

Investigation of the mechanisms of taxane-induced peripheral neuropathy focusing on Schwann cell and search for novel therapies by drug repositioning

(シュワン細胞に着目したタキサン系抗がん薬誘発末梢神経障害の機序
解明およびドラッグ・リポジショニングによる新規治療薬の探索)

2021

Madoka Koyanagi

目次

緒言	1
Chapter 1: Taxane-induced dedifferentiation of mature myelin-forming Schwann cells participates in CIPN development	
（第1章：タキサン系抗がん薬によって惹起される髄鞘形成成熟シュワン細胞の脱分化が末梢神経障害の発症に関与する）	
要約.....	2
Chapter 2: Schwann cell-derived galectin-3 has pro-nociceptive roles in taxane-induced peripheral neuropathy	
（第2章：シュワン細胞由来ガレクチン-3はタキサン系抗がん薬誘発末梢神経障害における疼痛発現に関与する）	
要約.....	4
Chapter 3: Cilostazol is a causal therapy for preventing taxane-related CIPN by suppression of Schwann cell dedifferentiation	
（第3章：シロスタゾールはシュワン細胞の脱分化を抑制することでタキサン系抗がん薬誘発末梢神経障害を予防する機序に基づいた新規治療薬となりうる）	
要約.....	6
総括および結論.....	8
謝辞.....	9
引用文献.....	11

緒言

タキサン系抗がん薬（パクリタキセルやドセタキセル）はがん治療において頻用される。しかし、タキサン系抗がん薬を投与された 50%以上の患者は、副作用として四肢末端の痛み、しびれ、感覚異常などを呈する抗がん薬誘発末梢神経障害（CIPN）を発症する(1-3)。CIPN は、患者の QOL を低下させるだけでなく、CIPN が重症化すると抗がん薬の休薬や減量が必要になることから、がん治療の大きな妨げとなる(4)。しかしながら、科学的根拠が担保された CIPN の予防・治療法は確立されていないのが現状である(5,6)。また、病理組織学的研究から、CIPN の発症はタキサン系抗がん薬による直接的な神経細胞障害に起因すると考えられているが、完全に解明されたとは言い難い(7-9)。神経細胞はシュワン細胞などの周辺細胞と相互作用しながら機能を保っていることから(10)、主に神経細胞のみに着目した従来の研究では CIPN の病態の全容を理解するには不十分といえる。一方、末梢神経系において髄鞘を形成するシュワン細胞は、神経軸索の再生において重要な役割を担っているだけでなく、その機能異常が末梢神経障害の引き金となることも知られている(11-13)。そこで本研究では、シュワン細胞に焦点を当てて検討を行った。

第 1 章では、パクリタキセルの処理によって、感覚神経障害に先行して、神経軸索周囲の髄鞘形成シュワン細胞の脱分化が惹起されることを明らかにした。

第 2 章では、タキサン系抗がん薬の処理後の脱分化シュワン細胞において、ガレクチン-3 (β -ガラクトシド結合タンパク質) の発現が上昇し、培養上清中に分泌されることを見出した。また、タキサン系抗がん薬の投与を受けて CIPN を発症した乳がん患者、およびタキサン系抗がん薬関連 CIPN モデルマウスの両方において、血漿中ガレクチン-3 濃度の上昇が起こることを明らかにした。さらに、脱分化シュワン細胞由来のガレクチン-3 は、末梢神経へのマクロファージの誘引を介して、タキサン系抗がん薬によって惹起される機械過敏応答において重要な役割を果たすことを示した。

第 3 章では、シュワン細胞分化誘導能を示す既承認医薬品をスクリーニングし、ホスホジエステラーゼ (PDE) 3 阻害薬であるシロスタゾールが、初代培養シュワン細胞の分化を強力に促進することを見出した。さらに、シロスタゾールはパクリタキセルによるシュワン細胞の脱分化を強力に抑制し、パクリタキセル誘発 CIPN モデルマウスにおける機械過敏応答を減弱させることを確認した。

これらの研究成果を、三章に分けて論述する。

Chapter 1: Taxane-induced dedifferentiation of mature myelin-forming Schwann cells participates in CIPN development

(第 1 章：タキサン系抗がん薬によって惹起される髄鞘形成成熟シュワン細胞の脱分化が末梢神経障害の発症に關与する)

要約

タキサン系抗がん薬は、微小管に作用することによって神経軸索障害を惹起し、二次的に髄鞘も障害すると考えられてきた(14,15)。しかしながら、その後、CIPN モデル動物において痛みが発現している場合でも、軸索変性が認められないといった報告がなされるなど(16)、タキサン系抗がん薬による CIPN 発症機序については未解明な点が多い。一方、末梢神経系において髄鞘を形成するシュワン細胞は、神経機能の維持や神経軸索再生に關与する(11-13)。そこで本研究では、感覚神経と髄鞘形成シュワン細胞との相互作用の破綻が CIPN 発症の一因であるという仮説を立て、シュワン細胞に着目して検討を行った。

まず、ラット坐骨神経由来初代培養シュワン細胞を用いて検討を行った。分化シュワン細胞をパクリタキセル (10 nM) で 48 時間処理したところ、シュワン細胞の生存率低下と双極性突起の退縮に加えて、髄鞘構成成分であるミエリン塩基性タンパク質 (MBP、分化シュワン細胞マーカー) の発現低下、および低親和性神経成長因子受容体 p75 (未分化シュワン細胞マーカー) とガレクチン-3 (脱分化シュワン細胞マーカー) の発現上昇を特徴とするシュワン細胞の脱分化が観察された。同様の変化は、ドセタキセル (10 nM) 処理によっても観察された。また、ラット脊髄後根神経節 (DRG) 由来初代培養感覚神経細胞を、より高濃度のパクリタキセル (100 nM) で 48 時間処理したところ、神経細胞数の減少と軸索変性が観察された。一方、シュワン細胞を脱分化させた 10 nM のパクリタキセルで処理しても、神経細胞死や形態変化は認められなかった。さらに、DRG 神経細胞とシュワン細胞を共培養し、*in vitro* 条件下で髄鞘様構造を構築させた感覚神経-シュワン細胞共培養系に対してパクリタキセルを処理して、その影響を調べた。パクリタキセル (10 nM) で 48 時間処理しても、神経の数と軸索形態に変化は認められなかったが、MBP 陽性シュワン細胞の減少が観察されたことから、脱髄が引き起こされたと考えられた。次に、CIPN マウスモデルにおいてもシュワン細胞の脱分化が起こるのかを検討した。パクリタキセル (4 mg/kg)

の反復腹腔内投与によって、投与開始 4 日から 7 日後において機械過敏応答が惹起され、投与開始 8 日後に坐骨神経のシュワン細胞において、p75 とガレクチン-3 の免疫活性の増加が認められた。以上の結果から、タキサン系抗がん薬が感覚神経の障害に先行して神経軸索の成熟シュワン細胞の脱分化を引き起こし、それに起因するシュワン細胞と感覚神経の相互作用の破綻が CIPN 発症のトリガーとなる可能性が示唆された (Fig. 1)。

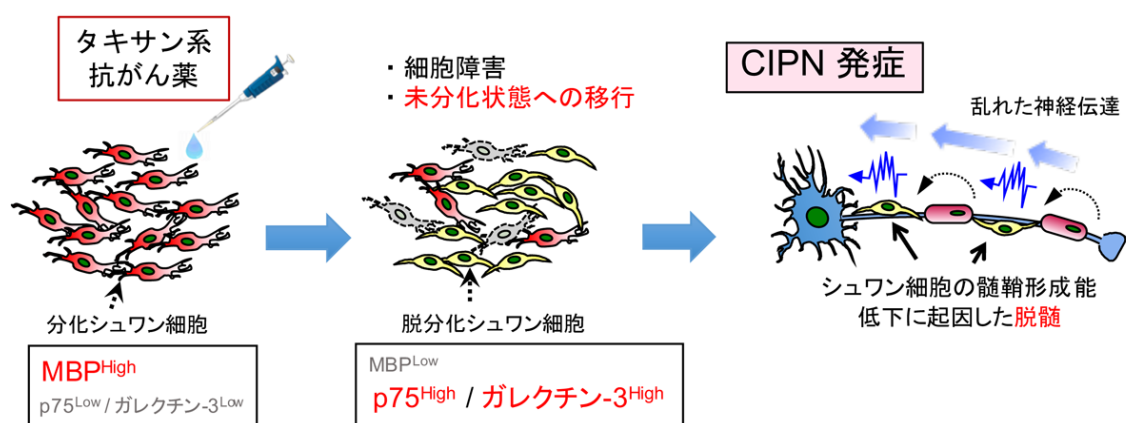


Fig. 1. タキサン系抗がん薬のシュワン細胞に対する直接作用

MBP を高発現する分化シュワン細胞にタキサン系抗がん薬で処理すると、細胞生存率の低下、双極性突起の退縮といった細胞障害に加えて、p75 とガレクチン-3 を高発現する脱分化型シュワン細胞への遷移が起こる。その結果、髄鞘形成能が低下して、髄鞘の減少 (脱髄) につながる。このようにして引き起こされるシュワン細胞と感覚神経の相互作用の破綻が、CIPN 発症のトリガーとなりうる。

Chapter 2: Schwann cell-derived galectin-3 has pro-nociceptive roles in taxane-induced peripheral neuropathy

(第 2 章：シュワン細胞由来ガレクチン-3 はタキサン系抗がん薬誘発末梢神経障害における疼痛発現に関与する)

要約

ガレクチン-3 は、サイトゾル、核内および細胞膜上に存在し、細胞外に分泌されることもある β -ガラクトシド結合タンパク質である(17)。第 1 章の結果に基づき、パクリタキセル処理に応答して脱分化シュワン細胞で発現が上昇するガレクチン-3 の役割について解析した。

まず、初代培養シュワン細胞をパクリタキセル (10 nM)、またはドセタキセル (10 nM) で 48 時間処理したところ、ガレクチン-3 が対照群と比較して有意に高い濃度で培養上清中に検出された。また、タキサン系抗がん薬の投与により CIPN を発症した乳がん患者、およびパクリタキセル (20 mg/kg) を反復腹腔内投与した CIPN モデルマウスにおいて、CIPN の発症期にシュワン細胞由来と考えられるガレクチン-3 の血漿中濃度が一過性に上昇することを確認した。CIPN モデルマウスにおける血漿中ガレクチン-3 濃度の上昇、および坐骨神経軸索のシュワン細胞におけるガレクチン-3 の発現上昇は、パクリタキセルの投与開始 2 週間後にピークを示した。他の末梢臓器、DRG (感覚神経細胞体)、末梢血単核球細胞においては、投与開始 2 週間後のガレクチン-3 の mRNA 発現量に、パクリタキセル投与群と対照群の間で差は認められなかった。

ガレクチン-3 は免疫細胞の遊走因子として知られることから、マクロファージ細胞株 RAW 264.7 を用いて細胞遊走アッセイを実施した。その結果、RAW 264.7 細胞は、パクリタキセル処理後のシュワン細胞の培養上清、およびリコンビナントガレクチン-3 (2 pM) 含有培地に対して遊走反応を示した。また、パクリタキセル投与開始 2 週間後の CIPN モデルマウスの坐骨神経軸索において、造血幹細胞由来の末梢マクロファージが多数浸潤していることを確認した。一方、クロドロン酸内包リポソーム処理により末梢マクロファージを除去すると、血漿中ガレクチン-3 濃度が高いレベルで存在するにもかかわらず、パクリタキセル投与 2 週間後における機械過敏応答が有意に抑制された。また、ガレクチン-3 遺伝子欠損マウス、およびガレクチン-3 阻害剤 TD-139 (15 mg/kg) を腹腔内

投与されたマウスでは、パクリタキセル投与 2 週間後の坐骨神経におけるマクロファージの浸潤と機械過敏応答が抑制された。以上の結果から、シュワン細胞由来の分泌型ガレクチン-3 が、化学誘引分子としてマクロファージの末梢神経への浸潤を誘発し、パクリタキセルによる CIPN の発現に関与することが示唆された (Fig. 2.)。

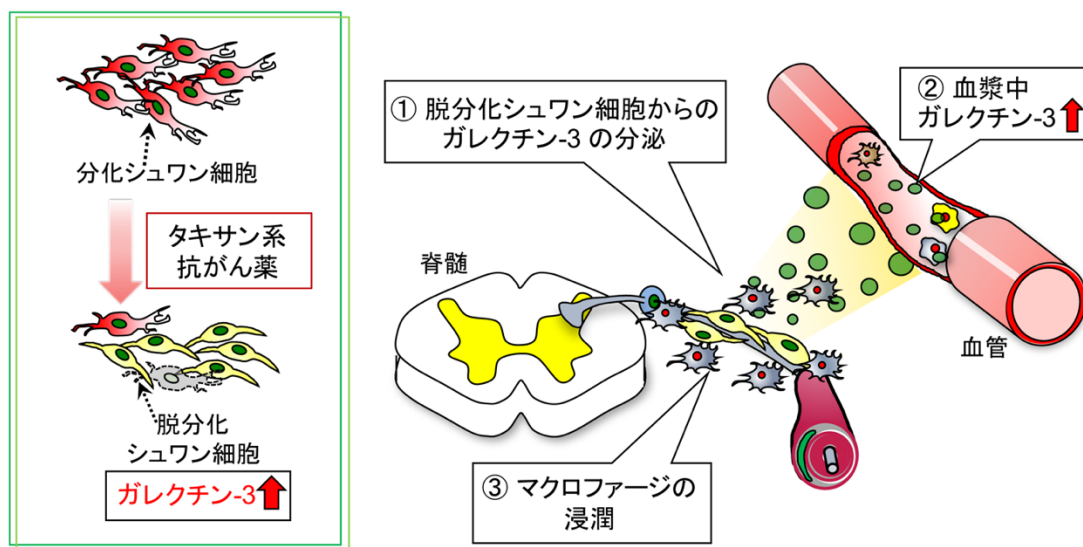


Fig. 2. タキサン系抗がん薬誘発 CIPN 発症メカニズムにおけるガレクチン-3 の関与
 タキサン系抗がん薬の処理に反応して脱分化したシュワン細胞からガレクチン-3 が血中へと分泌される。ガレクチン-3 の血中濃度勾配に従って、マクロファージが末梢神経へと誘引され、CIPN 発症期における疼痛発現を助長していると考えられる。

Chapter 3: Cilostazol is a causal therapy for preventing taxane-related CIPN by suppression of Schwann cell dedifferentiation

(第 3 章：シロスタゾールはシュワン細胞の脱分化を抑制することでタキサン系抗がん薬誘発末梢神経障害を予防する機序に基づいた新規治療薬となりうる)

要約

タキサン系抗がん薬の投薬中止や減量は患者の予後不良につながることから(18,19)、CIPNの増悪を予防してタキサン系抗がん薬の治療を完遂できるようにするために、CIPNの予防・治療薬の開発が切望されている。しかしながら、治療効果が統計的に担保されたCIPNの予防・治療薬は存在しない(5,6)。一方、中枢神経系において髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの分化・再髄鞘化を促進するような薬物が、中枢性脱髄性疾患である多発硬化症の根本的治療薬となる可能性が報告されている(20-22)。第1章、第2章の結果から、タキサン系抗がん薬によるシュワン細胞の脱分化を予防する薬物、あるいは脱分化したシュワン細胞の再分化・再髄鞘化を促進する薬物が、CIPNの新規予防・治療薬候補となると考えられた。そこで、分化シュワン細胞マーカーであるMBPの免疫活性を指標にして、シュワン細胞分化誘導能を示す既承認医薬品のスクリーニングを行った。その結果、PDE3阻害薬であるシロスタゾールがシュワン細胞の分化を促進することを見出した。シロスタゾール(30 μ M)処理によって惹起されるシュワン細胞の分化は、Epac阻害薬であるESI-09(1 μ M)の共処理によって抑制された。また、シロスタゾール(30 μ M)の共処理によって、パクリタキセル(10 nM)による初代培養シュワン細胞の脱分化、および神経-シュワン細胞共培養系における脱髄が有意に抑制された。さらに、0.3%シロスタゾール含有飼料を連日マウスに経口摂取させると、パクリタキセル(5 mg/kg)の反復腹腔内投与により誘導される機械過敏応答とともに、坐骨神経のシュワン細胞の脱分化が有意に抑制された。一方、シロスタゾール(30 μ M)は、乳がん細胞株MDA-MB-231に対するパクリタキセル(10 nM)の抗がん作用を阻害せず、むしろ増強した。以上の結果から、シロスタゾールはタキサン系抗がん薬によるシュワン細胞の脱分化を抑制することによって、CIPN発症を抑制することが示唆され、メカニズムベースの新規予防・治療薬候補として有用であることが示唆された(Fig. 3.)。

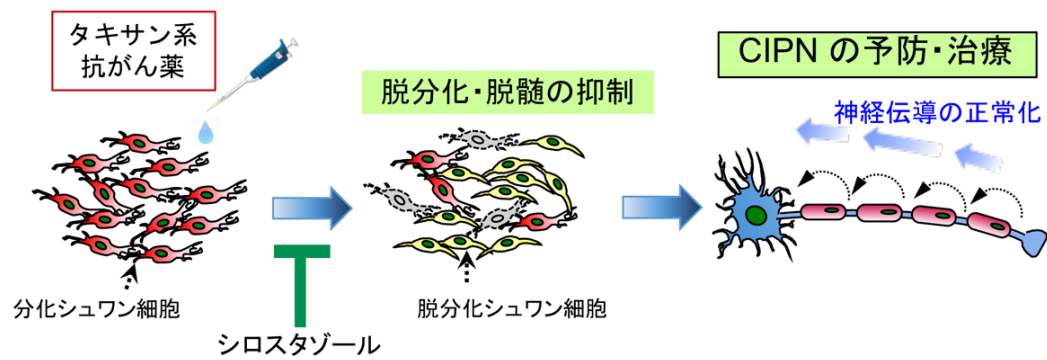


Fig. 3. シロスタゾールによるタキサン系抗がん薬誘発 CIPN 予防・治療効果

シュワン細胞の分化誘導効果を有するシロスタゾールの処理により、タキサン系抗がん薬によって惹起されるシュワン細胞の脱分化および脱髄が抑制される。その結果、髄鞘の維持・再生、およびシュワン細胞による神経保護・再生促進作用を介して神経伝導の正常化につながり、CIPNの予防・治療効果を示すと考えられる。

総括および結論

本研究において、私は、シュワン細胞に着目し、タキサン系抗がん薬誘発末梢神経障害の発症機序探索と新規治療薬の探索を行い、以下の新知見を得た。

第 1 章では、タキサン系抗がん薬が感覚神経障害に先行してシュワン細胞の脱分化を惹起することを示した。その結果、タキサン系抗がん薬がシュワン細胞に対して直接作用することによって、感覚神経軸索と髄鞘形成シュワン細胞間の相互作用が破綻し、末梢神経障害が促進される可能性が示唆された。

第 2 章では、パクリタキセル誘発 CIPN に関連するヒトとマウスに共通の病理変化として、血漿中ガレクチン-3 濃度の上昇を見出した。この血漿中で増加したガレクチン-3 は、タキサン系抗がん薬によって脱分化したシュワン細胞由来である可能性が示唆された。さらに、マクロファージのガレクチン-3 依存的な末梢神経への浸潤が、タキサン系抗がん薬誘発 CIPN モデルマウスにおける機械過敏応答の発現に関与している可能性が示唆された。

第 3 章では、PDE3 阻害薬であるシロスタゾールが、cAMP/Epac シグナル伝達系を介してシュワン細胞の分化を引き起こすことを明らかにした。パクリタキセル誘発 CIPN モデルマウスにおいて、シロスタゾールはシュワン細胞の脱分化および機械過敏応答を抑制した。一方、シロスタゾールは、乳がん細胞株に対するパクリタキセルの抗がん作用を阻害しなかった。したがって、シロスタゾールは、タキサン系抗がん薬誘発 CIPN を抑制する新規根本的治療薬となりうる可能性が示唆された。

以上の結果より、タキサン系抗がん薬処理によって脱分化したシュワン細胞から分泌されるガレクチン-3 が、マクロファージの末梢神経への浸潤を介して疼痛を惹起し、CIPN 発症に関与している可能性が示唆された。シロスタゾールは既承認の抗血小板薬であることから、新規の医薬品を開発するよりも容易に CIPN 治療薬として適用できる可能性がある。さらに、本研究の結果は、シュワン細胞の分化や髄鞘形成を促進する薬物が、タキサン系抗がん薬誘発 CIPN の根本的治療薬や他の脱髄性末梢神経障害の新規治療戦略になりうる可能性を示唆している。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切な御指導および御鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院薬剤部（和歌山県立医科大学附属病院薬剤部） 松原 和夫 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、博士課程への進学および実験技術・論文執筆といった研究全般に渡る多大な御支援、御指導を賜りました京都大学医学部附属病院薬剤部 今井 哲司 講師に謹んで深謝致します。

また、研究遂行にあたり種々の有益な御助言と御指導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、米澤 淳 准教授、中川 俊作 助教、糸原 光太郎 助教、神戸大学医学部附属病院薬剤部 大村 友博 准教授、北海道大学大学院薬学研究院 佐藤 夕紀 講師に深く感謝致します。

そして、臨床研究の遂行にあたり、臨床検体ならびに臨床情報の提供にご協力いただき、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腫瘍内科/乳腺外科 川口 展子 助教、古武 剛 先生、京都大学医学部附属病院薬剤部 猪熊 容子 先生ならびに各関係者の皆様に心より感謝致します。さらに、乳がん研究ネットワーク (BORN) バイオバンクならびに本臨床研究にご協力いただいたすべての皆様に心より感謝致します。

DRG 神経-シュワン細胞共培養系の習得にあたり、実験技術の御指導および有益な御助言をいただきました、国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第五部 荒木 敏之 部長、若月 修二 室長に深謝致します。

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 金子 周司 教授、白川 久志 准教授、遺伝子導入実験技術の御指導と御助言をいただきました 永安 一樹 助教に心より感謝の意を表します。

種々の御指導、御助言をいただきました、京都大学大学院薬学研究科 三宅 崇仁 助教、宗 可奈子 助教、勇 昂一 博士、Ziauddin Azimi 修士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多くのご協力をいただきました、京都大学医学部附属病院薬剤部/京都大学大学院薬学研究科の 荻原 孝史 助教、Ntogwa Mpumelelo 修士、中里 唯 学士、松本 真有奈 学士、平岩 怜 学士、岩満 優輝 くん、西郷 雅美子 さん、守屋 茜里 さん、また、研究室生活にあたり多くのサポートをいただきました京都大学医学部附属病院薬剤部の諸氏に心から感謝致します。

本研究の遂行に関し、御援助をいただきました日本学術振興会に深く感謝致します。

最後に、私が研究活動に専念できるよう終始支えてくださった父 祥康、母 智子に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

引用文献

1. Seretny M, Currie GL, Sena ES, Ramnarine S, Grant R, MacLeod MR, *et al.* Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* **2014**;155:2461-70
2. Velasco R, Bruna J. Taxane-Induced Peripheral Neurotoxicity. *Toxics* **2015**;3:152-69
3. Wilkes G. Peripheral neuropathy related to chemotherapy. *Semin Oncol Nurs* **2007**;23:162-73
4. Hausheer FH, Schilsky RL, Bain S, Berghorn EJ, Lieberman F. Diagnosis, management, and evaluation of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Semin Oncol* **2006**;33:15-49
5. Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, Lavoie Smith EM, Bleeker J, Cavaletti G, *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**;32:1941-67
6. Hu S, Huang KM, Adams EJ, Loprinzi CL, Lustberg MB. Recent Developments of Novel Pharmacologic Therapeutics for Prevention of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Clin Cancer Res* **2019**;25:6295-301
7. LaPointe NE, Morfini G, Brady ST, Feinstein SC, Wilson L, Jordan MA. Effects of eribulin, vincristine, paclitaxel and ixabepilone on fast axonal transport and kinesin-1 driven microtubule gliding: implications for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Neurotoxicology* **2013**;37:231-9
8. Leandro-García LJ, Leskelä S, Jara C, Gréen H, Avall-Lundqvist E, Wheeler HE, *et al.* Regulatory polymorphisms in β -tubulin IIa are associated with paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Clin Cancer Res* **2012**;18:4441-8
9. Melli G, Jack C, Lambrinos GL, Ringkamp M, Höke A. Erythropoietin protects sensory axons against paclitaxel-induced distal degeneration. *Neurobiol Dis* **2006**;24:525-30
10. Zenker J, Ziegler D, Chrast R. Novel pathogenic pathways in diabetic neuropathy. *Trends Neurosci* **2013**;36:439-49
11. Chen Z-L, Yu W-M, Strickland S. Peripheral Regeneration. *Annu Rev Neurosci* **2007**;30:209-33

12. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* **2005**;6:671-82
13. Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation* **2011**;8
14. Røyttä M, Raine CS. Taxol-induced neuropathy: chronic effects of local injection. *J Neurocytol* **1986**;15:483-96
15. Theiss C, Meller K. Taxol impairs anterograde axonal transport of microinjected horseradish peroxidase in dorsal root ganglia neurons in vitro. *Cell Tissue Res* **2000**;299:213-24
16. Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennett GJ. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* **2001**;94:293-304
17. Dunic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* **2006**;1760:616-35
18. Abdel-Rahman O. Outcomes of early-stage breast cancer patients treated with sequential anthracyclines-taxanes in relationship to relative dosing intensity: a secondary analysis of a randomized controlled trial. *Clin Transl Oncol* **2019**;21:239-45
19. Olawaiye AB, Java JJ, Krivak TC, Friedlander M, Mutch DG, Glaser G, *et al.* Does adjuvant chemotherapy dose modification have an impact on the outcome of patients diagnosed with advanced stage ovarian cancer? An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* **2018**;151:18-23
20. Deshmukh VA, Tardif V, Lyssiotis CA, Green CC, Kerman B, Kim HJ, *et al.* A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature* **2013**;502:327-32
21. Mei F, Fancy SPJ, Shen YA, Niu J, Zhao C, Presley B, *et al.* Micropillar arrays as a high-throughput screening platform for therapeutics in multiple sclerosis. *Nature Med* **2014**;20:954-60
22. Najm FJ, Madhavan M, Zaremba A, Shick E, Karl RT, Factor DC, *et al.* Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo. *Nature* **2015**;522:216-20