

令和元年5月30日現在

機関番号：35303
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K15683
 研究課題名(和文) 癌性疼痛患者における全身の痛覚過敏性亢進の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of Systemic allgesia in cancer pain

研究代表者

中塚 秀輝 (NAKATSUKA, HIDEKI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：70263580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢からの痛み伝達を制御している後根神経節内のBDNF(脳由来神経栄養因子)は、脊髄中の二次ニューロンに存在する特異的受容体TrkB-1を介して痛みを中枢へ伝達している。リン酸化ドメインのないTrkB-2(TrkB-isoform2)を用いてBDNF結合を競争的に阻害すれば鎮痛効果が期待できる、と考え発現ベクターを設計し、脊髄くも膜下腔に投与した結果、鎮痛効果を得た。しかしベクター投与自体が体重減少など細胞毒性を引き起こし、ベクターDNAの代わりに発現ベクターをもとに人工的に作成したTrkB-2タンパクを投与した結果、細胞毒性を起こさず、鎮痛効果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌性疼痛や神経障害性疼痛の治療は極めて難渋しており、薬物投与(モルヒネ、ANA-12など)によって一時的に(24時間以内)鎮痛を得ることは可能であるが中、長期にわたって鎮痛効果を得ることは困難である。したがって一回の投与で鎮痛が4～5日間持続すれば患者の負担が軽減される。

研究成果の概要(英文)：Tropomyosin-related tyrosine kinase B (TrkB) is the receptor for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and one of TrkB receptors (TrkB isoform1) gets tyrosine kinase(tk) domain. The other isoform without tk domain (isoform 2) competitively block the binding of BDNF to isoform1.

Expression vector constructed of [TrkB-isoform2 gene-GFP gene-Tag] was administered to pain model rat induced by spinal nerve ligation. Pain suppressive effect of the vector assessed by von Frey tests was observed. But expression vector is toxic effect on animals. The protein synthesized using the expression vector was administered to rat model, analgesic effects was observed without vector toxicity.

研究分野：麻酔・集中治療医学

キーワード：神経障害性疼痛モデル BDNF TrkB-isoform1 TrkB-isoform2 組み換えタンパク

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

1. 研究開始当初の背景

骨転移癌による疼痛発現メカニズムは不明な点が多く、積極的疼痛緩和に難渋している。我々はラットの脛骨骨髓にMRMT-1細胞(ラット乳癌細胞)を投与し、骨転移癌性疼痛モデルを作製し、神経栄養因子と疼痛発現の関連を報告してきた(Kawasaki Medical Journal 43(2):107~120, 2017)。これまでの研究で判明したことは、骨転移モデル作製後、von Freyテストによる疼痛評価を行うと、正常のラットと比較し患側の足底部の疼痛過敏性が亢進するとともに、健側の足底部の疼痛過敏性も亢進していることが分かった。さらに、3週間経過した時点で脛骨の骨髓(腫瘍部分)を採取し、RT-PCRを行いBDNF mRNAを定量すると患側骨髓でBDNFの量は増加しており、さらに健側骨髓でもBDNFの増加が認められた。このことから癌性疼痛に起因する全身の疼痛過敏にBDNF-TrkBの経路が関与していると仮説をたてた。

TrkBには細胞内リン酸化ドメインを持つものとリン酸化ドメインを持たないもの

(TrkB-isoform2:以下TrkB-2と略)の2種類が存在する。TrkB-2の生理的役割は不明であるが、TrkB-2はリン酸化ドメインが欠失しており、BDNFを補足する能力を有するにもかかわらずシグナル伝達ができない構造を持っている(Mol Cell Biol,1991)。TrkB-2発現ベクターもしくはTrkB-2タンパクを血中、脊髄くも膜下腔に投与することで局所の疼痛過敏のみならず全身の疼痛過敏を抑制する効果が期待される。

2. 研究の目的

脳由来神経栄養因子(BDNF)は神経系の正常な初期発生に不可欠の因子であるが、「痛み」伝達に関する役割は完全には解明されていない。G.R.Lewinら(2014)は癌性疼痛にBDNFとその特異的受容体であるTrkBの経路が関与していることを示した。一方、癌性疼痛を有する患者が全身の疼痛過敏を訴えることはしばしばあるがその原因は不明である。我々はBDNF-TrkBによる疼痛伝達の経路が局所の疼痛に加えて全身の疼痛過敏に関与している可能性を示唆するデータを得ている。本研究の目的は癌性疼痛の過敏性亢進の機序にBDNF-TrkBの経路がいかなる機序で関与しているかを明らかにし、その経路を抑制することで癌性疼痛患者のQOLの改善につなげることである。

3. 研究の方法

GFP遺伝子を導入した発現ベクター(pCMV-TrkB(2)-GFP-FLAG-S-tag)をMRMT-1細胞にトランスフェクトし、安定的にGFPを発現している細胞を選ぶ。この細胞をラット脛骨近位端骨髓に注入し骨転移癌性疼痛モデルを作製する。MRMT-1細胞移植後1週目、2週目、3週目にvon Frey testによる疼痛評価を行った後、ラットの両側脛骨骨髓、血液を取り出し、PCR法でBDNF mRNAを測定する。また取り出した両側脛骨を4%パラフォルムアルデヒドで固定を行い、脛骨周辺組織を除去し、10%EDTA溶液で脱灰処理後20 μ m厚の切片を作製する。疼痛評価、mRNA量、組織切片のGFP陽性細胞の割合からがんの進行度を評価する。さらにマイクロCTで健常ラット(MRMT-1のかわりに同量の生食を投与または無処理のまま、3週間おいたもの)と比較する。

TrkBはBDNFの受容体であるが、シグナル伝達機能を有する受容体のほかに細胞内リン酸化ドメインのないTrkB-2が知られている。このTrkB-2タンパクを作製し、骨転移癌性疼痛モデルラットの脊髄くも膜下にカテーテルを用いて、このタンパクを注入する。もしくはラット尾静脈を確保し血管内への投与を行う。これらの処置による疼痛抑制効果を観察する。

しかし癌性疼痛を引き起こす要因は複雑であり、痛み研究のうちで特に末梢神経系で比較的説明が進んでいる神経障害性疼痛モデルで得られた従来の知見をもとに、TrkB-2 遺伝子（ベクター、タンパク）の関与に関して実験を行った。

4. 研究成果

癌性疼痛モデルでは TrkB-2 ベクターを用いると痛みの抑制効果が得られた（Kawasaki Medical Journal 43(2):107-120, 2017）。この機序をさらに確認するために神経障害性疼痛モデルラットの脊髄へ TrkB-2 ベクターを投与した結果、疼痛閾値の改善がみられた（図1）。

ベクター投与後にラットの脊髄（L3-L5）を採取しベクターに添付した GFP をターゲットに PCR を行うと投与後 2 日目で発現量が増加し、その後 5 日目、7 日目と低下した（図2）。この GFP の発現の推移は von Frey test の結果と矛盾しない。

さらに神経障害性疼痛モデルラットに作成した TrkB-2 タンパクを投与したところ疼痛閾値の改善を認めた（図3）。

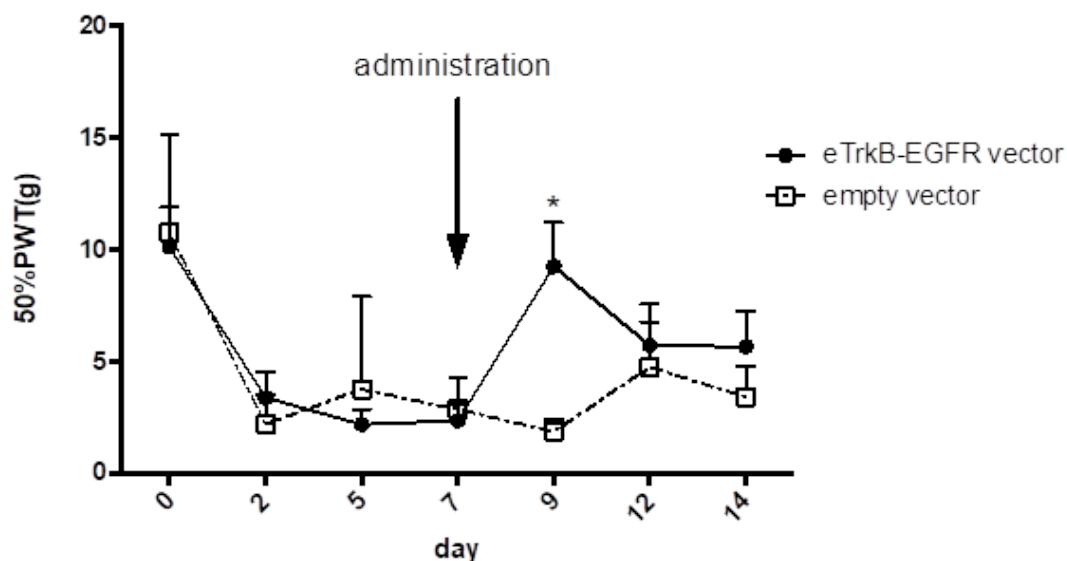


図1 day7 に TrkB-2 ベクターを投与。day9 で疼痛閾値の改善を認めた。

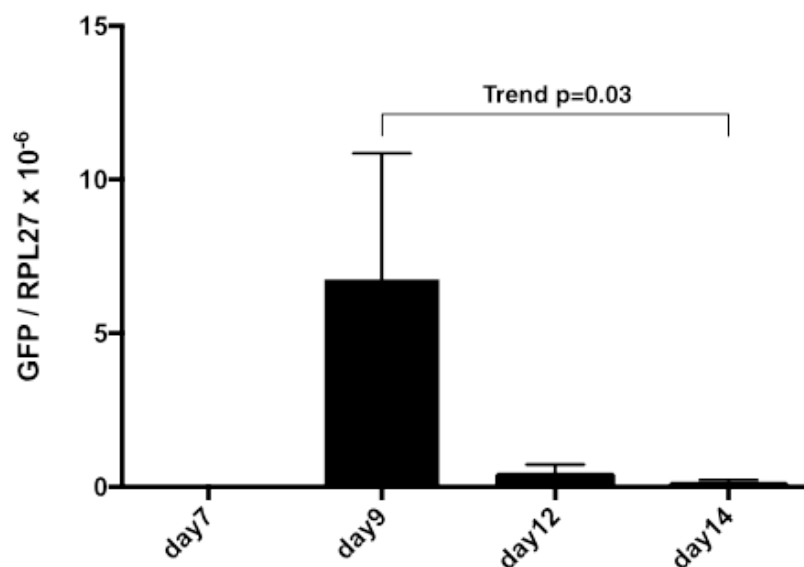


図2 投与後 2 日目（day9）で GFP の発現量増加を認めた。

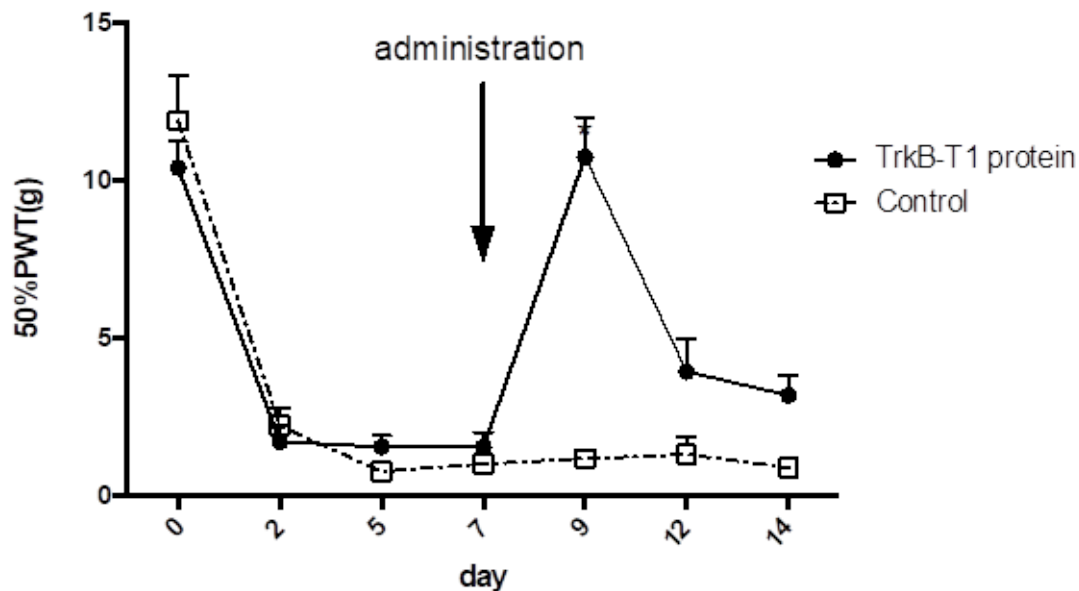


図3 day7にTrkB-2タンパクを投与。day9で疼痛閾値の改善がみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Keita Hazama, Kae Ikeda, Masatsugu Tsuge, Yoshitaro Itano, Mamoru Ouchida, Hideki Nakatsuka, Novel analgesics targeting brain-derived neurotrophic factor for neuropathic pain, *Kawasaki Medical Journal*, 44(2) 2018, pp.41-52
DOI:10.11482/KMJ-E44(2)41h

Masatsugu Tsuge, Keita Hazama, hirotaka Kanzaki, Yoshitaro Itano, Kyoichiro Maeshima, Mamoru Ouchida, Hideki Nakatsuka, Development of a novel analgesic pain targeting brain-derived neurotrophic factor, *Kawasaki Medical Journal*, 43(2) 2017, pp.107-120
DOI:10.11482/KMJ-E43(2)107

〔学会発表〕(計 2 件)

羽間恵太、柘植雅嗣、中塚秀輝 神経栄養因子を介した神経障害性疼痛に対する新たな治療戦略、日本麻酔科学会第64回学術集会、神戸ポートピアホテル(神戸) 2017. 6. 9

Keita Hazama, Hideki Nakatsuka, New analgesia of neuropathic pain through neurotrophic factor., *American Society of Anesthesiologists*, Boston(USA), 2017.10.21

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 疼痛治療剤

発明者: 中塚秀輝、板野義太郎、羽間恵太、池田佳恵、三棹聡美、大内田守

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2018-150847 号

出願年: 平成30年

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：前島 亨一郎
ローマ字氏名：(MAESHIMA, kyoichiro)
所属研究機関名：川崎医科大学
部局名：麻酔・集中治療医学
職名：准教授
研究者番号：20549852

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：羽間 恵太
ローマ字氏名：(HAZAMA, keita)

研究協力者氏名：板野 義太郎
ローマ字氏名：(ITANO, yoshitaro)

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。