

車前子成分を基盤とした 抗がん薬誘発末梢神経障害性異常感覚の予防・ 治療薬シーズの同定

申請代表者	安東 嗣修	富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)応用薬理学	准教授
所外共同研究者	歌 大介	富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)応用薬理学	助教
所外共同研究者	加藤 充	富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)応用薬理学	薬学科6年生
所内共同研究者	小松かつ子	資源開発部門生薬資源科学分野	教授
所内共同研究者	當銘 一文	資源開発部門生薬資源科学分野	准教授

■背景・目的

がん化学療法（抗がん薬による治療）は、がん患者にとって重要な薬物療法である。しかしながら、その副作用には重篤なものがあり、特に患者のQOL（生活の質）を著しく低下せるものに嘔吐及び末梢神経障害（疼痛や痺れなどの異常感覚）が挙げられる。嘔吐に関しては、セロトニン5-HT₃受容体遮断薬やニューロキニンNK1受容体拮抗薬が予防的に投与され奏効している。一方、末梢神経障害に関しては、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬ではコントロールできず、その発生により抗がん薬の投薬が中止される。このことはがん患者にとって非常に不利益である。また、無事に抗がん薬治療が終了した後においても、末梢神経障害は1年以上も続くことが多く、日常生活に障害をもたらす。したがって、抗がん薬による末梢神経障害の予防・治療は、がん患者にとって重要である。しかしながら、抗がん薬による末梢神経障害の予防や治療に有用な薬物が無いのが現状である。

申請者らは、これまでに抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛の動物モデルの作出 [Gauchan et al., 2009; Kitamura et al., 2014] に成功した。この動物モデルを用い、各種漢方方剤を用いて抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛への効果を検討してきた。その中で、十種の生薬（地黄、山薬、山茱萸、茯苓、沢瀉、牡丹皮、桂皮、附子、牛膝、車前子）から構成される牛車腎気丸の予防的繰り返し投与により抗がん薬パクリタキセル末梢神経障害性疼痛（アロディニア：健常では何も感じない刺激に対して過剰な過敏反応を示す状態）の誘発を抑制することを見出した。さらに、牛車腎気丸の構成生薬から牛膝と車前子を除いた生薬で構成される八味地黄丸の繰り返し投与では、パクリタキセルによって誘発されるアロディニアの発生を抑制することはできなかった。また、牛膝および車前子のエキスの繰り返し投与では車前子エキスを投与した場合のみアロディニアの発生が抑制された。これらの結果から、車前子にパクリタキセルによる末梢神経障害性疼痛の発生抑制効果を示す物質が存在することが示唆される。そこで、本研究では、パクリタキセルによる末梢神経障害性疼痛の発生抑制効果を示す車前子の活性成分を同定し、その作用機序を明らかにすることを目的とする。

■結果・考察

<方法>

使用実験動物：

雄性 c57BL/6 系マウス

細胞：

ラットシュワン細胞株 LY-PPB6 細胞 (理化学研究所 バイオリソースセンター 細胞材料開発室) は、10% 牛胎児血清、並びに抗生物質を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて培養した。実験時には、1% bovine serum albumin を含む DMEM 培地を用いた。

疼痛評価：

von Frey フィラメント (0.69 mN) をマウス後肢足蹠に軽くあて、その時生じる疼痛様反応をスコア化 (スコア 0: 無反応あるいは後肢の左右への移動、スコア 2: 後肢の腹部方向への引き挙げ動作、スコア 3: 後肢の振り動作あるいは舐め動作) することにより評価した。

パクリタキセル誘発性疼痛マウスモデル (図 1)：

パクリタキセル (5mg/kg) をマウスに単回腹腔内注射すると、投与後 14 日目をピークとする疼痛様反応の増大を認めた。薬物注射後 28 日目には溶媒注射コントロールと同程度にまで回復した。

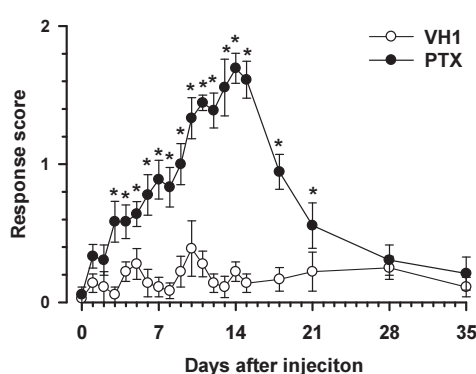


図 1. パクリタキセル誘発機械的アロディニア

パクリタキセル (PTX, 5 mg/kg) 或いは溶媒 (VH1) は、0 日目に単回腹腔内注射した。データは、平均及び標準誤差で表した (n=6)。

電気生理学的解析：

マウス麻酔下、脊椎の L1-L6 レベルの椎弓を除去し、脊髓を露出させ、Krebs 溶液で脊髓表面を灌流し、タングステン電極を脊髓後角側から挿入し、神経活動を細胞外記録した。マウス後肢足蹠への von Frey フィラメント (0.69 mN) の刺激により応答するニューロンの受容野を同定した。

ウエスタンブロッティング：

パクリタキセル投与後 14 日目にマウスの坐骨神経を採取し、タンパク抽出を行った。また、一部の実験では、ラットシュワン細胞株 LY-PPB6 細胞へのパクリタキセル (100 μ M) 添加 24 時間後にタンパク抽出を行った。常法に従い、ウエスタンブロッティングを行った。1 次抗体は、mouse anti-CCAAT/enhancer-binding protein (CHOP) monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 及び rabbit anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) polyclonal antibody (Novus Biologicals LLC, Littleton, CO, USA) を用いた。また、2 次抗体として、horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Piscataway, NJ, USA) を用いた。シグナルの検出は、chemiluminescence reaction (GE Healthcare Bio-Sciences Co.) と X 線フィルムを用いて行った。

<結果>

パクリタキセル誘発機械的アロディニアに対する車前子エキスの分画物の効果：

車前子水抽出物を各種カラムクロマトグラフィー（ダイアイオン HP21、ODS カラム）により分画し、パクリタキセル投与の翌日より、1日1回経口投与した。パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制した画分については、さらなる分画を行い、2種の化合物を単離した。NMR、ESIMSの解析の結果、これらをゲニポシジン酸及びアウクビンと同定した。

パクリタキセル誘発機械的アロディニアに対するゲニポシジン酸、アウクビン及びカタルポールの効果（図2）：

前項で単離・同定したゲニポシジン酸、アウクビンに加え、アウクビンの代謝物であるカタルポールのパクリタキセル誘発機械的アロディニアへの効果を検討した。アウクビン（50 mg/kg）のパクリタキセル投与翌日からの1日1回の腹腔内注射は、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制した。一方、ゲニポシジン酸（50 mg/kg）及びカタルポール（50 mg/kg）のパクリタキセル投与翌日からの1日1回の腹腔内注射は、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制しなかった。

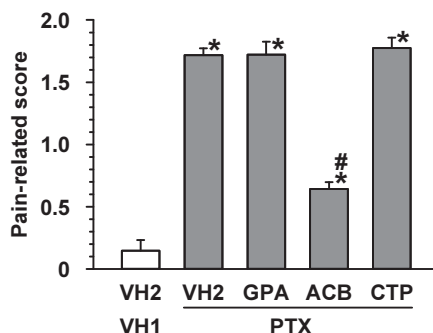


図2. パクリタキセル誘発機械的アロディニアに対するゲニポシジン酸、アウクビン及びカタルポールの効果
パクリタキセル (PTX, 5 mg/kg) 或いは溶媒 (VH1) は、0日目に単回腹腔内注射した。ゲニポシジン酸 (GPA, 50 mg/kg)、アウクビン (ACB, 50 mg/kg)、カタルポール (CTP, 50 mg/kg) 及び溶媒 (VH2) は、PTX 投与翌日より1日1回腹腔内注射した。データは、PTX 投与後14日目の結果を示す。データは、平均及び標準誤差で表した (n = 6-20)。* $P < 0.05$ vs. VH1+VH2, # $P < 0.05$ vs. PTX+VH2.

パクリタキセル投与マウスの脊髄後角ニューロンの神経活動に対するアウクビン及びカタルポールの効果（図3）：

溶媒投与健常コントロールマウスの脊髄後角ニューロンでは、自発神経発火並びに von Frey フィ

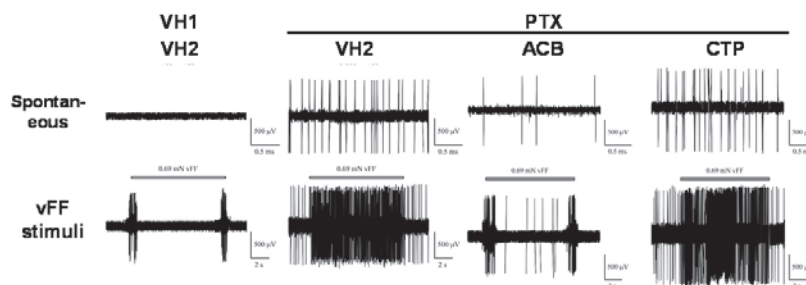


図3. パクリタキセル投与マウス脊髄後角ニューロンの神経活動に対するアウクビン及びカタルポールの効果
パクリタキセル (PTX, 5 mg/kg) 或いは溶媒 (VH1) は、0日目に単回腹腔内注射した。アウクビン (ACB, 50 mg/kg)、カタルポール (CTP, 50 mg/kg) 及び溶媒 (VH2) は、PTX 投与翌日より1日1回腹腔内注射した。データは、PTX 投与後14日目の結果を示す。データは、それぞれの神経活動の典型例を示す。Spontaneous, 自発神経発火; vFF stimuli, von Frey フィラメント (0.69 mN) 刺激。

ラメント (0.69 mN) 刺激による神経発火は、ほとんど観察されなかった。一方、パクリタキセル投与マウスの脊髄後角ニューロンでは、自発神経発火並びに von Frey フィラメント (0.69 mN) 刺激による神経発火が溶媒投与健常コントロールマウスと比べて明らかに増加していた。パクリタキセル投与マウスにおける脊髄後角ニューロンの自発神経発火並びに von Frey フィラメント (0.69 mN) 刺激による神経発火の増加は、アウクビン (50 mg/kg) のパクリタキセル投与翌日からの 1 日 1 回の腹腔内注射により抑制されたが、カタルポール (50 mg/kg) の連続投与では抑制されなかった。

パクリタキセル投与マウスの坐骨神経並びにパクリタキセル適用ラットシュワン細胞株 LY-PP6 細胞における小胞体ストレスへのアウクビンの効果 (図 4) :

パクリタキセル投与マウスの坐骨神経並びにパクリタキセル適用ラットシュワン細胞株 LY-PP6 細胞において、小胞体ストレスマーカーの CHOP の発現が、コントロールマウスの坐骨神経ならびに溶媒適用の LY-PP6 細胞と比較して有意に増加した。アウクビンは、これらパクリタキセル誘発の CHOP の発現を有意に抑制した。

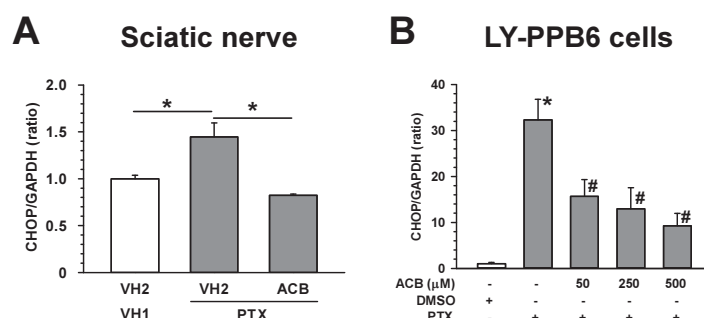


図 4. (A)パクリタキセル投与マウス坐骨神経並びに(B)パクリタキセル適用ラットシュワン細胞株 LY-PP6 細胞における小胞体ストレスへのアウクビンの効果

小胞体ストレスは、そのマーカーである CHOP の発現を指標にウエスタンブロッティングにより評価した。(A) パクリタキセル (PTX, 5 mg/kg) 或いは溶媒 (VH1) は、0 日目に単回腹腔内注射した。アウクビン (ACB, 50 mg/kg) 及び溶媒 (VH2) は、PTX 投与翌日より 1 日 1 回腹腔内注射した。坐骨神経は、PTX 投与後 14 日目に摘出した。データは、平均及び標準誤差で表した (n = 6)。**P* < 0.05 (B) アウクビン (ACB) は、PTX (100 μM) 投与 1 時間前に適用した。細胞は、PTX 適用 24 時間後に回収した。DMSO (dimethyl sulfoxide)、PTX の溶媒。データは、平均及び標準誤差で表した (n = 4)。**P* < 0.05 vs. DMSO, #*P* < 0.05 vs. PTX.

<考察>

車前子水抽出エキスの繰り返し投与により、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪が抑制されることをこれまでに明らかにしてきた。本研究では、車前子水抽出物エキスを更に分画し、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用を示す画分が一つに集約され、その中にゲニボシジン酸並びにアウクビンが含まれていることを明らかにした。そこで、ゲニボシジン酸並びにアウクビンに加え、アウクビンの代謝物であるカタルポールのパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用を評価したところ、アウクビンにパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用があることを見出した。しかし、アウクビンは、パクリタキセル誘発機械的アロディニアピーク時に単回投与してもアロディニア抑制効果は認められなかった (data not shown)。このことは、アウクビンには急性効果はないが、アロディニアの発生を予防する効果があることが示唆される。

本研究では、行動実験に加え、脊髄後角ニューロンの神経活動を電気生理学的に評価した。パクリタキセル投与マウスにおいて、行動実験と同様に von Frey フィラメント刺激による神経発火の増加

が認められた。興味あることに、パクリタキセル投与マウスにおいて自発的神経発火の増加も認められた。パクリタキセル投与患者では、チクチク、ビンビンなどしびれ様の不快な異常感覚が生じる。このようなしびれ様感覚は、動物の行動では客観的に評価することは難しい。しかし、本研究では電気生理学的解析によりパクリタキセル投与マウスに自発神経発火が検出された。これはパクリタキセル投与患者のしびれ様感覚を反映している可能性が考えられる。アウクビンの繰り返し投与により、機械刺激誘発で増加した神経発火及び自発神経発火が抑制されたことから、アウクビンがしびれを含む不快感異常感覚抑制効果があることが示唆される。

アウクビンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪ならびに神経発火増加抑制作用機序の詳細は完全には、本研究では明らかにされていない。パクリタキセル投与患者並びにマウスにおいて、末梢神経における脱髄現象が報告されている。神経障害性疼痛においても脱髄がその疼痛の憎悪に関与していることが知られている。また、脱髄には一部小胞体ストレスが関与していることが知られている。パクリタキセル投与マウスの坐骨神経において、小胞体ストレスのマーカーである CHOP の発現が増加していたことから、小胞体ストレスの関与が示唆される。続いて、髄鞘を形成しているシュワン細胞へのパクリタキセルの作用を調べたところ、パクリタキセルはシュワン細胞に対しても CHOP の発現を増加した。また、アウクビンは、坐骨神経及びシュワン細胞におけるパクリタキセル誘発 CHOP 発現を抑制した。これらの結果を勘案すると、アウクビンは、少なくともシュワン細胞におけるパクリタキセル誘発小胞体ストレスを抑制することで末梢神経の自発発火並びに機械的アロディニアを抑制していることが示唆される。

■結論

車前子の成分であるアウクビンは、パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛に有用であり、特に末梢神経の髄鞘を形成しているシュワン細胞の保護的な作用がアウクビンの作用の一つである可能性がある。

■学会発表

学会：

- ① Uta D., Kato M., Toume K., Komatsu K., Andoh T. Repetitive intraperitoneal injection of aucubin reduces mechanical allodynia caused by paclitaxel in mice: An in vivo electrophysiological analysis. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa pharmaceutical Network (1st TAA-Pham Symposium); 2016 Sep 12-13; Toyama.
- ② Kato M., Uta D., Toume K., Komatsu K., Andoh T. Aucubin contributes to the inhibitory action of goshajinkigan on mechanical allodynia induced by paclitaxel in mice. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa pharmaceutical Network (1st TAA-Pham Symposium); 2016 Sep 12-13; Toyama.
- ③ 安東嗣修、加藤 充、歌 大介、北村 亮、當銘一文、小松かつ子、倉石 泰. マウスにおけるパクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛抑制作用成分の探索. 日本生薬学会第 63 回年会；2016 Sep 24-25；富山.
- ④ 當銘一文、加藤 充、侯 志艶、北村 亮、葛 躍偉、倉石 泰、安東 嗣修、小松かつ子. 車前子のパクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛抑制作用成分の探索. 日本生薬学会第 63 回年会；2016 Sep 24-25；富山.

- ⑤當銘一文、安東嗣修、加藤 充、侯 志艶、北村 亮、葛 躍偉、白 焱晶、倉石 泰、小松かつ子. パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛を抑制する車前子成分の探索. 第21回天然薬物の開発と応用シンポジウム；2016 Oct 27-28；千葉.

その他：

- ①安東嗣修. 抗がん薬によって誘発される末梢神経障害と漢方薬—その効果と作用機序—. 富山大学和漢医薬学総合研究所 第21回夏期セミナー；2016 Aug 9-10；富山.

■公表論文

原著論文：

- ① Andoh T, Uta D, Kato M, Toume K, Komatsu K, Kuraishi Y. Prophylactic administration of aucubin inhibits paclitaxel-induced mechanical allodynia via the inhibition of endoplasmic reticulum stress in peripheral Schwann cells. *Biol Pharm Bull.*, 40; 473-478 (2017).