

令和元年6月14日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08395

研究課題名(和文) 薬剤性末梢神経障害の軽減を目的とした時間薬物療法の応用

研究課題名(英文) Application of chronotherapy to decrease the drug-induced peripheral neuropathy

研究代表者

藤 秀人 (To, Hideto)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：90346809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：プラチナ系抗がん剤であるシスプラチンとオキサリプラチンの副作用に、末梢神経障害がある。本研究では、投薬時刻を考慮し、この副作用を軽減することを目的とした。実験動物を対象に、両薬物を種々時刻に投薬したところ、これらの副作用を軽減できる投薬時刻があることを明らかにした。また、これらの副作用を抑制できるメカニズムを明らかにした。また、シスプラチンでは、時間治療でも改善できなかった神経過敏症を、既存の薬物の併用で改善できることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラチナ系抗がん剤であるシスプラチンとオキサリプラチンの投薬によって生じる末梢神経障害は、未だ予防法や治療法が開発されていない。本研究では、投薬タイミングを考慮することで、これらの副作用を軽減できることを明らかにした。オキサリプラチンの末梢神経障害については、今後、臨床試験を実施し、基礎研究で得られた成果が実臨床でも有益であるか評価する予定である。ここで有用性が明らかになれば、オキサリプラチンを使用するがん患者にとっては神経障害のない治療を提供できることになる。

研究成果の概要(英文)：A side effect of cisplatin and oxaliplatin which are platinum-based anticancer drugs is peripheral neuropathy. In this study, it was intended to relieve this side effect in consideration of the dosing-time of medication. After giving both drugs in animals in various dosing-time, we determined that there was the dosing-time when we could relieve these side effects. We determined the mechanism that could inhibit these side effects. With cisplatin, we proved that even chronotherapy could improve the nervousness that was not able to be improved by the combination of the existing drug.

研究分野：時間薬理学

キーワード：時間治療 末梢神経障害 パクリタキセル オキサリプラチン シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

がん化学療法において、副作用発現による治療の中断は、治療効果を減弱させるだけでなく、患者の治療に対するモチベーションも低減させてしまうおそれがあるため、十分に留意すべき問題である。特に、嘔気・嘔吐、末梢神経障害は、骨髄抑制と比較して、患者の自覚症状として現れるため、例え治療成績が良好であっても、患者による治療拒否により治療を断念せざるを得ないときもある。そのため、抗がん剤による末梢神経障害を抑制もしくは軽減することができる治療薬や治療法の開発は、化学療法を多くの患者で成功させるためにも急務であり、重要な課題であると考えられる。

地球上に存在するほとんどの生物には、種々の生体成分で概日リズムが認められる。近年、この概日リズムに関する研究が盛んにおこなわれ、早朝に高発現する喘息発作や関節リウマチの関節痛など、病状にも一日の中で発現しやすい時間帯があることが報告され、これを基にした薬物治療(時間治療)は一定の成果を収めている。抗がん剤領域においても、このような方法論を用いた薬物療法の構築がなされている。申請者はこれまで、がん患者および実験動物を対象にシスプラチンの毒性軽減を目的とした時間治療学及び時間薬理学的な検討を行ってきた。これらの結果より、臨床上大変問題となっているシスプラチン投薬時に生じる嘔吐が投薬時刻を考慮することで軽減できることを泌尿器系がん患者にて明らかにした(Chronobiol. Internatio. 18: 851, 2001)。また、実験動物を対象とした研究では、シスプラチンによる腎毒性の発現が投薬時刻の違いによって軽減できることを明らかにした(J. Pharm. Pharmacol. 52: 1233-1237, 2000; J. Pharm. Pharmacol. 52: 1499-1504, 2000)。以上のようにシスプラチンの毒性は、投薬時刻を考慮することで軽減できる可能性がある。

そこで、上記の研究手法を応用し、シスプラチンの末梢神経障害モデルを作成した。予備実験ではあるが、Dubuissonらの方法に準拠した formalin テストを用い、60 分間の痛み行動をスコア化した。シスプラチン(4 mg/kg)を1週間に1回、5:00 または 17:00 に計4回静脈内投薬を行い、シスプラチン最終投与後7日目に formalin テストを行った結果、17:00 投薬群は Control 群及び 5:00 投薬群と比較し顕著に痛みスコアが低下した。これを台形法により Area Under the Curve (AUC) を算出したところ、Control 群及び 5:00 投薬群と比較し、17:00 投薬群で有意に AUC が 4.0 - 4.1 倍低値を示した(P<0.01)。これは、17:00 投薬群が痛みに関する反応が鈍くなっていることを示すものであり、17:00 投薬群では末梢神経障害が発症していると考えられる。一方、5:00 投薬群では、control 群と同様の痛覚反応を示しており、5:00 投薬群では末梢神経障害の発現を抑制できる可能性が示唆された(BMC Cancer 16:756, 2016)。さらに、von Frey test で得られた機械刺激の閾値は、5:00 投薬群で、初回投薬直後から減少し続けた。一方、17:00 投薬群では、初回投薬後から、day 6 まで減少した後、増加傾向に転じ、末梢神経障害が改善されたと考えられた。しかし、von frey test は痛覚鈍麻を評価するには適していない方法のため、day 28 において、痛覚鈍麻を評価できる Hot plate test を用いて検討したところ、17:00 投薬群では、5:00 投薬群及び control 群と比較して、逃避行動を示すまでの時間が明らかに延長し、痛覚鈍麻が認められた(Fig. 1)。以上のことから、投薬時刻を考慮することで、シスプラチン使用時における痛覚過敏を軽減できなかったが、重症化を抑制又は遅延できると考えられる。

以上より、シスプラチン誘発末梢神経障害においても投薬タイミングを考慮することで毒性の軽減が可能になることを提示できるとともに、詳細な機序を解明することで新たな薬物療法の糸口が見いだせるのではないかと考えている。

抗がん剤による末梢神経障害の症状には、大きく分けて3種類に分類される。

1. アロディニア(軽微な刺激でも痛いと感じる。)
2. 痛覚鈍磨(神経の破壊により痛覚がなくなる。)
3. 冷感過敏(水などの冷たいものをさわると痛いと感じる。)

これらは、いずれも患者の生命を脅かす副作用ではないが、Quality of Life を低下させ、化学療法の継続を阻害する要因となる。これまで、多くの基礎研究がなされており、実験動物を対象に、これらを定量的に評価する方法は確立されている。申請者も、すでに、アロディニア及び痛覚鈍磨については、手技を獲得しており、それを用いた時間薬理学研究も実践済みである。冷感過敏反応を評価できることで、薬剤性末梢神経障害を評価するための基礎研究に関する研究基盤はほぼ整う。また、本年度より、富山大学病院の各診療科と連携し、抗がん剤などを用いた時間薬物療法の臨床研究に向けたディスカッションを開始した。

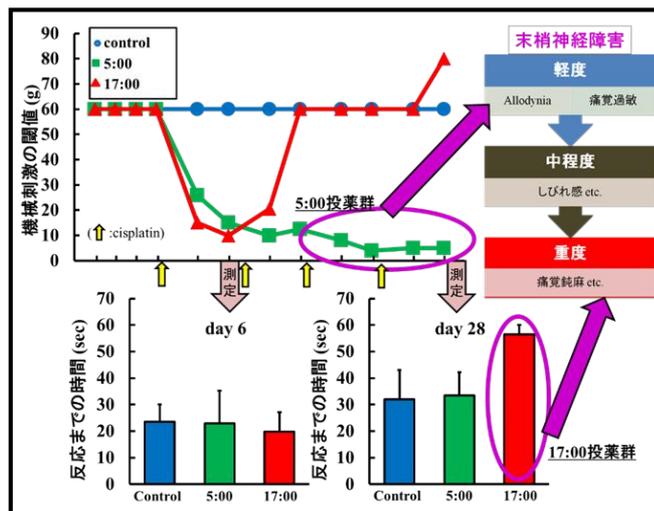


Fig.1 末梢神経障害に及ぼす cisplatin の投薬時刻の影響 (機械的・熱的侵害試験法)

そこで、本研究では、時間薬物療法を基盤に抗がん剤の末梢神経障害の軽減を目指し、実験動物を対象にプラチナ系の抗がん剤を中心に実験するとともに、その機序の解明を試みる。また、得られた成果は、臨床医とディスカッションを行い、臨床研究へと展開する（臨床研究は、別のプロジェクトとする。）。

## 2．研究の目的

Cisplatin：

- ・末梢神経障害の重症化の進度が、投薬時刻の違いによって変化する機序の解明を行う。
- ・時間薬物療法の臨床応用に向けた基礎研究を実施する。

Oxaliplatin：

- ・冷感過敏反応に及ぼす投薬時刻の影響およびその機序解明を行う。
- ・時間薬物療法の臨床応用に向けた基礎研究を実施し、臨床試験計画を立てる。

Paclitaxel：

- ・投薬時刻の違いによる末梢神経障害への影響およびその機序解明を行う。

## 3．研究の方法

Cisplatin

### 試験 1-1：作用機序の解明

これまで投薬時刻を考慮することで、神経傷害の進度を遅延させている可能性が明らかになっている。ここでは、その原因を明らかにするために、以下の実験を行う。

- ・病理評価：DRG や坐骨神経、後肢の足裏などの神経の形状や傷害の程度を電子顕微鏡などにより評価したり、疼痛物質の発現量などを蛍光染色などによって評価する。
- ・疼痛物質など測定：CGRP などの血中や神経組織に存在する疼痛物質の濃度などを定量的もしくは定性的（病理評価）に測定する。
- ・生体リズム評価：Cisplatin の組織内取り込みや排出、神経伝達物質の分泌、疼痛に関与する神経の受容体などの遺伝子発現や組織内濃度や局在部位濃度などを定量的遺伝子解析やウエスタンブロットなどの分子生物学的手法を用い測定する。

### 試験 1-2：治療効果向上を目指した投薬方法の検討

現段階では、Cisplatin の時間治療は神経傷害の進行を抑制することに有益であるが、投与初期に現れるアロディニアを十分に抑制することはできていない。Cisplatin の時間治療を臨床応用するためには、このアロディニアを抑制する必要がある。そこで、本試験では、神経障害性疼痛に使用されるプレガバリンと、GABA 賦活により鎮痛作用を示すバルプロ酸を用いて、アロディニア改善を試みる。

- ・安全性評価：白血球数、腎機能、肝機能を経日的に測定する。
- ・有効性評価：Cisplatin の反復投薬による痛覚鈍磨の測定には熱的侵害試験法などを、アロディニアの測定には機械的侵害試験法などを経日的に実施する。
- ・作用機序：プレガバリンやバルプロ酸の併用により、アロディニアが改善されたときは、その機序解明を試験 1-1 の測定技法を応用し評価する。

Oxaliplatin

### 試験 2-1：投薬タイミングの違いによる末梢神経障害への影響及び作用機序の解明

Oxaliplatin は臨床では、冷感過敏反応が点滴投薬中から発生することもあり、治療の継続を困難にすることも多い。そこで、Oxaliplatin の投薬時刻の違いによる冷感刺激障害への影響を評価する。

- ・投薬時刻：9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00
- ・安全性評価：白血球数、腎機能、肝機能を経日的に測定する。
- ・有効性評価：Oxaliplatin の反復投薬による冷感過敏反応の測定にはアセトン試験などを経日的に実施する。
- ・原因化合物の評価：Oxaliplatin には、主代謝物として Pt(DACH)Cl<sub>2</sub> と oxalate の 2 種がある。これらのいずれが冷感刺激障害の要因となっているのか評価するために、Pt(DACH)Cl<sub>2</sub> と oxalate 任意の時刻に投薬し、アセトン試験にて冷感刺激障害を評価する。

### 試験 2-2：治療効果向上を目指した投薬方法の検討

これらの実験については、試験 1-1, 1-2 の Cisplatin における試験内容を応用し、Oxaliplatin および代謝物の血中及び脊髄後根神経節 (DRG) 中薬物濃度を測定したり、神経組織の病理診断（組織像、電子顕微鏡）評価や疼痛物質など測定、神経障害や冷感刺激に高発現する関連タンパク質および遺伝子発現量の評価、生体リズム評価を行い、Oxaliplatin の投薬時刻の違いによる有効性・安全性の機構解明を行う。

Paclitaxel

### 試験 3-1：投薬タイミングの違いによる末梢神経障害への影響及び作用機序の解明

Paclitaxel は、これまで基礎・臨床研究にて時間薬物療法の有用性を評価されえない。そこで、Paclitaxel の投薬時刻の違いによる末梢神経障害への影響を評価する。評価項目は、上記の試験 1, 2 で使用した実験手法を応用する。機序についても同様に、上記の実験手法を応用し、対象評価項目を適宜変更し、対応する。

## 4．研究成果

### 試験 1: Cisplatin

Cisplatin の投薬時刻を考慮することで、末梢神経障害の重症化を遅延できる可能性を明らかにした。この要因として、神経修復因子やアポトーシス、フリーラジカル関連因子など種々の因子について評価した。その結果、投薬時刻の違いによって神経組織におけるフリーラジカル量などに顕著な差異が生じた。これらの影響によって、Cisplatin による神経障害に差異が発現しているものと考えられる。

神経障害性疼痛で用いられる pregabalin (PGN) を Cisplatin と併用したところ、CDDP 誘発痛覚過敏反応を抑制することが確認された。しかし、PGN の投与を中止すると痛覚過敏が発現するため、CDDP による神経傷害に対して PGN は、効果がないと考えられる。抗てんかん薬である valproate (VPA) は、脊髄損傷や脊髄結紮に対して神経修復作用を有するという報告がある。そこで、本研究では、VPA が CDDP 誘発痛覚過敏反応の改善に有効か否かを検討した。VPA は、CDDP の抗腫瘍効果および肝機能障害に影響を与えることなく、CDDP 誘発痛覚過敏反応に対して鎮痛作用を有することが明らかになった。また、VPA は投与中止後においても鎮痛作用を示したことから痛覚の伝達だけでなく CDDP による神経傷害の抑制にも関与していると考えられる。

### 試験 2: Oxaliplatin

Oxaliplatin の投薬時刻を考慮することで、冷感過敏反応は改善できることが明らかになった。また、この原因因子として、主代謝物として Pt(DACH)Cl<sub>2</sub> と oxalate の 2 種を同様に評価したところ、oxalate が冷感過敏反応の日内変動に影響を及ぼしているものと考えられた。冷感に関与する温度受容体として、低温領域では TRPA1 や TRP M8 が関与する。これらの阻害剤と Oxaliplatin の併用実験を実施しており、投薬初期における Oxaliplatin の薬理作用の違いには、TRPA1 が関与することを明らかにした。さらに、Oxaliplatin 投薬数日後では、TRPM8 が神経障害に関与していた。本研究によって、投薬タイミングの違いによる Oxaliplatin の神経障害には、TRPA1 及び TRP M8 が相補的に関与していることを明らかにした。

現在、本研究成果を基礎として、臨床医と協議し、臨床研究実施に向けた研究計画書を作成している。

### 試験 3: Paclitaxel

Paclitaxel (PTX) 誘発末梢神経障害モデル動物を作成するために、2 mg/kg を 4 回または 8 mg/kg を 3 回間欠投薬した。Day 17 および 25 において PTX 2 mg/kg 投薬群および 8 mg/kg 投薬群で、control 群と比較して機械刺激の閾値が有意に低下した。どちらの投薬スケジュールにおいてもモデル作製が可能であると判断したが、PTX 2 mg/kg 投薬で検討している文献が多くみられた。そこで、投薬スケジュールを 2 mg/kg の 1 日おき 4 回投薬に決定した。次に決定した投薬スケジュールを用いて、末梢神経障害に及ぼす PTX の投薬時刻の影響を検討した。PTX を 4:00, 10:00, 16:00, 22:00 に投薬し、von Frey test を行い、50%疼痛閾値により評価した。Day 17 において、4:00 および 16:00, 22:00 投薬群は control 群と比較して 50%疼痛閾値の有意な減少がみられた。また、10:00 投薬群では control 群と比較して有意な差はみられず、末梢神経障害が軽減できていると考えられた。次に、痛覚鈍麻の発症の有無を評価するために、day 18 および 25 において Hot plate test を行った。その結果、day 18 および 25 においていずれの投薬時刻群でも control 群と比較して有意な差はみられず、感覚鈍麻はみられなかった。投薬時刻の違いによって PTX による神経障害に差異が生じる可能性がある。

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Seto Y., Oazaki F., Horikawa K., Zhang J., Sasaki H., To H., Influence of dosing times on cisplatin-induced peripheral neuropathy in rats. *BMC Cancer* 16 : 756, 2016.

Seto Y, Takase M, Tsuji Y, To H., Pregabalin reduces cisplatin-induced mechanical allodynia in rats. *J Pharmacol Sci*. 134: 175-180, 2017.

〔学会発表〕(計 6 件)

瀬戸祥弘、高瀬美幸、辻泰弘、藤秀人、Cisplatin 誘発痛覚過敏反応の軽減を目指した pregabalin の併用投薬の影響 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術大会, 2016

高原彩、瀬戸祥弘、鰐淵将、岡崎史泰、藤秀人、Oxaliplatin の末梢神経障害に及ぼす投薬

時刻の影響 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術大会, 2016

藤秀人; 薬学的観点から考えるがん化学療法 第 37 回日本臨床薬理学会学術総会, 2016

瀬戸 祥弘、鰐淵 将、高原 彩、高倉 俊介、岡崎 史泰、友成 真理、藤 秀人. 投薬タイミングの違いによる oxaliplatin 誘発末梢神経障害の発症メカニズムの解明. 日本薬学会第 138 年会, 2018

友成 真理、館 愛美、瀬戸 祥弘、藤 秀人. Cisplatin 誘発痛覚過敏反応に及ぼすバルプロ酸の影響. 日本薬学会第 138 年会, 2018

Seto Y, Wanifuchi M, Takahara A, Takakura S, Okazaki F, Tomonari M, To H. Chemotherapy with consideration to biological rhythm reduce oxaliplatin- induced peripheral neuropathy. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), 2018

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphy2/index-j.html>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。