

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430067

研究課題名(和文) PAC1受容体シグナリングによる疼痛慢性化機構の解明と創薬

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of chronic pain by PAC1 receptor and drug discovery.

研究代表者

高崎 一郎 (TAKASAKI, ICHIRO)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・准教授

研究者番号：00397176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄PAC1受容体の活性化により疼痛が慢性化する。本研究ではその下流で発現が上昇するCyr61と疼痛の関連性を検討した。Cyr61タンパクをマウスの脊髄に投与すると疼痛を惹起し、アストロサイト(グリア細胞の一つ)細胞株においてインテグリンを介してケモカインの発現を誘導することを見出した。本研究の成果は、脊髄PAC1受容体-Cyr61-ケモカインシグナリングが疼痛の慢性化に寄与し、インテグリンやケモカイン受容体が新規鎮痛薬創薬のターゲットとなることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Activation of spinal PAC1 receptor induces long-lasting mechanical allodynia in mice. In this study, we analyzed the involvement spinal Cyr61 which expression is increased by PAC1 receptor activation on the pain. Intrathecal injection of Cyr61 recombinant protein induced mechanical allodynia. Cyr61 protein increased the expression of chemokine CCL2 and CCL7 mRNA via integrin beta-1 in the astrocyte. The present results suggest that spinal PAC1-Cyr61-chemokine signaling are involved in the chronic pain and that integrin and/or chemokine receptors may be useful target for developing new analgesics.

研究分野：神経薬理学, 疼痛学

キーワード：PACAP PAC1受容体 アロディニア 脊髄後角 マイクロアレイ 創薬

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 神経傷害性疼痛などの慢性痛とその問題点

帯状疱疹後神経痛や三叉神経痛に代表される神経障害性疼痛は、末梢神経および中枢神経の障害や機能的障害による慢性疼痛疾患の一種である。これらの痛みは、本来の疼痛意義である組織障害の警告という意味は既に失われており、苦痛としての痛み自体が障害となり患者の生活の質 (QOL) の著しい低下を引き起こされる。痛みが慢性化することで、最悪の場合にはうつ症状などの神経精神症状も引き起こす場合がある。現在のところ慢性疼痛に有効な鎮痛薬は少なく、また痛みが慢性化するメカニズムも不明な点が多い。鎮痛薬の開発が進んでいない理由には、神経障害性疼痛の痛みの発生メカニズム、痛みが慢性化するメカニズムが不明であり、またヒトの慢性痛を表現する適切な動物モデルがないことがあげられる。したがって慢性痛のメカニズムの解明、新しい鎮痛薬の開発、ヒトの慢性疼痛に適した動物モデルの確立が課題となっている。

### (2) 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) と受容体

PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) は 1989 年に、宮田らがヒツジの脳の視床下部からラット下垂体細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化作用を指標に単離・同定したペプチドホルモンである (Miyata et al, Biochem Biophys Res Commun, 1989)。PACAP とその受容体の組織分布の解析や、in vitro および in vivo における薬理学的研究から、PACAP は視床下部ホルモンとしてのホルモン作用だけでなく、神経栄養因子、神経伝達物質、神経調節因子等の多様な機能を示すことが明らかとなっている (Vaudry et al, Pharmacol Rev, 2009)。

PACAP の受容体には PAC1 受容体、VPAC1 受容体、VPAC2 受容体の 3 種類が知られており (次頁図 2 参照)、そのいずれもが 7 回膜貫通型の G タンパク質共役受容体である (Arimura and Shioda, Front Neuroendocrinol, 1995)。PAC1 受容体は PACAP との親和性が VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) との親和性に比べ 1000 倍程度高く、PACAP と特異的に結合することが報告されている (Ishihara et al., Neuron, 1992)。

### (3) PACAP と痛み

PACAP は、PACAP 受容体と共に、知覚神経節や脊髄後角など痛覚伝達経路に発現しており、痛覚伝達調節に関与することが示唆されているが、その調節メカニズムなどは不明な点が多い。これまでに、PACAP をマウスの脊髄くも膜下腔内に投与すると、下半身の

biting 反応などの疼痛様行動を惹起することや一過性の痛覚過敏を誘発することが報告されており、PACAP は脊髄における痛み伝達に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている (Narita et al., Eur J Pharmacol, 1996; Ohsawa et al., Pain, 2002)。また末梢神経を直接損傷させて誘発する神経障害性の疼痛モデル動物において、後根神経節における PACAP mRNA の発現が強く誘導されること (Zhang et al., Neuroscience, 1996)、PACAP 遺伝子欠損マウスでは末梢神経障害による後肢の疼痛反応が抑制されること (Mabuchi et al., J Neurosci, 2004) などが報告されていることから、PACAP は神経傷害性疼痛にも深く関与していることが示唆されている。しかしながら、関与する受容体 (PAC1, VPAC1, VPAC2) やシグナル伝達系路、関与する細胞 (神経細胞、グリア細胞) など、そのメカニズムに関し多くの不明点が残っている。

### (4) PACAP 投与による長期アロディニア反応と遺伝子発現

我々の研究グループも同様に、PACAP をマウス脊髄くも膜下腔内へ単回投与すると、数時間継続する下半身の licking や biting 反応といった自発痛様行動を惹起することを以前報告している (Shimizu et al, Reg Pep, 2004)。また最近、PACAP あるいは Maxadilan (PAC1 受容体選択的アゴニスト) を脊髄くも膜下腔内に投与すると、自発痛様行動は数時間で終了するが、その後数か月にわたって機械的アロディニア反応 (通常では痛みを起ささない刺激に対してもすべて疼痛として認識される感覚異常) が持続することを見出した (Yokai et al., Mol Pain, 2016)。一方で VPAC1/2 受容体アゴニストである VIP はアロディニア反応を誘発しない。以上の結果は、脊髄後角における PAC1 受容体シグナリングが痛みの慢性化に関与するということを強く示唆する成果であり、新しい慢性疼痛モデルマウスの確立という意義も含めて極めて新しい知見である。

また我々は、Maxadilan 髄腔内投与マウスの脊髄後角における遺伝子発現を、GeneChip マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、変動する多くの遺伝子を同定した。Maxadilan 投与により発現が変動する遺伝子は PAC1 受容体の下流で制御されていると考えられる。発現が変動した遺伝子には神経可塑性に関与するような遺伝子が多く含まれており、このような分子は痛みの慢性化に深く関与している可能性がある。また受容体やチャネル、酵素など創薬のターゲットとなり得る遺伝子も多く含まれていることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

帯状疱疹後神経痛や三叉神経痛などの神

経障害性疼痛は、その激しい痛みが慢性化することで生活の質（QOL）は著しく低下し、痛みが原因でうつ症状に陥る場合もある。現在のところ、このような慢性疼痛に有効な鎮痛薬は少なく、痛みが慢性化するメカニズムは不明な点が多い。

前述したように、申請者のグループは最近、PACAP 特異的受容体 PAC1 受容体を選択的なアゴニスト Maxadilan をマウス髄腔内に注射すると、長期の疼痛様反応を誘発すること新しく見出した。すなわち、脊髄 PAC1 受容体シグナリングが痛みの慢性化に重要な役割を果たしていることが示唆される。本研究では、この Maxadilan 誘導性の慢性疼痛モデルを用い、以下の点について明らかにする。

PAC1 受容体の下流で変動する一連の遺伝子について、分子機能や発現動態などを詳細に調べ、疼痛慢性化のメカニズムを明らかにする。

PAC1 受容体とその下流で疼痛の慢性化に関わる分子について、拮抗・阻害化合物のデザインおよび合成と薬効評価を行う。

以上のような研究を遂行することで、新たな慢性疼痛治療薬の創薬を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) Maxadilan 誘導性長期アロディニア発症メカニズムの解明

実験動物と脊髄くも膜下腔内投与

実験には ddY マウス（6 週齢， ）を使用した。脊髄くも膜下腔内投与は、Hylden & Wilcox 法（Hylden & Wilcox, Eur J Pharmacol, 1980）により投与した。すなわち、27 ゲージの注射針をマウス腰部 L5/6 脊椎間に穿針し、マイクロシリンジを用いて 5  $\mu$ L の用量で薬液（Maxadilan など）を投与した。

疼痛様行動（自発痛とアロディニア）の測定

（自発痛様行動）Maxadilan 脊髄くも膜下腔内投与後、下半身の licking/biting/scratching が誘発される。この行動を自発痛様行動とし、ビデオカメラによる撮影と再生により回数をカウントした。

（後肢アロディニアの測定）von Frey filament を用いて測定する。すなわち、マウス後肢に von Frey filament を用いて機械刺激を加え、50% 反応閾値を算出して機械的アロディニア反応を評価した。

遺伝子およびタンパク発現の確認および発現部位（発現細胞）の同定

Maxadilan 投与 30 分後の脊髄から RNA を抽出し、GeneChip マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、1.5 倍以

上に変動した遺伝子が 338 個（up: 145 個，down: 193 個）同定された。本研究では、の遺伝子発現のタイムコースや発現パターンなどを、リアルタイム PCR および western blot により検討し、発現挙動を解析した。組織における発現および発現局在は、in situ hybridization 法や蛍光免疫染色により検討した。

リコンビナントタンパクあるいは阻害剤投与による検討（in vivo 実験）

変動した遺伝子について、そのリコンビナントタンパクを作製し、マウスの脊髄くも膜下腔内に投与した。投与後の自発痛様行動および長期のアロディニア反応が誘発されるかどうかを検討した。なお、本研究では、Cysteine-rich protein 61 (Cyr61) に着目し、研究を遂行した。

in silico screening による阻害化合物のデザイン

変動した遺伝子について、それを阻害する化合物を in silico screening 法によりデザインし、細胞を用いた薬理的アッセイを行った。本研究では約 4.2 倍に発現が上昇した核内受容体 A について検討した。すなわち、核内受容体 A のリガンド結合部位にファーマコホアを定義し、ファーマコホアにドッキングできるような化合物を約 400 万化合物の中からスクリーニングした。デザインされた化合物は CHO 細胞を用いたレポーターアッセイ方により、ヒット化合物を探索した。

### 4. 研究成果

(1) Cyr61 と疼痛

Maxadilan 髄腔内投与マウスの脊髄後角における遺伝子発現を、GeneChip マイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、Cysteine-rich protein 61 (Cyr61) の遺伝子発現が約 9.4 倍に上昇していた。Cyr61 は、4 つの重要な機能ドメインを有する matricellular protein であり（図 1 参照）、これまでに、細胞接着や遊走、DNA 合成、細胞の生存・分化、血管新生、骨形成など様々な機能を有することが報告されている（Lau, Cell Mol Life Sci, 2011）。また、Cyr61 はその分子内に複数のインテグリン結合ドメインを有しており、細胞膜表面のインテグリンやヘパラン硫酸に結合することで、多彩な機能を発揮することが報告されている（Lau, J Cell Commun Signal, 2016）。Cyr61 は中枢神経系においても発現分布が確認されており、神経細胞の分化や、神経細胞保護に重要な役割を担っていることが報告されている（Malik et al., Front Cell Neurosci, 2015）。しかしながら、現在のところ Cyr61 と疼痛との関連性に関する報告はない。そこで、Cyr61 と疼痛との関連性を検討した。

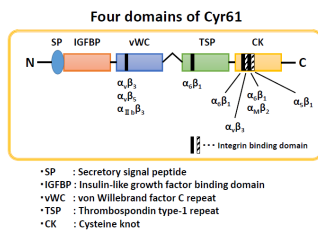


図1 Cyr61のタンパク構造

まずリアルタイムPCR法により脊髄におけるCyr61 mRNA発現のタイムコースを調べたところ、PACAPあるいはMaxadilanの投与30分後をピークとして顕著な発現の増大が見られた(図2)。免疫染色法により発現の局在を調べたところ、脊髄後角に強く発現し、これらは神経細胞マーカーであるNeuNと共局在した(data not shown)。

Real-time PCR analysis of the expression level of Cyr61 mRNA in the spinal cord of mice given intrathecal PACAP or Maxadilan

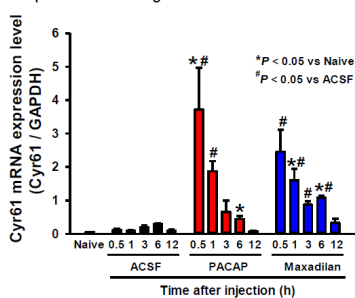


図2 リアルタイムPCR法によるCyr61 mRNAの発現解析

Cyr61が痛みに関与するかどうかを調べる目的で、リコンビナントタンパクを作製し、マウスの脊髄にも膜下腔内に投与した。自発痛様の嫌悪行動は確認されなかったものの、投与後1時間より機械的アロディニアが観察され、少なくとも3-5日間持続した(図3)。機械的アロディニアの程度はCyr61の濃度依存的であった。

Intrathecal injection of recombinant Cyr61 induces mechanical allodynia in mice

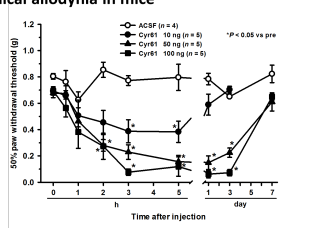


図3 Cyr61の髄腔内投与による機械的アロディニアの発症

次にCyr61によって誘発される疼痛メカニズムを解析する目的で、脊髄後角、初代培養神経細胞およびアストロサイト、それぞれのモデル細胞株(NG108-15およびC6 glioma cells)における遺伝子発現を検討した。Cyr61はサルの網膜細胞において痛みと関連するケモカインであるCCL2の発現を上昇させると言う報告から、CCL2 mRNAの発現を検討した。脊髄後角および神経細胞、アストロ

サイトのいずれにおいてもCyr61は、CCL2 mRNAの発現を増大させた(図4)。

Recombinant Cyr61 induces CCL2 (MCP-1) mRNA expression in neurons, astrocytes, and spinal dorsal horn

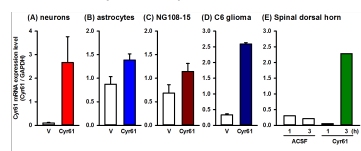


図4 Cyr61によるCCL2 mRNAの発現

Cyr61はタンパク構造内にインテグリン結合ドメインを多く有し、様々な細胞においてインテグリンを介して機能する。そこでCCL2 mRNAの発現に関与するインテグリンを同定する目的で、siRNAを用いてインテグリン(1, 3, および5)をノックダウンし、CCL2 mRNAの発現を検討した。細胞はC6 gliomaを使用した。その結果、インテグリン1のノックダウンによりCCL2 mRNAの発現が顕著に減少したことから、Cyr61によるCCL2 mRNAの発現はインテグリン1を介していることが明らかとなった。

Cyr61はタンパク構造内に4つの重要な機能ドメインを有する(図1)。そこで、どのドメインがCCL2 mRNAに重要な役割を果たすか検討する目的で、様々なドメイン欠損タンパクを作製し、CCL2発現誘導に及ぼす効果を検討した。その結果、ドメイン(N末)およびドメイン(C末)を欠損してもCCL2の発現は誘導されたが、中央ドメイン(ドメインおよび)の欠損により一部CCL2の発現が抑制された。したがってCCL2の発現誘導にはCyr61の内部ドメインが重要であることを明らかにした。今後は、これら欠損タンパクをマウスの髄腔内に投与し、疼痛が誘導されるかどうか検討中する必要がある。

(まとめ)

Cyr61がマウスにおいて疼痛様行動を誘発することを初めて見出した。PACAP-PAC1受容体のシグナリングによって誘発される疼痛反応には少なくとも一部、Cyr61とCyr61によって誘導されるCCL2が関与することが示唆される。インテグリン1のノックダウンによりCCL2 mRNAの発現が減少したが、今後はインテグリン1 KOマウスにおける疼痛様行動を調べるなどし、インテグリン1をターゲットとした創薬の展開が有用であるかどうかの検討が必要である。

(2) 核内受容体をターゲットとした創薬

Maxadilan 髄腔内投与マウスの脊髄後角における遺伝子発現を、GeneChipマイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、核内受容体Aの遺伝子発現が約4.2倍に上昇していた。この核内受容体はリガンドが未同定であり、痛みとの関連性も明らかでない。そこで核内受容体Aが痛みに関与するかどうかを調べる目的で、in silico screeningによる核

内受容体アンタゴニストのデザインと薬理学的評価を行った。

核内受容体 A のタンパク質構造をもとにリガンド結合ドメインにファーマコホアを定義し、*in silico* screening により約 400 万化合物のライブラリの中から候補化合物を選出した。その結果 10 個 (NRA-1~10 と命名) が見出された。

核内受容体 A とその応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターベクターを CHO 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、10 化合物のうち 2 化合物 (NRA-5 および 8) において、用量依存的な抑制効果が観察された。

(まとめ)

当該核内受容体をターゲットとした創薬の展開は他に類がないことから、有用な化合物が見つければ新しいタイプの鎮痛薬となることが期待できる。現在、NRA-8 が PACAP 誘導性の疼痛様行動を抑制することができるかどうか早急に検討中である。また、NRA-8 をリード化合物とした新規誘導体化合物の合成も展開中である。

#### 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 2 件)

1. Fukuchi M, Kanesaki K, Takasaki I, Tabuchi A, Tsuda M. Convergent effects of Ca(2+) and cAMP signals on the expression of immediate early genes in neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 466(3): 572-7, 2015. 査読有

2. Fukuchi M, Tabuchi A, Kuwana Y, Watanabe S, Inoue M, Takasaki I, Izumi H, Tanaka A, Inoue R, Mori H, Komatsu H, Takemori H, Okuno H, Bito H, Tsuda M. Neuromodulatory Effect of G<sub>s</sub>- or G<sub>q</sub>-Coupled G-Protein-Coupled Receptor on NMDA Receptor Selectively Activates the NMDA Receptor/Ca<sup>2+</sup>/Calcieneurin/cAMP Response Element-Binding Protein-Regulated Transcriptional Coactivator 1 Pathway to Effectively Induce Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in Neurons. *J Neurosci.* 35(14): 5606-24, 2015. 査読有

[学会発表](計 13 件)

1. 磯 芹奈, 高原理行, 合田浩明, 宮田篤郎, 栗原 崇, 豊岡尚樹, 高崎一朗. 新規鎮痛薬の開発を目指した核内受容体 Nr4a1 アンタゴニストの創製. 第 90 回日本薬理学会年会,

2016 年 3 月 15-17 日, 長崎(長崎ブリックホールほか)

2. 加藤 翔, 宮田篤郎, 栗原 崇, 高崎一朗. PACAP 誘導性機械的アロディニアと神経突起伸長における Btg2 の関与に関する研究. 第 90 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 15-17 日, 長崎(長崎ブリックホールほか)

3. 柴崎知華, 渡辺 藍, 栗原 崇, 宮田篤郎, 豊岡尚樹, 高崎一朗. ニトログリセリン誘発偏頭痛モデルマウスを用いた新規 PAC1 アンタゴニストの評価. 第 90 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 15-17 日, 長崎(長崎ブリックホールほか)

4. 長島涼太, 上田隆弘, 渡辺 藍, 岡田卓哉, 栗原 崇, 宮田篤郎, 豊岡尚樹, 高崎一朗. 種々疼痛モデルマウスにおける新規 PAC1 アンタゴニストの薬理学的評価. 第 90 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 15-17 日, 長崎(長崎ブリックホールほか)

5. 高崎一朗. 難治性疼痛治療を目指した PACAP 特異的受容体アンタゴニストの開発. 2016 年度痛み研究会 2017 年 1 月 30-31 日, 岡崎(生理学研究所・岡崎コンファレンスセンター)

6. 長島涼太, 上田隆弘, 渡辺 藍, 岡田卓哉, 栗原 崇, 宮田篤郎, 豊岡尚樹, 高崎一朗. 種々疼痛モデルマウスにおける新規 PAC1 受容体アンタゴニストの薬理学的評価. 日本薬学会北陸支部第 128 例会, 2016 年 11 月 27 日, 金沢(北陸大学薬学部アネックスホール)

7. Takasaki I, Maeda T, Yokai M, Miyata A, Kurihara T. Involvement of spinal Cyr61 in PAC1 receptor-mediated long-term mechanical allodynia in mice. 16th World Congress on Pain (Yokohama), 2016 年 9 月 26-30 日, 横浜

8. 渡辺 藍, 岡田卓哉, 福地 守, 合田浩明, 栗原 崇, 宮田篤郎, 豊岡尚樹, 高崎一朗. *In silico* and pharmacological screening identify novel PAC1 receptor antagonists. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9-11 日, 横浜(パシフィコ横浜)

9. 前田辰則, 中西秀行, 用皆正文, 宮田篤郎, 栗原 崇, 高崎一朗. Involvement of Cyr61 in PACAP-specific receptor-induced long-term allodynia. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9-11 日, 横浜(パシフィコ横浜)

10. 渡辺 藍, 岡田卓哉, 福地 守, 合田浩明, 栗原 崇, 宮田篤郎, 豊岡尚樹, 高崎一朗. 新規鎮痛薬の開発を目指した PAC1 受容体アンタゴニストの創出と薬理学的評価. 日本

薬学会北陸支部第 127 回例会，2015 年 11 月 15 日，富山（富山大学杉谷キャンパス）

11. 前田辰則，中西秀行，栗原 崇，宮田篤郎，高崎一朗. PACAP および Maxadilan 誘導性の長期アロディニア反応における 脊髄 Cyr61 の関与に関する研究. 第 66 回日本薬理学会北部会，2015 年 9 月 18 日，富山（富山国際会議場）

12. 前田辰則，中西秀行，栗原 崇，宮田篤郎，高崎一朗. PACAP および Maxadilan 誘導性の長期アロディニア反応における 脊髄 Cyr61 の関与. フォーラム富山「創薬」第 41 回研究会，2015 年 5 月 28 日，富山（オークスカナルパークホテル富山）

13. 渡辺 藍，栗原 崇，宮田篤郎，豊岡尚樹，高崎一朗. PAC1 受容体アンタゴニストの創出と薬理的評価. フォーラム富山「創薬」第 41 回研究会，2015 年 5 月 28 日，富山（オークスカナルパークホテル富山）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www3.u-toyama.ac.jp/yakuri/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高崎一朗 (TAKASAKI ICHIRO)  
富山大学  
大学院理工学研究部 (工学)・准教授  
研究者番号：00397176

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

栗原 崇 (KURIHARA TAKASHI)  
鹿児島大学  
医歯学総合研究科 (医学)・准教授  
研究者番号：60282745

豊岡尚樹 (TOYOOKA NAOKI)  
富山大学  
大学院理工学研究部 (工学)・教授  
研究者番号：10217565

合田浩明 (GOUDA HIROAKI)  
昭和大学・薬学部・教授  
研究者番号：60276160