

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790143

研究課題名(和文) がん薬物療法における末梢神経障害の早期診断と治療のためのバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Biomarker discovery for chemotherapy-induced peripheral neuropathy

研究代表者

鈴木 直人 (SUZUKI, NAOTO)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60372299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：がん薬物療法の代表的な副作用の一つである末梢神経障害の早期発見や治療の最適化に有用なバイオマーカーを見出すため、オキサリプラチンやパクリタキセル、ボルテゾミブといった各種抗悪性腫瘍薬を末梢神経のモデルである NGF 刺激 PC12D 細胞に処置後、細胞内に存在する化合物量の変化を液体クロマトグラフィー/質量分析装置により評価する系を構築した。本評価系を用いた解析から、抗悪性腫瘍薬特異的にその細胞内量が増加する化合物を複数見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a severe dose-limiting side effect of anticancer drugs because of the lack of effective care. The aim of this study was to discover the biomarkers for early diagnosis and optimal care of CIPN using NGF-differentiated PC12D cells. After treatment with anticancer drugs such as oxaliplatin, paclitaxel and bortezomib, intracellular metabolites were extracted and analyzed by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). LC/MS analysis revealed some characteristic changes in the concentration of intracellular metabolites related to treatment with specific types of anticancer drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：末梢神経障害 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

がん薬物療法で用いられる薬物は一般に治療域が非常に狭く、抗腫瘍効果と有害反応の発現がともに現れる。このため、がん薬物療法では有害反応の発現が不可避であり、悪心・嘔吐、骨髄抑制、下痢・便秘などの消化器症状、脱毛や末梢神経障害といった多彩な副作用が様々な頻度と程度で現れる。近年の優れた制吐薬や顆粒球コロニー形成刺激因子製剤(G-CSF)を用いた支持療法の発展により、がん薬物療法の副作用はある程度対処可能となってきたものの、依然として患者QOLの低下を引き起こすことも多く、がん薬物療法とともに副作用対策のさらなる進歩が望まれている。

代表的ながん薬物療法の副作用の一つである末梢神経障害は、オキサリプラチンやシスプラチンなどの白金製剤、パクリタキセルやドセタキセルといったタキサン系の薬剤、ピンクリスチンなどのピンカアルカロイド系薬剤、またプロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブなどの抗悪性腫瘍薬の投与で高頻度に発現する。末梢神経障害はラジカルの発生、Ca²⁺ channel の発現変動を含む Ca²⁺ホメオスタシスの異常といった様々な機序で誘発されることが示唆されているが、発生機序の詳細は未だ明らかではない。また、末梢神経障害は抗悪性腫瘍薬の種類によりその発現時期や症状が異なるほか、患者の状態によっても発現時期や症状、さらには回復に個人差が認められ、不可逆的な経過をたどる場合も少なくない。

末梢神経障害の一般的治療としてはビタミン製剤、NSAIDs、抗けいれん薬、抗うつ薬や局所麻酔薬といった様々な作用メカニズムの薬剤が投与されるほか、グルタミン、還元型グルタチオン、ジヒドロプロゲステロンを始め多くの化合物が末梢神経障害の症状を軽減させるという研究報告が認められている。しかし、現段階ではいずれも有効な治療効果が必ずしも期待できない状況である。末梢神経障害は早期に発見し、可能な限り症状に対応した適切な治療を早期に開始することが望ましいことから、鋭敏かつ症状特異的なバイオマーカーを見出すことが早期発見と治療の最適化を実現するために必要とされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、各種抗悪性腫瘍薬によるがん薬物療法により誘発される末梢神経障害について、in vitro の系を用い、早期診断や最適な治療法を選択するためのバイオマーカー候補を探索することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞の選択と培養条件の設定

In vitro における評価では、nerve growth

factor (NGF) 刺激により神経突起を伸長し、末梢神経細胞のモデルとなることが知られている PC12D 細胞を用いることとした。抗悪性腫瘍薬には、臨床的に末梢神経障害を引き起こすことが知られており、かつその作用機序が異なることが推定されているオキサリプラチン、パクリタキセル及びボルテゾミブを用いることとした。

(2) 細胞生存率の評価

各種抗悪性腫瘍薬が NGF 刺激 PC12D 細胞の生存に与える影響は、MTT assay を用いて評価を行った。すなわち、PC12D 細胞を 1×10^4 cells/well に播種した後、細胞播種時あるいは 24 h 後に NGF を加え、72 h 後の PC12D 細胞の神経細胞突起伸長を確認した。その後、各種抗悪性腫瘍薬を種々の濃度で添加し、24、48、72 h 培養後の細胞生存率の評価を行った。本結果から、抗悪性腫瘍薬の処置濃度を決定した。

(3) 神経突起・細胞骨格形成の評価

各種抗悪性腫瘍薬が NGF 刺激 PC12D 細胞の神経突起伸長に与える影響は、以下の手順で行った。すなわち、PC12D 細胞を 1×10^4 cells/well に播種した後、24 h 後に NGF を加え、72 h 後の PC12D 細胞の神経細胞突起伸長を位相差顕微鏡下で確認した。また、F-actin、G-actin、actinin の蛍光免疫染色により、各種抗悪性腫瘍薬の神経細胞骨格形成に与える影響を評価した。

(4) 試料調製法の検討

In vitro におけるバイオマーカー候補の探索にあたり、液体クロマトグラフィー/質量分析に付す試料の調製方法に関して条件検討を行った。すなわち、分析に必要な細胞数、細胞の洗浄溶媒、細胞内低分子代謝物の抽出方法などについて精査を加えた。

(5) 液体クロマトグラフィー/質量分析の条件検討

In vitro におけるバイオマーカー候補の探索のため、精密な分子量の測定が可能である高分解能質量分析装置を用いて網羅的な細胞内容物の検出を試みた。効率的な質量分析での検出を目的として、イオン化条件を始めとする各種条件について精査を加えた。また、網羅性の向上を目的として、液体クロマトグラフィーにおける分離カラムや移動相についても合わせて検討を加えた。

(6) データ解析手法の検討

液体クロマトグラフィー/質量分析による網羅的解析では、一般に分析により得られたデータからピーク情報を抽出し、信頼度の高いピーク情報のみを見出し、適切な標準化法を設定し、多変量解析を行うことでバイオマーカー候補を探索する。本研究では、これらの ~ の各ステップについて、信頼

性及び効率性の観点から条件検討を行った。

(7) 細胞内低分子代謝物データベース

様々な公開データベースが整備されつつあるが、現在も液体クロマトグラフィー/質量分析で検出される低分子代謝物の多くが帰属不可能な状況である。また、液体クロマトグラフィーにおける保持時間の情報が同定に有益であることから、未知代謝物の同定プロセスを効率的に進めるため、可能な限りの標準品を入手・解析し、公開データベースと連動したデータベースの充実化を図ることとした。

(8) NGF 刺激 PC12D 細胞を用いた抗悪性腫瘍薬の神経障害特異的バイオマーカー候補の探索

(2)、(3) の条件検討を踏まえ、臨床的に発現する症状が異なることが知られており、また神経細胞に対する障害機序が異なることが推定されているオキサリプラチン、パクリタキセル及びボルテゾミブを NGF 刺激 PC12D 細胞に処置して障害を誘発させた。その後、(4)~(6)の条件検討の結果を踏まえて試料を調製し、液体クロマトグラフィー/質量分析に付すことでバイオマーカー候補分子の探索・同定を試みた。

4. 研究成果

(1) In vitro 神経障害モデルの作成

各種抗悪性腫瘍薬が NGF 刺激 PC12D 細胞の生存に与える影響を MTT assay を用いて評価した。始めに、オキサリプラチン、パクリタキセル及びボルテゾミブがその処置濃度依存的、時間依存的に NGF 刺激 PC12D 細胞の生存率を低下させることを確認した。同様に、これらの抗悪性腫瘍薬が NGF 刺激 PC12D 細胞の神経突起伸長に与える影響を評価したところ、オキサリプラチン、パクリタキセル及びボルテゾミブはその処置濃度依存的、時間依存的に神経突起長を短縮させることを確認した。これらの結果を踏まえ、それぞれの抗悪性腫瘍薬について、細胞生存率に影響を与えず、かつ神経突起長を短縮させる処置濃度を決定して神経障害モデルを作成した。

(2) 試料調製法

NGF 刺激 PC12D 細胞にオキサリプラチン、パクリタキセル及びボルテゾミブを処置して作成した in vitro 神経障害モデルからの試料調製のプロトコールについて条件検討を行った結果、以下の手順で実施することで細胞内低分子代謝物を効率的に液体クロマトグラフィー/質量分析で検出できることを確認できた。すなわち、それぞれの抗悪性腫瘍薬を一定時間処置した細胞の培養液を除去し、Phosphate Buffered Saline (PBS) にて細胞を洗浄後、遠沈管に回収し、遠心分離

にて上清を取り除いた。PBS による洗浄を再度行った後、上清を除去し、メタノールを加えて懸濁・超音波破碎処理を実施した。再び遠心分離を行った後、一部をタンパク定量の試料とした上で、上清を減圧下で乾固した。乾固した試料は、タンパク定量の結果により用量を算出した水/アセトニトリル (90/10, v/v) 混合液にて再溶解し、孔径 0.2 μm のマイクロフィルターにて沈殿物を除去して液体クロマトグラフィー/質量分析に付すこととした。

なお、一連の解析に付す試料を等量ずつ混合した quality control 試料を調製することで、後の液体クロマトグラフィー/質量分析とその後のデータ解析における信頼性を担保することを可能とした。

(3) 液体クロマトグラフィー/質量分析の条件

(2)に記載した手順で調製した試料に含有される細胞内低分子代謝物は、液体クロマトグラフィーによる分離を行った後、高分解能・精密質量の測定が可能な四重極-Orbitrap 型質量分析装置にて検出することで、網羅的に検出・解析を行うことを可能とした。すなわち、各種条件検討を行った結果、液体クロマトグラフィーの分離条件は以下の通りとした。カラム:逆相カラム(2.1 mm x 100 mm, 粒子径 3.5 μm)、移動相:(A) 0.1% ギ酸/超純水、(B) 0.1% ギ酸/アセトニトリル、送液:(A)(B)のグラジエント、流速:0.3 mL/min。加えて、さらなる網羅的検出を目的として、イオン交換モードにて化合物の分離を行う条件も整備した。

同様に、質量分析の代表的な条件設定は以下の通りである。イオン化法:エレクトロスプレー法 (positive/negative)、ソース電圧:3.5 kV (positive), 2.5 kV (negative)、ペーポライザー温度:450°C、キャピラリー温度:275°C、スキャンモード:フルスキャン、スキャンレンジ: m/z 70-900、分解能:70,000。以上の条件設定で、1 試料あたりの分析時間は 15 分とすることができた。

(4) データ解析手法

液体クロマトグラフィー/質量分析により取得したデータについて、始めにピーク情報の抽出に用いる複数のソフトウェアの適用・比較を行った。アライメントや抽出アルゴリズムの比較、パラメータ設定の自由度、ピーク情報抽出後のフィルタリング処理、多変量解析との連動性、公開されている低分子化合物データベースとの連携、さらにはデータ取得から解析までの効率化といった点について考慮して検討を行い、最適と考えられた差異解析ソフトウェアを選択した。その後、選択した差異解析ソフトウェアを用いて抽出したピーク情報は、信頼度の高い情報のみを選択するフィルタリング処置後、多変量解析ソフトウェアにて主成分分析、PLS-判別分

析を行うこととした。主成分分析により取得データの信頼性の確認を行い、その後 PLS-判別分析に付すことで、各種抗悪性腫瘍薬が NGF 刺激 PC12D 細胞の細胞内代謝物の変化に与える影響を可視化して評価することを可能とした。また本分析を用いることで、抗悪性腫瘍薬処置で変化が認められたピーク情報の検出を可能とした。

(5) 細胞内低分子代謝物データベース

細胞内低分子代謝物データベースは、汎用のデータベースソフトウェアを用いて、以下の様な情報を含んだものを設計した：化合物名、公開データベース ID(ハイパーリンク)、精密質量、 $[M+H]^+ / [M-H]^-$ イオンの m/z 、組成式、液体クロマトグラフィーにおける保持時間、標準品の分析情報(濃度、溶解溶媒、測定ファイル名等)、検出されたイオン化法の極性。

これらの情報を含んだデータベースについて、NGF 刺激 PC12D 細胞の液体クロマトグラフィー/質量分析の結果から細胞内低分子代謝物として推定されたものを中心として構築することができた。

(6) NGF 刺激 PC12D 細胞を用いた抗悪性腫瘍薬の神経障害特異的バイオマーカー候補の探索

PC12D 細胞を 4×10^5 cells/well に播種した後、細胞播種時あるいは 24 h 後に NGF を加え、72 h 後の PC12D 細胞の神経細胞突起伸長を確認した。その後、オキサリプラチン、パクリタキセルあるいはボルテゾミブを最適化した濃度で添加し、24、48、72 h 培養した。抗悪性腫瘍薬処置後、(2)~(4)に記載の内容に従い解析を行った。その結果、各抗悪性腫瘍薬を処置することにより、その細胞内含有量が増加あるいは減少するピークを複数見出すことができた。具体的な例としては、オキサリプラチン処置により減少した化合物として還元型グルタチオンが同定された。その他神経伝達物質の関連代謝物、核酸代謝物、アミノ酸といった化合物が変化していることが示唆されており、さらに抗悪性腫瘍薬特異的な変化も見出された。これらの変化は、その低分子化合物の検出自体がバイオマーカーとなる可能性を秘めているばかりでなく、その代謝過程が末梢神経障害の新規治療ターゲットとなりうるものであり、解析・同定は引き続き継続中である。本研究は *in vitro* における神経障害のモデルを用いた基礎研究であるが、臨床的に有効な治療法が未だ確立していない現状から、今後本研究で確立した手法と得られたデータを詳細に検証することで、最終的には末梢神経障害の早期診断や最適な治療法選択に貢献することが期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

鈴木直人、抗悪性腫瘍薬に対する生体反応解明のための網羅的代謝物解析、第 24 回日本臨床化学会 東北支部総会、2013 年 7 月 20 日、仙台

杉山栄二、鈴木直人、ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 に対する鉄キレート剤デフェロキサミンの作用機序解明に向けた非標的メタボローム解析、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 30 日、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 直人 (SUZUKI, NAOTO)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：60372299

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：