

担癌マウスの感覚ニューロンにおける疼痛関連メディエーターの発現増加に伴う持続的な疼痛シグナルによるがんの悪化

難治性の痛みががん患者の生活の質と生存率の両方を低下させることを示唆する報告が増加している。本研究では、担癌マウスを用いて慢性疼痛刺激が癌の病態に直接影響を与える可能性があるかどうかを評価した。この目的のために、我々はマウスの慢性疼痛の 2 つの異なるモデル、神経障害性疼痛と持続性術後疼痛を使用し、腫瘍細胞としてルイス肺癌 (LLC) を使用した。これらの疼痛モデルでは腫瘍の増殖が劇的に促進されることがわかった。これらの疼痛モデルと同様に、デザイナードラッグであるクロザピン-N-オキシド (CNO) で治療した AAV6 hM3Dq 注射マウスでは、LLC、重度骨肉腫 (AXT) および B16 黒色腫細胞の腫瘍増殖が、感覚ニューロンの活性化によって有意に促進された。AAV6-hM3Dq を注射したマウスの後根神経節の同側における血管内皮増殖因子 A (Vegfa)、タキキニン前駆体 1 (Tac1) およびカルシトニン関連ポリペプチド α (Calca) の mRNA レベルの有意な増加が、同時活性化によって観察された。さらに、骨癌性疼痛モデルマウスにおいて さらに、AXT 細胞を右大腿骨骨髓腔に移植した骨癌性疼痛モデルマウスでは、CNO 投与による感覚ニューロンの活性化を繰り返すことにより、生存期間が有意に延長した。。さらに、マウスの右大腿骨骨髓腔に AXT 細胞を移植した骨癌性疼痛モデルでは、AAV6-hM4Di を注入したマウスの感覚ニューロンを CNO 投与により繰り返して阻害することにより、生存期間が有意に延長した。これらの結果は、持続的な疼痛シグナルが感覚局在ペプチドおよび成長因子の発現を増加させることによって腫瘍の成長を促進する可能性があり、癌性疼痛を制御することにより癌の生存期間を延長させる可能性があることを示唆している。

Introduction

がんの痛みは腫瘍による骨、神経、または体内の他の臓器の圧迫によって引き起こされる[1]。手術、放射線療法、化学療法などのがん治療でも痛みが生じる場合があ

る[1, 2]。末期がんでは、骨転移によってさらに激しい痛みが生じることもよくみられる [3, 4]。

がんの痛みはさまざまな要因によって引き起こされるため、管理が難しい場合がある。がん患者の半数以上が痛みを経験し、末期がん患者のほとんどは中等度から重度の痛みを経験すると報告されている[5, 6]。

最近の研究では、持続的な痛みは患者の生活の質 (QOL) を低下させ、さまざまな病気の生存率を低下させることが示されている [7-11]。これらの報告は

がんの痛みはがんの病状の悪化に寄与することを示唆している。さらに、転移性非小細胞肺癌患者では、早期の緩和ケアが QOL の大幅な改善につながる可能性がある [12]。

ただし、鎮痛は重要な要素だが、がん患者のケアでは、現在利用可能な薬物療法では痛みが容易に軽減されないことがよくある。

最近、末梢神経が腫瘍組織内に伸び、癌の進行の制御に役割を果たしていることが報告されている[13, 14]。これらの感覚ニューロンは、腫瘍微小環境を構成するさまざまな細胞と相互作用することにより、腫瘍の進行に部分的に対応しているとも考えられている[15]。

本研究では、持続的な痛み刺激が担癌マウスのがん病態を悪化させる可能性があるかどうかを調査した。さらに、化学遺伝学的操作による感覚ニューロンの活性化が担癌マウスの感覚ニューロンの変化を引き起こす可能性があるかについて評価を行った。最後に感覚ニューロンの抑制を繰り返すことで骨癌性疼痛モデルの生存期間を改善できるかどうかを検証した。

坐骨神経結紮による神経因性疼痛モデルの作製

麻酔下に、マウスの右後肢の坐骨神経を 8-0 糸を使用して結紮した。偽手術マウスでは、坐骨神経は露出しているだけで、結紮はされていない。

電気メスによる持続性術後疼痛モデルの作成

麻酔下で、マウスの右後足の皮膚と筋膜に、3 mm の縦方向の切開を加えた。次に電気メスでマウスの足底筋に 3 mm の縦方向の切開を加えた。偽手術マウスでは、切開せずに足底筋を露出させ、7-0 ナイロン糸で単純縫合を行なって皮膚を縫合した。

感覚ニューロンの化学遺伝学的操作

イソフルラン麻酔下で、マウスの右後肢(同側)の坐骨神経を露出させるために、皮膚および浅殿筋と大腿二頭筋の間の結合組織を 1~2cm 縦方向に切開した。次にカニューレを坐骨神経に挿入し、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを 4 μ L 注入した。その後、マウスにクロザピン N オキシド (CNO) を 2 週間腹腔内注射した

使用されたウイルス: AAV6 hSyn-hM3Dq mCherry、AAV6 hSynhM4DimCherry、AAV6-hSyn EGFP、AAV6 hSyn-mCherry

コントロールベクター: AAV6-hSyn EGFP および AAV6 hSyn-mCherry

足底検査

侵害受容刺激に応答した後足の退縮反応時間は、熱刺激装置を使用して、マウスの後足の足底表面に熱刺激を与えて測定した。

機械的異痛症の測定

デバイスに取り付けられたチップをマウスの後足の足底面に垂直に当て、後足を蹴るまでの圧力 (g) を痛みの閾値として記録した。

使用されたがん細胞: ルイス肺癌 (LLC)、LLC-luc および B16 黒色腫 (B16) 細胞、マウス重症骨肉腫 (AXT) 細胞

腫瘍体積: $(L \times W^2)/2$ (L = 長さ W = 幅)

がん性疼痛モデルマウス

腫瘍異種移植片を確立するために、50 μ L の IMDM に懸濁した AXT-luc 細胞を同系マウスの右大腿骨髄腔に注射した。膝関節を 90° まで曲げ、皮膚を切開して大腿骨の遠位側を露出させた。23 ゲージの針を骨髄腔に挿入して小さな孔を作り、そこに AXT-luc 細胞または培地のみを注入した。

生体内イメージングシステム (IVIS)

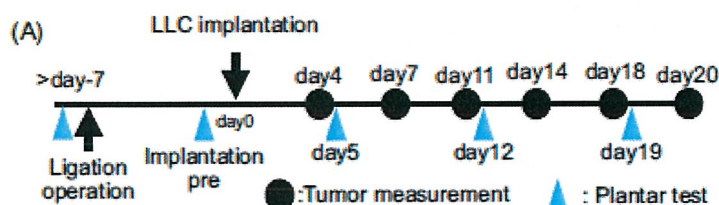
撮影の約 10 分前に、4.5 mg/ml の基質ルシフェリンを腹腔内に注射したマウスを麻酔し、画像検査を行なった。

定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

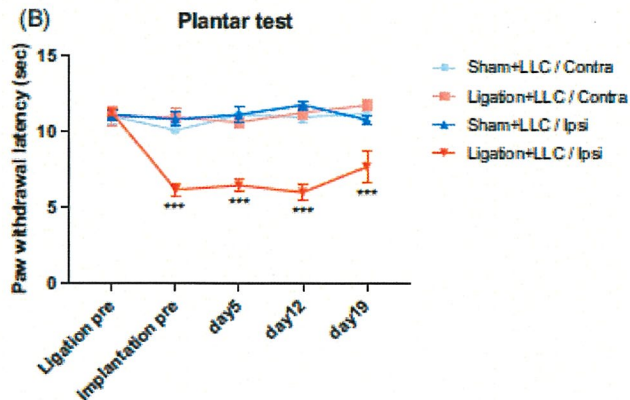
RT-qPCR 分析では、マウス後根神経節 (DRG) (L3 ~ L5) の同側から全 RNA を単離し、第一鎖 cDNA を合成した。グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Gapdh) を内部対照として使用した。

Results

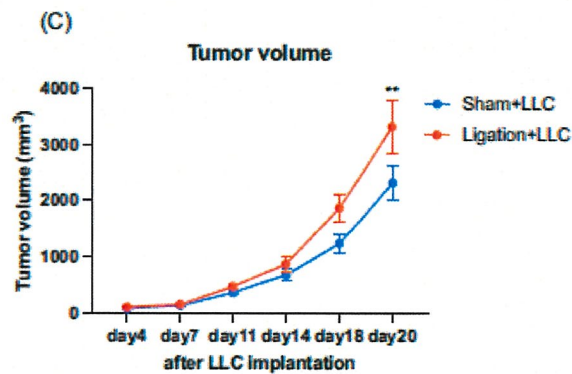
坐骨神経の結紮または足の電気焼灼手術によって引き起こされる持続性の痛みが腫瘍増殖に及ぼす影響: まず、坐骨神経結紮の結果として活性化された感覚ニューロンが腫瘍増殖に及ぼす影響を調査した(図 1A)。



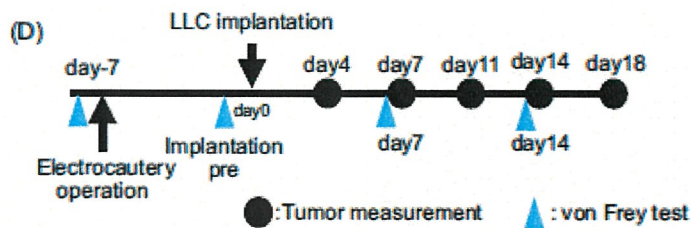
神経障害性疼痛のモデルとして部分的に坐骨神経結紮を行い、次に担癌マウスを作成するために術後 7 日目に LLC 細胞を坐骨神経結紮部周囲の皮下に移植した。この条件下で、これらのマウスの疼痛閾値と腫瘍体積を評価した。その結果、足底テストにより、術後 7 日目から坐骨神経結紮群の同側に有意な熱痛覚過敏反応が観察された(図 1B、*** $p < 0.001$ vs. Sham + LLC/Ipsi)。



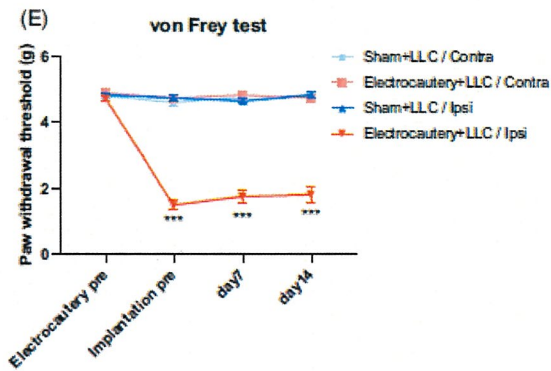
これらの条件下で、LLC 移植後 20 日の坐骨神経結紮群では、偽手術マウスと比較して腫瘍体積が有意に増加した(図 1C、** $p < 0.01$ 対偽+LLC)。



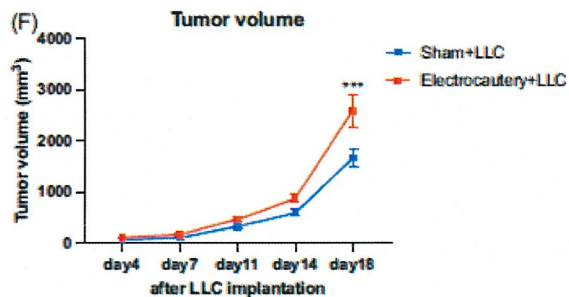
次に、さまざまな疼痛モデルにおける腫瘍増殖への影響を調査するために、持続性術後疼痛モデルとしての後足の電気焼灼手術によって活性化された感覚ニューロンが腫瘍増殖に及ぼす影響を調査した(図 1D)。



坐骨神経結紮と同じ実験スケジュールで、手術の 7 日後に LLC 細胞を移植し、疼痛閾値と腫瘍体積の変化を評価した。von Frey テストにより、術後 7 日目から電気メス群の同側に顕著な触覚異痛症が観察された(図 1E、*** $p < 0.001$ vs. Sham + LLC/Ipsi)。

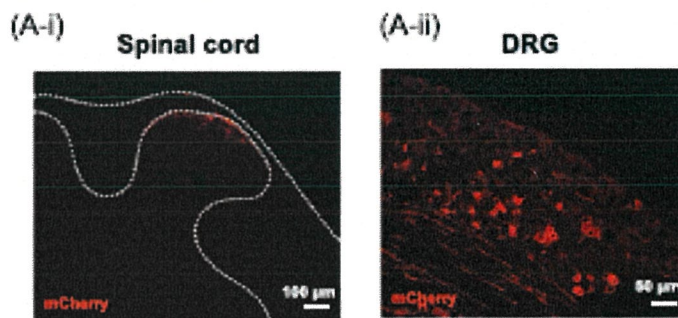


これらの条件下では、擬似手術マウスと比較して、LLC 移植後 18 日目の電気焼灼群で腫瘍体積が有意に増加した(図 1F、*** $p < 0.001$ 対擬似+LLC)。

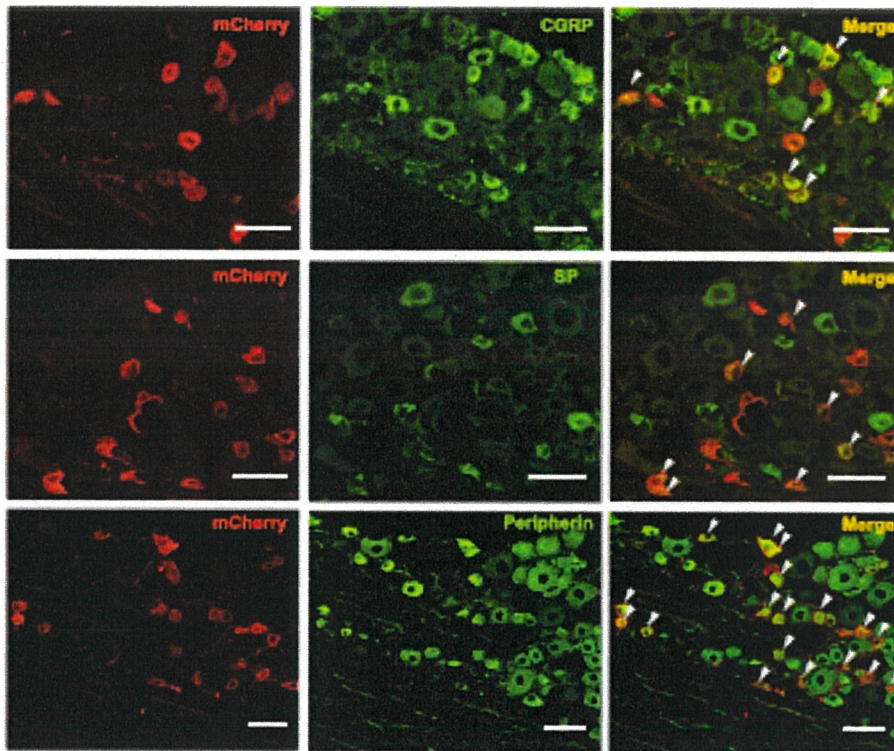


感覚神経の化学遺伝学的操作による一過性痛覚過敏の誘導

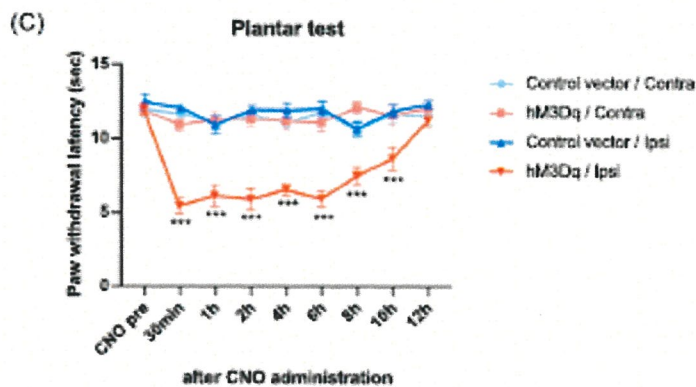
AAV6-hSyn-hM3Dq-mCherry またはコントロールベクターをマウスの坐骨神経に注射した。AAV 注射後 2 週間にわたって、腰部脊髄および感覚神経の投影としての後根神経節における hM3Dq-mCherry の発現を確認した(図 2A)。



さらに、注入された AAV の後根神経節における hM3Dq-mCherry の発現マウスは、ペプチド作動性 C 線維ニューロン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) およびサブスタンス P (SP) のマーカー、および小さな無髄 C 線維および薄い有髄 A δ 線維ニューロン、ペリフェリンのマーカーが高度に共局在していた[25、26](図 2B)。

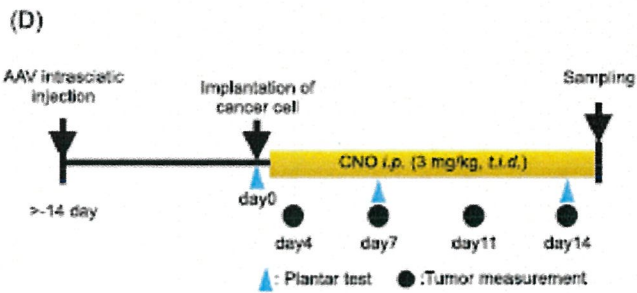


これらの条件下で、Gq-DREADD を介した CNO 投与による知覚神経の活性化は、AAV 注射後 2 週間以上経過した時点で、CNO 投与後 30 分から 10 時間までの間に、同側で温熱痛覚過敏を引き起こしたが、対側では起こらなかった(図 2C、*** $p < 0.001$ 対対照ベクター/Ipsi)。一方、これらのマウスは自発痛のような行動を示さなかった(データは示さず)。

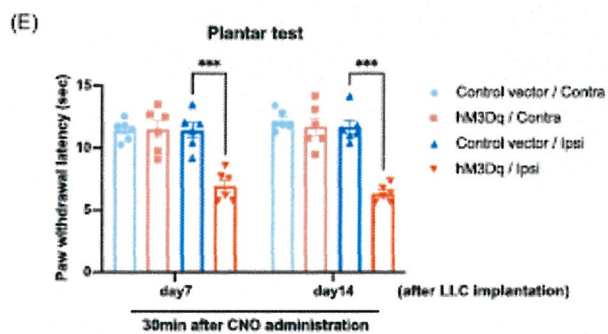


感覚神経の化学遺伝学的操作下での腫瘍増殖に対する影響

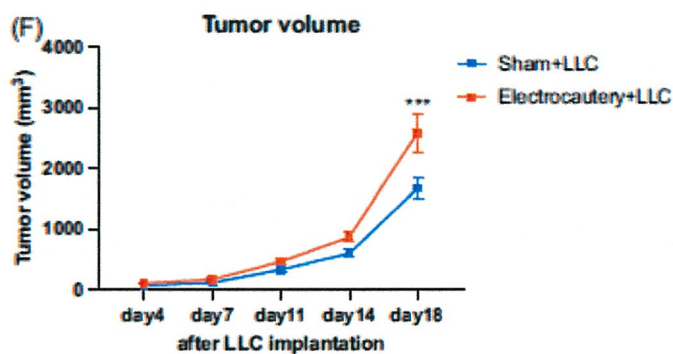
CNO 投与により疼痛が誘発されることを確認した後、AAV 注射後 2 週間かけて LLC 細胞を坐骨神経領域周囲の皮下に移植した (図 2D)。



LLC 移植の 7 日後および 14 日後、CNO 投与の 30 分後に熱性痛覚過敏が観察された (図 2E、*** $p < 0.001$ 対対照ベクター/Ipsi)。

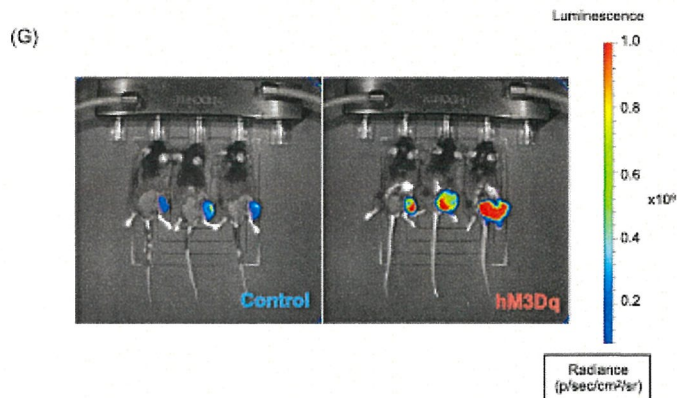


これらの条件下で、CNO の反復投与により、対照マウスと比較して hM3Dq 発現マウスの腫瘍体積が有意に増加した (図 2F、** $p < 0.01$ 対対照+LLC)。

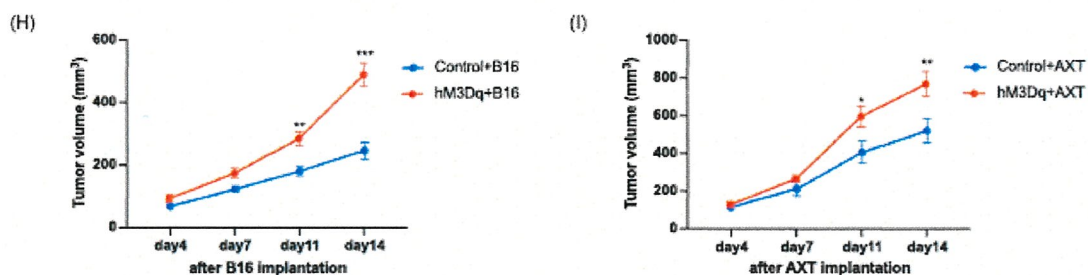


さらに、腫瘍内の発光強度を調べるために、AAV を注射した坐骨神経周囲の皮下に LLC-luc 細胞を移植した。

腫瘍におけるルシフェラーゼの発光は、ルシフェラーゼのリガンドであるルシフェリンの腹腔内投与によって誘導された。これらの条件下では、腫瘍移植後2週間で、対照マウスと比較して、hM3Dq 発現マウスの発光強度が劇的に増加した(図 2G)。

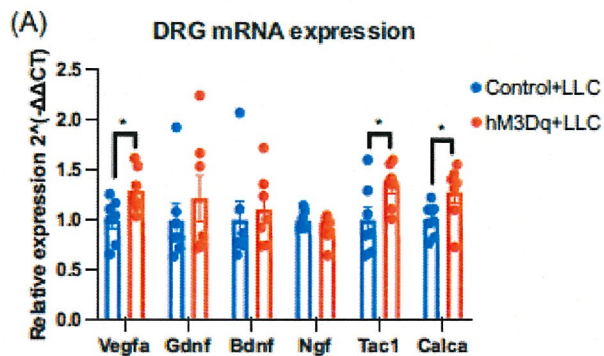


他の担癌モデル、B16 細胞および AXT 細胞では、コントロール マウスと比較して、hM3Dq 発現マウスの腫瘍体積が有意に増加した(図 2H および I, H; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) 対対照 + B16、I; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 対対照 + AXT)。

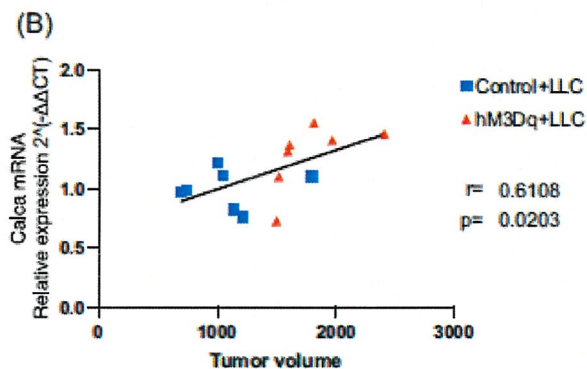


担癌 AAV 注射マウスにおける DRG ニューロンの遺伝子発現プロファイリングに対する感覚神経の化学遺伝学的操作の影響

血管内皮増殖因子 a (Vegfa)、タキキニン前駆体 1 (Tac1)、コード SP、およびカルシトニン関連ポリペプチドの mRNA レベル CGRP をコードする α (Calca) は、対照マウスと比較して、hM3Dq 発現マウスにおいて LLC 移植後 15 日で腰部 DRG の同側で有意に増加した(図 3A、* $p < 0.05$ 対対照+LLC)。



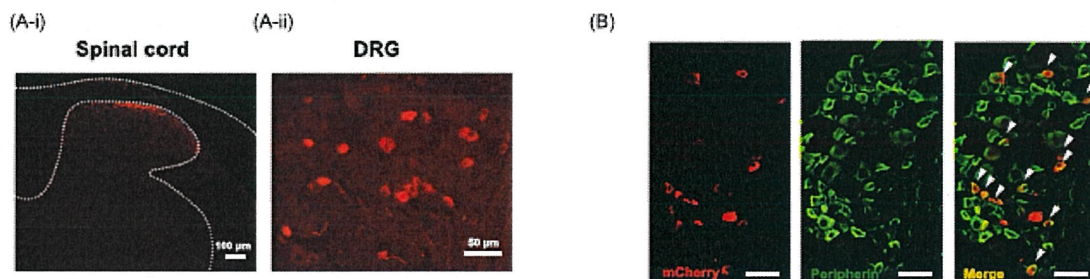
さらに、担癌状態では、Calca の mRNA レベルは腫瘍体積と有意かつ正の相関があった (図 3B、 $r = 0.6108$ 、 $p = 0.0203$)。



感覚ニューロンの抑制ががん疼痛状態下での生存に及ぼす影響

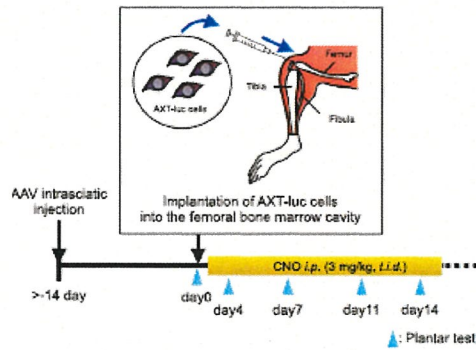
感覚神経の活動を選択的に阻害することを目的として、まず AAV-hSyn-hM4Di-mCherry またはコントロール ベクターをマウスの坐骨神経に注射し、腰髄における hM4Di-mCherry の発現と感覚神経の突起である DRG を確認した。

また、AAV 注射後 2 週間にわたってペリフェリンとの共局在も確認した (図 4A および B)。



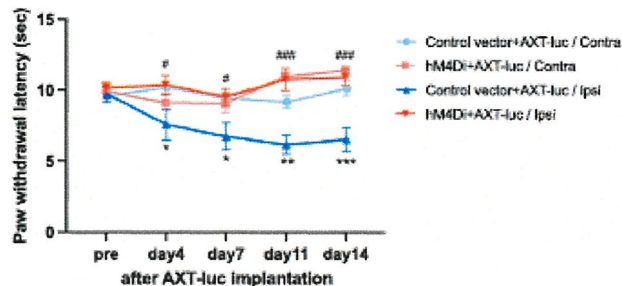
この時点で、我々は AXT-luc 細胞を AAV を注射したマウスの大腿骨内骨髄に移植して、骨癌性疼痛モデルを作製した(図 4C)。

(C)



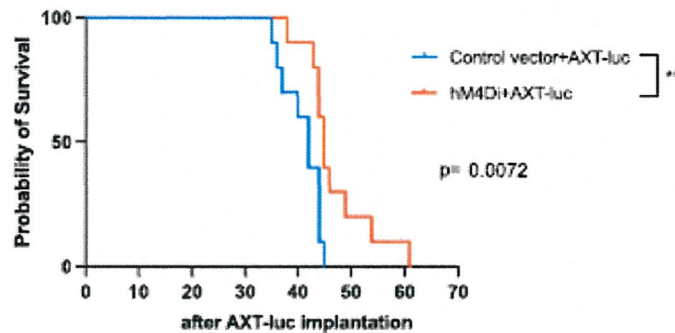
我々は、CNO の投与による Gi-DREADD を介した感覚神経の抑制が、AXT-luc 移植マウスの同側の熱性痛覚過敏を有意に抑制することを発見した(図 4D、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、***) * $p < 0.001$ 、対コントロール ベクター + AXT-luc/Contra、# $p < 0.05$ 、### $p < 0.001$ 、hM4Di + AXT-luc/Ipsi 対コントロール ベクター + AXT-luc/Ipsi)。

(D)



これらの条件下では、hM4Di 発現マウスの生存期間は、腫瘍移植後のコントロールマウスと比較して、DREADD を介した感覚神経の阻害によって有意に延長された(図 4E、 $p = 0.0072$)。

(E)



Discussion

がん患者の最大 40% が神経障害性疼痛に苦しんでいると報告されている[27]。このがん関連神経因性疼痛は、手術や化学療法などのがん治療と腫瘍の増殖による組織破壊の両方によって引き起こされ、痛みの強度や鎮痛剤の消費量が増加し、QOLの低下につながる[2, 27]。これらの報告は、神経因性疼痛が癌の病態に影響している可能性を示唆している。本研究では、神経因性疼痛の標準的なマウスモデルにおける持続的な痛みが腫瘍の増殖に影響を与える可能性があるかどうかを最初に調査した。神経障害性疼痛を誘発するために部分的な坐骨神経結紮を行い、術後7日目に坐骨神経結紮部位周囲の皮下に LLC 細胞を移植した。われわれは、坐骨神経結紮マウスの腫瘍体積が偽手術マウスと比較して有意に増加していることを発見し、神経因性疼痛様状態下での知覚神経の持続的な活性化が腫瘍の増殖を促進する可能性があることが示唆された。

一般に、がん治療の第一選択は手術だが、手術後は頻繁に痛みが引き起こされる[28, 29]。さらに癌の手術による持続的な術後疼痛は、鎮痛効果の低下により予後不良を引き起こすことが報告されている[30]。これらの発見は、がん患者における周術期の疼痛管理が、術後の痛みの持続を防ぐだけでなく、がんの進行を抑制し、平均寿命を延ばすためにも重要であることを示唆している。我々は次に、電気焼灼によって引き起こされる持続的な術後疼痛のモデル[18]を使用して、腫瘍増殖に対する疼痛シグナル伝達の影響を評価した。本研究では、電気メスで処置したマウスの腫瘍体積は、偽手術マウスの腫瘍体積と比較して有意に増加した。まとめると、今回の

結果は、痛みの種類に関係なく、持続的な痛みの存在下では腫瘍増殖の加速が誘発される可能性があることを示唆している。

炎症を伴わずに痛みを生じる刺激を生成することを目的として、化学遺伝学的アプローチに従って感覚神経に特異的に神経発火を誘導できるモデルの確立を試みた。

その結果、AAV ベクターによる遺伝子操作によるペプチド作動性 C 線維と薄く有髄化した A δ 線維の両方の活性化は、その特異的リガンドである CNO を投与したときに一過性の痛覚過敏を誘発した。これらの条件下で LLC、B16、または AXT 細胞のどの癌タイプを使用したかに関係なく、hM3Dq 発現マウスの腫瘍体積が対照マウスの腫瘍体積と比較して劇的に増加することを実証した。これらの発見は、多くの種類の腫瘍細胞における腫瘍拡大が、感覚神経の長期にわたる過活動によって誘発される可能性があることを示唆している。感覚ニューロンの活動亢進によって促進される腫瘍増殖のメカニズムを解明するために、RT-qPCR によって hM3Dq 発現マウスの DRG ニューロンの遺伝子発現解析を行った。我々は hM3Dq 発現マウスにおいて、知覚神経の付随的な活性化により、Vegfa、Tac1、および Calca の mRNA が有意に増加することを発見した。腫瘍微小環境 (TME) 内の VEGF は、血管新生を誘導し、腫瘍の発生に寄与し、がんの進行を促進することがよく知られている[31-33]。一方で、TME における SP と CGRP の機能はほとんど明らかになっていない。しかし、いくつかの最近の研究では、SP と CGRP の両方が癌の進行に直接影響を与える可能性があることが報告されている [34-36]。特に、CGRP は、がん細胞における細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK)/転写 3 シグナル伝達活性化因子 (STAT3) シグナル伝達の活性化を介して腫瘍の増殖を促進する可能性があることが知られている [37]。実際我々の実験結果では、CGRP の mRNA 発現レベルと腫瘍体積との間に有意で強い正の相関があることが示された。これらの結果は、感覚神経活性化の繰り返しが TME の感覚ニューロンからの VEGF、SP、特に CGRP の放出の増加を介して腫瘍の増殖を促進する可能性があることを示唆している。

最後に我々は、知覚神経活動の阻害により、骨癌疼痛モデルの生存期間を改善できるかどうかを調べた。以前の研究で大腿骨内骨髄への AXT-luc 移植によって誘発さ

れる熱性痛覚過敏が、CNO の反復投与によって有意に抑制されることが明らかにされている。これらの条件下では、DREADD を介した感覚神経の抑制により、対照マウスと比較して生存期間が延長された。これらの結果を総合すると、痛みの伝達に関与する感覚ニューロンの神経活動が、癌の生存に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

近年、脳からの信号は免疫機能などの全身動態の調節に重要であると考えられている[38]。さらに痛みの信号は脳に伝達され、持続する痛みは中枢神経系の機能不全を引き起こす可能性があることも広く知られている。したがって、持続的な痛みの状態では、免疫調節に関連する脳領域の活動が影響を受ける可能性がある。この仮説は今後の研究でさらに検証される必要があるが、このような中枢および末梢の調節は、持続的な痛みによる腫瘍増殖の促進に体系的に寄与している可能性がある。

結論として、我々は持続的な疼痛シグナルがマウスの腫瘍増殖を促進することを明らかにした。さらに、担癌マウスの感覚ニューロンの活性化は、感覚ニューロンにおける SP、CGRP、VEGF などの疼痛関連ペプチドの発現増加を誘導し、腫瘍の増殖を促進する可能性があると思われた。さらに、痛みの伝達を抑制することで、重度のがん性疼痛下での生存期間を改善できることを明らかにした。これらの結果は、がんの初期段階で感覚ニューロンの活動を制御することが、がん患者にとって腫瘍の進行を抑制するための重要な方策であるというエビデンスとなる。