

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号： 82606
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2011～ 2012 年度
 課題番号： 23790315
 研究課題名（和文） がん性疼痛における TRPC3 の機能解析とその機能に基づいた新規鎮痛薬の評価
 研究課題名（英文） The involvement of TRPC3 channels in the anti-cancer drug-induced peripheral neuropathy
 研究代表者
 宮野 加奈子 (MIYANO KANAKO)
 独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員
 研究者番号： 50597888

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、がん患者の疼痛病態時における TRPC3 チャネルの機能を解明することである。申請者は、抗がん剤治療時に発症する末梢神経障害に着目し、抗がん剤 carboplatin 投与による痛覚異常モデル動物を作製し、TRPC3 の発現変化と pyrazole-3 の鎮痛効果について解析した。その結果、saline 投与群と比較し carboplatin 投与群の脊髄後角、並びに脊髄後根神経節の TRPC3 発現量に有意な変化は認められなかった。次に、TRPC3 拮抗薬 pyrazole-3 の鎮痛効果を評価したところ、carboplatin 投与による痛覚異常を有意に改善した。以上の結果より、carboplatin 投与による痛覚異常には TRPC3 の発現増加ではなく活性化が関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The object of this study is to reveal the role of TRPC3 channel on cancer patients with severe pain. The present study is focused on the chemotherapy-induced peripheral neuropathy. We examined the expression levels of TRPC3 protein and analgesic effects of a TRPC3 antagonist pyrazole-3 using anti-cancer drug carboplatin-induced neuropathic pain model mice. The results showed that the expression levels of TRPC3 protein spinal cord dorsal horn and dorsal root ganglion from carboplatin-induced neuropathic pain model mice did not change. However, pyrazole-3 suppressed the carboplatin-induced neuropathic pain. These findings suggest that the activation of TRPC3, but not the expression levels of TRPC3 could be involved in the carboplatin-induced neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：TRP チャネル, 疼痛, 抗がん剤, 末梢神経障害

1. 研究開始当初の背景

現在、満足できる疼痛コントロールができていないがん患者は少なく、より効果的な治療法の開発が求められている。近年、がん性疼痛の発生・維持には一次知覚神経のみならず脊髄アストロサイトも関与すること、さらにこれらの両者の細胞に 6 回膜貫通型陽イオンチャネル transient receptor potential

(TRP) superfamily の一つである TRPC3 が発現していることが明らかとなった。TRPC3 は phospholipase C (PLC) の活性化に伴い産生・誘導される diacylglycerol や inositol triphosphate (IP₃) 感受性 Ca²⁺ ストアの枯渇により開口する Ca²⁺ チャネルであり、細胞内 Ca²⁺ の恒常性維持に重要な役割を果たしている。一次知覚神経および脊髄アストロサイト

には、がん性疼痛の発生・維持に関与する種々の PLC-linked receptor を発現していることから、複雑な痛みを呈するがん疼痛に一次知覚神経および脊髄アストロサイトに発現する TRPC3 が関与している可能性がある。しかし、がん性疼痛発生・維持における TRPC3 の役割について調べた報告は未だない。そこで、本研究は、一次知覚神経と脊髄アストロサイトの両者に発現する TRPC3 ががん性疼痛発生・維持に重要な役割を有していると考え、それをターゲットにすれば効率的な鎮痛が得られるのではという独自の発想に基づき計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん性疼痛病態時の疼痛伝達における TRPC3 の役割を明らかにすることである。本研究では、抗がん剤治療時に発症するしびれ、痛みなどをはじめとする末梢神経障害に着目し、抗がん剤投与による神経障害性疼痛における TRPC3 の役割について解析した。抗がん剤投与による末梢神経障害モデル動物を作製し、一次知覚神経および脊髄における TRPC3 の発現解析、並びに疼痛評価を行った。さらに、最近開発された TRPC3 拮抗薬 pyrazole-3 の鎮痛効果を評価することにより、新規鎮痛薬としての基礎的なデータを蓄積し、臨床応用の基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 抗がん剤投与による末梢神経障害モデル動物の作製

雄性 C57BL マウス (6 週齢) に抗がん剤 carboplatin を 10 mg/kg/回で週 2 回、合計 4 回腹腔内投与した。本実験を遂行するにあたり、独立行政法人国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針に従って行った。

(2) 疼痛評価

国際疼痛学会の指針に従い、以下①～③に示す方法を用いて疼痛評価を行った。

① von Frey test

マウスの後肢を様々な太さ (g) の von Frey filament で刺激し、肢をふる、なめるなどの逃避反応を測定した。

② Acetone test

マウス後肢に acetone をたらし、2 分間あたりの逃避反応時間を測定した。

③ Hot plate test

マウスを 55°C の plate の上にのせ、逃避反応を示すまでの時間を測定した。

(3) Western blot 解析

マウスより脊髄、並びに脊髄後根神経節を採取し、タンパクを抽出した。SDS-PAGE で分離後、nitrocellulose 膜にブロッキングさせた。ブロッキング後、一次抗体 (anti-TRPC3

antibody; 1:200, anti-GAPDH antibody; 1:1000) 反応させた。洗浄後、2 次抗体に反応させ、発光試薬を用いて検出した。

4. 研究成果

(1) 抗がん剤 carboplatin 投与による神経障害性疼痛の発生

抗がん剤 carboplatin をはじめとする白金製剤を用いた化学療法により、しびれや痛覚異常を引き起こすことが知られている。そこで、マウスに carboplatin を投与し経時的に疼痛評価を行った。その結果、von Frey test により carboplatin 投与回数依存的に疼痛閾値の低下、すなわち mechanical allodynia (通常痛みを感じない機械刺激に対して痛いと感じる症状) が観察された。また、Acetone test により、carboplatin 投与開始 1 日目から acetone 刺激による疼痛反応が増加し、cold hyperalgesia (冷刺激に対して過敏になる症状) が観察された。Hot plate test では、saline 投与群と carboplatin 投与群では熱刺激に対する疼痛逃避反応に有意な変化は認められなかった。これらの結果より、carboplatin が mechanical allodynia および cold hyperalgesia を引き起こすことが明らかとなった。

(2) carboplatin 投与による神経障害性疼痛発生時における脊髄後角、並びに一次知覚神経における TRPC3 の発現変化

carboplatin 投与による神経障害性疼痛発生時における脊髄アストロサイト、並びに一次知覚神経における TRPC3 の発現変化について解析するために、carboplatin 投与による神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄後角、並びに一次知覚神経の細胞体が存在する脊髄後根神経節における TRPC3 発現量を Western blot 解析を用いて測定した。その結果、saline 投与群、並びに carboplatin 投与群の脊髄後角および脊髄後根神経節において、TRPC3 発現量に有意な変化は認められなかった。

(3) carboplatin 投与による神経障害性疼痛に対する TRPC3 拮抗薬の効果

carboplatin 投与による神経障害性疼痛モデルマウスの腹腔内に pyrazole-3 (30 mg/kg) を投与後、疼痛評価を行った。Saline 投与群では pyrazole-3 (30 mg/kg) 腹腔内投与により鎮痛効果が認められなかったが、carboplatin 投与群では mechanical allodynia、並びに cold hyperalgesia を有意に改善した。以上の結果より、TRPC3 阻害薬 pyrazole-3 は、健常状態の痛覚に影響を与えないが、carboplatin 治療により感受性が亢進した痛覚に対して鎮痛作用を發揮し、mechanical allodynia や cold hyperalgesia

を抑制することが示唆された。

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 3 件)

(1) Uezono Y, Miyano K, Sudo Y, Suzuki M, Shiraishi S, Terawaki K. A review of traditional Japanese medicines and their potential mechanism of action. *Curr. Pharm. Des.* 18, 4839-4853, 2012. 査読有

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632864>)

(2) Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, Furuta S, Kawamata T, Ashikawa M, Miyano K, Yanagihara K, Chiwaki F, Ochiya T, Suzuki T, Matoba M, Sasaki H, Uezono Y. Sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied by changes in the expression of substance P and μ -opioid receptors in the spinal cord of mice. *Anesthesiology*. 117, 847-856, 2012. 査読有

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22913923>)

(3) Nakamura Y, Une Y, Miyano K, Abe H, Hisaoka K, Morioka N, Nakata Y. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 evokes nociception through substance P release from primary sensory neurons. *J Neurochem*. 120, 1036-1047, 2012. 査読有

(DOI:10.1111/j.1471-4159.2011.07628.x.)

[学会発表] (計 23 件)

(1) Miyano K, Minami K, Yokoyama T, Ohbuchi K, Yamamoto M, Shiraishi S, Matoba M, Uezono Y. An analgesic drug tramadol selectively modulates the activity of TRPA1 but not TRPV1. The 86th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Fukuoka/Japan, March 21-23 2013.

(2) Sudo Y, Hojo M, Murata H, Yokoyama A, Miyano K, Suzuki M, Shiraishi S, Higami Y, Uezono Y. Desensitization of GABA_B receptor may not be involved in the process of receptor internalization because of disassociation of β -arrestins. The 86th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Fukuoka/Japan, March 21-23 2013.

(3) Yokoyama A, Sudo Y, Miyano K, Suzuki M, Shiraishi S, Hirayama S, Hayashida K, Fujii H, Sakai J, Kanda T, Nakata E, Nagase H, Higami Y, Uezono Y. Development and screening of novel delta opioid receptor-specific agonists with a label-free, cell-impedance-based CellKey™ system. The Japanese Pharmacological Society, Fukuoka/Japan, March 21-23 2013.

(4) Terawaki K, Kashiwase Y, Sawada Y, Suzuki M, Miyano K, Sudo Y, Shiraishi S, Higami Y, Kase Y, Yanagihara K, Uezono Y. Ghrelin resistance in a novel cancer cachexia model and its effects of Rikkunshito by enhancement of ghrelin signaling. The Japanese Pharmacological Society, Fukuoka/Japan, March 21-23 2013.

(5) 上園保仁, 寺脇潔, 柏瀬陽平, 澤田祐美, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 須藤結香, 横山明信, 小柳尚史, 白石成二. がん性悪液質の予防・治療薬の開発 - 漢方薬を中心とした基礎から臨床にいたる橋渡し研究 -, 第 6 回日本緩和医療薬学会年会, 2012 年 10 月 6-7 日, 神戸.

(6) Miyano K, Shiraishi S, Suzuki M, Sudo Y, Sawada Y, Terawaki K, Uezono Y. Transient receptor potential ankyrin 1 channel contributes to the carboplatin-induced peripheral neuropathy. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo/Japan, September 19-21 2012.

(7) Terawaki K, Yanagihara K, Sawada Y, Kashiwase Y, Suzuki M, Miyano K, Sudo Y, Shiraishi S, Higami Y, Uezono Y. Establishment and pathophysiology of novel animal models of cancer cachexia by a human gastric cancer cell line. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo/Japan, September 19-21 2012.

(8) Kashiwase Y, Terawaki K, Sawada Y, Sudo Y, Yanagihara K, Suzuki M, Miyano K, Shiraishi S, Higami Y, Uezono Y. Ameliorative effects of Rikkunshito on novel cancer cachexia animal model and the mechanism through ghrelin signaling. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo/Japan, September 19-21 2012.

- (9) 鈴木雅美, 成田年, 芦川真帆, 川股知之, 宮野加奈子, 鈴木勉, 的場元弘, 上園保仁. がんの腹膜播種病態下におけるモルヒネ抵抗性メカニズムの解析, 第32回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2012年9月15-16日, 東京
- (10) 小野堅太郎, 人見涼露, 宮野加奈子, 太田洋二郎, 上園保仁, 的場元弘, 稲永清敏. 口内炎誘発疼痛解析のための覚醒下ラット口腔内刺激法の開発. 第6回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会, 2012年7月8日, 東京.
- (11) Kono T, Kaneko A, Matsumoto C, Hibino T, Shigenobu T, Miyano K, Fukutake M, Uezono Y. Amelioration of 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters by TJ-14 (Hagesyashinto), inhibitor of inducible prostaglandin E2 and proinflammatory cytokines. Digestive Disease Week 2012, San Diego/USA, May 19-22 2012.
- (12) Miyano K, Shiraishi S, Ohbuchi K, Sudo Y, Suzuki M, Terawaki K, Yamamoto M, Matoba M, Uezono Y. Carboplatin enhances the activity of human transient receptor potential ankyrin 1 through cyclic AMP-protein kinase A pathways. The 85th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Kyoto /Japan, May 14-16 2011.
- (13) Sudo Y, Hojo M, Miyano K, Suzuki M, Terawaki K, Shiraishi S, Nishida N, Uezono Y. Cell surface expression and functional assay of signal peptide-attached Halo Tag-GPCR. The 85th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Kyoto /Japan, May 14-16 2011.
- (14) Terawaki K, Yanagihara K, Sawada Y, Kashiwase Y, Suzuki M, Miyano K, Sudo Y, Shiraishi S, Uezono Y. Establishment of novel animal models of cancer cachexia by transplantation of human gastric cancer cell lines and effects of rikkunshito, a traditional Japanese medicine, on the cancer cachexia models. 6th Cachexia Conference, December 9 2011 in Milan/Italy.
- (15) Nakamura Y, Une Y, Abe H, Miyano K, Hisaoka K, Morioka N, Nakata Y. Transient receptor potential ankyrin 1 mediates substance P release in primary sensory neurons. Neuroscience 2011, Washington, DC /USA, November 13 2011.
- (16) 宮野加奈子, 白石成二, 大淵勝也, 須藤結香, 鈴木雅美, 寺脇潔, 山本雅浩, 上園保. carboplatinはprotein kinase A を介して transient receptor potential ankyrin 1 活性を増強させる. 第64回日本薬理学会西南部会, 2011年11月20日, 福岡.
- (17) 上園保仁, 須藤結香, 宮野加奈子, 柏瀬陽平, 澤田祐美, 寺脇潔, 鈴木雅美, 小柳尚史, 樋上賀一, 白石成二. ラベルフリーで細胞機能をアッセイ出来るシステム、Cellkey™を用いた各種 GPCR, Ion channel の活性評価. 第64回日本薬理学会西南部会, 2011年11月20日, 福岡.
- (18) 須藤結香, 宮野加奈子, 村田寛明, 北條美能留, 長瀬隆弘, 西田教行, 上園保仁. 細胞膜移行性シグナルペプチドを付加した HaloTag-GPCR の発現様式ならびにその機能的アッセイ. 第64回日本薬理学会西南部会, 2011年11月20日, 福岡.
- (19) Miyano K, Shiraishi S, Sudo Y, Suzuki M, Terawaki K, Uezono Y. Vinblastin and carboplatin activate human transient receptor potential ankyrin 1 through protein kinase A pathways. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya/Japan, October 5 2011.
- (20) Shiraishi S, Miyano K, Sudo Y, Suzuki M, Uezono Y. A rat model for the study of metastatic spine cancer pain. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya/Japan, October 5 2011.
- (21) Terawaki K, Yanagihara K, Sawada Y, Suzuki M, Miyano K, Sudo Y, Shiraishi S, Uezono Y. Novel animal models of cancer cachexia by human gastric cancer cell line and effects of Rikkunshito on their models. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya/Japan, October 5 2011.
- (22) 寺脇潔, 柳原五吉, 澤田祐美, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 須藤結香, 白石成二, 上園保仁. 新規がん悪液質モデルラットの作製及び同モデルに対する漢方薬六君子湯の改善効果. 第16回日本緩和医療学会, 2011年7月29-30日 札幌.
- (23) 上園保仁, 寺脇潔, 柳原五吉, 澤田祐美, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 須藤結香, 白石成二. 新規がん悪液質モデルラットの作製及び同モデルを用いた悪液質

症状改善薬物の開発. 第84回日本内分泌学会シンポジウム, 2011年4月21-23日, 神戸.

〔図書〕(計2件)

- (1) 宮野加奈子 Usus magister est optimus …経験は最良の教師 株式会社金芳堂, 日本薬理学会誌 140, 308, 2012.
- (2) 宮野加奈子, 上園保仁, 仲田義啓. パクリタキセル誘発性末梢神経障害のメカニズム. 真興交易株式会社, ペインクリニック 32, 1491-1498. 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/08path/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮野 加奈子 (MIYANO KANAKO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 50597888

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()