

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26350499

研究課題名（和文）ボツリヌス毒素の疼痛抑制効果の分子基盤解明と応用的研究

研究課題名（英文）Clarification of molecular mechanisms underlying the analgesic effect of botulinum toxin and applied study

研究代表者

山本 由弥子（YAMAMOTO, YUMIKO）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20403496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：ボツリヌス毒素（BoNT）の疼痛抑制効果の分子機構を解析するために、BoNTの活性測定系の開発と蛍光標識全長BoNTの作製を行った。また、4種の抗SNAP-25ペプチド抗体を作製して、三叉神経節培養細胞においてBoNT/AまたはBoNT/Eの投与によりSNAP-25が切断されることを示した。このことから、神経障害性疼痛に対するBoNTの疼痛抑制効果は、末梢に投与されたBoNTが知覚神経節でSNAREタンパク質を切断して神経伝達物質の遊離を減少させることにより得られることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We developed an assay to measure the proteolytic activity of botulinum toxin (BoNT), and attempted to synthesize fluorescently labeled full-length BoNT, in order to study molecular mechanisms for the analgesic effect of BoNT. We also generated four kinds of anti-peptide antibodies against SNAP-25, and showed that BoNT/A or BoNT/E cleaves SNAP-25 in cultured trigeminal ganglion neurons. This suggests that peripherally administered BoNT decreases the release of neurotransmitters via the proteolysis of SNARE proteins in sensory ganglion neurons and relieves neuropathic pain.

研究分野：細菌学

キーワード：ボツリヌス神経毒素 神経障害性疼痛 疼痛抑制 SNAP-25

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌の産生するボツリヌス神経毒素 (BoNT) は、運動神経終末で SNARE タンパク質を切断することによりアセチルコリンの放出を阻害して、弛緩性麻痺を引き起こす。その作用を利用して、BoNT は筋緊張の異常亢進を伴う疾患の治療に用いられてきた。近年、BoNT が片頭痛や三叉神経痛などの痛みに対しても有効であることが明らかとなり、すでに臨床応用も始まっているが、BoNT の鎮痛作用の機序は未だに解明されていない。

申請者は、眼窩下神経を結紮した三叉神経障害性疼痛モデルラットにおいて、研究室で独自の方法で精製した A 型ボツリヌス神経毒素 (BoNT/A) に接触性アロディニアや温熱性痛覚過敏に対する疼痛抑制効果があることを明らかにした (Kitamura et al., *Neuroscience* 159: 1422-1429, 2009; Kumada et al., *J. Oral Rehabil.* 39: 63-72, 2012; Matsuka et al., *J. Toxicol.* 648384, 2012)。また、その疼痛抑制効果は、三叉神経節での神経伝達物質の遊離を減少させることにより得られることも示した (Kitamura et al., *Neuroscience* 159: 1422-1429, 2009)。このことから、末梢に投与された BoNT は、逆行性軸索輸送により三叉神経節に到達して、そこで SNARE タンパク質を切断していると推察されるが、直接的な証拠は得られていない。また、三叉神経節に到達した BoNT がさらに上行して中枢に作用するか否かは不明である。BoNT の逆行性軸索輸送は従来の考えを覆すものであるが、近年は BoNT の逆行性軸索輸送を示唆する報告もあり、コンセンサスが得られつつある。しかしながら、BoNT の逆行性軸索輸送はリアルタイムでは観察されていない。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛に対するボツリヌス療法をエビデンスに基づいた治療法として確立することを目指して、本課題では、次のとおり、解析ツールの開発を行って、三叉神経障害性疼痛における BoNT の疼痛抑制効果の分子機構を解析する。なお、E 型ボツリヌス神経毒素 (BoNT/E) の場合他の血清型の BoNT よりも運動麻痺症状が早く現れることから、即効性鎮痛薬としての可能性を探るために、BoNT/A だけではなく BoNT/E についても解析を行う。

(1) 定量的で高感度な BoNT 活性測定法の開発

BoNT による治療や実験には、正確に活性が定量された BoNT を使用する必要がある。最も感度の高い BoNT 活性測定法として、現在マウスバイオアッセイが行われているが、定量性、迅速性に劣る上に、多数のマウスに堪え難い苦痛を与えるため、動物愛護の観点からも代替法の開発が求められている。そこで、本課題では、BoNT/A や BoNT/E が SNARE タンパク質の SNAP-25 を切断するプロテアーゼ活

性を利用して、FRET (fluorescence resonance energy transfer) ペプチドを基質として用いている活性測定系を開発する。

(2) 部位特異的に蛍光標識された全長 BoNT の作製法の開発

BoNT の動態をリアルタイムで観察するため、構造や機能に影響が出ないように、ピンポイントで毒素を蛍光標識する方法を確立する。すでに、申請者は大腸菌大量発現系で N-末に部位特異的に蛍光標識が入るよう設計した BoNT/A 神経細胞結合ドメイン (BoNT/A-Hc) 組換えタンパク質を作製しているが、強力な毒性ゆえに、この系で全長 BoNT を作製することは出来ない。そこで、本課題では、組換え DNA 実験に該当しない無細胞翻訳系を利用して、N-末端が部位特異的に蛍光標識された全長 BoNT を作製する方法を構築する。

(3) BoNT による三叉神経節における SNAP-25 の切断

BoNT が三叉神経節で機能していることを証明するため、先ず SNAP-25 に対する種々のペプチド抗体を作製し、BoNT/A、BoNT/E による三叉神経節における SNAP-25 の切断を *in vitro* および *in vivo* で観察する。また、BoNT が中枢へ上行して機能している可能性も検討するため、脊髄および大脳での SNAP-25 の切断も調べる。

3. 研究の方法

(1) 定量的で高感度な BoNT 活性測定法の開発

BoNT/A の活性測定については、BoNT/A と SNAP-25 の共結晶構造から FRET 用ペプチド基質として適した配列を設計した。また、共結晶構造が明らかになっていない BoNT/E の活性測定については、BoNT/A と SNAP-25 の共結晶構造から BoNT/E と SNAP-25 の複合体の構造を予測して、FRET 用ペプチド基質として適した配列を設計した。

それぞれの FRET ペプチド基質を BoNT と反応させた後、マルチマイクロプレートリーダーで蛍光を測定した。

(2) 部位特異的に蛍光標識された全長 BoNT の作製

先ず、遺伝子上流に T7 プロモーター配列、SD 配列が付加されるように毒素遺伝子を PCR で増幅した。この時、開始コドンの次の位置に、蛍光色素で修飾されたアミノ酸を挿入するためのアンバーコドンを入れた。次いで、得られた PCR 産物を鋳型にして、蛍光標識アミノ酸-tRNA 存在下で、転写・翻訳に必要な成分がすべて His タグ融合リコンビナントタンパク質で構成された *in vitro* 転写・翻訳系で合成反応を行った。

(3) BoNT による三叉神経節における SNAP-25 の切断

抗 SNAP-25 ペプチド抗体の作製

BoNT/A と BoNT/E は SNAP-25 の Gln¹⁹⁷ Arg¹⁹⁸ と Arg¹⁸⁰ Ile¹⁸¹ をそれぞれ切断する。

1) 全長 SNAP-25、BoNT/A により切断された SNAP-25 および BoNT/E により切断された SNAP-25 のすべてを検出するために SNAP-25 の 96 から 112 番目、2) BoNT/A により切断された SNAP-25 のみを検出するために 189 から 197 番目、3) BoNT/E により切断された SNAP-25 のみを検出するために 172 から 180 番目、4) BoNT により切断される前の全長 SNAP-25 のみを検出するために 198 から 206 番目に相当する 4 種のペプチドを設計し、キャリアタンパク質に結合させた後、ウサギに免疫して抗血清を得た。

BoNT による三叉神経節培養細胞での SNAP-25 の切断

1-2 週齢のラットから三叉神経節を摘出し、コラゲナーゼ処理とトリプシン処理により三叉神経節細胞を分離した。分離された細胞を 24-well プレートに播種、一晚培養した後、BoNT/A または BoNT/E を添加して培養を続けた。そして、ウェスタンブロッティングにより SNAP-25 の切断を調べた。

BoNT による三叉神経節組織での SNAP-25 の切断

BoNT/A または BoNT/E を成熟ラットの顔面部末梢皮内に投与した後、三叉神経節を摘出して、ウェスタンブロッティングにより SNAP-25 の切断を調べた。

4. 研究成果

(1) 定量的で高感度な BoNT 活性測定法の開発

設計した BoNT/A 活性測定用 FRET ペプチドおよび BoNT/E 活性測定用 FRET ペプチドを A-F 型の BoNT とそれぞれ反応させたところ、BoNT/A 測定用 FRET ペプチドは BoNT/A でのみ、BoNT/E 測定用 FRET ペプチドは BoNT/E でのみ切断されることが示されて、血清型特異的な FRET ペプチド基質を作製することに成功した。BoNT/E 用については、FRET ペアの導入位置や長さの最適化を図り、BoNT/E の検出感度を比較検討したところ、今回作製した 12 種の FRET ペプチド基質のうち 1 つの FRET ペプチド基質が市販の BoNT/E 用 FRET ペプチド基質よりも優れていることを明らかにした。

(2) 部位特異的に蛍光標識された全長 BoNT の作製

無細胞翻訳系で蛍光標識全長 BoNT の合成を試みて、SDS-PAGE で確認したところ、BoNT/A については蛍光標識されたタンパク質を検出することは出来なかったが、BoNT/E については目的のサイズ約 150 kDa に蛍光標識されたバンドを認めることが出来た。そして、BoNT/E に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングで BoNT/E であることを確認した。当初は、*in vitro* 転写・翻訳に必要な成分がすべて His タグ融合リコンビナントタンパク質で構成される系を用いることにより、Ni-アフィニティークロマトグラフィーで合成因子を除去して、部位特異的蛍光標識全長 BoNT を精製する予定であったが、合成

途中と考えられるバンドも複数あり精製には至っていない。しかしながら、今後、BoNT/E の C-末端に His タグを導入し、別の無細胞翻訳系で合成を行うことにより、蛍光標識全長 BoNT/E を精製出来ると考えられ、BoNT の逆行性軸索輸送のリアルタイムでの観察が可能になると期待される。

(3) BoNT による三叉神経節における SNAP-25 の切断

抗 SNAP-25 ペプチド抗体の特異性

ウェスタンブロッティングで各 SNAP-25 ペプチド抗体の特異性を調べたところ、期待どおりの抗体が得られていた。すなわち、抗 SNAP-25(96-112)抗体は全長 SNAP-25、BoNT/A により切断された SNAP-25 および BoNT/E により切断された SNAP-25 のすべてを検出した。抗 SNAP-25(189-197)抗体は BoNT/A により切断された SNAP-25 のみを、抗 SNAP-25(172-180)抗体は BoNT/E により切断された SNAP-25 のみを、抗 SNAP-25(198-206)抗体は切断前の全長 SNAP-25 のみを特異的に検出した(図 1)。

切断部位特異抗体、BoNT による切断前の全長 SNAP-25 のみを認識する抗体を得られたことにより、ウェスタンブロッティングだけでなく免疫組織化学染色によっても BoNT による SNAP-25 の切断の確認が可能になった。

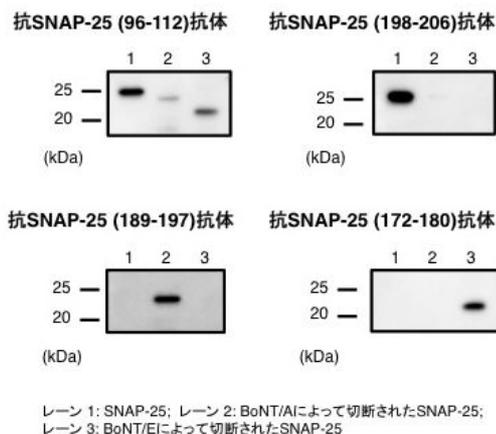


図 1 抗 SNAP-25 ペプチド抗体の特異性

BoNT による三叉神経節培養細胞における SNAP-25 の切断

まず、三叉神経節培養細胞において、確かに SNAP-25 が発現していることを確認した。次いで、三叉神経節培養細胞への BoNT/A または BoNT/E の添加により、SNAP-25 がそれぞれ Gln¹⁹⁷ Arg¹⁹⁸ と Arg¹⁸⁰ Ile¹⁸¹ で切断されることを示した(図 2、図 3)。このことから、BoNT 投与による三叉神経節での神経伝達物質遊離の減少は、BoNT が三叉神経節で SNARE タンパク質を切断することにより起こることが示唆された。

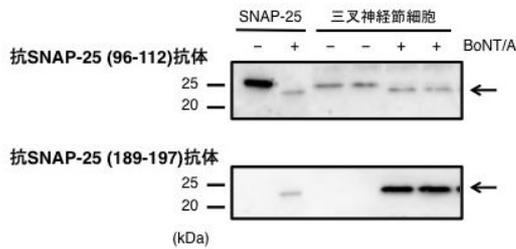


図2 BoNT/Aによる三叉神経節培養細胞におけるSNAP-25の切断

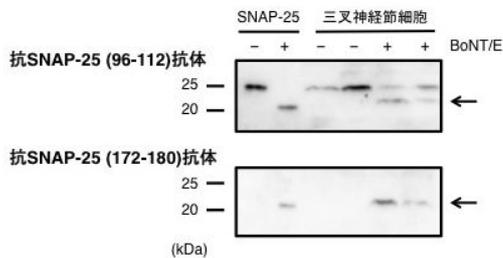


図3 BoNT/Eによる三叉神経節培養細胞におけるSNAP-25の切断

BoNTによる三叉神経節組織におけるSNAP-25の切断

BoNT/AまたはBoNT/Eを成熟ラットの顔面部末梢皮内に投与した後、三叉神経節を摘出してSNAP-25の切断を調べたところ、BoNT/A投与ラット、BoNT/E投与ラットのいずれにおいても、SNAP-25の切断を観察出来なかった(図4)。また、BoNT/Aを直接三叉神経節に投与したラットにおいても、SNAP-25の切断を調べたが、BoNT/AによるSNAP-25の切断物を検出することは出来なかった。そこで、末梢に投与したBoNTが三叉神経節にとどまらず、さらに上行して中枢で機能している可能性を検討するために、三叉神経脊髄路核および大脳におけるSNAP-25の切断を調べたが、BoNT/A投与ラット、BoNT/E投与ラットのいずれにおいてもSNAP-25は切断されていなかった(図5)。

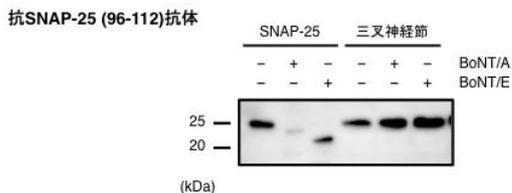


図4 三叉神経節組織におけるSNAP-25

抗SNAP-25 (96-112)抗体

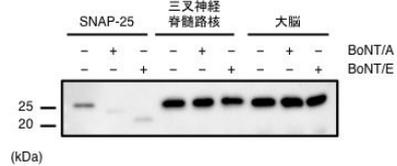


図5 中枢でのSNAP-25

本課題では、BoNTによる三叉神経節におけるSNAP-25の切断を*in vivo*で証明するには至らなかったが、*in vitro*で証明することは出来た。申請者らのこれまでの研究結果や最近の海外からの報告は、末梢に投与されたBoNTは、知覚神経節でSNAREタンパク質を切断することによりSubstance PやCGRPなどの神経伝達物質の遊離を阻害して、疼痛抑制効果を発揮していることはほぼ間違いないと考えられる。したがって、今後も実験条件を変えるなどして*in vivo*でBoNTによる三叉神経節におけるSNAP-25の切断を証明したい。また、本課題で開発した解析ツールを用いて、BoNTの逆行性軸索輸送のリアルタイムでの観察なども行って、神経障害性疼痛に対するボツリヌス療法をエビデンスに基づいた治療法として確立したい。

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2件)

Katsuhiro Omoto, Kotaro Maruhama, Ryuji Terayama, Yumiko Yamamoto, Osamu Matsushita, Tomosada Sugimoto, Keiji Oguma and Yoshizo Matsuka. Cross-excitation in peripheral sensory ganglia associated with pain transmission. *Toxins* 7(8) 2906-2917, 2015. doi:10.3390/toxins7082906. 【査読有】

Yoshihiko Sakaguchi, Tomonori Suzuki, Yumiko Yamamoto, Atsushi Nishikawa and Keiji Oguma. Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains. *Research in Microbiology* 166(4) 318-325, 2015. doi:10.1016/j.resmic.2014.07.016. 【査読有】

〔学会発表〕(計5件)

Katsuhiro Omoto, Kotaro Maruhama, Yumiko Yamamoto, Tomosada Sugimoto, Osamu Matsushita, John K Neubert and Yoshizo Matsuka. Pain transmission within peripheral sensory ganglia, *Neuroscience*, Chicago, October 17-21, 2015.

丸瀧功太郎, 寺山隆司, 杉本朋貞. 感覚情報伝達におけるA型ボツリヌス毒素の

効果,日本解剖学会第70回中国・四国支部学術集会,2015年10月24日-25日,愛媛大学(松山).

松香芳三,丸濱功太郎,山本由弥子,小熊恵二,松下治.ポツリヌス毒素を利用した神経障害性疼痛治療,第88回日本細菌学会総会,2015年3月26日-28日,長良川国際会議場(岐阜).

山本由弥子,丸濱功太郎,松香芳三,美間健彦,後藤和義,横田憲治,松下治,小熊恵二.末梢投与されたA型ポツリヌス神経毒素の三叉神経における局在と軸索輸送,第67回日本細菌学会中国・四国支部総会,2014年10月4日-5日,徳島文理大学(徳島).

丸濱功太郎,松香芳三,山本由弥子,寺山隆司,杉本朋貞.精製A型ポツリヌス毒素の軸索輸送と疼痛抑制効果,第37回日本神経科学大会,2014年9月11日-13日,パシフィコ横浜(横浜).

〔図書〕(計1件)

小熊恵二,山本由弥子,鈴木智典.ポツリヌス症.人獣共通感染症 改訂3版,医薬ジャーナル社,木村哲,喜田宏 編,280-296,2016.

〔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

山本 由弥子(YAMAMOTO, Yumiko)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号:20403496

(2) 研究分担者

松香 芳三(MATSUKA, Yoshizo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号:90243477

小出 隆規(KOIDE, Takaki)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号:70322253

丸濱 功太郎(MARUHAMA, Kotaro)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号:60712792

(3) 連携研究者

松下 治(MATSUSHITA, Osamu)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号:00209537

(4) 研究協力者

小熊 恵二(OGUMA, Keiji)
岡山大学・名誉教授