

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670694

研究課題名(和文) 神経栄養因子をターゲットにした骨転移癌性疼痛の積極的治療戦略

研究課題名(英文) Development of a novel analgesic method for cancer pain through the brain-derived neurotrophic factor

研究代表者

中塚 秀輝 (NAKATSUKA, HIDEKI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：70263580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子(BDNF)は神経ネットワークの構築に必須であり、後根神経節のBDNFは痛み伝達にneuromodulatorとして関わっている。脊髄後角には、細胞内チロシンキナーゼ(tk)ドメインを持つBDNF受容体(TrkB-isoform1)の他に、tkドメインを持たないisoform2が存在する。TrkB-isoform2が、BDNFのIsoform1への結合を競争阻害すれば鎮痛効果が期待できる。TrkB-isoform2を含む発現ベクターを骨転移癌性疼痛のラット脊髄くも膜下腔に投与した結果、鎮痛効果を得た。

研究成果の概要(英文)：The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is necessary for nerve growth. BDNF in the dorsal root ganglion (DRG) and also modulates the pain transduction from the peripheral nociceptor. One of TrkB receptors (isoform1), which has tyrosine kinase (tk) domain, acts as a pain modulator. If the other isoform (isoform2), which does not have tk domain, competitively block the binding of BDNF to isoform1, we could expect some effect against pain. Expression vector, constructed by TrkB-isoform2 gene-GFP gene-Tag (FLAG, S-Tag) after pCMV promoter, produced TrkB receptors with the transmembrane domain (TM+) and without the (TM-). Both TM+ group and TM- group in the expression vector administration group showed an analgesic effect. Pain-related behavior assessed by the von Frey tests showed hyperalgesia from day 7 after cancer cell administration. The expression of BDNF mRNA in the affected side of DRG at L3 increased compared with the unaffected side.

研究分野：麻酔・集中治療医学

キーワード：骨転移癌性疼痛モデル 脊髄神経 BDNF TrkB isoform2 発現ベクター

1. 研究開始当初の背景

骨転移がんによる疼痛は緩和ケア上きわめて深刻である。脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF)は他の神経栄養因子 (NGF、NT-3) とともに神経の発育、成長、維持等に必要なた神経栄養因子ファミリーの一つである。また末梢から中枢への痛み伝達は脊髄後根神経節の BDNF がニューロモデレーターとして働いている。

2. 研究の目的

脊髄後角に存在する BDNF の受容体 (TrkB) には細胞内チロシンキナーゼ (tk) ドメインを有する TrkB (TrkB isoform1) と tk ドメインのない TrkB (TrkB isoform2) が知られている。通常、末梢から中枢への痛み伝達は BDNF がニューロモデレーターとして TrkB iso1 受容体を介して機能している。

TrkB-iso2 の本来の機能は充分解明されていないが、TrkB-iso1 への BDNF 結合を競争阻害することができれば鎮痛効果が期待できる。

3. 研究の方法

Wistar 系ラット (7 週令) の脛骨近位端骨髄にラット乳がん細胞 MRMT-1 を 3×10^3 個 / $10 \mu\text{L}$ 注入し癌性疼痛モデルを作成した。注入後 2 週間にわたり von Frey test による疼痛評価を行った。1 週間疼痛評価を行った後、7 日目に発現ベクターを投与した。なお発現ベクター投与群は膜貫通ドメインの有る、無し、空ベクターの 3 群に分けた。

乳がん細胞 MRMT-1 投与による骨破壊の進行度は X 線画像で確認した (図 3)。

発現ベクターは pCMV プロモターの後に TrkB-iso2 遺伝子 - GFP 遺伝子 - Tag (FLAG, S-Tag) を結いだベクターを構築し、さらに膜貫通ドメインを有するもの (TM+) と有さないもの (TM-) を作成した (図 1)。これを脊髄くも膜下腔に投与して鎮痛

効果を確認した。

後根神経節での BDNF 発現、脊髄での TrkB 発現は組織より mRNA を抽出し、さらに cDNA に逆転写し、定量 PCR 法により分析した。

4. 研究成果

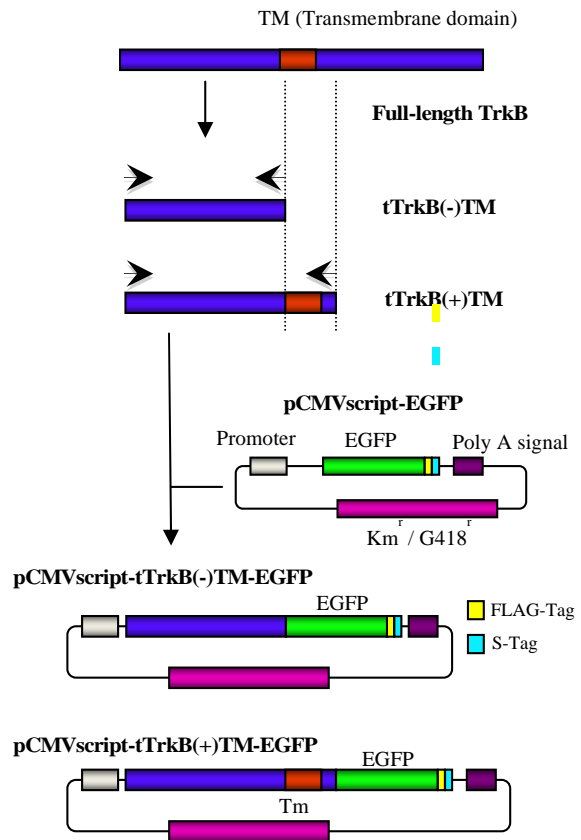


図 1. TrkB 発現ベクターの作成

von Frey test の結果は、がん細胞投与後 7 日目から有意に痛覚過敏を示しさらに 1 週間持続した (図 2)。

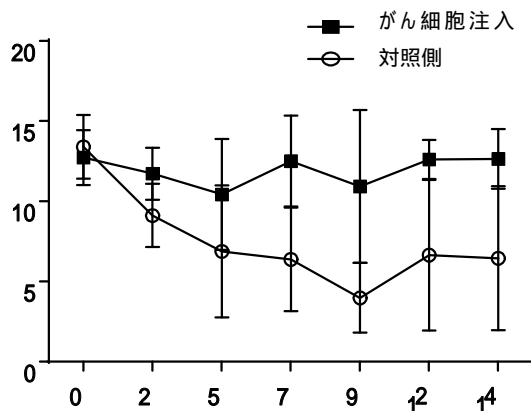


図 2 ベクター非投与群の von Frey test 結果

X線画像ではがん細胞投与から2週間後に骨融解が認められ3週間には骨破壊が確認された(図3)。

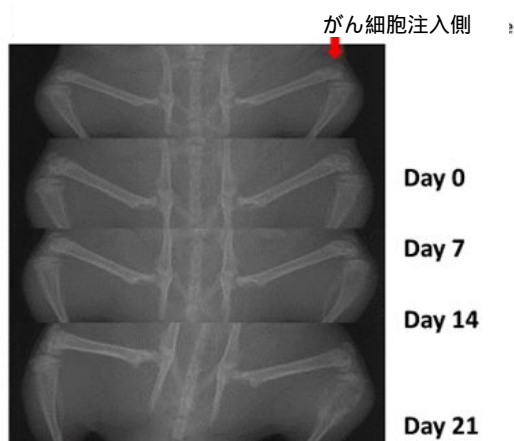


図3 ラット脛骨の骨破壊像

がん細胞投与後14日目では脛骨の神経支配領域であるL3の後根神経節(DRG)でBDNFの増加が観察され、痛覚過敏が確認された(図4)。

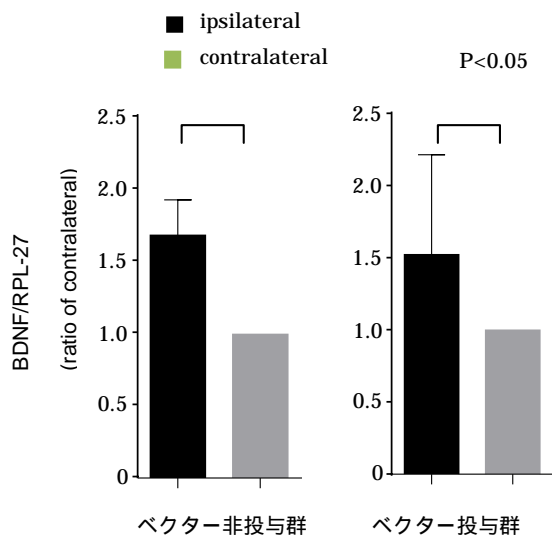


図4 L3 DRGにおけるBDNFmRNAの発現

また発現ベクター投与群は、TM+群、TM-群いずれも非投与群に較べて鎮痛効果を示した(図5a、図5b)。

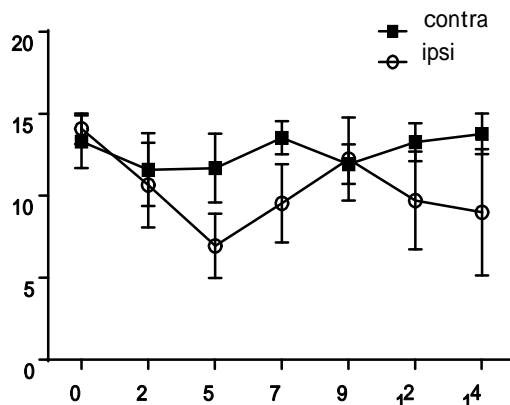


図5a TM+群

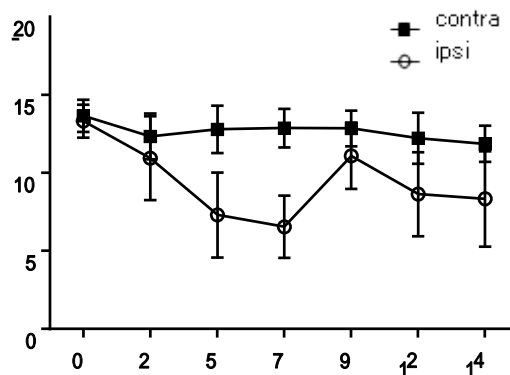


図5b TM-群

一方、TrkB-isoform2を含まない空ベクター投与群では効果が見られなかった(図6)。

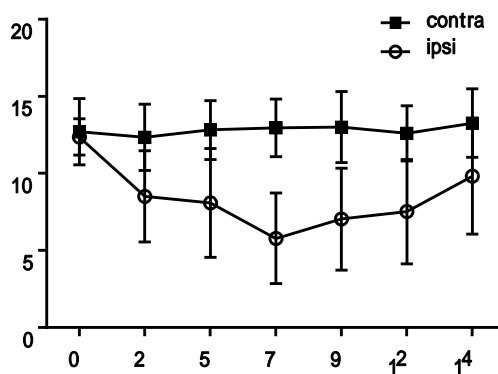


図6 空ベクター投与群

神経栄養因子(BDNF)は神経ネットワークの構築に必須であり、また後根神経節の BDNF は痛み伝達に neuromodulator として関わっている。

脊髄後角には2種類の BDNF 受容体(TrkB)が存在する。TrkB isoform1 は細胞内チロシンキナーゼ(tk)ドメインをもち、末梢から中枢への疼痛伝達に関与しているが、tk ドメインのない isoform2 の機能は充分理解されていない。TrkB-isoform2 が、Isoform1 への BDNF 結合を競争阻害すれば鎮痛効果が期待できる。

本研究では発現ベクター pCMV プロモターの後に TrkB-isoform2 遺伝子 - GFP 遺伝子 - Tag(FLAG、S-Tag)を結いだベクターを構築し(図 1)、さらに膜貫通ドメインを有するもの(TM+)と有さないもの(TM-)を作成した。これを脊髄くも膜下腔に投与して鎮痛効果を確認した(図 5a、図 5b)。

今後は発現ベクターの用量依存性、鎮痛効果の持続時間を検討する。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

柘植 雅嗣、大内田 守、中塚 秀揮、疼痛の新しい鎮痛、第 73 回日本疼痛学会、市民会館崇城大学ホール(熊本)、2015.7.4

Masatsugu Tsuge, Yoshihisa Fujita, Hideki Nakatsuka, New Analgesia of Cancer Pain Through the Brain-derived Neurotrophic Factor., American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, San Diego (USA), 2015.10.27

〔図書〕(計 0 件)

〔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

中塚 秀輝 (NAKATSUKA, Hideki)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：70263580

(2)研究分担者

前島 享一郎 (MAESHIMA, Kyoichiro)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：20549852

(3)研究協力者

板野 義太郎 (ITANO, Yoshitaro)

柘植 雅嗣 (TSUGE, Msatsugu)