

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09006

研究課題名(和文) 膵がんモデルマウスを用いた新たながんサポータティブケアの確立

研究課題名(英文) Establishment of new cancer-supportive care in tumor-bearing mouse models

研究代表者

鈴木 孝浩 (SUZUKI, Takahiro)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60277415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミダゾラムが膵がんのみならず、腫瘍進展に関わる癌関連線維芽細胞の増殖、腫瘍関連好中球や腫瘍関連M2様マクロファージ(M2様TAM)、骨髄由来免疫抑制細胞の局所浸潤を抑制し、疼痛スコアを緩和することを明らかにした。次にトラマドールが膵がん細胞の $\mu$ オピオイド受容体を介して増殖・浸潤を直接抑制するとともに、膵がんマウスの局所M1様TAMを刺激し抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。最後にミロガバリンが膵がんマウスの疼痛スコアを有意に軽減させる一方で、膵がん細胞の増殖能を高め、かつ腫瘍進展に関わるM2様TAMの局所浸潤を増加させることで腫瘍増大のリスクがあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周術期の鎮静に多用されるミダゾラムが、がん患者にも安全に使用できることが示され、がん患者の鎮痛への応用性も示唆された。トラマドールは膵がん細胞の $\mu$ オピオイド受容体を介して直接的な抗腫瘍効果を示し、かつ局所のM1様TAMを刺激することで腫瘍抑制に寄与していることが証明され、がん患者に対してもトラマドールを安心して処方できる。一方、ミロガバリンはがん性疼痛に対しても有意な鎮痛作用を示したが、膵がん細胞の増殖能を高め、腫瘍進展に関わる局所のM2様TAMを刺激し腫瘍を増大させるリスクがあることが明らかとなった。がん患者へのミロガバリン処方時には、より慎重な経過観察が必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that midazolam, a benzodiazepine anesthetic, improved cancer-associated pain, and inhibits the proliferation of pancreatic cancer and cancer-associated fibroblasts as well as the local infiltration of TANS, M2-like TAMs and PMN-MDSCs, thereby inhibiting pancreatic cancer progression. Next, we showed that tramadol, a weak opioid, would be a useful anesthetic for pancreatic cancer: inhibiting the proliferation and invasion along with increasing anti-tumor M1-like tumor-associated macrophages via the  $\mu$ -opioid receptor, while improving cancer-associated pain possibly through the anti-tumor effects with the decrease of inflammatory cytokines. Finally, we demonstrated that mirogabalin, a selective voltage-gated calcium channel 2 ligand, improves cancer-associated pain but enhances the proliferative potential of PDAC in vitro and in vivo.

研究分野：麻酔科学

キーワード：がんサポータティブケア 膵がんモデルマウス 麻酔薬

## 1. 研究開始当初の背景

早期膵がん患者の 75-80%で既に何らかの痛み・倦怠感を感じており、また 47-71%の膵がん患者においてうつ症状を訴えることが知られている (Er-Kamar F, *Oncologist*, 2003)。これまでに、われわれはデュロキセチン (抗うつ薬) が膵がんの増殖能や遊走浸潤能を抑制するのみならず、疼痛緩和、摂餌量低下と体重減少の遅延、生存期間の延長に寄与することを報告してきた (Kajiwara I, *Pain*, 2020)。このように、当時まだ膵がん患者に対して積極的に使用されていなかった薬物のなかにも、がん性疼痛に対して有効な薬物が多く含まれている可能性が高い。そこで、当初われわれは、がん性疼痛の緩和目的として使用されていない薬物の中から、疼痛緩和に有効な薬物を探索することにした。また同時に、薬物の腫瘍細胞や炎症・免疫細胞への影響は不明な点が多いため、膵がんを自然発症する遺伝子改変マウスを用いて、それらの詳細を検討することにした。

## 2. 研究の目的

本研究においては、新たながん性疼痛の緩和やそのメカニズムを科学的根拠に基づいて明らかにし、より良いサポーターケアの確立を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ミダゾラムの膵がんマウスに対する効果

遺伝子組換え委員会と動物実験委員会の承認を得た後、6週齢の *LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; Trp53<sup>fllox/fllox</sup>; Pdx-1<sup>cre/+</sup>* マウス (膵がんマウス) を 3 群に分け、30 mg/kg/day のミダゾラム投与群 (n=11)、30 mg/kg/day のミダゾラムと 3 mg/kg/day の K11195 (末梢性ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬) 投与群 (n=10)、飲水のみコントロール群 (n=11) とした。生存曲線を Kaplan-Meier 法により求め、統計学的に Log-rank 検定を行った。がん性疼痛は Hunching と mouse grimace scale (MGS) でスコアリングし、one-way ANOVA 後の Tukey 検定を行った。エンドポイント時には膵腫瘍と全身諸臓器をサンプリングし、免疫組織化学的解析を行い、Tukey-Kramer 検定もしくは Steel-Dwass 検定を行った。各検定の  $p < 0.05$  で有意差ありとした。血漿サイトカインの動態をサイトカイン抗体アレイにより半網羅的に解析した。ミダゾラムの膵がん細胞株の増殖への影響を AlamarBlue 法にて検討し、細胞周期関連分子の発現をウェスタンブロッティング、アポトーシスの誘導に関してはフローサイトメーターにて解析した。

### (2) ترامドールの膵がんマウスに対する効果

遺伝子組換え実験委員会と動物実験委員会の承認を得た後、6週齢の膵がんマウスに対して ترامドール 10 mg/kg/day (n=12)、 ترامドール 10 mg/kg/day とナルトレキソン 1 mg/kg/day (n=9)、 飲水 (n=14) を人道的エンドポイントまで経口投与した。疼痛を MGS で評価した。腫瘍体積と炎症細胞浸潤の程度は病理組織学的に評価し、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。膵がん細胞株の増殖能における ترامドールとナルトレキシソンの影響をアラマーブルー法により検討し、細胞周期関連分子の発現を Western blot 法にて解析した。

### (3) ミロガバリンの膀胱がんマウスに対する効果

遺伝子組換え実験委員会と動物実験委員会の承認を得た後、膀胱がんマウスをミロガバリン投与群 (n=10)、非投与群 (n=14)の2群に分け、ミロガバリン群では6週齢からミロガバリン 10 mg/kg/day を連日経口投与した。疼痛を Hunching と MGS でスコアリングし、エンドポイント時に血漿と膀胱腫瘍をサンプリングし、サイトカイン抗体アレイならびに病理組織学的解析を行った。また、膀胱がん細胞株を用いた増殖アッセイを *in vitro* で行った。生存曲線は Kaplan Meier 法により求め、2群間の統計学的検討はログランク法、組織学的な統計解析は *t* 検定もしくは Mann-Whitney *U* 検定、また *in vitro* の統計解析は Steel's の多重検定にて行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 4. 研究成果

### (1) ミダゾラムの膀胱がんマウスに対する効果

ミダゾラム投与群においては、膀胱がん細胞の細胞増殖に関わる Ki-67、サイクリン D1、A2、B1 の陽性率はコントロール群と比較して有意に低下したが、腫瘍体積と生存期間で有意差が得られなかった。悪性度の高い肉腫瘍様の成分や退形成癌の部分でミダゾラムが抗腫瘍効果を発揮しなかったことが考えられる。また、ミダゾラム群では CAF の増殖を抑制し、TAN や M2 様 TAM)、多形核骨髄由来免疫抑制細胞 (PMN-MDSC) の局所浸潤を有意に抑制した。一方、ミダゾラム+PK11195 投与群においては CAF の増殖と M2 様 TAM の浸潤は抑制されたが、TAN と PMN-MDSC の浸潤は MDZ 群と比較して増加した。疼痛評価においてもミダゾラム投与群で Hunching と MGS スコアの低下を認めたのに対し、ミダゾラム+PK11195 投与群ではコントロール群よりも両スコアが増加した。ミダゾラム群の血漿 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、CCL2、CCL3、CCL5、CXCL1 はコントロール群と比較して減少し、ミダゾラム+PK11195 群で TNF- $\alpha$  を除くサイトカインの増加を認めた。*in vitro* 解析においてはミダゾラムが膀胱がん細胞株のサイクリンや CDK を低下させ、増殖を抑制し、後期アポトーシスを誘導した。これらの結果から、ミダゾラムは膀胱がんマウスモデルにおいて膀胱がん細胞と CAF の増殖を抑制し、さらに TAN や M2 様 TAM、PMN-MDSC の局所浸潤を抑制することで炎症性サイトカインを低下させ、炎症性疼痛の軽減に寄与したことが考えられた。

### (2) ترامドールの膀胱がんマウスに対する効果

疼痛スコアに関しては、 ترامドール投与群と ترامドール+ナルトレキソン投与群で有意差を認めなかったが、腫瘍体積は ترامドール群と比較して ترامドール+ナルトレキソン群で増加した。TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインは ترامドール群、 ترامドール+ナルトレキソン群で減少した。病理組織学的には、腫瘍増殖能を示す Ki-67 陽性率やサイクリンは ترامドール投与で減少し、抗腫瘍効果を有する M1 様腫瘍関連マクロファージが増加した。これはナルトレキソン投与にて拮抗した。一方、CAF と腫瘍進展効果を有する M2 様 TAM はナルトレキソン投与の有無に関わらず ترامドールによって阻害された。TAN、ナチュラルキラー細胞、および細胞傷害性 T 細胞は変化しなかった。膀胱がん細胞株を用いた *in vitro* の実験系においては、 ترامドールはサイクリン/CDK の発現低下に伴い、増殖・浸潤を抑制し、ナルトレキソン添加により部分的に拮抗した。したがって、 $\mu$  オピオイド受容体を介した ترامドールの抗腫瘍効果は、がん細胞におけるサイクリン/CDK の発現低下に伴う増殖抑制に加え、M1 様 TAM の局所浸潤増加が寄与したことが考えられた。癌関連疼痛に対する ترامドールの効果に関しては、 ترامドール群と比較して ترامドール

ル+ナルトレキソン群で疼痛スコアが増加しなかったことから、多くのサイトカイン低下に伴う侵害受容性疼痛の緩和に加えて、下行性疼痛抑制系の活性化が深く関与したことが示唆された。

### (3) ミロガバリンの膀胱がんマウスに対する効果

ミロガバリン投与群とコントロール群の2群間の生存率には有意差がなかったが、ミロガバリン投与群の Hunching と MGS スコアはコントロール群と比較して有意に低下し、血漿 TNF $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  の低下を伴っていた。また両群の生存曲線に有意差はなかったが、腫瘍体積はコントロール群に比べてミロガバリン群で有意に増加し、がん細胞の Ki-67 陽性率はミロガバリン群で有意に増加した。細胞周期関連分子のサイクリン/CDK 陽性率もミロガバリン群で有意に増加した。腫瘍内の M2 様 TAM、CD31 陽性の腫瘍血管はミロガバリン群で増加した。一方、腫瘍内の SMA、CD8 陽性 T 細胞はミロガバリン群で減少した。膀胱がん細胞株においてもミロガバリン存在下でサイクリン/CDK 発現が増加し、増殖能が上昇した。したがって、ミロガバリンはがん性疼痛に対して鎮痛効果を示す一方で、腫瘍進展に関与することが示唆された。ミロガバリンによる膀胱がんマウスの腫瘍進展は、がん細胞におけるサイクリンと CDK の発現上昇に加えて、腫瘍進展に関わる M2 様 TAM の局所浸潤の増加に起因することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oshima Yukino, Sano Makoto, Kajiwara Ichie, Ichimaru Yoshimi, Itaya Tomoaki, Kuramochi Tomoya, Hayashi Emiko, Kim Jinsuk, Kitajima Osamu, Masugi Yohei, Masamune Atsushi, Ijichi Hideaki, Ishii Yukimoto, Suzuki Takahiro	4. 巻 128
2. 論文標題 Midazolam exhibits antitumour and anti-inflammatory effects in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Anaesthesia	6. 最初と最後の頁 679 ~ 690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bja.2021.12.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itaya Tomoaki, Sano Makoto, Kajiwara Ichie, Oshima Yukino, Kuramochi Tomoya, Kim Jinsuk, Ichimaru Yoshimi, Kitajima Osamu, Masamune Atsushi, Ijichi Hideaki, Ishii Yukimoto, Suzuki Takahiro	4. 巻 164
2. 論文標題 Mirogabalin improves cancer-associated pain but increases the risk of malignancy in mice with pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pain	6. 最初と最後の頁 1545-1554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/j.pain.0000000000002852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuramochi Tomoya, Sano Makoto, Kajiwara Ichie, Oshima Yukino, Itaya Tomoaki, Kim Jinsuk, Ichimaru Yoshimi, Kitajima Osamu, Masamune Atsushi, Ijichi Hideaki, Suzuki Takahiro	4. 巻 49
2. 論文標題 Effects of tramadol via a $\mu$ -opioid receptor on pancreatic ductal adenocarcinoma in vitro and in vivo	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Regional Anesthesia and Pain Medicine	6. 最初と最後の頁 200 ~ 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/rapm-2023-104511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大島雪乃, 佐野 誠, 板谷朋亮, 蔵持智也, 石井敬基, 鈴木孝浩
2. 発表標題 ミダゾラムの膵癌自然発症マウスに対する抗炎症効果とがん性疼痛緩和
3. 学会等名 第69回日本麻酔科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板谷朋亮, 佐野 誠, 梶原一絵, 大島雪乃, 蔵持智也, 金 眞淑, 北島 治, 石井敬基, 鈴木孝浩
2. 発表標題 ミロガバリンの担がんモデルマウスに対する鎮痛効果
3. 学会等名 第56回ペインクリニック学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶原一絵, 佐野 誠, 大島雪乃, 板谷朋亮, 蔵持智也, 金 眞淑, 北島 治, 石井敬基, 鈴木孝浩
2. 発表標題 心理社会的ストレス軽減による担がんマウスの鎮痛および延命効果
3. 学会等名 第56回ペインクリニック学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Oshima Y, Sano M, Kajiwara I, Itaya T, Kuramochi T, Kim J, Ijichi H, Ishii Y, Suzuki T
2. 発表標題 Midazolam inhibits nerve-cancer interaction in pancreatic cancer in vivo and in vitro
3. 学会等名 The 7th JCA-AACR Special Joint Conference, 2022 The Latest Advances in Pancreatic Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蔵持智也, 竹中彩乃, 梶原一絵, 大島雪乃, 佐野 誠, 鈴木孝浩
2. 発表標題 トラマドールの膀胱モデルにおける抗腫瘍・抗炎症効果
3. 学会等名 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部 第62回合同学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大島雪乃, 佐野 誠, 梶原一絵, 板谷朋亮, 蔵持智也, 金 真淑, 伊地知秀明, 石井敬基, 鈴木孝浩
2. 発表標題 膵癌モデルにおけるミダゾラムの神経 癌相互作用への影響
3. 学会等名 第30回 若手膵臓研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶原一絵, 佐野 誠, 大島雪乃, 金 真淑, 石井敬基, 鈴木孝浩
2. 発表標題 膵癌マウスの嗅球腹側僧房細胞変性へのデュロキセチンの効果
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大島雪乃, 佐野 誠, 梶原一絵, 北島 治, 石井敬基, 鈴木孝浩
2. 発表標題 ミダゾラムの膵癌自然発症マウスに対する抗腫瘍および炎症効果
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Oshima Y, Sano M, Ichimaru Y, Kajiwara I, Itaya T, Kuramochi T, Kim J, Ijichi H, Ishii Y, Suzuki T
2. 発表標題 Midazolam improves cancer pain in a pancreatic cancer mouse model via inhibiting cancer proliferation and inflammation.
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶原一絵, 板谷朋亮, 蔵持智也, 金 眞淑, 佐野 誠, 鈴木孝浩
2. 発表標題 デュロキセチンの担がんに伴う嗅球僧帽細胞変性と嗅覚過敏に対する緩和効果
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 板谷朋亮, 大島雪乃, 梶原一絵, 蔵持智也, 佐野 誠, 鈴木孝浩
2. 発表標題 ミロガバリンの膀胱マウスに対する癌性疼痛改善効果と腫瘍増大効果
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 蔵持智也, 梶原一絵, 大島雪乃, 板谷朋亮, 佐野 誠, 鈴木孝浩
2. 発表標題 トラマドールのμオピオイド受容体を介した抗腫瘍効果
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	高木 俊一  (TAKAGI Shunichi)  (20308464)	日本大学・医学部・准教授    (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	北島 治  (KITAJIMA Osamu)  (20772776)	日本大学・医学部・助教    (32665)	
研究分担者	佐野 誠 (Sano Makoto)  (SANO Makoto)  (70339323)	日本大学・医学部・研究員    (32665)	

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