

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K19178  
研究課題名（和文）口腔癌発症による難治性疼痛メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Oral Cancer Pain

## 研究代表者

古川 明彦（FURUKAWA, Akihiko）

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：00731738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞は様々な物質を放出することが報告されており、その中のプロテアーゼの一つとしてトリプシンが知られている。癌から放出されたトリプシンは末梢に発現している受容体の Protease-activated receptor2を活性化することによりtransient receptor potentialなどの疼痛関連イオンチャネルを介することが示唆された。このことにより、癌発症に伴う難治性疼痛の発現に関与していると考えられる。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって示唆された結果は癌発症における疼痛発現のメカニズムの一端を担うものである。これにより、癌細胞から放出される物質の癌性疼痛メカニズム関与のみならず、癌の発育や転移、また、全身に与える影響に関与している可能性が十分考えられる。このことにより癌発症に対する早期発見・早期治療法開発および難治性癌性疼痛治療薬開発に対して多大な貢献をするものであり、口腔外科領域における臨床的意義は極めて大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells have been reported to release various substances, of which trypsin is known as one of the proteases. It has been suggested that trypsin released from cancer cells can mediate pain-related ion channels such as TRP by activating the peripherally expressed receptor PAR2. This may contribute to the development of intractable pain associated with cancer development.

研究分野：口腔外科学

キーワード：舌癌 トリプシン 癌性疼痛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯科臨床の場で遭遇する異常疼痛には、抜歯、インプラント、顎変形症および腫瘍の手術や腫瘍などの様々な疾患そのものにより口腔顔面領域の末梢神経が損傷を受け、慢性的な疼痛症状を示す神経障害性疼痛、あるいは炎症が原因で引き起こされる侵害受容性疼痛がある。癌性疼痛は神経障害性疼痛と侵害受容性疼痛の両方が合併した症状、あるいはまったく特殊な症状を発症するといわれているが、いまだ不明な点が多い。この疼痛発現に関連する物質の生体内での変化については解明が行われていない。臨床的に、口腔癌においては疼痛が全身状態の悪化や機能回復を遅らせるなど治療の妨げになることが多く、さらに終末期においては疼痛緩和自体が治療の中心となる。このため患者の QOL 維持のためには疼痛に対する治療が重要である。

一方で、癌から放出された物質はさまざまな経路を介し、癌の細胞接着や増殖、遠隔転移などを起こすことが知られている。また、それらの物質が全身的な影響を及ぼし悪性腫瘍以外の全身的他疾患へも大きな影響があると考えられる。これまでの研究より、癌細胞からさまざまな酵素やケモカインが放出され、それらがさまざまな経路を介して癌性疼痛に寄与していることが解明されてきている。本研究において、癌細胞から放出される物質による疼痛メカニズムを解明することにより、癌性疼痛の新規治療薬の開発につながるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

近年の報告によると、癌性疼痛は TRP チャンネルとの関係性が示唆されている。しかしながら、口腔癌における難治性疼痛のメカニズムは不明な点が多い。本研究では、癌細胞から放出される物質と TRP チャンネルの活性化をターゲットとし、癌難治性疼痛のメカニズムの解明を目的とした。さらに、そのメカニズムが舌癌後期の疼痛に関わるとすると、受容体をブロックすることで舌癌による疼痛が抑制されることが考えられ得られた物質およびレセプターをターゲットとした新規治療法の開発につながると考えられる。また、癌細胞から放出される物質の癌性疼痛メカニズム関与のみならず、癌の発育や転移、また、全身に与える影響に関与している可能性が十分考えられる。このことにより癌発症に対する早期発見・早期治療法開発に対しても多大な貢献をするものである。

### 3. 研究の方法

JCRB 細胞バンクより分譲したラット由来の扁平上皮癌 (SCC-158) 細胞をラットの舌に 27G 針により播種し、舌癌を発症させた舌癌モデルラットを作成した。

#### (1) 舌癌モデルラットの作成および舌の組織像の観察

JCRB 細胞バンクより分譲したラット由来の扁平上皮癌 (SCC-158) 細胞を 2% イソフルランによる吸入麻酔下に、26 G 針にて SCC 細胞の懸濁液を舌左側縁部の位置に接種した (SCC 群)。対照として、同様の方法で溶媒 (0.1 M PBS) を舌左側縁部に接種した (PBS 群)。舌癌モデルラットの舌を経日的に取り出し HE 染色を行い舌の組織学的解析を行った。

#### (2) 癌細胞から放出される物質の定量解析

舌癌モデルラットおよびコントロールラットの舌を取り出した後ホモジナイズを行い、Western blot 法にて癌細胞から放出される物質についてタンパク定量解析を行った。

#### (3) 舌癌モデルラットにおける機械逃避反射閾値の測定

舌癌モデルラットおよびコントロールラットを用い、イソフルラン (0.5-1.0%) 吸入による浅麻酔下に、デジタルフォーセプスにて舌に機械刺激を与え逃避反射閾値の経日的な計測を行った。

#### (4) 三叉神経節における受容体の発現解析

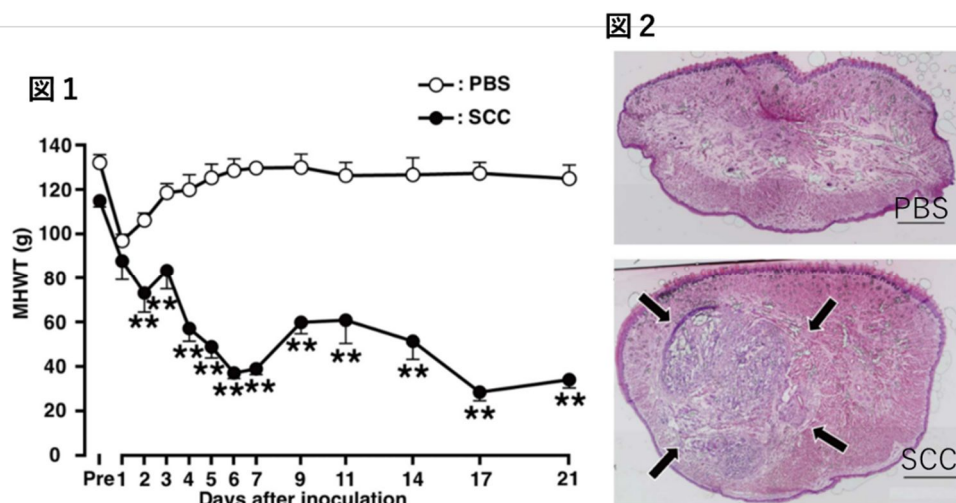
逆行性トレーサーである fluoro-gold (FG) による舌神経支配三叉神経節内細胞を標識した舌癌モデルラットの三叉神経節を取り出し作成し、受容体の免疫染色を行った。

#### (5) 舌癌モデルラットにおいて発症した異常疼痛に対する受容体アンタゴニスト投与の効果

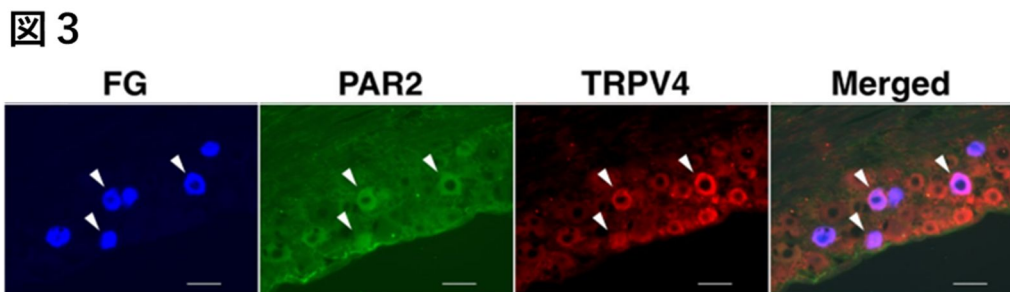
舌癌モデルラットの舌にアンタゴニスト局所連日投与を行う。処置後、経日的にデジタルフォーセプスにて舌に機械刺激を与え、舌癌モデルラットにおいて発症した異常疼痛に対するアンタゴニストの効果の解析を行った。

#### 4. 研究成果

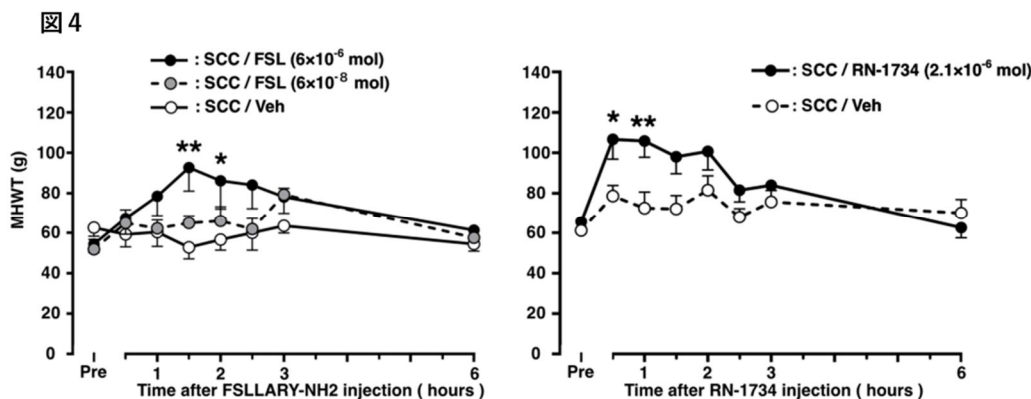
ラット舌癌モデル癌接種部位に機械刺激を与え逃避反射閾値の経日的な計測を行った結果、コントロール群と比べ、2日目から21日目まで優位な閾値の低下を認めた。(図1) また、SCC細胞接種後7日目において舌を取り出しHE染色を行ったところ癌細胞の定着を認めた。(図2)



癌細胞より放出される物質としてCXCL12を検索したところ検出が困難であったためターゲットをトリプシンに設定を行った。SCC細胞接種後7日目ラットの舌を摘出し舌トリプシン量を測定したところコントロール群と比較し優位な増加を認めた。トリプシンにより活性化を示すPAR2および、その関連性が報告されているTRPV4において癌発症状態に関与があるかどうか、SCC細胞接種後7日目の三叉神経節を取り出し受容体の免疫蛍光染色を行った。その結果、舌投射領域における三叉神経節内細胞においてPAR2およびTRPV4の共発現を認めた。(図3)

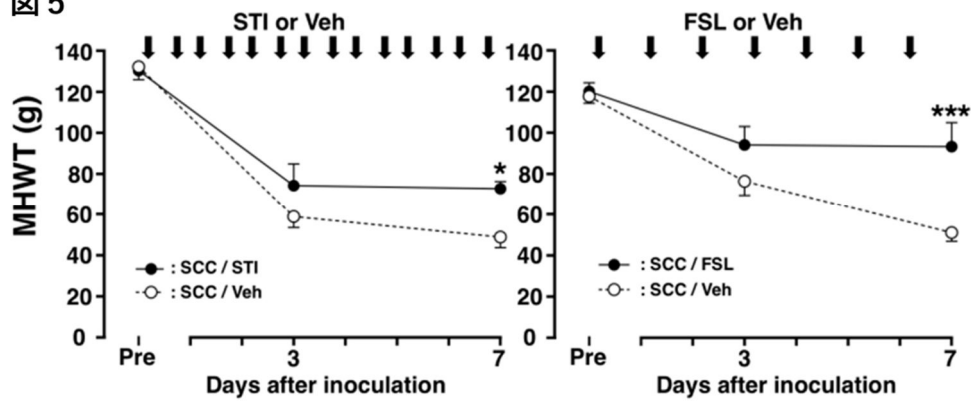


それぞれアンタゴニストを単回接種し経時的な逃避反射閾値の測定を行った。PAR2アンタゴニスト(FSLLRY-NH2)接種後1.5時間および2時間で、TRPV4アンタゴニスト(RN-1734)の接種後0.5時間および1時間に閾値低下の抑制が認められた。(図4)



また、トリプシン阻害薬(STI), および PAR2アンタゴニスト(FSLLRY-NH2)を連日接種したところ、SCC細胞接種後7日目において閾値低下の抑制が認められた。(図5)

図 5

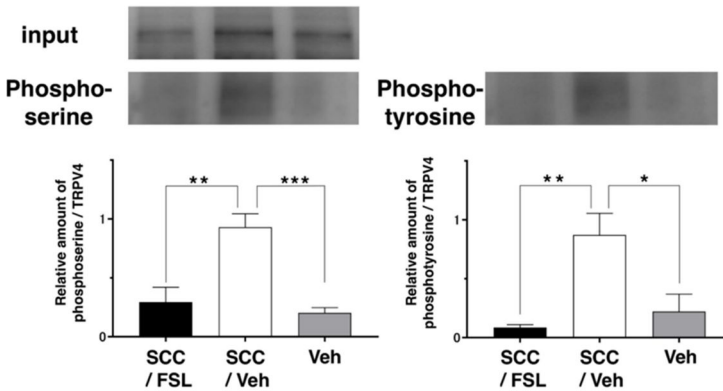


以上の結果より、癌発症において癌細胞から放出されるトリプシン、および末梢での PAR2, TRPV4 の受容体が行動的な痛みに関与していることが示唆された。

続いて、SC 細胞接種後三叉神経節内 TRPV4 のリン酸化部位を phosphoserine と phosphotyrosine を免疫沈降法で解析した。SCC 細胞接種により phosphoserine と phosphotyrosine の相対量が増加し、PAR2 アンタゴニストの接種により優位に抑制された。(図 6)

図 6

IP : TRPV4



以上の結果より、舌癌発症により舌癌微小環境から放出されるトリプシンが PAR2 シグナルを介して機械アロディニアが発症することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古川明彦, 篠田雅路, 赤坂竜太, 生木俊輔, 岩田潤, 米原啓之
2. 発表標題 ラット舌癌モデルにおける異常疼痛に対するProtease-activated receptor 2 の関与
3. 学会等名 第75回NPO法人口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------