

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659337

研究課題名（和文） がん細胞が産生する新規内因性鎮痛関連物質の探索

研究課題名（英文） Identification of tumor-cell producing novel endogenous analgesic substance.

研究代表者

森田 克也 (MORITA KATSUYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10116684

研究成果の概要（和文）：

近年、難治性疼痛（神経障害性疼痛）が注目されており、従来の鎮痛薬とは作用機序の異なった副作用の少ない新しい治療薬・治療法の開発が待たれている。このような情勢の中、申請者らはがん細胞が鎮痛性ペプチドを産生・遊離し、中枢神経系  $\mu$  オピオイド受容体に作用して疼痛を制御していることを明らかにした。がん細胞由来内因性鎮痛ペプチドの同定と産生・遊離機構および鎮痛発現機序の解明は新しい疼痛治療法と安全な新規鎮痛薬開発のターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Injury to peripheral or spinal nerves following either trauma or disease has several consequences including the development of neuropathic pain. This syndrome is often refractory against conventional analgesics; and thus, novel medicaments are desired for its treatment. This study provided evidence in support of the tumor cells produce novel endogenous opioids. Our findings suggest that a CNS  $\mu$ -opioid-receptor dependent mechanism tonically modulates early and late-stage bone cancer pain in cancer-bearing mice. Regulation of production or secretion of endogenous opioids and mechanisms of its analgesic may be targets for future innovations for chronic intractable pain including cancer or neuropathic pain management.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯科薬理学，疼痛，がん性疼痛，神経障害性疼痛，新規内因性鎮痛関連物質，がん細胞培養上清

## 1. 研究開始当初の背景

臨床において最も多い主訴は痛みであり、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)を処方することが一般的である。しかしながら、NSAIDsには胃腸障害や消化管出血、腎性高血圧といった

副作用や薬物相互作用が問題となっており、小児のインフルエンザ脳症を増悪させる可能性も指摘されている。喘息患者には禁忌である。近年、副作用が少ないシクロオキシゲナーゼ(COX-2)阻害薬が開発された。しかし、COX-2

阻害薬にも心筋梗塞や脳梗塞の危険性を高めるとして循環器疾患患者や高齢者には慎重投与が必要である等の問題が生じている。一方、慢性炎症や知覚神経損傷時には、正常では痛みを起こさない刺激、例えば軽い触覚や冷たい刺激に対して痛み反応を生じる神経因性疼痛、すなわちアロディニアと呼ばれる現象が生じる。アロディニアは従来の鎮痛薬はあまり有効ではなく、難治性で非常に長期間持続する厄介な痛みである。日本における慢性疼痛保有者は1,700万人といわれ(日本慢性疼痛学会公表)、神経障害性疼痛患者は全人口の3%に達するとの予測もある。この様な痛みは難治性で従来の鎮痛薬は奏効せず、モルヒネでさえ効果は限られている厄介な痛みであり、患者のQOLを極端に低下させ、治療に多大な悪影響を及ぼす。神経障害性疼痛のメカニズムは多岐にわたり、基礎研究の成果が治療法にうまく結びついていないのが現状であり、既存の鎮痛薬とは異なった作用機序による治療法・鎮痛薬の開発が望まれている。

近年、膵臓がんモデル動物において麻薬拮抗薬のnaloxone全身投与により、「がん性疼痛」の発現時期が著しく早まることが示された(Mantyh PW., *Nat Rev Neurosci*, 2006)。この機序として、Mantyhらは膵臓がんの初期では内因性オピオイド(ソースは不明)がオピオイド作動性神経機能を賦活して痛覚情報伝達を抑制的に調節しており、がんによる侵害受容神経刺激がこの調節機能を上回った時にがん性疼痛が発症するとしている。以上の知見より、申請者らは、この様な痛覚伝達調節が他のがん性疼痛の発症においても機能しており、がん細胞が産生する液性物質が、直接オピオイド受容体を活性化し、或いは間接的にオピオイド作動性神経を活性化して、疼痛の下降性抑制系を強化して疼痛を抑制しているとの発想に至った。即ち、がん細胞自身が未知の鎮痛物質或いは鎮痛関連物質を分泌している可能性が考えられる。当該物質は生体内鎮痛物質として新規鎮痛薬開発のシーズとなることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は「がん」細胞自身が未知の内因性鎮痛物質或いは鎮痛関連物質の分泌を介してオピオイド作動性神経活性を亢進し、痛覚の下降性抑制系を賦活して、その強力な鎮痛作用でがん性疼痛を抑制しており、この抑制が解除されることで難治性がん性疼痛の発現に関係するのではないかという独自の発想に基づき、新規鎮痛関連物質の探索・同定を世界に先駆けて行おうとするものである。

がん性疼痛の成り立ちは複雑で、侵害受容

性疼痛、神経障害性疼痛、情動や感情が影響し、それらが病状の経過と共に複雑に変化する。本機能分子ががん性疼痛に有効であれば、ターミナルケアにおける重要な薬剤としても位置付けられることが期待されると共に、原因の異なる種々な疼痛に対して普遍的に有効な新しい治療法と安全な新規鎮痛薬の開発をめざした、新たな治療戦略を構築する基盤を与えるものである。

## 3. 研究の方法

**実験動物：**実験には生後5-6週齢のC3H/HeN系雄性マウスおよびddY系雄性マウスを用い、1ケージ当たり5匹の状態、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12時間の明暗サイクル(明期：午前8時~午後8時)の環境下で飼育した。飼料と水は自由に摂取させた。実験は明サイクルの間に実施した。動物の取り扱いは全て日本薬理学会動物取り扱いガイドラインおよび広島大学動物取り扱いガイドラインに準拠して行った。

・**坐骨神経部分結紮モデルマウス：**マウスをsodium pentobarbital麻酔下に坐骨神経を剖出し、8-0絹糸を用いて坐骨神経の1/2~1/3をきつく結紮することにより作成した。

・**マウス大腿骨がんモデル：**マウス大腿骨がんモデルはMinamiら(*J. Pharmacol. Sci.*, 2009)の方法に準拠し、C3H/HeNマウス左大腿骨骨髓内に骨溶解性肉腫細胞NCTC2472を移植して作製した。即ち、C3H/HeNマウスをsodium pentobarbital麻酔下に皮膚を切開し、大腿骨を露出させる。歯科用リーマー(25番)を用いて、大腿骨の遠位部に注入口をあけ、30G注射針とマイクロシリンジで $2 \times 10^7$ 個/ml(HBSS)に調整した細胞浮遊液を5 $\mu\text{l}$ 注入した。歯科用水硬性仮封材(CAVITON EX)で注入口を塞ぎ、皮膚を縫合することにより作製した。Shamマウスは細胞の代わりに、凍結・溶解を繰り返した死亡NCTC2472細胞或いはHBSSを5 $\mu\text{l}$ 注入した。各種処置群への無作為化および薬物投与は術後11日目に行った。

・**NCTC2472細胞培養：**NCTC2472細胞の培養は10%ウシ胎児血清と100 unit/mlペニシリン、100  $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを含むDulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)で5%CO<sub>2</sub>、95%空気、気流下に37 $^\circ\text{C}$ で培養した。メジウムは3日毎に新しいメジウムに交換した。継代はスクレーパーを用いて物理的に細胞を剥がし、ピペットで懸濁後、約100倍に希釈して培養した。

・**細胞培養上清の調整：**80-90%コンフルエントに培養したNCTC2472細胞をDMEM(ウシ

胎児血清(不含)で洗浄後、新鮮な DMEM(ウシ胎児血清(不含))で 12 時間培養した培養液を 200 x g, 3 分間遠心分離した上清を細胞培養上清とした。

・がん性疼痛強度および神経障害性疼痛強度の評価：がん性疼痛の重篤度は以下の①~④で評価した。神経障害性疼痛は①, ②で評価した。

①アロディニアスコア；ペイントブラシで軽く患部を撫でる触覚刺激に対する逃避行動(疼痛関連行動)の程度をスコア化して評価した。即ち, 0: 反応なし, 1: 軽く鳴く, 筆から逃れようとする, 2: 激しく鳴く, 筆に噛み付こうとする, 筆から激しく逃れようとする, を基準とした。

②アロディニア閾値；von Frey hairs フィラメントによる患肢足蹠刺激に対するマウス後足の逃避行動閾値より評価した。

③Guarding behavior (自発痛の指標；安静時に患肢を持ち上げる行動)；マウスを底が金網のプラスチックケージ内で自由に行動させ, 2 分間の観察中に患肢の防御行動(guarding behavior), 即ち, 患肢を床から持ち上げている防御行動の時間を測定して評価した。

④Limb-use abnormality(体動時痛の指標；体動時に患肢を不自然に使う行動)；マウスの歩行異常の程度をスコア化して評価した。即ち, 0: 正常な歩行, 1: 軽い跛行, 2: 明らかな跛行, 3: 患肢を一部使用せずに歩行, 4: 患肢を使用せずに歩行, を基準とした。

評価は薬物投与の前, 及び投与後の特定の時点で実施した。研究は観察者に処置群を判別できない環境下でおこなった。

・内因性オピオイド受容体作用物質の探索：以下の①, ②の方法により検討する。

①モルモット摘出腸管のニコチンによる収縮反応の抑制作用を指標として評価する。

②BHK 細胞に  $G_{q15}$  を融合したオピオイド受容体 cDNA を導入することで構築した強制発現系を用い, 受容体活性化に伴い誘発される細胞内遊離  $Ca^{2+}$  濃度上昇の測定から, オピオイド受容体機能に対する当該物質の作用について明らかにする( $G_{q15}$  は  $G\alpha$  蛋白質のキメラ体で  $G_{i10}$  共役受容体と共役してホスホリパーゼ C 情報伝達系を活性化することが知られている, Hojo et al., *J Pharmacol Sci*, 2008)。

#### 4. 研究成果

近年, 鎮痛薬が奏効しない, 難治性疼痛(神経因性疼痛)が注目されており, 従来の鎮痛薬とは作用機序の異なった副作用の少ない新しい治療薬・治療法の開発が待たれている。この様な情勢の中, 「がん」細胞自身が未知の内因

性鎮痛物質或いは鎮痛関連物質を分泌して疼痛を抑制している可能性が考えられる知見が報告された(Mantyh PW., *Nat Rev Neurosci*, 2006)。この機能分子の同定と鎮痛機構の解明から, がん性疼痛を含む原因の異なる種々の疼痛に対して普遍的に有効な新しい疼痛治療法と安全な新規鎮痛薬開発の礎を構築し, 新たな治療戦略の開拓が可能となる。そこで本研究ではがん細胞が内因性疼痛物質を産生・遊離している可能性について詳細に検討し, 以下の結果を得た。

・がん細胞の培養上清を神経障害性疼痛モデル動物の脊髄腔内(10  $\mu$ l) および静脈内投与(10 ml/kg)により, それぞれ 10 時間, 30 時間前後持続する著明な鎮痛効果を見出した。本鎮痛作用はオピオイド受容体阻害薬 naloxone hydrochloride で拮抗され, オピオイド受容体に作用して鎮痛効果を発揮することが示された。

・がん細胞培養上清の鎮痛作用は限外ろ過により分画分子量 3,000~10,000 のフラクションに溶出された。更に, 鎮痛作用は熱変性処理, ペプチターゼ処理により失活し, ペプチド性生理活性物質であることが明らかとなった。

・本生理活性物質はモルモット摘出腸管で, ニコチンによる腸管収縮を濃度依存性に抑制したがアセチルコリンによる収縮には影響しなかった。ニコチン収縮の抑制は naloxone hydrochloride および選択的  $\mu$  オピオイド受容体阻害薬 cyprodime で拮抗された。更に, BHK 細胞オピオイド受容体発現系を用いた解析で, 培養上清は  $\mu$  オピオイド受容体を活性化することを明らかにし, *in vitro* の研究においても, がん細胞培養上清中に  $\mu$  オピオイド受容体(MOR)の強力なアゴニストとして機能する物質が存在することが明らかになった。

次に, がん細胞が生体内で本生理活性物質を産生・遊離している可能性について, がん細胞を移植したマウスの血清中に鎮痛物質が含まれるか否かを検討した。

・がん細胞を移植したマウスの種々のステージにおいて結成を採取し, 神経障害性疼痛モデルに投与したところ, がん性疼痛の発症前, 発症後のいずれのステージから採取した血清中にも強い鎮痛作用を認めた。

・がん細胞の移植により, 移植 1 日後の一過性の術後痛に続き, 4 日前後よりアロディニアスコアの上昇, アロディニア閾値の低下, Guarding behavior (患肢の挙上時間)の増加, Limb-use abnormality スコアの上昇等の痛み関連行動が見られ始め, 以降漸次痛み関連行動強度は強くなった。がん細胞を移植した動物の術後痛は, 偽手術動物のそれに比べ著しく

弱いものであり、がん細胞移植動物では鎮痛作用が発現している可能性が考えられた、実際、この鎮痛作用は naloxone hydrochloride で完全に拮抗された。更に、naloxone hydrochloride の全身投与はがん細胞移植マウスの何れのステージにおいても、naloxone hydrochloride 投与直前の痛み関連行動の強度に比べ、アロディニア強度の明らかな増強や患肢がほぼ挙上したままの状態になる等の疼痛の増強作用を認め、がん細胞が内因性鎮痛関連ペプチドを産生・遊離してがん性疼痛の全てのステージにおいて疼痛を制御していることが示された。

・坐骨神経部分結紮によりアロディニアを惹起した神経障害性疼痛モデルマウスの対照肢大腿骨髄腔内および大腿部皮下組織へのがん細胞の移植により、移植 4-6 時間後には神経障害肢のアロディニア反応は有意に抑制され、移植 1 日後以降では坐骨神経障害脚に見られるアロディニア反応は殆んど消失した。対照として、凍結・溶解処理した死亡がん細胞を移植しても鎮痛作用は全く認められず、生体内でもがん細胞が実際に内因性鎮痛関連ペプチドを産生・遊離し、種々の疼痛反応を抑制的に制御していることが明らかとなった。

・申請者らが見出した内因性鎮痛関連ペプチドによる鎮痛作用は、血液脳関門を通過しない naloxone methiodide の全身投与では全く影響されず、中枢に移行する naloxone hydrochloride 全身投与により消失し、本内因性鎮痛ペプチドは血液脳関門を容易に通過し、中枢神経系の  $\mu$  オピオイド受容体に作用して鎮痛作用を惹起することが明らかとなった。血液脳関門を通過できるオピオイドペプチドは報告されておらず、既存のオピオイドペプチドとは異なった新規ペプチドである可能性が示唆される。

・加えて、がん細胞培養上清を投与したマウス及びがん細胞移植マウスにおいては、モルヒネ投与時に問題となる「便秘、嘔吐、排尿障害、挙尾反応、呼吸抑制、眠気」等の副作用および、マウスの一般症状（自発運動等）に変化は認められなかった。

これらの成果は、がん細胞が未知の内因性鎮痛ペプチドを産生・遊離して疼痛を抑制している可能性を実証するものであり、がん細胞から遊離された鎮痛ペプチドが血液脳関門を通過して、中枢神経系の  $\mu$  オピオイド受容体に作用して強力な鎮痛効果をもたらすことを示唆しており、本ペプチドが新しい内因性オピオイドペプチドである可能性が考えられる。

申請者らは脊髄グリシン受容体(GlyR) $\alpha$ 3 機能の抑制、即ち、脱抑制により疼痛が惹起されること(Morita et al., *Pain*, 2004; 2008). 更に、PAF 受容体拮抗薬およびグリシンのクリ

アランスを阻害するグリシントランスポーター(GlyT)阻害薬は GlyRa3 機能を亢進して、様々な疼痛モデルで等しく鎮痛効果を現すことを明らかにし (Morita et al., *JPET*, 2008; Dohi et al., *Pharmacol & Ther*, 2009), 下降性抑制系の賦活が原因の異なる様々な痛みにも有効な鎮痛薬となる可能性をしめしてきた。

本研究はこれを更に発展させたもので、がん細胞由来鎮痛関連物質を精製、同定することで、今まで知られている鎮痛薬とは全く異なった作用機序を有する新規の鎮痛薬開発のシーズとなるのではないかと期待される。当該物質はオピオイド神経活性を賦活して下降性抑制系の上流部位で機能する生体内物質であり、従来のオピオイド製剤とは異なり、依存性や耐性、副作用の少ない、がん性疼痛を初めとする原因の異なる種々の疼痛に対して普遍的に有効な鎮痛薬となる可能性を秘めている。

さらに、がん細胞由来鎮痛関連ペプチドの産生・遊離機構および鎮痛発現機序の解明は新しい疼痛治療法と安全な新規鎮痛薬開発の礎を構築し、新たな治療戦略の開拓、ターミナルケアにおける重要な薬剤の開発にブレイクスルーを与える可能性がある。

加えて、がん細胞が特異的に産生・分泌することが確立されれば「腫瘍マーカー」として基礎医学および臨床医学における学問的・社会的価値は非常に高いものと考えられる。

## 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0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 克也 (MORITA KATSUYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10116684

### (2) 研究分担者

本山 直世 (MOTOYAMA NAOYO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70509661

兼松 隆 (KANEMATSU TAKASHI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：10264053  
[H22]

白石 成二 (SHIRAIISHI SEIZI)  
国立がん研究センター研究所・がん疼痛研究室・室長  
研究者番号：90216177

北山 滋雄 (KITAYAMA SHIGEO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：80177873  
[H23]

(3)連携研究者

土肥 敏博 (DOHI TOSHIHIRO)  
日本薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：00034182

上園 保仁 (UEZONO YASUHITO)  
国立がん研究センター研究所・がん患者病態生理研究分野・分野長  
研究者番号：20213340