

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792247

研究課題名(和文)ガン性疼痛に対する多剤的薬物療法の検討

研究課題名(英文)Examination of the medical therapy of the multiple drug for the cancer pain

研究代表者

原野 望 (Nozomu, Harano)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50423976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はラットの三叉神経節ニューロンにおいて、ET受容体のETAやETB受容体の発現やその誘導性の反応を調査した。これらの結果は、PTC経由のETA介在性TRPV1の過剰活性化とETB介在性のカルシウムイオン流動が、三叉神経節の異なったサブセットによって起こっていることを示唆した。これらは口腔顔面痛の発生に関与しているのかもしれない。三叉神経節ニューロンにおけるETB介在性は、脊髄神経節には発現していないため、三叉神経における特殊機構であると言える。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of the endothelin receptors ETA and ETB and endothelin induced responses in rat TRG neurons. These results suggest that ETA-mediated TRPV1 hyperactivation via PKC activation and ETB-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization occurs in different subsets of TRG neurons. These endothelin-induced responses may contribute to the induction of orofacial pain. The ETB-mediated function in TRG neurons is a special feature in the trigeminal system because of no ETB expression in dorsal root ganglion neurons.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔顔面痛 癌性疼痛 endothelin-1 endothelin-3 BQ-123 BQ-788 口内炎

## 1. 研究開始当初の背景

最近の報告では、ET-1、ET-2、ET-3が、炎症性や神経因性やガン性疼痛の末梢神経系での病因に含まれているとされている。哺乳類において、2つのET受容体である、ET<sub>A</sub>とET<sub>B</sub>が確認されている。ET-1とET-2は両方のレセプターサブタイプを活性化させ、ET-3は単独でET<sub>B</sub>を活性化させる。脊髄神経節では、ET<sub>A</sub>はニューロンで発現することが報告されているが、ET<sub>B</sub>はサテライトグリア細胞と非ミエリン化シュワン細胞にて発現していた。しかしながら、いくつかのラットと人間の研究では、三叉神経節ニューロンにおいて、ET<sub>B</sub>の発現が報告された。ET-3の上唇また顎関節への注入は、ラットにおいて自発痛を引き起こし、ET<sub>B</sub>の選択的アンタゴニストは、ラットモデルにおいて、三叉神経神経障害性疼痛を抑制した。このように、三叉神経系でのET<sub>B</sub>の発現は、侵害受容に関連があるようである。

脊髄神経節ニューロンにおける、ET<sub>A</sub>の発現は、原形質膜にプロテインキナーゼCの転流をもたらし、結果的にはカプサイシン受容体のTRPV1の活動亢進をもたらす。ET<sub>B</sub>の発現は、三叉神経節や脊髄神経節のサテライトグリア細胞において細胞内カルシウムイオンの動員を引き起こす。しかし、ETsの三叉神経節ニューロンに対する効果を記載している報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、最初に二重蛍光免疫染色を用いたラットの三叉神経節で、ET<sub>A</sub>とET<sub>B</sub>の発現パターンを調査した。次にETsの侵害受容のメカニズムを調べるため、オールセルパッチ・クランプ記録とカルシウムイオンイメージングを用いて、分離した三叉神経節ニューロンで、ETsのカプサイシンに誘発された電流と細胞内カルシウム濃度における影響を調査した。

## 3. 研究の方法

### 使用動物

4週齢Wistarラットにペントバルビタール麻酔後(60 mg/kg)、三叉神経節を摘出した。

### 蛍光免疫染色

三叉神経節をクライオスタットにて10μmにカットし、各種試薬で処理した。その後、三叉神経節領域のET<sub>A</sub>受容体とET<sub>B</sub>受容体の発現を調査した。またニューロンの識別を行うため、IB4による免疫

染色を行った。

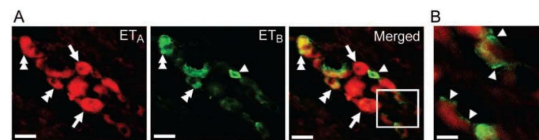
カプサイシン誘発性電流に対するETsの効果を計測するため、オールセルパッチクランプを行った。ET-1による反応を調査した後、ET<sub>A</sub>受容体のアンタゴニストであるBQ-123、ET<sub>B</sub>受容体アンタゴニストのBQ-788、プロテインキナーゼ抑制剤のチェレルスリンを、またプロテインキナーゼ活性化剤のPMCを投与して反応を調査した。

ETsが三叉神経節内において細胞内Caイオンの流動を引き起こしているかどうかを調査するため、カルシウムイメージングを使用した。

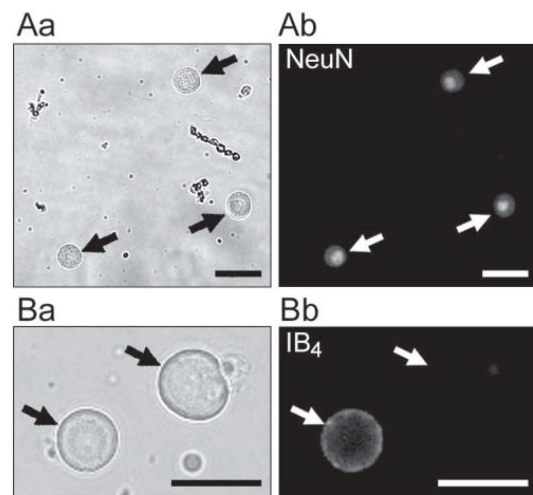
## 4. 研究成果

### ET<sub>A</sub>とET<sub>B</sub>の発現

ET<sub>A</sub>とET<sub>B</sub>の免疫反応性は、ニューロン内で



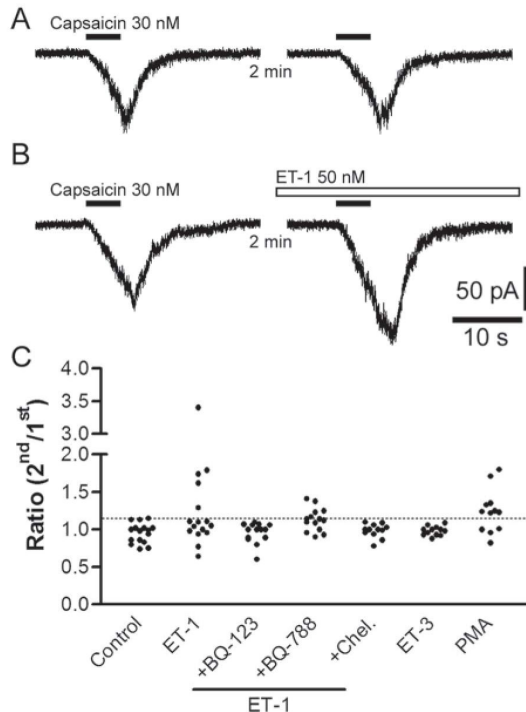
認められた(A)。ET<sub>B</sub>の免疫反応性はニューロンの周囲にも認められた。これらの結果は三叉神経節に関する以前の報告と一致した。ET<sub>A</sub>とET<sub>B</sub>の共同免疫反応性であったニューロンは、ET<sub>A</sub>またはET<sub>B</sub>免疫反応性を示したニューロンの総数のわずか26%であった。



分離した三叉神経節細胞におけるニューロンの識別

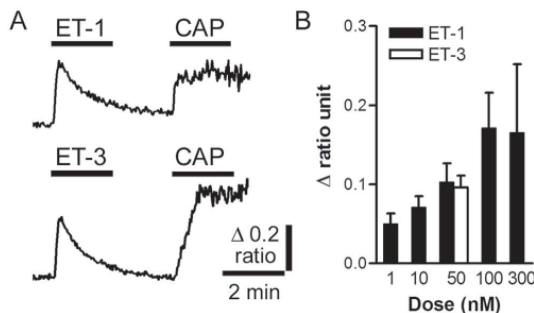
NeuN免疫反応性は、特に細胞核において、明確に細胞の周りに観察された。対照的に不規則な細胞では、免疫反応を示さなかった。それゆえ、本研究では明確に丸い細胞はニューロンであると考えられ、他の不規則な細胞を解析から除去した(A)。すべてのIB4陽性細胞は明らかに丸い細胞であり、これは丸い細胞がニューロンであることを支持した(B)。

## カプサイシン誘発電流に対する ETs の効果



カルシウムフリーの溶液において、30nM カプサイシンは、良い再現性で、カプサイシン過敏性ニューロンで内向き電流を誘発した (A)。最大の比率は 1.15 で、2 回目の薬物投与で 1.20 を超えると、カプサイシン誘発性電流はその薬物によって拡大されたと判断した。50nM の ET-1 は、カプサイシン誘導性電流を拡大したが、ET-3 では認められなかった。ET<sub>A</sub> アンタゴニストの BQ-123 や PKC 阻害剤のチェレルスリンを ET-1 と投与すると、ET-1 はカプサイシンによって誘発された電流を増大させることはできなくなった。しかし、ET-1 を ET<sub>B</sub> アンタゴニストである BQ-788 と投与すると、ET-1 はカプサイシン誘発性電流を増大した。さらには PKC の活性剤である PMA はカプサイシン誘発性電流を増大させた。

## ET-1 誘導性 Ca 流動



ETs が三叉神経節内において細胞内 Ca イオンの流動を引き起こしているかどうかを調査するため、カルシウムイメージングを使用した。50nM の ET-1 と ET-3 は三叉神経節ニューロンにおいて Ca イオンを 25% 以上も上昇させ (A) ET-1 と ET-3 によって誘発される Ca イオンのピークの反応は、同程度の平均値

を示した。BQ-788 の存在下にて、ET-1 はカルシウム反応を引き起こすことができなかったが、BQ-123 の存在下ではカルシウム反応を引き起こすことができた。ET-1 誘発性 Ca イオン反応は、用量依存性であった (B)。IB4 陽性反応と陰性反応のニューロン間やカプサイシン過敏性か非過敏性なニューロン間において、Ca イオン反応の用量依存性には違いがなかった。ET-1 に対する Ca イオンの反応は 10nM 以上、ET-3 では 50nM 以上で、反応した細胞分布は IB4 陰性細胞やカプサイシン非過敏性細胞の方がそうでない細胞と比べ高かった。カプサイシン過敏性と非過敏性ニューロン間の ET-1 誘発性 Ca イオン反応の違いは顕著であったが、IB4 陽性と陰性ニューロンではそうではなかった。ET-1 による Ca イオンの上昇は Ca フリーの溶液中でも観察された。

## 【結論】

ET<sub>A</sub> 活性化は、PKC 起動を通して TRPV1 の過敏化に繋がり、ET<sub>B</sub> の活性化は Ca イオンの流動に繋がり、これらの反応は三叉神経節ニューロンの異なるサブセットで生じる。

これらの ET-1 誘発性ニューロン反応は、おそらく、口腔顔面領域の炎症性、神経因性、ガン性疼痛に関与する。

三叉神経節ニューロンにおける ET<sub>B</sub> 介在性機能は三叉神経系における特徴である。

## 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)

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

Suzuro Hitomi, Kentaro Ono, Kanako Miyano, Yojiro Ota, Yasuhito Uezono, Motohiro Matoba, Sachiko Kuramitsu, Kiichiro Yamaguchi, Kou Matsuo, Yuji Seta, Nozomu Harano, Kiyotoshi Inenaga : Novel methods of applying direct chemical and mechanical stimulation to the oral mucosa for traditional behavioral pain assays in conscious rats. *Journal of Neuroscience Methods, Journal of Neuroscience Methods*, 239,162-169, 2015

Yamanoto T, Ono K, Hitomi S, Harano N, Sago T, Yoshida M, Nunomaki M, Shiiba S, Watanabe S, Nakanishi O, Inenaga K : Endothelin Receptor-mediated Responses in Trigeminal Ganglion Neurons, *J Dent Res*,92(4),335-339,2013

Sago T, Ono K, Harano N, Furuta-Hidaka K, Hitomi S, Nunomaki M, Yoshida M, Shiiba S, Nakanishi O, Matsuo K, Inenaga K : Distinct time courses of microglial and astrocytic hyperactivation and the glial contribution to pain hypersensitivity in a facial cancer model, *Brain Res*, 31;1457, 70-80, 2012

Ono K, Harano N, Inenaga K, Nakanishi O : A rat pain model of facial cancer, Methods Mol Biol. 851:149-157, 2012

〔学会発表〕(計 3 件)

Kiichiro Yamaguchi, Nozomu Harano, Suzuro Hitomi, Kentaro Ono, Teppei Sago, Seiji Watanabe, Kiyotoshi Inenaga : Effects of 5-fluorouracil on stomatitis-induced pain in rats, Neuroscience, Washington DC, November 15-19, 2014

K. Yamaguchi, S. Hitomi, K. Ono, N. Harano, T. Sago, S. Watanabe, and K. Inenaga : ラット口内炎モデルにおける疼痛発症への抗がん薬の影響、第 92 回日本生理学会大会、神戸国際会議場、平成 27 年 3 月 21 日 ~ 23 日

山口喜一郎, 人見涼露, 小野堅太郎, 原野 望, 左合徹平, 稲永清敏 : ラットにおける口内炎誘発疼痛に対する 5-fluorouracil の影響、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡国際会議場、平成 26 年 9 月 25 日 ~ 27 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
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

原野 望 (HARANO NOZOMU)  
九州歯科大学歯学部・助教  
研究者番号 : 50423976

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

小野堅太郎 (ONO KENTAROU)  
九州歯科大学歯学部・准教授  
研究者番号 : 40316154