神神経薬理学会 第 41 回日本神経精神薬理学会 合同年会。東京、2011.10.28

7) 廣瀬宗孝。TrkA を阻害するペプチド化合物及びその用途。科学技術振興機構 新技術説明会 東京 2011.8.23

8) 廣瀬宗孝。抗けいれん薬。シンポジウム「新しい薬物療法」、日本ペインクリニック学会第 45 回大会、愛媛、2011.7.23

9) 廣瀬宗孝。マウスメラノーマモデルにおけるがん性痛治療薬 IPTRK3 の開発。第 33 回日本疼痛学会、愛媛、2011.7.22

10) 廣瀬宗孝。ランチョンセミナー。神経障害性疼痛における薬物療法。第 31 回日本臨床薬理学会年会、京都、2010.12.3

11) 廣瀬宗孝、田畑麻里、坂井美賀子、竹内健二。CRPS が疑われた小児の 1 症例。CRPS 研究会 徳島、2010.11.6

12) 廣瀬宗孝、田畑麻里、坂井美賀子、竹内健二。C-アーム コーンビーム CT を併用した X 線透視下神経ブロックの有用性。日本臨床麻酔学会 第 30 回大会、徳島、2010.11.4

13) 廣瀬宗孝、田畑麻里、坂井美賀子、竹内健二、松木悠佳、次田佳代。Cアーム X 線透視下コーンビーム CT を用いた胸部交感神経節エタノールブロック。日本麻酔科学会 東海・北陸支部第 8 回学術集会、福井、2010.9.4

14) 廣瀬宗孝：神経障害性痛とオピオイド。JPAP セミナー2010 パネルディスカッション「オピオイドがもたらす疼痛治療の可能性～がん性疼痛から、非がん性疼痛へ ペインクリニックの責務～」、日本ペインクリニ

ック学会第44回大会、 京都、2010.7.3

15) Hirose M: IPTRK3: a peptide targeting to TrkA for cancer pain therapy. BI02010 International Convention, Chicago, 2010 5.4-6

〔図書〕(計3件)

1) 廣瀬宗孝：今後臨床応用が期待される薬物：新戦略に基づく周術期の疼痛管理（川真田樹人 編）中山書店、2014、pp203-209

2) 廣瀬宗孝、牛込綾子．エキスパートのワザに学ぶオペナースのための手術室モニタリング見きわめ力&判断力ピシッとマスターブック メディカ出版、大阪、2012、pp1-287

3) 廣瀬宗孝．感染対策：標準麻酔科学 第6版（古家仁、稲田英一、後藤隆久 編）医学書院、2011、pp206-211

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：TrkAを阻害するペプチド化合物及びその用途

発明者：廣瀬宗孝、黒田義弘

権利者：福井大学

種類：特許

番号：特願 2011 - 066819

出願年月日：2011年3月24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)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：50275228