

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590285

研究課題名（和文）

抗がん剤による末梢神経障害の発現機序解明および予防策・治療法の確立に関する研究

研究課題名（英文）

The elucidation of the mechanisms underlying anticancer drug-induced peripheral neuropathy and its prophylaxis.

研究代表者

大石 了三 (Oishi Ryoza)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：90112325

研究成果の概要（和文）：

オキサリプラチンによりラットに引き起こされる急性の低温知覚異常には、電位依存性 L/T 型 Ca^{2+} チャネルや NFAT、TRPM8 経路が関与しており、カルシウム拮抗薬が予防効果を示すことが示された。一方、オキサリプラチンの長期投与により生じる機械的アロディニアには、脊髄における NMDA 受容体 NR2B 発現の増加が関与し、イフェンプロジルおよびノイロトロピンにより障害が軽減可能であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The present study elucidated that the L type Ca^{2+} channels/NFAT/TRPM8 pathway plays a key role on oxaliplatin-induced cold hyperalgesia in rats, and Ca^{2+} channel blockers have prophylactic potential against that acute neuropathy caused by oxaliplatin. It was also found that the up-regulation of spinal NMDA receptor NR2B subunit involves in oxaliplatin-induced mechanical allodynia. Moreover, ifenprodil and neurotrophin could suppress the mechanical allodynia induced by oxaliplatin in rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：オキサリプラチン、パクリタキセル、末梢神経障害、機械的アロディニア、低温知覚異常

1. 研究開始当初の背景

白金系抗がん剤であるオキサリプラチンや、タキサン系抗がん剤であるパクリタキセルは、副作用として末梢神経障害を高頻度で引き起こす。これらの末梢神経障害の発現は治療の中止や減量につながるため、临床上大きな問題となっている。しかしながら、抗がん剤による末梢神経障害の発現機序の詳細

は不明であり、有効な予防策や治療法は国内外において未だに確立されていない。

我々はこれまでに、オキサリプラチンによる急性神経障害である低温知覚異常の発現に、オキサリプラチンより脱離するオキサレートが関与する一方で、オキサリプラチンによる慢性障害の機械的アロディニアの発現には、オキサリプラチンの活性代謝物である

Pt(dach)Cl₂ が関与することをラットモデルで明らかとしてきた(Sakurai et al. Pain. 2009)。

2. 研究の目的

本研究では、抗がん剤による末梢神経障害のラットモデルを作製し、抗がん剤による末梢神経障害の発現機序の解明と予防法や治療法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現機序の解明と保護薬物の探索

① Sprague-Dawley 系ラットにオキサリプラチン 4mg/kg を 2 日間連続で腹腔内投与した。カルシウム拮抗薬 (ニフェジピン : 10-30mg/kg、ジルチアゼム : 10-30mg/kg) およびナトリウムチャンネル阻害薬 (メキシレチン : 30mg/kg) はオキサリプラチン投与と同時に経口投与した。低温知覚異常はラット足裏にアセトンを噴霧し 40 秒間の逃避反応回数を測定する acetone test で評価した。オキサリプラチン投与開始 5 日目における脊髄後根神経節 (DRG) での TRPM8 mRNA の発現変化は PCR 法で評価した。

② Sprague-Dawley 系ラットより採取した脊髄後根神経節 DRG を初代培養し、オキサリプラチンおよびオキサレート (シュウ酸ナトリウム) をそれぞれ 500 μM の濃度で処置した。また、カルシウム拮抗薬としてニフェジピンおよびジルチアゼムをそれぞれ 30 μM の濃度で、ナトリウムチャンネル阻害薬としてメキシレチンを 1mM の濃度で処置した。カルシウムイオンの変化は Fura-2 蛍光強度比の変化より算出した。NFAT の核内移行および TRPM8 mRNA の発現変化は、免疫染色および PCR 法にてそれぞれ評価した。

(2) オキサリプラチンによる機械的アロディニアの発現機序の解明と保護薬物の探索

ラットにオキサリプラチン 4mg/kg を週に 2 回、4 週間連続で腹腔内投与し、機械的アロディニアを発現させた。機械的アロディニアの評価には足裏にフィラメントを押し当て逃避反応閾値を測定する von Frey test を用いた。機械的アロディニアを発現したラットに NMDA 受容体拮抗薬 (MK-801 : 1-10nmol、メマンチン : 100-1000nmol) および NR2B 阻害薬 (Ro25-6981 : 30-300nmol) を髄腔内投与し、投与後の機械的アロディニアの変化を観測した。また、NR2B を阻害する作用を持つ医薬品イフェンプロジル (10-50mg/kg) は経口投与し、アロディニアの変化を観測した。さらに、機械的アロディニアを発現したラットの脊髄における NR2B の発現変化をウエスタンブロット法および PCR 法にて測定した。

(3) オキサリプラチンによる末梢神経障害に対するノイロトロピンの効果

オキサリプラチンは 4mg/kg を週に 2 回、4 週間連続で腹腔内投与した。ノイロトロピンは 200NU/kg を週に 3 回、4 週間経口投与した。機械的アロディニアおよび低温知覚異常は、von Frey test および acetone test にてそれぞれ評価した。坐骨神経の軸索変性はトルイジンブルー染色にて評価した。

(4) オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する牛車腎気丸の効果

オキサリプラチンは 4 mg/kg を週に 2 回、4 週間連続で腹腔内投与した。牛車腎気丸は 0.3-1mg/kg を 1 日 1 回、4 週間の経口投与、あるいはオキサリプラチンによる神経障害が発現した後に、0.3-1mg/kg の単回経口投与を行った。機械的アロディニアおよび低温知覚異常は、von Frey test および acetone test にてそれぞれ評価した。抗腫瘍効果へ影響は C26 細胞を足皮下へ移入した BALB/c マウスを用い、腫瘍体積を経日的に測定し、評価した。

(5) アルブミン結合型パクリタキセル (nab-PTX) による末梢神経障害の発現パターンに関する検討

ラットにパクリタキセル (6mg/kg) およびアルブミン結合型パクリタキセル (6、7.4 mg/kg) を週に 1 回、4 週間腹腔内投与し、機械的アロディニアおよび低温知覚異常を評価した。

(6) 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較には Student' s t-test を、多重の比較には一元配置分散分析または二元配置分散分析を用い、Tukey-Kramer test により有意差評価を行った。有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現機序の解明と保護薬物の探索

培養 DRG 細胞において、オキサリプラチンおよびオキサレートを処置すると、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇、NFAT の核内移行および TRPM8 の発現上昇が認められた。また、これらの変化は、電位依存性 L 型および L/T 型カルシウムチャンネル阻害薬ニフェジピンやジルチアゼム、ナトリウムチャンネル阻害薬であるメキシレチンの処置により抑制された。ラットにオキサリプラチンを投与すると低温知覚異常が顕著に引き起こされ、また投与群の DRG では TRPM8 の発現が有意に増加した。一方、ニフェジピンやジルチアゼム、メキシレチンの併用は、TRPM8 の発現増加および低温知覚異常を有意に抑制した (図 1)。

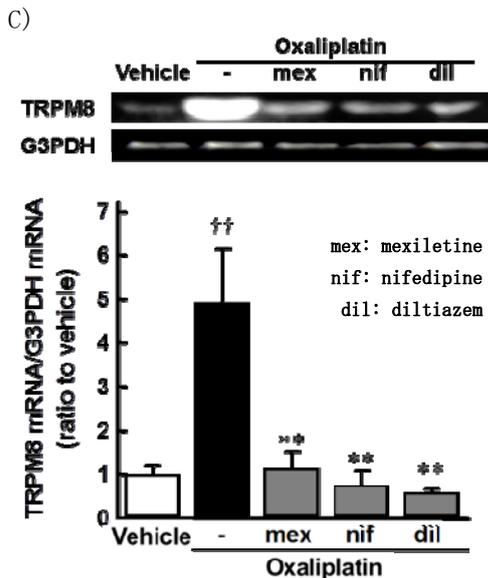
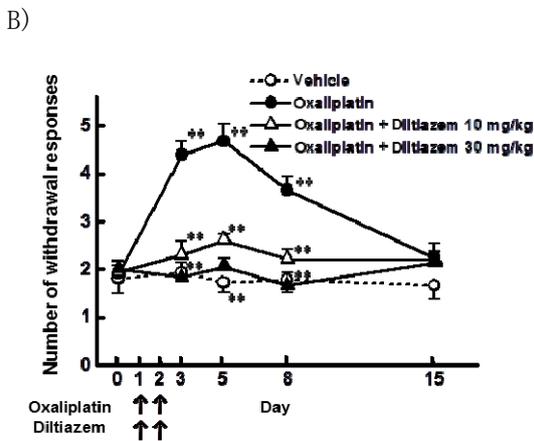
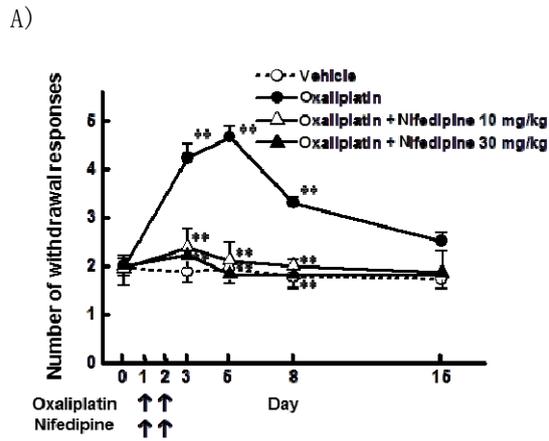


図1 オキサリプラチンによる低温知覚異常 (A, B) および DRG における TRPM8 mRNA 発現増加 (C) に対するカルシウム拮抗薬の効果。各結果は平均値 ± SEM (N=5-10) を示す。†† P < 0.01 vs Vehicle, ** P < 0.01 vs Oxaliplatin

(2) オキサリプラチンによる機械的アロディニアの発現機序の解明と保護薬物の探索

オキサリプラチン 4mg/kg を週に 2 回、4 週間腹腔内投与すると機械的アロディニアが発現し、またラット脊髄において、NR2B の発現量が上昇した (図 2AB)。また、NMDA 受容体拮抗薬および NR2B サブユニット阻害薬の髄腔内投与は、オキサリプラチンによる機械的アロディニアを一過性に抑制した。さらに、NR2B サブユニットに対して阻害作用を持つ臨床医薬品イフェンプロジルの経口投与は、オキサリプラチンによる機械的アロディニアを一過性に抑制した (図 2C)。

以上の結果より、オキサリプラチンにより引き起こされる末梢神経障害において、低温知覚異常と機械的アロディニアでは、異なる発現機序が関与しており、各機序に作用する薬物の併用により障害の発現を抑制しうることが明らかとなった (図 3)。

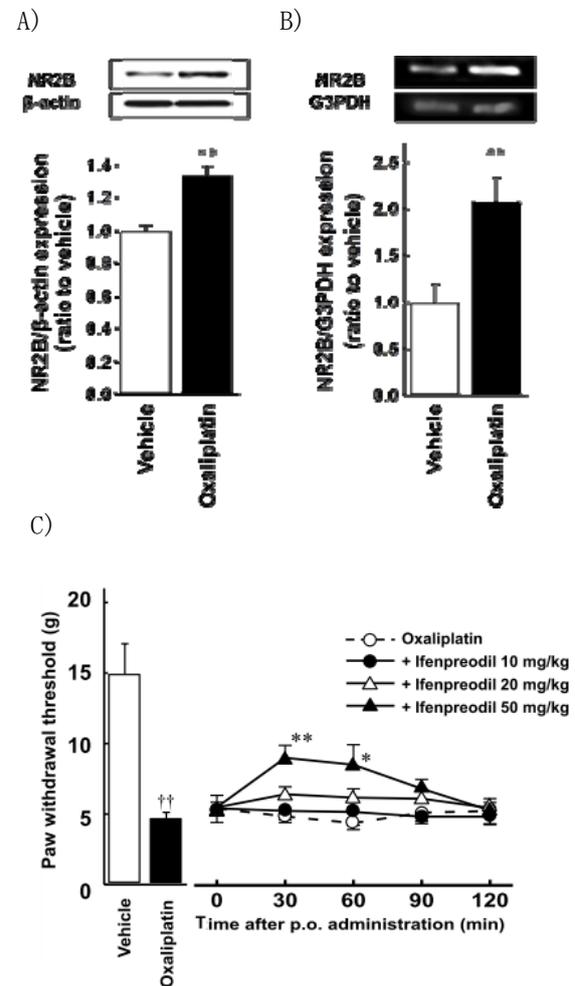


図2 オキサリプラチンによる脊髄内 NR2B タンパク (A) および mRNA (B) の発現量増加とオキサリプラチン誘発低温知覚異常に対する NR2B 阻害薬イフェンプロジルの効果 (C)

各結果は平均値 ± SEM (N=6-9) を示す。†† P < 0.01 vs Vehicle, ** P < 0.01 vs Oxaliplatin

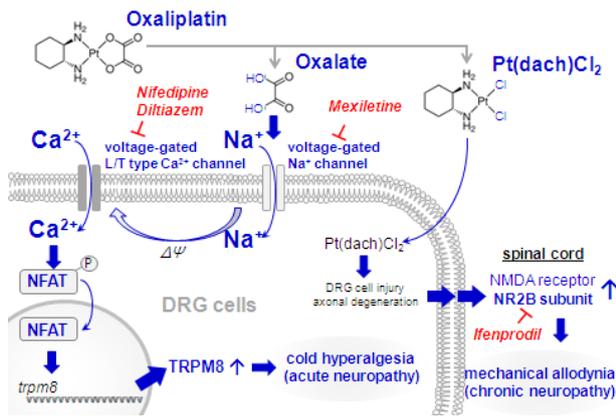


図 3 オキサリプラチンによる低温知覚異常および機械的アロディニアの発現メカニズム

(3) オキサリプラチンによる末梢神経障害に対するノイロトロピンの効果

ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液であるノイロトロピンの反復投与は、オキサリプラチンによる機械的アロディニアの発現を有意に抑制し(図 4)、同時に坐骨神経の軸索変性を改善させた。一方で、ノイロトロピン反復投与は、オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現は抑制しなかった。

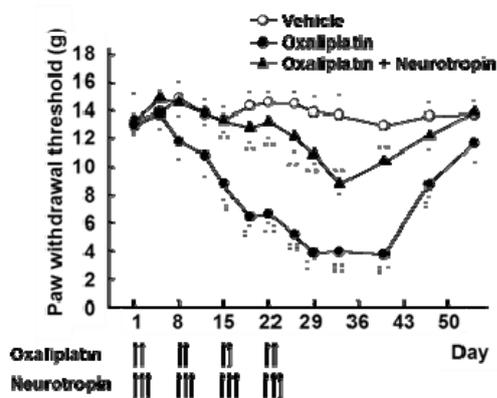


図 4 オキサリプラチンによる機械的アロディニアに対するノイロトロピン反復投与の効果
各結果は平均値 ± SEM (N=8) を示す。
††P<0.01 vs Vehicle, ** P <0.01 vs Oxaliplatin

(4) オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する牛車腎気丸の効果

牛車腎気丸の反復投与は、オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現を有意に抑制する一方で、機械的アロディニアの発現は抑制しなかった。さらに、既に発現した機械的アロディニアおよび低温知覚異常に対して、牛車腎気丸の単回投与は一過性の保護効果

を示した。また、牛車腎気丸の反復投与はオキサリプラチンの腫瘍増殖抑制作用に影響しなかった。

(5) アルブミン結合型パクリタキセル (nab-PTX) による末梢神経障害の発現パターンに関する検討

PTX 6mg/kg および nab-PTX 6mg/kg をそれぞれラットに投与すると、ほぼ同時期に同程度の機械的アロディニアならびに低温知覚異常を呈した。また、nab-PTX を 7.4mg/kg の用量で投与すると、機械的アロディニアならびに低温知覚異常はより強く発現し、PTX および nab-PTX により引き起こされる末梢神経障害に大きな違いは認められなかった。

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 8 件)

- ① Sada H, Egashira N, Ushio S, Kawashiri T, Shirahama M, Oishi R. Repeated administration of amitriptyline reduces oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. J Pharmacol Sci. 2012, 118:547-551, 査読有, DOI: 10.1254/jphs.12006SC
- ② Kawashiri T, Egashira N, Kurobe K, Tsutsumi K, Yamashita Y, Ushio S, Yano T, Oishi R. L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. Mol Pain. 2012, 31:8:7, 査読有, DOI: 10.1186/1744-8069-8-7
- ③ Ushio S, Egashira N, Sada H, Kawashiri T, Shirahama M, Masuguchi K, Oishi R. Goshajinkigan reduces oxaliplatin-induced peripheral neuropathy without affecting anti-tumour efficacy in rodents. Eur J Cancer. 2011 (in Press), 査読有, DOI: 10.1016/j.ejca.2011.08.009
- ④ Yamashita Y, Egashira N, Masuguchi K, Ushio S, Kawashiri T, Oishi R. Comparison of peripheral neuropathy induced by standard and nanoparticle albumin-bound paclitaxel in rats. J Pharmacol Sci, 2011, 117:116-120, 査読有, DOI: 10.1254/jphs.11062SC
- ⑤ Mihara Y, Egashira N, Sada H, Kawashiri T, Ushio S, Yano T, Ikeshue H, Oishi R. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced

mechanical allodynia in rats. Mol Pain. 2011, 20:7-8, 査読有, DOI: 10.1186/1744-8069-7-8

- ⑥ 川尻雄大, 江頭伸昭, 大石了三. 動物実験からみたオキサリプラチン誘発末梢神経障害の発現機序と対策. ペインクリニック. 2010, 31:877-884, 査読無
- ⑦ Kawashiri T, Egashira N, Watanabe H, Ikegami Y, Hirakawa S, Mihara Y, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Prevention of oxaliplatin-induced mechanical allodynia and neurodegeneration by neurotrophin in the rat model. Eur J Pain. 2011, 15:344-350, 査読有, DOI: 10.1016/j.ejpain.2010.08.006
- ⑧ Egashira N, Hirakawa S, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Mexiletine reverses oxaliplatin-induced neuropathic pain in rats. J Pharmacol Sci. 2010, 12:473-476, 査読有, DOI: 10.1254/jphs.10012SC

[学会発表] (計 20 件)

- ① 大石了三. エコファーマによる医薬品副作用の低減. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 15 日, 京都
- ② 成重友莉, 辰島瑤子, 江頭伸昭, 福井史織, 川尻雄大, 大石了三. オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対する Ca 拮抗薬の効果に関する臨床研究. 第 28 回日本薬学会九州支部大会, 2011 年 12 月 10 日, 福岡
- ③ Oishi R, Tatsushima Y, Narishige Y, Kawashiri T, Egashira N. Calcium channel antagonists prevent oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy; Retrospective analysis, 46th ASHP Midyear Clinical Meeting & Exhibition, 2011 年 12 月 5 日, ニューオーリンズ (アメリカ合衆国)
- ④ 牛尾聡一郎, 江頭伸昭, 佐田光, 川尻雄大, 白濱雅史, 益口賢, 大石了三. オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対する牛車腎気丸の改善作用. 第 39 回薬物活性シンポジウム, 2011 年 11 月 21 日, 福岡
- ⑤ 山下祐二, 江頭伸昭, 益口賢, 牛尾聡一郎, 川尻雄大, 大石了三. 行動学的検討によるパクリタキセルおよびナノ粒子アルブミン結合パクリタキセル誘発末梢神経障害の比較. 第 39 回薬物活性シンポジウム, 2011 年 11 月 21 日, 福岡

- ⑥ 堤国章, 江頭伸昭, 川尻雄大, 黒部健太郎, 山下祐二, 矢野貴久, 池末裕明, 大石了三. オキサリプラチン誘発低温知覚異常における Ca²⁺ チャネル/ NFAT/TRPM8 の関与. 第 64 回日本薬理学会西南部会, 2011 年 11 月 20 日, 福岡
- ⑦ 牛尾聡一郎, 江頭伸昭, 川尻雄大, 佐田光, 白濱雅史, 矢野貴久, 大石了三. オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対する牛車腎気丸の改善作用. 第 5 回日本緩和医療薬学会年会, 2011 年 9 月 24 日, 千葉
- ⑧ 辰島瑤子, 江頭伸昭, 成重友莉, 福井史織, 川尻雄大, 矢野貴久, 池末裕明, 大石了三. オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対する Ca 拮抗薬の有用性 - 後向き調査研究. 第 5 回日本緩和医療薬学会年会, 2011 年 9 月 24 日, 千葉
- ⑨ 大石了三. エコファーマによる医薬品副作用の低減. 第 84 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月, 誌上開催
- ⑩ 川尻雄大, 辰島瑤子, 江頭伸昭, 大石了三. 抗がん剤による末梢神経障害の発現機序と対応策. 第 84 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月, 誌上開催
- ⑪ 黒部健太郎, 川尻雄大, 江頭伸昭, 山下祐二, 堤国章, 矢野貴久, 池末裕明, 大石了三. オキサリプラチン誘発低温知覚異常における Ca²⁺ チャネル/NFAT 経路を介した TRPM8 活性化の関与. 第 84 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月, 誌上開催
- ⑫ 渡部仁美, 川尻雄大, 江頭伸昭, 益口賢, 辰島瑤子, 矢野貴久, 池末裕明, 大石了三. オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対するノイロトロピンの鎮痛作用とノルアドレナリン, セロトニンの関与. 第 84 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月, 誌上開催
- ⑬ 川尻雄大, 江頭伸昭, 三原由記, 佐田光, 矢野貴久, 池末裕明, 大石了三. オキサリプラチン誘発末梢神経障害ラットモデルにおける NMDA 受容体の関与. 第 4 回日本緩和医療薬学会年会, 2010 年 9 月 26 日, 鹿児島
- ⑭ Egashira N, Kawashiri T, Watanabe H, Ikegami Y, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Neurotrophin relieves the oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by inhibiting neurodegeneration. World Pharma 2010, 16th World Congress on Basic

and Clinical Pharmacology, 2010年7月
19日, コペンハーゲン (デンマーク)

⑮ 三原由記, 江頭伸昭, 川尻雄大, 佐田 光,
矢野貴久, 池末裕明, 大石了三. オキサリ
プラチン誘発末梢神経障害における NMDA
受容体の関与. 第 83 回日本薬理学会年会,
2010年3月18日, 大阪

⑯ 池上瑤子, 江頭伸昭, 川尻雄大, 三原由
記, 矢野貴久, 池末裕明, 大石了三. パク
リタキセル誘発末梢神経障害におけるサブ
スタンス P の関与-オキサリプラチンとの
比較研究. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010
年3月17日, 大阪

⑰ 川尻雄大, 江頭伸昭, 渡部仁美, 平川真
吾, 池上瑤子, 矢野貴久, 池末裕明, 大石
了三. オキサリプラチン誘発末梢神経障害
に対するノイロトロピンの改善効果. 第 83
回日本薬理学会年会, 2010年3月17日,
大阪

⑱ 川尻雄大, 江頭伸昭, 渡部仁美, 平川真
吾, 三原由記, 池上瑤子, 佐田光, 矢野貴
久, 池末裕明, 大石了三. オキサリプラチ
ン誘発末梢神経障害に対するノイロトロピ
ン反復投与の改善作用に関する研究. 第 62
回日本薬理学会西南部会, 2009年11月27
日, 愛媛

⑲ 川尻雄大, 江頭伸昭, 櫻井万理子, 矢野
貴久, 池末裕明, 大石了三. オキサレト
基はラットにおいてオキサリプラチン誘発
低温知覚異常には関与するが, 機械的アロ
ディニアには関与しない. 第 3 回次世代を
担う若手医療薬科学シンポジウム, 2009年
11月14日, 福岡

⑳ 川尻雄大, 江頭伸昭, 大石了三. パクリ
タキセルおよびオキサリプラチン誘発末梢
神経障害の回避・軽減を目指した研究. 第
3回日本緩和医療薬学会年会, 2009年10月
18日, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 了三 (OISHI RYOZO)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：90112325

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

江頭 伸昭 (EGASHIRA NOBUAKI)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：80352269