

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：37107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16466

研究課題名（和文）生体シグナルの日周リズムを基盤とした新規がん性疼痛治療法の構築

研究課題名（英文）Development of a novel cancer pain treatment based on the daily rhythm of biological signals.

研究代表者

岡崎 裕之（Okazaki, Hiroyuki）

第一薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50734125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：mTORシグナルを阻害する薬剤であるEverolimus、Temsirolimusは、腫瘍細胞において時計遺伝子の発現を変化させた。がん性疼痛の発現に影響を及ぼす因子に対しては、Temsirolimusのみが抑制作用を示していた。通常の腫瘍細胞内では疼痛因子Trpv1が周期的な発現変動を示す一方で、Temsirolimusによってその周期性が抑制されていることが明らかとなった。mTORとTrpv1の発現変動に着目した疼痛制御の有用性が示唆されたものの、両薬剤の反応性の違いについては詳細な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、mTOR阻害によるTrpv1を介した疼痛コントロールへの新たなアプローチについて、体内時計機構を加味した研究の有用性と必要性を提示するものである。さらに研究が進展し、詳細なメカニズムが解明されることで、より特異的に疼痛を抑制する新たな化合物や薬剤の探索が進み、臨床への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Everolimus and Temsirolimus, drugs that inhibit mTOR signaling, altered the expression of clock genes in tumor cells. Temsirolimus had an inhibitory effect on factors affecting the expression of cancer pain, on the other hand, Everolimus didn't show that. While the expression of the pain factor Trpv1 fluctuates cyclically in normal tumor cells, the fluctuation was suppressed by Temsirolimus. Although the results suggest that mTOR and Trpv1 expression changes may be useful for pain control, the difference in responsiveness between the two drugs needs to be investigated in detail.

研究分野：がん

キーワード：がん mTOR

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群を基盤とした体内時計機構の働きが、様々な疾患の発症、症状の重症度、薬物の治療効果/副作用の発現に日周リズム(時刻による変動)を生み出すことが知られている。申請者は過去の研究において、体内時計機構に基づき抗がん剤の投与タイミングを調整することにより、治療効果を改善しうる可能性について報告している(Okazaki et al., Cancer Res, 2014)。現代においてなお、がん細胞が体内の神経を傷害するなどの原因により生じるがん性疼痛はしばしばがん治療上の問題となる。がん性疼痛を軽減することは、がん患者の QOL; 生活の質を考える上で喫緊の課題である。現在の薬物治療では、疼痛のレベルに応じてシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)阻害薬、オピオイド系鎮痛薬などが用いられている。しかしながら、これらの薬剤を用いても十分な鎮痛作用が得られなかったり、あるいは、ある時刻では疼痛が治まっているが別の時刻には疼痛が発症してしまう、といった鎮痛作用の日内変動が治療上の課題として存在している。mTOR は生体内においてタンパクの翻訳、細胞の増殖、免疫系の調整など様々な生体機能の制御に関与しているキナーゼタンパク質である。申請者は、上記の過去の研究において、腫瘍モデル動物を用いて mTOR タンパクの発現と活性に日周リズムが生じていることを報告している(Okazaki et al., Cancer Res, 2014)。また、mTOR 阻害剤の投与が疼痛発現に関する因子の発現を抑制するという報告があり、mTOR シグナルの抑制は疼痛抑制の標的の一つと考えられる(Géranton et al., J Neurosci, 2008)。一方で、がん性疼痛の発現とその日周リズムにおける mTOR シグナルの影響、及びがん性疼痛の制御における mTOR 阻害薬の至適利用については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、体内時計機構と mTOR シグナルの相関を基盤として、がん性疼痛の新規治療法の基礎を構築することである。本研究の目的を達成することにより、既存の mTOR 阻害薬を用いた新規のがん性疼痛の治療法を構築することができる。ゼロから新規の疼痛作用を示す薬剤を探索するのではなく、既存の薬剤をより効果的に用いる方法を探索し、その結果を利用して新たな作用標的の探索につなげることで、より効率的な治療方法の確立を指向したものである。

3. 研究の方法

- (1)解析対象とする腫瘍細胞として、マウス乳がん細胞 4T1、及びマウスメラノーマ細胞 B16 を用いた。
- (2)mTOR 阻害剤として、Everolimus、Temozolomide を用いた。両阻害薬は Selleck Biotech 社より購入した。
- (3)遺伝子発現解析の方法として、total RNA を RNeasy Mini kit(Qiagen)による RNA の抽出、ReverTraAce® qPCR RT kit(TOYOBO)による逆転写、Fast Start Essential DNA Green Master Mix(Roche)によるリアルタイム RT-PCR を行った。また、タンパク質発現の解析には western blot 法を用いた。

4. 研究成果

(1)時計遺伝子発現に及ぼす mTOR 阻害剤の影響の検討

初めに、培養細胞における遺伝子発現への影響について検討するため、4T1 細胞、及び B16 細胞において Everolimus(Eve)、Temozolomide(Tem)の両薬剤を曝露し、時計遺伝子への発現を検討した。その結果、図 1 に示すように、各時計遺伝子の発現において発現の増減が認められたものの、その影響は Everolimus と Temozolomide で異なる挙動を示していた。なお、測定に用いた実験条件、曝露後経過時間において、いずれの薬剤においても顕著な生存率の低下を認めない濃度範囲であった。

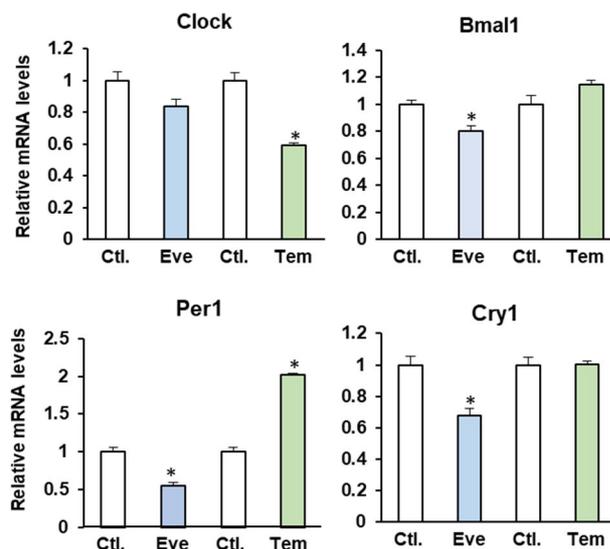


図 1. 4T1 細胞における mRNA 発現レベル

(2) 疼痛発現因子に及ぼす mTOR シグナルの影響

腫瘍モデルにおいて、mTOR シグナルの阻害による疼痛抑制作用を示すメカニズムについて検討するため、疼痛関連因子について mRNA 発現レベルを測定した。その結果、機械刺激受容体である Piezo1/2 については発現量は変化しないか、やや増加傾向であったのに対し、刺激受容体 TRP チャンルの一種である TRPv1 の発現が Temsirolimus の曝露によって有意に抑制されることが確認された(図 2)。また、炎症性サイトカインである TNF の発現も同様に低下しており、Temsirolimus による疼痛抑制作用機序として考えられた。また、その一方で同様に mTOR 阻害作用を示す Everolimus ではこれらの因子の発現に抑制は認められず、薬剤特異的な作用であることが示唆された。

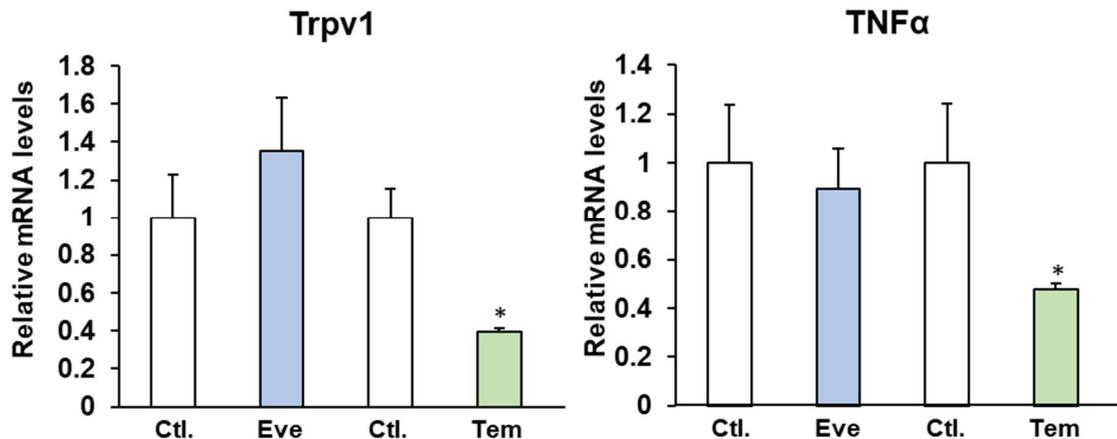


図 2. 4T1 腫瘍細胞内における疼痛関連遺伝子発現

(3) 腫瘍細胞における遺伝子発現リズムに及ぼす mTOR 阻害剤の影響

時計遺伝子の発現リズムと mTOR 阻害作用が Trpv1 の発現に対して及ぼす影響について検討するため、デキサメタゾンにより腫瘍細胞を刺激して細胞内の時計遺伝子を同調させ、4 時間ごとの細胞内の遺伝子発現を解析した。Temsirolimus は DEX の曝露から 30 分後に単回曝露で行った。

図 3 に示すように、Temsirolimus の曝露によって Clock、Bmal1 をはじめとした各時計遺伝子は、発現リズムの消失、発現量の低下、位相の変化(ピークのずれ)、といった影響が認められた。Trpv1 についても、Vehicle として DMSO を曝露した群では明確な周期的変動が見られたのに対し、Temsirolimus 曝露群では発現リズムが消失し、全体的な発現量の低下が認められた。

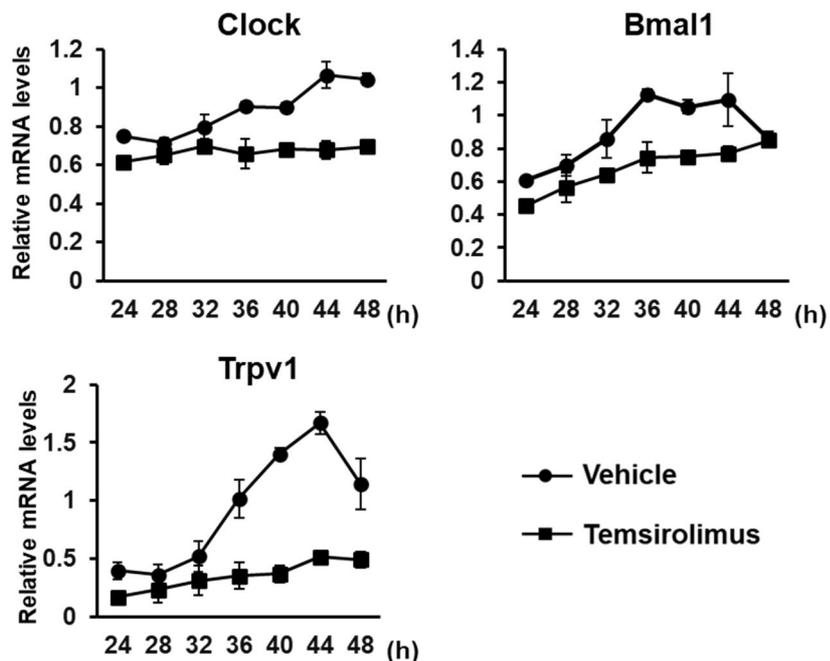


図 3. 時計遺伝子及び疼痛関連因子の周期的変動

以上の結果より、mTOR 阻害薬によるがん性疼痛の抑制とその作用機序について、体内時計機構の影響を強く受ける可能性が示唆された。しかしながら、Everolimus と Temsirolimus の応答性の違いについては原因を特定するに至らなかったため、今後臨床応用を目指すためにも作用機序についてより詳細な検討が必要な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡崎裕之、長田茂宏
2. 発表標題 マウス乳がん細胞におけるmTOR阻害剤による時計遺伝子発現変動解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎裕之、長田茂宏
2. 発表標題 マウス乳がん細胞におけるmTOR阻害剤による時計遺伝子発現変動解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎 裕之, 田中 怜, 市来 大河, 宮村 沙織里, 炬口 真理子
2. 発表標題 遺伝子発現に着目した乳がん細胞に おけるmTOR阻害剤の作用比較
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------