

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 6 月 7 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2010～2011
課題番号：	22791811
研究課題名（和文）	癌性骨痛の発生における酸感受性受容体の役割
研究課題名（英文）	The role of acid sensing nociceptors in the development of cancer-induced bone pain
研究代表者	
	中西 雅子 (Nakanishi Masako)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	60437382

研究成果の概要（和文）：骨転移モデル動物と蛍光色素を用いた検討から、骨転移巣は酸性に傾いていることが *in vivo* において示された。後根神経節ならびに神経系細胞株を用いた実験により、酸感受性受容体は骨転移巣において形成される酸性環境により刺激を受容し、神経伝達物質 CGRP の発現を増加させることで疼痛発現の一因を担っていることが推察された。

研究成果の概要（英文）：The pH-sensitive fluorescence dye indicated that acidic microenvironment was created in bone metastases of rats. It was suggested that acidic microenvironment activate acid sensing nociceptors in the sensory neurons, which in turn leads to up-regulation of CGRP expression. These events may be involved in the pathophysiology of bone pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：骨転移、癌性疼痛、酸感受性受容体

1. 研究開始当初の背景

骨転移に伴う疼痛は、NSAIDs のような末梢性鎮痛薬、あるいはモルヒネなどの中枢性鎮痛薬による除痛効果が得られない場合が多い。骨転移は、癌性疼痛の要因として最も頻

度が高いが、その痛みの発生メカニズムは複雑であり、未だ不明な点も多く残されている。

近年、新たな疼痛治療のターゲットとして Trpv1 (transient receptor potential vanilloid subtype 1) の拮抗剤が注目され、開発が進められている。カプサイシン受容体

として発見された Trpv1 は、熱や酸などの侵害刺激によっても活性化され、疼痛刺激の伝達に関与していることが明らかにされてきた。しかし、癌性骨痛における Trpv1 の関与については詳細なメカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

骨転移巣は、癌細胞、炎症細胞、さらには骨を破壊する破骨細胞などにより酸性環境を呈すると言われている。知覚神経より産生されるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は末梢において炎症を促進し、一方で中枢での疼痛の伝達に関与することが知られている。本研究計画では、骨転移巣における酸性環境と CGRP 発現の関連性、さらにその発現調節メカニズムについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ラット肺癌細胞株を F344 ラットの脛骨内へ接種し、骨転移モデルを作製した。このモデルに対し、酸性領域に集積する性質をもつ蛍光色素アクリジンオレンジを投与し、生体内での分布を検討した。

(2) 脛骨転移モデル動物から後根神経節

(DRG) を採取し、酸感受性受容体 (Trpv1、ASICs) の発現について免疫染色ならびにリアルタイム PCR 法により検討した。

(3) DRG の器官培養系あるいは神経系細胞株を用い、酸刺激に伴う CGRP の発現変化について検討した。また、Trpv1 ノックアウトマウスの DRG で同様の検討を行った。

(4) Trpv1 活性化に伴う細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、転写因子 CREB の発現抑制実験を行った。さらに、レポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降法により CGRP の転写活性について検討を加えた。

4. 研究成果

(1) アクリジンオレンジを投与したラットでは、腫瘍巣に一致して蛍光が認められ、骨転移巣が酸性環境を呈していることが示された (Fig. 1)。

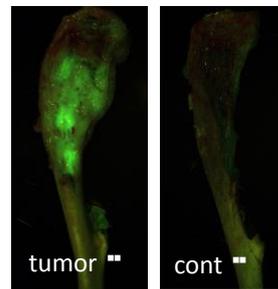
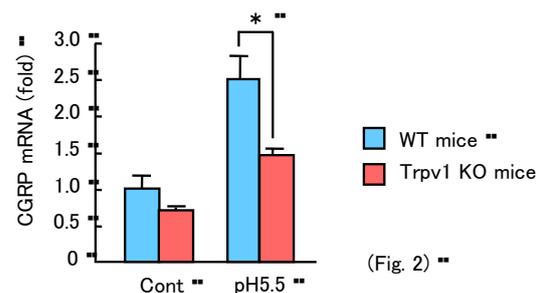


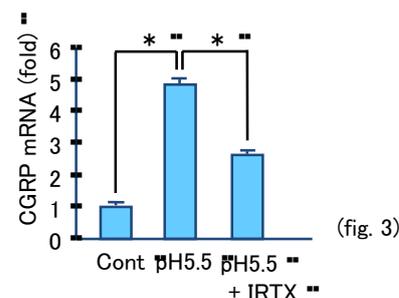
Fig.1

(2) DRG の免疫染色により、CGRP 陽性神経細胞において Trpv1 や ASIC の発現が認められたが、骨転移の有無による陽性細胞数の差は認められなかった。また、Trpv1 mRNA の発現は腫瘍接種側の DRG で増加した。

(3) DRG を酸性環境下 (pH5.5) で器官培養すると、CGRP mRNA の発現が著しく増加した。一方、Trpv1 ノックアウトマウスの DRG を pH5.5 で培養した場合、CGRP mRNA 発現の増加は野生型マウスに比較して有意に低下した (Fig. 2)。また、Trpv1 のアンタゴニストである IRTX は、pH5.5 による CGRP mRNA の発現増加を有意に抑制した (Fig. 3)。したがって、酸刺激は Trpv1 の活性化を介して CGRP の発現を増加させることが明らかとなった。

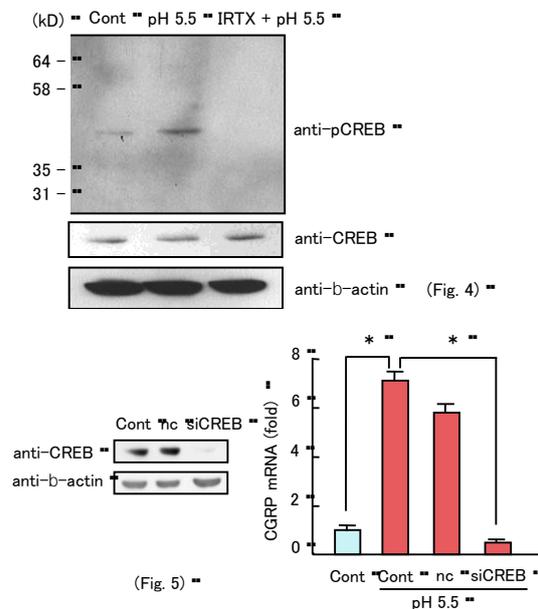


(Fig. 2)

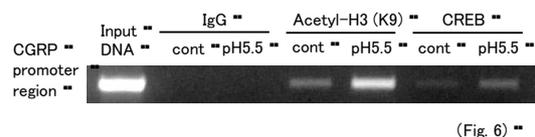


(fig. 3)

(4) DRG 初代培養細胞に酸刺激を行うと、転写因子 CREB のリン酸化が増強され、この効果は IRTX により抑制された (Fig. 4)。さらに siRNA により CREB の発現を抑制、あるいは A-CREB によりシグナルを阻害すると、酸刺激による CGRP mRNA の発現増加は有意に低下した (Fig. 5)。



(5) CGRP 遺伝子のプロモーター領域には、CREB の結合配列である CRE が存在することが分かった。そこで、CRE 配列を組み込んだコンストラクトを用いルシフェラーゼアッセイを行ったところ、酸刺激によるプロモーター活性の促進が認められた。しかし、CRE 配列を欠損、あるいは変異を導入させると、これらの効果は消失した。さらに ChIP アッセイにおいても、酸刺激によって CGRP 遺伝子の転写が促進されることと、プロモーター領域への CREB の結合の促進が確認できた (Fig. 6)。



以上の結果より、癌の骨転移が生みだす酸性環境は、知覚神経に発現している酸感受性受容体を活性化させ、CREB のリン酸化を介して CGRP の転写活性を誘導することが明らかと

なった。また、増強された CGRP が痛みの受容を変化させることで、癌性骨痛の発生に関与していることが推察された。

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 5 件)

(1) Nishisho T, Hata K, Nakanishi M, Morita Y, Sun-Wada H, Wada Y, Yasui N, Yoneda T. The $\alpha 3$ isoform vacuolar type H^+ -ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells. *Mol Cancer Res* 9: 845-855 (2011)

(2) Nakanishi M, Hata K, Yoneda T. [Encounter of cancer cells with bone. Molecular mechanism of cancer-induced bone pain.] *Clin Calcium* 21: 357-362 (2011)

(3) Hata K, Nakanishi M, Morita Y, Yoneda T. [Encounter of cancer cells with bone. The bone microenvironment and cancer metastasis.] *Clin Calcium* 21: 329-355 (2011)

(4) Yoneda T, Hata K, Nakanishi M, Nagae M, Nagayama T, Wakabayashi H, Nishisho T, Sakurai T and Hiraga T. Involvement of acidic microenvironment in the pathophysiology of cancer-associated bone pain. *Bone* 48: 100-105 (2011)

(5) Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H, Hiraga T, Ebisu S and Yoneda T. Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: A potential mechanism of inflammatory pain.

Mol. Biol. Cell. 21: 2568-2577 (2010)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) Masako Nakanishi, Kenji Hata, Toshiyuki Yoneda. Involvement of acidic microenvironment on the cancer-induced bone pain. 第 117 回日本解剖学会 2012 年 3 月 28 日 甲府

(2) 中西雅子、波多賢二、永山智崇、西庄俊彦、米田俊之 Up-regulation of CGRP expression by acid-activated calcium channel nociceptor Trpv1 is involved in bone pain. 第 5 回 Bone Research Seminar 2011 年 2 月 19 日 東京

(3) Masako Nakanishi, Kenji Hata, Tomotaka Nagayama, Toshihiko Nishisho, Toshiyuki Yoneda. Up-regulation of CGRP expression by acid-activated calcium channel nociceptor Trpv1 is involved in bone pain. The American Society for Bone and Mineral Research 2010 Annual Meeting 2010 Oct 18. Toronto, Canada

(4) 中西雅子、米田俊之 骨転移巣の酸性環境は TRPV1 の活性化による CGRP の発現増加を介して疼痛に関与する 第 69 回日本癌学会 2010 年 9 月 22 日 大阪

(5) 中西雅子、波多賢二、西庄俊彦、米田俊之 骨転移巣の酸性環境は知覚神経 TRPV1 の活性化による CGRP の発現増加を介して疼痛を誘発する 第 28 回日本骨代謝学会 2010 年 7 月 23 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 雅子 (Nakanishi Masako)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 60437382