

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09253

研究課題名(和文) Tmem45bに注目したがんによる体動時痛の機序解明

研究課題名(英文) Role of Tmem45b in cancer-related movement-evoked pain

研究代表者

池本 進一郎 (Ikemoto, Shinichiro)

和歌山県立医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30529269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：がんにおける体動時痛の末梢機序およびがん増殖におけるTmem45bの関与を検討した。その結果、Tmem45b KOマウスの腫瘍増殖経時変化はWTマウスと変わらなかった。脊髄後角細胞の細胞外電位測定を行なったが、KOマウスとWTマウスで反応に差はなかった。行動解析では、KOマウスで機械性痛覚過敏は減弱したが、自発痛関連行動はWTマウスと差はなかった。以上により、Tmem45bはがんによる機械性痛覚過敏に関与するが自発痛には関与せず、また、がんの増殖には関与しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが見出した新規痛み関連分子Tmem45bは、がんによる自発痛やがんの増殖には関与しないが、機械性痛覚過敏に関与する。機械性痛覚過敏は日常生活動作を妨げADLを低下させるため、Tmem45bを標的とした鎮痛治療法が開発されるなら、がん患者のADLおよびQOLを改善させる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the peripheral mechanism of movement-evoked pain in cancer and the involvement of Tmem45b in cancer growth. The results showed that tumor growth in Tmem45b KO mice did not differ from that in WT mice. Extracellular potential measurements of spinal cord dorsal horn cells showed no difference in response between KO and WT mice. Behavioral analysis showed that mechanical hyperalgesia was attenuated in KO mice, but spontaneous pain-related behaviors were not different from those in WT mice. These results indicate that Tmem45b is involved in cancer-induced mechanical hyperalgesia but not in spontaneous pain, and is not involved in cancer growth.

研究分野：麻酔科学

キーワード：疼痛 がん 末梢神経

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国では、近年のがん治療の飛躍的な発展とがん診療体制の構築により、がん患者の予後が延長し、いわゆる“がんサバイバー”が増加している。この現状を踏まえ、わが国ではがん治療だけでなく、がん患者のQOL向上を重視し、がんに伴う身体症状・精神症状に対応する緩和医療のさらなる充実が求められている。がん患者の症状の中でも、特に痛みはがん患者のQOLに大きく影響するため最優先で緩和されるべき症状である。がん性痛の標準的治療法として、非オピオイド (NSAIDs、アセトアミノフェン) とオピオイドからなるWHO方式がん疼痛治療法が普及している。WHO方式がん疼痛治療法の普及によって疼痛治療成績は向上したものの、進行がん患者の約30%は疼痛コントロールが不良であることが明らかになっている (Zech DF, Pain, 1995)。特に、痛みのコントロールが難しいのが、体動時痛である。安静時痛はオピオイド反応性が良く比較的コントロールされるが、体動時痛はオピオイド抵抗性であり治療に難渋する。この原因として、本法ががんの体動時痛の機序に基づいた鎮痛法ではないことが挙げられる。NSAIDsは末梢に作用し痛みの発生を抑制するが、プロスタグランジン以外の痛みの原因を抑制することはできない。オピオイドは末梢での痛み発生メカニズムに依存せず、脊髄および上位脊髄での痛みの伝達をシナプスレベルで抑制する。そのため、末梢で痛みの発生を制御できなければシナプスレベルで痛みの伝達を十分に抑制することが難しくなる。したがって、末梢をターゲットとした鎮痛法をオピオイドと併用することで体動時痛に対するすぐれた鎮痛が期待できるが、現在のところ、がんによる体動時痛の末梢機序はまったく明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、がんにおける体動時痛の末梢機序を明らかにし、とそれに基づく新たな痛みの治療のターゲットを提示すること目的とした。最近、申請者の教室では、炎症に伴う機械性痛覚過敏発生に重要な分子としてTmem45bを見出し、研究を進めてきた (Tanioku T & Kawamata T, PNAS, 2022)。申請者は、がんによる体動時痛に対してTmem45bが関与していると仮説を立て研究を行った。Tmem45bの痛みにおける役割はこれまでに全く報告されておらず、新規痛み関連分子である。そこで、Tmem45bに注目してがんでの体動時痛の末梢機序解明を試みた。さらに最近、末梢神経ががんの生育に寄与していることが報告されているため、Tmem45bのがんの生育への関与も検討する。

本研究成果を臨床応用されるならば、WHO方式がん疼痛治療法で、がんによる体動時痛の機序に基づいた末梢性鎮痛薬が追加され、オピオイドと相乗的な効果が期待できる。すなわち、Tmem45bをターゲットとした薬剤とオピオイドの併用によりオピオイドの投与量を減じて、優れた鎮痛効果が得られ、かつ、オピオイドによる副作用を減ずる可能性がある。これらは、がん患者のQOL向上に大きく貢献する。さらに、Tmem45bのがんの生育への関与が明らかになれば、抗がん作用を有する鎮痛方法が開発される。このように、本研究成果は、WHO方式がん疼痛治療法を大きく発展させる創造的な治療戦略を実現しうる。

### 3. 研究の方法

#### (1) がん疼痛モデル

C57BL/6系統の雄性マウスおよびTmem45b遺伝子欠損マウスを用いて足底がん移植モデルを作成する。全身麻酔下で、マウスの左足底にLewis Lung Carcinoma $1 \times 10^6$ 個/20  $\mu$ l移植する。対照マウスにはLLCの培養液20  $\mu$ lのみ注入する。本モデルの特徴は、確立された痛み評価ができるとともに腫瘍増殖も簡便に測定評価できる。腫瘍細胞接種35日目には腫瘍の崩壊やマウスの死亡が観察されたため、実験はモデル作成28日目までに行う。

#### (2) 疼痛行動評価

腫瘍移植前、移植1・2・3週間後に、自発痛関連行動 (足振り行動 (flinching) や足舐め行動 (licking))、機械性痛覚過敏 (Von Frey filamentによる足底への刺激に対する逃避閾値)、熱性痛覚過敏 (熱輻射装置を用いた足底への侵害熱刺激に対する逃避潜時)、および体動時関連行動 (立位時・歩行時の患肢使用状況、および単位時間あたりの運動量) を評価する。

#### (3) 腫瘍増殖の評価

全身麻酔下でマウスの足体積をplethysmometerで測定する。

#### (4) 末梢神経でのTmem45b発現変化

移植1・2・3週間後にL3/4/5後根神経節を摘出し、qPCRおよびウエスタンブロット法を用いてTmem45b mRNAとタンパクを定量評価し、対照マウスと比較する。さらに、免疫染色により後根神経節でのTmem45bの局在変化を検討する。Tmem45bとCGRP (ペプチド含有無髄神経)、IB4 (ペプチド非含有無髄神経)、NF200 (有髄神経) などの各種神経マーカーと多重染色を行い、局

在の変化を検討する。

#### (5) 脊髄単一細胞外電位記録

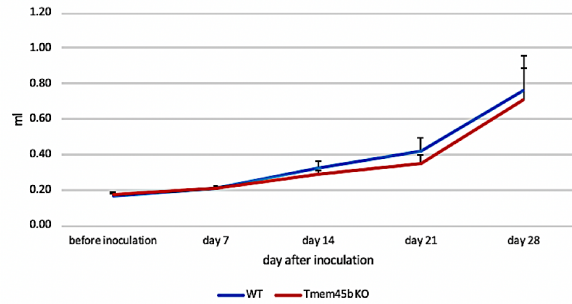
全身麻酔下にマウスを脊椎定位固定器に装着し、L3-5 レベルでの脊髄単一細胞外電位記録を行う。脊髄細胞の自発発火頻度および足底への機械刺激・熱刺激に対する発火頻度を測定記録し、対照マウスと比較検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 腫瘍増殖における Tmem45b の関与

野生型マウス (WT) と Tmem45b 遺伝子欠損マウス (KO) とともに、移植 21 日後より足体積は急速に増加した。腫瘍移植前と比較して、移植 21 日後と 28 日後で有意な増加をした。WT マウスと KO マウスの間で足体積に差はなかった (図 1)。したがって、Tmem45b は腫瘍増殖に関与しないことが明らかとなった。

図 1. 腫瘍増殖の経時変化



#### (2) 疼痛行動における Tmem45b の関与

WT と KO とともに腫瘍移植 14 日後より明らかな足振り行動 (flinching) (図 2) や足舐め行動 (licking) を示し、経時的に疼痛行動は増強した。しかしながら、WT マウスと KO マウスで統計学的に有意な差はなかった。したがって、Tmem45b はがんによる自発痛関連行動には関与しないことが明らかとなった。次に、腫瘍の中央部と周辺部で侵害熱刺激に対する逃避潜時と侵害機械刺激に対する逃避閾値を調べた。WT マウスと KO マウスともに腫瘍中央部では腫瘍が増殖し体積が増加するとともに侵害熱刺激に対する逃避潜時が延長し、侵害機械刺激に対する逃避閾値が上昇した。一方で、腫瘍周辺部では、侵害熱刺激に対する逃避潜時が短縮し、侵害機械刺激に対する逃避閾値が低下した。したがって、腫瘍体積増加とともに、中央部では痛覚鈍麻となり、周辺部では過敏となることが明らかとなった。腫瘍中央部皮膚と周辺部皮膚の神経線維の分布を調べたところ、周辺部皮膚では神経線維は観察されたが、中央部ではほとんど観察されなかった。したがって、中央部での痛覚鈍麻は腫瘍増殖により神経線維が消失することが原因と推測された。次に、WT マウスと KO マウスを比較すると、腫瘍周辺部において WT マウスに比べて KO マウスで機械性痛覚過敏が抑制されたが (図 3)、熱性痛覚過敏は同様であった。したがって、Tmem45b はがんによる機械性痛覚過敏に関与することが明らかとなった。

図 2. 足振り行動の経時変化

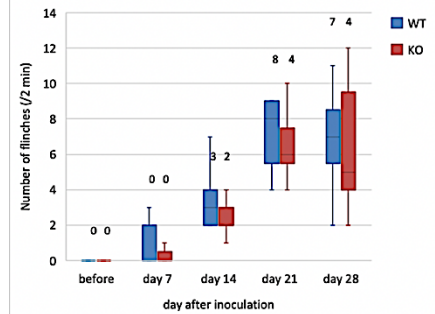
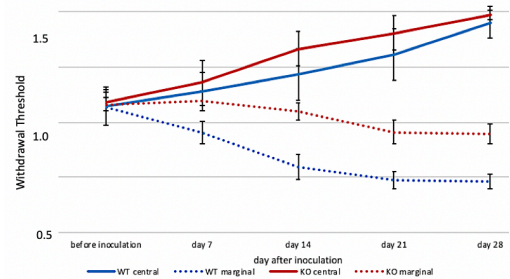


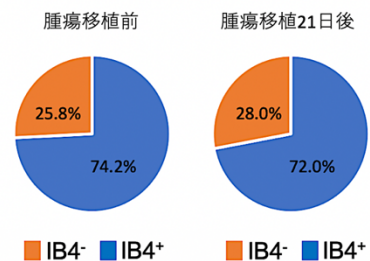
図 3. 侵害機械刺激に対する逃避閾値の経時変化



#### (3) 末梢神経での Tmem45b 発現変化

腫瘍移植 1・2・3 週間後に後根神経節での Tmem45b mRNA とタンパクの発現の経時変化を検討したところ、mRNA とタンパク量は変化しないことが明らかとなった。さらに、免疫染色により後根神経節での Tmem45b の局在変化を検討したが、Tmem45b と CGRP (ペプチド含有無髄神経)、IB4 (ペプチド非含有無髄神経)、NF200 (有髄神経) との共存率に変化はなかった (図 4)。したがって、がん状態において末梢神経での Tmem45b の発現・分布は変化しないことが明らかとなった。

図 4. Tmem45b 発現神経の割合



#### (4) 脊髄単一細胞外電位記録

全身麻酔下で脊髄後角細胞の細胞外電位測定を行い、自発活動とピンチ刺激に対する反応を検討した。KO と WT で、無処置状態に比べ、腫瘍移植により自発発射頻度は有意に増加し、ピンチ刺激に対する閾値の低下と発射頻度の増加が観察された。KO と WT の比較では、自発活動とピンチ刺激に対する反応ともに、統計学的に有意な差はなかった。

以上により、Tmem45b は機械性痛覚過敏に関与するが、熱性痛覚過敏や痔は通関連行動には関与しなかった。また。腫瘍増殖にも関与しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haruka Yoshida, Shinichiro Ikemoto, Yasuyuki Tokinaga, Kanako Ejiri, and Tomoyuki Kawamata	4. 巻 7
2. 論文標題 Successful removal of a central venous catheter misplaced in the right subclavian artery using an intravascular stent: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JA Clin Rep	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40981-021-00418-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究 分 担 者	川股 知之  (Kawamata Tomoyuki)  (80336388)	和歌山県立医科大学・医学部・教授    (24701)	

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