

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870496

研究課題名(和文)オキサリプラチンによる末梢神経障害性疼痛の新規治療ターゲットの探索

研究課題名(英文)Research for new therapeutic targets of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy

研究代表者

川尻 雄大(Kawashiri, Takehiro)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：30621685

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)：大腸がんの化学療法に不可欠な抗がん薬であるオキサリプラチンは、副作用として末梢神経障害(手足のしびれ・疼痛など)を高頻度で引き起こすが、その新たな対応策確立のターゲットを探索することを目的とした。

オキサリプラチンを反復投与したラットにおいて、末梢神経において神経細胞体障害、軸索変性のみならずニューレグリン1の発現低下を伴った髄鞘形成障害が起こることが初めて明らかとなった。また、脊髄内のグルタミン酸トランスポーターGLT-1の発現低下による脊髄内グルタミン酸濃度の上昇がオキサリプラチンの末梢神経障害の症状発現に関与することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Oxaliplatin, a key drug for colorectal cancer, causes severe peripheral neuropathy. In our study, repeated treatment of oxaliplatin induces hypomyelination and reduced NRG1 expression in peripheral nerve system in rats. Furthermore, oxaliplatin treatment induced reduction in glutamate transporter GLT1 and increase in glutamate concentration in spinal cord. These results suggest that the hypomyelination and reduction of NRG1 in peripheral nerve system and the spinal extracellular glutamate concentrations via and down-regulation of GLT-1 might be the new therapeutic targets of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy.

研究分野：医療薬学 臨床薬理学

キーワード：オキサリプラチン 末梢神経障害 抗がん薬 副作用(有害事象) グルタミン酸

## 1. 研究開始当初の背景

白金系抗がん薬であるオキサリプラチンは、大腸がんの化学療法に不可欠な薬剤であるが、副作用(有害事象)として、末梢神経障害(手足のしびれ、痛み、感覚異常など)を高頻度で引き起こす。この末梢神経障害の発現・悪化は患者の QOL(生活の質)を著しく下げただけではなく、治療の継続を妨げるものであり、臨床現場で大きな問題となっている。

しかし、オキサリプラチンの末梢神経障害の発現メカニズムは明確にされておらず、不明な点が多い。また、これまでにこの末梢神経障害に対してさまざまな薬剤の予防効果・治療効果などが試されてきたが、顕著な改善効果が期待できる薬剤は見出されておらず、現在のところ有効な治療法・対症療法・予防法などは確立されていない。

## 2. 研究の目的

オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する新たな治療法・予防法を確立すべく、動物モデルを用い、末梢神経障害の発現メカニズムを明らかとすることを目的とした。

特に本研究では、以下の3点に関して、解析を行い、新規治療ターゲットの探索を行うことを目的とした。

- (1) オキサリプラチンによる末梢神経系の直接的な傷害の形態学的解析とその成因について
- (2) 脊髄における二次的な分子的变化について
- (3) 末梢神経の傷害が脊髄の二次的な分子的变化を引き起こすシグナル・機序について

## 3. 研究の方法

### (1) 末梢神経障害動物モデルの作製

SD系ラットにオキサリプラチン 4 mg/kg を週に2回4週間反復投与を行った。

### (2) 末梢神経障害の症状の評価

von Frey 試験における触刺激への逃避反応閾値の変化を評価した。ラット足裏へ von Frey フィラメントを押し当て、ラットが逃避反応を起こすフィラメント強度を逃避反応閾値として評価した。

### (3) 末梢神経の組織学的評価

坐骨神経断面をトルイジンブルーで染色し、髄鞘と神経線維を染め分けた。神経線維の真円度(円の度合い)を軸索変性の評価とした。また、髄鞘の厚さおよび g-ratio(神経線維径/軸索径比)を計測し、髄鞘形成の度合いを評価した。

### (4) 坐骨神経におけるニューレグリン 1 の変化

坐骨神経を採取し、タンパク量はウエスタンブロット法で、mRNA は RT-PCR 法で定量した。

### (5) 脊髄内のグルタミン酸濃度の定量

脊髄 L4-L6 に透析プローブを留置し、リンゲル液を灌流することにより脊髄内のアミノ酸(グルタミン酸を含む)を回収した(脊髄内マイクロダイアリシス法)。回収したアミノ酸は、オルトフタルアルデヒドにより誘導体化し、HPLC-ECD システムで定量した。

### (6) 脊髄におけるグルタミン酸トランスポーターの定量

脊髄 L4-L6 を採取し、切片を作製し、グルタミン酸トランスポーターの抗体を用いて、免疫染色を行った。脊髄後角における陽性輝度をトランスポーターの発現量として評価した。

### (7) 統計処理

データは平均値 ± 標準誤差で示した。二群間の比較は Student's t-test により検定を行い、多群間の比較は二元配置分散分析(two-way ANOVA) 後、Tukey-Kramer's post-hoc test により検定を行った。5% 未満の危険率(P<0.05)を有意差とみなした。

## 4. 研究成果

(1) オキサリプラチンによる末梢神経系の直接的な傷害の形態学的解析とその成因について

オキサリプラチンによる末梢神経障害の症状発現には、これまで末梢神経の細胞体である脊髄後根神経節(DRG)細胞における細胞体障害および、軸索変性を伴うことが報告されている。本研究では、新たなターゲットとして、末梢神経線維を取り巻く髄鞘への傷害について解析を行った。

ラットに対しオキサリプラチンの反復投与(4 mg/kg、週に2回、4週間投与)を行うと、von Frey 試験において触刺激に対する逃避反応閾値の低下(触刺激への感覚過敏・アロディニア)が発現し、臨床現場での末梢神経障害に類似した症状が発現する。

この末梢神経障害を発現した動物の末梢神経(坐骨神経)の断面を評価すると、坐骨神経線維断面の真円度の低下(軸索変性)のみならず、髄鞘の厚みの減少および g-ratio(神経線維径/軸索径比)の低下が確認され、神経細胞体障害、軸索変性だけでなく、髄鞘形成障害もオキサリプラチンによる末梢神経障害の背景として起こることが初めて明らかとなった。

また、髄鞘形成に関わる因子として知られているニューレグリン 1 の mRNA およびタンパク発現量が、オキサリプラチン投与動物で

有意に低下しており、髄鞘形成障害に関与することが示唆された。

(2) 脊髄における二次的な分子的变化について

末梢神経の終末から脊髄側へ遊離される興奮性の神経伝達物質としてグルタミン酸が知られている。末梢神経障害発現時における脊髄内のグルタミン酸の濃度変化について、脊髄内マイクロダイアリシス法にて検討を行った。

オキサリプラチン反復投与群において、脊髄内のグルタミン酸濃度（非刺激時）が有意に上昇していた。さらに、オキサリプラチン反復投与群では、触刺激後のグルタミン酸濃度の上昇（放出量）が有意に増強した（図1）。また、von Frey 試験における触刺激への逃避反応閾値の低下はグルタミン酸受容体である AMPA 受容体拮抗薬 NBQX および NMDA 受容体拮抗薬 Ro25-6981 の髄腔内投与で有意に抑制された。そのため、脊髄内グルタミン酸濃度の上昇が、オキサリプラチンの末梢神経障害の症状発現に関与することが示唆された。

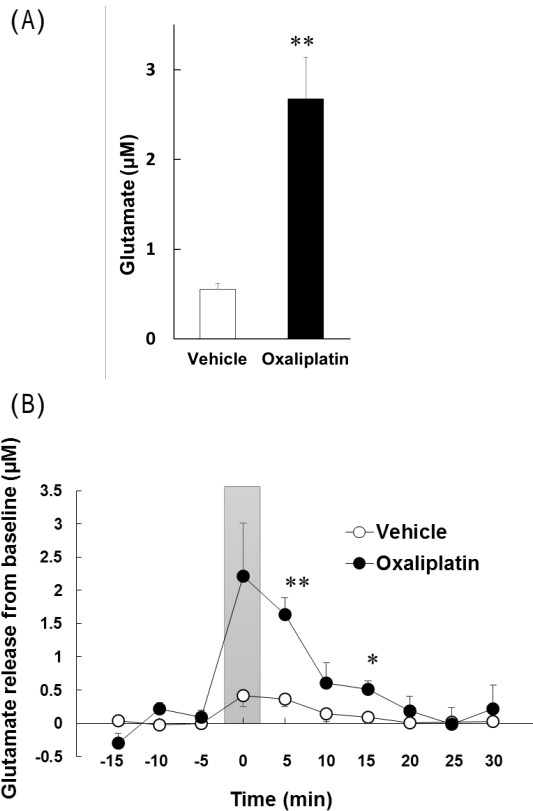


図1. 脊髄内グルタミン酸の変化  
(A) 非刺激時における脊髄内グルタミン酸濃度  
(B) 触刺激時における脊髄内グルタミン酸濃度の変化（グラフ中の灰色でしめす時間に触刺激を行った。）

(3) 末梢神経の傷害が脊髄の二次的な分子的变化を引き起こすシグナル・機序について

末梢神経 - 脊髄間のシナプス間隙のグルタミン酸濃度を調節する因子として、グルタミン酸トランスポーターが報告されている。オキサリプラチン投与後における、グルタミン酸トランスポーター-GLAST、GLT-1、EAAC1の発現変化について評価を行った。

オキサリプラチンを反復投与したラットにおいて、脊髄におけるGLT-1の発現量が有意に低下していた。GLASTおよびEAAC1の発現量に有意な変化は見られなかった（図2）。GLT-1は脊髄のアストロサイトなどに発現し、グルタミン酸をアストロサイトに取り込み、シナプス間隙のグルタミン酸濃度を調節する働きを担う。オキサリプラチン反復投与により、GLT-1の発現低下、グルタミン酸のアストロサイトへの取り込み低下により、シナプス間隙のグルタミン酸濃度の上昇が引き起こされたと考えられた。

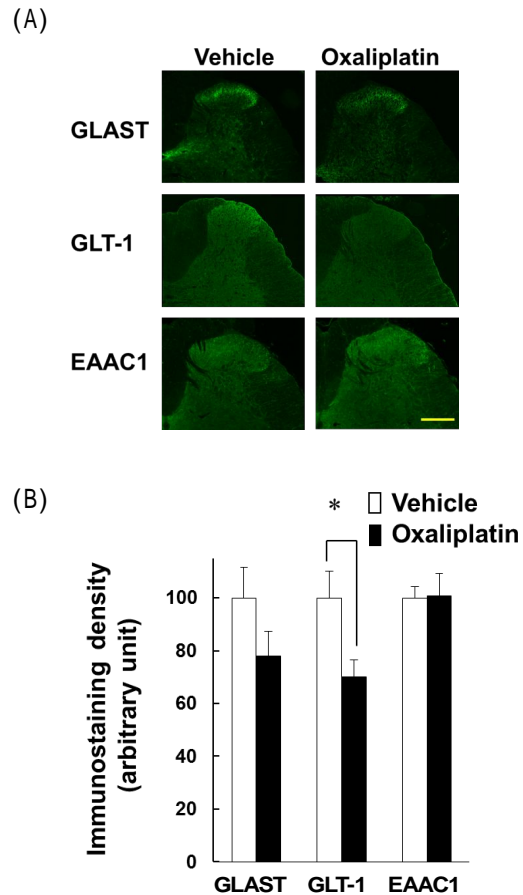


図2. 脊髄後角におけるグルタミン酸トランスポーターの発現変化  
(A) 免疫組織染色撮影像  
(B) 免疫組織染色撮影像を定量化したもの

以上(1)～(3)の結果より、オキサリプラチンの末梢神経障害の発現には、これまで知られていた末梢神経の軸索変性だけではなく、髄鞘障害や脊髄内におけるグルタミン酸トランスポーターGLT-1の発現低下とそれに伴う脊髄内のグルタミン酸濃度の上昇が関わることが初めて明らかとなった(図3)。これらを通規ターゲットとして、末梢神経障害の治療法・予防法の確立が可能と考えられる。

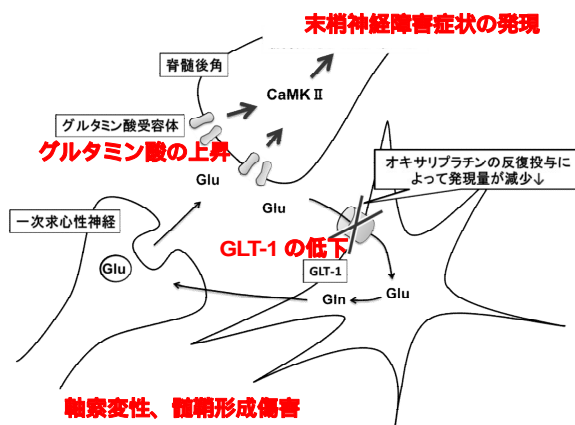


図3. オキサリプラチンによる末梢神経障害の発現メカニズム(新規治療ターゲット)

#### 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) Tsutsumi K, Yamashita Y, Ushio S, Kawashiri T, Kaname T, Fujita S, Oishi R, Egashira N. Oxaliplatin induces hypomyelination and reduced neuregulin 1 expression in the rat sciatic nerve. *Neurosci Res.* 2014. 80:86-90. doi: 10.1016/j.neures.2014.02.004. (査読あり)
- (2) Masuguchi K, Watanabe H, Kawashiri T, Ushio S, Ozawa N, Morita H, Oishi R, Egashira N. Neurotrophin® relieves oxaliplatin-induced neuropathy via Gi protein-coupled receptors in the monoaminergic descending pain inhibitory system. *Life Sci.* 2014. 7;98:49-54. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.229. (査読あり)
- (3) Ushio S, Kawashiri T, Egashira N. Basic evidence for efficacy of Goshajinkigan on oxaliplatin-induced neuropathy. *日本薬理学雑誌* 2014. 143:126-30. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/143/3/143\\_126/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/143/3/143_126/_pdf) (査読あり) review.

- (4) Yano T, Kawashiri T, Egashira N, Oishi R. Substance P in antitumor drug-induced adverse reactions. *日本薬理学雑誌* 2013. 142:255. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/142/5/142\\_255/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/142/5/142_255/_pdf) (査読あり)

〔学会発表〕(計10件)

- (1) 堤 国章、要 幸典、川尻 雄大、白石 遥、江頭 伸昭、増田 智先、パクリタキセル誘発末梢神経障害における炎症反応の関与、日本薬学会 第135年会、2015年3月25日～28日、神戸学院大学(兵庫県、神戸市)
- (2) 樋口 瞳、山本 将大、牛尾 聡一郎、川尻 雄大、江頭 伸昭、増田 智先、ボルテゾミブ誘発末梢神経障害に対する牛車腎気丸の効果、日本薬学会 第135年会、2015年3月25日～28日、神戸学院大学(兵庫県、神戸市)
- (3) 要 幸典、川尻 雄大、江頭 伸昭、増田 智先、パクリタキセル誘発末梢神経障害の発現要因解析、第31回日本薬学会九州支部大会、2014年12月6日～7日、第一薬科大学(福岡県、福岡市)
- (4) 川尻 雄大、堤 国章、山本 将大、牛尾 聡一郎、江頭 伸昭、増田 智先、オキサリプラチン、パクリタキセルおよびボルテゾミブによる末梢神経障害の発現機序の違い、第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2014年11月15日～16日、熊本大学(熊本県、熊本市)
- (5) Ushio S, Mitsuyasu S, Masuguchi K, Ozawa N, Ono Y, Kawashiri T, Egashira N, Masuda S. Association between decreased expression of GLT-1 derived spinal glutamate accumulation and oxaliplatin-induced mechanical allodynia. *Experimental Biology* 2014, 2014年4月26日～30日、サンディエゴ(アメリカ)
- (6) Kawashiri T, Tsutsumi K, Ushio S, Egashira N, Masuda S. Prophylactic effect of calcium channel blockers against oxaliplatin-induced neuropathy. *Experimental Biology* 2014, 2014年4月26日～30日、サンディエゴ(アメリカ)
- (7) 牛尾 聡一郎、光安 正平、小澤 奈々、小野 佑子、川尻 雄大、増田 智先、大石 了三、江頭 伸昭、オキサリプラチン誘発機

械的アロディニアにおける脊髄内グルタミン酸の関与、第 87 回 日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日～21 日、東北大学（宮城県、仙台市）

(8) 藤田 隼輔、牛尾 聡一郎、益口 賢、小澤 奈々、小野 佑子、馬場 美咲、川尻 雄大、増田 智先、大石 了三、江頭 伸昭、オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対するエキセナチドの効果第 87 回 日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日～21 日、東北大学（宮城県、仙台市）

(9) 光安 正平、牛尾 聡一郎、川尻 雄大、大石 了三、江頭 伸昭、オキサリプラチン誘発機械的アロディニアにおけるグルタミン酸神経系の関与、第 66 回 日本薬理学会西南部会、2013 年 11 月 16 日、福岡大学（福岡県、福岡市）

(10) 藤田 隼輔、牛尾 聡一郎、川尻 雄大、森田 春香、馬場 美咲、江頭 伸昭、オキサリプラチンによる神経障害ならびに抗腫瘍効果に対する 3-Aminobenzamide の作用、第 66 回 日本薬理学会西南部会、2013 年 11 月 16 日、福岡大学（福岡県、福岡市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川尻 雄大 （Kawashiri Takehiro）  
九州大学・大学病院・ 薬剤師  
研究者番号：30621685