

(第3号様式)

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 秋 田 聡

論 文 名 ハイstrupットイメージングシステムを用いたノイロトロピンの  
末梢神経保護効果の解析：ノイロトロピンのリポジショニングへの応用

---

### 学位論文要旨

#### <はじめに>

大腸癌は、世界で最も罹患数が多く、4番目に死亡数が多い悪性腫瘍である。近年の化学治療の発展により大腸癌による死亡数は2003年から2012年の間に3%ずつ低下している。オキサリプラチンは白金製剤に分類される化学治療剤であり、イリノテカンやフルオロウラシルとともに進行転移大腸癌に効果があり、予後の向上に寄与してきた。しかし、オキサリプラチンは急性もしくは慢性の末梢神経障害を引き起こし、多くの患者が投与量の減量や投与の中断を余儀なくされ、治療の有効性にも影響を与えてきた。種々の薬剤が、末梢神経障害を予防または治療するために開発されるも、標準的な治療法の確立には至らなかった。

ノイロトロピンは、ワクシニアウイルスを注射した兎の皮膚から抽出した鎮痛剤である。ノイロトロピンは、日本においてヘルペス後疼痛、腰背部痛、SMONなどの慢性疼痛に対して古くから使用されてきた。過去の報告において、ノイロトロピン投与が、オキサリプラチンの神経障害を軽減する可能性を示しているが、その作用機序は明らかになっていない。

我々は、オキサリプラチンの細胞障害性やノイロトロピンの神経保護作用を、ImageXpress（蛍光顕微鏡）を使用してhigh throughput image解析した。またノイロトロピンの抗酸化作用、抗炎症作用を調べ、ノイロトロピンの効果の解明を試みた。

#### <方法>

6週齢、雌のSDラットからDRG（後根神経節）を摘出し、コラゲナーゼ、トリプシンの酵素処理の後に30%パーコールで密度勾配遠心を行ってニューロンを単離し、B-27サプリメントを加えたF-12培地で2週間培養した。さらに、オキサリプラチン（0.1 $\mu$ M）、ノイロトロピン（4or 40mNU/mL；NU, Neurotropin Unit）を投与して1週間培養した。抗 $\beta$  III-tubulin1次抗体、FITC

氏名 秋田 聡

結合 2 次抗体、Hoechst33342 で蛍光染色し、ImageXpress で取り込み、高容量画像処理ソフトウェアである MetaXpress で分析した。薬剤投与後 1 週間の細胞からのタンパク質でウェスタンブロッティングを行い、ノイロトロピンの抗酸化、抗炎症性作用を検討した。

#### <結果>

40mNU/mL 以下の濃度のノイロトロピンを加えても、DRG ニューロンに障害を認めなかった。神経突起の長さ、面積、細胞体の面積、神経突起の branching の数量化を ImageXpress で行ったところ、ノイロトロピンを加えたものは、オキサリプラチン単独と比べて明らかな増加を示した。ウェスタンブロッティングでは、ノイロトロピンの 40mNU において p38 の発現は変化しないにもかかわらず、pp38 の発現は明らかに減少していた。対照的に JNK (c-Jun N-terminal kinase) と pJNK においては変化がなかった。またノイロトロピンは濃度依存的に TRX (thioredoxin) の発現を増加させた。

#### <考察>

ノイロトロピンは慢性の神経障害を軽減するものの、そのメカニズムは解明されていない。我々は、DRG ニューロンに対するノイロトロピンの効果を解明するために、high throughput imaging system を導入して、薬剤の効果を定量化して評価した。ノイロトロピンの細胞保護効果は神経突起の長さ、面積、細胞体の面積、神経突起の branching で特徴づけられ、それらは、オキサリプラチンとノイロトロピンの投与がノイロトロピン単独投与に比して改善傾向を示し、ノイロトロピンはオキサリプラチンの神経毒性を減量させていることを示唆している。また、ノイロトロピンはオキサリプラチンの total RNA 減少による転写障害から保護することで細胞体の大きさの維持し、コレステロールの代謝物を制御することで神経突起の branching を増やしている可能性がある。

ノイロトロピンは JNK のリン酸化に影響を与えず、高濃度において p38 のリン酸化を抑制した。このことからノイロトロピンはオキサリプラチンが誘発する p38 経路を介したアポトーシスを抑制していると推測できる。また、ASK1 と複合体を形成する TRX はノイロトロピンに濃度依存的に発現増加する。これらの結果は DRG においてノイロトロピンは、TRX の介在により ASK-p38 経路のアポトーシスを軽減していることを示す。ノイロトロピンは抗アポトーシス剤や抗炎症剤として働き、炎症性疾患における予防または治療の役目を担う可能性がある。

#### <結語>

ノイロトロピンは、オキサリプラチンによる神経障害に対して、神経突起の長さ、面積、細胞体の面積、神経突起の branching において効果が認められた。さらに、ノイロトロピンは、p38 経路のアポトーシスを防ぐ役割があった。我々の研究によりノイロトロピンの DRG ニューロンに対する神経保護効果が明らかになった。ノイロトロピンは、炎症疾患において有用な新薬であると期待できる

キーワード (3~5)	neurotrophin oxaliplatin dorsal root ganglion neuron apoptosis high throughput imaging
-------------	--