

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11161

研究課題名(和文) 前立腺癌骨転移と骨髄内感覚ニューロンとの分子学的相互メカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism between intramedullary sensory neuron and bone metastasis of prostate cancer

研究代表者

木村 高弘 (Kimura, Takahiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00307430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌患者血清における血漿エピネフリン、Ang II、Substance P、calcitonin-gene related peptide(CGRP)、アンギオテンシン1-7を測定した。CGRPに関し、転移あり群で有意な発現の亢進を認め、患者の疼痛と有意な関連を認めた。

骨転移を有する前立腺癌のうち疼痛スコアが高い症例5例、疼痛スコアの低い症例5例および骨転移を有しない未治療前立腺癌症例5例の計15例を対象に、末梢血単核球細胞よりRNAを抽出し、全トランスクリプトーム解析を行った。PFKPおよびSGPP2が疼痛スコアの高い症例で有意に発現が亢進していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により前立腺癌患者の骨転移部位で、感覚神経ニューロンの関連因子が高発現し、さらにその発現は疼痛の強い患者で多いことが明らかにされた。本成果より、骨転移による疼痛は、神経の圧迫などによる物理的な原因だけではなく、癌細胞の感覚神経ニューロンへの作用も原因となっている可能性が示唆され、今後の疼痛治療に意義があるものと考えられる。また、腫瘍細胞だけではなく、宿主の免疫細胞であるPBMCにおいても疼痛により分子の発現が影響を受けていることが発見された。

研究成果の概要(英文)：Serum epinephrine, Ang II, Substance P, calcitonin-gene related peptide (CGRP) and angiotensin 1-7 were analyzed in prostate cancer patients. Serum CGRP level was significantly associated with bone metastasis and pain score. Whole transcriptome was performed in PBMC of prostate cancer patients with and without pain. PFKP and SGPP2 was significantly associated with bony pain.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 骨転移 疼痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における前立腺癌の罹患率は年々増加し、2015年には男性で最も罹患数の多い癌と予測されている。その理由としては、食生活の西洋化などの要因が挙げられている他に、PSA 検診などによる過剰診断の影響も挙げられている。しかし、これまでにわれわれは前立腺ラテント癌の年次推移を比較し、本邦においては前立腺癌の真の罹患率が上昇している可能性を報告している (Kimura T et al. J Urol. 2016)。前立腺癌は比較的緩徐な進行を示すが、PSA スクリーニングの普及により早期癌が増えたとされる本邦においても、約 30% が診断時に転移を有するといわれ、進行性前立腺癌の治療は重要な課題である。

前立腺癌の主な転移先は骨であり、骨転移を有する患者の 80% 以上が骨転移の進行によって生じる疼痛、骨折や麻痺など骨関連事象 (skeletal-related event: SRE) に悩まされている。SRE の発症は、患者の生活の質 (quality of life: QOL) を損ねるだけでなく、患者の生命予後にも影響を与えるとされ、前立腺癌治療における骨転移の管理は重要な視点である。

従来、骨転移に伴う骨痛などの症状は転移した腫瘍による圧迫症状と考えられてきたが、最近の研究により、転移巣における播種性腫瘍細胞 (disseminated tumor cells: DTCs) と骨髄内の微小環境の相互作用が痛みに影響を与えていることが明らかになり、cancer-induced bone pain (CIBP) という概念が提唱されている。その機序には、DTCs が、プロスタグランジンなどの神経伝達物質を分泌することで、骨髄内の神経性感覚受容器である侵害受容器 (nociceptor) に作用する、周囲の炎症細胞と相互作用し、痛みを刺激する化学伝達物質を分泌する、骨の融解を促進するなど挙げられている。

本課題の研究協力者である米国 Wake Forest 大学医学部 Department of Cancer Biology の塩沢裕介准教授らは、これまでの研究で前立腺癌 DTCs の骨髄内微小環境における役割を明らかにしてきた。レニン-アンジオテンシン系は血圧制御にかかわるシステムであるが、前立腺癌細胞の増殖に関与することが報告されている。一方で骨髄内感覚ニューロンより放出され、末梢神経系から中枢神経系への侵害神経伝達物質として働くニューロンペプチドである substance P および calcitonin-related peptide (CGRP) も、その受容体である NK-1 受容体および CGRP 受容体を介して前立腺癌細胞の増殖に関与していることが報告されている。塩沢らはこれまでの研究で前立腺癌 DTCs に発現しているアンジオテンシン系がニューロンからの substance P および CGRP の分泌を促進し、前立腺癌の増殖および骨病変の進行、骨痛の増悪を促していることを発見している。このように、骨髄内感覚ニューロンが骨髄微小環境として影響し、その結果、骨転移に伴う疼痛だけでなく、癌細胞の増殖を引き起こすというモデルを提唱している。また前立腺癌患者において、エピネフリンは増加しており、アポトーシスを阻害することで癌の発生・増殖に関与していることが報告されている。ラット慢性疼痛モデルを用いた実験では、受容体遮断薬が内因性ノルエピネフリンを抑制し、結果、慢性疼痛が緩和されることが証明されている。しかし前立腺癌骨転移性疼痛と血中エピネフリンとの関係性は解明されていない。さらに上述のように骨転移に伴う疼痛において骨髄の微小環境における炎症細胞の重要性を示す報告は多いが、白血球などの血液細胞への影響は検討されていない。

2. 研究の目的

本研究は、これまでに研究協力者らが *in vitro* および *in vivo* の研究で明らかにしてきた、前立腺癌の増殖・進展および疼痛機序における骨髄内感覚ニューロンとニューロンペプチド、神経伝達系の相互作用を前立腺癌患者組織で証明することを第一の目的とする。また、骨転移に伴う炎症が疼痛や癌の増殖に与える影響を解明するために、採取が容易な末梢血白血球での分子発現プロファイルを解析し、新たな骨転移治療の標的候補を探索する。さらに、動物実験系を用いて、骨髄内感覚ニューロンや骨転移による炎症の抑制による抗腫瘍効果に関しても検討する。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌患者剖検検体の骨転移組織における神経伝達物質の発現の検討

対象

当院における過去の剖検症例の中で、骨転移を有する前立腺癌症例、前立腺ラテント癌症例および乳癌等の他臓器癌症例それぞれ 20 例。各剖検症例の骨髄組織 (転移性前立腺癌症例では癌細胞が浸潤した部位と正常骨髄組織) を選択した。

免疫組織染色

Angiotensin II (Ang II) 関連分子、ニューロンペプチド、神経伝達物質の骨髄内の発現を免疫組織染色により解析した。各症例に対し、神経伝達物質である CGRP および Substance P、それらの受容体である CGRP 受容体および NK-1 受容体、さらにニューロン内のシグナル伝達系に関与する分子である Erk、p38 の免疫組織染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、骨転移の有無を含む臨床情報との関連性を検討した。

(2) 前立腺癌患者血清における神経伝達物質の発現と疼痛との関連性の検討

対象

当院に通院している骨転移を有する前立腺癌症例 25 例、および骨転移を有しない未治療前立腺癌症例 10 例を対象とした。

組織採取および解析

患者より静脈血 10ml を採取後、血漿を分離し、ELISA 法により血漿エピネフリン、Ang II、Substance P、CGRP、アンギオテンシン 1-7 (Ang II に対する拮抗作用を有するアンジオテンシン系の分子) を測定した。同時に末梢血単核球細胞を分離し、実験 (3) に使用した。疼痛スコア
採血時に VAS (visual analogue scale) を用いて疼痛スコアの評価を行い、その結果との神経伝達物質の発現の関連を解析した。

(3) 前立腺癌患者末梢血中白血球の全トランスクリプトーム解析による、骨転移に伴う炎症関連分子の同定

対象および方法

対象は骨転移を有する前立腺癌のうち疼痛スコアが高い症例 5 例、疼痛スコアの低い症例 5 例および骨転移を有しない未治療前立腺癌症例 5 例の計 15 例とした。実験で分離された末梢血単核球細胞より RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた全トランスクリプトーム解析を行った。

分子発現プロファイルの検討

全トランスクリプトーム解析によって得た分子発現プロファイルと骨転移の有無および疼痛スコアとの関連性を解析した。

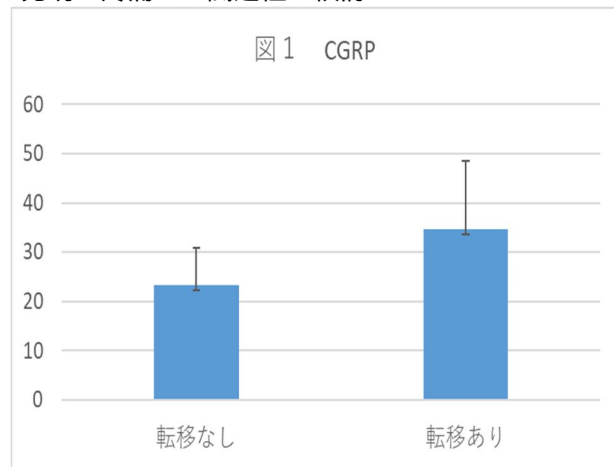
4. 研究成果

(1) 前立腺癌患者剖検検体の骨転移組織における神経伝達物質の発現の検討

剖検症例の中で、骨転移を有する前立腺癌症例、前立腺ラテント癌症例および乳癌等の他臓器癌症例の骨髄組織における Ang II 関連分子、ニューロンペプチド、神経伝達物質の骨髄内の発現を免疫組織染色により解析した。残念ながら剖検検体においては、今回検討した分子の有意な発現亢進は認められなかった。本学における病理解剖は死後 24 時間以内に行われているため、他施設に比べても早期に臓器はホルマリン固定されていると考えるが、手術検体などに比べるとやはり組織の保存状態は悪い可能性が高く、免疫染色での評価は困難であると考えられた。

(2) 前立腺癌患者血清における神経伝達物質の発現と疼痛との関連性の検討

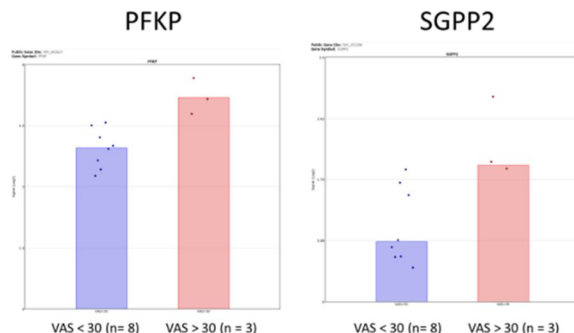
当院に通院している骨転移を有する前立腺癌症例 25 例、および骨転移を有しない未治療前立腺癌症例 10 例より静脈血 10ml を採取後、血漿を分離し、ELISA 法により血漿エピネフリン、Ang II、Substance P、CGRP、アンギオテンシン 1-7 を測定した。Substance P およびアンギオテンシン 1-7 の発現は転移の有無で有意な差を認めなかったが、CGRP に関しては、転移あり群で有意な発現の亢進を認めた (図 1)。さらに、患者の疼痛 (VAS score) と CGRP の発現についても有意な関連を認めた。



(3) 前立腺癌患者末梢血中白血球の全トランスクリプトーム解析による、骨転移に伴う炎症関連分子の同定

骨転移を有する前立腺癌のうち疼痛スコアが高い症例 5 例、疼痛スコアの低い症例 5 例および骨転移を有しない未治療前立腺癌症例 5 例の計 15 例を対象に、末梢血単核球細胞より RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた全トランスクリプトーム解析を行った。発現が疼痛スコアにより 2 倍以上変化した遺伝子を有意と判定した。結果、PFKP および SGPP2 が疼痛スコアの高い症例で有意に発現が亢進していることを発見した (図 2)。

図 2 全トランスクリプトーム解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	塩沢 裕介 (Shiozawa Yusuke)	ウェイクフォレスト大学・Cancer Biology・准教授	