

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590716

研究課題名(和文)新規神経ペプチドAPGWamideの抗アロディニア効果に関する基礎的研究

研究課題名(英文)A study of mechanism for antiallodynic effect of novel neuropeptide, APGWamide

研究代表者

池田 哲也 (IKEDA, TETSUYA)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：20264369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性神経因性疼痛モデルラットへの神経ペプチドAPGWamideの髄腔内投与によって、疼痛行動であるアロディニアが顕著に軽減する。また、APGWamideは、糖尿病ラット後肢への温熱刺激による、脊髄後角でのc-Fosタンパクの発現も顕著に抑制する。この抗アロディニア効果が脊髄後角において5-HT1レセプターアンタゴニストや1レセプターアンタゴニストによって顕著に阻害されることが示され、下行性抑制系の関与が示唆された。さらに、APGWamideアナログペプチドを用いた研究から活性に重要なアミノ酸配列がわかってきた。

研究成果の概要(英文)： Intrathecal administration of APGWamide significantly attenuated mechanical and thermal allodynia in the rats with diabetic neuropathy. Induction of c-Fos-like immunoreactivity that was observed in the spinal dorsal horn of diabetic rat following innocuous thermal stimulation to the hind paw was inhibited by intrathecal administration of APGWamide. These antiallodynic effects of APGWamide were inhibited by simultaneous injection of a specific 5-HT1 receptor or specific alpha2 adrenoceptor antagonist. These results indicate that APGWamide have an antiallodynic activity, which may be mediated by serotonergic and/or noradrenergic descending pain inhibitory system. Furthermore, investigation of structure and activity relationship of APGWamide using C-terminal fragment peptides of APGWamide and analogue peptides of a single amino acid substitution at N-terminal amino acid residue of APGWamide has provided information of important structure of APGWamide for antiallodynic activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：神経障害性疼痛 allodynia 糖尿病性神経因性疼痛 下行性抑制系 APGWamide セロトニン ノルアドレナリン c-Fos

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性疼痛や癌性疼痛、神経痛に代表される神経因性疼痛は末梢神経および中枢神経の物理的障害や、機能的障害による慢性疼痛疾患の一種であり、痛み本来の、組織障害の警告という意味は既に失われており、痛み自体が障害となっている。特徴的な痛み症状として、痛み刺激をより強く感じる痛覚過敏や本来なら痛み刺激とならない触覚や温覚を痛みとして感じる異痛（アロディニア）を示す。これら神経因性疼痛は難治性で既存の鎮痛薬の効果が乏しく、臨床的には抗けいれん薬や抗うつ薬が第一選択薬として用いられることが多い。現在、神経因性疼痛患者のQOL改善のためにも効果的な鎮痛薬（除痛薬）の開発が急がれている。当該研究室ではラットを用いて、座骨神経圧迫や糖尿病によって引き起こされる神経因性疼痛に対する抗うつ薬類の効果やその作用機序を調べてきた (Ikeda *et al.*, *Neurosci. Res.*, 63, 42-46, 2009: 研究代表者著)。その課程で、抗うつ薬類は神経因性疼痛を軽減させる。その効果は脊髄後角のシナプスにおいてセロトニンレセプターを介している。抗うつ薬類は脊髄後角に投射している下行性抑制経路のセロトニン神経から放出されたセロトニンの再取り込みを阻害し、セロトニン量を増やしている。の3点が示唆された。さらに、我々はこのセロトニン系に着目し、神経因性疼痛に効果的な薬物を開発する目的で、以前、軟体動物腹足類のナガニシの脳神経節から単離した (Kuroki *et al.*, *BBRC*, 167, 273-279, 1990: 研究代表者共著) 神経ペプチドである APGWamide (H-Ala-Pro-Gly-Trp-NH₂) に注目した。

ナガニシは肉食性で歯舌とよばれる特有の器官を用いて獲物をすりつぶし、消化管へ取り込む。この歯舌には牽引筋と伸出筋がつながっており、交互に収縮と弛緩を繰り返して、歯舌を動かす。この神経ペプチド APGWamide は牽引筋の電気刺激による素早い収縮を増強する活性を指標に単離精製された。その構造は甲殻類の赤色素凝集ホルモン (pQLNFSFGWamide: RPCH) と C 末端 4 残基の配列が類似しており、軟体動物における同族体ではないかと考えられた。RPCH は甲殻類のみならず節足動物門に属する動物に広く活性が認められており、APGWamide も軟体動物門の他の動物においてその活性が調べられた。その結果、APGWamide が有肺類や頭足類にも同定され、軟体動物に広く分布していることが示された。また、APGWamide は軟体動物の神経系でセロトニンの放出をコントロールしていることが示唆されていたが (Minakata *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 565-571, 1991: 研究代表者共著)、哺乳類では全く活性が認められなかった。

当該研究室ではそのセロトニン調節作用に注目し、抗うつ薬と同様に痛みの伝達に何

らかの影響を与えるのではないかと考え、ラットの神経因性疼痛に対する効果を調べた。その結果、APGWamide が糖尿病モデルラットへの脊髄髄腔内投与によって、神経因性疼痛のアロディニアを顕著に軽減すること (抗アロディニア効果) を発見した。さらに、APGWamide が大脳皮質前部帯状回においてセロトニン量を増大させることを発見した。

現在、神経ペプチドに対する一定の見解として、動物の類縁関係が離れるに従って、その神経ペプチドの構造や活性の性質は変化し、異なる動物門に属する神経ペプチド類はその構造も性質も異なるのが通常と考えられている。このことは、同じ動物門内には相同性の高い神経ペプチドが多く分布しているが、動物門が異なるとそれら神経ペプチド群の構造や性質が大きく異なってくることを示唆するものである。そのため、例えば、もっとも多くの研究のなされてきた軟体動物の神経ペプチドでさえ、異なる動物門であり類縁関係も遠い哺乳動物において、その効果が現実に確認された報告例は知られておらず、まして毒として毒腺や唾液腺に含まれる物質以外で医薬利用されている例は現在まで知られていない。当該ペプチドのラットに対する効果は無脊椎動物の神経系で実際に機能している神経ペプチドが哺乳類の神経系で効果を示したはじめての見解と思われる。

一方、鎮痛薬として、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬、インドメタシンに代表される非ステロイド系抗炎症剤などが従来から知られている。しかし、これらの鎮痛薬は、神経因性疼痛に対して一般的に効果が小さい。現在、神経因性疼痛の治療に抗うつ薬が用いられることが多いが、比較的副作用の少ない第三世代抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) でも、精神病的症状や過敏症、他の併用薬によって心血管系の副作用がでてしまう場合があり、セロトニン症候群と呼ばれる副作用発症の危険性を伴っている。また、最も副作用の少ないとされる第四世代のセロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (SNRI) についても、SSRI 同様、併用薬との相互作用も多いことから、専門家の指導を必要とする取扱いが難しい薬剤である。このように、神経因性疼痛においては、既存の鎮痛薬の効果が乏しい、もしくは現在用いられている鎮痛薬であっても取扱いが困難であり必ずしも安全性が高いとはいえないのが現状である。これらの事情などを背景として、神経因性疼痛においては、十分な薬物治療の効果があげられていないのが現状である。APGWamide の抗アロディニア効果の研究は、新しい鎮痛薬の開発につながるると共に、そのセロトニン増大作用から、新しい抗うつ薬の開発にもつながる可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

前述のように神経因性疼痛患者の QOL 改善のためにも効果的な鎮痛薬（除痛薬）が必要であり、本研究の目的は APGWamide の抗アロディニア効果の作用機序を解明することによって、効果的な鎮痛薬の開発を目指すことである。本研究では、まず、APGWamide の抗アロディニア効果が下行性抑制系を介しているという仮説を明らかにするために、5-HT レセプター類や NA レセプター類の関与を調べた。さらに、活性の中心となる構造を特定するために APGWamide のアナログペプチドを作製し、本ペプチドの構造活性関係調べた。

3. 研究の方法

3-1. 2 種類の神経因性疼痛モデルラットの作製

本実験には生後 7-8 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラット (250-300g) を用い、室温を 25℃、12 時間毎の明暗サイクルで飼育した。APGWamide 類を髄腔内に投与するため、ポリエチレン製のチューブ (PE10) を 70℃ の浴槽で引き延ばして、さらに直径の小さいカテーテルを作製した。ペントバルビタール麻酔下のラットの後頭骨と第 1 頸椎の間 (大槽) の硬膜を切開し、クモ膜下腔にカテーテルを挿入し、脊髄腰膨大部 (L4 と L5 の間) の近くにその先端が位置するようにカテーテルを留置した。約 1 週間後、術後の傷に炎症がみられず、前後肢等に運動障害が認められないラットを用いて、糖尿病性神経因性疼痛モデルラット (糖尿病ラット) と絞扼性神経因性疼痛モデルラット (Chronic Constriction Injury: CCI ラット) の 2 種類の神経因性疼痛モデルラットを作製した。

糖尿病ラットは、尾静脈からストレプトゾトシン (STZ) を投与し、膵臓の β 細胞を破壊し、糖尿病を引き起こすことによって作製する。投与後数日で血糖値は上昇し、3-4 週間で von Frey フィラメントによる足底への機械刺激に対する逃避行動の閾値が減少し、触刺激でも回避する、アロディニアを示すようになる。CCI ラットは、坐骨神経を慢性的に絞扼し、圧迫することによって作製した。左側後肢大腿骨上部の皮膚を切開し、坐骨神経に傷を付けないように剥離、露出する。露出した坐骨神経の大腿中央部に切り開いた長さ 3-5mm のポリエチレンチューブ (PE50) を 2 カ所、約 1mm の間隔をあけて巻き付けて絞扼する。糖尿病ラットと同様に 3-4 週間で von Frey フィラメントによる足底への機械刺激に対する逃避行動の閾値が減少し、アロディニアを示すようになる。

3-2. 神経因性疼痛 (アロディニア) の測定

アロディニアの測定には von Frey テス

トと接触式熱刺激プローブ (熱刺激式痛覚測定装置、UDH-104; Unique Medical Co. Ltd, Tokyo, Japan) によるテストを行った。von Frey テストには 0.07g、0.16g、0.4g、0.6g、1g、1.4g、2g、4g、6g、8g、10g、15g、26g、60g、100g の 14 種類のフィラメント (Touch-Test Sensory Evaluator; North Coast Medical Inc., Morgan Hill, CA) を用いた。これらのフィラメントを足底に押し当て段階的に刺激すると、足を動かす、逃避する等の回避行動を示す。up-down 法によって回避行動の閾値を決定した。正常ラットでは 26g-60g の閾値で回避行動を示すが、神経因性疼痛モデルラットは 1g 以下の触刺激程度の刺激の強さまで閾値が低下し、アロディニアを示すようになる。接触式熱刺激プローブは一定温度に保った直径 6mm の金属プローブを足底に直接接触させ熱刺激を与える装置で、低温やけどを回避するために 30 秒以上は接触させないようにした。正常ラットではプローブの温度を 46℃ に固定すると全く反応を示さない。神経因性疼痛モデルラットは 46℃ で回避行動を示すようになる。プローブを足底に 5 回当て、2 回以上回避行動を示したら熱アロディニアを起こしていると判断した。

APGWamide およびそのフラグメント類、また、アンタゴニスト類はカテーテルを通して髄腔内に投与した。投与後、15 分、30 分、1 時間、2 時間、6 時間後のタイムスケジュールで von Frey テストと接触式熱刺激プローブテストを行った。5-HT レセプターアンタゴニスト類と NA レセプターアンタゴニスト類は APGWamide と同時投与した。

3-3. c-Fos タンパク質の免疫組織化学

末梢への侵害刺激によって、対応する脊髄後角 (特に I/II 層) の細胞に c-Fos タンパクが発現することがよく知られており、痛み入力の指標になっている。正常なラットでは非侵害性の熱刺激でこれら転写調節因子の発現の増大は見られないが、糖尿病ラットにおいて非侵害性の熱刺激によって c-Fos が発現することを観察している。この糖尿病ラットに APGWamide を投与し、1 時間後にペントバルビタール麻酔下で左足を踵まで 46℃ の浴槽に 2 分間浸けた。2 時間後にホルマリンで灌流固定し、脊髄を取り出す。単離した脊髄からマイクロトームを用いて凍結切片を作製する。その後、脊髄の切片に c-Fos 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて ABC 法で免疫組織化学 (Histofine SAB-PO (R) kit; Nichirei, Tokyo, Japan) を行った。レセプターアンタゴニストと APGWamide を同時投与し、同様の実験を行った。脊髄 L4-5 切片を光学顕微鏡で観察し、c-Fos 様免疫陽性細胞を計測した。脊髄後角を I/II 層、III/IV 層、V/VI 層に分けそれぞれ切片あたりの平均値と標準誤差を求め、APGWamide 投与群、アンタゴニストと APGWamide の同時投与

群、対照群として生理食塩水投与群、を比較した。

3-4. アンタゴニストおよび APGWamide のアナログペプチド

セロトニンレセプターのアнтаゴニストは 5-HT1A/1B に選択的なシアノピンドロール、5-HT1 全体に選択的なメチオセピン、

- 1 アドレノセプターに選択的なプラゾシン、
- 2 アドレノセプターに選択的なヨヒンビンを用いた。

また、APGWamide の構造活性相関を調べるために、C 末端フラグメントアナログペプチドの PGWamide、GWamide を合成し、その抗アロディニア効果を調べた。さらに、N 末端の 1 残基のみを置換したアナログペプチドを合成した (Filgen および Hokkaido System Science)。疎水性のアミノ酸残基に置換した FPGWamide、LPGWamide、WPGWamide、MPGWamide、酸性アミノ酸残基に置換した EPGWamide、DPGWamide、塩基性アミノ酸に置換した RPGWamide、KPGWamide、電荷を持たない親水性アミノ酸に置換した SPGWamide、TPGWamide、YPGWamide の 11 種類のアナログペプチドを合成し、抗アロディニア活性を調べた。

4. 研究成果

4-1. APGWamide の抗アロディニア効果と関与する伝達物質

APGWamide は糖尿病ラット、CCI ラットいずれの神経因性疼痛モデルラットにおいても濃度依存的に抗アロディニア活性を示した。von Frey テストの結果、その活性は髄腔内投与の 1 時間後をピークに 2 時間後まで持続し、6 時間後には消失した。10-4M の濃度で比較すると、APGWamide 投与 1 時間後で CCI ラット (n=6) は 0.7 ± 0.1 g の域値が 6.8 ± 0.9 g まで上昇したのに対して糖尿病モデル (n=6) では 0.9 ± 0.1 g の域値が 20.3 ± 3.7 g というほぼ正常値に近い値まで回復し、CCI ラットの場合よりもより強くアロディニアが軽減されたと考えられる。また、46 に固定した接触式熱刺激プローブの回避行動は糖尿病ラット (n=6) が 5 回の刺激にたいして 4.8 ± 0.2 回の回避行動を示すのに対して 10-4M APGWamide 投与後 1 時間では 0.8 ± 0.2 回まで減少し、ほとんど回避行動を示さなくなった。このことは APGWamide が熱によるアロディニアも軽減したと考えられる。

この APGWamide の抗アロディニア効果が、脊髄における下行性抑制系を介しているかどうか明らかにするために、下行性抑制系で情報伝達を仲介していると考えられている 5-HT1 レセプター、

- 1 アドレノセプター、
- 2 アドレノセプターに注目し、5-HT1 レセプターに選択的なアンタゴニストのシアノピンドロールとメチオセピン、
- 1 アドレノセプターに選択的なプラゾシン、
- 2 アドレ

ノセプターに選択的なヨヒンビンを用いて、APGWamide の抗アロディニア効果に対する影響を調べた。それぞれのアンタゴニストを髄腔内に APGWamide と同時投与したところ、シアノピンドロールとメチオセピン、ヨヒンビンが APGWamide の抗アロディニア作用を阻害し、プラゾシンは全く効果を示さなかった (図 1)。

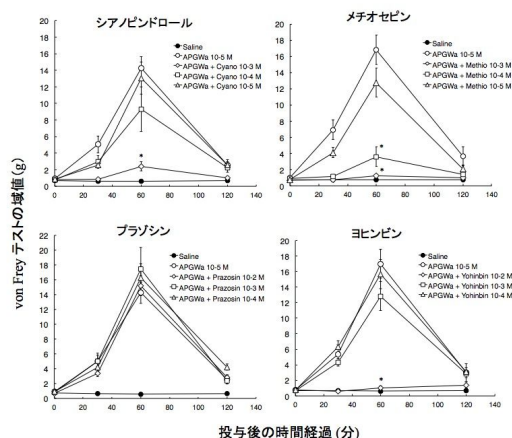


図 1

4-2. 脊髄後角における APGWamide の c-Fos タンパク発現抑制効果

アロディニアを示す糖尿病ラットの後肢に温熱刺激を与えるとその神経投射部位である脊髄後角における c-Fos の陽性細胞数が正常ラットに比べて有意に増大する。この c-Fos の発現は疼痛の指標とされており、c-Fos 抗体による免疫組織化学によって陽性細胞を計測することができる。APGWamide の髄腔内投与は、脊髄後角における c-Fos 陽性細胞数を減少させた。特に後角でも一次知覚神経が投射する表層 (I/II 層) で有意な陽性

脊髄後角における c-Fos 陽性細胞

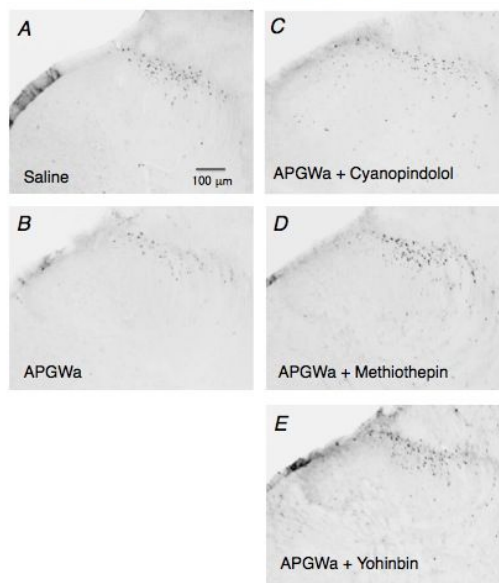


図 2

細胞数の減少が見られた。行動学的実験と同様に、APGWamide とシアノピンドロール、メチオセピンあるいはヨヒンピンの同時投与はAPGWamide の c-Fos 発現の抑制作用を阻害した (図 2)。APGWamide は c-Fos の発現も 5-HT₁ レセプターと 2 アドレノセプターを介していることが示唆された。

4-3. APGWamide の構造活性関係

APGWamide の構造活性関係を明らかにするためにその C 末端フラグメントペプチドである、PGWamide、GWamide を糖尿病ラットの髄腔内に投与した。PGWamide、GWamide いずれのフラグメントペプチドもアロディニアを有為に軽減した。また、その効果は APGWamide が一番強く、PGWamide、GWamide の順番であった (図 3)。

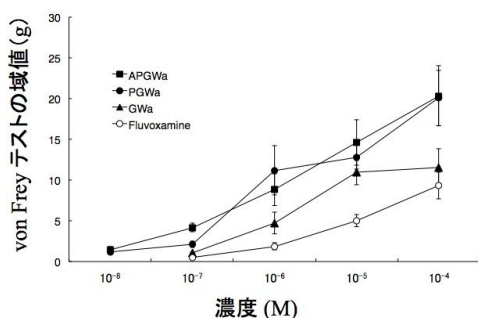


図 3

さらに C 末端の PGWamide 構造を保存し N 末端の Ala 残基を他のアミノ酸に置換したアナログペプチドを合成し、その活性を調べた。親水性アミノ酸に置換した SPGWamide、TPGWamide、YPGWamide はいずれも抗アロディニア活性を示した。塩基性アミノ酸に置換した RPGWamide、KPGWamide が活性を示すのに対して、酸性アミノ酸に置換した EPGWamide、DPGWamide は全く活性を示さなかった。また、疎水性のアミノ酸に置換したアナログの中で FPGWamide、LPGWamide、WPGWamide は抗アロディニア活性を示し、その効果は APGWamide よりも強い可能性が示唆された。しかし、MPGWamide だけは全く活性を示さなかった。

PGWamide が活性を持つのになぜその部分が保存されている EPGWamide、DPGWamide と MPGWamide 抗アロディニア活性を示さないのか、非常に興味深い。N 末端の酸性アミノ酸、メチオニン残基に含まれる S(イオウ)等が APGWamide の抗アロディニア活性に何らかの影響を与えているのかもしれない。

本研究の成果から、APGWamide が神経因性疼痛に対して強い鎮痛 (除痛) 作用を持つことが示された。また、その作用機序は 5-HT レセプターや 2 アドレノセプターを介していることが示唆された。さらに、アナログペプチドの活性からより効果の強いペプチド

が開発できる可能性が示された。本研究の成果を基に新しい鎮痛薬の開発を目指して APGWamide 作用機序、構造活性関係、またその標的分子を研究することは重要なテーマであると考えている。

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)

[学会発表](計 7 件)

(1)池田 哲也, 石塚 雄太, 武田 龍一郎, 中村 武弘, 井川 加織, 直野 留美, 西森 利数, 石田 康: 軟体動物由来神経ペプチド APGWamide のラットにおける抗 allodynia 効果及びセロトニン増大効果. 第 15 回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム, 2011 年 6 月 11 日, 宮崎.

(2)池田 哲也, 石塚 雄太, 井川 加織, 中村 武弘, 直野 留美, 武田 龍一郎, 石田 康, 西森 利数: 軟体動物由来神経ペプチド APGWamide の糖尿病性神経因性疼痛ラットにおける抗 allodynia 効果. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 17 日, 横浜.

(3)T. IKEDA, K. IGAWA, Y. ISHIZUKA, T. NAKAMURA, R. NAONO, R. TAKEDA, Y. ISHIDA, T. NISHIMORI: A molluscan neuropeptide, APGWamide, shows the antiallodynic effect in the rat model of diabetic neuropathy. Neuroscience 2011 (Society for Neuroscience), November 14, 2011, Washington DC.

(4)池田 哲也, 直野 留美, 西森 利数: 軟体動物由来神経ペプチド APGWamide の抗 allodynia 作用に対する 5-HT アンタゴニストと NA アンタゴニストの効果. 第 34 回日本疼痛学会, 2012 年 7 月 20 日, 熊本市.

(5)池田 哲也, 井川 加織, 中村 武弘, 直野 留美, 武田 龍一郎, 石田 康, 西森 利数: 糖尿病ラットに対する APGWamide の抗 allodynia 効果は、ノルアドレナリンやセロトニンレセプターアンタゴニストの髄腔内投与によって阻害される. 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋.

(6)池田 哲也, 瀧本真由美, 中山-直野留美, 西森利数: 糖尿病モデルラットの脊髄後角への APGWamide 投与による cFos 発現抑制作用に対する 5-HT アンタゴニストと NA アンタゴニストの効果. 第 35 回日本疼痛学会, 2013 年 7 月 12 日, さいたま.

(7)池田 哲也, 井川 加織, 中村 武弘, 武田 龍一郎, 石田 康, 西森 利数: 巻き貝の神経ペプチドがヒトの苦痛を救うかも

しれない? . 第 38 回日本比較内分泌学会,
2013 年 10 月 24 日, 宮崎.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 神経ペプチドを用いた神経因性疼痛軽
減薬ならびに抗うつ薬
発明者: 池田哲也
権利者: 国立大学法人宮崎大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/66418
出願年月日: 2011 年 7 月 20 日
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

平成 23 年度及び平成 24 年度
西森 利数 (NISHIMORI, Toshikazu)
宮崎大学・医学部・研究員
研究者番号: 20112211

平成 25 年 3 月 31 日付で研究分担者削除
(日本学術振興会より平成 25 年 3 月 22 日付
で科学研究費助成事業(学術研究助成基金
助成金)研究分担者変更承認書を受理)

(3) 研究分担者

武田 龍一郎 (TAKEDA, Ryuichiro)
宮崎大学・安全衛生保健センター・教授
研究者番号: 90336298