

オキサリプラチン誘発末梢神経障害の克服に向けて の研究

藤田, 隼輔

<https://doi.org/10.15017/1931849>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（臨床薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：



博士論文

オキサリプラチン誘発末梢神経障害の
克服に向けての研究

2018 年

九州大学大学院 薬学府 臨床薬学専攻

薬物動態学分野/臨床薬物治療学分野

藤田 隼輔

目次

略語	1
序論	2
第1章 オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対するエキセナチドの効果	
背景	6
結果	
1. オキサリプラチンによる細胞毒性及び神経様突起短縮に対するエキセナチドの効果	7
2. オキサリプラチン誘発末梢神経障害及び軸索変性に対するエキセナチド投与の効果	9
3. オキサリプラチン誘発末梢神経障害回復期におけるエキセナチドの影響	11
4. エキセナチド併用がオキサリプラチンによる抗腫瘍効果に与える影響	13
考察	15
小括	17
第2章 神経組織においてオキサリプラチン誘発末梢神経障害に寄与する薬物トランスポーターの解明	
背景	18
結果	
1. ラット DRG に発現するトランスポーターの探索	20

2. ラット DRG に発現するトランスポーターの絶対定量	21
3. 一過性発現細胞を用いたオキサリプラチン輸送トランスポーターのスクリーニング	22
4. トランスポーター安定発現細胞の構築	23
5. トランスポーター安定発現細胞を用いた濃度依存的細胞内 Pt 蓄積 . . .	24
6. トランスポーター安定発現細胞を用いた濃度依存的細胞内 Pt 活性化体蓄積	25
7. トランスポーター発現による細胞毒性への影響評価	26
8. トランスポーター発現による神経毒性への影響評価	27
9. ラット DRG におけるトランスポーターの <i>in vivo</i> ノックダウン	28
10. 末梢神経障害に対する Octn1 ノックダウンの影響評価	30
11. 末梢神経障害に対する Octn2 ノックダウンの影響評価	32
12. 末梢神経障害に対する Mate1 ノックダウンの影響評価	34
考察	36
小括	41
総括	42
実験の部	43
試薬・使用機器一覧	78
参考文献	83

略語

DRG	dorsal root ganglion
CTR	copper transporter
ABCATP	binding cassette sub-family
ATP	copper transporting ATPase
BCRP	breast cancer resistance protein
bp	base pair(s)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HEK 293 cells	human embryonic kidney 293 cells
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
MATE	multidrug and toxic compound extrusion
Mdr	multidrug resistance protein
MRP	multidrug resistance-associated protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
OCT	organic cation transporter
OCTN	organic cation/carnitine transporter
OATP	organic anion-transporting polypeptide
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate buffered saline
SLC	solute carrier family
TAE	tris-acetate-EDTA

序論

がん（悪性新生物）は三大疾病の一つであり、日本では2人に1人はがんに罹患し、3人に1人はがんで死亡すると言われる。国立がん研究センターによると2014年には約37万人ががんによって死亡しており、我が国における高齢化が著しいことから今後更なる罹患数・死亡数の増加が予測される。

大腸がんは結腸がん及び直腸がんの総称であり、がんによる死亡数の多い部位として男性では3位、女性では1位とされている。食生活の欧米化や喫煙・飲酒・肥満などが原因となり、主な症状として排泄異常や血便、腹痛、進行によっては貧血や体重減少等が挙げられる。予後は比較的良いとされるが、術後にはストーマの造設が必要になる場合もあるため治療後も患者にとって大きな負担となる可能性がある。

オキサリプラチンは本邦において開発された白金系抗悪性腫瘍薬である。作用機序は生体内変換体が腫瘍細胞内のDNA鎖と共有結合することによる白金・DNA架橋構造の形成と付随するDNAの複製・転写阻害であると考えられている。他の白金系抗悪性腫瘍薬とはDNA結合部位が異なる¹ことから、既存の白金製剤では効果が認められていなかった結腸・直腸がんに対して適応を持ち、承認から現在に至るまで大腸がん治療のキードラッグとして使用されている。近年、治癒切除不能な膵癌・胃癌に対しても適応を拡大しており、今後消化器系のがんに対して幅広い使用が見込まれる薬剤である。大腸がんにはFOLFOX療法、XELOX療法、胃がんにはCapeOX療法、膵がんにはFOLFIRINOX療法といったレジメンが開発・臨床応用され、治療効果の向上に寄与している。しかしながら、オキサリプラチンは末梢神経障害を高頻度で発現することが知られており、国内第Ⅱ相臨床試験におけるその発現頻度は100%であったことが報告されている²。

オキサリプラチンによる末梢神経障害はその性質によって急性障害と慢性障害に分類される。急性神経障害はオキサリプラチンの投与開始後数日以内にほぼ全例で発現し、冷感刺激によって発現・増悪する手足・口周辺の感覚異常を特徴とする³⁻⁶。休薬によって症状の

改善がみられることが多いが、投与毎に発現し冷刺激に対して注意が必要となることから QOL 低下につながる。慢性神経障害はオキサリプラチンの累積投与量に依存して発現し、手足のしびれや感覚異常、疼痛、重篤例では運動機能障害を引き起こす。さらに慢性神経障害は用量規制因子であり、発現により有効な治療の継続が困難となり変更や中止が余儀なくされる。重症例では不可逆的な神経障害が引き起こされ、治療終了後も末梢神経障害の症状が長期にわたって持続する⁷ことから、オキサリプラチン投与開始初期からの予防策・治療法の開発が重要となる。

現在に至るまで、オキサリプラチン誘発末梢神経障害の発現機序に関して様々な報告がなされている。特に用量規制因子とされる慢性神経障害に関しては、感覚神経の伝達を中継する脊髄後根神経節 (Dorsal Root Ganglia: DRG) へのオキサリプラチン蓄積が原因であることが明らかとなっている⁸。さらに DRG に蓄積したオキサリプラチンは、細胞体への障害や DRG に付随する神経線維を変性させることによって神経障害を発現すると考えられている^{9,10}。当研究室ではこれまでに、オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルラットを作成しその発現機序と対応策に関して研究を行ってきた。本モデルラットではオキサリプラチンの反復投与によって投与初期から急性神経障害の症状である冷感過敏を、2-3 クール目より慢性神経障害の症状である機械的アロディニアを発現した¹¹。オキサリプラチンの累積投与量依存的に痛覚過敏が引き起こされ、坐骨神経や DRG といった神経組織に障害がみられたことから、オキサリプラチンによる末梢神経障害の臨床症状を反映したモデルであると考えられる。

オキサリプラチンは生体内に投与された後、Cl⁻存在下で非酵素的な反応を経てオキサレート基と Pt 活性体 (Pt(dach)Cl₂) に分解される。オキサリプラチンによる急性神経障害は、分解産物のオキサレート基によって引き起こされることが報告されている。オキサレート基は DRG における電位依存性カルシウムチャネルを介した Ca²⁺の流入と、それに続く nuclear factor of activated T-cells (NFAT) の活性化、核内移行による温度感受性チャネル

transient receptor potential protein melastatin 8 (TRPM8) の発現増加を引き起こすことで冷刺激に対する感受性を増大させる¹²。さらに、上記のメカニズムをもとにオキサリプラチンによる急性神経障害に対してカルシウムチャネル阻害剤が有効であることが明らかになっている¹³。

慢性神経障害はPt活性体がDNAに結合し神経細胞に障害を引き起こすことで発症する。その細胞内取り込みはトランスポーターを介して行われ、腫瘍細胞の耐性化や組織における毒性の発現に影響を与えることが明らかになっている¹⁴⁻²⁴。細胞内に取り込まれたオキサリプラチンはDNA内のグアニン-グアニン及びアデニン-グアニン配列と架橋構造を形成しDNA合成を阻害することで細胞毒性を示し²⁵、Pt製剤のDNA架橋頻度と神経毒性の間に相関があることが報告されている²⁶。神経細胞は特に大きな細胞体と長い軸索を併せ持ち、その形態と機能を維持するために高度なDNA転写が必要となる。したがって、神経組織は他の組織と比較して損傷や機能不全が引き起こされやすいと考えられる。また、プラチナ製剤による神経細胞障害の発現機序としてミトコンドリア障害に伴う酸化ストレス²⁷⁻²⁹、グリア細胞の活性化^{30,31}、軸索形成関連タンパクの減少³²、ニコチン酸受容体の発現低下^{33,34}等が関与していることが報告されている (Fig.1)。

しかしながら、末梢神経障害の発現メカニズムに関しては未だ不明な点が多く、有効な予防策・対応策につながる研究結果は得られていない。本論文の第1章では末梢神経障害の治療薬探索を第2章では神経障害の発現メカニズムとしてDRGにおける取込及び排出に着目してトランスポーターの寄与を明らかにすることを目的に研究を行った。

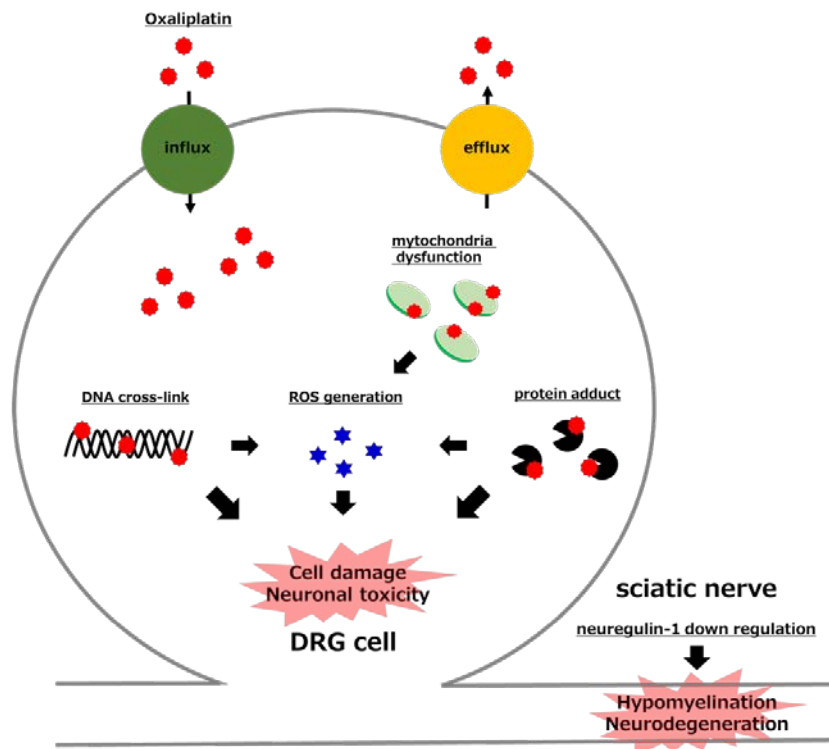


Fig. 1 オキサリプラチンによる末梢神経障害の発現メカニズム

第 1 章

オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対するエキセナチドの効果

背景

当研究室で用いているオキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルでは、オキサリプラチン投与開始 5 日から急性神経障害、15 日から慢性神経障害の発現がみられた¹¹。この慢性神経障害はオキサリプラチンの分解産物である Pt(dach)Cl₂ が原因であり、坐骨神経の有髄神経変性及びラット副腎髄質由来細胞 (PC12 細胞) とラット DRG 細胞に対する神経突起の伸長阻害が引き起こされることを明らかにした。さらに近年、オキサリプラチンが髄鞘形成を制御する因子である neuregulin 1 を減少させ、坐骨神経を変性させることを報告している³²。

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は小腸 L 細胞から分泌され、血糖依存的にインスリン分泌を制御する消化管ホルモンである。GLP-1 は生体内において dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) によって速やかに分解されるため、作用時間が非常に短いことが知られている。エキセナチドは DPP-4 による分解を受けにくくした GLP-1 のアナログ製剤であり、2 型糖尿病の治療薬として用いられている。神経系に対する作用も報告されており、GLP-1 アナログ製剤は血糖低下作用の他に糖尿病性末梢神経障害³⁵⁻³⁷、アルツハイマー病、パーキンソン病といった神経変性疾患に対して予防・改善効果を示すこと³⁸⁻⁴⁰が明らかになっている。本研究ではオキサリプラチン誘発末梢神経障害に対するエキセナチドの効果を明らかにすることを目的として研究を行った。

結果

1. オキサリプラチンによる細胞毒性及び神経様突起短縮に対するエキセナチドの効果

ラット副腎髄質由来細胞株である PC12 細胞をオキサリプラチン (3 μ M) 存在下で 24 時間培養することによって細胞生存率の低下 (Fig. 2A) と神経様突起の短縮 (Fig. 2BC) がみられた。GLP-1 アゴニスト単独での曝露が PC12 の神経様突起を伸ばすことは過去に明らかにされており⁴¹、本検討でもエキセナチドの同時曝露を行った結果、細胞生存率の改善はみられなかったが、神経様突起の伸展が確認された。また、神経様突起の伸展作用はエキセナチド濃度依存的であった。

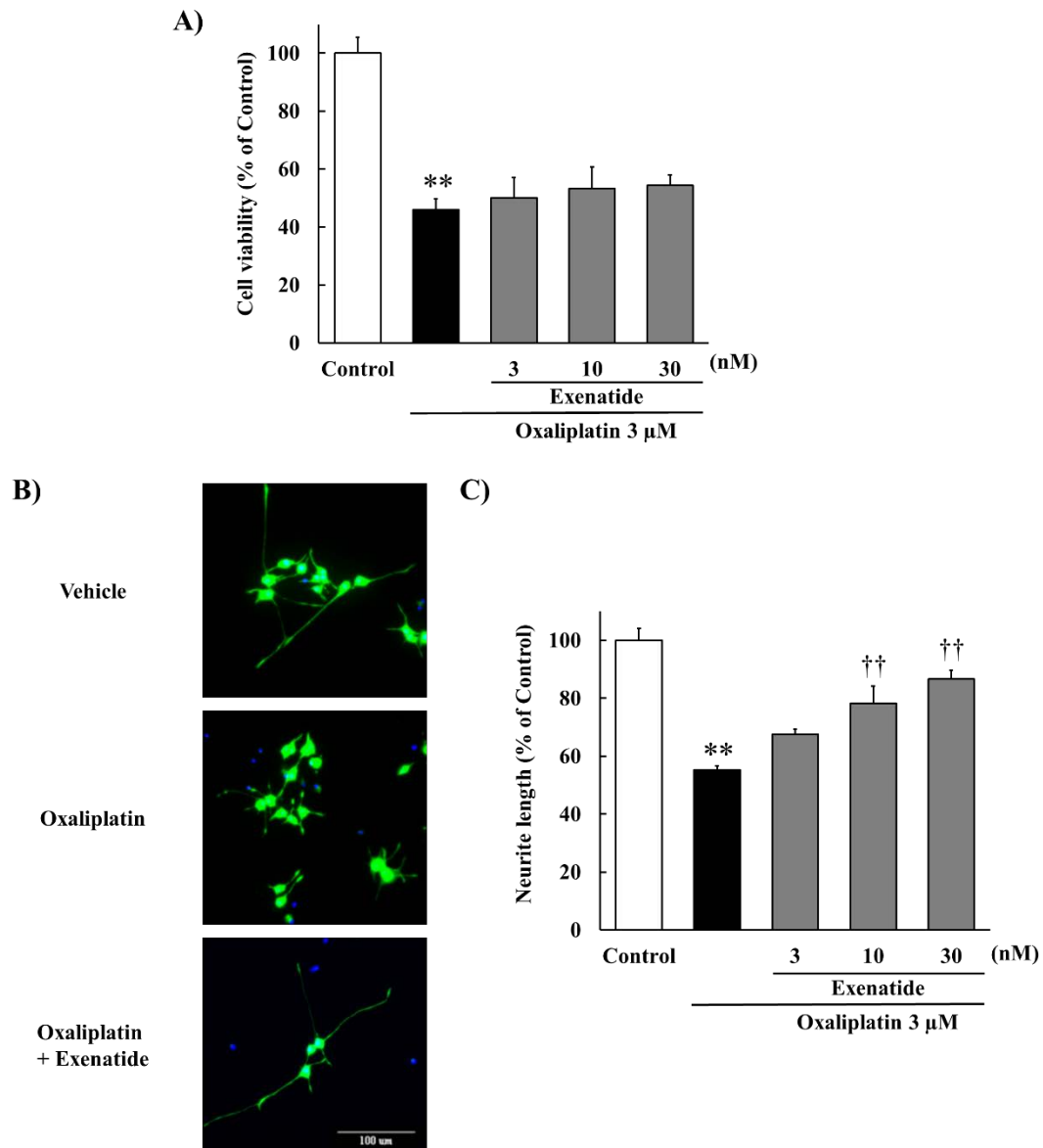
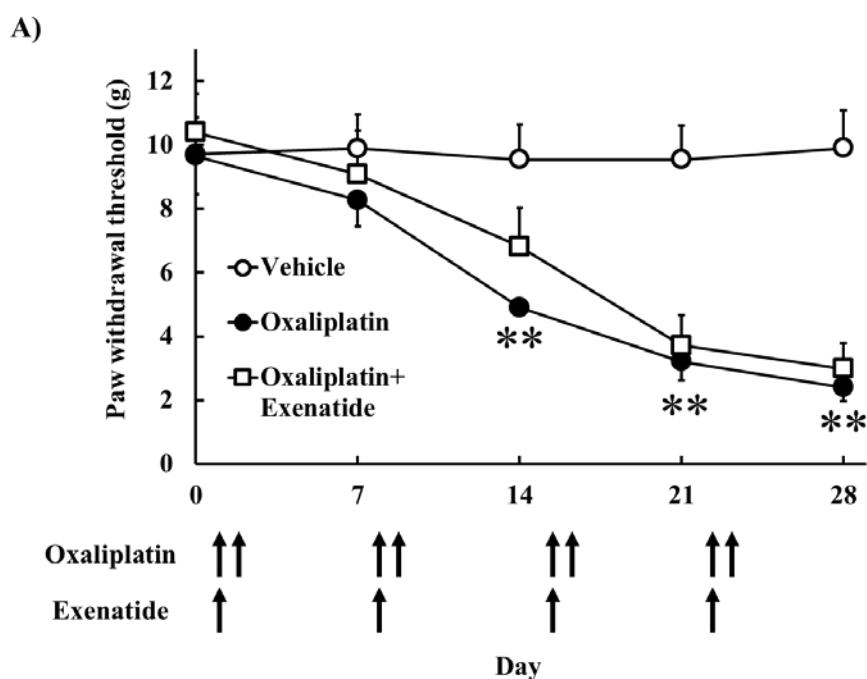


Fig. 2 Effect of exenatide on oxaliplatin-induced cell toxicity and neuro toxicity.

Cultured PC12 cells were incubated with oxaliplatin (3 μM) for 24 h in the presence or absence of exenatide (3, 10 or 30 nM). (A) Cell viability was measured using the CCK-8 assay. (B) Photographs were originally magnified 800 x. Scale bar = 100 μm. (C) Neurite length was measured using image analysis software (MetaXpress). Results are expressed as the mean $\pm$ standard error mean ($n = 3$). ** $P < 0.01$ compared with control, †† $P < 0.01$ compared with oxaliplatin alone.

2. オキサリプラチン誘発末梢神経障害の発現及び軸索変性に対するエキセナチド反復投与の効果

エキセナチドがオキサリプラチン誘発末梢神経障害の発現に与える影響を評価するため、モデルラットにエキセナチドの投与を行った。4週にわたってオキサリプラチン（4 mg/kg）を週 2 回静脈内投与、エキセナチド徐放性製剤（100 μ g/kg）を週 1 回皮下投与して神経障害を von Frey test で評価した。オキサリプラチンの投与によって投与開始 14 日目から反応閾値が低下し、神経障害の発現がみられた（Fig. 3A）。また、オキサリプラチンの投与によって神経障害の発現と同時に坐骨神経の変性が引き起こされることが明らかとなった。一方で、エキセナチドの投与は神経障害の発現と坐骨神経の変性には影響を与えなかった（Fig. 3BC）。



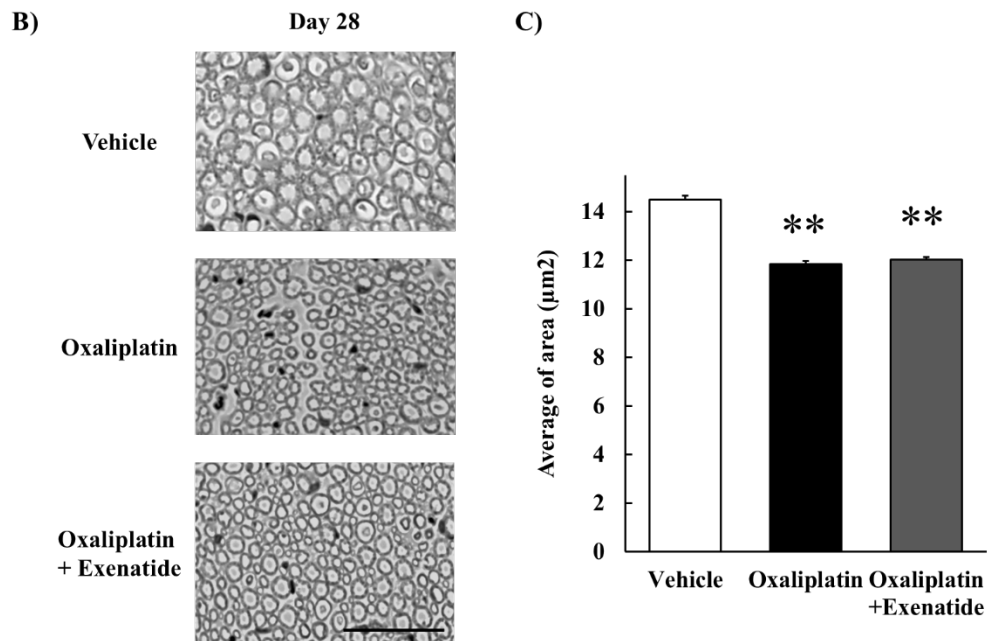


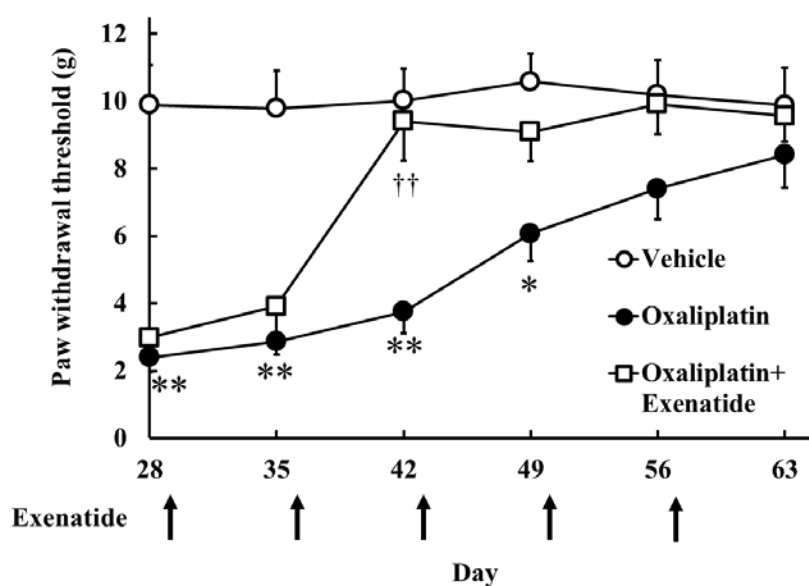
Fig. 3 Effect of exenatide on incidence of mechanical allodynia and axonal degeneration induced by oxaliplatin.

Oxaliplatin (4 mg/kg) was administered i.v. twice per week for 4 weeks (days 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22 and 23). Exenatide (100 µg/kg) was administered subcutaneously once per week for 4 weeks (days 1, 8, 15 and 22). (A) The von Frey test was performed before the first drug administration (on day 0) and on days 7, 14, 21 and 28. Values are expressed as the mean $\pm$ standard error mean of five or six animals. (B) On day 28, the sciatic nerve was harvested and samples were stained with toluidine blue. Images were captured at 800 x magnification. Scale bar = 60 µm. (C) The area of axon was calculated by image analysis software (Image J 1.36) from approximately 3000 to 6000 axons per group. Value are expressed as the mean $\pm$ standard error mean of four animals. ** $P < 0.01$ compared with vehicle.

3. オキサリプラチン誘発末梢神経障害回復期におけるエキセナチドの影響

4週にわたってオキサリプラチン投与を行った後、エキセナチド投与のみをさらに5週間にわたって継続し、末梢神経障害の発現状況と坐骨神経の形態変化を観察した。その結果、42日目においてエキセナチド併用群の反応閾値がオキサリプラチン投与群と比較して有意に上昇し、Vehicle群と同程度まで末梢神経障害の回復がみられた。一方で、オキサリプラチン群の末梢神経障害は63日目まで継続した (Fig. 4A)。坐骨神経の形態学的変化を評価したところ、オキサリプラチン投与群では軸索面積の減少が63日目までみられたが、エキセナチド併用群では42日目から軸索面積の増大がみられ、その変化は測定終了時まで継続した (Fig. 4BC)。

A)



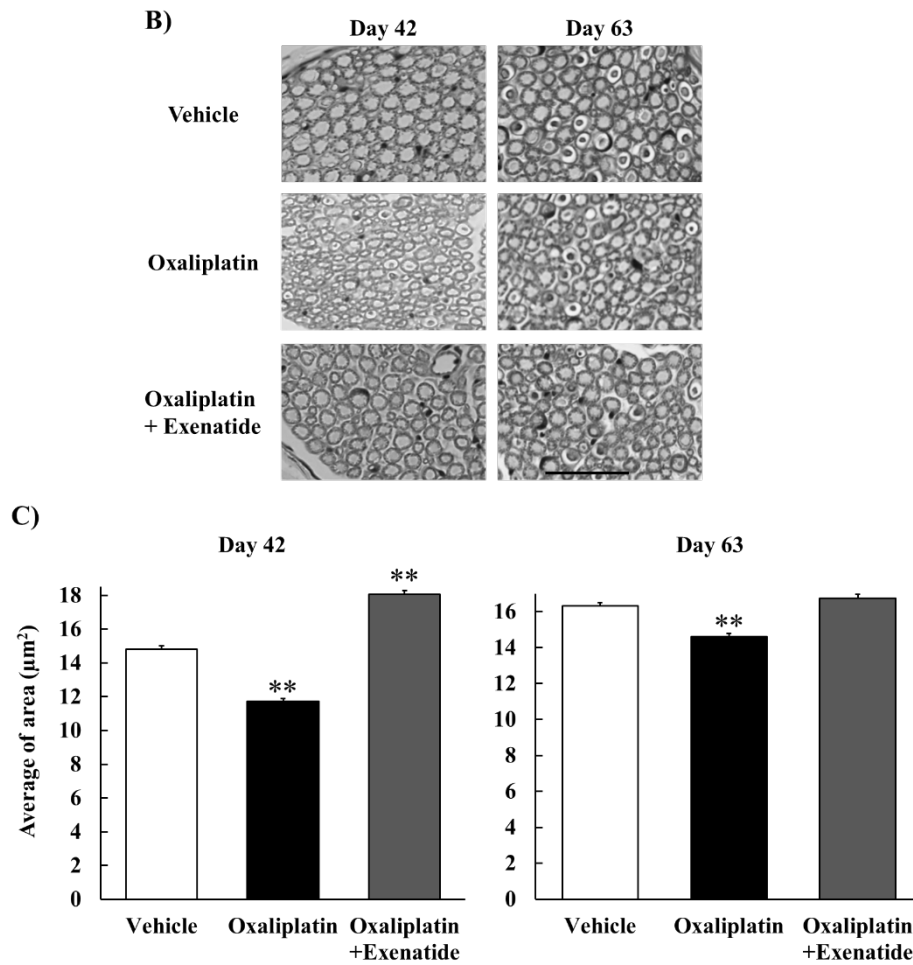
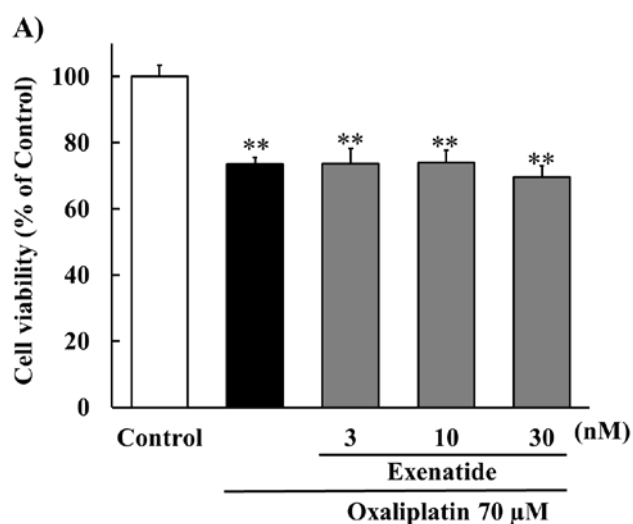


Fig. 4 Effects of exenatide on recovery from mechanical allodynia and axonal degeneration induced by oxaliplatin.

Oxaliplatin (4mg/kg) was administered i.v. twice per week for 4 weeks (day 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22 and 23). Exenatide (100 $\mu\text{g/kg}$) was administered s.c. once per week for 9 weeks (day 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 and 57). Oxaliplatin treatment ceased on day 23, however exenatide treatment was continued for additional 5 weeks. (A) The von Frey test was performed before the first drug administration (on day 0) and on days 35, 42, 49, 56 and 63. Values are expressed as the mean $\pm$ standard error mean of five or six animals. (B) On days 42 and 63, the sciatic nerve was harvested, and samples were stained with toluidine blue. Image were captured at 800 x magnification. Scale bar = 60 μm . (C) The area of axon: from 3000 to 6000/field) was measured using image analysis software (Image J 1.36). Value are expressed as the mean $\pm$ standard error mean of four animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle, ^{††} $P < 0.01$ compared with oxaliplatin alone.

4. エキセナチド併用がオキサリプラチンによる抗腫瘍効果に与える影響

エキセナチドの併用がオキサリプラチン誘発末梢神経障害からの回復を促進することが示唆されたため、続いてオキサリプラチンの抗腫瘍効果に与える影響に関して評価を行った。抗腫瘍効果マウス大腸がん由来細胞 (C-26) に対してオキサリプラチンとエキセナチドを同時に 24 時間曝露した後、CCK-8 法による細胞生存率測定を行った。また、C-26 細胞を足裏に埋め込んだ担癌マウスを作製し、オキサリプラチン単独投与及びエキセナチド併用投与後の腫瘍径を測定することによって抗腫瘍効果に与える影響を評価した。細胞生存率測定の結果、オキサリプラチン (70 μ M) の 24 時間曝露によって細胞生存率が低下し、エキセナチドはオキサリプラチンによる細胞障害に影響を与えないことが明らかとなった (Fig. 5A)。また、担癌マウスを用いた検討からオキサリプラチンが強い抗腫瘍効果を示し、エキセナチドがその作用を減弱しないことを確認した (Fig. 5B)。



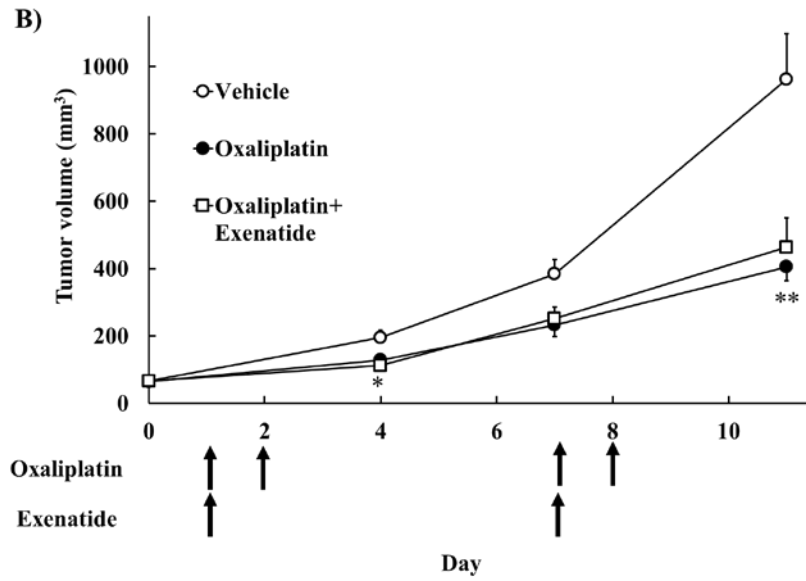


Fig. 5 Effect of exenatide on oxaliplatin induced antitumor effects.

(A) C-26 cells were incubated with oxaliplatin (70 μ M) for 24 h in the presence or absence of exenatide (3, 10 or 30 nM). Cell viability was measured using the CCK-8 assay. Values are expressed as a percentage of the control ($n = 4$). ** $P < 0.01$ compared with control. (B) C-26 cell-implanted mice were treated with oxaliplatin (6 mg/kg, i.p. days 1, 2, 8 and 9) and extended-release exenatide (150 μ g/kg, s.c. days 1 and 8). Tumor volumes were measured on day 0, 4, 7 and 11. Values are expressed as the mean $\pm$ standard error mean of 8-12 animals on day 0, 4, 7 and 11. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle.

考察

本研究で用いた末梢神経障害モデルラットでは以前の報告と同様に、オキサリプラチン投与開始 14 日目より神経障害が発現し、投与終了まで徐々に悪化した。その後も 63 日目まで反応閾値の低下がみられ、長期にわたって神経障害の症状が持続することが明らかとなった。実際にオキサリプラチンによる化学療法を受けた 10% の患者では末梢神経障害の症状が完全に回復するために投与終了から 2 年以上を要することが報告されている⁷⁾。本研究の結果から、消化管ホルモンのアナログ製剤であるエキセナチドがオキサリプラチン誘発末梢神経障害を早期に回復させることが示唆された。エキセナチドはオキサリプラチン誘発末梢神経障害の治療薬として有用である可能性がある。

本研究ではまず、オキサリプラチンによる細胞毒性及び神経様突起短縮に対するエキセナチドの効果について検討を行った。その結果、オキサリプラチンによる PC12 細胞の神経突起の短縮と細胞障害を認めた。エキセナチドの同時曝露は細胞障害の抑制作用は示さなかったが、神経突起を伸展させた。この結果は、エキセナチドが生体内でオキサリプラチンによる神経細胞体への障害には影響を与えないが、神経変性を緩和することを示唆している。*in vitro* でエキセナチドがオキサリプラチンによる神経毒性に対して保護効果を示したことから、*in vivo* でエキセナチド併用の効果について検討を行った。オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルラットでは、28 日目において神経軸索の変性が引き起こされ、63 日目まで Vehicle と比較して神経線維の断面積が減少した。エキセナチドを併用したところ、28 日目の軸索変性は抑制できなかったが、42 日目と 63 日目には軸索面積が増大した。この結果から、神経軸索の形態学的な改善がオキサリプラチン誘発末梢神経障害の早期回復に寄与する可能性が示唆された。また、オキサリプラチンとエキセナチドを同時投与したラットの坐骨神経評価の結果からも、エキセナチドによる神経組織の形態学的な改善作用が確認された。以上の結果から、エキセナチドはオキサリプラチン誘発末梢神経障害の発現に

影響を与えず、変性した神経線維の回復促進を介して神経障害の早期回復に寄与すると考えられる。

GLP-1 受容体は DRG 内の大型及び小型のペプチド作動性神経細胞体に局在しているため、様々な神経線維の機能と関与している⁴²。GLP-1 受容体アゴニストは cAMP の増加⁴³、抗アポトーシス作用⁴⁴、c-Jun N-terminal kinase (JNK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) シグナル経路の活性化を介した神経保護効果⁴⁵や NGF による PC12 細胞の分化促進作用を示す⁴¹ことが報告されている。NGF は stress-activated kinase/JNK や ERK1/2 を制御することでオキサリプラチンによる細胞障害から DRG 神経を保護する⁴⁶ことも知られており、神経機能の維持に重要な因子である。近年、GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 が損傷性神経障害後の回復を促進することが報告されている⁴⁷⁻⁴⁹。また、exendin-4 はラット DRG 細胞と PC12 細胞の神経突起の伸展促進作用を示し、この作用は phosphatidylinositol-3'-phosphate kinase (PI3K) シグナル経路の活性化によるとされている。現在、エキセナチドが神経線維の回復を促進させる詳細な分子メカニズムに関しては明らかになっていないが、本研究で明らかとなったオキサリプラチン誘発末梢神経障害に対するエキセナチドの作用には上記のメカニズムが関与していると考えられる⁴¹。また、これらの結果は GLP-1 受容体が化学療法後の神経再生時における新たな治療ターゲットとなりうることを示している。

また、GLP-1 受容体は脊髄後角のミクログリアに発現しており、特に末梢神経障害発現時にその発現量が増加する。さらに、GLP-1 受容体作動薬の髄腔内投与はホルマリン、末梢神経障害、骨肉腫、糖尿病に由来する痛覚過敏を緩和することが明らかになっている⁵⁰。この作用は GLP-1 受容体アンタゴニストやノックダウンだけでなく、ミクログリアの活性阻害剤として知られるミノサイクリンの投与によって抑制された。パーキンソン病モデルラットでは exendin-4 がミクログリアの活性化を抑制することでドパミン神経保護作用を示した⁴⁶。これらの報告から GLP-1 受容体の抗痛覚過敏効果や神経保護効果にミクログリ

アの強い関与が示唆される。一方で、オキサリプラチン誘発末梢神経障害の発現にはミクログリアではなく脊髄のアストロサイト活性化が関与しているという報告もなされている⁵¹。⁵³。本研究においてエキセナチドがオキサリプラチンによる末梢神経障害の発現や坐骨神経の変性を抑制しなかったことから、グリアの機能はエキセナチドの効果に関係していなかったと考えられる。

オキサリプラチンの抗腫瘍効果に与える影響に関する検討では、エキセナチドは大腸がん細胞である C-26 に対する細胞障害を抑制しなかった。さらに、担がんマウスを用いた検討からも抗腫瘍効果を減弱しなかったことから、エキセナチドの併用はオキサリプラチンの治療効果に影響を与えずに末梢神経障害の回復促進作用があることが示唆された。

小括

第 1 章では、消化管ホルモンである GLP-1 のアナログ製剤であるエキセナチドが、オキサリプラチン誘発末梢神経障害に与える影響について検討を行った。オキサリプラチンは PC12 細胞の神経様突起を短縮させたが、エキセナチドの同時処置によって突起の伸展がみられた。一方で、オキサリプラチンによる細胞毒性に影響を与えなかったことから、エキセナチドはオキサリプラチンの細胞障害には影響を与えず、神経保護作用を示すことが明らかになった。続いてオキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルラットを用いて検討を行ったところ、末梢神経障害の発現には影響しなかったが、オキサリプラチン投与終了後に回復を早める効果が確認された。併せて坐骨神経の組織をトルイジンブルー染色後に評価したところ、エキセナチドの投与が末梢神経障害と同時に坐骨神経の変性を改善することが明らかとなった。また、C-26 細胞と担がんマウスを用いた検討からエキセナチドがオキサリプラチンの抗腫瘍効果に影響を与えないことが明らかとなった。これらの知見はオキサリプラチン誘発末梢神経障害の治療薬としてのエキセナチドの有用性を示唆するものである。

第2章

神経組織においてオキサリプラチン誘発末梢神経障害に寄与する薬物トランスポーターの解明

背景

これまで、オキサリプラチンによる慢性末梢神経障害は累積投与量に依存して発現し、投与を繰り返すことによる蓄積、特に感覚刺激の中継を担う神経組織である DRG へのオキサリプラチン蓄積が原因であることが明らかになっている⁸。オキサリプラチンは DRG 細胞に取り込まれた後、細胞体の委縮及び核の縮小、坐骨神経の変性を引き起こすこと^{9,10}が知られているが、その詳細なメカニズムに関しては未だ不明とされ有効な対策の確立には至っていない。また、基本的に神経細胞体が強い障害を受けて死滅した場合、その再生は不可能であるとされる。さらに、末梢神経障害の症状は 2 年以上にわたって継続することも報告されており、神経障害が一度発現すると回復には長い時間を要する⁷。したがって、DRG 細胞へのオキサリプラチン蓄積に伴う細胞体への障害と神経障害を抑制することはオキサリプラチンによる化学療法の治療効果向上や長期にわたる患者の QOL 改善に大きく寄与すると考えられる。そのためには、神経障害の起点となるオキサリプラチンの蓄積に関わる機構を明らかにすることが必須である。

オキサリプラチンをはじめシスプラチン、カルボプラチンといった活性中心に Pt を持つ薬剤は、固形腫瘍に対して幅広いスペクトルを持つことから化学療法で頻繁に使用される。腫瘍細胞や腎臓に関する過去の報告から、Pt 製剤がトランスポーターを介して細胞内外へと輸送されることが示唆されている⁵⁴⁻⁵⁶。とりわけ、シスプラチンによる腎障害や腫瘍細胞の Pt 製剤耐性にトランスポーターが寄与しているとの報告は数多く、前者に関しては有機

カチオントランスポーターや金属トランスポーターの関与が知られている⁵⁷⁻⁵⁹。一方で ABC トランスポーターや **Mate** といった薬剤排出型のトランスポーターは耐性に強く寄与していると考えられている¹⁴⁻²⁴。Pt 製剤間で輸送を担うトランスポーターに違いがあることも報告されており、オキサリプラチンと比較してシスプラチンが強い腎毒性を示すのはオキサリプラチンだけが排出に寄与するトランスポーターである **Mate2-K** の基質になることがその理由とされる。オキサリプラチンは、腎臓や腫瘍細胞で有機カチオントランスポーターである **Oct2** や銅輸送トランスポーターである **Ctr1** をはじめ、いくつかのトランスポーターで基質として輸送されることが報告されている。しかしながら、**DRG** におけるそれらトランスポーターの発現に関しては未だ十分な報告がなく、神経障害との関連については *in vitro* で有機カチオントランスポーターの寄与を検討したものに限られている。そのため、オキサリプラチン輸送、特に神経系における輸送に関しては報告が不足しており、末梢神経障害との関連は明らかになっていない。

本研究ではオキサリプラチン誘発末梢神経障害に寄与するトランスポーターを明らかにすることを目的に研究を行った。

結果

1. ラット DRG に発現するトランスポーターの探索

DRG に発現するトランスポーターを明らかにするため、薬物トランスポーターの mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて確認した。オキサリプラチンをはじめとしたシスプラチン、カルボプラチンといった Pt 製剤の輸送に関して報告のある 21 種類を測定対象とした。ラット 4 匹から採取した DRG をサンプルとして測定した結果を以下に示す (Table. 1)。12 種のトランスポーターについて、Ct 値 < 30 の発現を認めた。

Target	Ct Value
Copper Transporter	Ctrl
	Ctrl
	Atp7a
	Atp7b
Organic Cation Transporter	Oct1
	Oct2
	Oct3
	Octn1
	Octn2
Organic Anion Transporter	Oatp1a1
	Oatp1a5
	Oatp1b2
ABC Transporter	Bcrp
	Mdr1a
	Mdr1b
	Mrp1
	Mrp2
	Mrp3
	Mrp4
	Mrp5
MATE Transporter	Mate1

Table 1 Searching for the candidate transporters in rat DRG.

DRG was harvested and mRNA expressions were measured by Real-time PCR.

Results are expressed as mean ($n = 3$).

2. ラット DRG に発現するトランスポーターの絶対定量

DRG において発現量の高いトランスポーターを明らかにするため、Table 1 で比較的发現の高かったトランスポーター ($Ct < 30$) を絶対検量線法により定量した。候補となったトランスポーター間でも発現量に最大で約 80 倍の差があり、ラット DRG ではトランスポーター間で発現量が大きく異なることが明らかになった (Fig. 1)。

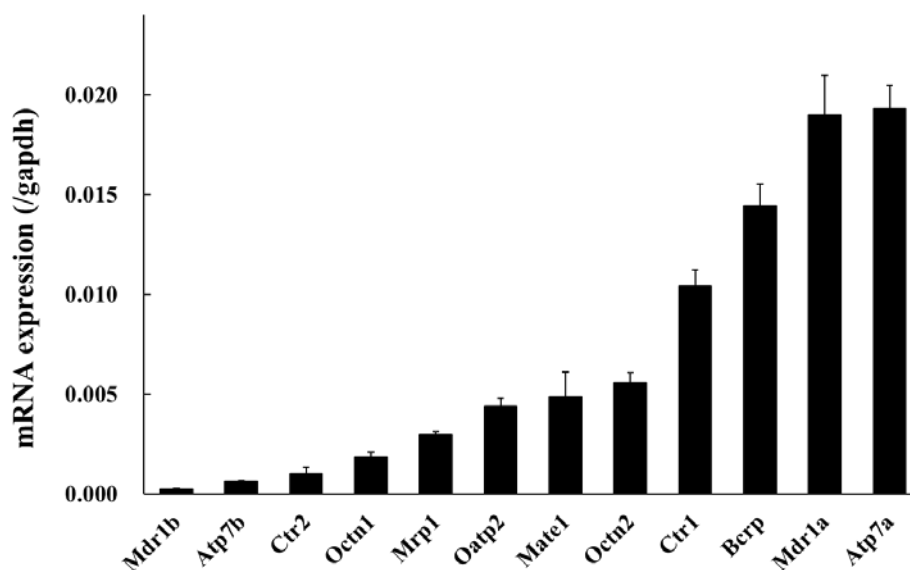


Fig. 1 Absolute quantification of drug transporters in rat DRG tissue.

mRNA expression of 12 drug transporters were measured by Real-time PCR. Data represents mean $\pm$ S.D. ($n = 4$) and the results were normalized to the expression of GAPDH.

3. 一過性発現細胞を用いたオキサリプラチン輸送トランスポーターのスクリーニング

DRG において高い発現を認めた 12 種のトランスポーターについて、オキサリプラチン輸送活性の有無を確認するため、これらトランスポーターを HEK293 細胞に一過性に発現させ、オキサリプラチンの細胞内蓄積量を測定した。オキサリプラチン 2 時間曝露の結果、Octn1、Octn2 及び Mate1 過剰発現細胞で control 細胞を比較して有意な Pt 蓄積量の増加がみられた (Fig. 2)。

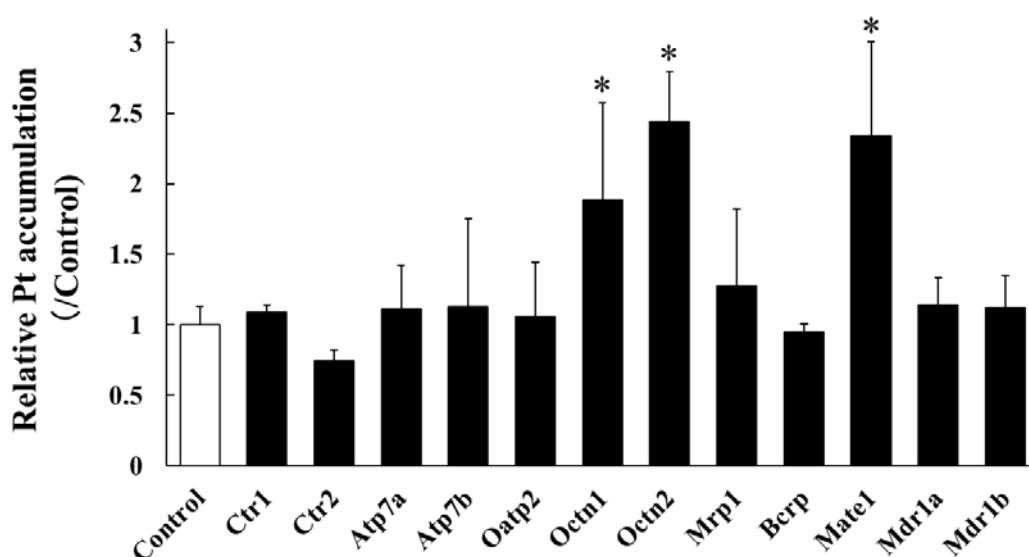


Fig. 2 Platinum accumulation in HEK293 cells which overexpress drug transporters.

Transporters transiently transfected HEK293 cells were incubated with oxaliplatin (100 μ M) for 2 h. Platinum accumulation was measured using ICP-MS. Results are expressed as a relative value of the control ($n = 4$). * $P < 0.05$ compared with control.

4. トランスポーター安定発現細胞の構築

前項の一過性発現細胞により、オキサリプラチン輸送に関与することが示唆されたトランスポーターについて、Flp-In システムを用いて安定発現細胞を作製し、以降の検討に供することとした。安定発現させたトランスポーターの発現はウェスタンブロット法により確認した (Fig. 3)。

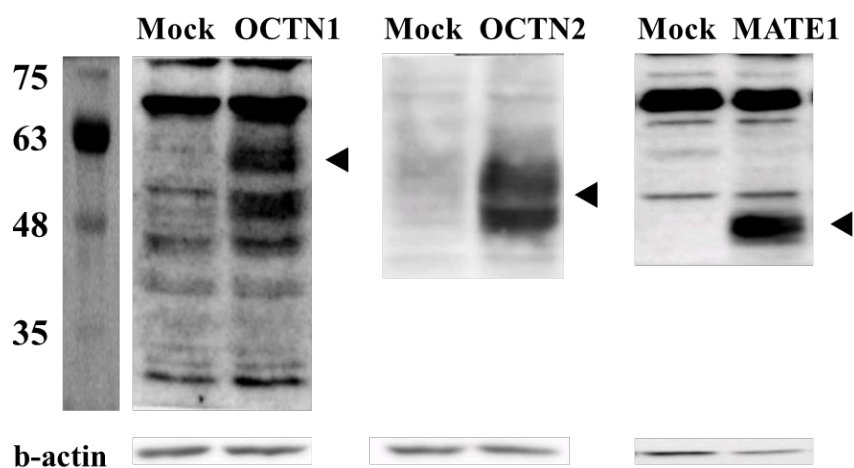


Fig. 3 Western blot analysis of various transporters in stably expressing Flp-In-293.

Stable expression cells were generated by Flp-In system. The expression levels of transporters (OCTN1/2 and MATE1) were assessed by western blot assay. Densitometric analysis was shown for transporter / b-actin of the blot.

5. トランスポーター安定発現細胞を用いた濃度依存的細胞内 Pt 蓄積

トランスポーターによるオキサリプラチン輸送能をより正確に評価するため、トランスポーターの安定発現細胞を用いて、オキサリプラチン曝露後の細胞内 Pt 蓄積量を測定した。オキサリプラチン濃度依存的な条件 (50, 100, 200, 500, 1000 μ M, 1 h) での細胞内 Pt 蓄積量を測定した結果、各濃度のオキサリプラチン曝露によって Octn1、Octn2、Mate1 トランスポーターの安定発現細胞では Mock 導入細胞と比較して約 3-5 倍の細胞内 Pt 蓄積量がみられた。また、トランスポーターを介した細胞内 Pt 蓄積は濃度依存的であった (Fig. 4)。

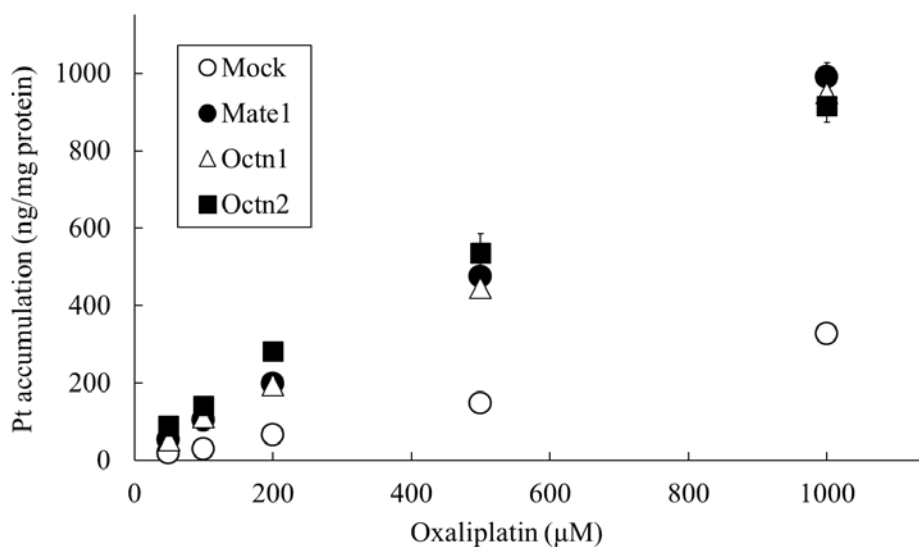


Fig. 4 Oxaliplatin concentration-dependent platinum accumulation in Flp-In-293 cells which overexpress candidate transporters.

Transporter stably expressing cells were incubated with oxaliplatin (50, 100, 200, 500 and 1000 μ M) for 1 h. Pt accumulation was measured by ICP-MS and corrected by protein concentration. Data represent the means $\pm$ S.D. ($n = 6$).

6. トランスポーター安定発現細胞を用いた濃度依存的細胞内 Pt 活性化体蓄積

オキサリプラチンは生体内でオキサレート基と Pt 活性体である Pt(dach)Cl₂ に分解される。トランスポーターによる Pt 活性体の輸送能を評価するため各安定発現細胞に Pt 活性体を曝露し、濃度依存的な条件での細胞内 Pt 蓄積量の測定を行った。その結果、トランスポーターの発現によって Pt 蓄積量の増加がみられたことから各トランスポーターが Pt 活性体を基質とすることが示された (Fig. 5)。

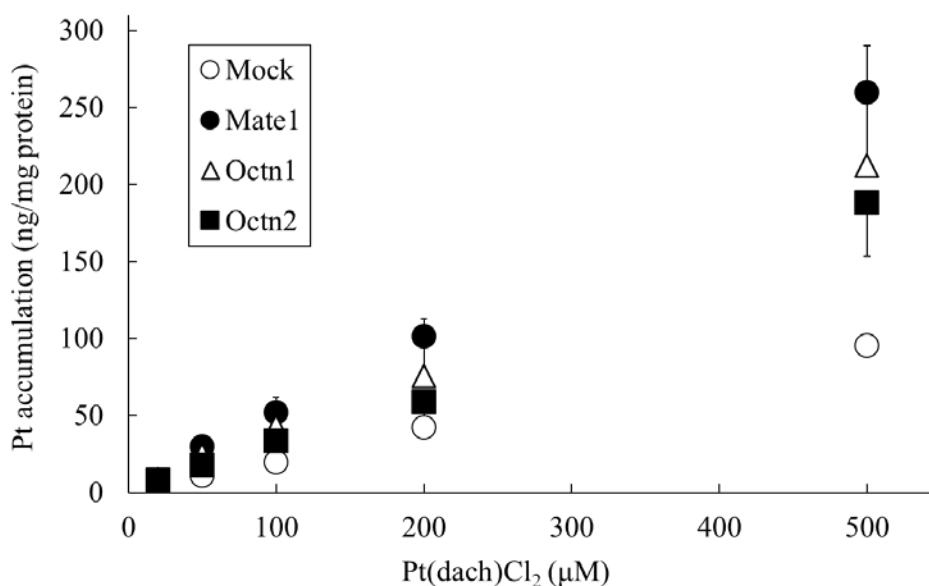


Fig. 5 Pt(dach)Cl₂ concentration-dependent platinum accumulation in Flp-In-293 cells which overexpress candidate transporters.

Transporter stably expressing cells were incubated with Pt(dach)Cl₂ (50, 100, 200 and 500 μM) for 1 h. Pt accumulation was measured by ICP-MS and corrected by protein concentration. Data represent the means $\pm$ S.D. ($n = 6$).

7. トランスポーター発現による細胞毒性への影響評価

各安定発現細胞に 0.1-100 μM のオキサリプラチンを曝露し、細胞毒性に与える影響について検討を行った。最終濃度 1 μM のオキサリプラチン曝露によって、control 細胞と比較して細胞生存率が有意に低下したことから、細胞に発現するトランスポーターがオキサリプラチンによる細胞毒性に影響を与えることが示唆された (Fig. 6)。

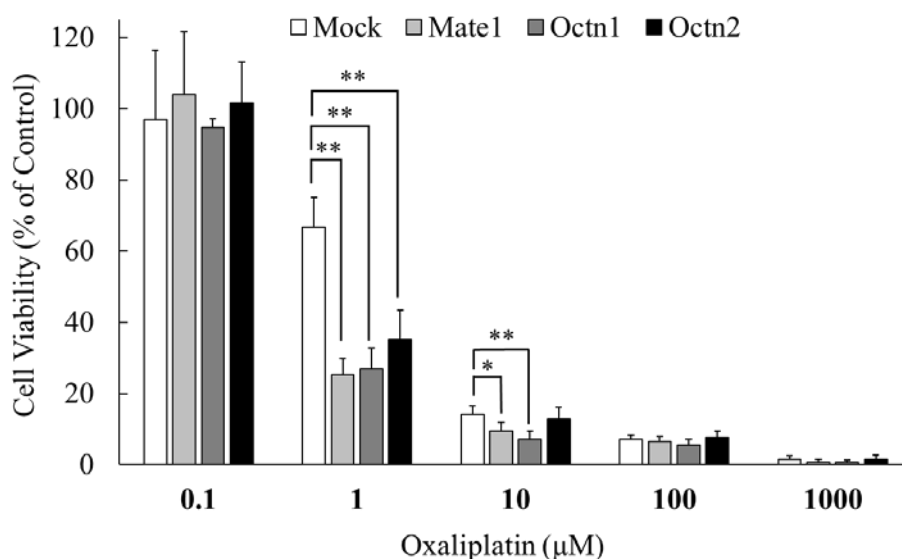


Fig. 6 Oxaliplatin-induced cytotoxicity in Flp-In-293 cells which overexpress candidate transporters.

Transporters overexpressing Flp-In-293 cells were incubated with oxaliplatin (0.1, 1, 10, 100 and 1000 μM). Cell viability was measured using the CCK-8 assay. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. ($n = 5$ or 6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with mock.

8. トランスポーター発現による神経毒性への影響評価

神経のモデルとされるラット副腎髄質由来細胞 (PC12) に各トランスポーターを発現させ、オキサリプラチン曝露後の神経様突起の長さを control 細胞と比較した (Fig. 7)。各トランスポーターの遺伝子導入は Real-time PCR 法にて mRNA 発現が増加していることにより確認した。Mate1 発現細胞では最終濃度 1 μ M から、Octn1、Octn2 発現細胞では 3 μ M から有意な神経様突起の短縮がみられた。上記の結果からトランスポーターの発現がオキサリプラチンによる神経毒性に影響を与えることが明らかとなった。

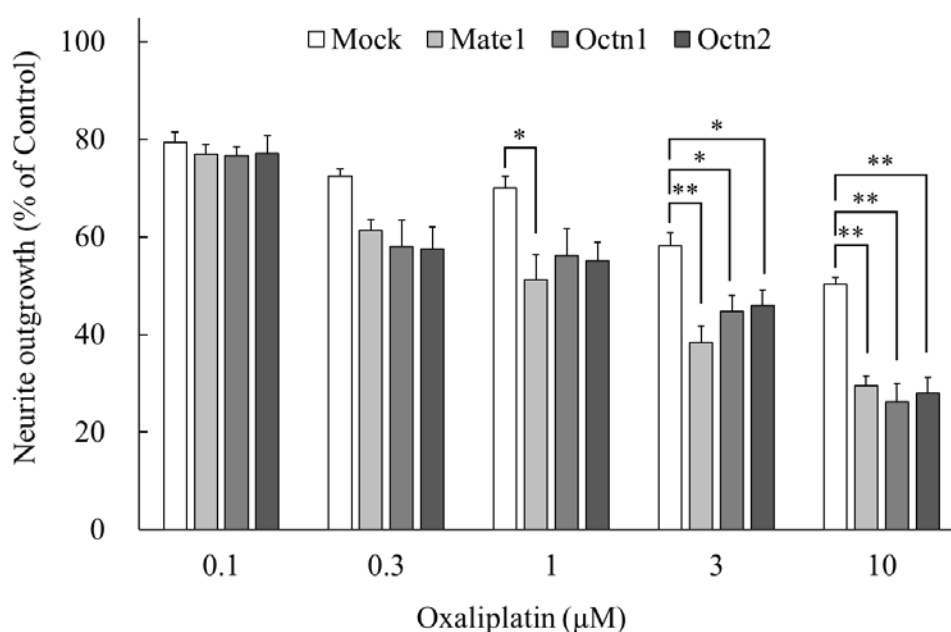


Fig. 7 Oxaliplatin-induced neurotoxicity in Flp-In-293 cells which overexpress candidate transporters.

PC12 cells were incubated with oxaliplatin (0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μ M) after NGF (100 ng/mL) treatment for 72 h. Neurite length was measured using image analysis software (Image J). Results are expressed as mean $\pm$ S.D. ($n = 6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with mock.

9. ラット DRG におけるトランスポーターの *in vivo* ノックダウン

In vitro の検討から Octn1、Octn2、Mate1 の 3 種のトランスポーターがオキサリプラチン輸送、細胞毒性、神経毒性に寄与している可能性が示された。上記のトランスポーターがオキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルラットに与える影響を評価するため、ラット DRG における *in vivo* ノックダウンを行った。下肢の神経とつながる L4-L6 の DRG を対象として AteloGene Local Use Quick Gelation を用いて髄腔内に siRNA を投与し、投与 3 日及び 7 日目の DRG におけるトランスポーターのタンパク発現量を western blot 法にて確認した。その結果、siRNA 投与 7 日目には各トランスポーターで約 4 割-6 割の発現低下が確認された (Fig. 8)。

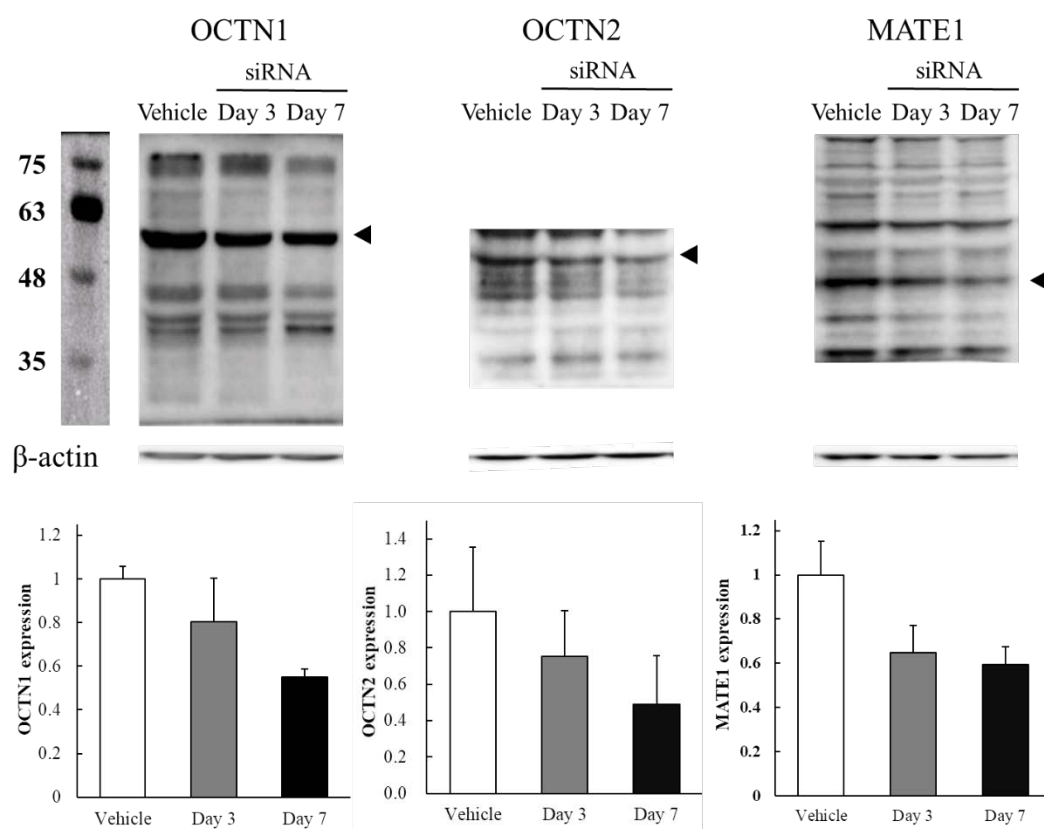


Fig. 8 Effects of siRNA administration intrathecally on transporter expressions in DRG.

Each siRNA was administrated with AteloGene Local Use “Quick Gelation” intrathecally. 3 or 7 days after siRNA administration, DRG were collected and the expression levels of transporters (OCTN1/2 and MATE1) were assessed by western blot assay. Densitometric analysis was shown for transporter / β -actin of the blot.

10. 末梢神経障害に対する Octn1 ノックダウンの影響評価

siRNA 投与開始 7 日目よりオキサリプラチンの投与 (4 mg/kg、twice a week) を開始し、von Frey test によって末梢神経障害の発現状況を確認した。オキサリプラチン投与によって Day 14 より反応閾値の低下がみられ、末梢神経障害が発現した一方で、Octn1 ノックダウン群では Day 28 まで反応閾値の低下はみられなかったことから、末梢神経障害の発現が遅延することが明らかとなった (Fig. 9A)。さらに DRG における Pt 蓄積量を測定したところ、Octn1 ノックダウンによって Pt 蓄積量が低下した (Fig. 9B) ことから Octn1 がオキサリプラチンの細胞内取込に寄与していることが明らかになった。

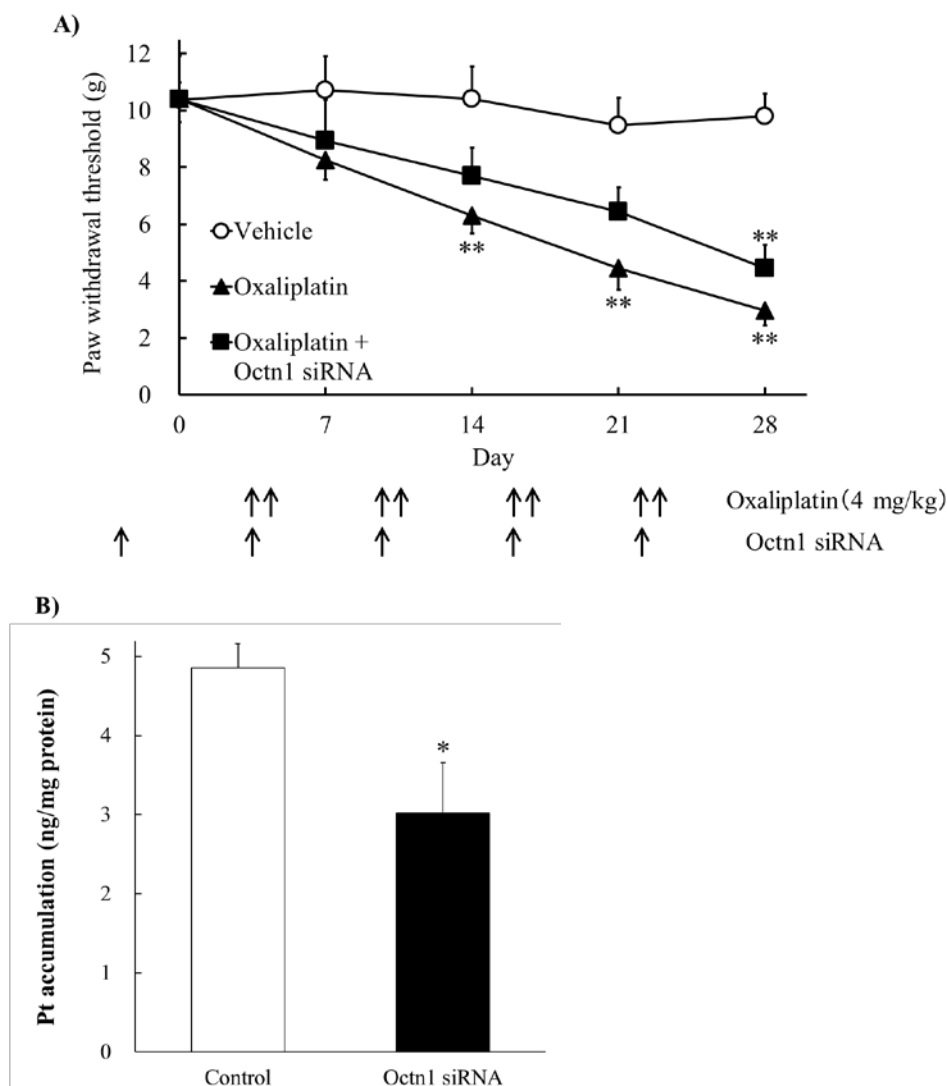


Fig. 9 Effects of Octn1 knockdown on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and platinum accumulation in DRG.

Oxaliplatin (4mg/kg) was administered i.v. twice per week for 4 weeks (day 0, 1, 7, 8, 14, 15, 21 and 22). Octn1 siRNA was administered intrathecally once per week for 5 weeks (day -7, 0, 7, 14 and 21). (A) The von Frey test was performed before the drug administration on days 0 and day 7, 14, 21 and 28. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). (B) On days 28, the DRG was harvested, and platinum accumulation was measured by ICP-MS. Value are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). * $P < 0.05$ compared with vehicle.

11. 末梢神経障害に対する Octn2 ノックダウンの影響評価

Octn1 と同様のスケジュールで siRNA による Octn2 のノックダウンを行い、末梢神経障害の発現状況を確認した。Octn2 ノックダウン群ではオキサリプラチン投与開始 14 日目より反応閾値の低下がみられ、オキサリプラチン単独投与群と差がみられなかった (Fig. 10A)。DRG 組織内 Pt 濃度を測定したところ、オキサリプラチン単独投与群と同程度の蓄積がみられたことから (Fig. 10B)、DRG 組織におけるオキサリプラチンの輸送に、Octn2 はあまり寄与していないと考えられる。

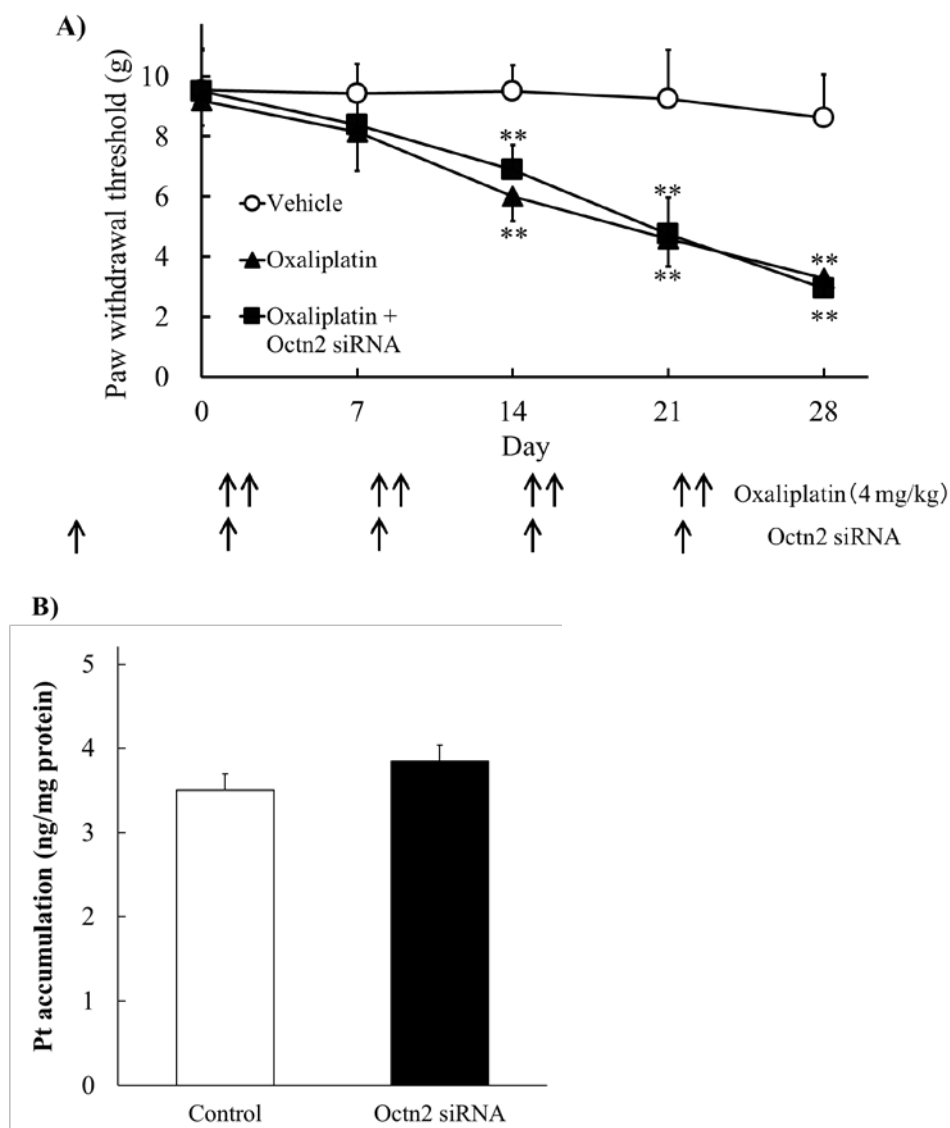


Fig. 10 Effects of Octn2 knockdown on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and platinum accumulation in DRG.

Oxaliplatin (4mg/kg) was administered i.v. twice per week for 4 weeks (day 0, 1, 7, 8, 14, 15, 21 and 22). Octn2 siRNA was administered intrathecally once per week for 5 weeks (day -7, 0, 7, 14 and 21). (A) The von Frey test was performed before the drug administration on days 0 and day 7, 14, 21 and 28. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). (B) On days 28, the DRG was harvested, and platinum accumulation was measured by ICP-MS. Value are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$).

12. 末梢神経障害に対する *Mate1* ノックダウンの影響評価

末梢神経障害モデルに対して、*Mate1* ノックダウンの影響を評価したところ、オキサリプラチン投与開始 21 日目において control siRNA と投与群と比較して有意な反応閾値の低下がみられた (Fig. 11A)。また、ノックダウンによって Day 17 の時点で DRG 組織内の Pt 蓄積量が上昇していた (Fig. 11B) ことから、*Mate1* がオキサリプラチンの排出に寄与していることが明らかとなった。

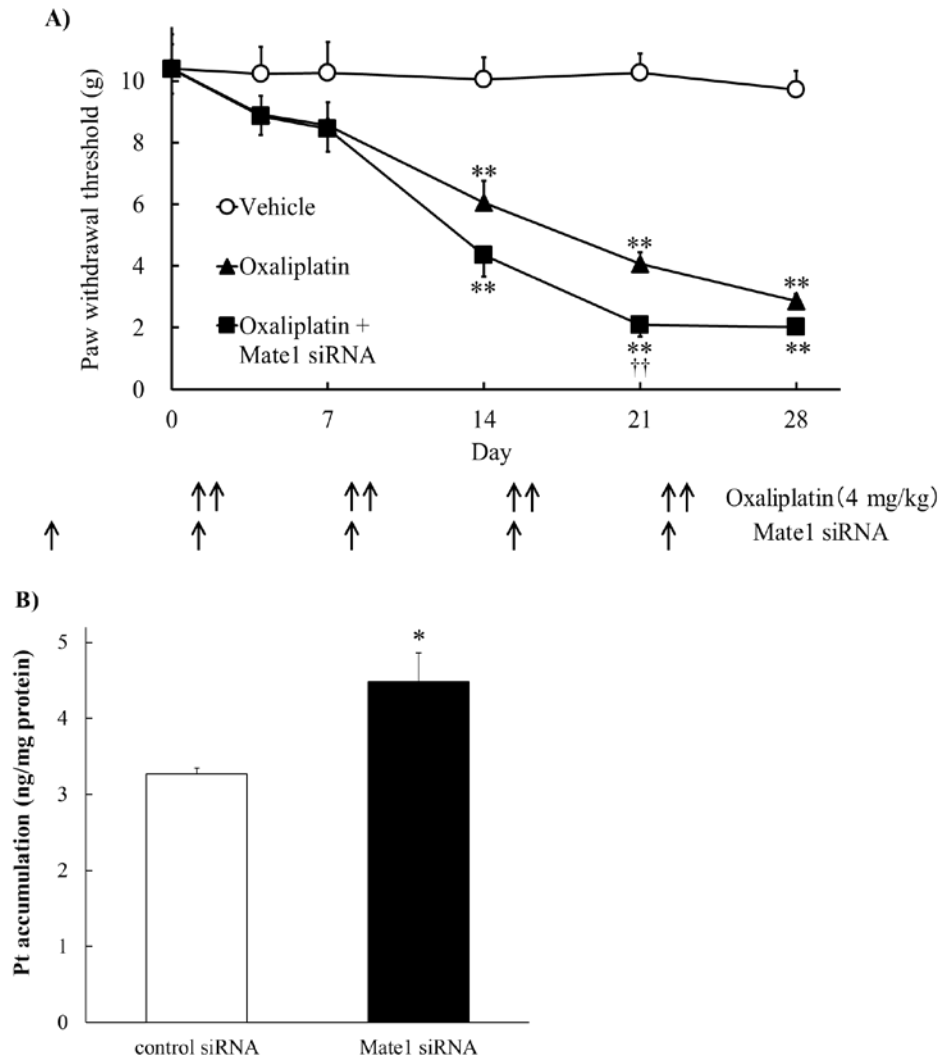


Fig. 11 Effects of Mate1 knockdown on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and platinum accumulation in DRG.

Oxaliplatin (4mg/kg) was administered i.v. twice per week for 4 weeks (day 0, 1, 7, 8, 14, 15, 21 and 22). Mate1 siRNA was administered intrathecally once per week for 5 weeks (day -7, 0, 7, 14 and 21). (A) The von Frey test was performed before the drug administration on days 0 and day 7, 14, 21 and 28. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). (B) On days 17, the DRG was harvested, and platinum accumulation was measured by ICP-MS. Value are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle.

考察

オキサリプラチンはトランスポーターを介して輸送されることが報告されてきたが、その報告は腫瘍細胞における薬剤耐性や代謝に寄与する腎臓や肝臓での検討が多く⁶⁰⁻⁶²、神経障害とトランスポーターの関連についてはほとんど研究されていない。本研究では、DRG 組織に発現するトランスポーターをスクリーニングし、DRG においてオキサリプラチン輸送と末梢神経障害に寄与するトランスポーターを *in vitro* 及び *in vivo* で明らかにした。

まず、過去の報告よりオキサリプラチンをはじめとするプラチナ製剤（オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン）を輸送する報告のある 21 のトランスポーターを解析対象とした。これらのトランスポーターのうち、オキサリプラチンの蓄積が神経障害の起点となるとされる DRG 組織に発現するものを明らかにした。Real-time PCR の結果、十分発現している（Ct value < 30）と考えられた 12 種のトランスポーターを対象に一過性発現細胞を作製し、オキサリプラチン曝露後の細胞内 Pt 蓄積量を測定することでスクリーニングを行った。その結果、Octn1/2 及び Mate1 がオキサリプラチンを基質として輸送することが示唆された。今回の結果からは、他の 9 種のトランスポーターの一過性過剰発現がオキサリプラチン曝露後の細胞内 Pt 蓄積量に与える影響は確認できなかった。過去の報告からは銅輸送トランスポーターである Ctr1 や Atp7A、Atp7B もオキサリプラチンの輸送とその抗腫瘍効果に寄与することが示唆されている。しかしながら、銅や白金製剤の曝露数分後から Ctr1 が脱感作すること⁶³や、Ctr1 の阻害剤であるヒスチジン銅が DRG における Pt 蓄積に影響しないこと⁶⁴、腫瘍組織における銅輸送トランスポーターの発現が FOLFOX による治療効果に影響を及ぼさないこと⁶⁵も報告されている。ABC トランスポーターに関しても、プラチナ製剤の体内動態や耐性に寄与することを示唆する報告がある⁶⁶⁻⁶⁸一方で、その遺伝子多型が治療効果に影響しないこと⁶⁹も報告されている。上記のようにオキサリプラチンの蓄積や毒性に対する各トランスポーターの寄与に関しては未だ統

一した見解は得られておらず、本検討から Octn1/2 及び Mate1 が比較的大きな影響を持つことが示唆されたことから、その後の検討を 3 種のトランスポーターに絞って行うこととした。

今回オキサリプラチンの輸送に寄与することが示された 3 種のトランスポーターを対象に安定発現細胞を作製し、オキサリプラチン輸送と細胞毒性、神経毒性への寄与について検討を行った。各トランスポーターの発現によって濃度依存的な細胞内 Pt 蓄積量の顕著な増加がみられた。オキサリプラチンは生体内の Cl⁻ 存在下で非酵素的な過程を経てシュウ酸基と活性体である Pt(dach)Cl₂ に分解されることが知られている。今回、Pt(dach)Cl₂ の細胞内取り込みについても検討を行ったところ、各トランスポーターの安定発現によってその取込量が増加することが明らかとなった。しかしながら、その細胞内蓄積量はオキサリプラチンよりも低値を示しており、各トランスポーターを介した細胞内輸送への寄与はオキサリプラチンと比較すると小さいと考えられる。オキサリプラチンの分解に関する報告は非常に限られており、未だ不明な点が多い。その理由として、HPLC の測定条件下においても分解が起こることや、オキサリプラチンと中間体を分離できないといった問題が挙げられる。そのため、オキサリプラチンの分解に関して生体内の環境で詳細に検討した報告はなされていない。しかしながら *in vitro* においては抗酸化作用を持つトリペプチドであるグルタチオンがオキサリプラチンの分解を促進することも報告されており、Cl⁻ に限らず種々の生体内物質の寄与が予想される⁷⁰。オキサリプラチンの分解は *medium* 内では一次消失過程に従うことが知られている一方で、生体内でのオキサリプラチン分解速度に関して詳細に検討された報告はなく、オキサリプラチン投与後の DRG への移行にどちらの形態が大きく寄与しているか明らかにするためには、今後更なる検討が必要である。

トランスポーターがオキサリプラチンの細胞毒性及び神経毒性に及ぼす影響を、CCK-8 assay による細胞生存率測定と神経様突起長測定によって評価した。細胞毒性評価の結果、トランスポーターの安定発現によって 1 μ M 及び 10 μ M のオキサリプラチン曝露条件にお

いて、Mock 導入細胞と比較して有意な細胞生存率の低下がみられ、細胞毒性の増強がみられた。さらに神経毒性の評価では、Mate1 発現細胞では 1 μ M から、Octn1/2 発現細胞では 3 μ M から神経様突起の短縮がみられ、神経毒性の増強も確認された。以上の検討より、トランスポーターの発現が細胞内の Pt 蓄積量をさせることで、オキサリプラチンによる細胞毒性と神経毒性に影響を与えることが示唆された。オキサリプラチン投与後の最大血中濃度は 10 μ M 以下とされ、本結果で得られた 1 μ M のオキサリプラチン曝露による細胞毒性の増大は臨床的な用量を反映した結果であるといえる。神経毒性に関しても低濃度で影響がみられており、今回着目したトランスポーターの影響が生体内でもあらわれ、神経障害に寄与する可能性が示された。

in vitro で行った検討から、Octn1/2 及び Mate1 のオキサリプラチンの輸送と神経毒性への寄与が明らかとなった。そこで、オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルラットの DRG において各トランスポーターの *in vivo* ノックダウンを行い、神経障害の発現、重症度に与える影響を評価した。下肢の神経とつながる L4-L6 の DRG を対象に siRNA を髄腔内投与したところ、投与 7 日後には各トランスポーターの 4-6 割の発現低下がみられた。本実験で用いた AteloGene Local Use “Quick Gelation” は生体内で siRNA と複合体を形成し、ゲル化することによって長期にわたる局所的な siRNA の投与を可能とする。siRNA 投与 7 日目にも十分なノックダウンが確認できたため、その後の検討では週に 1 回の siRNA 投与を行った。

末梢神経障害の発現を評価した結果、Octn1 ノックダウンラットでは反応閾値の低下が抑制される結果となった。DRG 組織における Pt 蓄積量を測定したところ、蓄積量が低下したことから Octn1 がオキサリプラチンの細胞内取り込みに大きく寄与することが示唆された。しかしながら、Octn1 と同じく有機カチオントランスポーターとして働く Octn2 ではノックダウンによる神経障害への影響はみられなかった。DRG 内 Pt 蓄積量にも変化はなく、オキサリプラチン輸送に対する Octn2 の寄与は今回確認できなかった。Octn1 は pH

依存的な cation/proton または cation/cation anti-port さらには Na⁺依存的なカルニチン及びエルゴチオネインの輸送を担う多機能性トランスポーターである⁷¹⁻⁷³。DRG 細胞内外のプロトン及びカチオン勾配に関して詳細を明らかにした報告はなされていないが、髄液の pH は 7.4-7.6 程度とされ、一般的な細胞内 pH (6.8-7.4) と比較して塩基性に偏っている。そのため、本検討でみられたオキサリプラチンの輸送は生体内のプロトンおよびカチオン濃度に依存した輸送によって行われたと思われる。一方で Octn2 は生体内でカルニチンを Na⁺と共輸送し、それと連動してカチオン性物質を輸送する⁷⁴。Octn2 の活性を組織内へのカルニチン取り込みによって評価した報告では、脳におけるカルニチン濃度が肺や心臓、腎臓、肝臓といった他臓器と比較して 1/20 - 1/30 程度であること⁷⁵が示唆されており、神経系における Octn2 の活性が比較的小さいことが予想される。初代培養 DRG 細胞を用いた Octn1/2 の阻害実験においても、Octn1 の寄与のみを認め⁵⁵、本研究と同様の結果が得られている。

一方で、Mate1 をノックダウンしたラットではオキサリプラチン投与開始 21 日目において末梢神経障害の悪化がみられた。DRG 組織内 Pt 蓄積量は増加しており、Mate1 がオキサリプラチンの排出に寄与していることが明らかとなった。Mate1 は腎尿細管や肝臓の微小胆管に発現し、薬物の排出過程で重要な役割を担うトランスポーターである。腎臓においてオキサリプラチンやシスプラチンを基質とし、腎障害の発現に寄与することが報告されている⁷⁷。今回、安定発現細胞を用いた検討では取り込み方向に働いていた一方で生体内では逆方向への輸送が示唆された。Mate1 は細胞内外のプロトン勾配に従って基質を輸送するアンチポーターとしての働きと、基質の濃度勾配に依存して基質を輸送するトランスポーターとしての働きを持つ⁷⁸。*in vitro*における検討では培地内に高濃度のオキサリプラチンが含有されており、Mate1 がオキサリプラチンを取り込む環境が維持されたため細胞内 Pt 蓄積量の増加がみられたと考えられる。ラット体内ではオキサリプラチンは投与後速やかに血中濃度が低下する⁷⁹。そのため、投与後には細胞内に蓄積したオキサリプラチン濃度

が細胞外よりも高い状態が保たれ、排出方向に働いたと予想される。

以上の結果より、DRGにおいては Octn1 がオキサリプラチンを取り込む方向に、Mate1 が排出方向に働くことが示唆された (Fig. 12)。DRG におけるオキサリプラチンの蓄積を抑制するには Octn1 の阻害または Mate1 の活性化が有効であると考えられる。Octn1 に対して阻害作用を持つ薬物としてキニジンやベラパミル、プロカインアミド等が挙げられるが、阻害剤自体が生体に及ぼす影響や Octn1 への特異性から、Octn1 阻害剤としての臨床使用には十分な検討が求められる。また、Mate1 の発現を増加させる物質に関しては試薬に限られており⁸⁰、臨床的に使用される薬剤としては報告がなされていないため、Mate1 に影響を与える薬剤の探索が求められる。しかしながら、本検討では 4-6 割のノックダウンによって末梢神経障害による反応閾値が有意に変化しており、トランスポーターの影響の大きさが示唆された。そのため、トランスポーターをターゲットとしたオキサリプラチン誘発末梢神経障害の予防法探索は非常に有用である可能性がある。

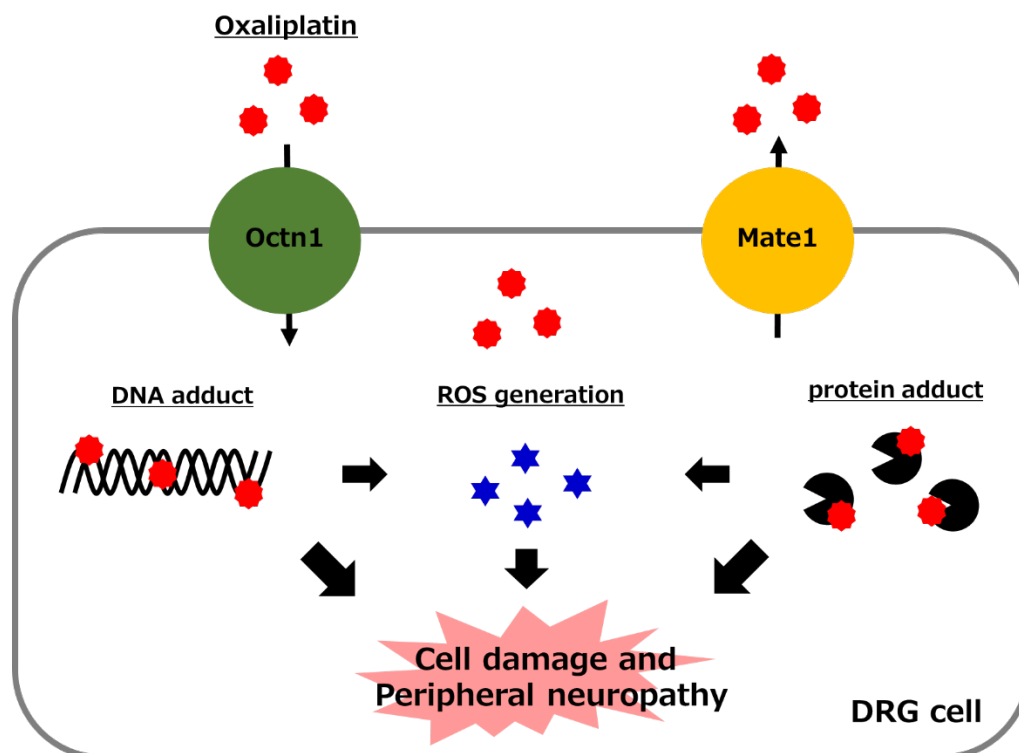


Fig. 12 トランスポーターによるオキサリプラチン輸送と末梢神経障害

小括

第2章では、DRGにおけるオキサリプラチン蓄積に伴う末梢神経障害に関与するトランスポーターを明らかにすることを目的に研究を行った。*in vitro*系の検討から、DRGには多くの薬物トランスポーターが発現しており、その内 Octn1/2 及び Mate1 がオキサリプラチン輸送活性を持つことを示した。安定発現細胞を用いた検討からは、トランスポーター発現による Pt 蓄積量の増加がオキサリプラチンによる細胞毒性、神経毒性を増大することが確認された。*in vivo*系では DRG に発現するトランスポーターをノックダウンすることで各トランスポーターがオキサリプラチン輸送と末梢神経障害に与える影響について検討を行った。その結果、Octn2 が末梢神経障害に影響を与えなかった一方で、Octn1 がオキサリプラチンの取り込みに、Mate1 が排出に寄与し、神経障害の発現や重症度に関与していることを確認した。

本研究から、DRGにおけるオキサリプラチン輸送に Octn1 及び Mate1 が大きく寄与することが明らかとなり、オキサリプラチン誘発末梢神経障害の新たな治療ターゲットとして有用である可能性が示唆された。

総括

がん治療において薬物療法は非常に重要な役割を担うが、ときに副作用による治療の中止、患者の QOL 低下が引き起こされる。白金系抗悪性腫瘍薬であるオキサリプラチンは消化器系のがんに幅広く適応を持つ一方で、末梢神経障害を高頻度で発現することが問題となっている。しかしながら、その発現機序は未だ明らかになっておらず、有効な予防法、治療法の確立には至っていない。そこで本研究ではオキサリプラチンの治療薬探索と末梢神経障害発現メカニズムとしてトランスポーターに着目して実験を行った。

まず第 1 章では、糖尿病治療薬として使用される GLP-1 アナログ製剤であるエキセナチドがオキサリプラチン誘発末梢神経障害に与える影響を評価した。その結果、エキセナチドは末梢神経障害の発現は抑制しないが、オキサリプラチン投与終了後の回復を促進することが明らかとなった。また、そのメカニズムとして坐骨神経の変性を改善することが寄与していると考えられる。さらにエキセナチドがオキサリプラチンの抗腫瘍効果に影響を及ぼさないことを示した。

第 2 章では、DRG においてオキサリプラチン誘発末梢神経障害に寄与するトランスポーターを明らかにした。*in vitro* における検討では Octn1/2 及び Mate1 がオキサリプラチンを基質とすることが示された。一方、*in vivo* では、Octn1 と Mate1 にのみトランスポーターの寄与がみられ、Octn1 は取り込みに、Mate1 は排出に寄与していることを明らかにした。

以上、本研究からオキサリプラチン誘発末梢神経障害の新たな治療薬としてエキセナチドが有用である可能性が示唆された。また、末梢神経障害の発現メカニズムとしてトランスポーターの寄与と重要性に関する知見を得ることが出来た。今後これらの知見が、末梢神経障害の有効な予防法・治療法の確立につながることを期待する。

実験の部

第 1 章

1-1. オキサリプラチンによる細胞毒性及び神経様突起短縮に対するエキセナチドの効果

エキセナチドがオキサリプラチンによる細胞毒性及び神経様突起短縮に対して与える影響を評価するため、神経のモデルとして使用される PC12 細胞を用いて検討を行った。

1-1-1. 細胞培養

PC12 細胞は独立行政法人理化学研究所より購入した。培養は 75 cm² 培養フラスコにて 37°C 5% CO₂ 湿気条件で行った。

1-1-2. 細胞生存率測定

細胞生存率は CCK-8 法により定量した。CCK-8 法はミトコンドリアの酵素活性を指標として生細胞数を検出する方法である。その原理は、ミトコンドリア内の脱水素酵素によって WST-8[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2Htetrazolin, monosodium salt] が還元されることで生成する水溶性ホルマザン色素量が生細胞数に比例関係にあることに基づく。細胞は 24 well plate に 6.0×10^4 cells を播種し、37°C 5% CO₂ 条件下にて 24 時間培養後に実験に用いた。薬物処置後、24 時間培養した後の細胞に新たに 210 μ L の無血清培地と 10 μ L の CCK-8 assay 試薬を加え、1 時間反応させた。反応後の上清 100 μ M を 96 well plate に移し、生成したホルマザン色素量をマイクロプレートリーダー (Rainbow Sunrise; Tecan Austria GmbH) を用いて測定した (測定波長 450 nm 参照波長 620 nm)。

1-1-3. 神経様突起の測定

PC12 細胞に NGF を添加した培地で 72 時間培養し、神経様突起を伸展させた。エキセナチドはオキサリプラチンと同時に処置し、曝露して 24 時間後の細胞を測定に用いた。細胞全体を Calcein-AM で、核を Hoechst-33342 で染色し High Content Screening System を用いて神経様突起の撮影、解析を行った。

1-2. オキサリプラチン誘発末梢神経障害の発現及び軸索変性に対するエキセナチド投与の効果

PC12 を使用した検討より、エキセナチドがオキサリプラチンによる神経毒性を抑制する可能性が示唆されたため、オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルラットを使用してエキセナチドの効果を検討することとした。反応閾値の低下を von Frey test、神経組織の変性をトルイジンブルー染色後の断面積測定によって評価を行った。

1-2-1. 動物

体重 200-250 g の雄性 Sprague-Dawley 系ラットを使用した。ラットは恒温・恒湿および明暗 12 時間周期（明期 7:00-19:00）の条件下で飼育し、固形飼料および水は自由に摂取できるようにした。なお、動物は九州大学動物実験規則に準拠し実施した。

1-2-2. 薬物投与

オキサリプラチン（4 mg/kg）を週に 2 回、4 週にわたって腹腔内投与し、週に 1 回の von Frey test によって神経障害の発現を確認した。エキセナチド（100 µg/kg）は徐放性製剤を週に 1 回皮下投与を行った。

1-2-3. von Frey test

オキサリプラチン誘発末梢神経障害の評価として von Frey test を行った。試験 30 分前より金網の上に置き馴化させた。その後、金網の下よりラット後足底を 1.0-15 g の von Frey フィラメントを用いて反応閾値の測定を行った。各フィラメント強度において左右 6 回ずつ、1 回につき 6 秒間刺激し、ラットが逃避反応を起こすフィラメント強度を逃避反応閾値として記録した。

1-2-4. 坐骨神経の変性評価

オキサリプラチン投与によって末梢神経障害が発現したラットより坐骨神経を採取し、2%グルタルアルデヒド溶液によって固定した。8%スクロース溶液による置換を行った後、それぞれのサンプルを 5 mm の長さに揃えパラフィンに包埋した。パラフィンプロックから 3 μ m 厚のスライスを作製し、0.05%のトルイジンブルー溶液で染色した。各サンプルは光学顕微鏡 (BX51; Olympus Corp.) を用いて撮影し、画像解析ソフト (Image J 1.36) によって軸索面積の測定を行った。

1-3. オキサリプラチン誘発末梢神経障害回復期におけるエキセナチドの影響

オキサリプラチン誘発末梢神経障害の発現に対するエキセナチドの効果を検討したところ、改善作用はみられなかった。続いて回復期にあたるオキサリプラチン投与終了後にエキセナチド投与が末梢神経障害に影響を与えるかを検討した。

1-3-1. 薬物投与

前実験で使用したラットに対して引き続き、週 1 度のエキセナチド投与のみを継続した。オキサリプラチン投与群で末梢神経障害の発現が完全に回復した 63 日目まで投与を行い、末梢神経障害の評価を行った。

1-3-2. 末梢神経障害の評価

末梢神経障害の評価として von Frey test を 2-3. と同様の方法で行った。また、坐骨神経の形態学的評価はオキサリプラチン群とエキセナチド併用群で有意差がみられた 42 日目と全群で神経障害の回復がみられた 63 日目にサンプルを回収して行った。トルイジンブルー染色は 1-2-4. と同様の方法で行った。

1-4. エキセナチド併用がオキサリプラチンによる抗腫瘍効果に与える影響

エキセナチドがオキサリプラチン誘発末梢神経障害の回復を促進することが明らかになったため、続いてエキセナチドがオキサリプラチンによる抗腫瘍効果に与える影響について検討を行うこととした。ラット直腸由来細胞 (C-26) を用いた細胞生存率測定と担がんマウスの腫瘍サイズの測地によって評価を行った。

1-4-1. 細胞培養

C-26 は理化学研究所より購入した。2 mM L-グルタミン、100 Unit/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、10% ウシ胎児血清 (FBS: Cell Culture Technology, Hannover, Germany) を含有する RPMI1640 培地中で、37°C 5% CO₂ 条件下で培養した。

1-4-2. 細胞生存率の測定

C-26 細胞にオキサリプラチン (70 μ M) およびエキセナチド (0, 3, 10, 30 nM) を同時曝露し、24 時間後の細胞生存率を測定した。細胞生存率の測定には CCK-8 法を使用し、1-2. と同様の手順で行った。

1-4-3. 担がんマウスの作製

培養した 1.0×10^6 個の C-26 細胞を 50 μ L の PBS に懸濁し、マウス右足裏皮下に投与した。6 日後よりオキサリプラチン (6 mg/kg 1, 2, 7, 8 日目) の腹腔内投与とエキセナチド (150 μ g/kg 1, 8 日目) の皮下投与を開始した。腫瘍径は 0、4、7、11 日目に測定し、測定した腫瘍径より以下の式で腫瘍の大きさを算出した。

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = \pi/6 \times \text{Thickness (mm)} \times \text{Length (mm)} \times \text{Width (mm)}$$

1-5. 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。二群間の比較は Student's *t*-test により検定を行った。多群間の比較は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後、各群間の検定を Tukey-Kramer test により行った。検定には StatView (Abacus Concepts) を用い、有意水準は 5% とした。

第 2 章

2-1. ラット DRG に発現するトランスポーターの探索

採取したラット DRG を試料として Real-time PCR によってトランスポーターの発現確認を行った。測定対象は Pt 製剤の輸送に関して報告のある 21 種類のトランスポーターとした。

2-1-1. 試料調製

2-1-1-1. total RNA 抽出

ラットから DRG を採取後、RNeasy® Plus Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。ホモジナイザー (30 Hz) で 3 min 細胞をホモジナイズ、遠心分離 (室温、max、3 min) し、上清を cDNA 合成に用いた。以降の操作は Kit のプロトコルに従った。total RNA の定量は、Nano Drop を用いて行い、A260/A280 の値により品質を確認した。

2-1-1-2. 逆転写反応

以下の反応組成式及び反応条件に従い、cDNA を合成した。コントロールとして逆転写酵素を水に置換した試料を用いた。

<組成>

5×cDNA Synthesis Buffer	4.0 µL
5mM dNTP	2.0 µL
Random Hexamer	1.0 µL
RT enhancer	1.0 µL
Verso Enzyme Mix	1.0 µL
total RNA	x µL ※
RNase free water	(11-x) µL
Total	20.0 µL

※ x は template RNA が 1 µg 以下になるように調整した

<Thermal cyclor 条件>

cDNA Synthesis	42°C	60 min
95°C 2min	95°C	2 min

2-1-2. Real-time PCR

21 種類のトランスポーターを特異的に増幅する primer を用いて測定を行い、Real-time PCR 法で定量可能なトランスポーターを探索した。内標準物質として gapdh を測定し、コントロールとして水、1-1-2. で逆転写酵素を水に置き換えた試料 (RT(-)試料) を設置した。

<組成>

SYBR Premix EX Taq™ (2×)	5.0 μL
10 μM primer (forward+reverse)	0.2 μL
ROX Reference Dye (50×)	0.2 μL
Template (cDNA 溶液)	1.0 μL
Nuclease free water	3.6 μL
Total	10.0 μL

<Thermal cycler 条件>

Hot-start activation	95℃	30 sec	
Denaturation	95℃	5 sec	} 40 cycles
Annealing/Extention	60℃	30 sec	
Dissociation	95℃	15 sec	
Melting	60℃	1 min から 0.3℃ずつ上昇させて	
		95℃15 sec で終了	

< primer >

Table 2. Primer sequences used for Real-time PCR analysis

	accession no.	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (3'–5')
Oct1	X78855	TGGCCGTAAGCTCTGTCTCT	TCAAGGTATAGCCGGACACC
Oct2	X98334	ATCACGCCTTTCTCGTCTA	CTGCATATTCTCGGCATCCT
Oct3	NM_019230	CAATGGGAAACACCTCTCGT	ATACACCACGGCACTTGTGA
Octn1	NM_022270	CATGGCTGTGCAGACTGG	GCACCATGTAGCCGATGG
Octn2	NM_019269	GGCGCAACCACAGTATCC	GGGGCTTTCCAGTCATCC
Oatp1	NM_017111	CCTAGGCATAGGCATTTGGA	TCAACCAAAGCACAAAGCAG
Oatp2	NM_131906	CCTAGGCATAGGCATTTGGA	TCAACCAAAGCACAAAGCAG
Oatp3	AF041105	GCAGGATGATGTGGATGGAACAAAC	GCATGTAAATCGGATTGCAGGAG
Oatp4	NM_031650	AACATGCTTCGTGGGATAGG	CATGGAAGTGTGCCCTTCTT
Ctr1	NM_133600.1	CAACACACCTGGAGAAATGG	CGGGCTATCTTGAGTCCTTC
Ctr2	NM_001033693.2	TGTAACCTTGAGGCCAGAGAGA	GCCCATGAGGTAAGTGAACG
Atp7a	NM_052803	AGCTTCAGGAGGAGGAAAG	AGCTGCTTCGATGGCTACAT
Atp7b	NM_012511	AACGGCGTCCTAATCAAGG	TGCCCGTTTTGTCAAACATA
Mdr1a	NM_133401	CAACCAGCATTCTCCATAATA	CCCAAGGATCAGGAACAATA
Mdr1b	NM_01262.2	TTTCTGCTGTTGTCTTTGGTG	GGTCGGGTGGGATAGTTGA
Mrp1	NM_022281	CCTTGGGTCTGGTTTACTT	ACAGGGGAACGACTGACAG
Mrp2	NM_012833	TTCACGGCACATCACCA	ATTCGGACCCAAACAGGATG
Mrp3	NM_080581	GGACCCCATCCTGTTCTC	GTCGGCTGGGTGCTCACA
Mrp4	NM_133411	GAACGCTACGAGAAAGTCATC	GCCCGTGCCAAAGTTCAC
Mrp5	NM_053924	AAAAGGCAGTTTCTACAC	CAGGGCGATGCTGATGAG

Bcrp	NM_181381.2	CAGCAGGTTACCACTGTGAG	TTCCCCTCTGTTTAACATTACA
MATE1	NM_001014118.2	CTCGTGGGCTACATTTTCACC	CCACCACAGGTACAGGCAAG

2-1-3. 絶対定量

2-1-2. の結果、測定可能であった 12 種類のトランスポーター配列を Real-time PCR 法により増幅させ、PCR product をエタノール沈殿により精製した。精製したサンプルを Vector と ligation 反応を行い、insert 配列を確認後、コロニーを少量培養し、plasmid DNA 抽出を行った。抽出した全 12 種のトランスポーターの plasmid DNA を段階希釈することで各トランスポーターに対する検量線を作成し、Real-time PCR 法による絶対定量を行った。

2-1-3-1. 検量線用試料の調製

2-1-3-1-1. Real-time PCR 法による insert 増幅

2-1-1-2. で増幅したラット DRG の cDNA 溶液を用いて検量線標準試料に用いる PCR product の増幅を行った。Primer、組成、Thermal cycler 条件は 1-1-2. と同様に行った。内標には gapdh を用い、コントロールとして水、RT(-)試料を設置した。

2-1-3-1-2. ligation

増幅した PCR product を以下に示す条件で pGEM®-T Easy Vector と ligation 反応を行った。

<組成>

Rapid Ligation buffer (2×)	5.0 μL
10 μM primer (50ng/mL)	0.2 μL
T4 DNA Ligase	1.0 μL
PCR product	2.0 μL
滅菌 milliQ 水	1.8 μL
Total	10.0 μL

<Thermal cycler 条件>

16°C	30 min
------	--------

2-1-3-1-3. 形質転換

E.coli JM 109 competent cells に 1/10 量の Ligation sample を加え、ボルテックス後、氷上で 5 min 静置した。その後 42°C 水浴内で 45 sec ヒートショックさせた後、再び氷上で 2 min 静置した。次いで、ボルテックス後 S.O.C. 培地 100 μL 加え、100 μL/mL Ampicillin 含有 LB 寒天培地に広げ、37°C にて一晩インキュベートした。

2-1-3-1-4. PCR 反応

得られたコロニーを鋳型サンプルとして、以下の組成、Thermal cyclers 条件で PCR を行った。

< primer >

Table 3. Primer sequences used for Gene RED PCR

	primer (5'-3')
T7	TTGTAATACGACTCACTATAG
SP6	GCTATTTAGGTGACACTATAG

< 組成 >

Gene RED PCR Mix (2×)	5.0 μL
10 μM T7	0.12 μL
10 μM SP6	0.12 μL
滅菌 milliQ 水	4.76 μL
Total	10.0 μL

< Thermal cyclers 条件 >

Initial Denaturation	94°C	3 min	
Denaturation	94°C	5 sec	} 35 cycles
Annealing	55°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final Extension	72°C	15 sec	

2-1-3-1-5. アガロース電気泳動

増幅させた PCR product を電気泳動し、目的バンドの有無を確認することで、insert check を行った。Agarose S 1.4 g に 1×TAE buffer 140mL を加え、5 min 加熱した。10 mg/mL ethidium bromide 2.8 μ L を加えプレートに移し成型し、冷やし固めることで 1%アガロースゲルを作製した。

作製したゲルを 1×TAE buffer で満たした泳動槽に固定し、電気泳動を行った。2% Agarose gel にアプライした。PCR product 2 μ L を well に注入し、分子量マーカールある ϕ X174DNA/HaeIII digest 3 μ L とともに、100 V、20 min 泳動した。Luminescent Image Analyzer LAS-3000 により UV 照射撮影し、目的バンドの有無を確認した。

2-1-3-1-6. Sequence

電気泳動により増幅を確認した PCR product の配列を以下の条件にて Sequence 反応に供した。PCR product の精製は予滅菌 milliQ 水を加え静置しておいた illustra™ Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade を用いて行った。塩基配列の同定は、九州大学大学院医学研究院教育・支援センターに依頼して、備付の ABI 3100 automatic sequencer にて配列を解読した。

<組成>

Terminator Ready reaction mix	1.0 μ L
BigDye®Terminator v1.1 v3.15×sequencing buffer	3.5 μ L
1 μ M SP6	3.2 μ L
PCR product	1.0 μ L
滅菌 milliQ 水	11.8 μ L
Total	20.0 μ L

<Thermal cyclers 条件>

Initial Denaturation	96°C	2 min	
Denaturation	96°C	10 sec	} 25 cycles
Annealing	50°C	5 sec	
Extension	60°C	4 min	
	15°C	∞	

2-1-3-1-6. plasmid DNA の精製

insert が確認できた vector を保有した大腸菌を 2 mL 1%Ampicillin 含有 LB 液体培地で 37°C 16 hr 培養後、NucleoSpin® Plasmid QuickPure を用いて plasmid DNA を抽出した。操作は Kit のプロトコルに従った。plasmid DNA の濃度は Nano Drop を用いて測定し、分子量より物質量を算出した。

塩基数 = insert の塩基数 + pGEM-T Easy Vector の塩基数 (3015 bp)

分子量 = 塩基数 × 660

物質量 (mol/L) = plasmid DNA 濃度 (ng/μL) / 分子量 × 10⁻³

2-1-3-2. 定量

2-1-3-2-1. Real-time PCR

Table 2 に示した primer を用いて、2-1-1-2 の組成、Thermal cyclers 条件に従って、ラット DRG のトランスポーター mRNA の定量を行った。内標は gapdh を用い、コントロールとして水、RT(-)試料を設置した。

<データ解析>

2-1-3-1. で作製した plasmid DNA を $10^4 \sim 10^9$ 倍に段階希釈し、検量線を作成した。
plasmid DNA の物質質量から各トランスポーターの物質質量を算出した。

2-2. トランスポーターの一過性過剰発現細胞を用いた検討

12 種類のトランスポーターの発現が確認されたことから、これらのトランスポーターの一過性発現細胞を作製しオキサリプラチンの輸送に関して検討を行うこととした。

2-2-1. トランスポーター発現ベクターの作製

2-2-1-1. primer の作製

2-1-3. で絶対定量を行った 12 種類のトランスポーターの mRNA の配列情報をもとに、プライマー作製ソフト OLIGO Primer Analysis Software を用いて、コーディング領域の配列を増幅させるプライマーを作製した。各プライマーの配列は Table 4 に示す。

Table 4. Primer sequence used for amplification of transporter genes

	Primer (5'-3')		Primer length (bp)	Product length (bp)	Annealing(°C)
Octn1	Forward	CAATCGCCGGATCCCTTTCT	20	1850	56.2
	Reverse	ATGACCTTGAATTCTCGATCCTCCT	25		
Octn2	Forward	TGCGGTACCCCCAGATCCCC	20	1876	55
	Reverse	GTGGCCCTCGAGGAAGGTGG	20		
Oatp2	Forward	GCTTCTTCATAAAAACAGCAGTAAG	25	2247	63.1
	Reverse	AAAATCTCGAGTACTATGTCAGCC	24		

Ctr1	Forward	GAGAGGAAGACTCAGGCGGTG	21	895	66.4
	Reverse	GATTAGACAAGGCTCGAGATGATGA	25		
Ctr2	Forward	GCGCGGTACCAGCTGCAATC	20	797	56.2
	Reverse	CAGCTTCTGGTCGCTCCATGTTC	23		
Atp7a	Forward	AAAGACATCAAAATGGAACCAAA	23	4668	55
	Reverse	TAGATAATGCCAGGTTCAGAGCT	23		
Atp7b	Forward	TTTTGGTACCATGCCTGAACAGGAGAGAAAG	31	4419	55
	Reverse	CGGGAGCGGGCCCGTCTGGAAGGAGCAC	28		
Mdr1b	Forward	GCGAAGGGTACCCGGAGTGTACAC	23	3884	55
	Reverse	TAGCACCTCGAATTCTCCCAGCTCAT	26		
Mrp1	Forward	GCTGCGCCTGCTAGCTCCG	19	2976	55
	Reverse	AAAAGGAAGATACTCAAGAAGG	22		
	Forward	AGGAGACTTGGAAGCTGATGG	21	1967	
	Reverse	GGCTTCCTCGAGGTCAGATCCAG	23		
Mate1	Forward	TTTTGCTAGCCACATGGAGGTCTTGGAGGAG	31	1734	55
	Reverse	TGAGGGGTACCTGCATTGCTGGATTATTC	29		
Bcrp	Forward	GCTAGAAAGGCATAGATCCTAAAG	24	2175	64.5
	Reverse	ATAACTGTGAAGAAAAGAACACTGAC	26		

2-2-1-2. PCR 法による insert 増幅

作製した primer を用いて、insert 配列を増幅させた。Template DNA にはラット DRG の cDNA 溶液を用いた。PCR 反応の組成、Thermal cyclers 条件は以下の通りである。また、酵素として Atp7a、Bcrp は LA Taq® DNA polymerase、それ以外のトランスポーターは PrimeSTAR GXL polymerase を用いた。

● PrimeSTAR GXL polymerase

<組成>

5×PrimeSTAR GXL buffer	2.0 μL
2.5 mM dNTP mixture	0.8 μL
10 μM mixed primers	0.3 μL
PrimeSTAR® GXL polymerase	0.1 μL
Template DNA	0.5 μL
滅菌 milliQ 水	6.3 μL
Total	10.0 μL

<Thermal cyclers 条件>

Denaturation	95°C	30 sec	} 40 cycles
Annealing	※	30 sec	
Extension	72°C	1 min/kbp	
	15°C	∞	

LA Taq[®] DNA polymerase

<組成>

10× LA PCR buffer II (Mg ²⁺ free)	1.25 μL
2.5 mM dNTP mixture	2.0 μL
25 mM MgCl ₂	1.25 μL
10 μM mixed primers	0.25 μL
LA Taq (5 unit/μL)	0.125 μL
Template DNA	0.25 μL
滅菌 milliQ 水	7.375 μL
Total	12.5 μL

<Thermal cycler 条件>

Initial Denaturation	94°C	1 min	
Denaturation	94°C	20 sec	} 30 cycles
Annealing/Extension	※	1 min/kbp	
Final Extension	72°C	10 min	
	15°C	∞	

※Annealing 温度は Table 4 に記載した温度とした

2-2-1-3. TA クローニング

Atp7a と Bcrp は LA Taq® DNA polymerase で insert 配列を増幅後、pGEM®-T Easy Vecotr と ligation 反応を行った。次いで形質転換を行い、insert 配列を確認した。

Ligation 反応と形質転換は 2-1-3. と同様に行った。目的の vector を保有した大腸菌を 2 mL 1%Ampicillin 含有 LB 液体培地で 37°C 16 hr 培養後、NucleoSpin® Plasmid QuickPure を用いて plasmid DNA を抽出した。操作は Kit のプロトコルに従った。

2-2-1-4. 制限酵素処理

以下の組成、Thermal cycler 条件に従って、2-2-1-1. で増幅させた PCR product、2-1-1. で抽出した plasmid DNA 及び pcDNA3.1 (+) vector を試料として制限酵素処理を行った。Table 5 の制限酵素、反応条件に従って反応を行った。また、制限酵素処理後は、アガロースゲル電気泳動で制限酵素処理の確認を行った。DNA の精製は NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit 及び EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit を用いて行った。操作は Kit のプロトコルに従った。

<組成>

10×buffer		2.0 μL
RE		1.0 μL each
PCR product/ pcDNA3.1 (+) vector	}	16.0 μL
滅菌 milliQ 水		
Total		20.0 μL

<Thermal cycler 条件>

37°C 60 min

Table 5. RE and buffer used for RE reaction

target		primer (5'-3')	RE	buffer
Octn1	Forward	CAATCGCCGGATCCCTTTCT	<i>BamH I</i>	K buffer
	Reverse	ATGACCTTGAATTCTCGATCCTCCT	<i>EcoRV</i>	
Octn2	Forward	TGCGGTACCCCCAGATCCCC	<i>Kpn I</i>	L buffer
	Reverse	GTGGCCCTCGAGGAAGGTGG	<i>Xho I</i>	H buffer
Oatp2	Forward	GCTTCTTCATAAAAAACAGCAGTAAG	<i>EcoRV</i>	H buffer
	Reverse	AAAATCTCGAGTACTATGTCAGCC	<i>Xho I</i>	
Ctrl	Forward	GAGAGGAAGACTCAGGCGGTG	<i>Xho I</i>	K buffer
	Reverse	GATTAGACAAGGCTCGAGATGATGA	<i>BamH I</i>	
Ctr2	Forward	GCGCGGTACCAGCTGCAATC	<i>Kpn I</i>	L buffer
	Reverse	CAGCTTCTGGTCGCTCCATGTTT	<i>Apa I</i>	
Atp7a	Forward	AAAGACATCAAAATGGAACCAAA	<i>Not I</i>	H buffer
	Reverse	TAGATAATGCCAGGTTTCAGAGCT		
Atp7b	Forward	TTTTGGTACCATGCCTGAACAGGAGAGAAAG	<i>Kpn I</i>	L buffer
	Reverse	CGGGAGCGGGCCCGTCTGGAAGGAGCAC	<i>Apa I</i>	
Mdr1b	Forward	TTTTGCTAGCCACATGGAGGTCTTGGAGGAG	<i>Kpn I</i>	L buffer
	Reverse	TGAGGGGTACCTGCATTGCTGGATTATTC	<i>EcoRV</i>	H buffer
Mrp1	Forward	GCTGCGCCTGCTAGCTCCG	<i>Nhe I</i>	M buffer
	Reverse	AAAAGGAAGATACTCAAGAAGG	<i>HindIII</i>	
	Forward	AGGAGACTTGGAAGCTGATGG	<i>HindIII</i>	M buffer
	Reverse	GGCTTCCTCGAGGTCAGATCCAG	<i>Xho I</i>	H buffer

MATE1	Forward	TTTTGCTAGCCACATGGAGGTCTTGGAGGAG	<i>Nhe I</i>	M buffer
	Reverse	TGAGGGGTACCTGCATTGCTGGATTATTC	<i>Kpn I</i>	
Bcrp	Forward	GCTAGAAAGGCATAGATCCTAAAG	<i>Not I</i>	H buffer
	Reverse	ATAACTGTGAAGAAAAGAACACTGAC		

2-2-1-5. Ligation、形質転換

制限酵素処理後の DNA を用いて、以下に示す条件で **Ligation** 反応を行った。また、制限酵素処理後 Nano Drop を用いて DNA 濃度を測定し、pcDNA3.1 (+) vector (5428 bp) 及び insert の分子量から mol 濃度を求めた。Ligation 反応の vector 及び insert の物質質量比は 1 : 1 及び 1 : 3 で調整した。形質転換は 1-3-1. と同様に行った。

<組成>

Rapid Ligation buffer (2×)	5.0 μL
T4 DNA Ligase	1.0 μL
pcDNA3.1 (+) vector	} 4.0 μL
PCR product	
滅菌 milliQ 水	
Total	10.0 μL

<Thermal cycler 条件>

16°C 60 min

2-2-1-6. Insert check

アガロース電気泳動及び Sequence により insert check を行った。アガロース電気泳動及び Sequence は 2-1-3-1. と同様に行った。

2-2-2. 細胞培養

HEK293 細胞を Dullbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に 10% Fetal bovine serum (FBS) を加えた培養液中で、37°C、5%CO₂、湿度 95% にて培養した。

2-2-3. トランスフェクション

細胞内 Pt 蓄積量の測定には 6 well プレート、細胞生存率の測定には 96 well プレートを用いた。播種から 24 h 後よりトランスフェクションを行い、トランスフェクションから 24 h 経過した細胞を実験に用いた。操作は Lipofectamine® 3000 の推奨プロトコルに従った。

<6 well プレート (per well) >

培地量	2.5 mL
播種する細胞数	7.5×10^5 cells
Opti-MEM	125 μ L $\times$ 2
Lipofectamine®3000	5 μ L
plasmid DNA	2.5 μ g

<96 well プレート (per well) >

培地量	200 μ L
播種する細胞数	3.0×10^4 cells
Opti-MEM	5 μ L $\times$ 2
Lipofectamine®3000	0.2 μ L
plasmid DNA	0.1 μ g

2-2-4. オキサリプラチン曝露

トランスフェクションから 24 h 経過した細胞にオキサリプラチンを曝露した。細胞内 Pt 蓄積量測定 (6 well プレート系) では 100 μ M で 2 h、細胞生存率測定 (96 well プレート系) では 0.1、1、10、100、1000 μ M で 24 h 曝露した。また、オキサリプラチンとしてエルプラット®点滴静注液 100 mg を用いた。

2-2-5. 細胞内 Pt 蓄積量の測定

2-2-5-1. 試料調整

オキサリプラチンを 2h 曝露したトランスポーター過剰発現細胞を使用した。各 well の培地を回収し、PBS 1 mL を加えセルスクレーパーで細胞をはがした。各 well の細胞懸濁液をチューブに回収し PBS 1 mL で wash 後、遠心分離 (20°C、15,000 $\times$ g、5 min) を行った。残渣を回収し、buffer RLT 200 μ L 加えピペッティング後、遠心分離 (20°C、15,000 $\times$ g、5 min) を行った。上清を 200 μ L 回収し、180 μ L を細胞内 Pt 蓄積量測定用、20 μ L をタンパク質定量用の試料とした。

2-2-5-2. タンパク定量

タンパク質の定量は Protein Assay Bicinchoninate kit を用いて行った。Standard solution にはウシ血清アルブミン (BSA) を 20、50、100、200、500、1000 μ M に調整したものを用いた。操作は kit のプロトコルに従い、30 min 反応後に吸光度 (562 nm) を測定した。

2-2-5-3. ICP-MS

2-2-5-1. で回収した 180 μ L の細胞溶解液に 60%硝酸 180 μ L を加え、3.24 mL milliQ 水で希釈した。これを試料として、細胞内 Pt 蓄積量を測定した。測定装置として、ICP-MS

(Agilent7500c) を使用した。また、測定値は、細胞内タンパク量で補正した。

2-2-6. 統計処理

データは平均値±標準偏差で示した。データの比較には one-way analysis of variance (ANOVA) 解析後、Dunnett's test を使用した。検定には StatView (Abacus Concepts) を用い、有意水準は 5%とした。

2-3. トランスポーターの安定発現細胞を用いた検討

2-3-1. 細胞培養

Flp-In-293 細胞を Dullbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に 10% Fetal bovine serum (FBS)、100 μ g/mL Zeocin を加えた培養液中で、37°C、5%CO₂、湿度 95% にて培養した。各トランスポーターを安定発現した Flp-In-293 細胞は DMEM に 10% FBS、100 μ g/mL Hygromycin B を加えた培養液中で、37°C、5%CO₂、湿度 95% にて培養した。

2-3-2. 安定発現用ベクター作製

2-3-2-1. 制限酵素処理

以下の組成、Thermal cycler 条件に従って、2-1-1. で増幅させた PCR product、及び pcDNA5/FRT vector を試料として制限酵素処理を行った。Table 6.の制限酵素、反応条件に従って反応を行った。また、制限酵素処理後は、アガロースゲル電気泳動で制限酵素処理の確認を行った。DNA の精製は NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit 及び EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit を用いて行った。操作は Kit のプロトコルに従った。

Table 6. RE and buffer used for RE reaction

target		primer (5'-3')	RE	buffer
Octn1	Forward	CAATCGCCGGATCCCTTTCT	<i>BamH I</i>	K buffer
	Reverse	ATGACCTTGAATTCTCGATCCTCCT	<i>EcoRV</i>	
Octn2	Forward	TGCGGTACCCCCAGATCCCC	<i>Kpn I</i>	L buffer
	Reverse	GTGGCCCTCGAGGAAGGTGG	<i>Xho I</i>	H buffer
MATE1	Forward	TTTTGCTAGCCACATGGAGGTCTTGGAGGAG	<i>Nhe I</i>	M buffer
	Reverse	TGAGGGGTACCTGCATTGCTGGATTATTC	<i>Kpn I</i>	

2-3-2-2. Ligation、形質転換、Insert check

2-2-1-5. と同様の手順で pcDNA5/FRT vector と目的配列の Ligation、形質転換、配列導入の確認として Insert check を行った。

2-3-3. 安定発現細胞株の作製

各トランスポーターのトランスフェクションは 6 well プレートにて、Lipofectamine® 3000 の推奨プロトコルに従い行った。

<6 well プレート (per well) >

培地量	2.5 mL
Opti-MEM	200 μ L×2
Lipofectamine®3000	8 μ L
plasmid DNA	0.4 μ g
pOG44	3.6 μ g

トランスフェクションから 72 h 経過後、細胞を 100 mm ディッシュに播種し、接着するまでインキュベーションした。その後 Hygromycin B 含有培地にて培養し、コロニーが形成されるまで 3-4 day 毎に培地交換を行った。得られた各クローンについて、ウェスタンブロッティングにより各トランスポーターの発現を確認したものを安定発現細胞として樹立し、以降の実験に用いた。

2-3-4. トランスポーターの発現確認

2-3-3. で作製した Mate1、Octn1、Octn2 トランスポーター安定発現細胞よりそれぞれタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングによる目的トランスポーターの発現確認を行った。

2-3-4-1. 試料調製

下記方法に従い、各 well にアプライする総タンパク量が等しくなるようにサンプルを調整した。

2-3-4-1-2. タンパク抽出

各トランスポーター安定発現細胞を 100 mm dish にて培養し、サブコンフルエントの状態の細胞を用いた。dish を氷冷した PBS 3 mL で 2 回 wash し、1% Protease Inhibitor Cocktails -RIPA buffer 600 μ L を加え、4°C にて 15 min 振盪し、細胞懸濁液をチューブに移した。dish をさらに 300 μ L の RIPA buffer で wash し、残渣を回収した。23 G のニードルに細胞懸濁液を 30-50 回通し、細胞を破碎した後、氷上で 30-60 min 静置した。その後、4°C, 10,000 $\times$ g, 10 min 遠心し、得られた上清をサンプルとした。

2-3-4-1-3. タンパク定量

抽出した試料のタンパク濃度を 2-5-2.と同様の方法で行った。

3-4-2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

2-3-4-2-1. ゲル作製

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 前日に、Polyacrylamide gel を作成し、4 °Cで保管した。Octn1、Octn2 安定発現細胞より抽出したタンパク質の泳動には 8% Polyacrylamide gel を、Mate1 安定発現細胞より抽出したタンパク質の泳動には 9% Polyacrylamide gel を用いた。

〈組成〉

8% Lower gel (1 枚分)

30% アクリルアミドミックス	2.7 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 mL
10% SDS solution	100 μ L
10% APS solution	100 μ L
Ultra Pure™ Temed	10 μ L
蒸留水	4.65 mL

9% Lower gel (1 枚分)

30% アクリルアミドミックス	3.0 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 mL
10% SDS solution	100 μ L
10% APS solution	100 μ L
Ultra Pure™ Temed	10 μ L
蒸留水	4.35 mL

3.0% Upper gel (1 枚分)

30% アクリルアミドミックス	0.6 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.25 mL
10% SDS solution	50 μ L
10% APS solution	32.5 μ L
Ultra Pure™ Temed	10 μ L
蒸留水	3 mL

2-3-4-2-2. 電気泳動

各 well にアプライする総タンパク量が等しくなるようにサンプルを調整し 6×loading buffer を加えて還元処理した。加熱処理は行わなかった。この試料を各 well に apply し、1 x Running buffer 中で泳動を行った。この際、泳動用マーカーとして、ワイドビュー™ プレステインタンパク質サイズマーカーを用いた。

2-3-4-3. ブロットイング

PVDF 膜を MeOH 10 mL に 30 秒浸した後、10×blotting buffer 20 mL を蒸留水で 190 mL までメスアップした調整液（以下 blotting buffer とする）を注ぎ、SDS-PAGE 中振盪した。SDS-PAGE 終了後、blotting 装置上を少量の blotting buffer を布き、下から濾紙、PVDF 膜、gel、濾紙の順で順にセットし、0.1 A/gel、120 分間転写した。なお、セットした濾紙、PVDF 膜、gel は乾燥しないようセット前に十分 blotting buffer で湿らせておいた。

2-3-4-4. ブロッキング

5% skim milk-0.5% Tween-PBS を用いて、室温で 60 min 振盪した。

2-3-4-5. 抗体反応

一次抗体として Mate1、Octn1、Octn2 検出用にそれぞれ anti-Mate1 抗体、anti-Octn1 抗体、anti-Octn2 抗体を、 β -actin 検出用に anti- β -actin 抗体を用いた。一次抗体は Can get signal 1 reagent で 1,000 倍希釈し、それぞれに対応する PVDF 膜と 4℃で終夜反応させた。翌日、0.5% Tween-PBS 中で 10 min 振盪させるウォッシュを 1 回行った。ウォッシュ後、二次抗体反応を行った。二次抗体を Can get signal 2 reagent で 10,000 倍希釈した溶液中に各 PVDF 膜を添加し、1 hr 静置した。静置後、0.5% Tween-PBS で 5 min 振盪

させウォッシュを3回行った。二次抗体として β -actinの検出には Amersham ECL Anti-Mouse IgG、Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibodyを用い、Mate1、Ocn1、Ocn2の検出には Amersham ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from donkey)を使用した。

2-3-4-6. 撮像

Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent を用い、添付のプロトコールに従い、LAS-3000 ルミノイメージアナライザーにて撮像を行った。

〈ウェスタンブロッティング関連試薬組成表〉

<u>0.5% Tween-PBS</u>		<u>Blotting buffer(/1L)</u>	
NaCl	8g	Tris	12.114g
KCl	0.2g	Glycine	14.41344g
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	2.9g	蒸留水	Up to 1L
KH ₂ PO ₄	0.2g		
Polysorbate 20	5g	<u>Running buffer(/1L)</u>	
蒸留水	Up to 1L	Tris	3.02g
		Glycine	14.413g
<u>6×Loading buffer</u>		SDS	1g
0.7M Tris-HCl(pH6.8)	10mL	蒸留水	Up to 1L
Bromophenol Blue	6mg		
Glycerol	6mL	<u>RIPA buffer</u>	
SDS	2g	50mM Tris-HCl(pH8.0)	
蒸留水	Up to 20mL	150mM NaCl	
		1.0% NP-40	
<u>30% アクリルアミドミックス</u>		0.5% デオキシコール酸 Na	
アクリルアミド	292g	1mM EDTA	
ビスアクリルアミド	8g	0.1% SDS	
蒸留水	Up to 1L	0.2mM PMSF	

2-3-5. 細胞内 Pt 蓄積量測定

2-3-5-1. オキサリプラチン曝露

細胞は 6 well plate に 7.5×10^5 cells を播種し、24 時間後にオキサリプラチンを曝露した。細胞内 Pt 蓄積量の濃度推移を測定するために、50、100、200、500、1000 μM を 1 h 曝露した。また細胞内 Pt 蓄積量の時間推移を測定するために 100 μM を 5, 10, 30, 60, 120, 240, 480 min 曝露した。

2-3-5-2. 試料調整

2-3-5-1. でオキサリプラチンを曝露したトランスポーター安定発現細胞を使用した。各 well の培地を回収し、HBSS 1 mL を加えセルスクレーパーで細胞をはがした。各 well の細胞懸濁液をチューブに回収し HBSS 1 mL で wash 後、遠心分離 (20°C、15,000 $\times$ g、5 min) を行った。残渣を回収し、buffer RLT 200 μL 加えピペティング後、遠心分離 (20°C、15,000 $\times$ g、5 min) を行った。上清を 200 μL 回収し、180 μL を細胞内 Pt 蓄積量測定用、20 μL をタンパク質定量用の試料とした。

2-3-5-3. タンパク質の定量

タンパク質の定量は 2-5-2. と同様の方法で行った。

2-3-5-4. サンプル調製、測定

回収した 180 μL の細胞溶解液に 60%硝酸 180 μL を加え、3.24 mL milliQ 水で希釈した。これを試料として、細胞内 Pt 蓄積量を測定した。測定装置として、ICP-MS (Agilent7500c) を使用した。また、測定値は、細胞内タンパク量で補正した。

2-4. トランスポーターノックダウンラットを用いた検討

in vitro での検討によって Octn1/2 及び Mate1 がオキサリプラチンの輸送に寄与することが示唆されたため、ラット DRG においてこれらのトランスポーターのノックダウンを行うこととした。

2-4-1. siRNA 髄腔内投与によるトランスポーターのノックダウン

siRNA の投与は AteloGene Local Use “Quick Gelation” を用いて行った。本キットによって投与される siRNA は AteloCollagen と複合体を形成し、生体内でゲル化することで長期にわたって局所的に作用する。

2-4-1-1. 試薬調製

投与用 siRNA の調製は推奨プロトコルに従って行った。氷冷しながら 200 μ L の QG buffer と siRNA 溶液 40 μ L を AteloGene QG の上にゆっくりと重層した。その後 4℃で 10 分間、12 r.p.m. で転倒混和を行った。

2-4-1-2. 薬物投与

調製した siRNA 溶液は下肢の神経とつながる DRG をターゲットとするため、L4-L6 髄腔内に 30 μ L ずつ投与した。投与時は麻酔薬としてイソフルラン吸入用麻酔を使用した。

2-4-1-3. トランスポーターのノックダウン確認

2-4-1-3-1. サンプル回収

siRNA 投与 3 日後及び 7 日後に DRG の採取を行った。L4-L6 の DRG 計 6 個を採取し、ターゲットトランスポーターのノックダウンをウェスタンブロットによって確認することとした。

2-4-1-3-2. タンパク抽出

DRG の入った 2 mL チューブに 120 μ L の RIPA buffer を加えてビーズによって破碎した。4°C 15000 rpm で 5 分遠心分離後、上清をサンプルとして回収した。

2-4-1-3-3. ウェスタンブロット

回収したサンプルを用いてウェスタンブロット法によって、トランスポーターのタンパク発現を確認した。ウェスタンブロットは 3-4. と同様の手法で行った。

2-4-2. トランスポーター発現低下がオキシリプラチン誘発末梢神経障害に与える影響評価

2-4-1. の結果、siRNA 投与 7 日後にトランスポーターの発現低下がみられたことから、siRNA の週 1 投与によるオキシリプラチン誘発末梢神経障害への影響評価を行うこととした。

2-4-2-1. 実験スケジュール

オキシリプラチン (4 mg/kg) を週 2 回、4 週にわたって (0、1、7、8、14、15、21 及び 22 日目) 静脈内投与した。siRNA の投与は 4-1. で行った方法に従ってオキシリプラチンの投与開始 1 週間前から毎週行った (-7、0、7、14 及び 21 日目)。末梢神経障害の評価として von Frey test を毎週オキシリプラチン投与前に行った。Mate1 ノックダウンラットでは 17 日目、Octn1/2 ノックダウンラットでは 28 日目に L4-L6 の DRG を採取し組織内 Pt 蓄積量を測定した。

2-4-2-2. von Frey test

オキシリプラチン誘発末梢神経障害の評価として von Frey test¹ を行った。試験 30 分前より金網の上に置き馴化させた。その後、金網の下よりラット後足底を 1.0-15 g の von Frey フィラメントを用いて反応閾値の測定を行った。各フィラメント強度において左右 6 回ずつ、1 回につき 6 秒間刺激し、ラットが逃避反応を起こすフィラメント強度を逃避反応閾値として記録した。

2-4-3-3. DRG 組織内 Pt 蓄積量測定

各ラットより L4-L6 の DRG を回収し、組織内 Pt 蓄積に対するトランスポーターノックダウンの影響を評価することとした。200 μ L の CellLytic M を加えてビーズによって破碎した後、4°C 15000 rpm 5 分の遠心後、上清 180 μ L を Pt 測定用サンプルとして、20 μ L をタンパク測定用サンプルとして使用した。

その後の試料調製、タンパク定量、ICP-MS による測定は 2-2-5. と同様の手法を用いた。

2-4-4. 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。二群間の比較は Student' s t-test により検定を行った。多群間の比較は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後、各群間の検定を Tukey-Kramer test により行った。検定には StatView (Abacus Concepts) を用い、有意水準は 5% とした。

試薬一覧

RNA extraction, Real-time PCR

RNeasy® Mini Kit QiAGEN

5×cDNA Synthesis Buffer Thermo

5 mM dNTP Thermo

Random Hexamer Thermo

RT enhancer Thermo

Verso Enzyme Mix Thermo

RNase free water Ambion

ROX Reference Dye TaKaRa

SYBR Premix EX Taq™ (2×) TaKaRa

Vetor 作製、Ligation、Transformation

Rapid Ligation buffer (2×) Promega

T4 DNA Ligase Promega

pGEM®-T Easy Vecotr Promega

QuickLyse® Miniprep QIAGEN

Ampicillin sodium salt Sigma-Aldrich

JM109 Competent Cells, Subcloning Efficiency Promega

LB 液体培地「ダイゴ」和光純薬工業

LB 寒天培地「ダイゴ」和光純薬工業

S.O.C. medium liquid Invitrogen

PCR, Agarose gel electrophoresis

10×PCR buffer

Applied Biosystems

25 mM MgCl₂

Applied Biosystems

5×PrimeSTAR GXL Buffer

TaKaRa

6×Gel loading solution

TaKaRa

Agarose S

ニッポンジーン

dNTP Mixture (2.5 mM each)

TaKaRa

Ethidium bromide

ニッポンジーン

GeneAmp® dNTP Mix 2 mM

Applied Biosystems

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase

TaKaRa

TAE (Tris-Acetate EDTA) powder

TaKaRa

TE buffer

TaKaRa

φ X174 DNA/HaeIII Markers

TaKaRa

λ -Eco T14I / Bgl II digest

TaKaRa

RE

10×H Buffer

TaKaRa

10×K Buffer

TaKaRa

10×L Buffer

TaKaRa

10×M Buffer

TaKaRa

BamH I

TaKaRa

EcoR V

TaKaRa

Xho I

TaKaRa

Kpn I	TaKaRa
Apa I	TaKaRa
Nhe I	TaKaRa
Not I	TaKaRa
HindIII	TaKaRa
Sequence	
BigDye Terminator v1.1 v3.15×Sequencing buffer	Applied Biosystems
Illustra™ Sephadex™ G-50 Columns	GE healthcare
Illustra™ Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade	GE healthcare
Multi Screen® Filtration System	MILLIPORE
Multi Screen®	MILLIPORE
Terminator ready reaction mixture	Applied Biosystems
Cell culture, Transfection	
DMEM/F-12 Medium	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich
Fetal bovine serum (FBS)	ニチレイバイオサイエンス
Lipofectamine™3000 Reagent	Invitrogen
Opti-Mem® I Reduced Serum Medium	Gibco
Trypan blue	和光純薬工業
Nerve Growth Factor (NGF)	alomone labs

細胞内 Pt 蓄積量測定、細胞生存率測定

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

同仁化学研究所

Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS)

Sigma-Aldrich

エルプラット点滴静注液

ヤクルト

Pt(dach)Cl₂

硝酸

和光純薬工業

Gene Silencing

AteloGene® Local Use “Quick Gelation”

高研

ソフトウェア・ウェブツール

BLAST

NCBI

GENETIX WIN Version 5.0.0

GENETIX

OLIGO Primer Analysis Software

Molecular Biology Insights

Stat View-J5.0

HULINKS

使用機器

BioShaker BR-13UM	TAITEC
CENTRIFUGAL EVAPORATOR CVE-2000	東京理化機器
Humid Chamer IH400	yamato
iCycler TM Thermal cycler	BIO RAD
iMyRun N 核酸用電気泳動システム	コスモ・バイオ
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	富士フィルム
NanoDrop	Thermo
PCR Thermal Cycler MP	TaKaRa
PCR Thermal Cycler Dice	TaKaRa
PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC707	ASTEC
T100 TM Thermal Cycler	BIO RAD
StepOnePlus TM Real-time PCR System	Applied Biosystems
Tabletop Centrifuge Model.5420	新興精機
Thermo-Mate BF400	yamato
クリーンベンチ	SANYO
テーブルトップマイクロ冷却遠心機 3500	KUBOTA
マイクロ冷却遠心機	KUBOTA
ユニバーサル冷却遠心機	KUBOTA
ICP-MS (Agilent7500c)	アジレント・テクノロジー

参考文献

1. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 4:307-20 (2005).
2. Boku N, Ohtsu A, Hyodo I, Shirao K, Miyata Y, Nakagawa K, Tamura T, Hatake K, Tanigawara Y. Phase II study of oxaliplatin in japanese patients with metastatic colorectal cancer refractory to fluoropyrimidines. *Jpn J Clin Oncol.* 37:440-5 (2007).
3. Cassidy J, Misset JL. Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin Oncol.* 29:11-20 (2002).
4. Extra JM, Marty M, Brienza S, Misset JL. Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. *Semin Oncol.* 25:13-22 (1998).
5. Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol.* 59:159-68 (2006).
6. Quasthoff S, Hartung HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol.* 249:9-17 (2002).
7. Zedan AH, Hansen TF, Fex S, Sørensen A, Vilholm OJ. Oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer: many questions with few answers. *Clin Colorectal Cancer.* 13:73-80 (2014).
8. Screnci D, McKeage MJ, Galettis P, Hambley TW, Palmer BD, Baguley BC. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. *Br J Cancer.* 82:966-72 (2000).
9. Renn CL, Carozzi VA, Rhee P, Gallop D, Dorsey SG, Cavaletti G. Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice. *Mol Pain.* 7:29 (2011).
10. Cavaletti G, Tredici G, Petruccioli MG, Dondè E, Tredici P, Marmiroli P, Minoia C,

- Ronchi A, Bayssas M, Etienne GG. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur J Cancer*. 37:2457-63 (2001).
11. Sakurai M, Egashira N, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain*. 147:165-74 (2009).
 12. Kawashiri T, Egashira N, Kurobe K, Tsutsumi K, Yamashita Y, Ushio S, Yano T, Oishi R. L type Ca^{2+} channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol Pain*. 8:7 (2012).
 13. Tatsushima Y, Egashira N, Narishige Y, Fukui S, Kawashiri T, Yamauchi Y, Oishi R. Calcium channel blockers reduce oxaliplatin-induced acute neuropathy: a retrospective study of 69 male patients receiving modified FOLFOX6 therapy. *Biomed Pharmacother*. 67:39-42 (2013).
 14. Liu JJ, Kim Y, Yan F, Ding Q, Ip V, Jong NN, Mercer JF, McKeage MJ. Contributions of rat Ctr1 to the uptake and toxicity of copper and platinum anticancer drugs in dorsal root ganglion neurons. *Biochem Pharmacol*. 85:207-15 (2013).
 15. Sprowl JA, Ciarimboli G, Lancaster CS, Giovino H, Gibson AA, Du G, Janke LJ, Cavaletti G, Shields AF, Sparreboom A. Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent on the organic cation transporter OCT2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:11199-204 (2013).
 16. Jong NN, Nakanishi T, Liu JJ, Tamai I, McKeage MJ. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 338:537-47 (2011).

17. Chen Y, Teranishi K, Li S, Yee SW, Hesselson S, Stryke D, Johns SJ, Ferrin TE, Kwok P, Giacomini KM. Genetic variants in multidrug and toxic compound extrusion-1, hMATE1, alter transport function. *Pharmacogenomics J.* 9:127-36 (2009).
18. Lancaster CS, Sprowl JA, Walker AL, Hu S, Gibson AA, Sparreboom A. Modulation of OATP1B-type transporter function alters cellular uptake and disposition of platinum chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther.* 12:1537-44 (2013).
19. Myint K, Li Y, Paxton J, McKeage M. Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2) Mediated Transport of Oxaliplatin-Derived Platinum in Membrane Vesicles. *PLoS One.* 10:e0130727 (2015).
20. Oguri T, Isobe T, Fujitaka K, Ishikawa N, Kohno N. Association between expression of the MRP3 gene and exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer.* 93:584-9 (2001).
21. Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer Res.* 34:547-50 (2014).
22. Aleksunes LM, Augustine LM, Scheffer GL, Cherrington NJ, Manautou JE. Renal xenobiotic transporters are differentially expressed in mice following cisplatin treatment. *Toxicology.* 250:82-8 (2008).
23. Pawłowski KM, Mucha J, Majchrzak K, Motyl T, Król M. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. *BMC Vet Res.* 9:119 (2013).
24. Samimi G, Katano K, Holzer AK, Safaei R, Howell SB. Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol.* 66:25-32 (2004).
25. Yan F, Liu JJ, Ip V, Jamieson SM, McKeage MJ. Role of platinum DNA damage-

- induced transcriptional inhibition in chemotherapy-induced neuronal atrophy and peripheral neurotoxicity. *J Neurochem.* 135:1099-112 (2015).
26. Ta LE, Espeset L, Podratz J, Windebank AJ. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology.* 27:992-1002 (2006).
 27. Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, Schlattau A, Lathroum L, Windebank AJ. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis.* 41:661-8 (2011).
 28. Podratz JL, Lee H, Knorr P, Koehler S, Forsythe S, Lambrecht K, Arias S, Schmidt K, Steinhoff G, Yudintsev G, Yang A, Trushina E, Windebank A. Cisplatin induces mitochondrial deficits in Drosophila larval segmental nerve. *Neurobiol Dis.* 97:60-69 (2017).
 29. Bobylev I, Joshi AR, Barham M, Neiss WF, Lehmann HC. Depletion of Mitofusin-2 Causes Mitochondrial Damage in Cisplatin-Induced Neuropathy. *Mol Neurobiol.* Epub ahead of print (2017).
 30. Di Cesare Mannelli L, Pacini A, Bonaccini L, Zanardelli M, Mello T, Ghelardini C. Morphologic features and glial activation in rat oxaliplatin-dependent neuropathic pain. *J Pain.* 14:1585-600 (2013).
 31. Di Cesare Mannelli L, Pacini A, Micheli L, Tani A, Zanardelli M, Ghelardini C. Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Exp Neurol.* 261:22-33 (2014).
 32. Tsutsumi K, Yamashita Y, Ushio S, Kawashiri T, Kaname T, Fujita S, Oishi R, Egashira N. Oxaliplatin induces hypomyelination and reduced neuregulin 1 expression in the rat sciatic nerve. *Neurosci Res.* 80:86-90 (2014).
 33. Di Cesare Mannelli L, Pacini A, Matera C, Zanardelli M, Mello T, De Amici M,

- Dallanocce C, Ghelardini C. Involvement of $\alpha 7$ nAChR subtype in rat oxaliplatin-induced neuropathy: effects of selective activation. *Neuropharmacology*. 79:37-48 (2014).
34. Kanat O, Bagdas D, Ozboluk HY, Gurun MS. Preclinical evidence for the antihyperalgesic activity of CDP-choline in oxaliplatin-induced neuropathic pain. *J BUON*. 18:1012-8 (2013).
35. Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Harada N, Ozaki N, Seino Y, Shibata T, Kondo M, Kato J, Okawa T, Fukami A, Hamada Y, Inagaki N, Seino Y, Drucker DJ, Oiso Y, Nakamura J. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes*. 60:2397-406 (2011).
36. Kan M, Guo G, Singh B, Singh V, Zochodne DW. Glucagon-like peptide 1, insulin, sensory neurons, and diabetic neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 71:494-510 (2012).
37. Liu WJ, Jin HY, Lee KA, Xie SH, Baek HS, Park TS. Neuroprotective effect of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist, synthetic exendin-4, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 164:1410-20 (2011).
38. During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med*. 9:1173-9 (2003).
39. Li Y, Perry T, Kindy MS, Harvey BK, Tweedie D, Holloway HW, Powers K, Shen H, Egan JM, Sambamurti K, Brossi A, Lahiri DK, Mattson MP, Hoffer BJ, Wang Y, Greig NH. GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:1285-90 (2009).

40. Belsham DD, Fick LJ, Dalvi PS, Centeno ML, Chalmers JA, Lee PK, Wang Y, Drucker DJ, Koletar MM. Ciliary neurotrophic factor recruitment of glucagon-like peptide-1 mediates neurogenesis, allowing immortalization of adult murine hypothalamic neurons. *FASEB J.* 23:4256-65 (2009).
41. Perry T, Lahiri DK, Chen D, Zhou J, Shaw KT, Egan JM, Greig NH. A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: a promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 300:958-66 (2002).
42. Tsukamoto M, Niimi N, Sango K, Takaku S, Kanazawa Y, Utsunomiya K. Neurotrophic and neuroprotective properties of exendin-4 in adult rat dorsal root ganglion neurons: involvement of insulin and RhoA. *Histochem Cell Biol.* 144:249-59 (2015).
43. Teramoto S, Miyamoto N, Yatomi K, Tanaka Y, Oishi H, Arai H, Hattori N, Urabe T. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, provides neuroprotection in mice transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31:1696-705 (2011).
44. Velmurugan K, Bouchard R, Mahaffey G, Pugazhenth S. Neuroprotective actions of glucagon-like peptide-1 in differentiated human neuroprogenitor cells. *J Neurochem.* 123:919-31 (2012).
45. Xiong H, Zheng C, Wang J, Song J, Zhao G, Shen H, Deng Y. The neuroprotection of liraglutide on Alzheimer-like learning and memory impairment by modulating the hyperphosphorylation of tau and neurofilament proteins and insulin signaling pathways in mice. *J Alzheimers Dis.* 37:623-35 (2013).
46. Scuteri A, Galimberti A, Ravasi M, Pasini S, Donzelli E, Cavaletti G, Tredici G. NGF protects dorsal root ganglion neurons from oxaliplatin by modulating JNK/Sapk and

- ERK1/2. *Neurosci Lett.* 486:141-5 (2010).
47. Yamamoto K, Amako M, Yamamoto Y, Tsuchihara T, Nukada H, Yoshihara Y, Arino H, Fujita M, Uenoyama M, Tachibana S, Nemoto K. Therapeutic effect of exendin-4, a long-acting analogue of glucagon-like peptide-1 receptor agonist, on nerve regeneration after the crush nerve injury. *Biomed Res Int.* 2013:315848 (2013).
 48. Perry T, Holloway HW, Weerasuriya A, Mouton PR, Duffy K, Mattison JA, Greig NH. Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy. *Exp Neurol.* 203:293-301 (2007).
 49. Li H, Jia Z, Li G, Zhao X, Sun P1, Wang J1, Fan Z1, Lv G1. Neuroprotective effects of exendin-4 in rat model of spinal cord injury via inhibiting mitochondrial apoptotic pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 8:4837-43 (2015).
 50. Gong N, Xiao Q, Zhu B, Zhang CY, Wang YC, Fan H, Ma AN, Wang YX. Activation of spinal glucagon-like peptide-1 receptors specifically suppresses pain hypersensitivity. *J Neurosci.* 34:5322-34 (2014).
 51. Yoon SY, Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM. Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *J Pain.* 14:205-14 (2013).
 52. Di Cesare Mannelli L, Pacini A, Micheli L, Tani A, Zanardelli M, Ghelardini C. Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Exp Neurol.* 261:22-33 (2014).
 53. Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM. Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience.* 274:308-17 (2014).
 54. Gale GR, Morris CR, Atkins LM, Smith AB. Binding of an antitumor platinum compound to cells as influenced by physical factors and pharmacologically active

- agents. *Cancer Res.* 33:813-8 (1973).
55. Binks SP, Dobrota M. Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochem Pharmacol.* 40:1329-36 (1990).
 56. Dobson PD, Lanthaler K, Oliver SG, Kell DB. Implications of the dominant role of transporters in drug uptake by cells. *Curr Top Med Chem.* 9:163-81 (2009).
 57. Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K. Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem Pharmacol.* 70:1823-31 (2005).
 58. Nakamura T, Yonezawa A, Hashimoto S, Katsura T, Inui K. Disruption of multidrug and toxin extrusion MATE1 potentiates cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 80:1762-7 (2010).
 59. Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol.* 62:1154-9 (2002).
 60. Qu Q, Qu J, Guo Y, Zhou BT, Zhou HH. Luteolin potentiates the sensitivity of colorectal cancer cell lines to oxaliplatin through the PPAR γ /OCTN2 pathway. *Anticancer Drugs.* 25:1016-27 (2014).
 61. Oguri T, Isobe T, Fujitaka K, Ishikawa N, Kohno N. Association between expression of the MRP3 gene and exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer.* 93:584-9 (2001).
 62. Kunii E, Oguri T, Kasai D, Ozasa H, Uemura T, Takakuwa O, Ohkubo H, Takemura M, Maeno K, Niimi A. Organic cation transporter OCT6 mediates cisplatin uptake and resistance to cisplatin in lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 75:985-91 (2015).
 63. Holzer AK, Katano K, Klomp LW, Howell SB. Cisplatin rapidly down-regulates its

- own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 10:6744-9 (2004).
64. Ip V, Liu JJ, McKeage MJ. Evaluation of effects of copper histidine on copper transporter 1-mediated accumulation of platinum and oxaliplatin-induced neurotoxicity in vitro and in vivo. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 40:371-8 (2013).
 65. Le Roy B, Tixier L, Pereira B, Sauvanet P, Buc E, Pétorin C, Déchelotte P, Pezet D, Balayssac D. Assessment of the Relation between the Expression of Oxaliplatin Transporters in Colorectal Cancer and Response to FOLFOX-4 Adjuvant Chemotherapy: A Case Control Study. *PLoS One.* 11:e0148739 (2016).
 66. Wang W, Sun YP, Huang XZ, He M, Chen YY, Shi GY, Li H, Yi J, Wang J. Emodin enhances sensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs via glutathione depletion and MRP1 downregulation. *Biochem Pharmacol.* 79:1134-40 (2010).
 67. Ota S, Ishii G, Goto K, Kubota K, Kim YH, Kojika M, Murata Y, Yamazaki M, Nishiwaki Y, Eguchi K, Ochiai A. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer.* 64:98-104 (2009).
 68. Ekblad L, Kjellström J, Johnsson A. Reduced drug accumulation is more important in acquired resistance against oxaliplatin than against cisplatin in isogenic colon cancer cells. *Anticancer Drugs.* 21:523-31 (2010).
 69. Mirakhorli M, Rahman SA, Abdullah S, Vakili M, Rozafzon R, Khoshzaban A. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphism and colorectal cancer recurrence in patients receiving adjuvant FOLFOX-4 chemotherapy. *Mol Med Rep.* 7:613-7 (2013).
 70. Myint K, Li Y, Paxton J, McKeage M. Multidrug Resistance-Associated Protein 2

- (MRP2) Mediated Transport of Oxaliplatin-Derived Platinum in Membrane Vesicles. *PLoS One*. 10:e0130727 (2015).
71. Tamai I, Nakanishi T, Kobayashi D, China K, Kosugi Y, Nezu J, Sai Y, Tsuji A. Involvement of OCTN1 (SLC22A4) in pH-dependent transport of organic cations. *Mol Pharm*. 1:57-66 (2004).
 72. Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther*. 289:768-73 (1999).
 73. Nakamura T, Yoshida K, Yabuuchi H, Maeda T, Tamai I. Functional characterization of ergothioneine transport by rat organic cation/carnitine transporter Octn1 (slc22a4). *Biol Pharm Bull*. 31:1580-4 (2008).
 74. Ohashi R, Tamai I, Nezu Ji J, Nikaido H, Hashimoto N, Oku A, Sai Y, Shimane M, Tsuji A. Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. *Mol Pharmacol*. 59:358-66 (2001).
 75. Yokogawa K, Higashi Y, Tamai I, Nomura M, Hashimoto N, Nikaido H, Hayakawa J, Miyamoto K, Tsuji A. Decreased tissue distribution of L-carnitine in juvenile visceral steatosis mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 289:224-30 (1999).
 76. Jong NN, Nakanishi T, Liu JJ, Tamai I, McKeage MJ. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 338:537-47 (2011).
 77. Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J Pharmacol Exp Ther*.

- 319:879-86 (2006).
78. Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol Sci.* 27:587-93 (2006).
79. Martin A. Graham, Graham F. Lockwood, Dennis Greenslade, Silvano Brienza, Martine Bayssas, Erick Gamelin. Clinical Pharmacokinetics of Oxaliplatin: A Critical Review. *Clin Cancer Res.* 6:1205-18 (2000).
80. Estrela GR, Wasinski F, Felizardo RJ, Souza LL, Câmara NO, Bader M, Araujo RC. MATE-1 modulation by kinin B1 receptor enhances cisplatin efflux from renal cells. *Mol Cell Biochem.* 428:101-108 (2017).

謝辞

本研究を進めるに際し、終始御懇切な御指導と御鞭撻を賜りました 九州大学大学院薬学
研究院薬物動態学分野教授 家入 一郎 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究をまとめるに際し種々の有益な御助言と御高閲を賜りました 九州大学大学院薬学
研究院グローバルヘルスケア分野 小柳 悟 教授、九州大学大学院薬学研究院臨床薬物
治療学分野 江頭 伸昭 准教授、ならびに 九州大学大学院薬物動態学分野 廣田 豪
准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるに際し、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました 九州大学名誉教授
大石 了三 先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究を進めるに際し、多大な御助言と御指導を賜りました 九州大学病院 矢野 貴久
先生、山田 孝明 先生、川尻 雄大 先生に深く感謝致します。

本研究を進めるに際し、共に悩み共に実験し、多大な御協力を頂いた 牛尾 聡一郎 氏、
馬場 美咲 氏、崎山 良 氏に心より感謝致します。

本研究に対し、多大なるご協力、ご助言を賜りました 九州大学大学院薬学研究院薬物動態
学分野 臨床薬物治療学分野 卒業生諸氏 ならびに 苦楽を共にした 学生諸子 に心
から感謝致します。

最後に、本研究を含め学生生活を陰ながら支えてくれた家族に深く感謝致します。