

令和元年6月25日現在

機関番号：35412

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05234

研究課題名(和文) がん細胞が産生する新規鎮痛ペプチドの同定と鎮痛機序の解明, 新しい疼痛治療戦略

研究課題名(英文) Novel pain treatment strategy-Identification of novel analgesic peptide produced by cancer cells and elucidation of analgesic mechanism

研究代表者

森田 克也 (MORITA, KATSUYA)

広島文化学園大学・看護学部・教授

研究者番号：10116684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはがん細胞の培養上清にペプチド性鎮痛物質を見出し、本物質血液脳関門を通過しMOP(μ)受容体に作用して、鎮痛効果を現すことを明らかにしてきた。本研究では本鎮痛物質の同定と作用様式から新規鎮痛薬の開発を目指す。本鎮痛ペプチドの同定はまだ成功していない。当該物質脳全身投与はオピオイド作用薬の有害作用を殆ど呈することなく、様々な疼痛モデルで強力な鎮痛効果を惹起すること。生体内に分解酵素が存在することを明らかにした。がん細胞由来内因性鎮痛ペプチドの同定と鎮痛発現機序および代謝機構の解明は新しい疼痛治療法と安全な新規鎮痛薬開発のターゲットとなることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞の培養上清に液性鎮痛物質を見出し、当該物質は血液脳関門を通過しMOP(μ)受容体に作用して、下降性疼痛抑制系を賦活して、がん性疼痛や原因の異なる様々な疼痛に広く有効であることを見出した。当該物質はモルヒネ投与で問題となる耐性や依存の獲得及び便秘や呼吸抑制等の副作用は認められず新規鎮痛薬開発のシーズとなることが期待される。当該物質の同定と、代謝機構の解明、代謝阻害薬の開発から、新しい治療法と安全な新規鎮痛薬の開発をめざした、新たな治療戦略を構築する基盤を与えるものである。と同時にブロックバスターになる可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：We have found that a peptide-like analgesic substance is presence in the culture supernatant of cancer cells, and it has been clarified that this substance passes through the blood-brain barrier and acts on the MOP (μ) receptor to exhibit an analgesic effect. In this study, we aim at the development of novel analgesics from the identification and action mode of this analgesic substance. Identification of this analgesic peptide has not been successful yet. The substance systemic administration should evoke the strong analgesic effect in various pain models without showing the side effect of an opioid agonist. It was clarified that degradative enzymes exist in the living body. Identification of cancer cell-derived endogenous analgesic peptide and elucidation of mechanism of degradation and mechanism of analgesia are expected to be targets for new pain therapy and safe new analgesic development.

研究分野：医歯薬学

キーワード：新規内因性鎮痛物質 オピオイド受容体 がん細胞培養上清 内因性鎮痛ペプチド がん性疼痛 難治性疼痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、鎮痛薬が奏効しない、難治性疼痛（神経因性疼痛）が注目されており、従来の鎮痛薬とは作用機序の異なった副作用の少ない新しい治療薬・治療法の開発が待たれている。このような情勢の中、膵臓がんモデル動物において麻薬拮抗薬の **naloxone** 全身投与により、「がん性疼痛」の発現時期が著しく早まることが示された(Mantyh PW, *Nat Rev Neurosci*, 2006)。「がん」細胞自身が未知の内因性鎮痛物質或いは鎮痛関連物質を分泌して疼痛を抑制している可能性が考えられる。申請者らも、がん細胞の培養上清に著明な鎮痛効果を見出し、本物質はペプチド性生理活性物質と考えられ、血液脳関門を通過し **MOP(μ)** 受容体に作用して、鎮痛効果を現すことを明らかにし、がん細胞が産生する液性物質が、直接オピオイド受容体を活性化する、或いは間接的にオピオイド作動性神経を活性化して、疼痛の下降性抑制系を強化して疼痛を抑制しているとの発想に至った。

μ オピオイド受容体のアゴニストは有効な鎮痛薬であるものの、有害な作用のため臨床における使用が制限される場合も多い。中毒及び呼吸不全などのリスクを低減するために、ベネフィットを維持しながらリスクを避けるために新しい鎮痛薬の開発が求められている。近年、 μ 受容体- β アレスチン経路（副作用をもたらず）と **G** タンパクを介したシグナル伝達系（鎮痛をもたらず）が明らかとなり、活性化が後者に偏ったバイアス・リガンドとして開発された **TRV130** や **PZM21**、ノシセプチン受容体及び μ 受容体の両者に部分アゴニスト活性を持つ **AT-121**、更にエンケファリンの分解を阻害するペプチドとして唾液腺から単離されたオピオルフィン、これらはモルヒネと同等或いはそれ以上の鎮痛効果を持つにもかかわらず、副作用の面でもモルヒネより優れた理想的な鎮痛薬として世界的に注目されている。申請者らの発見した内因性鎮痛ペプチドも上記化合物と同様の性質を持っている。これが人間でも確認されれば、ブロックバスターになる可能性は多分にある。

2. 研究の目的

本研究は「がん」細胞自身が未知の内因性鎮痛物質或いは鎮痛関連物質の分泌を介してオピオイド作動性神経活性を亢進し、痛覚の下降性抑制系を賦活して、その強力な鎮痛作用でがん性疼痛を抑制しており、疼痛刺激がこの抑制能力を超えて発生することではじめて難治性がん性疼痛が発現するのではないかという独自の発想に基づき、新規鎮痛関連物質の探索・同定を世界に先駆けて行おうとするものである。

がん性疼痛の成り立ちは複雑で、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、情動や感情が影響し、それらが病状の経過と共に複雑に変化する。本機能分子ががん性疼痛に有効であれば、ターミナルケアにおける重要な薬剤としても位置付けられることが期待されると共に、原因の異なる種々な疼痛に対して普遍的に有効な新しい治療法と安全な新規鎮痛薬の開発をめざした、新たな治療戦略を構築する基盤を与えるものである。

3. 研究の方法

試験薬物：薬物は生理食塩水または ACSF に溶解した。6-hydroxydopamine (6-OHDA) および 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) は 0.02% ascorbic acid 含有生理食塩水に溶解した。薬物は静脈内投与 (i.v.投与) あるいは脊髄くも膜下腔内投与 (i.t.投与) した。i.t.投与は isoflurane 麻酔下にマウスの第 5、第 6 腰椎間から薬物 5 μ l をゆっくり投与した。

試料の溶液の調整

細胞培養上清の調整：80-90% コンフルエントに培養したがん細胞を DMEM (ウシ胎児血清不含) で洗浄後、新鮮な DMEM (ウシ胎児血清不含) で 12 時間培養した培養液を 200 x g, 3 分間遠心分離した上清を細胞培養上清とし、限外ろ過により分画分子量 3,000 ~ 10,000 のフラクションを試料溶液とした。資料は使用時まで -80 °C で保存し、適宜生理食塩水で希釈して使用した。

実験動物：実験には 6 週齢、ddY 系雄性マウス (30~40 g)、C3H/HeN 系雄性マウス (25~30 g) 及び Wister 系雄性ラットを用い、室温 22 ± 1 °C、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクルの環境下で飼育した。動物の取り扱いは全て日本薬理学会動物取り扱いガイドラインおよび広島大学動物取り扱いガイドラインに準拠して行った。研究は観察者に処置群を判別できない環境下でおこなった。短期間で体重の著しい減少 (20% 以上)、或いは、摂水や摂食が困難となり衰弱の著しいマウスは、苦痛軽減をはかるため、安楽死処置した。マウスは 1 回の実験にのみ使用した。

実験的疼痛モデルの作製

坐骨神経部分結紮 (PSNL) モデル：マウスを麻酔下に坐骨神経を培出し、絹糸を用いて 1/2~1/3 をきつく結紮して作製した。

Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病性 painful neuropathy モデル：STZ (200 mg/kg) をマウス尾静脈から i.v.投与した。血中 glucose 濃度が 400 mg/dl 以上で糖尿病モデルマウスとして使用した。

Complete Freund's Adjuvant (CFA) 誘発慢性炎症性疼痛モデル：麻酔下に CFA (20 μ l) をマウス足蹠へ皮下投与することにより形成した。対照群にはミネラルオイル 20 μ l を皮下投与した。

マウス大腿骨がん (FBC) モデル：FBC モデルは C3H/HeN マウス左大腿骨骨髓内に骨溶解性肉腫細胞 NCTC 2472 を移植して作製した。

慢性及び難治性疼痛強度の評価：疼痛の重篤度は以下の ~ で評価した。

アロディニアスコア；ペイントブラシで軽く撫でる触覚刺激に対する逃避行動(疼痛関連行動)の程度をスコア化して評価した。**アロディニア閾値**；von Frey hairs フィラメントによる患肢足蹠刺激に対するマウス後足の逃避行動閾値より評価した。**Guarding behavior** (安静時に患肢を持ち上げる行動)；マウスを金網底のプラスチックケージ内で自由に行動させ、2分間の観察中に患肢の防御行動、即ち、患肢を床から持ち上げている時間を測定して評価した。**Limb-use abnormality** (体動時に患肢を不自然に使う行動)；マウスの歩行異常の程度をスコア化して評価した。

侵害受容性疼痛、急性炎症性疼痛の評価

Formalin test: マウス足蹠に formalin (1.5% in saline, 20 μ l)を皮下投与し、自発痛によって生じる行動(licking, flinching, lifting, biting, guarding, shaking)の行動回数を解析した。**酢酸 writhing test**：0.6%酢酸溶液を腹腔内投与(10 ml/kg)し、30分間のライジング反応回数を5分間隔で測定した。**Tail immersion test**: マウスの尾を48 $^{\circ}$ の温水につけて、尾が反応するまでの潜時を測定した。組織ダメージを最小限に控えるためオフセットタイムを15秒とした。**Hot plate test**: 52 $^{\circ}$ の熱板上にマウスを置き、熱刺激に対する逃避反応までの潜時を測定した。オフセットタイムを15秒とした。**Tail flick test**: 実験動物の尾に注射熱刺激を加え、尾を振り動かす反射を指標として、逃避反射の潜時を測定した。オフセットタイムを10秒とした。**Tail pinch test**：マウスの尾をクレンメで挟んだ際に尾を振ったり舐めたりする行動から評価した。

実験動物のバイタル及び一般行動、依存・耐性の獲得評価

以下の方法により検証した。なお、麻酔下(イソフルラン麻酔)の実験では、体温低下によるバイタルの変動を抑えるため加温マットにより動物を保温した。

呼吸数：胸部側壁に直径15 mmのタンブールを装着して呼吸による胸廓運動の圧変化をトランスデューサーに導いて電気変換し、1分間値として求めた。**血圧**:頸動脈にカニキュレーションし、直接法により測定した。**心拍数**：電極を右前肢、左後肢皮下に、生体アース電極を腰部の皮下に装着して標準肢誘導から誘導した心電図のR棘数から1分間値として求めた。

体温：直腸温を直腸プローブを用いて計測した。**自発運動試験**：ビームセンサー式自発運動測定装置を用いて計測した。**協調運動性**：ロータロッド試験で評価した。**耐性**：最大鎮痛効果が得られる容量の当該物質を1日1回7日間連続投与した後、tail flick test および formalin test で抗侵害受容効果に対する有意な耐性の発現を評価した。**身体依存**：モルヒネ依存マウスにナロキソンの腹腔内投与により誘発される典型的な禁断症状の一つである jumping について観察した(naloxone による退薬症候誘発試験)。**精神依存**：条件付け場所嗜好性試験で現在検証中である。**搔痒感**：ひっかき行動の回数をもとに評価した。**便秘**：モルヒネ投与による便秘を脱糞量の減少、および肛門括約筋と膀胱括約筋の収縮により生じるマウスの挙尾反応の亢進によって評価した。マウスをテストケージの中で順化させた。薬物投与後に脱糞量と挙尾反応の有無について観察した。1時間の脱糞量をマウスの体重で補正した。挙尾反応は実験時間中に尾を45 $^{\circ}$ 以上に挙上したマウスの割合で評価した。

下降性疼痛抑制系の関与評価

当該物質の鎮痛作用に下降性疼痛抑制系の賦活が関与するかを検討する目的で、神経毒を用いて脊髄ノルアドレナリン神経終末及びセロトニン神経終末を破壊したマウスを作製し、当該物質の静脈内投与による鎮痛作用に及ぼす影響から検証した。

脊髄ノルアドレナリン神経終末の破壊は6-OHDA (20 μ g/5 μ l)をi.t.投与し、3日後に実験に供した。脊髄セロトニン神経終末の破壊は5,7-DHT (50 μ g/5 μ l)をi.t.投与した。ノルアドレナリン神経終末への5,7-DHTの非特異的取り込みを阻害するために desipramine (25 mg/kg)を5,7-DHT投与30分前に前処置した。5,7-DHT投与3日後に実験に供した。

6-OHDA 処置により脊髄 NA 含量は90%以上低下した。5HT 含量には影響しなかった。5,7-DHT 処置により脊髄 5HT 含量は95%前後、NA 含量は10%前後低下した。

当該内因性鎮痛物質の代謝

摘出した脳および脊髄の細胞分画を調整し、各フラクションに培養上清標品を添加、37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベーションした後反応液を限外ろ過による deproteinization を行い分画分子量3,000~10,000のフラクションを試料溶液とした。代謝酵素活性は鎮痛効果から評価した。

4. 研究成果

慢性炎症性疼痛モデル、急性炎症性モデルでの効果

当該物質の全身投与はCFA誘発慢性炎症性疼痛モデル及びSTZ誘発糖尿病性 painful neuropathy モデル、formalin test (急性炎症性疼痛モデル)、tail flick test, tail immersion test (侵害受容性疼痛モデル)脊髄反射を介した逃避反射、hot plate test, plantar test (侵害受容性疼痛モデル)上位中枢を介した逃避行動でもnaloxone感受性の強力な鎮痛作用を示した。同様にがん細胞移植マウスにおいても偽手術を行ったマウスと比較し、tail flick test, hot plate test, tail immersion test

及び formalin test において強い鎮痛効果を示した。神経障害性疼痛モデルや CFA 誘発慢性炎症モデル動物にがん細胞を移植しても強い鎮痛効果を発揮した、実験は手術侵襲による侵害性疼痛がなくなる3日後に行った。ラット坐骨神経部分結紮モデルでも鎮痛作用を惹起した。

がん細胞は自ら未知の内因性鎮痛物質を分泌して疼痛を制御しており、がん性疼痛は疼痛刺激が当該物質の鎮痛作用に打ち勝つことにより発症することが示唆され、このことががん性疼痛にオピオイド等既存の鎮痛薬が奏功しない所以と考えられる。

下降性疼痛抑制系の関与

当該物質が中枢神経系の μ オピオイド受容体に作用して強力な鎮痛作用を惹起することを明らかにしている。そこで下降性疼痛抑制系の関与について検証した。

脊髄ノルアドレナリン神経終末およびセロトニン神経終末を6-OHDA および5,7-DHT 脊髄腔内投与することにより枯渇させた。これらの処置単独ではホルマリンテストに差異は見られなかったが、モルヒネ及び当該物質の全身投与による鎮痛効果を抑制したことから、当該物質が下降性疼痛抑制系を賦活して作用していることが明らかになった。本ペプチドが新しい内因性オピオイドペプチドである可能性が考えられる。

部分精製：

ヒト μ 受容体(MOP)発現 HEK239 細胞および HEK239 細胞(Mock)より MPL(膜タンパク質ライブラリ, membrane protein library) を作製し、MPL とがん細胞培養上清濃縮物を結合させ、溶出液を調製した (Protosera 社に委託)。

MPL solution は上清濃縮液から得られえた溶出液乾固物を 0.5 ml 生理食塩水に溶解後 5 ml/kg i.v. で投与した。MOP_MPL 溶液投与により、72 時間前後持続する強力な抗アロディニア作用を認めた。本作用は naloxone methiodide では抑制されず、naloxone HCl で完全に消失した。MOP_MPL 溶出液に標的ペプチドが部分精製されていることが明らかになった。

内因性鎮痛物質の同定

MOP_MPL 溶液投与を MALDI-MS/MS 解析による低分子量領域のプロファイリング及び MOP_MPL と Mock_MPL の差分ピークの特定から同定を試みているが、時間を要している現状である。当該物質は血液脳関門を通過できることから、静脈内投与した後脳脊髄液中に増加する成分の解析を行っているが、採取時に血液の混入が避けられず、同定に行き詰っている。現在、血液脳関門 *in vitro* 再構成モデルを構築し、問題の解決の糸口を検証している。

以上のことから、本来計画していた合成ペプチドを用いた研究は遂行出来ていない。このため、培養上清或いは部分精製品を用いて副作用/耐性、依存形成の有無、代謝等の解析を行った。

バイタル及び耐性、依存形成に対する作用

モルヒネ等のオピオイド系鎮痛薬で問題となる副作用に便秘、嘔吐、眠気、体の不安感、錯乱、発汗、ミオクロヌス、狡猾、うつ状態、及び身体依存、耐性、精神依存などがある。更にオピオイド鎮痛薬を反復投与すると痛覚の過敏や耐性・搔痒感を生じることも知られている。当該物質の臨床応用を視野に副作用、耐性・依存形成などについて行動薬理的に検証した。

- ・モルヒネ(10 mg/kg)皮下投与したマウスの著しい呼吸抑制とは対照的に鎮痛有効の濃度当該物質投与では呼吸がほぼ維持された。心拍数、血圧、体温に影響を及ぼさず、更にその 10~20 倍の用量を投与してもこれらのバイタルには殆ど影響しなかった。

- ・オープンフィールドを使用した、一般行動試験では、マウスの運動量は正常であり、活動亢進効果(モルヒネ投与時に見られる)も沈静作用も顕著な誘導しなかった。また、ロータロッド試験では、当該物質は筋弛緩や協調運動には影響しなかった。

- ・モルヒネやブプレノルフィンの全身投与は1時間後からひっかき行動がみられたが、当該物質の全身投与ではひっかき行動は見られなかった。連続投与による痛覚過敏も誘導しなかった。

- ・1日1回、7日間にわたる繰り返し投与では、モルヒネとは異なり、マウスの tail flick test および formalin test で抗侵害受容効果に対する有意な耐性を誘導しなかった。

- ・身体的依存について、naloxone による退薬症候誘発試験をおこなった。モルヒネ依存マウスに naloxone 投与により誘発される典型的な禁断症状の一つである jumping について観察した。有効鎮痛量の繰り返し投与において、有意な身体依存性を発生させなかった。

- ・モルヒネやペンタゾシンとは異なり、ペントバルビタール誘導睡眠を有意に延長させなかった。

このことはがん細胞移植動物と偽手術動物を比較してもバイタルに有意な差異が認められないこと。がん細胞移植動物で便秘や搔痒感、一般行動の変化も殆どなく、鎮痛効果の減弱がないことから支持される。

この様に、当該物質の全身投与により運動量・運動の協調性は正常であり、モルヒネの臨床応用上の問題となる便秘や搔痒感も殆どなかった。また長期使用でも、痛覚過敏や鎮痛耐性の形成および身体依存の発現も僅かであり、モルヒネなどの典型的なオピオイド鎮痛薬とは異なる性質をもつことが示された。精神依存については、検証中である。

特異的代謝酵素の検索

当該物質が生体内でも産生されることが明らかになれば、本ペプチドの産生・代謝をターゲッ

トとした、新しい疼痛緩和療法の可能性も考えられる。脊髄後角は痛みを伝える末梢神経の中
枢側終末が多く存在し、エンドルフィン等の内因性オピオイドペプチドやオピオイド受容体が
最も高密度で存在する部位でもある。脳および脊髄の細胞分画を作成し、当該物質の代謝活性
について検証した。

脳および脊髄の細胞分画の代謝活性を調べると、可溶性画分>シナプトソーム画分>ミクロ
ゾーム画分の順で当該物質を分解する酵素活性が存在することを明らかにした。

現在、シナプトソーム画分を用い、当該鎮痛ペプチドの分解を阻害する各種ペプチダーゼ阻
害薬の作用から、代謝酵素の同定を急いでいる。

内在性制御ペプチドの濃度を変化させることの主要な利点は、薬理作用が本来のリガンドに
より活性化される受容体部位のみで誘導されること、そして特定の環境、行動及び生理病理学
的ストレスのある状況で起る緊張又は刺激作動性のそれらの放出に依存することである。この
ため、作用は調節系の範囲から逸脱せず、調節系を飽和状態にすることはできない。よって、
有害作用を有さず、有していたとしてもわずかである。

当該物質はモルヒネ投与で問題となる耐性の獲得および便秘や呼吸抑制等の副作用や一般症
状の変化は認められないこと等を明らかにし、生体内鎮痛物質として新規鎮痛薬開発のシーズ
となることが期待される。当該物質は μ 受容体に強く作用し、Gタンパクを介したシグナル伝
達系(鎮痛をもたらす)に偏って活性化をもたらし、 β アレスチン経路(副作用をもたらす)
には殆ど作用しないバイアス・リガンドとして理想的な鎮痛薬が開発できる可能性を示唆した。

本研究では当該物質の同定はまだ出来ていない、同定でき次第合成ペプチドを作成し、本実
験の結果に基づき、迅速な本格的な研究を遂行することで、原因の異なる種々な難治性疼痛に対
して普遍的に有効な新しい疼痛治療法と安全な新規鎮痛薬開発の礎を構築し、新たな治療戦略
の開拓が可能となるものと期待される。新規ペプチドの生合成、代謝、受容体を標的とした創
薬ストラテジーを提供するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kitayama T, Morita K, Motoyama N and Dohi T. Down-regulation of zinc transporter-1 in astrocytes
induces neuropathic pain via the brain-derived neurotrophic factor - K^+ - Cl^- co-transporter-2 signaling
pathway in the mouse spinal cord. *Neurochem Int.* 101:120-131, 2016. doi: 10.1016/j.neuint.2016.11.001.
査読あり/謝辞記載あり

〔学会発表〕(計 9 件)

1) Motoyama N, Morita K, Asano S, Jodo Y, Shigaki M, Sanai M and Dohi T. Secreted extracellular miRNA,
Let-7b-5p causes neuropathic pain via TLR7 in peripheral nerve injury. 18th World congress of basic and clinical
pharmacology (Kyoto). 2018.7. 1-6.

2) Morita K, Motoyama N, Kitayama T, Sanai M, Hashimoto M, Tsuchii A, Kato K, Kawai Y and Dohi T. Role
of spinal LPCAT2, an inducible PAF synthesis enzyme on development and maintenance of painful peripheral
neuropathy models in mice. 18th World congress of basic and clinical pharmacology (Kyoto). 2018.7. 1-6.

3) Morita K, Motoyama N and Dohi T. Extracellular miRNA causes neuropathic pain via spinal TLR7 in
peripheral nerve injury. The 90th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. (Nagasaki) 2017.3.
15-17.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：本山 直世
ローマ字氏名：MOTOYAMA NAOYO
所属研究機関名：広島大学
部局名：医歯薬保健学研究科(歯)
職名：助教
研究者番号(8桁)：70509661

研究分担者氏名：北山 友也
ローマ字氏名：KITAYAMA TOMOYA
所属研究機関名：武庫川女子大学
部局名：薬学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：60363082

研究分担者氏名：土肥 敏博
ローマ字氏名：DOHI TOSHIHIRO
所属研究機関名：広島文化学園大学
部局名：看護学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：00034182

研究分担者氏名：尾野 雅哉
ローマ字氏名：ONO MASAYA
所属研究機関名：国立研究開発法人国立が
ん研究センター
部局名：研究所
職名：研究員
研究者番号(8桁)：00270900

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等
については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。