

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390149

研究課題名(和文) 難治性がん疼痛の概日変動メカニズムを基盤にした鎮痛標的分子の探索

研究課題名(英文) Exploration of analgesic target for tumor-induced neuropathic pain based on the molecular mechanism of circadian rhythm in allodynia

研究代表者

小柳 悟 (KOYANAGI, Satoru)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60330932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞が神経に浸潤した場合、モルヒネなども奏効しない難治性疼痛(神経障害痛)が発症し、患者のQOLを著しく低下させるが、その疼痛強度には概日性的変動が認められる。本研究では腫瘍の浸潤によって誘発される神経障害痛の概日変動のメカニズム解明と難治性がん疼痛の治療標的分子の探索を目標に検討を行った。その結果、概日時計と疼痛を繋ぐ因子の同定に成功し、同定した因子の機能を阻害することで、痛みを緩和できることが明らかになった。これらの結果は概日時計による病態の日内変動の制御メカニズムの解明が、新規の治療標的分子の探索において有用であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Pain in cancer is often associated with tumor compression or infiltration on tissues. Cancer-related neuropathic pain also arises from injury attributable to infiltration of malignant cells into peripheral nerves. One troublesome hallmark symptom of neuropathic pain is hypersensitivity to normally innocuous stimuli, a condition known as "tactile allodynia" that is refractory even to opioids. The intensity of neuropathic pain in patients with cancer has been known to vary over 24 hour. We aimed to clarify the molecular link connecting the circadian clock to neuropathic pain, and identified a molecule responsible for causing the circadian variation of "allodynia". Importantly, suppressing the function of the circadian-allodynic molecule resulted in the significant attenuation of neuropathic pain. Identification of mechanism underlying the circadian change in the pathological condition will be useful strategy to discover new therapeutic target.

研究分野：疼痛学

キーワード：神経障害痛 概日時計 医薬品開発

1. 研究開始当初の背景

医薬品は医療を支え生活の質を維持・向上するために不可欠なツールであるが、いまだ有効な治療法のない難治性疾患が数多く存在し、優れた新薬の開発が待望されている。「痛み」は、がん患者が経験する最も困難な苦痛であり、その発症率は進行期で90%にまで達する。がんによる疼痛には腫瘍の増殖による「侵害受容体疼痛」と「神経障害痛」とが混在し、特に腫瘍の浸潤に伴う神経障害痛はモルヒネなどのオピオイド鎮痛薬も奏効し難いことから、患者のQOLを著しく低下させる。神経障害痛は軽い触刺激でも激痛を引き起こす「アロディニア」を特徴とするが、その痛みは夜間に増悪することが知られている。申請者らはがんによるアロディニアの概日リズムは、体内時計を構成する時計遺伝子によって引き起こされることを見出し、神経障害痛の疼痛閾値が体内時計によって制御されていることを示唆する所見を得た。

2. 研究の目的

本研究では、がんの浸潤によって誘発される神経障害疼痛の概日リズムのメカニズム解明を通じて、難治性がん疼痛の治療薬開発に向けた基盤研究を行った。

3. 研究の方法

(1) がん性疼痛概日リズムを示すモデルマウスの作成：実験に用いたマウスはいずれも明暗周期（明期：7:00～19:00）、自由摂食・摂水環境下で飼育した。マウス大腿部を切開し坐骨神経を露呈させ、その周囲にマトリゲルに懸濁させたNCTC腫瘍細胞を移植した。細胞液は坐骨神経周囲に添加後、ゲルが固化することを確認してから切開部を包合した。腫瘍細胞移植後、経日的に移植側および非移植側後肢の疼痛閾値をVon Frayフィラメントを用いたアップ・ダウン法にて測定した。

また、神経障害痛を発症したマウスから副腎を摘出し、疼痛閾値に及ぼす影響を検討した。副腎摘出の確認は血中コルチコステロン濃度を測定することで行った。

(2) 腫瘍およびマウス脊髄における遺伝子の発現リズム解析：麻酔下においてマウスから腫瘍および脊髄を摘出した。脊髄はL3～L5神経が投射する部位を採取し、得られた各組織より、RNAおよびタンパク質を抽出し、

リアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法にて標的となる遺伝子・タンパク質の検出を行った。また、抽出したタンパク質の一部はマイクロアレイ解析にも用いた。タンパク質についても質量分析のサンプルとして使用した。

(3) 脊髄の免疫組織染色：疼痛を発症したマウスから脊髄の薄切片を作成し、実験(2)で同定した因子の免疫組織染色を行った。標的タンパクの可視化には蛍光プローブを標識した二次抗体を用いた。同時に抗 NeuN 抗体、抗 CD11b 抗体、および抗 GFAP 抗体を用いて同定したタンパクの細胞局在を観察した。

(4) 疼痛モデルマウスへの薬物投与：疼痛を発症したマウスの髄腔内または皮下に同定した疼痛原因物質の阻害を投与し、後肢の疼痛閾値を経時的に測定した。

(5) 統計解析：多群間比較には分散分析およびPost-hocテストにはTurkey-Kramer法を用いた。また、対応のある2群間の比較にはPaired-Tテストを用い、有意水準は5%とした。

4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞からの分泌因子によるがん性疼痛の概日リズムの制御：マトリゲルを用いて坐骨神経周囲に腫瘍細胞を移植したマウス後肢の疼痛閾値には有意な概日変動が認められ、がん性疼痛は一日の中に特定の時間帯に増悪することが確認された。また、この時間帯には腫瘍細胞から疼痛を引き起こすサイトカインの分泌が増大していることが明らかになった。

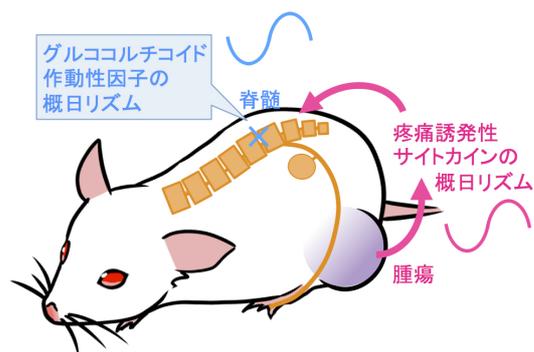
腫瘍移植マウスから9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00のいずれかに腫瘍塊からRNAを抽出して解析を行ったところ、上記の疼痛誘発性サイトカインの分泌リズムは転写レベルで引き起こされていることが明らかとなり、その原因として時計遺伝子による制御が一部関与していることが示唆された。更に、同定したサイトカインの受容体阻害薬を腫瘍移植マウスに皮下投与したところ、後肢における疼痛は阻害剤の用量依存的に緩和された。

(2) 脊髄内におけるグルココルチコイド作動性因子による疼痛閾値の概日リズム制御：マウスから副腎を摘出すると、血中コルチコステロン濃度の概日リズムは消失する。この状態において、坐骨神経を損傷したマウスの行

動量に変化は認められなかったが、後肢疼痛閾値の概日リズムは消失した。

また、副腎摘出マウスの脊髄から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行ったところ、グルココルチコイドの概日リズム依存的に発現が変動する遺伝子が 25 個抽出された。これらの中で、プロモーター領域におけるグルココルチコイド応答配列がヒトと高い相同性を示す因子 (GCRF#1: 仮称) に着目して更に検討を行った。免疫組織染色およびデータベースを用いた解析の結果、GCRF#1 は主に脊髄アストロサイトに発現するが、直接的には疼痛の発症に関与せず、標的となる因子をリン酸化することで生理作用を発揮することが明らかとなった。そこで GCRF#1 の標的分子で疼痛の発症に関わるものを質量分析によって同定することを試みたが、抽出された分子のなかにも疼痛の発症に直接関与するものは確認できなかった。また、GCRF#1 のキナーゼ活性を阻害する薬剤を坐骨神経が損傷したマウスの髄腔内に投与したところ、後肢における疼痛は有意に緩和された。

以上のことから、がん性疼痛の概日リズム制御には腫瘍細胞から分泌されるサイトカインが、また、神経障害が生じた場合の疼痛閾値の概日変動には脊髄内におけるグルココルチコイド作動性因子が関与していることが明らかになった (下図)。これらの結果は、概日時計による病態の日内変動の制御メカニズムの解明が、新規の治療標的分子の探索において有用であることを示唆している。



がんおよび神経障害による疼痛の概日リズム制御に関わる因子

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Horiguchi M, Koyanagi S, Hamdan AM, Kakimoto K, Matsunaga N, Yamashita C, Ohdo S. Rhythmic control of the ARF-MDM2 pathway by ATF4 underlies circadian accumulation of p53 in malignant cells. *Cancer Res* 73(8):2639-2649, 2013 (査読有り) doi: 10.1158/0008-5472
- ② Hayashi Y, Koyanagi S, Kusunose N, Okada R, Wu Z, Tozaki-Saitoh H, Ukai K, Kohsaka S, Inoue K, Ohdo S, Nakanishi H. The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S. *Sci Rep* 3:2744, 2013 (査読有り) doi: 10.1038/srep02744
- ③ Oda M, Koyanagi S, Tsurudome Y, Kanemitsu T, Matsunaga N, Ohdo S. Renal circadian clock regulates the dosing-time dependency of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Mol Pharmacol* 85(5):715-722, 2014 (査読有り) doi: 10.1124/mol.113.089805
- ④ Wada E, Koyanagi S, Kusunose N, Akamine T, Masui H, Hashimoto H, Matsunaga N, Ohdo S. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α activity by bile acids causes circadian changes in the intestinal expression of Octn1/Slc22a4 in mice. *Mol Pharmacol* 87(2):314-322, 2015 (査読有り) doi: 10.1124/mol.114.094979
- ⑤ Akamine T, Koyanagi S, Kusunose N, Hashimoto H, Taniguchi M, Matsunaga N, Ohdo S. Dosing time-dependent changes in the analgesic effect of pregabalin on diabetic neuropathy in mice. *J Pharmacol Exp Ther* May 11, 2015 (Online Published) (査読有り) <http://jpet.aspetjournals.org/content/early/2015/05/11/jpet.115.223891.long>

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kusunose N, Koyanagi S, Ohdo S. Molecular basis for circadian regulation of neuropathic pain in mice. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013 年 3 月 21 日 (福岡市)
- ② 楠瀬直喜, 小柳 悟, 松永直哉, 大戸茂弘. 神経障害性疼痛の概日リズム制御に関わるグルココルチコイド標的遺伝子の探索. 第 20 回日本時間生物学術大会. 2013 年 11 月 10 日 (福岡市)
- ③ 小柳 悟, 楠瀬直喜, 松永直哉, 大戸茂弘. 神経障害性疼痛の概日リズム形成メカニズムと鎮痛標的分子の探索. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 30 日 (熊本市)

- ④ Kusunose N, Koyanagi S, Ohdo S.
Exploration of analgesic target for
neuropathic pain based on the molecular
mechanism of circadian rhythm in allodynia.
第 87 回日本生化学会. 2014 年 10 月 18 日
(京都市)
- ⑤ 谷口真理恵、楠瀬直喜、赤嶺孝祐、松永直
哉、小柳 悟、大戸茂弘. がん性疼痛概日
変動メカニズムの検討. 第 31 回日本薬学
会九州支部大会. 2014 年 12 月 7 日
(福岡市)

[その他]

ホームページ等

[http://www.kyushu-u.ac.jp/pressrelease/
2013/2013_09_24_2.pdf](http://www.kyushu-u.ac.jp/pressrelease/2013/2013_09_24_2.pdf)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 悟 (KOYANAGI Satoru)
九州大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：60330932

(2) 連携研究者

津田 誠 (TSUDA Makoto)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：40373394

松永 直哉 (MATSUNAGA Naoya)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：10432915