

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592334

研究課題名(和文)テトラビオプテリンの代謝経路とコリン作動性阻害剤の鎮痛機序

研究課題名(英文)Analgesic mechanism of tetrahydrobiopterin and cholinergic metabolism inhibitors

研究代表者

J・P Bellier (Bellier, Jean-Pierre)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

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BH4生合成経路の制限酵素であり、痛みの神経伝導に關する調節因子の生成を制御する重要な役割を果たしている。近年の研究によりGCH1が疼痛の新しい制御因子であることは明らかとなった。一方GCH1の酵素活性はGFRPという調節因子によって修飾される。今回、免疫組織化学解析、PLA及びBN電気泳動を用い、GCH1/GFRP複合体形成の調節機構を検討した。セロトニン作動性及びドパミン作動性の神経細胞にGCH1/GFRPの共存がみられた。またGCH1/GFRP相互作用は主に感覚神経系に認められた。この結果は新規な鎮痛治療法の開発に寄与するものである。

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. The activity of GCH1 is regulated by its regulatory protein GTP cyclohydrolase regulatory protein (GFRP). Here we studied the regulation mechanism of GCH1/GFRP complexation using immunohistochemistry, proximity ligation assay and blue native electrophoresis. It was observed that GCH1 and GFRP were widely expressed in population of serotonergic, dopaminergic and nitrinergic neurons, but GCH1/GFRP complex occurs mainly in sensory system. This suggested that complex could be targeted for the develop new analgesic strategy.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：GTP cyclohydrolase 1 dorsal root ganglion アセチルコリン tetrahydrobiopterin 後根神経節
痛覚伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 一次知覚神経は感覚性及び痛覚性の神経細胞が後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) の中にある。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。痛覚伝達の調節にはほかの神経伝達物質、例えばサイトカイン、ニューロペプチドも関与する。またカテコールアミンやセロトニン、一酸化窒素も痛覚伝達の上流を制御することが知られている。

(2) グアニル酸シクロヒドロラーゼ 1 (GTP cyclohydrolase 1; GCH1) はテトラヒドロピオプテリン (BH4) 生成経路の律速酵素である。BH4 は酵素群である。BH4 が L-チロシンからレボドパ (L-DOPA) へ変換するチロシン水酸化酵素 (TH)、L-トリプトファンから 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 が 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重要な補酵素である。また GCH1 の酵素活性は GFRP (GCH1 feedback regulatory protein) という調節因子によって修飾されることが知られている。GFRP と GCH1 の複合体形成により、GCH1 活性が調節されている。

(3) 近年、後根神経節のニューロンにおいてコリンアセチル基転移酵素のアイソフォームが存在することが明らかとなった。コリンアセチル基転移酵素は、神経伝達物のアセチルコリン合成酵素である。このアイソフォームは選択的なスプライシングによるものであり、pChAT (末梢性 ChAT; peripheral type of ChAT) と呼ばれる。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研究により、後根神経節 (DRG) においては pChAT の遺伝子が転写され mRNA が生成されることや DRG の中で pChAT により合成されるアセチルコリン (ACh) が生成されることも確認されている。DRG 内におけるアセチルコリン (ACh) の機能についてはまだ十分解明されていない。

(4) 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。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 (NO) が増加すれば、GCH1 活性の増加に伴い、痛みをより強く感じると予想される。

(5) 痛覚におけるニコチン受容体の関与が知られている。さらに、カテコラミンと NO の神経細胞合成において ACh が主な役割を果たしている。

(5) 以前我々は、DRG に pChAT によって合成アセチルコリンが BH4 合成を調節することを仮説として提唱した。痛覚に調節にもかかわると考えられる。DRG に pChAT によって合成されたアセチルコリンが GFRP の発現を調節することが考えられる (図 1)。

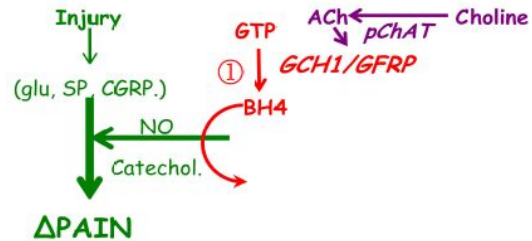


図 1: カスケード仮説の模式図

2. 研究の目的

- (1) GCH1/GFRP 複合体形成のメカニズムを調べる。
- (2) BH4 代謝を変えることによって DRG の初代細胞培養を用い薬剤のスクリーニングを行う。
- (3) 痛覚伝達において BH4 の変わりの代謝経路の関与を調べる。

3. 研究の方法

(1) GCH1/GFRP 複合体形成のメカニズムを調べる。
GFRPやGCH1に対する別な動物種 (ウサギ及びモルモット) に新抗体を作製した。新抗体の特異は、ウエスタンブロットによって確かめた。免疫組織化学法でラット脳を検査し、さらにGCH1 および GFRPに対する特異的な抗体を用い、proximity ligation assay (PLA) と blue-native電気泳動法でGFRP/GCH1の複合体形成を定量化した。また、GFRP/GCH1の複合体形成に対する特異抗体の作製を行った。高速液体クロマトグラフィー法を用い、BH4とほかのピオプテリンを解析した。同様に GCH1の酵素活性とテトラヒドロピオプテリンの性質を解析した。

(2) BH4 代謝を変えることによって DRG の初代細胞培養で薬剤のスクリーニングを行う。

初代細胞培養は、ラットの後根神経節から細胞を単離した。薬剤の効果は HPLC およびパッチクランプという電気生理学的な方法によって評価した。HPLC を用いて BH4 とピオプテリン (ネオピオプテリン、セピアピオプテリン、ピオプテリン、ジヒドロピオプテリン、テトラヒドロピオプテリン) の測定を行った。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関連な代謝

産物を明らかにすることを試みる。
 (3)BH4 の代謝経路に関与する因子を調べる。

ウエスタンブロットなど、免疫組織化学の手法、酵素アッセイを使用する。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テリンの分析を行う。

4. 研究成果

(1)GCH1/GFRP 複合体形成のメカニズムを調べる。

まず GFRP や GCH1 に対して異なる免疫動物 (ウサギ及びモルモット) に由来した新抗体を作製した。GCH1 及び GFRP 抗体の特異性を確認するために、ウエスタンブロットと免疫組織化学染色を行った。ウエスタンブロットで新抗体は、単一のタンパク質を認識したことを認めた。またラットの脳幹及び DRG 切片において抗体によるシグナル分布のマッピングを行った (図 2)。

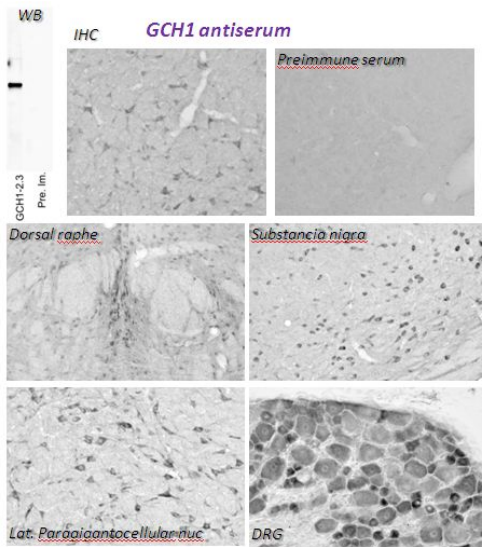


図 2 : 無処置ラットの中脳と根神経節のウエスタンブロットおよび免疫組織化学的な染色像。

GCH1 及び GFRP の分布は、通常はセロトニン作動性およびドーパミン作動性の神経細胞に発現している。また、詳細的には GFRP の発現は神経細胞の亜集団に依存する (図 3)。

DRG においては GCH1 と GFRP は常に同時発現することを認めた。

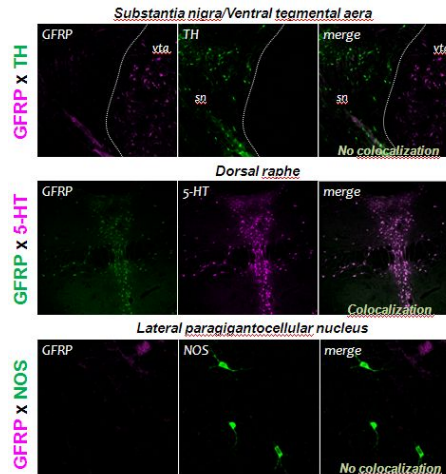


図 3 : 無処置ラットの中脳における蛍光免疫二重染色像。

次は、GFRP/GCH1 の複合体形成およびその相互作用を検討した。

Proximity ligation assay (PLA)、HPLC 及び blue-native を使用し、GCH1/GFRP が共局することなく、相互作用を有することが確認された。

これらの結果は、GFRP/GCH1 の複合体形成、主に感覚神経において発生することを示唆した (図 4)。したがって、GFRP が、疼痛治療の特異的なターゲットになる可能性がある。

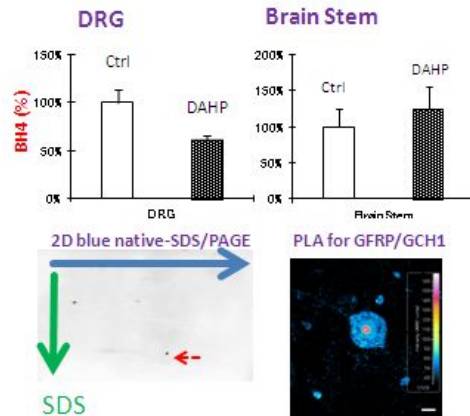


図 4 : 根神経節内および中脳内に ECD-HPLC で BH4 濃度の解析結果。Proximity ligation assay (PLA) 及び blue-native を使用し、GCH1/GFRP 相互作用を認めた。

(2) BH4 代謝を変えることによって DRG の初代細胞培養で薬剤のスクリーニングをする。

種々の薬剤を使用して、DRG の初代細胞培養で BH4 レベルを調節することを試みた。今後の研究に有意義の知見が得られた。最も重要な結果は、コリン作動薬が BH4 のレ

ベルを減少することを観察した。
 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、コリン代謝経路が変わることを観察し、また BH4 再利用経路を賦活することを示唆した。

次は GFRP/GCH1 の複合体形成に対する特異抗体を作製した。作製した抗体は DRG の初代細胞培養において GCH1 活性をブロックしたことを観察した。
 これらの結果は、痛みの新規治療寄与するものと考えられる。

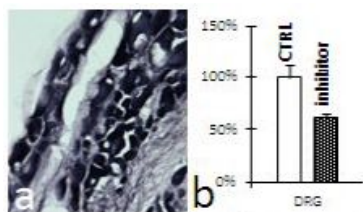


図 5：無処置ラットの根神経節の免疫組織化学的染色像および阻害剤の効果を示す。

(3) 痛覚伝達において、BH4 の代謝経路に関与する因子を調べる。

これまでの実験(2)では、BH4 再利用経路におけるコリン代謝経路が関与する可能性が示唆された。ラットの DRG におけるその経路を研究し、一次感覚神においてこの経路について調べた。薬物は、この経路の活性を減少させた。

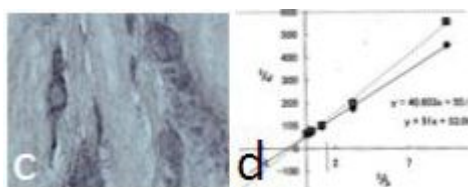


図 6：無処置ラットの根神経節における免疫組織化学的染色像、阻害剤の効果を示す。

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 5 件)

1. Sakaue Y, Bellier JP, Kimura S, D'Este L, Takeuchi Y, Kimura H.: Immunohistochemical localization of two types of choline acetyltransferase in neurons and sensory cells of the octopus arm. *Brain Structure and Function*, 219 (1) : 323-341, 2014 査読有
2. Koga T, Bellier JP, Kimura H, Tooyama I : Immunoreactivity for choline

acetyltransferase of peripheral-type (pChAT) in the trigeminal ganglion neurons of the non-human primate *Macaca fascicularis*. *Acta Histochem Cytoc*, 46 : 59-64, 2013 査読有

3. Abdelalim EM, Bellier JP, Tooyama I : Expression of NPR-B in neurons of the dorsal root ganglia of the rat. *Peptides*. *Peptides*, 43 : 56-61, 2013 査読有
4. Hanada K, Kishimoto S, Bellier JP, Kimura H : Peripheral choline acetyltransferase in rat skin demonstrated by immunohistochemistry *Cell Tissue Res*, 351 (3) : 497-510, 2013 査読有
5. Casini A, Vaccaro R, D'Este L, Sakaue Y, Bellier JP, Kimura H, Renda TG. : Immunolocalization of choline acetyltransferase of common type in the central brain mass of *Octopus vulgaris*. *Eur J Histochem*, 56 (3) : e34, 2012 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Bellier JP, Ding WG, Sakaue Y, Yasuhara O, Matsuura H, Tooyama I. GCH 1 and its regulatory protein in the rat brain stem The 91st annual meeting of the Physiological Society of Japan. 2014 年 3 月 16 日～18 日、鹿児島
2. Bellier JP, Yasuhara O, Ding WG, Matsuo A, Tooyama I. Distribution of the GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein (GFRP) in the rat brain stem. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry 2012 年 9 月 30 日～10 月 2 日、神戸
3. Bellier JP, Yasuhara O, Ding WG, Matsuo A, Tooyama I. Immunohistochemical localization of the GTP cyclohydrolase feedback regulatory protein (GFRP) in the rat brainstem. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 2012 年 8 月 26 日～29 日、京都

〔図書〕(計 3 件)

1. Bellier JP, 遠山育夫. 蛍光組織化学法と透明化技術で脳の中を観察する. 39 回組織細胞化学講習会、学際企画、169-74, 2014.

2. Bellier JP, Casini A, Sakaue Y, Kimura S, Kimura H, Renda TG, D'Este L :
Chemical Neuroanatomy of the
Cholinergic Neurons in the Cephalopod
Octopus and the Gastropod Limax.
(Fyodorov A and Yakovlev H ed.) Nova
Science Publishers, (New-York),
Chapter 3 in "Mollusks: Morphology,
Behavior and Ecology.", 89-122, 2012
3. 木村 宏, Bellier JP, 木村 新 : コリン
アセチルトランスフェラーゼの局在と機
能 Clinical Neuroscience, 30 (6) :
622-26, 2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

J・P Bellier (J・P ベリエ)

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

(2) 研究分担者

林 維光 (ハヤシ イコウ)

医学部・助教

研究者番号 : 80242973

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :