

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月20日現在

機関番号：27102

研究種目：若手（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791794

研究課題名（和文） 口腔顔面癌モデルラットにおける癌性疼痛発生メカニズム

研究課題名（英文） Mechanisms of cancer-induced pain in orofacial cancer model of rats

研究代表者

小野 堅太郎（ONO KENTARO）

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40316154

研究成果の概要（和文）：口腔顔面領域に癌が発生すると痛みにより食事ができず、他の部位の癌よりも重篤な症状に陥る。そこで、顔面癌モデルラットを用いて口腔顔面領域の癌性疼痛発症メカニズムについて検討した。その結果、癌性疼痛発症には炎症や神経傷害とは異なる癌特有の神経メカニズムが関与し、中枢グリア細胞活性化が関わるということが明らかになった。臨床において癌性疼痛の抑制に抗グリア活性薬が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Since orofacial cancer-induced pain causes difficulties in eating, the symptoms of patients with orofacial cancer may be more severe than those of patients with cancer in other regions. In the present study, we investigated mechanism of cancer-induced pain in a rat facial cancer model. Consequently, we have demonstrated that cancer-induced pain is caused by central glial hyper-activation, independently on inflammation and nerve injury. The result suggests that anti-glial activation drugs may be available to inhibit cancer-induced pain in clinical side.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：顔面癌、三叉神経節、ミクログリア、アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

末期ガン患者は治療困難な痛みをしばしば訴えることはよく知られており、患者のQOLの為に一刻も早いガン性疼痛発生メカニズムの解明が求められている。これまで行われた研究は後肢を支配する坐骨神経領域での癌モデル動物を使って実験が行われており、口腔顔面領域ではほとんど研究されていなかった。口腔顔面領域は摂食時に頻繁

に刺激を受けるため、異常疼痛が発症すると食欲不振になり、体幹部のガンよりも口腔顔面ガンは重篤な症状を示す。そこで我々の研究グループは顔面癌モデルラットを作成し、異常疼痛（異種性痛覚や痛覚過敏）が早期に発症し、食欲不振になることを報告した。この新規顔面癌モデルラットは臨床における口腔癌患者の症状とよく一致しており、このモデルを使ったガン性疼痛発生メカニズム

の研究が期待されていた。

当時、癌性疼痛は癌の進行により生じた炎症や神経傷害によって生じていると一般的に理解されていた。しかし、臨床では抗炎症剤が無効であり、神経傷害の兆候が見られないなどいくつかの矛盾点があった。また、異常疼痛の発症に中枢グリア細胞の活性化の関与が注目されていた時期であり、癌性疼痛にも同様のメカニズムの関与を示す論文があった。しかし、炎症や神経傷害とは異なり、ミクログリアの活性を認めず、アストロサイトの活性化のみの関与が示唆されていた。

そこで我々は、顔面癌モデルラットを用いて、これらの問題点を解決する研究計画を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、新規顔面癌モデルラットにおけるガン性疼痛の発症メカニズムを明らかにするために、口腔顔面領域を支配する求心性神経のある三叉神経節細胞とその受容野である三叉神経脊髄路核尾側亜核における変化を調べることであった。さらに原因として考えられる作用を薬物投与により止めることによって癌性疼痛の発症を抑制できるか否かを突き止めることにあった。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル動物の作成

3 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いて顔面癌モデル、顔面炎症モデルとシャム 群を作成した。チオペンタール(50 mg/kg, ip)で麻酔したラットの右鼻毛部に GFP 遺伝子導入癌細胞(Walker 256B)を  $4 \times 10^6$  (in PBS 100  $\mu$ l) もしくは PBS (100  $\mu$ l) を投与した。炎症モデルにはコンプリート・フルイド・アジュバンドを投与した。

### (2) モデル動物の行動解析

モデル作成前から任意の日まで、von Frey hair による機械刺激疼痛逃避閾値、放射熱による熱刺激逃避潜時ならびに自発的顔面グルーミング時間の測定を行った。それぞれ、機械的異痛症、熱性痛覚過敏、自発痛の発症を評価できる。抗炎症薬インドメタシンや抗グリア活性薬プロペントフィリン腹腔内投与し、コントロール投与と比較することで薬物の効果を評価した。

### (3) 蛍光組織染色とウエスタンブローディング

モデル動物をペントバルビタール (60  $\mu$ g/kg) で麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを心灌流後、三叉神経節ならびに脳幹を摘出した。各処理後、凍結封入して切片を作成した。その後、通法に従い特異的 1 次抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。染色には神経ペプチド(P 物質、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、ガラニン)、サテライトグリアおよびアストロサイトマーカーとして GFAP、ミクロ

グリアマーカーとして Iba1、神経傷害マーカーとして ATF3 を標的とした。ウエスタンブローディングでは非化学固定サンプルを摘出し、実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 炎症および神経傷害と独立した癌性疼痛の発症メカニズム

顔面炎症モデルでは異常疼痛の発症を十分に抑える抗炎症薬インドメタシンの処置によっても、顔面癌モデルの異常疼痛はほとんど残った。顔面炎症モデルでは三叉神経脊髄路核尾側亜核において P 物質とカルシトニン遺伝子関連ペプチドの増加が認められたが、顔面癌モデルでは変化がなかった。加えて、神経傷害で増加するといわれているガラニンも顔面癌モデルでは変化が認められなかった。また、顔面癌モデルの三叉神経節において神経傷害マーカーである ATF3 の発現はなかった。さらに、癌組織中においても炎症性細胞の浸潤や神経幹への癌細胞浸潤はほとんど観察されなかった。これらの結果は、顔面癌モデルに発症する異常疼痛は炎症および神経傷害とは独立していることを示唆している。

### (2) 中枢グリア細胞の活性化

炎症および神経傷害によって中枢グリア細胞が活性化し、それにより異常疼痛が発症するというメカニズムはよく知られていた。ゆえに、当初実験を始めた際は顔面癌モデルには中枢グリア細胞の活性化はないのではないかと予想していた。しかし、予想に反して、接種から 4 日目の顔面炎症モデルの三叉神経脊髄路核尾側亜核において、ミクログリアとアストロサイト両細胞種ともに活性化しているという結果を得た。さらに実験を進め、ミクログリア活性化は一過性に引き起こされ、その後続いてアストロサイトが持続的に活性化することが分かった。また、これらグリア細胞の活性化はその後、癌の発生している鼻毛部の支配領域を超えて広がっていくことが明らかとなった。そこで、癌の存在しない顔面皮膚領域でも疼痛テストを行ったところ、アストロサイト活性化の時期と一致して遅延して発症する異常疼痛が観察された。

### (3) 抗グリア活性薬プロペントフィリン

癌細胞接種前より抗グリア活性薬として知られるプロペントフィリンを顔面癌モデルに投与したところ、異常疼痛の発症を接種 2 日目より有意に抑制した。また、このプロペントフィリン投与により、三叉神経脊髄路核尾側亜核におけるグリア細胞の活性化は抑制されていた。これらの結果は中枢グリア細胞の活性化が癌性疼痛の発症に関わっていることを示す。

この実験は抗グリア活性薬が癌性疼痛の

治療に有効である可能性を示唆していた。臨床の現場では、癌性疼痛は発症してからその治療が行われる。ゆえに、顔面癌モデルにおいて、癌細胞接種前ではなく、異常疼痛発症後においてもプロペントフィリンは有効であるかどうかを検討した。結果、プロペントフィリンは一旦発症してしまった異常疼痛に対しては弱い抑制しか示さなかった。しかし、癌のない領域に遅延して発症する異常疼痛に関しては発症前であれば強い抑制を示した。この結果は、グリア細胞の活性化は異常疼痛の発生初期に関わっており、その維持にはあまり機能していないことを示唆している。こういった中枢グリア細胞活性化の性質は、臨床の現場においてまだ癌性疼痛を発症していない癌患者に対して抗グリア活性薬を予防的に処方される必要があることを示唆している。

#### (4) 神経トレーサー遺伝子を組み込んだ癌細胞を使用した癌モデルの作成

上記の実験と並行して、神経トレーサー WGA(小麦胚芽レクチン)に自家蛍光を持つ DsRed を付けた遺伝子を組み込んだ癌細胞での実験も行っていた。これは癌組織に接触する神経だけを特異的にラベルして、癌性疼痛に関連する神経について特異的に解析出来るという利点をもっている。試行錯誤の結果、安定した発現細胞株を得たが、ラットに接種して5日ほどは増大傾向を示すものの、約半数のモデルにおいて10日後には癌が消失してしまい、なかなか実験が進まなかった。その後、WGAと同様のレクチンに抗ガン作用があるという報告を見つけた。そこで、癌細胞培養中にWGAを添加したところ、確かにある濃度より急速に癌細胞が死滅したため、それ以来この実験は中断した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

- ① Sago T, Ono K, Harano N, Furuta-Hidaka K, Hitomi S, Nunomaki M et al. (11名中2番目) Distinct time courses of microglial and astrocytic hyperactivation and the glial contribution to pain hypersensitivity in a facial cancer model. *Brain Res*, 査読有, 2012, in press, DOI:10.1016/j.brainres.2012.03.039
- ② Miyahara N, Ono K, Hitomi S, Hirase M, Inenaga K. Dopamine modulates neuronal excitability pre- and post-synaptically in the rat subfornical organ. *Brain Res*, 査読有, 2012, 1447, 44-52. DOI:10.1016/j.brainres.2012.01.063
- ③ Ono K, Inagaki T, Iida T, Wakasugi-Sato N, Hosokawa R, Inenaga K. Distinct effects of cevimeline and pilocarpine on salivary mechanisms, cardiovascular response and thirst sensation in rats. *Arch Oral Biol*, 査読有, 2012, 57(4), 421-428. DOI:10.1016/j.archoralbio.2011.09.013
- ④ 小野堅太郎、原野望、古田和美、人見涼露、布巻昌仁、吉田光広、椎葉俊司、仲西修、稲永清敏、ガン性疼痛の発生メカニズム、九州歯科学会雑誌、査読有、65巻、2011、60-67。  
<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/kds/-char/ja/>
- ⑤ Ono K, Asami R, Miyahara N, Nakanishi O, Inenaga K. Neuronal effects of neurokinin B on the rat subfornical organ. *Neuroreport*, 査読有, 2011, 22(8), 374-378. DOI:10.1097/WNR.0b013e3283469645
- ⑥ Hidaka K, Ono K, Harano N, Sago T, Nunomaki M, Shiiba S, Nakanishi O, Fukushima H, Inenaga K. Central glial activation mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model. *Neuroscience*, 査読有, 2011, 180, 334-343. DOI:10.1016/j.neuroscience.2011.02.007
- ⑦ Iida T, Ono K, Inagaki T, Hosokawa R, Inenaga K. Nicotinic receptor agonist-induced salivation and its cellular mechanism in parotid acini of rats. *Auton Neurosci*, 査読有, 2011, 161(1-2), 81-86. DOI: 10.1016/j.autneu.2011.01.003
- ⑧ Asami R, Ono K, Nakanishi O, Inenaga K. Distinct mechanisms underlie the regulation of body fluid balance by neurokinin B and angiotensin II in the rat brain. *Brain Res*, 査読有, 2011, 1383, 179-186. DOI:10.1016/j.brainres.2011.01.072
- ⑨ Ono K, Xu S, Inenaga K. Isolectin B<sub>4</sub> binding in populations of rat trigeminal ganglion cells. *Neurosci Lett*, 査読有, 2010, 486(3), 127-131. DOI:10.1016/j.neulet.2010.08.076
- ⑩ Harano N, Ono K, Hidaka K, Kai A, Nakanishi O, Inenaga K. Differences between orofacial inflammation and cancer pain. *J Dent Res*, 査読有, 2010, 89(6), 615-620. DOI:10.1177/0022034510363095

- ⑪ Inagaki T, Ono K, Masuda W, Iida T, Hosokawa R, Inenaga K. Differences in the  $Ca^{2+}$  response resulting from neurotransmitter stimulations of rat parotid acini and ducts. *Auton Neurosci*, 査読有, 2010, 154(1-2), 102-107.

DOI:10.1016/j.autneu.2009.12.005

- ⑫ Xu S, Ono K, Inenaga K. Electrophysiological and chemical properties in subclassified acutely dissociated cells of rat trigeminal ganglion by current signatures. *J Neurophysiol*, 査読有, 2010, 104(6), 3451-3461  
DOI:10.1152/jn.00336.2010

〔学会発表〕(計27件)

- ① 木山茉莉子、小野堅太郎、人見涼露、中村太志、松尾拓、中島啓介、稲永清敏、歯周病モデルラットにおける唾液分泌障害、日本生理学会大会、2012年3月29-31日、松本文化会館(長野県)
- ② 小野堅太郎、許聖弘、人見涼露、稲永清敏、ラット三叉神経節ニューロンにおけるTRPA1の機能特性、日本生理学会大会、2012年3月29-31日、松本文化会館(長野県)
- ③ 山本徹、小野堅太郎、人見涼露、原野望、布巻昌仁、吉田光広、椎葉俊司、稲永清敏、ラット三叉神経節ニューロンにおけるエンドセリンB受容体を介した細胞内カルシウム濃度上昇、日本生理学会大会、2012年3月29-31日、松本文化会館(長野県)
- ④ 人見涼露、岡田明子、小野堅太郎、稲永清敏、岩田幸一、硬膜炎モデルラットにおける上部頸髄ニューロンの光応答性変化、日本生理学会大会、2012年3月29-31日、松本文化会館(長野県)
- ⑤ 稲永清敏、宮原宣高、小野堅太郎、人見涼露、脳弓下器官ニューロンのシナプス前膜および後膜に対するドーパミンの作用、日本生理学会大会、2012年3月29-31日、松本文化会館(長野県)
- ⑥ Inenaga K, Miyahara N, Ono K, Hitomi S, Pre- and post-synaptic modulation by dopamine in rat subfornical organ neurons, The Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Feb 17-19 2012, Gyeongju TEMF Hotel (Gyeongju, Republic of Korea)
- ⑦ Ono K, Sago T, Harano N, Furuta-Hidaka K, Hitomi S, Nunomaki M et al. (11人中1番目), Contribution of central glial activation to pain hypersensitivity at late-stage in a

rat facial cancer model, The Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Feb 17-19 2012, Gyeongju TEMF Hotel (Gyeongju, Republic of Korea)

- ⑧ Hitomi S, Okada-Ogawa A, Ono K, Inenaga K, Iwata K, Enhancement of photic responses in upper cervical spinal cord neurons in dura inflammation rats, The Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Feb 17-19 2012, Gyeongju TEMF Hotel (Gyeongju, Republic of Korea)
- ⑨ 小野堅太郎、基礎研究からみた口腔乾燥症治療薬の効果と副作用、北九州ドライマウス研究会、2011年12月1日、小倉歯科医師会館(福岡県)
- ⑩ Ono K, Xu S, Harano K, Inenaga K, Expression of TRPA1 in subpopulations of rat trigeminal ganglion neurons, Annual meeting of Neuroscience, Nov 12-16 2011, Washington Convention Center (Washington DC, USA)
- ⑪ Inenaga K, Miyahara N, Ono K, Dopamine inhibits neuronal excitability in the rat subfornical organ, Annual meeting of Neuroscience, Nov 12-16 2011, Washington Convention Center (Washington DC, USA)
- ⑫ 小野堅太郎、左合徹平、日高和美、稲永清敏、顔面癌モデルラットにおける癌性疼痛発症メカニズム、歯科基礎医学会、2011年9月30日-10月2日、長良川国際会議場(岐阜県)
- ⑬ 稲永清敏、小野堅太郎、飯田太一、ニコチン受容体アゴニストの唾液分泌促進とそのメカニズム、歯科基礎医学会、2011年9月30日-10月2日、長良川国際会議場(岐阜県)
- ⑭ 左合徹平、小野堅太郎、稲永清敏、顔面癌モデルラットにおける中枢グリア細胞の経時的変化、歯科基礎医学会、2011年9月30日-10月2日、長良川国際会議場(岐阜県)
- ⑮ 宮原宣高、小野堅太郎、稲永清敏、ドーパミンはD4受容体を介して脳弓下器官ニューロンの神経活動を抑制する、歯科基礎医学会、2011年9月30日-10月2日、長良川国際会議場(岐阜県)
- ⑯ 小野堅太郎、左合徹平、稲永清敏、顔面癌モデルラットにおける延髄後角グリア細胞活性化と癌性疼痛への関与、日本神経科学大会、2011年9月14日-17日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑰ 稲永清敏、宮原宣高、小野堅太郎、ドーパミンはD4受容体を介して脳弓下器官ニューロンを抑制する、日本神経科学大

- 会、2011年9月14日-17日、パシフィコ横浜（神奈川県）
- ⑱ Ono K, Hidaka K, Harano N, Sago T, Nakanishi O, Inenaga K. Central glial activation mediates allodynia and hyperalgesia in a rat facial cancer model. The Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Nov 26 2010, Kagoshima, Japan.
- ⑲ Ono K, Xu S, Inenaga K. Cell classification for rat trigeminal ganglion neurons by current signatures. Annual Meeting of Neuroscience. Nov 12-16 2010, San Diego Convention Center (San Diego, USA).
- ⑳ Inenaga K, Asami R, Ono K, Nakanishi O. Comparisons with neurokinin B and angiotensin II effects on body fluid regulations in rat brain. Annual Meeting of Neuroscience. Nov 12-16 2010, San Diego Convention Center (San Diego, USA).
- 21 Harano N, Ono K, Hidaka K, Nakanishi O, Inenaga K. Glial activation in the medullary dorsal horn mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model. Annual Meeting of Neuroscience. Nov 12-16 2010, San Diego Convention Center (San Diego, USA).
- 22 小野堅太郎、日高和美、原野望、仲西修、稲永清敏、顔面癌モデルラットにおける癌性疼痛の発生に中枢グリア細胞活性化が関与する、日本口腔顔面痛学会、2010年10月3日、九州大学医学部百年講堂(福岡県)
- 23 小野堅太郎、稲永清敏、電流特性に基づいた三叉神経節ニューロンの分類における電気生理学的特徴ならびに化学反応性、歯科基礎医学会 2010年9月20-22日、タワーホール船堀（東京都）
- 24 日高和美、小野堅太郎、稲永清敏、中枢グリア細胞の活性化は癌性疼痛の発生に関与する、歯科基礎医学会 2010年9月20-22日、タワーホール船堀（東京都）
- 25 飯田太一、小野堅太郎、細川隆司、稲永清敏、ニコチンによるラット耳下腺腺房細胞の細胞内  $Ca^{2+}$ 動態、歯科基礎医学会 2010年9月20-22日、タワーホール船堀（東京都）
- 26 小野堅太郎、飯田太一、稲垣智浩、細川隆司、稲永清敏、唾液分泌機能におけるドーパミンの役割、九州歯科学会総会 2010年5月22-23日、九州歯科大学講堂（福岡県）
- 27 仲西 修、小野堅太郎、原野 望、日高

和美、福島秀文、自見英治郎、稲永清敏、癌細胞への神経レーザー遺伝子導入による癌性疼痛関連神経細胞の同定、九州歯科学会総会 2010年5月22-23日、九州歯科大学講堂（福岡県）

〔図書〕（計1件）

- ① Ono K, Harano N, Inenaga K, Nakanishi O. Springer, Pain Research: Methods and Protocols (2nd Edition), 2012, p287; Section part- "A rat pain model of facial cancer.", p149-157.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 堅太郎 (ONO KENTARO)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：40316154