

令和元年6月21日現在

機関番号：34309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08676

研究課題名(和文)新規疼痛抑制ペプチドのラット神経系からの単離精製とそのバイオアッセイ法の確立

研究課題名(英文) Development methods of isolation of novel anti-allodynic peptide from cerebral tissue of rats and methods of bioassay for anti-allodynic activity

研究代表者

池田 哲也 (IKEDA, TETSUYA)

京都橘大学・健康科学部・教授

研究者番号：20264369

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)：初年度に行ったマウスの予備実験で、脳組織から抗アロディニア活性物質を精製する事ができたが、構造分析を行うには微量すぎた。ラット脳組織からの単離にも大量のラットが必要と思われた。一般的に脊椎動物であれば共通性の高い神経活性物質を含有しているため、本実験では入手が容易なニワトリの脳組織からAPGWamide様の抗アロディニア神経ペプチドの単離精製を試みた。800羽分のニワトリ脳組織から2種の抗アロディニア活性物質を単離し、AIS(Allodynia inhibitory substance)1,2と名付けた。質量分析の結果、AIS1は分子量を確定することができたが、構造決定までは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でニワトリ脳組織より単離精製した抗アロディニア活性物質AIS1、AIS2は非常に微量で有りながら神経因性疼痛に対して強い抑制活性を示す。神経因性疼痛においては、既存の鎮痛薬の効果が乏しく、新規の鎮痛薬の開発が急務となっている。AIS1、2の構造を明らかにすることができれば、合成物を作り、生理機能や作用機序を詳細に研究することによって、新たな神経因性疼痛治療薬の開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In preliminary experiment, a novel substance exhibited anti-allodynic activity has been isolated from cerebral tissue of mice (1000 animals) in the first year of this investigation program. But the purified substance was too small amount to analyze that molecular structure. When we isolate anti-allodynic substances from rat cerebral, a great deal of rats beyond a schedule are needed. In generally, common neuropeptides and neuroactive substances are distributed in the brain of vertebrate. From the above reason, we decided to isolate APGWamide-like anti-allodynic peptide from a cerebral tissue of chicken that get easily. Two anti-allodynic substances were isolated from 800 chicken brains and named AIS (allodynia inhibitory substance)1 and AIS2, respectively. AIS1 determined the molecular weight as a result of the mass spectrometric analysis, but it is not determined come to structural determination.

研究分野：疼痛学

キーワード：慢性疼痛 糖尿病性疼痛 神経因性疼痛 APGWamide アロディニア 神経ペプチド HPLC 疼痛

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

痛みは侵害刺激に対する警告信号であり、組織損傷を防ぐための防御反応への入力としてなくてはならない感覚の1つである。しかしながら、神経痛や癌性疼痛、糖尿病性疼痛に代表される神経因性(障害性)疼痛は慢性疼痛疾患の一種であり、痛み本来の“警告信号”という意味は既に失われており、痛みそれ自体が障害となっている。これら神経因性疼痛は、特徴的な症状として、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。また、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-NH<sub>2</sub>)に注目した。

APGWamideは軟体動物門の他の動物にも広く分布しており、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ていなかった。

我々は、APGWamideがセロトニン調節作用を介して、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が糖尿病性神経因性疼痛モデルラットや坐骨神経結紮モデルラットへの脊髄腔内投与によって、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。また、その活性が、セロトニンレセプターとノルアドレナリンレセプターを介していることを行動薬理学的手法とc-Fosタンパク(侵害受容のマーカータンパク)の免疫組織化学によって明らかにしてきた。また、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見出した。(科学研究費基盤研究(C), 23590716, H23-H25: 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)。

一方、鎮痛薬として、モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬、アスピリンやイブプロフェン、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。麻薬性鎮痛薬に至っては、中枢への作用から嗜癖性の問題があり、薬物乱用につながる可能性が排除できない。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おらず、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。さらに、APGWamideやそのアナログペプチド(PGWamide、GWamide)が抗うつ薬類と比べて極めて低濃度で抗アロディニア効果を発揮することから、ラットの神経系にAPGWamide様の抗アロディニア活性を持つ内因性の神経ペプチドが存在する事が予想できた。内因性の抗アロディニア活性物質を単離精製し、その構造を明らかにすることができれば、新たな神経因性疼痛治療薬の開発につながることが期待できる。

### 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(神経因性疼痛治療薬)は必要不可欠であり、喫緊の課題でもある。本研究の目的はAPGWamide様の抗アロディニア活性を有する新規神経ペプチドを哺乳類であるラットの神経系から単離精製し、効果的な新規神経因性疼痛治療薬開発のための基盤となる研究を目的に計画するものである。そのためには、まず、神経因性疼痛モデルラットの疼痛行動をアッセイ系にした効率的なバイオアッセイ法を確立する。次に、APGWamide様抗アロディニア活性を持つ新規ペプチドを脳神経組織から単離精製する。さらに、単離した新規神経ペプチドの生理活性並びにそのラット脳内での分布を明らかにする。の3点である。

### 3. 研究の方法

当該計画では、ラットの脳神経組織抽出液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC)を用いて分画し、得られた画分を糖尿病性神経因性疼痛モデルラットの髄腔内に投与する。後肢足底への機械的刺激 (von Frey フィラメント)によって観察される神経因性疼痛 (アロディニア) に対する軽減効果を指標にアッセイし、抗アロディニア活性の見られた画分を集める。さらに HPLC を用いた分取と糖尿病性神経因性疼痛モデルラットによるアッセイを繰り返し、APGWamide 様の抗アロディニア活性を持つ新規神経ペプチドを単離する。単離精製した神経ペプチドをアミノ酸分析、アミノ酸配列分析、質量分析にかけ、構造を決定する。その結果を基に新規ペプチドを合成し、抗アロディニア活性を詳細に調べる。さらに、新規ペプチドに対する抗体を作製し、ラットの脳や脊髄で免疫組織化学を行い、ラット脳脊髄内の分布を調べる予定であった。

しかしながら、計画年度の初年度に行ったマウス (1000 頭分) の脳組織を用いた予備実験において、抗アロディニア活性物質を単離精製する事ができたが、最終精製物が極めて微量で、アミノ酸分析、アミノ酸配列分析で何も検出することができなかった。結果として、予備実験に用いた脳組織の 10 倍以上が必要という結論になり、ラットの脳に換算すると最低でも 2500 頭が必要となった。決められた予算内でこれだけのラットを購入して脳組織を取り出すのは現実的ではない。そこで、一般的に同じ脊椎動物であれば共通性の高い神経ペプチドや神経活性物質を含有しているので、入手が容易なニワトリの脳組織から APGWamide 様の抗アロディニア活性を持つ新規神経ペプチドの単離精製を試みることにした。抗アロディニア活性物質の単離精製のスタートをラットの脳組織からニワトリの脳組織に変更する事になったが、精製方法やバイオアッセイの方法には当初の予定とまったく変更はない。

### 3-1. 糖尿病性神経因性疼痛モデルラットの作製

本実験にはすべて体重約 300g (7-8 週齢) の Sprague-Dawley(SD)系雄ラット (250-300g) を用い、室温を 25°C、12 時間毎の明暗サイクルで飼育した。ラット脳脊髄抽出物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°C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。ソムノペンチル麻酔下でラットの後頭骨と第 1 頸椎の間 (大槽)の硬膜を切開し、作成したカテーテルをクモ膜下腔に挿入し、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留置した。カテーテルが抜けないように絹糸で固定し、切開した皮膚を縫合した。カテーテル挿入約 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に用いて、糖尿病性神経因性疼痛モデルラット (糖尿病モデルラット) を作製した。ラットの尾静脈からストレプトゾトシン (STZ)を投与することによって膵臓の  $\beta$  細胞を破壊し、インシュリンを枯渇させる。STZ 投与後数日で血糖値は上昇し、常に高い状態が維持される。2-3 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、蝕刺激でも回避する、つまりアロディニアを示すようになる。

### 3-2. ニワトリ脳組織からの APGWamide 様抗アロディニア活性物質の単離精製

ニワトリ 800 羽を断頭し、脳 (大脳、間脳中脳、小脳、延髄、頸髄の一部) 組織を取り出し、マイナス 80°Cにて保管。ニワトリ脳全量 (2198 g) を 14L の蒸留水で 10 分間煮沸後、濃酢酸を添加し 1N にする。ホモジナイザーとポリトロンを用いてホモジナイズする。遠心分離機で遠沈した後、上清液を集め、ロータリーエバポレーターで約 1/10 に濃縮する。冷蔵庫の中でアセトンを加え、一晚攪拌し、アセトン沈殿を除去し、上清を集める。ロータリーエバポレーターでアセトンを蒸発させ、等量の 0.1%TFA を加え攪拌。Sep-Pak C18 に通し、吸着された物質を 60%アセトニトリル/0.1%TFA で溶出後、アセトニトリルを蒸発させ、濃酢酸を添加し 1N にする。SP Sephadex C-25 にて陽イオン交換し、吸着した物質を酢酸で溶出した後、Sep-Pak C18 に吸着された物質を凍結乾燥。

凍結乾燥された抽出物を 1N の酢酸で溶解し、セファデックス G50 でゲル濾過 (15ml/hr) する。糖尿病モデルラットで抗アロディニア活性を示した画分を Sep-Pak C18 に吸着させ 60%アセトニトリル/0.1%TFA で溶出。濃縮した後、陽イオン交換 HPLC (TSKgel CM-2SW) で分画。活性画分を Sep-Pak C18 にかけた後さらに、同じ陽イオン交換 HPLC (TSKgel CM-2SW) で条件を変えて分画。活性画分を Sep-Pak C18 にかけた後、逆相 HPLC (Waters Symmetry (C18)) で最終精製を行った。

### 3-3. 神経因性疼痛 (アロディニア) の測定 : バイオアッセイ

バイオアッセイには von Frey テストを用いた。von Frey テストとはアロディニアの強度を判定する一般的なテストで、数種類のフィラメントを用いる。本実験では 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、足を動かさず、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。

ニワトリ脳組織抽出物を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 テストを行った。

### 3-4. 最終精製物の構造解析

HPLCに接続したタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた。ペプチドであれば、アミノ酸配列も同時に決定することができる。質量分析計は高感度の Orbitrap 質量分析計(Thermo scientific)を用いて分子量を測定した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 抗アロディニア活性物質の単離精製

ゲル濾過(Sephadex G-50, 15ml/hr)で80フラクションに展開した画分の1/100量を0.05% BSA溶液に採取し、凍結乾燥した。3フラクションを1つにまとめ、バイオアッセイを行った。その結果1つの活性ピークが見られた(図1)。

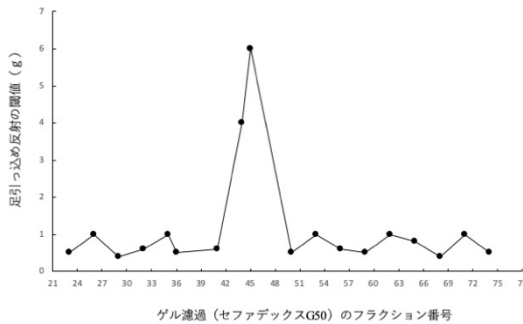


図1 ゲル濾過画分のバイオアッセイ(60min)

糖尿病性神経因性疼痛モデルラットは von Frey テストで 1g 以下の閾値で回避行動を示していたが、ゲル濾過画分の溶出物を投与すると最大で 6g 以上まで閾値が上昇した。十分な抗アロディニア活性を示したので、糖尿病性神経因性疼痛モデルラットの von Frey テストがバイオアッセイ系として利用できることが分かった。

さらに 1 フラクションずつアッセイした結果、フラクション 43-44 とフラクション 46-47 の 2 カ所に抗アロディニア活性が見られた。それぞれのフラクションをまとめ、HPLC を用いてさらに精製した結果、2 種の最終精製画分を得ることができ、それぞれ Allodynia 抑制物質 (allodynia inhibitory substance: AIS) 1, 2 と名付けた (図 2, 3)。

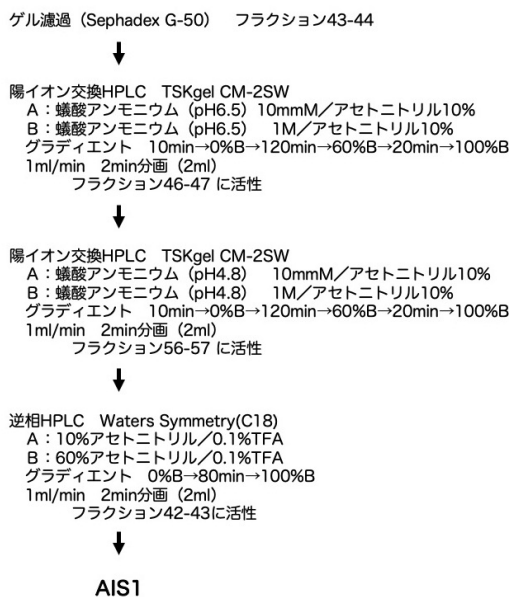


図2 AIS1の精製過程

ゲル濾過 (Sephadex G-50) フラクシオン46-47



陽イオン交換HPLC TSKgel CM-2SW

A : 蟻酸アンモニウム (pH6.5) 10mmM/アセトニトリル10%

B : 蟻酸アンモニウム (pH6.5) 1M/アセトニトリル10%

グラディエント 10min→0%B→120min→60%B→20min→100%B

1ml/min 2min分画 (2ml)

フラクシオン47-48 に活性



陽イオン交換HPLC TSKgel CM-2SW

A : 蟻酸アンモニウム (pH4.8) 10mmM/アセトニトリル10%

B : 蟻酸アンモニウム (pH4.8) 1M/アセトニトリル10%

グラディエント 10min→0%B→120min→60%B→20min→100%B

1ml/min 2min分画 (2ml)

フラクシオン58-59 に活性



逆相HPLC Waters Symmetry(C18)

A : 10%アセトニトリル/0.1%TFA

B : 60%アセトニトリル/0.1%TFA

グラディエント 0%B→80min→100%B

1ml/min 2min分画 (2ml)

フラクシオン42-44に活性



**AIS2**

図3 AIS2の精製過程

AIS1の最終精製物のバイオアッセイの結果を示す。von Frey テストで1g以下の閾値を7g以上に回復させた(図4)。

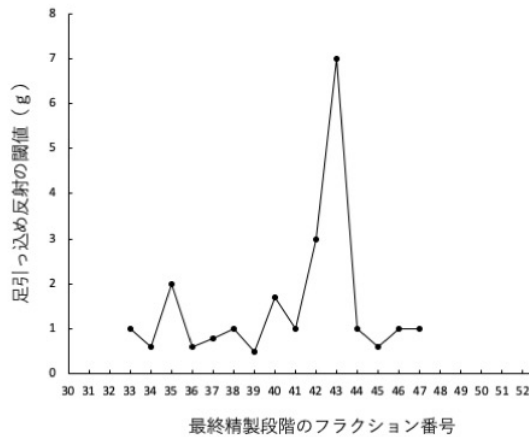


図4 AIS1の最終精製バイオアッセイ

#### 4-2. 最終精製物の質量分析

最終精製物 AIS1 を HPLC に接続したタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、分子量を測定した。その結果  $m/z$  205.079 のピークが観察された(図5)。

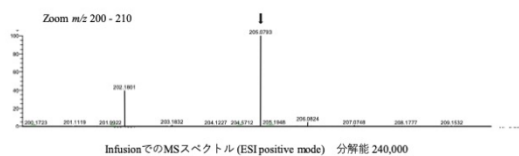


図5 AIS1の質量分析結果

AIS2は質量分析の結果、夾雑物が有ったため、正確な分子量は決定できなかった。興味深いことに、AIS1と同じ分子量の物質も観察されており、AIS2の活性はAIS1が混ざっていたた

めではないかとも考えられる。なぜ HPLC で異なる画分に分かれたのかは不明である。

本研究で新規抗アロディニア活性物質をニワトリ脳組織から単離精製することができた。当初の予想と違って APGWamide 様のペプチドでは無かった。分子量からまったく新規の化合物であることは間違いないが、最終精製量が非常に少なく、構造を決定するまでには至っていない。今後の展開としては NMR 等を用いて、分子構造を解明していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 5 件)

Tetsuya Ikeda, Ryuichiro Takeda and Yasushi Ishida

Antiallodynic activity of APGWamide appears in the same manner as that activity of antidepressant, milnacipran

日本比較生理生化学会第 40 回神戸大会, 神戸, 2018

池田哲也, 神谷莉香, 武田龍一郎, 石田康

軟体動物由来の神経ペプチド, APGWamide, の神経因性疼痛ラットに対する鎮痛効果

日本動物学会第 88 回富山大会, 富山, 2017

池田哲也, 神谷莉香, 武田龍一郎, 石田康

糖尿病ラットにおける熱アロディニアに対する APGWamide の抑制効果

第 39 回日本神経科学大会, 横浜, 2016

Tetsuya Ikeda, Rika Kamiya, Ryuichiro Takeda and Yasushi Ishida

APGWamide analogue peptides showed potent antiallodynic activity in the rats with diabetic neuropathy

第 40 回日本比較内分分泌学会・第 37 回日本比較生理生化学会 合同大会, 広島, 2015

神谷莉香, 瀧本真由美, 武田龍一郎, 石田康, 池田哲也

糖尿病ラットに対する APGWamide アナログペプチドの抗アロディニア効果

第 38 回日本神経科学大会, 神戸, 2015

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：安部 博史

ローマ字氏名：Abe, Hiroshi

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：理科学部臨床心理学科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：20344848

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。