

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 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791425

研究課題名（和文）

GCH1 阻害剤の鎮痛機序の検討

研究課題名（英文）

Study on analgesic mechanism of GCH1 inhibitor

研究代表者

J・P Bellier (JEAN-PIERRE BELLIER)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教

研究者番号：80346022

研究成果の概要（和文）：グアニル酸シクロヒドロラーゼ 1 酵素(GCH1) はテトラヒドロピオプテリン (BH4) 生合成経路の制限酵素であり、痛みの神経伝導に関与する調整物質の生成を制御する重要な制御因子でもある。近年の研究により GCH1 は疼痛の新しい制御因子であることが明らかになった。今回、我々は神経傷害痛のモデルラットとコリンアゴニストを投与した無処置ラットの DRG 内における BH4 の機能について研究した。実験結果からコリン作動性のシステムと BH4 代謝との相互作用により、痛覚が低下することが明らかになった。この結果より、GCH1 阻害薬による鎮痛効果の発現に GCH1 の調節タンパク (GFRP) 発現の増加が関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）： GCH1 is the first and rate-limiting enzyme in the biosynthetic pathway of tetrahydrobiopterin (BH4), an important cofactor for the synthesis of several modulator in pain neurotransmission. Recently, the importance of GCH1 as pain marker has been recognized. Here, the role of BH4 has been investigated in the DRG of rat model of pain and in naive rat treated with cholinergic agonist. Experimental results shown that cholinergic system interact with tetrahydrobiopterin metabolism to decrease pain sensation. This results suggested that an increase in GCH1 regulatory protein (GFRP) expression is involved in analgesic effect by GCH1 inhibitor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：テトラヒドロピオプテリン、グアニル酸シクロヒドロラーゼ 1、痛覚伝達、後根神経節、アセチルコリン、神経障害痛のラットモデル、pChAT

1. 研究開始当初の背景

(1) 痛覚伝達において、後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) の中にある一次知覚神経が重要な役割をもつ。痛覚伝達において主要な神経伝達物質はグルタミン酸である。しかしながら、痛覚伝達の調節には他の神経伝達物質も関与する。例えば、カテコールアミン、セロトニンや一酸化窒素も痛覚伝達を上方制御することが知られている。

(2) テトラヒドロビオプテリン (BH4) は酵素群である。BH4 は L-チロシンをレボドパ (L-DOPA) へ変換するチロシン水酸化酵素 (TH)、L-トリプトファンを 5-ヒドロキシトリプトファンへ変換するトリプトファン水酸化酵素に必須な補因子である。すなわち、BH4 は 3 重の神経伝達物質 (セロトニン、カテコールアミンと一酸化窒素) を生合成する酵素群の活性に必須となる重要な補酵素である。

(3) グアニル酸シクロヒドロラーゼ 1 酵素 (GTP cyclohydrolase 1; GCH1) はテトラヒドロビオプテリン BH4 生合成経路の制限酵素である。近年の研究によりグアニル酸シクロヒドロラーゼ 1 酵素 (GTP cyclohydrolase 1; GCH1) は疼痛の新しい制御因子であることが明らかになった。GCH1 活性の上昇により、セロトニンやカテコラミン、一酸化窒素が増加するのであれば、GCH1 の増加に伴い、痛みをより強く感じると予想される。

(4) GFRP (GCH1 feedback regulatory protein) は GCH1 の酵素活性である。GFRP と GCH1 の複合体形成により、GCH1 活性が調節されている。

(5) 近年、末梢神経系のニューロンにおいて選択的スプライシングによる Ach の合成酵素 (ChAT) のアイソフォームが存在することが明らかとなった。この新アイソフォームは発見者により、pChAT (末梢性 ChAT; peripheral type of ChAT) と命名された。組織学、トランスクリプトーム学および生化学的解析の手法を用いた後根神経節 (DRG) の研究により、DRG において pChAT の遺伝子が転写されて mRNA が生成されること、また、DRG 内で pChAT により合成されるアセチルコリン (Ach) があることも確認されている。

2. 研究の目的

GCH1 阻害薬 (DAHP) とコリン作動性薬剤の鎮痛効果を明らかにするために、GFRP/GCH1 複合体による痛覚消失の機構を研究する。

(1) 神経傷害痛のラットモデルにおける痛覚受容に対する GCH1 と GFRP の相互作用を解析する。

(2) 神経傷害痛のモデルと無処置ラットの DRG 内で pChAT, GCH1 と GFRP の分布を検討する。

(3) DRG 内における GCH1/GFRP 複合体の存在を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 神経障害痛モデルと侵害受容感覚の解析。坐骨神経結紮モデルを用いた機械的アロディニアおよび温度過敏性疼痛の評価。上記モデルラットおよび正常ラットにおける侵害受容感覚の分析。

① 機械的アロディニアの評価は Von Frey テストにて行う。

② 熱痛覚過敏の評価は hotplate テストにて行う。

(2) GCH1 と GFRP に対する特異抗体の作成。抗原性のペプチドのスクリーニングを行う。抗原ペプチドをマウスとウサギに投与し、免疫感作を行い、作成された特異抗体を用いて免疫組織化学的・生化学的評価を実施する。

(3) DRG におけるコリン作動性のシステムとテトラヒドロビオプテリン合成代謝の分析。

① リアルタイム PCR 法 (RT-PCR 法) により GCH1 と GFRP の mRNA 発現を定量する。

② ウェスタンブロットなど、免疫組織化学の手法を用い、GCH1, GFRP と pChAT のタンパク質の発現を解析する。

③ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による GCH1 の酵素活性とテトラヒドロビオプテリンの分析を行う。

④ キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOF/MS) を用い、後根神経節の細胞における GCH1 阻害薬の薬物動態の解析を試みる。

4. 研究成果

(1) 侵害受容感覚のコリン作動性とテトラヒドロプロテリン代謝の制御：
コリン作動性神経の拮抗薬を正常あるいは神経障害モデルラットのDRGに注入する。DRGに拮抗薬を直接注入したが再現性に乏しかった。次に、乳化したコリン作動性神経の拮抗薬を投与したところ、移行が確認されたので、痛覚レベルを測定した。エマルジョン化した拮抗薬投与後の薬物移行の解析はキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOF/MS)を用いた。この手法を用いて後根神経節の細胞におけるGCH1 阻害薬の薬物動態試験を実施した。(図1)。

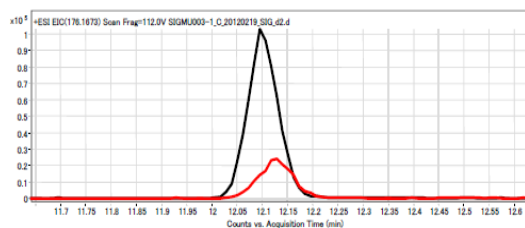


図1：CE/TOF-MSからDRG内にDAHPのトレースを認める。

Achの拮抗薬のみ、もしくはDAHPのみをラットに投与した場合には効果は見出せなかった。しかし、Achの拮抗薬(nicotine, epibatidine)とGCH1の拮抗薬(DAHP)を同時にラットに投与した場合、痛覚の消失が観測された(図2)。

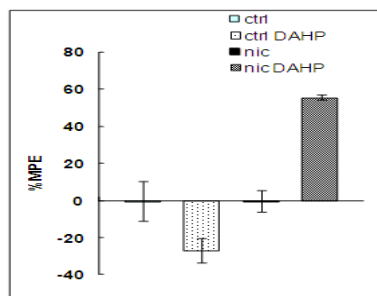


図2：Mechanical assay (Von Frey test)。痛覚消失によるAchの拮抗薬(nicotine)とGCH1の拮抗薬(DAHP)の効果。

(2) 神経傷害痛のモデルと無処置ラットのDRG内でpChAT, GCH1とGFRPの配布を検討する。

①コリン作動性マーカー(pChAT)。特異抗体を用いて、神経傷害痛のモデルと無処置ラットDRGの免疫組織染色を行った。神経傷害痛のモデルラットのDRGにおいて

pChATの分布に変化があり、pChAT陽染性の小型細胞の増加を認めた(図3)。

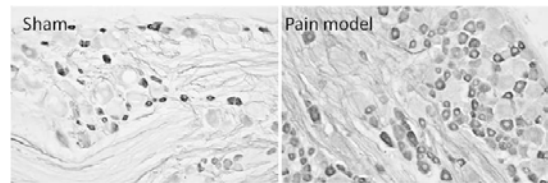
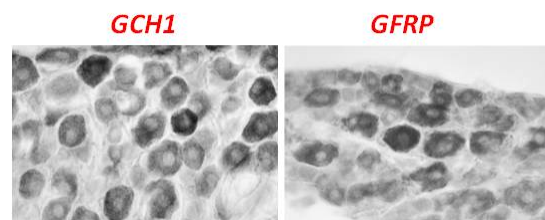


図3：無処置ラットのDRG(左)と神経傷害痛のモデルラットのDRG(右)におけるpChAT抗体を用いた免疫組織染色。

②GCH1とGFRPに対する特異抗体を新たに作成した。マウスを用いた抗原性ペプチドのスクリーニングにより、最も抗原性の高いペプチドを同定した。この抗原性ペプチドをマウスとウサギに投与し、特異抗体を作成した。ウエスタンブロット、免疫沈降およびペプチド吸収テストを用いて特異抗体検査を行った。得られた抗体を用いてDRGに免疫組織染色を行った(図4)。この結果、無処置ラットDRGにおけるテトラヒドロプロ



ン合成代謝を示唆する結果が得られた。

(図4)：DRGにGCH1(左)とGFRP(右)抗体の免疫組織染色。

(3) 神経傷害痛モデルラットのDRGでの合成解析により、alpha7nAChR, GCH1とGFRPのmRNA発現を定量化した。神経傷害痛のモデルラットのDRGにおけるalpha7nAChRの発現レベルは増加していたが、GCH1の発現レベルに変化はなかった。GFRPの発現レベルは減少していた(図5)。

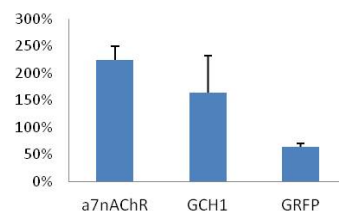


図5：神経傷害痛のモデルラットのDRGにおけるalpha7nAChR, GCH1とGFRP mRNA発現量。

(4) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって、GCH1の酵素活性とテトラヒドロプロ

リンを分析する。電子捕獲検出器の高速液体クロマトグラフィー (ECD-HPLC) を用いて、DAHP とニコチン処置ラットの DRG におけるテトラヒドロプロテリンの濃度を分析する (図 6)。ニコチンと DAHP 処置ラットの DRG 内、BH4 の濃度は有意な少減が見られた。

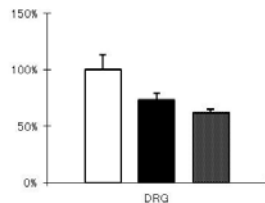


図 6 : ECD-HPLC を用いたラット DRG 内における BH4 濃度の解析結果。ニコチン処置ラット (黒)、DAHP 処置ラット (灰) の DRG 内において BH4 濃度の有意な現象を認める (白 : コントロール)。

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 4 件)

- ① Bellier JP, Kimura H, Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system, *Journal of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 42, No. 4, pp. 225-35, 2011, 査読有
- ② D'Este L, Casini A, Kimura S, Bellier JP, Ito E, Kimura H, Renda TG, Immunohistochemical demonstration of cholinergic structures in central ganglia of the slug (*Limax maximus*, *Limax valentianus*), *Neurochemistry International*, Vol. 58, No. 5, pp.605-11, 2011, 査読有
- ③ Casini A, Vivacqua G, Pontieri FE, Kimura H, Bellier JP, D'Este L, Renda TG. Choline acetyltransferase of the common type immunoreactivity in the rat brain following different heroin treatments: a pilot study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 4, No. 2, pp. 111-21, 2011, 査読有
- ④ Matsuo A, Bellier JP, Nishimura M, Yasuhara O, Saito N, Kimura H, Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a high-affinity choline transporter. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, No. 7, pp. 5836-45, 2010, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① Bellier JP, Kimura S, Sakaue Y, Kimura H.

Peripheral type choline acetyltransferase in the human intestine and dorsal root ganglion
Neuro2010. 第 33 回日本神経科学大会
2010.9.2-4 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

J・P Bellier (JEAN-PIERRE BELLIER)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター
・助教

研究者番号 : 80346022