

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16101

研究課題名(和文) Mitofusin2に着目したパクリタキセルによる末梢神経障害のメカニズム解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of paclitaxel-induced peripheral neuropathy by Mitofusin2

研究代表者

山下 郁太 (Yamashita, Yuta)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90823964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：Mitofusin 2 (Mfn2)に着目したパクリタキセル (PTX) 誘発性末梢神経障害の機序解明および治療法の探索を行った。PTXはラット脊髄後根神経節由来細胞×マウス神経芽細胞腫ハイブリドーマF11細胞に対して神経突起伸長阻害とMfn2発現量の低下を引き起こした。しかし、MFN2の発現量低下が神経突起伸長阻害に關与するかは明らかにすることはできなかった。さらに、治療候補薬として想定したBAPTA-AMやシクロスポリンAはPTXによる神経突起伸長阻害とMfn2の発現量低下には無効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTXは培養細胞に対して神経様突起伸長阻害とMfn2の発現量低下を引き起こした。このことは、PTX誘発性末梢神経障害モデルラットで起きた現象を細胞実験で模倣可能であることを示唆する。よって本結果は、培養細胞がPTX誘発性末梢神経障害における病態解明や治療候補薬スクリーニングに有用であることを示唆している。今後、PTXによるMfn2発現量低下と神経障害との関係と明らかにすることで、新たな治療・予防法の確立につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on mitofusin 2 (Mfn2), I investigated the mechanisms and treatments of paclitaxel (PTX)-induced peripheral neuropathy. PTX inhibited neurite outgrowth and decreased MFN2 expression in F11 dorsal root ganglia × mouse neuroblastoma cells. However, I was unable to clarify whether MFN2 is involved in neurite outgrowth inhibition. Moreover, BAPTA-AM and cyclosporin A, both of which are therapeutic candidates, had no effect on PTX-induced inhibition of neurite outgrowth and reduction of Mfn2 expression.

研究分野：薬理学

キーワード：パクリタキセル 末梢神経障害 mitofusin 2

## 1. 研究開始当初の背景

タキサン系抗がん剤パクリタキセル (PTX)は、高頻度でしびれや痛みといった末梢神経障害を引き起こし、がん治療の継続を困難にしている。しかし、この末梢神経障害が発現するメカニズムは未だ明らかとなっていないため、有効な対処法が確立されていない。申請者は、PTX 誘発性末梢神経障害モデルラットの解析から、遺伝子異常による末梢神経障害 Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) の原因遺伝子である *mitofusin2* (*Mfn2*) 遺伝子の発現量が低下することを報告した (*Neurosci Lett.* 2017;653:337-340.)。このことから、*Mfn2* が PTX による末梢神経障害に關与する可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

*Mfn2* に着目した PTX 誘発性末梢神経障害のメカニズム解明および治療法の探索を行うために、以下の実験を行った。

### (1) 培養細胞を用いた PTX 誘発性末梢神経障害モデルラットの再現

本項目では、PTX 誘発性末梢神経障害のメカニズム解明および治療法の探索を効率的に行えるよう、培養細胞モデルの確立を目的とした。

### (2) *Mfn2* 発現量低下と神経損傷との関連解明

*Mfn2* の発現量低下と神経障害の関連は、未だ明らかになっていない。そこで本項目では、siRNA により *Mfn2* 発現量を低下させる事で神経障害が発現するのかが検討した。

### (3) PTX による *Mfn2* 発現量低下の改善に着目した治療法の探索

先行研究において PTX による *Mfn2* 発現量低下は、細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルや mPTP 開口が關与している事が報告されている (*Circ J.* 2014;78(5):1206-1215.)。そこで本項目では、BAPTA-AM およびシクロスポリン A (CyA) による治療効果の検証を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では感覚神経を模倣するために、ラット脊髄後根神経節由来細胞×マウス神経芽細胞腫ハイブリドーマ F11 細胞を用いた。F11 細胞は、通常時では 10% FBS を含む高グルコース D-MEM 培地で維持され、実験時には 1% FBS + forskolin 50  $\mu$ M を含む高グルコース D-MEM 培地下 24 時間培養により神経様に分化させた。

### (1) 培養細胞を用いた PTX 誘発性末梢神経障害モデルラットの再現

分化した F11 細胞に PTX を 24 時間暴露させ、神経突起マーカーである NF200 の免疫染色による形態観察、ELISA 法による *Mfn2* の発現量測定を行った。

### (2) *Mfn2* 発現量低下と神経損傷との関連解明

分化した F11 細胞に対し、siRNA をリポフェクション法により導入し、ELISA 法による *Mfn2* の発現量測定を行った。

### (3) PTX による *Mfn2* 発現量低下の改善に着目した治療法の探索

分化した F11 細胞に対し、PTX 暴露 15 分前から BAPTA-AM もしくは CyA を暴露させた。PTX 暴露 24 時間後に、NF200 免疫染色による形態観察、ELISA 法による *Mfn2* の発現量測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 培養細胞を用いた PTX 誘発性末梢神経障害モデルラットの再現

PTX は、神経様突起の伸長を濃度依存的に阻害した。また PTX 100  $\mu$ M は、ほとんどの細胞を死滅させた (Fig. 1)。この結果から、神経障害が最も大きい PTX 10  $\mu$ M を検討モデルとした。このモデルにおいて、*Mfn2* の発現量は有意に低下していた (Fig. 2)。これらの事から、培養細胞においても PTX 誘発性末梢神経障害モデルラットと同様に神経障害と *Mfn2* 発現量の低下が確認された。よって、PTX 10  $\mu$ M に暴露させた F11 細胞は PTX 誘発性末梢神経障害の解析・探索モデルとして妥当であると考えられる。

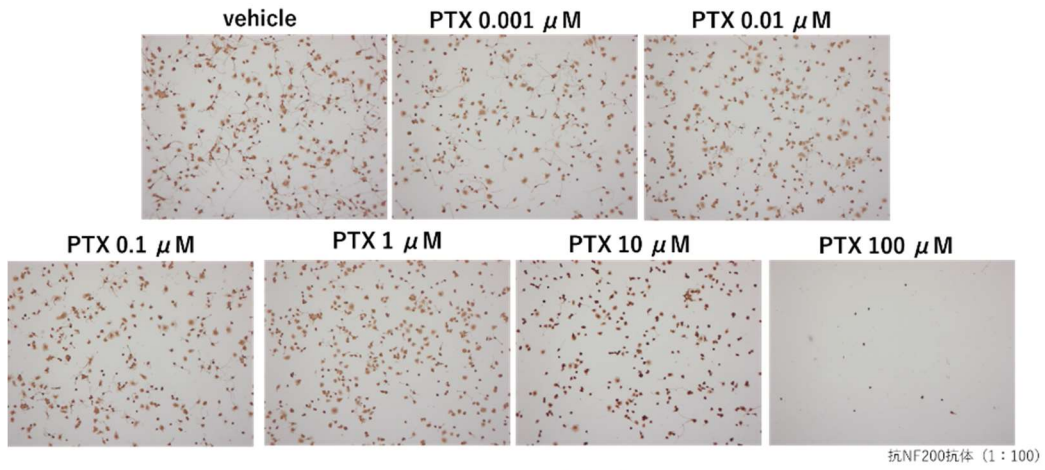


Fig. 1 PTX による神経様突起伸長への影響

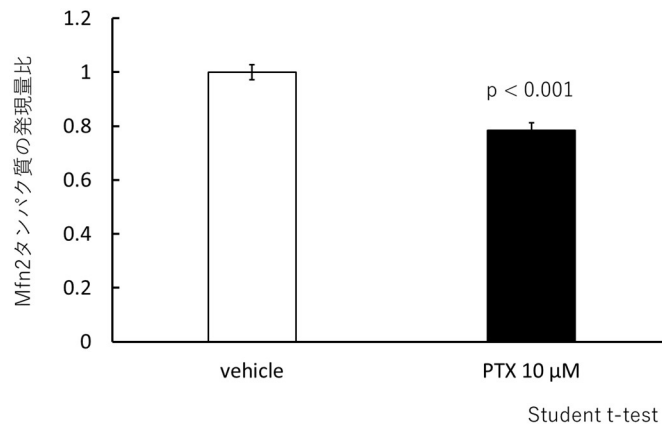


Fig. 2 PTX による Mfn2 発現量への影響

(2) Mfn2 発現量低下と神経損傷との関連解明

分化した F11 細胞に対して siRNA は、Mfn2 発現量を有意に減少させなかった (Fig. 3)。改善方策として、siRNA 導入時期や導入試薬の変更等を試みたが、Mfn2 発現量は減少しなかった。以上の事から、本検討では Mfn2 発現量低下と神経損傷との関連解明を明らかにすることはできなかった。本条件での検討が困難である事が明らかとなったため、細胞株や siRNA 導入法を再度見直す必要があると考えられる。

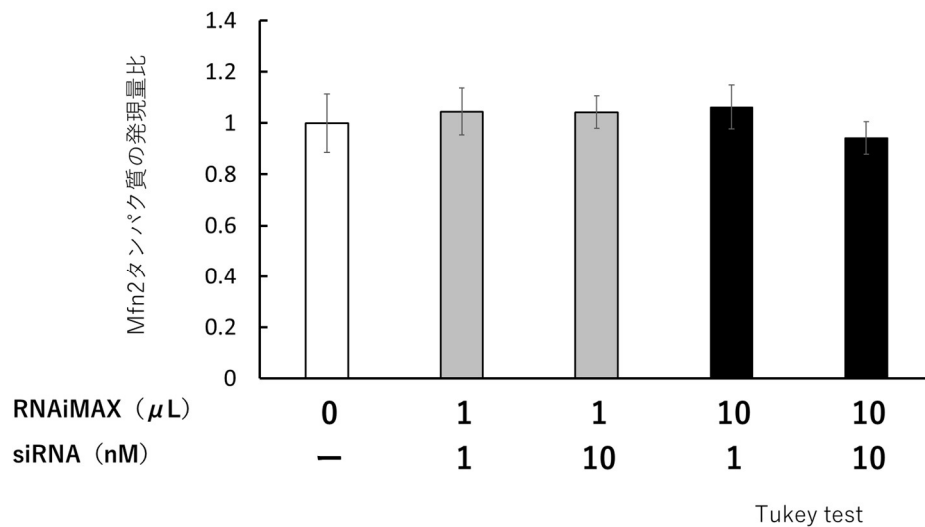


Fig. 3 siRNA による Mfn2 発現量への影響

(3) PTXによるMfn2発現量低下の改善に着目した治療法の探索

BAPTA-AM および CyA は、PTX による神経突起伸長阻害と Mfn2 発現量低下に対して効果を示さなかった (Fig. 4, 5)。このことから、BAPTA-AM および CyA は、PTX 誘発性末梢神経障害に対して無効である事が示唆される。一方で、先行研究では筋細胞が用いられていたことから、細胞の種類によって Mfn2 発現への影響が異なる可能性が考えられる。今後は神経細胞における PTX の Mfn2 発現量低下の機序についても検討する必要があると考えられる。

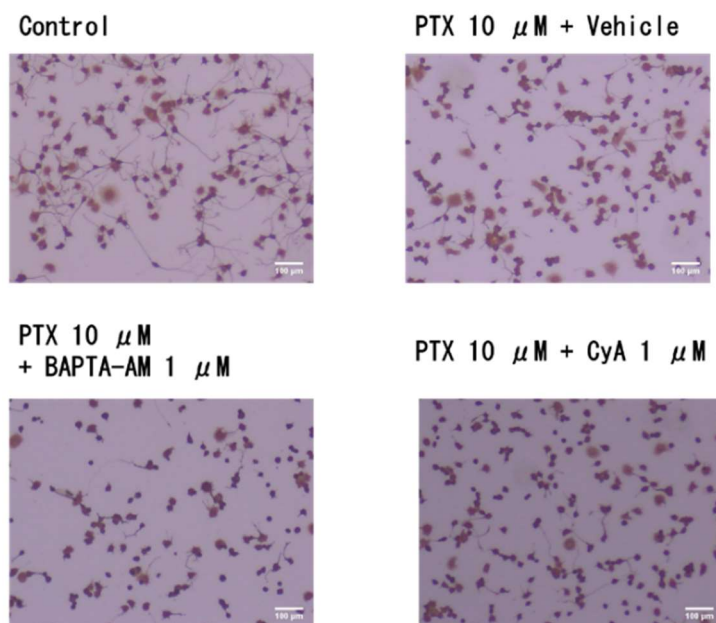


Fig. 4 BAPTA-AM および CyA による神経様突起伸長への影響

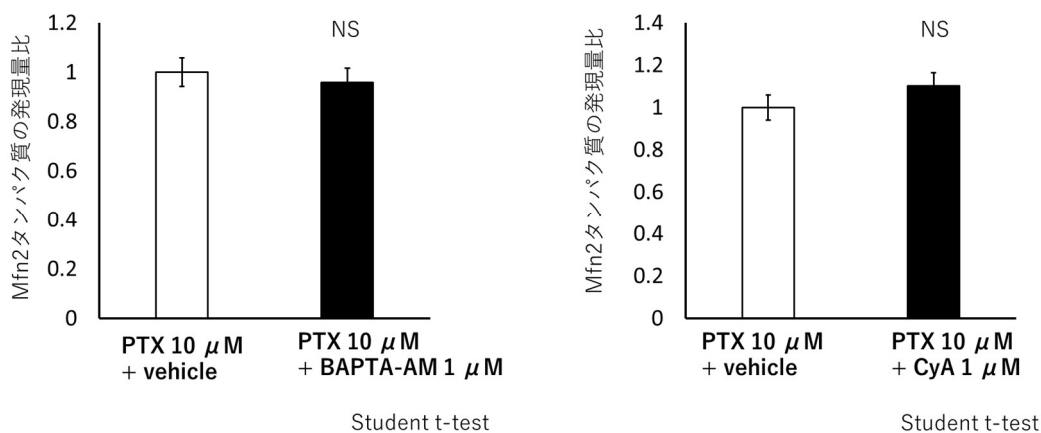


Fig. 5 BAPTA-AM および CyA による Mfn2 発現量への影響

以上の結果から、培養細胞を用いる事で PTX 誘発性末梢神経障害の解析が可能である事が明らかとなった。しかし、本研究では Mfn2 発現量低下による神経障害への関連および治療法を明らかとする事ができなかった。今後は、他の神経細胞を用いた検討や神経細胞における Mfn2 発現量低下の機序解明が課題であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------