

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791379

研究課題名 (和文) 低線量放射線照射による癌性骨痛の緩和メカニズムの解明

研究課題名 (英文) The analgesic mechanism of low dose irradiation on the cancer-induced bone pain

研究代表者

中西 雅子 (NAKANISHI MASAKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員

研究者番号：60437382

研究成果の概要：骨転移の動物モデルを作製し疼痛行動を検討したところ、腫瘍増殖ならびに骨融解の進展に伴って、患肢の挙上行動および機械刺激に対する痛覚過敏を認めた。低線量放射線照射による除痛効果は、病変進展のコントロールと照射のタイミングが困難であり、さらに詳細な検討が必要とされた。培養神経細胞を用いた実験から、酸による刺激は転写因子 CREB の活性化を介して神経伝達物質 CGRP の発現を制御することが示され、疼痛発生における酸性環境の関与が確認できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	270,000	2,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

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

(1) 癌による疼痛の発生は、癌と診断された時点における患者の約 30%、進行癌および末期癌患者の 70%以上に生じるとされており、病気のステージにかかわらず多くの癌患者にとって多大な苦しみをもたらす。特に、痛みの原発部位として最も頻度が高いのは骨であり、そのほとんどが癌の骨転移に合併してみられると報告されていることから、癌性

骨痛の発生機序の解明は患者の QOL 改善のために必須であると言える。

(2) 従来、放射線照射は、骨転移に伴う疼痛の緩和に有用な対処法として臨床的によく用いられている。興味あることに、低線量 (8Gy) を照射した場合と高線量 (20-30Gy) を照射した場合のいずれも同程度に疼痛が減少し、かつ、長期にわたり効果の持続が示されている。しかしながら、このような照射に

よる疼痛の緩和効果のメカニズムについては、ほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

癌患者に対する放射線療法において、軟部組織の腫瘍では、照射による腫瘍の縮小と疼痛の緩和に相関が認められるが、骨転移に対する照射は即効性が高く、また、腫瘍の縮小とは相関しないため、軟部腫瘍とは異なる疼痛メカニズムが存在する可能性がある。したがって本研究課題では、低線量の放射線照射による除痛効果の解析と、骨転移に特異的な疼痛の発生機序に着目し、以下の項目について検討することとした。

(1) ラットを用いた癌性骨痛モデルを作製し、放射線照射の影響について in vivo での検討を行う。

(2) 癌性骨痛モデルにおいて、骨および神経系における疼痛関連因子の動きを病理学的・分子生物学的に解析する。

(3) 破骨細胞や神経細胞の培養系を用い、疼痛の発生メカニズムならびに放射線照射による機能変化について in vitro で検討する。

3. 研究の方法

(1) 癌性骨痛モデルを用いた放射線照射の疼痛緩和効果の解析

ラット肺腺癌株(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。レントゲン検査により腫瘍の増大ならびに骨融解を確認し、脛骨に局限した放射線照射(8Gy あるいは 20Gy)を行った。疼痛は、以下の行動学的指標により患側・健側それぞれについて経時的に評価した。

① Plantar test (足底に熱刺激を与えて逃避反応までの時間を測定し、熱性痛覚過敏を判定)

② Grip force test (疼痛に伴う後肢の握力低下を測定)

③ von Frey test (足底にフィラメントによる機械刺激を与え、逃避反応を起こす閾値を評価)

④ Paw pressure test (一定の速度で連続的に増加する圧を与え、逃避閾値を測定)

⑤ Incapacitance test (左右の後肢にかかる体重の負荷を測定)

⑥ Guarding test (一定時間内における後肢の挙上行動を測定)

(2) 癌性骨痛モデルにおける骨および神経系(脊髄ならびに後根神経節)の評価

① 骨・脊髄・後根神経節における疼痛関連分子の発現について、組織学的に検討した。

② 患側および健側それぞれの後根神経節から mRNA を抽出し、疼痛関連分子の発現を検討した。

(3) 培養細胞を用いた、疼痛発生メカニズムの検討

① マウス脾臓細胞から破骨細胞を誘導し、放射線照射による影響について検討した。

② マウスおよびラットの後根神経節から、器官培養系あるいは初代培養系を樹立し、疼痛関連分子の発現について検討した。

4. 研究成果

(1) 癌性骨痛モデルの病態解析

① 腫瘍移植後 10 日頃より、脛骨における骨融解像がレントゲンの確認された (Fig. 1)。12 日目に 8Gy あるいは 20Gy の放射線照射を施し、その後の経過を観察したが照射群・非照射群とも同様に骨融解像の増大を認めた。



② 行動学的評価において、Plantar test ならびに Grip force test による評価は疼痛が検出できなかった。von Frey test では、13 日以降から患肢の機械刺激性痛覚過敏が認められた (Fig. 2) が、放射線照射による除痛効果は顕著ではなかった。

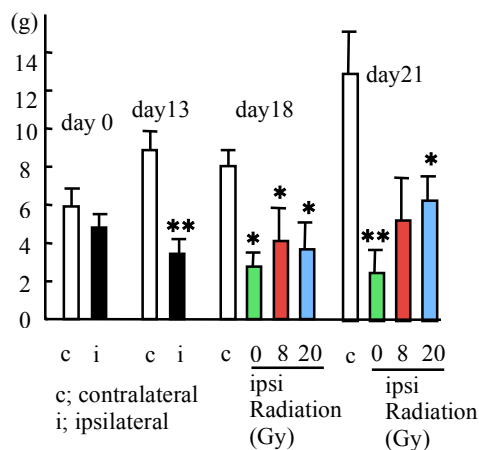


Fig. 2 Paw withdrawal threshold on the von Frey test.

さらに、Paw pressure test においても患側の機械刺激性痛覚過敏が認められたが (Fig. 3)、放射線照射による疼痛緩和効果は認められなかった。

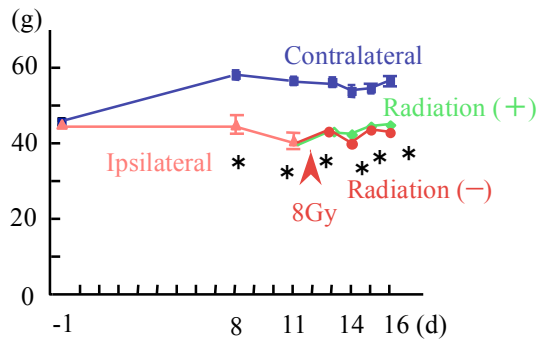
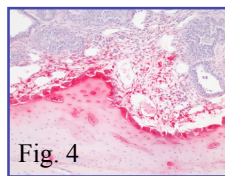


Fig. 3 Paw withdrawal threshold on the pressure test.

放射線照射による疼痛の緩和効果が確認できなかった要因として、疼痛行動が出現してくる病変後期ステージでは、著しい腫瘍増殖とそれに伴う病的骨折が生じており、緩和効果の検出限界を超えた状態であったことが推察される。今後、病変の進展をコントロールし、照射のタイミングについても詳細に検討する必要がある。

(2) 癌性骨痛モデルにおける疼痛関連分子の発現

① 脛骨内は増殖した腫瘍細胞によって置換されており、活性化した破骨細胞が多数認められた (Fig. 4)。放射線照射群・非照射群における相違は観察されなかった。



両群において腫瘍組織内には広範な壊死巣が散在し、炎症細胞の浸潤が認められた。著明な骨融解ならびにこれらの所見を併せると、腫瘍組織の微小環境は酸性状態を示していることが考えられる。そこで、骨転移痛の発生における酸性環境の関わりについて検討を加えた。

② 後肢に分布する感覚神経の後根神経節を用い、酸感受性受容体である TRPV1 と ASIC の発現について検討した。免疫染色により、痛覚神経マーカーである CGRP と TRPV1 あるいは ASIC の共局在が確認された (Fig. 5)。これらの発現細胞数には変化が認められなかったが (Fig. 6)、mRNA の発現は患側で増加する傾向が得られ、疼痛発生への関与が示唆された。

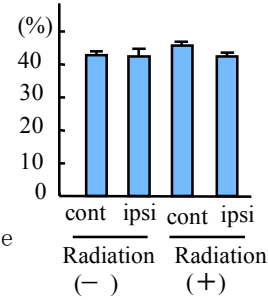
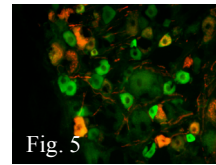


Fig. 6 The percentage of TRPV1 positive neuron.

(3) 培養細胞を用いた疼痛関連因子の解析

① マウスの脾臓から破骨細胞を分化誘導し、培養 2 日目あるいは 5 日目に 8Gy の放射線照射を行ったが、破骨細胞形成に有意な差は認められなかった (Fig. 7)。

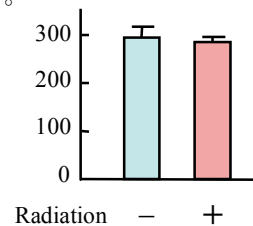
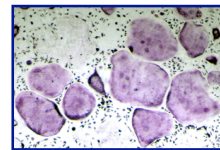


Fig. 7 Osteoclast formation.

② マウスあるいはラットの後根神経節から器官培養あるいは初代培養を行い、酸刺激による変化を検討した。その結果、神経細胞に対する酸刺激は、転写因子 CREB の活性化を介して CGRP mRNA の発現を増加させること、また、その経路には TRPV1 が関与していることが示唆された。

低線量の放射線照射は、腫瘍細胞の増殖に対して影響を与えない。また、破骨細胞や神経細胞においても数的な変化は生じないことが示唆された。おそらく、局所における疼痛関連因子の発現あるいは機能に変化を起させることで、疼痛緩和効果を生み出しているのではないかと考えられる。本研究における骨転移モデルでは、溶骨性が著しく、また病変の進展も早かったことから、放射線の影響が捉えられなかった可能性がある。臨床的に骨転移は進行が緩やかであり、症状が発生してからのパインコントロールが重要となってくることから、よりヒトの病態を反映した動物モデルが必要であると考えられた。

酸感受性受容体は、疼痛発生に関わる因子として近年注目されてきている。本研究課題においても、培養神経細胞での検討において TRPV1 の阻害剤により、酸刺激によりもたらされる CREB の活性化や CGRP の発現が抑制される結果が得られた。今後、放射線照射や疼

痛緩和薬の効果を検討することは、酸感受性受容体の発現ならびに機能変化を捉えることは、新たな疼痛緩和医療の開発において有用な知見となることが期待される。

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0件)

[学会発表] (計1件)

中西雅子、米田俊之、癌性骨痛の発生における酸性環境の関与、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 雅子 (NAKANISHI MASAKO)
大阪大学・歯学研究科・特任研究員
研究者番号：60437382

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：