

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791695

研究課題名(和文)末梢神経圧排とTRPV2に注目した難治性骨がん疼痛の機序解明と新たな治療法の開発

研究課題名(英文)Identify a mechanism of bone cancer pain and a therapeutic development of bone cancer pain, focused on TRPV2 and peripheral nervous system

研究代表者

山本 克己(YAMAMOTO, Katsumi)

信州大学・医学部附属病院・助教(診療)

研究者番号：60441862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：骨がん・骨転移による痛みはオピオイド抵抗性の難治性疼痛である。TRPV2に着目して新たな治療法の開発を目的として本研究を進めてきた。マウス大腿骨がんモデルは、疼痛関連行動として自発痛、運動時関連痛を呈する。コントロール、骨がんモデルともに持続でsiRNAを持続で投与できるように脊髄くも膜下カテーテルを埋め込んだ。

脊髄くも膜下カテーテルからsiRNAを投与した結果、骨がん疼痛関連行動のうち自発痛に関してはコントロール群と比較して改善傾向は認めなかった。運動時関連痛に関しては、siRNA投与群で改善傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：Tumor-bearing mice exhibited bone cancer-related pain behaviors, including spontaneous flinches, impaired limb use during spontaneous ambulation, and impaired weight bearing during spontaneous standing at day 14 after osteosarcoma injection. Intrathecal vector alone did not affect the 3 bone cancer-related pain behaviors. On the other hand, intrathecal TRPV2 siRNA significantly improved limb use and weight bearing but not the number of spontaneous flinches compared to the vector alone. The results of this study showed that primary afferent-expressing TRPV2 was involved in bone cancer-induced movement-evoked pain but not ongoing pain.

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：TRPV2 bone cancer pain siRNA knockdown

1. 研究開始当初の背景：がん治療の進展にも拘らず、わが国の死因第一位はがんである。3人に1人はがんで死亡している。進行がん患者に頻発する症状として全身倦怠感、食欲不振、痛み、不眠などがあげられる。中でも痛みはがん病変の治療を受けている患者の30-50%に、進行がん患者では70-90%の高率で認められる。したがって、最優先で対応すべき症状と考えられる。現在、WHO方式のがん疼痛治療法が考案され、その普及によりがん疼痛治療に対してオピオイドが使用されている。オピオイドは優れた鎮痛効果を発揮する一方、便秘、嘔気、眠気などの副作用を多く認め、副作用管理に難渋する。そこで、オピオイドによらない骨がん疼痛のメカニズムに基づいた治療法を開発することを目的とした。

2. 研究の目的：がん疼痛の中でも骨原発がんおよび骨転移による痛みはオピオイド抵抗性の難知性疼痛であり、新たな治療法の開発が急務である。本研究の目的は骨がん疼痛モデル動物を用いて新たな治療標的分子を同定することである。骨髄内での腫瘍進展様式に着目し、末梢神経圧排による疼痛形成メカニズムを検討する。Transient receptor potential familyの一つであるTRPV2は細胞膜伸展を感知する分子であり、知覚神経に発現している。TRPV2に注目し、その知覚神経での発現・分布・局在を明らかにするとともに、TRPV2の機能抑制による骨がん疼痛発現変化を検討、骨がん疼痛形成の分子基盤を明らかにして新たな治療法を提示する。

3. 研究の方法：

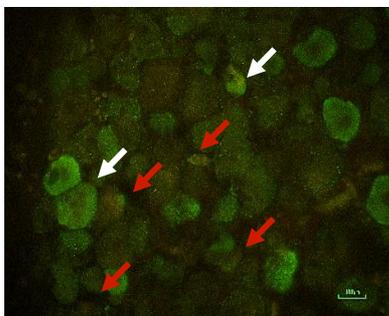
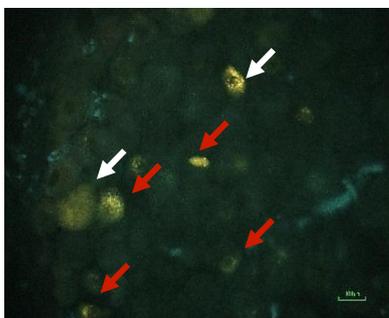
(1) マウス大腿骨骨髄へのTRPV2陽性神経の投射を確認するために、逆行性神経トレーサー・フルオロゴールドを使用した。マウス大腿骨骨髄内へフルオロゴールドを打ち込み、48時間以降にマウス後根神経節を採取した。神経節細胞のうち、フルオロゴールドを取り込んでいる細胞についてさらに性質を調べるために免疫組織学的染色を施行した。フルオロゴールド、TRPV2ともに陽性である細胞が後根神経節に存在することを確認した。

(2) 正常マウスにおける侵害熱刺激および機械刺激に対するTRPV2 siRNA脊髄投与の効果調べた。全身麻酔下にマウス脊髄くも膜下腔内へカテーテルを埋め込み、カテーテルを通じて薬剤投与が出来るようにモデルを作成した。TRPV2 siRNAをカテーテルから投与して熱刺激に対する逃避潜時時間およびvon Freyフィラメントに対する逃避閾値を測定した。

(3) 骨がん疼痛関連行動に対するTRPV2 siRNA脊髄投与の効果調べた。全身麻酔下にマウス脊髄くも膜下カテーテルを留置、同時にマウス大腿骨へ骨がん細胞を移植した。骨がんを移植されたモデルは移植後10日目以降から疼痛関連行動を示し、ピークをむかえ一定の期間継続する。疼痛関連行動について、自発痛(フリッチ)、運動時関連痛(患肢への体重かけ・歩行状態)に分類して経時的に測定、記録した。疼痛関連行動が顕著に認められる期間に脊髄くも膜下へ埋め込んだカテーテルを通じてTRPV2 siRNAを投与して効果を調べた。

4. 研究成果：

(1) マウス大腿骨骨髄への TRPV2 陽性神経の投射を調べた結果を示す。白矢印は逆行性神経トレーサー・フルオロゴールド、TRPV2 とともに陽性細胞を示し、赤矢印はフルオロゴールドのみ陽性である細胞を示す(図 1)。後根神経節の細胞において約 24%の細胞がフルオロゴールド、TRPV2 とともに陽性を示した。この結果からマウス大腿骨へ TRPV2 陽性神経が投射していることが示唆された。

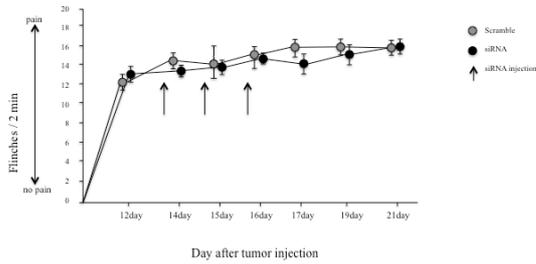


(図 1)

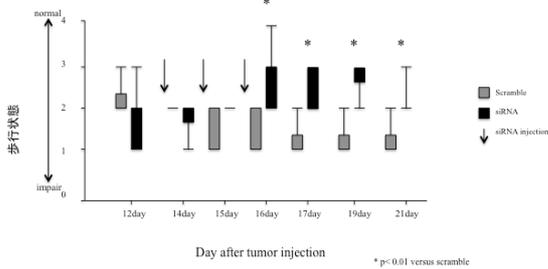
(2) 正常マウスにおける侵害熱刺激および機械刺激に対する TRPV2 siRNA 脊髄投与の効果について調べた。侵害熱刺激、von Frey フィラメントを用いた機械刺激ともに TRPV2 siRNA 投与による変化を認めなかった。この結果から細胞膜伸展変化を感知する TRPV2 は正常マウスにおいては機能的な働きをなさないことが示唆された。これは TRPV2 knockout マウスを用いた侵害熱刺激、機械刺激に対しての同様の結果となった。(J Neurosci 2011)。

しかし、TRPV2 は insulin like growth factor (IGF) などの存在下で細胞質から細胞膜へ移行する (Nat Cell Biol 1999)。IGF は破骨細胞によって破壊された骨から放出される生理活性物質の一つである。大腿骨へ骨がんを移植された骨がん疼痛状態では細胞膜移行を惹起する可能性がある。マウス骨がんモデルに TRPV2 siRNA を投与し、疼痛関連行動の変化を測定した。

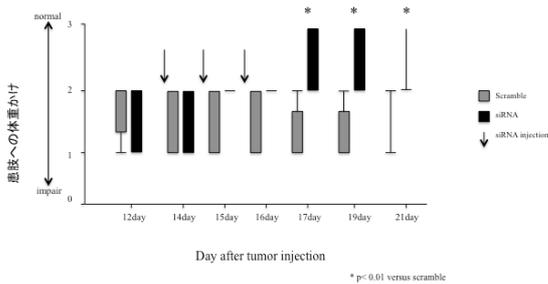
(3) 骨がん疼痛関連行動に対する TRPV2 siRNA 脊髄投与の効果について検討した。大腿骨骨髄へ骨がん細胞を移植すると疼痛関連行動として自発痛(フリッチ)、運動時関連痛(患肢への体重かけ・歩行状態)に変化をきたす。骨がん移植後、10 日目以降に認めるようになり、さらに 14 日目にかけて顕著に認める。TRPV2 siRNA の脊髄投与における効果を検討するためにマウス骨がんモデル作成後、14 日目から 3 日間連続して TRPV2 siRNA を投与した。自発痛、運動時関連痛について変化を経時的に測定・記録した。TRPV2 に対して何ら影響をもたらさない siRNA scramble を投与するコントロール群と TRPV2 siRNA 投与群との比較・検討を行った。結果として、自発痛に関しては両群に差を認めなかった(図 2)。運動時関連痛に関しては、コントロール群と比較して TRPV2 siRNA 投与群で改善傾向を認めた(図 3、図 4)。この結果から、TRPV2 siRNA を脊髄投与することにより骨がん疼痛、特に運動時関連痛について鎮痛効果を発揮することが示された。TRPV2 siRNA の脊髄投与は骨がん疼痛に対して新たな治療法となることが示唆された。



(図 2) 自発痛(フリinch)についてはコントロール群と比較して TRPV2 siRNA 脊髄投与での改善を示さなかった。



(図 3) 歩行状態ではコントロール群と比較して TRPV2 siRNA 脊髄投与により改善傾向を認めた。歩行状態について、0:患肢を使わない障害から、4:正常である歩行の 5 段階に分類してスコア化して比較した。



(図 4) 患肢への体重かけではコントロール群と比較して TRPV2 siRNA 脊髄投与により改善傾向を認めた。骨がんを移植された患肢への体重かけを、0:全く体重をかけられない障害から、3:正常に体重をかけられる状態の 4 段階に分類してスコア化して比較した。

5. 主な発表論文等：(計 4 件)

学会発表

- ① 山本克己、TRPV2 is involved in bone cancer-induced movement-evoked pain but not ongoing pain、北米神経科学会、2012年10月17日、米国(ニューオリンズ)
- ② 山本克己、マウス骨がん疼痛モデルにおいて TRPV2 は運動時関連痛に参与する、日本疼痛学会、2012年7月21日、熊本
- ③ 山本克己、TRPV1 and TRPV2 are expressed in primary afferent neurons innervating bone marrow、American society of Anesthesiologists、2011年10月19日、米国(シカゴ)
- ④ 山本克己、大腿骨骨髄へ投射する知覚神経の免疫組織学的性質、日本麻酔科学会、2011年5月20日、神戸

6. 研究組織

研究代表者

山本 克己 (YAMAMOTO, Katsumi)

信州大学・医学部附属病院・助教(診療)

研究者番号：60441862