

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592318

研究課題名(和文) 癌性疼痛治療におけるオピオイド非感受性に対するmiRNAの役割

研究課題名(英文) Role of miRNA for the opioid tolerance in cancer pain treatment

研究代表者

白石 成二 (SHIRAIISHI, Seiji)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90216177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、がん患者のオピオイドに対する感受性の低下とmiRNAの変化の関係を明らかにすることである。乳がん骨転移痛モデルラットを作製し、miRNAの変化を解析した。対照と比較して2倍以上増加したmiRNAは56個で、1/2以下に減少したのは9個であった。この異常miRNAのうちlet-7についてμオピオイド受容体をDAMGOで刺激した時の活性と細胞膜での発現に対する影響を検討したが、ばらつきが多く一定の結果に至っていない。他の異常miRNAにはmiR-20a、miR-21、miR-23b、miR-133a、miR-133bなどが含まれていた。

研究成果の概要(英文)：A purpose of this study was to determine the relation of the opioid tolerance and the changes of miRNA in cancer pain treatment. We established a breast cancer bone pain model rat and analyzed the changes of miRNA using miRNA array kit. Hyperalgesia and allodynia symptom significantly occurred after breast cancer cells transplant from one week. We sampled two weeks after transplant and measured miRNA. 56 miRNA increased more than double as compared with the control and 9 miRNA decreased in less than half. We examined the effects of let-7 among this abnormal miRNA on the activity of u-opioid receptor stimulated by DAMGO and on expression of u-opioid receptor on cell surface membrane. However there was much unevenness and did not lead to constant results. miR-20a, miR-21, miR-23b, miR-133a, and miR-133b were included in other abnormal miRNA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔科学

キーワード：癌 miRNA モルヒネ

## 1. 研究開始当初の背景

がん患者の痛みは、がん病変の治療を受けている患者の 30-50%に、進行がん患者では 70-90%に見られ、QOL を低下させている最も大きな原因である。なかでも骨転移による痛みや、腫瘍の神経浸潤に伴って発生する神経障害性疼痛は難治性であり、オピオイドの感受性は低く治療に難渋する。このオピオイドの感受性低下の原因は、がん骨転移痛モデルマウスで脊髄と後根神経節の  $\mu$  オピオイド受容体 (MOR) 発現の低下が指摘されている (Neuroscience.151:843-53, 2008)。細胞膜の MOR にオピオイドが結合すると MOR がインターナリゼーションし、また  $\mu$ - のヘテロ 2 量体化すると感受性が低下すること (J.Biol.Chem.275:26128-26135,2000) など報告されている。しかし、その発生メカニズムはまだ十分には解明されていない。

一方、内在性の small non-coding RNA の 1 つであるマイクロ RNA (miRNA) は、自身の塩基配列と相補性を有する mRNA を標的として遺伝子の発現調節を行っている。たとえば、ストレス時にはグルココルチコイド受容体が miRNA によってダウンレギュレーションされ (Endocrinology 150: 2220 -2228, 2009)、炎症性疼痛によって三叉神経節の miRNA が特異的にダウンレギュレーションされる (Mol Pain 3:15 2007)。最近、この miRNA の異常はがんの発生 (Mammalian Genome.18:316-327,2007) や抗がん剤に対する耐性獲得と密接に関係している (Cancer Res.68:425-433,2008) ことが注目されている。

そこで、がん患者の病態において見られる miRNA の異常がオピオイド受容体の細胞膜での発現やオピオイド感受性の低下と関係があるのではないかと考えられ、その関係を解明できればがん性疼痛の新たな鎮痛法を開発することが可能と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、がん患者の病態において見られる miRNA の異常と細胞膜での  $\mu$  オピオイド受容体 (MOR) の発現の変化やオピオイドに対する感受性の低下の関係を明らかにし、がんの難治性骨転移痛やオピオイド耐性の発生メカニズムを解明することである。さらに、この miRNA の異常を是正することによってがん性疼痛の新たな鎮痛法を開発することである。

## 3. 研究の方法

実験 1 がん骨転移痛モデルを作製し、miRNA の解析を行う

1) 8 週齢 Female Fischer 344 ラットを麻酔下に左大腿骨骨髓内に、乳がん細胞を移植してがん骨転移痛モデルを作製した。コントロールには培養液を注入した。疼痛過敏とアロディニアを von Frey test、gurdling Limb-use abnormality、Guarding behavior、paintbrush touch test を用いて評価した。

2) コントロールと骨転移痛モデルを 2 週間後にサンプリングし miRNA アレイキットにて miRNA を解析した。これにより異常 miRNA を網羅的に測定した。

実験 2 異常な miRNA の  $\mu$  オピオイド受容体の活性に対する影響を調べる

1) HEK293 に  $\mu$  オピオイド受容体を発現させ異常 miRNA の影響を調べた。 $\mu$  オピオイド受容体のアゴニストである DAMGO で刺激した時の活性をラベルフリーセルベースアッセイシステム CellKey system にて調べた。

2)  $\mu$  オピオイド受容体の細胞膜での発現に対する異常 miRNA の影響を調べる。

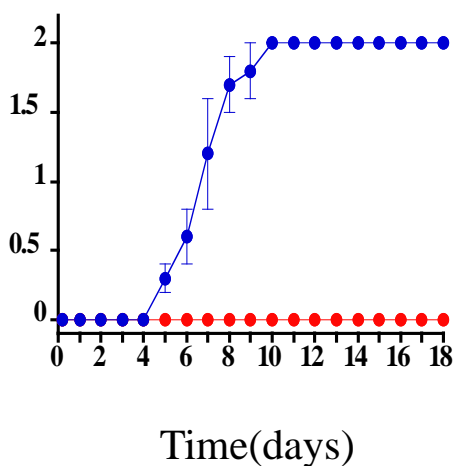
HEK293 に  $\mu$  オピオイド受容体を発現させ、異常 miRNA も導入し、細胞膜での  $\mu$  オピオイド受容体の発現変化を調べた。

## 4. 研究成果

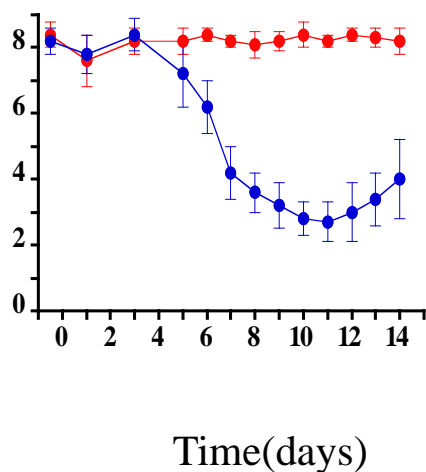
実験 1 8 週齢 Female Fischer 344 ラットを麻酔下に左大腿骨骨髓内に、乳がん細胞を

移植してがん骨転移痛モデルを作製した。疼痛過敏とアロディニアを von Frey test、guarding Limb-use abnormality、Guarding behavior、paintbrush touch test を用いて評価した。乳がん細胞移植後1週間から有意に疼痛過敏とアロディニアが発生し、進行性に悪化し2週間でピークに達した。

### Allodynia-like behavior



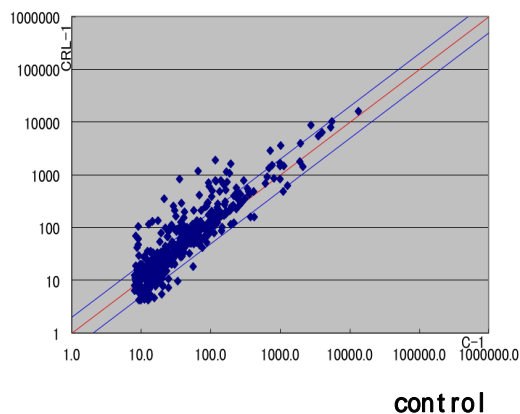
### Von Frey test



● sham op  
● breast cancer

移植2週間後に深麻酔下にサンプリングを行い、miRNA アレイキットにて miRNA を解析した。

### 大腿骨転移2週間後ラットのmiRNA変化



がん骨転移モデルラットにて変化の見られた miRNA

がん骨転移モデルラットで増加した miRNA:  
let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7i, miR-140\*, miR-20a, miR-10a-5p, miR-15b, miR-16, miR-17-5p, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-26a, miR-92a, miR-99a, miR-126, miR-130a, miR-133a, miR-191, miR-223, miR-451, miR-1, miR-133b, miR-20b-5p, miR-20b-5p, miR-378\*, miR-505, miR-30c-1, miR-204\*, miR-1224, miR-92a-2, miR-208\*, miR-433\*, miR-3065-3p, miR-351, miR-206, miR-210, miR-221, miR-291a-5p, miR-675

がん骨転移モデルラットで減少した miRNA:  
miR-327, miR-296, miR-598-5p, miR-615, miR-678, miR-211\*, miR-365\*, miR-758\*, miR-770\*

### 実験 2

1) HEK293 細胞に恒常的に  $\mu$ -オピオイド受容体を発現させて、DAMGO で刺激した時の  $\mu$ -オピオイド受容体活性をラベルフリーセルベースアッセイシステム CellKey system にて調べた。この活性に対する異常 miRNA による影響を検討した。異常 miRNA の1つである

let-7 について検討を行ったが、DAMGO による活性に対して変化はなかった。ただし let-7 が影響したかどうか確認できていない。

2)  $\mu$ -オピオイド受容体の細胞膜での発現に対する異常 miRNA の影響を HEK293 に  $\mu$ -オピオイド受容体を発現させて検討した。let-7 を導入し、細胞膜での  $\mu$ -オピオイド受容体の発現変化を調べた。しかし、let-7 導入のばらつきのためか一定の結果に至っていない。

今回の研究結果では異常 miRNA の数が多くすべての miRNA を検討できなかった。今回変化の見られた let-7、miR-20a、miR-21、miR-23b、miR-133a、miR-133b などは  $\mu$ -オピオイド受容体との関連が報告されており、オピオイド耐性との関連が示唆されるが直接のエビデンスは得られていない。実験方法について miRNA の導入法の改善を検討中である。

5. 主な発表論文等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

白石 成二 (SHIRAISHI, Seiji)  
独立行政法人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ユニット長  
研究者番号：90216177

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

森田 克也 (MORITA, Katuya)  
広島大学歯科薬理学 准教授  
研究者番号：10116684