

氏名	やました ゆうた 山下 郁太		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	甲第 1729 号		
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 15 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	遺伝性ニューロパチーCharcot-Marie-Tooth 病原因遺伝子を標的とした抗がん剤誘発性末梢神経障害の発現機序解明		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	三島 健一
	(副査) 福岡大学	教授	江川 孝
	福岡大学	准教授	松尾 宏一

内容の要旨

高齢化社会に伴いがん患者は年々増加している。それに伴いがん化学療法は、がん治療のみを目的とせず、患者の生活の質を維持した治療が望まれている。しかしながら、がん化学療法に伴う様々な副作用が患者の生活の質を低下させる要因となっている。現在、がん化学療法に伴う副作用に対する支持療法は、悪心・嘔吐、骨髄抑制のみが確立しており、末梢神経障害や食欲不振、倦怠感などに関しては十分でない。そこで本論では、最もニーズの高い末梢神経障害に着目して研究を行った。

臨床において末梢神経障害を最も引き起こしている抗がん剤は、白金系抗がん剤オキサリプラチン、タキサン系抗がん剤パクリタキセルおよびビンカルカロイド系抗がん剤ビンクリスチンの 3 剤である。これらの抗がん剤は、痛み（機械的アロディニア）やしびれ、寒冷刺激に対する異常感覚（低温知覚異常）および感覚鈍麻などの感覚障害を引き起こす。その発症原因は、末梢神経系を構成する神経細胞、軸索あるいは髄鞘が障害されることで生じると想定されている。しかしながら、発症機序は依然として不明であるため、有効な支持療法が確立されていない。

Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) は、痛みを伴う感覚性運動性ニューロパチーを生じる遺伝子疾患である。その原因遺伝子は、神経細胞、軸索あるいは髄鞘の機能に関わっており、病理所見の違いから髄鞘障害性あるいは軸索障害性に分類される。また、CMT 患者において、抗がん剤による末梢神経障害が増悪することが知られている 1)。しかしながら、CMT 原因遺伝子が抗がん剤による末梢神経障害の発現機序に関与するかは明らかとなっていない。

そこで、本論では各種抗がん剤による末梢神経の発現に CMT 原因遺伝子が関与するか検討した。まず始めに、①「各種抗がん剤誘発性末梢神経障害ラットを作製し、症状と発現時期」を検討した。次に、②「各種抗がん剤誘発性末梢神経障害ラットにおける CMT

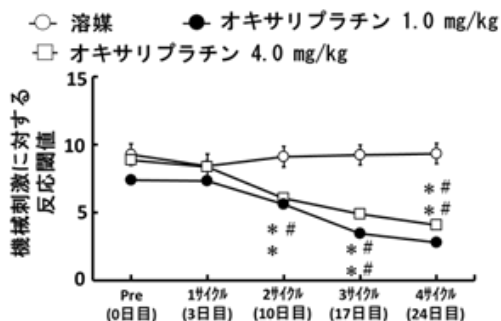
原因遺伝子の発現量解析」を検討した。最後に、③「オキサリプラチン誘発性末梢神経障害に対する CMT 治療薬クルクミンの有効性」を検討した。

① 各種抗がん剤による末梢神経障害ラットの作製および症状と発現時期

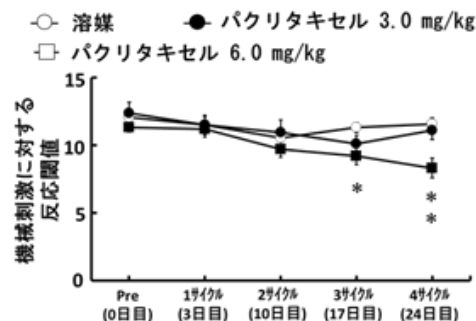
本課題では、臨床での使用方法を参考に投与サイクルを設定し、オキサリプラチン、パクリタキセルおよびビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットを作製した。その結果、オキサリプラチンは、1 サイクル目から低温知覚異常、2 サイクル目から機械的アロディニアを引き起こした (図 1A、図 2A)。パクリタキセルは、3 サイクル目から機械的アロディニアを引き起こし、低温知覚異常を引き起こさなかった (図 1B、2B)。ビンクリスチンは、2 サイクル目から機械的アロディニアを引き起こし、低温知覚異常を引き起こさなかった (図 1C、2C)。

これらのことから、機械的アロディニアは、各種抗がん剤に共通した症状であり、抗がん剤の累積投与量が増加する投与後期から発現することが明らかとなった。また、低温知覚異常は、オキサリプラチンに特異的な症状であり、投与初期から発現することが明らかとなった。これらの症状は、臨床での知見と一致することから、抗がん剤による末梢神経障害モデルラットとして適切であると考えられる。

A) オキサリプラチン



B) パクリタキセル



C) ビンクリスチン

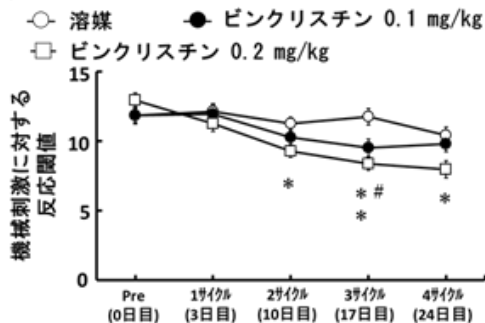


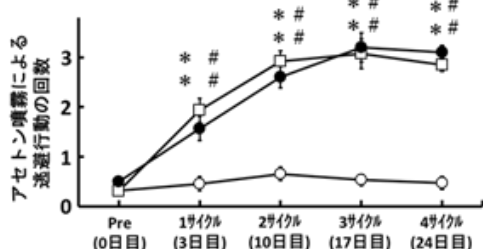
図1. 各種抗がん剤による機械的アロディニアの発現

オキサリプラチンの結果 (A)、パクリタキセルの結果 (B)、ビンクリスチンの結果 (C) を示す。

Two-way ANOVA followed by Tukey test, *P<0.05, #P<0.05, **P<0.01, ###P<0.01 (vs 溶媒)

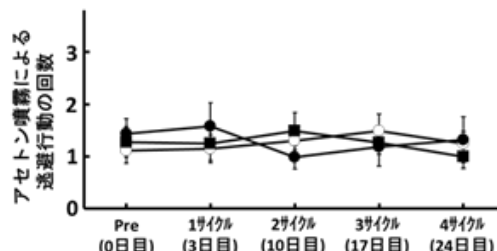
A) オキサリプラチン

○ 溶媒 ● オキサリプラチン 1.0 mg/kg
□ オキサリプラチン 4.0 mg/kg



B) パクリタキセル

○ 溶媒 ● パクリタキセル 3.0 mg/kg
□ パクリタキセル 6.0 mg/kg



C) ピンクリスチン

○ 溶媒 ● ピンクリスチン 0.1 mg/kg
□ ピンクリスチン 0.2 mg/kg

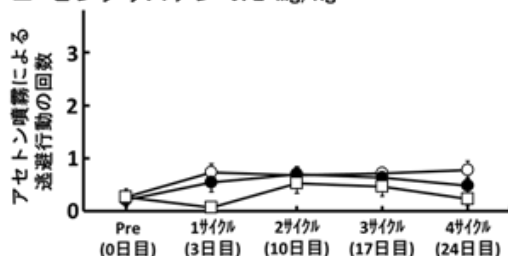


図2. 各種抗がん剤による低温知覚異常の発現

オキサリプラチンの結果 (A)、パクリタキセルの結果 (B)、ピンクリスチンの結果 (C) を示す。

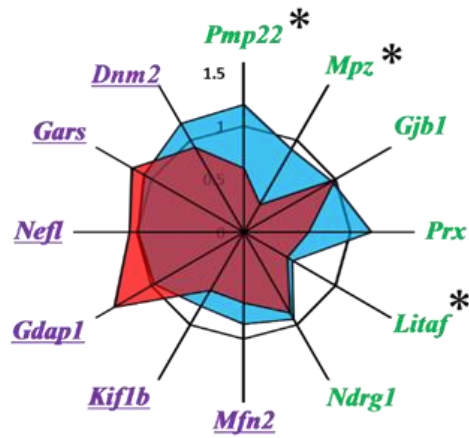
Two-way ANOVA followed by Tukey test **P<0.01, ##P<0.01 (vs 溶媒)

② 各種抗がん剤による末梢神経障害ラットにおける CMT 原因遺伝子の発現量解析

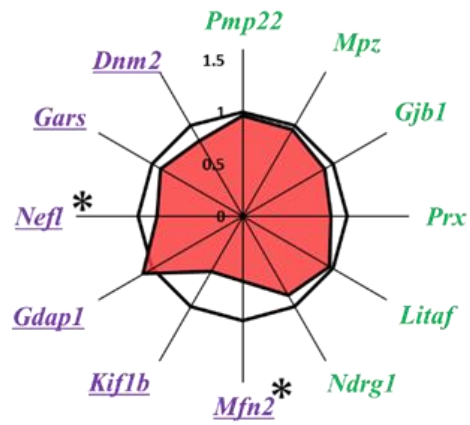
各種抗がん剤による末梢神経障害の発現時に CMT 原因遺伝子の発現量が変化するか検討した。オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットにおける低温知覚異常が発現する 1 サイクル目では、CMT 原因遺伝子の発現量は、変化しなかった。一方で、機械的アロディニアが発現する 4 サイクル目では、髄鞘障害性 CMT 原因遺伝子 Pmp22、Mpz および Litaf 遺伝子の発現量が低下した (図 3A)。パクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットでは、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 および Nef1 遺伝子の発現量が低下した (図 3B)。ピンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットでは、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 遺伝子の発現量が低下した (図 3C)。

以上の結果から、オキサリプラチンによる機械的アロディニアは、髄鞘障害性 CMT 原因遺伝子 Pmp22、Mpz および Litaf の発現量低下が関与することが考えられた。また、パクリタキセルによる機械的アロディニアは、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 および Nef1 遺伝子の発現量低下、ピンクリスチンによる機械的アロディニアは、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 遺伝子の発現量低下が関与することが考えられた。

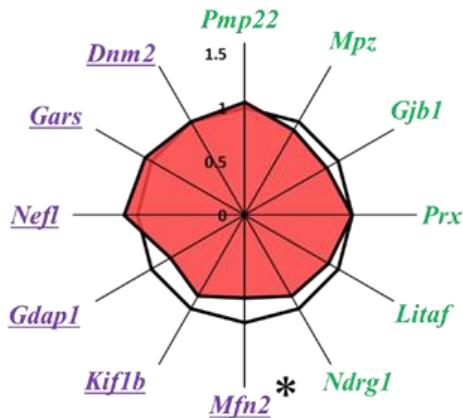
A) オキサリプラチン



B) パクリタキセル



C) ピンクリスチン



□ 溶媒 ■ 1サイクル目

■ 4サイクル目

■ 随鞘障害性CMT原因遺伝子

■ 軸索障害性CMT原因遺伝子

図3. 各種抗がん剤誘発性末梢神経障害ラットにおけるCMT原因遺伝子の発現量変化

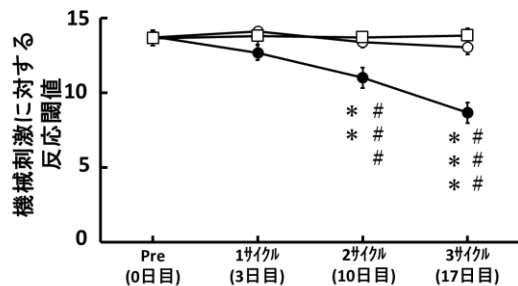
オキサリプラチンの結果 (A)、パクリタキセルの結果 (B)、ピンクリスチンの結果 (C) を示す。
One-way ANOVA followed by Dunnett's test, * $P < 0.05$, (vs 溶媒)

③ オキサリプラチンによる末梢神経障害に対して CMT 治療薬クルクミンの有効性

クルクミンは、随鞘障害性 CMT に対する治療薬として知られている。オキサリプラチンによる機械的アロディニアでは随鞘障害性 CMT 原因遺伝子が関与することが明らかとなったため、クルクミンが有効であると考えられた。オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットに対して予防的にクルクミンを経口投与した結果、クルクミンは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を抑制した (図 4)。このことから、クルクミンは、オキサリプラチンによる末梢神経障害の予防薬となることが明らかとなった。クルクミンが著効した理由として、機械的アロディニアの発現は、随鞘障害性 CMT 原因遺伝子 Pmp22、Mpz および Litaf の発現量低下が関与していることから、クルクミンによる随鞘化作用が有効であった可能性がある 2)。さらに、低温知覚異常の発現は、活性酸素種による温度感受性 transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) の刺激が関与する報告があるため、クルクミンによる抗酸化作用が有効であった可能性がある 3)4)。

A) 機械的アロディニアへの効果

□ オキサリプラチン 4.0 mg/kg + クルクミン 10 mg/kg



B) 低温知覚異常への効果

○ 溶媒 ● オキサリプラチン 4.0 mg/kg

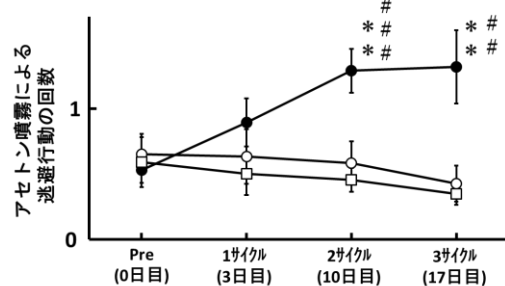


図4. オキサリプラチン誘発性末梢神経障害に対するCMT治療薬クルクミンの予防効果

Two-way ANOVA followed by Tukey test, **P<0.01 (vs 溶媒), ###P<0.01, ####P<0.001 (vs オキサリプラチン 4.0 mg/kg + クルクミン 10 mg/kg)

以上の結果から、オキサリプラチン誘発性機械的アロディニアには、髄鞘障害性 CMT 原因遺伝子 Pmp22、Mpz および Litaf、パクリタキセル誘発性機械的アロディニアには、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 および Nef1、ビンクリスチン誘発性機械的アロディニアには、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 が関与することが明らかとなった。さらに、髄鞘障害性 CMT 治療薬であるクルクミンは、オキサリプラチンによる機械的アロディニアならびに低温知覚異常を改善した。これらのことから、各種抗がん剤による末梢神経障害の発現機序には、異なる CMT 原因遺伝子が関与すること、さらに CMT 原因遺伝子を標的とした薬物が抗がん剤による末梢神経障害の発現を改善する予防薬となる可能性が示唆された。

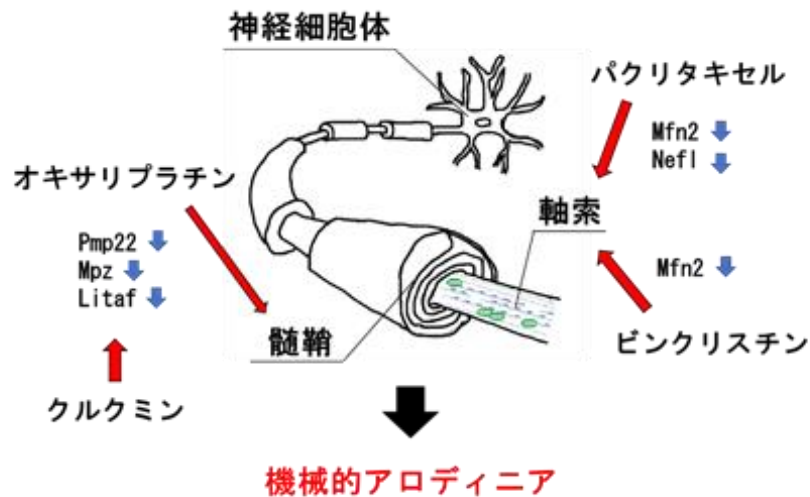


図5. 各種抗がん剤による末梢神経障と CMT 原因遺伝子との関連

引用文献

- 1) Martino MA, et al. Gynecol Oncol. 2005; 97(2): 710-712.
- 2) Tello Velasquez J, et al. Neuroscience. 2016; 324: 140-150.
- 3) Nakagawa T, et al. Biol Pharm Bull. 2017; 40(7): 947-953.
- 4) Fujisawa S, et al. Anticancer Res. 2004; 24(2B): 563-569.

審査の結果の要旨

がん化学療法は、がん治療のみを目的とせず、患者の生活の質を維持した治療が望まれている。しかしながら、がん化学療法に伴う副作用のなかで、末梢神経障害や食欲不振、倦怠感などの副作用に対する対応は不十分である。

臨床において、末梢神経障害を引き起こす頻度の最も高い抗がん薬は、白金系抗がん薬オキサリプラチン、タキサン系抗がん薬パクリタキセルおよびビンカアルカロイド系抗がん薬ビンクリスチンである。これらの抗がん薬は、手足の痛み（機械的アロディニア）やしびれ、寒冷刺激に対する異常感覚（低温知覚異常）および感覚鈍麻などの感覚障害を引き起こす。その発現には、末梢神経系を構成する神経細胞、軸索あるいは髄鞘の障害が関与すると考えられている。しかしながら、発現に関わる分子は見つかっておらず、有効な支持療法は確立されていない。

Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) は、手足の痛みを伴う感覚性運動性ニューロパチーを生じる遺伝子疾患である。その原因遺伝子は、病態の違いから髄鞘障害性あるいは軸索障害性に分類されている。また、CMT 患者において、抗がん薬による末梢神経障害が増悪することも知られている。しかしながら、CMT 原因遺伝子が抗がん薬による末梢神経障害の発現機序にどのように関わっているかは明らかとなっていない。

そこで、本論では抗がん薬による末梢神経障害の発現に CMT 原因遺伝子が関与するか検討した。第 I 章では、抗がん薬誘発性末梢神経障害ラットを作製し、その症状の特徴を調べた。次に、第 II 章では、抗がん薬誘発性末梢神経障害ラットにおける CMT 原因遺伝子の発現量を解析した。最後に、第 III 章では、オキサリプラチン誘発性末梢神経障害に対する予防・治療薬の探索を検討した。

(1) 抗がん薬による末梢神経障害ラットの症状の特徴

3 種類の作用機序の異なる抗がん薬を用いることで、それぞれの末梢神経障害の症状の特徴を解析した。その結果、オキサリプラチン、パクリタキセルおよびビンクリスチンは、いずれも von Frey test による機械的アロディニアを引き起こし、その症状は累積投与量依存的であった。一方、Acetone test による低温知覚異常はオキサリプラチンのみで生じた。

これらの結果から、抗がん薬による末梢神経障害の症状は多様であり、さらにその症状の程度や発症時期が異なることを明らかにした。また、抗がん薬による末梢神経障害に対する支持療法には各抗がん薬の個別の対応が必要であることが示唆された。

(2) 抗がん薬による末梢神経障害ラットにおける CMT 原因遺伝子の発現量解析

抗がん薬による末梢神経障害の発症時に CMT 原因遺伝子の発現量が変化するか検討した。オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットにおける低温知覚異常が発現する 1 サイクル目では、CMT 原因遺伝子の発現量は変化しなかった。一方で、機械的アロディニアが発現する 4 サイクル目では、髄鞘障害性 CMT 原因遺伝子 Pmp22、Mpz および Litaf 遺伝子の発現量が低下した。パクリタキセルおよびビンクリスチン誘発性末梢

神経障害ラットでは、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 や Nef1 遺伝子が低下した。

以上の結果から、抗がん薬による CMT 原因遺伝子の関与が特異的であることを明らかにした。このことは、症状においても原因遺伝子においても抗がん薬による末梢神経障害の対応の複雑さを示し、各抗がん薬の個別の対応が必要であることが示唆された。

(3) オキサリプラチンによる末梢神経障害に対して予防・治療薬の探索

オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する支持療法を確立するために 6 種類の作用機序の異なる薬物を検討した。その中で、クルクミンは、Pmp22 および Mpz の発現を増加させることで髄鞘障害性 CMT の末梢神経障害を改善することが報告されている。オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットに対して予防的にクルクミンを経口投与した結果、クルクミンはオキサリプラチンによる機械的アロディニアおよび低温知覚異常の発現を抑制した。このことから、クルクミンは、オキサリプラチンによる末梢神経障害の予防薬となることが示唆された。

本研究では、抗がん薬による末梢神経障害の症状は多様であり、さらに、CMT 原因遺伝子の関与も特異的であることを明らかにした。このことは、各抗がん薬における CMT 原因遺伝子の発現量変化に着目することで、有効な予防・治療薬を探索することが期待できる。また、変化のある CMT 原因遺伝子が各抗がん薬において特異的であることから、遺伝子診断による末梢神経障害の発現予測への応用も期待できる。

以上、本研究は、抗がん薬による末梢神経障害に対する支持療法について新しい知見を得ていることから高く評価できる。また、論文業績ならびに公聴会審査における申請者の質疑応答は、学位を授与するのに適切な能力であると判断した。本論文は、今後、抗がん薬による末梢神経障害に対する支持療法への応用に期待が持たれ、学位論文として十分に評価できるものと判定した。