

学位論文審査結果の要旨

氏名	秋田 聡
審査委員	主査 松田 正司 副査 田中 潤也 副査 藤岡 徹 副査 川上 良介 副査 柳原 豊

論文名 ハイスループ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

審査結果の要旨

本研究はノイロトロピンのDRGニューロンに対する神経保護効果とその作用機序をImageXpress（蛍光顕微鏡）、ウエスタンブロッティング等により明らかにしたものである。

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。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、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、同薬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。

一方、ノイロトロピンは、ワクシニアウイルスを注射した兔の皮膚から抽出した鎮痛剤である。過去の報告において、同薬の投与が、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。申請者らは、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。

6週齢、雌のSDラットからDRG（後根神経節）を摘出し、酵素処理の後にニューロンを単離し、2週間培養した。さらに、オキサリプラチン（ $0.1\mu\text{M}$ ）、ノイロトロピン（ $40\text{r}40\text{mNU}/\text{mL}$ ；NU, Neurotropin Unit）を投与して1週間培養した。抗 $\beta\text{III-tubulin}$ 1次抗体、FITC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、以下の点を明らかにした。

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 40mNU 投与において 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 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。

上記のように、申請者らは、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。

本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。申請者らはノイロトロピンが、炎症疾患において有用な新薬として期待できるとの結論を導き出した。

審査会は平成 30 年 1 月 24 日に開催された。申請者が学位論文の内容について英語で発表後、質疑応答がされ、オキサリプラチンによる神経障害の特徴、特に痛覚過敏と DRG 感覚神経細胞死との関連、p38 経路を介したアポトーシス抑制効果、ImageXpress の計測原理、ノイロトロピン、オキサリプラチンの投与方法、特に同時投与することの臨床的意義、オキサリプラチンの大腸癌への作用機序、両薬の作用点の異同、オキサリプラチンの神経性疼痛軽減効果、イメージングの正当性、両薬の投与量設定根拠、他の癌治療薬との比較等について多くの質問が出され、申請者はこれらに的確に回答した。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。