Effects of Cholecystokinin on Substance P, Neurokinin A and Neurokinin B-induced Aversive Behaviour in Mice

Shunsuke Kawamura¹, Motoaki Takayanagi¹, Chizuko Watanabe²,
Ryuichiro Ando², Akihiko Yonezawa³ and Shinobu Sakurada³

¹*Department of Clinical Pharmacy, ²Center for Laboratory Animal Science, and*

³*Department of Physiology & Anatomy, Tohoku College of Pharmacy,*

Sendai, Japan

(Received 6 April 1998)

Abstract

Cholecystokinin (CCK), substance P (SP) and neurokinin A (NKA) are known to be contained in the spinal cord and primary sensory neuron, and may have functional interactions as a neurotransmitter or neuromodulator on nociceptive information. The present experiment was to investigate the possible functional significance of the interaction between CCK and tachykinins in the spinal cord of male ddY strain mice. Intrathecal (i.t.) injection of SP (100 pmol/mouse), NKA (200 pmol/mouse) and neurokinin B (NKB, 2000 pmol/mouse) caused the aversive behaviour which includes licking, biting and reciprocal scratching responses. I.t. injection of high doses of CCK-8s (10, 30 and 100 pmol/mouse) which has a potent agonistic activity to both CCK-A and CCK-B receptors, significantly attenuated the aversive behaviour induced by i.t. injection of SP, NKA and NKB. On the contrarily, i.t. injection of low doses of CCK-8s (0.3 and 1 pmol/mouse) potentiated the aversive behaviour of SP and NKA. In contrast, pretreatment with selective CCK-B receptor agonists, CCK-8d (10~300 nmol/mouse), pentagastrin (10~300 nmol/mouse) and CCK-4 (10~300 nmol/mouse), did not significantly influence SP, NKA and NKB-induced aversive behaviour. These results indicate that CCK-8s may play an important role on nociceptive information via CCK-A receptor of the mouse spinal cord.

Key words : cholecystokinin, substance P, neurokinin A, neurokinin B, aversive behaviour

サブスタンス P、ニューロキニン A およびニューロキニン B 誘発性疼痛関連行動に及ぼす
コレシストキニンの効果

川村 俊介¹ 高柳 元明¹ 渡辺千寿子² 安藤隆一郎² 米沢 章彦³ 桜田 忍³

¹東北薬科大学 医療薬学

²同 実験動物センター

³同 機能形態学

緒 言

コレシストキニン (CCK) は、ヒトを含めた哺乳類の中樞神経内において多くみいだされ^{5,23)}、大脳皮質灰白質、中脳水道周囲灰白質 (PAG)、視床腹内側核および脊髄後角に分布することから、痛覚受容あるいは痛覚制御に密接に関連する機能を有することが多くの研究グループにより報告されている^{2,3,8,15)}。痛覚閾値に及ぼす CCK-8s およびデカペプチドアナログであるセルレインの効果についての研究結果は異なっている。Zetler ら^{14,27)}、Barbaz ら¹⁾ および Hill ら¹¹⁾ の研究グループは、CCK-8s およびセルレインが種々の疼痛モデルにおいてナロキソン拮抗性の鎮痛作用を生じることから、内因性 CCK-8s がオピオイド様の痛覚制御因子として機能している可能性を報告している。しかしながら、Faris ら⁷⁾ や Dourish ら⁶⁾ の研究グループは CCK-8s の少用量がモルヒネや内因性オピオイドの侵害刺激抑制作用を減弱させることをみだし、CCK-8s が内因性オピオイド拮抗因子として機能している可能性を提唱している。このように、脊髄後角に存在することが知られている CCK は、オピオイド拮抗作用および侵害刺激抑制作用といった相反する生理機能を有することが知られており、痛覚受容機構の調節因子の 1 つと考えられている。

一方、一次知覚神経内に含まれる痛覚伝達物質であるサブスタンス P (SP) およびタキキニン類をマウスやラットの脊髄クモ膜下腔内へ直接投与すると、後肢に対する licking, biting および後肢による交互の scratching といった疼痛関連行動を誘発し、この反応はオピオイド投与によって抑制される²¹⁾。

また、現在、タキキニン受容体は放射性リガンドを用いての結合実験や平滑筋標本を用いての実験により、NK-1、NK-2 および NK-3 受容体の 3 種類に分類され^{16,18,19)}、それぞれの受容体を選択的なアゴニストは、SP、ニューロキニン A (NKA) およびニューロキニン B (NKB) とされている。

そこで本実験では、SP、NKA および NKB をマウス脊髄クモ膜下腔内に投与した際に惹起される疼痛関連行動に及ぼす CCK の効果について検討を行った。

実験材料および方法

使用動物：実験には、体重 20～22 g の雄性マウス (Std-ddY) を日本 SLC より購入し、明暗 12 時間サイクル (明期：7：00～19：00、暗期：19：00～7：00)、室温 23±1°C、湿度 55±5 % の環境下で一定期間飼育した後、使用した。なお、飼料 (CE-2、日本クレア) および水は実験使用時以外は自由に摂取させた。

使用薬物：SP、NKA、NKB、CCK-8s、CCK-8d、ペントガストリンおよび CCK-4 は、ペプチド研究所 (箕面) より購入し、使用した。これらのペプチドは、すべて滅菌した人工脳脊髄液 (A-CSF、組成 NaCl 7.4 g、KCl 0.19 g、MgCl₂ 0.19 g、CaCl₂ 0.14 g/1000 ml) に溶解し、マウス脊髄クモ膜下腔内に投与した。

脊髄クモ膜下腔内投与：Hylden と Wilcox の方法¹²⁾ に準じ、マウスの腰椎を固定した後、腰椎の 5 番と 6 番間の脊髄クモ膜下腔 (i.t.) 内へ、50 μ l のマイクロシリンジ (Hamilton) に取り付けた 1/5 皮下針を挿入し、薬液を 5 μ l/mouse の割合で投与した。

マイクロシリンジおよび皮下針は、ペプチドの吸着を防ぐために5%シリコン化溶液 (Pierce) を用いて、シリコン化を施した後、使用した。

疼痛関連行動の測定：SP, NKA および NKB の i.t. 投与は、マウスに後肢に対する licking, biting および後肢による交互の scratching といった疼痛関連行動を誘発する。そこで、これらの疼痛関連行動の持続時間を SP, NKA および NKB i.t. 投与後5分ごとに20分間測定した。マウスは、測定用のプラスチックケージの中に1匹ずつ入れ、約1時間後に探索行動が消失を確認した後、実験に使用した。

統計処理：成績は平均値±標準誤差で表示し、統計学的有意差の検定は分散分析処理後、各群間の比較をDunnettの方法により行った。

実験結果

1. SP, NKA および NKB により惹起される疼痛関連行動

SP の5 pmol から500 pmol をマウス脊髄クモ膜下腔内に投与すると、マウス後肢に対する licking, biting および後肢による交互の scratching といった疼痛関連行動を誘発し、これらの疼痛関連行動の持続時間が用量依存的に増加し、20 pmol 以上の投与群で有意な効果が観察された。そこで、SP i.t. の用量を100 pmol/mouse に固定して以下の実験を行った (Fig. 1A)。NKA も SP と同様に20~500 pmol i.t. 投与で用量依存的かつ有意な効果を示した。SP と同様の効果を発現する用量は200 pmol であることが認められたので、以下の実験にはその用量を使用した (Fig. 1B)。同様の検討を NKB を用いて行った。NKB i.t. 投与も SP や NKA と同様に用量依存的かつ有意な疼痛関連行動を示したが、その効果は、SP や NKA よりも弱く、本実験では、同様の効果が得られるのに2000 pmol すなわち2 nmol を必要としたので、以下の実験にはこの用量に固定して使用した (Fig. 1C)。

2. SP, NKA および NKB i.t. 投与により惹起される疼痛関連行動に対する CCK-8s の効果

脊髄クモ膜下腔内に CCK-8s と SP (100 pmol/

Fig. 1 Aversive responses induced by substance P (5~500 pmol) (A), neurokinin A (5~500 pmol) (B) and neurokinin B (50~5000 pmol) (C) injected intrathecally (i.t.) in mice. The results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.01$ as compared to artificial cerebrospinal fluid (A-CSF)-treated group (Dunnett's test).

Fig. 2 Effect of CCK-8s (0.1~300 pmol/mouse, i.t.) on substance P (100 pmol/mouse, i.t.)-induced aversive responses in mice. The results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.01$ as compared to vehicle (Veh)-treated group (Dunnett's test).

mouse)を同時に投与すると、CCK-8sの高用量(10~300 pmol/mouse)投与時には、SPによる疼痛関連行動を有意($p < 0.01$)に抑制するにも関わらず、低用量(0.3, 1 pmol/mouse)投与時には、逆にSPの効果を有意($p < 0.01$)に増強した(**Fig. 2**)。NKA(200 pmol/mouse)とCCK-8sの併用もSPとCCK-8sの併用時と同様の効果が得られた。すなわち、CCK-8sの高用量(10~300 pmol/mouse)投与時には、NKAによる疼痛関連行動を有意($p < 0.01$)に抑制するにも関わらず、低用量(0.3, 1 pmol/mouse)投与時には、逆にNKAの効果を有意($p < 0.01$)に増強した。脊髄クモ膜下腔内にCCK-8sとNKB(2000 pmol/mouse)を同時に投与すると、CCK-8sの高用量(30, 100, 300 pmol/mouse)投与時のみ、NKBによる疼痛関連行動が有意($p < 0.01$)に抑制されたが、低用量の増強効果は観察されないという、SP、NKA投与時とは異なる結果が得られた。

SP (100 pmol, i.t.)に対するCCK-8sのID₅₀値は30.5 pmolで、NKA (200 pmol, i.t.)に対しては36.5 pmol、NKB (2000 pmol, i.t.)に対しては41.0 pmolと算出され、各群間で大きな違いは認められなかった(**Table 1**)。

Table 1 ID₅₀ values and their 95 % confidence limits of CCK-8s (pmol/mouse, i.t.) on substance P (SP, 100 pmol/mouse), neurokinin A (NKA, 200 pmol/mouse) and neurokinin B (NKB, 2000 pmol/mouse)-induced aversive responses in mice

	CCK-8s (pmol i.t.)	
	ID ₅₀	(95% confidence limit)
SP	30.5	(16.4-56.7)
NKA	36.5	(20.3-65.7)
NKB	41.0	(22.7-73.8)

R.P. : relative potency

3. SP, NKA および NKB i.t. 投与により惹起される疼痛関連行動に対する CCK 関連ペプチドの効果

CCK 関連ペプチドであり、選択的 CCK-B 受容体アゴニストである CCK-8s, ペンタガストリンおよび CCK-4 を用いて同様の検討を行った。これらのペプチドの前処理 (10, 30, 100 および 300 nmol/mouse) は、すべての群において、SP (100 pmol/mouse), NKA (200 pmol/mouse) および NKB (2000 pmol/mouse) i.t. 処理により惹起される疼痛関連行動に対して有意な影響は与えなかった (data not shown)。

考 察

タキキニン受容体は放射性リガンドを用いての結合実験や平滑筋標本を用いての実験により、NK-1, NK-2 および NK-3 受容体の3種類に分類され^{16,18,19)}、それぞれの受容体に選択的なアゴニストは、SP, NKA および NKB とされている。それらの中でも、NK-1 受容体は脊髄後角中に高濃度に存在し、求心性一次知覚神経の情報を上位脳へ伝える重要な役割を担っている。マウスやラットにおいて SP を代表とするタキキニン類を脊髄クモ膜下腔内へ投与すると後肢に対する licking, biting および後肢による交互の scratching 行動を特徴とする疼痛関連行動が誘発される²¹⁾。本実験においても、SP, NKA および NKB i.t. 投与によりこれらの疼痛関連行動が

Fig. 3 Effect of CCK-8s (0.1~300 pmol/mouse, i.t.) on neurokinin A (200 pmol/mouse, i.t.)-induced aversive responses in mice. The results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. * p < 0.01 as compared to vehicle (Veh)-treated group (Dunnett's test).

Fig. 4 Effect of CCK-8s (0.1~300 pmol/mouse, i.t.) on neurokinin B (2000 pmol/mouse, i.t.)-induced aversive responses in mice. The results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. * p < 0.01 as compared to vehicle (Veh)-treated group (Dunnett's test).

誘発されたが、その効力は SP が最も強く、NKA は SP に対して約 1/2、NKB は約 1/20 の効力を有することが明らかとなった (Fig. 1)。この結果は、NK-1 受容体アゴニストである SP が、投与直後から 5 分間で約 60 秒の反応が認められるが、NK-2 受容体アゴニストである NKA では同程度の反応が認められるには、SP よりも高用量を必要とするという Papir-Kricheli ら¹⁷⁾ の報告や、NK-3 受容体に選択的なセンクタイドおよび NKB では、疼痛関連行動を惹起する効果が認められないという Stoessl ら²²⁾ の報告と同様の結果を示している。このような特徴的な反応は、マウス脊髄における NK-1 受容体が疼痛関連行動の惹起に重要な役割を担っていることを示唆するものである。

CCK-8s は、CCK-A および CCK-B 受容体のアゴニストで、種々の疼痛モデルにおいて強力な鎮痛剤効果を有し、オピオイド拮抗薬であるナロキソン前処理で減弱することから、内因性 CCK-8s がオピオイド様の痛覚制御因子として機能しているとの報告や、全く逆に、 β -エンドルフィン¹³⁾ およびモルヒネの鎮痛効果⁷⁾ や内因性オピオイドの遊離を介して惹起される針鎮痛⁹⁾ を CCK-8s が拮抗することから、内因性オピオイドの拮抗物質として生理的に機

能しているとの報告が数多くなされている。本実験においても、相反した CCK-8s の効果が認められた。すなわち、高用量 (30~300 pmol) の CCK-8s の i.t. 投与では SP、NKA および NKB により惹起される疼痛関連行動を非選択的に抑制したが、低用量 (0.3~1 pmol) では SP および NKA により惹起される疼痛関連行動を増強した (Figs. 2, 3, 4)。CCK-8s の高用量投与による抑制効果、CCK-8s の含有量が脊髄では少ないこと²⁰⁾ を考えると、生理学的作用というよりもむしろ薬理学的作用かもしれない。しかしながら、最も興味深いのは SP および NKA の作用を低用量で増強した事実である。CCK は、痛覚受容あるいは痛覚制御に密接に関連する大脳皮質灰白質、PAG、視床腹内側核および脊髄後角に分布しており^{2,3,8,15)}、また、PAG および脊髄神経節においては SP と同一細胞内に共存することが知られており⁴⁾、SP の含量が高い脊髄後角膠様質においても CCK 含有神経が確認されている²⁶⁾。さらに電気生理学的研究においては、SP により脱分極する脊髄後角神経のほとんどが CCK によっても興奮することを Willetts ら²⁴⁾ は報告している。これらの事実から考えると、本実験の結果は、脊髄後角において CCK-8s が SP の痛覚伝達を調節している可能性を示唆す

るものである。

CCK 関連ペプチドであり、CCK-B 受容体拮抗薬の CCK-4、ペンタガストリンおよび CCK-8d の i.t. 投与は、SP、NKA および NKB により惹起される疼痛関連行動に対して有意な影響を与えなかった。この結果は、CCK-8s の効果が CCK-A 受容体を介して発現していることを示している。脳および脊髄内の CCK-A 受容体は、CCK-B 受容体に比較し、極めて少なく限局しているが、脊髄後角の最外層にも分布することが知られており¹⁰⁾、本実験で i.t. 投与された CCK-8s は、最外層の CCK-A 受容体を介して SP および NKA の効果を増強したものと考えられる。一方、Williams ら²⁵⁾ は、CCK-8s、CCK-A 受容体の選択的アゴニスト (SNF9019) および CCK-B 受容体の選択的アゴニスト (SNF9007) の脳室内投与により惹起される鎮痛が、CCK-A 受容体の選択的拮抗薬 (L-364, 718) や CCK-B 受容体の選択的拮抗薬 (L-365, 260) の前処理により拮抗されず、オピオイド拮抗薬のナロキソン前処理で拮抗されることから、従来から使用されている CCK-A および CCK-B 受容体といった分類以外の CCK 受容体が存在する可能性を最近になって報告しており、今後、この点に関しても検討をする必要があるものと思われる。

結 論

CCK-8s は SP、NKA および NKB 誘発性疼痛関連行動減弱作用を有し、その効果は CCK-A 受容体を介して発現することが明らかとなった。さらに、脊髄クモ膜下腔内への投与では SP および NKA による反応を低用量で増強し、また高用量で減弱するという相反した効果を有することから、脊髄における CCK-8s は一次知覚神経の伝達機構において重要な生理的役割を担っている可能性が考えられる。

文 献

- 1) Barbaz, B. S., Autry, W. L., Ambrose, F. C., Hall, N. R. and Liebman, J. M., Antinociceptive profile of sulfated CCK : comparison with CCK-4 unsulfated CCK and other neuropeptide, *Neuropharmacology*, **25** (1986) 823-829.
- 2) Beinfeld, M., Meyer, D. D., Eskay, R. L., Jensen, R. T. and Brownstein, M. I., The distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the central nervous system of the rat as determined by radioimmunoassay, *Brain Res.*, **212** (1981) 51-57.
- 3) Conrath-Verrier, M., Dietl, M. and Tramu, C., Cholecystokinin-like immunoreactivity in the dorsal horn of the spinal cord the rat, *Neuroscience*, **13** (1984) 871-885.
- 4) Dalsgaard, C. J., Vincent, S. R., Hokfelt, T., Lundberg, J. M., Dahlstrom, A., Schultzberg, M., Dockray, G. J. and Cuello, A. C., Co-existence of cholecystokinin and substance P-like peptides in the neurons of the dorsal root ganglia of the rat, *Neurosci. Lett.*, **33** (1982) 159-163.
- 5) Dockray, G. J., Cholecystokinins in rat cerebral cortex : identification, purification and characterization by immunochemical method, *Brain Res.*, **188** (1980) 155-165.
- 6) Dourish, C. T., Coughlan, J., Hawley, D., Clark, M. L. and Iversen, S. D., Blockade of CCK-induced hypophagia and prevention of morphine tolerance by the CCK antagonist L-364, 718. In : R. Y. Wang and Schoenfeld (Eds.), *Cholecystokinin Antagonists*, Alan R. Liss, New York, 1988, pp.307-325.
- 7) Faris, P. L., Komisaruk, B. R., Watkins, L. R. and Mayer, D. J., Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia, *Science*, **219** (1983) 310-312.
- 8) Fuji, K., Senba, E., Fujii, S., Nomura, I., Wu, J. Y., Ueda, Y. and Tohyama, M., Distribution, ontogeny and projections of cholecystokinin-8, vasoactive intestinal peptide and γ -aminobutyrate containing neurons in the rat spinal cord : an immunohistochemical analysis, *Neuroscience*, **14** (1985) 881-894.
- 9) Han, J., Ding, X. Z. and Fan, S. G., Cholecystokinin octapeptide (CCK) : antagonism to electroacupuncture analgesia and a possible role in electroacupuncture tolerance, *Pain*, **27** (1986) 101-115.
- 10) Hill, D. R., Show, T. M. and Woodruff, G. N., Binding sites for ¹²⁵I-cholecystokinin in primate spinal cord are of the CCK-A subclass, *Neurosci. Lett.*, **89** (1988) 133-139.

- 11) Hill, R. C., Hughes, J. and Pittaway, K. M., Antinociceptive action of cholecystokinin octapeptide (CCK) and related peptides in rats and mice: effects of naloxone and peptidase inhibitors, *Neuropharmacology*, **26** (1987) 289–300.
- 12) Hylden, J. L. K. and Wilcox, G. L., Intrathecal morphine in mice: a new technique, *Eur. J. Pharmacol.*, **67** (1980) 313–316.
- 13) Itoh, S., Katsuura, G. and Maeda, Y., Caerulein and cholecystokinin suppress β -endorphin-induced analgesia in the rat, *Eur. J. Pharmacol.*, **80** (1982) 421–425.
- 14) Jurna, I. and Zetler, C., Antinociceptive effect of centrally administered caerulein and cholecystokinin (CCK), *Eur. J. Pharmacol.*, **73** (1981) 323–331.
- 15) Kubota, Y., Inagaki, S., Shiosaka, S., Chok, H. J., Tateishi, K., Hashimura, E., Hamaoka, T. and Tohyama, M., The distribution of cholecystokinin octapeptide structures in the lower brain stem in the rat: an immunohistochemical analysis, *Neuroscience*, **9** (1983) 587–604.
- 16) Maggio, J. E., Tachykinins, *Ann. Rev. Neurosci.*, **11** (1988) 13–28.
- 17) Papir-Kricheli, D., Frey, J., Laufer, R., Gilon, M., Selinger, Z. and Debor, M., Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists, *Pain*, **31** (1987) 263–276.
- 18) Quirion, R. and Dam, T.-V., Multiple neurokinin receptors: recent developments, *Regul. Peptide*, **22** (1988) 18–25.
- 19) Regoli, D., Drapeau, G., Dion, S. and D'Orleans-Juste, P., Pharmacological receptors for substance P and neurokinins, *Life Sci.*, **40** (1987) 109–117.
- 20) Rehfeld, J. F., Immunochemical studies on cholecystokinin. II. Distribution and molecular heterogeneity in the central nervous system and small intestine of man and dog, *J. Biol. Chem.*, **253** (1978) 4022–4030.
- 21) Sakurada, T., Yamada, T., Sakurada, S., Kisara, K. and Ohba, M., A substance P analogues containing D-Histidine antagonize substance P-induced behavioural effects at spinal level in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, **174** (1989) 153–160.
- 22) Stoessl, A. J., Dourish, C. T., Young, S. C., Williams, B. J., Iversen, S. D. and Iversen, L. L., Senktide, a selective neurokinin B-like agonist, elicits serotonin-mediated behaviour following intracisternal administration in the mouse, *Neurosci. Lett.*, **80** (1987) 321–326.
- 23) Vanderhaeghen, J.-J., Signeau, J. C. and Gepts, W., New peptide in vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies, *Nature*, **257** (1975) 604–605.
- 24) Willetts, J., Urban, L., Murase, K. and Randic, M., Actions of cholecystokinin octapeptide on rat spinal dorsal horn neurons, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **448** (1985) 385–402.
- 25) Williams, C. L., Rosenfeld, G. C. and Burks, T. F., Cholecystokinin-induced antinociception is not blocked by CCK-A and CCK-B receptor antagonists, *Peptides*, **18** (1997) 409–414.
- 26) Williams, R. G., Dimaline, R., Varo, A., Isetta, A. M., Trizio, D. and Dockray, G. J., Cholecystokinin octapeptide in the rat central nervous system: immunocytochemical studies using a monoclonal antibody that does not react with CGRP, *Neurochem. Int.*, **11** (1987) 433–442.
- 27) Zetler, G., Analgesia and ptosis caused by caerulein and cholecystokinin octapeptide (CCK), *Neuropharmacology*, **19** (1980) 415–422.

Address for correspondence: Shunsuke Kawamura, Ph. D. Department of Clinical Pharmacy, Tohoku College of Pharmacy, 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-0905, Japan.
Tel : 81-22-234-4181 (ext 2405)
Fax : 81-22-275-2013