

令和元年6月11日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08908

研究課題名(和文) 抗がん剤による神経障害の発現機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of neuropathy caused by anticancer drug

研究代表者

久米 学 (KUME, Manabu)

神戸大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：10720922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、細胞を用いた実験で炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ が共存する時にシスプラチンの膜透過性が亢進することを明らかにした。このことから、シスプラチンの血中濃度は、炎症性サイトカインの影響を受ける可能性が示唆された。次に、ヒト血清を用いて、プラチナ製剤を含むがん化学療法施行中の炎症性サイトカインの変動に関して検討した。炎症性サイトカインは、がん化学療法のレジメンに関わらず、投与後2週間程度でピークが認められた。これらのことから、がん化学療法により炎症性サイトカインが変動することが明らかとなり、これによりシスプラチンの血管透過性が亢進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラチナを含むがん化学療法により炎症性サイトカインが変動し、これによりプラチナ製剤の血管透過性が亢進する可能性が示唆された。このことから、炎症によってプラチナ製剤の細胞内への取り込み量が増加することが、神経障害が発現する要因の1つである可能性が示唆された。今後、血管透過性の亢進によるヒト神経細胞におけるプラチナ製剤の取り込み量の変動に関して更なる検討を行い、抗がん剤による神経障害の発現機序の解明に努めたい。

研究成果の概要(英文)：In the present study, first, in experiments using cells, it was clarified that the membrane permeability of cisplatin is enhanced when the inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  coexist. This suggests that the blood concentration of cisplatin may be affected by inflammatory cytokines. Next, human serum was used to examine changes in inflammatory cytokines during chemotherapy including platinum. Inflammatory cytokines peaked around 2 weeks after administration regardless of the chemotherapy regimen. These results suggest that inflammatory cytokines may be altered by chemotherapy, and as a result, vascular permeability of cisplatin may be enhanced.

研究分野：医療薬学

キーワード：シスプラチン がん化学療法 神経障害 炎症 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シスプラチン (CDDP) は固形癌に対して幅広く使用されている抗癌剤の1つである。しかしながら、CDDP 投与後に発現する神経障害や腎障害などの副作用が問題となり、治療完遂に至らないケースも認められる<sup>1)</sup>。CDDPによる神経毒性で代表的なものは末梢神経障害と聴神経毒性である。通常は蓄積投与量が400mg/m<sup>2</sup>を超えると神経症状が出現しやすくなり、リスク因子としては性別(女性)、糖尿病などの基礎疾患、paclitaxelなどの神経毒性を有する薬剤の併用・前治療歴がある等が挙げられるが、個人差が大きく、その予測は困難である。また、治療薬も有効なものは存在せず、糖尿病神経症と同様にamitriptylineが投与されることがあるが、臨床試験での評価はなされていない。Amifostineは有効と報告がある一方で、無効との報告があり、米国臨床腫瘍学会(ASCO)のガイドラインではAmifostineの予防的投与は推奨されていない。

CDDP は主に腎臓から体外へ排泄される。血漿中の遊離体CDDP は、投与後速やかに消失し、その半減期は30分程度である。一方、血中の総CDDP は相対的に半減期が長く、投与後も血漿中あるいは組織中に長期間滞留することが報告されている<sup>2)</sup>。CDDP が体内に長期間滞留する要因の1つとして、CDDP とアルブミンのような血中タンパク質との結合が考えられており、化学療法後数カ月から数年間経過後も、血中に残存する白金の10%程度は活性体として存在することが報告されている<sup>2)</sup>。CDDP を投与された転移性胚細胞腫患者において、化学療法終了時では感覚異常を有する患者の割合は11%であったのに対し、終了3カ月後にはその割合は65%に上昇し<sup>3)</sup>、更に、Sprautenらは血清中に残存する白金濃度とCDDP による末梢神経障害や聴覚毒性の重篤度との関連が報告されている<sup>4)</sup>。これらのことから、化学療法後に血清中に残存する白金濃度が遅発性副作用のマーカーになる可能性が示唆される。一方、CDDP は腎排泄型薬剤であるため、投与直後の血中濃度は腎機能に相関するが、長期的な血中濃度は必ずしも腎機能に依存するわけではない。すなわち、腎機能以外の要因が残存する白金濃度に影響を及ぼす可能性が考えられる。中でも、全身炎症状態は、生体内における内分泌学的、免疫学的及び血液学的な変化を引き起こすことから、これら変化がCDDP の薬物動態に影響を与える可能性が考えられる。我々は、全身炎症状態におけるCDDP の血中濃度の変動を検討するために、CDDP を含むがん化学療法実施後に手術を施行した患者を対象として、手術前後における白金濃度変化について検討した。その結果、手術後に急激な血漿中白金濃度の低下が観察され、炎症により白金の組織間隙への移行量が増大する可能性を報告した<sup>5)</sup>。

以上のことから、本研究では抗がん剤、特に白金製剤による神経障害発現機序の解明を目的として、特に炎症と神経障害との関連に着目し、その発現機序を明らかにする。

(引用文献)

- 1) M. Brydoy, et al., *J Natl Cancer Inst*, 2009
- 2) E. Brouwers, et al., *BMC Clin Pharmacol*, 2008.
- 3) M FC von Schlippe, et al., *Br J Cancer*, 2001
- 4) M.Sprauten, et al., *J Clin Oncol*, 2012
- 5) M.Kume et al., *Jpn J TDM*, 2013.

### 2. 研究の目的

本研究では、抗がん剤、特に白金製剤による神経障害発現機序の解明を目的として、炎症と神経障害との関連に着目し、その発現機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 細胞を用いた炎症によるCDDPの血管透過性の変動に関する検討

1) 正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 細胞は EGM-2 培地により維持継代した。細胞培養用 24 ウェルプレートに EGM-2 培地を添加し、コラーゲンコートされたカルチャーインサート (pore size: 0.4  $\mu\text{m}$ ) をセットした。インサートのメンブレン上に HUVEC 細胞を播種し、コンフレントとなるまで培養した。インサートの内腔を血管内と想定し、被験薬である CDDP (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、血管透過性のトレーサー分子であるフルオレセイン (FITC) 結合デキストラン (分子量: 70,000) を 30 分間処置した。血管透過性を亢進させる因子として腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ )、ヒスタミン、インターロイキン (IL)-1 を選択し、CDDP と共存させた。また、血管透過亢進のポジティブコントロールとしてサイトカラシン B を選択した。処置後、24 ウェルプレート内およびインサート内の溶液の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより測定し、溶液内の白金濃度を原子吸光法により測定した。

2) HUVEC をトランスウェル上に均一に播種し、血管膜モデルを構築した。まず、本モデルの妥当性を評価するために FITC デキストラン の膜移送を検討した。この血管膜モデルを用いて、CDDP 処置時の膜透過性に及ぼす共存因子の影響を評価した。

#### ヒト血清を用いたプラチナ製剤の炎症性サイトカインの変動に関する検討

プラチナを含むがん化学療法が炎症性サイトカインに及ぼす影響について、ヒト血清を用いて検討した。CDDP またはカルボプラチンを含む化学療法を施行した 11 例 (それぞれ 7 例及び 4 例) の血清を用いて、IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  を測定した。うち 2 例については、プラチナ製剤を含まない化学療法中のサイトカインも測定した。

### 4. 研究成果

#### 1)

FITC の蛍光強度は、細胞を播種しないブランクウェルと比較して、細胞を播種したウェルの 24 ウェル内溶液が顕著に高かった。さらに、生理的に血管透過性を亢進させる TNF- $\alpha$  および IL-1 の共存により FITC の透過性はサイトカラシン B と同等まで亢進したが、ヒスタミンの処置においては顕著な透過亢進を認めなかった。CDDP の透過性はサイトカラシン B の共存によっても亢進を認めなかった。しかしながら、IL-1 の共存により、24 ウェル内への透過は顕著に亢進した。ヒスタミンなどは血管透過性の時間依存性が報告されているが、その他のサイトカインについてはこのような報告はなく、今後 CDDP においても検討すべき重大な結果であると考えられる。

#### 2)

血管膜モデルの妥当性について、FITC デキストラン 単独を細胞不在のトランスウェル内側に処置すると一定時間後の外側の培地に FITC デキストラン の移送が認められるが、細胞存在下ではウェル外側への移送は認められなかった。一方、炎症性物質であるサイトカラシン B を炎症状態のポジティブコントロールとして共存させるとウェル外側の FITC デキストラン 濃度が上昇することを確認した。血管膜モデルを用いた検討において、CDDP 単独の処置においては処置時間依存的に膜透過量の亢進を認めた。また、サイトカラシン B と CDDP の共存により、細胞不在条件とほぼ同等の CDDP の膜透過を認めた。一方、CDDP とヒスタミンの共存においては CDDP の膜透過性が亢進しないことを明らかにした。ヒスタミンの膜透過性亢進作用については、極めて短期間の作用であることが報告されていることから、CDDP の手術直後の高度炎症状態における血中濃度低下にヒスタミンの寄与は小さい可能性を示した。TNF- $\alpha$  や IL-1 の共存時に CDDP の膜透過性が亢進する

ことを明らかにしていることから、手術直後の高度炎症状態におけるCDDPの血中濃度低下においては、サイトカインの影響を受ける可能性を示唆した。

以上のことから、HUVEC細胞を用いた炎症によるCDDPの血管透過性の変動に関する検討では、血管膜モデルを構築し、TNF- $\alpha$  やIL-1 の共存時にCDDPの膜透過性が亢進することを明らかにした。このことから、手術直後の高度炎症状態におけるCDDPの血中濃度低下においては、サイトカインの影響を受ける可能性が示唆された。次に、CDDP処置時の膜透過性に及ぼす共存因子の影響について、CDDP単独の処置においては、処置時間依存的に膜透過量の亢進を認めた。また、サイトカラシンBとCDDPの共存により、細胞不在条件とほぼ同等のCDDPの膜透過が認められた。

ヒト血清を用いたプラチナ製剤の炎症性サイトカインの変動に関する検討では、各サイトカインにおいて、がん化学療法のレジメンに関わらず、投与後2週間程度でピークが認められたが、各サイトカインの変動とレジメンとの関連は認められなかった。

以上のことから、炎症によってCDDPの血管透過性が亢進する可能性が示唆された。またプラチナ製剤により炎症性サイトカインが変動することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Nakamura T, Takahashi M, Niigata R, Yamashita K, Kume M, Hirai M, Yasui H. Changes in blood concentrations of trace metals in cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Biomed Rep.* 2016 Dec;5(6):737-744. doi: 10.3892/br.2016.789.

〔学会発表〕(計0件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。