

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08445

研究課題名(和文) 神経/シュワン細胞相互作用に着目した抗がん剤誘発末梢神経障害の機序・治療法の探索

研究課題名(英文) Possible involvement of Schwann cell in the development of chemotherapy-induced peripheral neuropathy and search for new therapies by drug-repositioning

研究代表者

今井 哲司 (Imai, Satoshi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80468579

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)：Paclitaxel は末梢神経を髄鞘化するシュワン細胞を脱分化することを明らかにした。さらに脱分化シュワン細胞から分泌されたガレクチン-3の血中濃度勾配に従い、マクロファージの坐骨神経周囲への遊走が惹起され、抗がん剤誘発末梢神経障害発症期における疼痛発現を助長している可能性が示唆された。さらに、既承認医薬品をスクリーニングした結果、シロスタゾールが paclitaxel によるシュワン細胞の脱分化を抑制し、モデルマウスにおける末梢神経障害に起因した疼痛関連行動を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Paclitaxel の投与に応答して脱分化シュワン細胞から分泌されるガレクチン-3は、末梢神経障害の発症に深く関わり、また分泌されたガレクチン-3は血液サンプル中で検出可能であることを突き止めた。この成果は、新たな抗がん剤誘発末梢神経障害の治療標的となるだけでなく、世界で初の疼痛関連疾患の血中バイオマーカーとなる可能性があり、その学術的意義は大きい。また、本研究で見出されたシロスタゾールは、既存の抗がん剤誘発末梢神経障害に対する対症療法とは異なり、メカニズムベースの新規根本治療薬となりうる候補役であり、その臨床的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：The novel essence of this study lies in the finding that dedifferentiated Schwann cell-derived galectin-3 plays a pro-nociceptive role via macrophage infiltration in the pathogenesis of taxane-induced peripheral neuropathy.

On the other hand, we demonstrated here that a phosphodiesterase 3 inhibitor, cilostazol, strongly facilitates maturation of primary cultures of rat Schwann cells. Co-treatment with cilostazol prevented paclitaxel-induced dedifferentiation of Schwann cell cultures and demyelination in a mixed culture of Schwann cells and DRG neurons. Notably, consecutive oral administration of cilostazol (0.3% in chow diets) suppressed Schwann cell dedifferentiation within the sciatic nerve and the development of mechanical hypersensitivity in CIPN model mice generated by multiple intraperitoneal injections of paclitaxel.

研究分野：神経科学、薬理学、医療薬剤学

キーワード：タキサン系抗がん剤 末梢神経障害 シュワン細胞 新規治療薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん化学療法はがん治療の根幹であるが、タキサン系および白金製剤といった抗がん剤の使用によって、痛み、四肢のしびれおよび感覚異常などの「末梢神経障害」が高率に発症し、これらの有害反応(副作用)はがん化学療法の用量規定因子ともなっている。また、抗がん剤誘発末梢神経障害は、抗がん剤使用の中止後も持続化・難治化するケースが多く報告されるが、未だ有効な予防および治療法は確立されていない。病理組織学的な研究から抗がん剤による末梢神経障害は、直接的な神経軸索あるいは神経細胞体障害に起因すると考えられてきたが、未だその機序が完全に解明されたとは言い難い。また、従来主に神経細胞のみに着目した研究では、抗がん剤による神経細胞障害の分子機構を探索することは可能でも、既に発症し難治化している症状を緩解する治療法の提言は困難である。米国臨床腫瘍学会の抗がん剤による末梢神経障害ガイドラインや日本がんサポーターズケア学会の「がん化学療法に伴う末梢神経障害マネジメントの手引き 2017 年版」では、唯一科学的根拠のあるものとして糖尿病性神経障害や慢性痛にも適応のある SNRI デュロキセチンが弱く推奨されているが、その有効性は中等度で、抗がん剤による末梢神経障害を予防/治療できるものではないことも記載されている。また、デュロキセチンは、白金系抗がん剤の末梢神経障害に対しては有効性が認められるが、タキサン系抗がん剤の末梢神経障害には著効しないことも報告されている。他に、ビタミン B12 製剤、神経障害性疼痛治療薬プレガバリン、鎮痛薬の NSAID やオピオイド(トラマドールやオキシコドン)が用いられることも多いが、その有効性は明らかでなく、ガイドラインでも投与は否定されていないが、推奨もされていない。これらの既存の治療薬は、有効性に乏しいビタミン B12 製剤を除き、あくまで対症療法の位置づけであり、現在、抗がん剤による末梢神経障害を予防/治療できる医薬品は存在しない。そのため、抗がん剤による末梢神経障害が重症化した場合には、基本的には抗がん剤の減量・休薬が余儀なくされる。

2. 研究の目的

末梢神経において髄鞘を形成しているシュワン細胞は、末梢神経に特有な神経軸索の再生に重要な役割を担っているだけでなく、その機能異常が末梢神経障害の引き金となることが知られている(J Neurosci 34: 1838-1855, 2015)。これまでに、研究代表者らは、1) ラット由来シュワン細胞にタキサン系抗がん剤を処置すると成熟シュワン細胞が未分化状態になること、2) 白金系抗がん剤をシュワン細胞に対して処置するとミトコンドリア障害を伴う進行性の細胞毒性が引き起こされること、3) こうした抗がん剤処置後のシュワン細胞における変化は神経細胞障害よりも先行して引き起こされることを確認している。これらの知見は、抗がん剤が神経細胞の障害よりも先にシュワン細胞の直接的な機能異常・障害を引き起こすことで末梢神経障害を惹起し、さらに神経軸索再生を阻害することで症状をより難治化させている可能性を示唆するものである。これらの知見に基づき、本研究では、主にシュワン細胞の機能変化に焦点をあて、抗がん剤による末梢神経障害の on-set 機構や難治化に関わる分子機構の解明を行うことを第一の目的とする。さらに、シュワン細胞の機能正常化/再髄鞘化を誘導する薬物を既承認医薬品化合物ライブラリーから探索・解析し、シュワン細胞による神経軸索再生・再髄鞘化による新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 使用動物および薬物

雄性 C57BL/6J マウス(5-7 週齢、日本エスエルシー)を使用した。Paclitaxel(Sigma-Aldrich) は 0.1% DMSO を溶媒として、各試験に使用した。

(2)CIPN マウスモデルの作製および von Frey テストによる痛覚過敏反応の評価

Day 1 および 2 に paclitaxel 20 mg/kg を腹腔内投与し、これを 8 週間(8 サイクル)繰り返すことでモデルマウスを作製した。マウス後肢における痛覚閾値の変動については、von Frey フィラメントを用いて、各週の day 7 に測定を行なった。疼痛閾値のプレ値測定は paclitaxel の投与開始直前に実施した。

(3)CIPN マウスモデルの血漿中における ガレクチン 3 濃度測定

Paclitaxel 投与開始 1、2、4、8 週後にマウスを pentobarbital (50 mg/kg、i.p.) で麻酔後に、経心採血で収集した血液検体を遠心分離(800 × g、15 分、4 °C)し、上清を採取して血漿検体とした。各血漿検体中の ガレクチン 3 濃度について、ELISA kit(LifeSpan BioSciences)を用いて測定を行なった。

(4) CIPN マウスモデルの坐骨神経標本を用いた免疫組織科学的検討

Paclitaxel 投与開始 1、2、4、8 週後にマウスを pentobarbital (50 mg/kg、i.p.) で麻酔後に、経心還流によりホルマリン固定し、坐骨神経を摘出した。その後、クライオスタットを用いて 16 μm の厚さにスライスしてスライドガラス上に固定した。各標本は、1 次抗体として、抗ガレクチン 3 抗体(1:166、Abcam)あるいは抗 Iba1 抗体(1:500、和光純薬)を用いて染色を行なった。

(5) 初代培養シュワン細胞の採取

まず、生後 2 日のラット仔の坐骨神経を採取し、2 日後に MACS 法、更に 2 日後に補体処置を行うことによりシュワン細胞の純粋化を行い、未分化型シュワン細胞を得た。その更に 2 日後、forskoline 20 μM および heregulin 20 ng/mL を培地に添加して分化誘導を行って成熟シュワン細胞を得た。Paclitaxel と 48 時間共処置した後、その分化状態についてミエリン塩基性タンパク質 MBP (抗 MBP 抗体; 1:300、Merck)、未分化型シュワン細胞マーカーである神経栄養因子受容体である p75 (抗 p75 抗体; 1:500、Abcam)、シュワン細胞脱分化マーカーである ガレクチン 3 (抗ガレクチン 3 抗体; 1:200、Abcam) の免疫活性を指標に免疫染色に従い評価をした。

4 . 研究成果

タキサン系抗がん剤 paclitaxel 処置によって脱分化したシュワン細胞において、 α -ガラクトシド結合タンパク質であるガレクチン-3 の発現が増加することを確認した。ガレクチン-3 は、免疫細胞の誘引や血管新生、器官形成などに関与し、炎症病態下においては細胞外へと分泌されることが知られている。そこで、初代培養シュワン細胞の培養上清中のガレクチン-3 濃度を ELISA により測定したところ、paclitaxel 処置によりシュワン細胞で発現増加したガレクチン-3 が細胞外へと分泌され、培養上清中のガレクチン-3 濃度が有意に増加することを見出した。さらに研究代表者は、数週間にわたり痛覚過敏反応を呈する抗がん剤誘発末梢神経障害モデルマウスから血漿画分を抽出して、ELISA により血漿中ガレクチン-3 濃度推移についての検討を行った。その結果、痛覚過敏反応の発現開始時期(投与 2 週間後)と相関して、血漿中ガレクチン-3 濃度の有意な増加が認められた。また、それらに加えて、モデルマウスの坐骨神経においてマクロファージの浸潤が観察された。一方、ガレクチン-3 欠損マウスにおいては、これらの変化はほぼ完全に抑制された。さらに、ガレクチン-3 のリコンビナントタンパク質を、セルロースガーゼを担体として健常な野生型マウスの坐骨神経周囲へ直接的に投与した結果、坐骨神経へのマクロファージの浸潤を伴った痛覚過敏反応が惹起された。以上の結果より、paclitaxel 投

与後において、脱分化シュワン細胞から分泌されたガレクチン-3 の血中濃度勾配に従い、マクロファージの坐骨神経周囲への遊走が惹起され、抗がん剤誘発末梢神経障害発症期における疼痛発現を助長している可能性が示唆された。

さらに、研究代表者は paclitaxel により脱分化したシュワン細胞が薬物除去後に再分化することを確認している。近年、中枢神経系の髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトの前駆細胞に作用し、髄鞘形成を促進する薬物が既承認医薬品から複数同定され、中枢神経系の脱髄性疾患である多発性硬化症の動物モデルにおいて症状の緩和・改善効果を示すことが報告されている。これらの背景から、抗がん剤の投与により脱分化あるいは障害されたシュワン細胞を薬物によって正常化し再髄鞘化を促すことで、抗がん剤誘発末梢神経障害の発症を予防、あるいは障害された神経軸索の再生を促進させて抗がん剤誘発末梢神経障害を治療できるのではないかと考えた。研究代表者は、京都大学が保有する既承認医薬品ライブラリーを用いて、分化シュワン細胞マーカーである MBP の免疫活性を指標に、シュワン細胞の分化促進薬のスクリーニングを実施し、強力なシュワン細胞分化誘導効果を有する化合物（シロスタゾール）を同定した。シロスタゾールの処置により、paclitaxel によるシュワン細胞の脱分化や、神経/シュワン細胞共培養系における paclitaxel による脱髄が抑制されるだけでなく、パクリタキセル誘発抗がん剤誘発末梢神経障害モデルマウスにおいて痛覚過敏反応が抑制されることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ntogwa Mpumelelo, Imai Satoshi, Hiraiwa Ren, Koyanagi Madoka, Matsumoto Mayuna, Ogihara Takashi, Nakagawa Shunsaku, Omura Tomohiro, Yonezawa Atsushi, Nakagawa Takayuki, Matsubara Kazuo	4. 巻 S0889-1591
2. 論文標題 Schwann cell-derived CXCL1 contributes to human immunodeficiency virus type 1 gp120-induced neuropathic pain by modulating macrophage infiltration in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 31233-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbi.2020.03.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai Satoshi, Koyanagi Madoka, Azimi Ziauddin, Nakazato Yui, Matsumoto Mayuna, Ogihara Takashi, Yonezawa Atsushi, Omura Tomohiro, Nakagawa Shunsaku, Wakatsuki Shuji, Araki Toshiyuki, Kaneko Shuji, Nakagawa Takayuki, Matsubara Kazuo	4. 巻 7
2. 論文標題 Taxanes and platinum derivatives impair Schwann cells via distinct mechanisms	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-05784-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Koyanagi M, Imai S, Matsumoto M et al
2. 発表標題 Possible involvement of immune response mediated by Schwann cells in paclitaxel-induced peripheral neuropathy.
3. 学会等名 Neuro2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koyanagi M, Imai S, Matsumoto M et al
2. 発表標題 Schwann cell-mediated immune response participates in paclitaxel-induced peripheral neuropathy pathogenesis.
3. 学会等名 The 49th annual meeting of Society for Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井哲司
2. 発表標題 抗がん剤による末梢神経障害のメカニズム
3. 学会等名 第23回滋賀県がん薬物療法conference (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井哲司
2. 発表標題 Dedifferentiation of Schwann cells by taxanes participates in the chemotherapy-induced peripheral neuropathy pathogenesis.
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 今井哲司
2. 発表標題 抗がん剤誘発末梢神経障害の発症における末梢神経系グリア細胞であるシュワン細胞の関与と根本治療法の探索.
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井哲司
2. 発表標題 タキサン系抗がん剤誘発末梢神経障害のバイオマーカー同定とドラッグ・リポジショニングによる新規治療法の確立
3. 学会等名 第5回包括的緩和医療科学学術研究会・第6回Tokyo疼痛緩和次世代研究会 合同研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井哲司
2. 発表標題 抗がん剤誘発末梢神経障害に対する新規支持療法開発に向けたトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井哲司
2. 発表標題 神経 - 免疫システムの 2-way コミュニケーションから考える神経障害性疼痛の発症機序
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学学会・61回日本神経化学会合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井哲司
2. 発表標題 Identification of biomarkers for taxanes-induced peripheral neuropathy and search for new therapies by drug-repositioning
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小柳 円花、今井 哲司、松本 真有奈、岩満 優輝、平岩 怜、Mpumelelo Ntlogwa、荻原 孝史、中川 貴之、松原 和夫
2. 発表標題 タキサン系抗がん剤誘発末梢神経障害の発症におけるシュワン細胞由来マクロファージ誘引因子の関与
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井哲司、中川貴之、松原和夫
2. 発表標題 抗がん剤誘発末梢神経障害のバイオマーカー同定とドラッグ・リポジショニングによる新規治療法確立の試み
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本 真有奈、今井 哲司、小柳 円花、中里 唯、荻原 孝史、中川 貴之、松原 和夫
2. 発表標題 シュワン細胞由来 galectin-3のパクリタキセル誘発末梢神経障害におけるバイオマーカーとしての有用性
3. 学会等名 第132回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Madoka Koyanagi, Satoshi Imai, Yui Nakazato, Mayuna Matsumoto, Takashi Ogihara, Takayuki Nakagawa, Kazuo Matsubara
2. 発表標題 Direct impairment of Schwann cells by taxanes and platinum derivatives is associated with etiologic mechanisms underlying chemotherapy-induced peripheral neuropathy
3. 学会等名 Society for Neuroscience2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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
連携研究者	中川 貴之 (Nakagawa Takayuki) (30303845)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	松原 和夫 (Matsubara Kazuo) (20127533)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
連携研究者	金子 周司 (Kaneko Syuji) (60177516)	京都大学・薬学研究科・教授 (14301)	
連携研究者	津田 誠 (Tsuda Makoto) (40373394)	九州大学・薬学研究科・教授 (17102)	