

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390422

研究課題名(和文)プロトンによる骨痛誘発の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of cancer-associated bone pain caused by protons

研究代表者

米田 俊之(Yoneda, Toshiyuki)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：80142313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：骨痛はがんの骨転移に高頻度に併発し、がん患者のQOLを著しく低下させる。本研究では、腫瘍が形成する酸性環境に着目し骨痛誘発の分子メカニズム解明を行った。その結果、骨内で増大するがん細胞は酸性環境を形成し、がん細胞の細胞膜にはV型プロトンポンプが発現していることを見出した。また、後根神経節由来の初代培養感覚ニューロン細胞を用いたマイクロアレイ解析により、酸性環境により発現が誘導される遺伝子としてCGRPおよびSnap25を同定した。本研究結果より、骨転移がん細胞によるプロトン産生は後根神経節における疼痛関連遺伝子の発現を制御し骨痛を誘発するという、骨痛誘発の分子メカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Bone pain is one of the most common complications associated with bone metastasis. It causes increased morbidity and undermining QOL in cancer patients with bone metastasis. However, the molecular basis of bone pain remains unclear. We reasoned that acidic conditions contribute to bone pain, because cancer creates acidic extracellular microenvironment and acid is a well-known algogenic substance. We found that extracellular microenvironment of bone-colonizing cancer was acidic due to proton release via a V-ATPase proton pump expressed on plasma membrane. Microarray analysis using primary sensory neuron cells isolated from dorsal root ganglions (DRG) demonstrated that acidic microenvironment increased the transcription of several genes including CGRP and Snap25. Our findings suggest that acidic microenvironments created by cancer cells colonizing bone contribute to elicitation of bone pain through regulating the expression of algogenic genes in DRG sensory neurons.

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：口腔生化学

## 1. 研究開始当初の背景

“痛み”は生体に傷害や異変があることを警告し、防御対策をとらせるために生じる重要な感覚である。一方において痛みはあらゆる疾患において患者に多大の苦痛を与え、患者が何よりも恐れる症状であり、また治療担当医が患者管理上最も困難を極めるものの一つが痛みのコントロールである。さらに痛みは疾患の治癒を妨げ、慢性的な痛みは免疫能の抑制により二次的な疾患や感染を誘発する (*Textbook of Pain 4th ed, Wall PD, Melzack R eds, Churchill Livingstone, p. 1-10, p.331, 1999*)。しかしながら、痛みは主観的、情緒的、そして多様であり、その程度や質、あるいは治療効果を判定することは現状では非常に困難である。痛みの征圧を可能にするためには、痛みを客観的に、定量的に評価できる手段、すなわち痛みの分子レベルでの解析、理解が望まれる。

研究代表者は長年にわたる骨生物学研究、ならびにがん生物学研究の経験、蓄積から、**がんの骨転移による骨痛**を研究対象とした。骨転移による骨痛はがん患者に耐え難い痛みを与え、闘病意欲を失わせ、QOLを著しく低下させる。にもかかわらず現状では満足できる鎮痛療法が確立されていない。近年国内においては欧米に追随して肺がん、乳がん、前立腺がんが急増している。これらのがんはいずれも高頻度に骨に転移することから、今後我が国において骨痛の適切なマネジメントが喫緊の課題となることは疑う余地がない。我が国のKohnoらは乳がん患者における骨痛に関して報告 (*Kohno N et al, J Clin Oncol 23: 3314, 2005*) しているが、分子細胞レベルでの骨痛の研究は国内ではほとんど見当たらない。一方国外においては、がん患者の骨痛管理の重要性が比較的早くから認識されており、骨痛に対する臨床的解析 (*Mercadante S, Pain 69: 1, 1997*)、ならびに基礎的研究 (*Mantyh PW et al, Nature Rev Cancer 2: 201, 2002*) が我が国に先行して進められてきた。しかしながらこれらの国外の研究は生理学的、あるいは行動学的解析に基づくものであり、骨痛の実体を分子レベルで捉えるまでには至っていない。したがって、痛みの制圧のためにはこれまでの痛み研究には見られないアプローチによる骨痛の分子メカニズム解明が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

前述した研究背景を基盤として、本研究では、がんによる骨痛の分子メカニズム解

明のために、以下の3つの目的を設定した。

(1) 骨転移巣の酸性環境形成に寄与する細胞メカニズムの解明

骨転移巣にはがん細胞、炎症細胞、破骨細胞などが混在する。これらの細胞のプロトン酸性の有無、産生メカニズムと制御様式について検討する。

(2) 酸性環境が骨痛を誘発する分子メカニズムの解明

骨転移巣内で産生されるプロトンがどのような分子を介して末梢で痛みを誘発し、中枢に伝達するかを検討する。このプロジェクトにより、痛覚神経細胞が発現し、プロトンによる骨痛に関与する新規の分子の同定を試みる

(3) 酸性環境下で活性化される骨痛関与分子の発現調節メカニズムの解明

プロジェクト(2) で同定した因子の発現誘導を促進する痛覚神経細胞の細胞内シグナル経路を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) がんの骨転移モデルの作製

すべての動物実験は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査・承認を得た後に行った。肺がんの骨転移モデルは、6週齢の雄性 F344 ラットに、麻酔下にて右側脛骨骨髓内にラット肺腺癌細胞株 IP-B12 細胞 ( $2 \times 10^5$  個) を直接接種した。乳がんおよびメラノーマ細胞の骨転移モデルは、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞または B16-F10 細胞を、それぞれ  $1 \times 10^5$  個/生理食塩水 0.1ml で懸濁し、27G 針を用いて左心室に接種することにより作成した。腫瘍の増殖ならびに骨病変は X 線写真による骨透過像で確認した。

(2) アクリジンオレンジを用いた酸性環境の検討

骨転移腫瘍における酸性環境の検出は、酸性環境に集積する性質を有する蛍光物質アクリジンオレンジを用いて行った。すなわち骨転移が認められた動物に対し、アクリジンオレンジ溶液 ( $1.0 \text{mg/kg}$ ) を尾静脈より投与し、蛍光実体顕微鏡にてアクリジンオレンジの集積を観察した。

(3) 脊髄後根神経節 (DRG) 由来ニューロンの分離および初代培養

過剰麻酔により安楽死させた 8 週齢の雄性 SD ラットから、脊椎を摘出し、脊柱管を切り開いた後に頸部から腰部の DRG 神経細胞を採取した。PBS にて洗浄後、0.2% Collagenase (WAKO) にて 37 90 分、0.25% トリプシン (Sigma) にて 37 15 分の酵素処理を行った。トリプシンインヒビタ

ーを加えた後、30%パーコールにより密度勾配遠心分離法により DRG ニューロンを回収した。分離された DRG ニューロンは、PDL コートディッシュを用い F-12 培地で培養した。

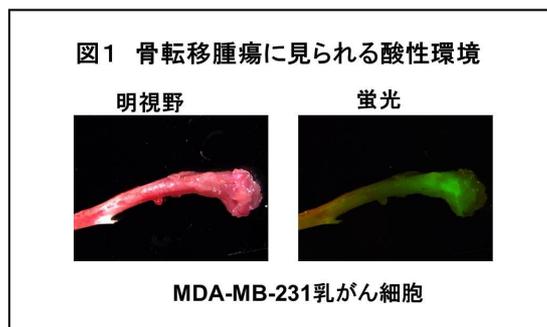
#### (4)マイクロアレイ

マイクロアレイ解析に用いるDRGニューロンはLONZA社より購入し、2mM L-Glutamine, 50 ug/ml Gentamicin/37 ng/ml Amphotericinおよび2% NSF-1を含む培地で培養した。乳酸でpH5.5に調整した培養液を用いて12時間酸性環境にて培養したのち、RNAを回収しAffymetrix社Gene Chip(Rat Genome 230 2.0 Array)により遺伝子発現の変化を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)骨転移腫瘍における酸性環境の形成

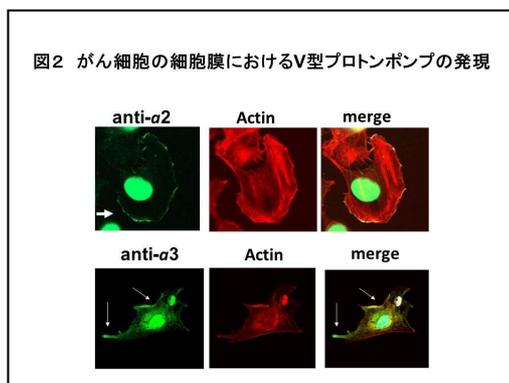
肺がん細胞、乳がん細胞およびメラノーマ細胞によって形成された骨転移腫瘍が、酸性環境を形成しているか否かを検討するために、アクリジンオレンジを骨転移モデル動物に投与し、蛍光顕微鏡下にてアクリジンオレンジの分布を検討した。その結果、骨転移腫瘍におけるアクリジンオレンジの集積が認められた(図1参照)。したがって、骨転移腫瘍は酸性環境を形成していることが明らかとなった。



#### (2)骨転移腫瘍細胞におけるプロトンポンプの発現

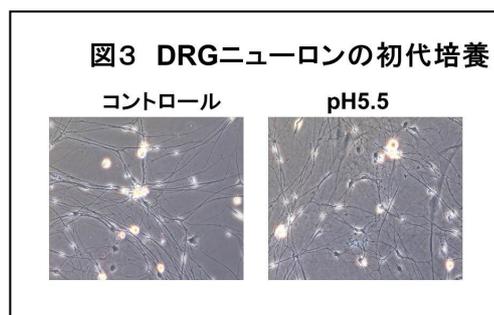
がん細胞や破骨細胞はプロトンポンプを介して細胞外へプロトンを放出することにより、酸性環境を形成する。そこで、がん細胞のプロトン産生の分子メカニズムを知るために、破骨細胞で高発現する液胞性(V型)プロトンポンプのアイソフォームであるa1~4, c, c', d1, d2に着目し、その発現をRT-PCRにより検索した。その結果、骨転移がん細胞ではa2型およびa3型V型プロトンポンプを強く発現することを見出していた。さらに、細胞免疫染色によりプロトンポンプの発現部位を検討した結果、a2型およびa3型V型プロトンポンプともに細胞膜に発現していることを見出した(図2参照)。これらの結果より、がん細胞は

細胞膜に発現するV型プロトンポンプa2およびa3を介してプロトンを細胞外へ放出し、酸性環境を形成している可能性が示唆された。



#### (3)プロトンにより発現誘導される遺伝子の同定

酸性環境が骨痛を誘発する分子メカニズムを解明するために、初代培養 DRG ニューロンを用いて、酸刺激によって発現誘導される遺伝子の検索を行った。ラット DRG より神経細胞を採取し、pH5.5に調整した培養液により12時間培養した後、RNAを回収し、マイクロアレイ解析を行った。pH5.5の培養液で12時間培養しても、DRGニューロンに形態学的変化や顕著な細胞毒性が見られないことを確認している(図3参照)。

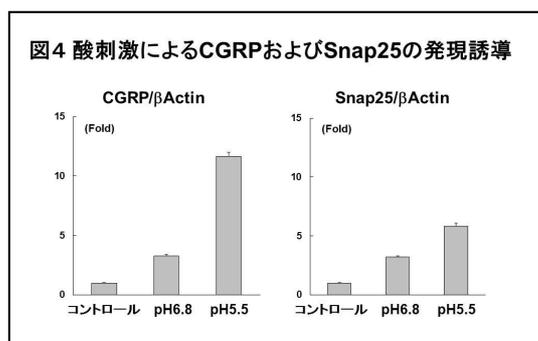


マイクロアレイ解析の結果、コントロール群の細胞に比較して酸性刺激によって2倍以上発現が増加する遺伝子を690個クローニングした。これら遺伝子の中には、痛み関連ペプチドの一つであるCGRPが含まれていた。Gene Ontology Biological Processによる分類で、神経細胞の機能に關与する遺伝子の絞り込みを行い、neurotransmitter secretionを10個、synaptic transmissionを15個、neuron migrationを6個クローニングした。興味深いことに、これら遺伝子の中にはシナプス前膜に存在し、神経伝達物質の開口放出に必要なタンパク質 Synaptosomal-associated protein-25 (SNAP-25) が含ま

れていた。

#### (4)プロトンにより誘発される遺伝子の発現制御メカニズムの解明

実験(3)によりクローニングされた遺伝子の中から、CGRP および Snap25 に着目し、その発現制御メカニズムについて検討した。初代培養 DRG ニューロンを酸刺激したところ、培養液中のプロトン含有量に比例して遺伝子発現の増加がみられた(図4参照)。



研究代表者らは、プロトンは末梢の知覚神経に発現する酸感受性受容体 Trpv1 を活性化し、さらに転写因子 CREB を活性化することにより CGRP の分泌および合成を制御することを明らかにしている(Nakanishi M et al MCB 2010)。そこで、Snap25 の発現に CREB が関与するか否かを、マウス、ラットおよびヒトの Snap25 遺伝子プロモーター解析により検討した。その結果、転写開始点からマウスでは -19bp 上流、ラットでは 63bp 上流に、ヒトでは -15bp 上流に、CREB 応答配列である TGACGTCA が高度に保存されていることを見出した。

本研究より、1. 骨転移がん細胞は V 型 ATPase を介してプロトンを細胞外へと放出し酸性環境を形成する、2. プロトンは DRG ニューロンの Trpv1-CREB 経路の活性化し CGRP および Snap25 の発現を促進する、3. これらの結果、酸性環境は痛み関連ペプチドの産生および分泌を増強することにより、癌性骨痛の誘発に関与している可能性が明らかとなった。

#### 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10件)

1. Morita Y, Morita N, Hata K, Nakanishi M, Kimoto N, Omata T, Nakamura Y, Yoneda T. Cyclooxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor-c and lymph node metastasis in human oral tongue cancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2014 Apr;

117(4):502-510. doi:10.1016/j.oooo.2013.12.410.査読有り

2. Soen S, Fukunaga M, (他 9 名) Yoneda T, Tomomitsu T, Japanese Society for Bone and Mineral Research and Japan Osteoporosis Society Joint Review Committee for the Revision of the Diagnostic Criteria for Primary Osteoporosis. Diagnostic criteria for primary osteoporosis: year 2012 revision. J Bone Miner Metab 2013 31:247-257 (2013) 査読有り
3. Yoneda T, Tanaka S, Hata K. Role of RANKL/RANK in primary and secondary breast cancer. World J Orthop. 2013 Oct 18;4(4):178-185.
4. Hiraga T, Myoui A, Hashimoto N, Sasaki A, Hata K, Morita Y, Yoshikawa H, Rosen CJ, Mundy GR, Yoneda T. Bone-derived IGF mediates crosstalk between bone and breast cancer cells in bony metastases. Cancer Res. 2012 Aug 15;72(16):4238-4249. 査読有り
5. Morita Y, Hata K, Nakanishi M, Nishisho T, Yura Y, Yoneda T. Cyclooxygenase-2 promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2012 Sep;41(3):885-892. doi: 10.3892/ijo.2012.1529. 査読有り
6. Oda M, Iwaya K, Kikuchi R, Kobayashi T, Yoneda T, Nishikawa, Matsubara O, Kohno N. Stathmin is involved in the cooperative effect of zoledronic acid and gefitinib on bone homing breast cancer cells in vitro. J Bone Oncol 2012 1: 40-46 査読有り
7. Nishisho T, Hata K, Nakanishi M, Morita Y, Sun-Wada GH, 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. 2011 Jul;9(7):845-55. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0449. 査読有り
8. Yoneda T, Hata K, Nakanishi M, Nagae M, Nagayama T, Wakabayashi H, Nishisho T, Sakurai T, Hiraga T. Involvement of acidic micro environment in the pathophysiology of cancer-associated bone pain. Bone. 2011 Jan;48(1):100-105. doi: 10.1016/j.bone.2010.07.009. 査読有り
9. Yoneda T, Hata K, Nakanishi M, Nagae M, Nagayama T, Wakabayashi H, Nishisho T, Sakurai T, Hiraga T. Molecular events of acid-induced bone

- pain. IBMS BoneKey 2011 8: 195-204 査読有り
10. Mandal CC, Ghosh-Choudhury N, Yoneda T, Choudhury GG, Ghosh-Choudhury N. Simvastatin prevents skeletal metastasis of breast cancer by an antagonistic interplay between p53 and CD44. J Biol Chem 2011 286: 11314-11327 査読有り  
〔学会発表〕(計 1 1 件)
  1. Hata K, Morita Y, Nakanishi M, Nishisyo T, Yoneda T The docking protein NEDD9 is a novel regulator of vicious cycle between breast cancer and bone in bone metastasis. 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research 2012/5/30 Kobe, Japan
  2. Yoneda T, Tanaka S, Hata K, Roodman D, Nishimura R. Zoledronic Acids Inhibits Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) of Breast Cancer Cells in Bone via Ubiquitin/Proteasome System The American Society for Bone and Mineral Research 2012 35th Annual Meeting 2013/10/4 Baltimore Maryland, USA
  3. Yoneda T, Tanaka S, Hata K, Roodman D, Nishimura R. Involvement of ubiquitin/proteasome system in the regulation of epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells in bone 13th International Conference on Cancer-Induced Bone Disease 2013/11/8 Miami, Florida, USA
  4. 米田俊之 「骨転移の分子メカニズム」 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012/10/26 名古屋 (招待講演)
  5. 米田俊之 「骨微小環境と癌」第 30 回日本骨代謝学会 2012/7/20 東京 (招待講演)
  6. Tanaka S, Yoneda T The De ubiquitinating Enzyme USP45 Is Critical to Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) in Breast Cancer Cells Colonized Bone The American Society for Bone and Mineral Research 2012/10/13 34th Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA
  7. Yoneda T. Role of acid micro environment in bone pain associated with bone metastasis. Skeletal Biology Workshop in Shanghai, Shanghai, China, 2011/6/26 (招待講演)
  8. 米田俊之 「骨は癌のチューター」特別講演 第 29 回日本骨代謝学会 2011/7/30 大阪 (招待講演)
  9. Yoneda T Crosstalk between metastatic cancer cells and bone microenvironment. Traditional Chinese Medicine International Forum 2011 in Shanghai, 2011/11/17 Shanghai, Republic of China (招待講演)
  10. Yoneda T. Bone pain associated with cancer metastasis to bone. Plenary lecture at ANZBMS/ JSBMR Joint Meeting and IOF Regionals 2<sup>nd</sup> Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting, 2011/9/6 Gold Coast, Queensland, Australia (招待講演)
  11. Yoneda T. Molecular events involved in bone pain. 2<sup>nd</sup> World University Network Symposium in Oral Health Sciences. 2011/11/6 Leeds, UK (招待講演)
- 〔図書〕(計 6 件)
1. 米田俊之 骨転移の成立— 1 . 癌の進展と血流循環性腫瘍細胞/播種性腫瘍細胞との関連 米田俊之、松本俊夫 編「癌と骨」メディカルレビュー社 2013:49-58
  2. 田中宗一、波多賢二、米田俊之 上皮間葉転換と骨転移 米田俊之、松本俊夫 編「癌と骨」メディカルレビュー社 2013:69-78
  3. 波多賢二、田中宗一、米田俊之 骨転移の骨病変形成メカニズム 1. 乳癌 米田俊之、松本俊夫 編「癌と骨」メディカルレビュー社 2013:121-128
  4. 中西雅子、波多賢二、米田俊之 骨転移による疼痛の分子メカニズム 米田俊之、松本俊夫 編「癌と骨」メディカルレビュー社 2013:180-188
  5. 波多賢二 癌に伴う骨病変の発症機序 松本俊夫、萩野浩 編「ファーマナビゲーター ビスホスホネート編」メディカルレビュー社 2013:84-93
  6. 米田俊之 編 「がん骨転移のバイオロジーとマネージメント」医薬ジャーナル社 2012
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

米田 俊之 (YONEDA TOSHIYUKI)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：80142313

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

波多 賢二 (HATA KENJI )

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：80444496

田中 宗一 (TANAKA SOICHI)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20548200