

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861750

研究課題名(和文) 口腔領域に発症した癌に対するグルタミン酸受容体をターゲットとした新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of novel therapies that target glutamate receptors for oral cancer

研究代表者

本田 訓也 (HONDA, Kuniya)

日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号：20548945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)であるmGluR5が、末梢神経損傷後や慢性炎症により発症する異常疼痛に関与することが知られている。また、様々なmGluRサブタイプが癌細胞の膜上に発現し、その受容体を介したシグナルが癌細胞の増殖・分化に関与する可能性が示唆されているが、mGluR5の役割は不明である。そこで、本実験は癌性疼痛の発症・維持および癌細胞の増殖・分化のメカニズムを解明することを目的とし、頬粘膜癌モデルラットを用い、行動実験、免疫組織化学実験を行った。実験結果より、mGluR5を介したシグナルが癌誘発機械アロディニアおよび癌の増殖・分化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that peripheral metabotropic glutamate receptor (mGluR) 1 and 5 are involved in abnormal pain following peripheral nerve injury and inflammation. Moreover, mGluRs express in cancer cell membrane and mGluRs signaling may induce cancer cell proliferation. However, involvement of mGluR5 signaling in cancer pain and cancer growth is not fully clarified. To clarify the mechanisms underlying initiation/maintenance of cancer pain and cancer cell proliferation, we performed behavioral testing and immunohistochemistry. Present findings suggest that peripheral mGluR5 signaling is involved in cancer induced mechanical hypersensitivity and cancer growth in orofacial region.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌性疼痛 代謝型グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

歯科臨床の現場で遭遇する異常疼痛には、抜歯、インプラントおよび顎変形症の手術や腫瘍などの種々の疾患やそれに対する処置により口腔顔面領域の神経が損傷を受け、慢性の疼痛症状を示す神経障害性疼痛、あるいは炎症が長期にわたり様々な慢性的な炎症が引き起こされ、これが原因で引き起こされる炎症性疼痛がある。癌性疼痛はこれらとは別に、神経障害性疼痛と炎症性疼痛の両方が合併した症状を発症する。現在までに代表者は、下歯槽神経および眼窩下神経切断による神経障害性疼痛モデルや Complete Freund's Adjuvant, グルタミン酸およびカプサイシンを処置した侵害受容性疼痛モデルを作成し、異常疼痛発症のメカニズムを明らかにしてきた(Honda et al., Mol Pain 7:75, 2011, Liu et al., J Neuroinflammation. 27:258, Suzuki et al., PLoS One. 8:e57278)。しかしながら、癌性疼痛は神経障害性疼痛と炎症性疼痛には見られない様々な特殊性を有していることから、これまでの研究結果をそのまま癌性疼痛発症メカニズムに当てはめることはできない。

代表者は最近、顔面皮下にグルタミン酸を持続投与したラットにおいて、mGluR5の活性化がPKC ϵ のリン酸化を誘導し、疼痛に関与すると言われている transient receptor potential (TRP) チャンネルの中でも熱刺激を受容する TRP vanilloid 1 (TRPV1) および・機械刺激を受容する TRP ankyrin 1 (TRPA1) を感作し、熱・冷・機械痛覚過敏を発症することを明らかにした。

mGluRには8種類のサブユニットが存在し、それらは3つのグループに分けられている。中でも、グループに分類される mGluR1 と mGluR5 は中枢における疼痛情報の伝達に関与すると言われている。近年、神経終末にこれらのグルタミン酸受容体が存在し、疼痛に関与することが明らかにされつつある。また、

組織障害や神経損傷によりシュワン細胞や角化細胞からグルタミン酸が放出されることも知られている (Parpura et al., J Neurosci. 15:5831-5839, 1995)。一方、Ca²⁺・リン脂質依存性セリン/スレオニン特異的プロテインキナーゼである protein kinase C (PKC) はその構造、活性化機構、生理機能によって、在来型 (α , β 1, β 2, γ)、新型 (δ , ϵ , η , θ)、非典型 (ζ , λ 1) の3つのサブファミリーに分類され、中でも従来型は細胞の増殖、分化、アポトーシスに関与あるいは疼痛の細胞内シグナルを伝達すると言われている (Fishman DD et al., Int J Oncol. 12:181-186, 1988, Nakajima A et al., J Dent Res. 90:777-781, 2011)。また、mGluR5 が活性化すると Gq タンパクのシグナルを介し PKC ϵ をリン酸化することが報告されており、この系が異常疼痛発症に重要な働きを有する可能性が示された。

また、代表者が行ったパイロットスタディーにおいて、ラット由来の squamous cell carcinoma (SCC)-158 細胞をラットの舌に投与したモデルを用いて経日的な機械刺激に対する疼痛反応の観察および舌の組織染色を行った結果、舌への SCC-158 細胞注入により、舌における経時的な癌の増大および機械刺激に対する2相性の疼痛閾値の低下を観察した。以上の結果から、癌細胞に発現すると報告されている mGluR5 が PKC の経路を介して癌性疼痛の発症に関与する可能性が非常に高いと考えられる。

一方、mGluR5 は神経のみならず口腔癌細胞にも存在し、癌の発育や増殖への関与が示されている。また、癌細胞からグルタミン酸が放出されることも明らかにされ (Teh and Chen, Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal, 1:211-220, 2012)、癌細胞自身からあるいは腫瘍増大に伴い生じる組織損傷によりシュワン細胞や角化細胞から放出されるグルタミン酸により、末梢 mGluR5 が活性

し細胞内シグナル伝達が亢進した結果 TRPV1 や TRPA1 が感作され疼痛が生じる可能性が考えられる。また、放出されたグルタミン酸により癌細胞上の mGluR5 が感作され、PKC ϵ のリン酸化を誘導することにより癌細胞の発育や増殖を促すネガティブフィードバックの回路を形成する可能性もある。以上から、これらのメカニズムを解明することは mGluR5 をターゲットとした異常疼痛および口腔癌の新規治療法開発の重要な足がかりとなると考えた。

2. 研究の目的

末梢神経に G タンパク共役型グルタミン酸受容体である mGluR5 が炎症や神経損傷に起因した異常疼痛発症に関与することが明らかにされ、mGluR5 をターゲットとした新規治療法の開発を目指した様々な基礎研究が行われている。また、最近では癌細胞の細胞膜上に mGluR5 の存在が確認され、異常疼痛だけでなく癌細胞の増殖にも関与する可能性が示されている。しかしながら、mGluR5 の異常疼痛および癌細胞の発育・増殖への関与には不明な点が多く残されており、臨床応用を目指した基礎研究が必要である。本研究では、mGluR5 をターゲットとした新規癌治療の開発を目指し、口腔顔面領域に発症した癌性異常疼痛と癌細胞の発育・増殖メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 類粘膜癌モデルラットの作成

培養したラット由来の扁平上皮癌 (SCC-158) 細胞を、ペントバルビタールナトリウムで麻酔した 6 週齢の Fischer (F344) 雄性ラットの類粘膜に注入し、類粘膜癌を発症させた類粘膜癌モデルラットを作成する。

(2) 癌組織におけるグルタミン酸の定量

glutamate assay kit を用い類粘膜癌モデルラットの類粘膜におけるグルタミン酸濃

度の測定を行う。

(3) SCC-158 細胞または舌癌組織における mGluR5 の局在性の解析

培養 SCC-158 細胞を用い、抗 mGluR5 と抗一次抗体を用い免疫染色を行う。また、類粘膜癌モデルラットの類粘膜の組織切片を作製し、抗 mGluR5 一次抗体を用い免疫染色を行う。免疫染色を行った標本を蛍光顕微鏡にて観察を行い、癌細胞上もしくは神経終末上の mGluR5 の局在の解析を行う。

(4) 類粘膜癌モデルラットにおいて発症した異常疼痛に対する mGluR5 アンタゴニストの効果

類粘膜に mGluR5 の選択的アンタゴニストである MTEP を持続投与した類粘膜癌モデルラットを用い、デジタルフォースプスにて機械刺激を与え逃避閾値を計測し、類粘膜癌モデルラットにおいて発症した異常疼痛に対する mGluR5 アンタゴニストの効果の解析を行う。

(5) 類粘膜癌モデルラットの癌の発育と増殖に対する mGluR5 アンタゴニスト効果

MTEP を持続した類粘膜癌モデルラットの類粘膜類粘膜の厚みを経日的に計測し、癌の発育と増殖に対する mGluR5 アンタゴニストの効果解析する。

(6) 三叉神経節における mGluR5 および PKC ϵ タンパクの発現解析

類粘膜癌モデルラットを用い、Western blot 法により三叉神経節における mGluR5 および PKC ϵ タンパクの発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) 類粘膜癌モデルラットの作成

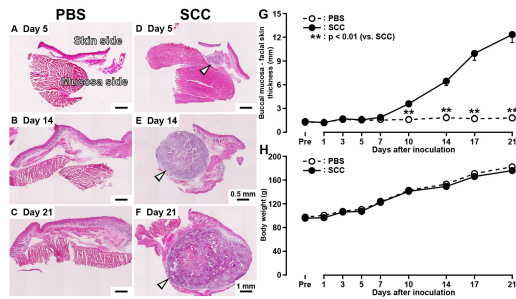


図1 頬粘膜への SCC 播種により腫瘍が定着し、播種後 10 日目以降、有意に腫瘍が増大した。

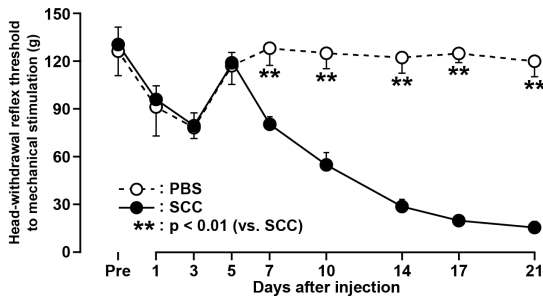


図2 頬粘膜への SCC もしくは PBS 播種後 3 日目において機械アロディニアが発症した。また、頬粘膜への SCC 播種後 7 日目以降に機械アロディニアが発症した。

(2) 癌組織におけるグルタミン酸の定量

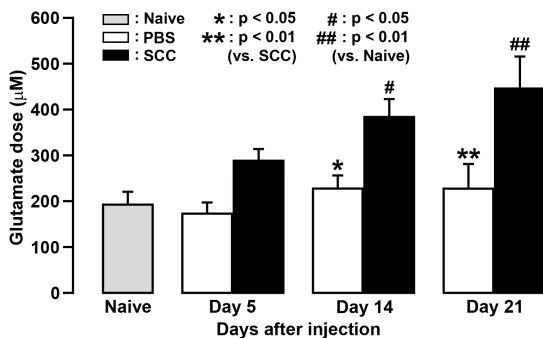


図3 頬粘膜への SCC 投与 7 および 14 日目において末梢のグルタミン酸濃度が有意に増加した。

(3) SCC-158 細胞または舌癌組織における mGluR5 の局在性の解析

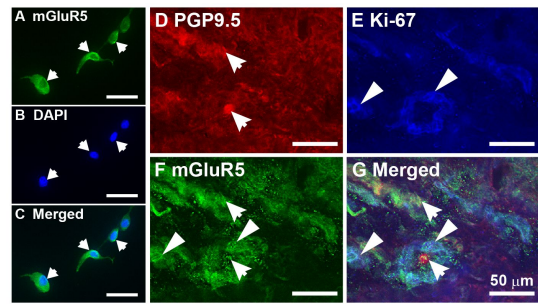


図4 培養 SCC 細胞において mGluR5 発現が認められた。また、末梢において mGluR5 は神経と増殖中の腫瘍細胞の両方で発現が認められた。

(4) 頬粘膜癌モデルラットにおいて発症した異常疼痛に対する mGluR5 アンタゴニストの効果

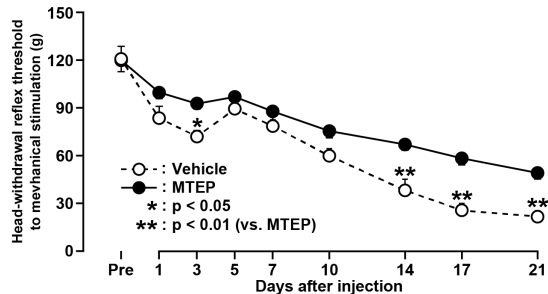


図5 mGluR5 antagonist である MTEP の持続処置により、頬粘膜癌によって発症した機械アロディニアが抑制された。

(5) 頬粘膜癌モデルラットの癌の発育と増殖に対する mGluR5 アンタゴニスト効果

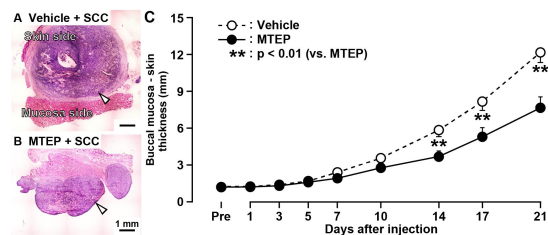


図6 mGluR5 antagonist である MTEP の持続処置により腫瘍の発育が有意に抑制された。

(6) 三叉神経節における mGluR5 および PKCε タンパクの発現解析

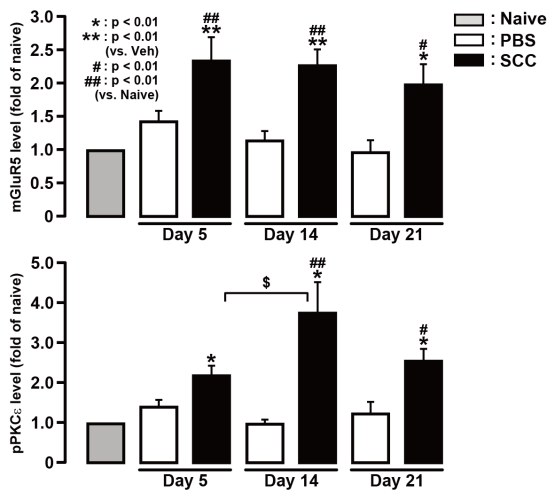


図7 SCC-158細胞播種により mGluR5 および pPKCεタンパク発現量は有意に増加した。

考察

以上の結果より、mGluR5 を介したシグナルが顔面領域における癌誘発機械アロディニアおよび癌の増殖・分化に関与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7件)

Kaji K, Shinoda M, Honda K, Unno S, Shimizu N, Iwata K (2016) Connexin 43 contributes to ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury. *Mol Pain*. 8;12. 査読有, doi: 10.1177/1744806916633704.

Suzuki A, Shinoda M, Honda K, Shirakawa T, Iwata K (2016) Regulation of transient receptor potential vanilloid 1 expression in trigeminal ganglion neurons via methyl-CpG binding protein 2 signaling contributes tongue heat sensitivity and inflammatory hyperalgesia in mice. *Mol Pain*. 8;12. 査読有. doi: 10.1177/1744806916633206.

Shinoda M, Takeda M, Honda K, Maruno M, Katagiri A, Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Tsuchiya M, Iwata K (2015) Involvement of peripheral artemin signaling in tongue pain: possible mechanism in burning mouth syndrome. *Pain*. 156:2528-2537. 査読有. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000322.

Kiyomoto M, Shinoda M, Honda K, Nakaya Y, Dezawa K, Katagiri A, Kamakura S, Inoue T, Iwata K (2015) p38 phosphorylation in medullary microglia mediates ectopic orofacial inflammatory pain in rats. *Mol Pain*. 11:48. 査読有.

doi: 10.1186/s12990-015-0053-y.

Urata K, Shinoda M, Honda K, Lee J, Maruno M, Itoh R, Gionhaku N, Iwata K (2015) Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intra-oral and extra-oral pain. *J Dent Res*. 94:446-454. 査読有.

doi: 10.1177/0022034514565645.

Tsuboi Y, Honda K, Bae YC, Shinoda M, Kondo M, Katagiri A, Echizenya S, Kamakura S, Lee J, Iwata K (2015) Morphological and functional changes in regenerated primary afferent fibers following mental and inferior alveolar nerve transection. *Eur J Pain*. 19:1258-1266. 査読有.

doi: 10.1002/ejp.650.

Honda K, Shinoda M, Furukawa A, Kita K, Noma N, Iwata K (2014) TRPA1 contributes to capsaicin-induced facial cold hyperalgesia in rats. *Eur J Oral Sci*. 122:391-396. 査読有. doi: 10.1111/eos.12157.

[学会発表](計4件)

Kuniya Honda, Masamichi Shinoda and

Koichi Iwata. Metabotropic glutamate receptor signaling is involved in cancer pain and cancer growth. 2015年9月13日、第57回歯科基礎医学会、朱鷺メッセ（新潟県・新潟市）

Kuniya Honda, Masamichi Shinoda and Koichi Iwata. Metabotropic glutamate receptor signaling is involved in cancer pain and cancer growth. September 4, 2015,

9th Congress of the European Pain Federation EFIC, Reed Messe Wien GmbH, Vienna (Austria)

Kuniya Honda, Masamichi Shinoda and Koichi Iwata. TRPA1 contributes to capsaicin-induced facial cold hyperalgesia in rats. May 15, 2015, 4th International Congress on Neuropathic Pain, Nice Acropolis Convention Center, Nice (France)

Kuniya Honda, Masamichi Shinoda and Koichi Iwata. Activation of peripheral mGluR5 contributes thermal and mechanical hyperalgesia via TRPA1 and TRPV1. 2014年9月26日、第56回歯科基礎医学会、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 訓也 (HONDA, Kuniya)

日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号：20548945