

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591515

研究課題名（和文） がん化学療法による認知機能障害の分子メカニズムの解明とその予防について

研究課題名（英文） The investigating the molecular mechanisms of cognitive impairment due to cancer chemotherapy and its prevention

研究代表者

谷向 仁（TANIMUKAI HITOSHI）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：60432481

研究成果の概要（和文）：

化学療法による認知機能障害の機序を検討するため、パクリタキセル（Px）、フルオロウラシル（5-FU）、シクロフォスファミド（CPA）を用いて、神経系細胞（SY5Y 細胞、SK-N-SH細胞）への毒性及び小胞体ストレス（ER stress）との関連性を検討した。Pxと5-FU負荷では濃度依存的に毒性が確認されたがCPAでは明らかではなかった。またPxと5FU負荷ではリン酸化eIF2 α 及びGRP78/94の誘導が認められた。さらにBip inducer X(BIX)にてこれらの細胞を前処理し、同様の負荷を行ったところ、Pxでは神経毒性が有意に減じていた。今回の結果は、Pxによる神経毒性にはER stressが一部関与し、その神経毒性はBIXにより予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the molecular mechanisms of chemotherapy induced cognitive impairment, we studied the neuronal toxicity (NT) of paclitaxel (Px), fluorouracil (5-FU), and cyclophosphamide (CPA) on neuronal culture cells (SY5Y and SK-N-SH) and further investigated its relationship to endoplasmic reticulum stress (ER stress). Significant NT was observed in cells treated with Px and 5-FU in dose dependent manner, but not with CPA. In addition, the induction of both p-eIF2 α and GRP78/94 were observed in cells by Px or 5-FU treatment. Pre-treatment of cells with Bip inducer X (BIX) reduced Px-induced NT but not 5-FU induced NT. These data suggest that Px induced NT probably relates to ER stress and BIX could prevent the Px induced NT as including chemobrain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：認知機能障害、抗がん剤、ケモブレイン、小胞体ストレス、予防

1. 研究開始当初の背景

がん患者は病期にもよるが、がんによる直接的な影響のみならず、化学療法や脳への放射線療法、痛みや精神症状の緩和に用いられるオピオイドや向精神薬などの薬剤により中枢神経系に少なからず影響を受け、認知機能や情動系に影響を与えることが知られている。特に認知機能への影響は、患者本人の病状認識、治療法の決定やその継続、家族とのコミュニケーションなどを含めた Quality of life (QOL) にも大きな影響を与える。これら治療中に見られる認知機能障害、特に化学療法後の認知機能障害（記憶障害や注意・集中困難など）を“Chemobrain”あるいは“Chemofog”と呼び、この数年特に注目を集めている。国内では、国立がんセンター（現国立がん研究センター）東病院精神腫瘍学開発部のグループが、乳がんの術後化学療法により、前頭葉、海馬傍回、帯状回、楔前部の灰白質・白質ともに、体積が有意に減少していることを見出し、さらには約3年後には正常な大きさに戻っていたと報告しているが、これら化学療法による脳への影響についての分子メカニズムは未だわかっていない。

2. 研究の目的

乳がん治療にて用いられる Px、5-FU、CPA による神経毒性の評価と ER stress との関連及びその予防法について分子生物学的に検討する。

3. 研究の方法

①：各薬剤による神経系細胞への影響（以下、

神経毒性とする）を、神経培養細胞である神経芽細胞腫 SY5Y 細胞および SK-N-SH 細胞を用いて形態的評価及び細胞から漏出する LDH を測定 (Cytotoxicity detection Kit) することで評価した。

②：①にて有意な神経毒性が確認された濃度を参考に、MCF7 との細胞毒性の比較検討を行った。

③：各抗がん剤による神経毒性における ER stress の関与について、関連抗体を用いて Western blot にて検討した。

④：各抗がん剤による ER ストレス関連細胞死に対する神経保護因子について BIX を用いて検討した。

4. 研究成果

① SY5Y 細胞を Px、5-FU、CPA の各抗がん剤 1～100 μ M の濃度にて刺激し、24 時間後に LDH assay を行ったところ、Px、5-FU とともに 1 μ M から既に有意な LDH release が確認された。その程度は濃度依存的であり、50 μ M を超えると顕著であった。一方 CPA では全濃度を通して有意な LDH release は見られなかった。この傾向は光学顕微鏡による目視的観察においても確認できた。またこの傾向は、SK-N-SH 細胞においてもほぼ同様に認められ、特に Px で 1 μ M から 100 μ M の範囲で有意な障害性が認められた。以上のことから、これら抗がん剤の神経障害性は、抗がん剤の種類によって異なることが示唆された。

②これらの抗がん剤による乳がん細胞と神経系細胞に対する影響の差異を明らかにするため、乳がん細胞株である MCF-7 細胞及び SY5Y 細胞を用いて比較検討した。Px、5-FU、CPA による刺激負荷を行い、24 時間後に LDH assay にて検討した。Px (1 μ M) では、MCF-7、SY5Y ともに細胞毒性を認めたものの MCF-7 にて強い傾向を示した。5-FU では、低濃度では MCF-7 が SY5Y よりも毒性が強い傾向が見られたが、25 μ M 以上では SY5Y で MCF-7 よりも細胞毒性が強い傾向がみられた。また CPA (50~100 μ M) では、MCF-7 において細胞毒性を示していたものの、SY5Y では明らかな細胞障害性はみられなかった。乳がん患者に用いられる FEC 療法 (5FU, epirubicin, CPA) を例にとると、5-FU, CPA ともに 500mg/m²(体表面積)として同用量を使用するが、今回の実験系での結果は、これら抗がん剤 (5-FU、Px) の乳がん細胞への *in vitro* での抗がん作用を示すと同時に、細胞種によりその感受性は異なり、比較的脳内移行がしやすいとこれまで報告されている 5-FU, CPA では神経障害性に差があり、今回の評価系では特に 5-FU での影響が起りやすい可能性が示唆された。SK-N-SH 細胞においても評価を行ったが、特に Px (1 μ M) において同様の結果が確認された。

③次にこれらの抗がん剤が小胞体ストレスを介した神経毒性と関連するかどうかについて検討した。SY5Y 細胞を用いて Px (1 μ M)、5-FU (10~50 μ M) によって 24 時間の刺激をしたのちに、ER stress マーカーである GRP78 と eIF2 α のリン酸化状態を指標としてウエスタンブロットにより生化学的に検討した。その結果、両薬剤とも ER stress が誘導される傾向が見られ、特に Px による ER stress の誘導が顕著であった。さらに 5-FU, Px にお

いて小胞体に関連する Caspase4 の評価も同時に行ったところ、5-FU, Px 負荷群において Caspase4 活性型の誘導が確認された。これらの事から 5-FU, Px による神経障害の一部の機序として、ER stress cascade が関与している可能性が考えられた。

④これまでの結果から 5-FU、Px に関連した神経毒性の一部には ER stress の関与が考えられたが、次にこの ER stress を軽減すると神経毒性が抑制できるかを検討する為、Bip Inducer X (BIX: Cell death Diff: Kudo et al) による分子シャペロン誘導を介したこれら抗がん剤 (5-FU 及び Px) による神経毒性の抑制効果を LDH assay にて検討した。まずはじめに、BIX の毒性について SK-N-SH 細胞を用いて検討した。BIX 2.5~25 μ M にて SK 細胞を 24 時間刺激し、LDH アッセイをおこなったところ、BIX 2.5~5 μ M では明らかな細胞障害性をみとめなかったものの、10 μ M 以上となると明らかに細胞障害性が認められた。したがって以後の検討には 2.5~5 μ M の濃度を用いることとした。次に SK-N-SH 細胞を BIX 3.5 μ M にて 12 時間前処理し、その後 5-FU 25 μ M、Px 1 μ M にて 24 時間負荷刺激をかけ、その後 LDH assay を行った。その結果、5-FU 刺激については明らかな LDH release の抑制効果を認めなかったが、Px については、BIX による前処理をしない群に比べ、BIX 前処理群では有意な LDH release の抑制効果を認めた。

このことは、少なくとも低濃度の BIX によって Px による神経毒性を抑制することができる可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Kudo T. ER stress and neuropsychiatric disease. Seishin Shinkeigaku Zasshi. 2012;114(2):115-23. 査読あり

(2) Mitsuda T, Omi T, Tanimukai H, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M. Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2 α /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Nov 25;415(3):519-25. 査読あり

(3) Kudo T. Molecular chaperone inducer: a possible treatment for Alzheimer disease.

Rinsho Shinkeigaku. 2011 Nov;51(11):889. 査読あり

(4) 谷向 仁、壁下康信

「がん疼痛に伴う精神症状の評価とその対策」 Progress in Medicine 31(5), 1235-1239, 2011. 査読なし

[学会発表] (計4件)

(1) 谷向 仁、平井啓、足立 祥洋

「血液がん患者における不眠の実態及び抑うつとの関連に関する研究」

第16回日本緩和医療学会学術大会, 札幌, 日本, 2011年7月29日

(2) Okamoto Y, Nagase M, Tsuneto S, Tanimukai H, Matsuda Y, Okishiro N, Kumakura Y, Ono Y, Tsugane M, Takagi T, Uejima E. “A retrospective chart review of agitation in terminal cancer patients” 12th Congress of the European Association for Palliative Care (Lisbon Congress Center)

Portugal, 20, May 2011

(3) Tanimukai H, Kumakura Y, Okishiro N, Matsuda Y, Okamoto Y, Kabeshita Y, Ohno Y, Tsuneto S. “Can Trazodone Improve Insomnia and Nightmare in Cancer Patients?: A Report of Two Cases” 12th Congress of the European Association for Palliative Care (Lisbon Congress Center)

Portugal, 19, May 2011

(4) 谷向 仁

「がん患者にみられる様々な認知機能障害～せん妄を中心に～」

第6回 北摂緩和医療懇話会, 大阪, 日本, 2010年9月3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷向 仁 (TANIMUKAI HITOSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
(常勤)
研究者番号: 60432481

(2) 研究分担者

工藤 喬 (KUDO TAKASHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 10273632

森原 剛史 (MORIHARA TAKASHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 90403196

岡本 禎晃 (OKAMOTO YOSHIAKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 90432442
(H22まで分担者として参画)

津金 麻実子 (TSUGANE MAMIKO)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 00469991

(3) 連携研究者

なし