

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08411

研究課題名(和文)臨床における白金系抗がん剤の神経障害に対する漢方薬の副作用回避に関する研究

研究課題名(英文) A study on the avoidance of side effects of Chinese herbal medicine on neuropathy caused by platinum-based anti-cancer drugs in clinical practice

研究代表者

山田 治美 (Yamada, Harumi)

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：70433620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オキサリプラチン(L-OHP)による急性末梢神経障害の発症因子の解明と漢方薬による副作用回避法の確立について研究を行った。臨床でのL-OHP使用患者の調査において、早期に末梢神経障害を発症した患者では、L-OHPの初回投与量が有意に多いことが示された。次いで、ラットにおいて末梢神経障害抑制効果および、冷感受容体のTRPM8およびTRPA1遺伝子の増加抑制が確認されている牛車腎気丸を構成する10生薬成分の内、6生薬から構成される六味丸で、牛車腎気丸と同様にラットにおいてL-OHPによる冷感感受性亢進の抑制および、TRPM8とTRPA1遺伝子の発現抑制が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん化学療法における副作用は、白血球減少などの致死性の重篤なものから、比較的軽微なものまで多岐にわたる。その中で、オキサリプラチンによる冷感過敏症状を主症状とする末梢神経障害は、抗がん剤の用量制限や中断にもつながる重篤な副作用である。本研究では、オキサリプラチンが高用量のレジメンでは早期に末梢神経障害が発症しやすいことを示し、末梢神経障害のリスクファクターを見出した。また、臨床において経験的に使用されている簡保製剤の牛車腎気丸の中の6生薬から構成される六味丸によっても牛車腎気丸と同様の効果が得られたことから、生薬成分の絞り込みを行うことで今後の末梢神経障害軽減の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the causative factors of oxaliplatin (L-OHP) in acute peripheral neuropathy and established a method of avoiding side effects caused by Kampo medicines. A clinical survey of patients using L-OHP showed that the initial dose of L-OHP was significantly higher in patients who developed early peripheral neuropathy. Next, among the constituent crude drugs of Goshajinki-gan, which are confirmed to suppress peripheral neuropathy and increase of the transient receptor potential cation channel subfamily TRPM8 and TRPA1 genes in rats, Rokumi-gan composed of 6 crude drugs was used. Similar to the circles, suppression of hypersensitivity to cold sensation by L-OHP and suppression of TRPM8 and TRPA1 gene expression were shown in rats.

研究分野：医療薬学

キーワード：白金系抗がん剤 末しょう神経障害 副作用 漢方薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行・再発性大腸がんのキードラッグである白金系抗がん剤オキサリプラチン (L-OHP) は、重篤な副作用として、投与初期より冷感知覚過敏症状を引き起こし、患者の QOL および治療に大きな影響を及ぼす。この冷感知覚過敏に対して、牛車腎気丸(GJG)の投与が有効であるとの臨床報告があるものの、その作用メカニズムは未だ明らかにされていない。また、GJG は 10 種の生薬成分より構成されているが、いずれの成分が冷感知覚過敏症状に効果を示すのかも明らかではない。

申請者はこれまで、L-OHP 投与により冷感知覚過敏症モデルラットを作成し、GJG の併用による症状抑制効果について検討した。その結果、L-OHP 投与により、冷感の受容器として機能する transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) および ankyrin 1 (TRPA1) の遺伝子発現レベルが上昇した。その一方、L-OHP/GJG 併用ラットでは、その発現レベルは L-OHP 非投与ラット (Control 群) と同様であり、GJG は TRPM8 および TRPA1 遺伝子の発現レベルを低下させることで、冷感知覚過敏症状を改善させることを示した(Kato Y, Yamada H *et al.*, *Anti-Cancer Drugs*, 2013, PMID: 24052105)。このような知見を臨床現場へのフィードバックすることを目的とし、

(1) 臨床検体を用いた TRPM8 および TRPA1 遺伝子の発現パターンと冷感知覚過敏症発症との関連性の解析

(2) 牛車腎気丸の投与時期の最適化

(3) 冷感知覚過敏症抑制効果を示す生薬成分の絞り込み

の 3 点を計画している。

2. 研究の目的

(1) 臨床検体を用いた TRPM8 および TRPA1 遺伝子の発現パターンと冷感知覚過敏症発症との関連性の解析について、まず、検体採取時の侵襲性が低く、冷感感受性評価を行える口腔内細胞をターゲットとして、健常者の口腔内細胞における TRPM8、TRPA1 遺伝子の発現および変動に関する基礎的データの収集と解析を行う。これらのデータ収集が可能になった時点で、国際医療福祉大学三田病院と連携して患者の口腔内細胞での解析を行うとともに、過去の治療患者からの情報を収集し、冷感知覚過敏症発症の関連因子なども調査する。

(2) 牛車腎気丸の投与時期の最適化については、TRPA1/TRPM8 発現細胞またはラット後根神経節 (DRG) 初代培養細胞を用いて牛車腎気丸の効果的な投与計画を推定し、最終的にラットを用いて冷感知覚過敏症状との関連性を精査する。

(3) 冷感知覚過敏症抑制効果を示す生薬成分の絞り込みについては、GJG を構成する各生薬抽出物を用いる。先行研究と同様のプロトコールにて、TRPA1/TRPM8 発現細胞または DRG 初代培養細胞に対して L-OHP および各種生薬抽出物を併用した際の、TRPM8、TRPA1 遺伝子発現パターンを解析することで有効生薬成分を絞り込み、効率が良く、価格が安い生薬の方剤を見出す。

3. 研究の方法

(1) 健常者の口腔内細胞を採取し、TRPM8、TRPA1 遺伝子の発現および変動に関する基礎的データの検討を行う。また、これら遺伝子発現の変動を起こすことが知られている *l*-menthol 等の刺激による TRPM8 および TRPA1 遺伝子の発現変化を解析する。これらのデータ収集が可能となった時点で、L-OHP 投与患者口腔内細胞研究の倫理審査承認後、研究実施期間において、患者へのインフォームドコンセント、検体採取および患者情報の収集を行う。さらに、国際医療福祉大

学三田病院と連携して、L-OHP を含む化学療法施行患者の情報を収集し、冷感知覚過敏を含む早期末梢神経障害発症の関連因子を調査する。

(2) DRG 初代培養細胞または、*TRPA1/TRPM8* 発現細胞を用いて、GJG を L-OHP 投与 7 日前から 7 日後の 4 段階で添加し、real-time RT-PCR 法により、細胞中の *TRPM8* および *TRPA1* 遺伝子の発現パターンを解析する。

(3) 当初、DRG 初代培養細胞または *TRPA1/TRPM8* 発現細胞を用いて、GJG の構成生薬抽出物を添加し、real-time RT-PCR 法により、細胞中の *TRPM8* および *TRPA1* 遺伝子の発現パターンを解析することとしていたが、研究過程でラットによる研究へと変更した。Wistar 系雄性ラットに、GJG 関連方剤である六味丸および L-OHP をそれぞれ経口、腹腔内投与し、冷感に対する反応性をコールドプレートで 12 日間解析した。行動試験終了後、ラットより DRG を採取し、real-time RT-PCR 法で、細胞中の *TRPM8* および *TRPA1* 遺伝子の発現パターンを解析した。

4 . 研究成果

(1) 健常者の口腔内細胞における *TRPM8*、*TRPA1* 遺伝子の発現および変動に関する基礎的データの収集に向け、健常者の口腔内細胞を、各種スワブを用いて採取した。得られた細胞について、RT-PCR により遺伝子解析を行ったが、サンプル採取に用いるスワブの違いだけでなく、採取する際の摩擦強度、回数により、得られるサンプルに大きなばらつきが認められ、患者への適用ができないことが判明し、口腔内細胞の採取を断念せざるを得なかった。本研究では、冷感過敏症の大きな要因として、舌での知覚過敏が考えられるが、舌細胞の採取方法について簡便な方法の開発が現時点では進んでおらず、今後舌細胞の効率的な採取方法の確立が必要であろう。

次に、国際医療福祉大学三田病院と連携して、L-OHP を含む化学療法施行患者の情報を収集し、冷感過敏症を含む早期末梢神経障害発症の関連因子の調査については、2010 年 1 月～2017 年 8 月に当院において L-OHP を含む化学療法として FOLFOX4/6 療法、FOLFIRINOX 療法、SOX 療法、および CapeOX 療法を施行した患者 71 例（男性 37 例，女性 34 例）を対象に、早期に急性末梢神経障害を発症した患者とそれ以外の患者の 2 群間での各種因子の違いを比較解析した。早期に急性末梢神経障害を発症した患者（1 コース発症群）とそれ以外の患者（1 コース非発症群）の 2 群間での各種因子の違いを検討した結果、早期に急性末梢神経障害を発症した患者では、L-OHP の初回投与量が有意に多いことが示された。（表 1）

さらに、L-OHP の投与量で 2 群に分け、その急性末梢神経障害の累積発症率を比較した結果、高用量で投与された患者の累積発症率が有意に高かった。（図 1）

これら解析より、L-OHP 投与による冷感過敏症を含む急性末梢神経障害の発症には、投与量が関係していることを発見した。

表 1. 1 コース発症群と非発症群における背景比較

	1 コース発症群	1 コース非発症群	P 値 ^{a)}
症例 (例)	37	34	—
年齢 (歳)	63.0 (50.0–68.0)	65.0 (57.0–71.0)	0.165 ^{a)}
男性/女性 (例)	19/18	18/16	0.894 ^{b)}
身長 (m)	1.61 (1.54–1.72)	1.63 (1.55–1.68)	0.936 ^{a)}
体重 (kg)	57.0 (49.0–62.5)	53.5 (46.2–60.2)	0.298 ^{a)}
BMI (kg/BSA)	21.0 (19.4–24.4)	20.1 (19.1–22.3)	0.222 ^{a)}
AST (U/L)	21.0 (17.0–29.5)	22.5 (18.8–28.3)	0.620 ^{a)}
ALT (U/L)	21.0 (14.5–32.0)	18.5 (12.0–29.8)	0.294 ^{a)}
Ccr (mL/min)	88.3 (76.9–113.1)	81.5 (65.8–90.4)	0.066 ^{a)}
Scr (kg/BSA)	0.66 (0.53–0.81)	0.68 (0.57–0.79)	0.683 ^{a)}
初回投与量 (mg/BSA)	117.3 (84.7–127.4)	83.5 (80.6–85.0)	<0.001 ^{a)}
高用量群/低用量群 (例)	23/14	5/29	<0.001 ^{b)}
GJG 併用 有/無 (例)	12/25	10/24	0.803 ^{b)}
胃	3	1	—
原発部位 (例)			
小腸	1	0	—
大腸	31	23	—
膵臓	2	10	—

質的変数は例数, 連続変数は中央値 (四分位範囲) で表記. a) Mann-Whitey *U*-test, b) Fisher's exact test. BMI: body mass index, BSA: body surface area, AST: aspartate amino transferase, ALT: alanine amino transferase, Ccr: creatinine clearance, Scr: serum creatinine, GJG: 牛車腎気丸.

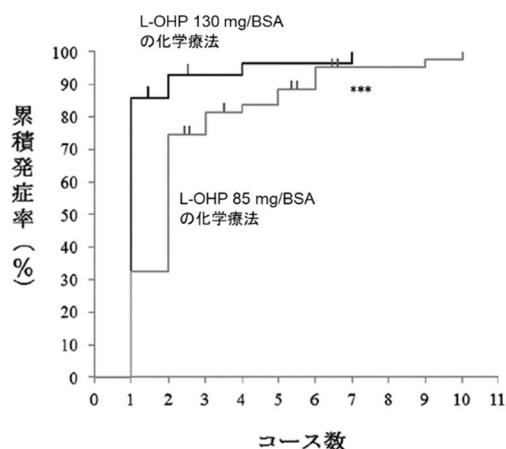


図 1. L-OHP の投与量ごとの急性末梢神経障害の累積発症率の比較

(2) *TRPA1* および *TRPM8* 発現細胞について、論文報告のある細胞 (HSC4, LNCap など) を用いて、*TRPM8* および *TRPA1* 遺伝子の発現を確認した。まず HSC4 細胞については、real-time RT-PCR 法により、細胞中の *TRPM8* および *TRPA1* 遺伝子の発現パターンを解析した結果、いずれも遺伝子の発現自体が確認できなかった。LNCap 細胞においては、論文の報告と同様、*TRPM8* 遺伝子の発現が確認できた。しかし、各種濃度の L-OHP 暴露により、細胞死が誘発され、GJG による影響を解析するに至らなかった。これら結果を加味すると、DRG 初代培養細胞においても、生体中の L-OHP の影響と異なる挙動が誘発されると判断され、細胞での研究については、良好な成績を収めるに至らなかった。なお、国際医療福祉大学三田病院との共同研究から、GJG の投与と、早期の急性末梢神経障害発症との間に関連性が認められなかった (表 1)。今回、国際医療福祉大学三田病院における GJG の投与については、急性末梢神経障害発症後の投与が多く、発症後の GJG 投与は効果が示されないことが判明した。過去の申請者の知見と併せると、GJG は、少なくとも L-OHP 投与前から施行される必要があることが示された。

(3) (2)とも関連して、本来であれば DRG 初代培養細胞または、*TRPA1*/*TRPM8* 発現細胞を用いて、GJG の構成生薬抽出物を添加し、real-time RT-PCR 法により、細胞中の *TRPM8* および *TRPA1*

遺伝子の発現パターンを解析することとしていたが、*in vitro* と *in vivo* での L-OHP の影響が大きく異なる可能性が認められたことから、ラットを用いて、研究実施することとした。Wistar 系雄性ラットに、GJG 関連方剤である六味丸および L-OHP をそれぞれ経口、腹腔内投与し、冷感に対する反応性をコールドプレート (10℃、4℃) で 12 日間解析した。行動試験終了後、ラットより DRG を採取し、real-time RT-PCR 法により、*TRPM8* および *TRPA1* 遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、各薬剤投与ラットについて、投与 3 日および 10 日後に、10℃ における冷感感受性試験 (a) を、投与 5 日および 12 日後に、4℃ における冷感感受性試験 (b) を実施した結果、縦軸はコールドプレートにおけるラットの脚上げ行動の数を示しており、L-OHP 単独投与群では脚上げ行動が増加し、冷感過敏症状が出現しているが、L-OHP/六味丸併用群では、その症状の出現は確認できなかった。(図 2)

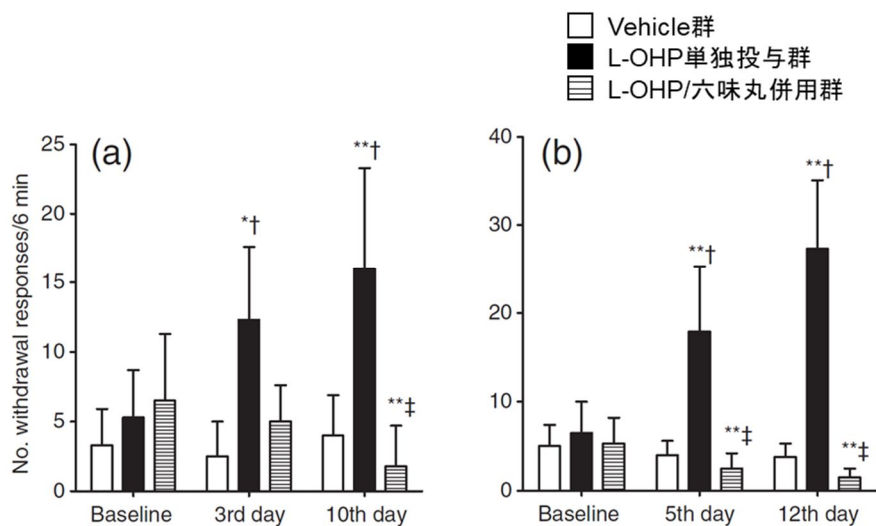


図 2. L-OHP および六味丸投与ラットの冷感感受性試験

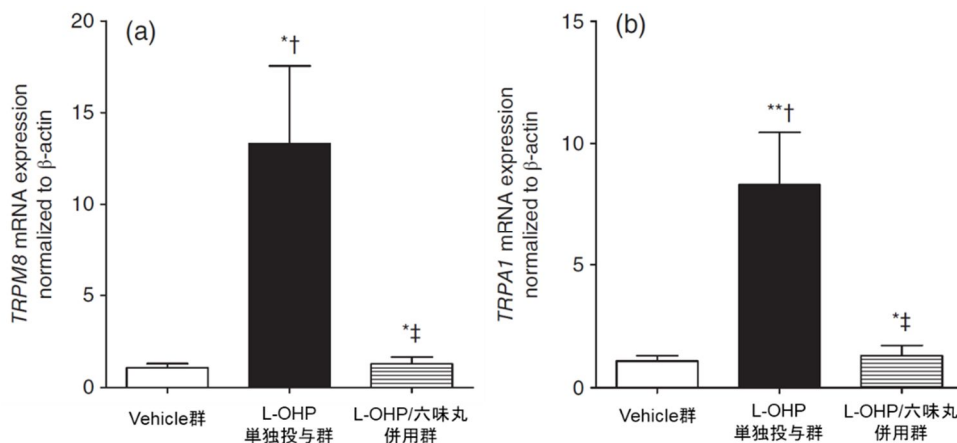


図 3. L-OHP および六味丸投与ラットにおける *TRPM8* (a) および *TRPA1* (b) 遺伝子の発現

行動試験終了後に、各薬剤投与ラットより DRG を単離し、real-time RT-PCR により、*TRPM8* および *TRPA1* 遺伝子の発現について解析した。その結果、L-OHP 単独投与群において、いずれの遺伝子も発現が上昇している一方、L-OHP/六味丸併用群では発現レベルは Vehicle 群と同様であった。(図 3)。

これらの成果から、GJG を構成する 10 種の生薬のうち、六味丸に含まれる 6 種の生薬の成分に効果があることが確認できた。

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 2件）

1. 著者名 清水加奈子, 加藤芳徳, 中村裕義, 山田治美	4. 巻 44
2. 論文標題 オキサリプラチンによる急性末梢神経障害発症の危険因子の解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医療薬学	6. 最初と最後の頁 623 ~ 630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.5649/jjphcs.44.623	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 -

1. 著者名 Shimizu Kanako, Kato Yoshinori, Nakamura Hiroyoshi, Yamada Harumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Rokumigan alleviates oxaliplatin induced cold hypersensitivity by suppression of transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 and subfamily A member 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 32 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tkm2.1205	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 芳徳, 篠 加奈子, 中村 裕義, 山田 治美
2. 発表標題 早期発症オキサリプラチン誘発性末梢神経障害と化学療法レジメン中の体表面積当たりのオキサリプラチン量との関連性
3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠 加奈子, 加藤 芳徳, 中村 裕義, 山田 治美
2. 発表標題 早期発症オキサリプラチン誘発性末梢神経障害の危険因子の探索
3. 学会等名 第27回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 篠 加奈子, 加藤 芳徳, 中村 裕義, 山田 治美
2. 発表標題 オキサリプラチン誘発性末梢神経障害発症に及ぼす関連因子に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----