

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24592358

研究課題名(和文) オキサリプラチンによる難治性神経障害性疼痛の機序解明および治療法の開発

研究課題名(英文) Research on the mechanism and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy

研究代表者

下山 恵美 (Shimoyama, Megumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：10206253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいて抗がん作用を示すオキサリプラチンの用量を、臨床と同様に急性障害から回復させるための休薬期間を設けて繰り返し投与することにより、患者の病態に類似したオキサリプラチン惹起性末梢神経障害のマウスモデルが作成できた。このモデルにおいて、ミトコンドリアのカルジオリピンに作用し、エネルギー産生を改善するペプチドであるSS-31、SS-20が末梢神経障害の発症を予防できることが示され、臨床での予防法の開発につながると考えられた。また、すでに発症している神経障害性疼痛の治療薬として、デュロキセチンの他に、トラマドール、プレギャバリン、オレキシン1受容体作動薬が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Repeated administrations of oxaliplatin at doses with anti-tumor effects with rest periods in between administrations to allow recovery from acute toxic effects, induced neuropathy that closely mimicked patients conditions. In this model, tetrapeptides that target cardiolipin of the mitochondria and improve mitochondrial bioenergetics prevented the development of the neuropathy. This suggested that mitochondrial dysfunction is involved in the pathogenesis and these compounds may be useful in preventing chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients. Furthermore, the results of drug tests using this model suggested that, in addition to duloxetine which is already recommended for the treatment of neuropathic pain due to chemotherapy-induced peripheral neuropathy, tramadol, pregabalin and orexin 1-receptor agonists may be effective.

研究分野：palliative medicine

キーワード：peripheral neuropathy chemotherapy oxaliplatin mitochondria

### 1. 研究開始当初の背景

がん化学療法薬による末梢神経障害が引き起こす痛みやしびれは標準治療が存在せず、患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、抗がん剤の投与量の制限や治療の中止の要因となり、がん患者にとって深刻な問題である。末梢神経障害を惹起する抗がん剤には、ビンクリスチン、シスプラチン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ボルテゾミブなどがある。現在、わが国におけるがんの罹患数の多い臓器は胃、大腸、肺、前立腺、乳房であるが、これらのがんの治療には末梢神経障害をおこす抗がん剤が適応であり、化学療法薬惹起性末梢神経障害はがん治療において重大な課題である。この中で、オキサリプラチンは大腸癌・直腸がんの化学療法の第 1 選択薬であり、難治性の神経障害性疼痛を来す。これに対して鎮痛補助薬などによる対症療法は試みられているが、症状コントロールが困難なことが多く、機序に基づく予防法・治療法の確立が急務である。このためには、患者の病態を反映する動物モデルが必須となる。これまでにパクリタキセル、シスプラチンなどの化学療法薬の神経障害に関する基礎研究は行われてきたが、近年オキサリプラチンによる神経障害に関しても、動物モデルを用いた研究が報告されてきている。これらの報告の一部では、後根神経節細胞や末梢神経の形態学的変化が報告されている一方、このような変化を認めないとする報告もある。これらの研究で用いられているモデルはオキサリプラチンの投与量や投与スケジュールが様々であるが、形態学的変化をはじめとする末梢神経障害の病態は投与量や投与スケジュールに依存すると考えられる。モデル作成において臨床で行われている投与法に少しでも近づけた投与量や投与スケジュールを用いる必要があることが示唆される。

### 2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では、まずは患者病態を十分反映するモデルを作成することを目的とする。このためにはオキサリプラチンの投与量や投与スケジュールを臨床で行われている投与法に近づけるために、マウスで抗がん作用を示す用量を投与し、投与スケジュールは臨床で行われているように、急性障害からの回復を可能とするため休薬期間を設ける。これらの点を重視したオキサリプラチン惹起性末梢神経障害のモデルを作成し、患者の症状と比較すると同時に末梢神経の形態学的評価を行う。

次いで、オキサリプラチンにより惹起される神経障害の機序にミトコンドリア障害やそれによる参加ストレスが関与するという仮説に基づいて、ミトコンドリアに集積し、抗酸化作用を及ぼすとともに、ミトコンドリアの生体エネルギー環境を改善する作用のある SS-31 ペプチドや SS-31 のアナログでミトコンドリアに対する同様の効果はあるが、抗酸化作用のない SS-20 の神経障害に対する効果を検討し、ミトコンドリア障害の関与を明らかにすると同時に、神経障害の予防法の開発につなげる。

さらに、すでに神経障害が確立している患者における疼痛緩和法を検討するため、疼痛緩和の可能性が示唆される薬物の本モデルにおける鎮痛効果を検討する。検討する薬物は各種オピオイド、各種鎮痛補助薬の他に、近年鎮痛効果が報告されている視床下部ペプチドのオレキシンも検討する。

### 3. 研究の方法

オキサリプラチンで急性効果を検討するため、マウスにオキサリプラチン 2、5、15mg/kg もしくは生食を腹腔内投与し、1、2、3、4、5、7、9、14 日後に 15 に設定した cold plate 上での四肢を振る行動 (paw shake) の回数を測定した。ついで、マウスにオキサリプラチン 15 mg/kg を腹

腔内に投与し、double cold plate を用いて室温以下の温度(24、20、15、10、5、0 )の選好 (preference) を生食投与のコントロールマウスと比較した。

ついで、オキサリプラチンの患者で行われるのと同様の繰り返し投与による効果を検討するため、マウスに1週間の休薬期間を設けた投与スケジュールで、オキサリプラチンを繰り返し投与し、von Frey hair test を用いて、機械的アロディニアの出現を観察した。15mg/kg を1週間に1回3回繰り返し、毎投与後4日、その後7日毎に機械的閾値を測定した。また10mg/kg を週1回9回繰り返し投与し、毎投与後4日に機械的閾値を測定した。10mg/kg を9回繰り返し投与したマウスの坐骨神経や後根神経節を採取し、光学顕微鏡、電子顕微鏡で観察した。また、オキサリプラチン15mg/kg を3回繰り返し投与したマウスで足底の皮膚を採取し、表皮内神経線維を免疫染色法を用いて観察した。

ヒト大腸癌細胞 (HCT116) を SCID マウスの大腿皮下に移植し、オキサリプラチン2、5、10、15mg/kg を上記と同じスケジュールである週1回の3回投与を行い、発育する腫瘍の大きさを観察した。

ミトコンドリア保護薬でありかつ ROS スカベンジャーである SS-31 の神経障害発症に対する予防効果を検討するため、SS-31 を皮下に留置した浸透圧ポンプにより持続投与した上で、オキサリプラチンオキサリプラチン15mg/kg を上述のように3回繰り返し投与し、同様に冷覚アロディニア、機械的アロディニアの形成および表皮内神経線維の消失に対する影響を観察した。また、急性神経障害、慢性神経障害が確立した状態で、SS-31 を投与し、冷覚アロディニア、機械的アロディニアに対する急性効果を検討した。さらに、急性神経障害によって惹起される脊髄後角細胞における

c-Fos の発現に対する SS-31 の効果も観察した

また、抗酸化作用のないミトコンドリア保護薬の SS-20 の慢性神経障害発症に対する効果を検討した。SS-31 の実験と同様に、オキサリプラチン投与期間中に SS-20 もしくは生食の持続投与を行い、機械的アロディニアの出現の程度を比較した。

本モデルにおける機械的アロディニアに対して、鎮痛薬、鎮痛補助薬の効果を検討した。オピオイドはモルヒネ、フェンタニル、トラマドール、SS-02 の効果を比較した。比較は、オピオイドの鎮痛効果評価で用いられる tail flick test における等鎮痛効果量 (ED50 の1倍、2倍量) を比較した。また、鎮痛補助薬として、デュロキセチンとプレギャバリンの本モデルにおける効果を検討した。いずれの薬物もオキサリプラチンを3回繰り返し投与し、機械的アロディニアが形成された状態で、全身投与し、機械的アロディニアに対する効果を von Frey hair テストで評価した。

また、本モデルマウスにおける機械的アロディニアに対するオレキシン A の効果を検討した。オキサリプラチンを3回繰り返し投与し、機械的アロディニアが形成された状態で、オレキシン A もしくは生食を脳室内投与し、機械的アロディニアに対する効果を von Frey hair テストで評価した。同時にオレキシン A の脳室内投与による急性疼痛に対する効果を tail flick test によって評価した。さらに、オレキシン投与とともにオレキシン1受容体アンタゴニストとオレキシン2受容体アンタゴニストを投与し、オレキシン A の抗アロディニア効果がどちらの受容体を介するかを検討した。

#### 4 . 研究の成果

患者におけるオキサリプラチン惹起性末梢神経障害で特徴的なのは、他の化学療法

薬による末梢神経障害で見られる慢性神経障害とは別に急性神経障害が生じることである。この急性神経障害は患者の約 90% に発症し、主症状は冷覚アロディニアであり、本来痛みを起こさない冷刺激（水道の水などに触れること）で誘発される上肢末端や口唇周囲の痛みがみられる。この症状は投与直後からみられ、多くは 1 週間以内に消失するとされる。マウスにオキサリプラチン 15 mg/kg を腹腔内に投与し、double cold plate を用いて室温以下の温度の選好（preference）を調べると、対象マウスに比べ 10 から 15 の温度を有意に嫌がることわかった。この温度域は本来痛みを起こさない温度である。15 に設定した cold plate 上での四肢を振る行動（paw shake）を観察すると、15 mg/kg の投与を受けた動物では、2 日後から有意に前肢の paw shake の数が増加し、4 日後にピークに達し、その後減少した。2 mg/kg や 5 mg/kg の投与量では paw shake の数に変化は見られなかった。このような paw shake の増加は痛みに対する反応であると考えられ、これらの結果から、オキサリプラチンは患者と同様に一過性の冷刺激に対する疼痛過敏を惹起することがわかった。

一方、患者における慢性神経障害はオキサリプラチン投与のクールを重ねて行くうちに出現・増悪し、持続性の不快な異常感覚や痛み、機械刺激によるアロディニアなどの感覚障害として現れる。そこで、マウスに 1 週間の休薬期間を設けた投与スケジュールで、オキサリプラチンを繰り返し投与し、von Frey hair test を用いて、機械的アロディニアの出現を観察した。15mg/kg を単回投与した場合はアロディニアが出現しなかったが、1 週間に 1 回 3 回繰り返し投与すると、徐々にアロディニアが進行した。その時点で投与を中止すると、アロディニアは徐々に回復したが、ベ

ースラインに戻るのに、4 週間かかった。しかし 15mg/kg の投与は一時的な体重減少を来し、繰り返し投与によりマウスの体重増加が阻止された。これに対し約 30% 減量した 10mg/kg を週 1 回繰り返し投与したところ、体重の増加は正常マウスと差がなかった。そこで、10mg/kg を週 1 回 9 回繰り返し投与し von Frey test で評価したところ、アロディニアは徐々に進行し、9 週目では高度のアロディニアを呈した。10mg/kg を 9 回繰り返し投与し、高度の機械的アロディニアを示したマウスの坐骨神経や後根神経節を採取し、光学顕微鏡、電子顕微鏡で観察したところ、コントロールマウスに比べ、形態学的変化は全く認められなかった。このことにより、化学療法惹起性神経障害では末梢神経や後根神経節の形態学的変化は症状出現には必須でないことが示唆された。一方、ラットにおける化学療法惹起性末梢神経障害では、糖尿病性末梢神経障害などで見られる small fiber neuropathy と同様の表皮内神経線維の消失が報告されている。オキサリプラチン 15mg/kg を 3 回繰り返し投与したマウスでも、表皮内神経線維の消失が認められ、化学療法惹起性末梢神経障害は small fiber neuropathy であると考えられる。

上記で使用したオキサリプラチンの投与用量がマウスにおいて抗がん作用を示すかどうかを調べるため、ヒト大腸癌細胞（HCT116）を SCID マウスの大腿皮下に移植し、オキサリプラチン 2、5、10、15mg/kg を上記と同じスケジュールである週 1 回の 3 回投与を行い、発育する腫瘍の大きさを観察した。この結果、5、10、15mg/kg を投与されたマウスではコントロールに比べ、腫瘍が有意に小さかったが、2mg/kg 投与されたマウスでは有意差がなく、5、10、15mg/kg の投与用量は抗腫瘍効果が確認できた。

以上より、抗腫瘍効果を示す用量のオキサリプラチンを投与すると、患者と同じように1回投与で一過性の急性神経障害症状が出現し、1週間の休薬期間で繰り返し投与すると、徐々に進行する慢性神経障害症状が出現することが示され、このモデルは患者の病態に類似していると考えられた。

次いでミトコンドリア保護薬のSS-31の神経障害発症に対する予防効果を検討するため、SS-31を皮下に留置した浸透圧ポンプによりオキサリプラチン投与と並行して投与したが、急性神経障害、慢性神経障害の両方を予防することが可能であった。また、慢性神経障害でみられた足底皮膚における表皮内神経線維の消失を予防することができた。これに対し、急性神経障害、慢性神経障害が確立した後は、急性神経障害は症状を緩和したが、慢性神経障害には効果を及ぼさなかった。急性神経障害により脊髄後角細胞におけるc-Fosの発現もSS-31投与で抑制することができた。以上より、慢性神経障害は、神経細胞のミトコンドリアの活性酸素種の増加や生体エネルギー障害が関与し、これらを改善することにより予防できることが示された。これに対して、急性神経障害はその症状発現自体に活性酸素種が関与していることが考えられた。

SS-31はミトコンドリアの生体エネルギー環境を改善する作用の他に抗酸化作用があり、そのいずれかもしくは両者が、神経障害の予防効果を発揮していると考えられた。酸化作用は抗がん剤の抗がん作用の一部を担っていると考えられることから、抗酸化作用のある薬物は抗がん剤の抗がん作用を減弱させる可能性がある。そこで、抗酸化作用のないSS-20の慢性神経障害発症にたいする効果を検討した。オキサリプラチン投与期間中のSS-20の持続投与により、慢性神経障害による神経障害性疼痛は低減

し、足底の表皮内神経線維の消失も予防された。よって、オキサリプラチン惹起性慢性末梢神経障害はミトコンドリアの生体エネルギー産生能の悪化が関与することが示唆され、SS-20がオキサリプラチン惹起性慢性末梢神経障害の予防に有用な可能性が示唆された。

さらに、本モデルにおける機械的アロディニアに対して、鎮痛薬、鎮痛補助薬の効果を検討した。オピオイドはモルヒネ、フェンタニル、トラマドール、SS-02の効果を比較した。比較は、オピオイドの鎮痛効果評価で用いられるtail flick testにおける等鎮痛効果量(ED50の1倍、2倍量)を比較した。フェンタニルは他のオピオイドに比べ有意に鎮痛効果が低かった。SS-02はオピオイド効果に加え、ノルアドレナリン再取込み阻害作用を有するため、高い鎮痛効果が期待されたが、モルヒネとの間に有意差はなかった。トラマドールは、弱オピオイドであるが、ノルアドレナリンおよびセロトニン再取込み阻害作用を有し、tail flick testにおける等鎮痛効果量他のオピオイドに比べ有意に鎮痛効果が高かった。また、トラマドールのオピオイド効果をオピオイド拮抗薬であるナロキソンでブロックした場合、tail flick testでは鎮痛効果が消失したが、本モデルでは鎮痛効果は減弱はしたが残存し、その効果はノルアドレナリンおよびセロトニン再取込み阻害作用によるものと考えられた。鎮痛補助薬として、デュロキセチンとプレギャバリンの本モデルにおける効果を検討した。デュロキセチンは一定の効果は見られたが、高用量でも、機械的アロディニアの完全な消失はなかった。これに比べ、プレギャバリンは用量依存性に鎮痛効果を示し、高用量では機械的アロディニアの完全な消失がみられた。臨床において化学療法惹起性神経障害性疼痛に対して鎮痛効果の有効性が示されている

のはデュロキサチンのみであるが、本研究の結果、トラマドール、プレギャバリンも有効である可能性が示唆された。

オレキシンは視床下部で産生される神経ペプチドで、鎮痛効果があることが示されている。本モデルマウスにおける機械的アロディニアに対してオレキシンAの効果を検討し、オレキシン受容体アゴニストの化学療法惹起性神経障害性疼痛の治療薬としての可能性を探った。オレキシンAの脳室内投与は、tail flick testにおいて疼痛閾値に影響しない低用量で、完全に機械的アロディニアをブロックした。より高用量ではtail flick testにおいて疼痛閾値を上昇させた。オレキシンA投与による明らかな行動上の副作用はみられなかった。オレキシンAの抗アロディニア効果はオレキシン1受容体アンタゴニストにより拮抗され、オレキシン2受容体アンタゴニストでは拮抗されなかった。このことより、オレキシンAの鎮痛効果はオレキシン1受容体を介することが示された。以上により、オレキシン1受容体アゴニストの化学療法惹起性神経障害性疼痛の治療薬としての可能性が示された。

#### 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2件)

1. Toyama, S., Shimoyama, N., Ishida, Y., Koyasu, T., Szeto, H.H., Shimoyama, M., Characterization of acute and chronic neuropathies induced by oxaliplatin in mice and differential effects of a novel mitochondria-targeted antioxidant on the neuropathies. *Anesthesiology* 査読あり 120 (2014) 459-473. doi: 10.1097/01.anes.0000435634.34709.65.
2. Toyama, S., Shimoyama, N. and Shimoyama, M., The analgesic effect of

orexin-A in a murine model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Neuropeptides* 査読あり 61 (2017) 95-100. doi: 10.1016/j.npep.2016.12.007.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

下山恵美 (SHIMOYAMA, Megumi)  
東京慈恵会医科大学・麻酔科学・教授  
研究者番号: 10206253

##### (2)研究分担者

下山直人 (SHIMOYAMA, Naohito)  
東京慈恵会医科大学・麻酔科学・教授  
研究者番号: 40196572

##### (3)連携研究者

遠山悟史 (TOYAMA, Satoshi)  
国立成育医療研究センター・手術・集中治療部・医長  
研究者番号: 30318092

石田康生 (ISHIDA, Yasuo)  
帝京大学ちば総合医療センター・病院病理部・教授  
研究者番号: 50151387