様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２８　年　　６　月　　４　日現在

機関番号：　３４４１９
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2013～2015
課題番号：　２５８６００７１

研究課題名（和文）分子標的薬によるオキサリプラチン誘発末梢神経障害の治療法の開発

研究課題名（英文）Therapeutic strategy for oxaliplatin-induced neuropathy by mulecular targeting drugs

研究代表者

椿　正寛（TSUBAKI, Masanobu）

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：３０４３４８５６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：オキサリプラチン誘発末梢神経障害の発症メカニズムについて解析を行い、腰髄部分（lumber 4～6）におけるProtein kinase C（PKC）活性化に基づくERK/c-Fos経路の活性化が関与することを見出した。また、PKCを阻害する分子標的薬によりERK/c-Fos経路の抑制を介してオキサリプラチン誘発末梢神経障害を阻害することを明らかにした。以上の結果は、臨床におけるオキサリプラチン誘発末梢神経障害発症時における治療に貢献できる可能性が考えられる。
なお、本研究成果は主な発表論文の項に全てまとめてある。

研究成果の概要（英文）：I show that oxaliplatin induces the neuropathy through the activation of PKC/ERK/c-Fos pathway in lumber spinal cords. In addition, PKC inhibitor suppressed the oxaliplatin-induced neuropathy via PKC pathways. These findings suggest that PKC inhibitors are potentially useful for oxaliplatin-induced neuropathy.
As well, These results are summarized as section of presented paper.

研究分野：　薬物治療学

キーワード：　オキサリプラチン　末梢神経障害　分子標的薬

１．研究開始当初の背景

がん化学療法における副作用の発現は患者の生活の質（Quality of Life; QOL）を著しく低下させるだけではなく、がん治療の中止や変更を余儀なくさせることから、臨床上大きな問題となっている。

がん化学療法の副作用の一つである末梢神経障害はタキサン系、プラチナ系、およびプロテアソーム阻害薬等の抗がん剤により頻発し、特にオキサリプラチンによって高頻度に発現する。オキサリプラチンによる末梢神経障害には代謝物であるオキサレートが関与することが考えられている。また、脊髄後根において、transient receptor potential（TRP）ファミリーに属し低温（<25°C）などの刺激によって活性化するTRP melastatin 8（TRPM8） mRNA量の増加が関与することが示されているものの、その詳細は不明である。

これまでに、これら知見をもとに臨床試験が行われいる。しかし、オキサレートとキレートを形成するカルシウム・マグネシウム製剤の静脈内投与の有効性が認められないことが示された。また、神経障害性疼痛の第一選択薬であるガバペンチンの有用性も二重盲検無作為化試験にて検討されたが、効果は認められていない。その他の薬剤も二重盲検無作為化試験では明確な効果が証明されておらず、臨床の現場ではほとんど何の薬剤も用いられていないのが現状である。

２．研究の目的

本研究ではオキサリプラチン誘発末梢神経障害メカニズムの解明及び治療法の開発を目的として、解析を行った。また、オキサリプラチン誘発末梢神経障害にはシグナル伝達因子の関与が重要である可能性が考えられるため、その因子を同定することは末梢神経障害を抑制する治療標的になりえる。これらのことから、シグナルの解析を行い、末梢神経障害抑制法の開発を試みた。

３．研究の方法

（１）使用動物および使用細胞株

使用動物には6～8週齢のBALB/c系雄性マウスを用いた。また、使用細胞株はBALB/cマウス由来の大腸癌細胞株であるColon-26細胞を用い、HEPES、L-グルタミン、ペニシリン・ストレプトマイシン、炭酸水素ナトリウム、10% fetal bovine serumを含むpH 7.4のRPMI1640培養液にて、37°C、5% CO2条件下で培養した。

（２）オキサリプラチンおよびタモキシフェン投与による腫瘍成長抑制

前培養したColon-26細胞をBALB/cマウスの右背部に皮下注射した。原発巣の体積の平均が50mm³になるまで形成期間を設けた後、投薬と腫瘍径の測定を開始した。タモキシフェンは連日経口投与、オキサリプラチンは0、7、14日目に6mg/kgを尾静脈投与、vehicleとしてPBS(-)を経口投与した。

（３）タモキシフェン投与によるオキサリプラチン誘発性冷過敏症状の抑制効果

（３）－1　Cold Plate Test

10°Cに設定したCold Plateを用いてオキサリプラチンによるCold allodyniaの発現およびタモキシフェンによるその抑制効果を検討した。Cold Plateにマウスを乗せ30秒間測定し、その間に逃避行動をした最初の秒数を評価として用いた。なお、逃避行動が見られなかった場合は30秒とした。

（３）－２　Von Frey Test

Von Frey Filamentを用いてオキサリプラチンによるMechanical allodyniaの発現およびタモキシフェンによるその抑制効果を検討した。マウスの左右後足をFilamentで各5回ずつ刺激し、その際に見られる逃避行動を評価した。刺激間隔は3～5秒とした。

（４）Western Blotting

マウスを還流固定し、脊髄からサンプルを回収した。回収した組織にcell lysis bufferを添加後、ホモジナイズして細胞膜を破壊した。その後遠心分離を行い、その上清を試料とした。また、タンパク定量はBCA Protein Assay法を用いて行った。このサンプルを10% SDS-ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動(SDS-PAGE)を行い、続いてWestern BlottingによりPVDF膜にタンパクを転写した。タンパクを転写したPVDF膜をTBSで洗浄後、スキムミルクを含むTBSでブロッキングした。次に目的とするタンパクに特異的な一次抗体を反応させた後、TBSで洗浄した。さらにHorseradish peroxidase標識した二次抗体と反応させた後、再びTBSで洗浄し、ECL plusにより化学発光させ、Cooled CCD camera system Light-captureⅡにより撮影し解析を行った。

（５）統計的解析

上記の方法により得られた結果は平均値±標準偏差で示した。各群間の検定にはANOVA with Dunnettを用い、$p<0.05$のとき有意差があるとした。

４．研究成果

４－１．Cold allodynia抑制効果

各薬剤投与前(0日目)から15日目までの10°Cおよび4°Cにおける冷過敏状態を測定した。オキサリプラチンにおける10°Cでの冷過敏状態はコントロール群と比較し、投与後3日目から優位な差が認められ、15日目まで持続した。10 mg/kgタモキシフェン併用群では3日目から冷過敏が認められ、30 mg/kgタモキシフェン併用群においては冷過敏は認められなかったまた、4°Cにおける冷過敏状態の変化はいずれにおいても認められなかっ

た。

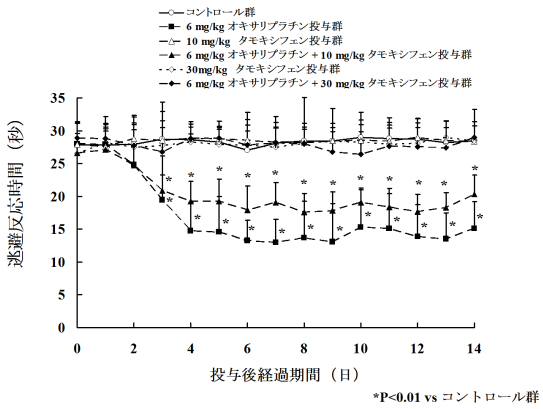


図１．10℃における冷過敏抑制効果

４－２．痛覚過敏抑制効果

各薬剤投与前(0 日目)から 15 日目までの 0.16 g von Frey フィラメントにおける刺激過敏状態を測定した。オキサリプラチン投与群においてはコントロール群と比較し、すべての von Frey フィラメントにおいて過敏状態が認められた。10 mg/kg タモキシフェン併用群では 5 日目から痛覚過敏が認められ、30 mg/kg タモキシフェン併用群においては痛覚過敏は認められなかった（図 2)。

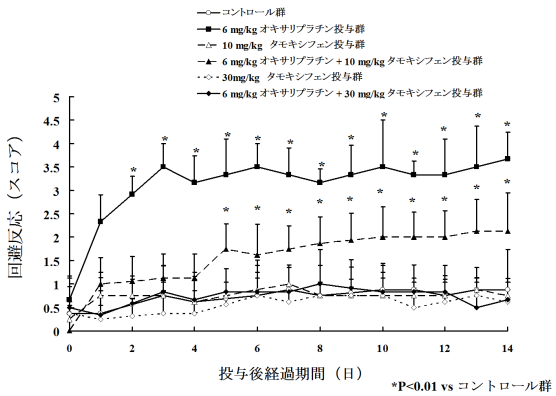


図２．痛覚過敏抑制効果

４－３．腰髄部分における PKC 阻害効果

オキサリプラチンによる末梢神経障害誘導メカニズム及びタモキシフェンによるその抑制効果のメカニズムを検討するため、測定１４日目のマウス腰髄部分を採取し、ウエスタンブロッティングにて PKC、ERK、c-Fos の活性動態を検討した。その結果、オキサリプラチン投与群において、PKC、ERK、c-Fos の活性化が認められた。しかし、タモキシフェン併用群においては、オキサリプラチンで誘導されたシグナル伝達因子の活性化が抑制されることが明らかとなった（図３)。

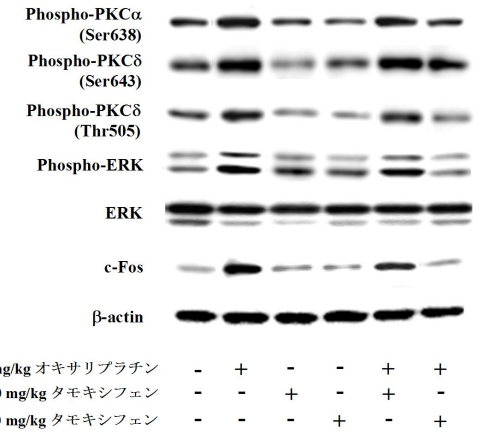


図 3. オキサリプラチンによる PKC 経路活性化及び PKC 阻害薬によるその抑制効果

４－４．オキサリプラチンの抗腫瘍効果に対する PKC 阻害薬の影響

オキサリプラチンの抗腫瘍効果に対するタモキシフェンの影響について、大腸がん細胞をマウス背部皮下に移植し、検討を行った。その結果、オキサリプラチン及びタモキシフェン単独投与では腫瘍体積が約 3 分の 1 程度減少し、オキサリプラチン及びタモキシフェンの併用投与ではさらに腫瘍体積の減少が認められた（図 4)。

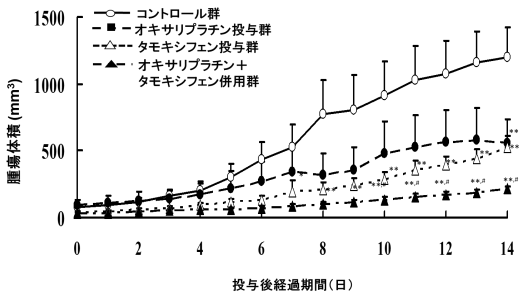


図 4. オキサリプラチン及び PKC 阻害薬投与による腫瘍増殖抑制効果

４－５．考察及び結論

臨床の場において、大腸癌治療のファーストラインとして用いられているオキサリプラチンの投与時では高確率で末梢神経障害(Oxaliplatin-induced Peripheral Neuropathy:OIPN)を発症することが知られている。本研究では、抗エストロゲン薬として汎用されているタモキシフェンを投与した際の OIPN に及ぼす影響について検討を行った。その結果、タモキシフェン投与により OIPN の抑制効果が確認された。このことから、タモキシフェンは OIPN に対して有効な治療法となる可能性が期待できる。

OIPN には投与後数時間～数日で現れる Acute PN と、数サイクル投与後に現れる

Chlonic PN に分類される。他の抗がん剤における PN とは異なり、冷気暴露により発現・増強する点もオキサリプラチンに特有の症状である。オキサリプラチンは体内でオキサレートおよび Pt- DACH (Cl2)(dichloro-1,2-diaminocyclohexane)に代謝され、それぞれが OIPN に関与することが推測されている。Nancy N. Jong らの報告では、オキサリプラチンが有機カチオントランスポーターにより DRG(dorsal root ganglion)、脊髄、大腸に集積することが示されており、OIPN の要因の一つとして DRG および脊髄への L-OHP の蓄積が挙げられる。一方、作用機序のもう一つの要因として DRG および脊髄に発現しているイオンチャネルの関与が考えられる。オキサリプラチン投与時において、非選択性陽イオンチャネルである TRP (Transient receptor potential)ファミリーのうち A1、M8 および電位依存性 Na+チャネル、K+チャネルなどの関与が示唆されている。冷気暴露の面から、特に TRPA1 の関与が強く示唆されているが、TRPA1 阻害薬では改善が見られなかったという報告もあるなど、一致した結果は得られていない。細胞内 Ca2+濃度の上昇で PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1)の活性化を介して Protein Kinase C(PKC)δ、およびその下流に位置する ERK(Extracellular Signal-regulated Kinase)1/2, c-Fos が活性化すること、oxalate が TRPA1 を活性化すること、腎尿細管上皮細胞において PKCα,δの発現を上昇させることが報告されており、Acute PN の発現にもこれらの経路が関与している可能性が考えられる。また、オキサリプラチンのもう一つの代謝物である Pt-DACH(Cl2)は、chronic PN への関与が考えられる。L-OHP を投与したマウスでは、神経細胞のアポトーシスを誘導することが報告されているが、oxalate のみの投与ではアポトーシスを誘導しないことから、アポトーシスの原因は代謝物である Pt-DACH (Cl2)であると推測される。この類似体である cisplatin や[Pt(O,O'-acac)(γ-acac)DMS]でもアポトーシスを誘導することが報告されている。PKCδがアポトーシスにも関与していることは既に報告されており、[Pt(O,O'-acac)(γ-acac) DMS]によるアポトーシスにも PKCδが関与していることから、タモキシフェンによるアポトーシスの抑制が考えられる。タモキシフェンの薬理作用についてのエビデンスは、抗エストロゲン作用に対するものが多く、PKC 阻害作用についてのエビデンスはまだまだ少ないのが現状である。タモキシフェンはエストロゲン非依存的に conventional PKC を阻害し、既に躁病における臨床使用も行われて始めている。また我々も悪性黒色腫細胞である B16BL6 細胞での、タモキシフェンによる PKCα,δの阻害作用も見出している。大脳皮質ニューロン終末ではタモキシフェンの PKCα阻害によるグルタミン酸放出の阻害、DRG での PKCδ阻害による神経突起生成の阻害、中枢における OIPN 時の PKC の活性化が報告されていることなどからも、タモキシフェンによる PKC の抑制が考えられたため、L4-L6 脊髄において細胞内シグナルの活性動態を検討した結果、PKCδおよびその下流シグナルである ERK1/2、c-Fos の活性抑制が認められた。この結果から、OIPN におけるタモキシフェンの抑制効果には PKCδ/ERK/c-Fos 経路の関与が示唆された。

さらに、オキサリプラチンおよびタモキシフェンの単独投与または併用投与時において、濃度依存的な腫瘍増殖抑制効果が確認された。Yu-Jing Fang らはタモキシフェンにより ER-positive であるヒト大腸癌細胞 HT-29 細胞のアポトーシスが誘導されることを示唆しているが、ヒト乳癌細胞において ER-positive な MCF-7 細胞だけでなく、ER-negative である MDA-MB-231 細胞においてもタモキシフェンによるアポトーシス誘導が報告されており、タモキシフェンによるアポトーシスには必ずしも ER の発現が必要ではない可能性が考えられる。

以上の結果から、オキサリプラチンによる末梢神経障害には PKC/ERK/c-Fos 経路が関与し、この経路を抑制するタモキシフェンがその抑制薬として有用である可能性が示唆された。

なお、今回の科学研究費補助金による研究成果は下記、発表論文の 8 報に公表済みである。

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）

今回の科学研究費助成事業による研究成果は下記、発表論文の 4 報に公表済みである。

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1) Tsubaki M, Takeda T, Yoshizumi M, Ueda E, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. RANK-RANKL interactions are involved in cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cell lines., Tumour Biol. 2016, In press., 査読有. DOI: 10.1002/ijc.29367.
2) Tsubaki M, Takeda T, Kino T, Obata N, Itoh T, Imano M, Mashimo K, Fujiwara D, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S. Statins improve survival by inhibiting spontaneous metastasis and tumor growth in a mouse melanoma model., Am J Cancer Res., 5, 3186-97, 2015, 査読有.
3) Tsubaki M, Takeda T, Kino T, Itoh T, Imano M, Tanabe G, Muraoka O, Satou T, Nishida S. Mangiferin suppresses CIA by suppressing the expression of TNF-α, IL-6, IL-1β, and RANKL through inhibiting the activation of

NF-κB and ERK1/2., Am J Transl Res., 7, 1371-81, 2015, 査読有.

4) Tsubaki M, Takeda T, Tani T, Shimaoka H, Suzuyama N, Sakamoto K, Fujita A, Ogawa N, Itoh T, Imano M, Funakami Y, Ichida S, Satou T, Nishida S. PKC/MEK inhibitors suppress oxaliplatin-induced neuropathy and potentiate the antitumor effects., Int J Cancer., 137, 243-50, 2015, 査読有.

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 椿 正寛、武田 朋也、木野 稔己、藤原 大一朗、山添 譲、阪口 勝彦、西田 升三. PKC 及び MEK 阻害剤によるオキサリプラチン誘発末梢神経障害の抑制及び抗腫瘍効果の増強.日本薬学会 第 136 年会. 2016 年 3 月 28 日 パシフィコ横浜 横浜
2) 安原 翔大、椿 正寛、武田 朋也、西田 升三. PKC 阻害剤はオキサリプラチン誘発末梢神経障害を抑制し抗腫瘍効果を増強させる. 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2015 年 10 月 17 日 大阪大谷大学 大阪
3) 椿 正寛、武田 朋也、中橋 拓也、小川 直希、石坂 敏彦、西田 升三. PKC 阻害剤はオキサリプラチン誘導末梢神経障害を抑制するとともに抗腫瘍効果を増強させる. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月 8 日 名古屋国際会議場 名古屋
4) 椿 正寛、武田 朋也、藤田 亜梨沙、木野 稔己、中橋 拓也、小川 直希、山添 譲、石坂 敏彦、西田 升三. PKC/MEK 阻害剤により oxaliplatin 誘導末梢神経障害を抑制できる. 第 19 回日本がん分子標的治療学会. 2015 年 6 月 11 日 松山全日空ホテル 松山

６．研究組織

(1)研究代表者

椿 正寛（TSUBAKI Masanobu）
近畿大学 薬学部・講師
研究者番号：30434856