

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16342

研究課題名(和文) 難治性癌性疼痛に対する新規治療薬開発の為に神経機構解析

研究課題名(英文) Neural mechanism analysis for the development of new therapeutic agents for intractable cancer pain

研究代表者

玉川 崇皓 (TAMAGAWA, Takaaki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：40814380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍の浸潤による癌性疼痛が知られている。グリア-神経細胞関連のメカニズムをより深く解明するため舌癌モデルラットにおいて三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)に発現するP2X7受容体ならびにPannexin1(Panx1)がいかなるメカニズムで舌癌性疼痛発現に関与するかを検討した。その結果、舌癌性疼痛発現時には、Vcの表層に出現した活性型マイクログリアにおいてPanx1が発現し、このチャンネルを通して放出されたATPが侵害受容ニューロンのP2X7受容体に結合することによって侵害受容ニューロンの活動が亢進し、舌癌性疼痛が発症する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍による癌性疼痛に対しては現在では非オピオイド鎮痛剤が奏効しない場合オピオイドによる疼痛管理が行われているが、悪心・嘔吐、便秘、眠気、せん妄などの副作用が存在する。今回の研究結果はそのような副作用を発生させないために考えられた方法である。管理のできない疼痛は非常に耐え難いものであり、新たな非オピオイドに鎮痛剤による疼痛管理を作り出すことはとても有意義なものである。また新たな、そして既存の研究結果と併せて新規疼痛管理の手段になりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：Cancer pain is known to be caused by malignant tumor invasion. To elucidate the mechanism of the glia-neuron connection more deeply, we investigated the involvement of P2X7 receptors and Pannexin1 (Panx1) expressed in the caudal subnucleus (Vc) of the trigeminal spinal tract nucleus in a rat model of tongue cancer in the development of tongue cancer pain. The results showed that Panx1 is expressed in active microglia appearing on the surface of Vc, and that ATP released through this channel binds to P2X7 receptors of nociceptor neurons, which in turn increases the activity of nociceptor neurons and causes the onset of tongue cancer pain. This is the first time that this has been done in Japan.

研究分野：口腔外科学

キーワード：マイクログリア 舌癌 P2X7 Pannexin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床の現場で遭遇する異常疼痛には、抜歯、インプラントや顎変形症の手術による末梢神経の損傷などが起因となる神経障害性疼痛、あるいは慢性的な炎症が起因となる炎症性疼痛や、悪性腫瘍の浸潤による癌性疼痛が知られている。神経障害性疼痛や炎症性疼痛に関してはその疼痛発生の機序が解明されつつあるが、癌性疼痛に関しては研究が遅れており、早期の解明が望まれる。近年、三叉神経脊髄路核尾側亜核のマイクログリアを介した疼痛発症メカニズムが神経障害性疼痛や炎症性疼痛に関与しているとの報告がある。このグリア-神経細胞関連のメカニズムをより深く解明し、舌癌の進展に伴う三叉神経脊髄路核尾側亜核における P2X₄ および P2Y₆ 受容体を介したグリア-神経機能連関の変調を明らかにし、これまでの研究結果と併せて癌性難治性異常疼痛に対する新規治療法の開発につなげることを目的とした。

2. 研究の目的

全悪性腫瘍の中の1~5%程度を占める口腔癌の約7割が進行癌として発見され、毎年約3000人が口腔癌により亡くなることが知られている。進行癌の患者の約75~90%が耐え難い癌性疼痛を経験するといわれており、口腔癌患者における Quality of life 低下の主な原因となっている。しかしながら、進行癌において生じる難治性癌性疼痛の発症メカニズムは不明な点が多く、口腔外科臨床の場においては舌癌の進展に伴う難治性癌性疼痛のコントロールに苦渋しているのが現状である。口腔癌の進展に伴い、癌組織に投射する一次神経の興奮性が増強し(Shinoda et al., *J Pain*, 9(8):687-99, 2008)、脊髄後角神経細胞や一次求心性神経の中樞終末から ATP が放出されるという報告されている(*J Neurosci*. 21(17):6522-31, 2001)。ATP 受容体は、P2 プリン受容体とも呼ばれ、大きく2つのファミリー(P2X および P2Y)に分類される。マイクログリアにタンパク発現している主な P2 受容体は P2X₄ および P2X₇、P2Y₆ および P2Y₁₂ である(井上和秀 福岡医誌 99(12):239-245,2008)。近年、ATP 受容体の受容体の一つである P2Y₁₂ 受容体が神経障害性疼痛の発症に関与することが示唆された(Bemier et al., *Glia*. 60(5):728-37, 2012)。癌性疼痛には末梢組織における炎症性疼痛および神経障害性疼痛が関与することが考えられる。よって、マイクログリアに存在する P2X₇ および P2Y₁₂ 受容体が難治性癌性疼痛発症に関与することが推測されるが、その詳細なメカニズムに関しては不明である。

本研究は、未だ解明されていない癌性難治性異常疼痛のメカニズムを解明することで、口腔領域に生じた癌性難治性異常疼痛に対する新規治療法の開発を目指すもので、より独創的かつ有意義な研究である。申請者は、ラット舌に癌細胞を接種した舌癌モデルラットを用い、選択的 P2X₇ アンタゴニスト(A-438079)ならびに P2Y₁₂ 受容体アンタゴニスト(MRS2395)を投与した後、ラット舌への機械刺激および熱刺激に対する疼痛反応を観察した。結果、熱刺激に対する逃避反射閾値の低下の抑制は見られなかったが、A-438079 では短期的な、MRS2395 では長期的な機械刺激に対する逃避反射閾値の低下の有意な抑制を観察した(Tamagawa et al., *J. Dent. Res.* 95(10) 1176-82, 2016; 玉川崇皓 日大歯学, 90(2), 131-136, 2016) (図1、2、3)。これにより、三叉神経脊髄路核尾側亜核のマイクログリア上に発現する P2 受容体が癌性難治性異常疼痛に関与していることが推測され、P2X₄ および P2Y₆ 受容体の選択的アンタゴニストによっても癌性難治性異常疼痛が緩和される可能性が考えられる。

本研究では、このグリア-神経細胞関連のメカニズムをより深く解明し、舌癌の進展に伴う三叉神経脊髄路核尾側亜核における P2X₄ および P2Y₆ 受容体を介したグリア-神経機能連関の変調を明らかにし、これまでの研究結果と併せて癌性難治性異常疼痛に対する新規治療法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)舌癌モデルラットの作成

ラットを麻酔し、開口させ舌を引き出した後に SCC 細胞(SCC-158, JCRB)の懸濁液(SCC 細胞 5 × 10⁶ を 0.1 M phosphate buffer saline (PBS)に攪拌したものをラット舌に接種する(SCC 群)。対照として 0.1 M PBS を vehicle として用い、同様の方法で行う(PBS 群)。

(2)ラット舌へ機械刺激を加えた際の逃避反射閾値の解析

浅麻酔下において、機械刺激を舌左側縁部、先端から 5mm 後方の接種部位にデジタルピンチを用いて加え、それらに対する逃避反射閾値の測定を行う。同一個体で接種前、接種

2,3,4,6,8,11,14,21 日後において各 5 回ずつ計測を行い、その平均値を逃避反射閾値として算出する。

(3)免疫組織学的解析

各モデルにおいて、接種 3,14 日後のラットを麻酔し、生理的食塩水で脱血後に 4% paraformaldehyde 固定液(pH 7.4)で灌流固定を行う。その後、延髄を摘出し後固定を行う。その後標本を obex から ±1mm の部位で 30 μm の間隔で連続凍結切片を作製し、免疫組織学的染色を行う。Noma らの報告により舌の侵害刺激一次ニューロンが投射する三叉神経脊髄路核尾側亜核領域は特定されているので、各切片の舌投射領域に一定の範囲を設定し、その範囲内に発現した Iba1 陽性細胞の密度を、画像解析ソフトを用いて解析する。

(4)P2X₄および P2Y₆ 受容体のアンタゴニストの持続髄腔内投与

ラットを麻酔し、頭頂部から尾側へ皮膚切開を加え、後頭骨を露出し直径 2mm の小孔を開け、ポリエチレンチューブを髄腔に挿入。P2X₄ 受容体選択的アンタゴニスト(NC-2600)あるいは P2Y₆ 受容体選択的アゴニスト(MRS2957)を髄腔内へ連続投与を行う。NC-2600 あるいは MRS2957 を投与した SCC 群の逃避反射閾値の測定は前述の方法と同様に行う。

(5)ウェスタンブロットティング法を用いたタンパク量の解析

各モデルにおいて、接種 14 日後のラットを麻酔し、脱血後に延髄を取り出す。ウェスタンブロットティング法を用いて三叉神経脊髄路核尾側亜核のマイクログリア上に存在する P2X₄・P2Y₆ 受容体の発現量を解析する。

(6)細胞外記録法を用いた三叉神経脊髄路核ニューロン活動の解析

各モデルにおいて、接種 14 日後のラットを麻酔し、鼠蹊部静脈より筋弛緩施行。頭頂部から尾側へ皮膚切開を加え後頭骨を除去した後に延髄を露出させる。単一記録法を用いて WDR(広範囲作動性ニューロン)を記録し、舌への侵害刺激に対する三叉神経脊髄路核の表層に存在する二次ニューロンの応答性を解析し、さらに NC-2600 あるいは MRS2957 の持続髄腔内投与による応答性の変化を観察する。

(7)統計解析

全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表し、有意差の検定には Student's t-test, one-way or two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple-comparison test を用いる。有意水準は P < 0.05 とする。

4. 研究成果

P2X₄、P2Y₆ モデルにおいて、ラット舌への機械刺激に対する舌逃避反射閾値 (MHWT) の有意な低下が認められたが、アンタゴニスト投与による MHWT の有意な低下が認められなかったため以前研究を行なった P2X₇ 受容体と Pannexin1 チャネルの関係に着目し、同様のモデルで研究を行なった。

ラット舌へ癌細胞接種後 6 日目以降、機械刺激に対する MHWT の有意な低下が認められたが、Panx1 アンタゴニスト (10panx) 投与により低下は抑制された(図 1)。

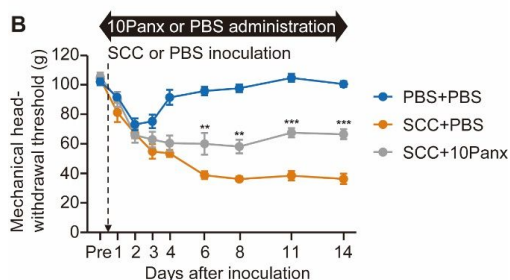


図 1

接種後 14 日目、Vc の表層において Iba1 陽性細胞に Panx1 発現と pERK 陽性細胞の増加を認められたが、10panx 投与により減少した(図 2、3)。

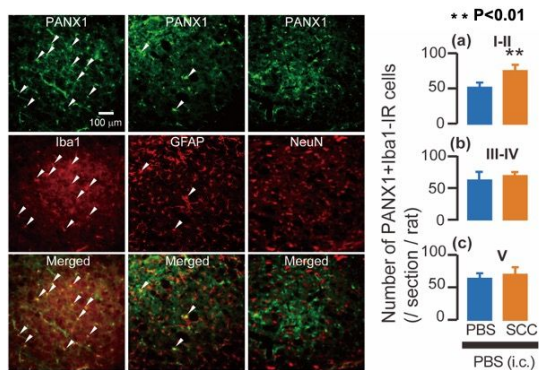


図 2

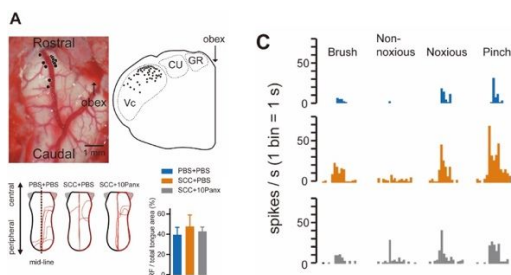


図 3

SCC 細胞接種群において接種後 14 日目に Vc ニューロン活動が亢進し、10Panx 投与により抑制された(図 4)。

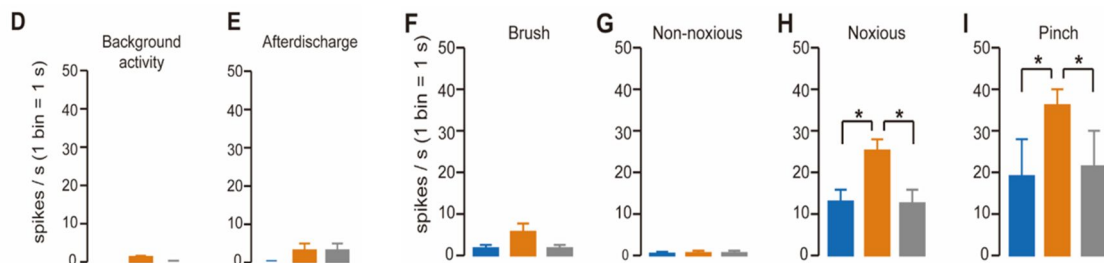
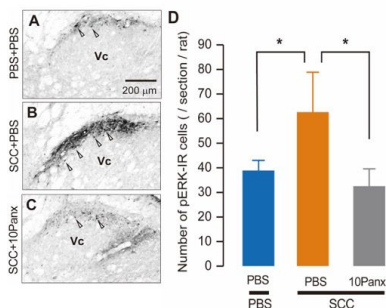
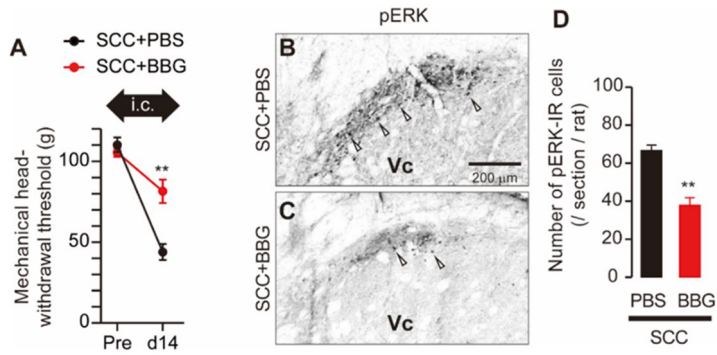


図 4

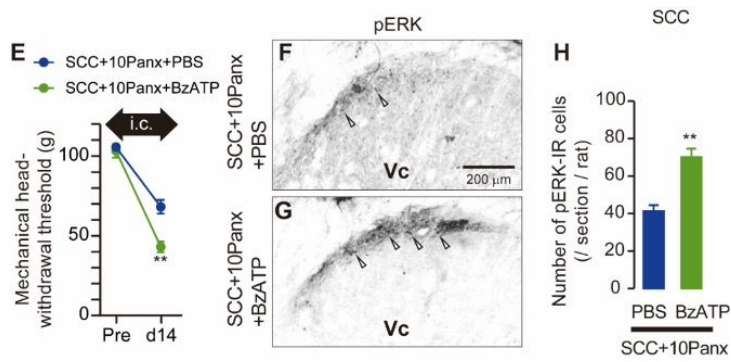
また P2X7 受容体拮抗薬の大槽内持続投与によって MHWT の上昇および pERK 陽性細胞数の減少、さらに naive ラットに P2X7 受容体の作動薬である BzATP を投与することにより MHWT の低下および pERK 陽性細胞数の増加が認められた(図 5、6、7)。



5



6



7

これらにより舌癌性疼痛発現時には、Vc の表層に出現した活性型マイクログリアにおいて Panx1 が発現し、このチャンネルを通して放出された ATP が侵害受容ニューロンの P2X7 受容体に結合することによって侵害受容ニューロンの活動が亢進し、舌癌性疼痛が発症する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ryo Koyama, Koichi Iwata, Yoshinori Hayashi, Suzuro Hitomi, Ikuko Shibuta, Akihiko Furukawa, Sayaka Asano, Tadayoshi Kaneko, Yoshiyuki Yonehara, Masamichi Shinoda	4. 巻 4
2. 論文標題 Pannexin 1-Mediated ATP Signaling in the Trigeminal Spinal Subnucleus Caudalis Is Involved in Tongue Cancer Pain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222111404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小山 亮、林良憲、人見涼露、岩田幸一、篠田雅路
2. 発表標題 舌癌疼痛発症に対するPannexin1チャンネルの関与
3. 学会等名 第26回一般社団法人日本口腔顔面痛学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山 亮、古川明彦、保坂万智、澤田憧、髭内美穂、玉川崇皓、生木俊輔、金子忠良、米原啓之
2. 発表標題 舌癌性疼痛発症に対する三叉神経脊髄路核尾側亜核におけるパネキシン1を介したATPシグナルの役割
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------