

令和元年6月10日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18965

研究課題名(和文) がん化学療法誘発末梢神経障害治療を目指した分子標的薬の応用

研究課題名(英文) Application of molecular-targeted drugs for treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy

研究代表者

椿 正寛 (TSUBAKI, Masanobu)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：30434856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オキサリプラチン及びパクリタキセル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(lumber4～6)におけるProteinkinaseC(PKC)活性化に基づくERK経路の活性化が関与することを見出した。また、PKCあるいはMEKを阻害する分子標的薬によりERK経路の抑制を介してオキサリプラチン及びパクリタキセル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及びパクリタキセル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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、臨床においてオキサリプラチン及びパクリタキセル誘発末梢神経障害の予防、治療法は確立されていない。また、末梢神経障害発症機序の詳細は不明である。さらに、これら抗がん剤による末梢神経障害は患者のQOLを低下させるだけでなく、投与の継続も不可能となるため患者は著しく不利益をこうむる。本成果においてオキサリプラチン及びパクリタキセル誘発性末梢神経障害にPKC/ERK経路の活性化が関与することを明らかにし、その抑制薬により完全に末梢神経障害を抑制できることを見出した。これらの結果により、オキサリプラチン及びパクリタキセルの継続投与が可能となり、患者の予後、QOLの改善に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：I show that oxaliplatin and paclitaxel induces the neuropathy through the activation of PKC/ERK pathway in lumber spinal cords. In addition, PKC and MEK inhibitor suppressed the oxaliplatin- and paclitaxel-induced neuropathy via PKC/ERK pathways. These findings suggest that PKC and MEK inhibitors are potentially useful for oxaliplatin- and paclitaxel-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：がん化学療法 末梢神経障害

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

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、臨床的大きな問題となっている。特に抗がん剤の副作用の一つである末梢神経障害はがん患者が苦痛に感じる副作用として男性で5位、女性で3位となっており、早急な改善が求められている。

抗癌剤による末梢神経障害はタキサン系、プラチナ系、及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やパクリタキセル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。また、パクリタキセルでは、微小管障害による神経細胞変性が関与することが考えられている。さらに、脊髄後根神経節及び脊髄において TRP vanilloid 1 (TRPV1) や TRPV4 の発現増加が認められているものの、不明な点は多い。

これまでに、これら知見をもとにオキサリプラチン及びパクリタキセル誘発末梢神経障害に対する臨床試験が行われている。オキサリプラチンにおいては、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。またパクリタキセルでは、グルタチオンによる二重盲検試験が施行されたが、抑制効果は確認できていない。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、臨床の現場では抗がん剤による末梢神経障害に対して、ほとんどど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及びパクリタキセルによる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、オキサリプラチン及びパクリタキセル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4T1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) パクリタキセル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4T1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、パクリタキセルは0、7、14日目に6mg/kgを腹腔内投与、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パクリタキセル誘発性冷過敏症状の抑制効果

(3) - 1 Cold Plate Test

10に設定したCold Plateを用いてパクリタキセルによる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を用いてパクリタキセルによる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) ترامチニブ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

(4) - 1 Cold Plate Test

10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 ترامチニブ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。

(4) - 2 Von Frey Test

Von Frey Filament を用いてオキサリプラチンによる Mechanical allodynia の発現およびトラメチニブ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。

(5) 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-capture により撮影し解析を行った。

(6) 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における冷過敏状態を測定した。パクリタキセルにおける10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。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 (data not shown)。

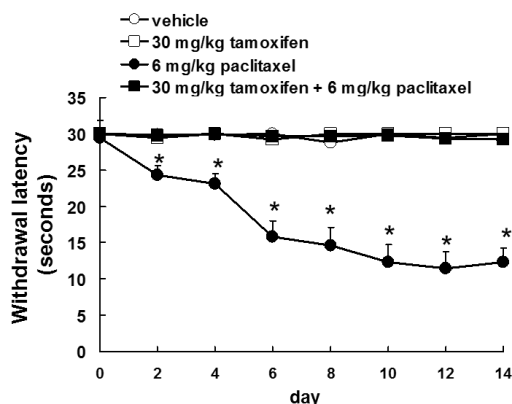


図1. 10 における冷過敏抑制効果

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。パクリタキセル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。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)。

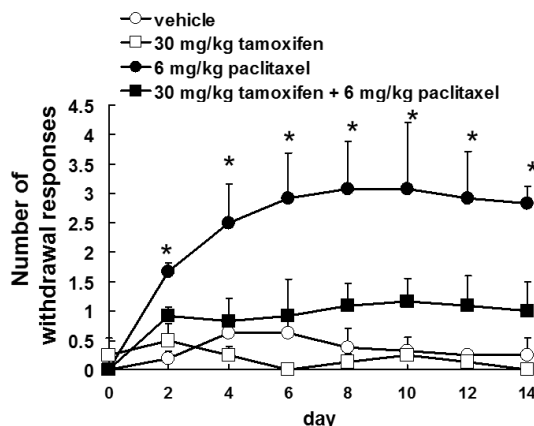


図2. 痛覚過敏抑制効果

4 - 3 . 腰髄部分における PKC 阻害効果

パクリタキセル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、ウエスタンブロットングにて PKC、ERK の活性動態を検討した。その結果、パクリタキセル投与群において、PKC、ERK 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、パクリタキセル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)。

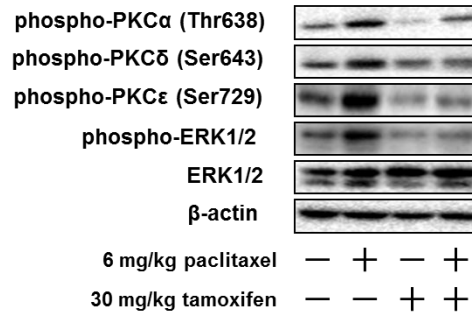


図 3 . パクリタキセルによる PKC 経路活性化及び PKC 阻害薬によるその抑制効果

4 - 4 . パクリタキセルの抗腫瘍効果に対する PKC 阻害薬の影響

パクリタキセルの抗腫瘍効果に対するタモキシフェンの影響について、4T1 細胞をマウス背部皮下に移植し、検討を行った。その結果、パクリタキセル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、パクリタキセル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)。

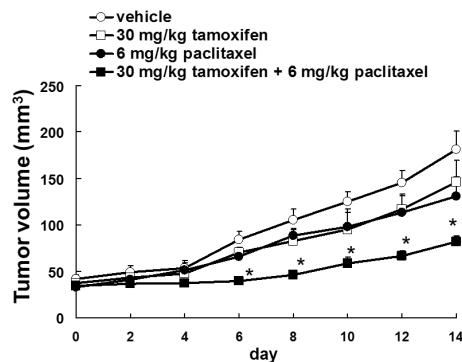


図 4 . パクリタキセル及び PKC 阻害薬投与による腫瘍増殖抑制効果

4 - 5 . Cold allodynia 抑制効果

各薬剤投与前(0 日目)から 15 日目までの 10 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 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。0.5 mg/kg ترامチニブ併用群においては冷過敏は認められなかった。また、4 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 (data not shown)。

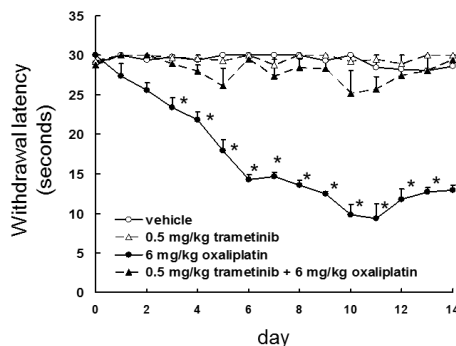


図 5 . 10 における冷過敏抑制効果

4 - 6 . 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。0.5 mg/kg ترامチニブ併用群においては痛覚過敏は認められなかった（図 6）。

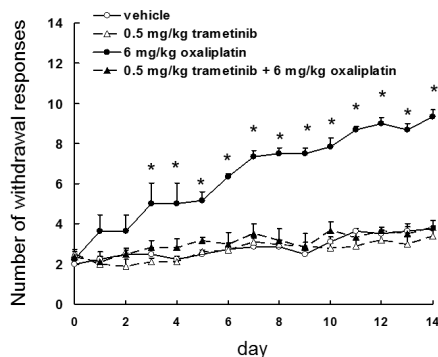


図 6 . 痛覚過敏抑制効果

4 - 7 . 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 ترامチニブ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 ERK 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、ERK の活性化が認められた。しかし、 ترامチニブ併用群においては、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 7）。

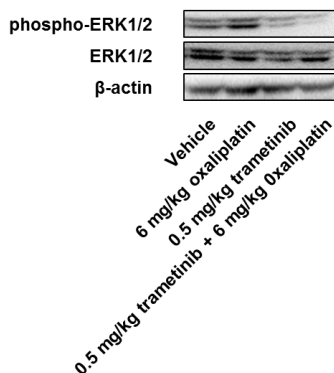


図 7 . オキサリプラチンによる ERK 経路活性化及び ترامチニブによるその抑制効果

4 - 8 . 考察及び結論

臨床の場において、様々ながん治療に汎用されるパクリタキセルの投与時では高確率で末梢神経障害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パクリタキセル誘発末梢神経障害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パクリタキセル誘発末梢神経障害の抑制効果が確認された。このことから、タモキシフェンはパクリタキセル誘発末梢神経障害に対して有効な治療法となる可能性が期待できる。

パクリタキセル誘発末梢神経障害においてカルシウムチャネルの発現増加が報告されており、細胞内カルシウム濃度上昇により PKC の活性化が引き起こされ神経障害が起こることが明らかとなっている。このことより、カルシウム濃度上昇により PKC が活性化され、下流の MEK/ERK 経路が活性化し、神経過敏症状が生じたことが考えられる。また、酸化ストレスが末梢神経障害の発現に関与しているとの報告があり、酸化ストレスによって生じる oxidized DAG が強い PKC 活性化作用を有することも明らかとなっている。これらのことから、脊髄における酸化ストレスにより生じた oxidized DAG による PKC の異常な活性化をタモキシフェンが抑制することにより末梢神経障害を抑制した可能性も考えられる。以上のことから、PKC の活性化をタモキシフェンが抑制することにより下流の MEK/ERK 経路が抑制され神経過敏症状を抑制できることが明らかとなった。

さらに、パクリタキセル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。

また、オキサリプラチン誘発末梢神経障害を ERK 阻害を介して ترامチニブにより抑制できることを明らかにした。オキサリプラチン投与によりカルシウムイオンチャネルである TRPA1 等の発現増加を介する細胞内カルシウム濃度の増加により ERK が活性化することが報告されて

おり、末梢神経障害発症にこの経路が関与する可能性が考えられる。また、オキサリプラチンの代謝物の一つである t-DACH(CI2)も末梢神経障害に関与する可能性が考えられる。この類似体である cisplatin や [Pt(0,0'-acac)(-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。これらの代謝物が神経細胞の細胞死に関与する PKC を活性化することで末梢神経障害が誘導されている可能性がある。PKC は ERK 経路を活性化することから、トラメチニブによりオキサリプラチンによるアポトーシスが抑制されたことが考えられる。

以上の結果から、オキサリプラチン及びパクリタキセルによる末梢神経障害には PKC/ERK 経路が関与し、この経路を抑制するタモキシフェンあるいはトラメチニブ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

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- 1) Tsubaki M, Takeda T, Tomonari Y, Koumoto YI, Imano M, Satou T, Nishida S. Overexpression of HIF-1 contributes to melphalan resistance in multiple myeloma cells by activation of ERK1/2, Akt, and NF- B., *Lab Invest.*, 99, 72-84, 2019, 査読有.
- 2) Mashimo K, Tsubaki M, Takeda T, Asano R, Jinushi M, Imano M, Satou T, Sakaguchi K, Nishida S. RANKL-induced c-Src activation contributes to conventional anti-cancer drug resistance and dasatinib overcomes this resistance in RANK-expressing multiple myeloma cells., *Clin Exp Med.*, 19, 133-141, 2019, 査読有.
- 3) Tsubaki M, Takeda T, Matsumoto M, Kato N, Yasuhara S, Koumoto YI, Imano M, Satou T, Nishida S. Tamoxifen suppresses paclitaxel-, vincristine-, and bortezomib-induced neuropathy via inhibition of the protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase pathway., *Tumour Biol.*, 40, 1-13, 2018, 査読有.
- 4) Tsubaki M, Takeda T, Matsumoto M, Kato N, Asano RT, Imano M, Satou T, Nishida S. Trametinib suppresses chemotherapy-induced cold and mechanical allodynia via inhibition of extracellular-regulated protein kinase 1/2 activation., *Am J Cancer Res.*, 8, 1239-1248, 2018, 査読有.
- 5) Tsubaki M, Takeda T, Tomonari Y, Mashimo K, Koumoto YI, Hoshida S, Itoh T, Imano M, Satou T, Sakaguchi K, Nishida S. The MIP-1 autocrine loop contributes to decreased sensitivity to anticancer drugs., *J Cell Physiol.*, 233, 4258-4271, 2018, 査読有.
- 6) Tsubaki M, Takeda T, Asano RT, Matsuda T, Fujimoto SI, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. Rebamipide suppresses 5-fluorouracil-induced cell death via the activation of Akt/mTOR pathway and regulates the expression of Bcl-2 family proteins., *Toxicol In Vitro.*, 46, 284-293, 2018, 査読有.
- 7) Tsubaki M, Takeda T, Tomonari Y, Kawashima K, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. Pioglitazone inhibits cancer cell growth through STAT3 inhibition and enhanced AIF expression via a PPAR -independent pathway., *J Cell Physiol.*, 233, 3638-3647, 2018, 査読有.
- 8) Fujiwara D, Tsubaki M, Takeda T, Tomonari Y, Koumoto YI, Sakaguchi K, Nishida S. Statins induce apoptosis through inhibition of Ras signaling pathways and enhancement of Bim and p27 expression in human hematopoietic tumor cells., *Tumour Biol.*, 39, 1-11, 2017, 査読有.
- 9) Tsubaki M, Takeda T, Kino T, Sakai K, Itoh T, Imano M, Nakayama T, Nishio K, Satou T, Nishida S. Contributions of MET activation to BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia cells., *Oncotarget.*, 8, 38717-38730, 2017, 査読有.

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 加藤 菜月、椿 正寛、武田 朋也、川島 啓司、地主 みなみ、藤本 伸一郎、森井 悠介、西田 升三. PKC 阻害剤による抗がん剤誘導末梢神経障害抑制効果. 第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2018 年 10 月 13 日 姫路独協大学 姫路
- 2) 松本 幹広、椿 正寛、武田 朋也、木野 稔己、友成 佳加、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 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2016 年 10 月 15 日 大阪薬科大学 大阪

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。