

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18283

研究課題名（和文）がん性疼痛モデルにおけるキマーゼ阻害薬による鎮痛効果の検証

研究課題名（英文）Analgesic effects of chymase inhibitors in a model of cancer pain

研究代表者

北埜 学（KITANO, MANABU）

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：10838296

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：現在、日本における死因の1位は悪性腫瘍である。多くのがん患者は痛みを経験するため、がん性疼痛コントロールはQOLの向上につながる。がんはしばしば骨転移し、局所に炎症を惹起させる。骨転移による痛みは侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛が複雑に関わるため、疼痛コントロールは困難と考えられている。キマーゼは心血管、各臓器の線維化に関する研究が進められているが、痛みに関しての報告はない。本研究では、マウスがん性疼痛モデルを作成し、キマーゼ阻害薬であるTY51469を用いて疼痛効果の検証を行ったが、鎮痛効果は得られなかった。生存率を経日追跡したが、TY51469による生存率への影響を示すことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キマーゼががん性疼痛に作用するか検証を行うことで、がん性疼痛発現機序の解明につながり、がん患者のQOLの向上につながることに期待できる。しかし、本研究ではキマーゼ阻害薬による鎮痛効果を検証することができず、がん性疼痛機序解明にはつながらなかった。

研究成果の概要（英文）：Malignant tumors are currently the leading cause of death in Japan. Since many cancer patients experience pain, cancer pain control can improve quality of life. Cancer often metastasizes to the bone, causing local inflammation. Pain caused by bone metastases is considered to be difficult to control because of the complex relationship between nociceptive pain and neuropathic pain. Chymase has been studied for fibrosis in cardiovascular and various organs, but there are no reports on pain.

In this study, a mouse model of cancer pain was created and the pain effect was tested using TY51469, a chymase inhibitor, but no analgesic effect was obtained. Survival was followed over time, but the study failed to show an effect of TY51469 on survival.

研究分野：がん性疼痛

キーワード：キマーゼ

1. 研究開始当初の背景

現在、日本における死因の1位が悪性腫瘍によるものであり、全体の28%を占めている。多くのがん患者は病期に関わらず痛みを経験し、日常での痛みと異なり、持続的で複数の痛みを抱えている。早期のがん性疼痛コントロールはQOLの向上につながるため、近年盛んに行われている。乳がん、肺がんはしばしば骨転移し、局所に炎症を惹起させるだけでなく、腫瘍細胞自体を増殖する[1][2]。腫瘍細胞が神経浸潤、神経圧迫を来すと、侵害受容性疼痛だけでなく、神経障害性疼痛も生じるため、がん性疼痛コントロールは困難と考えられている。キマーゼはキモトリプシン様のセリンプロテアーゼであり、肥満細胞の顆粒中に蓄積されている[3]。脱顆粒するには、活性酵素やサイトカイン、組織障害などに伴う機械的刺激が必要である。またキマーゼは血管内で数秒のうちに活性を失うため、炎症や傷害が生じた局所に限定される。放出されたキマーゼはアンジオテンシン産生、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9およびTransforming growth factor(TGF)- β を活性化する。組織におけるそれらの因子は血管新生、組織線維化、血管リモデリングに作用する[4][5][6][7][8]。キマーゼの作用に着目した疼痛分野における研究はほとんどなく、キマーゼとがん性疼痛が関係しているかを検証した報告はない。

我々の研究室では以前より神経障害性疼痛モデルを作成し、神経障害性疼痛の発生機序、アロディニアの解明に分子レベルで研究を行ってきた。研究協力者の高井真司(大阪医科薬科大学大学院創薬医学教室)はキマーゼ研究の第一人者である。高井らはキマーゼ、MMPが潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患の病態に関与することを報告し、炎症抑制効果としてのキマーゼ阻害薬の可能性を示唆している[9]。キマーゼはMMP前駆体より活性体に変換する作用を有していること、また、炎症に関与するIL-1、IL-8活性作用、線維化、血管新生に関与するTGF- β 、VEGF活性作用が、それぞれがん性疼痛に関わっている可能性があり、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究はBalb/cマウスを用いてがん骨転移モデルを作成し、キマーゼ阻害薬であるTY51469を投与することでがん性疼痛への影響、キマーゼ阻害薬による生存率と腫瘍発育の影響、さらにはがん性疼痛の発症機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

すべての実験は、大阪医科薬科大学動物実験委員会の規程(No.30048)に準拠し、国際疼痛学会倫理委員会のガイドラインに従った。本研究では、体重20~22gの4週齢の雄Balb/Cマウスを用いた。マウスは日本SLC(日本、浜松市)から購入した。動物は温度、湿度、光を制御した部屋で飼育した。実験前に餌と水に自由にアクセスできるようにした。動物実験は、使用する動物の数とその苦痛を最小限にするように行った。

4T1細胞の脛骨内注射により、がん骨転移モデルマウスを作成した。ペントバルビタールナトリウム(i.p.、60mg/kg)で麻酔した後、右脚を剃毛し、70%エタノール(v/v)で皮膚を消毒した。脛骨上部1/3の皮膚を、筋肉と神経への損傷を最小限に抑えながら、0.5cm長で切開した。マウス右脛骨を注意深く露出させ、脛骨に開けた穴から25ゲージ針を髄腔に挿入した。その後10 μ Lハミルトンシリンジに取り付けた30G針を用いて、4T1細胞(1×10^4 個/10 μ L)を接種した。細胞が骨腔を満たすように2分間遅延させた後、最終的に1-0絹糸を用いて創傷を閉じた。

がん性疼痛を客観的かつ定量的に定量化するために、プレキシガラス製の筐体(11 \times 11 \times 30cm)に1936個の圧力変換器を含む床センサーからなるdynamic weight bearing(DWB)装置(フランス、プローニュ、Bioseb社製)を使用した。マウスは5分間装置内で自由に動くことができ、その間の各動作はカメラで記録された。ライブ記録と床センサーの圧力データはPCに転送され、解析のために保存された。各肢の重量(g)と表面積(mm²)の平均値を、各検証セグメントの時間長に基づいて試験期間全体について算出した。

キマーゼ阻害剤であるTY51469の用量は、過去の報告および我々の予備研究に基づいて選択した。キマーゼ阻害薬は100mg/kg連日腹腔内投与した。生存曲線を作成し、キマーゼ阻害薬の効果を検討した。術後、苦痛による体動の消失、接触・飲水の停止、体重の急激な現象(数日間で20%以上)などを認めた場合、実験終了を待たず安楽死させた。体重は週に2回測定した。モデル作成後56日目の時点で安楽死させた。

結果は平均値 \pm 標準偏差(SD)で表した。データの統計解析は、スチューデントのt検定、一元配置分散分析を使用し、p値が0.05未満を統計的に有意な差とした。

4. 研究成果

(1) がん性疼痛に対するTY51469の腹腔内投与効果

図1a、1bに示すように、TY51469を毎日100mg/kg腹腔内投与すると、投与後3日目の体重負

荷と荷重面積の左右比が生理食塩水に比べ有意に減少したが 5 日目、7 日目では差はみられなかった。

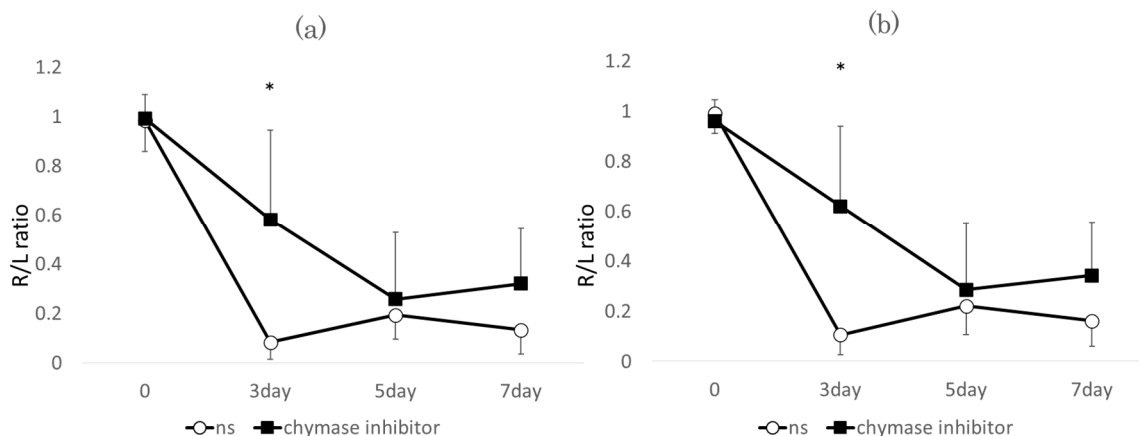


図 1. キマーゼ阻害剤の腹腔内投与が体重負荷と荷重面積に及ぼす影響。マウスに 100 mg/kg の TY51469 または生理食塩水を 1 日 1 回、7 日間腹腔内投与した。(a) 連日腹腔内投与による体重負荷の時間経過、(b) 連日腹腔内投与による荷重面積の時間経過。

(2) TY51469 の連日腹腔内投与ががん骨転移モデルの生存率に及ぼす影響

図 2 は、TY51469 と生理食塩水を連日投与したがん骨転移モデルマウスの生存率観察結果である。TY51469 投与群は、生理食塩水投与群と生存率に差はみられなかった。

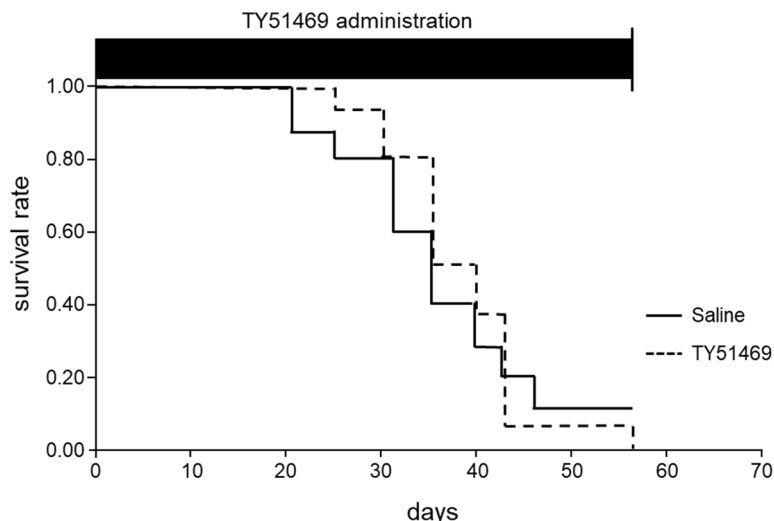


図 2. TY51469 または生理食塩水を連日投与したがん骨転移モデルの生存率。各群 15 匹のマウスに 1 日 1 回 100 mg/kg の TY51469 または生理食塩水を腹腔内注射した。2 群間に生存率の差はみられなかった。

引用文献

Theriault RL, Theriault RL. Biology of bone metastases. *Cancer Control*. 2012 Apr; 19(2): 92-101.

Cines GA, Guise TA. Mechanisms and treatment for bone metastases. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2004 May; 2(5): 295-302.

Takai S, Jin D, Miyazaki M. Multiple mechanisms for the action of chymase inhibitors. *J Pharmacol Sci*. 2012; 118: 311-6.

Takai S, Shiota N, Sakaguchi M et al. Characterization of chymase from human vascular tissues. *Clin Chim Acta* 1997; 265: 13-20.

Katada J, Muramatsu M, Hayashi I et al. Significance of vascular endothelial cell growth factor up-regulation mediated via a chymase-angiotensin-dependent pathway during angiogenesis in hamster sponge granulomas. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 949-56.

Muramatsu M, Yamada M, Takai S et al. Suppression of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis by a specific chymase inhibitor, BCEAB, through the chymase-angiotensin-dependent pathway in hamster sponge granulomas. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 554-60.

Fang KC, Raymond WW, Lazarus SC et al. Dog mastocytoma cells secrete a 92-kDa gelatinase activated extracellularly by mast cell chymase. *J Clin Invest* 1996; 97: 1589-96.

Fang KC, Raymond WW, Blount JL et al. Dog mast cell alpha-chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain. *J Biol Chem* 1997; 272: 25628-35.

Kumi Ishida, Shinji Takai, Mitsuyuki Murano et al. Role of chymase-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2008 Feb; 324(2): 422-6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------