

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16134

研究課題名(和文) PACAP-PAC1シグナルはオキサリプラチン誘発末梢神経障害発症に関与するか?

研究課題名(英文) Dose PACAP-PAC1 signaling contribute to oxaliplatin-induced peripheral neuropathy?

研究代表者

齊藤 弘樹 (Saito, Hiroki)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80747478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：オキサリプラチン(OXA)は大腸がん化学療法に用いられ、これに伴う末梢神経障害は高頻度に発現する副作用であるが、投与回数増加により慢性化し、生命予後不良につながる。しかしながら、これまで有効な治療・予防法はない。当研究室では、Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) およびその受容体PAC1が疼痛の慢性化に重要であることを明らかにしたことから、我々は新たなPAC1受容体小分子拮抗薬を創製した。本研究では、新規PAC1受容体拮抗薬の1種PA-810-04はOXA誘発末梢神経障害性疼痛に有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人の慢性疼痛保有率は世界的に近年増加傾向であり、疼痛領域の市場規模は世界医薬品市場においても、がん、糖尿病、免疫に続く第4位の市場規模(2021年は約8兆円)となっている。世界的ながん、糖尿病患者数の増加、および人口の高齢化は、疼痛の中でも難治度の高い神経障害性疼痛保有率を増加させており、有害作用がなく、長期使用可能な鎮痛薬の開発が求められている。本研究結果は、疼痛発症予防に臨床的な有用性を一貫して示した鎮痛薬が未だ存在しない「がん化学療法に伴う末梢神経障害性疼痛(CIPN)」に対するFirst-in-classの鎮痛薬開発の端緒となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of a novel small-molecule PACAP-specific PAC1 receptor antagonist (PA-810-04) on the cold and mechanical allodynia in the mouse and common marmoset models of oxaliplatin (OXA)-induced peripheral neuropathy. OXA-induced cold and mechanical allodynia were dose-dependently inhibited by single intraperitoneal (i.p.) and intravenous pretreatment of PA-810-04. Furthermore, i.p. pretreatment of PA-810-04 repeatedly exhibited anti-cold allodynic effect on OXA-treated mice, suggesting that PA-810-04 would not show significant analgesic tolerance. In addition, PA-810-04 also exhibited preemptive analgesic action in the non-human primate (common marmoset) model of OXA-induced cold allodynia. These results suggest that PACAP/PAC1 signaling is involved in OXA-induced cold and mechanical allodynia and that PA-810-04 may become an analgesic agent against OXA-induced peripheral neuropathy.

研究分野：Pharmacology

キーワード：下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド PACAP PAC1受容体 PAC1受容体拮抗薬 非ペプチド性拮抗薬 化学療法誘発性末梢神経障害 オキサリプラチン 冷アロディニア

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤によるがん化学療法は多くの副作用を伴うが、その副作用の一つに末梢神経障害 (Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: CIPN) がある。オキサリプラチン (OXA) はステージ III および IV の進行再発大腸がんの術後補助療法、および延命に使用されるキードラッグであるが、末梢神経障害が高頻度に認められ、用量制限毒性になり得る。特に治療直後からほとんどの患者に手足、口唇周囲のしびれ・痛みなどが生じ、寒冷刺激で誘発・悪化するその急性症状は良く知られている。また、総投与量が増加するにつれて、手足のしびれ感・痛みなどが慢性化し、最終的には回復困難な末梢神経障害に至る。現在、これらの副作用に対する有効な予防策や治療法は確立しておらず、急性症状に対しては、寒冷刺激を避ける、蓄積性症状に対しては、OXA を休薬する消極的対処法が取られる。

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) は、宮田篤郎教授らが 1989 年にヒツジ視床下部から見出した多機能神経ペプチドである。PACAP およびその特異的受容体 PAC1 (PACAP type 1 receptor) は、一次感覚神経や脊髄後角など疼痛伝達経路に発現していることなどから、疼痛伝達に重要な分子であると考えられていたが、PACAP が作用する他の受容体 (PACAP 受容体には、PAC1 以外に、PACAP 関連ペプチドである VIP も同程度の親和性で作用する受容体 VPAC1 および VPAC2 が存在)、シグナル伝達経路、グリア細胞の関与など、疼痛発症にどのように関与するか、多くの不明点が残っていた。しかし、所属研究室の近年の研究結果から、PACAP は PAC1 受容体を介し脊髄後角神経細胞の protein kinase A-extracellular signal-regulated kinase (PKA-ERK) シグナルを活性化し、マウスに自発性疼痛様行動を引き起こすが、平行して脊髄アストロサイト活性化を急速 (30 分程度) に誘導し、何らかの介在因子を介して後角神経細胞内の ERK 活性化を維持させることで、自発性疼痛様行動を数時間に渡り維持し (Ohnou et al, J Pharmacol Sci 2016)、更に脊髄後角 PAC1 受容体が十分刺激されると、アストロサイトの活性化と触刺激誘発疼痛行動 (機械的アロディニア現象) は長期間 (3 ヶ月以上) に渡って持続することを見出した (Yokai et al. Mol Pain 2016)。

以上の結果から、脊髄 PACAP-PAC1 受容体シグナルは疼痛慢性化に重要な役割を持つことが示唆されたことから、研究代表者所属研究室では、インシリコスクリーニング法により、有機小分子 PAC1 受容体拮抗薬を複数種デザイン・創製した (Takasaki et al. JPET 2018; 栗原ら. 特許 7169592 号、US11,365,194B2、EP3689870)。更に、これら PAC1 受容体拮抗薬がマウス疼痛モデルにおいて実際有効性を示すか否かを検討したところ、ホルマリン誘発自発性疼痛行動モデルにおいて、十分な鎮痛作用を発揮した (Takasaki et al. J Pharmacol Sci 2019)。当研究室では、各種疼痛モデルを用いて検討を進めるなか、OXA 誘発急性末梢神経障害モデルにおいて顕著な有効性が認められていたことから (栗原、齊藤、宮田ら 第 41 回日本疼痛学会発表 2019)、我々は OXA 誘発末梢神経障害性疼痛に対する新規有機小分子 PAC1 拮抗薬 PA-810-04 の有効性を評価分析することに至った。

## 2. 研究の目的

これまで創製した新規 PAC1 受容体拮抗薬の *in vitro* 物性評価および ADMET 試験 (創薬等先端技術支援基盤プラットフォームによる支援) 等による評価から PA-810-04 を開発候補物質に選定し、外部委託 (シオノギファーマ) において合成経路の最適化を行い、高純度 (97.7%以上) の PA-810-04 を取得することに成功した。そこで本研究では、この高純度 PA-810-04 を使用することで、OXA 誘発末梢障害性疼痛に対する PA-810-04 の有効性を再検証し、更に PA-810-04 が急

性末梢神経障害を抑制することで、慢性障害をも抑制する（あるいは遅延させる）ことができるかを検討することで、PA-810-04 の臨床適用を目指した基盤的研究を行った。

### 3 . 研究の方法

本研究では、以下の研究計画を立案し、検討を行った。

#### (1) マウス OXA 誘発急性冷/機械的アロディニアに対する PA-810-04 の効果の検討

マウス（雄性 ddY、10～15 週齢）に OXA (5 mg/kg) を腹腔内投与することで、末梢神経障害性疼痛様モデルマウスを作製した。その OXA 投与マウスを用いて PA-810-04 (0.3、1、3 mg/kg : シオノギファーマ委託合成品) の鎮痛効果をアセトンテストと von Frey テストにより評価した (PA-810-04 の溶媒投与がコントロール)。アセトンテストは、注射筒の先にアセトンバブルを作り、それをマウスの後肢足底に接触させ、肢を激しく振るなどの異常行動を冷刺激誘発行動時間として測定した。

#### (2) PA-810-04 静脈内投与による鎮痛効果の確認と体重に与える影響の検討

がん化学療法を繰り返し行っていくと、多くの患者は吐気・嘔気を催すため、注射剤は有用性が高い。そこで、マウスに PA-810-04 の溶媒あるいは PA-810-04 (0.1、0.3、1 mg/kg) を静脈内投与した 30 分後、OXA (5 mg/kg) を腹腔内投与し、鎮痛効果を評価するとともに、体重測定を行った。

#### (3) OXA 誘発慢性末梢神経障害性疼痛モデル作製の試み

マウスに PA-810-04 の溶媒、あるいは PA-810-04 (3 mg/kg) を腹腔内投与した 30 分後、OXA (2 mg/kg) を腹腔内投与した。この一連の投与を週 2 日 (月曜および火曜日) 繰り返し行い、PA-810-04 の鎮痛効果をアセトンテストおよびコールドプレートテストにより経時的に評価した。コールドプレートテストは、4°C コールドプレート上で 120 秒間行動観察し、マウスが両前肢をプレートに接地している時間を Touch (s) とした。

#### (4) 非ヒト霊長類 (コモンマーモセット) を用いた OXA 誘発冷アロディニアに対する PA-810-04 繰り返し投与の効果の検討

コモンマーモセットに PA-810-04 の溶媒、あるいは PA-810-04 (3 mg/kg) を腹腔内投与した後、オキサリプラチン (5 mg/kg) を腹腔内投与した。この一連の投与を週 1 回 (月曜日) 行い、PA-810-04 の鎮痛効果を経時的に 45 日間、コールドプレートテストにより評価した。マーモセットの観察結果を示す % response 値の算出は以下の通りである。すなわち、4°C コールドプレート上にマーモセットを置き、7 分間行動をビデオ撮影するが、最初の 2 分間は予備観察とし、続く 5 分間の行動を観察する。この間の冷過敏行動時間を積算し、5 分間 (300 秒間) に対する比率を求め、これを % response 値としている。冷過敏行動時間は、前足足底をコールドプレートに接触させないなどの異常行動を積算した時間である。

#### (5) OXA の抗がん作用に対する PAC1 受容体拮抗薬の影響の検討

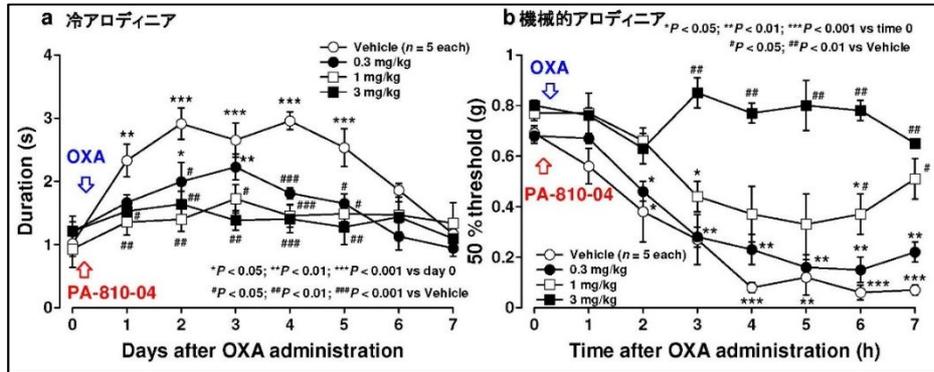
大腸がん細胞株 (マウス由来 Colon 26、ヒト由来 HTC116) を培養し、OXA (30  $\mu$ M) と有機小分子 PAC1 受容体拮抗薬 5 種 (PA-8, PA-810, PA-810-04, PA-9, PA-915: 各 10  $\mu$ M) を共添加し、オキサリプラチンの抗がん作用に対する影響を評価した。

### 4 . 研究成果

#### (1) OXA 投与マウス疼痛様行動に対する PA-810-04 の効果の検討

PA-810-04 (0.3、1、3 mg/kg : シオノギファーマ委託合成品) は OXA 誘発冷アロディニア (図 1a) および機械的アロディニア (図 1b) 発症を濃度依存的に抑制した。

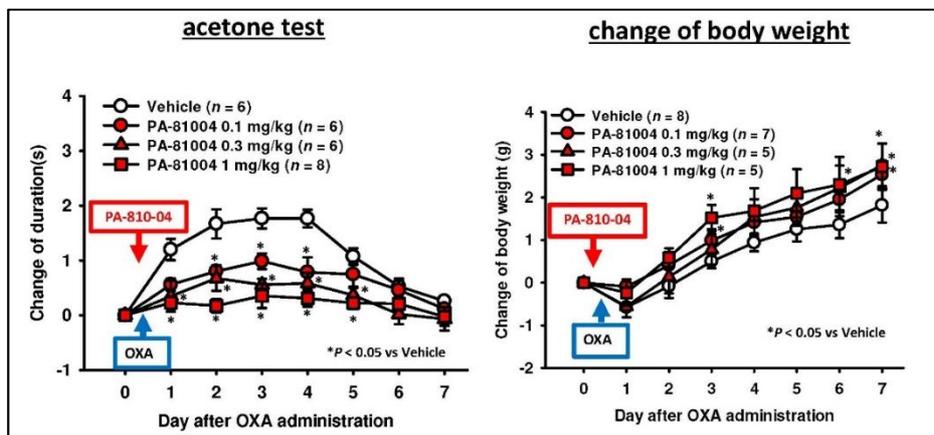
図 1



(2) PA-810-04 静脈内投与による鎮痛効果の確認と体重に与える影響の検討

PA-810-04 静脈内投与は OXA 誘発冷アロディニアを用量依存的に抑制すると共に、OXA 投与によると考えられる体重抑制も用量依存的に改善することが示唆された。腹腔内投与による鎮痛効果 (図 1) と比較すると、静脈内投与による鎮痛効果はさらに低用量で有効性を示す傾向が認められた(図 2)。

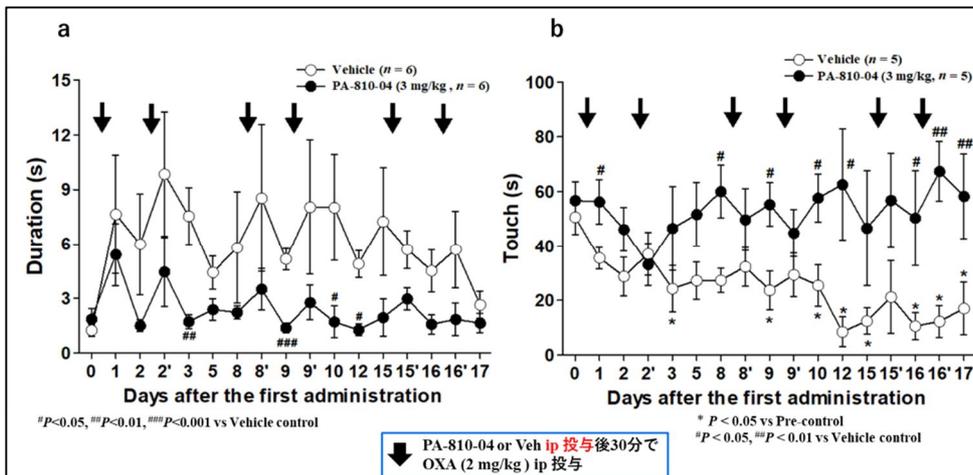
図 2



(3) OXA 誘発慢性末梢神経障害性疼痛マウスモデル作製の試み

OXA を頻回腹腔内投与することで慢性障害マウスモデル作製を試みるとともに、OXA 各回投与前に PA-810-04 を投与することで、PA-810-04 の鎮痛効果に影響が出るか否か検討を行った。なお本検討では、冷アロディニアはアセトンテスト (図 3a) およびコールドプレートテスト (図 3b) により評価した。アセトンテストにおいては OXA (2 mg/kg) の 6 回目の投与において冷アロディニア症状が認められなくなったが、コールドプレートテストにおいては冷アロディニアに対する麻痺様症状は認められなかった。一方、PA-810-04 (3 mg/kg) の腹腔内前投与は、OXA 誘発冷アロディニアを繰り返し抑制し、本条件下においては、PA-810-04 の鎮痛耐性は認められなかった。

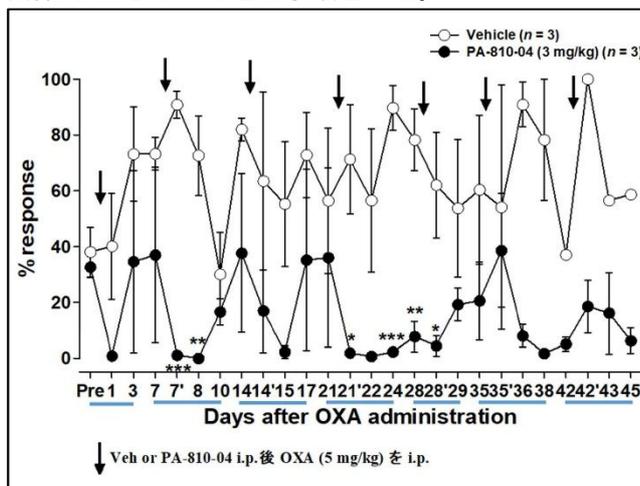
図 3



(4) 非ヒト霊長類 (コモンマーモセット) を用いた OXA 投与疼痛様行動に対する PA-810-04 繰り返し投与の効果の検討

非ヒト霊長類コモンマーモセットを用いOXA誘発冷アロディニアをコールドプレートテストにより評価した(図4)。その結果、コモンマーモセットにおいても、OXA(5 mg/kg)の腹腔内投与により急性の冷アロディニア症状が生じること、週1回の投与で冷アロディニア発症が維持されること、PA-810-04(3 mg/kg)の腹腔内前投与は、OXA誘発冷アロディニアの発症を抑制し、本条件下では鎮痛耐性を生じないことも示唆された。

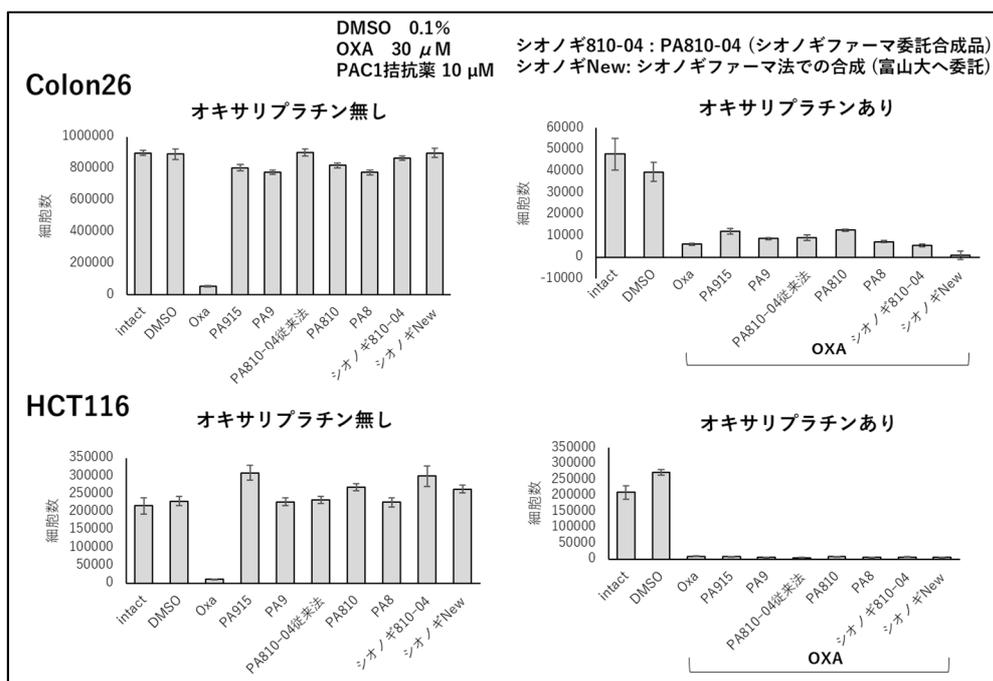
図4



### (5) OXAの抗がん作用に対するPAC1受容体拮抗薬の影響の検討

大腸がん細胞株(マウス由来 Colon 26、ヒト由来 HTC116)を培養し、OXA(30  $\mu$ M)と有機小分子PAC1受容体拮抗薬5種(PA-8, PA-810, PA-810-04, PA-9, PA-915: 各10  $\mu$ M)を共添加し、OXAの抗がん作用に対する影響を評価した。その結果、いずれの有機小分子PAC1受容体拮抗薬は単独では殺細胞効果を示さず(図5左図: OXAなし)、更にOXAの殺細胞効果にも影響しなかった(図5右図: OXAあり)。

図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 足原佑弥、齊藤弘樹、宮田篤郎、栗原 崇、高崎一郎
2. 発表標題 PAC1受容体拮抗薬PA-81004はオキシリプラチン誘発性冷的アロディニアに対し優れた予防効果を示す。
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kurihara T, Fujii K, Uchida Y, Terawaki T, Saito H, Kato S, Ikeda R, Murata M, Kambe Y, Miyata A, Takasaki I and Kanekura T
2. 発表標題 Possible contribution of both central and peripheral PACAP-PAC1 receptor signaling to itch sensation in mice.
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (47th JSID)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kurihara T, Fujii K, Uchida Y, Terawaki T, Saito H, Kato S, Ikeda R, Murata M, Kambe Y, Miyata A, Kanekura T and Takasaki I
2. 発表標題 Both central and peripheral PACAP-PAC1 receptor signaling pathways contribute to itch sensation in mice.
3. 学会等名 The 15th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides/The 1st International Society for Bioactive Peptides Meeting (VPAC ISBAP2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takasaki I, Kato S, Ikeda R, Murata M, Nakayama T, Saito H, Kambe Y, Miyata A and Kurihara T
2. 発表標題 Involvement of spinal and peripheral PACAP-PAC1 receptor signaling system to itch sensation in mice.
3. 学会等名 The 15th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides/The 1st International Society for Bioactive Peptides Meeting (VPAC ISBAP2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ashihara Y, Saito H, Miyata A, Kurihara T and Takasaki I
2. 発表標題 Small-molecule PAC1 receptor antagonist PA-81004 prevents the induction of oxaliplatin-induced cold allodynia in mice.
3. 学会等名 The 15th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides/The 1st International Society for Bioactive Peptides Meeting (VPAC ISBAP2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fujii K, Uchida Y, Terawaki T, Saito H, Kato S, Ikeda R, Murata M, Kambe Y, Miyata A, Takasaki I, Kanekura T and Kurihara T
2. 発表標題 The role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in itching.
3. 学会等名 第36回表皮細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足原佑弥、齊藤弘樹、宮田篤郎、栗原 崇、高崎一朗
2. 発表標題 PAC1受容体拮抗薬PA-81004はOxaliplatin誘発性冷的アロディニアに対し優れた予防効果を示す。
3. 学会等名 第73回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高崎一朗、加藤翔、池田竜太、村田万祐子、齊藤弘樹、神戸悠輝、合田浩明、岡田卓哉、豊岡尚樹、宮田篤郎、栗原崇
2. 発表標題 痒み伝達におけるPACAP-PAC1受容体情報伝達系の関与の可能性 Possible Involvement of PACAP-PAC1 Receptor Signaling System to Itch Sensation in Mice.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原崇、池田竜太、齊藤弘樹、村田万祐子、神戸悠輝、加藤翔、岡田卓哉、豊岡尚樹、合田浩明、宮田篤郎、高崎一朗
2. 発表標題 PACAP誘発嫌悪行動は一種の搔痒反応を表しているのか？ 脊髄痒み伝達におけるPACAP情報伝達系の関与の可能性 Do intrathecal PACAP-evoked aversive behaviors represent itch-like behaviors?-Possible involvement of PACAP signaling system in spinal itch transmission in mice.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kurihara T, Ikeda R, Saito H, Murata M, Kambe Y, Kato S, Okada T, Toyooka N, Gouda H, Miyata A, and Takasaki I
2. 発表標題 Possible contribution of PACAP-PAC1 receptor signaling system to itch sensation in mice.
3. 学会等名 14th Asia Pacific Federation of Pharmacologists (APFP2020)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------