

京都大学	博士 (薬学)	氏名	趙 萌
論文題目	オキサリプラチンによる急性末梢神経障害におけるTRPA1チャンネルの関与		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>がん化学療法で用いられるタキサン系 (パクリタキセル等)、白金製剤 (シスプラチン、オキサリプラチン等) などの抗がん剤は、副作用として、四肢末端のしびれ、感覚異常、歩行困難、神経痛などの末梢神経障害を高率に誘発するが、現在のところ、有効な予防法や対処法は確立されておらず、がん化学療法の用量規定因子ともなっている。特に、オキサリプラチンは、ほぼ全例において投与直後から数時間以内に寒冷刺激で誘発、増強される四肢・口周囲のしびれや感覚異常など、他の抗がん剤では見られない特有の急性末梢神経障害を誘発することが知られているが、その発症機序は明らかになっていない。本研究では、オキサリプラチンによる急性末梢神経障害の動物モデルを作製し、特に侵害受容に深く関わるtransient receptor potential (TRP) チャンネルの関与とその分子機構について検討し、以下の新知見を得た。</p> <p>第1章 オキサリプラチンによる急性末梢神経障害モデルの確立</p> <p>マウスにオキサリプラチン (5 mg/kg) を単回腹腔内投与すると、投与翌日以降から、von Freyフィラメントの足底触刺激に対する有意な過敏応答が生じた。一方、5°Cの冷刺激に対する逃避反応は、オキサリプラチン投与2時間後から有意な増強が認められ、両者とも少なくとも7日以上持続した。投与2時間後の冷過敏応答は、パクリタキセルやシスプラチンでは認められず、オキサリプラチンに特有の急性末梢神経障害を表していると考え、次に、代表的な鎮痛薬の薬効評価を行った。その結果、神経障害性疼痛に対する第1選択薬で電位依存性Ca²⁺チャンネル$\alpha_2\delta$リガンドのガバペンチン、局所麻酔薬メキシレチン、モノアミン再取り込み阻害作用を有する弱オピオイドのトラマドール、オキサリプラチン誘発末梢神経障害の予防目的で用いられるグルコン酸カルシウムにより、濃度依存的に有意に抑制された。一方、強オピオイドのモルヒネ、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬ミルナシプランは、弱い抑制効果しか示さず、非ステロイド性抗炎症薬ジクロフェナク、三環系抗うつ薬アミトリプチリンでは変化が認められなかった。これらの結果から、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害は、侵害受容性疼痛や神経障害性疼痛とは異なる薬物感受性を示すことが示唆される。</p> <p>第2章 オキサリプラチン誘発急性冷過敏応答におけるTRPチャンネルの関与</p> <p>オキサリプラチン (1-10 mg/kg) 投与は、2時間後においてTRPA1刺激薬AITCの足底内投与によって惹起される疼痛様行動を濃度依存的かつ有意に増強した。一方、TRPV1刺激薬カプサイシンあるいはTRPA1遺伝子欠損マウスへのTRPM8/A1刺</p>			

激薬メントールの後足底内投与による疼痛様行動にオキサリプラチンによる変化は認められなかった。また、単離マウス後根神経節 (DRG) 神経を用いたCa²⁺イメージングにおいて、AITCに感受性を示すDRG神経の割合が、オキサリプラチン (30-300 μM) の2時間前処置により濃度依存的に増加したのに対し、メントールおよびカプサイシン感受性DRG神経の割合に変化は認められなかった。さらに、オキサリプラチン誘発冷過敏応答はTRPA1阻害薬HC030031の前処置およびTRPA1遺伝子欠損マウスにおいて消失した。シスプラチンあるいはパクリタキセルは、AITC足底内投与による疼痛様行動および単離DRG神経におけるAITC感受性細胞数を変化させなかった。これらの結果から、オキサリプラチンによる急性末梢神経障害は、TRPA1チャンネルが選択的に活性化ないし機能増強される結果、生じるものであると示唆される。

第3章 オキサリプラチンによるTRPA1活性化機構に関する検討

ヒトTRPA1強制発現HEK293細胞を用いたCa²⁺イメージングおよびパッチクランプ記録により、高濃度オキサリプラチン (1 mM) 処置によりCa²⁺流入と電流応答が認められた。このオキサリプラチンによるCa²⁺流入は、抗酸化剤グルタチオン、活性酸素種 (ROS) スカベンジャーPBNにより有意に抑制された。さらに、変異型TRPA1を用いた検討から、オキサリプラチンによるTRPA1活性化に関与するシステイン残基を複数同定し、ROSによる活性化機構と重複することを確認した。また、ROSプローブを用いた検討により、オキサリプラチン処置によるROSの産生を確認した。これらの結果から、高濃度オキサリプラチンは、ROSを産生させることによりTRPA1を活性化することが示唆される。一方、比較的低濃度のオキサリプラチン (100 μM) を2時間前処置することにより、H₂O₂によるCa²⁺流入が増強し、同様に、マウスへのオキサリプラチン投与2時間後にH₂O₂足底内投与による疼痛様行動が有意に増加した。これらの結果から、比較的低濃度のオキサリプラチン前処置によりROSに対するTRPA1感受性が増大することが示唆される。

以上、オキサリプラチンの単回投与により数時間で特有の冷過敏応答が惹起されることを見だし、鎮痛薬に対して特徴的な薬物感受性を示すことを明らかにした。また、この冷過敏応答は、一次感覚神経のTRPA1チャンネルの感受性が選択的に増大し、ROS産生を介して活性化されることにより惹起するものであることを明らかにした。これらの成果は、臨床上問題となっているオキサリプラチンによる末梢神経障害の発症機序の一部を明らかにしたものであり、その予防法と対処法確立のための重要な知見となる。

(論文審査の結果の要旨)

がん化学療法で用いられるタキサン系（パクリタキセル等）、白金製剤（シスプラチン、オキサリプラチン等）などの抗がん剤は、副作用として、四肢末端のしびれ、感覚異常、歩行困難、神経痛などの末梢神経障害を高率に誘発するが、現在のところ、有効な予防法や対処法は確立されておらず、がん化学療法の用量規定因子ともなっている。特に、オキサリプラチンは、ほぼ全例において投与直後から数時間以内に寒冷刺激で誘発、増強される四肢・口周囲のしびれや感覚異常など、他の抗がん剤では見られない特有の急性末梢神経障害を誘発することが知られているが、その発症機序は明らかになっていない。本研究では、オキサリプラチンによる急性末梢神経障害の動物モデルを作製し、特に侵害受容に深く関わるtransient receptor potential (TRP) チャネルの関与とその分子機構について検討し、以下の新知見が得られた。

第1章 オキサリプラチンによる急性末梢神経障害モデルの確立

マウスにオキサリプラチン (5 mg/kg) を単回腹腔内投与すると、投与翌日以降から、von Freyフィラメントの足底触刺激に対する有意な過敏応答が生じた。一方、5°Cの冷刺激に対する逃避反応は、オキサリプラチン投与2時間後から有意な増強が認められ、両者とも少なくとも7日以上持続した。投与2時間後の冷過敏応答は、パクリタキセルやシスプラチンでは認められず、オキサリプラチンに特有の急性末梢神経障害を表していると考え、次に、代表的な鎮痛薬の薬効評価を行った。その結果、神経障害性疼痛に対する第1選択薬で電位依存性Ca²⁺チャネル $\alpha_2\delta$ リガンドのガバペンチン、局所麻酔薬メキシレチン、モノアミン再取り込み阻害作用を有する弱オピオイドのトラマドール、オキサリプラチン誘発末梢神経障害の予防目的で用いられるグルコン酸カルシウムにより、濃度依存的に有意に抑制された。一方、強オピオイドのモルヒネ、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬ミルナシプランは、弱い抑制効果しか示さず、非ステロイド性抗炎症薬ジクロフェナク、三環系抗うつ薬アミトリプチリンでは変化が認められなかった。これらの結果から、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害は、侵害受容性疼痛や神経障害性疼痛とは異なる薬物感受性を示すことが示唆される。

第2章 オキサリプラチン誘発急性冷過敏応答におけるTRPチャネルの関与

オキサリプラチン (1-10 mg/kg) 投与は、2時間後においてTRPA1刺激薬AITCの足底内投与によって惹起される疼痛様行動を濃度依存的かつ有意に増強した。一方、TRPV1刺激薬カプサイシンあるいはTRPA1遺伝子欠損マウスへのTRPM8/A1刺激薬メントールの後足底内投与による疼痛様行動にオキサリプラチンによる変化は認められなかった。また、単離マウス後根神経節 (DRG) 神経を用いたCa²⁺イメージングにおいて、AITCに感受性を示すDRG神経の割合が、オキサリプラチン (30-300 μ M) の2時間前処置により濃度依存的に増加したのに対し、メントールおよびカプサイシン感受性DRG神経の割合に変化は認められなかった。さらに、オキサリプラチン誘発冷過敏

応答はTRPA1阻害薬HC030031の前処置およびTRPA1遺伝子欠損マウスにおいて消失した。シスプラチンあるいはパクリタキセルは、AITC足底内投与による疼痛様行動および単離DRG神経におけるAITC感受性細胞数を変化させなかった。これらの結果から、オキサリプラチンによる急性末梢神経障害は、TRPA1チャンネルが選択的に活性化ないし機能増強される結果、生じるものであると示唆される。

第3章 オキサリプラチンによるTRPA1活性化機構に関する検討

ヒトTRPA1強制発現HEK293細胞を用いたCa²⁺イメージングおよびパッチクランプ記録により、高濃度オキサリプラチン（1 mM）処置によりCa²⁺流入と電流応答が認められた。このオキサリプラチンによるCa²⁺流入は、抗酸化剤グルタチオン、活性酸素種（ROS）スカベンジャーPBNにより有意に抑制された。さらに、変異型TRPA1を用いた検討から、オキサリプラチンによるTRPA1活性化に関与するシステイン残基を複数同定し、ROSによる活性化機構と重複することを確認した。また、ROSプローブを用いた検討により、オキサリプラチン処置によるROSの産生を確認した。これらの結果から、高濃度オキサリプラチンは、ROSを産生させることによりTRPA1を活性化することが示唆される。一方、比較的低濃度のオキサリプラチン（100 μM）を2時間前処置することにより、H₂O₂によるCa²⁺流入が増強し、同様に、マウスへのオキサリプラチン投与2時間後にH₂O₂足底内投与による疼痛様行動が有意に増加した。これらの結果から、比較的低濃度のオキサリプラチン前処置によりROSに対するTRPA1感受性が増大することが示唆される。

以上、オキサリプラチンの単回投与により数時間で特有の冷過敏応答が惹起されることを見だし、鎮痛薬に対して特徴的な薬物感受性を示すことを明らかにした。また、この冷過敏応答は、一次感覚神経のTRPA1チャンネルの感受性が選択的に増大し、ROS産生を介して活性化されることにより惹起するものであることを明らかにした。これらの成果は、臨床上問題となっているオキサリプラチンによる末梢神経障害の発症機序の一部を明らかにしたものであり、その予防法と対処法確立のための重要な知見となる。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、（当分の間）当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降