

舌の癌性疼痛発症における protease-activated receptor 2 の役割

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

赤坂 竜太

(指導：岩田 幸一 教授，米原 啓之 教授，篠田 雅路 准教授)

**要旨：**Protease-activated receptor (PAR) は特定のプロテアーゼを内因性リガンドとする 7 回膜貫通型 G タンパク共役型受容体である。本研究では、扁平上皮癌 (SCC) 細胞の舌接種による舌癌モデルラットを作製し、同モデルラットに発症する舌機械痛覚過敏に対する PAR2 の役割を検討した。SCC 細胞接種 2 日目から 7 日目, SCC 細胞を舌左側縁部に接種した群で舌への機械刺激に対する逃避反射閾値 (MHWT) の有意な低下を認めた。SCC 細胞接種後 7 日間, 舌左側縁部への PAR2 の選択的アンタゴニストである FSLLRV-NH2 の投与により, SCC 細胞接種後 7 日目の MHWT 低下が有意に抑制された。SCC 細胞接種 7 日目, 舌に投射する三叉神経節ニューロンにおける PAR2, TRPV1, P2X<sub>3</sub>, TRPA1, Nav1.8 または TRPV2 発現を解析した。舌に投射する PAR2 陽性三叉神経節ニューロン数は, PBS 群と比較して有意に増加し, その増加は SCC 細胞接種後 7 日間の舌左側縁部への FSLLRV-NH2 投与により有意に抑制された。さらに, SCC 細胞接種 7 日目において舌に投射する PAR2 陽性で TRPV1, P2X<sub>3</sub> または Nav1.8 陽性三叉神経節ニューロン数は, PBS 群と比較して有意に増加し, その増加は SCC 細胞接種後 7 日間 FSLLRV-NH2 の舌左側縁部への連続投与により有意に抑制された。以上の結果から, 舌に投射する一次侵害受容ニューロンにおいて, 舌癌発症部から持続的に放出されるトリプシンをはじめとしたプロテアーゼが PAR2 シグナルを介して TRPV1, P2X<sub>3</sub> や Nav1.8 を含む疼痛関連イオンチャネルの発現を増強することで, 舌癌による機械アロディニアが発症することが示唆された。

キーワード：舌癌, 三叉神経節, 機械アロディニア, protease-activated

receptor 2

## 結 言

我が国において、口腔癌は頭頸部癌の中で最も頻度が高いことが知られている<sup>1)</sup>。口腔癌の種類としては、舌に発症する扁平上皮癌 (SCC) が大多数を占め、舌癌の5年生存率は約60%であることが報告されている<sup>2-4)</sup>。舌癌は発音、口腔感覚、咀嚼や嚥下などの口腔機能の破綻を招き、quality of life (QOL) の低下を引き起こす<sup>5)</sup>。また、舌癌発症初期における舌の感覚異常は少ない一方、舌癌の進展に伴い難治性の舌異常疼痛が発症し、QOLの低下を引き起こす<sup>6)</sup>。しかしながら舌癌発症メカニズムは不明な点が多く、臨床の場において舌異常疼痛の制御に難渋する場合が多い。

口腔癌浸潤に伴い、炎症や末梢神経傷害あるいは癌細胞からサイトカイン、ケモカイン、神経ペプチド、オートコイドなど様々な分子が放出される<sup>7,8)</sup>。また、癌細胞もしくは間質細胞が各種プロテアーゼやグリコシダーゼを産生分泌し、その結果として細胞外マトリックスを分解して正常細胞間を移動し、細胞外マトリックスへ接着することを繰り返すことによって癌が浸潤すると考えられている<sup>9)</sup>。特に、癌細胞から放出されるプロテアーゼの一つとして知られているトリプシンは、癌組織において増加し、癌の浸潤に対して重要な役割を有する可能性があると考えられている<sup>10)</sup>。

Protease-activated receptor (PAR) は、特定のプロテアーゼを内因性リガンドとする三量体 G タンパクと共役した7回膜貫通型受容体である<sup>11)</sup>。現在、4つの PAR ファミリーがクローニングされているが、なかでもトリプシン、トリプ

ターゼ，VIIa 因子やXa 因子などによって活性化される PAR2 は生体内に広く分布し，様々な機能の制御に関与している<sup>12-14)</sup>。PAR2 アゴニストの足底部投与によって疼痛関連行動や痛覚過敏が惹起され，脊髄後角表層において Fos 発現が誘導されることから，PAR2 シグナル増強は異常疼痛発症の重要な因子であることが強く示唆される<sup>15,16)</sup>。例えば，PAR2 は transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 陽性の一次ニューロン末梢端に発現し，PAR2 シグナル増強によって TRPV1 感受性の増大を引き起こすことが痛覚過敏の原因になることが示されている<sup>17)</sup>。また，癌細胞から分泌されるサイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  は，PAR2 の発現を増加させることが知られている<sup>18)</sup>。以上のことから，口腔癌浸潤に伴い癌細胞から分泌されるトリプシンが，一次侵害受容ニューロンに発現する PAR2 を活性化し，口腔癌による異常疼痛を発症させる可能性がある。

そこで本研究では，SCC 細胞の舌接種による舌癌モデルラットを作製し，同ラットに発症する舌機械痛覚過敏に対する PAR2 の役割を検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

実験には、Fischer 系雄性ラット（n = 51, 100-200 g, 日本エスエルシー）を使用した。ラットは 12 時間明暗サイクル（午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯）で恒温恒湿の環境下で, 十分な飼料と水を与えて飼育した。本研究は, 日本大学動物実験委員会の承認（承認番号: AP18DEN012-2）を受け, 国際疼痛学会の動物実験ガイドラインに従って行われた。実験に際して, 動物の苦痛を最少限にするよう配慮し, 動物数は必要最少限とした。

### 2. 舌癌モデルの作製

2%イソフルラン（Mylan）による吸入麻酔下にて, ラットを開口させ舌を引き出した後に 26 G 針にて SCC 細胞（SCC-158, JCRB）の懸濁液（30  $\mu$ l,  $2 \times 10^6$  SCC 細胞/0.1 M phosphate buffer saline（PBS））を舌左側縁部（舌先端から 5 mm 後方）の位置に接種した（SCC 群）<sup>19,20</sup>。対照として, 同様の方法で溶媒（0.1 M PBS）を舌左側縁部に接種した（PBS 群）。

### 3. 舌の機械刺激に対する逃避反射閾値の測定

2%イソフルラン吸入による浅麻酔下にて, 舌左側縁部（舌先端から 5 mm 後方）にデジタルフォーセプス（0 - 200 g [カットオフ値, 200 g]; Bioseb）を用いて機械刺激を加え, 機械刺激に対する逃避反射閾値（MHWT）を測定した。

MHWT 測定時は，ラットを側臥位に寝かせた状態で，左側後肢への侵害機械刺激により弱い屈曲反射が起こるレベルに 2%イソフルランによる麻酔深度を維持した。ラットの舌を口腔外に引き出し，機械刺激強度を徐々に増加させ（10 g/s），頭部を引込める逃避反射が生じた時点でただちに機械刺激を止めた。SCC 細胞接種後 7 日間，0.1 M PBS を溶媒とした 6.0  $\mu$ l の PAR2 アンタゴニスト（1.25 mM, FSLLRY-NH<sub>2</sub>, R&D systems）を舌左側縁部（舌先端から 5 mm 後方）に皮下投与（1 回/日）した。SCC 細胞接種前および SCC 細胞接種後 7 日目，2 回 MHWT を計測し，その平均値を各ラットの MHWT とした。

#### 4. 免疫組織化学染色

SCC 細胞接種 3 日前，舌に投射する三叉神経節ニューロンを同定するために，2%イソフルラン吸入による浅麻酔下にて，4% FluoroGold（FG）（4  $\mu$ l; Fluorochrome）を 30 G 針にて舌左側縁部（舌先端から 5 mm 後方）粘膜下に注射した。SCC 細胞接種後 7 日間，0.1 M PBS を溶媒とした 6.0  $\mu$ l の PAR2 アンタゴニスト（1.25 mM, FSLLRY-NH<sub>2</sub>, R&D systems）を舌左側縁部（舌先端から 5 mm 後方）粘膜下に投与（1 回/日）した。SCC 細胞接種前および SCC 細胞接種後 7 日目，塩酸メデトミジン（0.15 mg/kg, i.p.），ミダゾラム（2 mg/kg, i.p.）および酒石酸ブトルファノール（2.5 mg/kg, i.p.）を 0.9%生理的食塩水に溶解した三種混合麻酔薬を腹腔内投与して麻酔した後，0.9%生理的食塩水（500 ml）を用いて経心的に脱血し安楽死させた。その後，0.1 M PBS に溶解した 4% パラホ

ホルムアルデヒド固定液 (pH 7.4) にて灌流固定を行った。その後、三叉神経節を摘出し、4%パラホルムアルデヒド固定液に 4°C で 48 時間浸漬し、後固定を行った。後固定した三叉神経節を 20%蔗糖液に浸漬 (12 時間) した後、三叉神経節を Tissue Tek (Sakura Finetechnical) にて凍結包埋した。クライオスタット (CM1850, Leica) を用いて三叉神経節の長軸と平行に厚さ 10  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、MAS コートスライドガラス (MAS-coated Superfrost plus, Matsunami) に貼り付け、室温にて乾燥した。HistoVT One (1:10; nacalai tesque) を用いて 70°C で抗原を賦活化し、0.01 M PBS にて洗浄後、4%正常ヤギ血清を含む 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) で希釈したマウス抗 PAR2 モノクローナル抗体 (1:50; Santa Cruz Biotechnology) およびウサギ抗 TRPV1 ポリクローナル抗体 (1:400; Alomone Labs), ウサギ抗 P2X<sub>3</sub> ポリクローナル抗体 (1:1000; Genetex), ウサギ抗 TRP Ankyrin 1 (TRPA1) ポリクローナル抗体 (1:1000; Abcam) またはウサギ抗 Nav1.8 ポリクローナル抗体 (1:500; Alomone Labs) に 24 時間 4°C で浸漬した。0.01 M PBS にて洗浄後、0.01 M PBS にて希釈された Alexa Fluor 488 抗マウス IgG (1:200; Thermo Fisher Scientific) および Alexa Fluor 568 抗ラビット IgG (1:200 Thermo Fisher Scientific) に 2 時間、室温で反応させた。0.01 M PBS にて洗浄後、mounting medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて封入した。蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence) を用いて、背景に比べ 2 倍以上の蛍光強度を示した場合を陽性反応と定義し、FG に標識された細胞のうち PAR2 陽性かつ TRPV1, P2X<sub>3</sub>, TRPA1, Nav1.8 または TRPV2 陽性の細胞を解析した。解析は、1 つの三叉神経節あたり



5つの切片（100 μm 毎）を使用して行った。FG 標識かつ PAR2-免疫陽性（IR）で TRPV1-IR であったニューロンの割合（FPTR）（%）を以下の式で求めた。

$$\text{FPTR} = \frac{\text{FG 標識かつ PAR2-IR かつ TRPV1-IR}}{\text{FG 標識}} \times 100$$

P2X<sub>3</sub>-IR, TRPA1-IR, Nav1.8-IR および TRPV2-IR も同様の式で求めた。

## 5. 統計学的分析

各データは平均値 ± 標準誤差で表した。有意差検定には繰り返しのある一元もしくは二元配置の分散分析を行った後、*post hoc* テストとして Bonferroni's multiple comparison tests を用いた。 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 舌 MHWT の変化

SCC 細胞接種 2 日目から 7 日目において、PBS 群と比較して SCC 群で有意な MHWT の低下を認めた (図 1A)。 SCC 細胞接種後 7 日間、舌左側縁部への FSLLRY-NH<sub>2</sub> 粘膜下投与を行ったラットでは、SCC 細胞接種後 7 日目の MHWT 低下が有意に抑制された (図 1B)。

### 2. 舌に投射する三叉神経節ニューロンにおけるイオンチャネルの発現変化

SCC 細胞接種 7 日目, FG に標識された三叉神経節ニューロンにおける PAR2, TRPV1, P2X<sub>3</sub>, TRPA1, Nav1.8 または TRPV2 発現を確認した (図 2-7)。 SCC 細胞接種 7 日目において FG に標識され PAR2 陽性であった三叉神経節ニューロン数は、PBS 群と比較して有意に増加し、その増加は SCC 細胞接種後 7 日間の舌左側縁部への FSLLRY-NH<sub>2</sub> 粘膜下投与により有意に抑制された (図 2)。さらに、SCC 細胞接種 7 日目において FG に標識され PAR2 陽性で TRPV1, P2X<sub>3</sub> または Nav1.8 陽性であった三叉神経節ニューロン数は、PBS 群と比較して有意に増加し、その増加は SCC 細胞接種後 7 日間 FSLLRY-NH<sub>2</sub> の舌左側縁部への連続粘膜下投与により有意に抑制された (図 3, 4, 6)。一方、FG に標識され PAR2 陽性で TRPA1 陽性であった三叉神経節ニューロン数は、PBS 群と比較して有意に増加したが、その増加は FSLLRY-NH<sub>2</sub> の舌左側縁部への粘膜下投与により抑制されなかった (図 5)。 SCC 細胞接種によっては FG に標識され PAR2 陽性で

TRPV2 の陽性三叉神経節ニューロン数には，変化が見られなかった（図 7）。

## 考 察

舌癌発症後の舌への侵害刺激は舌神経の一次侵害受容ニューロンにより受容されると考えられる。侵害刺激を受容する一次侵害受容ニューロンは A $\delta$ 線維と C 線維であり、その末端は自由神経終末の形態を有している。一次侵害受容ニューロンの細胞膜上には、侵害刺激に反応して開口するさまざまなイオンチャネルが存在していることが分かっており、痛み刺激が加わると開口して陽イオンが神経軸索内に流入する<sup>21)</sup>。これらのイオンチャネルの開口が受容器電位を脱分極させ、Nav1.8をはじめとした電位依存性ナトリウムチャネルが開口する結果、活動電位が発生する<sup>22)</sup>。この活動電位が侵害情報として三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄に伝達され、痛みが引き起こされる。

PAR2 は、さまざまな組織に発現しているが、末梢神経系ではアウエルバッハ神経叢や一次侵害受容ニューロンに発現が認められる<sup>16,23,24)</sup>。トリプシンをはじめとしたプロテアーゼおよびその分解産物は、口腔癌、子宮癌、膵臓癌、胃癌などの微小環境において豊富に存在し、発癌および癌性異常疼痛に重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>25-27)</sup>。また、プロテアーゼは癌微小環境における一次侵害受容ニューロン末梢端に発現する PAR2 を直接活性化するだけでなく、そのペプチド分解産物によっても活性化される<sup>28)</sup>。トリプシンは癌細胞が主な供給源であるが、上皮細胞もまたトリプシンの供給源となり得る<sup>29)</sup>。さらに、胃癌組織に囲まれた血管壁や口腔癌組織内の線維芽細胞にもトリプシンの発現が確認され、胃癌患者の血清中トリプシン量も増加していること

が報告されている<sup>30)</sup>。ヒト癌細胞より放出されるプロテアーゼの曝露は一次ニューロンにおける PAR2 発現を増強する<sup>31)</sup>。このような報告から、癌微小環境における癌および非癌細胞からのトリプシンをはじめとしたプロテアーゼの持続的放出は、癌患者における癌性機械アロディニアに関連した一次侵害受容ニューロンの長期的興奮性増強に寄与する可能性がある。

本研究では、舌への SCC 細胞接種による舌癌発症後、舌癌発症部に機械アロディニアが生じるとともに、舌に投射する PAR2 陽性の三叉神経節ニューロン数が有意に増加した。さらに、PAR2 拮抗薬の舌癌発症部投与は舌癌による機械アロディニアを抑制した。よって、舌癌組織の微小環境において増加するトリプシンをはじめとしたプロテアーゼおよびその分解産物が PAR2 シグナルを介して一次侵害受容ニューロンの興奮性を増大することにより、舌癌発症部に機械アロディニアが生じたと考えられる。

TRP チャンネルは 6 回膜貫通領域を有する非特異的陽イオンチャンネルであり、侵害熱刺激 (43°C 以上) および侵害機械刺激に対して開口する TRPV1 や侵害機械刺激に対して開口する TRPA1 が知られており、侵害受容機構に深く関わっている<sup>32)</sup>。侵害情報伝達に関与する小型から中型の一次ニューロンにおいて PAR2 は protein kinase C epsilon (PKC $\epsilon$ ) や protein kinase A (PKA) と共発現する<sup>33)</sup>。そして、PAR2 シグナルは PKC $\epsilon$  と PKA の感覚神経節細胞膜へのトランスロケーションを引き起こし、cyclic adenosine monophosphate/PKA カスケードを活性化させる。PKC $\epsilon$  と PKA の活性化は TRP チャンネル の過敏化を引き起こし、異

常疼痛を発症させることが知られている<sup>34,35)</sup>。

Adenosine triphosphate (ATP) は侵害化学刺激物質として知られ、ATP 受容体としてイオンチャネル型の P2X と G タンパク共役型の P2Y が存在している。そのうち P2X<sub>3</sub> サブユニットが会合して中央にイオン透過チャネル孔が形成された P2X<sub>3</sub> 受容体は一次侵害受容ニューロンにおいて、特異的に多く発現している<sup>36)</sup>。PAR2 シグナルは PKA や PKC の活性化を引き起こし、P2X<sub>3</sub> 受容体の細胞膜移行を促進する<sup>37)</sup>。その結果、P2X<sub>3</sub> 受容体の活性化に伴い一次侵害受容ニューロンへの陽イオン流入が増大し、異常疼痛発症の原因となる<sup>38)</sup>。

Nav は、一次侵害受容ニューロンの興奮伝達を司っており、疼痛伝達に深く関与している<sup>39)</sup>。現在までに 9 種類のサブタイプが見つかっており、共通構造として 6 回膜貫通ドメインが 4 回繰り返される  $\alpha$  サブユニットを有している。そのサブタイプのひとつである Nav1.8 は、tetrodotoxin 抵抗性で一次ニューロンに発現しており神経障害性疼痛との関連性を示唆する報告が多く、痛みのターゲット分子として注目されている<sup>39)</sup>。PAR2 シグナルは prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) と calcitonin gene-related peptide の神経終末からの放出を増強し、Nav1.8 を介した Na<sup>+</sup>電流を増強する<sup>40,41)</sup>。さらに、一次侵害受容ニューロンにおいて PGE<sub>2</sub> シグナルを介して Nav1.8 発現が増強することも報告されている<sup>42)</sup>。

本研究では、SCC 細胞接種後、舌に投射する PAR2 陽性ニューロンでかつ TRPV1, P2X<sub>3</sub>, TRPA1 または Nav1.8 の発現をみた三叉神経節ニューロン数が有意に増加した。その増加は TRPV1, P2X<sub>3</sub> および Nav1.8 について SCC 細胞接種

後に FSLRLY-NH<sub>2</sub> を舌左側縁部に粘膜下投与することにより抑制された。

以上の結果から、舌に投射する一次侵害受容ニューロンにおいて、舌癌微小環境における癌および非癌細胞から持続的に放出されるトリプシンをはじめとしたプロテアーゼが PAR2 シグナルを介して TRPV1, P2X<sub>3</sub> や Nav1.8 といった疼痛関連イオンチャネルの発現を増強することで、舌癌による機械アロディニアが発症することが示唆された。今後、PAR2 が難治性癌性疼痛の治療ターゲットになり得る可能性が高いことが考えられる。

## 結 論

舌癌モデルラットを用いて、舌の機械刺激に対する感受性の変化をみた。また、三叉神経節ニューロンにおける PAR2, TRPV1, P2X<sub>3</sub>, TRPA1, Nav1.8 と TRPV2 の発現, および舌の機械刺激に対する感受性変化における PAR2 の役割について検討を加えた。その結果以下の知見を得た。

1. SCC 細胞接種後, 舌癌発症部に機械アロディニアが生じるとともに, 舌に投射する PAR2 陽性三叉神経節ニューロン数が有意に増加した。さらに, PAR2 拮抗薬の舌癌発症部投与は舌癌による機械アロディニアを抑制した。
2. SCC 細胞接種後, 舌に投射する三叉神経節ニューロンで PAR2 陽性かつ TRPV1, P2X<sub>3</sub>, TRPA1 または Nav1.8 の発現をみたニューロン数が有意に増加した。その増加は TRPV1, P2X<sub>3</sub>, および Nav1.8 について SCC 細胞接種後の FSLLRV-NH<sub>2</sub> 舌左側縁部への粘膜下投与により抑制された。

以上の結果から, 舌に投射する一次侵害受容ニューロンにおいて, PAR2 シグナルを介して TRPV1, P2X<sub>3</sub> や Nav1.8 を含む疼痛関連イオンチャネルの発現を増強することにより, 舌癌における機械アロディニアが発症することが示唆された。



## 謝辞

稿を終えるにあたり，格別なるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部臨床医学講座 米原啓之教授，日本大学歯学部生理学講座 岩田幸一教授，篠田雅路准教授に心より感謝申し上げます。また，本研究の遂行に際し，多大なるご協力とご支援を頂いた日本大学歯学部臨床医学講座および生理学講座の皆様には厚く御礼申し上げます。

本研究に関して，利益相反はない。

## 文 献

- 1) Matsuda T, Marugame T, Kamo K, Katanoda K, Ajiki W, Sobue T, Japan Cancer Surveillance Research G (2009) Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2003: based on data from 13 population-based cancer registries in the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Jpn J Clin Oncol* 39, 850-858.
- 2) Tateda M, Shiga K, Saijo S, Yokoyama J (2000) A clinical study of oral tongue cancer. *Tohoku J Exp Med* 192, 49-59.
- 3) Shiga K, Ogawa T, Sagai S, Kato K, Kobayashi T (2007) Management of the patients with early stage oral tongue cancers. *Tohoku J Exp Med* 212, 389-396.
- 4) Ogawa T, Matsuura K, Shiga K, Tateda M, Katagiri K, Kato K, Saijo S, Kobayashi T (2011) Surgical treatment is recommended for advanced oral squamous cell carcinoma. *Tohoku J Exp Med* 223, 17-25.
- 5) Benoliel R, Epstein J, Eliav E, Jurevic R, Elad S (2007) Orofacial pain in cancer: part I--mechanisms. *J Dent Res* 86, 491-505.
- 6) Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y (2010) Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol* 46, 414-417.
- 7) Jimi E, Furuta H, Matsuo K, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O (2011) The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell

- carcinoma. *Oral Dis* 17, 462-468.
- 8) Schmidt BL (2015) The neurobiology of cancer pain. *J Oral Maxillofac Surg* 73, S132-135.
  - 9) Liyanage C, Fernando A, Batra J (2019) Differential roles of protease isoforms in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 38, 389-415.
  - 10) Zhu J, Miao XR, Tao KM, Zhu H, Liu ZY, Yu DW, Chen QB, Qiu HB, Lu ZJ (2017) Trypsin-protease activated receptor-2 signaling contributes to pancreatic cancer pain. *Oncotarget* 8, 61810-61823.
  - 11) Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64, 1057-1068.
  - 12) Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A, Hoxie JA, Schechter N, Woolkalis M, Brass LF (1997) Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 272, 4043-4049.
  - 13) Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, Hollenberg MD (2001) Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci* 22, 146-152.
  - 14) Kawabata A, Kuroda R (2000) Protease-activated receptor (PAR) , a novel family of G protein-coupled seven trans-membrane domain receptors: activation mechanisms and physiological roles. *Jpn J Pharmacol* 82, 171-174.

- 15) Kawabata A, Kawao N, Kuroda R, Itoh H, Nishikawa H (2002) Specific expression of spinal Fos after PAR-2 stimulation in mast cell-depleted rats. *Neuroreport* 13, 511-514.
- 16) Kawabata A, Kawao N, Kuroda R, Tanaka A, Itoh H, Nishikawa H (2001) Peripheral PAR-2 triggers thermal hyperalgesia and nociceptive responses in rats. *Neuroreport* 12, 715-719.
- 17) Kawao N, Shimada C, Itoh H, Kuroda R, Kawabata A (2002) Capsazepine inhibits thermal hyperalgesia but not nociception triggered by protease-activated receptor-2 in rats. *Jpn J Pharmacol* 89, 184-187.
- 18) Sokolova E, Aleshin S, Reiser G (2012) Expression of protease-activated receptor (PAR) -2, but not other PARs, is regulated by inflammatory cytokines in rat astrocytes. *Neurochem Int* 60, 276-285.
- 19) Tamagawa T, Shinoda M, Honda K, Furukawa A, Kaji K, Nagashima H, Akasaka R, Chen J, Sessle BJ, Yonehara Y, Iwata K (2016) Involvement of microglial P2Y<sub>12</sub> signaling in tongue cancer pain. *J Dent Res* 95, 1176-1182.
- 20) Furukawa A, Shinoda M, Kubo A, Honda K, Akasaka R, Yonehara Y, Iwata K (2018) Endothelin signaling contributes to modulation of nociception in early-stage tongue cancer in rats. *Anesthesiology* 128, 1207-1219.
- 21) Gold MS, Gebhart GF (2010) Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 16, 1248-1257.

- 22) Schrenk-Siemens K, Rosseler C, Lampert A (2018) Translational model systems for complex sodium channel pathophysiology in pain. *Handb Exp Pharmacol* 246, 355-369.
- 23) Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6, 151-158.
- 24) Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Gamp P, Thoma M, Al-Ani B, Caughey GH, Hollenberg MD, Bunnett NW (1999) Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. *J Physiol* 517 (Pt 3) , 741-756.
- 25) Nyberg P, Ylipalosaari M, Sorsa T, Salo T (2006) Trypsins and their role in carcinoma growth. *Exp Cell Res* 312, 1219-1228.
- 26) Ohta T, Amaya K, Yi S, Kitagawa H, Kayahara M, Ninomiya I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Miwa K (2003) Angiotensin converting enzyme-independent, local angiotensin II-generation in human pancreatic ductal cancer tissues. *Int J Oncol* 23, 593-598.
- 27) DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L,

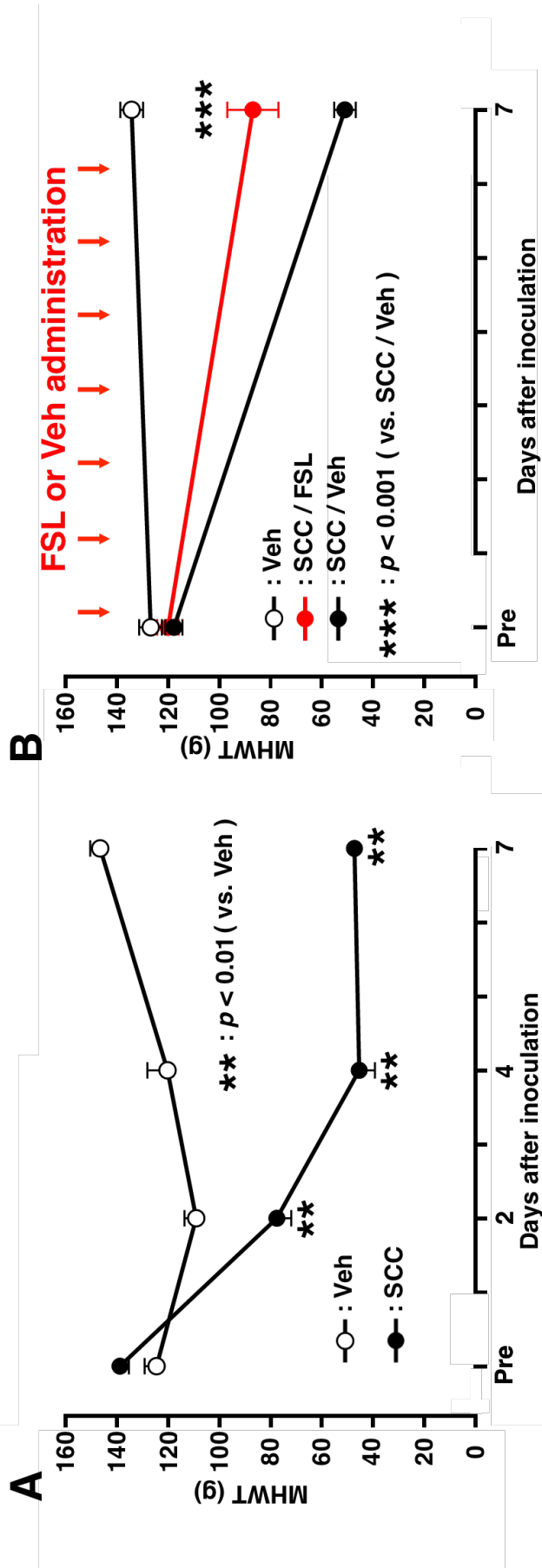
- Padarathsingh M (2004) Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 164, 1131-1139.
- 28) Ossovskaya VS, Bunnett NW (2004) Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84, 579-621.
- 29) Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, Mitsuhashi K, Tsubota Y, Miyata S, Miyagi Y, Yasumitsu H, Miyazaki K (1998) Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *Am J Pathol* 153, 937-944.
- 30) Ichikawa Y, Koshikawa N, Hasegawa S, Ishikawa T, Momiyama N, Kunizaki C, Takahashi M, Moriwaki Y, Akiyama H, Yamaoka H, Yanoma S, Tsuburaya A, Nagashima Y, Shimada H, Miyazaki K (2000) Marked increase of trypsin (ogen) in serum of linitis plastica (gastric cancer, borrmann 4) patients. *Clin Cancer Res* 6, 1385-1388.
- 31) Lam DK, Schmidt BL (2010) Serine proteases and protease-activated receptor 2-dependent allodynia: a novel cancer pain pathway. *Pain* 149, 263-272.
- 32) Moore C, Gupta R, Jordt SE, Chen Y, Liedtke WB (2018) Regulation of pain and itch by TRP channels. *Neurosci Bull* 34, 120-142.
- 33) Amadesi S, Nie J, Vergnolle N, Cottrell GS, Grady EF, Trevisani M, Manni C, Geppetti P, McRoberts JA, Ennes H, Davis JB, Mayer EA, Bunnett NW (2004) Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor

- potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci* 24, 4300-4312.
- 34) Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K (2004) Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci* 24, 4293-4299.
- 35) Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, Chapman K, Grady EF, Bautista F, Karanjia R, Barajas-Lopez C, Vanner S, Vergnolle N, Bunnett NW (2006) Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase Cε- and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol* 575, 555-571.
- 36) Burnstock G (2000) P2X receptors in sensory neurones. *Br J Anaesth* 84, 476-488.
- 37) Xu GY, Huang LY (2004) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II potentiates ATP responses by promoting trafficking of P2X receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 11868-11873.
- 38) Brown DA, Yule DI (2007) Protein kinase C regulation of P2X3 receptors is unlikely to involve direct receptor phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1773, 166-175.
- 39) Hameed S (2019) Nav1.7 and Nav1.8: Role in the pathophysiology of pain. *Mol Pain* 15, 1-11.
- 40) Natura G, von Banchet GS, Schaible HG (2005) Calcitonin gene-related peptide

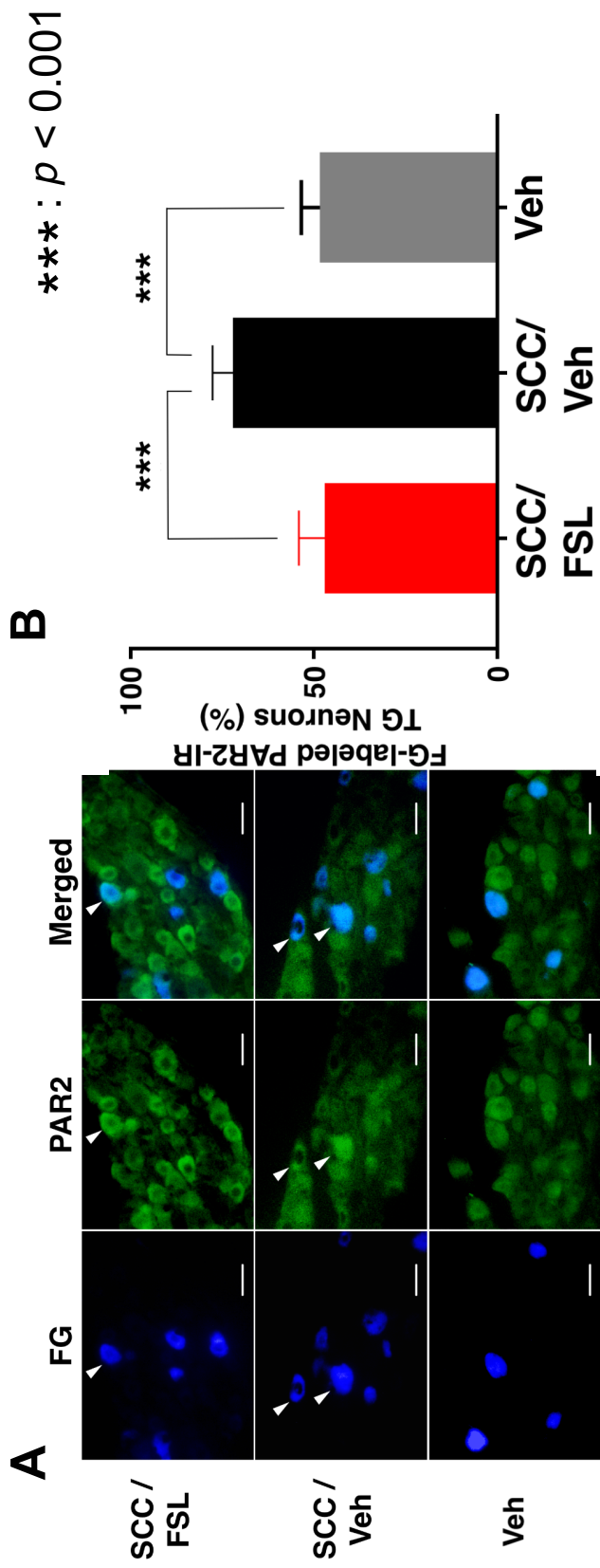
enhances TTX-resistant sodium currents in cultured dorsal root ganglion neurons from adult rats. *Pain* 116, 194-204.

- 41) Vergnolle N, Ferazzini M, D'Andrea MR, Buddenkotte J, Steinhoff M (2003) Proteinase-activated receptors: novel signals for peripheral nerves. *Trends Neurosci* 26, 496-500.
- 42) Villarreal CF, Sachs D, Cunha FQ, Parada CA, Ferreira SH (2005) The role of Na (V) 1.8 sodium channel in the maintenance of chronic inflammatory hypernociception. *Neurosci Lett* 386, 72-77.





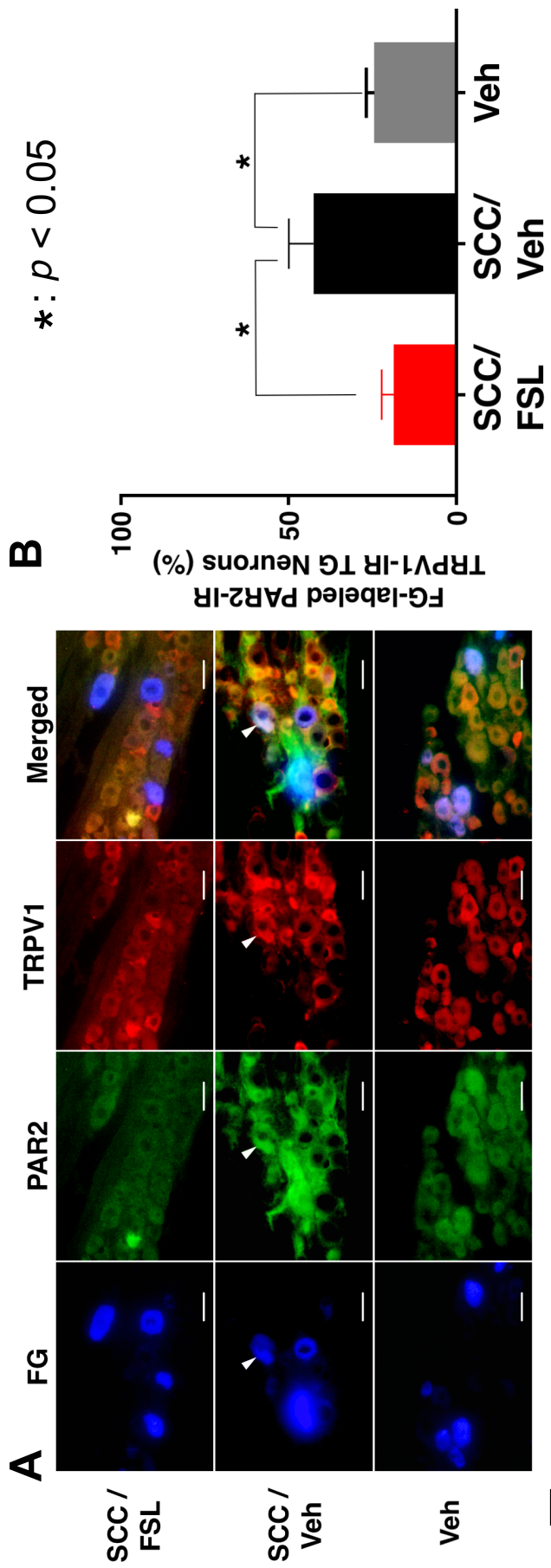
**図1** 舌の機械刺激に対する逃避反射閾値 (MHWT) の経日的変化  
**A:**舌に扁平上皮癌 (SCC) 細胞または溶媒 (Veh) 接種後の舌MHWTの経日的変化  
**B:**SCC細胞接種後のMHWT低下に対する舌へのFSL<sub>LLRY-NH<sub>2</sub></sub> (FSL) 連日投与の影響



**図2**

FluoroGold (FG)標識PAR2陽性三叉神経節(TG)ニューロン

A: 舌SCC接種後7日目におけるFG標識PAR2陽性TGニューロン. 矢頭: FG標識PAR2陽性TGニューロン. SCC/FSL: 舌へFSLを連日投与したSCC群, SCC/Veh: 舌へ溶媒を連日投与したSCC群, Veh: PBS群. スケールバー: 50  $\mu$ m.  
B: 舌SCC接種後7日目, FG標識TGニューロンにおけるPAR2陽性ニューロンの割合.

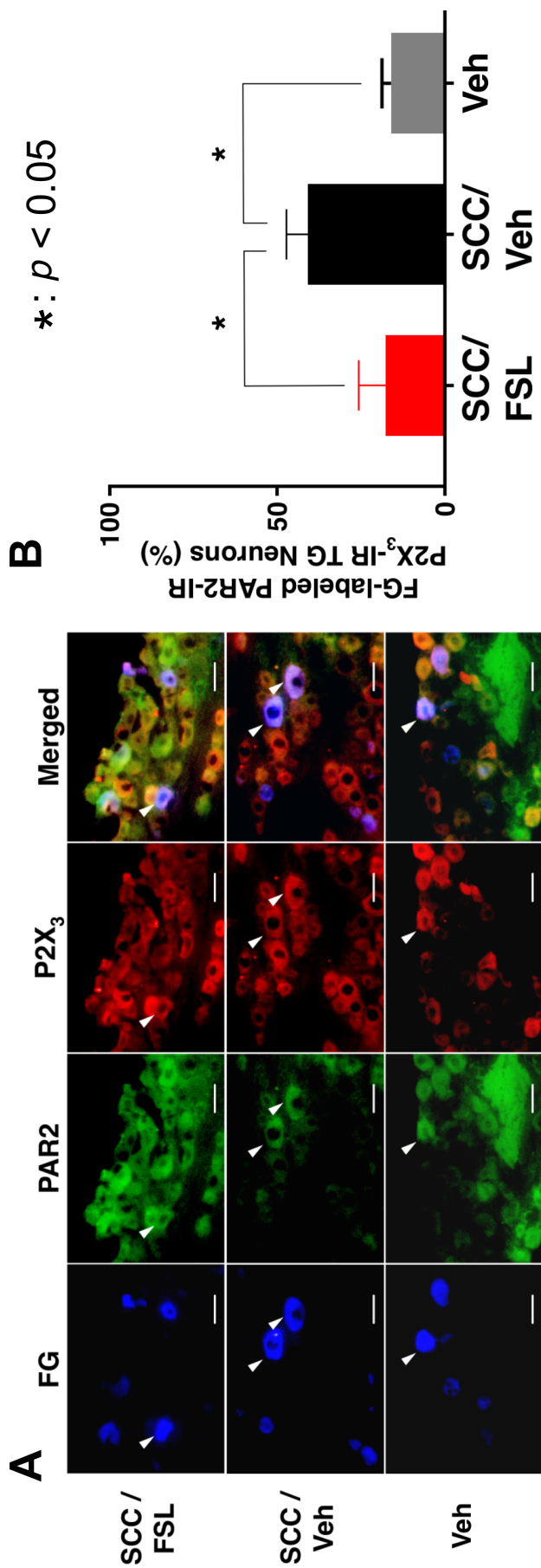


**図3**

FG標識PAR2およびTRPV1陽性TGニューロン

A: 舌SCC接種後7日目におけるFG標識PAR2およびTRPV1陽性TGニューロン.  
 矢頭: FG標識PAR2およびTRPV1陽性TGニューロン. SCC/FSL: 舌へFSL連日投与したSCC群, SCC/Veh: 舌へ溶媒を連日投与したSCC群, Veh: PBS群. スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ .

B: 舌SCC接種後7日目, FG標識TGニューロンにおけるPAR2およびTRPV1陽性ニューロンの割合.

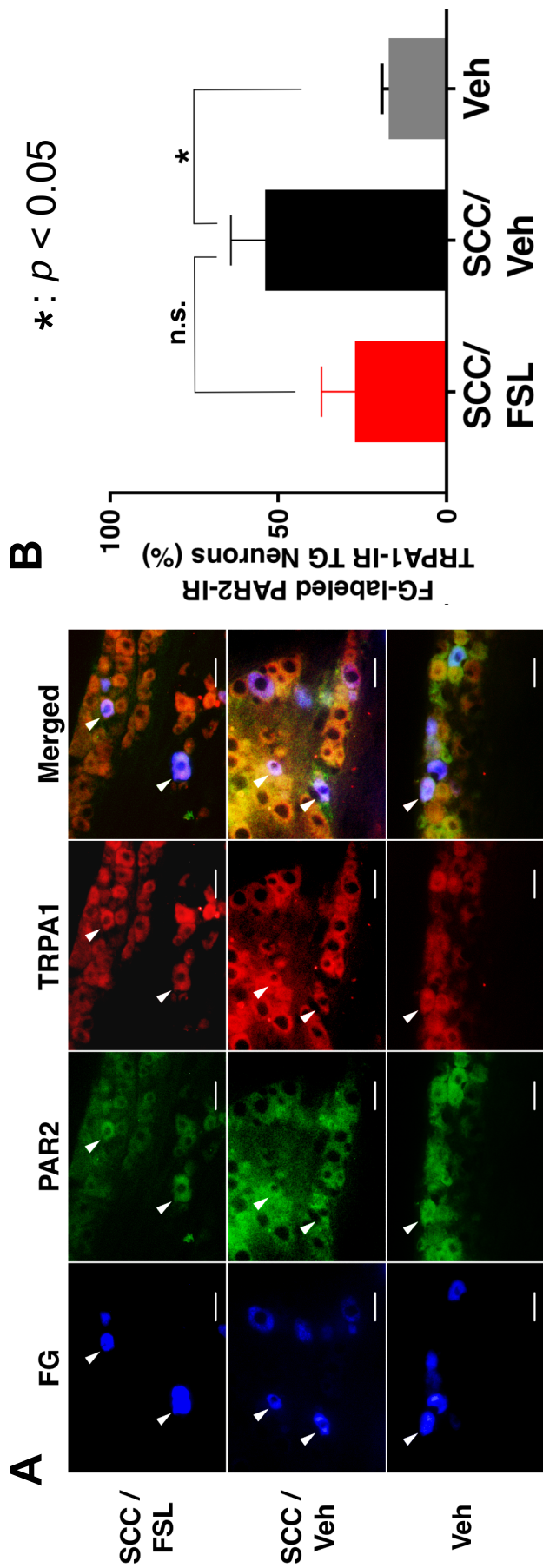


**図4**

FG標識PAR2およびP2X<sub>3</sub>陽性TGニューロン

A: 舌SCC接種後7日目におけるFG標識PAR2およびP2X<sub>3</sub>陽性TGニューロン. 矢頭: FG標識PAR2およびP2X<sub>3</sub>陽性TGニューロン. SCC/FSL: 舌へFSLを連日投与したSCC群, SCC/Veh: 舌へ溶媒を連日投与したSCC群, Veh: PBS群. スケールバー: 50  $\mu$ m.

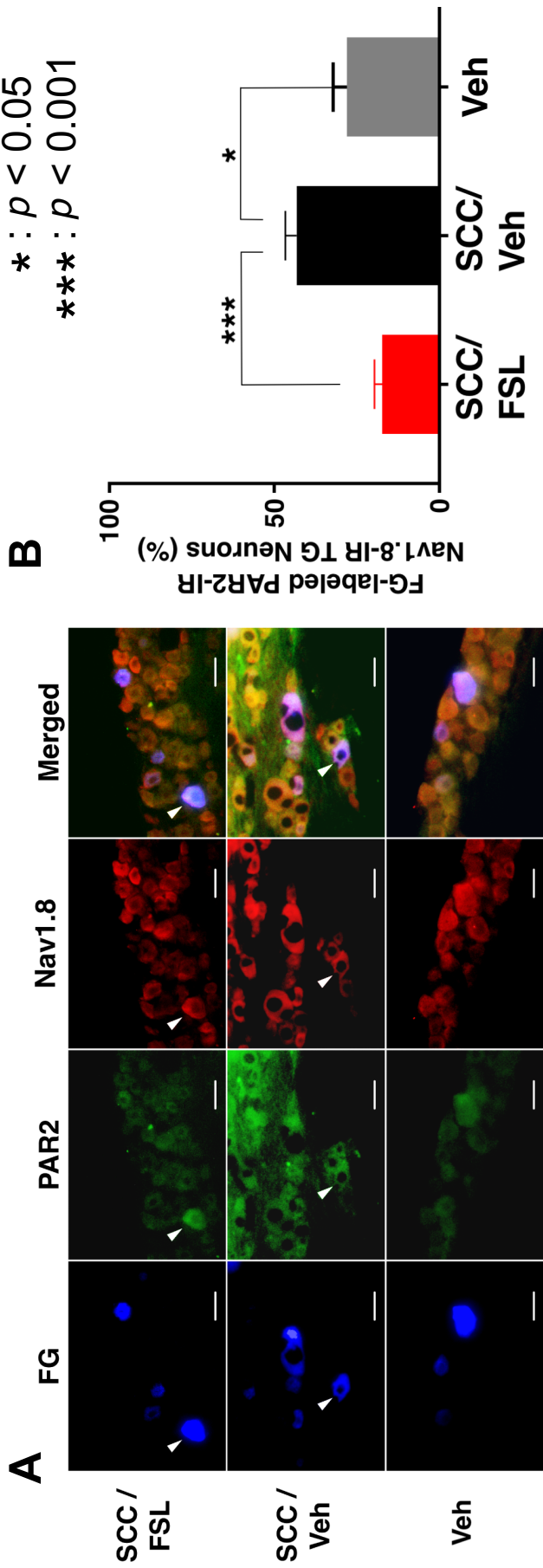
B: 舌SCC接種後7日目, FG標識TGニューロンにおけるPAR2およびP2X<sub>3</sub>陽性ニューロンの割合.



**図5**

FG標識PAR2およびTRPA1陽性TGニューロン

A: 舌SCC接種後7日目におけるFG標識PAR2およびTRPA1陽性TGニューロン。  
 矢頭: FG標識PAR2およびTRPA1陽性TGニューロン. SCC/FSL: 舌へFSLを連日  
 投与したSCC群, SCC/Veh: 舌へ溶媒を連日投与したSCC群, Veh: PBS群. ス  
 ケールバー: 50  $\mu\text{m}$ .  
 B: 舌SCC接種後7日目, FG標識TGニューロンにおけるPAR2およびTRPA1陽性  
 ニューロンの割合.

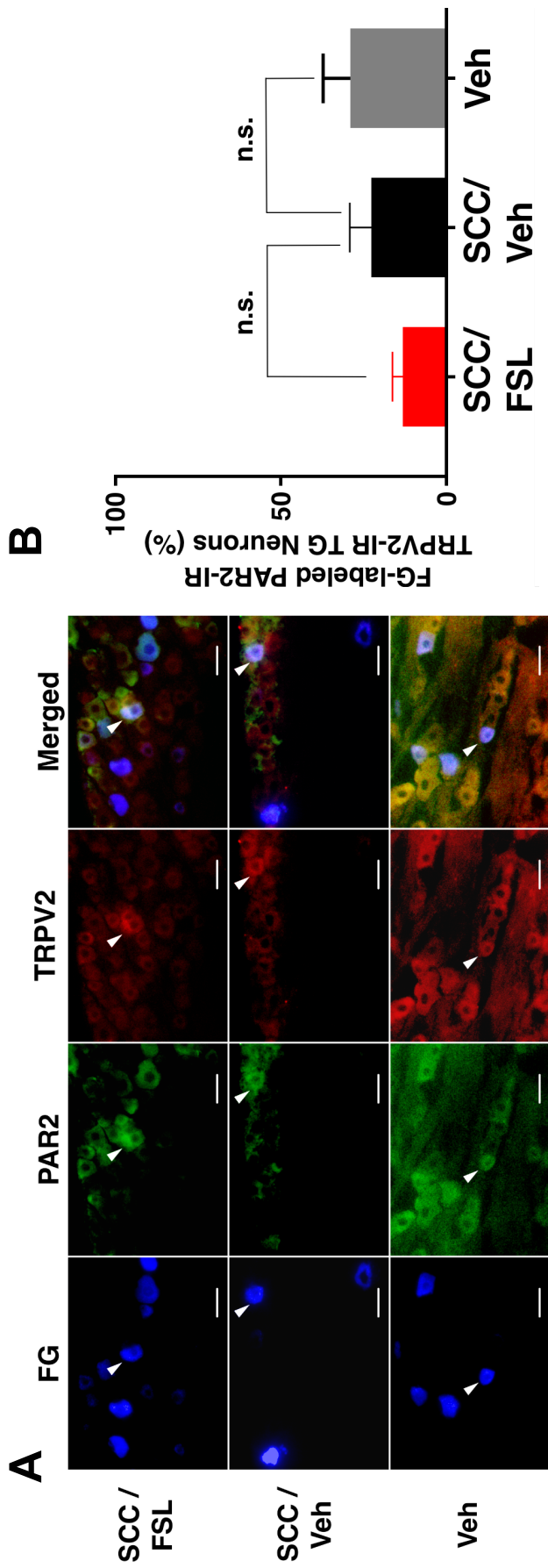


**図6**

FG標識PAR2およびNav1.8陽性TGニューロン

A: 舌SCC接種後7日目におけるFG標識PAR2およびNav1.8陽性TGニューロン.  
矢頭: FG標識PAR2およびNav1.8陽性TGニューロン. SCC/FSL: 舌へFSLを連日投与したSCC群, SCC/Veh: 舌へ溶媒を連日投与したSCC群, Veh: PBS群. スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ .

B: 舌SCC接種後7日目, FG標識TGニューロンにおけるPAR2およびNav1.8陽性ニューロンの割合.



**図7**

FG標識PAR2およびTRPV2陽性TGニューロン

A: 舌SCC接種後7日目におけるFG標識PAR2およびTRPV2陽性TGニューロン。  
 矢頭: FG標識PAR2およびTRPV2陽性TGニューロン. SCC/FSL: 舌へFSLを連日  
 投与したSCC群, SCC/Veh: 舌へ溶媒を連日投与したSCC群, Veh: PBS群. ス  
 ケールバー: 50  $\mu$ m.  
 B: 舌SCC接種後7日目, FG標識TGニューロンにおけるPAR2およびTRPV2陽性  
 ニューロンの割合.