

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17798

研究課題名（和文）骨がんモデルマウスにおけるがん増殖とがん性疼痛における一次求心性線維の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of primary afferent fibers in cancer growth and cancer-induced pain in a bone cancer mouse model

研究代表者

長峯 達成（Nagamine, Tatsunari）

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：20867436

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：がん増殖における血管新生の役割はよく知られているが、神経系の役割は不明である。我々は痛みの中でも慢性疼痛に関係の強いC線維の破壊が、鎮痛作用だけでなく、がんの進展予防や生命予後にも効果があるかを検討した。新生仔マウスの生後0日目と2日目にカプサイシンを投与することでC線維を破壊できることは知られている。C線維を破壊したマウスと正常マウスの各々の右脛骨骨髓腔内に乳がん細胞株を打ち、がんの進展の違いと、生存率の違いを調べた。カプサイシン処置群で腫瘍の増殖は抑えられる傾向にあったが、両群間に統計学的な有意差は認めなかった。また、各群のカプランマイヤー生存曲線を作成したが、生存率に有意差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では骨がんモデルマウスを用いて、神経系（特に一次求心性線維）ががん性疼痛だけでなく、がん増殖に関与するのか、関与するとすればどの神経線維がどのようにがん増殖に関与するのかという機序の解明を目的とした。がん組織と一次求心性線維の方向性作用を検討するもので、神経系からがん増殖への影響を検討することは全く新しい発想である。本研究では有意差が出る様な結果には至らなかったが、がん性疼痛と、がん増殖に対する一次求心性線維の関与が解明されれば、疼痛が抑えられることによってがん患者のQOLが向上し、今までとは全く異なるアプローチでの抗がん剤などのがん治療の選択肢が増える可能性もある。

研究成果の概要（英文）：The role of angiogenesis in cancer growth is well-known, but the involvement of the nervous system remains unclear. We investigated whether the destruction of C-fibers, which are strongly associated with chronic pain, not only has analgesic effects but also affects cancer progression and prognosis. It is known that C-fibers can be destroyed by administering capsaicin to newborn mice on day 0 and day 2. We injected mammary cancer cells into the bone marrow cavity of the right tibia of mice with destroyed C-fibers and control mice. We examined the differences in tumor progression and survival rates between the two groups. There was a tendency for tumor growth to be suppressed in the capsaicin-treated group, but there was no statistically significant difference between the two groups. We also created Kaplan-Meier survival curves for each group, but there was no significant difference in survival rates.

研究分野：疼痛治療学

キーワード：カプサイシン処置 TrkA受容体ノックアウトマウス 4T1 ルシファラーゼ DWB IVIS 一次求心性線維

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんは1981年から日本人の死因のトップにあり、2015年には約37万人ががんで亡くなり、死因の28%を占める。乳がん、肺癌、前立腺がんなどの多くのがんは多発的に骨転移し、末期がんでは耐え難い激しい痛みを起すことも少なくない。最近、Mantyhらは骨で増殖するがん組織から遊離される神経成長因子(NGF)が末梢神経の発芽や神経腫の形成によりがん性疼痛が誘発されることから、骨転移によるがん性疼痛はこれまで考えられてきた侵害受容性疼痛よりは神経障害性疼痛に起因すると提唱している。神経が障害されると、痛みに対する感受性が亢進する。後根神経節ニューロンから皮膚や骨に投射する一次求心性神経の末梢端の神経終末とその中枢端が終結する脊髄後角での感受性の亢進は末梢性感作と中枢性感作と呼ばれる。我々は、神経障害性疼痛、中でも当教室が開発したマウス髄腔内投与によるアロディニアにおける脊髄後角での感作機序の解明に取り組み成果をあげてきた。最近、我々は骨がんモデルに薬剤を投与することにより、がん性疼痛が緩和されるだけでなく、がん増殖が抑制され、生存率が延長することを見出した(投稿中)。末梢性感作で重要な役割を果たすNGFはがん細胞だけでなく、浸潤した免疫系細胞(マクロファージ、好中球、Tリンパ球、肥満細胞等)や間質細胞から遊離される。遊離されたNGFは一次求心性線維の神経終末からNGFの受容体TrkAにより取り込まれ、後根神経節ニューロンに運ばれ、末梢神経の発芽に関係する遺伝子発現の誘導を引き起こすと考えられる。その遺伝子の1つに血管拡張作用を有するカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)がある。我々はNGFががん性疼痛に関与するだけでなく、一次求心性線維の神経終末から遊離された生理活性物質ががん組織に作用し、がん増殖に関与するのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

難治性がん性疼痛の伝達経路の解明はがん患者のQOLの向上に寄与するものと考えられる。がん増殖における血管新生の役割はよく知られているが、神経系の役割は不明である。カプサイシン処置マウスとTrkA受容体ノックアウトマウスによるがん性疼痛閾値の変化、がんの進展の変化を比較して、がん性疼痛における一次求心性線維の役割を明らかにし、無髄の一次求心性線維(C線維)の破壊が鎮痛作用だけでなく、がんの進展予防や生命予後にも効果があるかを検討し、一次求心性線維ががん増殖や生命予後に与するとすればどの神経線維がどのようにがんを増殖させるのかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) がん性疼痛モデルマウスの作製

1983年に報告があって以降、カプサイシン処置によりC線維が破壊したマウスでの研究は多数報告されている。BALB/c妊娠マウスから出生した雄の新生仔マウスの生後0日目と2日目にカプサイシン5mg/kgを皮下投与し、C線維を破壊したマウスを作製した。C線維の破壊は生後4週目に行ったワイピングテストによって証明された。TrkA受容体ノックアウトマウスは購入した後に本研究室で繁殖させた。5-6週齢時となったカプサイシン処置マウスおよびTrkA受容体ノックアウトマウスの右脛骨髄腔内に、ルシファラーゼ酵素を発現する乳がん細胞株4T1-Lucを30G注射針付きシリンジを用いて $10^4$ 個注入し、骨がんモデルを作製した。

#### (2) 行動学的評価

カプサイシン処置マウスおよびTrkA受容体ノックアウトマウスにおいてがん性疼痛が抑制されるかどうかについて、動的体重負荷測定装置(Dynamic Weight Bearing :DWB、Bioseb社製)を用いて左右の肢にかかる重量と接地面積の左右比の評価を行った。

#### (3) がんの進展の評価

がんの進展の評価は、マウスにD-Luciferinを150mg/kg腹腔内投与した10分後に発光イメージングシステムIVISで撮影し、光源の光度であるTotal Flux (photons/sec)によって腫瘍の増殖を定量化した。

#### (4) 生存率の評価

動物愛護の観点から、急激な体重減少(数日間で20%以上)や明らかな衰弱が認められた場合に安楽死させて生存曲線を作成した。

## 4. 研究成果

### (1) がん性疼痛モデルマウス

TrkA 受容体ノックアウトマウスは本研究室で繁殖させていたが、全てのホモ型ノックアウトマウスは胎児期または出生直後に死亡した。TrkA 受容体ノックアウトマウスのジェノタイプングは出生直後のマウスの尾から DNA を抽出して行ったが、本研究室で繁殖させていた全てのホモ型 TrkA 受容体ノックアウトマウスは胎児期または出生直後に死亡し、本研究に应用することが出来なかった。今後、ホモ型の生存条件を検討していく必要がある。

### (2) がん性疼痛に対するカプサイシン処置の効果

カプサイシン処置を行った群と無処置の群にそれぞれがん細胞を移植し、疼痛閾値の変化を DWB で測定したところ 2 群間に有意差は認められなかった(各群 n=8)(図 1)。統計処理は、Student's *t*-test を実施し、 $P < 0.05$  を有意差とした。

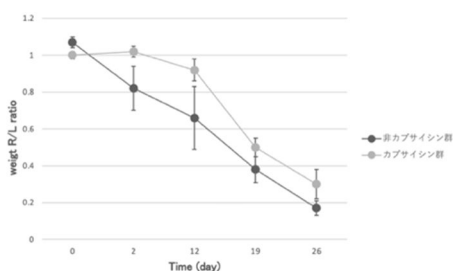


図1(a) 左右の肢にかかる重量の比

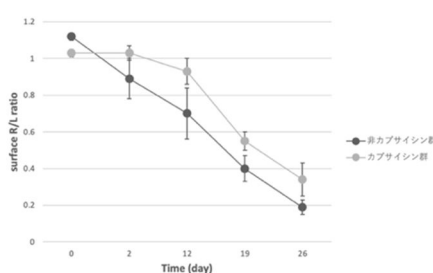


図1(b) 左右の肢の接地面積の比

### (3) 発光イメージングシステム IVIS

がん性疼痛モデルマウスを発光イメージングシステム IVIS により経日的に撮影したところ、腫瘍増殖の程度や転移が視覚的に観察出来た(図 2)。

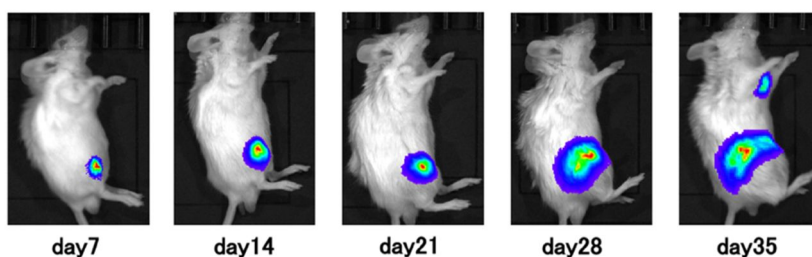


図2 経日的なIVIS画像の1例

カプサイシン群と非カプサイシン群を比較して腫瘍の増殖の進展に差があるかを調べるために、各々のマウスで光源の光度である Total Flux 値を測定し、腫瘍の増殖の程度を定量化した。カプサイシン処置群で腫瘍の増殖は抑えられる傾向にあったが、両群間に統計学的な有意差は認めなかった。統計処理は、Student's *t*-test を実施し、 $P < 0.05$  を有意差とした。

今回 IVIS による経日的な Total Flux 値の測定においてカプサイシン群と非カプサイシン群では有意差がなかったが、各個体での Total Flux 値のばらつきが大きく、標準誤差の値が大きい信頼性の低いデータとなった。今後、各個体での Total Flux 値のばらつきをなくす方法について検討していく必要がある。

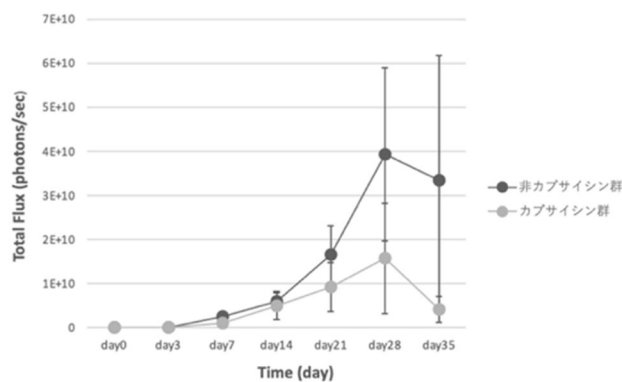


図3 両群のTotal Flux 値の平均±標準誤差の推移。

#### (4) カプサイシン群と非カプサイシン群の生存率への影響

カプサイシン群と非カプサイシン群で、それぞれがん性疼痛モデルマウスの生存率に影響があるかどうかについて比較検討を行った。カプサイシン群 (n=9) と非カプサイシン群 (n=8) で Kaplan-Meier 生存曲線 (図 4) を作成したが、生存率に有意差はなかった。

統計処理は、ログランク検定を実施し、 $P < 0.05$  を有意差とした。我々は予備実験でカプサイシン処置により C 線維を破壊したがん性疼痛モデルマウスの生存率が延長することを確認していたが、本研究では再現性を得るに至らなかった。

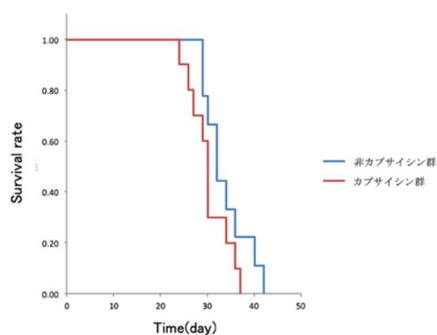


図4 両群のカプランマイヤー生存曲線

#### < 引用文献 >

Patrick Mantyh. Bone cancer pain: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Pain*. 2013; 154: 54-62.

Jl Nagy, D van der Kooy. Effects of neonatal capsaicin treatment on nociceptive thresholds in the rat. *Journal of Neuroscience*. 1983; 3 (6): 1145-1150.

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------