

## 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 10日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791694

研究課題名（和文） 正に電荷した局所麻酔薬を用いた難治性がん疼痛治療法の開発

研究課題名（英文） A novel treatment of cancer pain with a quaternary derivative lidocaine.

研究代表者

布施谷 仁志（FUSEYA SATOSHI）

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00588197

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、4級アミン局所麻酔薬 QX-314 の骨がん痛に対する鎮痛効果とその機序解明である。骨がん痛モデルマウスを作製し、QX-314 投与前後で痛み関連行動が改善するか調べた。QX-314 全身投与は、動作時痛ではなく、自発痛関連行動を用量依存性に抑制した。次いで、QX-314 持続投与による、TRPV1 陽性 1 次知覚神経における p-CREB 発現の変化、およびカプサイシンくも膜下投与による、TRPV1 陽性神経脱落の痛み行動への影響を調べた。QX-314 は TRPV1 陽性神経を選択的に抑制し、その結果自発痛を減弱させることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to examine effects and the mechanisms of QX-314 for bone cancer pain. An animal model of bone cancer pain was produced by implantation of osteosarcoma cells into the mouse femur. We examined the effects of QX-314 for bone cancer-induced pain-related behaviors. Systemic administration of QX-314 selectively inhibited ongoing pain-related behavior but not movement-evoked pain-related behaviors in sarcoma-implanted mice. QX-314 inhibited increase in p-CREB expression in TRPV1-positive, but not TRPV1-negative, DRG neurons in sarcoma-implanted mice. Selective ablation of TRPV1-positive afferents inhibited ongoing pain-related behavior but not movement-evoked pain-related behaviors, as did administration of QX-314. Our results indicate that QX-314 selectively inhibits TRPV1-positive afferents, reducing ongoing pain but not movement-evoked pain in bone cancer 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 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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・蘇生学

キーワード：骨がん痛、4級アミン局所麻酔薬、TRPV1

## 1. 研究開始当初の背景

がん患者において、がんによる痛みは QOL 上重要な問題である。痛みは、持続的で次第に増強することが多く、不眠や食欲低下などを引き起こす。その結果、患者の苦痛が増大するため、痛みは最優先で対応すべき症状である。痛みからの解放を目指し、世界保健機構（WHO）が提唱したオピオイド投与を柱と

したがん性痛治療法は、現在、標準治療法として全世界に普及している。モルヒネなどのオピオイドは、安価であること、鎮痛効果が高いこと、副作用対処法がある程度確立されていること、などの理由から WHO ががん性痛治療法で柱をなす薬物として採用されている。すなわち、オピオイドは決してがん性痛機序に基づいた薬物ではない。そのため、WHO が

ん性痛治療法は万能ではなく、がん患者の30%でオピオイドによる薬物療法では痛みの緩和が困難である。患者はしばしば高用量のオピオイドが必要となるが、痛みは軽減されず、傾眠や認知障害などのオピオイドの副作用にも苦しむ。したがって、がん患者のQOLの改善には、オピオイド抵抗性難治性がん性痛の機序解明と機序に基づいた治療法の開発が急務である。

オピオイド抵抗性難治性がん性痛の1つが骨がん痛である。Mantyhら(Schwei, J Neurosci 1999)によって開発された、骨がん痛モデルマウスによる解析から、末梢神経に発現する多刺激痛み受容体であるTRPV1の活性化が、骨がん痛に関与していることが明らかとなった(Ghilardi, J Neurosci 2005; Niiyama, Neuroscience 2007)。TRPV1拮抗薬は、新たな鎮痛薬として期待され、臨床治験が進められてきたが、発熱などの副作用のためその臨床応用が進んでいない(Gavva Pain 2008)。一方、局所麻酔薬とTRPV1について2007年に画期的な研究成果が報告された。通常、正に電荷した局所麻酔薬(QX-314)は、細胞膜を通過することができず局所麻酔作用を発揮することができないが、神経に発現しているTRPV1が活性化し開口すると、TRPV1のチャネルポアを通過して細胞内に入り、局所麻酔作用を引き起こすことが報告された(Binshtok, Nature 2007)。TRPV1の活性化が骨がん痛に関与しているため、QX-314はTRPV1の活性化した神経を選択的に抑制して骨がん痛を減弱できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨がん痛モデルマウスを用いて、4級アミン局所麻酔薬QX-314の骨がん痛に対する鎮痛効果とその機序を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

雄性C3H/HeJ(20-25g)、TRPV1ノックアウトマウス(C57BL/6J系統)を用いた。

### (2) 薬剤

Lidocaine N-ethyl bromide (QX-314)は生食で溶解した。カプサイシンは10%エタノール(vol/vol)、10% Tween80 (vol/vol)、生食で溶解した。

### (3) 骨がん痛モデル

Honoreら(Nat Med 2000)の方法に準じた。マウス骨がん細胞(NCTC 2472)を10%ウマ血清含有NCTC 135培地で培養した。1.5%ハロセンによる全身麻酔下にマウスの左膝蓋骨下で切開し、大腿骨遠位端の軟骨を露出させた。20  $\mu$ Lの溶媒液(偽処置マウス用)ま

たは $1 \times 10^5$ の骨がん細胞含有培養液(骨がん痛モデル用)を左大腿骨に注入した。注入口は、アマルガムで閉鎖した。先行研究で、骨がん痛関連行動は、がん細胞移植後14日後で最大となり、21日後まで持続することがわかっているため(Sevcik, Pain 2005; Kawamata, J Anesth 2010)、以下の実験は、骨がん細胞移植後14-16日後に行った。

### (4) 骨がん痛関連行動の評価

自発痛および動作時痛関連行動の評価法は先行研究に準じた(Niiyama, Neuroscience 2007; Honore, Nat Med 2000)。2分間の観察時間における足振り行動の数を自発痛の評価に用いた。自発歩行中の患側下肢の使用状態および自発的起立時における患側下肢への加重の状態を動作時痛の評価に用いた。患側下肢の使用状態は、0-4(0: 全く患肢を使用しない; 1: 時々しか歩行運動に使用しない; 2: 跛行+防御行動; 3: 跛行が存在する; 4: 正常使用)の5段階でスコアをつけた。患側下肢の加重状態は、0-3の4段階(0: 常に患肢を拳上して床に接地しない; 1: 基本的には患肢を拳上しているが時々床に足をつける; 2: 患肢で部分的に体重を支える; 3: 全体重を支えることができる)でスコアをつけた。

### (5) 免疫染色

以下のポリクローナル抗体を使用した。TRPV1(0.1  $\mu$ g/mL, モルモット, 北海道大学渡辺先生より提供)、phosphorylated cyclic-adenosine monophosphate response element-binding protein (p-CREB)(1:50, ウサギ, Cell Signaling)、biotinylated isolectin B4 (IB4)(1:100, Sigma)。マウスは、ウレタン(1.25g/kg 腹腔内投与)により全身麻酔し、0.1Mリン酸緩衝液(PB)含有4%パラホルムアルデヒド(PFA)で灌流固定した。左L2後根神経節(DRG)およびL1-3神経根が付着する脊髄を採取した。サンプルは、0.1M PB含有4% PFAにて2時間浸して後固定し、さらに凍結保護のために4℃の0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(PBS)含有25%ショ糖液に1晩浸した。サンプルは、急速凍結し、クライオスタット(LEICA)を用いて、DRG・脊髄をそれぞれ16  $\mu$ m  $\times$  50  $\mu$ mでスライスした。スライスサンプルは、スライドグラスに張り付けた後、0.01M PBSで30分間、0.2% Triton X-100含有0.01M PBS(PBS-t)で30分間室温にて洗浄し、さらに1%正常ロバ血清含有0.01M PBS-t(ブロッキング液)に60分間浸した。サンプルは、各種1次抗体含有ブロッキング液に浸して4℃で1晩保温した。0.01M PBS-tで洗浄後、Alexa-Fluor 488または597種特異的2次抗体(1:500, Invitrogen)含有PBS-tに室温で2時間反応

させた。コンフォーカルレーザー顕微鏡 (ECLIPSE) で撮影して画像を得た。

#### (6) 実験プロトコール

##### ①骨がん痛関連行動に対する QX-314 の効果

QX-314 は単回または持続全身投与した。単回投与実験では、がん細胞移植後 1 4 日目に、溶媒または QX-314 を 0.05 mL/10g 体重で腹腔内投与した。QX-314 の用量は、0.01, 0.1, 1.0, 3.0 mg/kg に調整した。痛み関連行動は、QX-314 投与前、投与後 5, 10, 15, 20, 30, 60 分時点で観察した。持続投与実験では、Alzet osmotic pump (1.5cm×0.6cm, 1003D, DURECT) を QX-314 持続投与のために使用した。Alzet pump はマウスの背部皮下に埋め込んだ。溶媒または QX-314 を 1  $\mu$ L/h で 48 時間持続投与した。QX-314 濃度は 5 mg/kg/ $\mu$ L に調整した。痛み行動は、持続投与開始 24・48 時間後に評価した。

別の実験として、血液サンプルを QX-314 の血清濃度を測定するために入手した。QX-314 3 mg/kg 単回投与後、最大効果が得られているときに血液を左室より 0.5mL 採取した。QX-314 5mg/kg/h 投与後、24 および 48 時間時点で同様に血液を採取した。QX-314 の血清濃度は HPLC で測定した。

##### ②p-CREB 発現に対する QX-314 の効果

QX-314 投与 48 時間後のマウスの一部は、免疫組織学的解析に使用した。L2 DRG 神経における p-CREB 発現を調べた。DRG スライスごとに TRPV1 陽性、TRPV1 陰性、p-CREB 陽性神経の数を調べた。神経を数えるために、コンピューター画像分析装置 (EZ-C1, Nikon) を使用した。神経細胞は、核が明瞭に描出されているものを数えた。TRPV1 陰性神経は、背景染色されているものを数えた。TRPV1 陽性または陰性神経と p-CREB 陽性神経が同一発現している割合は、1 つのマウスから 7-11 DRG スライスサンプルを得て、そこから 1500-2000 個の神経細胞を数えることで決定した。細胞数計測の重複を避けるために、サンプルのスライス間隔を 48  $\mu$ m とした。

##### ③骨がん痛関連行動に対する TRPV1 陽性神経脱落の効果

1.5% ハロセンによる全身麻酔下に、ハミルトンシリンジを用いて、5.0  $\mu$ L の溶媒またはカプサイシン 10  $\mu$ g を腰椎レベルでマウスにくも膜下投与した (Cavanaugh, Proc Natl Acad Sci U S A 2009)。くも膜下投与 7 日後に骨がん細胞をマウスの左大腿骨に移植した。骨がん痛関連行動は、骨がん細胞移植後 14 日目に評価した。くも膜下カプサイシン投与による TRPV1 陽性神経脱落を家訓するため、腰髄の TRPV1 発現を調べた。先行研究では、TRPV1 陽性神経の中核側端は、く

も膜下カプサイシン投与後 24 時間以内に選択的に脱落し、その効果は少なくとも 8 週間持続すると報告されている (Shields, Pain 2010)。

#### (7) 統計解析

足振り行動の数、足ふり行動の area under the time-effect curve (AUC)、p-CREB 陽性神経の割合は、平均±SD で表現した。歩行時の患側下肢の使用状態、立位時の患側下肢の加重状態は中央値±第 1・3 四分位で表現した。足振り行動の数は、繰り返しのある 1 元配置分散分析で QX-314 投与前の値と比較し、次いでグループ内で Tukey' s test を行った。足振り行動の数は、1 元配置分散分析で群間比較し、次いで Tukey' s test した。また、unpaired *t*-test で 2 群間比較した。AUC における QX-314 の用量依存性を解析するために、Jonckheere-Terpstra test を使用した。歩行時の患側下肢の使用状態、立位時の患側下肢の使用状態は、Freidman test で QX-314 投与前の値と比較し、Mann-Whitney *U*-test で 2 群間比較した。QX-314 の血清濃度および p-CREB 発現の割合は、一元配置分散分析で群間比較し、次いで Tukey' s test した。P < 0.05 を統計学的有意とした。IBM SPSS statistics version 21 を用いて検定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 骨がん痛関連行動に対する QX-314 単回全身投与の効果

QX-314 投与前においては、痛み関連行動に群間差はなかった。溶媒単独投与は、痛み行動に影響を与えなかったのに対し、0.1, 1.0, 3.0 mg/kg の QX-314 単回投与は、投与前と比較して有意に足ふり行動の数を減弱させた (0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg いずれも P < 0.001)。QX-314 の最大効果は、投与 5-10 分後に観察され、60 分以内に投与前の値まで戻った。AUC 解析により、QX-314 の効果は用量依存性であることが示された (P < 0.001)。一方、本研究で使用した QX-314 の全ての投与量で、患側下肢の歩行時の使用状態、立位時の加重状態に変化はなかった。

##### (2) 骨がん痛関連行動に対する QX-314 持続全身投与の効果

QX-314 単回全身投与の効果持続時間が短かったので、次に持続全身投与を行った。QX-314 投与前においては、溶媒投与群と QX-314 投与前群とで痛み関連行動に差はなかった。溶媒持続投与は、投与 24・48 時間後の痛み行動に影響を与えなかった。QX-314 (5 mg/kg/h) は、投与 24・48 時間後において、溶媒投与前群よりも有意に足ふり行動の数を

減少させた (24 時間後 QX-314:  $3 \pm 2$  回, 溶媒:  $13 \pm 3$  回,  $P = 0.001$ ; 48 時間後 QX-314:  $4 \pm 1$  回, 溶媒:  $12 \pm 2$  回,  $P < 0.001$ )。QX-314 投与 24 時間後の足ふり行動の数と、48 時間後のそれとでは差はなかった。一方、QX-314 持続投与は、患側下肢の歩行時の使用状態および立位時の加重状態を変化させなかった。

QX-314 (5 mg/kg/h) 持続投与 24・48 時間後の血清濃度は、それぞれ  $0.54 \pm 0.18$   $\mu\text{g/mL}$ 、 $0.66 \pm 0.41$   $\mu\text{g/mL}$  で、3.0 mg/kg 単回投与 10 分後の血清濃度 ( $0.73 \pm 0.29$   $\mu\text{g/mL}$ ) と同等だった。

(3) TRPV1 陽性神経における p-CREB 発現に対する QX-314 持続投与の効果

持続的な侵害刺激は、ある特定の DRG 神経において、細胞活性化の指標である CREB のリン酸化を引き起こすことが報告されている (Tamura, Neuroscience 2005; Nakanishi, Mol Biol Cell 2010)。そこで我々は、骨がん細胞を移植した患肢における TRPV1 陽性および TRPV1 陰性 DRG 神経の p-CREB 発現に対する QX-314 の効果を調べた。無処置マウスでは、TRPV1 陽性神経の  $33.8 \pm 2.1\%$ 、TRPV1 陰性神経の  $31.1 \pm 7.5\%$  で p-CREB が陽性だった。偽処置マウスでは TRPV1 陽性神経・陰性神経いずれにおいても p-CREB 発現に変化はなかった。骨がん細胞移植 14 日後の骨がん痛モデルマウスでは、TRPV1 陽性神経における p-CREB 陽性の割合は、偽処置マウスのそれと比べて有意に増加した (骨がん痛モデルマウス:  $50.6 \pm 2.5\%$ ,  $P < 0.001$  対偽処置マウス)。TRPV1 陰性神経における p-CREB 陽性の割合も、偽処置マウスのそれと比べて有意に増加した (骨がん痛モデルマウス:  $41.5 \pm 6.1\%$ ,  $P = 0.044$  対偽処置マウス)。QX-314 (5 mg/kg/h 48 時間) 持続投与は、TRPV1 陽性神経における p-CREB 陽性の割合を、溶媒投与におけるそれと比べて有意に減少させた (QX-314:  $32.2 \pm 3.0\%$ ; 溶媒:  $52.6 \pm 5.9\%$ ,  $P < 0.001$ )。一方、QX-314 持続投与後の TRPV1 陰性神経における p-CREB 陽性の割合は、溶媒投与におけるそれと同等で減少しなかった。

(4) 骨がん痛関連行動に対する TRPV1 陽性神経脱落の効果

上述の我々の実験結果から、QX-314 が選択的に TRPV1 陽性神経を抑制して動作時痛ではなく自発痛関連行動を抑制することが示された。次に、我々は、TRPV1 陽性神経が、骨がん痛の中でどのような痛みの伝達に関与しているのかを調べた。くも膜下カプサイシンによって、くも膜下投与 21 日後の L2 腰髄後角における TRPV1 陽性神経が脱落していることを免疫組織学的に確認した。脱落範囲は、

上部胸髄から下位仙髄に及んだ。くも膜下溶媒投与は、TRPV1 陽性神経発現に影響しなかった。また、くも膜下カプサイシンは、TRPV1 がほとんど発現していない IB4 陽性神経は脱落させず、TRPV1 陽性神経を特異的に脱落させることを確かめた。

くも膜下溶媒投与マウスの痛み関連行動は、くも膜下溶媒投与していない骨がん痛モデルマウスのそれらと同等だった。くも膜下カプサイシン投与マウスの足ふり行動の数は、くも膜下溶媒投与マウスと比べて有意に少なかった (カプサイシン:  $2 \pm 1$  回; 溶媒:  $14 \pm 2$ ,  $P < 0.001$ )。しかし、くも膜下カプサイシン投与後における患側下肢の歩行時の使用状態、および立位時の加重状態は、くも膜下溶媒投与の場合と違いはなかった。

(5) 得られた成果のまとめとその意義

① QX-314 は、骨がん痛モデルマウスでは、動作時痛ではなく、自発痛関連行動を選択的に抑制した。

② QX-314 は、TRPV1 陰性ではなく、TRPV1 陽性神経の p-CREB 発現を抑制した。この結果から、QX-314 は TRPV1 陽性神経に選択的に作用することが示された。QX-314 が、TRPV1 陽性神経を選択的に抑制する機序はいくつか想定されている。これらはいずれも、QX-314 の細胞内への流入を促進するために、TRPV1 の活性化が必要である。したがって、これまでの研究では、QX-314 による局所麻酔作用を生み出すために、カプサイシン、リドカイン、酸性溶液といった TRPV1 アゴニストを QX-314 と併用することが必要だった。しかし、我々の研究では、TRPV1 アゴニストを併用しなくても QX-314 は TRPV1 陽性神経を抑制した。我々や他の研究者は、TRPV1 の活性化が骨がん痛に関与することを報告している (Ghilardi, J Neurosci 2005; Niiyama, Neuroscience 2007 and Br J Anaesth 2009)。骨がん痛状態では、TRPV1 が持続的に活性化しているため、QX-314 は TRPV1 陽性神経に作用し抑制したと考えられた。

③ TRPV1 陽性神経脱落は、動作時痛ではなく自発痛関連行動を抑制した。この結果から、TRPV1 陽性神経は、骨がん痛においては自発痛を選択的に伝達していることが示された。上述のように、QX-314 は、TRPV1 陽性神経に選択的に作用するため、自発痛を抑制する結果となったと考えられた。

④ 本研究で得られた成果の臨床応用は、大きな意義がある。これまでは、QX-314 による局所麻酔作用を生み出すために、カプサイシンなどの TRPV1 アゴニストを QX-314 と併用することが必要だった。しかし、カプサイシ

ン注入に伴う強い痛みは、QX-314の臨床使用の大きな妨げとなっていた。今回の我々の研究は、TRPV1 アゴニストを併用しなくても、QX-314 は骨がん痛に対して鎮痛効果を発揮することを示した。したがって、QX-314 全身投与は、TRPV1 が活性化している痛み状態においては、TRPV1 アゴニストを併用しなくても局所麻酔作用を發揮し、そのため、TRPV1 アゴニスト投与に伴う強い痛みも避けることができる。QX-314 は、自発痛を選択的に抑制するため、今後は骨がん痛の強さだけでなく、自発痛か動作時痛かという痛みの性質によって治療することが可能となる。

QX-314はTRPV1陽性神経に選択的に作用するため、QX-314による鎮痛効果の有無により、患者が苦しんでいる痛みがTRPV1陽性神経を介するものかどうかを判定することも可能となる。さらに、TRPV1陽性神経は侵害受容神経と考えられているため、QX-314のTRPV1陽性神経への選択的作用は、触覚や運動を麻痺させることなく痛みだけを減弱できる可能性がある。本研究では、QX-314の触覚や運動機能への影響を詳細に検討していないが、QX-314全身投与は歩行時の下肢の使用状態を悪化させなかった。

QX-314単回全身投与の作用持続時間が短かったため、持続投与を行った。QX-314持続投与24時間後の血清濃度および鎮痛効果は、48時間後でも変わらなかった。したがって、QX-314持続投与は、血清濃度の蓄積なく、安定した鎮痛効果が得られると考えられる。しかも、QX-314などの4級アミン局所麻酔薬は、血液脳関門を通過しにくいいため、リドカインなどの3級アミン局所麻酔薬よりも中枢神経毒性が少ない可能性がある。今後は、QX-314の安全性に関してさらなる検討が必要である。

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

①Fuseya S, Kawamata T, Kawamata M: QX-314 selectively reduces ongoing pain but not movement-evoked pain in a murine model of bone cancer pain. 14th World Congress on Pain, 2012. 8. 28, Milan, Italia.

②布施谷仁志, 川股知之, 山本克己, 井出進, 川真田樹人: 正に電荷した局所麻酔薬 QX-314はTRPV1陽性神経活動を抑制して骨がん疼痛行動を減弱させる. 日本ペインクリニック学会第46回大会 2012. 7. 6, (松江)

③Fuseya S, Kawamata T, Imai E, Urasawa M, Kawamata M: QX-314 selectively reduces ongoing pain but not movement-evoked pain

in a murine model of bone cancer pain. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, 2011. 10. 19, Chicago, USA.

④布施谷仁志, 川股知之, 山本克己, 井出進, 川真田樹人: 正に電荷した局所麻酔薬 QX-314 は自発痛関連骨がん疼痛行動を特異的に抑制する. 第58回日本麻酔科学会総会, 2011年5月19日(神戸)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

布施谷 仁志 (FUSEYA SATOSHI)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号: 00588197