

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790669

研究課題名(和文)膵がん腫瘍浸潤による疼痛と悪液質に関わる脊髄アストロサイト活性化の分子機序

研究課題名(英文)Molecular mechanism of astrocyte-related cachexia and pain due to neural invasion of pancreatic cancer

研究代表者

光永 修一 (Mitsunaga, Shuichi)

独立行政法人国立がん研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：20466197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：進行膵がん患者の特徴は、疼痛や体重減少であるが、その機序には不明な点が多い。我々はヒト膵癌細胞を用いた膵癌神経浸潤モデルマウスを作製し、神経浸潤による疼痛と体重減少を再現した。マウスモデルでは神経浸潤と接続する神経組織が活性化しており、神経組織の過度の活性化を抑制する薬剤の投与で疼痛および体重減少が抑制された。これらの発見は、膵癌患者のQOLを著しく低下させる疼痛や悪液質の機序解明や新規治療開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The reaction of the nervous system to neural invasion (N-inv) may lead to cachexia and pain in pancreatic cancer (PCa). The N-inv model was created by injecting Capan-1 cells into the left sciatic nerve of severe combined immunodeficiency mice. The N-inv model was compared to a sham operation group. Propentofylline (PPF), an inhibitor of astrocytic activation, was administered daily into the abdominal cavity. Pain and body weight (BW) were measured weekly. Mice were euthanized 6 weeks after surgery. Pain and astrocytic activation were observed 2 weeks after the start of N-inv and maintained throughout the experiment. Loss of BW began at 4 weeks and was worse at 6 weeks. PPF treatment inhibited pain, astrocytic activation, and BW loss in the N-inv model. The reaction of the nervous system to N-inv leads to cachexia in PCa. The reaction of the nervous system to N-inv leads to cachexia in PCa.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：緩和医療

1. 研究開始当初の背景

進行膵がん患者の特徴は、腫瘍の増大とともに、疼痛や体重減少を主徴とする悪液質が増悪し、QOL が低下して予後不良となることである。この病態の原因となる腫瘍因子を同定してその機序を解明することは、有効な新規治療を開発する上で重要と考える。

神経浸潤は、膵がんで高頻度に認められる浸潤様式であり、病状悪化や予後不良に関わることを我々は明らかにしてきた。そこで、ヒト膵がん細胞を座骨神経に注入して作製するマウス神経浸潤モデルを確立してその病状を検討したところ、悪液質と疼痛を認めた。従って、神経浸潤は疼痛や悪液質の原因となる可能性がある。

マウス神経浸潤モデルを用いた検討により、神経浸潤による脊髄アストロサイト活性化が疼痛や悪液質に関与することを示す研究結果が得られた。そこで、神経浸潤モデルの脊髄における遺伝子発現プロファイリングを行ったところ、RAGE (receptor of advanced glycation endproducts) の関与が示唆された。RAGE は膵がんの増大、炎症、疼痛、神経損傷や神経再生に関わるマルチリガンド受容体である。われわれは、膵がん細胞、シュワン細胞、脊髄後根神経節、脊髄アストロサイトの間で RAGE ligand axis を介した相互作用が存在し、その結果、アストロサイトが活性化すると仮説した。この仮説の立証により、神経浸潤による脊髄アストロサイト活性化を制御する有望な標的分子が明らかとなり、疼痛や悪液質を改善させる新規治療法の開発に大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

膵がん神経浸潤での脊髄アストロサイト活性化における RAGE ligand axis の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

臨床 : 膵がん臨床例を用いて、CT 画像上の神経浸潤の程度と疼痛および皮膚知覚などの臨床データとの関連を評価し、神経浸潤やが関わる臨床像を検討する。

臨床 : 膵がん剖検例の神経浸潤部の程度および脊髄のグリア活性を検討し、神経浸潤の程度と脊髄グリア活性の相関を検討する。また、脊髄における RAGE ligand axis 関連分子の発現も評価する。これまでに、進行膵がん剖検検体 6 例 (高度神経浸潤 3 例を含む) の脊髄検体を採取している。本研究期間では、脊髄検体におけるアストロサイト活性化について、mRNA 発現と免疫染色による蛋白発現を測定し、組織学的な神経浸潤との比較検討を行う。

基礎 1 : 本研究では、足底を機械的刺激して侵害忌避行動を起こす刺激の閾値を測定し (von-Fray test) その閾値の低下を疼痛とし、悪液質は体重減少と定義する。ヒト膵がん細胞株を複数用いて神経浸潤モデルを作製し、疼痛、悪液質、脊髄グリア活性の上昇

が顕著な細胞株を同定する。次に、疼痛、悪液質、脊髄グリア活性の上昇を認める神経浸潤モデルにグリア抑制剤を投与して疼痛、悪液質、グリア活性抑制効果を確認し、グリア抑制剤にて RAGE 関連遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイ解析にて確認する。

基礎 2 : 疼痛および悪液質が顕著でグリア活性の高い神経浸潤モデルの脊髄脊髄後根神経節で高い遺伝子発現を cDNA マイクロアレイ解析で同定する。

基礎 4 : 神経浸潤/アストロサイト活性化 vitro モデルを作製し、RAGE ligand axis に関連した分子を阻害し、アストロサイト活性抑制効果の評価する。

基礎 5 : 神経浸潤 vivo モデルにおいて、RAGE ligand axis 関連分子を阻害し、アストロサイト活性抑制効果、疼痛や悪液質の抑制効果を検討する。

4. 研究成果

臨床 : 国立がん研究センター東病院の倫理審査委員会に承認されたプロトコルに則り、文書で研究参加に同意を得た進行膵がん患者 71 名の CT 画像、血液検体、皮膚知覚や疼痛などの臨床データを解析した。神経浸潤が高度 (図 1) であれば、疼痛スコアは上昇し (図 2)、知覚閾値も上昇していた。

図 1. 高度な膵癌神経浸潤の CT 画像

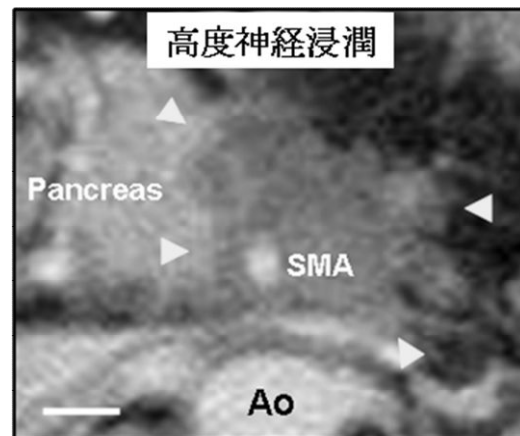
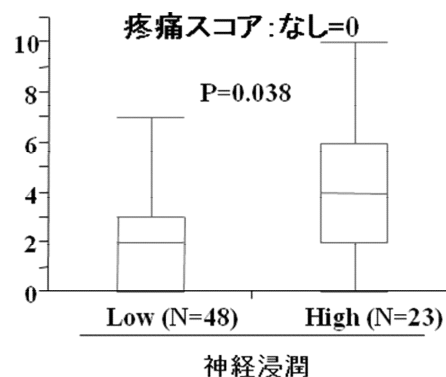


図 2. 膵癌神経浸潤の程度と疼痛スコア

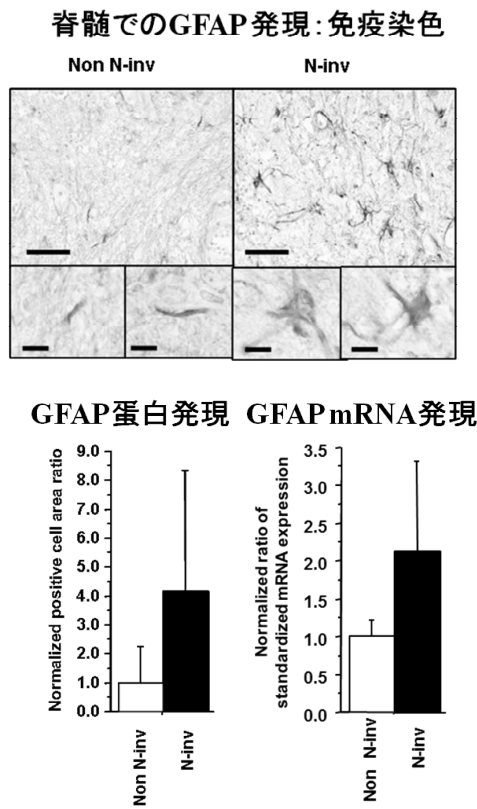


(平均 ± 標準誤差)

臨床 : 進行膵がん剖検検体 6 例 (高度神経浸潤 3 例を含む) を検討したところ、高度神

経浸潤例の脊髄では、アストロサイト活性化を示す Glial fibrillary acidic protein : グリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP) の発現上昇を認めた (図 3)。

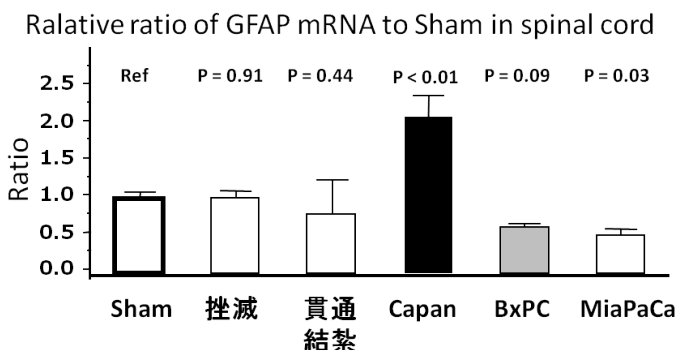
図 3 . 膵癌剖検例での神経浸潤の程度と脊髄



GFAP 発現
(各群 N=3, 平均 ± 標準誤差)

基礎 1: ヒト膵がん細胞株である、Capan-1、BxPC-3、MiaPaCa-2 を重度複合免疫不全マウスの座骨神経にそれぞれ 2.5×10^5 個を直接注入し、神経浸潤モデルを作製した。また、対象群として、PBS を座骨神経に注入したマウス (sham) を作製した。良性神経損傷モデルとして、座骨神経挫滅マウス (挫滅)、座骨神経貫通結紮マウス (貫通結紮) を作製した。モデル作製から 4 週後に上記マウスの脊髄グリア活性を脊髄 GFAP mRNA で定量して比較したところ、Capan-1 モデルのみ GFAP mRNA 発現上昇を認めた (図 4)。

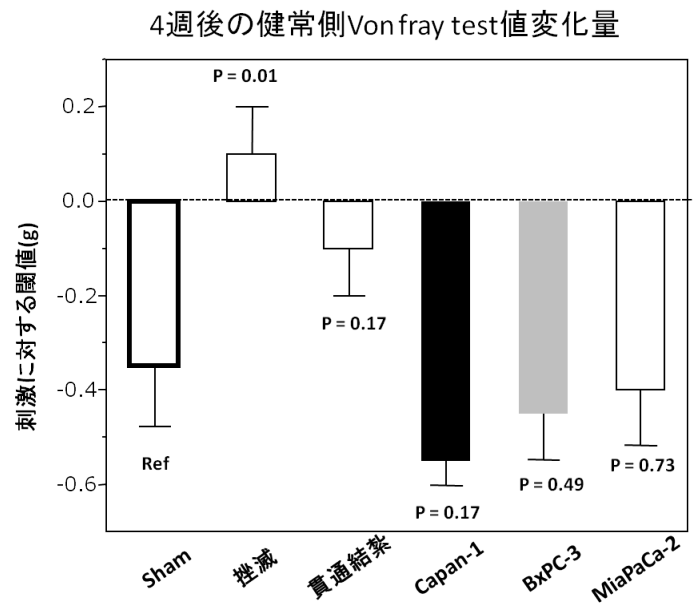
図 4 . 各種モデルマウスと脊髄 GFAP 発現



(各群 N=4, 平均 ± 標準誤差)

健常側 (座骨神経の操作を行っていない) の足底を機械的刺激して侵害回避行動を起こす刺激の閾値を定量 (von-Fray test) し、モデル作製前と観察終了後の閾値の変化量をモデル間で比較すると、sham 群と比較して Capan-1 で閾値が減少する傾向を認めた (図 5)。これは、Capan-1 神経浸潤モデルが疼痛モデルであることを示唆する。

図 5 . 各種モデルマウスと疼痛



(各群 N=4, 平均 ± 標準誤差)

Capan-1 神経浸潤モデルと sham マウスについて、6 週間の観察期間で Von Fray test および体重を経時的に測定した。Capan-1 神経浸潤モデルは、体重減少 (図 6) および疼痛 (図 7) が特徴的なマウスモデルであった。

図 6 . 膵癌神経浸潤モデルマウスの体重変動

実験開始時と比較した体重の変動

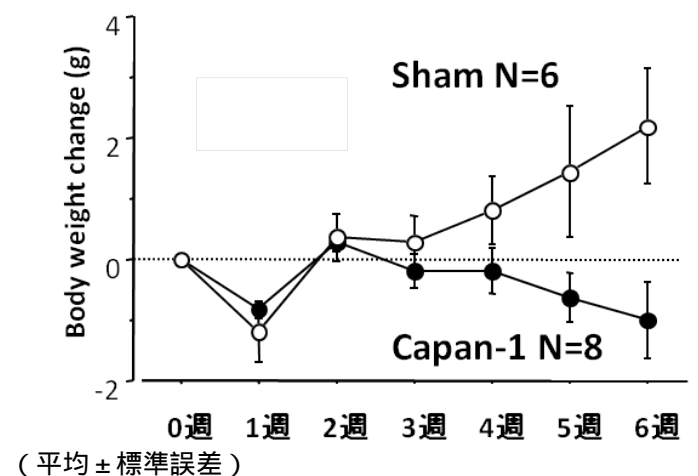
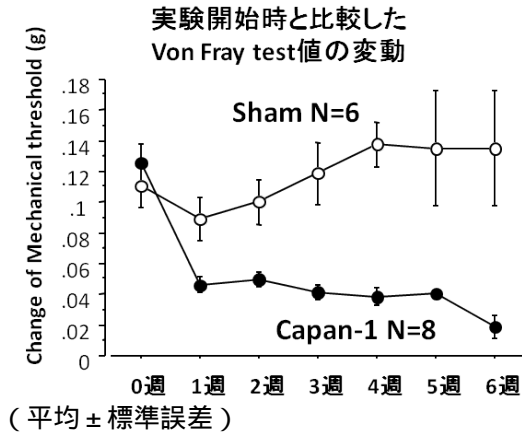


図 7. 膵癌神経浸潤モデルマウスの疼痛



基礎 2: グリア活性抑制剤であるプロベントフィリン (PPF) を Capan-1 を用いた神経浸潤モデルに 6 週間連日腹腔内投与 (ip) したところ (N=8) 生理食塩水 (NS) を連日腹腔内投与した Capan-1 神経浸潤モデルと比較して (N=6) 体重減少が抑制される傾向 (図 8)、疼痛の改善 (Von Fray test 値の上昇) (図 9)、健常側の脊髄後角グリア活性の抑制 (図 10) を認めた。

図 8. 膵癌神経浸潤モデルマウスに対するグリア抑制と体重減少改善効果

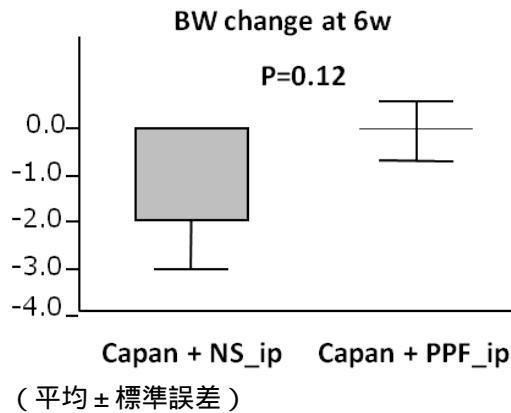


図 9. 膵癌神経浸潤モデルマウスに対するグリア抑制と疼痛緩和効果

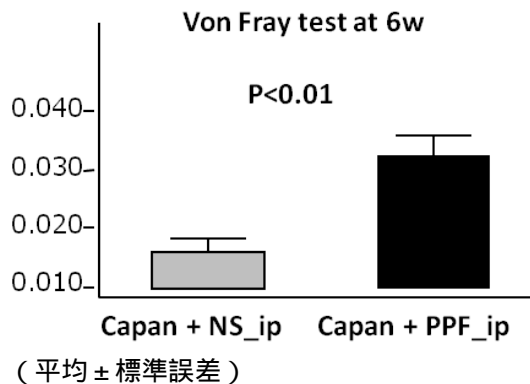
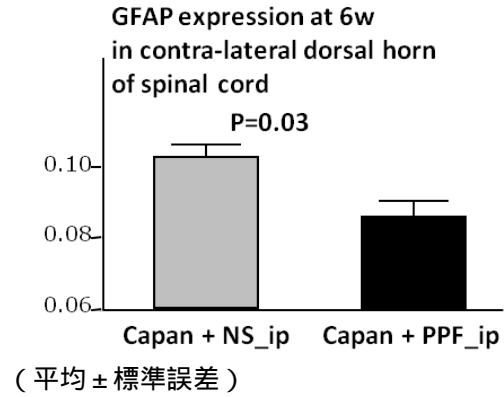


図 10. 膵癌神経浸潤モデルマウスに対するグリア抑制とグリア活性抑制効果



生理食塩水投与 Capan-1 神経浸潤モデルと比較して、PPF 投与 Capan-1 神経浸潤モデルの脊髄で有意に発現が低下する遺伝子を cDNA マイクロアレイ解析で検討したところ、CCL7 や CCL2 などのケモカインや、ATF3 などの神経障害関連遺伝子発現が低下していたが、RAGE 関連遺伝子発現に特徴的な変動を認めなかった。

基礎 2: 神経浸潤部と脊髄を接続する脊髄後根神経節で特徴的な変化をきたしている可能性が高い。Sham マウスと比較して Capan-1 神経浸潤モデルの脊髄後根神経節で高発現する遺伝子を cDNA マイクロアレイ解析で検討したところ、RAGE ligand である S100A8 や A100A9、ケモカインである CCL8 や CCL9、炎症性サイトカインである IL-6 が高発現していた (表 1)。

表 1. 膵癌神経浸潤モデルマウスに対するグリア抑制により、脊髄後根神経節内で発現が低下した遺伝子

Gene	Fold change (N-inv vs PBS)
Reg3b	138.9
Anxa10	26.9
Ccl8	14.0
Gal	10.2
Il6	9.7
Slc6a4	7.7
Spr1a	7.0
Adrb3	6.2
S100a8	4.9
Gfap	4.6
S100a9	3.9
Ccl9	3.6

基礎 4：神経浸潤/アストロサイト活性化 vitro モデルを作製し、RAGE ligand axis に関連した分子を阻害し、アストロサイト活性抑制効果を評価する予定である。現在、Capan-1、脊髄後根神経節、アストロサイトを共培養し、アストロサイトが活性化すること、基礎 3 で見出した遺伝子発現が脊髄後根神経節で高発現となる条件を検討している。基礎 5：基礎 4 の結果を受けて実施する予定である。

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 5 件)

1. Sugimoto M, Mitsunaga S, Yoshikawa K, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Konishi M, Ikeda M, Kojima M, Ochiai A, Kaneko H. Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer*. 50(11):1900-8, 2014.
2. Inagaki M, Akechi T, Okuyama T, Sugawara Y, Kinoshita H, Shima Y, Terao K, Mitsunaga S, Ochiai A, Uchitomi Y. Associations of interleukin-6 with vegetative but not affective depressive symptoms in terminally ill cancer patients. *2013 Aug;21(8):2097-106*.
3. Mitsunaga S, Ikeda M, Shimizu S, Ohno I, Furuse J, Inagaki M, Higashi S, Kato H, Terao K, Ochiai A. Serum levels of IL-6 and IL-1 can predict the efficacy of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 108(10):2063-9, 2013.
4. Imoto A, Mitsunaga S, Inagaki M, Aoyagi K, Sasaki H, Ikeda M, Nakachi K, Higuchi K, Ochiai A. Neural invasion induces cachexia via astrocytic activation of neural route in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 131(12):2795-807, 2012.
5. Yoshikawa K, Mitsunaga S, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Kato Y, Aizawa M, Ochiai A. Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. *Cancer Sci*. 103(11):2012-20, 2012.

[学会発表](計 10 件)

1. 田中弘人、光永修一、小林美沙樹、船崎秀樹、高橋秀明、大野泉、清水怜、和泉啓司郎、池田公史. ゲムシタピン耐性進行膵癌に対する S-1 療法の 3 週

レジメンの有効性と安全性 6 週レジメンとの比較 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2013/08/30 仙台市

2. 奥山浩之、光永修一、桑原明子、高橋秀明、大野泉、清水怜、池田公史. 進行膵がんにおける塩酸ゲムシタピン療法の有害事象と炎症性サイトカイン・タンパクの関連 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2013/08/29 仙台市
3. 三浦智史、光永修一、清水怜、大野泉、高橋秀明、奥山浩之、桑原明子、池田公史. Characterization of patient with high serum level of IL-6 in advanced pancreatic cancer. 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2013/08/29 仙台市
4. 光永修一、池田公史、清水怜、大野泉、高橋秀明、奥山浩之、桑原明子、加藤祐一郎、落合敦志、小西大. 胆道がんの患者背景と治療成績の変遷 国立がん研究センター東病院 1031 例の検討 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2013/08/29 仙台市
5. Shuichi Mitsunaga, Masafumi Ikeda, Hideki Ueno, Kohei Nakachi, Chigusa Morizane, Shunsuke Kondo, Satoshi Shimizu, Yasushi Kojima, Takuya Suzuki, Toshiyuki Tamai, James P. O'Brien, Takuji Okusaka. Phase I/II study of lenvatinib (E7080), a multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): Phase I results. ASCO-GI2013 Gastrointestinal Cancers Symposium January 24-26 2013 San Francisco
6. Masafumi Ikeda, Shuichiro Shiina,

Kohei Nakachi, **Shuichi Mitsunaga**, Satoshi Shimizu, Yasushi Kojima, Hideki Ueno, Chigusa Morizane, Shunsuke Kondo, Yasunari Sakamoto, Ryosuke Tateishi, Yoshinari Asaoka, Kazuhiko Koike, Hitoshi Arioka, Takuji Okusaka. Phase I study of safety, pharmacokinetics, and efficacy of TSU-68 plus S-1 combination in patients with advanced hepatocellular carcinoma. ASCO-GI2013 Gastrointestinal Cancers Symposium January 24-26 2013 San Francisco

7. 篠原旭、奥山浩之、高橋秀明、小林美沙樹、船崎秀樹、桑原明子、大野泉、清水怜、**光永修一**、池田公史、市田泰彦、和泉啓司郎. 進行肝細胞癌患者における Sorafenib 療法 - C 型肝炎と B 型肝炎の背景肝の違いによる有効性と安全性の検討 第 7 回 日本肝がん分子標的治療研究会. 2013/1/19 岐阜市
8. 清水怜、桑原明子、奥山浩之、高橋秀明、大野泉、**光永修一**、篠原旭、小林美沙樹、船崎秀樹、近藤俊輔、森実千種、上野秀樹、奥坂拓志、池田公史. 血小板低値の肝細胞癌患者に対する Sorafenib 第 7 回 日本肝がん分子標的治療研究会. 2013/1/19 岐阜市.
9. 桑原明子、池田公史、**光永修一**、清水怜、大野泉、高橋秀明、奥山浩之、近藤俊輔、森実千種、上野秀樹、佐竹光夫、荒井保明、奥坂拓志. 肝動脈化学塞栓術に不応の肝細胞癌に対するソラフェニブの有効性 - 肝動注化学療法との比較 - 第 7 回 日本肝がん分子標的治療研究会. 2013/1/19 岐阜市.

10. 小林美沙樹、奥山浩之、船崎秀樹、桑原明子、高橋秀明、大野泉、清水怜、**光永修一**、池田公史、市田泰彦、和泉啓司郎. 80 歳以上の高齢者の切除不能肝癌症例に対するゲムシタピン療法の有効性と忍容性 第 50 回日本癌治療学会学術集会 2012/10/25 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
光永 修一 (Mitsunaga Shuichi)
国立がん研究センター東病院・医員
研究者番号：20466197

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし