

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893118

研究課題名(和文) 抗がん剤誘発末梢神経障害の発生・難治化における神経-シュワン細胞相互作用の関与

研究課題名(英文) Differential effects of paclitaxel and platinum derivatives on primary cultured Schwann cells could be associated with the pathogenesis of peripheral neuropathy

研究代表者

今井 哲司 (Imai, Satoshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80468579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養シュワン細胞に対するパクリタキセル(TXL)、シスプラチン(CDDP)、あるいはオキサリプラチン(L-OHP)処置の影響を検討した。本研究の結果より白金系抗がん剤はシュワン細胞に対してミトコンドリア障害を誘導し、不可逆的な髄鞘障害による難治性の末梢神経障害との関連が考えられること、一方、TXLはシュワン細胞脱分化による髄鞘障害を引き起こすが可逆的で、タキサン系抗がん剤に認められる早期薬剤中止後の末梢神経障害の回復に、再分化したシュワン細胞が関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：To address mechanism underlying chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN), we focused on major supportive roles of Schwann cells in the maintenance of peripheral nerve systems and evaluated the effects of anti-cancer agents on primary cultured rat Schwann cells. Treatment of primary cultured Schwann cells from rat sciatic nerves with either cisplatin or oxaliplatin induced cell toxicity accompanied with mitochondrial dysfunction even after the washout of each drug. On the contrary, the treatment with paclitaxel to Schwann cells reverted to immature state accompanied with its bipolar process retraction. After the washout of paclitaxel, immature Schwann cells differentiated into mature state. These phenomena can explain different mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy depending on classes of anti-cancer agents. Furthermore, we propose here that such diverse effects of anti-cancer agents on Schwann cells are likely responsible for the development of CIPN.

研究分野：神経科学、神経薬理学、医療薬剤学

キーワード：抗がん剤 末梢神経障害 シュワン細胞 脱分化 ミトコンドリア障害

## 1. 研究開始当初の背景

がんは、日本で長らく死亡原因の第1位を占めており、国民病と言える。平成19年に施行(平成24年に変更)された「がん対策推進基本計画」では、重要課題として放射線療法、手術療法およびがん化学療法のさらなる充実が挙げられている。がん化学療法はがん治療の根幹であるが、タキサン系、ビンカアルカロイド系、白金製剤およびプロテアソーム阻害剤といった抗がん剤によって、四肢のしびれ、痛みおよび感覚異常などの「末梢神経障害」が引き起こされる。これらの有害反応(副作用)は比較的多くの患者が訴える症状であるが、有効な予防および治療法は確立されておらず、がん化学療法の用量規定因子ともなっている。一方、近年外来でのがん化学療法が急増しており、抗がん剤の適正使用および副作用対策の重要性が益々増大している。従って、抗がん剤による末梢神経障害の分子機構を明らかにし、有効な対応策を確立することは急務である。抗がん剤による末梢神経障害は、抗がん剤治療の用量規定因子ともなっているが、有効な対応策は確立されていない。従来主に神経細胞に着目した研究のみでは、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と考えられる。シュワン細胞が神経細胞の機能制御や末梢神経の軸索再生に密接に関連していることを考慮すると、シュワン細胞の機能異常は抗がん剤による末梢神経障害発症の引き金になるだけでなく、重篤化・難治化に深く関わっている可能性が推察される。

## 2. 研究の目的

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不明な点が多く、その機序が完全に解明されたとは言い難い。一方、末梢神経においてミエリンを形成しているシュワン細胞は、末梢神経に特有な神経再生能力に必要な不可欠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。興味深いことに、*in vitro*の実験において、極めて低濃度のシスプラチンやパクリタキセルなどの抗がん剤をシュワン細胞に暴露すると、細胞毒性を示すことが報告されている。研究協力者らも純度の高いラット由来シュワン細胞の初代培養実験系を確立し(図1)、抗がん剤の処置によりシュワン細胞における数種機能タンパク質の著明な発現低下が誘導されることを明らかにしている。これらの知見は抗がん剤が、1) シュワン細胞

の機能異常を引き起こすことで末梢神経障害を誘発する、2) シュワン細胞が制御する神経軸索再生を阻害することで末梢神経障害をより難治化させている可能性を示唆するものである。本研究ではこれらの仮説に基づき抗がん剤誘発末梢神経障害の病態を解明するために、ラット脊髄後根神経節由来の初代神経培養細胞とラット坐骨神経由来シュワン細胞の共培養実験系ならびに抗がん剤誘発末梢神経障害動物モデルを用いて、両細胞の細胞間相互作用、抗がん剤による末梢神経障害の on-set 機構ならびに難治化に関わる分子機構の解明を行った。

## 3. 研究の方法

初代シュワン培養細胞は、新生ラットの坐骨神経より採取した。新生ラットから摘出した坐骨神経を酵素処理した後に分散培養し、magnetic activated cell separation (MACS) システムを用いて、シュワン細胞のポジティブセレクションを行った。培養した初代シュワン培養細胞に、抗がん剤であるシスプラチン、オキサリプラチンあるいはパクリタキセルを処置した後、細胞生存率、細胞分化系譜の発現、細胞形態、細胞の機能などの変化について、MTT法、Western-blotting法や免疫染色法に従い、検討を行った。一方、初代神経細胞は新生ラットの後根神経節(DRG: dorsal root ganglia)より採取した。分散化したDRG細胞をパーコール溶液に重層し、密度勾配遠心分離法に従い純粋化した。その後、先述の方法にて作製した初代シュワン培養細胞と共培養し、14-21日間培養をすることで髄鞘化させた。抗がん剤であるシスプラチン、オキサリプラチンあるいはパクリタキセルを処置した後、Western-blotting法や免疫染色法に従い、末梢神経の脱ミエリン化が引き起こされているか、末梢神経やシュワン細胞障害が起こっているかについて検討を行った。

## 4. 研究成果

近年、神経障害により脱分化したシュワン細胞が、傷害されたミエリンや軸索のマクロファージによる貪食・除去に関わり、その後、再分化したシュワン細胞が軸索の再生や再髄鞘化に関わることなどが報告されている。また、末梢神経とシュワン細胞の細胞間相互作用の破綻が、神経軸索変性に関わることも明らかにされている。そこで本研究では、まず抗がん剤誘発末梢神経障害の原因となりうるシュワン細胞の機能変化をより詳細に検討するために、ラット坐骨神経由来の成熟シュワン細胞単独培養系にパクリタキセルあるいはシスプラチン、オキサリ

ラチンを処置し、ミエリン構成タンパク質 myelin basic protein (MBP)、未分化状態でのみ発現する神経栄養因子受容体 p75、ならびにシュワン細胞の分化やミエリン形成に關与する転写因子 (Oct-6、Krox20 など) の発現変化を免疫染色や Western blot 法により検討した。パクリタキセル、シスプラチンあるいはオキサリプラチンをシュワン細胞に 48 時間処置したところ、いずれも濃度依存的な細胞生存率の減少ならびにミエリン構成タンパク質である MBP および転写因子 Oct-6、Krox20n の発現低下が引き起こされた。シスプラチンあるいはオキサリプラチン処置群では細胞形態に変化は認められなかったものの、MitoTracker 染色や JC-1 凝集蛍光の低下で示されるミトコンドリア障害が惹起された。一方、パクリタキセル処置群では双極性突起が消失し、MBP 発現低下、シュワン細胞の未分化マーカーである p75 発現増加で示されるシュワン細胞の脱分化が観察された。これらのことから、抗がん剤によるシュワン細胞障害が末梢神経障害のトリガーになりうるといった仮説が考えられた。その仮説を検証するために、本研究では DRG 神経/シュワン細胞共培養系および DRG 移植片培養系といった、より生体内に近い条件下でメカニズムを評価可能な系を取り入れ、各種検討を行った。ラット胎児あるいは新生児より神経、シュワン細胞あるいは DRG を採取・純粋化した後に *in vitro* 条件下で髄鞘を形成させる技術は非常に時間がかかり、工程も煩雑であるため、国内で当該試験系を取り入れて研究推進しているラボはそれほど多くはない。本研究では、研究代表者は国立精神神経センター神経研究所疾病研究第 5 部 荒木敏之部長ならびに若月修二室長の協力を得て、これらの試験系の確立に成功した。そこで次に DRG 神経/シュワン細胞系に各種抗がん剤を処置した結果、いずれの群においても顕著な myelin 形成シュワン細胞の減少 (脱髄) が観察された。しかしながら、神経マーカー MAP2 で染色される神経細胞の形態変化および細胞数の減少は、同様の抗がん剤処置では全く確認されなかった。また、各薬物を洗浄除去後 48 時間培養したところ、シスプラチンあるいはオキサリプラチン除去後も細胞障害、MBP 発現低下が継続・進行したのに対し、パクリタキセル除去後は、双極性突起の再生および MBP 発現増加が認められ、シュワン細胞が再分化する様子が観察された。以上、本研究の結果より、白金系抗がん剤はシュワン細胞に対してミトコンドリア障害を誘導し、不可逆的な髄鞘障害による難治性の末梢神経障害との関連が考えられること、一方、パクリタキセルはシュワ

ン細胞脱分化による髄鞘障害を引き起こすが可逆的で、タキサン系抗がん剤に認められる早期薬剤中止後の末梢神経障害の回復に、再分化したシュワン細胞が關与する可能性が考えられる。これらの成果について、第 127 回日本薬理学会近畿支部会および第 89 回日本薬理学会年会にて口頭発表を行い、いずれも優秀発表賞を受賞した (参照：学会発表の項)。また、現在、海外学術誌に投稿中である。

#### 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)

1. 小柳円花、今井哲司、Ziauddin Azimi、三宅崇仁、白川久志、中川貴之、金子周司、松原和夫、培養シュワン細胞に対するタキサン系および白金系抗がん剤の異なる影響：抗がん剤誘発末梢神経障害の発生・難治化との関連、第 127 回日本薬理学会近畿支部会(2015年6月26日、長良川国際会議場)

2. 中里唯、今井哲司、小柳円花、Ziauddin Azimi、米澤淳、大村友博、中川俊作、矢野育子、白川久志、金子周司、中川貴之、松原和夫、シュワン細胞に着目したタキサン系あるいは白金系抗がん剤誘発末梢神経障害の発症機序の相違、第 89 回日本薬理学会年会(2016年3月9-11日、パシフィコ横浜)

[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：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 哲司 ( IMAI, Satoshi )

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80468579

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：