

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：34309  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2020～2023  
課題番号：20K07768  
研究課題名（和文）難治性の神経因性疼痛を抑制する脳由来新規生理活性物質の構造決定と生理作用の解析

研究課題名（英文）Structure determination and physiological effect analysis of a novel brain-derived physiologically active substance that suppresses intractable neuropathic pain

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、神経因性疼痛モデルラットのアロディニア（疼痛行動）をバイオアッセイ系に用い、ニワトリ脳神経系から新規抗アロディニア物質を単離精製することを目的としている。軟体動物由来神経ペプチド、APGWamideがラットのアロディニアに対して鎮痛作用を示すことから、同様な疼痛抑制ペプチドが脊椎動物にも存在する可能性を考えた。その結果、ラット疼痛モデルのアッセイ系を確立し、1000羽分のニワトリ脳組織から2種類の精製物を得ることができた。残念ながら最終精製物の絶対量が少なく、構想を決定することは出来なかった。アッセイ系開発の過程で、APGWamide類のアナログペプチドを用いた構造活性関係も調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
神経因性疼痛は難治性で有効な治療薬の開発が望まれている。神経因性疼痛モデルラットの行動実験をバイオアッセイに用いて新規生理活性物質を探索することは、本研究の最大の特徴であり、他に例を見ない独創的な手法である。今回2種類の新規疼痛抑制物質を単離できた。構造解析までは至らなかったが、新たな疼痛抑制物質を単離する方法の開発に貢献できたと考えている。さらに、軟体動物の神経ペプチドであるAPGWamideの神経因性疼痛に対する鎮痛効果の構造活性関係も解析し、N-末端のアミノ酸残基が活性の発現に重要な役割を果たしていることがわかった。この結果を基に新たな鎮痛薬の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to isolate and purify a novel anti-allodynic substance from the chicken nervous system using allodynia of a neuropathic pain model rat as a bioassay system. Since APGWamide, a molluscan neuropeptide, exhibits analgesic effects on allodynia in rats, we considered the possibility that similar anti-allodynic peptides exist in vertebrates. As a result, we were able to (1) establish an assay system for a rat pain model, and (2) obtain two types of purified products from 1000 chicken brain tissues. Unfortunately, the absolute amount of the final purified product was small, and the structure could not be determined. In the process of developing the assay system, we also investigated the structure-activity relationship using analog peptides of APGWamide.

研究分野：神経生物学

キーワード：allodynia APGWamide 神経因性疼痛 神経障害性疼痛 慢性疼痛 CCI CCIモデルラット 絞扼性神経損傷モデル

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、神経痛やがん性疼痛を代表とする神経因性疼痛（神経障害性疼痛）は高齢化社会の進展とともに患者数が増加している。特にその特徴的な症状であるアロディニア（異痛）は痛覚以外の触覚等の非侵害性刺激を痛みとして感じる病的疼痛状態で、抗炎症薬等の既存の鎮痛薬ではその疼痛を軽減するのが難しく疼痛患者の QOL 改善の為にも新規の有用な鎮痛薬（抗アロディニア製剤）の開発が求められている。

研究代表者らは神経因性疼痛モデルラットを用いて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、Nakamura et al., *Eur. J. Pharmacol.* 738, 57-65, 2014；研究代表者著）。その課程で、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ことが示唆された。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、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絞扼性神経損傷モデルラット（chronic constriction injury (CCI) モデルラットへの脊髄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（抗アロディニア活性）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。（科学研究費基盤研究 (C) , 23590716 ,2011-2013：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）。軟体動物の神経ペプチドである APGWamide が抗アロディニア活性を示すと言うことは、同様の類縁ペプチドが哺乳類を含めた脊椎動物に存在する可能性が高いと考えられる。そこで、我々は脳組織の入手の容易さからニワトリの脳神経系から抗アロディニア活性を有する APGWamide 様の新規神経ペプチドの単離を試みた。その結果、強い抗アロディニア活性を示す物質の単離精製に成功したが、精製量が少なく構造決定には至らなかった（科学研究費基盤研究 (C) , 15K08676 , 2015-2018：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）。

本研究は、精製に使用するニワトリ脳の量、精製法を見直し、新規疼痛抑制物質を効率よく精製し、その構造を明らかにすることを目的とした。さらに、バイオアッセイ法を工夫し、効果的な新規神経因性疼痛治療薬開発のために APGWamide 類のアナログペプチドを用いた構造活性関係を解析することを目指した。

### 2. 研究の目的

本研究は、神経因性疼痛患者に見られるアロディニアの効果的な治療薬の開発を目指し、以下の 3 点を目的に計画する。ニワトリ脳神経系から新規抗アロディニア活性物質（疼痛抑制物質）の単離精製。単離精製した新規抗アロディニア活性物質の合成と活性の解析。ラット神経因性疼痛モデルを用いたバイオアッセイ法の確立と平行して APGWamide の構造活性相関の解析。神経因性疼痛モデルラットの行動実験（疼痛回避行動）をバイオアッセイに用いて新規生理活性物質を探索することは、本研究の最大の特徴であり、他に例を見ない独創的な手法である。新規抗アロディニア活性物質の探索と同時並行して、APGWamide のアナログペプチドを合成し、アミノ酸配列の変化と活性との相関の解析を進めていくことでより効果的な活性ペプチドの開発とバイオアッセイ法の確立ができるものと考えた。

### 3. 研究の方法

当該計画では、ニワトリ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 CCI 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アロディニアに対する軽減効果（抗アロディニア活性）を指標にアッセイし、活性の見られた画分を収集する。さらに HPLC を用いた分取と CCI 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。

#### 3-1. 絞扼性神経損傷（chronic constriction injury：CCI）モデルラットの作製

本実験には 8 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄ラットを用いた。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）でカテーテルを作製した。3 種混合麻酔

の深麻酔下でラットの後頭骨と第 1 頸椎の間の硬膜を切開し、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、前後肢共に運動障害が認められないラットを用いて、CCI モデルラットを作製した。ラットの左後肢の大腿骨付近の外側を切開し、大腿骨に沿って坐骨神経を露出する。血管と軟膜を除去し、2-4mm のポリエチレン製のチューブ (PE90) を縦に切り開き、坐骨神経を被覆する。術後 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、2g 以下の刺激 (触覚刺激) で回避行動を示すアロディニアが見られるようになる。

### 3-2. ニワトリ脳組織からの抗アロディニア活性物質の単離精製

ニワトリ 1000 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 (2818 g) を 14L の蒸留水で 10 分間煮沸後、濃酢酸を添加し全体が 1N の酢酸になるようにする。回転式のホモジナイザーとポリトロンを用いて脳全体を酢酸中でホモジナイズする。ホモジナイズした脳抽出液を遠心分離機で遠沈し、上清を集める。この抽出液を少しずつナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで約 1/10 になるまで濃縮する。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。再びロータリーエバポレーターを用いて、アセトンを蒸発させ、等量の 0.1% TFA を加え攪拌。全体を適量に分け、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、全体が 1N の酢酸になるよう濃酢酸を添加する。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、再び Sep-Pak C18 逆相クロマトを行い濃縮。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) し、分画する。得られた画分を CCI モデルラットでバイオアッセイし、抗アロディニア活性を示した画分を Sep-Pak C18 で濃縮した後、陽イオン交換 HPLC (TSKgel CM-2SW)、逆相 HPLC (Waters Symmetry (C18), Waters biphenyl, Chemco Semi-Micro) など数段階の HPLC 精製過程と CCI モデルラットでのバイオアッセイを繰り返し、抗アロディニア活性物質を単離精製した。

### 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 2g 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各精製段階で分画した画分から適当量凍結乾燥し、10 $\mu$ l の生理食塩水で溶解した。溶解液を留置したカテーテルを通して髄腔内に投与し、10 $\mu$ l の生理食塩水でフラッシュした。1 回のアッセイで 20 $\mu$ l 髄腔内に投与することになるが、投与そのものがラットの行動に影響することはなかった。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 テストを行い、アロディニアを観察した。

### 3-4. 最終精製物の構造解析

2 種類の最終精製物を得、AAC1 と AAC2 と名付けた。両方ともマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 質量分析計 (TOF-MS) を用いて、質量分析を行った。AAC1 は加えてアミノ酸配列分析も行った。

### 3-5. APGWamide N-末端アミノ酸置換アナログペプチド類のバイオアッセイ

APGWamide の N-末端のアミノ酸残基である Ala を他のアミノ酸に置換したアナログペプチドを合成した (業者に依頼)。置換したアミノ酸は Gly、Leu、Ile、Val、Phe、Trp、Arg、Lys、His、Asp、Tyr、Ser、Pro、Met、Cys の 15 種類で、生理食塩水に溶解しカテーテルを介して投与し、von Frey テストを行い抗アロディニア活性を調べた。

## 4. 研究成果

### 4-1. ニワトリ脳組織からの抗アロディニア活性物質の単離精製

ニワトリ 1000 羽分の脳組織をホモジナイズし、Sep-Pak C18 に吸着された物質を SP Sephadex C-25 にて陽イオン交換し、セファデックス G50 でゲル濾過 (15ml/hr) で溶出し分画した。各画分 50 $\mu$ l (3.3 羽分) を凍結乾燥し、生理食塩水に溶解してバイオアッセイした。

CCI モデルラットは von Frey テストで 2g 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の髄腔内投与で、フラクション ( fr. ) 46-48 と fr.50-52 の 2 箇所にて 6g 以上まで閾値が上昇する抗アロディニア活性のピークが見られた ( 図 1 )。

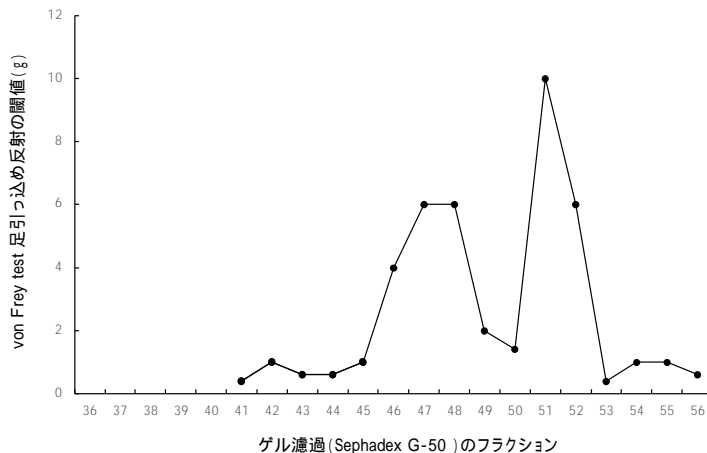


図 1 ゲル濾過フラクションのバイオアッセイ

fr.46-48 を 1 つにまとめ、陽イオン交換 HPLC ( TSKgel CM-25W ) 1ml/min で溶出。fr.56-57 に活性が有った。さらに、逆相 HPLC ( Waters Symmetry ) 1ml/min で溶出したところ、fr.42-43 に活性が見られた。活性画分を逆相 HPLC ( Waters biphenyl ) につ

き、溶出画分をバイオアッセイ。最後にもう 1 度逆相 HPLC ( Chemco Semi-Micro ) にかけて、最終精製物とした。最終精製物には Anti-allodynic chicken ( AAC ) 1 と名付けた。

fr.50-52 を 1 つにまとめ、陽イオン交換 HPLC ( TSKgel CM-25W ) 1ml/min で溶出。fr.53-54 に活性が有った。さらに、逆相 HPLC ( Waters Symmetry ) 1ml/min で溶出したところ、fr.32-33 に活性が見られた。活性画分を逆相 HPLC ( Chemco Semi-Micro ) にかけて、最終精製物とした。最終精製物には AAC2 と名付けた。

#### 4-2. AAC1 と AAC2 の構造解析

AAC1 をマトリックス支援レーザー脱離イオン化 ( MALDI ) 質量分析計 ( TOF-MS ) を用いて、質量分析を行った ( 図 2 )。

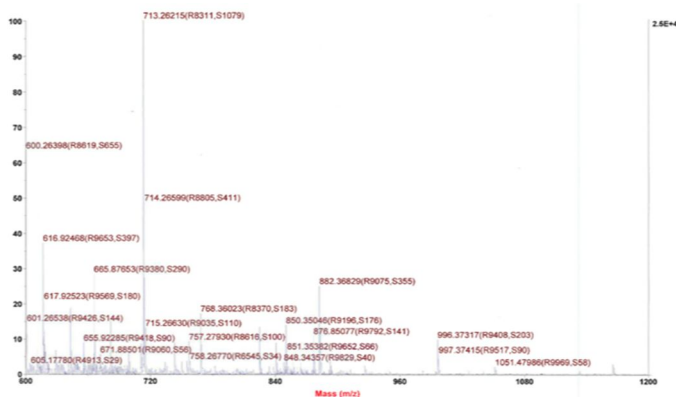


図 2 AAC1 の質量分析結果

質量分析の結果は、特異的なシグナルが検出できなかった。また、15pmol 相当量を用いてアミノ酸配列分析を行ったが、アミノ酸は検出できなかった。これらのことから、AAC1 はペプチドではない微量な活性物質である可能性が考えられる。しかしながら、今回の方法では構造を決定するまでには至らなかった。

AAC2 の MALDI-TOF-MS を用いた質量分析の結果を図 3 に示す。

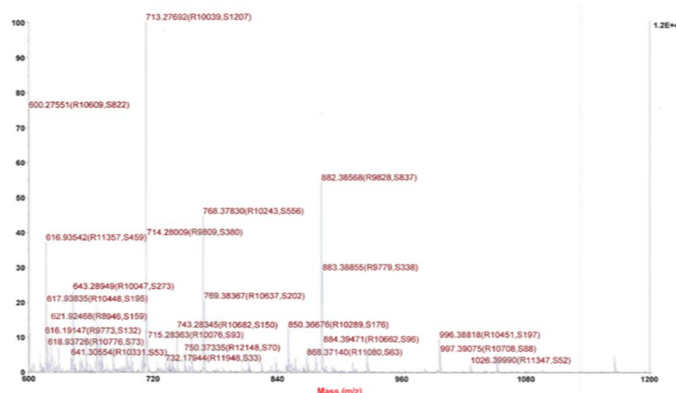


図 3 AAC2 の質量分析結果

質量分析の結果は、AAC2 も特異的なシグナルが検出できなかった。また、ペプチドの質量分析に有用な timsTOF-MS を用いて質量分析を行ったところ、11 種類のペプチドが検出された。しかしながら、再解析では検出することが出来なかった。実際にペプチドがあるのかノイズを検出したのか判断が難しい。

本研究で CCI ラットのアロディニア行動をバイオアッセイ系にして 2 種類の新規抗アロディニア活性物質をニフトリ脳組織から単離精製することができた。し

かしながら、当初の予想と違って APGWamide 様のペプチドを単離することは出来ず、単離精製した活性物質の構造決定までは至らなかった。抗アロディニア活性は有るのに質量分析で特異的なシグナルが検出できない原因は 2 つ考えられる。1 つは、最終精製物の収量が余りにも少ない

可能性である。活性から考えると、最終精製物のバイオアッセイで用いた量が APGWamide で換算して、10-4M の濃度で 10 $\mu$ l に相当すると考えられる。絶対量で 1 ナノモル。全体の 1/50 をアッセイに使っているので、全体の量が 50 ナノモル。アミノ酸の数にもよるが検出するには少なすぎるのかもしれない。2 つめの可能性はペプチド以外の有機物で分子量が小さく量も少ない可能性である。ノイズに紛れて検出できないのかもしれない。今後の展開としては、出発の脳組織の量を増やし、ロスが少ない抽出法や精製法を開発する必要があると思われる。

#### 4-3. APGWamide N-末端アミノ酸置換アナログペプチド類の構造活性相関

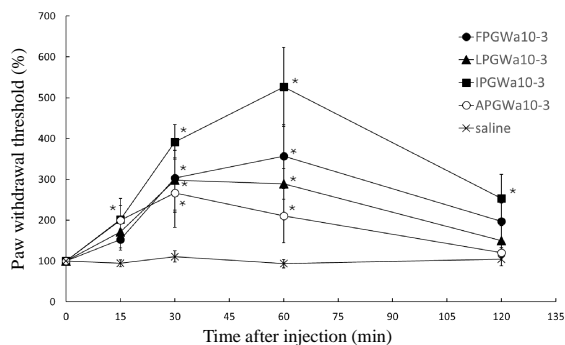


図 4 FPGWamide、LPGWamide、IPGWamide の抗アロディニア効果 (\* p<0.05)

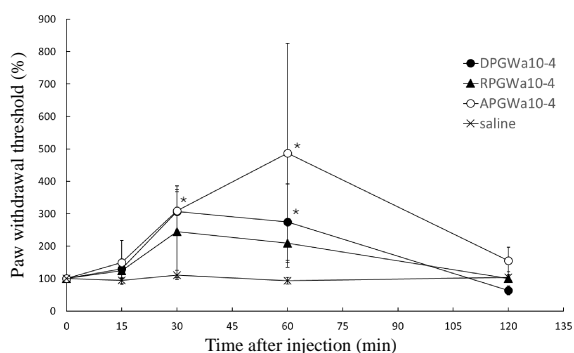


図 5 DPGWamide、RPGWamide の抗アロディニア効果 (\* p<0.05)

効果的な抗アロディニア鎮痛薬開発を目指して 3 つめの目的である APGWamide の構造活性関係の解析について述べる。APGWamide の N-末端のアミノ酸残基を置換した 15 種類のペプチドを合成した。抗アロディニア活性は von Frey テストで検証した。それぞれのアナログペプチドを生理食塩水に溶解し、カテーテルを介して髄腔内に投与した。投与後、15 分、30 分、1 時間、2 時間のタイムスケジュールで von Frey テストを行い、アロディニアを観察した。ペプチド類は 10-3M か 10-4M の濃度で 10 $\mu$ l 投与し、カテーテルを 10 $\mu$ l の生理食塩水でフラッシュした。代表的なアナログペプチドの効果を図 4 に示す。APGWamide の N-末端を疎水性アミノ酸である Phe、Leu、Ile に置換したアナログペプチドはいずれも有意に抗アロディニア活性を示した。特に Phe に置換したペプチドが最も効果が強かった。さらに、酸性アミノ酸 (図 5)、水酸基を持つアミノ酸、含硫アミノ酸、いずれも抗アロディニア活性を示した。ただし、塩基性アミノ酸である Arg、Lys、His に置換したペプチドはいずれも活性を失った。アミノ酸残基を置換することで活性が変化することがわかった。さらに、N-末端だけでなく、他のアミノ酸も置換することによってより効果の大きい鎮痛薬の開発につながる可能性が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryo Okumura, Jun Kato and Tetsuya Ikeda
2. 発表標題 The effect of a peptide hormone, oxytocin, on a rat model of neuropathic pain
3. 学会等名 44th Annual Meeting, Japanese Society for Comparative, Physiology and Biochemistry, Kochi
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Sawami, Ayumi Nakaya, Reina Fujimura, Futaba Nishikawa, Yuzuho Yoshii and *Tetsuya Ikeda
2. 発表標題 The effect of the analogue peptides of APGWamide on rat models of inflammatory and neuropathic pain
3. 学会等名 43rd Annual Meeting (online), Japanese Society for Comparative, Physiology and Biochemistry
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Kato, Ryo Okumura and Tetsuya Ikeda
2. 発表標題 Antiallodynic effect of APGWamide analogue peptides are subjected to the involvement of descending pain inhibitory system
3. 学会等名 45th Annual Meeting, Japanese Society for Comparative, Physiology and Biochemistry, Osaka
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥村瞭, 加藤純, 池田哲也
2. 発表標題 坐骨神経慢性圧迫損傷ラットに対するペプチドホルモン, オキシトシン, の抗アロディニア効果
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会, 仙台
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	井田 隆徳  (Ida Takanori)  (00381088)	宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・准教授   (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------