

謹呈

拙書ではございますが、御一読頂ければ幸いに存じます。
今後とも御指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

令和2年3月23日

荻原孝史

オキサリプラチンによる末梢神経障害モデル
評価系の確立と治療薬の探索

2020

荻原 孝史

目次

緒言	1
第一章 オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルマウスの作製と評価系の確立.....	4
要約	4
第二章	6
オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルにおける 血管拡張薬の有効性の評価.....	6
実験方法.....	8
実験結果	
第一節 L-OHP 誘発末梢血管障害および冷過敏応答に対する血管拡張薬の急性効果.....	15
第二節 L-OHP 誘発末梢血流障害に対するタダラフィル長期投与の効果.....	17
第三節 L-OHP 反復投与による冷過敏応答、機械過敏応答、電流過敏応答および熱痛覚障害 に対するタダラフィル長期投与の効果.....	19
第四節 L-OHP 反復投与による神経伝導速度の低下に対するタダラフィル長期投与の効果	21
第五節 L-OHP 反復投与による坐骨神経内微小血管の減少に対する長期タダラフィル投与 の効果.....	22
第六節 L-OHP 反復投与による神経軸索変性に対する長期タダラフィル投与の効果.....	23
第七節 L-OHP の細胞毒性に対するタダラフィルの直接的な影響.....	24
考察	25
結論	28
論文目録	29
謝辞.....	30
引用文献	31

緒言

がん化学療法で用いられる抗がん剤は、様々な副作用が出現するが、なかでもがん化学療法誘発性末梢神経障害（chemotherapy-induced peripheral neuropathy : CIPN）は、比較的多くの患者が経験するにもかかわらず、対応が遅れている副作用の1つである。CIPNを生じやすい抗がん剤は、タキサン系、ビンカアルカロイド系などの微小管阻害薬や白金系抗がん剤などであり、しびれ、感覚障害、痛みなどの感覚異常が生じるほか、場合によっては運動神経障害や自律神経障害が出現することもある。CIPNは、患者の日常生活動作（activities of daily living : ADL）や生活の質（quality of life : QOL）を低下させるだけでなく、重症化すれば、抗がん剤の減量や休薬を余儀なくさせ、がん治療成績に影響を与えることもある。しかしながら、その詳細な機序は不明な点が多く、今なお、有効な予防法や治療法は確立されていない。特に大腸癌、胃癌などの治療に広く使用される白金系抗がん剤のオキサリプラチン（L-OHP）は、CIPNを高率に誘発し、治療継続上問題となることが多い。

CIPNの予防/治療薬の開発が進まない原因の一つに、これまでのCIPN動物モデルが適切でなかったことが挙げられる。現在、動物実験で利用されているCIPNモデルの多くは、単回または数回、L-OHPを短期間に連続して投与することにより作製されており、ヒトにおける投与スケジュールと大きく異なっている。また、これらCIPNモデルでは、実験手技的に検出しやすい痛み（機械刺激や冷刺激に対する過敏応答）のみが評価され、ヒトCIPNで見られる感覚障害や神経伝導速度の低下などの症状や所見が評価できていないことが多い。従って、CIPN動物モデルでの痛みに対しては多くの鎮痛薬が有効性を示すが、実臨床と異なる結果となってしまうといった、誤った結論を導いてしまう可能性がある。そのため、CIPN動物モデルの改良や評価系の再構築が必要であると考えられる。

一方、末梢血流量が一定時間低下すると、四肢のしびれ、痛みなどの異常感覚が発

生するとともに、感覚障害などが生じる。糖尿病患者および糖尿病モデル動物では、末梢血流障害が先行して生じ、糖尿病性神経障害の原因の1つとなっていると考えられている。また、L-OHPをマウスに投与しても末梢血流が低下することが報告されており、L-OHP誘発末梢神経障害にも関与している可能性が考えられる。しかし、L-OHPによる末梢血流の低下とCIPNの関連については不明な点も多い。

そこで本研究では、まず、ヒトで見られるCIPNの症状や所見を呈するCIPN動物モデルの作製とその評価方法を検討した。さらに、CIPNに対する予防/治療薬を開発することを目標に、L-OHPによるCIPN動物モデルで認められる末梢血流障害が末梢神経障害に関わっているとの仮説のもと、血管拡張作用を有する既承認医薬品からCIPN予防/治療薬候補を探索するドラッグ・リポジショニング研究を実施し、以下の新知見を得た。

第一章では、オキサリプラチンによるCIPN動物モデル及び評価系を改良し、痛みだけでなくCIPNの主症状である感覚障害や神経伝導速度の低下、神経軸索障害などの組織学的所見も検出できる投与スケジュールと一連の評価系を構築した。

第二章では、血管拡張薬であるタダラフィルが、過敏応答だけでなく、感覚障害や神経機能障害にも効果を示すことを見出し、オキサリプラチンの反復投与によって生じる末梢血流障害が、CIPNの増悪に寄与していることを明らかとした。

これらの研究成果について以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである

ADL:	activities of daily living
ANOVA:	analysis of variance
CD31:	cluster designation 31
CIPN:	chemotherapy induced peripheral neuropathy

DMSO:	dimethyl sulfoxide
DRG:	dorsal root ganglion
ET:	endothelin
HMGB1:	high mobility group box 1
i.p.:	intraperitoneal
L-OHP:	oxaliplatin
MNCV:	motor nerve conduction velocity
N.S.:	not significant
OIPN:	oxaliplatin induced peripheral neuropathy
PB:	phosphate buffer
PBS:	phosphate buffered saline
PBS-T:	0.1% Triton-X100 phosphate buffered saline
PFA:	paraformaldehyde
PDE5:	phosphodiesterase type 5
QOL:	quality of life
ROS:	reactive oxygen species
SNCV:	sensory nerve conduction velocity
SEM:	standard error of mean
TRPA1:	transient receptor potential ankyrin 1
TDF:	tadalafil
Veh:	vehicle

第一章

オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルマウスの 作製と評価系の確立（要約）

L-OHPによるCIPN動物モデルはこれまでも多数報告されている。しかしこれらは、L-OHPの単回または数回の反復投与によるものが多く、機械刺激や温度刺激に対する過敏応答（疼痛）は生じるものの、CIPN患者で見られる感覚障害や神経伝導速度の低下等が認められない、あるいは評価されていないことが多い(1-4)。そのため、ヒトへの外挿性が低いことが問題点として挙げられる。そこで本研究では、これら感覚障害や神経伝導速度を評価できるCIPN動物モデルとその評価方法を確立するため、L-OHPの用量や投与間隔、投与期間等を再検討するとともに、痛みだけでなく感覚障害を評価できる行動試験、神経伝導速度などの生理学的試験、組織学的検討などを組み合わせ、CIPNを総合的に評価した。L-OHP (5 mg/kg) の数回の腹腔内投与により、既報通り、機械過敏応答（von Freyフィラメントテスト）や冷過敏応答（アセトンテスト）が認められたが、熱感覚障害（Hargreavesテスト）や神経伝導速度の低下、神経軸索の変性等は認められなかった。一方、比較的高用量のL-OHP (10 mg/kg) を週1回8週間反復腹腔内投与したモデルでは、投与初期から持続的な機械過敏応答や冷過敏応答が誘発されるだけでなく、投与6~8週後から熱感覚障害や触覚障害（adhesive removalテスト）が認められた。またこれらの異常感覚に対して、神経障害性疼痛治療薬としてCIPN患者にも用いられるCa²⁺チャネル $\alpha\delta$ サブユニット阻害薬プレガバリンおよびセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬デュロキセチンの効果を検討したところ、誘発痛である機械過敏応答や冷過敏応答は有意に抑制されたが、熱感覚障害に対する効果は認められなかった。また、L-OHP反復投与8週間後には、神経伝

導速度の低下、神経軸索変性といった所見が観察された。以上、今回のL-OHPの用量・投与スケジュールであれば、CIPN患者と同様、疼痛だけでなく感覚障害も誘導され、感覚神経の機能障害や、神経軸索障害などの組織学的所見も観察できるCIPNを評価するのに適した動物モデルおよび評価系になると考えられる。

第二章

オキサリプラチン誘発末梢神経障害モデルにおける 血管拡張薬の有効性の評価

これまで、CIPNの予防/治療薬開発を目指し、グルコン酸カルシウム/硫酸マグネシウム製剤、牛車腎気丸、グルタチオン、活性酸素種（ROS）スカベンジャー、各種イオンチャンネル阻害薬などが基礎および臨床研究双方から探索されてきた（5-8）。しかし、未だ効果的な予防/治療薬の開発には至っていない。ガイドライン等で推奨されるデュロキセチンも、CIPNの痛みには有効性が示されているものの、しびれや感覚障害に対する有効性が示されているわけではなく、また神経障害そのものに対して予防あるいは治療効果を示すものではない（9）。これらの問題を解決するため、著者は第一章において、L-OHPによる末梢神経障害動物モデル及び評価系を改良し、痛みだけでなくCIPNの主症状である感覚障害を検出できるL-OHP誘発末梢神経障害モデルと一連の新規評価系を構築した。本章では作製したL-OHP誘発末梢神経障害モデルとその評価系を用いて、疼痛だけでなく、感覚障害や神経機能障害、神経軸索障害などに対しても有効性を示す予防/治療薬の候補となる薬剤を探索することを目的とした。

一方、末梢血流量が一定時間低下すると、四肢のしびれ、痛みなどの異常感覚が発生するとともに、感覚障害などが生じる（10-11）。このような症状は、末梢閉塞性動脈疾患（閉塞性動脈硬化症、閉塞性血栓性血管炎、レイノー病など）、糖尿病などの疾患でも認められ、その治療には主に末梢血管拡張薬や漢方薬などによる薬物治療、理学療法、ときに血行再建など手術療法などが行われる（12-14）。また、末梢神経の伝導速度は末梢温の低下により遅延し、末梢温の上昇により回復することが知られている（15）。このように、末梢血流障害と異常感覚は密に関連すると考えられ、実際、

糖尿病患者および糖尿病モデル動物の末梢神経障害は、血管の機能低下が先行して生じ、糖尿病性の末梢神経障害の重症度の早期診断マーカーおよび予測因子となる(16-17)。また、糖尿病性神経障害モデル動物では、末梢神経幹内の微小血管障害が観察されること(16-19)、ホスホジエステラーゼ(PDE)阻害薬、プロスタグランジン類似体、エンドセリン(ET)受容体拮抗薬などの血管拡張薬が末梢血流障害を改善するだけでなく、疼痛や神経機能障害、神経変性などを軽減することが報告されている(13)。これらの知見は、血管拡張薬によって末梢血流障害を改善することにより、末梢神経障害を予防または治療できる可能性を示唆している。

一方、CIPNと末梢血流障害の関連を示唆する報告は少ないが、CIPNの症状緩和に、末梢循環改善薬や血流を改善する漢方薬、温熱療法などが用いられることがある(19)。また、L-OHPをマウスに投与すると末梢血流が低下することも報告されており(20-21)、CIPNにおいても末梢血流障害が末梢神経障害に寄与している可能性がある。しかし、L-OHP誘発蓄積性末梢神経障害モデルで認められる痛みや感覚障害、神経機能障害、神経軸索障害に対する血管拡張薬の効果に関する詳細な検討は未だ報告されていない。そこで本章では、L-OHPによる蓄積性末梢神経障害モデルで、末梢血流障害が末梢神経障害に関わっているとの仮説のもと、血管拡張作用を有する医薬品からCIPN予防/治療薬候補を探索するドラッグ・リポジショニング研究を実施した。

実験方法

1) 実験動物

実験には雄性の C57BL/6J 系マウス (生後 6-7 週齢; 日本 SLC、静岡) を使用した。全てのマウスは $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクルの条件下で飼育し、エサ及び水は自由に摂取させた。実験は全て、京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

2) 使用薬物

オキサリプラチン (L-OHP) は和光純薬工業 (大阪、日本) から購入し、5% グルコース溶液に用事調製した。PDE5 阻害薬タダラフィルは Combi-Blocks (San Diego, CA, USA) から購入し、10% ジメチルスルホキシド (DMSO) および 20% ポリエチレングリコール 400 (ナカライテスク、京都、日本) 溶液に溶解した。プロスタグランジン E₁ 製剤リマプロストアルファデックス (小野薬品株式会社、大阪、日本) および ET 受容体拮抗薬ボセンタン (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) は生理食塩水に溶解した。タダラフィル (i.p.)、リマプロストアルファデックス (p.o.)、およびボセンタン (i.p.) は、それぞれ行動試験の 1 時間前、30 分前、および 4 時間前に投与した。また、0.1% (w/w) タダラフィルを含有する MF 固形飼料はオリエンタル酵母工業株式会社 (東京、日本) にて製造し、L-OHP 投与前日より 8 週間、通常の MF 固形飼料の代わりにマウスに与えた。

3) L-OHP 誘発末梢神経障害モデル

L-OHP (10 mg/kg) あるいは対照として 5% グルコース溶液を週 1 回 8 週間にわたって腹腔内投与し、投与開始 8 週間まで評価を行うモデルを作製した。

4) 後肢血流の測定

小型レーザードップラー血流センサー (RBF-101; Pioneer, Tokyo) を使用して、後肢の足底表面の皮膚を通る血流を、非麻酔下で測定した。各マウスを固定シリンダー (Medical Agent, 京都) で拘束し、測定用プローブを足底表面に取り付け測定した。少なくとも 30 秒間、3 回連続して測定し、これらの測定値を平均し、末梢血流量として算出した。

5) マウス皮膚温および直腸温の測定

マウス後肢の足底表面の皮膚温と直腸温を、皮膚表面プローブと直腸温プローブを接続した温度計 (BAT-10 多目的温度計; Physitemp Instruments, Clifton NJ, USA) を用いて、非麻酔下で測定した。皮膚表面プローブはマウス後肢足底に密着させた上で固定し、直腸温プローブはマウス肛門から約 1 cm 刺入し、少なくとも 30 秒以上測定した。これらの測定値を平均し、皮膚温と直腸温の平均温度として算出した。

6) 行動学的評価

von Frey フィラメントテスト

非侵害性機械刺激に対する過敏反応は、刺激強度の異なる 7 本 (0.008, 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 1.0 g) の von Frey フィラメント (Stoelting, Wood Dale, IL) を用いた up-down 法に従い測定した (22)。穴のあいた金属板の上にアクリル性の囲い (株式会社山本製作所) を置き、その中でマウスを 60 分以上馴化させた後、測定を行った。0.16 g のフィラメントから開始し、フィラメントをわずかに曲がる程度の強さで約 1 秒間、マウス後肢足底面に当てる操作を 5 回繰り返し 1 試行とした。フィラメントをあてた際、反応を示さなければ 0 点、後肢を持ち上げれば 1 点、後肢を激しく振る、あるいは舐めれば 2 点とスコアを付け、各試行でスコアの合計が 5 点以上であれば 1 段階弱いフィラメントを、4 点以下であれば 1 段階強いフィラメントを選択して試行を繰り返し、最初に半数以上の逃避行動を示す、あるいは 2 回目以降に半数以下の逃避

行動を示したフィラメントから 4 回の試行を繰り返して、50%逃避行動閾値を算出した (23)。

アセトンテスト

冷刺激に対する過敏反応の評価はアセトンテストを用いた (24-25)。各マウスは、試験前に金属板の上にアクリル製の囲い (株式会社山本製作所、京都) を置き、その中でマウスを 60 分以上馴化させた後、測定を行った。マウス後肢足底に 10 μ L のアセトン (和光純薬、大阪) を後足の足底皮膚に塗布することによって冷刺激を与え、後肢をなめる、振るなどの逃避行動の回数を、アセトン塗布後 60 秒間計数した。

Hargreaves test

熱性侵害刺激に対する受容閾値の測定は Hargreaves radiant heat apparatus (UGO BASILE) を用いて行った。ガラス板の上に設置したアクリル製の囲い (株式会社山本製作所) にマウスを入れ、1 時間以上馴化させた後、測定を行った。正常マウスが 10 秒前後で逃避行動を示すように赤外線熱刺激の強度を設定した。マウス足底に赤外線を照射し、逃避行動を示すまでの時間を測定した。この試行を 3 回行い、3 回の測定時間の平均値を赤外線熱刺激に対する反応潜時とした。後肢の火傷による傷害を防ぐため、cut off time は 30 秒とした。

電流知覚閾値の測定

電流刺激に対する感受性は、電流知覚計測装置 Neurometer CPT/C (Neurotron Inc. Baltimore, MD, USA) を用いて評価した (22)。マウス後足の毛を剃り、ボールマンケージ (直径 3 cm; 長さ 10 cm, 夏目製作所, 京都) に入れて保定し、30 分馴化させた後、測定を開始した。刺激電極を足底表面に取り付け、3 種類の正弦波パルス (5、250、および 2,000 Hz) を含む経皮電流刺激を適用した。各刺激の強度を 0 mA から徐々に上昇させ、足を振る、引っ込めるなどの逃避行動を起こした電流 (mA)

を反応閾値とした。各周波数で3回測定し、これらの測定値の平均を電流知覚閾値とした。測定はマニュアルモードで行った。

7) マウス尾の神経伝導速度の測定

マウス尾の神経伝導速度の測定は、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下で行った。測定はデジタル温度調節器 (TC-1000; AS ONE、大阪) によって 37°C に維持した加熱パッド上で行った。刺激装置 (STG4002; Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany) に接続したステンレス製の電極をマウスの尾に挿入し、電気刺激を与えた。感覚神経および運動神経の伝導速度は、それぞれ尾の遠位および近位部分を刺激し、刺激誘発反応を記録することにより評価を行った。参照電極は尾の付け根に挿入した。誘発された神経活動電位をアンプ (EX-1; AD Instruments, Milford, MA, USA) により増幅し、LabChart8 ソフトウェア (AD Instruments) を用いて PowerLab 4/26 (ML-846; AD Instruments) にて記録した。神経活動電位の潜時は、刺激の開始から電位のピークまでの時間とし、2つの記録部位間の距離を近位および遠位記録部位の潜時の差で割ることにより感覚神経および運動神経の伝導速度を算出した。神経伝導速度は15回測定を行い、その平均値とした。

8) 電子顕微鏡観察による坐骨神経形態評価

マウスをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて開胸し、phosphate-buffered saline (PBS) 10 mL を経心灌流することで脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) を含む 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) で経心灌流し、全身を固定した。その後、坐骨神経を採取し、2% glutaraldehyde および 4% PFA を含む 0.1 M PB 溶液で 4°C で一晩固定し、1% 四酸化オスミウム溶液中、4°C で2時間、後固定した。次に、これらのサンプルをエタノールで段階的に脱水し、Luveak 812 (Nacalai Tesque) に包埋した。厚さ 70 nm の坐骨神経切片を作製し (京都大学大学院

医学研究科附属総合解剖センター 電子顕微鏡室に依頼)、透過型電子顕微鏡 (H7650; Hitachi, Tokyo) で撮影を行った。1つの切片からランダムに5視野撮影を行い、解析に用いた。神経軸索の円形度は、画像解析ソフト MetaMorph を使用して次のように分析を行った。

$$\text{軸索円形度} = (4\pi \times \text{area of axon}) / (\text{perimeter of axon})^2$$

円形度が1の場合は円に相当し、0の場合は直線を表している。軸索は、円形度>0.7、円形度0.5~0.7、円形度<0.5の3群に分類し、全軸索数に対するそれぞれの群が占める軸索数の割合を算出した。

9) 免疫組織化学

マウスをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて開胸し、PBSを10 mL 経心灌流することで脱血した後、4% PFA を含む 0.1 M PB で経心灌流し、全身を固定した。その後、坐骨神経を採取し、4% PFA で4℃にて4時間、後固定した。次に15% sucrose を含む PBS 中で4℃にて一晩静置し、ティシュー・テック O.C.T コンパウンド (Sakura Fintek USA, Torrance, CA, USA) に包埋後、-80℃にて凍結させた。凍結ミクロトーム (Leica CM 1850; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて厚さ 6 μm の凍結切片を作製し、MAS コート付きスライドガラス (松浪硝子工場株式会社、大阪) に接着させ、凍結切片を風乾後、-80℃で凍結保存した。切片をブロッキングバッファー (5% ヤギ血清を含む 0.1% Tween 20 in PBS (PBS-T) ; Vector Laboratories, Burlingame, CA) で室温で1時間ブロッキングを行った後、一次抗体液中で4℃で一晩反応させた。一次抗体として、rat monoclonal anti-mouse CD31 antibody (1:100, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) を PBS-T で希釈して用いた。PBS による洗浄後、遮光し、二次抗体液中で室温にて1.5時間反応させた。二次抗体として、goat anti-rat IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (1:500; Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) を PBS-T に希釈して用いた。PBS で洗浄後、VECTASHIELD を用いて封入した。乾燥後、共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i confocal microscope, オリンパス株式会社) により坐骨神経断面の画像を撮影した。坐骨神経切片は 60 μm 以上間隔をあけて作製し、その中から 3 つ切片を選択し、コンピューター支援システム (Image J) によって画像分析を行った。CD31 免疫反応性血管の総数をカウントし、坐骨神経断面積で割って密度 (血管本数/ mm^2) を算出した。

10) 細胞生存率評価

ヒト癌細胞株である HCT116 (ヒト結腸癌細胞株) および AGS (ヒト胃腺癌細胞株) は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入した。細胞は、10% 熱非動化ウシ胎児血清および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した培地を用いて、5% CO_2 、37°C の条件下で培養した。70% のコンフルエンスに達した後、タダラフィル (1, 3, および 10 μM) の存在下または非存在下で、L-OHP (10 μM) を処置した。24 時間のインキュベーション後、培地を、37°C で 45 分間、0.05 mg/mL 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 溶液を含む培地と交換し、150 μL の dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。次に、波長 560/630 nm の光に対する吸光度をマイクロプレートリーダー (MAXline, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) で測定した。細胞生存率は、対照群に対する相対値で表した。

11) 白金濃度測定

マウスをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg , i.p.) にて麻酔し、眼窩静脈叢から血液を採取した後、後根神経節 (DRG) と坐骨神経を顕微鏡下で速やかに採取した。採取した血液サンプルの一部を 1.5 mL の遠心管に移し、4°C、15 分間、3,000 rpm で遠心分離した。組織サンプルは蒸留水で洗浄後、水分を吸い取り乾燥させ、重量を測定した。次に、各血清サンプル (10 μL) と組織サンプルを 60% 硝酸 1 mL に入れ、室温で一晩放置した。翌日、組織をドラフト内の密閉容器で 90°C で 2 時間加熱する

ことで灰化させ、その後、蒸留水を使用して、メスフラスコでサンプル量を 10 mL に調整し、Agilent 7700x ICP-MS システム (Agilent Technologies、日本) にて測定を行った。分析は m/z 195Pt を対象とし、白金の定量の下限と上限は、それぞれ 500 pM と 5 μ M であった。

12) 統計解析

値は全て、平均値 \pm 標準誤差 (S.E.M.) で表記した。二群間の差は Student's t-test により、三群以上の差は、one-way あるいは two-way ANOVA に続く Tukey post hoc test を用いて解析した。von Frey フィラメント試験の 50% 反応閾値の統計解析には Mann-Whitney U 検定または Kruskal-Wallis 検定とそれに続く Dunn's post hoc test を使用した。P < 0.05 の差を統計的に有意であると判定した。

実験結果

第一節 L-OHP 誘発末梢血管障害および冷過敏応答に対する血管拡張薬の急性効果

L-OHP または vehicle を週 1 回 4 週間反復投与したマウス後肢の皮膚血流を測定した。その結果、マウス皮膚血流量は、L-OHP (10 mg/kg, i.p.) を繰り返し投与することにより、vehicle 投与群と比較して有意に減少した。そこで、L-OHP により低下した皮膚血流に対する各種血管拡張薬の単回投与による効果を検討した (Fig. 2-1A)。PDE5 阻害薬タダラフィル (10 mg/kg)、プロスタグランジン E₁ 製剤リマプロストアルファデクス (0.3 mg/kg)、あるいは ET 受容体拮抗薬ボセンタン (30 mg/kg) を単回投与することにより、L-OHP により低下した皮膚血流は、血管拡張薬投与前と比較していずれも有意に増加した。また、PDE5 阻害薬タダラフィルは、vehicle を反復投与した対照群においても、皮膚血流量を有意に増加させた。

L-OHP 投与 5 週後のマウスでは、アセトン塗布により冷刺激を与えることによって冷過敏応答が惹起した。この L-OHP による冷過敏応答は、タダラフィル (10 mg/kg)、リマプロストアルファデックス (0.3 mg/kg)、あるいはボセンタン (30 mg/kg) の単回投与によって、いずれも有意に抑制された (Fig. 2-1B)。一方、von Frey フィラメントによる機械刺激に対する 50% 反応閾値は、L-OHP 投与 6 週後のマウスにおいて有意に低下したが、この機械過敏応答はタダラフィル (10 mg/kg) を単回投与しても有意な変化は見られなかった (Fig. 2-1 C)。

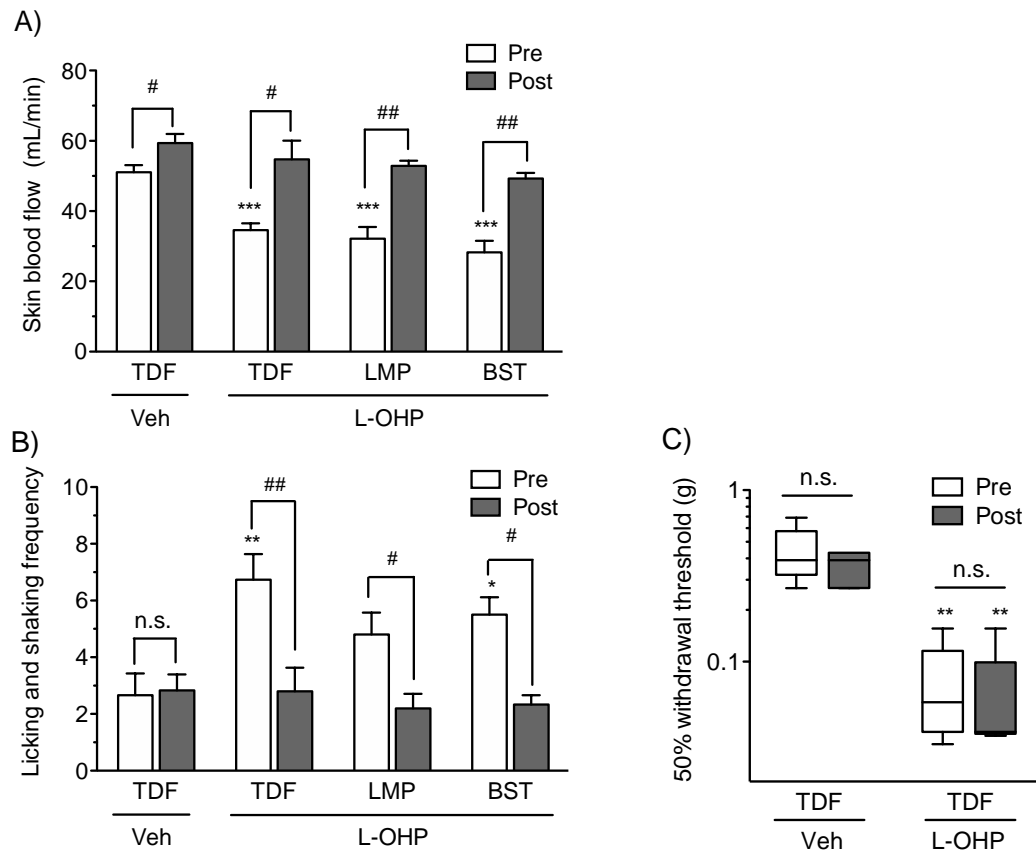


Fig. 2-1. Acute effects of vasodilators on L-OHP-induced peripheral vascular impairment and peripheral neuropathy. Oxaliplatin (L-OHP; 10 mg/kg) or its vehicle (Veh) was injected intraperitoneally once a week for 4–6 weeks. Skin blood flow in the hind paw (A) and cold sensitivity (B) were assessed before (pre) and after (post) administration of tadalafil (TDF; 10 mg/kg, i.p., 1 h before testing), limaprost alfadex (LMP ; 0.3 mg/kg, per os, 0.5 h before testing), or bosentan (BST ; 30 mg/kg, i.p., 4 h before testing) 4 and 5 weeks after the repeated injections, respectively. Skin blood flow (mL/min) in the hind paw was measured by using a small laser Doppler blood flow sensor. The frequency of cold-escape behaviors (licking and shaking) were measured for 60 s in response to an application of acetone. The results are expressed as means \pm S.E.M. (n = 4–6). **P < 0.01, ***P < 0.001 compared with the pre-values of vehicle-treated mice (unpaired t test); #P < 0.05, ##P < 0.01 (paired t test); n.s., not significant. (C) The 50% withdrawal thresholds to mechanical stimulation with von Frey filaments were measured before (pre) and 1 h after (post) an administration of tadalafil (TDF; 10 mg/kg, i.p.) after 6 weeks of repeated injections of vehicle or L-OHP (n = 5–6). **P < 0.01 compared with the pre values of vehicle-treated mice (Mann-Whitney U-test).

第二節 L-OHP 誘発末梢血流障害に対するタダラフィル長期投与の効果

第一節で用いた 3 種類の血管拡張薬のうち、最も血中半減期が長く、血管拡張作用が長時間持続する PDE5 阻害薬タダラフィルを以降の検討に用いた。タダラフィル長期投与による L-OHP 誘発末梢神経障害への影響を検討するため、0.1% タダラフィルを含有する飼料を作製し、L-OHP を投与する 1 日前から継続して与えた。本節では、まず、このタダラフィルの長期投与が L-OHP の血中濃度や組織蓄積に影響を与えないことを確認するため、L-OHP (10 mg/kg, i.p.) 投与開始 8 週後のマウスの血液、および、坐骨神経、DRG の白金濃度あるいは含有量を測定した。その結果、通常飼料を与えた対照群と比較して、白金の血漿中濃度、また、坐骨神経および DRG での白金蓄積量に有意な差は見られなかった (Table 2-1)。

次に、L-OHP 反復投与によるマウスの体重減少に対するタダラフィル長期投与の効果を検討した。Vehicle を反復投与した対照群においては、マウスの体重は 8 週間後まで経時的に増加したが、L-OHP (10 mg/kg, i.p.) を反復投与した群では体重の増加は認められず、対照群と比較して有意に減少した。しかし、タダラフィルの長期投与は、対照群および L-OHP 反復投与群の体重変化に影響を与えなかった (Fig. 2-2A)。

次に、L-OHP 反復投与によって誘発される末梢血流障害に対するタダラフィル長期投与の効果を検討した。Vehicle を反復投与した対照群においては、マウス後肢の皮膚血流量に変化は認められなかったが、L-OHP (10 mg/kg, i.p.) を反復投与した群では、徐々に皮膚血流量が減少し、L-OHP 投与 4 週から 8 週後において有意な減少が認められた。この L-OHP による皮膚血流量の減少は、タダラフィル長期投与により、通常飼料を与えた群と比較して有意に抑制された (Fig. 2-2B)。同様に、L-OHP 反復投与群では、投与 8 週後に後肢の皮膚温度の有意な低下が認められたが、この皮膚温度の低下は、タダラフィル長期投与によって有意に抑制された (Fig. 2-2C)。

Table 2-1. Effect of tadalafil on platinum concentration or accumulation in blood, sciatic nerves and dorsal root ganglia in oxaliplatin-treated mice.

	Platinum concentration (nmol/g or nmol/mL)	
	L-OHP	L-OHP + TDF
Blood	0.85 ± 0.15	0.92 ± 0.11
Sciatic nerve	4.21 ± 0.72	5.66 ± 1.31
DRG	5.55 ± 0.69	6.45 ± 0.15

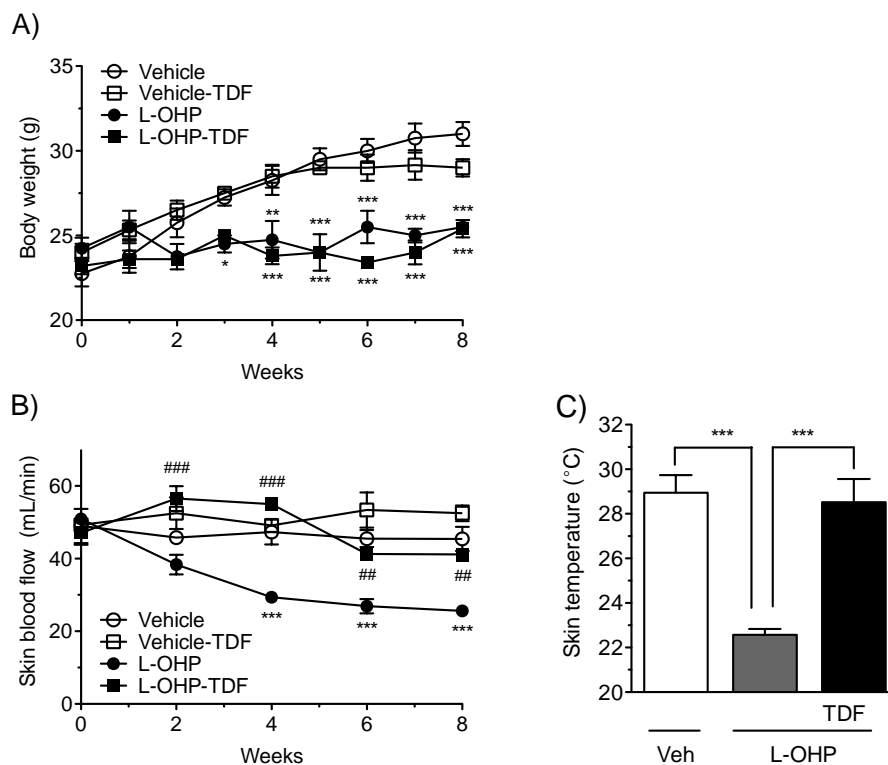


Fig. 2-2. Effects of tadalafil and L-OHP on body weight and peripheral vascular impairment. L-OHP (10 mg/kg) or its vehicle (Veh) was injected i.p. once a week for 8 weeks, during which mice were fed normal chow or a chow diet containing 0.1% tadalafil (TDF). Body weight (A) and skin blood flow through the hindpaw (B) were measured before and weekly or biweekly (n = 4–6). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 compared with the vehicle-treated mice without tadalafil; ###P < 0.01, ###P < 0.001 compared with the L-OHP-treated mice without tadalafil (Tukey’s post hoc test following two-way repeated measured ANOVA). (C) Skin temperature in the hind paw was measured after 8 weeks of repeated injections (n = 8). ***P < 0.001 (Tukey’s post hoc test following one-way ANOVA). The results are expressed as means ± S.E.M.

第三節 L-OHP 反復投与による冷過敏応答、機械過敏応答、電流過敏応答および熱痛覚障害に対するタダラフィル長期投与の効果

第一章で認められた L-OHP 誘発末梢神経障害の症状である冷過敏応答、機械過敏応答、電流過敏応答、また、熱痛覚障害に対するタダラフィル長期投与の効果を検討した。L-OHP (10 mg/kg, i.p.) の反復投与により、von Frey フィラメント刺激に対する 50% 反応閾値の低下 (機械過敏応答)、アセトン塗布に対する逃避行動の増加 (冷過敏応答) は、0.1% タダラフィル含有飼料をオキサリプラチン投与開始の 1 日前から与えることにより、いずれも有意に抑制された (Fig. 2-3A,B)。

同様に、5、250、および 2,000 Hz の電流刺激により、C 線維、A δ 線維、および A β 線維をそれぞれ選択的に刺激した際の電流知覚閾値は、8 週間の L-OHP 反復投与により有意に減少したが、タダラフィルの長期投与によりいずれも有意に抑制された (Fig. 2-3D-F)。

また、8 週間の L-OHP 反復投与により惹起される熱痛覚障害も、タダラフィルの長期投与により有意に抑制された (Fig. 2-3C)。

なお、Fig. 2-3 で示した結果のうち、vehicle 反復投与群と L-OHP 反復投与群のデータは、第一章で示したものと同一データを使用している。

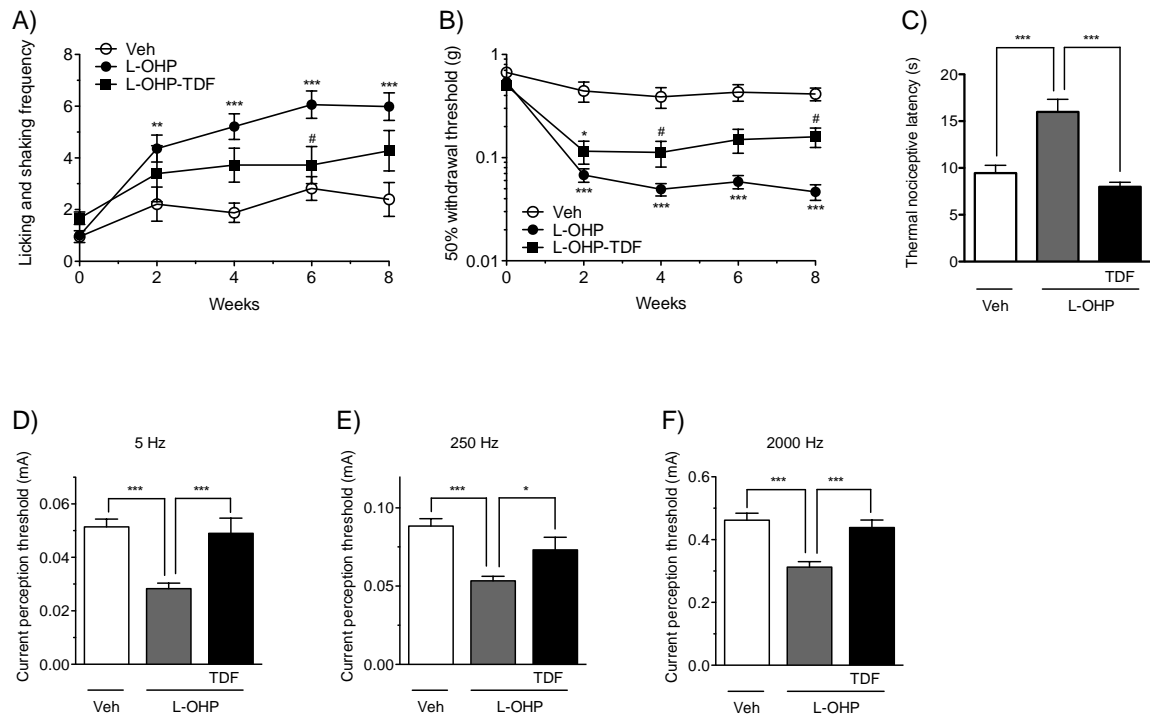


Fig. 2-3. Effects of tadalafil on L-OHP-induced cold, mechanical, and current hypersensitivities and thermal hypoesthesia. L-OHP (10 mg/kg) or its vehicle (Veh) was injected i.p. once a week for 8 weeks, during which mice were fed normal chow or a chow diet containing 0.1% tadalafil (TDF). Cold (A, $n = 6-11$) and mechanical (B, $n = 5-12$) sensitivities were assessed by acetone and von Frey filament tests, respectively, before injections and biweekly after. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ compared with the vehicle-treated mice without tadalafil; # $P < 0.05$ compared with the L-OHP-treated mice without tadalafil (A, Tukey's post hoc test following two-way repeated measured ANOVA; B, Dunn's post hoc test following Kruskal-Wallis test). (C) Thermal sensitivity was assessed by Hargreaves test after 8 weeks of repeated injections ($n = 5-8$). *** $P < 0.001$ (Tukey's post hoc test following one-way ANOVA). (D-F) The current perception thresholds (mA) eliciting paw withdrawal responses to the sine-wave pulses at 5 Hz (A; C fiber), 250 Hz (B; A δ fiber), and 2,000 Hz (C; A β fiber) were measured after 8 weeks of repeated injections ($n = 8-13$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Tukey's post hoc test following one-way ANOVA). The results are expressed as means \pm S.E.M.

第四節 L-OHP 反復投与による神経伝導速度の低下に対するタダラフィル長期投与の効果

第一章で認められた L-OHP 反復投与による神経伝導速度の低下に対するタダラフィル長期投与の効果を検討した。その結果、L-OHP 反復投与 8 週後のマウスの尾での感覚神経伝導速度の減少は、タダラフィルの長期投与により、有意に抑制された (Fig. 2-4A)。同様に、運動神経伝導速度も L-OHP 反復投与により低下し、タダラフィル長期投与によって抑制される傾向にあったが、有意な差は認められなかった (Fig. 2-4B)。

なお、Fig. 2-4 で示した結果のうち、vehicle 反復投与群と L-OHP 反復投与群のデータは、第一章で示したものと同一データを使用している。

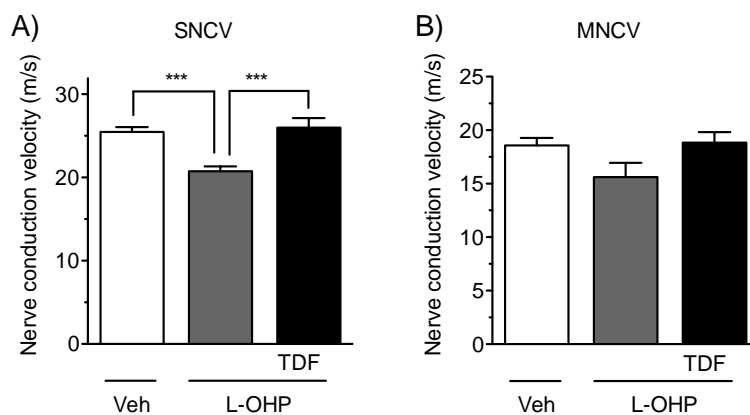


Fig. 2-4. Effect of tadalafil on L-OHP-induced decreases in nerve conduction. L-OHP (10 mg/kg) or its vehicle (Veh) was injected i.p. once a week for 8 weeks, during which mice were fed normal chow or a chow diet containing 0.1% tadalafil (TDF). Sensory (A) and motor (B) NCVs were measured in the mouse tails (n = 8–13). ***P < 0.001 (Tukey's post hoc test following one-way ANOVA). The results are expressed as means \pm S.E.M.

第五節 L-OHP 反復投与による坐骨神経内微小血管の減少に対する長期タダラフィル投与の効果

神経幹内には多数の微小血管が走行しており、末梢神経を栄養する役割を果たしているが、各種末梢神経障害モデルにおいて坐骨神経内微小血管の減少や形態変化が報告されている (16,26-28)。そこで、L-OHP (10 mg/kg, i.p.) 8 週間投与後のマウスの坐骨神経を摘出し、血管内皮マーカーである血小板内皮細胞接着分子 CD31 の免疫染色を行い、共焦点画像の定量分析を行った (Fig. 2-5A)。その結果、CD31 免疫陽性微小血管の密度が L-OHP 反復投与によって有意に減少し、その減少はタダラフィル長期投与によって有意に抑制された (Fig. 2-5B)。

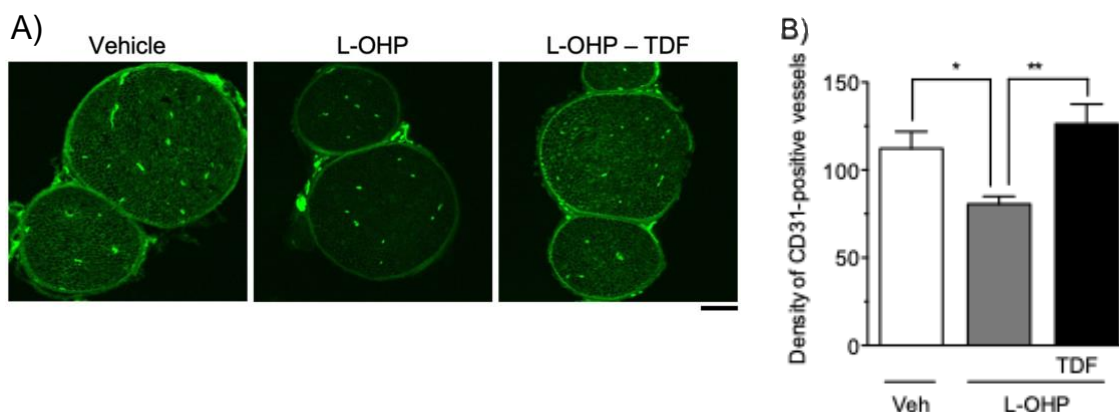


Fig. 2-5. Effect of tadalafil on L-OHP-induced decrease in the density of endoneurial microvessels in the sciatic nerve. L-OHP (10 mg/kg) or its vehicle (Veh) was injected i.p. once a week for 8 weeks, during which mice were fed normal chow or a chow diet containing 0.1% tadalafil (TDF). (A) Representative confocal fluorescence photographs of CD31-immunoreactive staining of endoneurial microvessels in cross-sections of sciatic nerves. Scale bar = 100 μ m. (B) Quantitative analysis of the density of CD31-immunoreactive vessels (number/mm²) (n = 5–11). *P < 0.05, **P < 0.01 (Tukey's post hoc test following one-way ANOVA). The results are expressed as means \pm S.E.M.

第六節 L-OHP 反復投与による神経軸索変性に対する長期タダラフィル投与の効果

第一章で認められた L-OHP 反復投与による神経軸索変性に対するタダラフィル長期投与の効果を検討した。その結果、L-OHP 反復投与 8 週後の円形度 0.5 以下の歪んだ形態の神経軸索の増加、および、円形度 0.7 を超える正常な形態の神経軸索の減少は、タダラフィル長期投与によって抑制する傾向が認められた (Fig. 2-6)。

なお、Fig. 2-6 で示した結果のうち、vehicle 反復投与群と L-OHP 反復投与群のデータは、第一章で示したものと同一データを使用している。

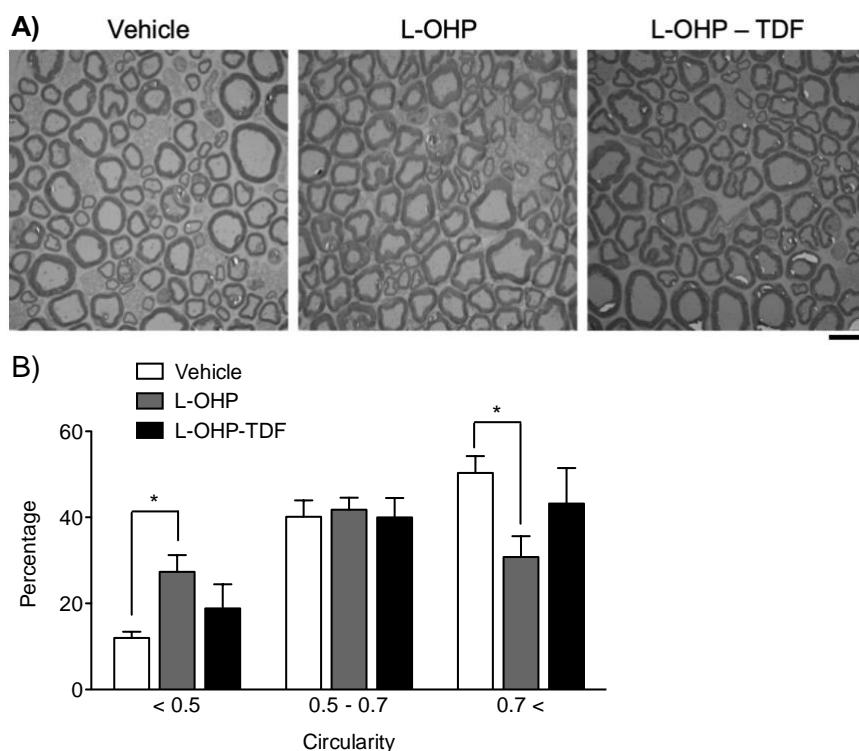


Fig. 2-6. Effect of tadalafil on L-OHP-induced axonal degeneration in the sciatic nerve. L-OHP (10 mg/kg) or its vehicle was injected i.p. once a week for 8 weeks, during which mice were fed normal chow or a chow diet containing 0.1% tadalafil (TDF). (A) Representative electron light micrographs of cross-sections of the sciatic nerves from vehicle- and L-OHP-treated mice with or without tadalafil. Scale bar = 10 μ m. (B) Quantitative analysis of the distribution of axon circularity in the sciatic nerves. The percentages of the myelinated fibers showing axon circularity >0.7 , between 0.5 and 0.7, and <0.5 are presented ($n = 7-10$). * $P < 0.05$ (Tukey's post hoc test following one-way ANOVA). The results are expressed as means \pm S.E.M.

第七節 L-OHP の細胞毒性に対するタダラフィルの直接的な影響

癌細胞に対する L-OHP の細胞毒性に対してタダラフィルが直接影響を与えないことを確認するため、MTT アッセイを実施した。ヒト結腸癌細胞株 HCT116 (Fig.2-7A) およびヒト胃腺癌細胞株 AGS (Fig.2-7B) の細胞生存率は、10 μ M L-OHP を 24 時間曝露することによりいずれも有意に低下した。一方、タダラフィル (1, 3, 10 μ M) を 24 時間処置しても、L-OHP を処置していないコントロール細胞の細胞生存率、および L-OHP 曝露によって低下した細胞生存率、いずれにも影響を与えなかった (したがって、タダラフィルは、L-OHP の細胞毒性に対して直接的に影響を与えないものと考えられる。

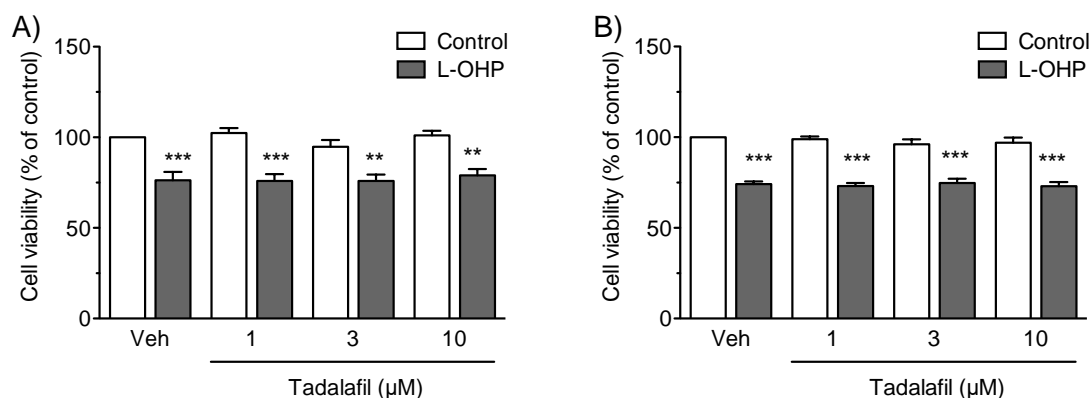


Fig. 2-7. Effect of tadalafil on L-OHP-induced cytotoxicity in cultured human cancer cell lines. HCT116 (A) and AGS (B) human cancer cell lines were incubated with vehicle (0.1% DMSO; control) or L-OHP (10 μ M) for 24 h in the presence or absence of tadalafil (TDF; 1–10 μ M). Then, the cell viability was measured by an MTT assay. The results are expressed as percentages relative to control cells (n = 4–5). **P < 0.01, ***P < 0.001 compared with the control cells (Tukey's post hoc test following two-way ANOVA). The results are expressed as means \pm S.E.M.

考察

本章では、第一章で構築した L-OHP 誘発蓄積性末梢神経障害モデルと一連の評価系を用いて、末梢血流障害を改善する血管拡張薬の単回投与により、本モデルで認められる症状のうち一部の症状（冷過敏応答）は抑制できること、また、血管拡張薬のうち PDE5 阻害薬タダラフィルの予防的な長期投与により、冷過敏応答だけでなく、機械/電流過敏応答、感覚障害や神経機能障害、軸索障害などに対して抑制作用を示し、CIPN の発症や進展そのものに対して予防効果を示すことを示した。

本研究で用いた動物モデルにおいて、L-OHP の累積投与量の増加とともに末梢血流が徐々に減少し、皮膚温度の低下が観察された。L-OHP による末梢血流障害のメカニズムは未だ不明な点が多いが、L-OHP によって直接のおよび間接的に引き起こされる血管内皮障害や機能障害が、末梢血流障害を引き起こす可能性が報告されている(29-31)。本研究で用いたモデルでは、機械過敏応答が投与初期から観察期間中、常に観察されたが、冷過敏応答は投与初期から観察されたものの L-OHP の累積投与量の増加とともに徐々に悪化し、末梢血流障害の進行と平行していると考えられる。本モデルで観察された投与初期からの冷過敏応答は、末梢血流障害や皮膚温の低下よりも、L-OHP に特徴的な症状である急性冷過敏応答が関与している可能性がある(32-34)。この急性冷過敏応答は L-OHP の代謝産物であるオキサレートが、冷感受性侵害受容器である transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) を間接的に感作することによって惹起されることが報告されている(34-35)。本研究では、血管拡張薬であるタダラフィル、リマプロストアルファデックス、およびボセンタンは、単回投与でも末梢血流を改善するとともに冷過敏応答を抑制することを示した。これらの結果は、末梢血流の増加によって冷過敏応答を軽減できることを示している。これまでに、末梢血流障害に起因する低酸素負荷が、糖尿病性末梢神経障害および後肢虚血マウスモデルで TRPA1 を感作することが報告されている(36-37)。したがって、冷過敏応答に対する

血管拡張薬の急性効果は、末梢血流障害の改善により、低酸素によって誘発された TRPA1 の感作を抑制することが原因であると推察される。一方、タダラフィルの単回投与は、以前の糖尿病性神経障害および後肢虚血マウスモデルの報告と同じく(36-37)、機械過敏応答に効果を示さなかった。L-OHP による機械過敏応答は、末梢血流障害が直接的な原因となっているのではなく、他の原因、例えば、末梢神経のミトコンドリア障害により産生される ROS (38-40) やマクロファージから遊離される high mobility group box 1 (HMGB1) (41) などが関与しているのかもしれない。

本研究では、タダラフィルの予防的長期投与によって、L-OHP によって引き起こされる末梢血流障害や末梢温低下が改善されるだけでなく、機械、冷、電流刺激による過敏応答といった疼痛反応、さらに、熱痛覚障害、神経伝導速度低下や坐骨神経内微小血管の減少、軸索変性などを含む様々な所見が抑制されることを明らかにした。ただし、タダラフィルによって L-OHP の血中濃度や組織への蓄積量に変化は見られず、これらの効果は L-OHP の分布変化によるものではないと考えられる。第一章でも示したように、CIPN の治療に使用されるデュロキセチンやプレガバリンはこのような感覚障害には効果を示さず、CIPN に対する予防効果も報告されていない(42)。したがって、タダラフィルの長期投与は単なる症状緩和ではなく、末梢血流の改善によって末梢神経障害の進行を抑制し、その結果、冷過敏応答だけでなく機械過敏応答や感覚障害、神経機能障害等をも抑制したと考えられる。

糖尿病性神経障害モデルなどで、坐骨神経内微小血管機能の障害が、神経周囲の低酸素や低栄養状態を引き起こし末梢神経障害の進展に寄与することが報告されている(27)。また、酸化ストレスの増加はさらなる神経幹内微小血管機能障害を引き起こすと考えられ(16,28)、L-OHP 誘発神経毒性の進行に寄与する可能性がある。本研究でも、L-OHP 投与により末梢神経内における微小血管が減少し、タダラフィルの長期投与により抑制されること示した。神経周囲の低酸素、低栄養状態の予防によって神経幹内環境を保護することにより、坐骨神経の神経機能障害や軸索変性の進展を抑制した可能性がある。

以上、本章において、PDE5 阻害薬タダラフィルによる末梢血流障害の改善が、冷感過応答を抑制するだけでなく、その予防的投与により CIPN の進行を防ぎ、感覚異常、神経機能障害、および神経軸索変性をも抑制することを示した (Fig. 2-8)。またタダラフィルは *in vitro* における実験で L-OHP の抗腫瘍効果に影響を与えなかった。そのため、タダラフィルなどの血管拡張薬は治療/予防薬の候補となることが示唆される。

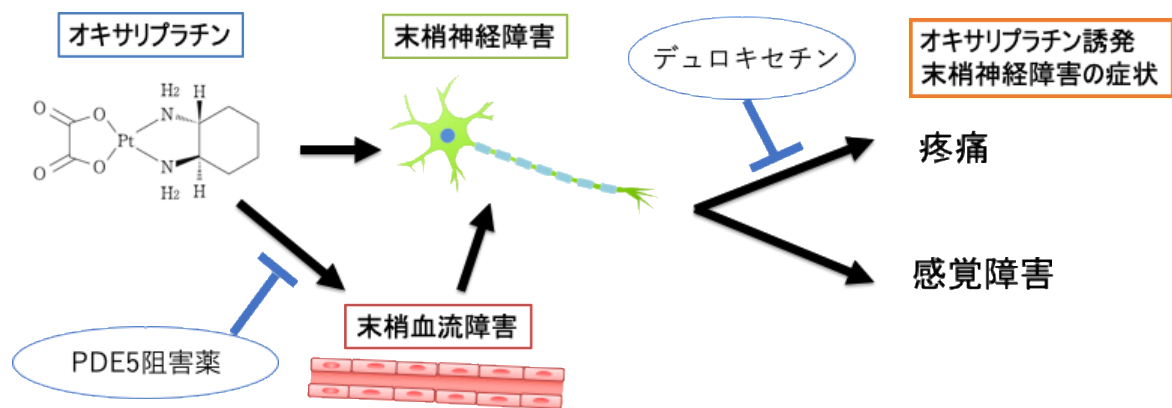


Fig. 2-8. Effect of tadalafil on L-OHP-induced peripheral neuropathy. Improvement of peripheral vascular impairment by tadalafil, a PDE5 inhibitor, alleviates cold hypersensitivity and prevents the progression of peripheral neuropathy, resulting in inhibition of abnormal sensations, neurological dysfunction and morphological neurodegeneration.

結論

以上、二章にわたり、著者はオキサリプラチンによる末梢神経障害モデル評価系の確立と治療薬の探索を目的とした検討を行い、以下の結論を得た。

第一章 オキサリプラチンによる CIPN 動物モデル及び評価系を改良し、痛みだけでなく CIPN の主症状である感覚障害や神経機能障害等を検出できる投与スケジュールと一連の評価系を構築した。

第二章 血管拡張薬であるタダラフィルが、過敏応答だけでなく、感覚障害や神経機能障害にも効果を示すことを見出し、オキサリプラチンの反復投与によって生じる末梢血流障害が、CIPN の増悪に寄与していることを明らかとした。

以上、本研究において、L-OHP による CIPN 動物モデル及び評価系を改良し、痛みだけでなく CIPN の主症状である感覚障害（しびれ・感覚障害など）を検出できる L-OHP 投与スケジュールと一連の新規評価系を構築した。さらに、これらの手法を用いて、L-OHP の反復投与によって生じる末梢血流障害が、CIPN の発症や進行に寄与していることを明らかとし、血管拡張薬により末梢血流障害を改善することで末梢神経障害が抑制されるという新たな治療戦略を提唱した。本研究で用いた血管拡張薬は、現在、臨床使用されている既承認医薬品であり、本研究成果は L-OHP による CIPN に対する有効な予防/治療薬の開発に直結すると考える。

論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Ogihara T, Nakagawa T, Hayashi M, Koyanagi M, Yonezawa A, Omura T, Nakagawa S, Kitada N, Imai S, Matsubara K

Improvement of peripheral vascular impairment by a phosphodiesterase type 5 inhibitor tadalafil prevents oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in mice.

J Pharmacol Sci 141: 131-138 (2019)

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会に与えて頂き、終始懇切な御指導とご鞭撻賜りました京都大学医学部附属病院薬剤部薬剤部 松原 和夫 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、研究遂行や論文作成にあたり直接御指導を賜り、終始多くの有益な御助言をいただきました京都大学医学部附属病院薬剤部 中川 貴之 准教授、今井 哲司 講師に心から感謝の意を表します。また、終始多くの有益な御助言をいただきました京都大学医学部附属病院薬剤部 米澤 淳 准教授、中川 俊作 助教、佐藤 夕紀 助教、糸原 光太郎 助教に深く感謝いたします。また、終始多くの有益な御助言をいただきました神戸大学医学部附属病院薬剤部 大村 友博 准教授に心から感謝の意を表します。また多くの有益な御助言をいただきました京都大学大学院薬学研究科 宗可奈子 助教、三宅 崇仁 助教に心から感謝いたします。本研究の遂行に当たり、共同研究者として本研究に多大なるご協力いただきました京都大学医学部附属病院薬剤部 小柳 円花 学士、林 真穂 さん、吉田 圭織 さんに心から感謝いたします。また、研究生活において御指導、御助言をいただきました大谷 祐基 博士、勇 昂一 博士、張 昀鵬 修士、近藤 美貴 学士をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。そして、日々の研究生活において互いに切磋琢磨し合えた、鄭 有奈 学士、辻 光貴 学士、宮山 大 学士、中里 唯 学士、緋山 遥 修士、助石 有沙美 学士、谷口 あい 学士、金 叢芸 修士、Ntogwa Mpumelelo 修士、平岩 怜 学士、松本 真有奈 学士、清水 佑美 学士、鈴木 茉莉 学士、増井 翔 学士、矢野 佑一 学士、幾田 慧子 学士、香川雅登 くん、岩満 優輝 くん、西郷 雅美子 さんをはじめとする京都大学医学部附属病院薬剤部、京都大学大学院生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう支えてくださった父 正人、母、寿美子、妹 晴菜、沙也香、祖父 寛、祖母 りよ、そして妻 みさきに心から感謝いたします。

引用文献

1. Kono T, Suzuki Y, Mizuno K, Miyagi C, Omiya Y, Sekine H, Mizuhara Y, Miyano K, Kase Y, Uezono Y. Preventive effect of oral goshajinkigan on chronic oxaliplatin-induced hypoesthesia in rats. *Sci Rep.* 5:16078, 2015.
2. Cavaletti G, Tredici G, Petruccioli MG, Dondè E, Tredici P, Marmiroli P, Minoia C, Ronchi A, Bayssas M, Etienne GG. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur J Cancer.* 18: 2457-2463, 2001.
3. Ling B, Coudoré-Civiale MA, Balayssac D, Eschalier A, Coudoré F, Authier N. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology.* 234:176-84, 2007.
4. Sakurai M, Egashira N, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Oxaliplatin induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain.* 147:165-174, 2009.
5. Ali BH. Amelioration of oxaliplatin neurotoxicity by drugs in humans and experimental animals: a minireview of recent literature. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 10:272-279, 2010.
6. Coriat R, Alexandre J, Nicco C, Quinquis L, Benoit E, Chéreau C, Lemaréchal H, Mir O, Borderie D, Tréluyer JM, Weill B, Coste J, Goldwasser F, Batteux F. Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir. *J Clin Invest.* 124:262-272, 2014.
7. Soichiro U, Kawashiri T, Egashira N. Basic evidence for efficacy of Goshajinkigan on oxaliplatin-induced neuropathy. *Nihon yakurigaku zasshi.* 143:12, 2014.
8. Schloss J, & Colosimo M. B vitamin complex and chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Curr Oncol Rep.* 19: 76, 2017.
9. がん薬物療法に伴う末梢神経障害マネジメントの手引き. 2017 年版日本がんサポーティブケア学会編, 金原出版; 2017.
10. Jensen TS, Gottrup H, Sindrup SH, Bach FW. The clinical picture of neuropathic pain. *Eur.*

- J. Pharmacol. 429:1-11, 2011.
11. Merskey H. & Bogduk N. Task Force on Taxonomy of the International Association for the study of Pain. Classification of Chronic Pain, Second Edition,, IASP Press, Seattle 1994.
 12. Conte SM, Vale PR. Peripheral Arterial Disease. *Heart Lung Circ.* 27:427-432, 2018.
 13. Hamdy O, Abou-Elenin K, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. Contribution of nerve-axon reflex-related vasodilation to the total skin vasodilation in diabetic patients with and without neuropathy. *Diabetes Care.* 24:344-349, 2001.
 14. Suzuki Y, Goto K, Ishige A, Komatsu Y, Kamei J. Effect of Goshajinkigan, a Kampo medicine, on enhanced platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Jpn J Pharmacol.* 78:87-91, 1998.
 15. Todnem K, Knudsen G, Riise T, Nyland H, Aarli JA. The non-linear relationship between nerve conduction velocity and skin temperature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 52:497-501, 1989.
 16. Yorek MA. Vascular Impairment of Epineurial Arterioles of the Sciatic Nerve: Implications for Diabetic Peripheral Neuropathy. *Rev Diabet Stud.* 12:1-2, 2015.
 17. Kambiz S, van Neck JW, Cosgun SG, van Velzen MH, Janssen JA, Avazverdi N, Hovius SE, Walbeehm ET. An early diagnostic tool for diabetic peripheral neuropathy in rats *PLoS One.* 10: e0131144, 2015.
 18. The review of diabetic studies : RDS. 12:13-28, 2015.
 19. Issels RD. Hyperthermia adds to chemotherapy. *EJC.* 44:2546-2554, 2008.
 20. Kono T, Suzuki Y, Mizuno K, Miyagi C, Omiya Y, Sekine H, Mizuhara Y, Miyano K, Kase Y, Uezono Y. Preventive effect of oral goshajinkigan on chronic oxaliplatin-induced hypoesthesia in rats. *Sci Rep.* 5:16078, 2015.
 21. Gauchan P, Andoh T, Kato A, Sasaki A, Kuraishi Y. Effects of the prostaglandin E₁ analog limaprost on mechanical allodynia caused by chemotherapeutic agents in mice. *J Pharmacol Sci.* 109: 469-472, 2009.
 22. Hiyama H, Yano Y, So K, Imai S, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. TRPA1 sensitization during diabetic vascular impairment contributes to cold

- hypersensitivity in a mouse model of painful diabetic peripheral neuropathy. *Mol Pain*. 14:1744806918789812, 2018.
23. Isami K, Imai S, Sukeishi A, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. The impact of mouse strain-specific spatial and temporal immune responses on the progression of neuropathic pain. *Brain Behav Immun*. 74: 121-132, 2018.
 24. Ali BH. Amelioration of oxaliplatin neurotoxicity by drugs in humans and experimental animals: a minireview of recent literature. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 10:272-279, 2010.
 25. Coriat R, Alexandre J, Nicco C, Quinquis L, Benoit E, Chéreau C, Lemaréchal H, Mir O, Borderie D, Tréluyer JM, Weill B, Coste J, Goldwasser F, Batteux F. Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir. *J Clin Invest*. 124:262-272, 2014.
 26. Nukada H. Ischemia and diabetic neuropathy. *Handb Clin Neurol*. 126:469-487, 2014.
 27. Coppey LJ, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA. Slowing of motor nerve conduction velocity in streptozotocin-induced diabetic rats is preceded by impaired vasodilation in arterioles that overlie the sciatic nerve. *Int J Exp Diabetes Res*. 1:131-143, 2000.
 28. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in non-ischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res*. 93:1074-1081, 2003.
 29. Pan Y, Chen F, Huang S, Cai Z, Lan H, Tong Y, Yu X, Zhao G. TRPA1 and TRPM8 receptors may promote local vasodilation that aggravates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy amenable to 17 β -estradiol treatment. *Curr Neurovasc Res*. 13:309-317, 2016
 30. Jensen SA, Sørensen JB. 5-Fluorouracil-based therapy induces endovascular injury having potential significance to development of clinically overt cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 69:57-64, 2012.

31. Robinson SM, Mann J, Vasilaki A, Mathers J, Burt AD, Oakley F, White SA, Mann DA. Pathogenesis of FOLFOX induced sinusoidal obstruction syndrome in a murine chemotherapy model. *J Hepatol.* 59:318-326, 2013.
32. Sakurai M, Egashira N, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Oxaliplatin induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain.* 147:165-174, 2009.
33. Ling B, Coudoré-Civiale MA, Balayssac D, Eschalier A, Coudoré F, Authier N. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology.* 234:176-184, 2007.
34. Zhao M, Isami K, Nakamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol Pain.* 8:55, 2012.
35. Quattrini C, Harris ND, Malik RA, Tesfaye S. Impaired skin microvascular reactivity in painful diabetic neuropathy. *Diabetes Care.* 30:655-659, 2007.
36. So K, Tei Y, Zhao M, Miyake T, Hiyama H, Shirakawa H, Imai S, Mori Y, Nakagawa T, Matsubara K, Kaneko S. Hypoxia-induced sensitization of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. *Sci Rep.* 6:23261, 2016.
37. Miyake T, Nakamura S, Meng Z, Hamano S, Inoue K, Numata T, Takahashi N, Nagayasu K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. Distinct mechanism of cysteine oxidation-dependent activation and cold sensitization of human transient receptor potential ankyrin 1 channel by high and low oxaliplatin. *Front Physiol.* 8:878, 2017.
38. Xiao WH, Zheng H, Bennett GJ. Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. *Neuroscience.* 203:194-206, 2012.
39. Zheng H, Xiao WH, Bennett, GJ. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. *Exp Neurol.* 232: 154-161, 2011.

40. Xiao WH, Bennett GJ. Effects of mitochondrial poisons on the neuropathic pain produced by the chemotherapeutic agents, paclitaxel and oxaliplatin. *Pain*. 153: 704-709, 2012.
41. Tsubota M, Fukuda R, Hayashi Y, Miyazaki T, Ueda S, Yamashita R, Koike N, Sekiguchi F, Wake H, Wakatsuki S, Ujiie Y, Araki T, Nishibori M, Kawabata A. Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants. *J Neuroinflammation*. 16:199, 2019.
42. Smith EM, Pang H, Cirrincione C, Fleishman S, Paskett ED, Ahles T, Bressler LR, Fadul CE, Knox C, Le-Lindqwister N, Gilman PB, Shapiro CL. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *Alliance for Clinical Trials in Oncology. JAMA*. 309:1359-1367, 2013.