

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22600001

研究課題名（和文）新規疼痛関連リン酸化酵素情報伝達マップ：リン酸化プロテオミクスによる痛み表情解析

研究課題名（英文）A new pain-related protein kinase signal transduction map: an analysis by phosphor proteomics

研究代表者

栗原 崇 (KURIHARA TAKASHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60282745

研究成果の概要（和文）：神経障害性疼痛および炎症性疼痛の新規薬物治療ターゲットとして、脊髄および感覚神経に発現する CK1 δ/ϵ が有望であることを示唆した。また、臨床応用により適切な新規 CK1 阻害薬を見出すことに成功した。候補化合物の 1 つ TG003 は、マウス炎症性疼痛モデルにおいて有効性を示し、さらに安全性も高いことが予備的検討から示唆されている。以上の結果から、TG003 は CK1 を標的にした新規鎮痛薬開発のリード化合物として期待できることが示された。

研究成果の概要（英文）：We have suggested that CK1 δ/ϵ play important physiological roles in both neuropathic and inflammatory pain signaling, which makes them useful targets for analgesic drug development. We have also identified several potential new CK1 inhibitors. TG003, one of these candidates, was suggested to have potent inhibitory effects on CK1 isoforms *in vitro*, and showed antinociceptive effects on acute and persistent inflammatory pain models in mice. Our data indicate that TG003 might be a promising lead compound for the development of CK1-targeted new analgesic drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：痛み、プロテオーム、シグナル伝達、脊髄、リン酸化酵素、ホールセルパッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

長引く炎症や神経障害後に生じる疼痛(神経障害性疼痛)は現在においてもなお最も治療に難渋する疼痛であり、外傷後神経痛(幻肢痛など)、帯状疱疹後神経痛、糖尿病性神経痛、がん性疼痛などにおける痛みの主要な原因となる。今後急速に高齢化社会を迎える

本邦において、有効な疼痛コントロール法の確立は社会的急務である。このような疼痛の確立には末梢および中枢神経系における様々な機能変化が深く関与するが、この機能変化には多くの遺伝子発現変動が寄与していることが、申請者らおよび他の研究グループの cDNA マイクロアレイ法を用いた研究結

果より示されていた。

申請者らは神経型(N、P/Q、R型)Caチャネル遺伝子の欠損あるいは変異したマウスの様々な疼痛受容反応をそれまで検討していたが、特にN型チャネル欠損マウスにおいては、末梢神経損傷に伴う神経障害性疼痛の発症が著明に減弱していることを見出していた。そこで神経障害性疼痛を誘発する脊髄神経結紮術(spinal nerve ligation: SNL)を野生型およびN型チャネル欠損マウス(Ca_v2.2^{-/-})に適用し、後根神経節・脊髄・延髄・視床・中脳・大脳皮質などにおいて発現変動を受ける遺伝子産物をマイクロアレイ法により検索することで、神経障害性疼痛発症および維持に重要と思われる候補遺伝子のカタログ化を行った。これら候補分子の中にある種のリン酸化酵素が含まれ、中でもカゼインキナーゼ1ε(CK1ε)は、その阻害薬の髄腔内投与(CK1εの発現変動は脊髄において見出された)が、マウスの神経障害性疼痛行動や炎症性疼痛行動を著明に減弱する可能性が示唆されていた。

CK1はヒトやマウスに存在する8種の主要なタンパク質リン酸化酵素群の1種であり、CK1ε以外に6種のアイソフォーム(α、β、γ1、γ2、γ3、δ)が存在する。CK1はリン酸化酵素研究の歴史において最初期に発見されているにもかかわらず、疼痛を含めた感覚情報伝達における機能的役割についての検討は一切なされていなかった。申請者らの予備的な脊髄リン酸化タンパク質解析では、神経障害性疼痛の発現により多くのタンパク質のリン酸化動態の変動が認められ、またCK1δ/ε選択的阻害薬(IC261)の髄腔内処置の有無によりリン酸化動態の変動を示すタンパク質群を一部同定することができていた。

2. 研究の目的

本研究は申請者らが最近脊髄および後根神経節において見出した新規疼痛関連プロテインキナーゼであるCK1εについて、様々な疼痛モデルにおけるCK1εの発現調節や活性化機構、CK1ε情報伝達系の下流タンパク質群の検索、および他のCK1アイソフォームとの機能的役割の相違など、未だ検討中かつ基礎的な問題を解決することが目的である。計画した主要な研究項目は以下の通りである。①脊髄・後根神経節で発現するCK1ε以外のCK1アイソフォームの検索と両疼痛発症が及ぼす影響。②神経障害性疼痛モデルおよび炎症性疼痛モデルマウス脊髄におけるリン酸化プロテオミクス解析によるCK1ε標的タンパク質群の検索。

3. 研究の方法

マウス炎症性疼痛モデル(急性炎症モデル)としてカラゲニン後肢投与モデル、遷延性炎症モデルとしてアジュバント後肢投与モデ

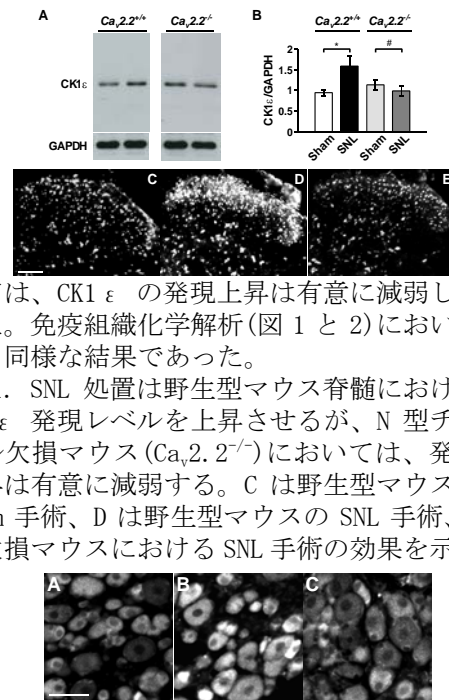
ル)および神経障害性疼痛モデル(SNLモデル)を採用し、行動学的解析、脊髄スライス標本を用いた生理学的解析、脊髄・後根神経節においてCK1各種アイソフォームの発現量変化および組織学的検討を行う。また、脊髄サンプルでリン酸化タンパク質のプロテオミクス解析を行い、各疼痛モデルにおけるリン酸化タンパク質動態を把握し、CK1δ/ε阻害薬の処置の有無、N型Caチャネル欠損マウスを用いた同様の解析によりCK1ε標的タンパク質群を解析する。

4. 研究成果

1) 神経障害性疼痛(SNL)モデルにおける解析

① Western blot 解析および免疫組織化学解析

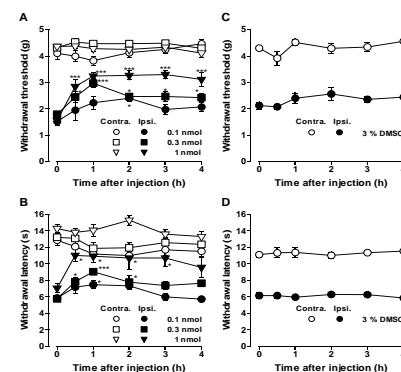
脊髄および後根神経節(DRG)を用いたwestern blot解析(図1Aは脊髄の例)において、野生型マウスではSNL処置(処置後14日)によりCK1ε発現量の有意な上昇を認めた。一方、N型チャネル欠損マウス(Ca_v2.2^{-/-})にお



いては、CK1εの発現上昇は有意に減弱していた。免疫組織化学解析(図1と2)においても、同様な結果であった。

図1. SNL処置は野生型マウス脊髄におけるCK1ε発現レベルを上昇させるが、N型チャネル欠損マウス(Ca_v2.2^{-/-})においては、発現上昇は有意に減弱する。Cは野生型マウスのsham手術、Dは野生型マウスのSNL手術、Eは欠損マウスにおけるSNL手術の効果を示す。

図2. SNL処置は野生型マウスDRGにおけるCK1ε発現レベルを上昇させるが、N型チャネル欠損マウス(Ca_v2.2^{-/-})においては、有意に減弱していた。Aは野生型マウスのsham手術、Bは野生型マウスのSNL手術、Cは欠損



マウスにおける SNL 手術の効果を示す。図 3. IC261 の SNL 誘発疼痛行動に対する効果。C, D はそれぞれ機械的アロディニアおよび熱性痛覚過敏現象に対する溶媒の効果。

② 疼痛行動学的解析

SNL 処置後 2~3 週間の野生型マウスは、処置側に著明な機械的アロディニア現象(図 3A)および熱性痛覚過敏現象(図 3B)を生じるが、CK1 δ/ϵ 阻害薬 IC261 (0.1~1 nmol) の髄腔内投与は、両疼痛現象を濃度依存的に抑制した。

③ 脊髄スライス標本を用いた解析

野生型マウスに sham 手術あるいは SNL 手術を施し、術後 2-3 週間後に L5 脊髄横断スライス標本を作製した。作製したスライス標本は、膜電位感受性色素 di-4-ANEPPS で染色後、後根を強度電気刺激(図 4)あるいは薬物(NMDA あるいはグルタミン酸)を灌流適用(図 5)することで誘発される興奮性膜電位応答を後角より記録した。

IC261 (1-2 μ M) の灌流適用は、sham 手術群における後根誘発膜電位応答には影響しなかったが、SNL 群の膜電位を有意に抑制した(図 4)。一方、NMDA およびグルタミン酸で誘発される膜電位応答には IC261 は影響しなかった(図 5)。

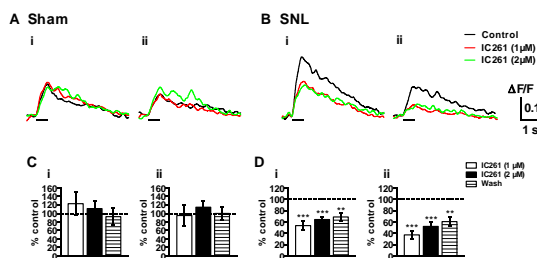


図 4. 後根誘発興奮性膜電位応答に対する IC261 の効果。

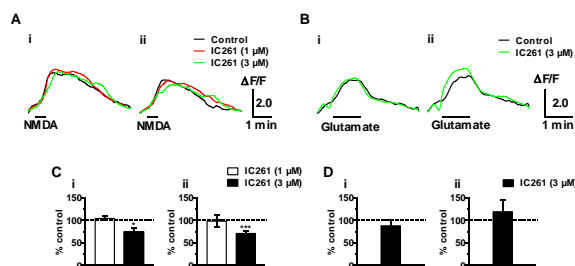


図 5. NMDA あるいはグルタミン酸灌流適用により誘発される興奮性膜電位応答に対して IC261 は影響を与えなかった。

以上の結果およびその他の知見から、マウスの末梢神経損傷後、DRG ニューロンおよび脊髄後角ニューロンにおいて CK1 ϵ タンパクの発現が上昇し、特に DRG ニューロンで増加した CK1 ϵ タンパクが感覚神経中枢端に運ばれ、脊髄後角において神経障害性疼痛の神経

伝達を促進的に調節していることが考えられた。本研究申請後、以上の結果をまとめたものを Molecular pain 誌に投稿し、受理された(雑誌論文 1)。

2). 炎症性疼痛モデルにおける解析

急性炎症性疼痛モデルとしてカラゲニン足底投与モデルを、遷延性炎症性疼痛モデルとしてフロインドアジュバント足底投与(CFA)モデルを用いた。

これら炎症性疼痛モデルマウスにおいても、IC261 の髄腔内投与 (0.1-1 nmol) は、機械的アロディニア現象および熱性痛覚過敏現象を抑制することを見出し、CK1 δ/ϵ は神経障害性疼痛および炎症性疼痛両者における新規薬物治療ターゲットになりうることを示唆した。しかし、我々の予備的検討および他の研究グループの報告から、IC261 には CK1 阻害とは直接関係はないと考えられる細胞毒性の存在が示唆され、医薬品開発の障害となることが予想された。そこで、臨床応用可能な新規 CK1 阻害薬のスクリーニングを行なった結果(京都大学の萩原正敏教授との共同研究)、in vitro で有効な候補化合物を複数種見出すことに成功した。本研究では、候補化合物の 1 つ TG003 のマウス炎症性疼痛モデルに対する効果を検討した。

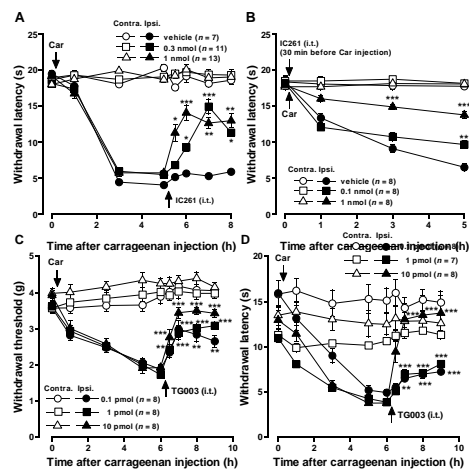


図 6. IC261 と TG003 の抗侵害効果-1 (A, B) 急性炎症性疼痛(カラゲニン: Car)モデルマウスにおける IC261(A, B) および TG003(C, D) 髄腔内投与 (i. t.) による抗侵害効果。Ipsi.: カラゲニン投与側後肢。Contra.: 反対側後肢。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (投与直前の値との比較。Dunnett's 検定による)。

① TG003 の抗侵害効果

TG003 は、IC261 と同様、炎症性疼痛に有効であるか否かを検討するため、モデルマウス髄腔内に TG003 を投与し、機械的アロディニア現象および熱性痛覚過敏現象に対する

効果を検討した (図 6, 7)。カラゲニンモデルにおいては、機械的アロディニア (図 6C) および熱性痛覚過敏 (図 6D) 両者に対し、0.1 pmol で有意な抗侵害効果を示し、10 pmol でほぼ完全な抗侵害効果をもたらした。一方、CFA モデルにおいては、両疼痛様行動に対し、0.1 pmol では有意な効果を示さなかったが (図 7C, D)、機械的アロディニアに対しては 1 pmol (図 7C) で、熱性痛覚過敏に対しては 10 pmol (図 7D) で有意な抗侵害効果を示した。抗侵害効果は投与後 30 分程度で現れ、少なくとも 2-3 時間は持続することが示された。しかし、反体側に対しては、いずれも有意な効果は観察されなかった。

以上の結果から、TG003 の抗侵害効果は、IC261 の効果 (図 6A, B および 図 7A, B: 0.1-1 nmol で有効) と比較して、用量比で少なくとも 10 倍以上の力価を持つことが示唆された。

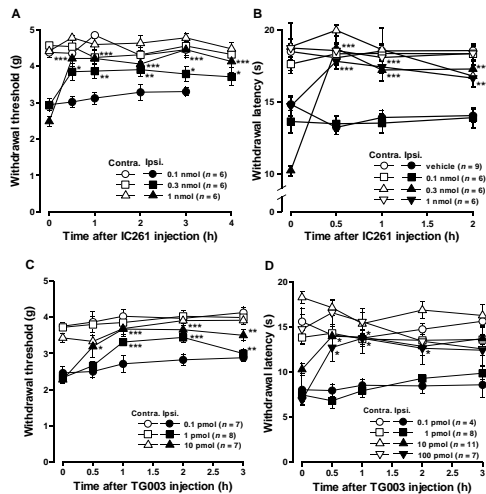


図 7. IC261 と TG003 の抗侵害効果-2 (A, B) 遷延性炎症性疼痛 (CFA) モデルマウスにおける IC261 (A, B) および TG003 (C, D) 髄腔内投与 (i. t.) による抗侵害効果。Ipsi.: CFA 投与側後肢。Contra.: 反体側後肢。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (投与直前の値との比較。Dunnett's 検定による)。

② 作用メカニズム - 脊髄後角膠様質ニューロンにホールセルパッチクランプ法を適用した検討 -

IC261 および TG003 の脊髄レベルにおける抗侵害メカニズムを検討するため、モデルマウスおよびそのコントロールマウスより脊髄横断スライス標本を作製し (スライス標本は、カラゲニン投与後 6 時間後、あるいは CFA 投与後 3 日後に作製)、後角第 II 層 (膠様質) ニューロンよりホールセルパッチクランプ記録を行い、自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSCs) に対する両薬物灌流適用の効果を検討した (図 8, 9)。

両者ともコントロール (図 8, 9A は Naïve

control の例) マウスにおける sEPSC の頻度と振幅に対し有意な影響を与えなかったが、カラゲニンモデル (図 8, 9B) および CFA モデル (図 8, 9C) において両者 (1 μ M) の灌流適用は、sEPSC の頻度を主に抑制した。また、カラゲニンおよび CFA 両モデルにおいて TG003 (1 μ M) は、IC261 に比べ sEPSC の平均頻度抑制効果が有意に強いことが示唆された ($p < 0.05$, Student's t -検定による)。

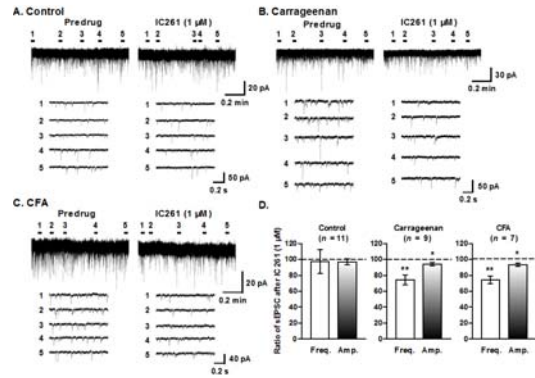


図 8. 自発性 EPSCs (sEPSCs) に対する IC261 の効果。(A, B, C) Naïve control マウス (A)、急性炎症性疼痛 (カラゲニン: Carrageenan) モデルマウス (B)、遷延性炎症性疼痛 (CFA) モデルマウス (C) における自発性 EPSCs (sEPSCs) に対する IC261 (1 μ M) 灌流適用 10 min 後の効果。図 A, B および C における下のトレースは、上のトレース任意の 5 点 (1-5) 0.5 秒間のトレースを引き延ばしたものである。(D) IC261 の sEPSCs に対する効果のまとめ。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (IC261 投与前コントロールとの比較。Student's t -検定による)

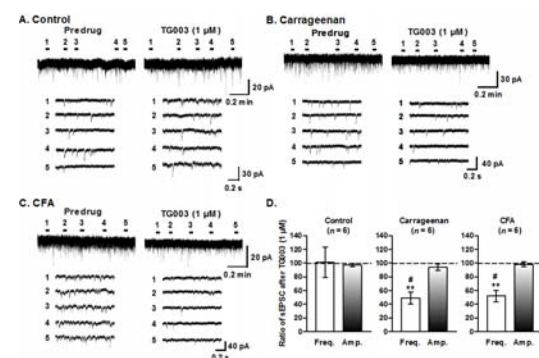


図 9. 自発性 EPSCs (sEPSCs) に対する TG003 の効果。(A, B, C) Naïve control マウス (A)、カラゲニン (Carrageenan) モデルマウス (B)、CFA モデルマウス (C) における自発性 EPSCs (sEPSCs) に対する TG003 (1 μ M) 灌流適用 10 min 後の効果。図 A, B および C における下のトレースは、上のトレース任意

の5点(1-5)0.5秒間のトレースを引き延ばしたものである。(D)TG003のsEPSCsに対する効果のまとめ。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (阻害薬投与前コントロールとの比較。Student's *t*-検定による); $#p < 0.05$ (IC261の効果との比較。Student's *t*-検定による)

③ 炎症性疼痛モデルにおける Western blot 解析

脊髄および後根神経節(DRG)を用いたwestern blot解析において、カラゲニンおよびCFAモデルいずれにおいても、検討した全てのCK1 isoform(α , γ , δ , ϵ)について顕著な発現量変化は認められなかった。免疫組織化学解析においても、同様な結果であった。

以上の結果から、カラゲニンあるいはCFAモデルマウスの脊髄痛覚伝達に、両起炎物質の炎症刺激がもたらすCK1活性化が寄与しており、IC261およびTG003はこのCK1活性化を抑制することで鎮痛効果を示すことが示唆された。また、そのメカニズムとして、一次求心性神経と二次神経、または介在神経間における興奮性シナプス伝達を、主にシナプス前性に抑制することが示唆された。また、TG003はCK1を標的にした新規鎮痛薬開発のリード化合物として有望であることが示唆された。

これらの結果をまとめたものが現在投稿中である。

Kurihara *et al.* Alleviation of behavioral hypersensitivity in mouse models of inflammatory pain with two structurally different casein kinase 1 (CK1) inhibitors. (Submitted)

3) プロテオミクス解析

2次元電気泳動の条件設定を整え、図10に示すように、脊髄タンパク質の濃度を様々にかえて泳動することで、各疼痛モデルで発現変動する特徴的なタンパク質を複数種類同定することが出来た。その一部はCK1情報伝達系の下流に存在していることが想定されている。現在、各種疼痛発症における病態生理学的意義を検討中である。

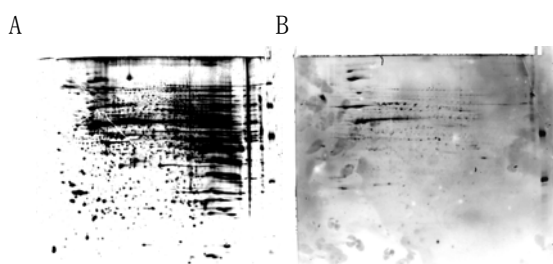


図10. 脊髄タンパク質の二次元電気泳動の例。

A, BともにSNLモデルの脊髄タンパク質を約300 μ g泳動している。AはSyproRuby染色、BはProQDiamind染色の例である。

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) Sakurai, E., Kurihara, T., Kouchi, K., Saegusa, H., Zong, S & Tanabe, T. Upregulation of casein kinase 1 ϵ in dorsal root ganglia and spinal cord after mouse spinal nerve injury contributes to neuropathic pain. *Mol. Pain*, **5**, 74, 2009. (査読あり). DOI: 10.1186/1744-8069-5-74

[学会発表] (計37件) なお6), 7)は東日本大震災のため、雑誌上での誌上開催となった。

1) 川元大輔、喜井勲、豊本雅靖、朝田俊秀、吉村恵、萩原正敏、宮田篤郎、栗原崇: 炎症性疼痛モデルマウスに対する新規カゼインキナーゼ阻害薬の抗侵害効果。第65回日本薬理学会西南部会(2012/11/23, 熊本)

2) Kurihara, T., Sakurai, E., Asada, T., Yoshimura, M., Miyata, A. & Tanabe, T. On the role of casein kinase 1 in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *J. Pharmacol. Sci.*, **118** (Suppl. 1), 194P (P2-8-5), 2012. (2012/3/15, 京都)

3) 栗原崇、櫻井絵里、朝田俊秀、吉村恵、宮田篤郎、田邊勉: 脊髄痛覚情報伝達におけるカゼインキナーゼ1の役割。第39回薬物活性シンポジウム(2011/11/21, 福岡)

4) 栗原崇、櫻井絵里、朝田俊秀、吉村恵、宮田篤郎、田邊勉: カゼインキナーゼ1 δ/ϵ 活性化は炎症性疼痛情報伝達に寄与する。第64回日本薬理学会西南部会(2011/11/20, 福岡)

5) 朝田俊秀、栗原崇、櫻井絵里、吉村恵、宮田篤郎、田邊勉: 炎症性疼痛情報伝達におけるカゼインキナーゼ1 δ/ϵ 活性化の関与。第5回トランスポーター研究会九州部会(2011/9/17, 宮崎)

6) Sakurai, E., Kurihara, T., Miyata, A. & Tanabe, T. Upregulation of casein kinase 1 ϵ in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **115** (Suppl. 1), 2011, 198P (P2J7-2).

7) Kurihara, T., Sakurai, E., Asada, T., Miyata, A. & Tanabe, T. Activation of casein kinase 1 δ/ϵ in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to

behavioral hypersensitivity induced by peripheral inflammation in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **115** (Suppl. 1), 2011, 254P (P3J8-4).

〔その他〕 ホームページ

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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