

臨床ビッグデータ解析に基づくボルテゾミブ誘発末
梢神経障害の治療薬の探索

2023

鈴木 茉莉

目次

緒言	1
第1章 臨床ビッグデータ解析によるボルテゾミブ誘発末梢神経障害治療薬の網羅的探索.....	4
実験方法	7
実験結果	
第1節 末梢神経障害の報告オッズ比を上げる薬物の探索	9
第2節 ボルテゾミブと末梢神経障害発症の因果関係の解析	11
第3節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害を抑制する併用薬の探索	12
考察	14
第2章 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害マウスに対する mTOR 阻害薬の鎮痛効果の検討および分子機序の解明.....	18
実験方法	20
実験結果	
第1節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスの作成	23
第2節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスに対する mTOR 阻害薬の鎮痛効果の検討.....	24
第3節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスの脊髄後角におけるグリア細胞活性化の観察.....	25
第4節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスの脊髄における mTOR 阻害薬の鎮痛効果の検討.....	27
第5節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスに対する S6K1 の阻害による鎮痛効果の検討.....	30
考察	32
総括および結論	36
謝辞	37
発表論文目録	38
参考文献	39

緒言

ボルテゾミブは多発性骨髄腫やマントル細胞リンパ腫の治療に使われるプロテアソーム阻害薬である。ボルテゾミブは2006年にFDAの承認を得て以来、難治性や再発性の多発性骨髄腫の生存率の向上に貢献している。ボルテゾミブ誘発末梢神経障害（bortezomib-induced peripheral neuropathy : BIPN）はボルテゾミブ投与に伴われる副作用であり、手足の先の感覚過敏、疼痛、痺れなどの手袋靴下型と呼ばれる感覚異常を主症状とする。BIPNの決定的な治療法は未確立であり、ボルテゾミブの減薬や投与中止によりがん治療が妨げられることがある。BIPNの治療薬の開発は、がん治療の成績の向上および患者のQOLの維持に貢献することになるだろう。

BIPNを含む末梢神経障害の治療薬の創薬研究において、動物モデルとヒトとの乖離は未解決の問題であり、有効な新規治療薬の創薬を困難なものにしている。末梢神経障害の基礎研究において、一般的には齧歯類モデルを用いた行動実験により感覚が評価される。しかし、ヒトの末梢神経障害の患者は、痺れや感覚鈍麻など様々な感覚異常および、誘発刺激を必要としない自発痛など複雑な症状を現すため、齧歯類モデルによる行動実験においては十分な評価が困難である。ヒトに的確に外挿されるモデルの評価を行うには課題が多い現状において、従来とは異なる新しい方法を試みる価値があるだろう。

ドラッグリポジショニングは市販後の薬を本来の適応症とは別の疾患の治療に使用すること、および新規治療ターゲットを見出す手法であり、短い開発期間、低いコストでの治療薬開発を可能とする。近年の医療情報の大規模化を背景に、電子カルテや市販後調査などのリアルワールドデータ解析を通じた網羅的なドラッグリポジショニングが可能となりつつある。当研究室では、臨床ビッグデータの活用と基礎実験を組み合わせる手法により、治療法が未確立の疾患の新規治療ターゲットを見出し、報告をしてきた。それらの研究は、有害事象自発報告のデータベースの解析を中心に進められた。ある医薬品Aの有害事象の発生を抑制する併用薬Bの探索を行い、有害事象抑制の作用点を特定し、新規治療ターゲットとして見出すという構想に基づく手法である。

本研究では、近年医療・創薬において注目されている臨床ビッグデータを活用し、明らかにされた未知の医薬品相互作用から治療薬の開発が困難なBIPNの新規治療ターゲットの探索を試みた。第1章では臨床ビッグデータ解析によりBIPNに対して高い治療効果を示すことが期待される薬を探索した。第2章で

は臨床ビッグデータ解析により導かれた仮説に基づき BIPN モデルマウスを用いた実験を行い、BIPN の治療薬の検証、作用機序の解明および新規治療ターゲットの探索を試みた。

これらの研究成果について以下に論じる。

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。

ASCO:	American Society of Clinical Oncology
ANOVA:	analysis of variance
ASCO:	American Society of Clinical Oncology
ASR:	adjusted sequence ratio
BIPN:	bortezomib-induced peripheral neuropathy
CIPN:	chemotherapy-induced peripheral neuropathy
CI:	confidential interval
DAPI:	4',6-diamino-2-phenylindole
DMSO:	dimethyl sulfoxide
DRG:	dorsal root ganglion
FAERS:	FDA Adverse Event Reporting System
FDA:	Food and Drug Administration
GFAP:	glial fibrillary acidic protein
GLT-1:	glutamate transporter-1
Iba1:	ionized calcium-binding adaptor molecule 1
ICD-10:	International Classification of Disease-10
mTOR:	mechanistic target of rapamycin
mTORC1:	mechanistic target of rapamycin complex 1
mTORC2:	mechanistic target of rapamycin complex 2
NCI-CTCAE:	National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events
PB:	phosphate buffer
PBS:	phosphate buffered saline
PI3K:	phosphatidylinositol-3 kinase
QOL:	quality of life
ROR:	reporting odds ratio

RR: reporting rate
S6K1: ribosomal protein S6 kinase 1
SEM: standard error of mean
SSA: sequence symmetry analysis

第1章 臨床ビッグデータ解析によるボルテゾミブ誘発

末梢神経障害治療薬の網羅的探索

ボルテゾミブは多発性骨髄腫やマントリン細胞リンパ腫の治療に使われるプロテアソーム阻害薬であり (1)、2006年に米国FDAから承認を受けた (2)。国内では2006年に多発性骨髄腫への適応が承認されたのち、2015年にはマントリン細胞リンパ腫への適応拡大が承認された (3,4)。ボルテゾミブは、再発性や難治性の多発性骨髄腫の生存率の向上に貢献したが (5)、副作用であるボルテゾミブ誘発末梢神経障害 (bortezomib-induced peripheral neuropathy : BIPN) が患者を苦しめるという課題が生じた。BIPNはボルテゾミブを投与された患者の手足の先に、疼痛を伴う灼熱感や感覚過敏、痺れを呈する手袋靴下型と呼ばれる感覚異常を発症させる (6)。BIPNの発症率は8.4–80.5% (中央値37.8%) であり、重症度については1.0–33.2%が日常生活に支障をきたすようなグレードの高いもの (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events [NCI-CTCAE]のスコアにおいてGrade 3-4) であったという報告がある (7)。また、BIPNのために5%の患者が治療の中断、12%が減薬をしたという報告がある (8)。BIPNの発症リスクは、ボルテゾミブの累積投与量および多発性骨髄腫に伴う末梢神経障害をすでに発症していることにより高まるが、年齢や性別には影響されない (9)。現在はしびれや疼痛を軽減させる対症療法のために、抗うつ薬や抗てんかん薬が使われているが (10)、その治療効果は未だ十分に評価されておらず、決定的な治療法や予防法は確立されていない。アメリカ臨床腫瘍学会 (ASCO) のガイドラインで化学療法誘発末梢神経障害 (chemotherapy-induced peripheral neuropathy : CIPN) の対症療法として推奨されているのはデュロキセチンのみであり、それは中程度の推奨に留まる (11, 12)。国内におけるCIPN治療薬の臨床使用では、プレガバリンが40%でルーチン使用され、デュロキセチンは20%で使用されているという報告がある (13)。抗痙攣薬プレガバリンは神経障害性疼痛治療の第一選択薬であり、CIPN治療への保険適用が有効のためよく使用されている。一方デュロキセチンはCIPNの治療には保険適用外であるためコストから使用されにくい面がある。日本がんサポーターズケア学会の策定したガイドラインにおいては、デュロキセチンは弱い推奨である一方、プレガバリンは推奨されていない。但しデュロキセチン以外の薬については、評価できる根拠となる研究が不十分である

(14)。国内および海外においても、BIPNを含むCIPNに対する治療法は未確立である。BIPNに対する決定的な治療法や予防法を確立することは、難治および再発の多発性骨髄腫の生存率の向上および質の高い抗がん治療の提供のためにも必要である。

BIPNの治療薬が未開発であることの背景には、モデル動物とヒトとの乖離が挙げられる。BIPNを含む神経障害性疼痛の基礎研究において、一般的には齧歯類モデルを用いた行動実験により症状が評価されるが、熱や機械的な刺激に誘発されない疼痛や自発的に起こる自発痛については、評価法は議論されているところである(15)。また、ヒトの慢性疼痛を複雑にする因子である、心因的および社会的な背景等の評価をモデル動物で行うことには課題が多い(16)。BIPNの患者に起こる症状は、灼熱感、痺れ、疼痛など多様であり(6)、モデルを用いて症状を的確に評価することが難しい。BIPNを含む疼痛研究において、ヒトへ妥当に当てはまるモデル動物と評価系の確立には課題が多く困難であるため、従来とは異なる新しい研究手法を試す価値はあるだろう。

ドラッグリポジショニングとは既に市販されている医薬品を、本来の適応症とは別の疾患の治療に用いることおよび、その医薬品をもとに新規治療ターゲットを見出すことである(17)。この手法を用いることにより、新薬の開発期間およびコストの削減が期待される。以前は偶発的な発見からドラッグリポジショニングは始められていたが、近年の医療情報の大規模化を背景に、電子カルテや市販後調査などのリアルワールドデータ解析を通じた網羅的なドラッグリポジショニングが可能となりつつある(18)。ドラッグリポジショニングの例として、医薬品有害事象のデータベースを用いて、薬物間に起こる未知の相互作用を見出し、治療法が未確立である疾患の新規治療ターゲットを見出した研究報告がある(19, 20, 21)。これらの報告では、臨床ビッグデータ解析の結果から導かれた、研究仮説に基づいて研究が行われた(22)。これらの研究では、米国FDAから無料で公開されている医薬品有害事象自発報告データベースFAERSのデータを用いた解析から始められた。FAERSデータは全世界から1100万件以上の報告が蓄積される大規模なリアルワールドデータであり、医薬品の隠れた相互作用の探索を可能とする。ただし、自発報告のためデータに欠損がみられる事がある。また、医薬品使用の時系列の記載はないため、解析から得られるものは医薬品と有害事象の発生の相関であり、因果関係を明らかにするものではない。

本研究では、近年医療・創薬において注目されている臨床ビッグデータを活用し、明らかにされた未知の医薬品相互作用から治療薬の開発が困難な疾患の新規治療ターゲットの探索を試みた。第1章では臨床ビッグデータ解析によ

りボルテゾミブ誘発末梢神経障害に高い治療効果を示すことが期待される薬を探索した。

方法

FAERS データ解析

2004 年から 2019 年までの有害事象報告を FDA のウェブサイト (<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-adverse-event-reporting-system-faers>) から入手した。重複した症例は既報 (23) の通りに除去して 11,438,031 例を解析に使用した。また、FAERS に記載されている医薬品名は任意記載形式であるため、ライフサイエンス辞書を駆使したテキストマイニングにより、医薬品名 Medical Subject Headings (MeSH) の記述子 ID を使用して一般名に統一した。ボルテゾミブ誘発末梢神経障害は MedDRA version 23.0 の「peripheral neuropathy」と定義した。解析において、有害事象である末梢神経障害の報告オッズ比を上げる医薬品を薬物 A とした。薬物 A に併用されて末梢神経障害の報告オッズ比を低下させる医薬品を薬物 B とした。

薬物 A の解析 (Fig. 1) における算出方法を以下に示す。FAERS に報告された患者を以下の 4 つのグループに分けた。(a) 薬物 A を投与され、かつ有害事象である末梢神経障害を発症した患者、(b) 薬物 A を投与され、かつ有害事象である末梢神経障害を発症しなかった患者、(c) 薬物 A を投与されず、かつ有害事象である末梢神経障害を発症した患者、(d) 薬物 A を投与されず、かつ有害事象である末梢神経障害を発症しなかった患者。有害事象の報告率は 95% 信頼区間 (CI) 付きの報告オッズ比 (ROR) と Z スコアにより評価された。ROR、95% CI および Z スコアは以下の (1) - (3) の式から算出された。ボルケーノプロットでは P 値の代わりに Z スコアを使用した。

$$\text{ROR} = \frac{a/b}{c/d} \quad (1)$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log(\text{ROR}) \pm 1.96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}} \right\} \quad (2)$$

$$\text{Z score} = \frac{\log(\text{ROR})}{\sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}} \quad (3)$$

薬物 A に併用された薬物 B の解析 (Fig. 3 A) における算出方法を以下に示す。薬物 A を投与された患者を以下の 4 つのグループに分けた。(a1) 薬物 B を投与

され、かつ有害事象である末梢神経障害を発症した患者、(b1) 薬物 B を投与され、かつ有害事象である末梢神経障害を発症しなかった患者、(c1) 薬物 B を投与されず、かつ有害事象である末梢神経障害を発症した患者、(d1) 薬物 B を投与されず、かつ有害事象である末梢神経障害を発症しなかった患者。ROR、95% CI および Z スコアは以下の (4) – (6) の式から算出された。ボルケーノプロットでは P 値の代わりに Z スコアを使用した。

$$\text{ROR} = \frac{a1/b1}{c1/d1} \quad (4)$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log(\text{ROR}) \pm 1.96 \sqrt{\frac{1}{a1} + \frac{1}{b1} + \frac{1}{c1} + \frac{1}{d1}} \right\} \quad (5)$$

$$\text{Z score} = \frac{\log(\text{ROR})}{\sqrt{\frac{1}{a1} + \frac{1}{b1} + \frac{1}{c1} + \frac{1}{d1}}} \quad (6)$$

Fig. 3 B における算出方法を以下に示す。FAERS に報告された患者をボルテゾミブ使用および mTOR 阻害薬使用の有無により 4 つのグループに分けた。有害事象の発生は報告率 (RR) により評価された。RR は以下の (7) の式から算出された。

$$\text{RR} = \frac{\text{各群において末梢神経障害を発症した患者数}}{\text{各群における全患者数}} \times 100 \quad (7)$$

JMDC データ解析

2005 年 1 月から 2019 年 8 月までの保険請求データは株式会社 JMDC から購入した。このデータセットには 7,438,470 人分の月単位の医療診断と処方箋請求が含まれていた。データを構成するのは企業の従業員とその家族であること、日本の健康保険組合のシステムから、ほとんどの患者は 65 歳以下であり、75 歳以上の患者はいなかった。診断名は国際疾病分類第 10 版に従い分類され、化学療法誘発性末梢神経障害は ICD-10 コードの G629 「peripheral neuropathy」に定義した。JMDC データに末梢神経障害と診断された患者は 388,666 人いた。抗がん剤の投与後に末梢神経障害が発症したという時系列を確定させ、薬と有害事象の因果関係を明らかにするために、既報に従い観察開始の前後 36 ヶ月間の sequence symmetry analysis (SSA) により解析を行なった (24)。

結果

第1節 末梢神経障害の報告オッズ比を上げる薬物の探索

はじめに、FAERS データにおける末梢神経障害の発生と医薬品の使用との相関を、ROR と Z スコアを算出し不均衡分析を用いて解析し、末梢神経障害の報告オッズ比を上げる医薬品である薬物 A を探索した。ボルテゾミブの Z スコアはデータ内の医薬品の中で一番高く、Z スコアの高い医薬品の中では ROR が最も高い値を示すことが確認された。薬物 A の中から Z スコアの高い抗がん剤を挙げたところ、いずれの薬においても添付文書内に末梢神経障害の発生が報告されていた (14)。その中でも化学療法誘発末梢神経障害を起こすことがよく知られている抗がん剤 (9) であるオキサリプラチン、パクリタキセル、サリドマイドおよびシスプラチンの ROR と Z スコアは高値を示した (Fig. 1, Table. 1)。

また、ボルテゾミブ使用者の中で年齢および性別が、末梢神経障害の発症リスクに影響を及ぼすかどうか層別解析により検討した。ボルテゾミブ使用群および非使用群の両方において、65 歳未満と 65 歳以上との層の間には末梢神経障害の報告率に差はみられなかった。同様に末梢神経障害の報告率に性差はみられなかった (Table. 2)。

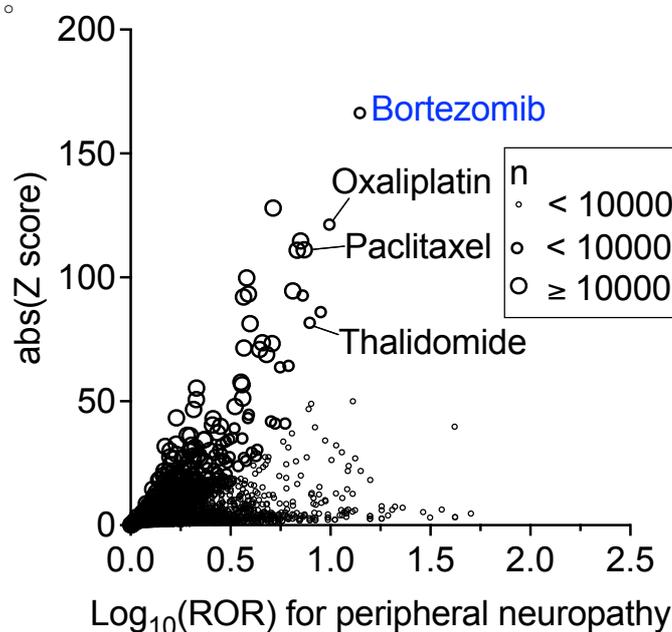


Fig. 1 末梢神経障害の報告率を上げる薬物の網羅的解析

FAERS データの解析により末梢神経障害の ROR を上げる薬物 A の探索を行なった。各医薬品について算出した ROR の対数および Z スコアの絶対値を用いてボルケーノプロットを作成した。各プロットの大きさは医薬品を使用した症例数を表す。ボルテゾミブの Z スコアは最も高く、ROR も高い値を示した。

Anti-cancer drug of Drug A	ROR	Z score	Incident rate in interview form (%)
Bortezomib	14.02	166.33	28.20
Oxaliplatin	9.88	121.29	96.60
Paclitaxel	7.40	111.09	43.80
Lenalidomide	3.67	92.12	5.50
Thalidomide	7.87	81.69	37.80
Vincristine	5.10	73.32	25.50
Carboplatin	3.63	51.27	<1~10
Docetaxel	3.33	47.87	Unknown
Ixazomib	5.93	40.99	11.10
Pomalidomide	3.11	34.56	7.2
Vinorelbine	5.80	33.78	<5
Cisplatin	2.83	32.68	<1~10
Carfilzomib	3.78	25.94	≥5

Table. 1 末梢神経障害の ROR が上がる抗がん剤の Z スコアおよび末梢神経障害の発生率

FAERS データにおける末梢神経障害の ROR を上げる薬物 A の中で Z スコアの高い抗がん剤を挙げた。ボルテゾミブの Z スコアは最も高く、ROR も高いことが確認された。リストに挙げられた抗がん剤の添付文書内には、末梢神経障害発生の報告が記載

	Reporting ratio of peripheral neuropathy		ROR (95%CI)
	With bortezomib	Without bortezomib	
<u>Age</u>			
<65	1,207 / 13,826 (8.7%)	38,377 / 4,471,810 (0.86%)	11.0 (10.4–11.7)
≥65	1,377 / 16,404 (8.4%)	18,306 / 2,383,664 (0.77%)	11.8 (11.2–12.5)
<u>Sex</u>			
Male	1,966 / 21,483 (9.2%)	30,320 / 3,931,059 (0.77%)	13.0 (12.4–13.6)
Female	1,583 / 17,275 (9.2%)	47,671 / 6,301,723 (0.76%)	13.2 (12.6–13.9)

Table. 2 末梢神経障害を発症した患者の因子の層別解析

FAERS データを用いて、末梢神経障害を発症した患者の年齢および性別について層別解析を行なった。65 歳未満の群および 65 歳以上の群の両群間において、ボルテゾミブの末梢神経障害の報告率に差はみられず、ボルテゾミブを使用した患者の末梢神経障害の報告率は非使用に患者に比べ 10 倍以上高かった。性別もボルテゾミブの末梢神経障害の報告率に影響を与えなかった。

第2節 ボルテゾミブと末梢神経障害発症の因果関係の解析

JMDC のデータを用いて、ボルテゾミブと末梢神経障害の因果関係を調べるため SSA を行なった。JMDC 加入からの月ごとのボルテゾミブ使用患者数と末梢神経障害を発症した患者数を考慮して、加入前よりボルテゾミブ使用または末梢神経障害を発症していた患者を除外する期間 (Run-in period) を3ヶ月に設定した (Fig. 2 A, B)。SSA によりボルテゾミブ使用開始前後36ヶ月間に末梢神経障害を発症した患者数の計測を行ったところ、ボルテゾミブ使用後に増加が見られた。調整順序比 ASR は 2.03 (1.03~3.10) であった。95%信頼区間の下限が1より大きく、その有意性が示された (Fig. 2 C)。

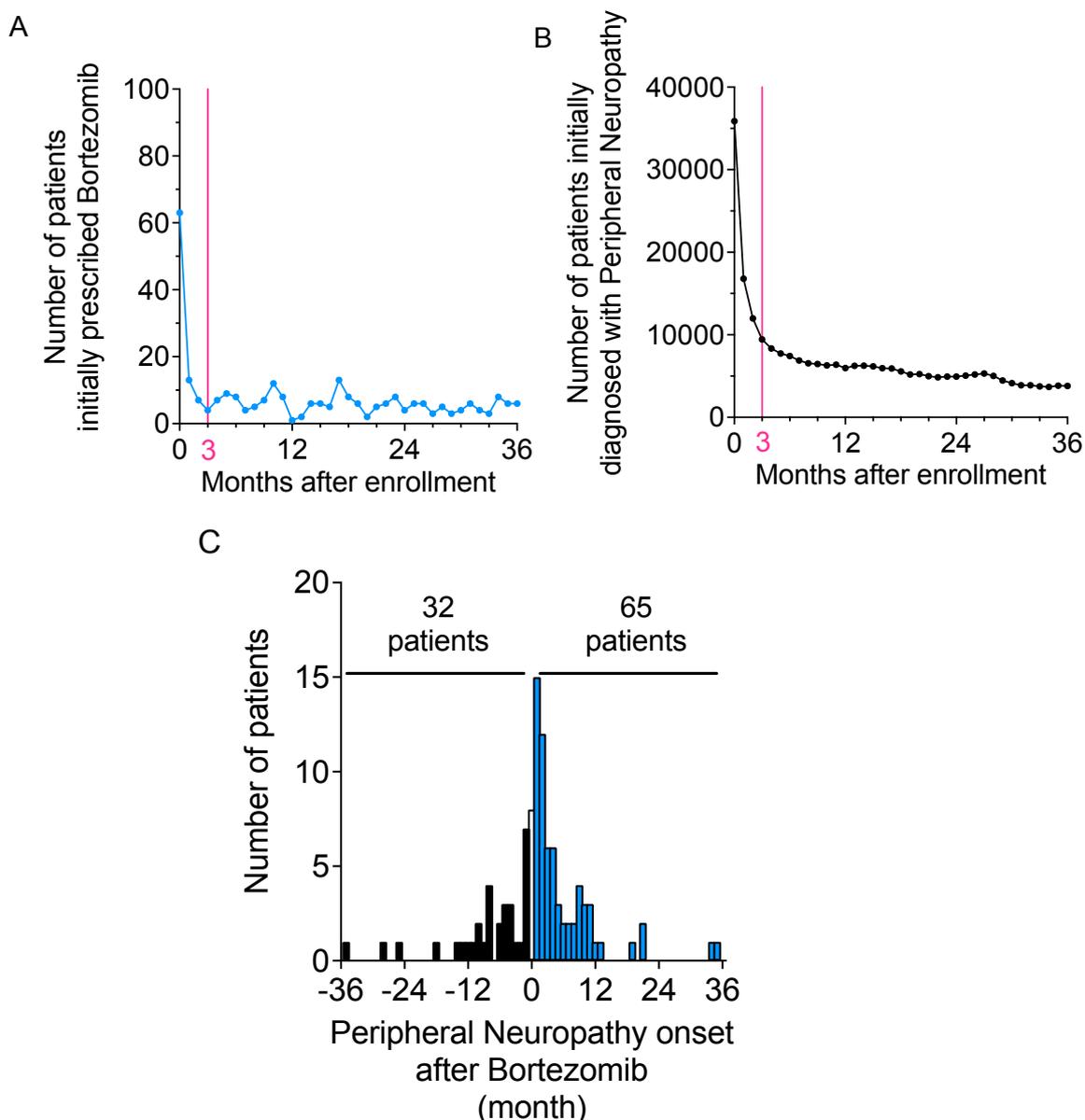
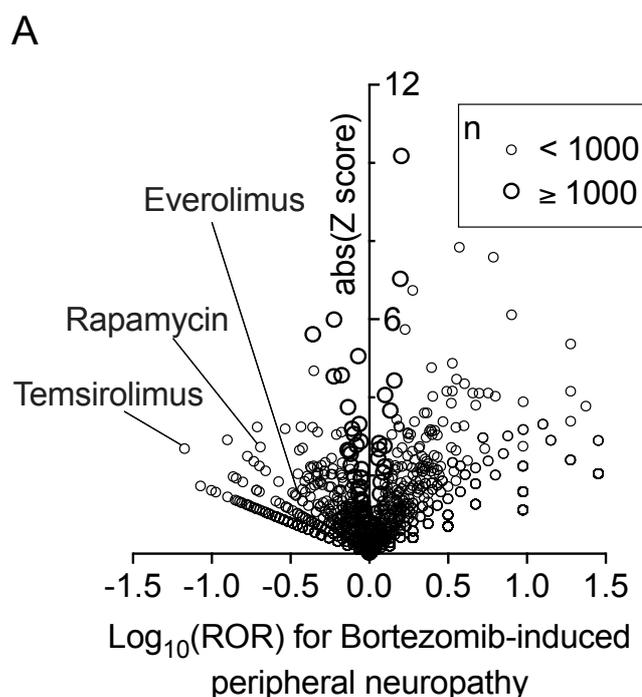


Fig. 2 ボルテゾミブ使用と末梢神経障害発症の時間的順序の解析

ボルテゾミブの使用と末梢神経障害の因果関係を調べるため、JMDC 保有のレセプトデータの解析を行なった。A, B. JMDC 加入後に新規にボルテゾミブを使用した後に末梢神経障害と診断された患者の選別を行なった。JMDC 加入後に初めてボルテゾミブを処方された患者数を A に、初めて末梢神経障害と診断された患者数を B に示した。JMDC 加入後 2 ヶ月間は患者数が多く、3 ヶ月後からは患者数の変動が少なくなり 36 ヶ月後まで維持された。SSA において JMDC 加入 3 ヶ月までの患者を除外した。C. ボルテゾミブの使用と末梢神経障害の時間的順序を示すため SSA を行なった。ボルテゾミブの処方を前後の時間を横軸に、末梢神経障害と診断された患者数をグラフに示した。ボルテゾミブの処方後に末梢神経障害と診断される患者数が増加した。調整順序比 ASR は 2.03 (1.33-3.10) であり、95%信頼区間の下限が 1 より大きく、その有意性が示された。

第 3 節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害を抑制する併用薬の探索

次に FAERS データを用いて、末梢神経障害の報告オッズ比を上げる薬物 A をボルテゾミブとして、ボルテゾミブ使用者群における末梢神経障害に対する併用薬 B の交絡効果を網羅的に解析した。多くの併用薬がボルテゾミブ使用群の末梢神経障害の ROR を変化させたが、併用薬の臨床での適用や作用機序を考察して併用薬を除外した。シスプラチン、ポマリドミドおよびレナリドミドは末梢神経障害の ROR を低下させたが、Z スコアの絶対値は低く、それらが神経毒性を有するため除外した (14)。mTOR 阻害薬であるテムシロリムスが併用薬 B の中で最も末梢神経障害の ROR を低下させた。他の mTOR 阻害薬であるラパマイシンとエベロリムスも ROR を低下させた (Fig. 3 A, Table. 3)。これらの mTOR 阻害薬はボルテゾミブに併用されない場合は末梢神経障害の報告率に影響を与えず、ボルテゾミブに併用された患者群の末梢神経障害の報告率を下げた (Fig. 3B)。



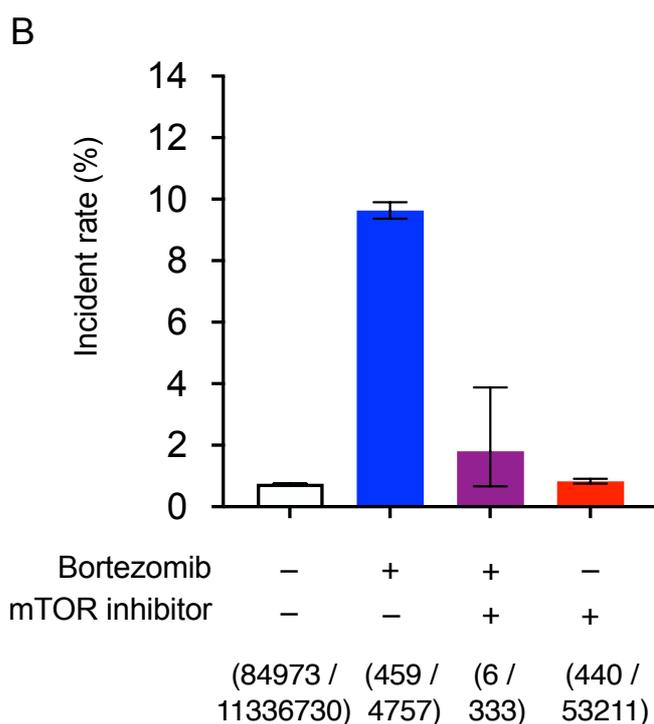


Fig. 3 ボルテゾミブ使用患者の末梢神経障害の ROR を下げる併用薬の解析

FAERS データの解析によりボルテゾミブによる末梢神経障害の報告率を下げる併用薬の探索を行なった。各医薬品について算出した ROR の対数および Z 値の絶対値を用いてボルケーノプロットを作成した。各プロットの大きさは医薬品を使用した症例数を表す。**A.** ボルテゾミブを使用した症例の中で、末梢神経障害の ROR を下げる併用薬 **B** の解析を行なった。テムシロリムスが最も末梢神経障害の ROR を低下させ、他の mTOR 阻害薬（ラパマイシン、エベロリムス）も ROR を低下させた。**B.** ボルテゾミブおよび mTOR 阻害薬の使用と FAERS データにおける末梢神経障害の報告率を示した。ボルテゾミブの単独使用は末梢神経障害の発生率を上げ、mTOR 阻害薬との併用は発生率の上昇を抑制した。mTOR 阻害薬の単独使用は末梢神経障害の発生率に影響を与えなかった。

Drug B	ROR	Drug B	ROR
Temsrolimus	0.07 (0.01-0.48)	Perindopril	0.35 (0.13-0.96)
Ibrutinib	0.13 (0.03-0.51)	Torsemide	0.36 (0.17-0.77)
Bimatoprost	0.14 (0.02-0.98)	Fludarabine	0.37 (0.20-0.67)
Dalteparin	0.17 (0.04-0.68)	Everolimus	0.38 (0.09 -1.55)
Beclomethasone	0.18 (0.05-0.75)	Glimepiride	0.38 (0.19-0.76)
Antilymphocyte globulin	0.19 (0.07-0.52)	Panobinostat	0.44 (0.32-0.62)
Calcium acetate	0.20 (0.05-0.81)	Methylprednisolone	0.40 (0.16-0.99)
Rapamycin	0.20 (0.06-0.64)	Busulfan	0.42 (0.20-0.90)
Valganciclovir	0.22 (0.05-0.89)	Nebivolol	0.43 (0.20-0.91)
Formoterol	0.29 (0.14-0.62)	Mycophenolic acid	0.44 (0.26-0.72)

Table. 3 ボルテゾミブ使用患者の末梢神経障害の ROR を下げる併用薬 **B**

FAERS データの解析から (Fig. 3 A)、ボルテゾミブ使用症例の中で末梢神経障害の ROR を下げる併用薬 **B** のうち上位をリストに挙げた。テムシロリムスが最も ROR を下げ、ラパマイシンおよびエベロリムスも上位に含まれた。

考察

これまでに FAERS を使ったデータ解析から医薬品同士の予測されない相互作用が見出され、報告されてきた (19, 20, 21, 25)。本研究の第 1 章では、FAERS の解析から BIPN の抑制効果を有する併用薬の探索を行い、BIPN の治療薬へのドラッグリポジショニングが可能な医薬品を見出すことを試みた。これらの解析および本研究の解析において使用された FAERS データは、医薬品と有害事象の間のシグナルを検出するのに十分な大きさであった。末梢神経障害の ROR を上げる薬物 A を探索した解析結果 (Fig. 1, Table. 1) から、ボルテゾミブの Z スコアはデータ内の医薬品の中で一番高く、Z スコアの高い医薬品の中では ROR が最も高い値を示すことが確認された。Z スコアの高い抗がん剤の中には、オキサリプラチン、パクリタキセル、ビンクリスチン、サリドマイドという化学療法誘発末梢神経障害を起こすと知られている抗がん剤 (9) が含まれ、それらの ROR は高値であった。その他の Table. 1 に挙げられた抗がん剤は、添付文書内に末梢神経障害の発生の報告が記載されていた (14)。

化学療法誘発末梢神経障害 (chemotherapy-induced peripheral neuropathy : CIPN) はオキサリプラチン、パクリタキセル、ボルテゾミブ、ビンクリスチンおよびサリドマイドに代表される抗がん剤により引き起こされる末梢神経障害であり、BIPN は CIPN の一つである。CIPN の主症状は手足の末端の感覚異常であるが、抗がん剤の種類により特徴があり、灼熱感、冷覚過敏、感覚過敏、しびれ、疼痛など様々である (26, 28)。FAERS データの解析より、末梢神経障害の ROR を上げる医薬品リストには CIPN を起こす抗がん剤が挙げられたが、ボルテゾミブはそれらの中では最も ROR および Z 値が高値であった。CIPN を起こす抗がん剤で最も知られているものはオキサリプラチンを含む白金製剤およびパクリタキセルを含むタキサンである。オキサリプラチンは 30~50% の患者に急性から慢性の末梢神経障害を起こし (9, 27, 28, 29)、パクリタキセルは 59.2~92.8% の患者に末梢神経障害を起こす (29)、という報告がある。BIPN の発症率は 8.4~80.5% (中央値 37.8%) であり、重症度については 1.0~33.2% が日常生活に支障をきたすようなグレードの高いものであったという報告がある (7)。ROR は疾患の重症度および発生率を表すわけではなく、データベース内における不均衡シグナルを表すため、有害事象と医薬品を結びつけるためには更なる検証が必要である (30, 31)。また、FAERS データには医薬品使用と有害事象の時系列が不明であり、対象医薬品を使用した患者の総数が不明であるため、医薬品使用と有害事象発生

の因果関係は明らかではない。当研究室の先行研究においては JMDC の保有する国内の健康保険組合加入者とその家族の月単位のレセプトデータを解析して、医薬品と有害事象の因果関係の検証している (20,21)。ボルテゾミブにより起こされる末梢神経障害は BIPN として知られており (6)、ボルテゾミブと末梢神経障害の因果関係は疑いにくいものではあるが、JMDC のデータを用いて時間的順序を明らかにする SSA による更なる検証を行なった。

SSA によりボルテゾミブの使用開始を境界として末梢神経障害を発症した患者数を調べたところ、ボルテゾミブ使用後の末梢神経障害を発症した患者数は使用前に比べて多く見られることが明らかになった。薬物使用とイベント発生の因果関係の指標となる調整順序比 (ASR) は 2.03 であり、95%信頼区間の下限が 1 より大きく、有意性が示された (Fig. 2 C)。この結果から、ボルテゾミブの使用と末梢神経障害には、SSA から因果関係があることが示唆された。これは、ボルテゾミブが CIPN を起こす抗がん剤として既に知られていること (7) に矛盾しない結果であることが確認された。

次に FAERS データのボルテゾミブを使用した患者群の中で、末梢神経障害の ROR を下げる併用薬 B の探索を行った。mTOR 阻害薬テムシロリムスは最も ROR を下げ、他の mTOR 阻害薬であるラパマイシンおよびエベロリムスも ROR を下げた (Fig. 3 A)。末梢神経障害の ROR を下げる併用薬 B の上位に、国内で臨床使用される mTOR 阻害薬 3 種類全てが含まれた (Table. 3)。

また JMDC のデータの SSA により、ボルテゾミブと末梢神経障害と併用薬 mTOR 阻害薬の因果関係の検証を試みたが、ボルテゾミブと mTOR 阻害薬を併用した症例は 1 人のみであるため解析が不可能であった。そのため、リストに挙げられた併用薬の臨床適用および作用機序の考察により、BIPN 抑制効果の見込める併用薬の絞り込みを行い、更なる検証は第 2 章の実験による検証に委ねた。

一方、神経障害性疼痛の治療に使われる、ガバペンチン、プレガバリンやデュロキセチンは末梢神経障害の ROR を下げなかった。それらはすでに発症した末梢神経障害に対して使われる治療薬であり、BIPN の発症には影響しなかったと考えられる (32)。イブルチニブおよびフルダラビンなどの他の抗がん剤も ROR を下げたが、mTOR 阻害薬による低下には及ばなかった。臨床研究においてイブルチニブは、再発および難治性のマンツル細胞リンパ腫に対して単剤で有効であり、ボルテゾミブの使用歴はその奏効率には影響しないことを示唆する報告がある (33)。一方で、*in vitro* の基礎研究では、イブルチニブは骨髄腫細胞への毒性を有し、ボルテゾミブおよびレナリドミドの活性を増強

することが示唆された報告がある (34)。再発および難治性マントル細胞リンパ腫の患者にボルテゾミブにフルダラビンおよびシクロホスファミドを併用したプロトコルの有用性を示唆する臨床研究報告がある (35)。また *in vitro* の研究から、フルダラビンはボルテゾミブの慢性白血病細胞に対する毒性を増強させることが示唆される報告がある (36)。実際にボルテゾミブの抗がん治療の成績を向上させるため、他の薬と併用を試みた多くの臨床研究が行われている (37)。他の抗がん剤の併用による末梢神経障害の ROR の低下の解釈には、ボルテゾミブが中止もしくは減薬されたことにより末梢神経障害が改善されたため、ROR が低下した可能性が考えられる。同様に、ステロイドも抗がん治療に併用されるため、ボルテゾミブの減薬による末梢神経障害の ROR の低下がみられた可能性が考えられる。これらの場合、ボルテゾミブの減薬もしくは、併用薬の使用が末梢神経障害の抑制に寄与したか判別することは難しい。

末梢神経障害およびがんの治療に一般的に適用されない医薬品について考察する。 $\beta 2$ アドレナリン受容体作動薬であるホルモテロールは、神経損傷モデルマウスの機械的刺激および寒冷刺激に対する過敏反応を軽減したという報告がある (38)。鎮痛に関与するアドレナリン受容体は、下降性抑制系の $\alpha 2$ 受容体が知られているが (39)、 $\beta 2$ 受容体の鎮痛効果や抗炎症作用も注目されている (40)。これは BIPN の治療薬になり得るかもしれない。ただし、ROR を下げる薬の上位に他の $\beta 2$ 作動薬は挙げられていないため、 $\beta 2$ 作動薬の BIPN 抑制の強いシグナルが検出されたのではなく、作用機序が $\beta 2$ 受容体以外である可能性もある。その他にリストに挙げた医薬品ダルテパリンには BIPN との関連を示唆する既報がある。低分子ヘパリンであるダルテパリンは BIPN モデルに鎮痛効果を示すという報告があり、そこでは HMGB1-RAGE を介する機序が既に解明されている (41)。

ボルテゾミブとテムシロリムスの併用により、多発性骨髄腫の治療成績の向上が示唆される臨床研究報告がある (42) が、この報告ではテムシロリムスが末梢神経障害の発生を抑制するとまでは言及していない。テムシロリムスおよびエベロリムスは抗がん剤としても使用されているが、多発性骨髄腫ではなく腎細胞がん、乳がん、神経内分泌腫瘍の治療に使用される (43, 44, 45, 46)。しかし、mTOR 阻害薬は免疫抑制薬としても用いられるため、ボルテゾミブの減薬による末梢神経障害の改善だけが ROR の低下の原因ではないと考えられる。mTOR 阻害薬は末梢神経障害の抑制効果を有する可能性がある。そして mTOR 阻害薬 3 種全てが ROR を低下させたことは BIPN 抑制の強いシグナルとして、BIPN 抑制効果を有する可能性を支持する結果といえる。一方で基礎研

究において、ラパマイシンがオキサリプラチン (47) およびシスプラチン (48) 誘発末梢神経障害モデルに対する鎮痛効果を示したという報告がある。また、神経障害性疼痛モデルである CCI ラット (49)、SNI マウス (50) および SNL ラット (51) の感覚過敏反応に対して、mTOR 阻害薬が抑制効果を示したと報告されている。これらの報告から mTOR 阻害薬が鎮痛効果を持つことは支持されるが、その鎮痛効果はボルテゾミブに特異的ではなく、病的疼痛全般にもたらされる可能性はある。これらを追求するには鎮痛効果の機序の解明が必要である。

FAERS の解析結果から「mTOR 阻害薬はボルテゾミブ誘発末梢神経障害に対して抑制効果を有する」という研究仮説が導かれ、第 2 章において、仮説の検証および機序の解明を試みた。

第二章 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害マウスに対する

mTOR 阻害薬の鎮痛効果の検討および分子機序の解明

BIPN はボルテゾミブ使用に伴う副作用であり、決定的な治療法が確立されていない。BIPN を含む末梢神経障害の治療薬の創薬においては、その病理機序が複雑で全容が明らかでないことおよび、疾患モデルのヒトへの外挿の妥当性が疑われることなどの課題があり新薬開発が困難である。本研究では、臨床ビッグデータ解析から研究仮説を導く手法を試みた。第 1 章では臨床ビッグデータ解析から BIPN の抑制効果の見込める医薬品の網羅的探索を行い、mTOR 阻害薬を見出した。

mTOR 経路は、アミノ酸や成長因子などの刺激を受けて、細胞の成長、増殖、生存の調節を行う経路であり、がん、代謝性疾患、神経変性疾患および老化に関わる (52)。mTOR は PI3K/AKT/mTOR 経路を構成する分子であり、生体内では mTORC1 と mTORC2 の 2 種類の複合体を形成する。mTORC1 はタンパク合成および転写の調節を行い、細胞成長のハブとなる分子であり、ラパマイシン感受性がありラパマイシン、エベロリムスなどの mTOR 阻害薬により阻害される。mTORC2 は細胞の生存や増殖に関わる分子であり、ラパマイシンに対して非感受性である (52)。

mTOR 阻害薬はラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスが医薬品として製造され、免疫抑制剤および抗腫瘍薬として使用されている。ラパマイシンは主に移植片対宿主病の治療 (53, 54) およびリンパ脈管筋腫症の治療 (55, 56) に使用されるが、臨床研究において抗腫瘍効果も示唆される (55, 56)。テムシロリムスおよびエベロリムスは腎細胞がん (59, 60)、エベロリムスは肺がんや神経内分泌腫瘍の治療に使用される (45, 46)。また、げっ歯類による基礎研究では、mTOR 経路は慢性疼痛に関係することが示唆されている (49, 50, 51)。mTOR 阻害薬とボルテゾミブを含む抗がん剤の併用により骨髄腫および白血病の治療効果の向上を示唆する報告がある (42, 61)。mTOR 阻害薬をボルテゾミブに併用することにより、抗腫瘍効果の向上に加えて、末梢神経障害の抑制を目指すことができるかもしれない。しかし、免疫抑制薬や抗腫瘍薬として使われる mTOR 阻害薬を鎮痛薬に転用することは、BIPN 治療を必要とする患者に一般的に適用できるかどうかには疑いがある。mTOR 阻害薬の鎮痛機序の解明から、新規治療ターゲットを見出す必要がある。

第1章では、副作用有害事象データベース FAERS のデータ解析から BIPN を抑制する医薬品として mTOR 阻害薬が見出された。第2章では、第1章の結果から導かれた研究仮説に基づき、BIPN モデルマウスに対する mTOR 阻害薬の鎮痛効果の検討および分子機序の解明から、新規治療ターゲットの特定を試みた。

方法

動物

全ての実験は、動物の使用数と実験回数を最小限にするように設計された。雄性 C57BL/6J 系マウス (6-8 週齢、20-30 g) は日本 SLC から購入した。全ての動物は室温 22±2°C、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。全ての動物実験は京都大学実験動物委員会の倫理指針に基づき行なった (承認番号 13-38-2, 19-38, 19-38-2, 19-38-3)。

試薬

ボルテゾミブは Wako から、ラパマイシンとエベロリムスは LC Laboratories から、PF-4708671 は Cayman Chemical から購入した。ボルテゾミブは DMSO に溶解し-20°C に在庫を保存し、最終濃度が 1%DMSO になるように生理的食塩水で希釈した。全身投与のラパマイシンおよびエベロリムスは使用前に DMSO に溶解し、最終濃度が 1%DMSO になるように生理的食塩水で希釈した。髄腔内投与のラパマイシンエベロリムスおよび PF-4708671 は使用前に DMSO に溶解し、最終濃度が 10%DMSO になるように生理的食塩水で希釈した。機械的疼痛過敏を示す BIPN モデルマウスを作成するために、ボルテゾミブを 1 mg/kg を週に 2 回を 2 週間腹腔内投与した (62) (Fig. 4 A)。ボルテゾミブを 2 週間投与されたマウスに対してラパマイシン (3, 6, 10 mg/kg 腹腔内投与、10, 100 nmol または 1, 10 μmol 髄腔内投与)、エベロリムス (10, 30 mg/kg 腹腔内投与、20, 200 nmol または 2, 20 μmol 髄腔内投与) および PF-4708671 (10, 100 nmol 髄腔内投与) の単回投与を行い、急性鎮痛効果の検討をするための行動実験を行った。髄腔内投与はイソフルランによる全身麻酔下で、5 μl の液量を腰椎穿刺により投与した。

行動実験

機械的刺激に対する反応を von Frey filament test により評価した。穴を空けた金属板の床の上に置いたアクリル製の箱にマウスを入れて、測定開始の前に 30 分以上の馴らしを行った。up-down 法では、7 種類 (0.008, 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 1.0 g) の重さのフィラメント (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) を用いて、マウスの足底にフィラメントをわずかに曲がる程度の力で約 1 秒間押し当てる操作を行った。フィラメントによる刺激に対するマウスの反応をスコア化した。足を激しく動かし回避する、また振る (flinching)、舐める (licking)、などの動作

を伴う場合 2 点、足を動かし回避する場合 1 点、反応しない場合を 0 点とした。5 回のフィラメント刺激を 1 つの測定単位として、フィラメント刺激は 1 分程度の間隔を置いて行った。0.16 g のフィラメントから始め、一つのフィラメントについて 5 回刺激を行い、スコアの合計が 5 点以上ならば反応ありとして一段階軽いフィラメントへ、4 点以下ならば反応なしとして一段階重いフィラメントを用いて次の測定を行った。初めて反応の有無に変化のあったフィラメントの重さから 4 回の測定を行い、50%反応閾値を算出した (63)。急性鎮痛効果の検討はスコア法により行なった。0.16 g のフィラメントを用いてマウスの足底を 10 回刺激することを一つの測定単位として、薬物投与後に継時的に測定を行った。刺激に対するスコアの判定は上記の方法と同様に行った。20 点を最高点として、機械的刺激に対する過敏反応を評価した (64, 65)。

免疫染色による組織学的評価

マウスに 3 種混合麻酔 (0.5 mg/kg メデトミジン [Zenoac]、4.0 mg/kg ミダゾラム [Sandoz]、5 mg/kg ブトルファノール [Meiji Seika Pharm] の腹腔内投与) (66) による全身麻酔を行い、経心灌流法により K^+ free リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で脱血ののちに 4 %パラホルムアルデヒド含リン酸緩衝液 (PB) により固定をした。第 4 腰椎節の部分の脊髓を採取し、氷中で 3 時間の後固定ののちに、18 %スクロース含 PB 液に浸漬し一晩 4 °C でスクロース置換を行った。クリオモルドを用いてティッシュ・テック O.T.C コンパウンドに -70 °C で包埋したのち、クリオスタット (Leica CM 1950; Leica Biosystems, Vista, CA, USA) で厚さ 20 μ m の横断面の凍結切片を作製した。0.25% Triton X-100 を含む PBS により 3 回洗浄し、3%牛血清アルブミン (BSA) および 0.25% Triton X-100 を含む PBS により室温で 45 分間のブロックングののち、抗 GFAP ウサギ IgG (rabbit anti-GFAP antibody, 1:300; Abcam, Cambridge, UK) もしくは抗 Iba-1 ウサギ抗体 (rabbit anti-Iba1 antibody, 1:500; Wako, Osaka, Japan) をスライドグラス上の切片に載せて一晩 4 °C にインキュベートして一次抗体処置を行った。PBS により 3 回洗浄したのち Alexa Fluor 488 標識抗ウサギロバ IgG (1:300, Thermo Fisher Scientific) もしくは Alexa Fluor 594 標識抗ウサギロバ IgG (1:300, Thermo Fisher Scientific) を室温で遮光し 1 時間インキュベートして二次抗体処置を行った。共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) により切片の観察を行い、脊髓後角の第 I 層および II 層における GFAP もしくは Iba-1 陽性細胞数を計数した。細胞数は、封入剤中の DAPI (DAPI-Fluoromount-G; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) により染色された細胞核の数を細胞数とみなし、計数

した。

統計解析

動物実験のデータは GraphPad Prism v8.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて処理し、データは平均値±標準誤差 (SEM) を表記した。2 群間の比較には Student's *t*-test を用いて、2 群以上の比較には one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) で分散分析を行い、Bonferroni または Sidak post hoc tests を用いて多重比較検定を行った。タイムコースのデータは two-way repeated measures ANOVA で分散分析を行い、Bonferroni post hoc tests を用いて多重比較検定を行った。全ての *p* 値が 5%未満を統計的に有意であるとみなした。

結果

第1節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスの作成

mTOR 阻害薬の BIPN に対する治療効果を検討するため、BIPN モデルマウスを作成した。ボルテゾミブを 1 mg/kg、週に 2 回 2 週間 (0、3、7、10 日) 腹腔内投与を行った。von Frey filament test による機械的刺激に対する反応の評価は投与前、投与後 1、7、14 日に行った (Fig. 4 A)。von Frey filament に対する 50% 反応閾値は、ボルテゾミブ投与後 1 日から低下し、14 日まで持続した (Fig. 4 B)。ボルテゾミブ投与 14 日後のマウスを BIPN モデルマウスとした。

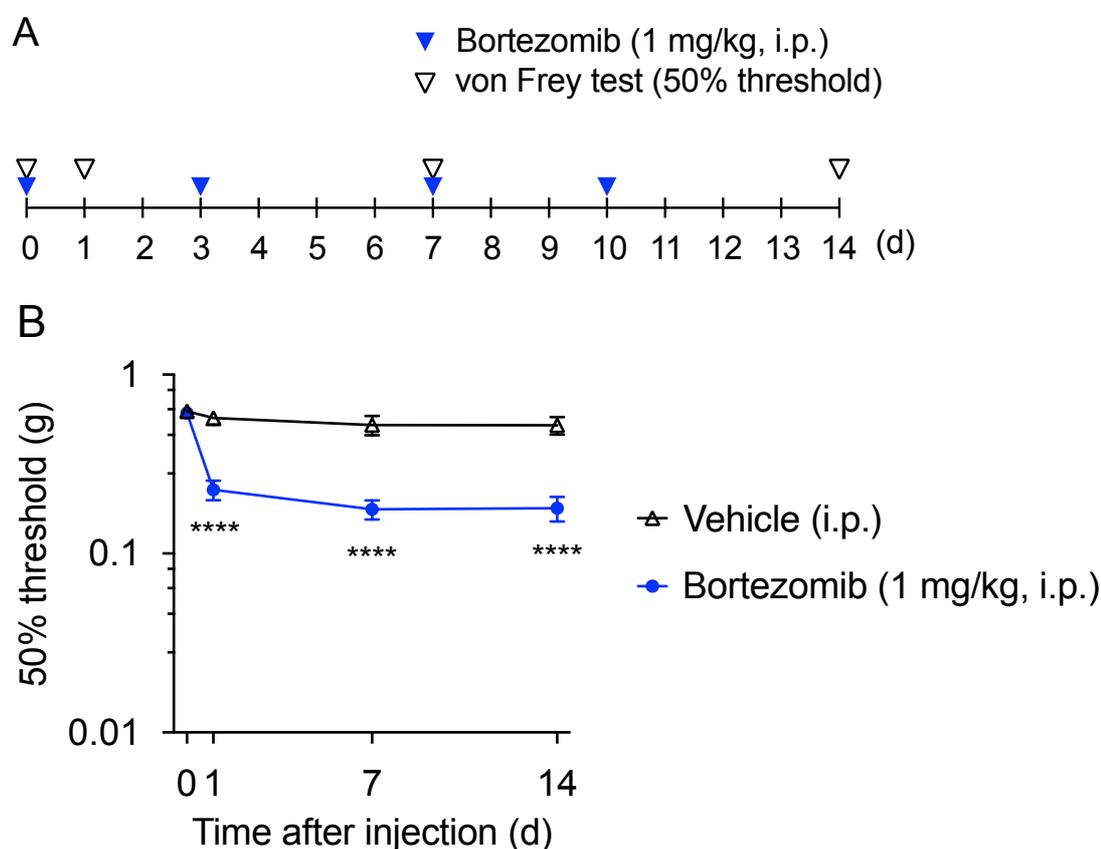
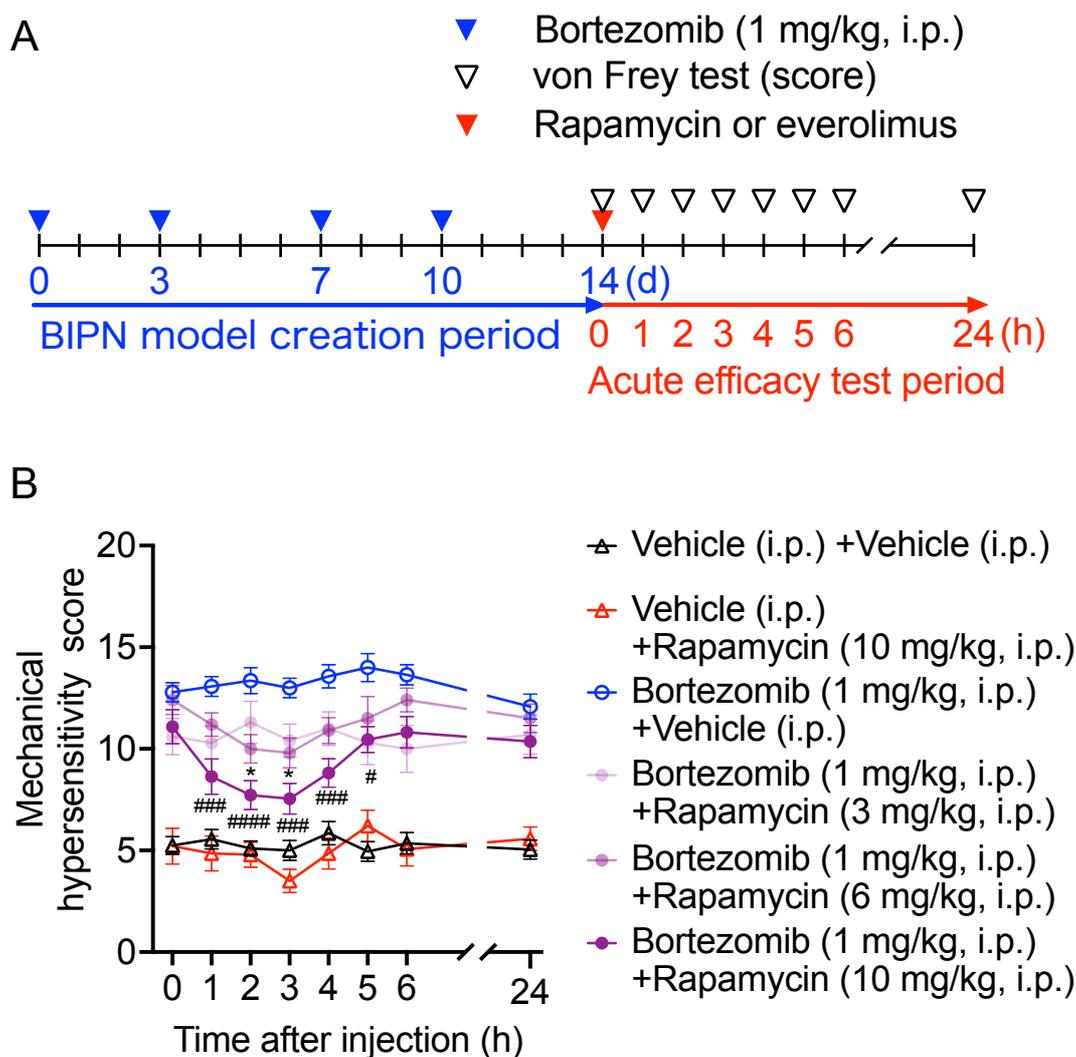


Fig. 4 BIPN モデルマウスの機械的刺激に対する反応

BIPN モデルマウスを作成し、von Frey filament test により機械的刺激に対する反応を評価した。**A.** BIPN モデル作成プロトコル。マウスにボルテゾミブ 1 mg/kg を 2 回/週間 (0、3、7、10 日) 腹腔内投与した。14 日後に von Frey test を行なった。**B.** BIPN モデルマウスの機械的刺激に対する反応を von Frey test により測定した。ボルテゾミブ投与の翌日から 50% 反応閾値の低下がみられ、7、14 日後にも低下が持続した。(n=8) 各データは平均値±SEM で表した。統計学的有意性は two-way ANOVA (day: $F_{3,42} = 22.3, p < 0.0001$, treatment: $F_{1,14} = 41.0, p < 0.0001$, interaction: $F_{3,42} = 9.34, p < 0.0001$) followed by Bonferroni's multiple comparisons (**** $p < 0.0001$ vehicle vs. bortezomib on days 1, 7, and 14) により検定した。

第2節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスに対する mTOR 阻害薬の鎮痛効果の検討

次に BIPN モデルマウスを用いて、mTOR 阻害薬の全身投与による鎮痛効果の評価を行った。ラパマイシンを 3、6、10 mg/kg またはエベロリムスを 10、30 mg/kg 腹腔内投与した後の急性鎮痛効果を von Frey filament を用いた機械的刺激に対する反応スコアを測定することにより評価した。BIPN モデルマウスの機械的刺激に対する反応スコアは、ラパマイシン投与後 1~5 時間の間に用量依存的に急性の低下が見られ、24 時間後にはラパマイシン投与前のスコアに戻った (Fig. 5 B)。また、エベロリムス 30 mg/kg 投与後 2 時間後にスコアの低下が見られた後、4 時間後にはスコアが上がり始め、24 時間後にはエベロリムス投与前のスコアに戻った (Fig. 5 C)。



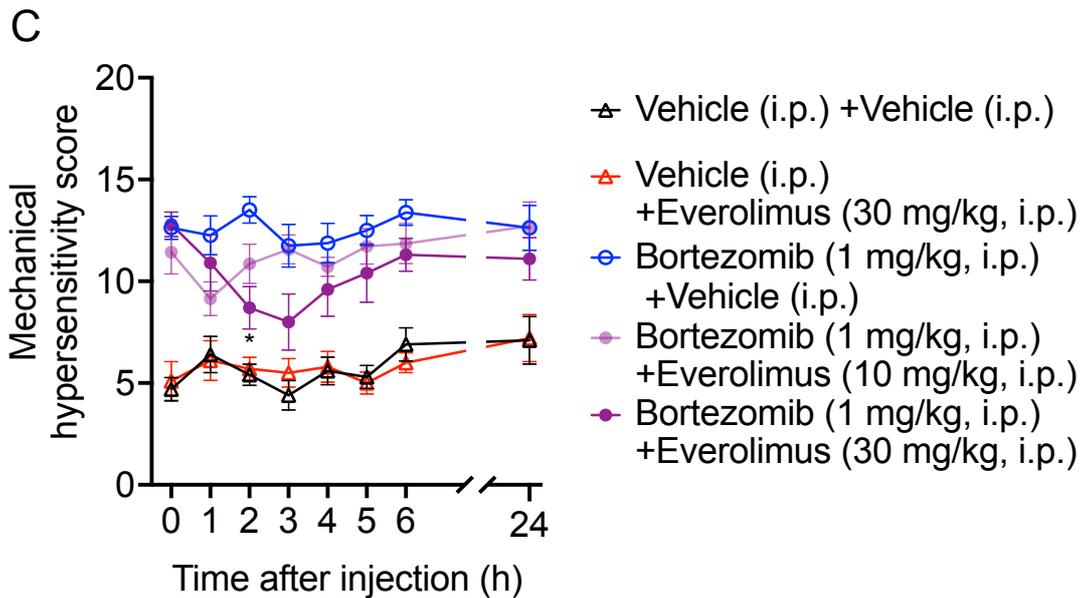


Fig. 5 BIPN モデルマウスに対する mTOR 阻害薬の腹腔内投与の急性効果の検討

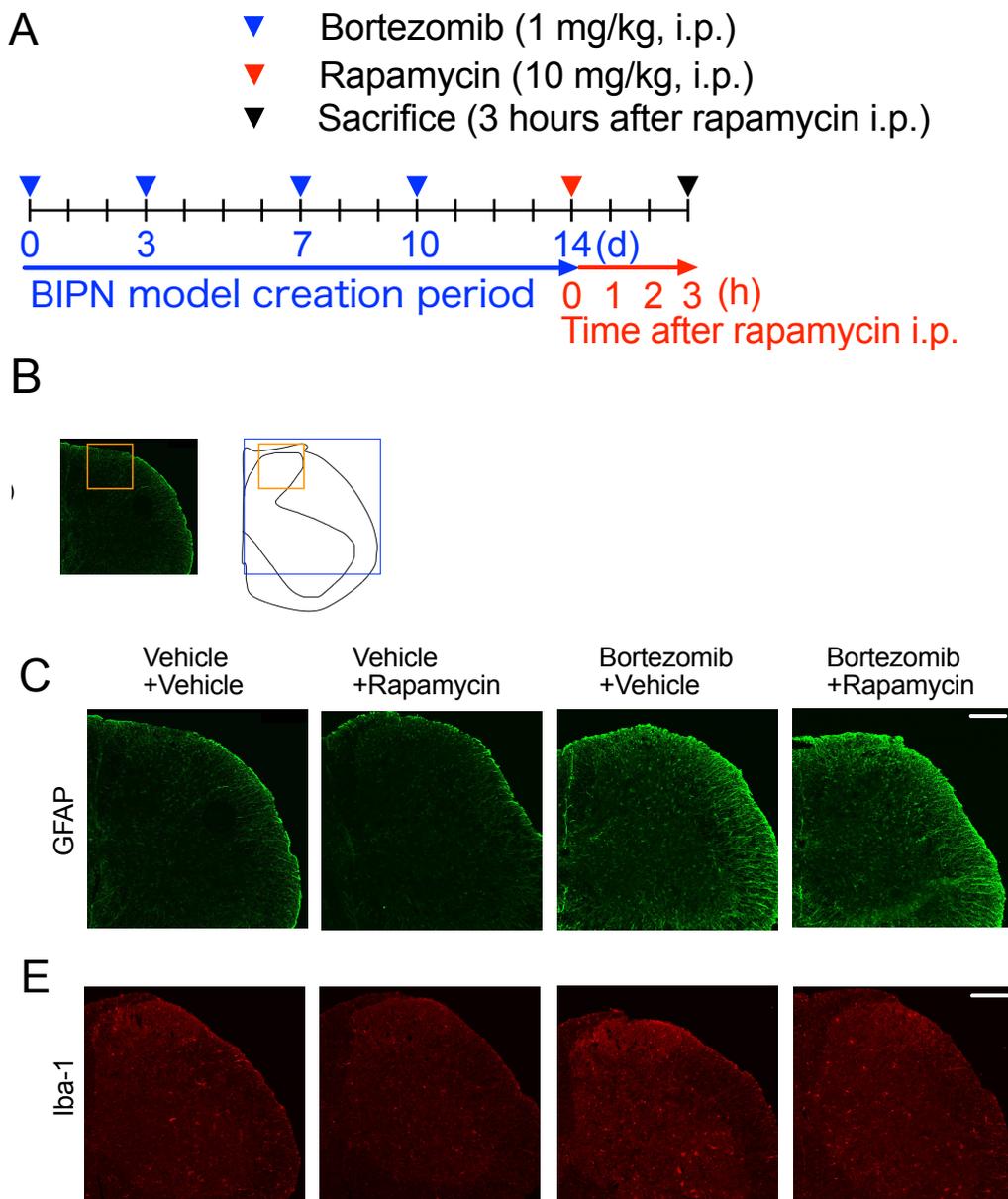
A. von Frey test のプロトコル。BIPN モデルに mTOR 阻害薬を投与後から 6 時間後まで 1 時間毎に (1、2、3、4、5、6、24 時間後)、機械的刺激に対する反応スコアの測定を行った。**B.** ラパマイシンの腹腔内投与後 von Frey test により機械的刺激に対する反応スコアを測定した。ラパマイシン投与 2-3 時間後をピークに急性一過性にスコアの回復がみられ、24 時間後には投与前のスコアに戻った。各データは平均値±SEM で表した。統計学的有意性は two-way ANOVA ($n = 10-20$, time: $F_{7, 511} = 5.64$, $p < 0.0001$, treatment: $F_{5, 73} = 48.1$, $p < 0.0001$, interaction: $F_{35, 511} = 2.23$, $p = 0.0001$) followed by Tukey's multiple comparisons (* $p < 0.05$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 6 mg/kg rapamycin, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 10 mg/kg rapamycin) により検定した。**C.** エベロリムス腹腔内投与後の反応スコアは 3 時間後をピークに急性一過性に回復がみられ、24 時間後には投与前のスコアに戻った。統計学的有意性は two-way ANOVA ($n = 8-10$, time: $F_{7, 280} = 3.64$, $p = 0.0009$, treatment: $F_{4, 40} = 25.6$, $p < 0.0001$, interaction: $F_{28, 280} = 1.59$, $p = 0.033$) followed by Tukey's multiple comparisons, * $p < 0.05$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 30 mg/kg everolimus) により検定した。

第 3 節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスの脊髄後角におけるグリア細胞活性化の観察

ボルテゾミブ投与慢性期のげっ歯類の脊髄後角において、脊髄アストロサイトの活性化がみられることが報告されている (67, 68)。また、脊髄アストロサイトは病的な疼痛における中枢感作に関与することが知られている (69, 70)。BIPN モデルマウスの機械的刺激に対する過敏反応と脊髄アストロサイトとの関係を検討するために、脊髄の抗 GFAP 抗体による免疫染色を行った。ボルテゾミブ投与 14 日後のマウス (BIPN モデルマウス) にラパマイシンを投与した 3 時間後に脊髄を回収して標本を作成した。von Frey test の結果 (第 2 節、Fig. 5 B) から、ラパマイシンの急性鎮痛効果が最もよく現れている時間に組織回収時間を合わせた。

BIPN モデルマウスの脊髄後角における GFAP 陽性細胞数はコントロールマウスに比べ増加が見られ、ラパマイシン投与 3 時間後に減少する傾向は見られた (Fig. 6 C, D)。

一方、損傷後の急性期から活性化すると知られているミクログリア (71, 72) の活性も検討した。GFAP の検討に用いた脊髄標本に対して、ミクログリア活性化のマーカである Iba-1 の免疫染色を行ったところ、Iba-1 陽性細胞数はボルテゾミブ投与群とコントロール群の間に Iba1 陽性細胞数に差は見られず、ラパマイシン投与による変化も見られなかった (Fig. 6 E, F)。



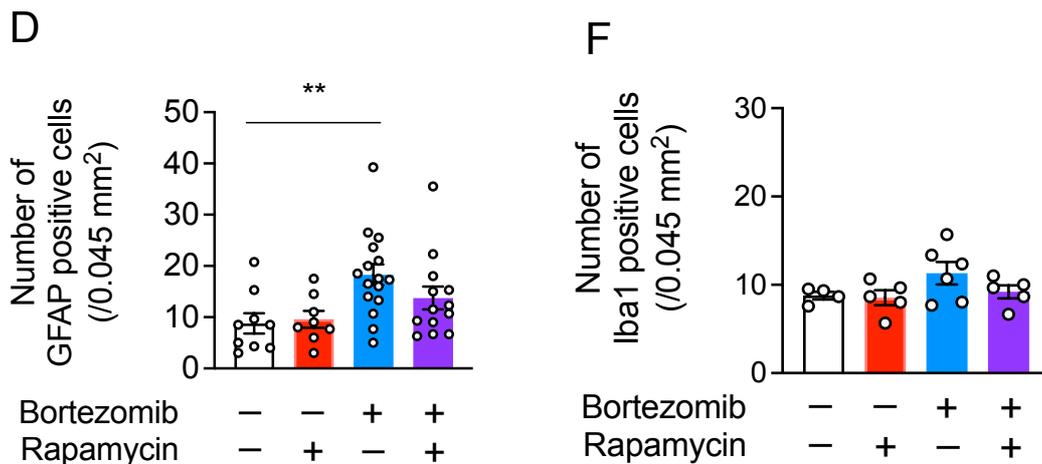


Fig. 6 BIPN モデルマウスの脊髄後角の標本の免疫染色による観察

A. 標本作成のプロトコル。BIPN モデルマウスにラパマイシンを腹腔内投与し、3 時間後に脊髄の回収を行なった。標本回収はラパマイシン投与後の機械的刺激に対する反応スコア回復のピークに合わせて 3 時間後に行なった。**B.** 脊髄の観察部位を图示した。小四角で囲まれた脊髄後角の第 I - II 層におけるマーカー陽性細胞数を計測した。**C, D.** GFAP (アストロサイトの活性化マーカー) 陽性細胞数の計数を行なった。写真のスケールバーは $200 \mu\text{m}$ である。ボルテゾミブ投与により脊髄後角の GFAP 陽性細胞の増加がみられた。ラパマイシン投与後には GFAP 陽性細胞の減少傾向はみられたが、有意的ではなかった。ラパマイシン単独投与では GFAP 陽性細胞数に変化がみられなかった。**E, F.** Iba-1 (ミクログリアの活性化マーカー) 陽性細胞数の計数を行なった。ボルテゾミブ投与およびラパマイシン投与により Iba-1 陽性細胞数に変化はみられなかった。統計学的有意性は two-way ANOVA (rapamycin: $F_{1,42} = 0.706, p = 0.405$, bortezomib: $F_{1,42} = 9.25, p = 0.0037$, interaction: $F_{1,42} = 1.44, p = 0.237$, $n = 8-17$, for GFAP-positive cells, and rapamycin: $F_{1,14} = 1.025, p = 0.2908$, bortezomib: $F_{1,14} = 4.599, p = 0.0500$, interaction: $F_{1,14} = 0.1096, p = 0.7455$, $n = 4-6$ for Iba1-positive cells) followed by Sidak's multiple comparisons (** $p < 0.01$ vehicle vs. bortezomib alone) により検定した。

第 4 節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスの脊髄における mTOR 阻害薬の鎮痛効果の検討

脊髄アストロサイトの活性化がボルテゾミブ投与マウスの中樞感作に関与することを示唆する報告がある (67, 69, 73)。そこで、mTOR 阻害薬の髄腔内投与により全身投与の結果と同様の鎮痛効果が見られるかどうか検討を行った。BIPN モデルマウスの髄腔内にラパマイシン $10 \text{ nmol} \sim 10 \mu\text{mol}$ またはエベロリムス $20 \text{ nmol} \sim 20 \mu\text{mol}$ を投与して von Frey filament test により機械的刺激に対する反応スコアの測定を行った。BIPN モデルマウスにおいて上昇がみられた反応スコアは、低容量ラパマイシン 100 nmol 髄腔内投与 2 時間後に急性に低下した。高用量ラパマイシン $10 \mu\text{mol}$ 投与後 30 分から 6 時間まで鎮痛効果がみられたように、投与ラパマイシンの用量依存的に鎮痛効果が現れるまでの時間は短くなり、持続時間は延長した (Fig. 7 A, B)。エベロリムスの場合は、低用量 200 nmol 髄腔内投与後 2 時間から 5 時間までの間および、高用量エベロリムス $2 \mu\text{mol}$ ま

たは 20 μ mol 髄腔内投与後 30 分から 6 時間後まで用量依存的に急性鎮痛効果がみられた (Fig. 7 C, D)。

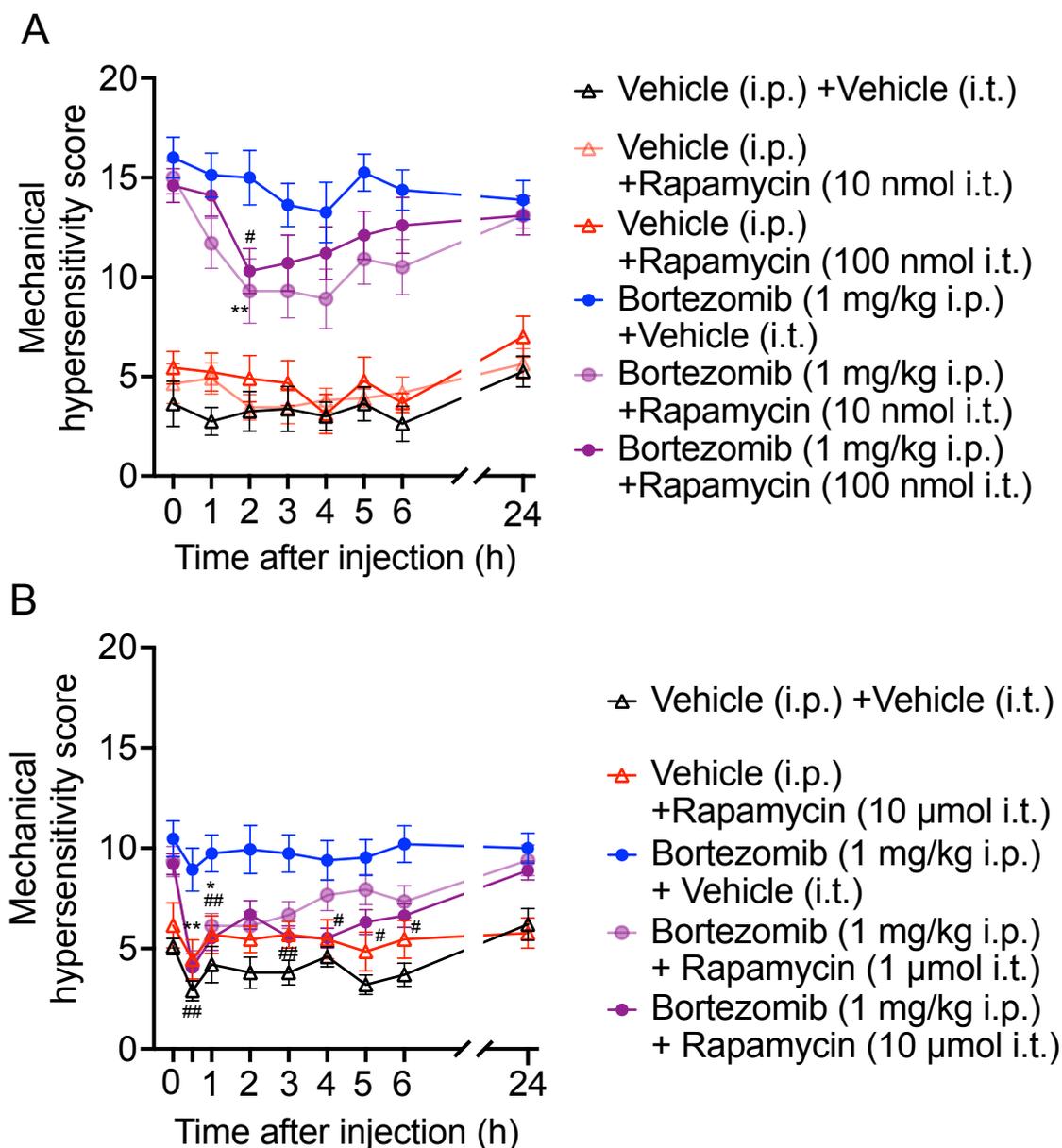


Fig. 7 BIPN モデルマウスに対する mTOR 阻害薬の髄腔内投与の急性効果の検討

プロトコルは Fig. 5 A と同様に、von Frey filament test による機械的刺激に対する反応スコアの計測を行なった。各データは平均値 \pm SEM で表した。**A.** ラパマイシン低用量 (10、100 nmol) の髄腔内投与 2 時間後に反応スコアの回復がみられた。統計学的有意性は two-way ANOVA ($n = 8-13$, time: $F_{7, 350} = 10.5$, $p < 0.0001$, treatment: $F_{5, 50} = 34.9$, $p < 0.0001$, interaction: $F_{35, 350} = 1.57$, $p = 0.024$) followed by Tukey's multiple comparison test (** $p < 0.01$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 10 nmol rapamycin; # $p < 0.05$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 100 nmol rapamycin) により検定した。

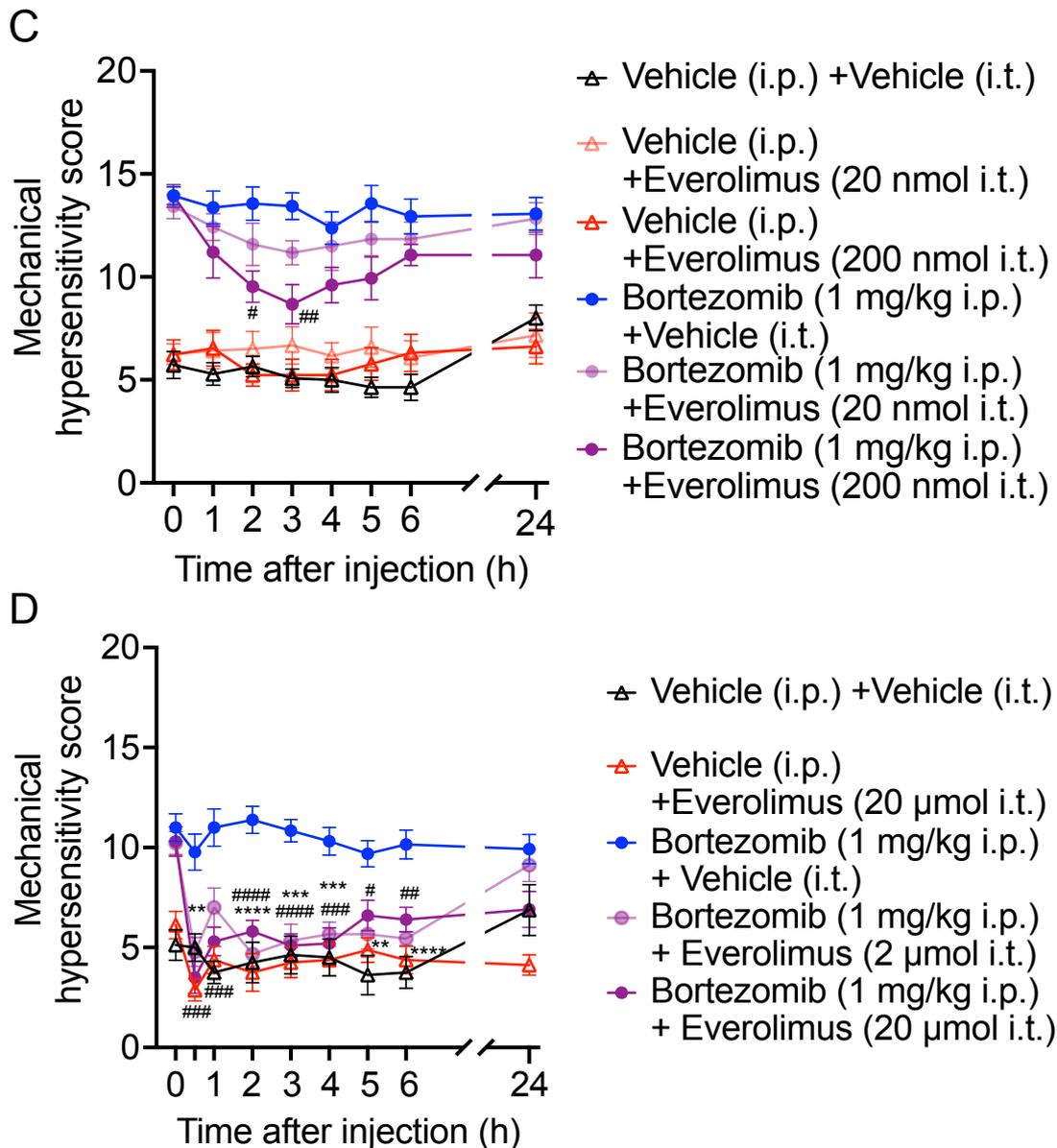


Fig. 7 続き B. ラパマイシン高用量 (1、10 μmol) の髄腔内投与 30 分後から 6 時間後まで反応スコアの回復が持続したが、24 時間後には投与前のスコアに戻った。統計学的有意性は two-way ANOVA ($n = 10-19$, time: $F_{8, 536} = 16.9$, $p < 0.0001$, treatment: $F_{4, 67} = 10.7$, $p < 0.0001$, interaction: $F_{32, 536} = 2.30$, $p < 0.0001$) followed by Tukey's multiple comparisons ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 1 μmol rapamycin; $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 10 μmol rapamycin) により検定した。**C.** エベロリムス低用量 (20、200 nmol) の髄腔内投与 2-5 時間後に反応スコアの回復がみられた。統計学的有意性は two-way ANOVA ($n = 12-16$, time: $F_{7, 532} = 5.78$, $p < 0.0001$, treatment: $F_{5, 76} = 39.9$, $p < 0.0001$, interaction: $F_{35, 532} = 1.59$, $p = 0.020$) followed by Tukey's multiple comparisons ($\#p < 0.01$, $\#\#\#p < 0.001$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 200 nmol everolimus) により検定した。**D.** エベロリムス高用量 (2、20 μmol) の髄腔内投与 30 分後から 6 時間後まで反応スコアの回復が持続したが、24 時間後には投与前のスコアに戻った。統計学的有意性は two-way ANOVA ($n = 8-10$, time: $F_{8, 344} = 12.3$, $p < 0.0001$, treatment: $F_{4, 43} = 28.4$, $p < 0.0001$, interaction: $F_{32, 344} = 3.06$, $p < 0.0001$) followed by Tukey's multiple comparisons ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 2 μmol everolimus; $\#p < 0.05$, $\#\#\#p < 0.01$, $\#\#\#\#p < 0.001$, $\#\#\#\#\#p < 0.0001$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 20 μmol everolimus) により検定した。

第5節 ボルテゾミブ誘発末梢神経障害モデルマウスに対する S6K1 の阻害による鎮痛効果の検討

mTOR は生体内では mTORC1 または mTORC2 の 2 種類の複合体として存在する。mTORC1 はタンパク合成、脂質代謝、細胞の成長およびオートファジーなどの調節を行い、mTORC2 は細胞の生存の調節を行う分子である (52)。ラパマイシンおよびエベロリムスは mTORC1 を阻害するが mTORC2 は阻害しない。ラパマイシンは FKBP12 と複合体を形成し、mTOR の FRB ドメインに結合する。mTORC1 は FRB ドメインが露出しているが、mTORC2 は複合体形成分子 Rictor により FRB ドメインが覆われているため、mTORC2 には FKBP12-ラパマイシン複合体が結合しない (74)。これより、ラパマイシンおよびエベロリムスの鎮痛効果は mTORC1 の下流の分子を介して現れるという仮説が立てられた。Ribosomal protein S6 kinase (S6K1) は mTORC1 の下流にあり、mRNA の翻訳を調節する分子である。S6K1 は糖尿病、がんや老化に関わることが知られている (75)。S6K1 が BIPN モデルマウスの脊髄における鎮痛効果に関与する分子かどうかの検討を行なった。S6K1 の特異的阻害薬 PF-4708671 の BIPN モデルマウスに対する鎮痛効果を von Frey filament test により測定した。BIPN モデルマウスで上昇がみられた過敏反応スコアは、PF-4708671 の髄腔内投与 1 時間後から 6 時間後まで急性一過性に低下し、24 時間後には PF-4708671 投与前のスコアに戻ることが確認された。また溶媒の髄腔内投与マウスにスコアの変化は見られなかった (Fig. 8)。

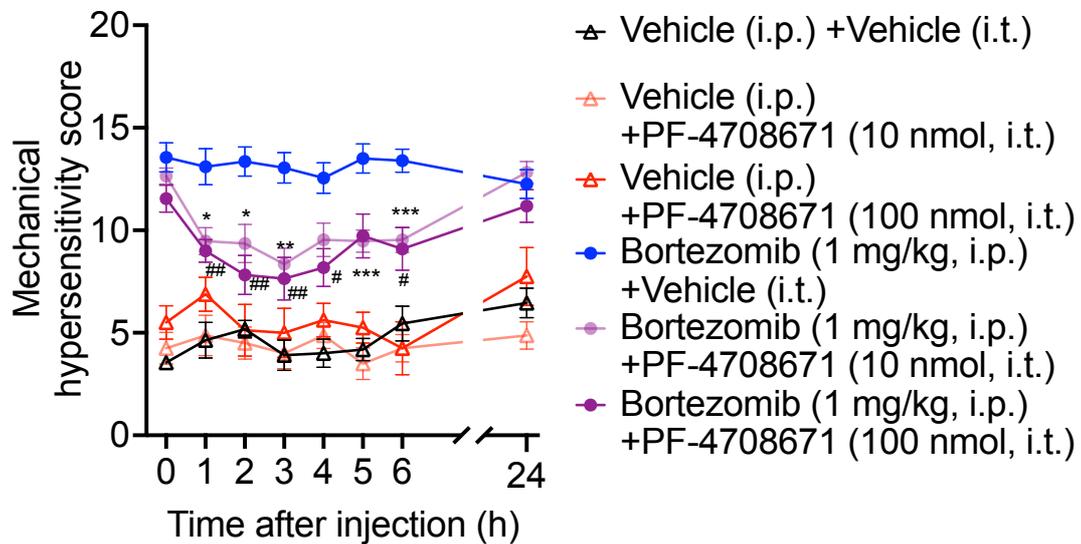


Fig. 8 BIPN モデルマウスに対する S6K1 阻害薬 PF-4708671 の髄腔内投与の急性効果の検討

プロトコルは Fig. 4 A と同様に、von Frey filament test による反応スコアの計測を行なった。PF-4708671 (1、10 nmol) の髄腔内投与の 1 時間後から 6 時間後まで反応スコアの回復が持続したが、24 時間後には投与前のスコアに戻った。各データは平均値±SEM で表した。統計学的有意性は two-way ANOVA ($n = 8-20$, time: $F_{7, 483} = 7.60$, $p < 0.0001$, treatment: $F_{5, 69} = 37.6$, $p < 0.0001$, interaction: $F_{35, 483} = 2.88$, $p < 0.0001$) followed by Tukey's multiple comparisons ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 10 nmol PF-4708671; $##p < 0.01$ bortezomib + vehicle vs. bortezomib + 100 nmol PF-4708671) により検定した。

考察

第2章では、FAERS データ解析から導かれた仮説に基づき、BIPN モデルマウスを用いた実験を行なった。まず、mTOR 阻害薬であるラパマイシンおよびエベロリムスの BIPN モデルマウスに対する鎮痛効果の検討を行なったところ、全身および髄腔内投与により急性鎮痛効果がみられた (Fig. 5 B, C, Fig. 7 A–D)。mTOR 阻害薬の全身投与により、早いものでは1時間後から効果が現れ、24 時間後には消失することが確認された。これらの結果から mTOR 阻害薬は急性に明確な治療効果を現すことが示唆された。ラパマイシンおよびエベロリムスは血液脳関門を通過し中枢へ到達すると想定される (76, 77)。ここでは腹腔内投与において末梢性および中枢性の作用の両方を観察しており、髄腔内投与においては末梢性の作用を除外した観察を行なった。BALB/c マウスにラパマイシンを静脈投与した半減期は 5.1 時間 (78)、CD-1 マウスにエベロリムスを経口投与した半減期は 5.4 時間 (77) という報告がある。これらの報告から、mTOR 阻害薬がマウスに対して一過性の鎮痛効果を現したという本研究の結果は妥当であると考えられる。また、ラパマイシンおよびエベロリムスはマウスの血液脳関門を多少通過する。CD-1 マウスにラパマイシン 2.5 mg/kg を静脈投与した時の Cmax は脳内 825 ± 240 ng/kg、血中 3020 ± 327 ng/kg (血中から脳内へ 27.3%が移行した) という報告 (76) および、BALB/c マウスにエベロリムス 5 mg/kg を経口投与した時の Cmax は脳内 69 ± 29 ng/kg、血中 4530 ± 876 ng/kg (血中から脳内へ 1.5%が移行した) という報告がある (77)。血液脊髄関門は血液脳関門よりも透過性が高いことを示唆する報告から (79)、腹腔内投与されたラパマイシンおよびエベロリムスが脊髄にも到達し得ると考えられる。また、エベロリムスはラパマイシンに比べて、血中から中枢へ移行する割合が低いと考えられる (76, 77)。

本研究での BIPN マウスに対する腹腔内投与の効果検討において、エベロリムスの鎮痛効果がラパマイシンに比べて弱い傾向が見られた (Fig. 5 B, C)。in vitro 実験の結果、エベロリムスはラパマイシンに比べて結合リガンド FKBP12 (80) への親和性が 3 倍程度弱く、免疫抑制活性も 2–5 倍程度弱いが、一方で、in vivo 実験の結果では免疫抑制効果にラパマイシンとエベロリムスの間に差が見られなかったことが報告されている (81)。ラパマイシンとエベロリムスは薬物動態および代謝が異なる (82)。本研究の結果において、腹腔内投与時にはエベロリムスの鎮痛効果はラパマイシンに比べて弱く現れた (Fig. 5 B, C)。これは結合リガンド FKBP12 に対する親和性の違い (81) ではなく、エベロリムスはラパマイシ

ンに比べ血中から中枢への移行率が低い(76, 77)、脊髄における鎮痛効果が現れるまでの末梢からのエベロリムスの投与量を多く必要としたと考えられる。そして髄腔内投与による鎮痛効果にはラパマイシンとエベロリムスの間に大きな差は見られなかった (Fig. 7 A-D)。髄腔内へのラパマイシン (10, 100 nmol または 1, 10 μ mol)、およびエベロリムス (20, 200 nmol または 2, 20 μ mol) の投与量を考えると結合リガンド FKBP12 に対する親和性 (81) の差の関連も否定できないが、これは血中から脊髄への移行する割合の差により起こったと考えられる。

本研究の結果において、mTOR 阻害薬は腹腔内投与に比べて髄腔内投与により、BIPN モデルマウスに対して顕著な鎮痛効果を示した (Fig. 5 B, C, Fig. 7 A-D)。mTOR 阻害薬の BIPN に対する鎮痛効果の機序は、ボルテゾミブによる末梢神経障害に対する抑制ではなく、脊髄における中枢感作の抑制にあると考えられる。全身投与されたボルテゾミブは中枢へほぼ移行しないと考えられており (83)、BIPN の機序においてボルテゾミブが中枢へ及ぼす毒性は重要とされていないが、脊髄における中枢感作により中枢にも変化が生じる (99, 84)。中枢感作とは、末梢からの異常な刺激が繰り返されることにより、刺激の伝達経路に変化が起こり、刺激に対する感受性が増強されることであり、神経障害性疼痛など病的疼痛の慢性化および難治化を形成する機序の一つである (85)。脊髄アストロサイトは、慢性疼痛における中枢感作に関わると知られている (69)。BIPN モデル齧歯類の脊髄後角では、アストロサイトが活性化するという報告があり (67, 86)、また、BIPN モデルの脊髄後角のシナプスにおけるグルタミン酸の増加を示す報告がある (87, 88)。本研究の結果から、髄腔内投与された mTOR 阻害薬は BIPN の中枢感作を抑制すると考えられる。その機序には、後述する S6K1 を介した脊髄アストロサイトの GLT-1 の膜表面への発現増加による (89)、グルタミン酸再取り込み量の増加が考えられる。

mTOR 阻害薬とボルテゾミブを含む抗がん剤の併用により骨髄腫および白血病の治療効果の向上を示唆する臨床研究報告がある (42, 61)。これらから、mTOR 阻害薬はボルテゾミブの治療効果の向上および末梢神経障害の抑制のために、併用薬として使用される可能性がある。しかし、免疫抑制薬や抗腫瘍薬として臨床使用される mTOR 阻害薬を鎮痛薬に転用することは、BIPN 治療を必要とする患者に一般的に適用できるかどうかは疑わしい。そこで、ラパマイシン感受性である mTORC1 の下流にある分子、S6K1 について検討を行なった。BIPN モデルマウスに対して S6K1 阻害薬 PF-4708671 の髄腔内投与により、mTOR 阻害薬と同様の一過性急性鎮痛効果を示した (Fig. 8)。S6K1 は mTORC1 の下流にあり、タンパク翻訳の調節をする分子である (75)。基礎研究においては、S6K1 阻害薬の

乳がん (90, 91) および肺がん (92) への有効性、2型糖尿病 (93) やてんかん (94) に対する治療効果が示唆される報告があるが、製剤として臨床使用されている S6K1 阻害薬はない。様々な疾患の研究において S6K1 は新規治療ターゲットとして注目されつつある分子と言える。そして、S6K1 と病的疼痛との関連を示唆する報告がある。炎症性疼痛における後根神経節 (DRG) の c-Fos の生合成に S6K1 が関与すること (95)、サソリ毒の足底皮下投与誘発の急性機械的刺激への過敏反応下において、脊髄後角および DRG の S6K1 の活性化がみられたこと (96) が報告されている。これらの報告からも、S6K1 は BIPN の新規治療ターゲットとなる可能性が示唆される。

S6K1 は mTORC2 を抑制的に制御する (97, 98)。初代培養アストロサイトに於いて、mTORC1 の阻害が S6K1-mTORC2 を介してグルタミン酸トランスポーターGLT-1 の発現量の増加を促進し、グルタミン酸再取り込み能が増強されることを示唆する報告がある (89)。これらから、S6K1 の阻害による鎮痛効果の機序として、脊髄アストロサイトのグルタミン酸再取り込み能の増強は考えられる。脊髄アストロサイトの膜表面の GLT-1 が急性に増加し、GFAP 発現のようなアストロサイト活性とは別の機序が働き脊髄後角の興奮性神経伝達が抑制された可能性がある。これは本研究で観察された通り BIPN モデルマウスの脊髄アストロサイトは GFAP 発現量が増加し活性化されるが、ラパマイシンの投与によりその活性化が有意に抑制されなかったという結果 (Fig. 6 C, D) に矛盾しない解釈である。

BIPN には、アストロサイトだけではなくミクログリアやニューロンが関わることが知られている (99)。ラパマイシン、エベロリムスおよび PF-4708671 がそれらの細胞にも mTOR を介した鎮痛効果を及ぼす可能性についても考察した。mTOR 阻害がミクログリアに及ぼす効果を報告した研究のほとんどが、単回投与による急性効果ではなく持続的な効果を報告したものである。ミクログリアに対する mTOR 阻害効果は時間をかけて現れる、もしくは数日間の連続投与が必要であることが多い (100, 101) が、急性効果を示した報告もある。三叉神経損傷および部分結紮 2 週間後のマウスに現れた機械的疼痛過敏および冷覚過敏が、ラパマイシンの全身投与 1 時間後に急性一過性に抑制され、それには三叉神経尾核のミクログリア活性の抑制の関与が示唆された (102)。しかし、本研究のボルテゾミブ投与マウス慢性期の脊髄後角においてはミクログリアの Iba-1 陽性細胞数は増加せず、ラパマイシン単回投与後にも変化が見られなかった (Fig. 6 E, F)。そして BIPN モデルラットの慢性期の脊髄後角においては、ミクログリアではなくアストロサイトの活性化が認められるという報告

がある (67)。これらのことから、本研究の BIPN モデルマウスに対する mTOR 阻害により現れた急性鎮痛効果へのミクログリアの関連は強くはないことが示唆される。

ニューロンに対しては mTOR 阻害薬が急性効果を及ぼすことを示唆する報告がいくつかある。行動実験では、神経損傷 (SNI) モデルラットへのラパマイシン足底内投与 (103) および髄腔内投与 (104) の 4 時間後から機械的疼痛過敏が軽減されたという報告がある。それらの報告では、リン酸化 mTOR がラットの末梢神経 (103) および脊髄後角 (104) において、有髄 A 線維に局在することが示された。また、mTOR の阻害により初代培養ニューロンの樹状突起の Kv1.1 チャネルの急速な膜表面へ発現増加 (105) および、脱抑制による翻訳の増加 (106) が報告されている。これらの報告は、mTOR の阻害がシナプス興奮性を局所的に急性に抑制する可能性があることを示唆する。ニューロンが mTOR 阻害による急性一過性鎮痛効果へ関与することは考えられる。しかし、初代培養 DRG に対する低濃度のボルテゾミブ処置 24 時間後に、感覚センサーとして働くイオンチャネル (Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、Cav3.2、Cav α 2 δ 1、TRAP1、TRAPV1) の mRNA 発現が減少するという報告もある (107)。このことは、ボルテゾミブはニューロンの興奮性を亢進させない可能性を示唆する。但し、BIPN モデルに対して mTOR 阻害によるニューロンの興奮性の抑制がどのように働くのかは不明である。BIPN に対する mTOR 阻害による一過性急性鎮痛効果の機序に対して、疼痛に関連する細胞の関与については更なる検討が必要である。

総括および結論

本研究では臨床ビッグデータ解析により BIPN を抑制する併用薬を探索し、BIPN 治療薬の探索および分子機序の解明を試み、以下の結論を得た。

第 1 章

臨床ビッグデータ FAERS の解析から、BIPN の発症リスクは mTOR 阻害薬の併用により抑制されることが示された。

第 2 章

mTOR 阻害薬および S6K1 阻害薬 PF-4708671 は BIPN モデルマウスに対して、脊髄を作用点とする急性鎮痛効果をもたらした。S6K1 は BIPN の新規治療ターゲットとなり得る可能性を見出した。

以上、リアルワールドデータの一つである医薬品有害事象のビッグデータ解析と病態モデル動物における作用機序解析に基づき、ボルテゾミブ誘発末梢神経障害に対して治療効果を示す薬として mTOR 阻害薬を見出すとともに、その創薬標的として S6K1 を見出した。本研究成果はボルテゾミブ誘発末梢神経障害の治療に新たな戦略をもたらし得ると考えられる。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導および御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科名誉教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、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准教授 白川久志 先生、助教 永安一樹 先生、和歌山県立医科大学薬学部教授 中川貴之 先生、京都大学大学院医学研究科助教 浅岡希美 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言をいただきました、長崎大学名誉教授 植田弘師 先生、和歌山県立医科大学薬学部教授 今井哲司 先生、京都大学大学院薬学研究科助教 宗可奈子 先生、助教 三宅崇仁 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に多大なる御協力をいただきました、長島卓也 博士、Soni Siswanto 博士、古田晴香 博士、長岡巧樹 博士、山本浩貴 博士、抱将史 博士、周子剣 博士、幡鎌輝 博士、戸田千尋 学士、栢沼玄 学士、中島弘貴 修士、鈴木崇英 さん、に心から感謝いたします。また、研究生活を始めるにあたり御指導、御助言をいただきました、荻原孝史 博士、小柳円花 博士、尾山翔平 修士、緋山遥 修士、矢野佑一 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、河合洋幸 博士、田中景吾 博士に心から御礼を述べると共に、大橋佳奈 博士、澁井紀宏 学士、福添新太郎 修士、堂園直貴 修士、戸堀翔太 学士、岩井信太郎 学士、小林萌音 学士、山田麻莉 学士、山下志織 学士をはじめとする京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の諸氏および、林真穂 学士、吉田圭織 学士、西郷雅美子 学士をはじめとする京都大学医学部附属病院薬剤部の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして多大な応援をいただきました、ひさだ動物病院 久田篤典 院長、久田裕美 先生をはじめとする皆様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終始支えてくださいました、父 眞雄、母 さやか、姉 翠に心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究の内容は以下の論文に発表した

Inhibitors of mechanistic target of rapamycin can ameliorate bortezomib-induced peripheral neuropathy

Mari Suzuki, Zijian Zhou, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Shuji Kaneko

Biological and Pharmaceutical Bulletin (2023 年) 46 卷 8 号 pp1049-1056

参考文献

1. Dou QP, Zonder JA. Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Curr Cancer Drug Targets*. 2014;14(6):517-36. doi: 10.2174/1568009614666140804154511. PMID: 25092212; PMCID: PMC4279864..
2. Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R. United States Food and Drug Administration approval summary: Bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res*. 2006;12(10):2955-2960. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0170. PMID: 16707588.
3. ヤンセンファーマ株式会社, 武田薬品工業株式会社. ベルケイド®注射用 3 mg ベルケイド®適正使用ガイド第 7.0 版 (2015 年 6 月作成)
4. Robak T, Huang H, Jin J, Zhu J, Liu T, Samoiloova O, Pylypenko H, Verhoef G, Siritanaratkul N, Osmanov E, Alexeeva J, Pereira J, Drach J, Mayer J, Hong X, Okamoto R, Pei L, Rooney B, van de Velde H, Cavalli F; LYM-3002 Investigators. Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2015 Mar 5;372(10):944-53. doi:10.1056/NEJMoa1412096. PMID: 25738670.
5. Manochakian R, Miller KC, Chanan-Khan AA. Clinical impact of bortezomib in frontline regimens for patients with multiple myeloma. *Oncologist*. 2007 Aug;12(8):978-90. doi: 10.1634/theoncologist.12-8-978. PMID: 17766658.
6. Cata JP, Weng HR, Burton AW, Villareal H, Giralt S, Dougherty PM. Quantitative sensory findings in patients with bortezomib-induced pain. *J Pain*. 2007 Apr;8(4):296-306. doi: 10.1016/j.jpain.2006.09.014. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17175202.
7. Li T, Timmins HC, King T, Kiernan MC, Goldstein D, Park SB. Characteristics and risk factors of bortezomib induced peripheral neuropathy: A systematic review of phase III trials. *Hematol Oncol*. 2020 Aug;38(3):229-243. doi: 10.1002/hon.2706. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31873944.
8. Richardson PG, Briemberg H, Jagannath S, Wen PY, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Siegel DS, Irwin D, Schuster M, Srkalovic G, Alexanian R, Rajkumar SV, Limentani S, Alsina M, Orłowski RZ, Najarian K, Esseltine D, Anderson KC,

- Amato AA. Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 1;24(19):3113-20. doi: 10.1200/JCO.2005.04.7779. Epub 2006 Jun 5. PMID: 16754936.
9. Kerckhove N, Collin A, Condé S, Chaletex C, Pezet D, Balayssac D. Long-Term Effects, Pathophysiological Mechanisms, and Risk Factors of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathies: A Comprehensive Literature Review. *Front Pharmacol*. 2017 Feb 24;8:86. doi: 10.3389/fphar.2017.00086. PMID: 28286483; PMCID: PMC5323411.
 10. Argyriou AA, Iconomou G, Kalofonos HP. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1593-9. doi: 10.1182/blood-2008-04-149385. Epub 2008 Jun 23. Erratum in: *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4478. PMID: 18574024.
 11. Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, Lavoie Smith EM, Bleeker J, Cavaletti G, Chauhan C, Gavin P, Lavino A, Lustberg MB, Paice J, Schneider B, Smith ML, Smith T, Terstriep S, Wagner-Johnston N, Bak K, Loprinzi CL; American Society of Clinical Oncology. 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 Jun 20;32(18):1941-67. doi: 10.1200/JCO.2013.54.0914. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24733808.
 12. Loprinzi CL, Lacchetti C, Bleeker J, Cavaletti G, Chauhan C, Hertz DL, Kelley MR, Lavino A, Lustberg MB, Paice JA, Schneider BP, Lavoie Smith EM, Smith ML, Smith TJ, Wagner-Johnston N, Hershman DL. Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2020 Oct 1;38(28):3325-3348. doi: 10.1200/JCO.20.01399. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32663120.
 13. Hirayama Y, Sasaki J, Dosaka-Akita H, Ishitani K. Survey of the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in Japan: Japanese Society of Medical Oncology. *ESMO Open*. 2016 May 13;1(3):e000053. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000053. PMID: 27843610; PMCID: PMC5070239.
 14. 日本がんサポーターイングケア学会編. がん化学療法に伴う末梢神経障害診療ガイドライン 2023 年版. 金原出版株式会社. 2023

15. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci*. 2017 Sep 6;10:284. doi: 10.3389/fnmol.2017.00284. PMID: 28932184; PMCID: PMC5592204.
16. Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Apr;10(4):283-94. doi: 10.1038/nrn2606. Epub 2009 Mar 4. PMID: 19259101.
17. Parvathaneni V, Kulkarni NS, Muth A, Gupta V. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug Discov Today*. 2019 Oct;24(10):2076-2085. doi: 10.1016/j.drudis.2019.06.014. Epub 2019 Jun 22. PMID: 31238113.
18. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Guilliams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jan;18(1):41-58. doi: 10.1038/nrd.2018.168. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30310233.
19. Nagashima T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Prevention of antipsychotic-induced hyperglycaemia by vitamin D: a data mining prediction followed by experimental exploration of the molecular mechanism. *Sci Rep*. 2016 May 20;6:26375. doi: 10.1038/srep26375. PMID: 27199286; PMCID: PMC4873813.
20. Nagaoka K, Nagashima T, Asaoka N, Yamamoto H, Toda C, Kayanuma G, Siswanto S, Funahashi Y, Kuroda K, Kaibuchi K, Mori Y, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. Striatal TRPV1 activation by acetaminophen ameliorates dopamine D2 receptor antagonist-induced orofacial dyskinesia. *JCI Insight*. 2021 May 24;6(10):e145632. doi: 10.1172/jci.insight.145632. PMID: 33857021; PMCID: PMC8262333.
21. Siswanto S, Yamamoto H, Furuta H, Kobayashi M, Nagashima T, Kayanuma G, Nagayasu K, Imai Y, Kaneko S. Drug Repurposing Prediction and Validation From Clinical Big Data for the Effective Treatment of Interstitial Lung Disease. *Front Pharmacol*. 2021 Sep 21;12:635293. doi: 10.3389/fphar.2021.635293. PMID: 34621164; PMCID: PMC8490809.
22. Kaneko S, Nagashima T. Drug Repositioning and Target Finding Based on Clinical Evidence. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(3):362-365. doi: 10.1248/bpb.b19-00929. PMID: 32115497.

23. Banda JM, Evans L, Vanguri RS, Tatonetti NP, Ryan PB, Shah NH. A curated and standardized adverse drug event resource to accelerate drug safety research. *Sci Data*. 2016 May 10;3:160026. doi: 10.1038/sdata.2016.26. PMID: 27193236; PMCID: PMC4872271.
24. Lai EC, Pratt N, Hsieh CY, Lin SJ, Pottegård A, Roughead EE, Kao Yang YH, Hallas J. Sequence symmetry analysis in pharmacovigilance and pharmacoepidemiologic studies. *Eur J Epidemiol*. 2017 Jul;32(7):567-582. doi: 10.1007/s10654-017-0281-8. Epub 2017 Jul 11. PMID: 28698923.
25. Zhao S, Nishimura T, Chen Y, Azeloglu EU, Gottesman O, Giannarelli C, Zafar MU, Benard L, Badimon JJ, Hajjar RJ, Goldfarb J, Iyengar R. Systems pharmacology of adverse event mitigation by drug combinations. *Sci Transl Med*. 2013 Oct 9;5(206):206ra140. doi: 10.1126/scitranslmed.3006548. PMID: 24107779; PMCID: PMC3963511.
26. Staff NP, Grisold A, Grisold W, Windebank AJ. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. *Ann Neurol*. 2017 Jun;81(6):772-781. doi: 10.1002/ana.24951. Epub 2017 Jun 5. PMID: 28486769; PMCID: PMC5656281.
27. Grothey A. Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin Oncol*. 2003 Aug;30(4 Suppl 15):5-13. doi: 10.1016/s0093-7754(03)00399-3. PMID: 14523789.
28. Beijers AJ, Mols F, Vreugdenhil G. A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration. *Support Care Cancer*. 2014 Jul;22(7):1999-2007. doi: 10.1007/s00520-014-2242-z. Epub 2014 Apr 13. PMID: 24728618.
29. Seretny M, Currie GL, Sena ES, Ramnarine S, Grant R, MacLeod MR, Colvin LA, Fallon M. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain*. 2014 Dec;155(12):2461-2470. doi: 10.1016/j.pain.2014.09.020. Epub 2014 Sep 23. PMID: 25261162.
30. van Puijenbroek EP, Bate A, Leufkens HG, Lindquist M, Orre R, Egberts AC. A comparison of measures of disproportionality for signal detection in spontaneous reporting systems for adverse drug reactions. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2002 Jan-Feb;11(1):3-10. doi: 10.1002/pds.668. PMID: 11998548.
31. 漆原尚巳. 自発報告に基づくシグナル検出ができること, できないこと—その理論と実践—. *医薬品情報学* 2020 ; 21, 4 : 135-141.

32. Hou S, Huh B, Kim HK, Kim KH, Abdi S. Treatment of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Systematic Review and Recommendations. *Pain Physician*. 2018 Nov;21(6):571-592. PMID: 30508986.
33. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, Jurczak W, Advani RH, Romaguera JE, Williams ME, Barrientos JC, Chmielowska E, Radford J, Stilgenbauer S, Dreyling M, Jdrzejczak WW, Johnson P, Spurgeon SE, Li L, Zhang L, Newberry K, Ou Z, Cheng N, Fang B, McGreivy J, Clow F, Buggy JJ, Chang BY, Beaupre DM, Kunkel LA, Blum KA. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013 Aug 8;369(6):507-16. doi: 10.1056/NEJMoa1306220. Epub 2013 Jun 19. PMID: 23782157; PMCID: PMC4513941.
34. Rushworth SA, Bowles KM, Barrera LN, Murray MY, Zaitseva L, MacEwan DJ. BTK inhibitor ibrutinib is cytotoxic to myeloma and potently enhances bortezomib and lenalidomide activities through NF- κ B. *Cell Signal*. 2013 Jan;25(1):106-12. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.008. Epub 2012 Sep 11. PMID: 22975686.
35. Wang XX, Gao Y, Jin J, Cao JN, Feng JF, Wang HQ, Zhang HL, Cai QQ, Li ZM, Jiang WQ, Huang HQ; Lymphoma Committee, Chinese Anti-Cancer Association (CACA). Bortezomib in combination with fludarabine plus cyclophosphamide for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: results of the LYM-4003 study. *Ann Hematol*. 2021 Dec;100(12):2961-2968. doi: 10.1007/s00277-021-04619-4. Epub 2021 Jul 31. PMID: 34331111.
36. Duechler M, Linke A, Cebula B, Shehata M, Schwarzmeier JD, Robak T, Smolewski P. In vitro cytotoxic effect of proteasome inhibitor bortezomib in combination with purine nucleoside analogues on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Eur J Haematol*. 2005 May;74(5):407-17. doi: 10.1111/j.1600-0609.2004.00406.x. PMID: 15813915.
37. Wright JJ. Combination therapy of bortezomib with novel targeted agents: an emerging treatment strategy. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 15;16(16):4094-104. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2882. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20682705.
38. Damo E, Agarwal A, Simonetti M. Activation of β 2-Adrenergic Receptors in Microglia Alleviates Neuropathic Hypersensitivity in Mice. *Cells*. 2023 Jan 11;12(2):284. doi: 10.3390/cells12020284. PMID: 36672219; PMCID: PMC9856373.

39. Bahari Z, Meftahi GH. Spinal α_2 -adrenoceptors and neuropathic pain modulation; therapeutic target. *Br J Pharmacol*. 2019 Jul;176(14):2366-2381. doi: 10.1111/bph.14580. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30657594; PMCID: PMC6592871.
40. Lubahn CL, Lorton D, Schaller JA, Sweeney SJ, Bellinger DL. Targeting α - and β -Adrenergic Receptors Differentially Shifts Th1, Th2, and Inflammatory Cytokine Profiles in Immune Organs to Attenuate Adjuvant Arthritis. *Front Immunol*. 2014 Aug 11;5:346. doi: 10.3389/fimmu.2014.00346. PMID: 25157248; PMCID: PMC4127464.
41. Tsubota M, Miyazaki T, Ikeda Y, Hayashi Y, Aokiba Y, Tomita S, Sekiguchi F, Wang D, Nishibori M, Kawabata A. Caspase-Dependent HMGB1 Release from Macrophages Participates in Peripheral Neuropathy Caused by Bortezomib, a Proteasome-Inhibiting Chemotherapeutic Agent, in Mice. *Cells*. 2021 Sep 27;10(10):2550. doi: 10.3390/cells10102550. PMID: 34685531; PMCID: PMC8533714.
42. Ghobrial IM, Weller E, Vij R, Munshi NC, Banwait R, Bagshaw M, Schlossman R, Leduc R, Chuma S, Kunsman J, Laubach J, Jakubowiak AJ, Maiso P, Roccaro A, Armand P, Dollard A, Warren D, Harris B, Poon T, Sam A, Rodig S, Anderson KC, Richardson PG. Weekly bortezomib in combination with temsirolimus in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, phase 1/2, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncol*. 2011 Mar;12(3):263-72. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70028-6. Epub 2011 Feb 21. PMID: 21345726.
43. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ; Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 May 31;356(22):2271-81. doi: 10.1056/NEJMoa066838. PMID: 17538086.
44. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A; RECORD-1 Study Group. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008 Aug 9;372(9637):449-56. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61039-9. Epub 2008 Jul 22. PMID: 18653228.

45. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT, Ito Y, Yardley D, Deleu I, Perez A, Bachelot T, Vittori L, Xu Z, Mukhopadhyay P, Lebwohl D, Hortobagyi GN. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 Feb 9;366(6):520-9. doi: 10.1056/NEJMoa1109653. Epub 2011 Dec 7. PMID: 22149876; PMCID: PMC5705195.
46. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011 Feb 10;364(6):514-23. doi: 10.1056/NEJMoa1009290. PMID: 21306238; PMCID: PMC4208619.
47. Duan Z, Su Z, Wang H, Pang X. Involvement of pro-inflammation signal pathway in inhibitory effects of rapamycin on oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Mol Pain*. 2018 Jan-Dec;14:1744806918769426. doi: 10.1177/1744806918769426. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29587559; PMCID: PMC5898663.
48. Alotaibi M, Al-Aqil F, Alqahtani F, Alanazi M, Nadeem A, Ahmad SF, Lapresa R, Alharbi M, Alshammari A, Alotaibi M, Saleh T, Alrowis R. Alleviation of cisplatin-induced neuropathic pain, neuronal apoptosis, and systemic inflammation in mice by rapamycin. *Front Aging Neurosci*. 2022 Sep 28;14:891593. doi: 10.3389/fnagi.2022.891593. PMID: 36248001; PMCID: PMC9554141.
49. Cui J, He W, Yi B, Zhao H, Lu K, Ruan H, Ma D. mTOR pathway is involved in ADP-evoked astrocyte activation and ATP release in the spinal dorsal horn in a rat neuropathic pain model. *Neuroscience*. 2014 Sep 5;275:395-403. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.06.030. Epub 2014 Jun 27. PMID: 24976516.
50. Obara I, Tochiki KK, Géranton SM, Carr FB, Lumb BM, Liu Q, Hunt SP. Systemic inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway reduces neuropathic pain in mice. *Pain*. 2011 Nov;152(11):2582-2595. doi: 10.1016/j.pain.2011.07.025. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21917376.
51. Asante CO, Wallace VC, Dickenson AH. Mammalian target of rapamycin signaling in the spinal cord is required for neuronal plasticity and behavioral hypersensitivity associated with neuropathy in the rat. *J Pain*. 2010 Dec;11(12):1356-67. doi: 10.1016/j.jpain.2010.03.013. Epub 2010 May 8. PMID: 20452291; PMCID: PMC3000494.

52. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960-976. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004. Erratum in: *Cell*. 2017 Apr 6;169(2):361-371. PMID: 28283069; PMCID: PMC5394987.
53. Shihab F, Christians U, Smith L, Wellen JR, Kaplan B. Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and clinical outcomes. *Transpl Immunol*. 2014 Jun;31(1):22-32. doi: 10.1016/j.trim.2014.05.002. Epub 2014 May 24. PMID: 24861504.
54. Abouelnasr A, Roy J, Cohen S, Kiss T, Lachance S. Defining the role of sirolimus in the management of graft-versus-host disease: from prophylaxis to treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Jan;19(1):12-21. doi: 10.1016/j.bbmt.2012.06.020. Epub 2012 Jul 5. PMID: 22771839.
55. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Young LR, Kinder BW, Downey GP, Sullivan EJ, Colby TV, McKay RT, Cohen MM, Korbee L, Taveira-DaSilva AM, Lee HS, Krischer JP, Trapnell BC; National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med*. 2011 Apr 28;364(17):1595-606. doi: 10.1056/NEJMoa1100391. Epub 2011 Mar 16. PMID: 21410393; PMCID: PMC3118601.
56. Davies DM, de Vries PJ, Johnson SR, McCartney DL, Cox JA, Serra AL, Watson PC, Howe CJ, Doyle T, Pointon K, Cross JJ, Tattersfield AE, Kingswood JC, Sampson JR. Sirolimus therapy for angiomyolipoma in tuberous sclerosis and sporadic lymphangioleiomyomatosis: a phase 2 trial. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 15;17(12):4071-81. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0445. Epub 2011 Apr 27. PMID: 21525172.
57. Seto B. Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer. *Clin Transl Med*. 2012 Nov 15;1(1):29. doi: 10.1186/2001-1326-1-29. PMID: 23369283; PMCID: PMC3561035.
58. Douros J, Suffness M. New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev*. 1981 Mar;8(1):63-87. doi: 10.1016/s0305-7372(81)80006-0. PMID: 7248995.
59. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ; Global

- ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 May 31;356(22):2271-81. doi: 10.1056/NEJMoa066838. PMID: 17538086.
60. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Leblwohl D, Ravaud A; RECORD-1 Study Group. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008 Aug 9;372(9637):449-56. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61039-9. Epub 2008 Jul 22. PMID: 18653228.
61. Ghobrial IM, Redd R, Armand P, Banwait R, Boswell E, Chuma S, Huynh D, Sacco A, Roccaro AM, Perilla-Glen A, Noonan K, MacNabb M, Leblebian H, Warren D, Henrick P, Castillo JJ, Richardson PG, Matous J, Weller E, Treon SP. Phase I/II trial of everolimus in combination with bortezomib and rituximab (RVR) in relapsed/refractory Waldenstrom macroglobulinemia. *Leukemia*. 2015 Dec;29(12):2338-46. doi: 10.1038/leu.2015.164. Epub 2015 Jul 3. PMID: 26139427.
62. Bruna J, Udina E, Alé A, Vilches JJ, Vynckier A, Monbaliu J, Silverman L, Navarro X. Neurophysiological, histological and immunohistochemical characterization of bortezomib-induced neuropathy in mice. *Exp Neurol*. 2010 Jun;223(2):599-608. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.02.006. Epub 2010 Feb 24. PMID: 20188093.
63. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994 Jul;53(1):55-63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9. PMID: 7990513.
64. So K, Tei Y, Zhao M, Miyake T, Hiyama H, Shirakawa H, Imai S, Mori Y, Nakagawa T, Matsubara K, Kaneko S. Hypoxia-induced sensitisation of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. *Sci Rep*. 2016 Mar 17;6:23261. doi: 10.1038/srep23261. PMID: 26983498; PMCID: PMC4794653.
65. Kitamura R, Andoh T, Mizoguchi S, Saito Y, Takahata H, Kuraishi Y. Gabapentin inhibits bortezomib-induced mechanical allodynia through supraspinal action in mice. *J Pharmacol Sci*. 2014;124(4):502-10. doi: 10.1254/jphs.13274FP. Epub 2014 Mar 29. PMID: 24681698.

66. Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim.* 2011;60(5):481-7. doi: 10.1538/expanim.60.481. PMID: 22041285.
67. Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM. Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience.* 2014 Aug 22;274:308-17. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.051. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24905437; PMCID: PMC4099296.
68. Robinson CR, Dougherty PM. Spinal astrocyte gap junction and glutamate transporter expression contributes to a rat model of bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Neuroscience.* 2015 Jan 29;285:1-10. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.009. Epub 2014 Nov 13. PMID: 25446343; PMCID: PMC4282967.
69. Nakagawa T, Kaneko S. Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. *J Pharmacol Sci.* 2010;114(4):347-53. doi: 10.1254/jphs.10r04cp. Epub 2010 Nov 11. PMID: 21081837.
70. Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Jan;10(1):23-36. doi: 10.1038/nrn2533. PMID: 19096368; PMCID: PMC2752436.
71. Ledebor A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain.* 2005 May;115(1-2):71-83. doi: 10.1016/j.pain.2005.02.009. PMID: 15836971.
72. Zhang H, Yoon SY, Zhang H, Dougherty PM. Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of Paclitaxel-induced painful neuropathy. *J Pain.* 2012 Mar;13(3):293-303. doi: 10.1016/j.jpain.2011.12.002. Epub 2012 Jan 29. PMID: 22285612; PMCID: PMC3294066.
73. Watkins LR, Maier SF. Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain. *J Intern Med.* 2005 Feb;257(2):139-155. doi: 10.1111/j.1365-2796.2004.01443.x. PMID: 15656873.
74. Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1886-1918. doi: 10.3390/ijms13021886. Epub 2012 Feb 10. PMID: 22408430; PMCID: PMC3291999.

75. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 2012 Jan 1;441(1):1-21. doi: 10.1042/BJ20110892. PMID: 22168436.
76. Kadakia E, Harpude P, Parayath N, Bottino D, Amiji M. Challenging the CNS Targeting Potential of Systemically Administered Nanoemulsion Delivery Systems: a Case Study with Rapamycin-Containing Fish Oil Nanoemulsions in Mice. *Pharm Res.* 2019 Jul 11;36(9):134. doi: 10.1007/s11095-019-2667-7. PMID: 31297653
77. O'Reilly T, McSheehy PM, Kawai R, Kretz O, McMahon L, Brueggen J, Bruelisauer A, Gschwind HP, Allegrini PR, Lane HA. Comparative pharmacokinetics of RAD001 (everolimus) in normal and tumor-bearing rodents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010 Mar;65(4):625-39. doi: 10.1007/s00280-009-1068-8. Epub 2009 Sep 27. PMID: 19784839.
78. Shah M, Edman MC, Janga SR, Shi P, Dhandhukia J, Liu S, Louie SG, Rodgers K, Mackay JA, Hamm-Alvarez SF. A rapamycin-binding protein polymer nanoparticle shows potent therapeutic activity in suppressing autoimmune dacryoadenitis in a mouse model of Sjögren's syndrome. *J Control Release.* 2013 Nov 10;171(3):269-79. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.07.016. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23892265; PMCID: PMC3796004.
79. Huttunen KM, Terasaki T, Urtti A, Montaser AB, Uchida Y. Pharmacoproteomics of Brain Barrier Transporters and Substrate Design for the Brain Targeted Drug Delivery. *Pharm Res.* 2022 Jul;39(7):1363-1392. doi: 10.1007/s11095-022-03193-2. Epub 2022 Mar 7. PMID: 35257288; PMCID: PMC9246989.
80. Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science.* 1996 Jul 12;273(5272):239-42. doi: 10.1126/science.273.5272.239. PMID: 8662507.
81. Schuler W, Sedrani R, Cottens S, Häberlin B, Schulz M, Schuurman HJ, Zenke G, Zerwes HG, Schreier MH. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation.* 1997 Jul 15;64(1):36-42. doi: 10.1097/00007890-199707150-00008. PMID: 9233698.
82. Klawitter J, Nashan B, Christians U. Everolimus and sirolimus in transplantation-related but different. *Expert Opin Drug Saf.* 2015 Jul;14(7):1055-70. doi: 10.1517/14740338.2015.1040388. Epub 2015 Apr 26. PMID: 25912929; PMCID: PMC6053318.

83. Meregalli C, Chiorazzi A, Carozzi VA, Canta A, Sala B, Colombo M, Oggioni N, Ceresa C, Foudah D, La Russa F, Miloso M, Nicolini G, Marmioli P, Bennett DL, Cavaletti G. Evaluation of tubulin polymerization and chronic inhibition of proteasome as cytotoxicity mechanisms in bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Cell Cycle*. 2014;13(4):612-21. doi: 10.4161/cc.27476. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24335344.
84. Yan W, Wu Z, Zhang Y, Hong D, Dong X, Liu L, Rao Y, Huang L, Zhang X, Wu J. The molecular and cellular insight into the toxicology of bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Biomed Pharmacother*. 2021 Oct;142:112068. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112068. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34463262.
85. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):77-92. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.021. PMID: 17015228; PMCID: PMC1810425.
86. Moschetti G, Amodeo G, Maftei D, Lattanzi R, Procacci P, Sartori P, Balboni G, Onnis V, Conte V, Panerai A, Sacerdote P, Franchi S. Targeting prokineticin system counteracts hypersensitivity, neuroinflammation, and tissue damage in a mouse model of bortezomib-induced peripheral neuropathy. *J Neuroinflammation*. 2019 Apr 17;16(1):89. doi: 10.1186/s12974-019-1461-0. PMID: 30995914; PMCID: PMC6471808.
87. Ghelardini et al., 2014 Ghelardini C, Menicacci C, Cerretani D, Bianchi E. Spinal administration of mGluR5 antagonist prevents the onset of bortezomib induced neuropathic pain in rat. *Neuropharmacology*. 2014 Nov;86:294-300. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.08.004. Epub 2014 Aug 13. PMID: 25128849.
88. Xie JD, Chen SR, Chen H, Pan HL. Bortezomib induces neuropathic pain through protein kinase C-mediated activation of presynaptic NMDA receptors in the spinal cord. *Neuropharmacology*. 2017 Sep 1;123:477-487. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.06.027. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28663117; PMCID: PMC5546238.
89. Ji YF, Zhou L, Xie YJ, Xu SM, Zhu J, Teng P, Shao CY, Wang Y, Luo JH, Shen Y. Upregulation of glutamate transporter GLT-1 by mTOR-Akt-NF- κ B cascade in astrocytic oxygen-glucose deprivation. *Glia*. 2013 Dec;61(12):1959-75. doi: 10.1002/glia.22566. Epub 2013 Sep 24. PMID: 24108520.
90. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered

- phosphorylation events. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):569-80. doi: 10.1016/j.cell.2005.10.024. PMID: 16286006.
91. Khotskaya YB, Goverdhan A, Shen J, Ponz-Sarvise M, Chang SS, Hsu MC, Wei Y, Xia W, Yu D, Hung MC. S6K1 promotes invasiveness of breast cancer cells in a model of metastasis of triple-negative breast cancer. *Am J Transl Res*. 2014 Jul 18;6(4):361-76. PMID: 25075253; PMCID: PMC4113498.
 92. Shen H, Wang GC, Li X, Ge X, Wang M, Shi ZM, Bhardwaj V, Wang ZX, Zinner RG, Peiper SC, Aplin AE, Jiang BH, He J. S6K1 blockade overcomes acquired resistance to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2020 Dec;39(49):7181-7195. doi: 10.1038/s41388-020-01497-4. Epub 2020 Oct 9. PMID: 33037411; PMCID: PMC7718330.
 93. Shum M, Bellmann K, St-Pierre P, Marette A. Pharmacological inhibition of S6K1 increases glucose metabolism and Akt signalling in vitro and in diet-induced obese mice. *Diabetologia*. 2016 Mar;59(3):592-603. doi: 10.1007/s00125-015-3839-6. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26733005.
 94. Zhang Y, Cheng X, Wu L, Li J, Liu C, Wei M, Zhu C, Huang H, Lin W. Pharmacological inhibition of S6K1 rescues synaptic deficits and attenuates seizures and depression in chronic epileptic rats. *CNS Neurosci Ther*. 2023 Sep 22. doi: 10.1111/cns.14475. Epub ahead of print. PMID: 37736829.
 95. de la Peña JB, Kunder N, Lou TF, Chase R, Stanowick A, Barragan-Iglesias P, Pancrazio JJ, Campbell ZT. A role for translational regulation by S6 kinase and a downstream target in inflammatory pain. *Br J Pharmacol*. 2021 Dec;178(23):4675-4690. doi: 10.1111/bph.15646. Epub 2021 Sep 12. PMID: 34355805; PMCID: PMC9169231.
 96. Jiang F, Hua LM, Jiao YL, Ye P, Fu J, Cheng ZJ, Ding G, Ji YH. Activation of mammalian target of rapamycin contributes to pain nociception induced in rats by BmK I, a sodium channel-specific modulator. *Neurosci Bull*. 2014 Feb;30(1):21-32. doi: 10.1007/s12264-013-1377-0. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24132796; PMCID: PMC5562571.
 97. Dibble CC, Asara JM, Manning BD. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol*. 2009 Nov;29(21):5657-70. doi: 10.1128/MCB.00735-09. Epub 2009 Aug 31. PMID: 19720745; PMCID: PMC2772744.

98. Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol.* 2010 Feb;30(4):908-21. doi: 10.1128/MCB.00601-09. Epub 2009 Dec 7. PMID: 19995915; PMCID: PMC2815569.
99. Yamamoto S, Egashira N. Pathological Mechanisms of Bortezomib-Induced Peripheral Neuropathy. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 17;22(2):888. doi: 10.3390/ijms22020888. PMID: 33477371; PMCID: PMC7830235.
100. Li D, Wang C, Yao Y, Chen L, Liu G, Zhang R, Liu Q, Shi FD, Hao J. mTORC1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from M1 type to M2 type. *FASEB J.* 2016 Oct;30(10):3388-3399. doi: 10.1096/fj.201600495R. Epub 2016 Jun 24. Erratum in: *FASEB J.* 2018 Nov;32(11):6353. PMID: 27342766.
101. Tateda S, Kanno H, Ozawa H, Sekiguchi A, Yahata K, Yamaya S, Itoi E. Rapamycin suppresses microglial activation and reduces the development of neuropathic pain after spinal cord injury. *J Orthop Res.* 2017 Jan;35(1):93-103. doi: 10.1002/jor.23328. Epub 2016 Jun 22. PMID: 27279283.
102. Yeo JH, Roh DH. The mTOR inhibitor rapamycin suppresses trigeminal neuropathic pain and p-MKK4/p-p38 mitogen-activated protein kinase-mediated microglial activation in the trigeminal nucleus caudalis of mice with infraorbital nerve injury. *Front Mol Neurosci.* 2023 Apr 14;16:1172366. doi: 10.3389/fnmol.2023.1172366. PMID: 37122619; PMCID: PMC10140572.
103. Jiménez-Díaz L, Géranton SM, Passmore GM, Leith JL, Fisher AS, Berliocchi L, Sivasubramaniam AK, Sheasby A, Lumb BM, Hunt SP. Local translation in primary afferent fibers regulates nociception. *PLoS One.* 2008 Apr 9;3(4):e1961. doi: 10.1371/journal.pone.0001961. PMID: 18398477; PMCID: PMC2276314.
104. Géranton SM, Jiménez-Díaz L, Torsney C, Tochiki KK, Stuart SA, Leith JL, Lumb BM, Hunt SP. A rapamycin-sensitive signaling pathway is essential for the full expression of persistent pain states. *J Neurosci.* 2009 Nov 25;29(47):15017-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3451-09.2009. PMID: 19940197; PMCID: PMC2830115.
105. Raab-Graham KF, Haddick PC, Jan YN, Jan LY. Activity- and mTOR-dependent suppression of Kv1.1 channel mRNA translation in dendrites. *Science.* 2006 Oct 6;314(5796):144-8. doi: 10.1126/science.1131693. PMID: 17023663.

106. Sosanya NM, Huang PP, Cacheaux LP, Chen CJ, Nguyen K, Perrone-Bizzozero NI, Raab-Graham KF. Degradation of high affinity HuD targets releases Kv1.1 mRNA from miR-129 repression by mTORC1. *J Cell Biol.* 2013 Jul 8;202(1):53-69. doi: 10.1083/jcb.201212089. PMID: 23836929; PMCID: PMC3704988.
107. Zhou Z, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. Specific Cellular Effects of Low Bortezomib Concentrations on Purified Cultures of Schwann Cells, Satellite Glial Cells, Macrophages, and Dorsal Root Ganglion Neurons. *Biol Pharm Bull.* 2023;46(1):102-110. doi: 10.1248/bpb.b22-00668. PMID: 36596518.