

# 平成 29 年度 博士学位論文

## 論題

---

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

---

指導教授                      三島 健一

福岡大学大学院              薬学研究科

薬学専攻

学籍番号                      PD141002

氏名                              山下 郁太

目次

序論..... 1

**第1章 各種抗がん剤による末梢神経障害モデルの作製および症状の解析**

緒言..... 7

**第1節 白金系抗がん剤オキサリプラチンによる末梢神経障害の解析..... 10**

**1. 実験方法 ..... 10**

1.1. 実験材料

1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

1.1.2 オキサリプラチンの調整

1.2. 実験手続きならびに実験装置

1.2.1. 投与方法

1.2.2. von Frey test

1.2.3. Acetone test

1.3. 統計処理

**2 実験結果..... 13**

2.1. オキサリプラチンによる生存率および体重への影響

2.2. オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現

2.3. オキサリプラチンによる機械的アロディニアの発現

**第2節 オキサリプラチンから遊離されるシュウ酸による末梢神経障害の解析..... 17**

**1. 実験方法..... 17**

1.1. 実験材料ならびに実験試薬

1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

1.1.2 シュウ酸の調整

1.2. 実験手続きならびに実験装置

1.2.1. 投与方法

1.2.2. von Frey test

1.2.3. Acetone test

1.3. 統計処理

**2 実験結果..... 18**

2.1. シュウ酸による生存率および体重への影響

2.2.	シュウ酸による低温知覚異常の発現	
2.3.	シュウ酸による機械的アロディニアの発現	
<b>第3節</b>	<b>タキサン系抗がん剤パクリタキセルによる末梢神経障害の解析</b>	<b>22</b>
<b>1.</b>	<b>実験方法</b>	<b>22</b>
1.1.	実験材料ならびに実験試薬	
1.1.1	実験動物ならびに飼育方法	
1.1.2	パクリタキセルの調整	
1.2.	実験手続きならびに実験装置	
1.2.1.	投与方法	
1.2.2.	von Frey test	
1.2.3.	Acetone test	
1.3.	統計処理	
<b>2</b>	<b>実験結果</b>	<b>23</b>
2.1.	パクリタキセルによる生存率および体重への影響	
2.2.	パクリタキセルによる低温知覚異常の発現	
2.3.	パクリタキセルによる機械的アロディニアの発現	
<b>第4節</b>	<b>ビンカアルカロイド系抗がん剤ビンクリスチンによる末梢神経障害の解析</b>	<b>27</b>
<b>1.</b>	<b>実験方法</b>	<b>27</b>
1.1.	実験材料ならびに実験試薬	
1.1.1	実験動物ならびに飼育方法	
1.1.2	ビンクリスチンの調整	
1.2.	実験手続きならびに実験装置	
1.2.1.	投与方法	
1.2.2.	von Frey test	
1.2.3.	Acetone test	
1.3.	統計処理	
<b>2</b>	<b>実験結果</b>	<b>28</b>
2.1.	ビンクリスチンによる生存率および体重への影響	
2.2.	ビンクリスチンによる低温知覚異常の発現	
2.3.	ビンクリスチンによる機械的アロディニアの発現	
<b>第5節</b>	<b>考察</b>	<b>32</b>
<b>第6節</b>	<b>小括</b>	<b>36</b>

## 第 2 章 抗がん剤による末梢神経障害モデルラットにおける遺伝性神経障害 Charcot-Marie-Tooth 病遺伝子の発現量解析

緒言.....	37
第 1 節 オキサリプラチン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.....	39
1. 実験方法.....	39
1.1. 実験動物ならびにサンプル作製	
1.1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.1.2. サンプル作製	
1.2. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) 法	
1.3 統計処理	
2. 実験結果.....	41
2.1 オキサリプラチンによる髄鞘病変に関連のある CMT 遺伝子発現への影響	
2.2 オキサリプラチンによる軸索病変に関連のある CMT 遺伝子発現への影響	
第 2 節 シュウ酸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.....	44
1. 実験方法.....	44
1.1. 実験動物ならびにサンプル作製	
1.1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.1.2. サンプル作製	
1.2. RT-PCR 法	
1.3 統計処理	
2 実験結果.....	44
2.1 パクリタキセルによる髄鞘病変に関連のある CMT 遺伝子発現への影響	
2.2 パクリタキセルによる軸索病変に関連のある CMT 遺伝子発現への影響	
第 3 節 パクリタキセル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.....	47
1. 実験方法.....	47
1.1. 実験動物ならびにサンプル作製	
1.1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.1.2. サンプル作製	
1.2. RT-PCR 法	

1.3	統計処理	
<b>2.</b>	<b>実験結果</b> .....	47
2.1	パクリタキセルによる髄鞘病変に関連のある CMT 遺伝子発現への影響	
2.2	パクリタキセルによる軸索病変に関連のある CMT 遺伝子発現への影響	
<b>第 4 節</b>	<b>ビンクリスチン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</b> .....	50
<b>1.</b>	<b>実験方法</b> .....	50
1.1.	実験動物ならびにサンプル作製	
1.1.1.	実験動物ならびに飼育方法	
1.1.2.	サンプル作製	
1.2.	RT-PCR 法	
1.3	統計処理	
<b>2</b>	<b>実験結果</b>	
2.1	ビンクリスチンによる髄鞘病変に関連のある CMT 遺伝子発現への影響	
2.2	ビンクリスチンによる軸索病変に関連のある CMT 遺伝子発現への影響	
<b>第 5 節</b>	<b>考察</b> .....	53
<b>第 6 節</b>	<b>小括</b> .....	56
<b>第 3 章</b>	<b>オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する Charcot-Marie-Tooth 病治療薬クルクミンの治療効果</b> .....	57
<b>緒言</b> .....		57
<b>第 1 節</b>	<b>オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する CMT 治療薬クルクミンの治療効果</b> .....	58
<b>1.</b>	<b>実験方法</b> .....	58
1.1.	実験材料ならびに実験試薬	
1.1.1.	実験動物ならびに飼育方法	
1.1.2.	オキサリプラチンの調整	
1.1.3.	クルクミンの調整	
1.2.	実験手続きならびに実験装置	
1.2.1.	投与方法	

1.2.2.	von Frey test	
1.2.3.	Acetone test	
1.3.	統計処理	
<b>2.</b>	<b>実験結果</b> .....	59
2.1.	オキサリプラチンによる低温知覚異常に対するクルクミンの効果	
2.2.	オキサリプラチンによる機械的アロディニアに対するクルクミンの効果	
<b>第2節</b>	<b>考察</b> .....	62
<b>第3節</b>	<b>小括</b> .....	63
	総括ならびに結論.....	64
	参考文献.....	67
	謝辞.....	72

## 序論

### 我が国におけるがん患者の推移と政策

がん治療は、我が国の医療において重要な課題となっている。我が国においてがん患者数は、年々増加しており、平成 26 年には 1626 千人であることが報告されている<sup>1)</sup>。さらに、がんによる死亡率は昭和 56 年以降、第 1 位となり一貫して上昇を続けている<sup>2)</sup>。そのため我が国では、平成 19 年から「がん対策推進基本計画」が策定された。この政策では、「全てのがん患者とその家族の苦痛の軽減と療養生活の質の維持」を目標に掲げている。つまり、これからのがん治療は、患者の生活の質 (Quality of Life; QOL) を十分に考慮したがん治療であることが求められている。

### 我が国における抗がん剤による副作用状況

抗がん剤による副作用は、がん治療を受ける患者の QOL を低下させる大きな要因である。静岡県立静岡がんセンターによる実態調査において、薬物療法に関する悩みや負担の割合が平成 15 年の 19.2%から平成 25 年の 44.3%へと急増していることが明らかとなっている (図 1)<sup>3)</sup>。細分類を行った結果、悩みは末梢神経障害や脱毛、食欲不振、味覚障害などが上位に挙げられた。また、株式会社 QLife が行ったインターネットによるアンケート調査において、抗がん剤による副作用を理由に治療を止めたいと感じた患者は、3 人に 1 人の割合であった (図 2)<sup>4)</sup>。さらに最も辛いと感じた副作用を調べたところ、吐気・嘔吐、倦怠感・疲れ、手足のしびれ、食欲不振などが上位に挙げられた。こうした調査から、抗がん剤による副作用のコントロールは、がん治療において QOL を維持するために必要であると考えられる。

### 抗がん剤による副作用に対する支持療法

抗がん剤による副作用をコントロールする手段として、支持療法が行われている。抗がん剤は、治療の進行に伴い悪心・嘔吐や骨髄抑制、末梢神経障害、食欲不振、倦怠感などの副作用を引き起こす (図 3)。これらの副作用に対して症状を軽減あるいは予防するための支持療法として、悪心・嘔吐に対しては、5-HT<sub>3</sub>拮抗薬やニューロキニン 1 (NK1) 拮抗薬、副腎皮質ステロイド薬が推奨されている<sup>5)</sup>。骨髄抑制では、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 製剤や輸血が推奨されている<sup>6) 7)</sup>。さらに近年では、遺伝子診断により副作用の重症度が予測可能となってきている。肝代謝酵素 UGT1A1 の遺伝子検査は、イリノテカンによる重篤な副作用 (特に好中球減少) の予測を可能とし、適切な患者が選択できるようになっている<sup>8) 9)</sup>。また、細胞内分子 STAT3 は、分子標的薬による活性の低下により、皮膚障害を引き起こすことから、遺伝子診断や治療薬の標的となり始めている<sup>10) 11)</sup>。一方で、末梢神経障害や食欲不振、倦怠感に対しては、推奨される薬剤や遺伝子診断は未だ存在していない。そのため、こ

れらコントロールが不十分な副作用への支持療法の確立がこれからの課題であるといえる（表 1）。中でも末梢神経障害は発現頻度が高く、苦痛を感じる患者が多い<sup>3)</sup>。そのため、抗がん剤による末梢神経障害は、早期解決すべき副作用であると考え、本研究テーマとした。

### 抗がん剤による末梢神経障害

抗がん剤による末梢神経障害は、手足のしびれや痛み、冷覚が過敏になるなど感覚性の症状が特である。また、末梢神経障害を引き起こしやすい抗がん剤として、白金系抗がん剤オキサリプラチン（発現率：54.4%）、タキサン系抗がん剤パクリタキセル（発現率：43.8%）およびビンカアルカロイド系抗がん剤ビンクリスチン（発現率：25.5%）が知られている<sup>12)13)14)</sup>。これらの抗がん剤による末梢神経障害は、日常の動作に制限をかけるため、がん治療患者に強い不快感を引き起こす。そのため、末梢神経障害が現れた場合には、抗がん剤の減量、休薬もしくは中止の処置が行われ、抗がん剤の用量規定因子となっている。こうしたことから、抗がん剤による末梢神経障害に対する支持療法の臨床試験が数多く行われている。オキサリプラチンによる末梢神経障害に対しては、カルシウム／マグネシウム製剤の静脈内投与、プレガバリン、牛車腎気丸などの効果が検討されてきた<sup>15)16)17)</sup>。パクリタキセルによる末梢神経障害では、アミフォスチン、グルタミン、アセチル-L-カルニチン、ビタミン E などの効果が検討されてきた<sup>18)19)20)</sup>。またビンクリスチンによる末梢神経障害では、グルタミン酸、ビタミン B 群、デュロキセチンなどの効果が検討されてきた<sup>21)22)23)</sup>。しかしながら、依然として推奨される支持療法とはなりえていない（表 2、3）<sup>24)</sup>。そのため、現在では、推奨度の低いデュロキセチン、漢方薬およびビタミン剤がやむなく使用されている。

抗がん剤による末梢神経障害に対して有効な支持療法が確立されていない原因として、発現機序が依然として明らかになっていないことが考えられる。そこで本論では、抗がん剤による末梢神経障害の発現機序を解明することで、有効な支持療法の提案を目指した（図 4）。

本研究では、ラットを用いた抗がん剤による末梢神経障害の発現機序の解明を行った。第 1 章ではオキサリプラチン、パクリタキセルおよびビンクリスチンによる末梢神経障害モデルラットを作製し、末梢神経障害の症状および発現時期について検討した。第 2 章では、各種抗がん剤による末梢神経障害の発現機序を解明するために、遺伝性ニューロパチー Charcot-Marie-Tooth 病（CMT）原因遺伝子の発現量を検討した。第 3 章では、第 2 章で明らかとなった知見から、オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する CMT 治療薬であるクルクミンの有効性を検討した。



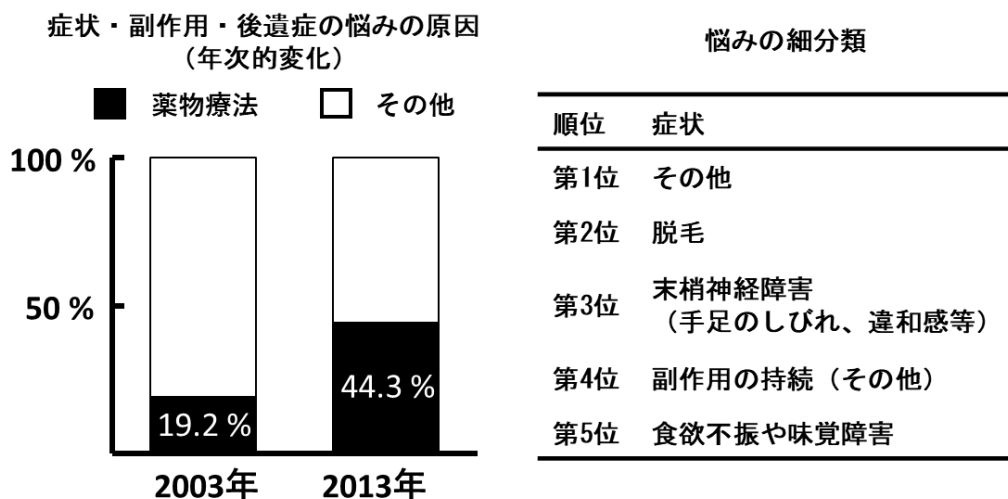
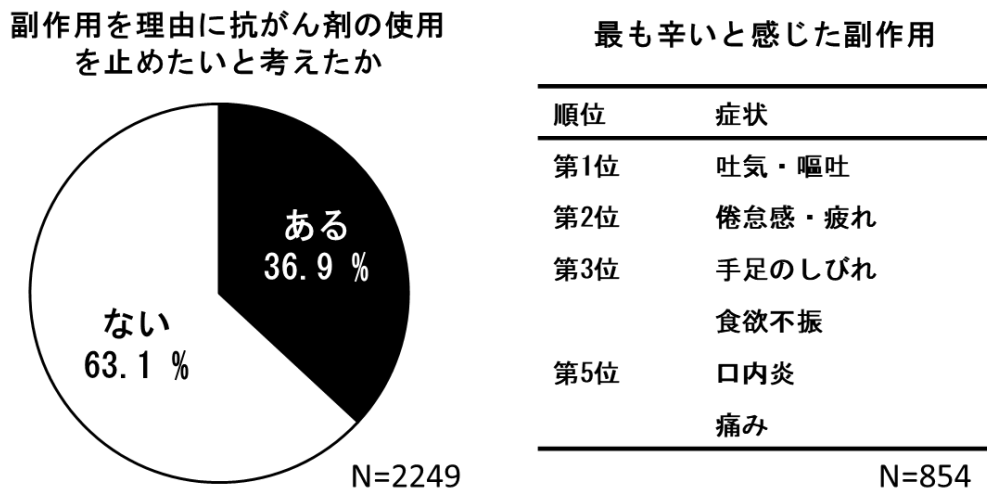


図1 がん体験者の悩みや負担に関する調査結果



調査主体: 総合医療メディカル株式会社Qlife  
 調査対象: 医療機関によって「がん」と診断され、かつ医療機関受診経験のある患者  
 有効回収数: 2249人, 調査方法: インターネット調査, 調査時期: 2013/2/22~2013/3/3  
[http://www qlife.co.jp/news/130329qlife\\_research.pdf](http://www qlife.co.jp/news/130329qlife_research.pdf)

図2 抗がん剤の副作用に関するネットアンケート結果

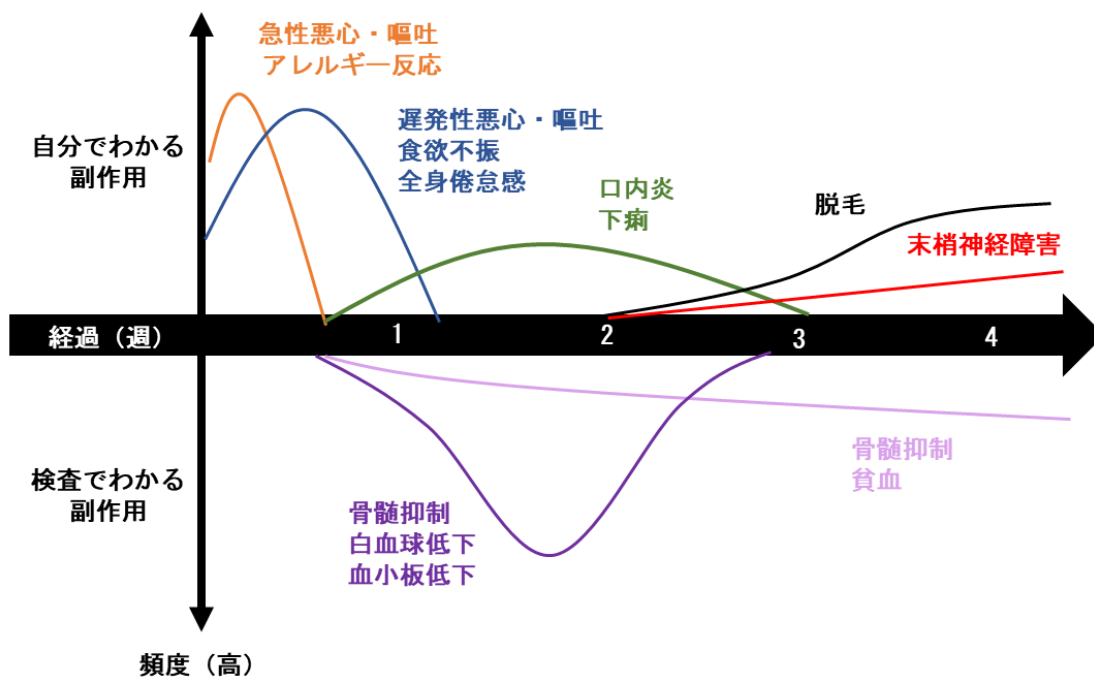


図3 抗がん剤による副作用の発現時期および頻度

表1 抗がん剤による副作用に対する対策

症状	対策	ガイドライン・推奨
悪心・嘔吐	5-HT3拮抗薬、NK1拮抗薬、副腎皮質ステロイドの投与	○
骨髄抑制	G-CSF製剤の投与、輸血の使用	○
脱毛	カツラの使用、生活指導	△
口内炎	口腔ケア、うがい薬の使用	△
アレルギー反応	抗ヒスタミン薬、副腎皮質ステロイドの投与	△
下痢	生活指導、止瀉薬、整腸薬の投与	△
末梢神経障害	漢方薬、ビタミン剤の投与	×
倦怠感	生活指導	×
食欲不振	生活指導、漢方薬の投与	×

表2 抗がん剤による末梢神経障害に対する予防薬の推奨度

薬物	推奨度	エビデンス	効果	有害性
Acetylcystein	不確定	低	低	低
Acetyl-L-carnitine	中程度 非推奨	高	無	高
Amifostine	中程度 非推奨	中	低	中
Amitriptyline	中程度 非推奨	中	無	中
Calcium and magnesium	中程度 非推奨	高	低	低
Carbamaepine / carbamate	不確定	低	低	低
Dietyldithiocarbamate	高度 非推奨	低	無	高
Glutamate / glutamine	不確定	低	低	低
Glutathione	中程度 非推奨	中	低	低
Goshajinkigan	不確定	低	低	低
Nimodipine	高度 非推奨	低	無	中
Omega 3	不確定	低	低	低
Org 2766	中程度 非推奨	中	低	低
Retinoic acid	中程度 非推奨	低	低	中
rhu LIF	中程度 非推奨	低	無	低
Venlafaxine	不十分	中	中	中
Vitamin E	中程度 非推奨	中	低	低

表3 抗がん剤による末梢神経障害に対する治療薬の推奨度

薬物	推奨度	エビデンス	効果	有害性
Acetyl-L-carnitine	不確定	低	低	中
Duloxetine	中程度 推奨	中	中	低
Gabapentin	不確定	中	低	低
Lamotrigine	中程度 非推奨	中	無	低
Nortriptyline / amitriptyline	不確定	中	低	低
Topical amitriptyline, ketamine, ± Baclofen	不確定	中	中	低

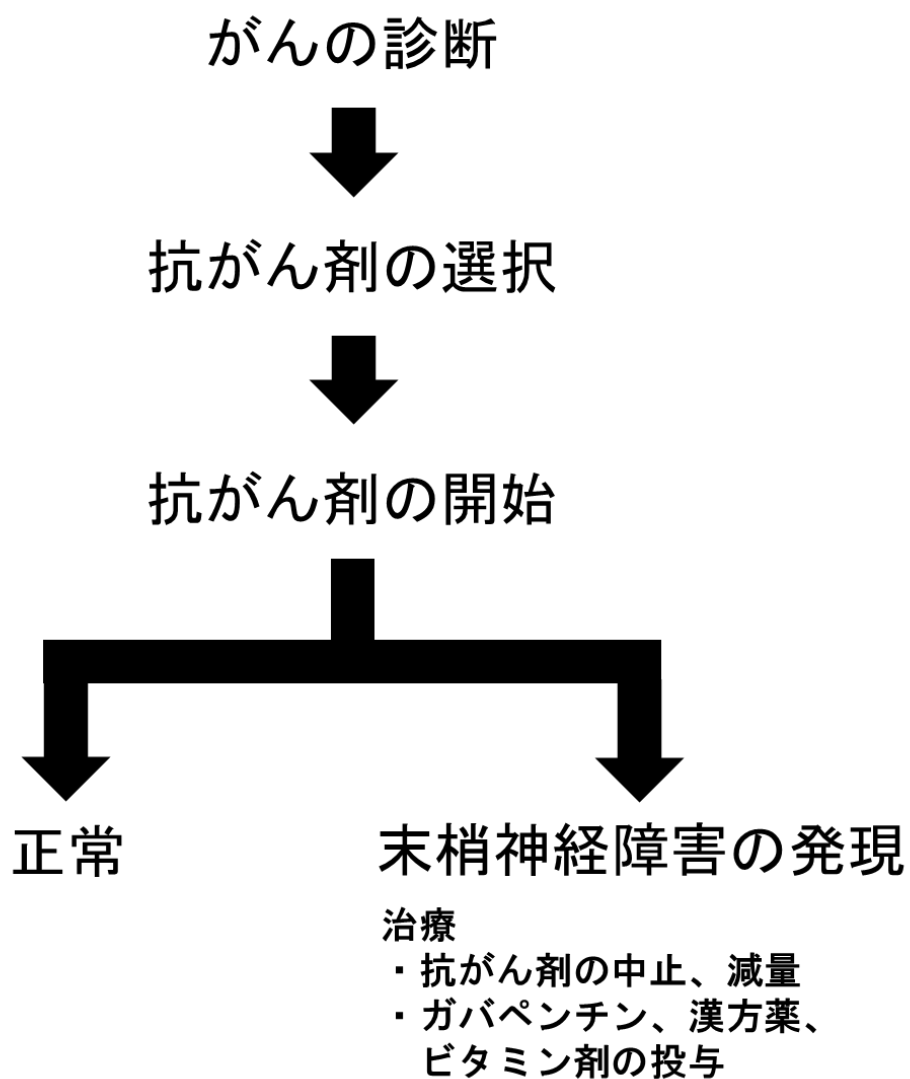


図4 抗がん剤による末梢神経障害への現在の対策アルゴリズム

## 第1章 各種抗がん剤による末梢神経障害モデルの作製および症状の解析

### 緒言

抗がん剤の中でも、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ならびにビンカアルカロイド系抗がん剤ビンクリスチンは、多くの患者において末梢神経障害を引き起こす。これら種類の異なる抗がん剤は、薬理機序だけでなく、末梢神経障害の症状が異なることが知られている（図5、6）。

オキサリプラチンは、第三世代の白金製剤であり、DNAのチミンやシトシンに選択的に結合し、架橋を形成することで、DNA合成やRNA合成を阻害する。本邦においてオキサリプラチンは、結腸・直腸癌及び結腸癌のキードラッグであり、膵癌に対しても適応が拡大されている。このオキサリプラチンによる末梢神経障害は、抗がん剤の中でも発現率が高く、急性症状と慢性症状に分けられるのが特徴である<sup>25)</sup>。急性症状は、投与直後から始まる寒冷刺激による手や足、口のまわりの痛みやしびれである。この急性症状の原因として、生体内においてオキサリプラチンから非酵素的に遊離されるシュウ酸が原因であることが報告されている（図7）。慢性症状は、長期間オキサリプラチンを使用することで引き起こされる手足のしびれや痛み、知覚鈍麻である。この慢性症状の原因は、シュウ酸が脱離した後に生成される白金錯体であることが報告されている<sup>26)</sup>。これらオキサリプラチンによる末梢神経障害は、感覚神経細胞体の萎縮や細胞死といった細胞障害によって引き起こされると想定されている<sup>27)</sup>。

パクリタキセルは、西洋イチイから単離された成分を原料としたタキサン系抗がん剤であり、細胞内の微小管に結合し安定化することで、細胞分裂を阻害する。本邦においてパクリタキセルは、乳癌、卵巣癌、胃癌、非小細胞肺癌および食道がんなどに対して幅広く使用されている。このパクリタキセルによる末梢神経障害は、長期間パクリタキセルを使用することで誘発される手足・足先のしびれ、刺すような痛み、感覚が鈍いなどである。このパクリタキセルによる末梢神経障害は、末梢からの刺激を伝導する軸索の変性や消失といった軸索障害によって引き起こされると想定されている<sup>27)</sup>。

ビンクリスチンは、ニチニチソウから単離された成分を原料としたビンカアルカロイド系抗がん剤であり、細胞内の微小管に結合し脱重合を促進することで、細胞分裂を阻害する。本邦においてビンクリスチンは、急性リンパ性白血病のキードラッグであり、他に小児腫瘍や褐色細胞腫などに対して用いられている。ビンクリスチンによる末梢神経障害は、長期間ビンクリスチンを使用することで誘発される指先のピリピリした感じ、感覚が鈍いなどである。このビンクリスチンによる末梢神経障害は、パクリタキセルと同様に軸索障害により引き起こされると想定されている<sup>27)</sup>。

本章では、ラットを用いてオキサリプラチン、パクリタキセルおよびビンクリスチン誘発

性末梢神経障害モデルの作製を行い、行動学的に末梢神経障害の発現について検討した。末梢神経障害の症状として、寒冷刺激に対して過敏となる低温知覚異常、触刺激により痛みが発生する機械的アロディニアを指標とした。さらに、オキサリプラチンに関しては、シュウ酸が急性症状の原因であると報告されていることから、シュウ酸誘発性末梢神経障害モデルを作製し、同様に検討した。

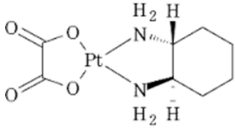
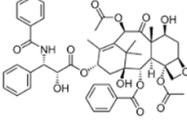
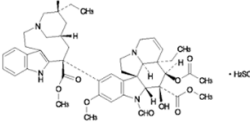
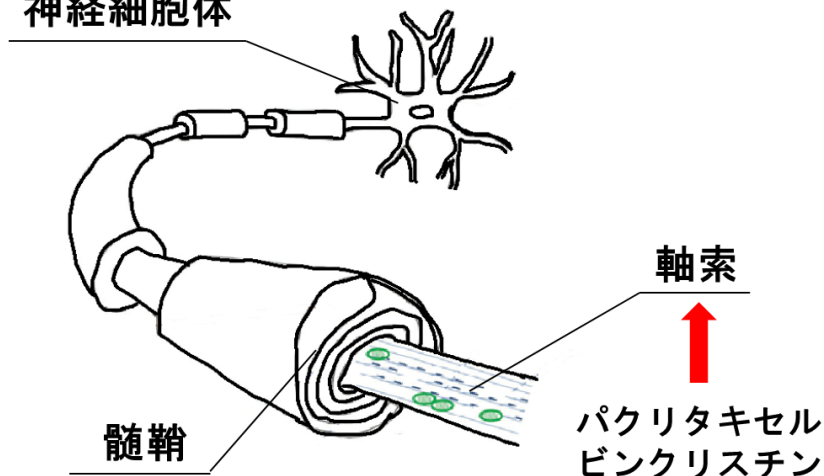
	オキサリプラチン	パクリタキセル	ビンクリスチン
構造式			
薬理機序	DNA架橋	微小管重合の安定化	微小管重合の阻害
臨床症状	急性症状； 低温知覚異常 慢性症状； 機械的アロディニア	機械的アロディニア	機械的アロディニア
発現時期	急性症状； 投与直後～2日以内 慢性症状； 治療後期	治療後期	治療後期

図5 各種抗がん剤の特徴

オキサリプラチン



神経細胞体



軸索

パクリタキセル  
ビンクリスチン

図6 各種抗がん剤による推定障害部位

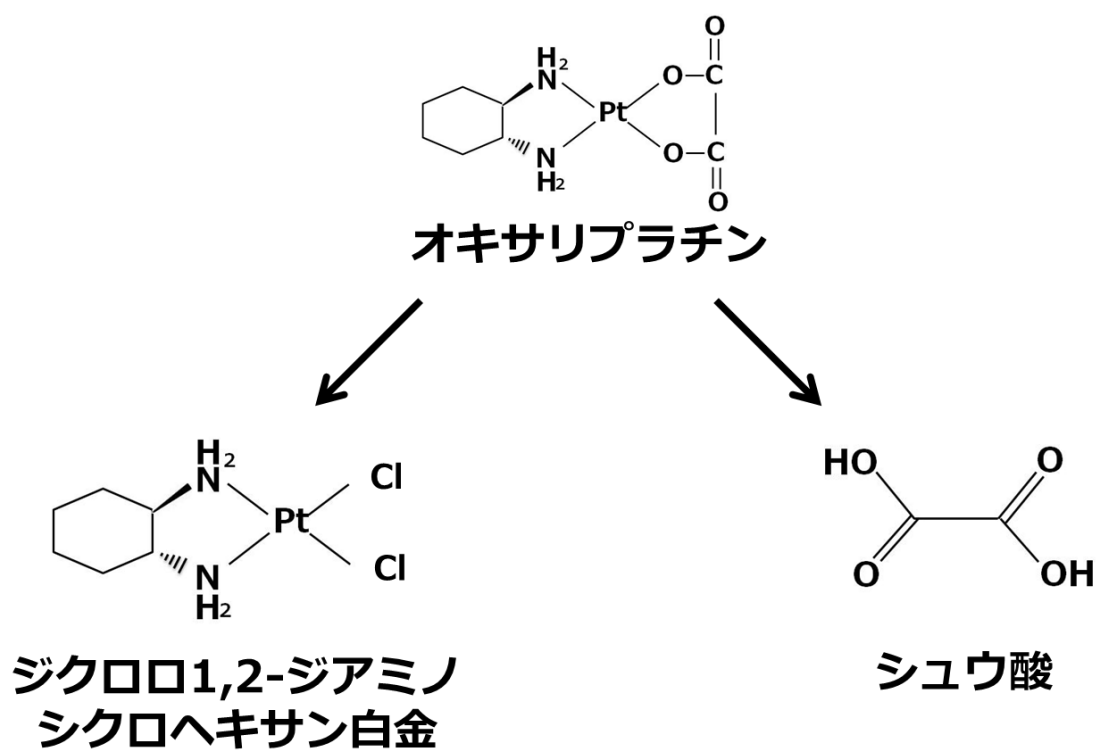


図7 生体内でのオキサリプラチンの代謝

## 第1節 白金系抗がん剤オキサリプラチンによる末梢神経障害の解析

### 1. 実験方法

#### 1.1. 実験材料

##### 1.1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物は、雄性8-9週齢のSprague-Dawley系ラット（体重270-300g；九動株式会社，佐賀）を用いた。飼育は、1ケージ（プラスチック製 30×35×17 cm）に2-4匹ずつ入れ、室温21±2℃、湿度60±2%および12時間の明暗サイクル（明期7：00-19：00）の部屋で行った。水および餌（CE-2；日本クレア株式会社 東京）は自由摂食とした。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験委員会（Experimental animal care and committee）に準じて行った。

##### 1.1.2. オキサリプラチンの調整

エルプラット®点滴静注液（ヤクルト株式会社 東京）を使用した。オキサリプラチンの濃度は、ヒトにおける用量85~130 mg/m<sup>2</sup>およびSakuraiらの論文から1, 4 mg/kgを設定した<sup>26)</sup>。オキサリプラチンの希釈には5%グルコース溶液を使用した。

#### 1.2. 実験手続きならびに実験装置

##### 1.2.1. 投与方法

オキサリプラチン 1, 4 mg/kg および5%グルコース溶液（対照群）を投与容量が1 mL/kgとなるように腹腔内へ投与した。投与間隔は、オキサリプラチンが臨床において隔日投与（1日1回投与+13~20日間の休薬）で用いられていることから、1週間のうち始めの2日間を投与日とし、その後5日間を休薬日とした（図8）。この投与方法を4週間繰り返し行った（1, 2, 8, 9, 15, 16, 22, 23日）。

1サイクル	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
	投与		行動実験				
2サイクル	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14
3サイクル	Day 15	Day 16	Day 17	Day 18	Day 19	Day 20	Day 21
4サイクル	Day 22	Day 23	Day 24				

図8 実験スケジュール



### 1.2.2. von Frey test

von Frey test は、動物の非侵襲性の機械刺激に対する感受性を評価する方法である（図 9 A）。本方法は、神経因性疼痛モデルの神経障害性疼痛を示すモデルにおいて機械的アロディニアを評価することができる<sup>25)</sup>。本研究では、Kawashiri らの方法を参考に行った<sup>29)</sup>。ラットをアイソレーションケージ（ワイヤーメッシュ製 20×13.5×27 cm）に1匹ずつ入れ、30分間の順化を行い、von Frey フィラメント（プラスチック製 North Coast Medical Inc., Gilroy, CA）をマウスの足の裏に6秒間押し当て、逃避行動（足を上げる、足をなめる）が起きる機械刺激に対する閾値（反応閾値）を測定した。機械刺激の強さは、フィラメントの太さや硬さから換算された質量（g）を指標とした。使用したフィラメントは、細い順に2 g、4 g、6 g、8 g、10 g、15 gである。反応閾値は、up-down法により決定した。Up法は、グラムのお小さいフィラメントから始め、順番にグラムのお大きいフィラメントに変えていき、初めて逃避行動が起きるグラム値を記録した。一方で、down法では、グラムのお大きいフィラメントから始め、順番にグラムのお小さいフィラメントに変えていき、逃避行動が起きる最小のグラム値を記録した。これらを1回の試行とし、左右の足にそれぞれ3回ずつ行い、その平均値を反応閾値とした（図）。

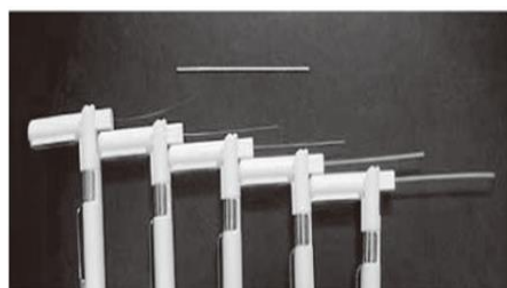
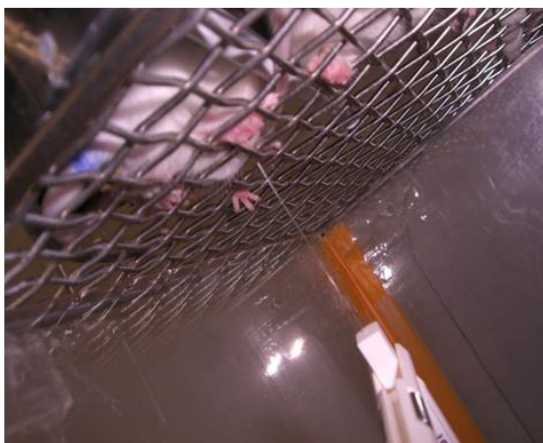
### 1.2.3. Acetone test

Acetone test は、acetone の気化熱を利用した寒冷刺激に対する感受性を評価する方法である（図 9 B）<sup>28)</sup>。本方法により、低温知覚異常を評価することができる。本研究では、Kawashiri らの方法を参考に行った<sup>29)</sup>。von Frey test の後に、15分のインターバルを挟んで行った。針先をつぶした27Gの針を装着したシリンジにアセトンを入れ、ラットの足の裏に5秒間噴霧した。噴霧後40秒間、ラットの冷刺激に対する逃避行動が起きるまでの時間（潜時）および逃避行動が起きた回数（反応回数）を記録した。左右の足にそれぞれ3回ずつ行い、その平均値を求めた（図）。

## 1.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差（SEM）で示した。独立多群間の比較には、二元配置反復定分散分析（two-way repeated measures analysis of variance）後、各群間の比較には Tukey-Kramer post hoc test を使用した。なお、危険率が5%以下である場合を統計学的に有意差ありとした。

A) von Frey test : 機械的アロディニア (mechanical allodynia) の評価



B) Acetone test : 低温知覚異常 (cold hyperalgesia) の評価



図9 実験スケジュール

## 2. 実験結果

### 2.1 オキサリプラチンによる生存率および体重への影響

生存率に対してオキサリプラチン 1, 4 mg/kg は、ラットの生存率に影響を及ぼさなかった (図 10 A)。体重に対してオキサリプラチン 1 mg/kg は、ラットの体重増加を抑制しなかった。一方で、オキサリプラチン 4 mg/kg は、ラットの体重増加を有意に抑制した (図 10 B)。

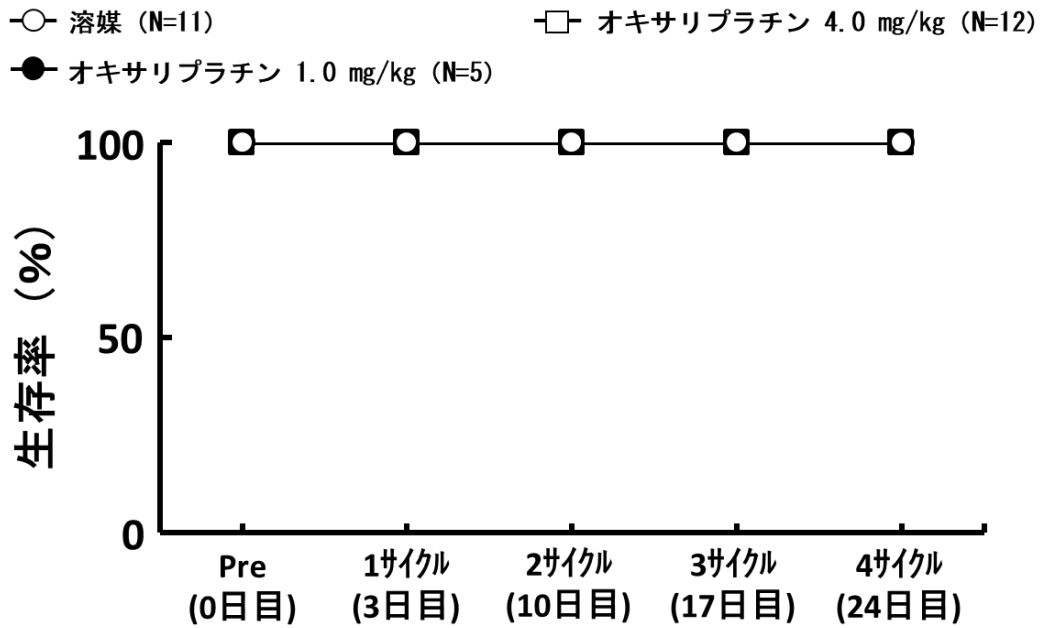
### 2.3 オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現

Acetone test の結果から、オキサリプラチン 1, 4 mg/kg は、1 サイクル目から対照群と比べて潜時を有意に短縮し、反応回数を有意に増加した (図 11)。潜時の短縮および反応回数増加は、2 サイクル目で最大となり、以降も継続した。

### 2.4 オキサリプラチンによる機械的アロディニアの発現

von Frey test の結果から、オキサリプラチン 1, 4 mg/kg は、1 サイクル目で反応閾値に影響しなかった。しかし、2 サイクル目において対照群に比べて反応閾値を有意に低下した (図 12)。この反応閾値の低下は、サイクルを追うごとにより顕著となった。

A) 生存率



B) 体重

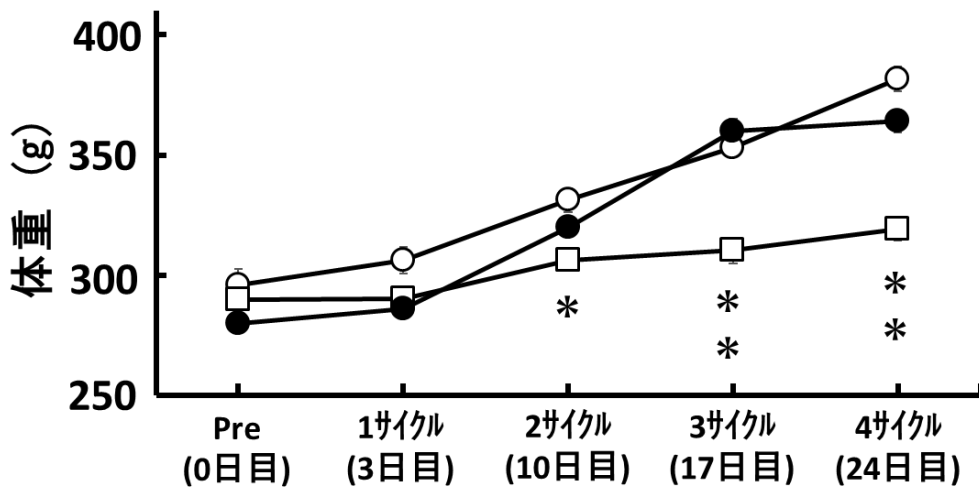
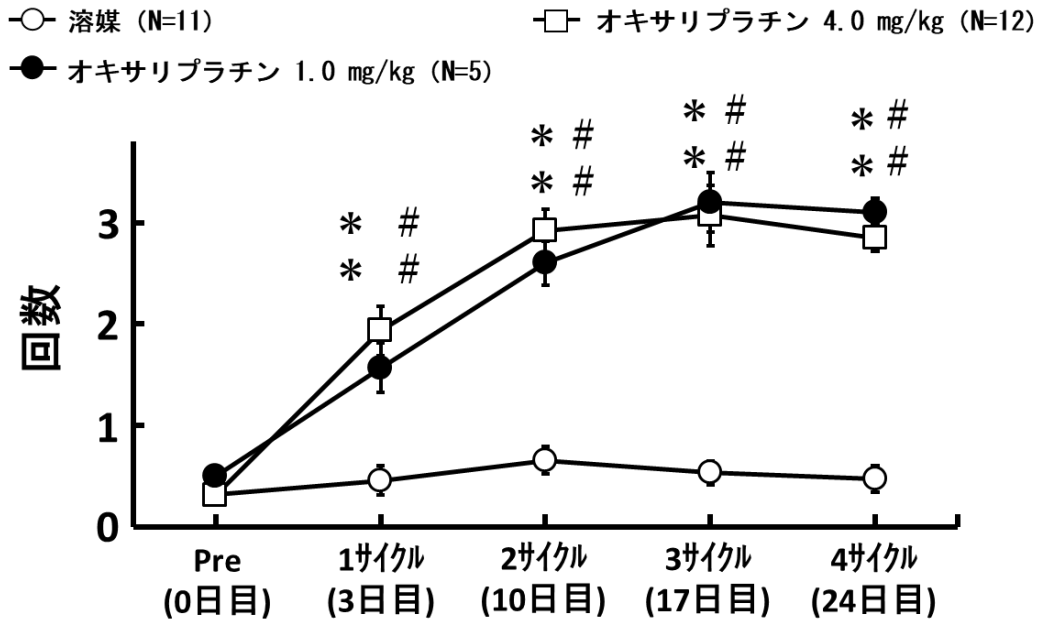


図10 オキサリプラチンによる生存率および体重変化

A) 逃避行動回数



B) 潜時

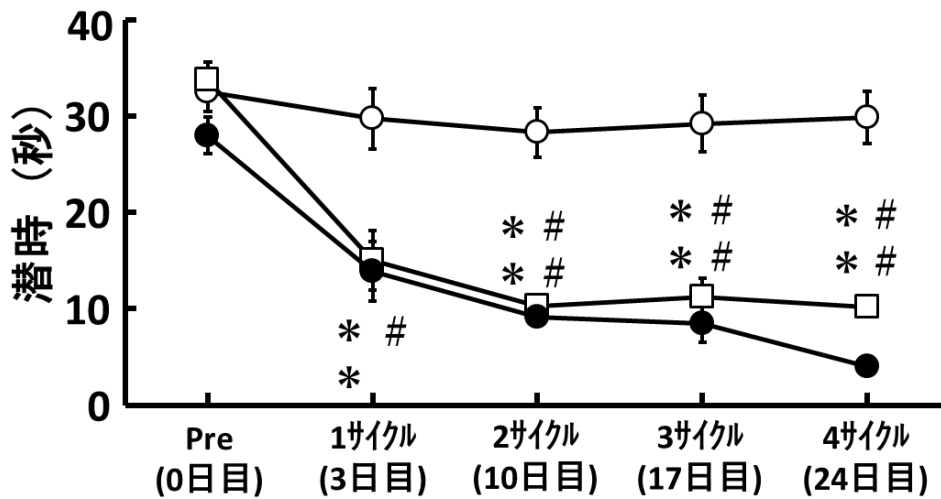


図11 オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現

○ 溶媒 (N=11)                      □ オキサリプラチン 4.0 mg/kg (N=12)  
 ● オキサリプラチン 1.0 mg/kg (N=5)

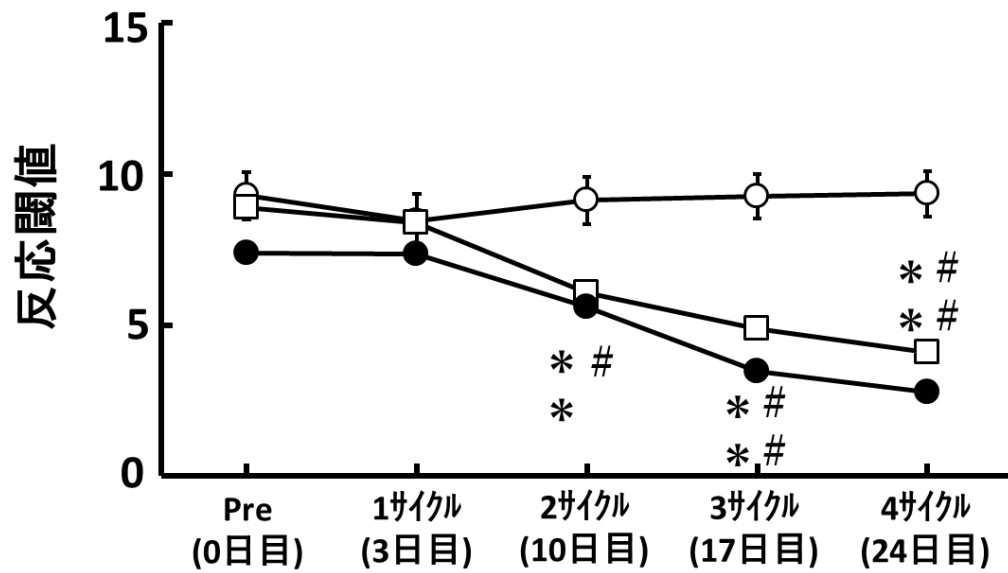


図12 オキサリプラチンによる機械的アロディニアの発現

## 第2節 オキサリプラチンから遊離されるシュウ酸による末梢神経障害の解析

### 1. 実験方法

#### 1.1. 実験材料

##### 1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節1.1.1と同様である。

##### 1.1.2 シュウ酸の調整

シュウ酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社、大阪）を生理食塩水に溶解して使用した。シュウ酸の濃度は、第1章第1節よりオキサリプラチン 4 mg/kg が低温知覚異常および機械的アロディニアを誘発したことから、オキサリプラチン 1 mol からシュウ酸 1 mol が遊離されると想定し、1.6 mg/kg を設定した。

#### 1.2 実験手続きならびに実験装置

##### 1.2.1 投与方法

オキサリプラチンとの比較を行うため、第1章第1節1.2.1と同様である。

##### 1.2.2 von Frey test

第1章第1節1.2.2と同様である。

##### 1.2.3 Acetone test

第1章第1節1.2.3と同様である。

#### 1.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差（SEM）で示した。独立多群間の比較には、二元配置反復定分散分析（two-way repeated measures analysis of variance）後、各群間の比較には Tukey-Kramer post hoc test を使用した。なお、危険率が5%以下である場合を統計学的に有意差ありとした。

## 2. 実験結果

### 2.1 シュウ酸による生存率および体重への影響

生存率および体重に対してシュウ酸 1.6 mg/kg は、影響しなかった (図 13)。

### 2.2 シュウ酸による低温知覚異常の発現

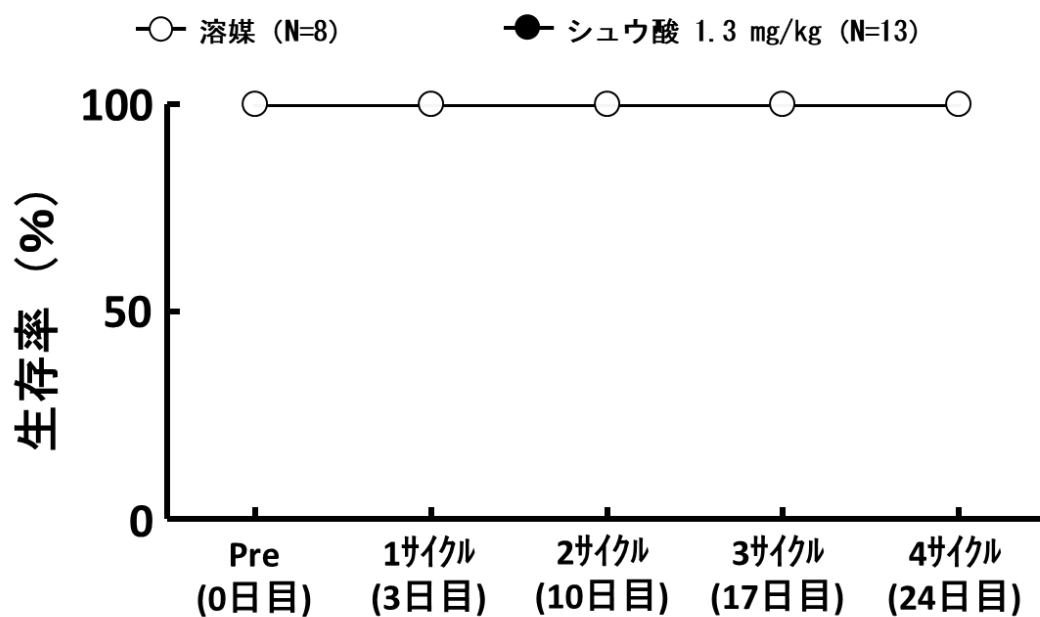
Acetone test の結果から、シュウ酸 1.6 mg/kg は、1 サイクル目から対照群と比べて潜時を有意に短縮し、反応回数を有意に増加した (図 14)。潜時の短縮および反応回数の増加は、2 サイクル目以降も継続した。

### 2.3 シュウ酸による機械的アロディニアの発現

von Frey test の結果から、シュウ酸 1.6 mg/kg は、全てのサイクルで反応閾値に影響しなかった (図 15)。



### A) 生存率



### B) 体重

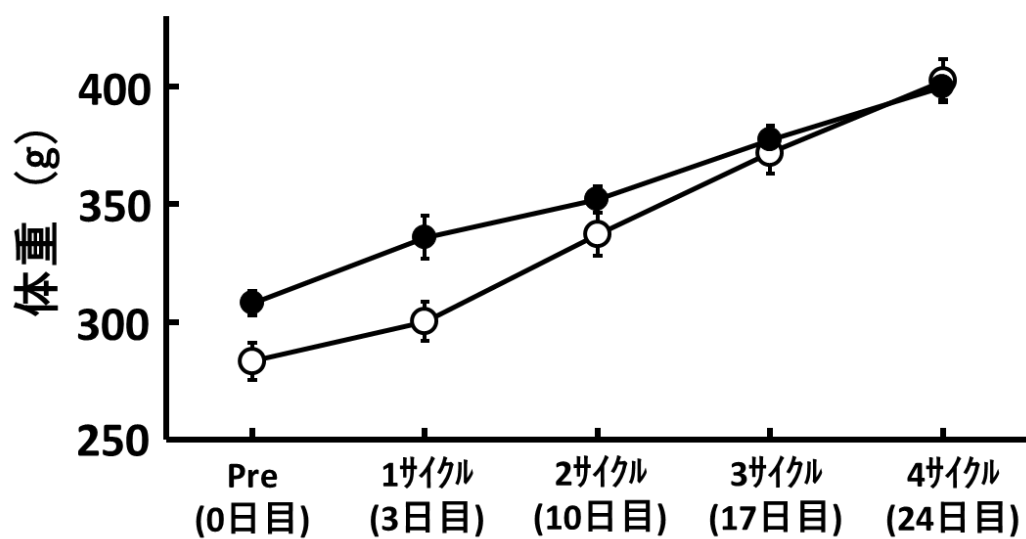
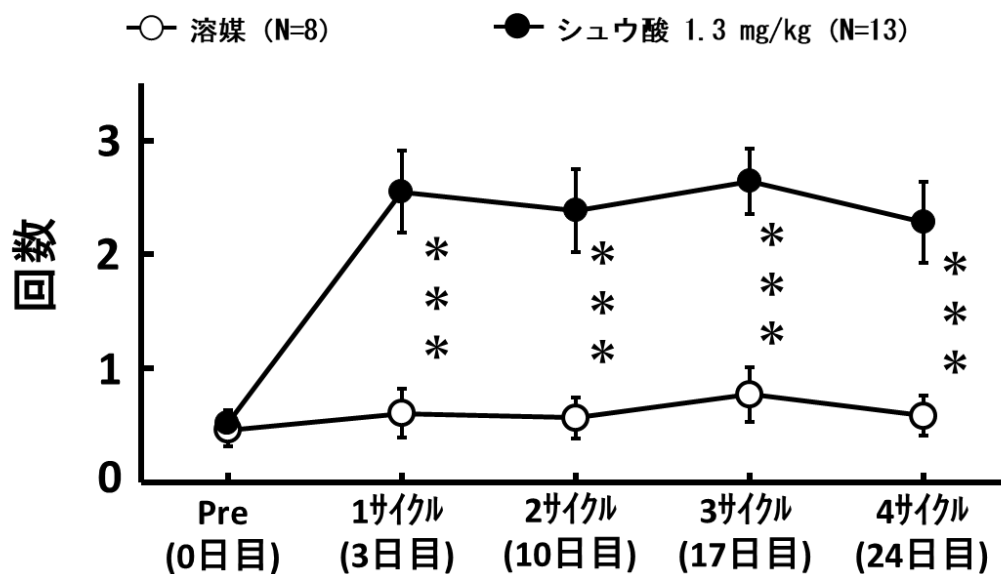


図13 シュウ酸による生存率および体重変化

A) 逃避行動回数



B) 潜時

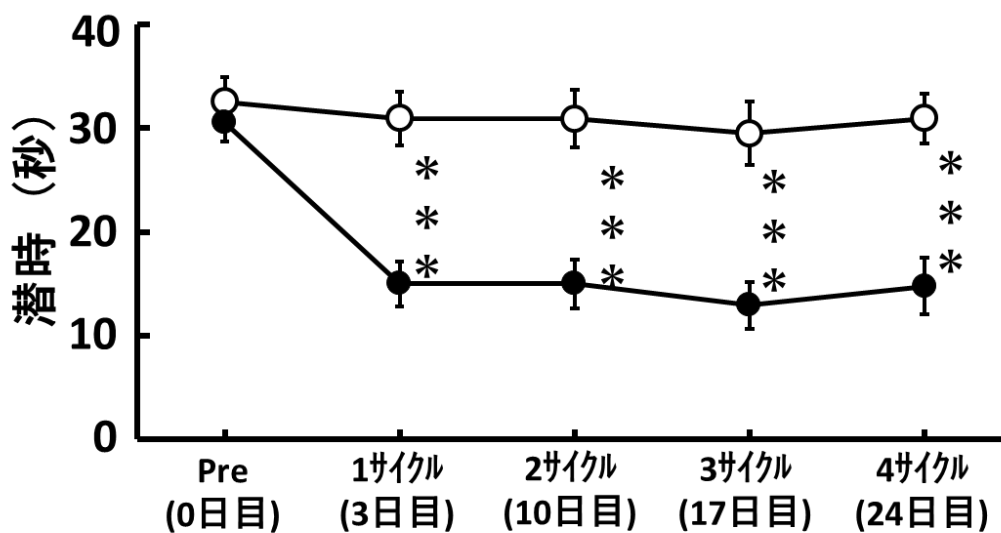


図14 シュウ酸による低温知覚異常の発現

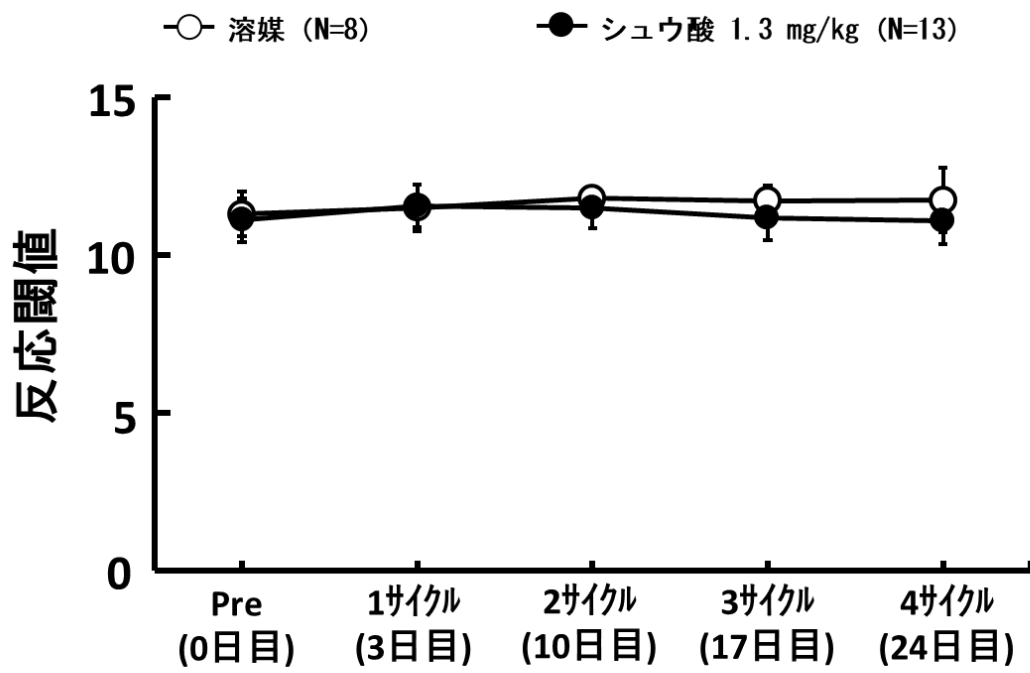


図15 シュウ酸による機械的アロディニアの発現

### 第3節 タキサン系抗がん剤パクリタキセルによる末梢神経障害の解析

#### 1. 実験方法

##### 1.1. 実験材料

##### 1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節1.1.1と同様である。

##### 1.1.2 パクリタキセルの調整

パクリタキセル注「NK」(日本化薬株式会社 東京)を使用した。パクリタキセルの濃度は、ヒトにおける用量(80-210 mg/m<sup>2</sup>) およびKawashiriらの論文から3, 6 mg/kgを設定した<sup>30)</sup>。パクリタキセルの希釈には生理食塩水を使用した。

##### 1.2 実験手続きならびに実験装置

##### 1.2.1 投与方法

パクリタキセル(3, 6 mg/kg) および生理食塩水(対照群)を投与容量が1 mL/kgとなるように腹腔内へ投与した。投与間隔は、パクリタキセルは臨床において隔日投与(1日1回投与+14~21日間休薬)で用いられていることから、第1章第1節1.2.1と同様である。

##### 1.2.2 von Frey test

第1章第1節1.2.2と同様である。

##### 1.2.3 Acetone test

第1章第1節1.2.3と同様である。

##### 1.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差(SEM)で示した。独立多群間の比較には、二元配置反復定分散分析(two-way repeated measures analysis of variance)後、各群間の比較にはTukey-Kramer post hoc testを使用した。なお、危険率が5%以下である場合を統計学的に有意差ありとした。

## 2. 実験結果

### 2.1 パクリタキセルによる生存率および体重への影響

生存率に対してパクリタキセル 3, 6 mg/kg は、生存率に影響しなかった。一方で、パクリタキセル 16 mg/kg は、1 サイクル目から生存率を 0% まで低下させた (図 16 A)。体重に対してパクリタキセル 3 mg/kg は、影響しなかった。一方で、パクリタキセル 6 mg/kg は、体重増加を有意に抑制した (図 16 B)。

### 2.2 パクリタキセルによる低温知覚異常の発現

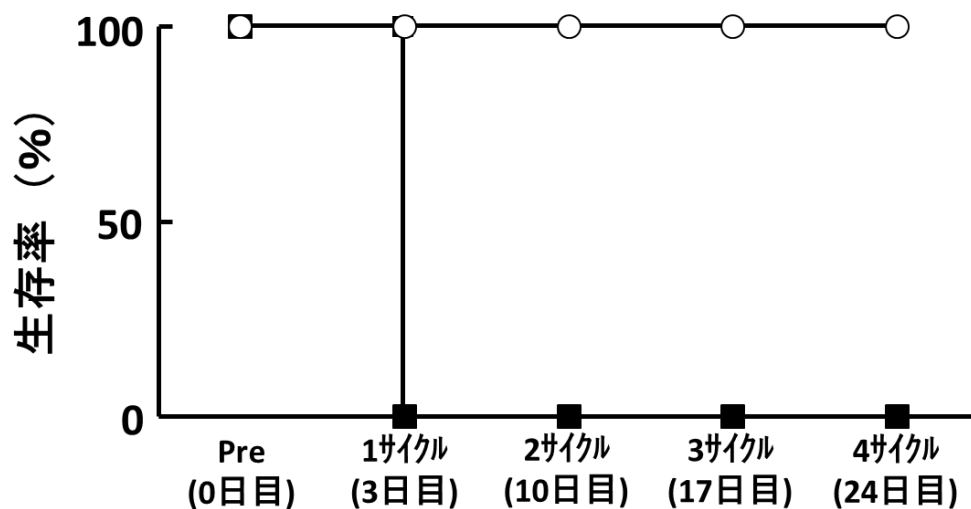
Acetone test の結果から、パクリタキセル 3, 6 mg/kg は、潜時および反応回数に影響しなかった (図 17)。

### 2.3 パクリタキセルによる機械的アロディニアの発現

von Frey test の結果から、パクリタキセル 3 mg/kg は、反応閾値に影響しなかった。一方でパクリタキセル 6 mg/kg は、3 サイクル目から反応閾値を有意に低下した (図 18)。さらに、この反応閾値の低下は、4 サイクル目でより顕著となった。

A) 生存率

- 溶媒 (N=11)
- パクリタキセル 3.0 mg/kg (N=5)
- パクリタキセル 6.0 mg/kg (N=12)
- パクリタキセル 16.0 mg/kg (N=12)



B) 体重

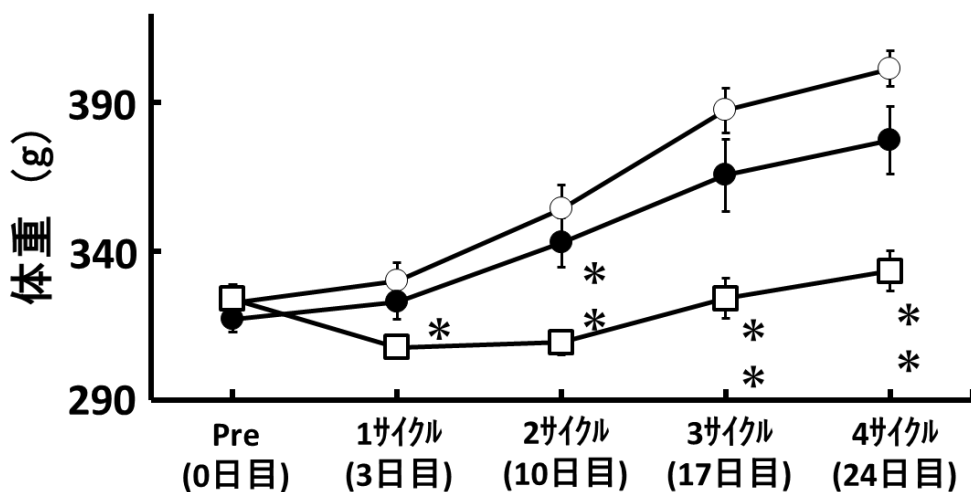


図16 パクリタキセルによる生存率および体重変化



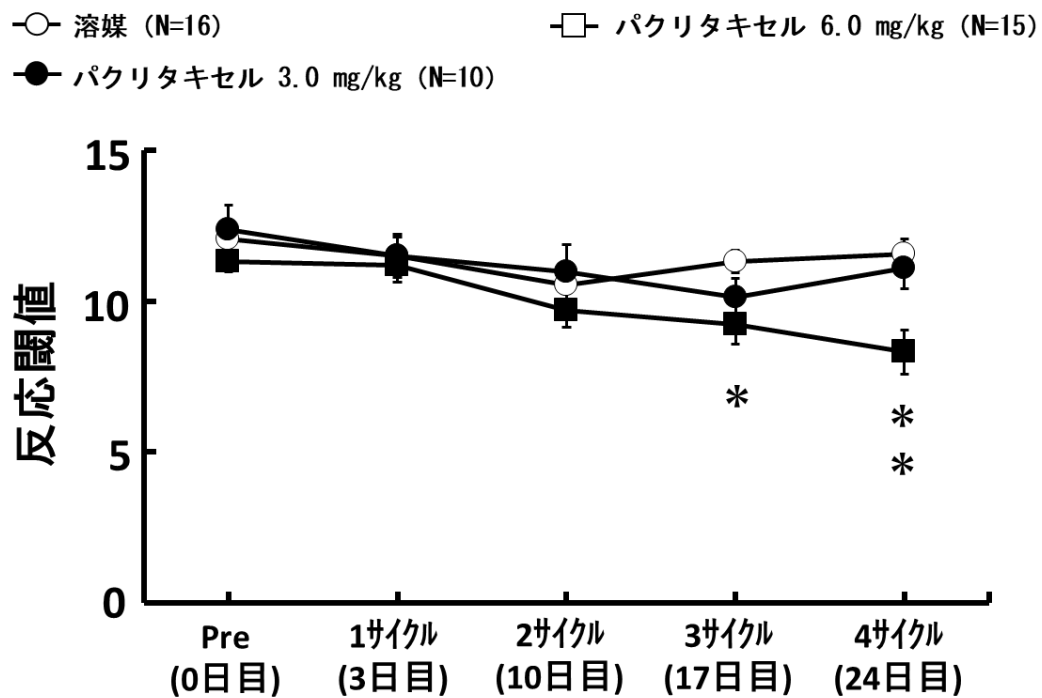


図18 パクリタキセルによる機械的アロディニアの発現



## 第4節 ビンカアルカロイド系抗がん剤ビンクリスチンによる末梢神経障害の解析

### 1. 実験方法

#### 1.1. 実験材料

##### 1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節1.1.1と同様である。

##### 1.1.2 ビンクリスチンの調整

ビンクリスチン硫酸塩(和光純薬工業株式会社 大阪)を生理食塩水に溶解して使用した。ビンクリスチンの濃度は、ヒトにおける用量(0.02~0.05 mg/kg)およびCaprioliらの論文から0.1, 0.2, 0.5 mg/kgを設定した<sup>31)</sup>。ビンクリスチンの希釈には生理食塩水を使用した。

#### 1.2 実験手続きならびに実験装置

##### 1.2.1 投与方法

ビンクリスチン(0.1, 0.2, 0.5 mg/kg)および生理食塩水(対照群)を投与容量が1 mL/kgとなるように腹腔内へ投与した。投与間隔は、パクリタキセルは臨床において週1回投与で用いられていることから、第1章第1節1.2.1と同様のスケジュールで投与した(1, 2, 8, 9, 15, 16, 22, 23日)。

##### 1.2.2 von Frey test

第1章第1節1.2.2と同様である。

##### 1.2.3 Acetone test

第1章第1節1.2.3と同様である。

#### 1.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差(SEM)で示した。独立多群間の比較には、二元配置反復定分散分析(two-way repeated measures analysis of variance)後、各群間の比較にはTukey-Kramer post hoc testを使用した。なお、危険率が5%以下である場合を統計学的に有意差ありとした。

## 2. 実験結果

### 2.1 ビンクリスチンによる生存率および体重への影響

生存率に対してビンクリスチン 0.1, 0.2 mg/kg は、影響しなかった。一方で、ビンクリスチン 0.5 mg/kg は、1 サイクル目から生存率を 25%、2 サイクル目には 0% に低下させた (図 19 A)。体重に対してビンクリスチン 0.1, 0.2 mg/kg は、体重増加を有意に抑制した (図 19 B)。

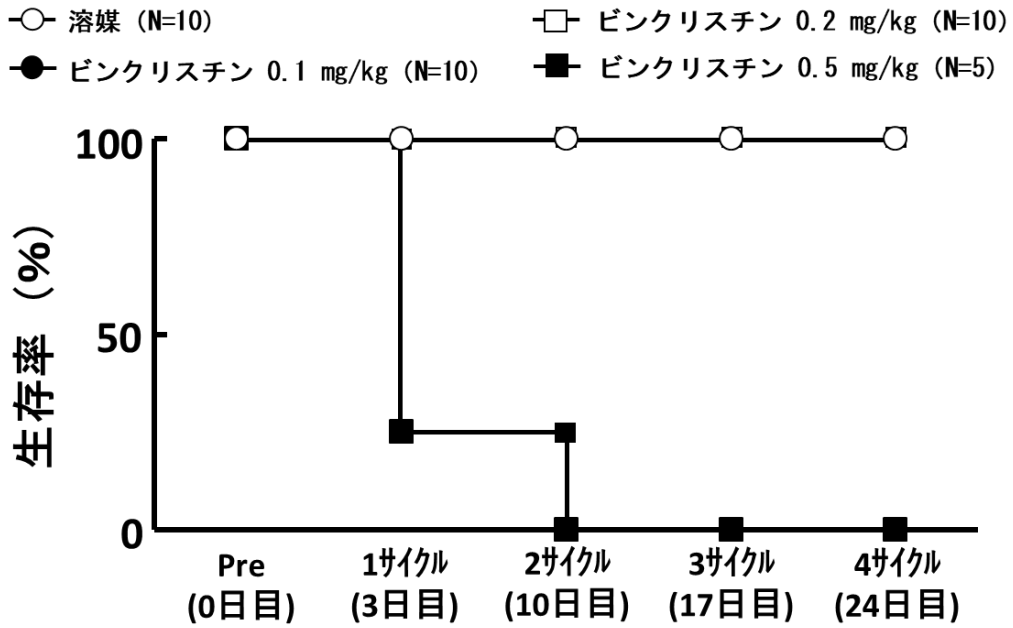
### 2.2 ビンクリスチンによる低温知覚異常の発現

Acetone test の結果から、ビンクリスチン 0.1, 0.2 mg/kg は、全てのサイクルで潜時および反応回数に影響しなかった (図 20)。

### 2.3 ビンクリスチンによる疼痛の発現

von Frey test の結果から、ビンクリスチン 0.1 mg/kg は、全てのサイクルで反応閾値に影響しなかった。一方でビンクリスチン 0.2 mg/kg は、2 サイクル目から反応閾値を有意に低下した (図 21)。さらに、この反応閾値の低下は、4 サイクル目でより顕著となった。

A) 生存率



B) 体重

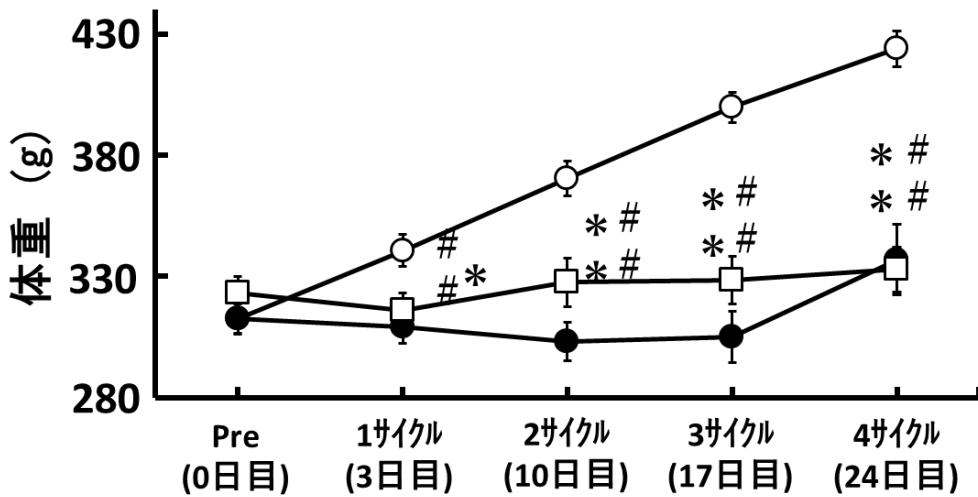
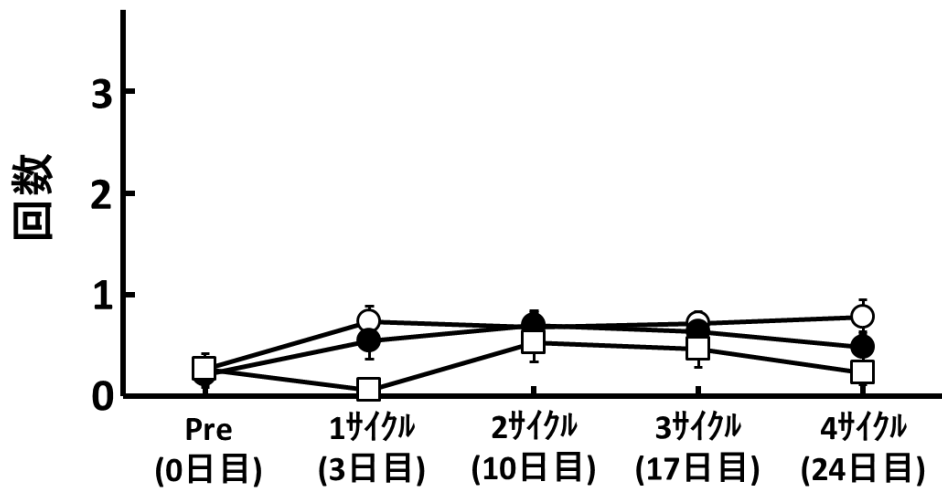


図19 ビンクリスチンによる生存率および体重変化

### A) 逃避行動回数

- 溶媒 (N=10)
- ビンクリスチン 0.2 mg/kg (N=10)
- ビンクリスチン 0.1 mg/kg (N=10)



### B) 潜時

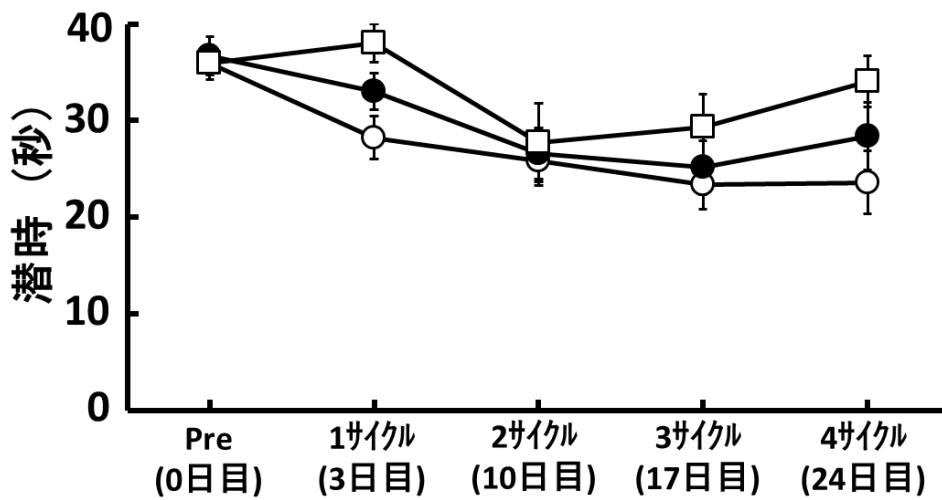


図20 ビンクリスチンによる低温知覚異常の発現



## 第5節 考察

本章では、オキサリプラチン、シュウ酸、パクリタキセルならびにビンクリスチンによる末梢神経障害モデルを作製し、症状の程度および発現時期について検討した。

### 第1節 白金系抗がん剤オキサリプラチンによる末梢神経障害の解析

エルプラット®点滴静注液 インタビューフォーム (IF) の毒性試験から、オキサリプラチンの単回致死量は、18 mg/kg である<sup>32)</sup>。本検討において、オキサリプラチン 1 mg/kg は、生存率および体重に影響しなかった。一方で、オキサリプラチン 4 mg/kg は、体重増加を抑制したが、生存率に影響しなかった。本検討では致死量以下であるため、毒性試験の結果と一致していた。よって、オキサリプラチン 1, 4 mg/kg は、投与スケジュールを完遂することができる妥当な濃度であると考えられる。

オキサリプラチンは、臨床において投与直後から 2 日以内に寒冷刺激による手足の痛みやしびれといった低温知覚異常（急性症状）を引き起こす。本検討においてオキサリプラチン 1, 4 mg/kg は、初回投与翌日である 1 サイクル目から低温知覚異常を引き起こした。さらに、低温知覚異常は、毎サイクルの投与翌日においても出現した。先行研究においても、同様にオキサリプラチンがラットにおいて低温知覚異常を引き起こすことが報告されている<sup>33)</sup>。よって、本モデルは、臨床におけるオキサリプラチン誘発性急性症状を反映する適切なモデルであると考えられる。

オキサリプラチンは、累積投与量の増加と共に手足の痛みやしびれといった慢性症状を引き起こす。本検討においてオキサリプラチン 1, 4 mg/kg は、累積投与量が増加した 2 サイクル目から機械的アロディニアを引き起こした。さらに、機械的アロディニアは、累積投与量が増加すると伴に悪化した。先行研究においても、同様にオキサリプラチンがラットにおいて機械的アロディニアを引き起こすことが報告されている<sup>34)</sup>。よって、本モデルは、臨床におけるオキサリプラチン誘発性慢性症状を反映する適切なモデルであると考えられる。

本検討で作製したオキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットは、臨床における急性症状および慢性症状を反映したモデルであった。よって、オキサリプラチンによる末梢神経障害の発現機序を解明するために適切なモデルであると考えられる。

### 第2節 オキサリプラチンから遊離されるシュウ酸による末梢神経障害の解析

シュウ酸は、生体内でシュウ酸カルシウムとなることで針状結晶を形成し、細胞を障害する。しかしながら、マウス腹腔内投与の LD<sub>50</sub> は、155 mg/kg の高用量が必要である<sup>35)</sup>。本検討において、シュウ酸 1.6 mg/kg は、生存率および体重に影響しなかった。このことから、シュウ酸が低用量であったため、毒性が現れなかったと考えられる。よって、シュウ酸 1.6

mg/kg は、投与スケジュールを完遂することができる妥当な濃度であると考えられる。

オキサリプラチンは、生体内で Cl<sup>-</sup>存在下、非酵素的にシュウ酸と白金錯体に代謝される。このシュウ酸は低温知覚異常の原因物質であると想定されている<sup>26)</sup>。本検討において、シュウ酸は、初回投与翌日である 1 サイクル目から低温知覚異常を引き起こした。さらに、低温知覚異常は、毎投与翌日で発現していた。一方で、機械的アロディニアを引き起こさなかった。先行研究においても、同様にシュウ酸がラットにおいて低温知覚異常を引き起こすことが報告されている<sup>26)</sup>。そのため本結果は、シュウ酸がオキサリプラチンによる低温知覚異常の原因物質であることを支持する (図 22)。また本モデルは、臨床におけるオキサリプラチン誘発性急性症状のみを反映する適切なモデルであると考えられる。

本検討で作製したシュウ酸誘発性末梢神経障害ラットは、オキサリプラチンによる急性症状を特異的に反映したモデルである。よって、オキサリプラチンによる急性症状の発現機序を解明するために適切なモデルであると考えられる。

### 第 3 節 タキサン系抗がん剤パクリタキセルによる末梢神経障害の解析

タキソール®注射液 IF の毒性試験から、パクリタキセルの単回致死量は、85 mg/kg である<sup>36)</sup>。本検討において、パクリタキセル 3 mg/kg は、生存率および体重に影響しなかった。一方で、パクリタキセル 6 mg/kg は、体重増加を抑制したが、生存率に影響しなかった。パクリタキセル 16 mg/kg は、1 サイクル目から生存率を 0% に低下させた。本検討においてパクリタキセル 16 mg/kg は、致死量以下であるにも関わらず、毒性試験の知見と異なった。結果が異なった理由として、ラットの系統差もしくは実験環境の違いが関与していると考えられる。よって、パクリタキセル 3, 6 mg/kg は、投与スケジュールを完遂することができる妥当な濃度であると考えられる。

パクリタキセルは、累積投与量の増加に伴い手足の痛みやしびれを引き起こす。また、パクリタキセルによる低温知覚異常は、発現報告が少なく、患者に対する注意事項への記載がなされていない<sup>37)</sup>。基礎研究において、パクリタキセルは、低温知覚異常と機械的アロディニアを引き起こすことが報告されている<sup>30)39)</sup>。一方で、低温知覚異常を引き起こさないといった報告もある<sup>39)</sup>。これらのことから、パクリタキセルによる低温知覚異常は、臨床における出現頻度の少ない症状であり、動物モデルにおいても出現する場合とそうでない場合が存在している。オキサリプラチンの例から、低温知覚異常の発現にはシュウ酸の関与が考えられる。パクリタキセルは、生体内において肝代謝を受けることで、水酸化、加水分解、エピ化および脱アセチル化を受けるが、シュウ酸が発生するといった報告はない<sup>36)</sup>。そのため、パクリタキセルは低温知覚異常を引き起こしにくい抗がん剤であると考えられる。本検討においてパクリタキセル 3, 6 mg/kg は、低温知覚異常を引き起こさなかった。また、パクリタキセル 3 mg/kg は、機械的アロディニアを引き起こさなかった。一方で、パクリタキセル 6 mg/kg は、累積投与量が増加した 3 サイクル目から機械的アロディニアを引き起こした。そのため、本パクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットは、機械的アロディニア

のみを特徴としたモデルである。臨床におけるパクリタキセルによる痛みを反映していることから、パクリタキセル誘発性末梢神経障害の発現機序を解明するために適切なモデルであると考えられるとされる。

#### 第4節 ビンカアルカロイド系抗がん剤ビンクリスチンによる末梢神経障害の解析

オンコビン®注射用 IF の毒性試験から、ビンクリスチンの単回半致死量は、1.9 mg/kg である（オンコビン®注射用 IF）。本検討において、ビンクリスチン 0.1, 0.2 mg/kg は、体重増加を抑制したが、生存率に影響しなかった。一方で、ビンクリスチン 0.5 mg/kg は、1 サイクル目から生存率を 50% 以下まで低下した。本検討においてビンクリスチン 0.5 mg/kg は、半致死量以下であるにも関わらず、毒性試験の知見と異なった。結果が異なった理由として、ラットの系統差もしくは実験環境による違いが関与していると考えられる。よって、ビンクリスチン 0.1, 0.2 mg/kg は、投与スケジュールを完遂することができる適切な濃度であると考えられる。

ビンクリスチンは、累積投与量の増加と共に手足の痛みやしびれを引き起こす。またビンクリスチンによる低温知覚異常は、報告数が少なく、患者に対する注意事項への記載がなされていない<sup>40)</sup>。基礎研究において、ビンクリスチンは、低温知覚異常と機械的アロディニアを引き起こすことが報告されている<sup>41)42)</sup>。一方で、低温知覚異常を引き起こさないといった報告もある<sup>43)</sup>。これらのことから、ビンクリスチンによる低温知覚異常は、臨床における出現頻度の少ない症状であり、動物モデルにおいても出現する場合とそうでない場合が存在している。オキサリプラチンの例から、低温知覚異常の発現にはシュウ酸の遊離が考えられる。ビンクリスチンは、生体内においてほとんど肝代謝を受けることなく、胆汁中に排泄され、シュウ酸が発生するといった報告はない<sup>40)</sup>。そのため、ビンクリスチンは低温知覚異常を引き起こしにくい抗がん剤であると考えられる。本検討においてビンクリスチン 0.1, 0.2 mg/kg は、低温知覚異常を引き起こさなかった。また、ビンクリスチン 0.1 mg/kg は、機械的アロディニアを引き起こさなかった。一方で、ビンクリスチン 0.2 mg/kg は、累積投与量が増加した 2 サイクル目から機械的アロディニアを引き起こした。そのため、本ビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットは、機械的アロディニアのみを特徴としたモデルである。臨床におけるビンクリスチンによる痛みを反映していることから、ビンクリスチン誘発性末梢神経障害の発現機序を解明するために適切なモデルであると考えられる。

各種抗がん剤による末梢神経障害を比較したところ、低温知覚異常は、オキサリプラチンに特異的な症状であることが明らかとなった。またシュウ酸、パクリタキセルおよびビンクリスチンの結果から、低温知覚異常の発現にはシュウ酸の発生が必要であると考えられる。機械的アロディニアは、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において出現した。さらにオキサリプラチンによる機械的アロディニアは、パクリタキセルやビンクリスチンにおける症状よりもひどく、発現時期も早かった。こ



のことから、オキサリプラチンによる末梢神経障害が、抗がん剤の中でも最も重症であることが考えられる。

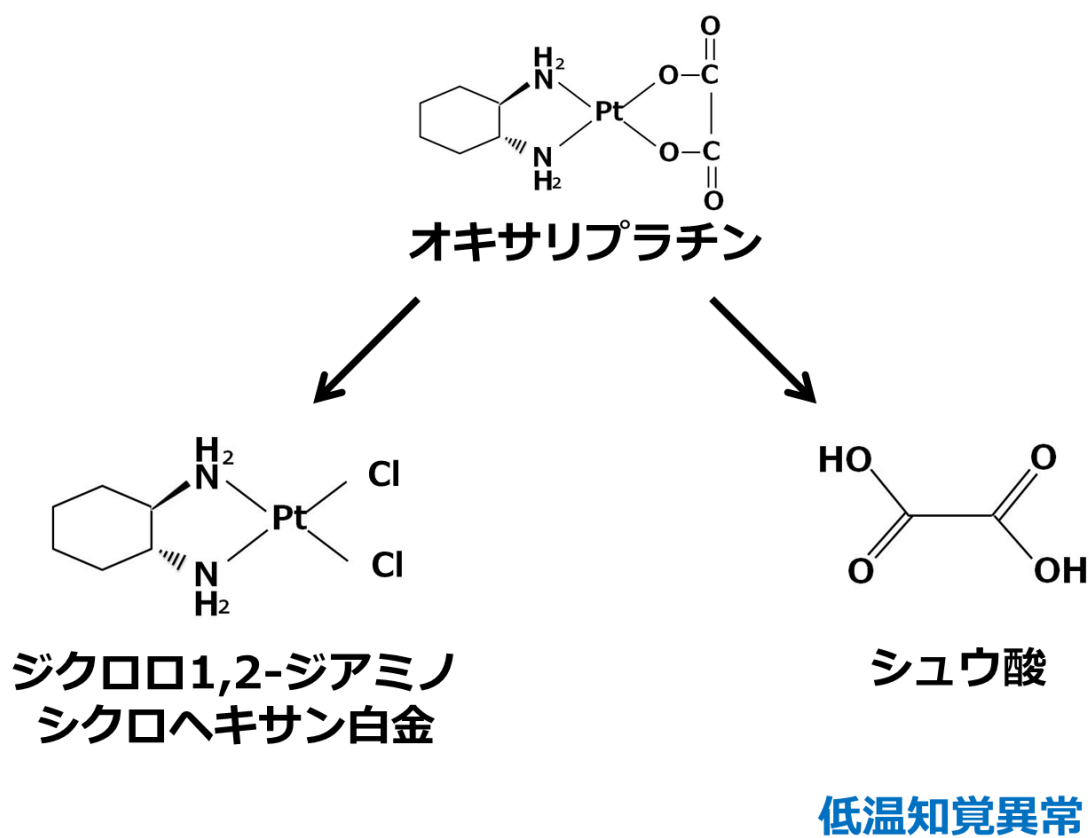


図22 生体内でのオキサリプラチンの代謝

## 第6節 小括

本章では、ラットを用いてオキサリプラチン、シュウ酸、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の作製を行い、行動学的に症状の程度および発現時期について検討した。

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。これらの症状は、臨床における症状および発現時期と一致していた。そのため、オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットは、臨床での症状を反映したモデルである。

シュウ酸は、非酵素的にオキサリプラチンから遊離されることから、低温知覚異常の原因物質であると考えられている。このシュウ酸は、1サイクル目から低温知覚異常を引き起こし、機械的アロディニアを引き起こさなかった。そのため、シュウ酸誘発性末梢神経障害ラットは、オキサリプラチンによる低温知覚異常のみを反映したモデルである。

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。これは、臨床における症状および発現時期と類似していた。そのため、パクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットは、臨床での症状を反映したモデルである。

ビンクリスチンは、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。これは、臨床における症状および発現時期と類似していた。そのため、ビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットは、臨床での症状を反映したモデルである。

本章において、各種抗がん剤による末梢神経障害を解析するための適切なモデルを作製できたと考えられる（表4）。

表4 各種抗がん剤による末梢神経障害の特徴

抗がん剤	症状	1サイクル	2サイクル	3サイクル	4サイクル
オキサリプラチン	低温知覚異常	+	++	++	++
	機械的アロディニア	—	+	++	+++
シュウ酸	低温知覚異常	+	++	++	++
	機械的アロディニア	—	—	—	—
パクリタキセル	低温知覚異常	—	—	—	—
	機械的アロディニア	—	—	+	++
ビンクリスチン	低温知覚異常	—	—	—	—
	機械的アロディニア	—	+	++	++

## 第 2 章 抗がん剤による末梢神経障害モデルラットにおける遺伝性神経障害 Charcot-Marie-Tooth 病原因遺伝子の発現量解析

### 緒言

Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) は、1886 年に Charcot, Marie, Tooth の 3 人によって報告された最も頻度の高い遺伝子異常による末梢神経障害の総称である。CMT の症状は、末梢神経の障害によって引き起こされる四肢遠位部優位の筋力低下や感覚異常である。さらに、多くの患者において疼痛が発現することが報告されている<sup>44)</sup>。CMT の発症に関与する遺伝子は、現在 40 以上が報告されており、末梢神経障害の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ている (図 23、表 5)<sup>45)46)</sup>。これらのことから、CMT 遺伝子は髄鞘あるいは軸索障害により疼痛を発現する末梢神経障害を引き起こす要因であることが予想される。

髄鞘障害性 CMT 原因遺伝子は、peripheral myelin protein 22 (Pmp22)、myelin protein zero (Mpz)、gap junction protein beta1 (Gjb1)、periaxin (PRX)、lipopolysaccharide induced TNF factor (Litaf) および N-myc downstream regulated 1 (Ndr1) の出現頻度が高い<sup>47)48)</sup>。Pmp22 および Mpz 遺伝子は、髄鞘を構成する主要タンパク質をコードする。Gjb1 および PRX 遺伝子は、髄鞘と軸索を接着させるタンパク質をコードする。Litaf 遺伝子は、髄鞘の構成タンパク質の代謝を調節するタンパク質をコードする。一方で、軸索障害性 CMT 原因遺伝子は、mitofusin 2 (Mfn2)、kinesin family member 1B (Kif1b)、ganglioside induced differentiation associated protein 1 (Gdap1)、neurofilament light (Nefl)、glycyl-tRNA synthetase (Gars) および dynamin 2 (Dnm2) の出現頻度が高い<sup>47)48)</sup>。Mfn2、Kif1b および Gdap1 遺伝子は、ミトコンドリア分布を調節するタンパク質をコードする。Nefl 遺伝子は、軸索の構成タンパク質をコードする。Gars 遺伝子は、tRNA 合成を助ける酵素をコードする。Dnm2 遺伝子は、細胞分裂や融合を調節するタンパク質をコードする。

CMT 患者においてビンクリスチンの末梢神経障害が重篤化することが報告されている<sup>49)</sup>。また、パクリタキセルによる末梢神経障害も同様に悪化することが報告されている<sup>50)</sup>。ヒト由来人工多能性幹細胞 (iPS) から分化させた神経細胞を用いた毒性試験において、ビンクリスチンおよびパクリタキセルは、重度の神経障害を引き起こすことが報告されている<sup>51)</sup>。さらに、パクリタキセルによる末梢神経障害の重症度に CMT 原因遺伝子の多型が関連していることが明らかとなっている<sup>52)</sup>。そのため、末梢神経障害を副作用に持つ抗がん剤は、CMT 患者に対してハイリスク薬となっている<sup>53)</sup>。一方で、各種抗がん剤が CMT 原因遺伝子の発現量に影響するかは明らかとなっていない。

本章では、各種抗がん剤による末梢神経障害の発現機序に CMT 原因遺伝子の発現量変化が関与していると仮説を立てた。そこで、各種抗がん剤末梢神経障害ラットにおける CMT 原

因遺伝子の発現量を調べるために、第 1 章で作製した各種抗がん剤誘発性末梢神経障害ラットの脊髄サンプルを用いて、real-time PCR 法により、図で示した遺伝子発現量を解析した。

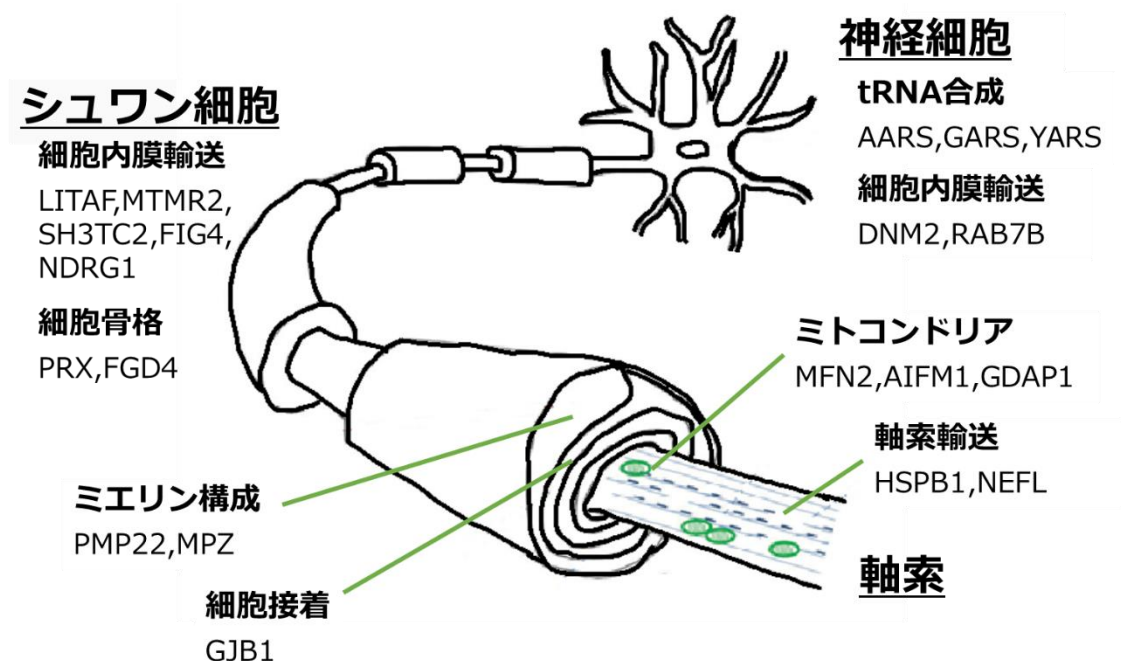


図23 CMT原因遺伝子の分布

表5 CMT原因遺伝子の分類

Gene	Description	Function
<b>髄鞘関連遺伝子</b>		
<b>PMP22</b>	peripheral myelin protein 22	髄鞘の構造
<b>MPZ</b>	myelin protein zero	髄鞘の構造
<b>LITAF</b>	lipopolysaccharide induced TNF factor	細胞内膜輸送
<b>GJB1</b>	gap junction protein beta 1	細胞接着
<b>PRX</b>	periaxin	細胞骨格
<b>NDRG1</b>	N-myc downstream regulated 1	細胞内膜輸送
<b>軸索関連遺伝子</b>		
<b>MFN2</b>	mitofusin 2	ミトコンドリア機能
<b>KIF1β</b>	kinesin family member 1B	ミトコンドリア機能
<b>GDAP1</b>	ganglioside induced differentiation associated protein 1	ミトコンドリア機能
<b>NEFL</b>	neurofilament, light polypeptide	軸索輸送
<b>GARS</b>	glycyl-tRNA synthetase	tRNA合成
<b>DNM2</b>	dynamamin 2	軸索輸送

## 第 1 節 オキサリプラチン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

### 1. 実験方法

#### 1.1. 実験動物ならびにサンプル作製

##### 1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

第 1 章第 1 節 1.1.1. と同様である。

##### 1.1.2. サンプル作製

第 1 章第 1 節で作製したオキサリプラチンによる末梢神経障害ラットを 3 日目ならびに 24 日目の行動実験終了後に断頭により安楽死させ、脊髄の第 4～第 5 腰神経 (L4～L5) を素早く摘出した。Total RNA は、摘出した脊髄から 100 mg あたり 1 mL の TRI Reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH) を用いて抽出し、RNeasy Mini plus kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製した。cDNA は、1  $\mu$ g の total RNA から ReverTra ACE qPCR RT Master Mix (東洋紡株式会社 大阪) を用いて合成した。

#### 1.2. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

プライマーは、Primer3plus を用いて、エクソン-エクソン間が増幅部位となるように設計し、BLAST を用いて特異性を確認し作製した (表 6)。定量 PCR は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡株式会社 大阪) ならびに LightCycler 96 Instrument (Roche Ltd., Basel, Switzerland) を用いて行った。各遺伝子の発現量は、内標準である Gapdh により規準化し、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて対照群との比として表した。

#### 1.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差 (SEM) で示した。独立多群間の比較には、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance) 後、各群間の比較には Tukey-Kramer post hoc test を使用した。なお、危険率が 5%以下である場合を統計学的に有意差ありとした。

**表6 プライマー一覧**

Gene	Sense	Antisense
Pmp22	tggtctctgccagctcttcac	gttgttgacatgccactcactg
Mpz	tcaaaaaccacccggacatag	agaagagcaacagcagcaacag
Litaf	aagggcatgaatccaccttc	ctgctgcacataaacctctg
Gjb1	agggtgtgggcaattctttc	actgacatgactcccaaagtgg
Prx	tacagcagaaggaggagaggaaac	ctccacgataatctccaccaac
Ndrp1	aatgcctggaaccacactg	cattccaccacagcatccac
Mfn2	gacacatggctgaggtgaatg	tgggtccagtctgtattcctg
Kif1b	agtcccgcagacatcaactatg	cctcattgataacagcgttgc
Gdap1	ggacgcactccttcagctct	taaaccaaggctcattgtgctc
Nefl	gacctctcaatgtcaagatgg	tgagagtagccgctgggtatg
Gars	tctcctgataaactccgcttcc	ggtcagcacatccaacaatctc
Dnm2	acagatcgaactggcttgtagc	tgttctcttgctccatcctc
Gapdh	aaccatcaccatcttccag	acatactcagcaccagcatcac

## 2 実験結果

### 2.1 オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットにおける髄鞘障害に関連のある CMT 原因遺伝子発現量の変化

オキサリプラチンは、投与 3 日目において髄鞘障害に関連のある CMT 原因遺伝子の発現量に影響を及ぼさなかった。一方で、投与 24 日目において Pmp22、Mpz および Litaf の発現量を有意に低下させた (図 24)。

### 2.2 オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットにおける軸索障害に関連のある CMT 原因遺伝子発現量の変化

オキサリプラチンは、投与 3 および 24 日目において軸索障害に関連のある CMT 原因遺伝子の発現量に影響を及ぼさなかった (図 25)。

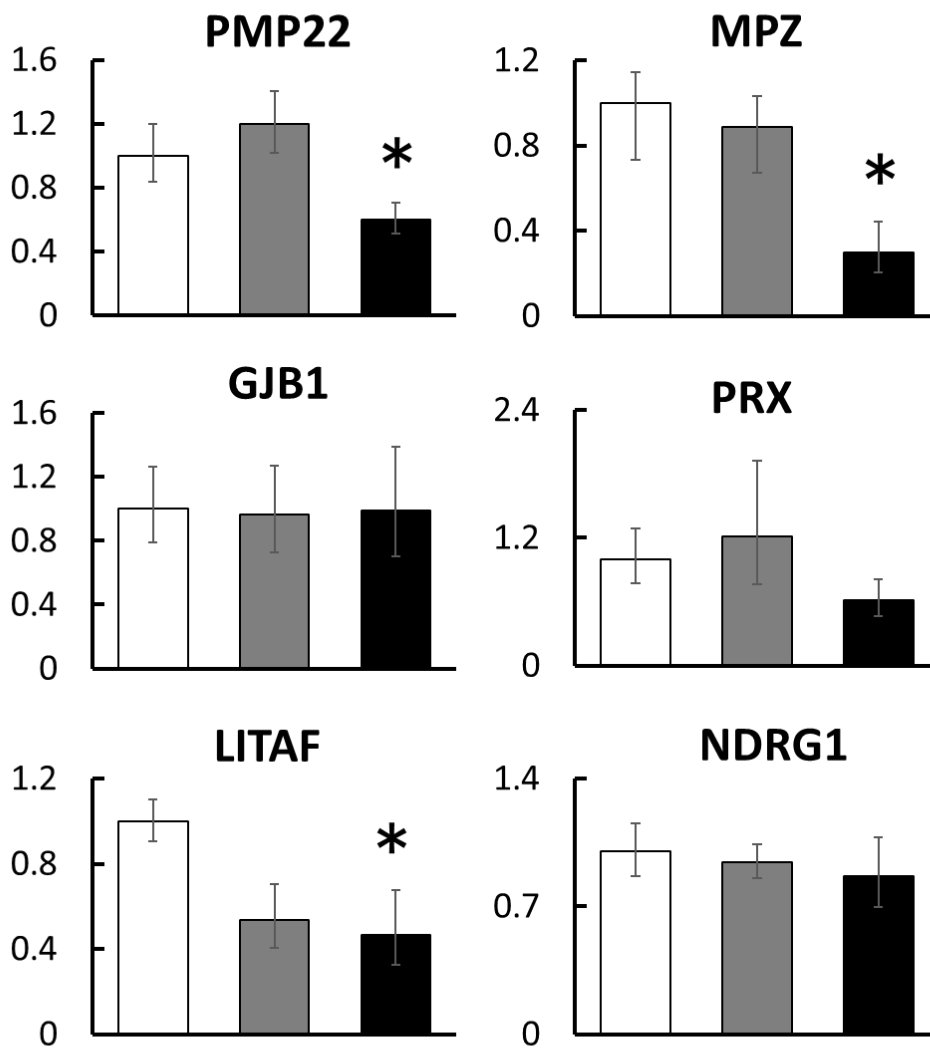
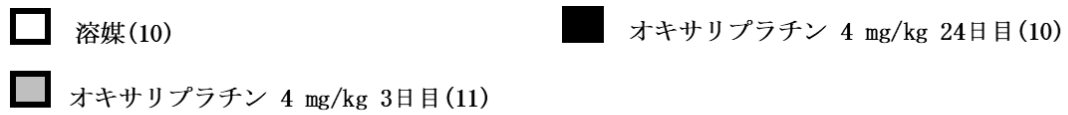


図24 オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットにおける  
髄鞘障害性CMT原因遺伝子の発現量



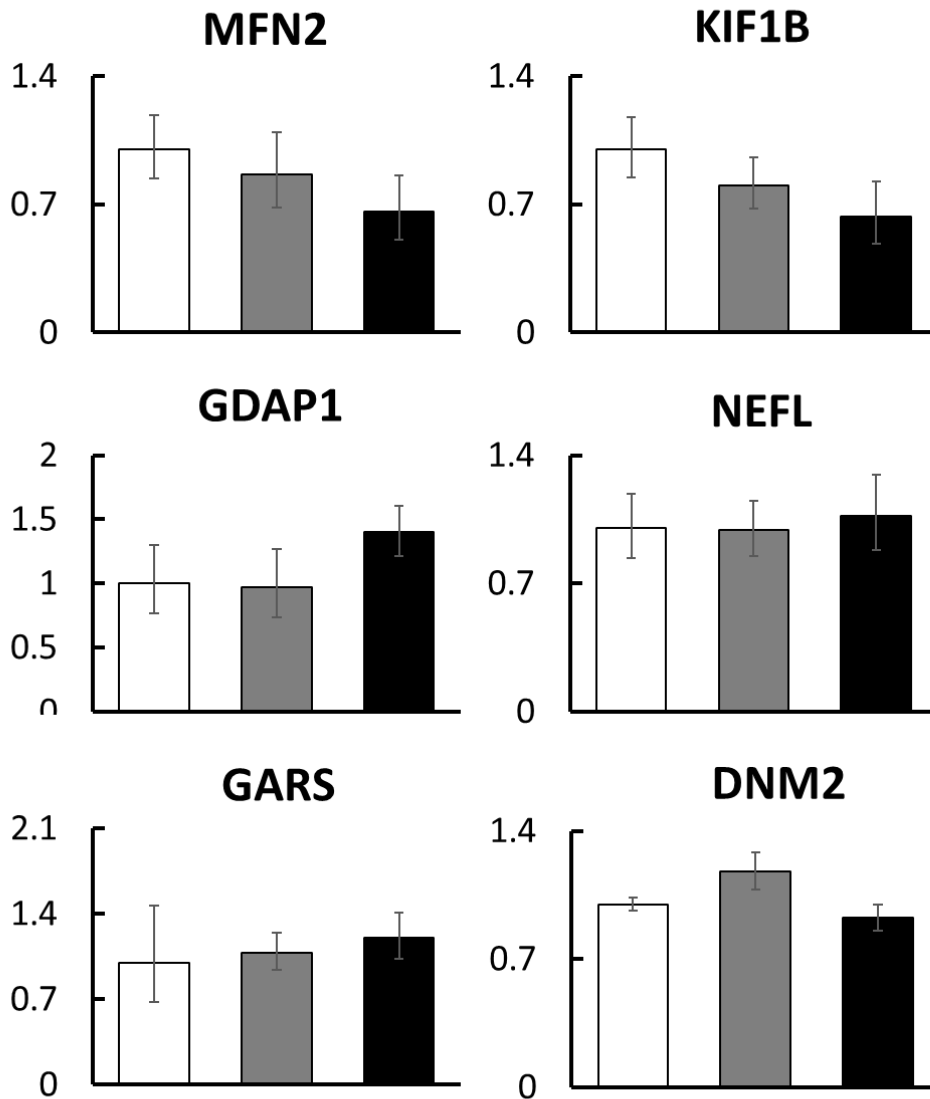
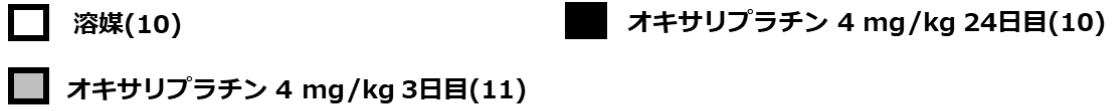


図25 オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットにおける軸索障害性CMT原因遺伝子の発現量

## 第2節 シュウ酸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

### 1. 実験方法

#### 1.1. 実験動物ならびにサンプル作製

##### 1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節 1.1.1. と同様である。

##### 1.1.2. サンプル作製

第1章第2節で作製したシュウ酸による末梢神経障害ラットの24日目をサンプルとして用いた。サンプルの調整は、第2章第1節 1.1.2. と同様である。

##### 1.1.3 RT-PCR 法

第2章第1節 1.1.2. と同様である。

### 1.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差 (SEM) で示した。独立多群間の比較には、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance) 後、各群間の比較には Tukey-Kramer post hoc test を使用した。なお、危険率が5%以下である場合を統計学的に有意差ありとした。

## 2 実験結果

### 2.1 シュウ酸誘発性末梢神経障害ラットにおける髄鞘障害に関連する CMT 原因遺伝子発現量の変化

シュウ酸は、投与24日目において髄鞘障害に関連する CMT 原因遺伝子の発現量に影響しなかった。(図 26)

### 2.2 シュウ酸誘発性末梢神経障害ラットにおける軸索障害に関連する CMT 原因遺伝子発現量の変化

シュウ酸は、投与24日目において Dnm2 遺伝子の発現量を有意に増加した (図 27)。

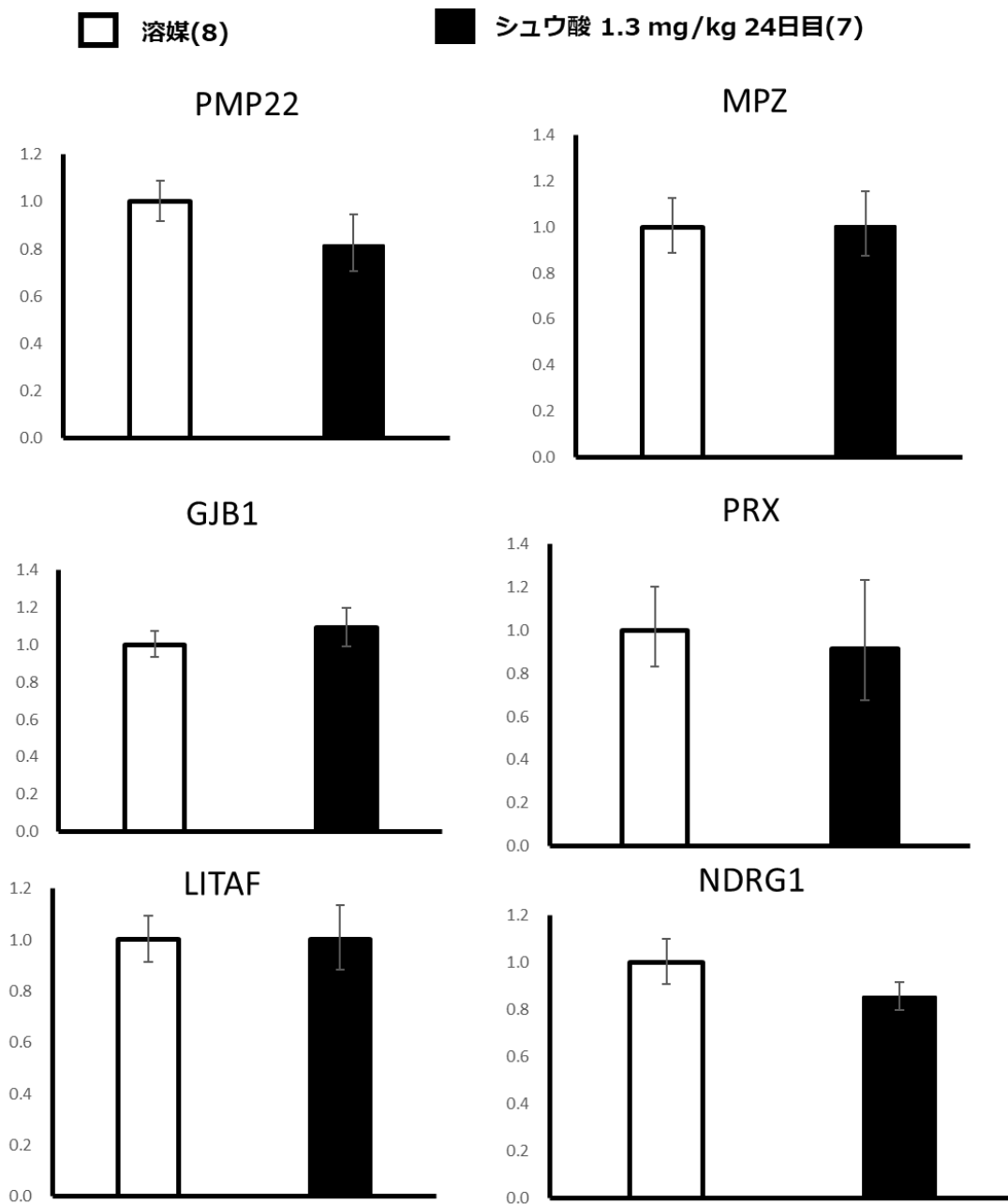


図26 シュウ酸誘発性末梢神経障害ラットにおける  
 髄鞘障害性CMT原因遺伝子の発現量

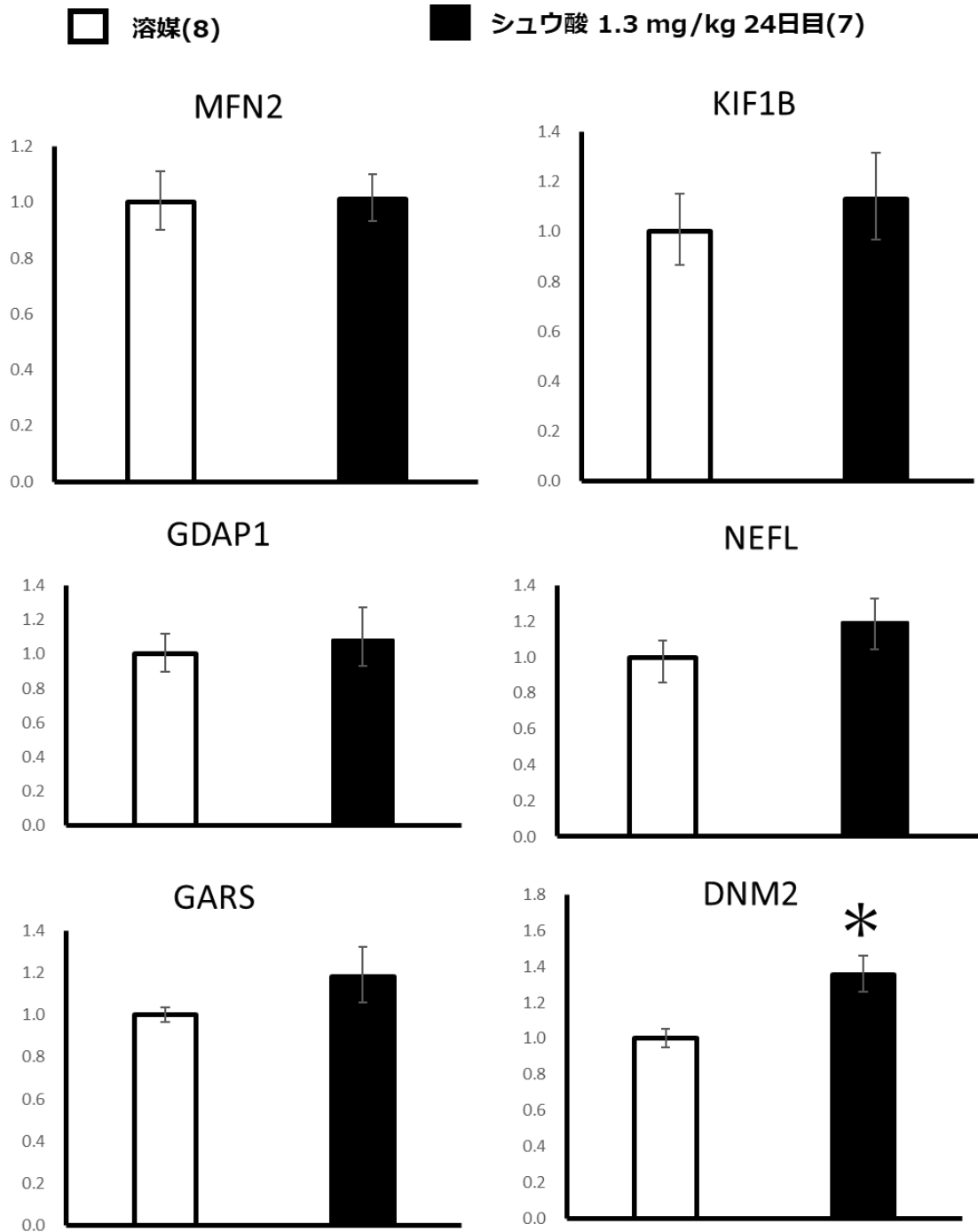


図27 シュウ酸誘発性末梢神経障害ラットにおける  
 軸索障害性CMT原因遺伝子の発現量

### 第3節 パクリタキセル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

#### 1. 実験方法

##### 1.1. 実験動物ならびにサンプル作製

##### 1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節 1.1.1. と同様である。

##### 1.1.2. サンプル作製

第1章第3節で作製したパクリタキセルによる末梢神経障害ラットの24日目をサンプルとして用いた。サンプルの調整は、第2章第1節 1.1.2. と同様である。

##### 1.2. RT-PCR 法

第2章第1節 1.1.2. と同様である。

##### 1.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差 (SEM) で示した。独立多群間の比較には、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance) 後、各群間の比較には Tukey-Kramer post hoc test を使用した。なお、危険率が5%以下である場合を統計学的に有意差ありとした。

#### 2 実験結果

##### 2.1 パクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットにおける髄鞘障害に関連する CMT 原因遺伝子発現量の変化

パクリタキセルは、投与24日目において髄鞘障害に関連のある CMT 原因遺伝子の発現量に影響しなかった (図 28)。

##### 2.2 パクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットにおける軸索障害に関連する CMT 原因遺伝子発現量の変化

パクリタキセルは、投与24日目において Mfn2 と NEFL 遺伝子の発現量を有意に低下した (図 29)。

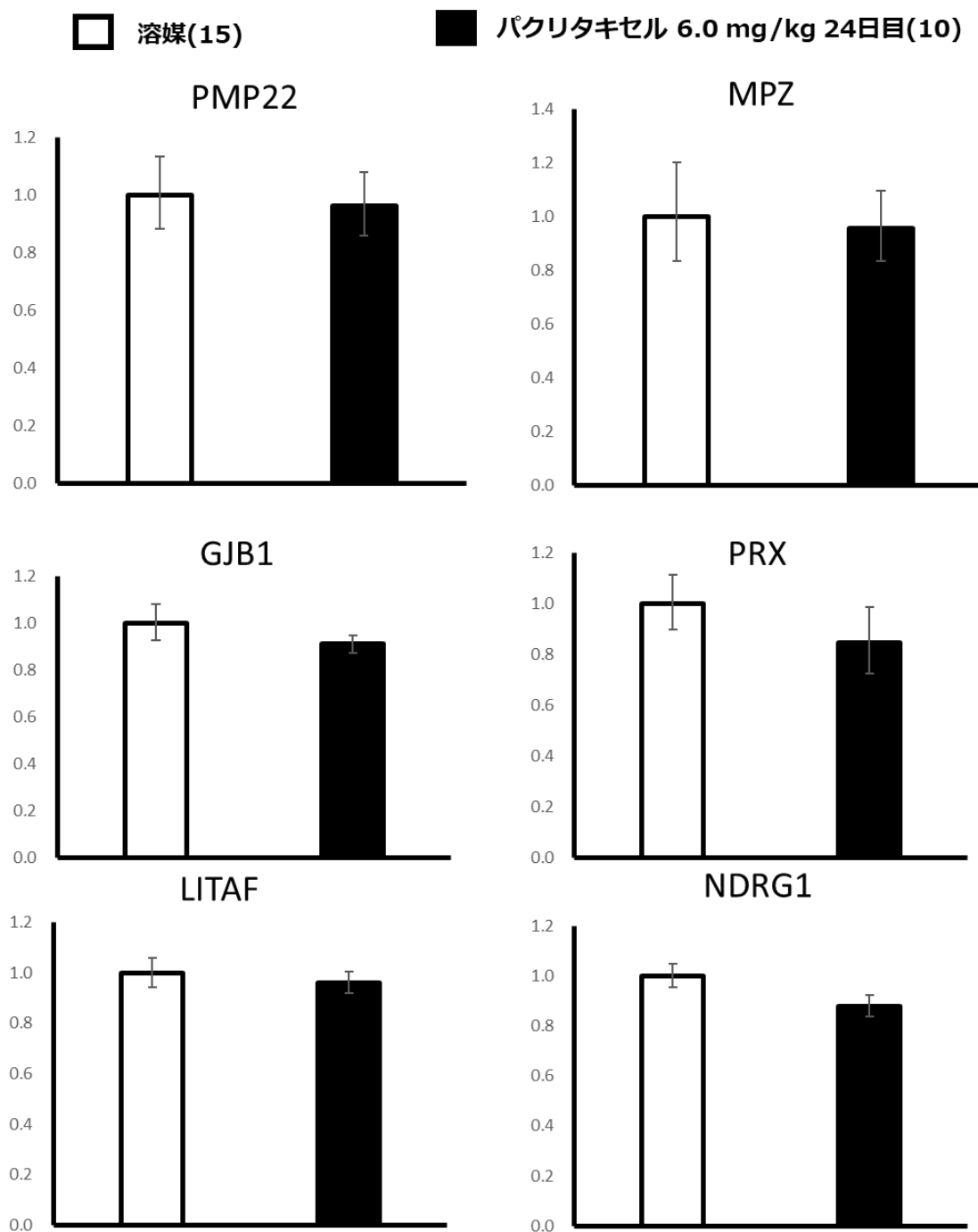


図28 パクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットにおける  
 髄鞘障害性CMT原因遺伝子の発現量

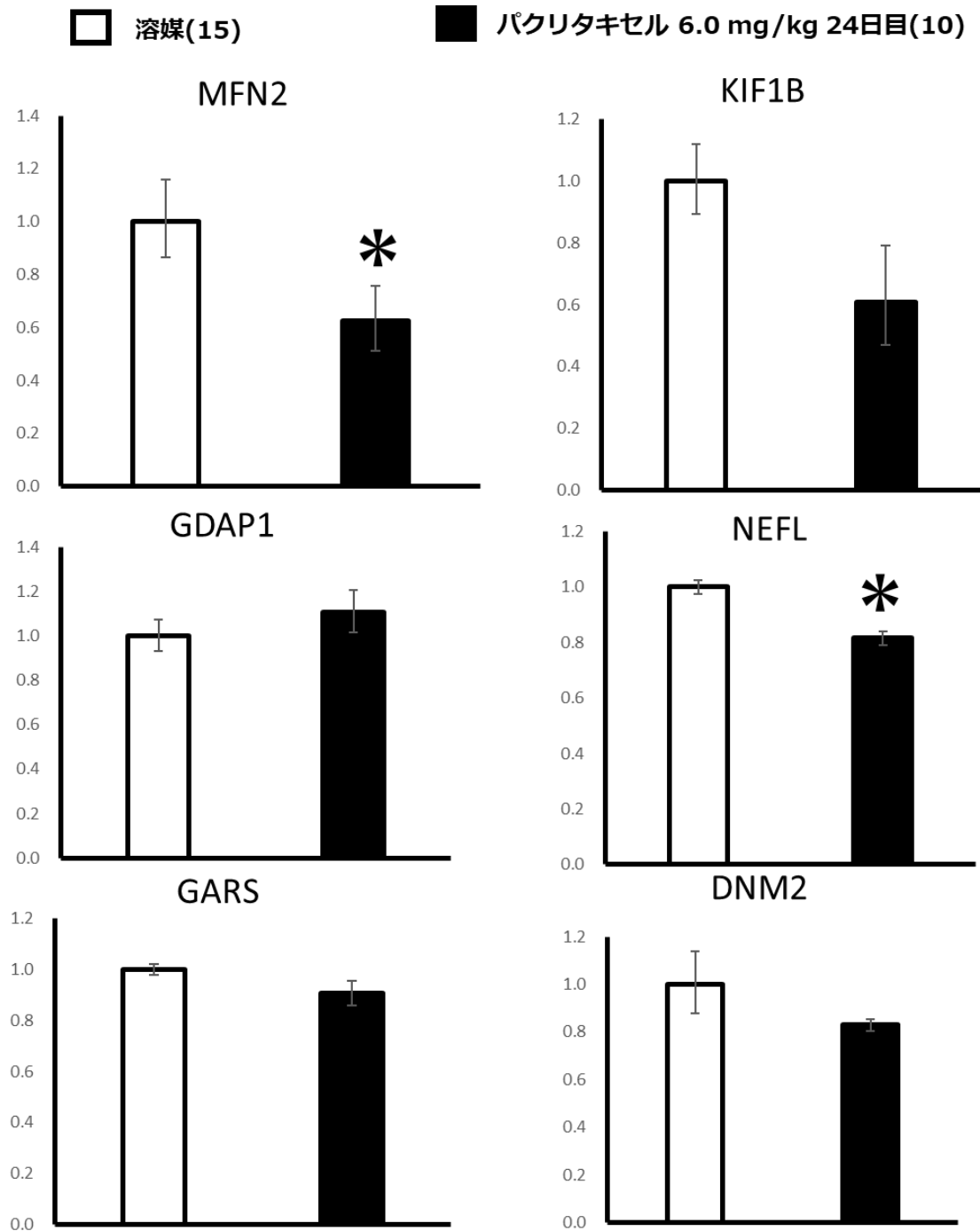


図29 パクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットにおける  
 軸索障害性CMT原因遺伝子の発現量

## 第4節 ビンクリスチン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

### 1. 実験方法

#### 1.1. 実験動物ならびにサンプル作製

##### 1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

第1章第1節 1.1.1. と同様である。

##### 1.1.2. サンプル作製

第1章第4節で作製したビンクリスチンによる末梢神経障害ラットの3日目ならびに24日目をサンプルとして用いた。サンプルの調整は、第2章第1節 1.1.2. と同様である。

#### 1.2. RT-PCR 法

第2章第1節 1.1.2. と同様である。

#### 1.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差 (SEM) で示した。独立多群間の比較には、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance) 後、各群間の比較には Tukey-Kramer post hoc test を使用した。なお、危険率が5%以下である場合を統計学的に有意差ありとした。

## 2 実験結果

### 2.1 ビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットにおける髄鞘障害に関連する CMT 原因遺伝子発現量の変化

ビンクリスチンは、投与24日目において髄鞘障害に関連のある CMT 原因遺伝子の発現量に影響しなかった (図 30)。

### 2.2 ビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットにおける軸索障害に関連する CMT 原因遺伝子発現量の変化

ビンクリスチンは、投与24日目において Mfn2 遺伝子の発現量を有意に低下した (図 31)。



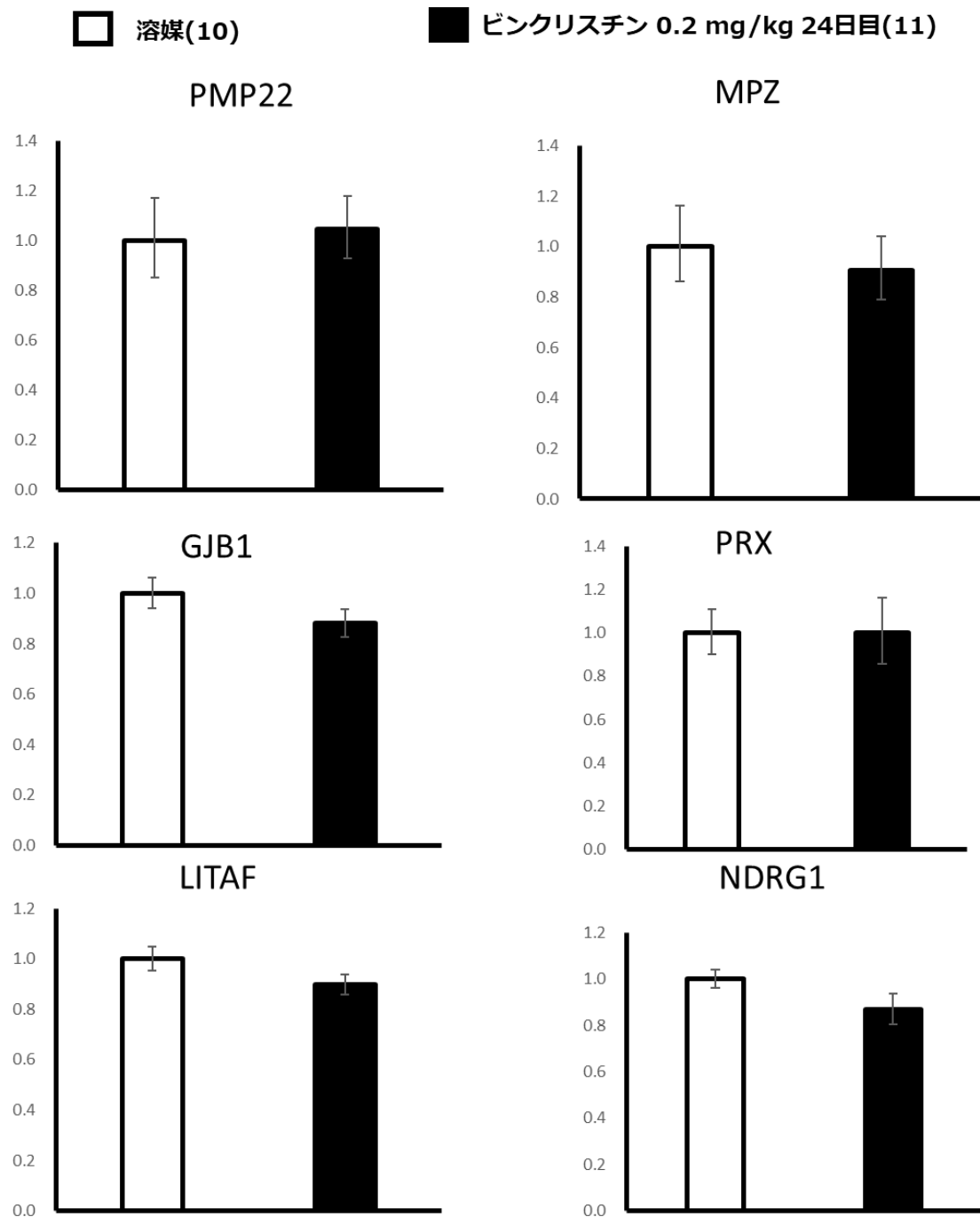


図30 ビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットにおける  
 髄鞘障害性CMT原因遺伝子の発現量

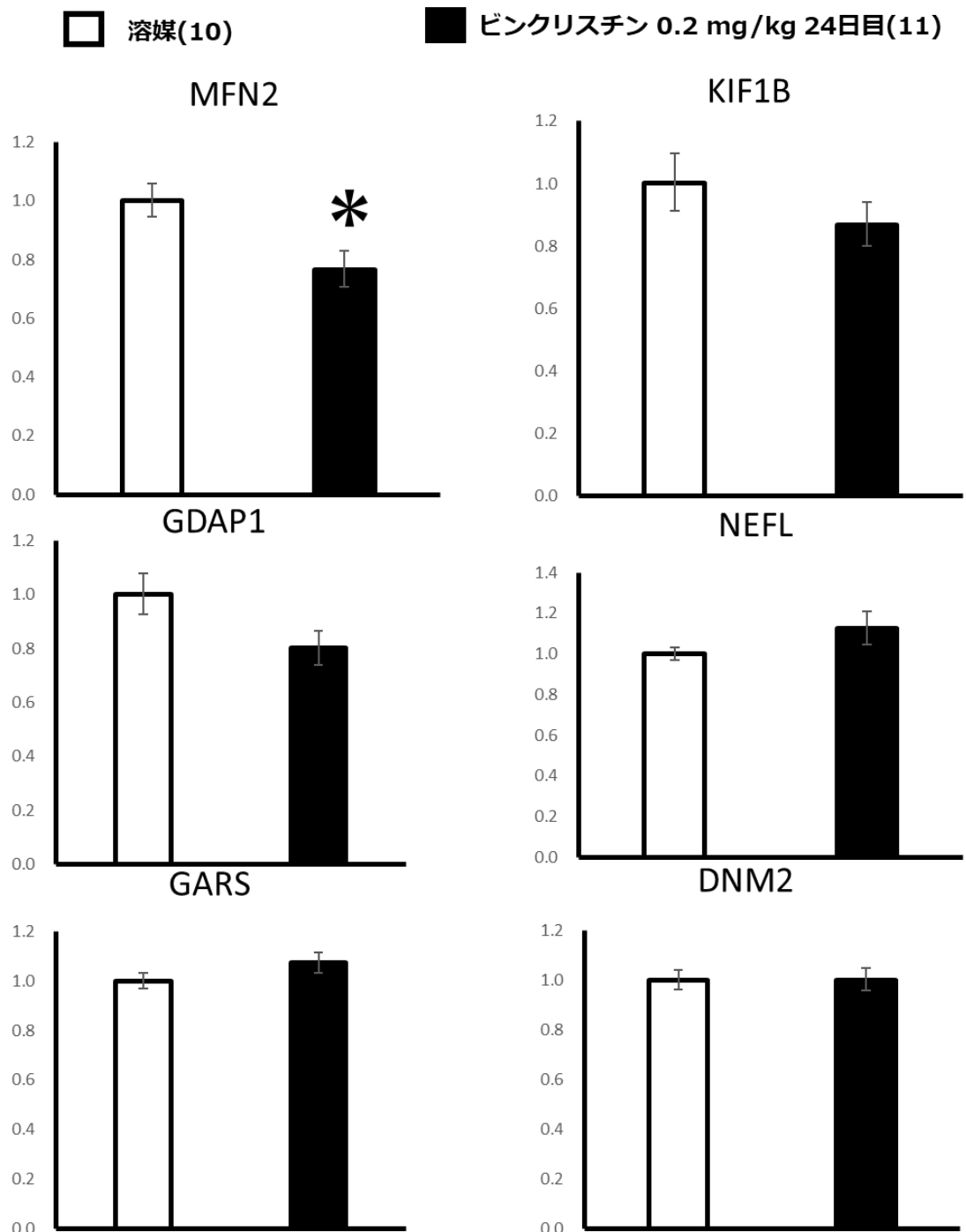


図31 ビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットにおける  
 軸索障害性CMT原因遺伝子の発現量

## 第5節 考察

本章では、第1章で作製した各種抗がん剤による末梢神経障害ラットの脊髄におけるCMT原因遺伝子の発現量を検討した。

### 第1節 オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットの解析

オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットの1サイクル目において髄鞘障害性ならびに軸索障害性CMT原因遺伝子の発現量は、変化しなかった。一方で、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の発現量が、有意に低下した。また、他のCMT原因遺伝子は、低下しなかった。これらのことから、Pmp22、MpzおよびLitaf遺伝子は、オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットの4サイクル目において特異的に低下することが明らかとなった。

第1章第1節よりオキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットは、1サイクル目において低温知覚異常、4サイクル目において低温知覚異常ならびに機械的アロディニアを発現した。低温知覚異常の発現したラットにおいて、発現量に変化する遺伝子がみられなかったことから、本検討におけるCMT原因遺伝子は、低温知覚異常の発現に関与しないと考えられる。一方で、機械的アロディニアの発現したラットにおいて、Pmp22、MpzおよびLitaf遺伝子は、低下していた。このことから、Pmp22、MpzおよびLitaf遺伝子の発現量低下は、オキサリプラチンによる機械的アロディニアを引き起こすことが考えられる。

Pmp22およびMpz遺伝子は、髄鞘を形成する主要なタンパク質をコードしている。そのため、Pmp22およびMpz遺伝子の欠損は、髄鞘形成障害を引き起こす<sup>54)55)</sup>。これらのことから、Pmp22およびMpz遺伝子の発現量低下は、髄鞘形成障害を引き起こすことが考えられる。またLitaf遺伝子は、髄鞘内のタンパク質代謝を調節するタンパク質をコードしており、髄鞘の維持に関与する。そのためLitaf遺伝子の欠損は、髄鞘損傷を増悪することにより、髄鞘形成障害を引き起こす<sup>56)</sup>。これらのことから、Litaf遺伝子の発現量低下も、髄鞘形成障害を引き起こすことが考えられる。本研究結果において、オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットでは髄鞘障害性CMT原因遺伝子Pmp22、MpzならびにLitafの発現量が低下していた。オキサリプラチンによる機械的アロディニアは、髄鞘形成障害が関与する可能性が指摘されている<sup>57)58)</sup>。そのため、オキサリプラチンは、Pmp22、MpzおよびLitaf遺伝子の発現量低下による髄鞘障害を介し、機械的アロディニアを引き起こしていると考えられる。

### 第2節 シュウ酸誘発性末梢神経障害ラットの解析

シュウ酸誘発性末梢神経障害ラットの4サイクル目において、軸索障害性CMT原因遺伝子Dnm2の発現量が、有意に増加した。また、他のCMT原因遺伝子は、変化しなかった。このことから、Dnm2遺伝子は、シュウ酸誘発性末梢神経障害ラットの4サイクル目において

特異的に増加することが明らかとなった。

第1章第2節よりシュウ酸誘発性末梢神経障害ラットは、4サイクル目において低温知覚異常を発現した。このことから、Dnm2 遺伝子の発現量増加は、シュウ酸による低温知覚異常を引き起こしていることが考えられる。しかし、第2章第1節のオキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットにおいて、Dnm2 遺伝子の発現量は変化していなかった。そのため、Dnm2 遺伝子の発現量増加が、低温知覚異常を引き起こしているとは考えにくい。低温知覚異常に関わる CMT 原因遺伝子を特定するためには、今後オキサリプラチンおよびシュウ酸誘発性末梢神経障害ラットにおいて共通して変動する遺伝子を見つける必要がある。

### 第3節 パクリタキセルによる末梢神経障害ラットの解析

パクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットの4サイクル目において、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 ならびに Nef1 の発現量が有意に低下した。また、他の CMT 原因遺伝子は、変化しなかった。このことから、Mfn2 および Nef1 遺伝子は、パクリタキセル酸誘発性末梢神経障害ラットの4サイクル目において特異的に低下することが明らかとなった。

第1章第3節よりパクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットは、4サイクル目において機械的アロディニアを発現した。このことから、Mfn2 ならびに Nef1 遺伝子の発現量低下は、パクリタキセルによる機械的アロディニアの発現を引き起こしている可能性がある。

Mfn2 遺伝子は、ミトコンドリアの融合、分裂および輸送に関するタンパク質をコードしている。そのため、Mfn2 遺伝子の異常は、軸索上のミトコンドリア分布障害により、軸索変性を引き起こす<sup>59)60)</sup>。これらのことから、Mfn2 遺伝子の発現量低下は、軸索障害を引き起こすことが考えられる。また、Nef1 遺伝子は、軸索の構造に関わるタンパク質をコードしている。そのため、Nef1 遺伝子の変異は、軸索形成タンパク質の機能低下により、軸索変性を引き起こす<sup>61)</sup>。これらのことから、Nef1 遺伝子の発現量低下は、軸索障害を引き起こすことが考えられる。本研究において、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 ならびに Nef1 の発現量が低下していた。パクリタキセルによる末梢神経障害は、軸索の変性により発現していることが指摘されている<sup>30)62)</sup>。よって、Mfn2 ならびに Nef1 遺伝子の発現量低下は、軸索障害を介してパクリタキセルによる機械的アロディニアを引き起こしている可能性がある。

### 第4節 ビンクリスチンによる末梢神経障害ラットの解析

ビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットの4サイクル目において、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 の発現量が有意に低下した。また、他の CMT 原因遺伝子の発現量は、変化しなかった。このことから、Mfn2 遺伝子は、ビンクリスチン酸誘発性末梢神経障害ラットの4サイクル目において特異的に低下することが明らかとなった。

第1章第4節よりビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットは、4サイクル目において機械的アロディニアを発現した。このことから、Mfn2 遺伝子の発現量低下は、ビンクリスチ

ンによる機械的アロディニアを引き起こしている可能性がある。

Mfn2 遺伝子は、ミトコンドリアの融合、分裂および輸送に関するタンパク質をコードしている。そのため、Mfn2 遺伝子の異常は、軸索上のミトコンドリア分布障害により、軸索変性を引き起こす<sup>59)60)</sup>。これらのことから、Mfn2 遺伝子の発現量低下は、軸索障害を引き起こすことが考えられる。本研究において、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 の発現量が低下していた。ビンクリスチンによる末梢神経障害は、軸索変性により生じることが指摘されている<sup>63)</sup>。よって、Mfn2 遺伝子の発現量低下は、軸索障害を介して、ビンクリスチンによる機械的アロディニアの発現を引き起こしている可能性が考えられる。

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変化を比較したところ、各種抗がん剤による機械的アロディニアの発現と関連する特異的な CMT 原因遺伝子の発現量低下が明らかとなった。髄鞘障害性 CMT 原因遺伝子 Pmp22、Mpz および Litaf の発現量低下は、オキサリプラチンによる機械的アロディニアを引き起こしている可能性がある。軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Mfn2 の発現量低下は、パクリタキセルならびにビンクリスチンによる機械的アロディニアを引き起こしている可能性がある。さらに、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 Nef1 の発現量低下は、パクリタキセルによる機械的アロディニアを引き起こしている可能性がある。これらの発見は、各種抗がん剤による機械的アロディニアの発現機序を特徴付ける新たな知見である。

抗がん剤による末梢神経障害は、CMT 患者において重症化しやすいことが明らかとなっている。しかし、どの抗がん剤がどの CMT 患者に対してハイリスクとなるかは明らかとなっていない。先行研究では、Mfn2 遺伝子に変異を持つ患者から作製した iPS 細胞を分化させた神経細胞において、パクリタキセルおよびビンクリスチンの毒性が強く発現することが報告されている<sup>51)</sup>。本研究から、パクリタキセルならびにビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットにおいて Mfn2 遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなっている。このことから、Mfn2 遺伝子の多型は、パクリタキセルならびにビンクリスチンによる末梢神経障害の重症化を引き起こすことが考えられる。そのため、CMT 原因遺伝子の遺伝子診断を行うことで、各種抗がん剤による末梢神経障害の重症度を予測することが可能となることが考えられる。本研究結果から、オキサリプラチンによる末梢神経障害では Pmp22、Mpz および Litaf 遺伝子、パクリタキセルによる末梢神経障害では Mfn2 および Nef1 遺伝子、ビンクリスチンによる末梢神経障害では Mfn2 遺伝子が重症度を予測するための標的となる可能性がある。

## 第6節 小括

本章では、各種抗がん剤による末梢神経障害の発現機序に CMT 原因遺伝子の発現量変化が関与していると仮説を立て、各種抗がん剤およびシュウ酸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調べた。

オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットにおいて、髄鞘障害性 CMT 原因遺伝子 *Pmp22*、*Mpz* および *Litaf* は、低温知覚異常のみが発現している 1 サイクル目では変化せず、機械的アロディニアが発現している 4 サイクル目で低下していた。

シュウ酸誘発性末梢神経障害ラットにおいて、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 *Dnm2* は、低温知覚異常のみが発現している 4 サイクル目で増加していた。しかし、オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットにおいて変化していないことから、低温知覚異常に関与している可能性は低いと考えられる。

パクリタキセル誘発性末梢神経障害ラットにおいて、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 *Mfn2* および *Nefl* は、機械的アロディニアが発現している 4 サイクル目で低下していた。

ビンクリスチン誘発性末梢神経障害ラットにおいて、軸索障害性 CMT 原因遺伝子 *Mfn2* は、機械的アロディニアが発現している 4 サイクル目で低下していた。

本章において、特定の CMT 原因遺伝子の発現量低下は、各種抗がん剤による機械的アロディニアを引き起こすことが考えられた (図 32)。さらにこのことは、各種抗がん剤による機械的アロディニアの治療薬および遺伝子診断としての新たな標的となることを示唆する。

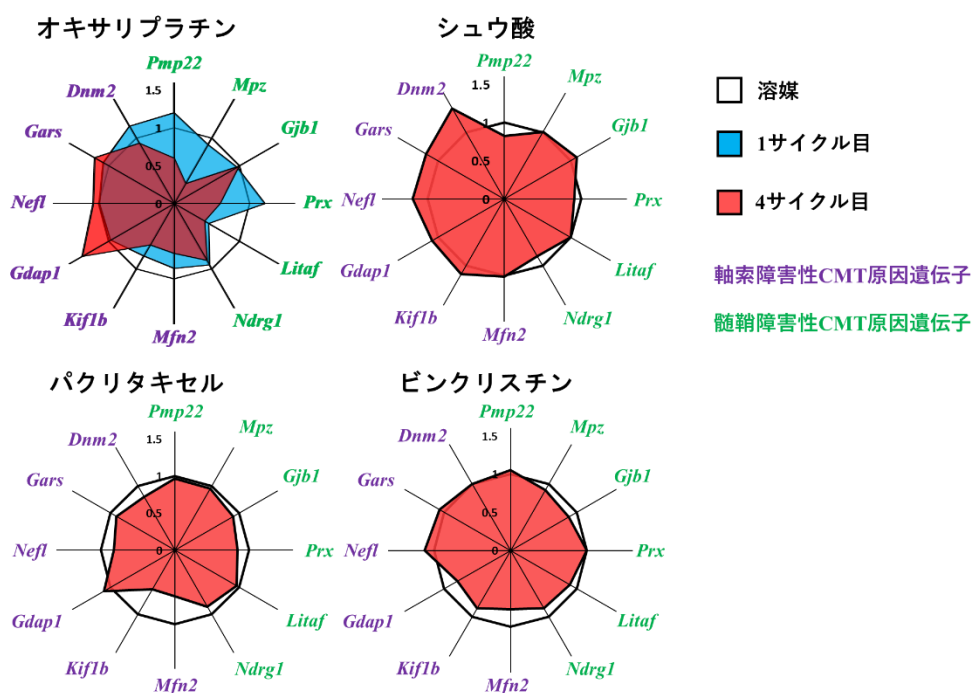


図32 各種抗がん剤によるCMT原因遺伝子の発現量変化

### 第3章 オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する Charcot-Marie-Tooth 病治療薬クルクミンの治療効果

#### 緒言

クルクミンは、天然生薬ウコンなどに含まれる黄色のポリフェノール化合物の一種である。クルクミンによる生理作用は、抗酸化作用やNF- $\kappa$ Bの活性抑制などを介した抗炎症作用などである<sup>64)65)66)</sup>。さらにクルクミンは、Pmp22やMpz遺伝子異常によって引き起こされる髄鞘障害性CMTに対して有効であることが報告されている<sup>67)68)</sup>。そのため、髄鞘障害に関与するCMT遺伝子異常による末梢神経障害にはクルクミンが有効であることが予想される。

オキサリプラチンによる末梢神経障害は、ヒトにおける末梢神経障害の発現頻度が最も高い。第1章の結果から他の抗がん剤よりも末梢神経障害の症状が強いことが明らかとなっている。さらに第2章の結果から、オキサリプラチンによる末梢神経障害には髄鞘障害に関与するCMT原因遺伝子Pmp22、MpzならびにLitafの発現量が低下することが明らかとなっている。これらのことから、オキサリプラチンによる末梢神経障害は、早期に解決すべき問題であり、クルクミンが著効する末梢神経障害である可能性が考えられた。

本章では、オキサリプラチン誘発性末梢神経障害ラットに対するクルクミンの治療効果を検討した。

## 第1節 オキサリプラチンによる末梢神経障害に対するCMT治療薬クルクミンの治療効果

### 1 実験材料ならびに飼育方法

#### 1.1.1 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節1.1.1と同様である。

#### 1.1.2 オキサリプラチンの調整

第1章第1節1.1.1.と同様である。

#### 1.1.3 クルクミンの調整

クルクミン (シグマアルドリッチ USA) を0.5% カルボキシメチルセルロース (CMC) に溶解し使用した。クルクミンの濃度は、Babuらの方法を参考に、10 mg/kgとした<sup>69)</sup>。

### 1.2 実験手続きならびに実験装置

#### 1.2.1 投与方法

オキサリプラチンの投与は、第1章第1節1.2.1と同様である。クルクミン 10 mg/kg および0.5% CMCを投与容量が10 mg/kgとなるように、毎オキサリプラチンの投与直前に経口投与した(1、2、8、9、15、16、22、23日)。

#### 1.2.2 von Frey test

第1章第1節1.2.2と同様である。

#### 1.2.3 Acetone test

第1章第1節1.2.3と同様である。

### 1.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差 (SEM) で示した。独立多群間の比較には、二元配置反復定分散分析 (two-way repeated measures analysis of variance) 後、各群間の比較には Tukey-Kramer post hoc test を使用した。なお、危険率が5%以下である場合を統計学的に有意差ありとした。



## 2 実験結果

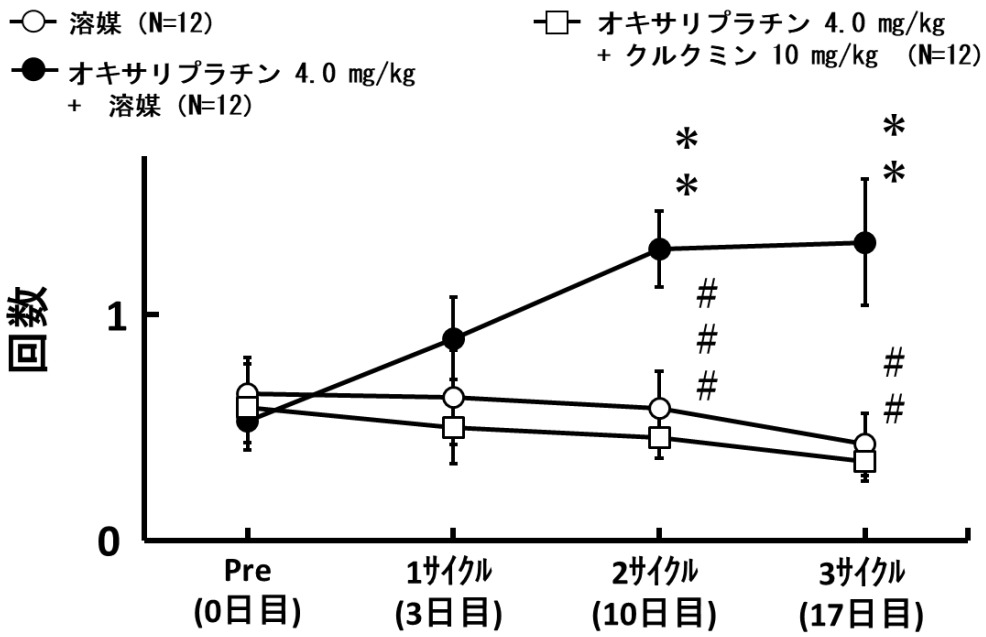
### 2.1. オキサリプラチンによる低温知覚異常に対するクルクミンの効果

クルクミンは、オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現を抑制した (図 33)。

### 2.2. オキサリプラチンによる機械的アロディニアに対するクルクミンの効果

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の発現を抑制した (図 34)。

### A) 逃避行動回数



### B) 潜時

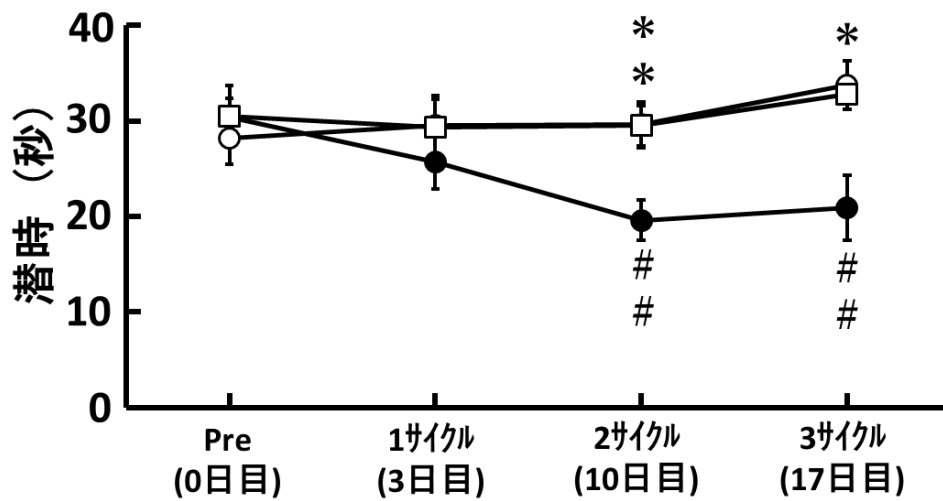


図33 オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現へのクルクミンの効果

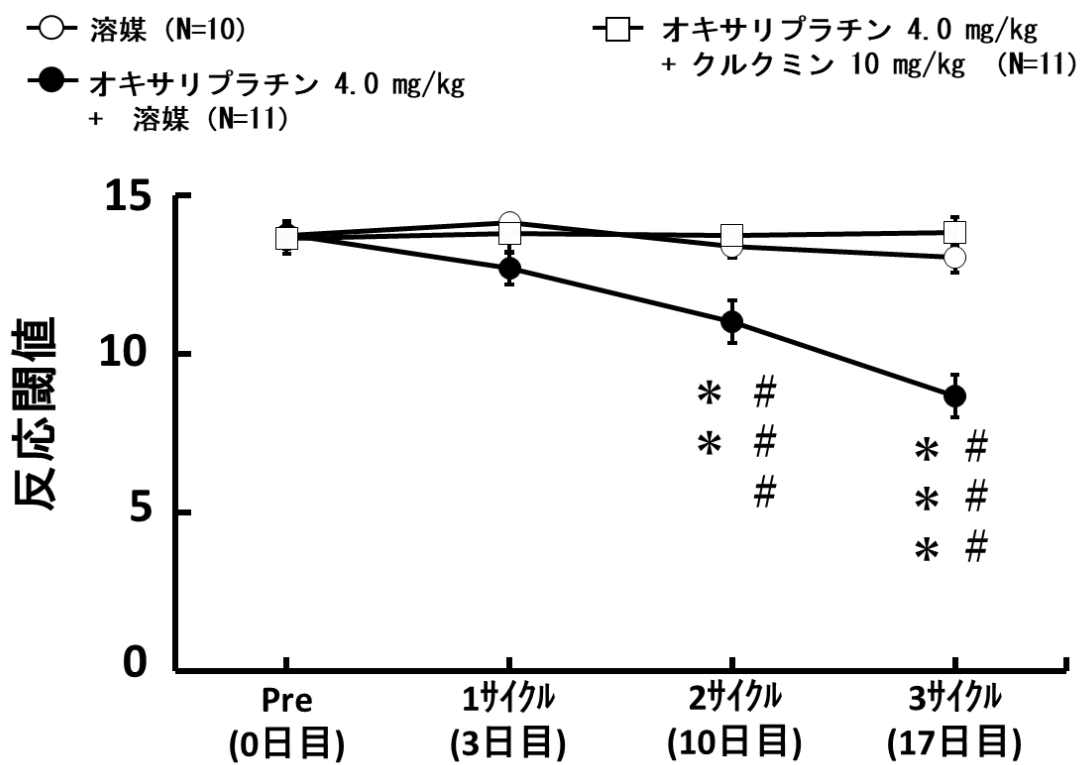


図34 オキサリプラチンによる機械的アロディニアの発現へのクルクミンの効果

## 第2節 考察

本章では、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に対するクルクミンの治療効果を検討した。

クルクミンは、オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現を抑制した。第2章の結果から、低温知覚異常に関与する CMT 原因遺伝子は特定できていない。そのため、低温知覚異常に対するクルクミンの効果が CMT 原因遺伝子を介して引き起こされているかは定かでない。オキサリプラチンによる低温知覚異常の発現機序として、温度感受性 transient receptor potential (TRP) チャンネルの活性化が考えられている。中でも TRP ankyrin 1 (TRPA1) は、活性酸素 (ROS) シグナル伝達を介して有害な冷覚を感知する<sup>70)71)</sup>。オキサリプラチンおよびシュウ酸は、TRPA1 の N 末端アンキリンリピート内のプロリン残基のヒドロキシル化を介して、TRPA1 の感受性を増強することが報告されている<sup>72)</sup>。これらの報告から、オキサリプラチンによる低温知覚異常は、ROS シグナル伝達を介した TRPA1 経路により生じていることが考えられる。本検討で用いたクルクミンは、ROS 捕捉作用を持つことが報告されている<sup>73)</sup>。そのため、クルクミンは ROS シグナル伝達を阻害することで低温知覚異常の発現を抑制した可能性がある。

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の発現を抑制した。第2章の結果から、オキサリプラチンによる機械的アロディニアは、Pmp22、Mpz ならびに Litaf の発現量低下による髄鞘障害により引きこされている可能性が示唆されている。クルクミンは、髄鞘を形成するシュワン細胞の増殖や分化を促進することが報告されている<sup>74)</sup>。さらにクルクミンは、シュワン細胞に対して Pmp22 や myelin basic protein (MBP) の発現量を増加することで、髄鞘化を促進する<sup>75)</sup>。これらのことから、クルクミンは、シュワン細胞の髄鞘化を促進することで、オキサリプラチンによる機械的アロディニアの発現を抑制した可能性がある。

### 第3節 小括

本章では、オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する CMT 治療薬クルクミンの治療効果を検討した。

CMT 治療薬クルクミンは、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。このことから、CMT 治療薬クルクミンがオキサリプラチンによる末梢神経障害に有効であることが明らかとなった。

本章の結果から、CMT 治療薬が抗がん剤による末梢神経障害に対して有効であることが示唆された。そのため、各種抗がん剤により変化する特定の CMT 遺伝子は、治療薬の開発および探索の標的となると考えられる。

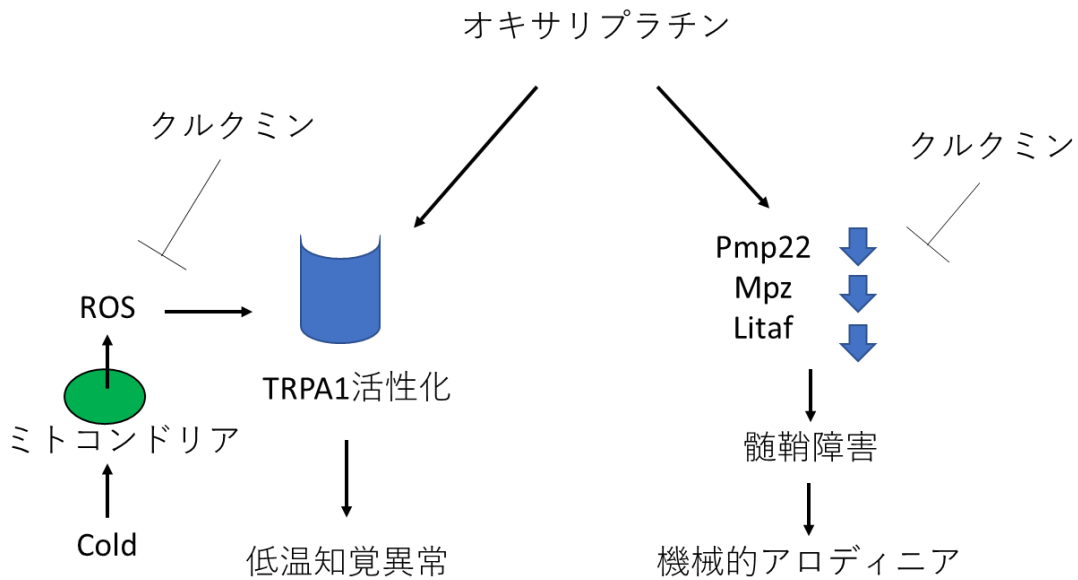


図 35 オキサリプラチンによる末梢神経障害へのクルクミンの効果

## 総括ならびに結論

抗がん剤による末梢神経障害の支持療法を確立するためには、より詳細な末梢神経障害の発現機序を解明する必要がある。本論では、遺伝性ニューロパチーCMT 原因遺伝子を標的とした各種抗がん剤による末梢神経障害の機序解明を行った。

### 第1章 各種抗がん剤による末梢神経障害ラットの作製および解析

- ・オキサリプラチンは、投与初期（1 サイクル目）から低温知覚異常、投与後期（4 サイクル目）から機械的アロディニアを引き起こした。
- ・シュウ酸は、投与初期（1 サイクル目）から低温知覚異常を引き起こし、機械的アロディニアを誘発しなかった。
- ・パクリタキセルは、投与後期（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。
- ・ビンクリスチンは、投与後期（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。

以上の結果から、各種抗がん剤による末梢神経障害の症状が異なることが明らかとなった。特にオキサリプラチンによる低温知覚異常では、非酵素的に遊離されるシュウ酸が原因であることが明らかとなった。また、これらの末梢神経障害ラットは、臨床における症状および発現時期が類似していることから、末梢神経障害の発現機序を解明する上で有用なモデルである。

### 第2章 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

- ・オキサリプラチンは、1 サイクル目では CMT 原因遺伝子の発現量に影響しなかったが、4 サイクル目では髄鞘障害に関わる CMT 遺伝子 Pmp22、Mpz および Litaf の発現量を低下させた。
- ・シュウ酸は、4 サイクル目で軸索障害に関わる CMT 原因遺伝子 Dnm2 の発現量を上昇させた。
- ・パクリタキセルは、4 サイクル目で軸索障害に関わる CMT 原因遺伝子 Mfn2 および Nef1 の発現量を低下させた。
- ・ビンクリスチンは、4 サイクル目で軸索障害に関わる CMT 原因遺伝子 Mfn2 の発現量を低下させた。

以上の結果から、各種抗がん剤による末梢神経障害ラットにおいて特定の CMT 原因遺伝

子が低下していることが明らかとなった。オキサリプラチンおよびシュウ酸の結果から、低温知覚異常の発現に関わる CMT 原因遺伝子は、特定できなかった。一方で、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 遺伝子の発現量低下による髄鞘障害により引き起こされてい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 Nefl 遺伝子の発現量低下による軸索障害により引き起こされている可能性が考えられた。ビ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による軸索障害により引き起こされている可能性が考えられた。これらの発見は、各種抗がん剤による末梢神経障害に対する治療および遺伝子診断に特定の CMT 遺伝子が標的となることを示唆する。

### 第 3 章 オキサリプラチンによる末梢神経障害に対する CMT 治療薬クルクミンの治療効果

- ・クルクミンは、1 サイクル目から低温知覚異常の発現を抑制した。
- ・クルクミンは、2 サイクル目から機械的アロディニアの発現を抑制した。

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対してクルクミンが有効であることが明らかとなった。クルクミンは、ROS を除去することで、TRPA1 を介した低温知覚異常の発現を抑制したと考えられる。さらに、クルクミンはシュワン細胞の増殖や分化、髄鞘化を誘導することで、Pmp22、Mpz および Litaf 遺伝子の発現量低下による髄鞘障害性機械的アロディニアを防いだと考えられる。よって CMT 原因遺伝子は、各種抗がん剤による末梢神経障害の治療薬の標的となることが示唆された。

本研究結果から、CMT 原因遺伝子を標的とすることで各種抗がん剤による末梢神経障害の発現機序を調べるということが可能であることが明らかとなった。さらに、CMT 治療薬が抗がん剤による末梢神経障害であることが明らかとなった。今後、CMT 原因遺伝子を標的とした各種抗がん剤による末梢神経障害の治療薬および遺伝子診断法を調べることで、より効果的な支持療法が可能となる (図 36)。

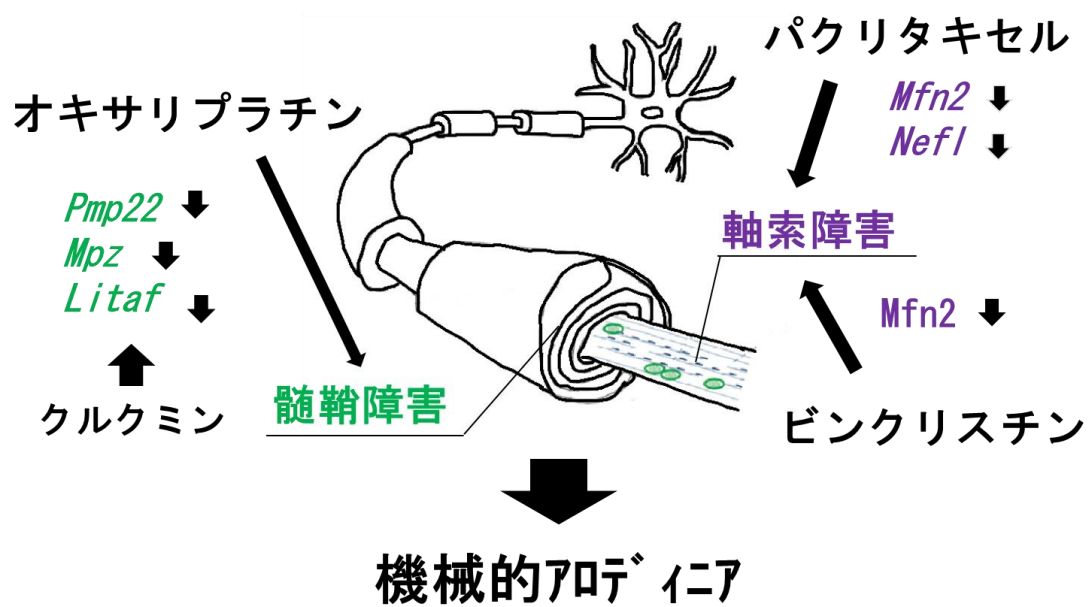


図 36 抗がん剤による末梢神経障害の発現機序（仮説）



#### 参考文献

- 1) 厚生労働省 平成 26 年患者調査の概要
- 2) 厚生労働省 平成 29 年我が国の人口動態
- 3) 静岡県立静岡がんセンター 2013 年がん体験者の悩みや負担等に関する実態調査報告書
- 4) 株式会社 QLife 抗がん剤の副作用とその軽減方法に関する大規模患者調査 結果報告書  
平成 25 年 3 月 29 日
- 5) 日本癌治療学会編 制吐薬適正使用ガイドライン 第 2 版
- 6) 日本癌治療学会 G-CSF 適正使用ガイドライン 2013 年版 ver.4
- 7) 厚生労働省医薬・生活衛生局 血液製剤の使用指針 平成 29 年 3 月
- 8) Minami H, et al. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of UGT1A1\*6 and \*28. *Pharmacogenet Genomics*. 2007; 17(7): 497-504.
- 9) 第一三共株式会社 トポテシン®点滴静注 適正使用ガイド 2014 年 3 月改訂
- 10) Yamamoto K, et al. Association of toxicity of sorafenib and sunitinib for human keratinocytes with inhibition of signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3). *PLoS One*. 2014; 9(7): e102110.
- 11) Yamamoto K, et al. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in STAT3 with Hand-Foot Skin Reactions in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Multiple Tyrosine Kinase Inhibitors: A Retrospective Analysis in Japanese Patients. *Target Oncol*. 2016; 11(1): 93-99.
- 12) 株式会社ヤクルト本社 エルプラット®点滴静注液 添付文書 2016 年 10 月改訂 (第 10 版)
- 13) ブリストル・マイヤーズ・スクイブ株式会社 タキソール®注射液 添付文書 2016 年 4 月改訂 (第 25 版)
- 14) 日本化薬株式会社 オンコビン®注射用 1 mg 添付文書 2015 年 2 月改訂 8
- 15) Hochster HS, et al. Pregabalin for the Prevention of Oxaliplatin-Induced Painful Neuropathy: A Randomized, Double-Blind Trial. *Oncologist*. 2017; 22(10): 1154-e105.
- 16) Oki E, et al. Preventive effect of Goshajinkigan on peripheral neurotoxicity of FOLFOX therapy (GENIUS trial): a placebo-controlled, double-blind, randomized phase III study. *Int J Clin Oncol*. 2015; 20(4): 767-775.
- 17) Hilpert F, et al. Neuroprotection with amifostine in the first-line treatment of advanced ovarian cancer with carboplatin/paclitaxel-based chemotherapy--a double-blind, placebo-controlled, randomized phase II study from the Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) Ovarian Cancer Study Group. *Support Care Cancer*. 2005; 13(10): 797-805.

- 18) Jacobson SD, et al. Glutamine does not prevent paclitaxel-associated myalgias and arthralgias. *J Support Oncol*. 2003; 1(4): 274-278.
- 19) Bianchi G, et al. Symptomatic and neurophysiological responses of paclitaxel- or cisplatin-induced neuropathy to oral acetyl-L-carnitine. *Eur J Cancer*. 2005; 41(12): 1746-1750.
- 20) Pace A, et al. Vitamin E for prophylaxis against chemotherapy-induced neuropathy: a randomized controlled trial. *Neurology*. 2005; 65(3): 501-502
- 21) Sands S, et al. Glutamine for the treatment of vincristine-induced neuropathy in children and adolescents with cancer. *Support Care Cancer*. 2017; 25(3): 701-708.
- 22) Schloss JM, et al. A randomised, placebo-controlled trial assessing the efficacy of an oral B group vitamin in preventing the development of chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). *Support Care Cancer*. 2017; 25(1): 195-204.
- 23) Hirayama Y, et al. Effect of duloxetine in Japanese patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized trial. *Int J Clin Oncol*. 2015; 20(5): 866-871.
- 24) Hershman DL, et al. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2014; 32(18): 1941-1967.
- 25) 沢井製薬株式会社 オキサリプラチンによる末梢神経障害のマネジメント
- 26) Sakurai M, et al. Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain*. 2009; 147(1-3): 165-174.
- 27) 厚生労働省 重篤副作用疾患別対応マニュアル 末梢神経障害 平成 21 年 5 月
- 28) Kontinen VK, et al. Behavioural measures of depression and anxiety in rats with spinal nerve ligation-induced neuropathy. *Pain*. 1999; 80(1-2): 341-346.
- 29) Kawashiri T, et al. Prevention of oxaliplatin-induced mechanical allodynia and neurodegeneration by neurotropin in the rat model. *Eur J Pain*. 2011; 15(4): 344-350.
- 30) Kawashiri T, et al. Neurotropin reverses paclitaxel-induced neuropathy without affecting anti-tumour efficacy. *Eur J Cancer*. 2009; 45(1): 154-163.
- 31) Caprioli A, et al. The novel reversible fatty acid amide hydrolase inhibitor ST4070 increases endocannabinoid brain levels and counteracts neuropathic pain in different animal models. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012; 342(1): 188-195.
- 32) 株式会社ヤクルト本社 エルプラット®点滴静注液 医薬品インタビューフォーム 2016 年 10 月改訂 (第 10 版)
- 33) Kawashiri T, et al. L type Ca<sup>2+</sup> channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol Pain*. 2012; 8: 7.
- 34) Mihara Y, et al. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. *Mol Pain*. 2011; 7: 8.
- 35) キシダ化学株式会社 しゅう酸ナトリウム 安全データシート 最終改訂日;2014 年 1 月

27日

- 36) ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社 タキソール®注射液 医薬品インタビューフォーム 2015年9月改訂 (第9版)
- 37) ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社 タキソール®注射液の治療を受けるあなたへ
- 38) Toma W, et al. Effects of paclitaxel on the development of neuropathy and affective behaviors in the mouse. *Neuropharmacology*. 2017; 117: 305-315.
- 39) Ward SJ, et al. Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice. *Anesth Analg*. 2011; 113(4): 947-950.
- 40) 日本化薬株式会社 オンコビン®注射用 1 mg 医薬品インタビューフォーム 2015年9月改訂 (改訂第10版)
- 41) Jaggi AS, et al. Pharmacological investigations on mast cell stabilizer and histamine receptor antagonists in vincristine-induced neuropathic pain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2017; 390(11): 1087-1096.
- 42) Hu C, et al. Antinociceptive effects of fucoidan in rat models of vincristine-induced neuropathic pain. *Mol Med Rep*. 2017; 15(2): 975-980.
- 43) Schappacher KA, et al. Early life vincristine exposure evokes mechanical pain hypersensitivity in the developing rat. *Pain*. 2017; 158(9): 1647-1655.
- 44) Carter GT, et al. Neuropathic pain in Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Phys Med Rehabil*. 1998; 79(12): 1560-1564.
- 45) Berger P, et al. Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia*. 2006; 54(4): 243-257.
- 46) Züchner S, et al. Mechanisms of disease: a molecular genetic update on hereditary axonal neuropathies. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006; 2(1): 45-53.
- 47) Saporta AS, et al. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol*. 2011; 69(1): 22-33.
- 48) Abe A, et al. Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *J Hum Genet*. 2011; 56(5): 364-348.
- 49) Nakamura T, et al. Vincristine exacerbates asymptomatic Charcot-Marie-tooth disease with a novel EGR2 mutation. *Neurogenetics*. 2012; 13(1): 77-82.
- 50) Martino MA, et al. The administration of chemotherapy in a patient with Charcot-Marie-Tooth and ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2005; 97(2): 710-712.
- 51) Ohara R, et al. Modeling Drug-Induced Neuropathy Using Human iPSCs for Predictive Toxicology. *Clin Pharmacol Ther*. 2017; 101(6): 754-762.
- 52) Beutler AS, et al. Sequencing of Charcot-Marie-Tooth disease genes in a toxic polyneuropathy. *Ann Neurol*. 2014; 76(5): 727-737.

- 53) Weimer LH, et al. Medication-induced exacerbation of neuropathy in Charcot Marie Tooth disease. *J Neurol Sci.* 2006; 242(1-2): 47-54.
- 54) Sancho S, et al. Distal axonopathy in peripheral nerves of PMP22-mutant mice. *Brain.* 1999; 122 ( Pt 8): 1563-1577.
- 55) Martini R. P0-deficient knockout mice as tools to understand pathomechanisms in Charcot-Marie-Tooth 1B and P0-related Déjérine-Sottas syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 883: 273-280.
- 56) Somandin C, et al. LITAF (SIMPLE) regulates Wallerian degeneration after injury but is not essential for peripheral nerve development and maintenance: implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *Glia.* 2012; 60(10): 1518-1528.
- 57) Tsutsumi K, et al. Oxaliplatin induces hypomyelination and reduced neuregulin 1 expression in the rat sciatic nerve. *Neurosci Res.* 2014; 80: 86-90.
- 58) Imai S, et al. Taxanes and platinum derivatives impair Schwann cells via distinct mechanisms. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 5947.
- 59) Misko A, et al. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci.* 2010; 30(12): 4232-4240.
- 60) Misko AL, et al. Mitofusin2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *J Neurosci.* 2012; 32(12): 4145-4155.
- 61) Yum SW, et al. A novel recessive Nefl mutation causes a severe, early-onset axonal neuropathy. *Ann Neurol.* 2009; 66(6): 759-770.
- 62) Wang MS, et al. Calpain inhibition protects against Taxol-induced sensory neuropathy. *Brain.* 2004; 127(Pt 3): 671-679.
- 63) Topp KS, et al. Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Comp Neurol.* 2000; 424(4): 563-576.
- 64) Sujatha R, et al. Modulation of lipid peroxidation by dietary components. *Toxicol In Vitro.* 1995; 9(3): 231-236.
- 65) Himadri P, et al. Role of oxidative stress and inflammation in hypoxia-induced cerebral edema: a molecular approach. *High Alt Med Biol.* 2010; 11(3): 231-244.
- 66) Shehzad A, Lee YS. Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. *Biofactors.* 2013; 39(1): 27-36.
- 67) Pareyson D, et al. Natural history and treatment of peripheral inherited neuropathies. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 652: 207-224.
- 68) Patzkó A, et al. Curcumin derivatives promote Schwann cell differentiation and improve neuropathy in R98C CMT1B mice. *Brain.* 2012; 135(Pt 12): 3551-3566.
- 69) Babu A, et al. Effect of curcumin in mice model of vincristine-induced neuropathy. *Pharm*

*Biol.* 2015; 53(6): 838-848.

70) Takahashi N, et al. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)*. 2008; 2(4): 287-298.

71) Andersson DA, et al. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci*. 2008; 28(10): 2485-2494.

72) Nakagawa T, et al. Roles of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 in Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *Biol Pharm Bull*. 2017; 40(7): 947-953.

73) Fujisawa S, et al. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. *Anticancer Res*. 2004; 24(2B): 563-569.

74) Zhao Z, et al. Curcumin accelerates the repair of sciatic nerve injury in rats through reducing Schwann cells apoptosis and promoting myelinization. *Biomed Pharmacother*. 2017; 92: 1103-1110.

75) Tello Velasquez J, et al. Stimulating the proliferation, migration and lamellipodia of Schwann cells using low-dose curcumin. *Neuroscience*. 2016; 324: 140-150.

## 謝辞

本稿を終わるにあたり、本研究に終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部生体機能制御学教室の三島 健一教授、本多 健治講師、佐野 和憲講師および福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室の岩崎 克典教授、桂林 秀太郎准教授、窪田 香織助教に深謝致します。また、本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助言を賜りました入江 圭一助教、松尾 宏一准教授、中野 貴文助教、林 稔展博士に感謝の意を表します。また、共に実験を行ってくださった明瀬 孝之氏に深く感謝致します。更に、共同研究者として、多くの議論、実験を共に行ってくださった特別実習生の寺岡 沙織女史、平山 美奈子女史、幸地 茜女史、木村 奈美女史、伊賀 歩実女史、近藤 布由美女史、赤木 麻里女子、安武 亜珠女子をはじめとする福岡大学薬学部生体機能制御学教室の皆様に深く感謝申し上げます。また、本研究に尊い命を提供して頂きました実験動物諸霊に深く感謝致します。最後に、学生生活を通じ始終精神的、経済的御支援を賜りました家族、そして私を支えてくださった方々に心より感謝致します。誠にありがとうございました。