

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

赤坂竜太

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(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FSLRLY-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、舌に注射する三叉神経節ニューロンにおけるPAR2, TRPV1, P2X₃, TRPA1, Nav1.8またはTRPV2発現を解析した。舌に注射する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FSLRLY-NH₂投与により有意に抑制された。さらに、SCC細胞接種7日目において舌に注射するPAR2陽性でTRPV1, P2X₃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FSLRLY-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、舌に注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, P2X₃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

緒言

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¹⁾。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^{2,4)}。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⁵⁾。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⁶⁾。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。

口腔癌の浸潤に伴い、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^{7,8)}。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⁹⁾。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¹⁰⁾。

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¹¹⁾。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^{12,14)}。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^{15,16)}。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¹⁷⁾。また、癌細胞から分泌されるサイトカインであるTNF- α やIL-1 β は、PAR2の発現を増加させることが知られている¹⁸⁾。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。

(受付: 令和2年1月17日)

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

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、日本大学歯学部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 針を用いて SCC 細胞 (SCC-158, JCRB) の懸濁液 (30 μ l, 2×10^6 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)^{19,20}。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) にデジタルフォースセップス (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、ラットを側臥位とした状態で、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 μ l の PAR2 アンタゴニスト (1.25 mM, FSLLRY-NH₂, 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 μ l; Fluorochrome) を 30 G 針を用いて舌左側縁部 (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 μ l の PAR2 アンタゴニストを舌左側縁部 (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、塩酸メドミジン (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ェノール (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% パラホルムアルデヒド固定液 (pH7.4) を用い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 Finetech) 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 μ 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; nacal 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) およびラビット抗 TRPV1 ポリクローナル抗体 (1:400; Alomone Labs), ラビット抗 P2X₃ ポリクローナル抗体 (1:1000; Genetex), ラビット抗 TRP Ankyrin 1 (TRPA1) ポリクローナル抗体 (1:1000; Abcam) またはラビット抗 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, P2X₃, 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 μ m 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。

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

P2X₃-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 \pm 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 1 A)。SCC 細胞接種後 7 日間、舌左側縁部への FSLLRN-NH₂ 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 1 B)。

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, P2X₃, 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 FSLLRN-NH₂ 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, P2X₃ 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 FSLLRN-NH₂ 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 FSLLRN-NH₂ の舌左側縁部への粘膜下投与により抑

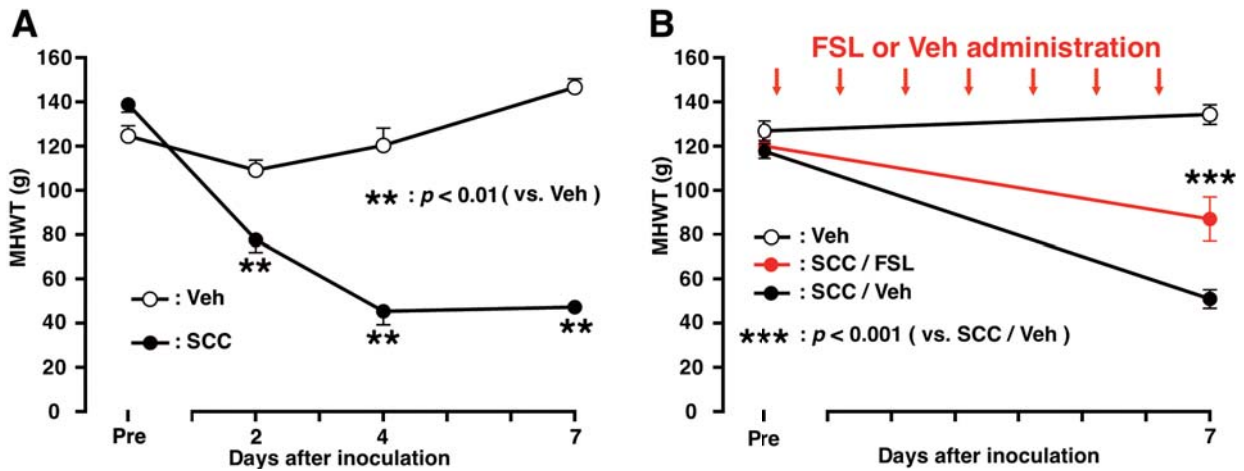


図 1 舌の機械刺激に対する逃避反射閾値(MHWT)の経日的変化
 A : 舌に扁平上皮癌(SCC)細胞または溶媒(Veh)接種後の舌 MHWT の経日的変化
 B : SCC 細胞接種後の MHWT 低下に対する舌への FSLLRN-NH₂(FSL)連日投与の影響

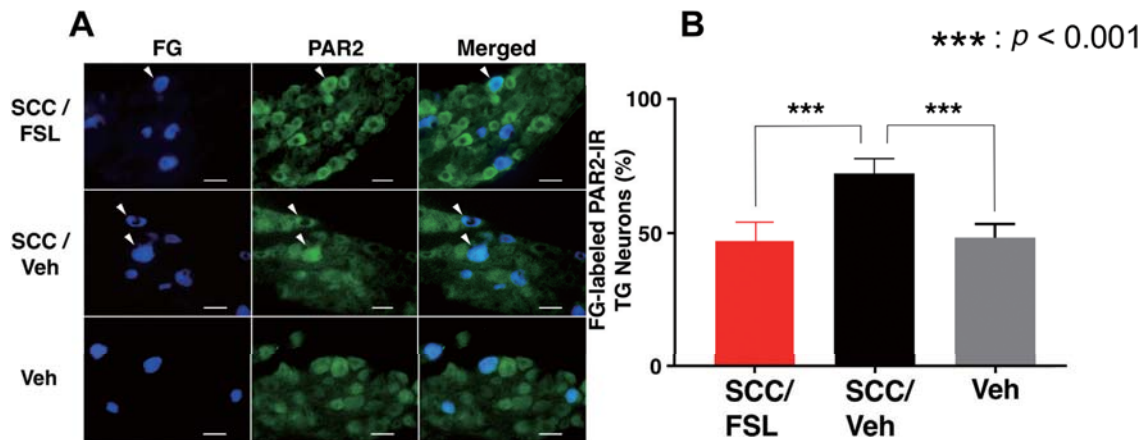


図 2 FluoroGold (FG) 標識 PAR2 陽性三叉神経節(TG)ニューロン
 A : 舌 SCC 接種後 7 日目における FG 標識 PAR2 陽性 TG ニューロン。矢頭 : FG 標識 PAR2 陽性 TG ニューロン。SCC/FSL : 舌へ FSL を連日投与した SCC 群, SCC/Veh : 舌へ溶媒を連日投与した SCC 群, Veh : PBS 群。スケールバー : 50 μm
 B : 舌 SCC 接種後 7 日目, FG 標識 TG ニューロンにおける PAR2 陽性ニューロンの割合

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 δ 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様々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²¹⁾。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²²⁾。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、様々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^{16,23,24)}。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²⁵⁻²⁷⁾。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

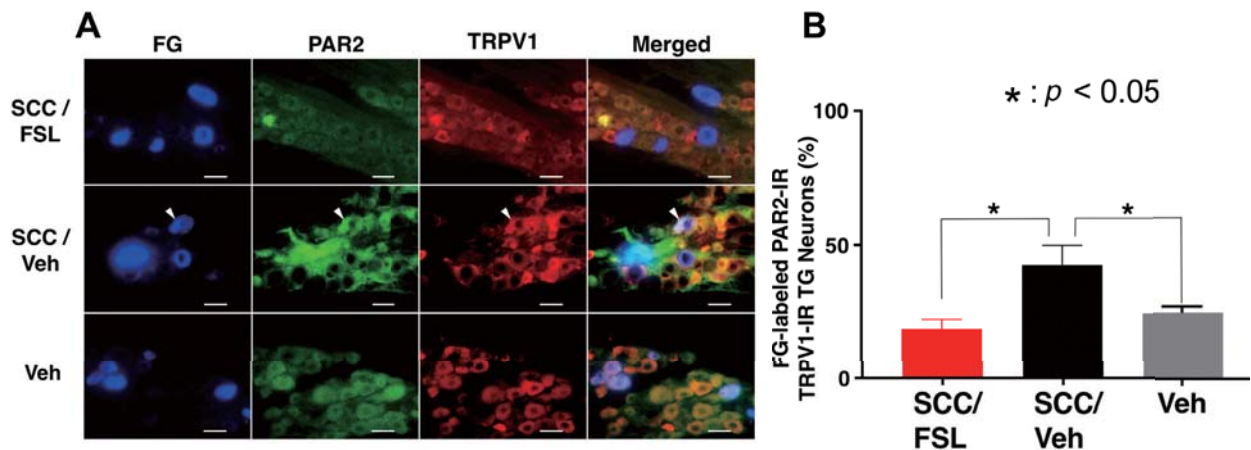


図3 FG標識PAR2およびTRPV1陽性TGニューロン

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 μ 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

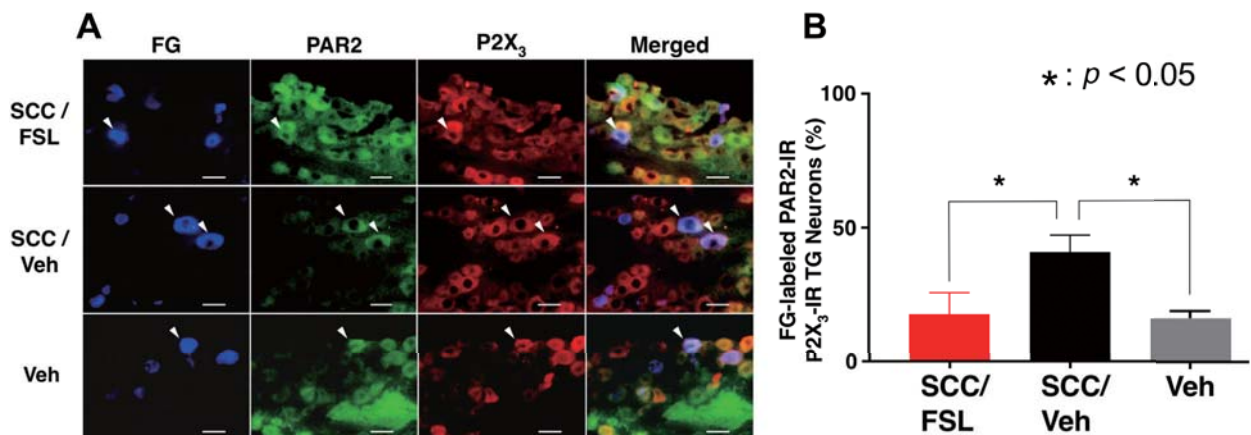


図4 FG標識PAR2およびP2X₃陽性TGニューロン

A: 舌SCC接種後7日目におけるFG標識PAR2およびP2X₃陽性TGニューロン。矢頭: FG標識PAR2およびP2X₃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 μ 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P2X₃陽性ニューロンの割合

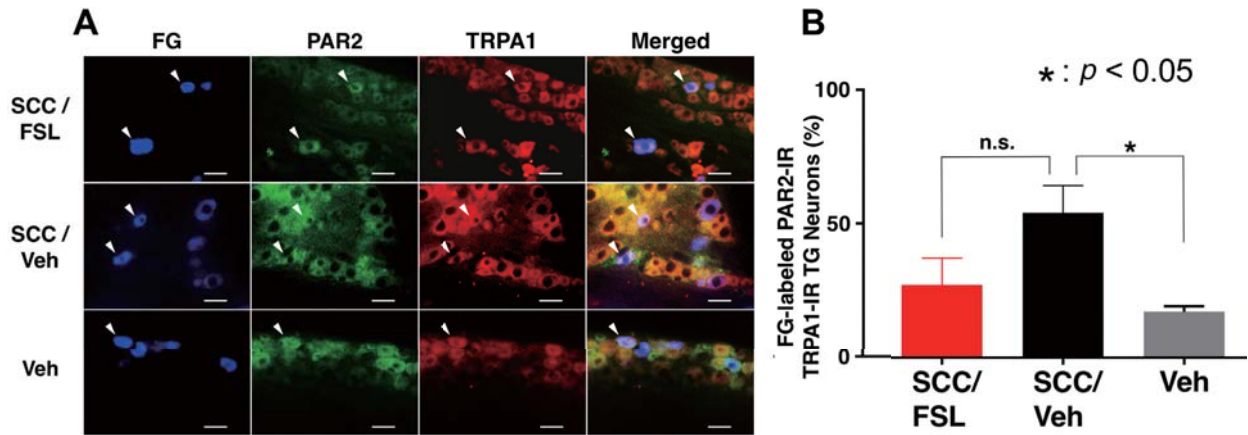


図5 FG 標識 PAR2 および TRPA1 陽性 TG ニューロン

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 μ 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

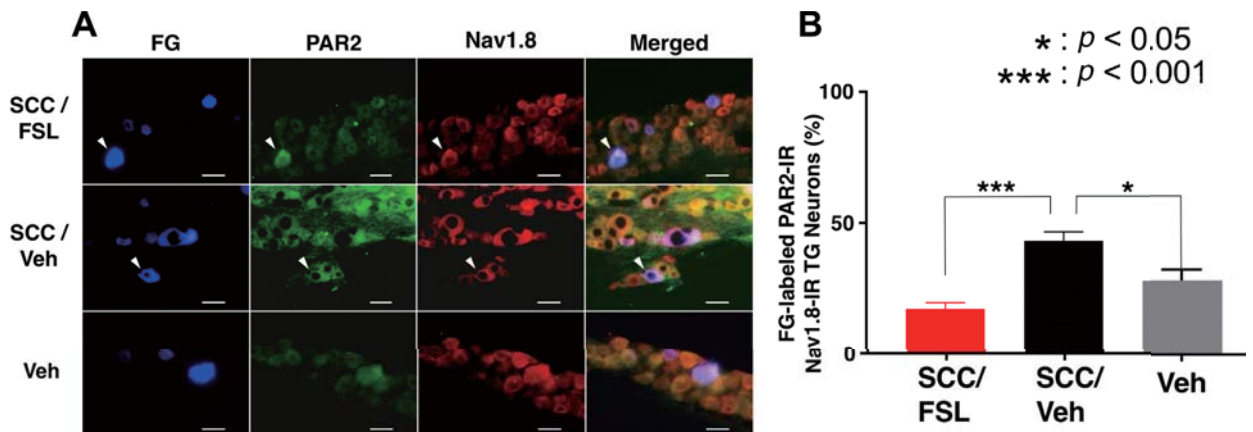


図6 FG 標識 PAR2 および Nav1.8 陽性 TG ニューロン

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 μ 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

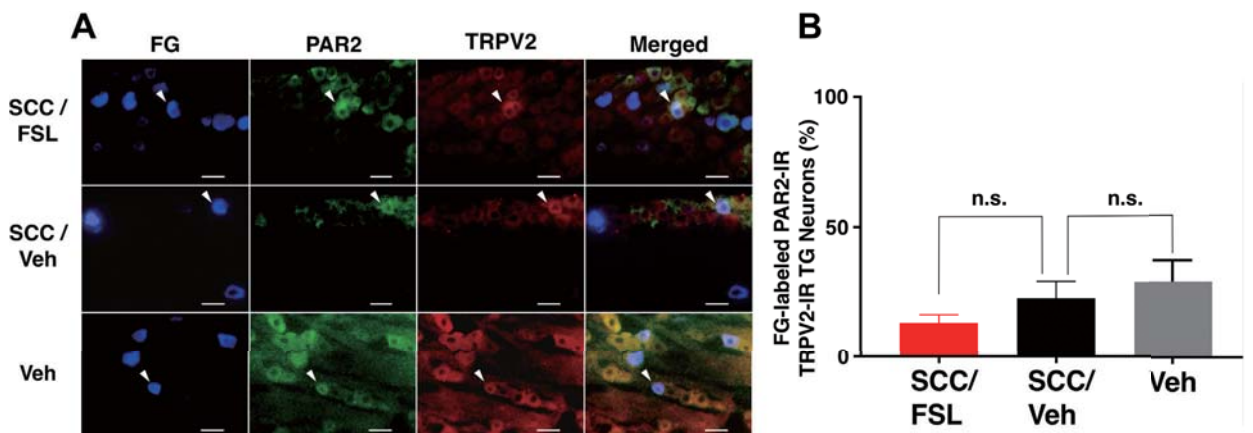


図7 FG 標識 PAR2 および TRPV2 陽性 TG ニューロン

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 μ 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

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²⁸⁾。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²⁹⁾。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³⁰⁾。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³¹⁾。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℃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³²⁾。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(PKCε)やprotein kinase A(PKA)と共発現する³³⁾。そして、PAR2シグナルはPKCε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。PKCε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^{34,35)}。

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ンネル型のP2XとGタンパク共役型のP2Yが存在している。そのうちP2X₃サブユニットが会合して中央にイオン透過チャンネル孔が形成されたP2X₃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³⁶⁾。PAR2シグナルはPKAやPKCの活性化を引き起こし、P2X₃受容体の細胞膜移行を促進する³⁷⁾。その結果、P2X₃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³⁸⁾。

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³⁹⁾。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α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³⁹⁾。PAR2シグナルはprostaglandin E₂(PGE₂)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⁺電流を増強する^{40,41)}。さらに、一次侵害受容ニューロンにおいてPGE₂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⁴²⁾。

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、P2X₃、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、P2X₃およびNav1.8についてSCC細胞接種後にFSLRY-NH₂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、P2X₃やNav1.8といった疼痛関連イオンチャン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た。

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測定した。また、三叉神経節ニューロンにおけるPAR2、TRPV1、P2X₃、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、P2X₃、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、P2X₃、およびNav1.8についてSCC細胞接種後のFSLRY-NH₂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、P2X₃やNav1.8を含む疼痛関連イオンチャン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。

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

- Matsuda T, Marugame T, Kamo K, Katanoda K, Ajiki W, Sobue T, Japan Cancer Surveillance Research Group (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.
- Tateda M, Shiga K, Saijo S, Yokoyama J (2000) A clinical study of oral tongue cancer. *Tohoku J Exp Med* 192, 49-59.
- 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.
- 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.
- Benoliel R, Epstein J, Eliav E, Jurevic R, Elad S (2007) Orofacial pain in cancer: part I—mechanisms. *J Dent Res* 86, 491-505.
- Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y (2010) Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol* 46, 414-417.
- 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.
- Schmidt BL (2015) The neurobiology of cancer pain. *J Oral Maxillofac Surg* 73, S132-135.
- Liyanage C, Fernando A, Batra J (2019) Differential roles of protease isoforms in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 38, 389-415.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, Hollenberg MD (2001) Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci* 22, 146-152.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 P2Y₁₂ signaling in tongue cancer pain. *J Dent Res* 95, 1176-1182.
- 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.
- Gold MS, Gebhart GF (2010) Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 16, 1248-1257.
- Schrenk-Siemens K, Rosseler C, Lampert A (2018) Translational model systems for complex sodium channel pathophysiology in pain. *Handb Exp Pharmacol* 246, 355-369.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 27) Nyberg P, Ylipalosaari M, Sorsa T, Salo T (2006) Trypsins and their role in carcinoma growth. *Exp Cell Res* 312, 1219-1228.
- 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 Cepsilon- 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) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II potentiates ATP responses by promoting trafficking of P2X receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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) 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.
- 41) 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.
- 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.