

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592363

研究課題名(和文) 癌性骨痛を制御する因子の同定とその機能的役割の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of bone metastatic pain

研究代表者

中西 雅子(Nakanishi, Masako)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60437382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨転移を有する微小環境において発現制御される疼痛関連分子の同定を目的とし、ラット骨転移モデルの後根神経節を用い遺伝子発現解析を行った。骨転移により発現が誘導される因子としてMatrix metalloproteinase (MMP)13ならびにP2x7受容体が同定された。骨転移巣に豊富に存在するIL-1やTNF- α は、神経節におけるMMP13発現を増加させ、骨融解を促進させることで腫瘍進展ならびに疼痛発現に関与すると考えられた。また、P2x7受容体の発現を誘導する因子の1つとして、腫瘍巣において形成されるアシドーシスの影響が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gene expression analysis was performed using by dorsal root ganglions (DRG) of rat bone metastasis model. It was revealed that matrix metalloproteinase (MMP) 13 and P2x7 receptor were up-regulated in DRG with bone metastatic microenvironment. Cytokines such as IL-1 and TNF- α , abundant in bone metastatic foci, increased the MMP13 mRNA expression in organ cultured DRG. It was considered that up-regulated MMP13 expression accelerate the osteolysis, which in turn contribute tumor progression and development of pain. In addition, it was suggested that acidic microenvironment in tumor is one of the factors, which induced the expression of P2x7 receptors in DRG.

研究分野：実験病理学

キーワード：癌性疼痛 骨転移 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

骨は、癌性疼痛を引き起こす部位として最も頻度が高く、そのほとんどが癌の骨転移に起因することが知られている。しかしながら、骨転移に伴う疼痛は、NSAIDsのような末梢性鎮痛薬、あるいはモルヒネなどの中枢性鎮痛薬による除痛効果が十分に得られない場合が多い。一方、破骨細胞の特異的阻害剤が骨痛を軽減するという報告 (Kohno *et al.*, *J Clin Oncol* 2005) は、疼痛の誘発における破骨細胞性骨融解の関与を強く示唆するものである。このように、「骨」という特殊な微小環境における痛みの発生メカニズムは、非常に複雑であることが推察される。

申請者はこれまで癌性骨痛の動物モデルを確立し、その病態評価を行ってきた。その結果、溶骨性の特徴を持つ腫瘍では、脛骨転移モデルにおいて患側後肢の自発痛ならびに刺激に対する痛覚過敏反応を経時的に検出することを見出した。さらに、酸性領域に集積する蛍光色素アクリジンオレンジを用いた検討から、骨転移巣が酸性環境を呈していることを *in vivo* で明らかにした。

そこで、疼痛の発現における酸性環境の影響を明らかにするため、酸感受性受容体である transient receptor potential vanilloid subtype 1 (Trpv1) に着目した。知覚神経の細胞体の集合である後根神経節 dorsal root ganglion (DRG) では、神経伝達物質の1つである calcitonin gene related peptide (CGRP) と Trpv1 を共発現する神経細胞が多く認められた。また、培養神経細胞ならびに DRG 器官培養系を用いた検討から、酸性刺激は、知覚神経に発現している Trpv1 を活性化させ、転写因子 CREB のリン酸化を介して CGRP の発現を誘導していることが明らかとなった (Nakanishi *et al.*, *Mol Biol Cell* 2010)。

しかしながら、Trpv1 の発現や活性化の制御メカニズムは未だ解明されておらず、骨転移の微小環境と DRG の分子病態変化との関わりについても不明である。

2. 研究の目的

(1) 癌性骨痛の発生に関与する因子の同定

知覚神経内において、骨転移巣の影響を受けて発現が制御される因子を明らかにするため、骨転移モデル動物の後根神経節を用い、遺伝子発現解析を行う。

(2) 神経細胞内におけるシグナル伝達経路の解析

発現解析により得られた候補遺伝子について、培養神経細胞に過剰発現させ、これらの遺伝子を介した神経細胞の活性化を評価する。その際に、神経活動に重要とされる転写因子や神経伝達物質の発現などを指標に検討を行う。

(3) 酸感受性受容体との相互作用の検討

疼痛の発生には、神経細胞内において複数の分子がネットワークを形成し、相互に発現を制御している可能性が考えられる。そこで、既に癌性骨痛への関与が示唆されている酸感受性受容体の発現および機能において、発現解析により得られた分子による調節機構の有無を検討する。

3. 研究の方法

(1) 骨転移巣により制御される疼痛関連分子の同定

ラット肺腺癌細胞株 (IP-B12) を F344 ラットの脛骨骨髓内へ移植し、骨転移モデルを作製した。対照として反対側の脛骨に PBS を注入した。このモデルにおいて溶骨性病変と疼痛行動の発現を確認した後、左右の後根神経節から mRNA を採取し、網羅的な遺伝子発現解析を行った。得られた結果をもとに疼痛発現に関与する遺伝子を同定し、後根神経節における発現についてリアルタイム PCR 法ならびに免疫染色法により検討した。

(2) 疼痛関連分子の発現制御機構の解析

(1) で得られた分子の発現誘導に関わる因子を明らかにするため、神経系細胞株 F11 ならびにラット後根神経節の器官培養系を用いて *in vitro* での検討を行った。転移を有する骨微小環境において豊富に存在すると考えられるサイトカインに着目し、培養液に添加後、神経節あるいは F11 での疼痛関連分子の発現をリアルタイム PCR により解析した。

(3) 酸感受性受容体との相互作用の検討

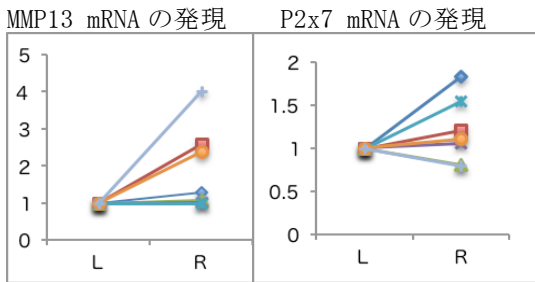
骨転移モデルラットの後根神経節における酸感受性受容体 (Trpv1、ASIC1-4、OGR1、TDAG8、Gpr4、Gpr132) の発現をリアルタイム PCR により検討した。また、乳酸で pH 調整を行った培地により酸刺激を行い、酸感受性受容体を介した疼痛関連分子の発現誘導の有無について解析した。

4. 研究成果

(1) 癌性骨痛の発生に関与する因子の同定

骨転移モデルラットの後根神経節を用いたマイクロアレイ解析の結果、患側において発現上昇が認められる遺伝子の候補として Matrix metalloproteinase (MMP) 13、P2x7 受容体が挙げられた。健側と比較し、MMP13 の発現は 4.067 倍、P2x7 受容体の発現は 2.377 倍であった。そこで、骨転移モデルの各ラットにおける MMP13 mRNA ならびに P2x7 mRNA 発現をリアルタイム PCR により検討したところ、いずれも患側において発現が増加する傾向が認められた (図 1)。後根神経節の免疫染色では、MMP13 は神経細胞、P2x7 受容体は神経周囲の satellite glia において陽性像が確認された (図 2)。

図 1



(n=7, それぞれ L は健側, R は患側)

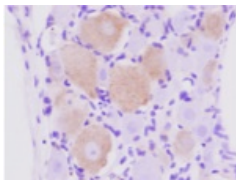
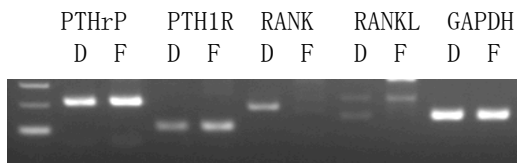


図 2
ラット後根神経節の
MMP13 免疫染色

(2) 神経節における MMP13 の発現制御機構

骨転移巣では、腫瘍細胞や炎症細胞ならびに破骨細胞性骨吸収により様々なサイトカインが豊富に存在することが示唆されている。PTHrP ならびに TGF- β はその代表的因子とされているが、神経節においても受容体とともにその発現が確認された (図 3)。

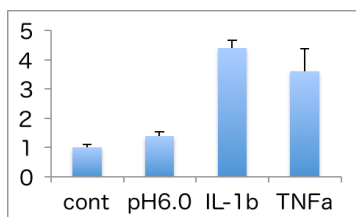
図 3 神経節 (D) および F11 細胞 (F) における骨転移関連分子の発現



そこで、MMP13 の発現誘導におけるこれら因子の関与を検討した。神経系細胞株 F11 では MMP13 mRNA の発現が非常に微量であったため、ラット後根神経節の器官培養系を用いた。

培養下の神経節に TGF- β を添加したところ、MMP13 mRNA の発現が増加する傾向が得られた。また、溶骨に関与する IL-1 β ならびに TNF- α によっても同様の効果が認められた (図 4)。

図 4
サイトカインによる MMP13 mRNA 発現誘導



これらの結果から、骨転移巣の微小環境は、末梢へ分布している知覚神経に受容され、神経節における MMP13 発現の誘導に関与してい

ると考えられた。

そこで、ラット MMP13 遺伝子を組み込んだ GFP ベクターを作製し、F11 細胞株での MMP13 過剰発現系の樹立を目指した。しかし、非神経系細胞での遺伝子発現は確認できたが、F11 細胞における遺伝子導入効率は非常に低く、様々な手法を試みたが十分な細胞系を得ることが困難であった。今後はさらに遺伝子導入法の改良や、リコンビナントタンパクを用いた検討が必要である。

MMP13 はコラーゲン分解酵素であり、特に軟骨分化において重要な役割を果たすことが知られているが、神経系での働きについてはほとんど報告がない。近年、MMP13 の作用として IL-1 β や MMP9 の活性化が報告されていることから (Nannuru *et al.*, *Cancer Res* 2010)、神経節あるいは脊髄においてこれら因子を介した疼痛発生への関与が示唆される。また、MMP13 は血管新生作用が報告されていることから、末梢で分泌された MMP13 が骨転移巣の病態悪化に関与している可能性も推察される。

(3) 酸感受性受容体との相互作用

骨転移巣の特徴であるアシドーシスの関与を検討したところ、酸刺激により神経節における P2x7 mRNA の発現が増加することが示された。他のサイトカインによる刺激では P2x7 mRNA 発現に変化は認められなかった。また、MMP13 の発現は酸刺激の影響を受けないことが確認された。神経節における P2x7 受容体の発現は satellite glia が主体であることから、神経細胞と glia の相互作用を介した疼痛発生機序についても今後さらなる検討が必要である。

今回、神経節において PTHrP ならびにその受容体である PTH1R の発現が認められた。PTHrP は腫瘍細胞から産生され、破骨細胞の活性化を誘導して骨融解を引き起こすことが知られているが、神経系における作用は明らかになっていない。興味深いことに、酸性刺激は神経節における PTHrP の発現を増加することが示された (図 5)。

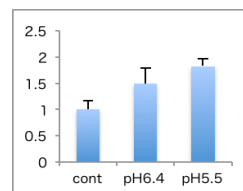


図 5 酸刺激による PTHrP mRNA 発現の増加

同様に、F11 細胞に酸刺激を行った場合も PTHrP mRNA の発現が増加する傾向が認められた。最近、培養神経細胞において PTHrP は Trpv1 の機能促進を介して疼痛に関与することが見出されている (Mickle *et al.*, *Pain* 2015)。知覚神経における Trpv1 の活性化は、神経伝達物質の発現増加を誘導して疼痛伝達に関与している。したがって、疼痛制御の

メカニズムを明らかにする上で、PTHrP は新たな標的因子となり得ると思われる。

以上の結果より、骨転移巣で産生される様々な因子は、知覚神経を直接刺激するだけでなく、知覚神経内における MMP13 などの分泌タンパクの発現誘導を介して病態形成の悪循環に関与していることが示唆された。

<引用文献>

Kohno N et al., Zoledronic acid significantly reduces skeletal complications compared with placebo in Japanese women with bone metastases from breast cancer: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 23: 3314-3321 (2005)

Nakanishi M et al., Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of CGRP expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain. *Mol Biol Cell* 21: 2568-2577 (2010)

Nannuru KC et al., Matrix metalloproteinase-13 regulates mammary tumor-induced osteolysis by activating MMP9 and transforming growth factor- β signaling at the tumor-bone surface. *Cancer Res* 70: 3494-3504 (2010)

Mickle AD et al., Induction of thermal and mechanical hypersensitivity by PTHrP via upregulation of TRPV1 function and trafficking. *Pain* (2015)

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 2 件)

① 中西雅子

骨転移に伴う疼痛のメカニズム
腎と骨代謝、日本メディカルセンター、
査読無、Vol 27 (1)、p41-46、2014
<http://www.nmckk.jp/top.php?category=KMBD>

② Cyclooxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor-c and lymph node metastasis in human oral tongue cancer.

Morita Y, Morita N, Hata K, Nakanishi M, Kimoto N, Omata T, Nakamura Y and Yoneda T.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol

(2014). 117, 502-510 査読有 doi: 10.1016/j.oooo.2013.12.410.

[学会発表] (計 2 件)

① 中西雅子

骨転移巣の酸性環境は TRPV1 の活性化による CGRP の発現増加を介して疼痛に関与する
第 103 回日本病理学会
2014 年 4 月 25 日 広島

② 中西雅子

酸性環境による Trpv1 の活性化は CGRP の発現増加を介して骨転移痛に関与する
第 118 回日本解剖学会
2013 年 3 月 28 日 高松

[図書] (計 1 件)

① 中西雅子、波多賢二、米田俊之
癌と骨、メディカルレビュー社、2013、
pp179-186

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 雅子 (Nakanishi, Masako)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：60437382