

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893243

研究課題名(和文) 口腔ガン誘発機械性痛覚過敏におけるTRPA1感作メカニズムの解明

研究課題名(英文) Involvement of TRPA1 in oral cancer-induced mechanical pain

研究代表者

小野 堅太郎 (Ono, Kentaro)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40316154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がんになると食事の際に患部に物があたるたびに痛みが生じる。これまでの研究にて、ガン組織から放出されるアデノシン三リン酸が接触痛を起こしていることが分かっていたが、どの機械受容体が関与しているかどうかは不明であった。本研究では、動物実験にて機械受容体であるTRPA1チャネル分子が接触痛に関与するかどうかを調べた。その結果、アデノシン三リン酸の受容体P2X3が活性化するとTRPA1チャネルが感作し、接触痛が起きることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Oral cancer induces pain during meals when food and teeth touch on cancer region. In previous studies, it has been reported that adenosine triphosphate released from cancer causes mechanical pain. However, it is unclear which mechano-sensitive channels are involved. In this study, we investigated whether the mechano-sensitive channel TRPA1 is related in cancer-induced mechanical pain. Consequently, we revealed that mechanical pain is mediated by sensitization of TRPA1 following activation of P2X3 in the response to adenosine triphosphate.

研究分野：神経生理学

キーワード：TRPA1 P2X3 ATP ガン性疼痛 接触痛

1. 研究開始当初の背景

1981年以降、日本の死因トップは脳血管疾患から悪性新生物(悪性腫瘍)となった。75~90%の末期・進行がんの患者は疼痛を訴え、うち45~80%は治療困難な異常疼痛を強いられる(Epstein et al., J Dent Res, 2007)。カリフォルニア大学からの報告では、口腔がん患者は大学病院来院時に既に何らかの痛みを有しており、visual analog scaleを用いた痛みの程度評価では前がん病変の患者よりも統計学的に有意に高い値を示している(Connelly & Schmidt, J Pain, 2004; Lam & Schmidt, Pain, 2011)。本邦では、研究代表者からのものも含めて数多くの口腔顔面ガンモデルラットにおける疼痛発症の報告がなされている(Nagamine et al., J Pain, 2006; Shinoda et al., J Pain, 2008; Ono et al., Eur J Pain, 2009; Harano et al., J Dent Res, 2010; Hidaka et al., Neurosci, 2011; Sago et al., 2012)。これらの研究から、がん細胞を後肢に接種したモデル(Brigatte et al., J Pain, 2007)よりも、口腔顔面領域に接種した方がより早期に自発痛、機械的異痛症、熱性過敏を引き起こすことがわかった。これらの動物実験の結果はアメリカでの臨床研究の報告と一致している。こういった異常疼痛はがん組織の摘出により消失するが、末期・進行がんの患者では手術不可な場合もあり、食事の運動性接触痛や刺激性味物質誘発による痛みが食欲を減退させ、衰弱のうちに死に至ることから非常に問題視されている。これらの問題の解決のために、口腔ガン性疼痛の発症メカニズムの解明とそれに基づいた鎮痛法の開発が急務とされている。

口腔ガン患者の疼痛アンケート解析では、自発痛に比べて口腔機能時の痛みがより深刻であり、接触過敏痛の程度が最も高い値を示している(Lam & Schmidt, Pain, 2011)。ゆえに、口腔がんによる機械刺激誘発疼痛(もしくは機能痛)に焦点を当てた研究が必要である。ヒト扁平上皮癌細胞 HSC-3 の培養上澄み液をマウス C57BL/6 に投与した研究では、癌細胞そのものがなくても機械刺激誘発疼痛が誘発され、過剰分泌される神経成長因子や細胞内エネルギーである ATP が関与することが示唆されている(Ye et al., Mol Cancer Ther, 2011; Acta Neuropathol Commun, 2014)。疼痛関連 ATP 受容体として P2X2/3 チャンネルがよく知られているが、機械刺激により活性化を示さないため、なぜ P2X2/3 の活性化が機械刺激誘発疼痛を引き起こすのかが不明である。一方で、機械受容体である TRPA1 チャンネルによる機械刺激誘発疼痛の発生メカニズムはよく知られている。そこで、P2X2/3 の活性化が TRPA1 の機械感受性を感作するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ガン細胞培養上澄み液の ATP による TRPA1 チャンネルの感作が機械刺

激過敏性疼痛の発症に関与するのかどうかを明らかにすることとした。このメカニズムの解明は、疼痛を有する口腔がん患者に対しての新しい鎮痛薬やその方法を開発する手がかりとなるかもしれない。

3. 研究の方法

ヒト扁平上皮癌細胞 HSC-3 を 100 mm プラスチック培養皿にて 10%FBS の DMEM 下で培養し、90%以上コンフルエントになった状態で無血清透明 DMEM 培養液 3 ml に置換した。この状態で 24 時間後に上澄み液を回収し、遠心により浮遊していた細胞を除去して、口腔癌培養上澄み液とした。これに、P2X2/3 阻害薬 A317491 および TRPA1 チャンネル阻害薬 HC030032 を混合し、イソフルラン麻酔下にてマウス C57BL/6 の鼻毛部に 50 μ l 投与した。また、P2X2/3 活性化薬 メチル ATP も使用した麻酔から回復した 1 時間後に、von Frey 毛を用いて鼻毛部における機械逃避閾値を測定した。

マウス C57BL/6 から摘出した三叉神経節を通常に従って分散培養し、1 日培養した。Ca²⁺-蛍光指示薬となる fura-2 AM (10 μ M) を添加した透明 DMEM 溶液(細胞外灌流液)にて単離三叉神経節ニューロンを 30 分インキュベーションする。透過顕微鏡下で測定領域を選択後、fura-2 の蛍光を適切なフィルターを介して継時的に観察した。試薬として、P2X2/3 阻害薬 A317491、P2X2/3 活性化薬

メチル ATP および TRPA1 チャンネル活性化薬マスタードオイル、TRPV1 チャンネル活性化薬カプサイシンを使用した。

マウス C57BL/6 から摘出した三叉神経節を通常に従って凍結切片を作成し、P2X3 と TRPA1 の特異抗体を用いて蛍光二重染色を行った。

4. 研究成果

HSC-3 培養上澄み上清のマウス鼻毛部への投与により機械逃避閾値は有意に低下し、機械痛覚過敏が発症していた。これは P2X2/3 阻害薬 A317491 および TRPA1 チャンネル阻害薬 HC030032 により有意に抑制され、口腔癌細胞より分泌された ATP が P2X2/3 を刺激して機械痛覚過敏を発症させること、そして TRPA1 の活性化が関与することが示唆された。HSC-3 培養上澄み上清と同様に、P2X2/3 活性化薬 メチル ATP の投与も機械逃避閾値を有意に低下させ、HC030032 により有意に抑制された。よって、P2X2/3 の活性化により TRPA1 の活性化が引き起こされる可能性がある。

この可能性について、マウス三叉神経節ニューロンからの fura-2 を用いた Ca²⁺-イメージング法にて検討した。多くのニューロンが HSC-3 培養上澄み上清により細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させ、A317491 により抑制されたため、HSC-3 培養上澄み上清中の ATP が三叉神経節ニューロンにおける P2X2/3 を活性化

していることが明らかとなった。さらに、TRPA1 チャンネル活性化薬マスタードオイルによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、HSC-3 培養上澄み上清の投与後では反応が増強され、A317491 によりこの増強反応は抑制された。同様のマスタードオイル反応の増強は、P2X2/3 活性化薬 メチルATP にも引き起こされた。一方、TRPV1 チャンネル活性化薬カプサイシンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、HSC-3 培養上澄み上清の投与後でも増強反応は見られなかった。これらの結果は、P2X2/3の活性化によりTRPA1の活性化が引き起こされるという可能性を支持する。

P2X3 と TRPA1 の特異抗体を用いて蛍光二重染色にて、マウス三叉神経節ニューロンにおいて、両チャンネルが共発現していることが確認された。

これらの結果より、口腔癌細胞から放出される ATP が疼痛関連一次求心性線維の P2X2/3 チャンネルを活性化し、その後の TRPA1 チャンネルの感作を引き起こすことによって機械痛覚過敏が発症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8件)

Hitomi S, Ono K, Yamaguchi K, Terawaki K, Imai R, Kubota K, Omiya Y, Hattori T, Kase Y, Inenaga K. The traditional Japanese medicine hangeshashinto alleviates oral ulcer-induced pain in a rat model. Arch Oral Biol. 2016 Jun; 66: 30-7. (査読有)

Yamaguchi K, Ono K, Hitomi S, Ito M, Nodai T, Goto T, Harano N, Watanabe S, Inoue H, Miyano K, Uezono Y, Matoba M, Inenaga K. Distinct TRPV1- and TRPA1-based mechanisms underlying enhancement of oral ulcerative mucositis-induced pain by 5-fluorouracil. Pain. 2016 May; 157(5): 1004-20. (査読有)

小野堅太郎, 人見涼露, 稲永清敏 (2015) 唾液と歯周病, 日本歯科評論, 868: 133-7. (査読無)

小野堅太郎, 人見涼露, 稲永清敏 (2015) 癌性疼痛、そして口内炎痛, 日本歯科評論, 878: 129-35. (査読無)

Ujihara I, Hitomi S, Ono K, Kakinoki Y, Hashimoto H, Ueta Y, Inenaga K. The ethanol metabolite acetaldehyde induces water and salt intake via two distinct pathways in the central nervous system of rats. Neuropharmacology. 2015 Dec; 99: 589-99. (査読有)

Ono K, Ye Y, Viet CT, Dang D, Schmidt

BL. TRPV1 expression level in isolectin B₄-positive neurons contributes to mouse strain difference in cutaneous thermal nociceptive sensitivity. J Neurophysiol. 2015 May 1; 113(9): 3345-55. (査読有)

Hitomi S, Ono K, Miyano K, Ota Y, Uezono Y, Matoba M, Kuramitsu S, Yamaguchi K, Matsuo K, Seta Y, Harano N, Inenaga K. Novel methods of applying direct chemical and mechanical stimulation to the oral mucosa for traditional behavioral pain assays in conscious rats. J Neurosci Methods. 2015 Jan 15; 239: 162-9. (査読有)

Viet CT, Dang D, Ye Y, Ono K, Campbell RR, Schmidt BL. Demethylating drugs as novel analgesics for cancer pain. Clin Cancer Res. 2014 Sep 15; 20(18): 4882-93. (査読有)

[学会発表](計20件)

小野堅太郎, 人見涼露, 山口喜一郎, 伊藤美紗, 野代知孝, 稲永清敏 (2016) 口内炎疼痛メカニズムに基づいた新規鎮痛法 日本生理学会, 札幌.

人見涼露, 小野堅太郎, 山口喜一郎, 寺脇潔, 松本千波, 大宮雄司, 稲永清敏 (2016) Shogaol と gingerol は Nav を介して口内炎疼痛を抑制する 日本生理学会, 札幌.

小野堅太郎 (2015) 口内炎に対する半夏瀉心湯の鎮痛作用～作用機序と活性成分の検討～ 日本癌治療学会学術大会 京都.

Hitomi S, Ono K, Yamaguchi K, Omiya Y, Terawaki K, Inenaga K. (2015) Analgesic effect of Hangeshashinto, a traditional Japanese medicine, on oral ulcer-induced pain in rats. Asia-Pacific Conference, Fukuoka.

Ono K, Ye Y, Viet CT, Dang D, Hitomi S, Inenaga K, Schmidt BL. (2015) Tyrosinase-dependent skin dopamine mediates heat pain sensitivity. Asia-Pacific Conference, Fukuoka.

Yamaguchi K, Hitomi S, Ono K, Harano N, Watanabe S, Inenaga K. (2015) Effects of anti-cancer drugs on oral ulcer-induced pain in rat model. Asia-Pacific Conference Fukuoka.

Yamaguchi K, Hitomi S, Ono K, Harano N, Watanabe S, Inenaga K. (2015) Effects of anti-cancer drugs on pain induction in a rat stomatitis model. 日本生理学会, 神戸.

Hitomi S, Ono K, Yamaguchi K, Omiya Y, Terawaki K, Inenaga K. (2015)

Analgesic effect of hangeshashinto on oral ulcer-induced pain in rats. 日本生理学会, 神戸.

Ono K, Ye Y, Viet CT, Dang D, Hitomi S, Inenaga K, Schmidt BL. (2015) Primary nociceptive modulation via pigmentation-dependent dopaminergic signaling in skin. 日本生理学会, 神戸.

人見涼露, 小野堅太郎, 山口喜一郎, 寺脇潔, 松本千波, 大宮雄司, 稲永清敏 (2015) 半夏瀉心湯による口内炎疼痛抑制には shogaol および gingerol の Nav1.8 抑制作用が関与する 西日本生理学会, 福岡.

小野堅太郎, Viet CT, Ye Y, Dang D, 人見涼露, 稲永清敏, Schmidt BL. (2015) メラノサイト由来ドーパミンによる新規皮膚感覚調節機構 西日本生理学会, 福岡.

人見涼露, 小野堅太郎, 山口喜一郎, 稲永清敏 (2015) Shogaol および gingerol はナトリウムチャンネル Nav1.8 を阻害して口内炎疼痛を抑制する 歯科基礎医学会, 新潟.

山口喜一郎, 小野堅太郎, 人見涼露, 原野望, 左合徹平, 渡辺誠之, 稲永清敏 (2015) 5-フルオロウラシル投与ラットにおける口内炎誘発疼痛のメカニズム 歯科基礎医学会, 新潟.

伊藤美紗, 小野堅太郎, 人見涼露, 山口喜一郎, 川元龍夫, 稲永清敏 (2015) 矯正ワイヤーによる新規口内炎モデルラットの開発 歯科基礎医学会, 新潟.

人見涼露, 小野堅太郎, 山口喜一郎, 寺脇潔, 大宮雄司, 稲永清敏 (2015) 半夏瀉心湯によるラット口内炎疼痛抑制メカニズムの解明 九州歯科学会, 北九州.

山口喜一郎, 人見涼露, 小野堅太郎, 原野望, 左合徹平, 渡辺誠之, 稲永清敏 (2015) 口内炎誘発疼痛に対するガン化学療法薬の影響 九州歯科学会, 北九州.

Yamaguchi K, Ono K, Hitomi S, Harano N, Sago T, Watanabe S, Inenaga K. (2015) Mechanism underlying oral ulcerative mucositis-induced pain in chemotherapy-received rat model. Neuroscience, Chicago.

Ito M, Ono K, Hitomi S, Yamaguchi K, Kawamoto T, Inenaga K. (2015) A new pre-clinical animal model for oral ulcer pain following orthodontic wire appliance. Neuroscience, Chicago.

Hitomi S, Ono K, Yamaguchi K, Omiya Y, Terawaki K, Inenaga K. (2015) Ginger-contained shogaol and gingerol inhibit oral ulcer-induced pain through sodium channel blockage.

Neuroscience, Chicago.

小野堅太郎 (2014) ニューヨーク大学での留学経験について 日本病態生理学会サテライトセミナー 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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