

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460723

研究課題名(和文) カゼインキナーゼ1シグナル伝達系をターゲットにした難治性疼痛治療戦略

研究課題名(英文) Strategy for controlling intractable pain by targeting casein kinase 1 signaling system

研究代表者

栗原 崇 (Kurihara, Takashi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：60282745

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)：新規鎮痛薬開発ターゲットとして、脊髄および感覚神経に発現するカゼインキナーゼ1 (CK1) 情報伝達系に着目し、その候補としてvacuolar-ATPase (vATPase)、およびWnt3a情報伝達系の可能性を評価した。その結果、vATPase阻害薬(バフィロマイシンA1)の脊髄くも膜下腔投与は、神経障害性疼痛の発症を抑制し、一方、Wnt3aくも膜下腔投与は、機械的疼痛を惹起した。また、CK1阻害薬のスクリーニング系を新たに構築し、新規CK1阻害薬を複数見出した。マウス疼痛行動に対するこれら阻害薬候補化合物の効果を検討したところ、良好な鎮痛効果を発揮する化合物が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have focused on the spinal and sensory CK1 signaling system as potential useful targets for analgesic drug development, and evaluated the vacuolar ATPase (vATPase) and Wnt3a signaling pathway as possible candidates. Consequently, we found that intrathecal administration of a vATPase inhibitor, bafilomycin A1, and Wnt3a, significantly alleviated the expression of spinal nerve injury-induced mechanical allodynia, and produced mechanical allodynia, respectively. We have also constructed new screening system for the identification of novel CK1 inhibitors. Some of newly identified CK1 inhibitors showed antinociceptive effects on acute and persistent inflammatory pain models in mice. Our data indicate that evaluating spinal and sensory CK1 signaling system would be promising to identify potential useful targets for analgesic drug development.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経障害性疼痛 炎症性疼痛 脊髄 リン酸化酵素 vacuolar-ATPase Wntシグナル

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が、現在においても副作用(非ステロイド性抗炎症薬における消化性潰瘍、オピオイドにおける便秘・嘔吐・依存など)が少なく、長期間にわたって使用できる有効性の高い鎮痛薬は存在しない。今後急速に高齢化社会を迎える本邦において、難治性疼痛に有効な薬物治療法の確立は社会的急務である。

申請者らはそれまで神経型(N、P/Q、R型)Caチャンネル遺伝子欠損/変異マウスの疼痛受容反応の検討を行い、特に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N型チャンネル欠損マウスを利用し、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を見出してきた。

平成22~24年度の基盤研究(C)(課題番号22600001)においては、末梢神経障害に伴い脊髄および後根神経節において発現上昇するカゼインキナーゼ1 ϵ (CK1 ϵ)の末梢神経障害性疼痛発症における役割を検討し、CK1阻害薬の髄腔内投与は末梢神経障害性疼痛モデルマウスに対し著明な抗侵害効果を持つことを報告した。さらに上記基盤研究(C)において、CK1阻害薬(以下に示すIC261)の髄腔内投与はマウス炎症性疼痛モデルにおいても有効であることも見出している。また各種疼痛モデルマウス脊髄サンプルを用いた2次元電気泳動/MALDI-TOF/MS解析により、疼痛刺激により活性化されるCK1により直接的・間接的にリン酸化修飾される候補タンパク質を複数種同定した。

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、CK1 ϵ 以外に6種のアイソフォーム(α , β , γ 1, γ 2, γ 3, 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おらず、申請者らの研究が世界初である。しかし、疼痛行動試験で使用した市販のCK1阻害薬CKI-7およびIC261は、アイソフォーム非選択的(CKI-7)、あるいはCK1 δ/ϵ 選択的阻害薬(IC261)であり、 δ/ϵ の機能・役割の区別をすることが不可能であった。

2. 研究の目的

末梢神経障害性疼痛モデルマウス脊髄サンプルを用いたリン酸化プロテオミクス解析から、CK1 δ/ϵ により直接的・間接的にリン酸化される候補タンパク質として、神経伝達物質放出関連タンパク(vacuolar-ATPaseサブユニットや14-3-3タンパク質アイソフォームなど)や、ある種の熱ショックタンパク質(HSP)を同定している。また、CK1情報伝達系は、発生・増殖調節に關与するWNT情報

伝達系に關与することが文献的に知られている。そこで、これらのタンパク質や情報伝達系が末梢神経障害性疼痛や炎症性疼痛発症に關与するか否かを検討する。

さらに申請者らは、連携研究者(萩原正敏 京都大学教授)と共同でCK1 δ と ϵ を区別しうる阻害剤を見出し、炎症性疼痛や末梢神経障害性疼痛に有効であるかどうかを検討するプロジェクトを開始し、その成果として、髄腔内投与で疼痛抑制に有効な新規CK1阻害薬TG003を見出し、その後CK1 δ と ϵ を区別しうる化合物や経口投与可能なCK1阻害薬を数種類見出すことに成功した。本研究においては、これらの化合物が各種疼痛モデルに対しin vivoで有効であるか否かを検討し、それらをもとに経口投与で有効な化合物を見出すことも大きな目標の一つとしている。

3. 研究の方法

マウス(雄性C57BL6/J)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完全フロインドアジュバント(CFA)後肢投与モデル)、末梢神経障害性疼痛モデル(脊髄神経結紮モデル; spinal nerve ligation (SNL)モデル)、およびがん性疼痛モデル(骨転移モデル)を採用し、機械刺激、あるいは熱刺激を用いて疼痛発症を確認後、vacuolar-ATPase阻害剤、HSP阻害薬、新規CK1阻害薬等の投与(髄腔内投与、腹腔内投与、あるいは経口投与)の効果を検討する。効果を示す薬物には、In vitro(脊髄スライス標本)あるいはIn vivo下で脊髄後角神経細胞にパッチクランプ法を適用し、シナプス伝達に対する効果を検討する。また、vacuolar-ATPaseやCK1アイソフォーム等の各種疼痛モデルにおけるタンパク質発現レベルの変化を、ウエスタンブロット法により検討する。

4. 研究成果

1) CK1阻害薬候補化合物アッセイ系の構築

CK1阻害薬候補物質スクリーニングのため、in vitro kinase assay系(QuickScout screening assist mobility shift assay: Carna Biosciences)(図1)、およびFLAGを付加した各種CK1アイソフォーム(ドキシサイクリンの有無でCK1タンパク質発現誘導を操作)とmCherry-PER3融合タンパク質を共発現させたHEK293培養細胞系(PER3 nuclear translocation assay系)を確立した(PER3は、CK1によってリン酸化されると核移行することが知られている)(図2)。

これらのアッセイ系を用いたスクリーニングの結果、論文報告を行ったTG003(発表論文1)を始め、複数種の候補物質(化合物1~6:後述)を見出し、知的財産権取得を目指している(産業財産権出願)。

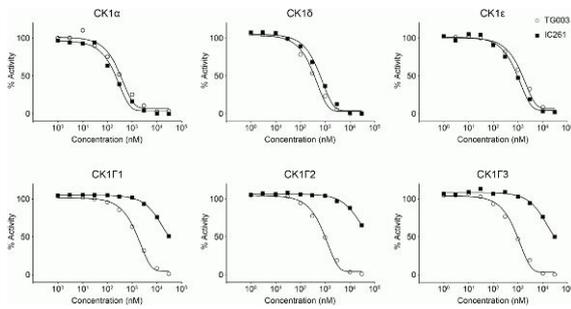


図 1. TG003 は CK1 アイソフォームの酵素活性を広く阻害するが、市販の CK1 阻害薬 IC261 は CK1 α 、 δ 、 ϵ をより強く阻害した。

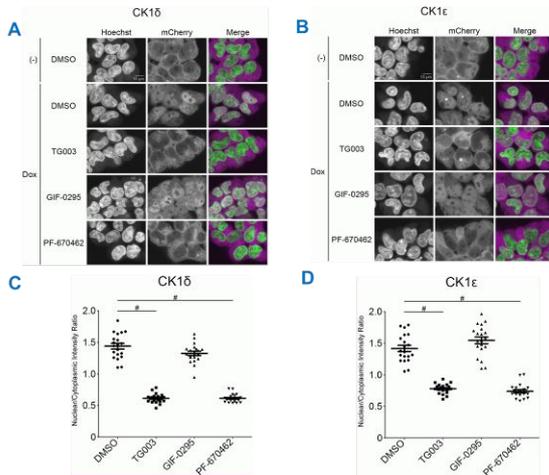


図 2. TG003 (30 μ M) は CK1 δ および ϵ の核移行を阻害する。TG001 (30 μ M) は TG003 類似化合物であるが、CK1 阻害活性を持たないことが、in vitro kinase アッセイで示されていた。Pf-670462 (1 μ M) は、市販の CK1 阻害薬。

2) CK1 阻害薬候補化合物の疼痛行動学的解析

化合物 1 から 6 が鎮痛効果を示すか否か、様々な疼痛モデルを用いた検討が進行中であり (代表例として図 3~6)、いずれの化合物も有望であることが示唆されている。この内、化合物 1 を APX と名付け、臨床試験を見据えた非臨床研究 (急性毒性試験、反復経口投与試験、遺伝毒性試験等) を開始している。

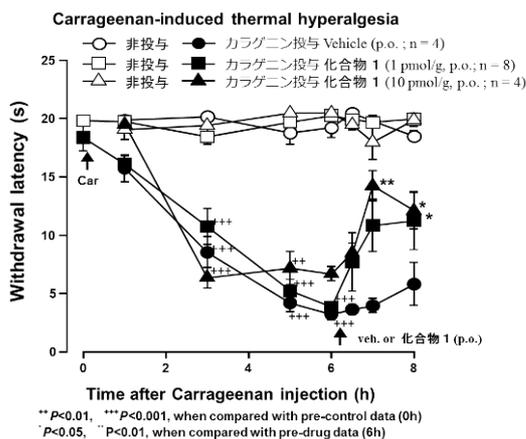


図 3. 化合物 1 の鎮痛効果 (抗熱性痛覚過敏)。

カラゲニンモデルにおける検討。化合物 1 は経口投与した。

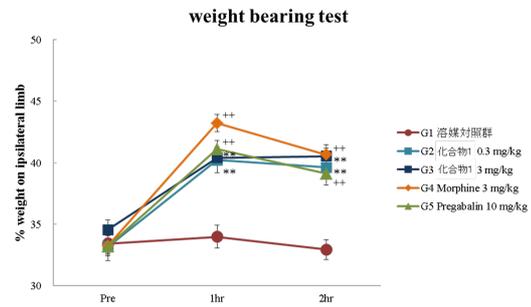


図 4. 化合物 1 の鎮痛効果 (Morphine と pregabalin との比較)。骨がん性疼痛モデルにおける検討 (体重負荷試験)。化合物 1 は経口投与した。

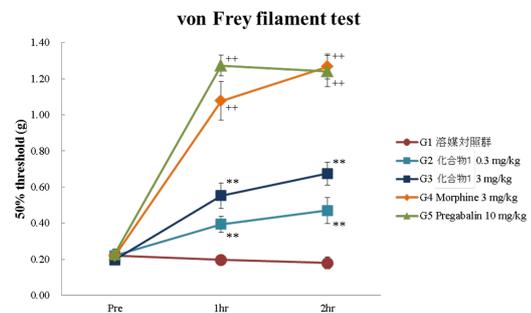


図 5. 化合物 1 の鎮痛効果 (抗機械的痛覚過敏: Morphine と pregabalin との比較)。骨がん性疼痛モデルにおける検討。化合物 1 は経口投与した。

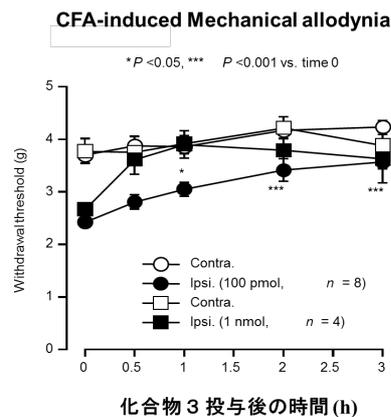


図 6. 化合物 3 の鎮痛効果 (CFA モデル)。化合物 3 は、time 0 における機械的疼痛確認後 (閾値の低下)、くも膜下腔投与した。

3) 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電気生理学的解析

平成 22~24 年度の基盤研究(C) (課題番号 22600001) の研究成果報告においては、IC261 および TG003 の脊髄レベルにおける鎮痛効果を検討するため、疼痛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経験した。その後、自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSCs)、および後根電気刺激により誘発される単シナプス性興奮性シナプス後電流 (後根誘起 EPSCs) に対する効果の検討が進行しているため、本報告ではその一部を記載する。

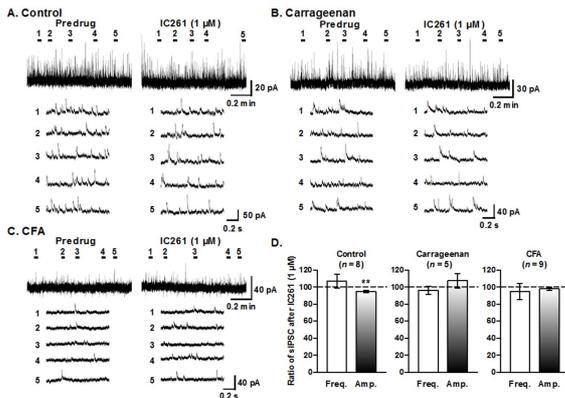


図 7. 自発性 IPSCs (sIPSCs) に対する IC261 の効果。(A, B, C) Naive control マウス (A)、急性炎症性疼痛 (カラゲニン: Carrageenan) モデルマウス (B)、遷延性炎症性疼痛 (CFA) モデルマウス (C) における sIPSCs に対する IC261 (1 μM) 灌流適用 10 min 後の効果。図 A, B および C における下のトレースは、上のトレース任意の 5 点 (1-5) 0.5 秒間のトレースを引き伸ばしたものである。(D) IC261 の sIPSCs に対する効果のまとめ。**p* < 0.01 (IC261 投与前コントロールとの比較。Student's *t*-検定による)

図 7 に示すように、IC261 は sIPSCs (特に疼痛モデル) に対しては、有意な効果を示さないことが示唆された。一方、後根誘起 EPSCs に対しては、sEPSCs に対する効果同様、疼痛モデルマウスにおいては抑制効果を示し、paired-pulse 試験の結果から、その抑制効果の一部は、一次知覚神経終末におけるシナプス前抑制効果に基づくものであることが示唆された (図 8)。

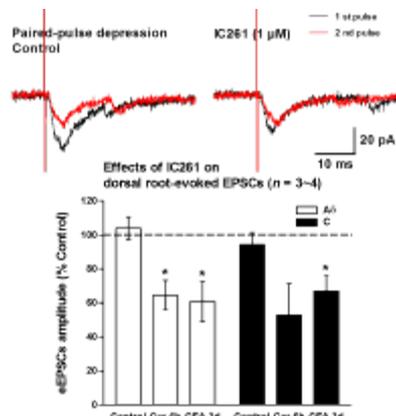


図 8. 後根誘起 EPSCs に対する IC261 の抑制

効果。一部の神経細胞では連続する 2 回の後根刺激に対するシナプス応答の比率 (paired pulse ratio, PPR = 2 回目の EPSC の振幅 / 1 回目の EPSC の振幅) を、IC261 投与前後で測定した (上段: CFA モデル)。一次知覚神経 - II 層神経細胞間のシナプスは、Aδ 線維刺激強度を用いて後根を 50 ms 間隔で 2 回電気刺激すると、2 発目の EPSC の振幅が小さくなる (PPR は 1 より小) paired pulse depression (PPD) を示す。しかし、IC261 (1 μM) 灌流適用下では、Aδ 線維誘起単シナプス性 EPSCs の振幅を低下させると共に、PPD の比率も小さくしたことから、IC261 の鎮痛作用の少なくとも一部は、脊髄後角第 II 層における炎症性あるいは末梢神経障害性疼痛伝達に参与するグルタミン酸作動性興奮性シナプス伝達を、シナプス前性に抑制することに起因することが示唆された。

4) ウェスタンブロット法によるタンパク質発現変化の検討

CK1 アイソフォーム (図 9)、vacuolar-ATPase (A サブユニット: 図 10)、および WNT 情報伝達系に参与する β-カテニン (図 11) の脊髄および後根神経節におけるタンパク質発現レベルに関して、各種疼痛モデル間 (カラゲニン投与後 6 時間後、CFA 投与後 3 日後、SNL 処置後 7 あるいは 14 日後) で比較した。以下、代表例を提示する。

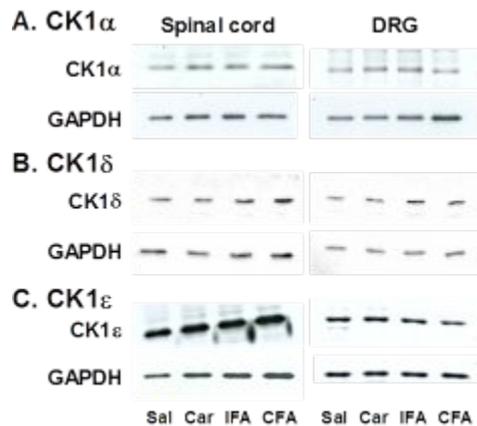


図 9. カラゲニンおよび CFA による後肢炎症は、CK1α、δ、ε 発現レベルに影響を与えなかった。

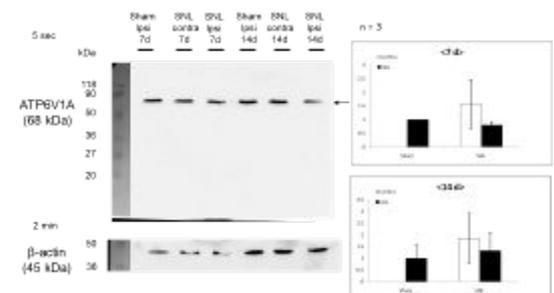


図 10. SNL 処置後 7 および 14 日における脊髄 vacuolar-ATPase A サブユニットの発現。有意な発現変動は認められなかった。

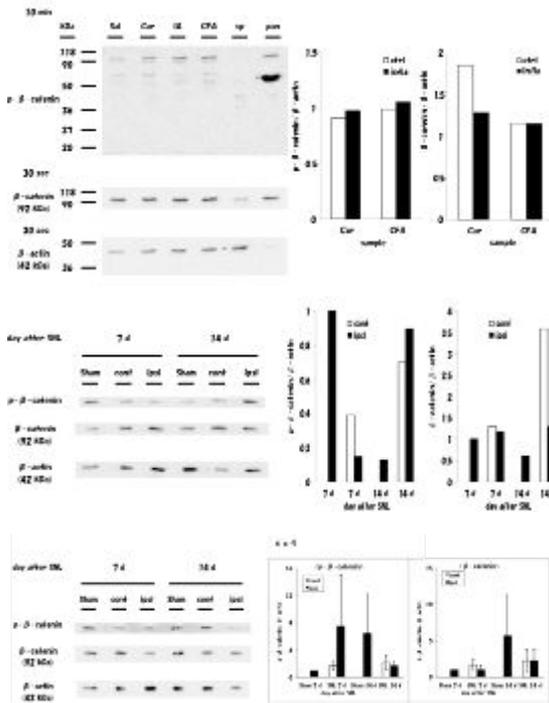


図 11. 炎症および SNL モデルにおける β -カテニンの発現変化。カラゲニンおよび CFA モデル(上段)においては、顕著な発現変化を現在のところ認めていないが、SNL モデル後根神経節(中段)および脊髄(下段)においては、それぞれ 7 日目および 14 日目にリン酸化 β -カテニンの発現減少傾向が観察された。

今後さらに例数を重ねるとともに、免疫組織化学的検討を行っていく予定である。

5) Wnt 3a および vacuolar-ATPase 阻害薬くも膜下腔投与の効果

最後に Wnt 3a (30 ng)、およびバフィロマイシン (vacuolar-ATPase 阻害薬) をそれぞれ正常マウス、および SNL 処置マウス (2~3 週間後) にくも膜下腔投与した予備的データを提示する (図 12、13)。

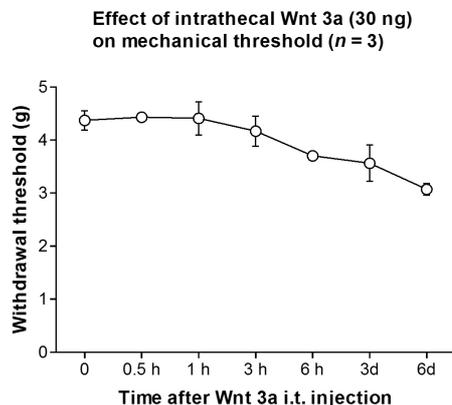


図 12. Wnt3a くも膜下腔投与の効果
正常マウスくも膜下腔に Wnt3a (30 ng)を投与すると、投与後 6 時間目以降に機械的閾値の低下が認められるようになる。

Effects of intrathecal **bafilomycin** (a V-type H^+ -ATPase inhibitor) on SNL-induced mechanical allodynia

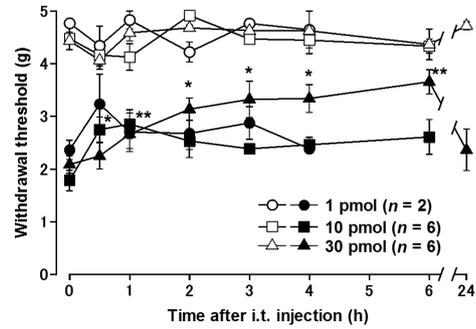


図 13. SNL (処置後 2~3 週間) モデルマウスが呈する機械的疼痛に対する vacuolar-ATPase 阻害薬バフィロマイシンくも膜下腔投与の鎮痛効果。Time 0 で機械的疼痛閾値の低下を確認後、バフィロマイシンを投与した。

以上の結果から、脊髄 Wnt3a シグナル伝達の活性化は機械的疼痛発症を促し、vacuolar-ATPase の阻害は、末梢神経障害性疼痛の発症を抑制する可能性が示唆された。

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 7 件)

Yokai, M., Kurihara, T., Miyata, A. (2016) Spinal astrocytic activation contributes to both induction and maintenance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor-induced long-lasting mechanical allodynia in mice. *Molecular Pain* 12: 1-13. DOI: 10.1177/1744806916646383. 査読有

Ohnou, T., Yokai, M., Kurihara, T., Hasegawa-Moriyama, M., Shimizu, T., Kanmura, Y., Miyata, A. (2016) Pituitary adenylate cyclase - activating polypeptide type 1 receptor signaling evokes long-lasting nociceptive behaviors through the activation of spinal astrocytes in mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 130 (4): 194-203. DOI: 10.1016/j.jphs.2016.01.008. 査読有

栗原 崇、宮田 篤郎 (2015). 脊髄痛覚伝達における遊離脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の関与. *日本薬理学雑誌*, 146 (6): 309-314. DOI: 10.1254/fpj.146.309. 査読有

Karki P., Kurihara T., Nakamachi T., Watanabe J., Asada T., Oyoshi T., Shioda S., Yoshimura M., Arita K., Miyata A. (2015) Attenuation of inflammatory and neuropathic pain behaviors in mice through activation of free fatty acid receptor GPR40. *Molecular Pain* 11: 6. DOI: 10.1186/s12990-015-0003-8. 査読有

Kurihara, T., Sakurai, E., Toyomoto, M., Kii, I., Kawamoto, D., Asada, T., Tanabe, T., Yoshimura, M., Hagiwara, M., Miyata, A. (2014) Alleviation of behavioral hypersensitivity in mouse models of inflammatory pain with two structurally different casein kinase 1 (CK1) inhibitors. *Molecular Pain*, 10: 17. DOI: 10.1186/1744-8069-10-17. 査読有

Hanada, T., Kurihara, T., Tokudome, M., Tokimura, H., Arita, K., Miyata, A. (2014) Development and pharmacological verification of a new mouse model of central post-stroke pain. *Neuroscience Research* 78: 72-80. DOI: 10.1016/j.neures.2013.09.005. 査読有

Miura, A., Kambe, Y., Inoue, K., Tatsukawa, H., Kurihara, T., Griffin, M., Kojima, S., Miyata, A. (2013) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor (PAC1) gene is suppressed by transglutaminase 2 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 32720-32730. DOI: 10.1074/jbc.M113.452706. 査読有

〔学会発表〕(計 44 件)

栗原 崇. カゼインキナーゼ 1 をターゲットとした難治性疼痛治療薬創薬の試み. 第 7 回トランスポーター研究会九州部会シンポジウム. 2014/11/22、産業医科大学 (福岡県北九州市).

栗原 崇, 櫻井絵里, 豊本雅靖, 喜井 勲, 川元大輔, 朝田俊秀, 田邊 勉, 吉村 恵, 萩原正敏, 宮田篤郎. 炎症性疼痛モデルマウスに対するカゼインキナーゼ 1 (CK1) 阻害薬の抗侵害効果. 第 37 回日本神経科学大会 2014/9/11、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

豊本雅靖, 喜井 勲, 栗原 崇, 木村 亮, 小野木 博, 山本 誠, 吉田 優, 細谷孝充, 萩原正敏. 副作用を示さない新規疼痛治療薬の発見 New Drug Discovery for Pain. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 9 回年会. 2014/6/12、大阪大学会館 (大阪府豊中市).

栗原 崇. 難治性疼痛に対する新たな薬物治療ターゲットを求めて. 富山大学生命融合科学教育部特別講演会 (招待講演). 2014/2/21、富山大学 (富山県富山市).

〔図書〕(計 2 件)

栗原 崇. 電位依存性 Ca チャネル. 痛み診療キーポイント. 痛みの Science & Practice 第 6 巻 (分担執筆) (川真田樹人 編), 文光堂, pp. 28-29, 2014.

栗原 崇. グルタミン酸受容体. 痛み診療キーポイント. 痛みの Science & Practice 第 6 巻 (分担執筆) (川真田樹人 編), 文光堂, pp. 42-43, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 疼痛に関する化合物及び医薬組成物
発明者: 萩原正敏、豊本雅靖、細谷孝充、吉田 優、栗原 崇

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2013・261396 / (PCT/JP2014/083569)

出願年月日: 平成 25 年 12 月 18 日、平成 26 年 12 月 18 日

国内外の別: 国内外

〔その他〕

ホームページ

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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 崇 (Kurihara, Takashi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号: 60282745

(2) 連携研究者

萩原正敏 (Hagiwara, Masatoshi)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 10208423

吉村 恵 (Yoshimura, Megumu)

熊本保健科学大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 10140641