

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：



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

薬物動態学分野 3PS14023G 藤田 隼輔

【序論】

オキサリプラチンは消化器系のがんに対して広く適応を持つ白金系抗悪性腫瘍薬である。しかしながら、特徴的な副作用として末梢神経障害を発現することが知られている。この末梢神経障害は用量規制因子とされており、患者の QOL を低下させるだけでなく有効な治療の変更や中止が余儀なくされるため、臨床上大きな問題となっている。その発症メカニズムは未だ完全には明らかになっておらず、有効な対応策の開発が強く望まれている。

オキサリプラチンの長期投与に伴って発現する末梢神経障害は手足の痛みやしびれ、感覚異常などを引き起こすことが知られている。現在までに、しびれに対する漢方製剤である牛車腎気丸や抗酸化作用が期待されるビタミン製剤などの臨床試験が行われてきたが、神経障害に対する顕著な抑制作用は得られていない。近年、*in vivo* での検討において、2型糖尿病治療薬である GLP-1 アナログ製剤がアルツハイマー病モデルラットや神経損傷モデルに対して神経保護または回復作用を示すことが報告されている。本研究の第1章では、オキサリプラチン誘発末梢神経障害の治療薬探索として GLP-1 アナログ製剤であるエキセナチドに着目し、その効果に関して研究を行った。

また、末梢神経障害の原因は末梢からの感覚情報を中継する神経組織である脊髄後根神経節 (DRG) にオキサリプラチンが蓄積することだと考えられている。さらに、オキサリプラチンをはじめとした白金製剤の輸送に薬物トランスポーターが寄与しているとの報告があるが、DRG においてオキサリプラチン輸送を担うトランスポーターは未だ明らかになっていない。第2章では発症メカニズム解明のため、神経細胞に発現する薬物トランスポーターに着目し、オキサリプラチン輸送と神経障害への寄与を明らかにするため、研究を行った。

【方法】

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

1. オキサリプラチンによる細胞毒性及び神経毒性に対するエキセナチドの効果

神経細胞のモデルとして使用されるラット副腎髄質由来褐色細胞腫細胞 (PC12) に対してオキサリプラチンを曝露し、エキセナチド同時曝露による効果を検討した。細胞毒性は CCK-8 assay kit による細胞生存率測定で、神経毒性は神経様突起長の測定によって評価した。

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

6週齢の雄性 SD ラットに対してオキサリプラチン (4 mg/kg, i.v., twice a week) 及びエキセナチド (100 µg/kg, s.c., once a week) を投与し、神経障害の発現を von Frey test で評価した。オキサリプラチン投与開始から 28、42 および 63 日目のラットより坐骨神経を採取し、その断面積を測定して軸索変性の評価を行った。

3. 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

培養した 1.0×10^6 個のマウス大腸がん由来細胞（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。

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

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

1. DRG におけるオキサリプラチントランスポーターのスクリーニング

ラット DRG における mRNA 発現を確認した。測定には real-time PCR 法を用い、Ct 値 30 以下の比較的発現量が多いトランスポーターをその後の検討対象とした。発現が確認された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（100 μ M, 2 h）曝露後の細胞内 Pt 蓄積量を ICP-MS にて測定した。発現ベクターとして pcDNA3.1 を、導入試薬として Lipofectamine 3000 を使用した。

2. 安定発現細胞を用いたトランスポーターの影響評価

上記の検討から、オキサリプラチンを基質とすることが示唆されたトランスポーターを対象に、Flp-In system を用いて安定発現細胞を作製した。オキサリプラチン（50, 100, 200, 500, 1000 μ M, 1 h）曝露後に細胞を回収し、細胞内 Pt 蓄積量を ICP-MS にて測定した。また、細胞障害への影響を評価するため、オキサリプラチン（0.1, 1, 10, 100, 1000 μ M, 72 h）曝露後の細胞生存率を CCK-8 assay にて測定した。

3. オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルラットにおけるトランスポーターノックダウンの影響評価

オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルラットの DRG においてトランスポーターのノックダウンを行い、その影響を評価した。ノックダウンには AteloGene Local Use “Quick Gelation” を使用し、オキサリプラチン投与開始 7 日前より週 1 回髄腔内投与を行った。末梢神経障害の評価として von Frey test を実施した。オキサリプラチン投与開始から 17 日目または 28 日目に DRG を採取し、組織内 Pt 蓄積量を ICP-MS を用いて測定した。

【結果】

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影響評価

オキサリプラチンによる細胞毒性および神経毒性に与える影響を評価するため、オキサリプラチン曝露時の細胞生存率と神経様突起長を測定した。オキサリプラチンの曝露によって PC12 細胞の細胞生存率低下、神経様突起の短縮がみられた。エキセナチドを併用することによって細胞生存率に改善がみられなかった一方で、神経様突起の伸展が確認された。エキセナチドの神経保護効果が確認されたことから、オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルラットへのエキセナチド投与によって神経障害への影響を評価した。オキサリプラチンの投与によって末梢神経障害が発現し、反応閾値の低下する 28 日目まではエキセナチド投与による症状の改善はみられなかった。オキサリプラチンによる坐骨神経の形態学的な変化も抑制しておらず、末梢神経障害の発現には影響を与えないことが明らかとなった。その後、オキサリプラチンの投与を終了しエキセナチドの投与のみを継

続いて行い、末梢神経障害からの回復過程への影響について検討を行った。その結果、エキセナチド併用群でのみ早期に反応閾値の低下が改善され、坐骨神経組織も正常に回復した (Fig. 1)。

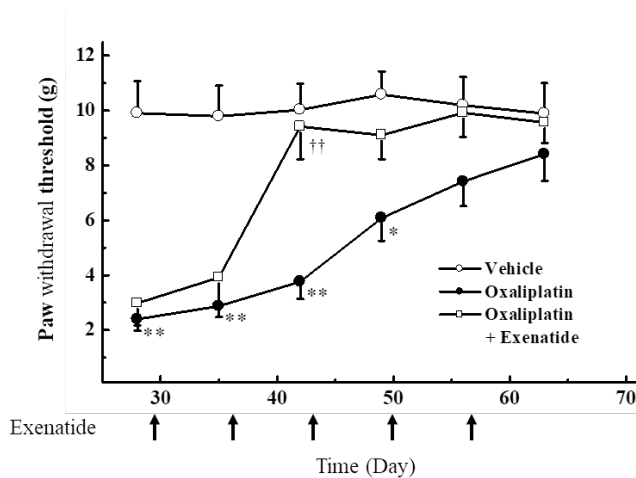


Fig. 1 Effects of exenatide on recovery from mechanical allodynia induced by oxaliplatin.

Oxaliplatin treatment ceased on day 23, however exenatide treatment was continued for additional 5 weeks. 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 $\pm$ S.E.M. ($n = 5$ or 6). Value are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ compared with oxaliplatin alone.

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は影響を与えないが、回復を促進することが明らかとなった。同時に、坐骨神経の形態学的な変化も回復させた。最後にオキサリプラチンの治療効果に与える影響を評価したところ、担がんマウスを用いた検討では抗腫瘍効果には影響を与えないことが確認された。

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

プラチナ製剤を輸送する 21 種のトランスポーターを対象に DRG における mRNA を測定したところ、12 種の発現が確認された。この 12 種のトランスポーターを HEK293 細胞に一過性に過剰発現させ、オキサリプラチン曝露後の細胞内蓄積量を測定したところ、Octn1、Octn2、Mate1 発現細胞で顕著な Pt 蓄積量の増加がみられた (Fig. 2)。

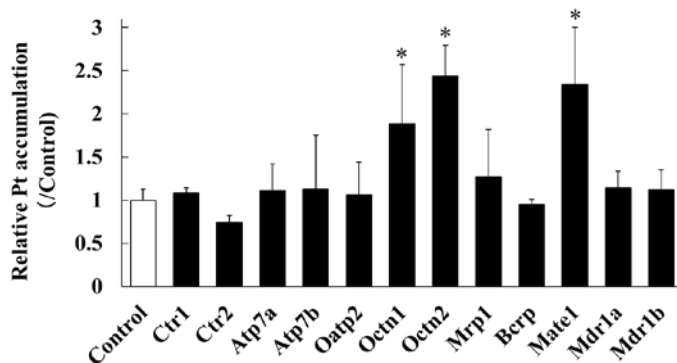


Fig. 2 Platinum accumulation in drug transporter-transfected HEK293 cells.

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 Control ($n = 4$). * $P < 0.05$ compared with Control.

これらのトランスポーターの安定発現細胞を Flp-In system を使用して作製し、各トランスポーターによるオキサリプラチン輸送と細胞毒性の変化について検討を行った。その結果、トランスポーターの発現によってオキサリプラチン蓄積量と細胞毒性の増加がみられた。同様に神経のモデルとされる PC12 細胞にトランスポーターを発現させ神経毒性にあたえる影響を評価したところ、神経毒性が増大した。

さらにラット DRG に siRNA を投与し、各トランスポーターによる Pt 輸送が末梢神経障害に与える影響を評価した。Octn1 ノックダウンによって末梢神経障害が軽減し (Fig. 3A)、Octn2 のノ

ックダウンでは末梢神経障害への影響は認めなかった (Fig. 3B)。一方、Mate1 のノックダウンにより、末梢神経障害は増悪した (Fig. 3C)。同条件下での DRG 組織内 Pt 蓄積量を測定したところ、トランスポーターノックダウンによる末梢神経障害への影響は、Pt 蓄積量の変化に基づくことを示唆する結果を得た。

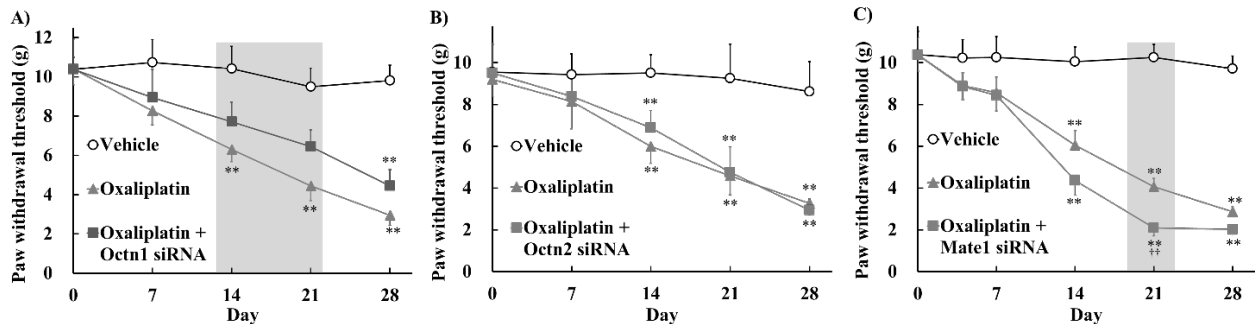


Fig. 3 Effects of in vivo knockdown of transporter on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy.

Oxaliplatin (4 mg/kg) was administered i.v. twice per week for 4 weeks (day 0, 1, 7, 8, 14, 15, 21 and 22). Each siRNA was administered intrathecally once per week for 5 weeks (day -7, 0, 7, 14 and 21). The von Frey test was performed to evaluate the effects of each knockdown of transporter (A) Octn1, (B) Octn2 and (C) Mate1 before the drug administration on days 0 and day 7, 14, 21 and 28. Value are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). ** $P < 0.01$ compared with Vehicle. ** $P < 0.01$ compared with Oxaliplatin.

【考察】

本研究ではオキサリプラチン誘発末梢神経障害の克服を目指し、治療薬探索とメカニズムの解明を行った。

第一章では末梢神経障害の治療薬探索として、GLP-1 アナログ製剤であるエキセナチドの効果を明らかにした。すでに糖尿病治療薬として臨床使用されている薬剤であり、オキサリプラチンの治療効果を低下させずに回復を促進する作用が確認されたことから、末梢神経障害の治療薬としての有用性が示唆された。

第二章では神経障害発現メカニズムの一端を明らかにするため、神経組織に発現するトランスポーターの役割を明らかにした。過剰発現細胞を用いた検討において、Octn1、Octn2、Mate1 の 3 つのトランスポーターはオキサリプラチンを輸送することが示唆された。また、ラットを用いた検討から DRG において Octn1 がオキサリプラチンの取り込みを、Mate1 がオキサリプラチンの排出を担っていることが示唆された。Mate1 は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働く一方、基質の濃度勾配に依存して双方向性に基質を輸送することが明らかになっている。本検討において過剰発現細胞では培地中のオキサリプラチン濃度が高く、モデルラットでは細胞内と比較して DRG 細胞外のオキサリプラチン濃度が低かったことで Mate1 による輸送方向が異なっただと考えられる。神経組織において Octn1 阻害または Mate1 の活性を上昇させることで末梢神経障害を予防できる可能性が考えられる。

今後、本研究がオキサリプラチン誘発末梢神経障害の治療法・予防法開発の一助となることを期待する。

【発表論文】

Exenatide Facilitates Recovery from Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Rats.

Fujita S, Ushio S, Ozawa N, Masuguchi K, Kawashiri T, Oishi R, Egashira N. (2015) *PLoS One*. 10:e0141921.