

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462453

研究課題名(和文)低酸素によるがん疼痛に関する研究

研究課題名(英文)hypoxia in cancer pain

研究代表者

安心院 純子(AJIMI, Junko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80328111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダイノルフィン A (1-17)[Dyn A (1-17)]のN末端領域とC末端領域はそれぞれオピオイド受容体とNMDA受容体に親和性が高い。ペプチダーゼによるDyn A (1-17)のC末端分解産物はNMDA受容体を介する神経毒性を誘導することが報告されている。3種のペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン)はDyn A (1-17)のC末端分解産物量を減少させることによりその毒性を軽減し、鎮痛効果を増強することが示唆された。がん性疼痛時にはオピオイド分解機構に変調変調を来し、Dyn分解が抑制されその結果神経毒性が生じるのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to evaluate antinociceptive potential and toxicity with administration of Dyn under pretreatment with a mixture of amastatin (A), captopril (C), and phosphoramidon (P), and/or Dyn-converting enzyme inhibitor (p-hydroxymercuribenzoate; PHMB). MALDI-TOF-MS analysis identified Dyn A (1-6) and Dyn A (1-10) fragments as products following incubation of Dyn A (1-17) with membrane preparation of rat midbrain with a mixture of the three PIs. Pretreatment with a mixture of the three PIs produced an approximately 30-fold augmentation in antinociception induced by low-dose administration of Dyn A. Dyn-induced antinociception and toxicity under pretreatment with various combinations of the three PIs and PHMB was greater than that with a mixture of the three PIs alone. These findings suggest that administration of a mixture of the three PIs increases Dyn A-induced antinociception under physiological conditions without toxicity.

研究分野：鎮痛

キーワード：dynorphin peptidase toxicity cancer pain

1. 研究開始当初の背景

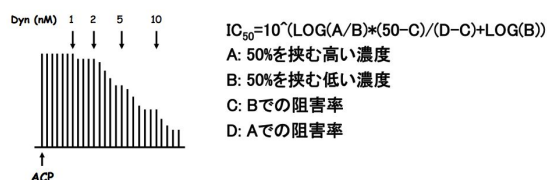
がん細胞の増殖速度と腫瘍血管の形成速度とのアンバランスから悪性腫瘍の内部には、十分な酸素が供給されない低酸素領域が生じる(慢性低酸素)。がん組織では低酸素環境の存在により、低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor-1、HIF-1)の発現が亢進している。近年、糖尿病神経症に伴う疼痛発症の細胞内分子メカニズムとして、末梢組織の低酸素状態によりHIF-1が活性化され、タンパク質リン酸化酵素(PKC)の活性化を介してカプサイシン受容体(TRPV1)機能亢進することが明らかになった。本研究では、溶骨性がんモデル動物を用いて疼痛発症時におけるHIF-1の活性化、TRPV1受容体機能亢進、疼痛の連関を明らかにすることを当初目指した。最近、オピオイドペプチドの一種であるDynorphin(Dyn)が溶骨性がん性疼痛に関与するとの報告がなされた¹⁾。また、虚血による障害とDynとの関連性が知られるようになってきた²⁾。そこで、申請者はDynによる鎮痛効果と神経毒性との調節機構について明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

ダイノルフィン A (1-17)[Dyn A (1-17)]のN末端領域とC末端領域はそれぞれオピオイド受容体とNMDA受容体に親和性が高い。ペプチダーゼによるDyn A (1-17)のC末端分解産物はNMDA受容体を介する神経毒性を誘導することが報告されている。本研究では3種のペプチダーゼ阻害剤(Pis)(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン)のDyn A(1-17)に対する*in vitro*、*ex vivo*、*in vivo*への効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) *in vitro*: ラット中脳の膜分画に Dyn A (1-17)、Pis を加え 37 で 20 分間保温し、matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF-MS; AXIMA-QIT-TOF-MS; Shimadzu)によりペプチド断片を解析した。
 2) *ex vivo*: マウス輸精管を経壁電気刺激し誘発される収縮に対する Dyn A (1-17)の抑制効果を IC₅₀の値で求めた。



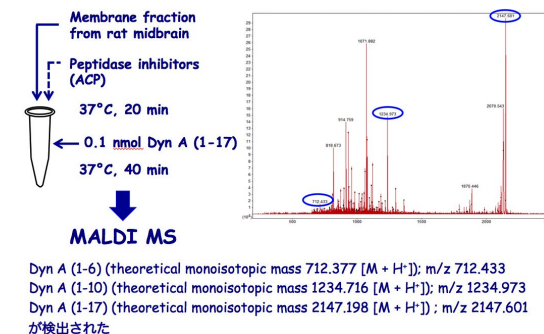
3) *in vivo*: a. 脳室内投与 7 週齢 Wistar 系雄性ラットの第三脳室内にガイドカニューレを挿入固定した。b. 髄腔内投与 Yaksh らの方法に従い、7 週齢 Wistar 系雄性ラットの

髄腔内にカニューレを挿入した。薬液投与後に 55 の温水にラットの尾を浸し、Tail-flick response までの潜時を測定した。薬液投与後 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 分目に 55 の温水にラットの尾を浸し、Tail-flick response までの潜時を測定した。Percentage of maximal possible effect (%MPE)を、%MPE=[(test latency - baseline latency) / (5 - baseline latency)] x 100 の式により求め、鎮痛効果は%MPEあるいはAUC(縦軸に%MPE,横軸に時間をとった場合の area under the curve)などの値で表した。神経毒性の指標としてアロディニアの発現を von Frey 法で解析した。

4. 研究成果

1) *in vitro*: 3 種 Pis(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン)存在下で Dyn A (1-17) (m/z 2147.601 [M+H⁺]) は Dyn A (1-6)(m/z 712.433 [M+H⁺]), Dyn A (1-10)(m/z 1234.973 [M+H⁺]) の分解産物と未分解の Dyn A (1-17)が検出された。C末端領域ペプチド断片の Dyn A (7-17), Dyn A (11-17)は検出されなかった。すなわち、3 種 Pis 存在下では Dyn A (1-17)のC末端分解産物を生じないことが示唆された(下図)。

MALDI-MSによるペプチド断片の解析



2) *ex vivo*: 3 種ペプチダーゼの混合物はマウス輸精管の電気刺激誘発性収縮への Dyn A (1-17)の抑制効果に対して用量依存的に増加した。Pis 非存在下と存在下における Dyn A (1-17)の IC₅₀はそれぞれ約 11nmol と 3nmolであった。また、マウス輸精管の電気刺激誘発性収縮への Dyn A (1-17)の抑制効果に対してアマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドンはいずれも必要であった。すなわち、アマスタチン感受性ペプチダーゼ、カプトプリル感受性ペプチダーゼ、ホスホラミドン感受性ペプチダーゼによって Dyn A (1-17)の分解を行うことが明らかとなった。

3) *in vivo*: a. 脳室内投与

アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン(それぞれ 10 nmol)をラット第三脳室内に前投与した群では、非投与群に比べて Dyn A (1-13)あるいは Dyn A(1-17)の鎮痛効果はミューおよびカッパ受容体を介して用量依存的に有意に増強し、毒性を示さなかった。ア

マスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン(それぞれ 10 nmol)を Dynorphin converting enzyme 阻害剤 PHMB(10 nmol)とともにラット第三脳室内に前投与した群では、毒性(Barrel rotation など)が生じた。

b. 髄腔内投与

アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン(それぞれ 10 nmol)は Dyn A (1-17)の鎮痛効果に対して、ミュー、デルタ、カプパ受容体を介して、約 30 倍増強した。しかし、毒性を示さなかった。アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン(それぞれ 10 nmol)を Dynorphin converting enzyme 阻害剤 PHMB(10 nmol)とともにラット髄腔内に前投与した群では、神経毒性が生じた。

以上の結果より

3 種 PIs は Dyn A (1-17)の C 末端分解産物量を減少させることによりその毒性を軽減し、鎮痛効果を増強することが示唆された。がん性疼痛時にはオピオイド分解機構に変調変調を来し、Dyn 分解が抑制されその結果神経毒性が生じるのではないかと考えられた。

<引用文献>

1)Middlemiss, T. et al.. Mechanisms of cancer-induced bone pain. *Clinical Oncology*, 2011, 23, 387-392.

2) Headricks et al.. Opioid receptors and cardioprotection-opioidergic conditioning of the heart. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172, 2026-50.

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 6 件)

1. Irie M, Yoshikawa M, Ono R, Iwafune H, Furuse T, Yamada I, Wakana S, Yamashita Y, Abe T, Ishino F, Kaneko-Ishino T. Cognitive function related to the Sirh11/Zcchc16 gene acquired from an LTR retrotransposon in eutherians. *PLoS Genet*. 2015, 11(9): e1005521. 査読有

2. Ajimi J, Yoshikawa M, Takahashi S, Miura M, Tsukamoto H, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Effect of three peptidase inhibitors on antinociceptive potential and toxicity with intracerebroventricular administration of dynorphin A (1-17) or (1-13) in rat. *J. Anesthesia* 2014, 29(1), 65-77. 査読有

3. Shinomiya T, Kawaguchi M, Okubo M, Kosuge Y, Yoshikawa M. mRNA Expression and localization of LPS-induced beta-defensin isoforms in rat salivary glands. *Bul. Tokyo Den. Coll.* 2014,

55(3), 139-147. 査読有

4. Murata T, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Potentiation of [Met5]enkephalin-induced antinociception by mixture of three peptidase inhibitors in rat. *J. Anesthesia* 2014, 28(5), 708-715. 査読有

5. Ito M, Yoshikawa M, Ito K, Matsuda M, Jin X.L., Takahashi S, Kobayashi H, Suzuki T. Antinociceptive effect of intracerebroventricular administration of d-serine on formalin-induced pain. *J. Anesthesia* 2014, 28(2), 228-234. 査読有

6. Takeyama K, Sakamoto R, Yoshikawa M, Suzuki T. A case of Wenckebach-type atrioventricular block caused by administration of indigo carmine. *Tokai J Exp Clin Med* 2014, 39 (1), 10-13. 査読有

[学会発表](計 3 件)

1. 姜卓義、吉川正信、渡邊真理子、安心院純子、三浦正明、鈴木利保. ラット髄腔内に投与した 3 種ペプチド分解酵素阻害剤はダイノルフィン A(1-17)の神経毒性を示さずに鎮痛効果を増強する. 日本麻酔科学会第 62 回学術集会. 2015 年 5 月 28 日 兵庫県神戸市神戸国際展示場

2. Ajimi J, Yoshikawa M, Takahashi S, Miura M, Suzuki T. A mixture of three peptidase inhibitors on antinociceptive action of dynorphin A (1-17) by intrathecal administration in rats without neurotoxicity. *Euroanesthesia* 2013. 2013 年 6 月 3 日 Spain, Barcelona. Congress Centre Barcelona

3. 三浦正明、渡邊真理子、安心院純子、高橋滋、吉川正信、鈴木利保. 3 種ペプチダーゼ阻害剤前処理によるロイシンエンケファリンの鎮痛効果は μ および κ 受容体を介する. 日本麻酔科学会第 60 回学術集会. 2013 年 5 月 23 日 北海道札幌市ロイトン札幌

4. 渡邊真理子、吉川正信、鈴木利保. モルヒネ長期投与によりラット脳内の D - セリン量および D - セリン代謝関連酵素の発現量は増加する. 日本麻酔科学会第 60 回学術集会. 2013 年 5 月 23 日 北海道札幌市ロイトン札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

安心院 純子 (AJIMI, Junko)
東海大学・医学部・助教

研究者番号 : 80328111

(2)研究分担者

吉川 正信 (YOSHIKAWA, Masanobu)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号： 90276791