

抗がん薬オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対する新規予防薬の探索

山本, 将大

<https://hdl.handle.net/2324/1931864>

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：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

抗がん薬オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対する新規予防薬の探索

臨床薬物治療学分野 3PS14024R 山本将大

【序論】

オキサリプラチンは、結腸・直腸癌、膵癌および胃癌における化学療法に対して適応を有する白金系抗がん薬であり、その特徴的な副作用として、投与を受けたほぼすべての患者において発症する末梢神経障害が臨床的大きな問題となっている。オキサリプラチンによる末梢神経障害は、発症する症状や時期により急性神経障害と慢性神経障害の2つに分類される。急性神経障害は、投与開始から数時間以内に発症し、冷たいものに触れることで引き起こされる手足末端や口周辺の不快感などの一過性の症状が挙げられる。一方、慢性神経障害は、投与を繰り返すことで累積投与量依存的に、手足のしびれや疼痛、運動機能障害などの症状を発症し、多くの場合は治療終了後も継続する。世界最大のがん学会である American Society of Clinical Oncology (ASCO: 米国臨床腫瘍学会) が 2014 年に発表した化学療法誘発末梢神経障害の治療ガイドラインによると、オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対して予防薬として推奨される薬剤は皆無であり、新規予防薬の登場が切望されている。そこで本研究では、オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対する予防薬候補を、迅速に臨床応用可能な既承認医薬品から見出すこと、そして基礎的エビデンスを構築することを目的に検討を行った。

第 1 章と第 2 章では、これまで明らかにしてきたオキサリプラチン誘発機械的アロディニア(慢性神経障害)および冷感アロディニア(急性神経障害)の各発症メカニズムを基に、グルタミン酸トランスポーター活性化作用やカルシウムチャンネル拮抗作用を有する、筋萎縮性側索硬化症治療薬リルゾールに着目して検討を行った。

第 3 章では、オキサリプラチン誘発末梢神経障害ラットモデルにおいて、機械的アロディニア発症時に坐骨神経軸索の変性が認められるという知見に着目し、*in vitro* ハイスループット形態解析スクリーニング法の構築と、その利用により、神経変性に対して保護作用を有する既承認医薬品を見出すことを目的に検討を行った。

【実験】

オキサリプラチン誘発末梢神経障害ラットモデル作製法および疼痛行動測定法

5-6 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットに、オキサリプラチン(4 mg/kg)を週 2 回 4 週間、腹腔内に反復投与することで、ラットモデルを作製した。ラット足底部に対して、von Frey フィラメントもしくはアセトンを用いて刺激を与え、機械刺激および冷刺激への応答性を評価した。

ラット脊髄および脊髄後根神経節(DRG)組織における疼痛関連分子の発現量測定法

オキサリプラチン誘発末梢神経障害ラットモデル(day 28)から摘出した脊髄後角組織からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットリング法を用いて、glutamate transporter 1 (GLT-1)タンパク質発現量を測定した。また、同ラットモデル(day 5)から摘出した DRG 組織から total RNA を抽出し、real-time PCR 法を用いて、transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) mRNA 発現量を測定した。

オキサリプラチン誘発神経傷害 *in vitro* モデル確立と神経突起長測定法

F11 細胞(ラット胚 DRG 神経細胞とマウス神経芽細胞腫細胞株 N18TG2 の体細胞雑種)に対して、神経突起伸長促進作用が知られている forskolin (10 μ M) を 96 時間処置することで、十分な神経突起を伸長した F11 細胞を作製した。同細胞にオキサリプラチンを処置することで神経変性を誘導した。また、各化合物はオキサリプラチン処置の 30 分前から実験終了まで処置した。オキサリプラチンおよび化合物を処置した細胞の形態解析時には、細胞体染色に Calcein-AM、核染色に Hoechst 33342 を用い、IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) で撮影した。画像解析は解析ソフトウェア IN Cell Investigator を用いて、神経突起長の評価を行った。また、各試薬の処置と培地交換は、Biomek NX^P (ベックマン・コールター株式会社) を用いて行った。

(第1章)オキサリプラチンによる脊髄細胞外グルタミン酸の恒常性破綻に対する

筋萎縮性側索硬化症治療薬リルゾールの有用性

【結果】

オキサリプラチン処置ラットでは、機械的アロディニア発症時(day 28)に、脊髄後角 GLT-1 発現量の低下、腰部脊髄(L4-L6)近傍の脳脊髄液中グルタミン酸濃度や機械刺激時のグルタミン酸放出量の増加が認められた。一方、リルゾール(12mg/kg)を1日1回27日間、経口投与によりオキサリプラチンと併用処置したラットでは、これらすべてが抑制でき、且つ、機械的アロディニア発症が抑制できた(Fig. 1a-c)。さらに、マウス結腸線癌由来細胞株 C-26 細胞を用いた検討では、オキサリプラチンによる抗腫瘍効果に対して、リルゾールは影響しないことが確認できた(Fig. 1d)。

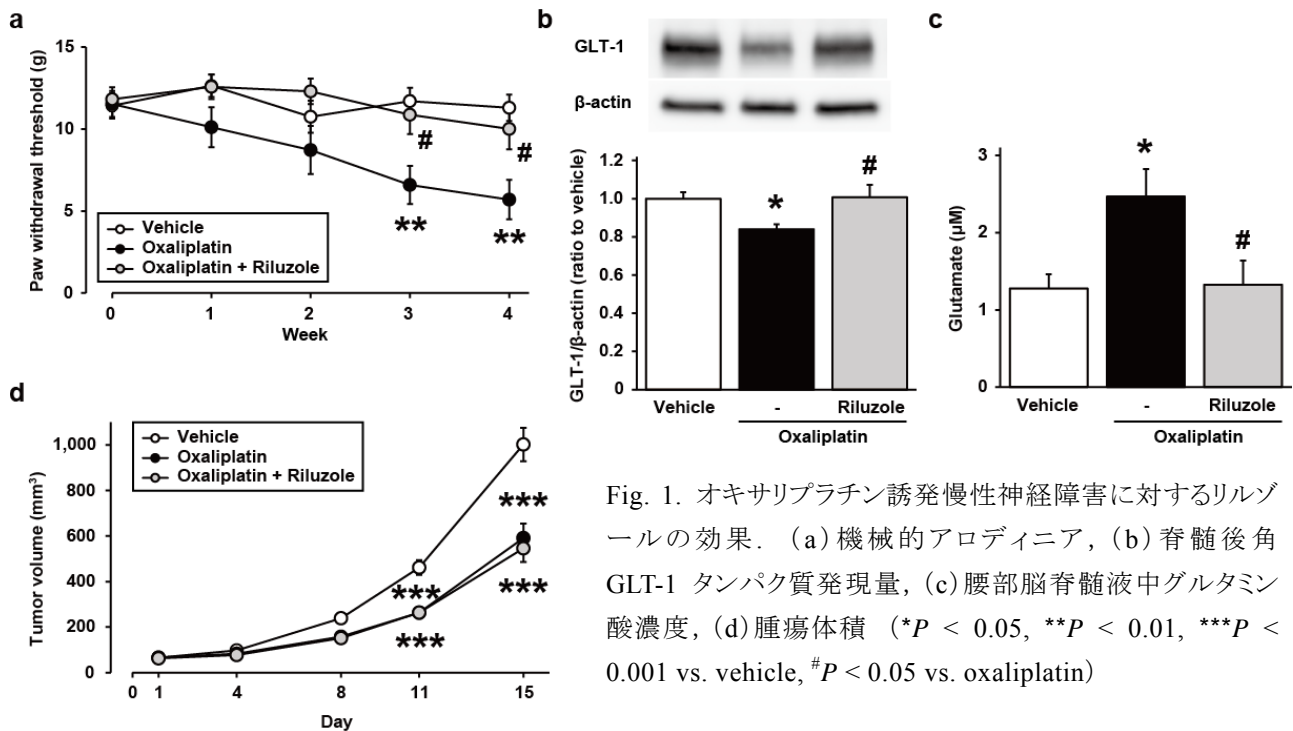


Fig. 1. オキサリプラチン誘発慢性神経障害に対するリルゾールの効果. (a) 機械的アロディニア, (b) 脊髄後角 GLT-1 タンパク質発現量, (c) 腰部脳脊髄液中グルタミン酸濃度, (d) 腫瘍体積 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. vehicle, # $P < 0.05$ vs. oxaliplatin)

【考察】

以前の研究により、オキサリプラチン処置による機械的アロディニア発症時には、脊髄グルタミン酸濃度が増加する知見が得られていた(牛尾聡一郎, 博士論文, 2015)。第1章では、ウェスタンブロッティング法を用いたタンパク質発現量の定量的解析により、オキサリプラチン処置動物(day 28)の脊髄後角組織における GLT-1 の発現量が有意に低下しており、グルタミン酸濃度増加の一因である可能性を示唆した。さらに、リルゾールの併用によりグルタミン酸トランスポーターを活性化すると、GLT-1 発現量の低下、グルタミン酸濃度や機械刺激時のグルタミン酸放出の変化がすべて抑制できた。さらに、機械的アロディニアの発症が抑制できたことから、単なる現象論として認められていた脊髄グルタミン酸恒常性の破綻が、機械的アロディニアの発症と強く関与していることが明確に示唆された。また、脊髄グルタミン酸恒常性の維持を標的とした薬物治療が有効であることを示すだけでなく、オキサリプラチンによる抗腫瘍効果に影響しなかったことから、安全に使用できることが確認できた。

(第2章)オキサリプラチン誘発冷感アロディニアに対するリルゾールの保護メカニズム

【結果】

オキサリプラチン処置ラットの DRG では、冷感アロディニア発症時(day 5)に、低温感受性チャネル TRPM8 の発現増加が認められた。一方、リルゾール(12mg/kg)を1日1回4日間、経口投与によりオキサリプラチンと併用処置したところ、冷感アロディニアならびに TRPM8 発現増加が抑制できた(Fig. 2a,b)。また、初代培養 DRG 神経

細胞を用いたカルシウムイメージングでは、オキサレート処置によるメントール (TRPM8 作用薬) 感受性細胞数の増加が、リルゾール (10 μ M) の併用処置により抑制された (Fig. 2c)。

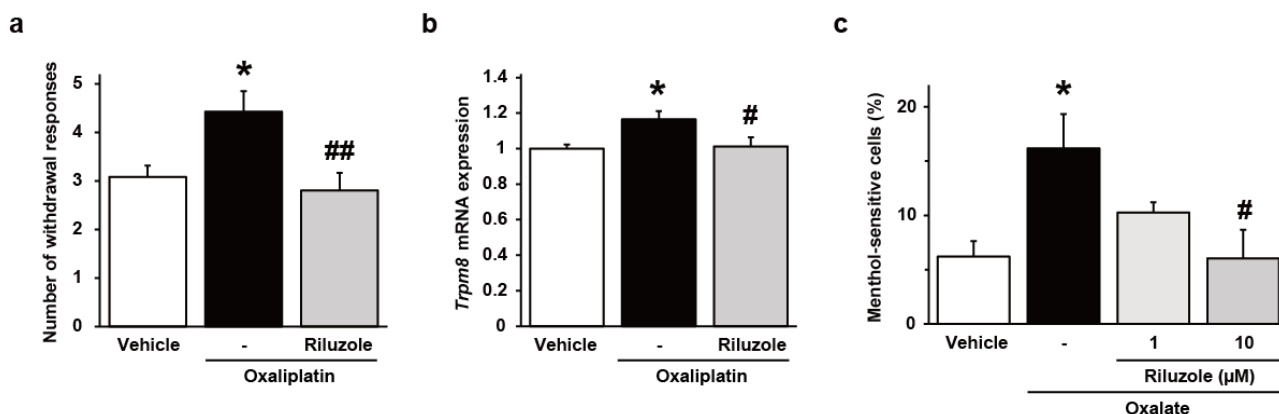


Fig. 2. オキサリプラチン誘発冷感アロディニアならびに TRPM8 活性化に対するリルゾールの効果. (a) 冷感アロディニア (day 5), (b) DRG 組織中 TRPM8 mRNA 発現量 (day 5), (c) カルシウムイメージングにおけるメントール感受性細胞数 (* $P < 0.05$ vs. vehicle, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. oxaliplatin or oxalate)

【考察】

過去の知見から、オキサリプラチン(および代謝物オキサレート)がカルシウムチャネル依存的に TRPM8 を増加させることが明らかになっている。一方、リルゾールは、グルタミン酸トランスポーター活性化作用のみでなく、カルシウムチャネル拮抗作用を有することが報告されており、リルゾールの有する多様な薬理作用の中でも、特にカルシウムチャネル拮抗作用を介して TRPM8 発現増加を抑制し、オキサリプラチンによる冷感アロディニアの発症を抑制したことが考えられる。第 2 章の検討により、リルゾールは、第 1 章で明らかにしたオキサリプラチン誘発慢性神経障害に対する予防効果だけでなく、慢性神経障害とは異なる分子標的を制御することで急性神経障害に対しても予防効果を発揮することが明らかになり、臨床現場において非常に有用であることが期待できる。

(第 3 章)オキサリプラチンによる神経傷害に着目した新規予防薬の探索

【結果】

神経突起を十分に伸ばしたラット DRG 由来細胞株 F11 細胞に対して、オキサリプラチン (100 μ M, 48 h) を処置することで神経突起の退縮を誘導し、オキサリプラチン誘発神経傷害 *in vitro* モデルを確立した。この *in vitro* モデルにおいて、既承認医薬品を含む化合物ライブラリーを用いたハイスループット形態解析スクリーニングを行い、神経変性に対して保護作用を持つ候補薬物として閉経後乳癌治療薬フルベストラントを見出した (Fig. 3a-d)。さらに、ラットモデルを用いた *in vivo* 評価において、フルベストラント (10 mg/kg, 週 1 回 5 週間, 皮下投与) 併用処置ラットでは、機械的アロディニア発症が抑制された (Fig. 3e)。また、第 1 章と同様に抗腫瘍効果に対する影響を評価し、フルベストラントは影響しないことが確認できた。

【考察】

第 3 章により、オキサリプラチンによる末梢神経傷害および機械的アロディニアに対して、既承認薬であるフルベストラントが保護作用を有することが明らかになった。また、神経傷害の保護により機械的アロディニアの発症を抑制できたことから、これまで不明瞭であった、末梢神経の傷害と機械的アロディニア発症との関連をより強く示唆することができた。神経保護作用のメカニズムについては更なる検討が必要だが、フルベストラントがオキサリプラチンによる抗腫瘍効果に対して影響を与えることなく慢性神経障害の発症を抑える有用な予防薬になりうることを期待できる。

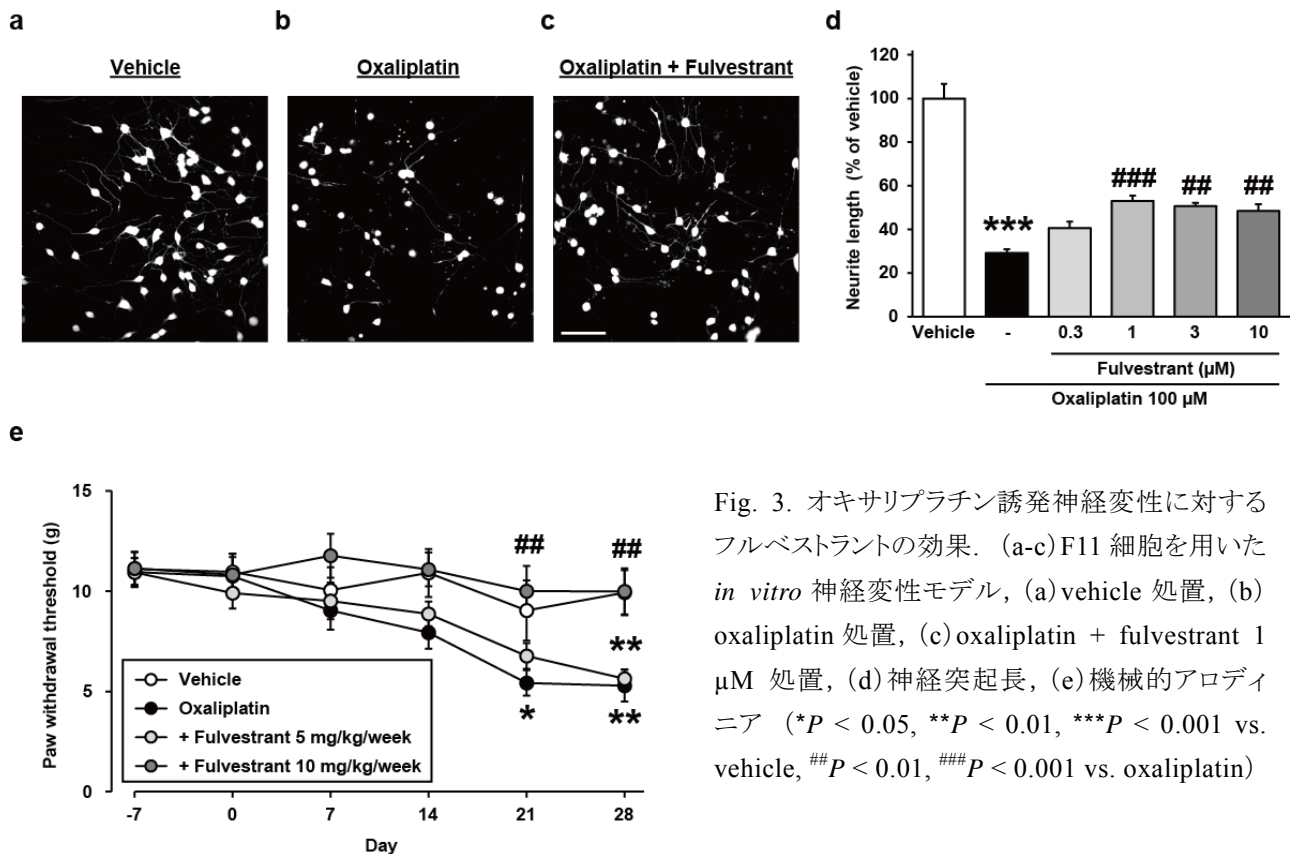


Fig. 3. オキサリプラチン誘発神経変性に対するフルベストラントの効果. (a-c) F11 細胞を用いた *in vitro* 神経変性モデル, (a) vehicle 処置, (b) oxaliplatin 処置, (c) oxaliplatin + fulvestrant 1 μM 処置, (d) 神経突起長, (e) 機械的アロディニア (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. vehicle, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. oxaliplatin)

【総括】

本研究成果により、オキサリプラチンによる脊髄グルタミン酸の恒常性破綻が機械的アロディニアの要因のひとつであること、さらに、末梢神経変性もまた、機械的アロディニア発症の要因であることが明らかになった。また、既承認医薬品であるリルゾールやフルベストラントの併用により、オキサリプラチン誘発末梢神経障害が予防できることが明らかになった。ヒトにおける安全性が保証された既承認医薬品による予防効果を見出したことから、本研究成果が迅速に臨床現場へと還元され、がんサバイバーの QOL 改善に繋がることを期待する。

【発表文献】

1. **Yamamoto S**, Kawashiri T, Higuchi H, Tsutsumi K, Ushio S, Kaname T, Shirahama M, Egashira N. Behavioral and pharmacological characteristics of bortezomib-induced peripheral neuropathy in rats. *J Pharmacol Sci.* 129(1):43-50 (2015).
2. Higuchi H, **Yamamoto S**, Ushio S, Kawashiri T, Egashira N. Goshajinkigan reduces bortezomib-induced mechanical allodynia in rats: Possible involvement of kappa opioid receptor. *J Pharmacol Sci.* 129(3):196-9 (2015).
3. Yamashita T, **Yamamoto S**, Zhang J, Kometani M, Tomiyama D, Kohno K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Tsuda M, Duloxetine Inhibits Microglial P2X4 Receptor Function and Alleviates Neuropathic Pain after Peripheral Nerve Injury. *PLoS One.* 11(10):e0165189 (2016).
4. **Yamamoto S***, Ushio S*, Egashira N, Kawashiri T, Mitsuyasu S, Higuchi H, Ozawa N, Masuguchi K, Ono Y, Masuda S. Excessive spinal glutamate transmission is involved in oxaliplatin-induced mechanical allodynia: a possibility for riluzole as a prophylactic drug. *Sci Rep.* 7(1):9661 (2017). (*These authors contributed equally to this work.)