

慢性疼痛を担う鍵分子リゾホスファチジン酸と脳を守る鍵分子プロサイモシン  $\alpha$  に関する研究植田 弘 師<sup>†</sup>**Lysophosphatidic Acid Receptor Signaling Underlying Chronic Pain and Neuroprotective Mechanisms through Prothymosin  $\alpha$** Hiroshi Ueda<sup>†</sup>*Department of Pharmacology and Therapeutic Innovation, Nagasaki University, Institute of Biomedical Sciences; 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan.*

(Received June 14, 2019)

For my Ph.D. research topic, I isolated endogenous morphine-like analgesic dipeptide, kyotorphin, which mediates Met-enkephalin release, and discovered kyotorphin synthetase, a putative receptor and antagonist. Furthermore, I succeeded in purifying  $\mu$ -opioid receptor and functional reconstitution with purified G proteins. After receiving my full professor position at Nagasaki University in 1996, I worked on two topics of research, molecular mechanisms of chronic pain through lysophosphatidic acid (LPA) and identification and characterization of neuroprotective protein, prothymosin  $\alpha$ . In a series of studies, we have shown that LPA signaling defines the molecular mechanisms of neuropathic pain and fibromyalgia in terms of development and maintenance. Above all, the discovery of feed-forward system in LPA production and pain memory may contribute to better understanding of chronic pain and future analgesic drug discovery. Regarding prothymosin  $\alpha$ , we first discovered it as neuronal necrosis-inhibitory molecule through two independent mechanisms, such as toll-like receptor and  $F_0/F_1$  ATPase, both which protect neurons through indirect mechanisms. Prothymosin  $\alpha$  is released by non-classical and non-vesicular mechanisms on various stresses, such as ischemia, starvation, and heat-shock. Thus it may be called a new type of neuroprotective damage-associated molecular patterns (DAMPs)/Alarmins. Heterozygotic mice showed a defect in memory-learning and neurogenesis as well as anxiogenic behaviors. Small peptide, P6Q derived from prothymosin  $\alpha$  retains neuroprotective actions, which include blockade of cerebral hemorrhage caused by late treatment with tissue plasminogen activator in the stroke model in mice.

**Key words**—kyotorphin; lysophosphatidic acid; prothymosin  $\alpha$ ; opioid receptor; chronic pain; stroke

## はじめに

「退職を迎える先生に永い間の研究を回顧し研究業績をまとめられた総説的な論文を執筆してください」、とのご丁寧なご案内を頂きお受けしたので、執筆させて頂くこととした。実は筆者は長崎大学薬学を定年退職後も京都大学薬学でもう少し研究を続けていることに今さらに気づき、まとめるには少し早いかと躊躇しつつもとりあえず回顧的な総説を書かせて頂いている。

70年安保闘争後の学生紛争も終息しつつある

1972年に筆者は京都大学薬学部入学を果たした。しかし、教養課程時代は、紛争のなごりで試験期間中の教養校舎のバリケード封鎖があり落ち着いて勉学に励むことが困難であった。ただ幸いなことに、その2年間の教養課程時代に自分の頭でものを考える習慣ができたことはその後の研究者人生に大いに役立ったように思える。サークル活動でサリドマイド、スモンなど薬害問題を医学的に勉強するなかで「将来薬学で何を学ぶか」が少し見え始めた気がした。その結果、医学との密接な関連を持つ薬理学に興味を持ち、故高木博司教授の素晴らしい講義に魅了されてその分野への道を選んだ。

## キョートルフィンの発見

高木先生の研究室ではモルヒネの作用機構の研究をしていたが、「モルヒネは脳下位脳幹部に作用して、脊髄での痛み入力を選択的に抑制する」という発見がなされており、このことは半世紀近く経過し

長崎大学生命医科学域 (薬学) 創薬薬理学分野 (〒852-8521 長崎市文教町 1-14)

現所属: <sup>†</sup>京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町)

e-mail: ueda.hiroshi.8e@kyoto-u.ac.jp

本総説は、2018年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

た現在もなお難治性疼痛の仕組みの研究に大いに生かされている。薬理学研究室の学部生時代は当時の塩見浩人助手の指導の下でこのモルヒネ鎮痛の生化学的機構解明について研究を行ってきた経緯があり、大学院のテーマとして引き続き塩見先生の指導の下で「脳内モルヒネ物質探索」を行うこととなった。この研究の背景には1) モルヒネは触覚には影響せずに痛みのみを選択的にしかも強力に抑制するが、2) その作用点である脳へはごくわずかししか到達しない、3) モルヒネの薬理作用を選択的に遮断する拮抗薬には *d*-体と *l*-体を区別する立体特異性が発見され、これが鍵(リガンド)と鍵穴(受容体)という概念、すなわち受容体の存在発見となり、4) ついで、その受容体に作用する内在性のモルヒネ様物質の存在が推定され、その探索が世界中の研究者による競争となった、という経緯があった。この研究テーマが与えられて1ヵ月もたない時期の1975年12月 *Nature* 誌にエンケファリン発見の報告がイギリス Hughes, Kosterlitz 博士たちのグループによりなされた。

エンケファリンの研究は世界中の注目を浴びたことから、とりあえず筆者はモルモットの腸管収縮抑制を指標として同様な生理活性物質をと研究を開始したが、エンケファリン同様な活性も見い出せなかった。そこで発想を変えて抽出物をマウス脳内投与し、モルヒネ拮抗薬ナロキソンで遮断される鎮痛効果を評価することとした。一見無謀な試みだと言われたが、大変幸運なことに、ゲル濾過で分離した5-6分画のなかにいきなりナロキソンで拮抗される鎮痛効果を示すものが見つかったのである。その後、Dowex というイオン交換樹脂で分離し、30分画程度に分け、凍結乾燥したのちに溶媒に溶かしてマウス脳内投与を行い、鎮痛効果を評価した。その中でも数分画に鎮痛効果を示すものがあったが、ナロキソンで遮断されるものは塩基性の高い1分画のみであった。さらに幸運なことにこの物質は薄層クロマトグラムや高電圧ペーパークロマトグラフィーでほぼ単一純粋なものであったのでアミノ酸分析を行った。再び幸運だったのは、その成分は tyrosine と arginine の2つのアミノ酸のみだったことだ。京都大学薬学部薬品製造化学の故矢島治明教授の研究室で tyrosine-arginine と arginine-tyrosine を合成して頂き、生理活性やクロマトグラフィーの移動度から

tyrosine-arginine であることが明らかとなった。このペプチドが京都で発見したモルヒネ様鎮痛効果を示すものだとして、高木先生はキョートルフィン(Kyotorphin)と名付けた。修士課程発表前後の出来事である。今から思えば、ずいぶん稚拙な研究手法であったが、当時の日本の薬理学分野で生理活性物質探索に成功した例はあまりなかったのではないかと思う。

すぐにその作用機構の研究を行ったが、残念なことに Kyotorphin はいわゆるオピオイド受容体には結合しなかったのである。そこで、エンケファリン分解阻害と遊離機構に絞り研究を行ったが、結論的には後者がその中心的なメカニズムとなった。当初はエンケファリンに対するラジオイムノアッセイ系は確立していなかったもので、モルモット脳線条体切片に Kyotorphin を作用させて得られた灌流液を HPLC で精製してエンケファリン画分としてオピオイド受容体結合活性で定量的評価を行い、Kyotorphin はメチオニンエンケファリン遊離物質であることを証明した。この段階で高木先生の判断で *Nature* 誌に投稿することを決意し、全力で改訂作業を行った後採択となった。<sup>1)</sup>ただ、*Nature* では Kyotorphin という命名は採用されなかった。小さなペプチドであったことから発表されてからも、「このペプチドは何かのタンパク質の分解産物ではないか」という意見を耳にすることがあった。そこで、筆者が取り組んだのは Kyotorphin が神経伝達物質的な役割を持っているかどうかを調べることとした。神経伝達物質の定義から、1) 生合成機構、2) 神経終末における局在、3) 適当刺激による遊離、4) 受容体、5) 不活性化機構が必要である、ということ学んでいたものでこれらについて取り組んだ。大学院課程期間の制限があり Kyotorphin がシナプトソーム分画に高濃度濃縮されていること<sup>2)</sup>とアミノペプチダーゼによる急速な分解を証明した<sup>3)</sup>段階で博士論文としてまとめたが、のちにこの仕事は昭



植田弘師

京都大学薬学部・大学院修了後、薬学博士、京都大学、横浜市立大学教員を経て、長崎大学教授(1995-2019年)定年後の現在、京都大学研究員、日本薬学会奨励賞(1985年)、日本薬理学会学術奨励賞(1989年)、日本薬学会賞(2019年)受賞、AMED創薬拠点代表、国際疼痛学会 councilorなどを歴任。

和 60 年日本薬学会奨励賞受賞「鎮痛活性ペプチド、キョートルフィンの脳からの単離と作用機序に関する研究」(塩見先生と共同受賞)につながった。

生合成機構と受容体に関しては、横浜市立大学助手を経て 1983 年京都大学に助手として戻ってから、大学院生の吉原良浩君と共同で行い、このテーマについて実体解明をなし得た。生合成機構では、1987 年に tyrosine と arginine から Kyotorphin を生合成する酵素を同定したが、<sup>4)</sup> 2018 年には長崎大学で塚原 完 准教授が中心となり tyrosyl-tRNA synthetase がその重要な候補であることを証明した。<sup>5)</sup> 脳に豊富に存在する各種ジペプチドがこのようなタンパク質合成酵素で生合成されることが一般化されるならば、こうした研究は大きな発見として評価されるかもしれない。一方、受容体機構は高比活性の <sup>3</sup>H-tyrosine-arginine を作製することから始めた。<sup>6)</sup> 幸運にも好熱菌からの tyrosyl-tRNA synthetase を入手することができたので、高比活性の <sup>3</sup>H-tyrosine を購入し arginine と反応させて HPLC で精製して結合試験に用い高親和性結合を見出すことに成功した。<sup>6)</sup> ついで、当時の北海道大学薬学部 宇井理生教授から精製 G タンパク質を頂き、細胞膜 Kyotorphin 受容体との再構成実験を行い、GTPase 活性によりアゴニスト活性を評価することができ、さらに Kyotorphin 類似の各種ジペプチドを評価したところ、受容体結合は示すがアゴニストとしての GTPase 活性を示さない pure 拮抗薬 leucine-arginine を見出すことに成功した。<sup>6)</sup> のちの様々な生化学、薬理学研究からも leucine-arginine は Kyotorphin の優れた拮抗薬であることが証明されている。最近では N-methyl-Kyotorphin は経口投与でも強力な鎮痛効果を示し、その効果が脳室内に投与した N-methyl-leucine-arginine により拮抗されることが証明されている。<sup>7)</sup> さらに星薬科大学 成田 年教授との共同研究では Kyotorphin 鎮痛効果はメチオニンエンケファリン前駆体、あるいは  $\beta$  エンドルフィン遺伝子欠損マウスにおいて抑制されるなど、内在性オピオイドペプチド遊離が改めて証明できている。<sup>7)</sup> 心残りなのは、Kyotorphin 受容体をクローニングすることが未解決の課題となっていることである。

#### オピオイド受容体研究

細胞膜 Kyotorphin 受容体と G タンパク質との再

構成実験を行いつつ、一方でオピオイド受容体精製と G タンパク質との再構成実験の研究も行った。当時岐阜大学助教授であった野崎正勝先生との共同研究として 6-succinylmorphine を頂き、そのアフィニティーカラムを用いた  $\mu$  オピオイド受容体精製を行い、リボソームを用いて G タンパク質との再構成実験を行った。<sup>8)</sup> 活性を有した精製オピオイド受容体を単離できた世界最初の研究となり高い評価を受け、平成 2 年日本薬理学会学術奨励賞受賞「オピオイドレセプター機構の分子薬理学的研究」につながった。この研究では G タンパク質なしではアゴニスト結合活性は低く、再構成したときにその結合活性が高まることも見い出すことができた。この事実は、受容体にアゴニストが結合すると G タンパク質は乖離するのでアゴニストの結合活性が低下する、といういわゆるシグナル伝達の turn-off 機構の一端が解明されたことを示している。オピオイド受容体のクローニングをするために精製実験に励んだが収率が大変低く当時クローニングに必要とされるだけの精製タンパク質量が得られなかった。すなわちアゴニストに対するアフィニティーでは G タンパク質と結合しているものだけが精製されるので、洗浄操作をすればするほど収量が減ることが判明したのである。アンタゴニストのアフィニティーカラムを作製すべく化学研究者と交渉している間に留学の機会が訪れ、その試みは中断してしまった。悔やまれるところである。少しほっとしたのは、留学中に古くからの友人である Chris Evans 博士が発見クローニング法で  $\delta$  オピオイド受容体のクローニングに成功したことである。<sup>9)</sup> 同じ時期に  $\delta$  オピオイド受容体のクローニングに成功した研究者 Brigitte Kieffer 博士<sup>10)</sup> ともその後、友好を深め、国際グラント Human Frontier Science Program の研究チームなど様々な方面で共同研究活動が続けている。

#### 痛み応答の *in vivo* シグナル伝達機構

カリフォルニア工科大学とミシガン大学で発生物学と分子神経生物学をまなび、横浜市立大学に助教授として帰国することとなった。そこでは分子生物学的技術を駆使した受容体シグナル伝達機構と神経細胞死抑制物質の探索を行ったが、1996 年縁あって長崎大学に主任教授として赴任することとなった。十分に設備も資金もない状態で最初に行ったのは、あり合わせの機器の組み合わせで作成した

末梢性疼痛評価法の確立であった。モルヒネは脳に働いて鎮痛効果を示すことが当然のように理解されていたが、当時ドイツ Max Planck 研究所の故 Albert Herz 教授は免疫担当細胞からエンドルフィンが分泌されて知覚神経の末梢側終末に作用して鎮痛的に働くということを報告していたからである。筆者がアイデアを出して学生に作成してもらったのは、マウスをハンモックのような布袋に入れて四肢を出し、後肢に糸をかけてトランスデューサーにつなぎ、足の侵害性屈曲応答を記録するという方法であった。この手法の長所は、四肢すべてが接地せず触覚刺激を受けないため、侵害刺激応答が高まるということにある。つまり、有名な「ゲートコントロール説」すなわち、触覚刺激は痛み応答を抑制する「痛いところをさすると痛みが和らぐ」仕組みをなくしたモデルとなるのである。これを用いた研究で一連の *in vivo* 疼痛応答を解析することとなり、米国 National Institute of Mental Health (NIMH) の Andreas Zimmer 博士からサブスタンス P 前駆体遺伝子欠損 (knock-out; KO) マウスをもらい受け研究を完成できたことにより、1998 年 PNAS 誌に論文掲載を可能となった。<sup>11)</sup> 研究室立ち上げからわずか 2 年であった。この装置をいろいろ工夫している間に、知覚神経線維のうち痛みを伝える C 線維と A $\delta$  線維、さらには触覚などを伝える A $\beta$  線維ごとの応答として区別できる方法に発展させることができ、痛みの分子機構解明の新しい手法を得ることができた。アンチセンスオリゴを脊髄くも膜下腔に投与し知覚神経の末梢側神経終末内で連関する G タンパク質、キナーゼ、イオンチャンネルをノックダウンさせることで、足蹠皮下に投与した痛み物質の *in vivo* シグナル伝達機構を解明することができた。

#### 慢性疼痛研究へ

ちょうどその頃、長崎大学麻酔科の澄川耕二教授との交流があり神経因性疼痛 (のちには神経障害性疼痛と呼ばれるようになっていく) の研究に興味を持つようになった。最もよく利用されている坐骨神経部分結紮 (partial sciatic nerve ligation; pSNL) モデルを導入しこの装置で解析したとき驚くべき事実気づくこととなった。<sup>12)</sup> 予想通り A $\delta$  と A $\beta$  応答が過敏となるが、C 線維応答だけは鈍麻になったのである。その分子機構は現在もお引き続き研究対

象となっているが、一部、感覚鈍麻メカニズムは抑制性転写因子 (neuron restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor; NRSF/REST) による知覚神経の膜電位依存性 Na<sub>v</sub>1.8 チャネルの発現抑制によることで説明できた。<sup>13)</sup> 神経損傷後発現上昇する NRSF はコレプレッサー mSin3 とともに転写調節領域に結合し histone deacetylase (HDAC) を活性化してクロマチンのリモデリングを引き起こして発現抑制につなげるというエピゲノム性遺伝子調節機構の解明となったのである。この研究は当時、「神経系の疾患モデルにおけるエピゲノム解析」ということで高い評価を受け「Faculty of Biology 1000」に選ばれた。最近では創薬研究にもつなげ、NRSF と mSin3 間のタンパク質相互作用抑制物質 mS-11 の発見と機能検証などを行っている (Fig. 1)。<sup>14)</sup>

#### リゾフォスファチジン酸 (lysophosphatidic acid; LPA) 研究へ

こうした解析を進めるうちに、かねてより気になっていた LPA 受容体 LPA<sub>1</sub> 作用をこのシステムに当てはめてみた。実は横浜市立大学助教授時代に進めていたオピオイド受容体関連遺伝子クローニングの過程で見つかった遺伝子は Adult 神経新生と関係の深い脳室周囲細胞層に局限することに気づいていたが、ちょうどこの時期にカリフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD) の Jerold Chun 博士がこの脳室周囲細胞層で特異的に発現する G タンパク質連関 LPA<sub>1</sub> 受容体クローニングの報告を行った。<sup>15)</sup> 長崎大学に赴任した後も、この新しい LPA<sub>1</sub> 受容体を痛み研究につなげたいと考えていたので LPA を脊髄くも膜下腔に投与したとき、pSNL による神経障害性疼痛と同様な A $\delta$  と A $\beta$  応答過敏と C 線維応答鈍麻が見い出された。<sup>16)</sup> LPA<sub>1</sub> 受容体は G タンパク質 G<sub>12/13</sub>-RhoA-ROCK 系を介して形態変化を示すことがよく知られており、実際培養神経細胞突起の退縮を示すという報告がなされている。<sup>17)</sup> 生後に LPA<sub>1</sub> の神経細胞における発現は低下するが Schwann 細胞発現では維持されるということから、直感で LPA<sub>1</sub> 受容体は Schwann 細胞に働き形態変化、脱髄を示すのではないかと推論した。脱髄は末梢神経間の絶縁を取り除くので触覚線維と痛み線維間の電気的あるいは物理的な混線からアロディニアを生ずるのではないかと考えたのである。

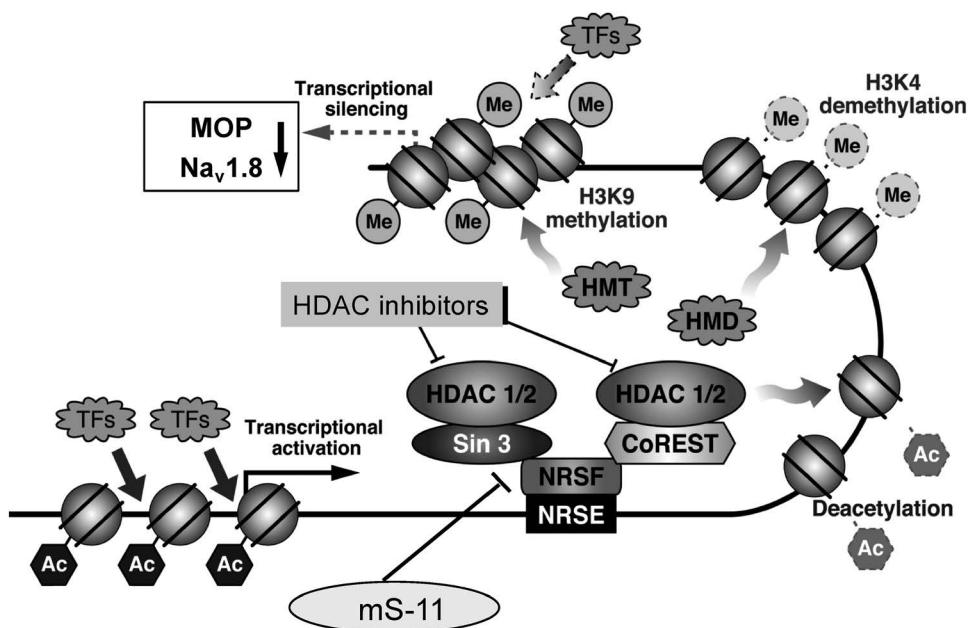


Fig. 1. Epigenetic Silencing of  $\text{Na}_v1.8$  and MOP Gene Expression following Peripheral Nerve Injury, and the Discovery of mS-11 to Block This Negative Regulation

This schematic figure describes the molecular based mechanism underlying epigenetic silencing of gene expression of voltage-dependent sodium channel  $\text{Na}_v1.8$  and  $\mu$  opioid receptor (MOP). It is known that gene silencing is closely related to the deacetylation of histone, which makes the chromatin closed form, followed by suppression of transcription factor (TF) access. It is known that  $\text{Na}_v1.8$  gene has repressor elements NRSEs (or REs) both in exon and intron, while MOP gene has an NRSE at the transcription start point. Following partial sciatic nerve injury, the gene expression of neuron restrictive silencer factor (NRSF/REST) is upregulated for more than 2 weeks, resulting in suppression of  $\text{Na}_v1.8$  and MOP gene expression in small (C) fiber neurons in the dorsal root ganglion (DRG). In this mechanism, NRSF first binds to NRSE, and recruits co-repressors Sin3 and CoREST, followed by further binding to histone deacetylase HDAC1/2, which in turn causes histone deacetylation and makes chromatin closed form. The gene silencing followed by histone deacetylation may include the histone methylation of H3K9 and demethylation of H3K. The authors have attempted to treat this type abnormal pain by use of HDAC inhibitors and newly discovered compound mS-11, which inhibits the protein-protein interaction between mSin3 and NRSF.

また、Schwann 細胞は Nogo 受容体を介して神経突起進展を抑制する働きがあることを留学先で学んでいたこともあったので、脱髄後のスプラウティングが脊髄後角での誤入力を招き、触覚  $\text{A}\beta$  神経が痛み神経情報へと変換される可能性を想定した。LPA は無髄の C 線維により効率よく働き突起退縮を誘発させるならば感覚鈍麻につながり、しかも  $\text{A}\beta$  線維の誤入力の手助けにもなると推定した。これらすべての推論は幸運にも実験データとして検証できたのである。<sup>18,19)</sup> LPA を脊髄くも膜下腔に投与することで脊髄後角の C 線維サブスタンス P の発現が消失したが、<sup>20)</sup> おそらく LPA が C 線維の退縮を誘発させたためであろう (Fig. 2)。こうした研究から  $\text{LPA}_1$  受容体シグナリングが神経障害性疼痛の引き金になるとして 2004 年の Nature Medicine 誌<sup>21)</sup> を始めとして一連の論文に掲載され、国内外の関心を集めることができた。

#### LPA 産生のフィードフォワード機構

脱髄応答を観察していると、坐骨神経に障害を与えているのに  $\text{LPA}_1$  受容体を介する脱髄は脊髄神経

を超えて脊髄に近い後根に観察された。<sup>22)</sup> 知覚神経を取り出して LPA を添加するといずれの領域でも脱髄が生じること<sup>23)</sup> から、LPA は脊髄で産生され後根に作用することが推定されている。LC-MS/MS や質量顕微鏡解析では LPA は傷害側の脊髄後角に局限して産生されることが明らかとなっている。こうした事実が解明されると、LPA 産生の調節機構に関心が移り、最初に行ったのは脊髄切片を灌流して痛み伝達物質としてのサブスタンス P や NMDA を添加し LPA 産生を測定するという実験であった。この両者を併用すると顕著な LPA 産生が観察されるがそれぞれの単独では効果がなかった、という結果を得たのである。<sup>24)</sup> このことは、痛み刺激も特定刺激ではなく、複合異種の刺激が同時に働いたときに LPA が産生することを示しており、結果として神経傷害により非生理的な異種刺激が与えられたときに LPA 産生が生ずることを示唆している。<sup>19)</sup> これはアジュバント関節炎時には強力な痛みが生ずるが、 $\text{LPA}_1$  KO マウスでも影響されないこと、脊髄で LPA 産生を生じないという事実

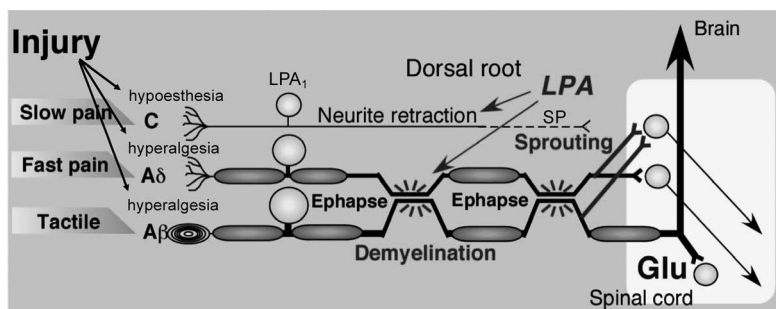


Fig. 2. A Hypothetical Mechanism of  $LPA_1$ -receptor-mediated Abnormal Pain, Hypoesthesia and Hyperalgesia/Allodynia following Peripheral Nerve Injury

After peripheral nerve injury, mice show hyperalgesia to the stimuli of  $A\delta$ - or  $A\beta$ -fibers, possibly through  $LPA_1$ -mediated demyelination and following sprouting, which in turn may form abnormal pain synapse at the spinal dorsal horn. The  $Ca_v\alpha2\delta1$  upregulation in A-fiber neurons in DRG may also contribute to the hyperalgesia (not shown in the figure). On the other hand, mice show hypoesthesia to the stimuli of C-fibers, possibly through the neurite retraction of substance P (SP) neurons. The silencing of  $Na_v1.8$  and MOP gene may be also involved in abnormal pain behaviors.

と対照的である。したがって、 $LPA_1$  シグナルは慢性疼痛と急性疼痛を区別することができる病態分子マーカーと言えるかもしれない。 $LPA$  産生についてさらに興味ある研究成果が得られている。脊髄切片に  $LPA$  を添加すると 6 時間のあいだ時間依存性に  $LPA$  産生が増加し、 $LPA_3$ -KO マウスからの切片では産生増幅は観察されないことを見出したのである。<sup>25)</sup>

$LPA$  産生の自己増幅は *in vivo* 実験でも証明され、詳細な研究結果から (Fig. 3) に示したようなフィードフォワード機構が明らかになった。<sup>19)</sup> 多量に産生する  $LPA$  は逆行性刺激となり脱髄や後根神経節におけるカルシウムチャンネル ( $Ca_v\alpha2\delta1$  サブユニット) 発現を介して異常痛を誘発することから、<sup>19)</sup> その異常疼痛伝達によりさらに  $LPA$  産生が強化されることが期待される。詳細な研究成績は以下の通りである。(1) 神経損傷のような非生理的な刺激で放出される複数の侵害刺激が同時に脊髄受容細胞に与えられると、脊髄神経細胞におけるホスホリパーゼ ( $cPLA_2$ ) と  $iPLA_2$  がともに活性化されるが、その結果細胞質において両親媒性の lysophosphatidylcholine (LPC) が大量に産生され、おそらくミセル形成や細胞膜攪乱により LPC が細胞外に放出されるが、(2) 一旦 LPC が細胞外に放出されると、細胞外 (脳脊髄液) に十分量存在するオートタキシン (ATX) が LPC を  $LPA$  に変換し、(3) 続いて  $LPA$  がミクログリアの  $LPA_3$  受容体を活性化しインターロイキン (interleukin- $1\beta$ ; IL- $1\beta$ ) 産生を誘発させ、再び神経  $PLA_2$  活性化を誘発する、という仕組みである。(4) 産生された  $LPA$  は

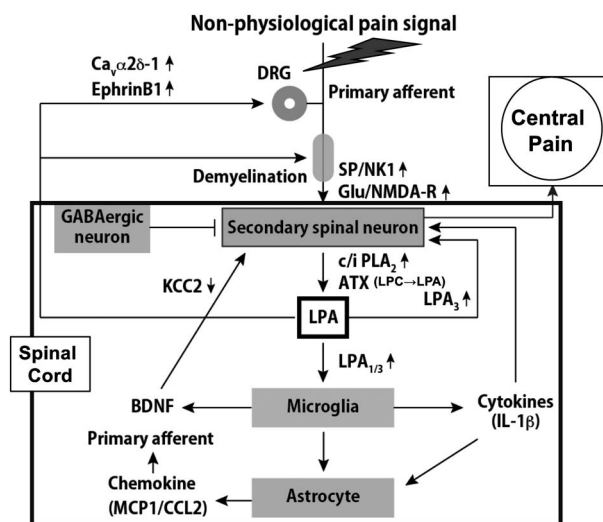


Fig. 3. Feed-forward System of  $LPA$  Production Underlying Neuropathic Pain following Peripheral Nerve Injury

Peripheral nerve injury causes intense non-physiological pain signals to the spinal dorsal horn neurons, which activate not only cytosolic phospholipase  $A_2$  ( $cPLA_2$ ), but also Ca-insensitive phospholipase  $A_2$  ( $iPLA_2$ ), resulting in the production of enough amounts of lysophosphatidyl choline (LPC). High amounts of LPC may form micelle, which is excreted from the cell. Autotaxin (ATX, lysophospholipase D) converts secreted LPC to  $LPA$ .  $LPA$  activates microglia and produces interleukin- $1\beta$ , which in turn activates neuron and stimulates  $cPLA_2$  and  $iPLA_2$ . Thus, the initial intense non-physiological activation of spinal dorsal horn neurons by nerve injury, but not inflammation may lead to a feed-forward  $LPA$  production, and possibly to a cause of chronic pain. The produced abundant  $LPA$  goes back to dorsal root pain. The produced abundant  $LPA$  goes back to dorsal root fibers and DRG, where  $LPA_1$ -mediated demyelination underlying allodynia and upregulation of  $Ca_v\alpha2\delta1$  and ephrin B1 underlying hyperalgesia occur. These mechanisms contribute to the functional feed-forward system of pain transmission. On the other hand,  $LPA$  has an action of BDNF production in microglia through an activation of  $P2X_4$  receptor by secreted ATP. As BDNF is known to decrease neuronal plasma membrane  $KCC2$  levels and increase cytosolic  $Cl^-$  ion levels, resulting in a conversion of  $GABA_A$  receptor function from inhibitory to excitatory one. All these mechanisms may play roles in the development of neuropathic pain. Astrocyte activation, on the other hand, may be also involved in the neuropathic pain, but the role is not well-evidenced at least in the early (development) stage of neuropathic pain.

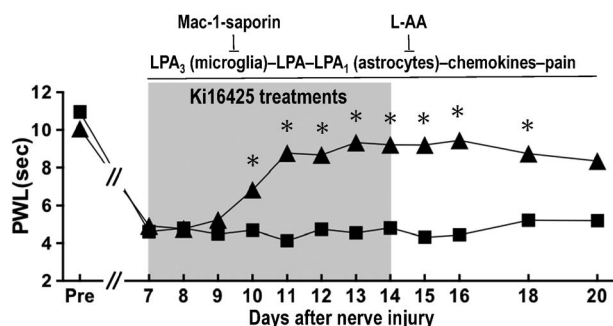


Fig. 4. Repeated Treatments with  $LPA_{1/3}$  Receptor Antagonist Cure the Established Chronic Pain and Erase the Pain Memory

Repeated treatments with  $LPA_{1/3}$  receptor antagonist Ki14625 (30 mg/kg, i.p.) from day 7 to day 13 (twice daily) after the partial sciatic nerve ligation (pSNL) gradually reverse the basal pain threshold to the normal level in the thermal nociception test, and the reversal lasts at least for another week even after the cessation of antagonist treatments. ■: pSNL alone, ▲: Ki14625 + pSNL. \* $p < 0.05$ , vs. pSNL alone. The studies using pharmacological tools (Mac-1-saporin: microglia toxin; L- $\alpha$ -aminoazipate: astrocyte toxin) suggest that microglia play a role in the production of LPA, which in turn activates astrocytes and induces hyperalgesia through a production of chemokines.

これに留まらず、ミクログリアに働き brain derived neurotrophic factor (BDNF) を産生する。カナダの研究者 De Koninck らの研究では「BDNF がカリウム-クロライド共輸送体 KCC2 の低下により神経細胞内のクロライドイオンを上昇させ、 $\gamma$ アミノ酪酸 ( $GABA_A$ ) 受容体シグナルが興奮性に逆転する」と報告していることから、<sup>26)</sup> LPA 産生のフィードフォワード機構のエンドポイントは BDNF を介する神経伝達促進(疼痛過敏)そのものかもしれない。

#### 慢性疼痛維持機構

こうしたメカニズムは慢性疼痛の形成を説明し得るが、臨床における関心は LPA が慢性疼痛の維持に関与するか、すなわち LPA 関連薬が疼痛治療薬たり得るかである。幸いなことに、神経損傷 2, 3 週間後においても脊髄後角での LPA 産生は確認されたのである。<sup>27)</sup> そこで、慢性疼痛が確立している 1 週間後からさらに 1 週間連続で  $LPA_{1/3}$  拮抗薬を投与し続けると、日を追うごとに疼痛閾値が正常に戻り、しかも投与終了後少なくとも 1 週間は疼痛が抑制されたままであった (Fig. 4)。<sup>27)</sup> このことから、LPA 受容体シグナルは慢性疼痛の維持にも働き、結果として  $LPA_{1/3}$  拮抗薬は慢性疼痛治療に用いられる創薬標的となることが確認された。興味あることは、LPA 拮抗薬は急性の疼痛抑制効果を示さないため、 $LPA_1$  シグナルは「痛みメモリーを構成する可塑的神経回路」形成の鍵物質であることが明らか

かとなった。ミクログリアは神経損傷後の疼痛維持期における LPA 産生にも関与するが、アストロサイトは LPA 産生機構に関与せず、むしろアストロサイトに作用してケモカイン等を産生することにより、痛み維持に寄与しているという証拠も得ている。<sup>27)</sup> このように、神経-ミクログリア-アストロサイト間の相互作用が痛みメモリーの維持に寄与していることが明らかになった。一般に記憶は様々な外来刺激「強化」により維持されると考えられる。改めて神経損傷に続く末梢機構を文献検証すると、免疫細胞が後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) に浸潤して神経活動に影響を与えることが数多く報告されていることがわかる。<sup>28)</sup> DRG には神経の周りにアストロサイトに類似したサテライト細胞が存在し、神経損傷後にはミクログリアと起源を同一にするマクロファージが DRG に浸潤することから、脊髄と同様な 3 種の細胞種間のネットワークを形成するものと推定できる。この末梢免疫担当細胞がどのようにして活性化を受けるかは今後興味のあるところである。

#### 線維筋痛症研究

古代ギリシャのアリストテレスは痛みを情動と説き、ルネサンス期のデカルトは末梢から脳へ伝わる感覚であると説いた。現在の国際疼痛学会における定義や最新の研究においてもこの両者の性質が重要であるとされている。先に述べたように、筆者らは「LPA は痛みメモリー機構の責任分子である」ことを明らかにしてきたが、また慢性疼痛における LPA 機構の関与は、化学療法剤による中毒性、<sup>29)</sup> 糖尿病性の末梢性神経障害性疼痛や、脳卒中後中枢性神経障害性疼痛<sup>30)</sup>においても等しく寄与することも明らかとなった。

先述のように痛みには感覚性に加えて情動性の性質も含まれることが知られてきたが、その代表的な慢性疼痛として線維筋痛症 (fibromyalgia; FM) が注目されている。筆者らは様々な同モデル動物の開発を報告し、最近では心理的ストレスによる Empathy (共感) 性のマウスモデルの開発に成功している。<sup>31)</sup> このモデルでは FM 患者にみられる病態生理的 (全身性・慢性疼痛が認められ、雌性優位、とくに性腺摘出後はより顕著) 並びに治療薬理的 (モルヒネやジクロフェナックには治療効果はみられないが、プレガバリンやデュロキセチンは高い治療効

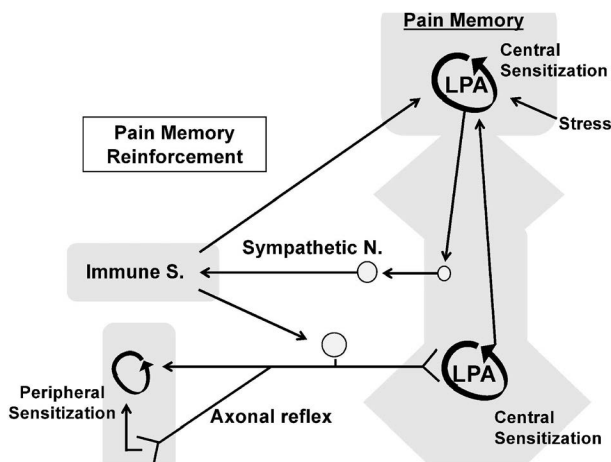


Fig. 5. Generalized Pain-related Feed-forward System

In centralized/nociplastic pain models, which are represented by fibromyalgia-like generalized pain model, LPA signal-mediated central pain memory including central sensitization is first produced by intense peripheral (muscle injury or autonomic disturbance) or central (emotional) stress. Central pain memory subsequently drives peripheral immune or sympathetic signals, which in turn maintain or reinforce the central pain memory. It may be called 'Generalized pain-related feed-forward system'.

果を示す) 性質を示すことを明らかにした。さらに、その疼痛は  $LPA_1$ -KO マウスで完全に消失され、いったん形成された慢性疼痛は  $LPA_1$  拮抗薬の連続投与で完治することも明らかとなった。筆者らは同様なモデルとして温度変化による自律神経性ストレス intermittent cold stress (ICS) 性全身性疼痛モデルや酸性食塩水の繰り返し筋肉注射による筋痛モデルを作製しているが、 $LPA_1$ -KO マウスはすべて遮断することを報告している。<sup>31)</sup> 今後の課題ではあるが、線維筋痛症と類似点を有する他の有痛性疾患として慢性疲労症候群、過敏性腸症候群、顎関節症などについての  $LPA$  受容体シグナルの関与についても興味がある。これらの疼痛症状は全身性ではないが、より広汎な慢性の痛み疾患である点において共通している。おそらく原因は末梢性に始まり、最終的には脳における可塑的なメカニズムが関与する可能性がある。こうしたことを踏まえて、筆者はこれらの痛みを「Centralized Pain」と呼ぶことを提案している (Fig. 5)。

#### 脳を守る鍵物質プロサイモシン $\alpha$

筆者は、 $LPA$  は傷害時に産生され生体に不都合な作用を示すが、傷害時に脳を守る役目を果たすタンパク質プロサイモシン  $\alpha$  の研究についても精力的に行っている。横浜市立大学時代に始めたこのテーマは長崎大学において大きく展開した。吉田明 助教授や大学院生の協力により MALDI-TOF-

MS を使って精製・単離したタンパク質の構造解析に成功し、その結果 N 末端がアセチル化されたプロサイモシン  $\alpha$  であることを突き止めた。<sup>32)</sup> 神経細胞は飢餓状態で培養した場合、低密度培養下では 12 時間以内に完全にネクローシスで細胞死を遂げるが、かろうじて接触する程度の密度では 12 時間ではほとんど生存状態を維持している。その違いは飢餓ストレスにより遊離されたプロサイモシン  $\alpha$  がこのネクローシスを抑制するからであった。したがって、プロサイモシン  $\alpha$  は damage-associated molecular patterns (DAMPs)/Alarmins ファミリー分子であると考えられるが、他の DAMPs/Alarmins と異なり、(神経)細胞の保護的役割を示すという性質を有している点でユニークである。特に神経細胞のネクローシスを抑制するというところに大きな特長がある。

#### 2つのユニークなプロサイモシン $\alpha$ 受容体機構

ネクローシスの分子機構として十分な解明はなされていないが、細胞内の ATP 低下 (Energy Crisis) と関連するという考えは共通した理解である。筆者らの研究では、初代培養神経細胞に虚血再灌流や飢餓ストレスを与えたときに生ずるネクローシスはグルコーストランスポーター (GLUT4) の内在化に続く細胞内 ATP 低下と関連することを見出している。この条件下でプロサイモシン  $\alpha$  を添加すると  $G_{i_o}$  タンパク質連関型受容体の活性化とその下流の protein kinase C (PKC) を介して GLUT4 を細胞膜表面へ移行させ、グルコース流入による ATP 産生を介してネクローシスを抑制することが明らかとなった。一方、プロサイモシン  $\alpha$  は同様な細胞内シグナル (PKC) を介して Bcl2 関連タンパク質 Bax の発現上昇を誘発し、ミトコンドリアからのチトクローム C 漏出、アポトソーム活性化、続いて Caspase 3 の活性化でアポトーシスを誘発させることも明らかにしている。<sup>32,33)</sup> Caspase 3 は ATP を消費する DNA 修復酵素 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) を分解することでよく知られているが、PARP 分解はいわば細胞内 ATP レベルの低下を食い止める役割を果たすと考えられるのである。このようにプロサイモシン  $\alpha$  は神経細胞の飢餓ストレスによるネクローシス開始までの時間稼ぎをしていると考えられる。そうしている間に、脳内ではアポトーシスを抑制する神経栄養因子



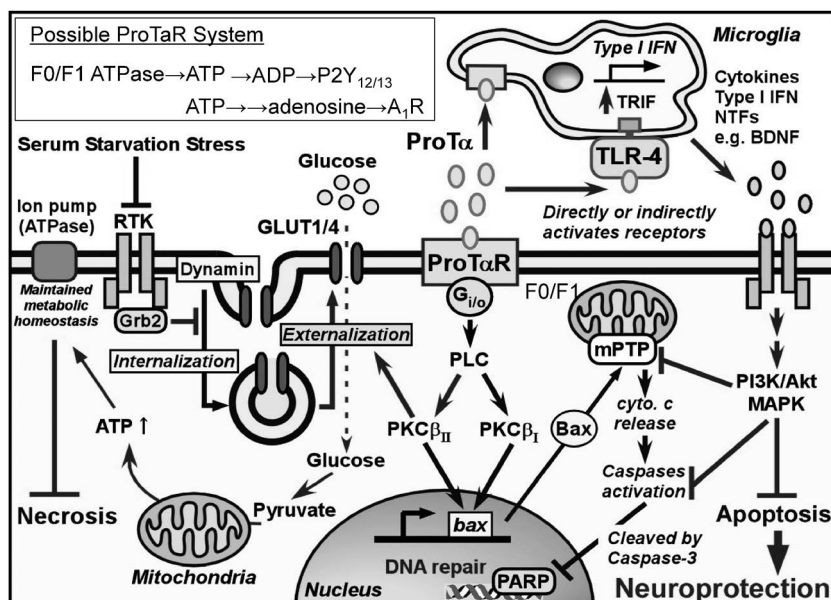


Fig. 6. Two Independent Candidates for Prothymosin  $\alpha$  Receptors

Prothymosin  $\alpha$  (ProT $\alpha$ ) is released from cultured primary cortical neurons under the serum-free starving condition, and inhibits the rapid necrosis mechanism through an activation of  $G_{i/o}$ -coupled receptor, PLC and PKC $\beta$ II, followed by the externalization of glucose transporter (GLUT1/4), which allows the glucose influx and subsequent necrosis inhibition *via* the rescue of intracellular contents of ATP. ProT $\alpha$  also causes the delayed apoptotic mechanism through a similar downstream signaling, followed by induction of PKC-mediated Bax expression and caspase 3 activation. As caspase 3 is known to degrade poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), which consumes abundant ATP for the purpose of restoration from the stress-induced DNA damage, the ProT $\alpha$ -induced apoptosis-inducing mechanism may also contribute to an inhibition of rapid necrosis. In *in vivo* retinal ischemia-reperfusion system, on the other hand, ProT $\alpha$  inhibits not only necrosis, but also apoptosis, possibly through an action of neurotrophic factors, since ProT $\alpha$  increases the level of BDNF in an ischemic condition-dependent manner. The machineries of ProT $\alpha$ -induced BDNF production remain elusive. One of possibilities may be related to the beneficial actions of ProT $\alpha$  to activated microglia through TLR4. The identification of  $G_{i/o}$ -coupled ProT $\alpha$  receptor remains to be determined. Recent study reveals that ProT $\alpha$  binds to plasma membrane bound  $F_0/F_1$  ATPase and increases extracellular ATP. As it is expected  $F_0/F_1$  ATPase digests ATP and produces ADP,  $G_{i/o}$ -coupled ADP receptor P2Y $_{12/13}$  may be an indirect receptor for ProT $\alpha$ . Alternatively,  $G_{i/o}$ -coupled  $A_1$  receptor for further metabolite adenosine, may be another candidate. Thus, it is suggested that extracellularly secreted ProT $\alpha$  may have two independent receptor systems underlying beneficial actions in the central nervous system.

の働きが始まり、結果的にはネクローシスもアポトーシスも抑制される。こうした現象は、網膜虚血再灌流システムにおけるプロサイモシン $\alpha$ の神経保護機構解析で検証されているが、いずれの例でもプロサイモシン $\alpha$ は BDNF 産生をも誘発することが確かめられている (Fig. 6).<sup>34)</sup>

この網膜虚血再灌流システムは *in vivo* での情報伝達機構を解析する優れた特徴を有している。最も重要なことは、96 well プレートよりも小さな容量の *in vivo* 硝子体内への微量注射が可能であること、組織化学的並びに電気生理学的機能として作用評価が可能であることである。プロサイモシン $\alpha$ は DAMPs に分類される性質を有することから toll-like receptor (TLR4) への作用を推論し、その下流の TIR-domain-containing adapter-inducing interferone- $\beta$  (TRIF) 系を選択的に駆動するなどのメカニズムを明らかにした。つまり、プロサイモシン $\alpha$ を虚血 2 日前に硝子体内にプレコンディショニング投与することで、網膜虚血障害を半減させること、並

びにその効果は TLR4 や TRIF の KO マウスにおいて消失し、myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) の KO マウスでは無影響であることが明らかとなった。また、こうした結果はプロサイモシン $\alpha$ によるサイトカイン類の遺伝子発現解析からも検証されている。<sup>35)</sup> TLR4 の代表的なリガンドとしてリポ多糖 lipopolysaccharide (LPS) が知られており、LPS シグナルの下流には MyD88 と TRIF の両方が機能し、LPS を投与した初期には炎症性メディエーターの産生が生ずるが、プロサイモシン $\alpha$ と同様にプレコンディショニング投与をした場合、TRIF 系を介した虚血保護効果が認められる (Fig. 7)。また、LPS と TLR4/MD2 間の結晶解析結果を基にした分子動力的解析から、プロサイモシン $\alpha$ は TLR4 と MD2 の双方に対する結合様式があることも見い出している (Fig. 8).<sup>36)</sup>

このメカニズムとは別に、プロサイモシン $\alpha$ を網膜虚血後数時間から 24 時間までの間に硝子体内に 1 回投与した場合には、細胞障害は完全に抑制さ

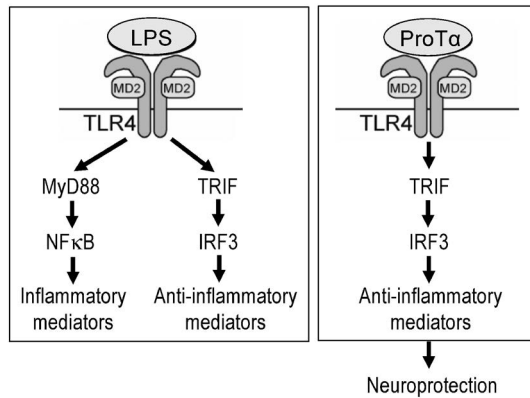


Fig. 7. ProT $\alpha$  Selectively Activates Cytoprotective TLR4-TRIF System

In the retinal ischemia-reperfusion model in mice, the intravitreal (i.vt.) preconditioning treatment with ProT $\alpha$  protects the retinal cells in terms of morphology and function, and this beneficial action is abolished in mice deficient of TLR4 and TRIF, but not MyD88 gene. The i.vt. administration of ProT $\alpha$  induces several anti-inflammatory mediator genes downstream to TLR4-TRIF-IRF3 cascade, but not inflammatory mediator genes downstream to TLR4-MyD88-NF $\kappa$ B cascade in the retina. The i.vt. preconditioning treatment with ProT $\alpha$  blocks the retinal ischemia-reperfusion-induced expression of inflammatory mediator genes. These actions are in a good contrast to the case with lipopolysaccharide (LPS) actions, which are the induction of inflammatory mediator gene expression or blockade of ischemic damage-induced expression of these genes by i.vt. administration or i.vt. preconditioning treatment prior to ischemia-reperfusion with LPS, respectively.

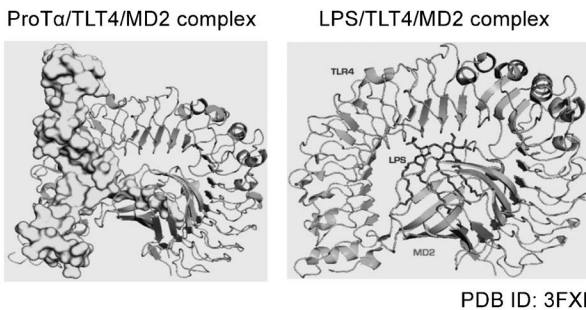


Fig. 8. Predicted Structure of ProT $\alpha$ /TLR4/MD2 Complex

The predicted structure of ProT $\alpha$ /TLR4/MD2 complex was calculated by use of crystal structure of LPS/TLR4/MD2 complex (PDB ID: 3FXI). In this model, it looks that ProT $\alpha$  binds to TLR4 as well as MD2, unlike the case with LPS, which binds to MD2.

れることを見い出している. 最近この作用に関与する受容体として細胞膜上の F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATPase が 1 つの候補であることを見い出している.<sup>37)</sup> すなわち, プロサイモシン  $\alpha$  はこの酵素を活性化し, 細胞外に ATP 遊離を誘発させると同時に ATPase 活性の作用で ADP にまで変換させ, あるいはさらに別酵素によりアデノシンにまで変換させる結果として, 最終的に ADP 受容体 P2Y<sub>12/13</sub> やアデノシン受容体 A<sub>1</sub> などの G<sub>i/o</sub> タンパク質連関受容体を活性化することがその薬理作用機構ではないか, との仮説を筆

者らは提唱している. しかし, この点に関しては更なる研究が必要である.

### プロサイモシン $\alpha$ の生理機構

プロサイモシン  $\alpha$  は虚血, 飢餓あるいはヒートショックストレス時に主に神経細胞から放出されるが, 細胞膜の破綻の前に非小胞性の非古典的な様式で行われる. 培養実験では神経細胞とアストロサイトからの放出は確認されるが, ミクログリアからの放出は確認されない. 予備試験では免疫細胞など多くの非神経系細胞においても同様なのでその遊離様式は細胞系譜特異的であるように理解される. アストロサイト系の C6 グリオーマ細胞を用いた詳細な解析では, 虚血・飢餓ストレス時に核に存在していたプロサイモシン  $\alpha$  は速やかにほぼ完全に細胞外に放出される.<sup>38)</sup> プロサイモシン  $\alpha$  には C 末端領域に核移行シグナルが存在し, タンパク質合成後速やかにシャペロン分子 importin により核に運ばれる. 輸送を終えた importin は低分子 G タンパク質 Ran と複合体を形成して細胞質に戻されるが, 虚血時の ATP 低下が間接的に GTP 低下につながり, Ran による importin の核外排出が妨げられ, 結果的にはプロサイモシン  $\alpha$  のそれ以上の核内移行はなくなり, しかもプロサイモシン  $\alpha$  は低分子なので核膜孔を容易にくぐり抜けるために自然に細胞全体に分布するようになる. 虚血時には細胞膜を通してカルシウムスパイクが発生してカルシウム流入が生じるが,<sup>39)</sup> その結果細胞質においてカルシウム結合タンパク質 S100A13 とプロサイモシン  $\alpha$  との結合が生じ, その後更なるカルシウム結合タンパク質との複合体を形成して細胞膜に移行する.<sup>40)</sup> ここで重要な事実シナプス小胞膜に存在する soluble NSF-attachment protein receptor (v-SNARE) タンパク質 p65 シナプトタグミンの膜貫通領域を欠如した p40 シナプトタグミンが S100A13 と結合し, 結果的にこれら複合体が細胞膜の tSNARE タンパク質に接合テザリングする. その後細胞膜フリッピングする性質を有する Annexin2 にさらに結合し flippase の力を借りてプロサイモシン  $\alpha$  複合体が細胞外に放出されるということを見い出している. 小胞を用いないので放出される量に制限がなく, ほぼすべてのプロサイモシン  $\alpha$  が放出されることがなし得るのであろう. 虚血脳においてもプロサイモシン  $\alpha$  の細胞からの完全な枯渇は確認されている.

### プロサイモシン $\alpha$ の病態生理機構

このテーマに関してはまだ十分な研究報告はなされていないが、網膜虚血実験において内顆粒層細胞のプロサイモシン $\alpha$ が枯渇することが確認されている。またプロサイモシン $\alpha$ のアンチセンスオリゴヌクレオチドやIgG抗体を網膜虚血前に硝子体内微量注入すると網膜細胞層における細胞死が加速されることが確認されている。<sup>41)</sup> 一方、プロサイモシン $\alpha$ の遺伝子欠損マウスに関する知見についても一部報告済みである。ホモ接合型マウスは胎生段階で死亡するがヘテロ接合型マウスは生存できることからその表現型解析を行ったところ、行動観察では学習障害、不安惹起が確認され、組織化学では海馬歯状回におけるブロモデオキシウリジン (BrdU) 染色やダブルコルチン/DCX 染色において神経新生の有意な低下が確認されている。<sup>42)</sup> 線条体に比較的特異的に発現するGタンパク質 $\gamma$ サブユニットプロモーターを用いたコンディショナルKOでは若年期には目立った表現型は認められないが、20週令以上の高週齢マウスでは、ロータロッド試験などにおいて運動障害が観察される。また、若年期のマウスでも弱いtransient middle cerebral artery (tMCAO) 虚血ストレスを与えると野生型では無影響であったものがこのコンディショナルKOマウスでは運動障害が観察されるようになることを確認している。こうしたことから生理的にもストレスから脳を守るレジリエンス機能を有していることが判明した。

### プロサイモシン $\alpha$ による虚血性脳神経・血管保護作用

上記のように様々なメカニズムで神経細胞を保護することが明らかとなったが、実際に全身投与したプロサイモシン $\alpha$ は虚血脳を保護する効果を示した。筆者らが試みた虚血再灌流モデルは、先に述べた網膜虚血モデル<sup>41)</sup>と塞栓子を用いた中大脳動脈梗塞・再灌流 (tMCAO) モデル、<sup>43)</sup>さらにはローズベンガル静脈内注射後の緑色光照射による脳血栓 photochemically induced thrombosis (PIT) モデル<sup>43)</sup>と tissue plasminogen activator (tPA) 静脈内注射による再灌流モデルであった。プロサイモシン $\alpha$ はアミノ酸 111 個からなる極端な酸性タンパク質であるが、脳虚血時には血液脳関門は傷害を受けることから脳移行が容易になっていると予想され、実際タ

ンパク質の脳移行が確認され、全身投与したプロサイモシン $\alpha$ の脳障害保護作用が確認されている。1時間のtMCAOモデルでは虚血後2時間に静脈内投与したプロサイモシン $\alpha$ は0.1 mg/kgでほぼ完全に運動障害を抑制した。一方、臨床では脳梗塞後4.5時間にtPA投与を投与し血栓溶解させることが承認されているが、この時間帯では脳出血のリスクはあると報告されており、実際マウスモデルにおいては顕著な脳出血が確認されている。筆者らはtPAをMCAO後6時間に投与することでtPA誘発性脳梗塞後脳出血をより明確にするモデルを作製しているが、静脈内投与したプロサイモシン $\alpha$ はこのtPA誘発性脳出血を完全に抑制することを見出ししている。しかし、このモデルではマウスは1週間以上生存し続けることができなかったために、MCAO後2時間と6時間の2回投与を行ったところ、ほぼ完全な生存効果が検証された。このような投与計画が臨床で承認されるならば、より多くの患者の生命を救うことができるかもしれない。

### プロサイモシン $\alpha$ 由来小ペプチドと創薬

プロサイモシン $\alpha$ それ自身での治療有効性は確認されているが、実臨床応用としてはタンパク質製剤の持つ合成コストの問題は避けることができない。そこで小ペプチド化を試み、最終的に6アミノ酸の活性ペプチドNEVDQE (P6Q)を開発した。<sup>44)</sup>脳卒中治療は超急性期治療が重要であることと、副作用の可能性を避ける意味でP6Qはすべて天然アミノ酸で構成されている。様々な虚血再灌流モデルにおいて分子あたりの活性は弱いですが、プロサイモシン $\alpha$ と同程度の神経保護活性を見出ししている。最近、iPS由来の凍結保存網膜神経細胞を解凍する際に生じる細胞死をこのP6Qが抑制できるという報告が理化学研究所の高橋政代先生のチームとの共同研究で報告した。<sup>45)</sup>今後、様々な神経変性疾患への応用を検討しているところである。

**謝辞** 本研究成果は主に京都大学、長崎大学においてともに研究に参加して下さった教員、研究者、学生諸君の貢献なしではなし得なかったものばかりである。特筆すべき共同研究者については本文にお名前を記載させて頂いた。ここに厚く感謝したいと思います。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

### REFERENCES

- 1) Takagi H., Shiomi H., Ueda H., Amano H., *Nature*, **282**, 410–412 (1979).
- 2) Ueda H., Tatsumi K., Shiomi H., Takagi H., *Brain Res.*, **231**, 222–224 (1982).
- 3) Ueda H., Ge M., Hazato T., Katayama T., Takagi H., *Life Sci.*, **36**, 1865–1871 (1985).
- 4) Ueda H., Yoshihara Y., Fukushima N., Shiomi H., Nakamura A., Takagi H., *J. Biol. Chem.*, **262**, 8165–8173 (1987).
- 5) Tsukahara T., Yamagishi S., Neyama H., Ueda H., *Peptides*, **101**, 60–68 (2018).
- 6) Ueda H., Yoshihara Y., Misawa H., Fukushima N., Katada T., Ui M., Takagi H., Satoh M., *J. Biol. Chem.*, **264**, 3732–3741 (1989).
- 7) Neyama H., Hamada Y., Tsukahara R., Narita M., Tsukamoto K., Ueda H., *Peptides*, **107**, 10–16 (2018).
- 8) Ueda H., Harada H., Nozaki M., Katada T., Ui M., Satoh M., Takagi H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7013–7017 (1988).
- 9) Evans C. J., Keith D. E. Jr., Morrison H., Magendzo K., Edwards R. H., *Science*, **258**, 1952–1955 (1992).
- 10) Kieffer B. L., Befort K., Gaveriaux-Ruff C., Hirth C. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12048–12052 (1992).
- 11) Inoue M., Kobayashi M., Kozaki S., Zimmer A., Ueda H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10949–10953 (1998).
- 12) Matsumoto M., Xie W., Ma L., Ueda H., *Mol. Pain*, **4**, 25 (2008).
- 13) Uchida H., Ma L., Ueda H., *J. Neurosci.*, **30**, 4806–4814 (2010).
- 14) Ueda H., Kurita J. I., Neyama H., Hirao Y., Kouji H., Mishina T., Kasai M., Nakano H., Yoshimori A., Nishimura Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 4705–4709 (2017).
- 15) Hecht J. H., Weiner J. A., Post S. R., Chun J., *J. Cell Biol.*, **135**, 1071–1083 (1996).
- 16) Ma L., Matsumoto M., Xie W., Inoue M., Ueda H., *J. Neurochem.*, **109**, 603–610 (2009).
- 17) Weiner J. A., Fukushima N., Contos J. J., Scherer S. S., Chun J., *J. Neurosci.*, **21**, 7069–7078 (2001).
- 18) Ueda H., *Mol. Pain*, **4**, 11 (2008).
- 19) Ueda H., *Pain*, **158**, S55–S65 (2017).
- 20) Inoue M., Yamaguchi A., Kawakami M., Chun J., Ueda H., *Mol. Pain*, **2**, 25 (2006).
- 21) Inoue M., Rashid M. H., Fujita R., Contos J. J., Chun J., Ueda H., *Nat. Med.*, **10**, 712–718 (2004).
- 22) Nagai J., Uchida H., Matsushita Y., Yano R., Ueda M., Niwa M., Aoki J., Chun J., Ueda H., *Mol. Pain*, **6**, 78 (2010).
- 23) Fujita R., Kiguchi N., Ueda H., *Neurochem. Int.*, **50**, 351–355 (2007).
- 24) Inoue M., Ma L., Aoki J., Ueda H., *J. Neurochem.*, **107**, 1556–1565 (2008).
- 25) Ma L., Uchida H., Nagai J., Inoue M., Chun J., Aoki J., Ueda H., *Mol. Pain*, **5**, 64 (2009).
- 26) Coull J. A., Beggs S., Boudreau D., Boivin D., Tsuda M., Inoue K., Gravel C., Salter M. W., De Koninck Y., *Nature*, **438**, 1017–1021 (2005).
- 27) Ueda H., Neyama H., Nagai J., Matsushita Y., Tsukahara T., Tsukahara R., *Pain*, **159**, 2170–2178 (2018).
- 28) Kim D., You B., Lim H., Lee S. J., *Mol. Pain*, **7**, 74 (2011).
- 29) Uchida H., Nagai J., Ueda H., *Mol. Pain*, **10**, 71 (2014).
- 30) Ueda H., Neyama H., Sasaki K., Miyama C., Iwamoto R., *Neurobiol. Pain*, **5**, 100020 (2019).
- 31) Ueda H., Neyama H., *Neurobiol. Pain*, **1**, 16–25 (2017).
- 32) Ueda H., Fujita R., Yoshida A., Matsunaga H., Ueda M., *J. Cell Biol.*, **176**, 853–862 (2007).
- 33) Ueda H., *Pharmacol. Ther.*, **123**, 323–333 (2009).
- 34) Fujita R., Ueda M., Fujiwara K., Ueda H., *Cell Death Differ.*, **16**, 349–358 (2009).
- 35) Halder S. K., Matsunaga H., Ishii K., Ueda H., *J. Neurochem.*, **135**, 1161–1177 (2015).
- 36) Omotuyi O., Matsunaga H., Ueda H., *Expert Opin. Biol. Ther.*, **15**, S223–S229 (2015).
- 37) Ueda H., Matsunaga H., Matsushita Y., Maeda S., Iwamoto R., Yokoyama S., Shirouzu M., *Expert Opin. Biol. Ther.*, **18**, 89–94 (2018).
- 38) Matsunaga H., Ueda H., *Cell Death Differ.*, **17**, 1760–1772 (2010).

- 39) Matsunaga H., Ueda H., *Neurochem. Int.*, **49**, 294–303 (2006).
- 40) Matsunaga H., Ueda H., *Cell Death Differ.*, **17**, 1760–1772 (2010).
- 41) Fujita R., Ueda M., Fujiwara K., Ueda H., *Cell Death Differ.*, **16**, 349–358 (2009).
- 42) Ueda H., Sasaki K., Halder S. K., Deguchi Y., Takao K., Miyakawa T., Tajima A., *J. Neurochem.*, **141**, 124–136 (2017).
- 43) Halder S. K., Matsunaga H., Yamaguchi H., Ueda H., *J. Neurochem.*, **125**, 713–723 (2013).
- 44) Ueda H., Halder S. K., Matsunaga H., Sasaki K., Maeda S., *Neuroscience*, **318**, 206–218 (2016).
- 45) Kitahata S., Tanaka Y., Hori K., Kime C., Sugita S., Ueda H., Takahashi M., *Sci. Rep.*, **9**, 2891 (2019).