博士論文

Oxaliplatinによる冷感誘発末梢神経障害と Transient Receptor Potential Ankyrin 1, 電位依存性カルシウムチャネル $\alpha_2\delta$-1に関する研究

平成28年度

山本　健

目　次

序　論……………………………………………………………………………………1

本　論

第1章　Oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応に対する TRPA1 の関与

1. 緒言………………………………………………………………………………4
2. 実験材料及び実験方法………………………………………………………6
3. 結果……………………………………………………………………………28
4. 考察……………………………………………………………………………55

第2章　Oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応に対する電位依存性カルシウム

チャネル $\alpha_2\delta$ サブユニットの関与

1. 緒言……………………………………………………………………………41
2. 実験材料及び実験方法………………………………………………………43
3. 結果……………………………………………………………………………50
4. 考察……………………………………………………………………………55

結論………………………………………………………………………………………57

引用文献…………………………………………………………………………………59

謝辞………………………………………………………………………………………64

序　論

昭和 56 年から現在に至るまで，わが国においてがんは死亡原因として第 1 位を保っており，直近の調査（2014 年）では約 37 万人ががんで死亡したと推定されている[1)]．一般にがんの治療は，その大きさや各臓器での深達度，転移の程度などから病期が決定された後，がんの種類や病期に応じた手術療法・化学療法等が選択される．現在の化学療法では，研究・開発の進展により，有用性の高い多岐にわたる抗悪性腫瘍薬が臨床現場で使用可能となっている．しかしながら，抗悪性腫瘍薬が重篤な副作用を引き起こすという現実もまた存在している．

抗悪性腫瘍薬が引き起こす副作用は，骨髄抑制による血液毒性と，悪心・嘔吐，末梢神経障害などに代表される非血液毒性に大別される．血液毒性は血液検査にて評価されるため，その重症度については容易に把握可能である．しかし非血液毒性は，客観的な所見に乏しく，評価が難しいことや有効な支持療法薬や予防薬が少ないため，重篤な場合には抗悪性腫瘍薬による治療の継続が困難となり，投与量の減量や中止を余儀なくされることがある．例として，非血液毒性に含まれる末梢神経障害は，症状が重篤化しても表面上や外見上に変化はなく，重症度の評価が難しい副作用のひとつとして知られている．末梢神経障害は患者の Quality of Life（QOL）を著しく低下させるだけでなく，抗悪性腫瘍薬の用量規制因子として薬剤の変更や中止をしなければならなくなる場合も生じることから，臨床上の大きな問題となっている．

化学療法による神経障害は，侵害受容性疼痛・神経障害性疼痛・心因性疼痛にて構成される疼痛の一部として整理されており，【神経障害性疼痛】における【末梢性神経障害性疼痛】として定義されている[2)]．末梢神経障害を誘発する抗悪性腫瘍薬としてタキサン系（paclitaxel，docetaxel），白金製剤（oxaliplatin，cisplatin），ビンカアルカロイド（vincristine など），プロテアソーム阻害薬（bortezomib）などが知られている．中でも oxaliplatin は，第三世代の白金錯体系抗悪性腫瘍薬で，近年，他剤を併用する様々な治療法に用いられており，本邦では現在，大腸がん・胃がん・膵臓がんに適応を持つ[3)]．その作用機序は，oxalate 基が脱離し，ジクロロジアミノシクロヘキサン（DACH）等の生体内変換体を形成することで腫瘍細胞内の DNA 鎖と共有結合し，DNA の複製及び転写を阻害する．それにより細胞増殖抑制作用を発現すると考えられている（Fig 1）[3)]．しかし，高率に発現する副作用として末梢神経障害が知られており，その改善・回避が喫緊の課題となっている．

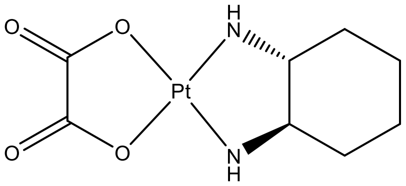


Fig.1　Oxaliplatin の構造式

Oxaliplatin による末梢神経障害は，急性末梢神経障害と慢性末梢神経障害に分類される [4]．前者は，本剤の投与直後からほぼ全例に出現し，冷感刺激により手足や口の周り，咽頭部における感覚不全が誘発されるという特有の症状である [5]．後者は，本剤による治療を長期間継続することにより発症する手足のしびれ等の感覚性機能障害で，oxaliplatin の累積投与量が 850 mg/m^2 において 10%，1020 mg/m^2 において 20% の発生率であることが報告されている [6]．

Oxaliplatin の冷感刺激誘発による末梢神経障害の発症機序として，oxaliplatin の代謝物である oxalate 基が，神経細胞の電位依存性 Na^+ チャネルに作用して神経細胞の興奮性増加，温度感受性チャネルである Transient Receptor Potential（TRP）Ankyrin 1（TRPA1）や TRP Melastatin 8（TRPM8）の関与，p38 mitogen-activated protein kinase（MAPK）の関与が示唆されている [6-12]．また oxaliplatin 以外の薬剤における末梢神経障害の発症には，電位依存性カルシウムチャネル（voltage-dependent calcium channel：Ca_v）$\alpha_2\delta$-1 サブユニットが関与しているという報告もあり [10]，その詳細な発症機序は特定されていない．

これまでに著者は，ラットの脊髄後根神経節（dorsal root ganglion：DRG）における TRPA1 及び $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの mRNA に対する oxaliplatin の作用について検討し，oxaliplatin が両者の発現量を一過性に増加させることを本学修士学位論文にて報告している [13]（Fig.2）．しかし，これらの増加が感覚神経に及ぼす影響に関する解析は未実施であり，また oxaliplatin と感覚神経系の関連性について精査した報告も非常に少ないのが現状である．そこで本研究では，TRPA1 ならびに $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットが oxaliplatin 誘発による末梢神経障害に及ぼす影響について，acetone spray test・real-time PCR および Western blot 法・蛍光免疫染色法を用いて oxaliplatin 投与から経時的に観察した．さらに，DRG のみではなく脊髄における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの mRNA 及びタンパクの変化にも着目し，TRPA1 ならびに $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットと末梢神経障害との関連性を，DRG 及び脊髄での変化と対応させることにより詳細に検討した．

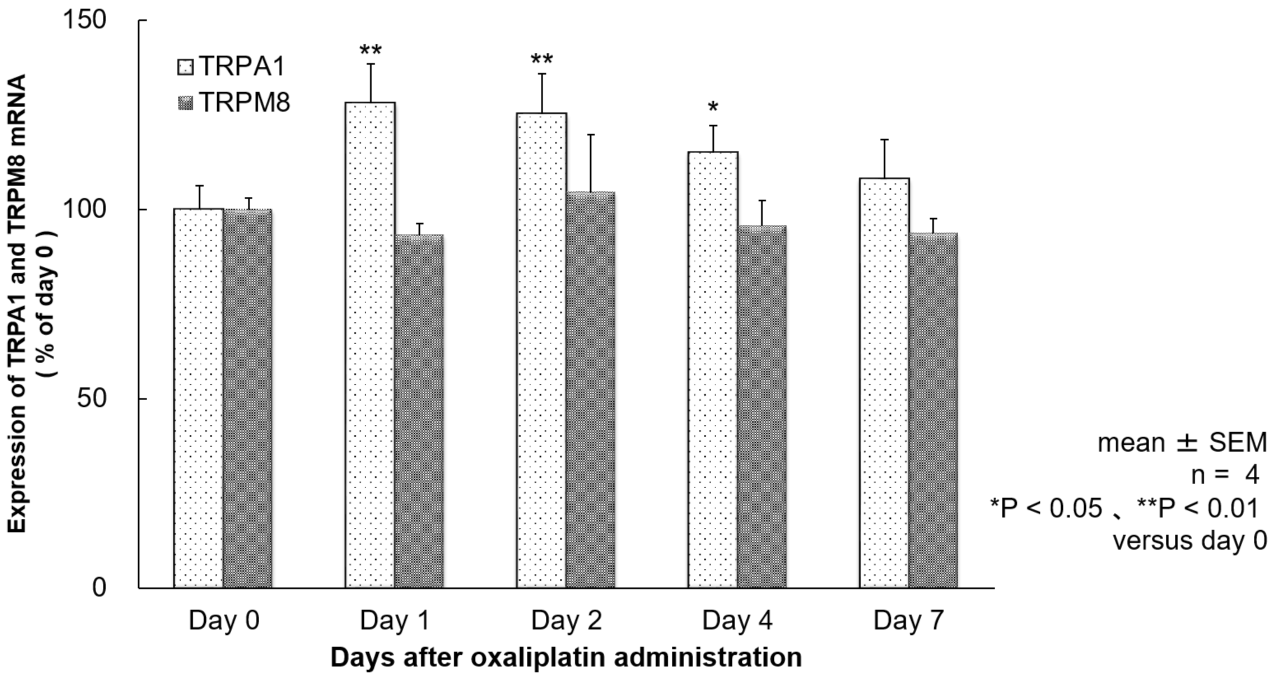


Fig.2　Oxaliplatin が DRG における TRPA1 及び TRPM8 mRNA 発現量へ及ぼす影響

（文献 13 より引用）

本　論

第１章　Oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応に対する TRPA1 の関与

緒　言

Oxaliplatin は白金錯体系抗悪性腫瘍薬であり，切除不能な進行・再発の結腸・直腸がんや，胃がん，膵臓がんに適応を有する．本剤特有の副作用として，冷感刺激により誘発される末梢神経障害が挙げられる．

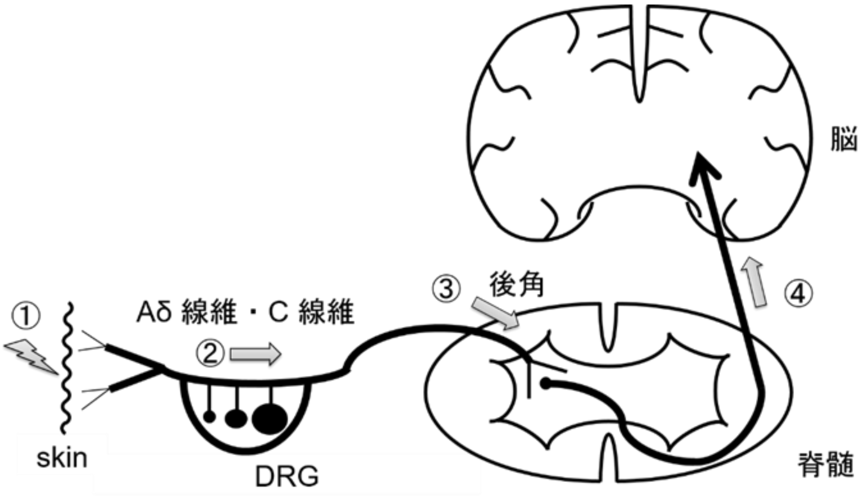


Fig.3　感覚刺激の伝達経路

ヒトにおいて，末梢での温度や痛みといった感覚刺激（Fig.3 ①）は，受容器にて電気信号に変換され，末梢と脊髄を結ぶ一次求心性の感覚神経である有髄神経（Aδ 線維）や，細い無髄神経（C 線維）にて伝導が行われる．この際，これらの刺激は感覚神経の細胞体集合部である DRG（Fig.3 ②）を経由して脊髄後角に達する（Fig.3 ③）．その後，神経伝達物質を介して二次神経へ伝わり，脊髄側索より中枢神経系へ至ることで痛みや温度が認知される（Fig.3 ④）．

温度感受性イオンチャネルである Transient Receptor Potential（TRP）は，表皮に近い感覚神経終末に発現しており，感覚刺激を電気信号に変換していると考えられている [11]．TRP は Ca^{2+} の透過性の高い非選択的カチオンチャネルであり，哺乳類では TRPC（C : canonical），TRPV（V : vanilloid），TRPM（M : melastatin），TRPP（P : polycystin），TRPML（ML : mucolipin），TRPA（A : ankyrin）の 6 つのサブファミリーに分類されている [14]．これら TRP サブファミリーのうち，9 つの TRP チャネルが温度感受性であることが知られており（Fig.4），TRPA1 はその活性化閾値が 17℃以下であることから，

冷刺激受容体のひとつと考えられている[15]．さらにTRPA1は，複数の侵害刺激により活性化されるポリモーダル受容器であるTRPV1と感覚神経細胞上で共発現していることから，侵害刺激の受容に深く関わっていることが推測されている[11]．

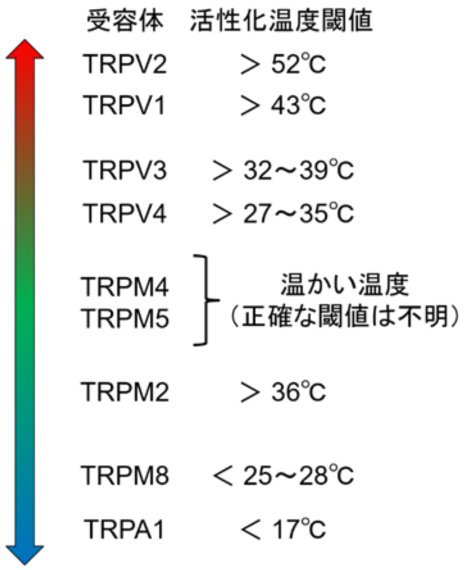


Fig.4 温度感受性TRPチャネルと活性化温度閾値

加えて，TRPA1の発現に細胞内シグナル伝達系として知られるMAPKが関与することが知られている[11-12]．そのサブファミリーにはextracellular signal-regulated kinase（ERK），p38，c-Jun N-terminal kinase（JNK）などがある．これらの細胞内シグナル伝達系の活性化が，一次知覚ニューロンや脊髄後角ニューロンにおいて生じ，痛みの発生やそれに伴う可塑的な変化に重要な役割を担っていることが明らかになりつつある[16-17]．これはタンパク質のリン酸化といった早期における神経系の可塑的変化だけでなく，核内における遺伝子発現レベルでの制御といった長期間の可塑的変化にも関与している[17]．中でもp-38MAPK，ERK1/2，ERK5は冷感刺激により活性化が認められ，p38MAPKは冷感刺激時にTRPA1と共発現することが報告されている[11,18]

以前，著者は本学修士学位論文にて，oxaliplatinがラットDRGにおいてTRPA1 mRNAの発現を増加させることを報告したが，この変化が感覚神経へ及ぼす影響については未検討であった[13]．そこで本研究では，冷感刺激に対するoxaliplatinの作用を行動学的に評価するとともに，一次求心性神経の細胞体であるDRGにおけるoxaliplatinがTRPA1のmRNA及びタンパクの発現、p38MAPKに及ぼす影響について神経化学的に検討を行った．

実験材料及び実験方法

1　実験動物

Wistar 系雄性ラット（8 週齢，250 - 350 g）を日本医科学動物資材研究所より購入し，一週間の馴化期間を経た後に実験に使用した．これらの動物は，昭和薬科大学・実験動物飼育施設において，温度 23 ± 1℃，湿度 55 ± 5% に調節された明暗 12 時間サイクル（8：00～20：00）下で，3 匹 / ケージで飼育した．水及び固形飼料は自由摂取とした．

2　薬物の調製方法

2.1　使用薬物

Oxaliplatin（エルプラット®点滴静注用 100 mg，ヤクルト本社）

Glucose（和光純薬工業）

2.2　薬物調製

Oxaliplatin 100 mg を 5% glucose 溶液 50 mL にて溶解し，濃度を 2 mg/mL とした．なお，本溶液は用時調製とした．

3　冷感刺激誘発による逃避反応へ及ぼす oxaliplatin の影響

3.1　薬物投与

動物に oxaliplatin 1, 3 及び 6 mg/kg を単回腹腔内投与した．対照群には，溶媒である 5% glucose 溶液を同様に投与した．観察期間は，投与前を Day 0 とし，投与後 7 日目まで 1 回/日の頻度で行動学的評価を実施した（それぞれ Day 1 ～ Day 7）.

3.2　Acetone spray test

冷感刺激に対する行動学的評価は，Choi ら [19] の方法（acetone spray test）を一部改変して実施した．金属性メッシュの上に透明なアクリル製の箱（23 cm × 23 cm × 12 cm）を乗せて動物を入れた後, 環境に慣れさせるため 30 分間放置した．その後，MicroSprayer® を用いてラットの足底に acetone（関東化学）を 50 µL 噴霧した．噴霧は左右の足底に対して交互に計 10 回実施し，総噴霧回数に対する逃避行動（跳ねる・舐める・噛む）の発生率を response rate（%）として算出した.

3.3　統計処理

測定結果はいずれも平均値 ± 標準誤差（means ± SEM）で表現した．群間の有意差は，Bartlett 法により分散の均一性を検定し，二元配置分散分析を経て Dunnett の多重比較検定を実施した．検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した.

4　DRG における TRPA1 タンパクの発現に及ぼす oxaliplatin の影響
-Western blot 法を用いた検討 –

4.1　実験材料及び試薬調製

4.1.1　実験材料

10 × Tris / Glycine / SDS buffer（BIO-RAD）
10% Ammonium persulfate（SIGMA-ALDRICH）
10% Sodium dodecyl sulfate（SDS：SIGMA-ALDRICH）
2-mercaptoethanol（SIGMA-ALDRICH）
Acrylamide（SIGMA-ALDRICH）
Albumin Bovine, Solution（2 mg/mL）for Protein Assay（BSA：ナカライテスク）
Anti-Mouse IgG (Fab specific)–Peroxidase antibody produced in goat（peroxidase labeled anti-mouse IgG antibody：A2304：SIGMA-ALDRICH）
Anti-TRPA1（extracellular）antibody（anti-TRPA1 antibody：ACC-037, Alomone Labs）
Bromophenol blue（SIGMA-ALDRICH）
Enhanced Chemiluminescence plus Western Blotting Detection Kit（Amersham）
Difco™ Skim milk（Becton Dickinson and company）
Ethylene diamine tetra acetic acid（EDTA：SIGMA-ALDRICH）
Glycine（SIGMA-ALDRICH）
Glycerol（SIGMA-ALDRICH）
Methanol（和光純薬工業）
Monoclonal Anti-β-Actin antibody produced in mouse（anti-β-actin antibody：A5441, SIGMA-ALDRICH）
Monoclonal Anti-Rabbit Immunoglobulins-Peroxidase antibody produced in mouse（peroxidase labeled anti - rabbit Ig antibody：A2074, SIGMA-ALDRICH）
N, N' - methylene bisacrylamide（SIGMA-ALDRICH）
N, N, N', N' - Tetramethylethylenediamine（TEMED：SIGMA-ALDRICH）
O , O' - Bis（2–aminoethyl）ethyleneglycol – N, N, N, N' - tetraacetic acid（EGTA：同仁化学研究所）
Pentobarbital（ソムノペンチル®：共立製薬）
Phosphatase Inhibitor Cocktail（ナカライテスク）

Polyoxyethylene（10）Octylphenyl Ether（Triton X-100：和光純薬工業）
Polyoxyethylene（20）Sorbitan Monolaurate Solution（Tween 20：関東化学）
Protease Inhibitor Cocktail（ナカライテスク）
Sodium chloride（和光純薬工業）
Sodium deoxycholate（SIGMA-ALDRICH）
Sodium dodecyl sulfate（SDS：SIGMA-ALDRICH）
Tris Buffered Saline with Tween®20 Tablets, pH 7.6（タカラバイオ）
Trizma® Base（SIGMA-ALDRICH）
Trizma® hydrochloride（SIGMA-ALDRICH）
Western BLoT Stripping Buffer（タカラバイオ）

4.1.2 Lysis buffer

各試薬の終濃度が 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100，0.5% sodium deoxycholate となるように精製水中に溶解し，4℃で保存した．

4.1.3 Acrylamide mix（Total % = 30, 30% T）

Acrylamide 73 g，N, N' - methylene bisacrylamide 2 g を精製水 250 mL で溶解した．

4.1.4 分離ゲル（7.5% Acrylamide gel）

精製水 4.85 mL，1.5 M Tris-HCl（pH 8.8）2.5 mL，10% SDS 100 µL, Acrylamide mix (30% T) 2.5 mL, 10% Ammonium persulfate 50 µL，TEMED 5 µL を混合し，調製した．

4.1.5 濃縮ゲル（4.0% Acrylamide gel）

精製水 3.0 mL，0.5 M Tris-HCl（pH 6.8）1.25 mL，10% SDS 50 µL, Acrylamide mix (30% T) 665 µL, 10% Ammonium persulfate 25 µL, TEMED 5 µL を混合し，調製した．

4.1.6 Sample buffer

0.5 M Tris-HCl（pH 6.8）1.0 mL，glycerol 0.8 mL，10% SDS 1.6 mL，2-mercaptoethanol 0.4 mL，1% bromophenol blue 0.4 mL を混合した．

4.1.7 泳動 buffer

Trizma® Base 9 g，Glycine 43.2 g，SDS 3 g を精製水 600 mL にて溶解した．SDS-PAGE 電気泳動を行う際は，これを 5 倍希釈して用いた．

4.1.8 転写 buffer

Trizma® Base 3.03 g，Glycine 14.4 g，methanol 200 mL を精製水 800 mL に溶解した.

4.1.9 Wash buffer

Tris Buffered Saline with Tween®20 Tablets（pH 7.6）を精製水 500 mL に溶解した.

4.1.10 5% skim milk

Difco™ Skim milk 0.5 g を，Wash buffer 10 mL に溶解した.

4.2 DRG からのタンパク抽出

Oxaliplatin 6 mg/kg の投与前（Day 0）ならびに腹腔内投与後 1, 2, 4 及び 7 日目（それぞれ Day 1, Day 2, Day 4 及び Day 7）に，動物を pentobarbital（50 mg/kg, i.p.）麻酔下で断頭放血致死させた．背部を切開後，椎骨を摘出して $L_{4\text{-}6}$ の DRG を採取し，実体顕微鏡下でピンセットと眼科剪刀を用いてトリミングを行い，余分な結合組織を除去した．この DRG に lysis buffer 200 µL を加えてホモジナイズし，15,000 × g，4℃，30 分間遠心分離して得た上清を試料とした．試料は実験に使用するまで -80℃ にて保存した.

4.3 タンパク質の定量

タンパク質の定量は，Bicinchoninic Acid（BCA）法を用いて行った．本章 4.2 項で調製した試料の 1 µL を分取し，0.01 M PBS にて 20 倍希釈した．また，標準物質には BSA を用い，0, 32.25, 62.5, 125, 250, 500 及び 1000 µg/mL の希釈系列を作製し，検量線とした．これらの溶液を，96 well plate（秋田住友ベーク）に 20 µL/well の容量で注入し，BCA™ Protein Assay Reagent A と BCA™ Protein Assay Reagent B を 50:1 で混合した溶液を各 well へ 200 µL ずつ分注した. 37℃, 30 分間インキュベートした後，波長 562 nm における吸光度を分光光度計（BIO-RAD Model 550）により測定し，試料中のタンパク質量を算出した．なお，測定は triplicate で実施した.

4.4 SDS -ポリアクリルアミドゲル（SDS - PAGE）電気泳動

分離ゲルをガラスプレート内に充填し，約 1 時間放置して分離ゲルが固化したことを確認後，濃縮ゲルを重層してさらに固化するまで放置した．試料をタンパク質量として 10 µg となるように分取し，等量の sample buffer を添加して混合し，試料混合液とした．Mini Trans Blot（BIO - RAD）に泳動 buffer を充填し，100℃, 5 分間加熱した試料混合液をゲルに充填して 200 V，約 30 分間電気泳動した.

4.5　Western Blot 法

本章 4.4 項で SDS-PAGE 電気泳動を行ったゲルを用いて，Western Blot 法を行った．Mini Trans Blot（BIO - RAD）に転写 buffer 充填し，ゲル上のタンパク質をポリビリニデンジフルオライド（PVDF）膜上に転写後，5% skim milk を用いて 1 時間ブロッキングした．PVDF 膜を wash buffer により洗浄後，一次抗体として anti-TRPA1 antibody（1：200）を 4℃にて終夜反応させた．Wash buffer にて 10 分間，3 回洗浄し，二次抗体として peroxidase labeled anti - rabbit Ig antibody（1：2000）を室温にて 60 分間反応させた．Wash buffer にて 10 分間，3 回洗浄後，Enhanced Chemiluminescence plus the TM Western Blotting Detection Kit 及び BIOMAX Light Film (Kodac) を用いてバンドを検出した. 検出したバンドは，MultiGage Ver.3 software（Fuji Film）にて数値化し，β-actin の発現量で補正後，Day 0 群を 100% とした相対値を算出した.

4.6　統計処理

測定結果はいずれも平均値 ± 標準誤差（means ± SEM）で表現した．群間の有意差は，Bartlett 法により分散の均一性を検定し，一元配置分散分析を経て Dunnett の多重比較検定を実施した．検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した.

5　DRG における TRPA1 mRNA の発現に及ぼす oxaliplatin の影響
- in situ hybri-dization histochemistry（ISHH）法を用いた検討 –

5.1　実験材料及び試薬調製

5.1.1　実験材料

2-propanol（和光純薬工業）
20 × SSC（和光純薬工業）
6 × loading dye（タカラバイオ）
Acetic acid（和光純薬工業）
Acetic anhydride（和光純薬工業）
Anti-Digoxigenin-Alkaline phosphatase （AP）, Fab fragments（11093274910, Roche）
Boric Acid（和光純薬工業）
Block ace（Bio-Rad）
Chloroform（和光純薬工業）
Diethylpyrocarbonate（DEPC）（和光純薬工業）
Digoxigenin（DIG）RNA Labeling Mix（Roche）
DIG Wash and Block Buffer Set（Roche）
Ethylene diamine tetra acetic acid（EDTA：SIGMA-ALDRICH）
Ethidium Bromide Solution（Invitrogen）
Formamide（和光純薬工業）
GenElute® Plasmid Miniprep Kit（SIGMA-ALDRICH）
Heparin（50 mg/mL, ノボノルディスクファーマ）
Magnesium chloride（SIGMA-ALDRICH）
Maleic acid（和光純薬工業）
Nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate（NBT / BCIP Stock Solution（Roche）
Normal goat serum（NGS：和光純薬工業）
Nylon Membrane（Roche）
Paraformaldehyde（和光純薬工業）
pGEM® - T Easy Vector Systems（Promega）
Pentobarbital（ソムノペンチル®：共立製薬）
Potassium phosphate monobasic（SIGMA-ALDRICH）
Ribonucleic acid from torula yeast（SIGMA-ALDRICH）
Riboprobe® in vitro Transcription Systems（Promega）

Saturated Phenol（和光純薬工業）
Sodium chloride（和光純薬工業）
Sodium citrate （和光純薬工業）
Sodium Hydroxide（和光純薬工業）
Sodium phosphate dibasic dodecahydrate（SIGMA-ALDRICH）
Sodium phosphate monobasic dihydrate（SIGMA-ALDRICH）
Sucrose（和光純薬工業）
TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver.1.1（タカラバイオ）
Triethanolamine（和光純薬工業）
TRI® Reagent（SIGMA-ALDRICH）
Trizma® Base（SIGMA-ALDRICH）
Trizma® hydrochloride（SIGMA-ALDRICH）
Tryptone（和光純薬工業）
Tween 20（SIGMA-ALDRICH）
UltraPure™ Agarose - 1000（Invitrogen）
X-Gal（タカラバイオ）
N,N-Dimethylformamide（DMFA：和光純薬工業）
Yeast Extract（和光純薬工業）
大腸菌株 JM109 competent cell（東洋紡）

TRPA1 に特異的な primer（Forward：5’- ccccactacattgggctgca -3’，Reverse：5’- ccgctgtccaggcacatctt -3’）は，SIGMA-ALDRICH ライフサイエンス事業部へ作製を依頼した．

5.1.2 Tris-Acetate-EDTA（TAE）緩衝液

50 倍濃縮 TAE 緩衝液（Tris base 48.4 g，酢酸 11.42 mL，0.5 M EDTA（pH 8.0）20 mL を溶解後，精製水にて全量 200 mL とし，121℃，20 分間高圧蒸気滅菌したもの）を用時，精製水にて 50 倍に希釈した．

5.1.3 Tris-EDTA（TE）緩衝液

1 M Tris-HCl（pH 8.0），0.5 M EDTA（pH 8.0）を精製水に溶解し，全量を 1000 mL とした．

5.1.4 LB 培地

Tryptone 10 g，Yeast extract 5 g，NaCl 10 g を約 950 mL の精製水に溶解し，pH 7.0 に調整後に全量を 1000 mL とした．121℃，20 分間高圧蒸気滅菌し，4℃にて保存した．

5.1.5 X-Gal 溶液

X-Gal 粉末 5 mg を DMFA 200 µL にて溶解し，最終濃度を 25 mg/mL とした．

5.1.6 10 倍濃縮 Tris-Borate-EDTA（TBE）緩衝液

Trizma® Base 121.1 g（1 M），Boric acid 51.3 g（0.83 M），EDTA 3.72 g（10 mM）を精製水にて溶解し，全量 1000 mL とした後，121℃，20 分間高圧蒸気滅菌した．

5.1.7 DEPC treated water

DEPC 500 µL を 500 mL の精製水に加えて振とうし，蓋を緩め室温で 1 時間静置後，121℃，15 分間高圧蒸気滅菌した．

5.1.8 RNA dilution buffer

DEPC treated water : 20 × SSC : formamide を 5 : 3 : 2 の割合で混和した．

5.1.9 10 倍濃縮リン酸緩衝液（PB）

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.96 g，$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ 29 g を精製水に溶解した．pH 7.4 に調整し，精製水を加えて全量 1000 mL とした後，121℃，15 分間高圧蒸気滅菌した．

5.1.10 0.01 M リン酸緩衝生理食塩液（PBS）

10 倍濃縮 PB に精製水を加えて希釈し，NaCl 8.0 g を添加した．pH 7.4 に調整し，精製水を加えて全量 1000 mL とした後，121℃，15 分間高圧蒸気滅菌した．

5.1.11 0.1% Tween 20 添加 PBS（PBT）

PBS 1000 mL に対して Tween 20 を 1 mL 添加し，溶解した．

5.1.12 4% paraformaldehyde（4% PFA）

PB 500 mL に PFA 20 g を加え，60℃に加温して溶解させた後，孔径 0.22 µm のメンブランフィルターを用いてろ過した．

5.1.13 4% PFA / PBS

PBS 250 mL に PFA 10 g を加え，60℃に加温して溶解させた後，孔径 0.22 µm のメンブランフィルターを用いてろ過した．

5.1.14 15% 及び 30% sucrose / PBS 溶液

15 g 及び 30 g の sucrose を PBS 100 mL に溶解させた後，孔径 0.22 µm のメンブランフィルターを用いてろ過した．

5.1.15 20 × SSC

NaCl 87.7 g，クエン酸ナトリウム 44.1 g を精製水に溶解した．pH 7.0 に調整した後に全量 500 mL とし，121℃，15 分間高圧蒸気滅菌した．

5.1.16 マレイン酸緩衝液

Maleic acid 5.8 g，NaCl 4.4 g を精製水に溶解した．pH 7.5 に調整した後に全量 500 mL とし，121℃，15 分間高圧蒸気滅菌した．

5.1.17 ブロッキング液

Block ace：NGS = 9：1 の割合で混合した．

5.1.18 抗体希釈液

Block ace：NGS：PBS = 1：1：8 の割合で混合した．

5.1.19 Tween 20-Tris buffered saline（TTBS）

5 M NaCl 100 mL，1 M Tris-HCl（pH 8.0）20 mL を精製水で希釈し，990 mL とした．これを 121℃，15 分間高圧蒸気滅菌した後，10% Tween 20 を 10 mL 加えた．

5.1.20 NaCl-Tris（NT）溶液

1 M Tris-HCl（pH 7.5）100 mL，5 M NaCl 30 mL を精製水で希釈し，全量 1000 mL とした．これを 121℃，15 分間高圧蒸気滅菌した．

5.1.21 アセチル化溶液

100 mM Triethanolamine 50 mL を，acetic anhydride により pH 8.0 とした．

5.1.22 hybridize 緩衝液

Formamide 12.5 mL，20 × SSC 12.5 mL，Heparin 0.5 mL，Ribonucleic acid from torula yeast（10 mg/mL）1 mL を混合し，DEPC treated water で全量 50 mL とした．

5.1.23 NaCl-Tris-$MgCl_2$（NTM）緩衝液

5 M NaCl 0.1 mL，1 M Tris - HCl（pH 9.5）0.5 mL，1 M $MgCl_2$ 0.25 mL を混合し，DEPC treated water で全量 5 mL とした．

5.2 TRPA1 antisense probe の作製

5.2.1 Total RNA の抽出

本章 4.2 DRG からのタンパク抽出の項に準じて，oxaliplatin 6 mg/kg を投与した動物から Day 2 における $L_{4\text{-}6}$ の DRG を採取した．この DRG を TRI® reagent 1 mL とともにホモジナイズし，5 分間室温放置した後，Chloroform 200 μL を加えて 2 分間室温放置した．12,000 ×g，4℃，15 分間遠心分離した後，上層に 2-propanol 500 μL を加えて 10 分間室温放置し，さらに 12,000 ×g，4℃，8 分間遠心分離した．上清を除去し，沈渣に 75% ethanol 1 mL を加えて混和後，7,500 ×g，4℃，5 分間遠心分離した．上清を除去して沈渣を風乾後，RNase Free dH_2O 50 μL にて溶解し，total RNA sample とした．

Total RNA sample の波長 260 nm における吸光度を　分光光度計（Pharmacia Biotech, Ultroapec® 3000）を用いて測定し，RNA 濃度を算出した．

5.2.2 Reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）

RT-PCR は RNA LA PCR™ Kit（AMV）Ver.1.1（タカラバイオ）を用いて行った．$MgCl_2$ 2 μL，10 × RNA PCR Buffer 1 μL，RNase Free dH_2O 4.25 μL，dNTP mixture 1 μL，RNase Inhibitor 0.25 μL，AMV Reverse Transcriptase 0.5 μL R-Primer 0.5 μL 及び total RNA sample 0.5 μL を混合し，全量 10 μL とした．この溶液を 42℃で 30 分間インキュベートした後，99℃，5 分間加熱し，5℃で反応を停止した．

5.2.3 PCR の実施

5.2.2 で得られた反応溶液に，$MgCl_2$ 3 μL，10 × LA PCR Buffer II 4 μL，F-primer（2 pmol / L）5 μL，LA Taq 0.25 μL を混合し，精製水にて全量 50 μL とした後，以下の反応条件で PCR を行い，反応液を得た．

94℃・2 分 / 1 Cycle

94℃・30 秒，60℃・30 秒，72℃・1 分 / 28 Cycle

5.2.4 TRPA1 目的断片の回収

5.2.3 で得られた PCR 反応溶液 20 μL と 6 × loading dye 4 μL を，0.7% UltraPure™ Agarose-1000 溶液に 100 V，1 時間電気泳動後，波長 322 nm の紫外線照射下，目的の TRPA1 断片のバンドを DNA 回収用フィルター付き遠心チューブ（SUPERC™-01，タカラバイオ）にて回収した．回収したゲルをチューブ内にてメスで細切し，-80℃で 20 分間放置後，37℃ にて 5 分間インキュベートした．その後，5,000 ×g，4℃ で 10 分間遠心分離して溶液を回収し，TE buffer を加えて全量を 200 μL とした．エタノール沈殿を行い，目的断片を精製し，TE buffer で溶解し，TRPA1 cDNA 溶液とした．

5.2.5 TRPA1 cDNA の pGEM® - T Easy Vector への導入

5.2.4 で得られた TRPA1 cDNA 溶液 9 μL に pGEM® -T Easy Vector 溶液 1 μL を添加し，45℃・10 分，25℃・1～2 分間反応させた．Ligation Kit Solution I を 10 μL 添加して 15℃，30 分間以上反応後，大腸菌株 JM109 competent cell を用いて形質転換を行った．菌液を LB 培地 plate（50 μg/mL ampicilin，50 μg/mL X - Gal，0.2 mM IPTG 含有）上に塗布し，37℃で 15～20 時間培養した．

得られたコロニーを LB 培地（50 μg/mL ampicilin 含有）を用いて，目的断片の挿入を確認した．すなわち，菌液 2 μL を精製水 100 μL と混和し，100℃で 3 分間加熱した．遠心後，再び 100℃で 3 分間加熱し，室温にて 6,000 ×g，3 分間遠心分離した．上清 2 μL に 25 mM MgCl2 5 μL，10 × PCR Buffer

5 µL，dNTP mix 4 µL，F - primer（2 pmol / µL）5 µL，R - primer（2 pmol/µL）5 µL，精製水 23.8 µL 及び LA Taq 0.2 µL を添加し，PCR を実施した．

その後，1% UltraPure™ Agarose-1000 溶液にて 100 V，1 時間電気泳動し，TRPA1 cDNA 断片を波長 322 nm の紫外線照射下，目的断片のバンドを確認した．

5.2.6 挿入断片の塩基配列確認

5.2.5 にて培養した菌液は 12,000 ×g，室温で 5 分間遠心分離した後に上清を除去し，沈渣の菌体を使用時まで -20℃で保存した．組み換え plasmid の調製には，GenElute® Plasmid Miniprep Kit を用いた．調製した plasmid の目的断片塩基配列は自動シーケンサー（A.L.F.red DNA sequencer）にて決定し，Jordt らにより登録されたラット TRPA1 mRNA 配列情報（AY496961）[20]と照会し，配列が完全に一致することを確認した．Plasmid の大量調製には，QIA filter™ Midi Kit（QIAGEN）を使用した．

5.2.7 DIG ラベル化プローブの調製

DIG ラベル化には DIG Labeling Mix，Riboprobe in vitro Transcription System を用いた．TRPA1 遺伝子断片は pGEM® - T Easy vector の T7 プロモーター領域側に 5' 末端，Sp6 プロモーター領域側に 3' 末端が組み込まれたことから，antisense probe 作製時には T7 領域を制限酵素 NcoI により消化後，Sp6 polymerase 1 を用いて 37℃，3 時間反応させた．一方，sense probe 作製時には Sp6 領域を制限酵素 SalI により消化後，T4 polymerase 1 を用いて 37℃，3 時間反応させた．いずれも反応後に DNase 1 µL を添加し，さらに 37℃で 3 時間反応させた．エタノール沈殿後，TE buffer（RNase free）20 µL に溶解し，Quick Spin Columns により未反応の DIG を除去した．得られた DIG ラベル化プローブならびに DIG - labeled control RNA を Nylon Membrane にスポットし，anti-Digoxigenin-AP と反応後，NBT / BCIP 発色基質を用いた化学発色させた．スポットのシグナル強度とコントロールを比較し，DIG ラベル化された RNA 量を算出した．

5.3 DRG 凍結ブロックの作製

Oxaliplatin 6 mg/kg あるいは 5% glucose 溶液の投与前（Day 0）ならびに腹腔内投与後 1, 2, 4 及び 7 日目（それぞれ Day 1, Day 2, Day 4 及び Day 7）に，動物を pentobarbital（50 mg/kg, i.p.）により深麻酔した．動物を背位に固定し，胸部及び腹部を正中切開した後，心臓及び下大静脈を露出した．心尖部から左心室に針を挿入して，生理食塩水 100 mL による灌流を行った後，直ちに 4% PFA 100 mL で灌流固定を行った．背部を切開後，椎骨を摘出して $L_{4\text{-}6}$ の DRG を採取し，実体

顕微鏡下でピンセットと眼科剪刀を用いてトリミングを行い，余分な結合組織を除去した．採取した DRG は 30% sucrose / PBS 溶液に浸漬し，4℃で沈むまで静置した後，15% sucrose / PBS 溶液に入れ替えて 4℃，終夜放置した．DRG は包埋剤（O.C.T　Compound，サクラファインテック）中で 4℃，1 時間放置後，包埋皿（Tissue-Tek 3 号，サクラファインテック）を用いて包埋し，液体窒素にて凍結して試料とした．試料は使用まで -80℃にて保存した．

5.4　in situ hybridization

試料からクライオスタットを用いて 10 μm の薄切切片を作製し，MAS コーティングスライドガラス（松浪硝子工業）に貼り付け，37℃で終夜風乾した．その後，室温下で PBS を用いて 15 分間 ×2 回，5 分間 ×1 回洗浄後，4% PFA / PBS 溶液中に室温で 10 分間浸漬し，組織を固定した．PBS にて 5 分間，3 回洗浄後，proteinase K / PBS 溶液（1 μg/mL）に 10 分間，glycine / PBS 溶液（2 mg/mL）に 3 分間，PBS に 5 分間，いずれも室温でインキュベートした．その後，再び 4% PFA / PBS 溶液中に室温で 10 分間浸漬して組織を固定し，PBS にて 5 分間，3 回洗浄した．さらに室温下でアセチル化溶液に 20 分間，4 × SSC に 10 分間浸漬する操作を 2 回行った．Hybridize 緩衝液中で，55℃，60 分間プレハイブリダイゼーションを施行後，probe（0.5 μg/μL）を含有する Hybridize 緩衝液をスライドガラス 1 枚につき 50 μL 滴下し，スライドグラスにパラフィルムを重ねた．スライドグラスは 2 × SSC を含む 50% formamide（formamide : 4 × SSC = 1 : 1）の溶液で湿らせたキムタオルを敷いた湿箱に入れ，55℃，16 時間ハイブリダイゼーションを行った．その後，4 × SSC 中にスライドガラスを入れてパラフィルムを除去し，2 × SSC / formamide 溶液中で 55℃，60 分間インキュベートした．さらに 2×SSC 中で 30 分間，2 回インキュベート後，切片周辺の水分を除去し，切片をパップペンで囲った．スライドグラスに適量のブロッキング液を滴下し，NT 溶液で湿らせたキムタオルを敷いた湿箱中で，室温下 30 分間インキュベートした．ブロッキング液を除去し，抗体反応液（anti - DIG AP conjugate : ブロッキング液=1 : 5,000）を滴下し，室温下 2 時間インキュベートした．インキュベート終了後，TTBS にスライドガラスを室温で 10 分間浸し，PBS にて 3 回洗浄後，NTM 溶液を滴下して 15 分間静置した．発色溶液（NBT / BCIP）を滴下し，遮光条件下で発色反応を行った．発色反応は，TE 緩衝液中で室温下 5 分間，続いて PBS 中で室温下 5 分間洗浄することにより停止した．Aqua / Poly Mount（Polysciense）を用いて封入後，冷蔵庫で終夜静置し，乾燥させた．観察には正立顕微鏡（BX-60，Olympus）で 10，40 倍の対物レンズ，10 倍の接眼レンズ用いた．撮影には全自動顕微鏡撮影装置（PM-30，Olympus）を用いた．

5.5　データ解析・統計処理

現像写真より，DRG における個々の神経細胞について染色性の有無を指標として計数し，DRG 細胞全体に対する染色陽性細胞の割合を算出した．統計処理は F 検定により分散の均一性を検定し，等分散の場合には Student の t 検定を，不等分散の場合には Aspin-Welch の t 検定を実施した．なお，有意差検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判断した．

6　DRG における TRPA1 発現細胞数に及ぼす oxaliplatin の影響
- 蛍光免疫染色法による検討 –

6.1　実験材料と試薬調製

6.1.1　実験材料

Rabbit IgG-heavy and light chain cross-adsorbed Antibody（anti - rabbit IgG antibody Cy5 conjugate：A120-201C5, Bethyl Laboratories）

Anti-TRPA1（extracellular）antibody（anti-TRPA1 antibody：ACC-037, Alomone Labs）

Isolectin B_4（Bandeiraea simplicifolia）(fluorescein isothiocyanate（FITC）conjugate)（IB_4 - FITC：ALX-650-001F-MC05, Enzo Life Science）

Scrose（和光純薬工業）

6.1.2　25% sucrose / PBS 溶液

25g の sucrose を PBS 100 mL に溶解させた後，孔径 0.22 µm のメンブランフィルターを用いてろ過した.

6.2　DRG 凍結ブロックの作製

Oxaliplatin 6 mg/kg あるいは 5% glucose 溶液の投与後 2 日目（Day 2）に，動物を pentobarbital（50 mg/kg, i.p.）により深麻酔した．本章 5.3 DRG 凍結ブロックの作製の項に準じて DRG を採取し，25% sucrose / PBS 溶液に終夜浸漬した後，常法に従って DRG を包埋し，試料とした．試料は使用まで -80℃にて保存した.

6.3　蛍光標識抗体を用いた免疫組織化学的染色

試料からクライオスタットを用いて厚さ 10 µm の薄切切片を作製し，MAS コーティングスライドガラス（松浪硝子工業）に貼り付け，室温にて終夜乾燥させた．スライドグラスを PBT（5.1.11 参照）に室温下 15 分間，2 回浸漬後，PBS（5.1.10 参照）で 5 分間洗浄した．4% PFA / PBS 溶液（5.1.13 参照）にて室温下 10 分間浸漬して組織を固定した後，PBS にて 5 分間，3 回洗浄した．スライドガラスから組織周辺の水分を除去した後に湿箱へ移し，ブロッキング液（5.1.17 参照）を滴下して，室温で 60 分間インキュベートした．ブロッキング液を除去し，PBS にて 10 分間，3 回洗浄後，一次抗体である anti - TRP antibody：抗体希釈液　(5.1.18 参照）= 1：200 を滴下し，4℃で終夜インキュベートした．PBS にて 10 分間，3 回洗浄後，二次抗体（Anti - rabbit IgG antibody Cy5 conjugate：抗体希釈液= 1：100）をスライドグラスに滴下し，室温にて 1 時間インキュベートした．PBS にて 10 分

間，3 回洗浄後，IB4 - FITC 溶液（IB4 - FITC : 抗体希釈液 ＝1 : 100）を滴下し，遮光条件下, 4℃, 4 時間インキュベートした. 切片周辺の水分を除去し, Aqua / Poly Mount（Polysciense）を用いて封入した.

6.4　鏡検の実施

共焦点レーザー蛍光顕微鏡（FLUOVIEWFV 300，Olympus）を用い，FITC は励起波長 488 nm，蛍光波長 530 nm で緑色，Cy5 は励起波長 649 nm，蛍光波長 670 nm で赤色に発光させて観察した．観察時は 10，40 倍の対物レンズ，10 倍の接眼レンズを用いた.

6.5　データ解析・統計処理

個々の IB_4 陽性細胞につき，その面積の 50% 以上が TRPA1 抗体によって染色されているものを共染色と判定し，IB_4 陽性細胞における共染色細胞数の割合を算出した.

統計処理は F 検定により分散の均一性を検定し，等分散の場合には Student の t 検定を，不等分散の場合には Aspin-Welch の t 検定を実施した．なお，有意差検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した.

7　TRPA1 ノックダウンが oxaliplatin 誘発冷感刺激過敏反応に及ぼす影響

7.1　実験材料及び試薬調製

7.1.1　実験材料

ALZET® MINI - OSMOTIC PUMP MODEL 2001（室町機械）
Calcium Chloride（和光純薬工業）
Magnesium Chloride（和光純薬工業）
Potassium chloride（和光純薬工業）
Potassium phosphate monobasic　（SIGMA-ALDRICH）
Sodium chloride（和光純薬工業）
Sodium Hydrogen Carbonate（和光純薬工業）
Sodium phosphate dibasic（SIGMA-ALDRICH）
Soft tube（Silascon, Kaneka Medix Company, Osaka, Japan ; outer diameter, 0.64 mm）

TRPA1 antisense（以下，AS : TCTATGCGGTTATGTTGG ），missense（以下，MS : ACTACTACACTAGACTAC ） は，インビトロジェンカスタムプライマー受注チームへ作製を依頼した.

7.1.2　脳・脊髄液（perfusion buffer）

0.14198 g/mL Na_2HPO_4 溶液及び 0.13609 g/mL KH_2PO_4 溶液を 80 : 20 の割合で混和し，pH 7.4 に調整した（1 mM リン酸緩衝液）. 1 mM リン酸緩衝液中に, 終濃度として 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.3 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 23 mM $NaHCO_3$ となるように各試薬を溶解し，孔径 0.22 μm のメンブランフィルターを用いてろ過したものを perfusion buffer とした.

7.1.3　TRPA1 AS，MS 溶液

AS，MS を RNase free dH_2O（5.1.8 参照）により溶解し，それぞれ 10 nmol/μL とした．それらの各 10 μL を perfusion buffer 190 μL と混和し，0.5 nmol/μL の AS，MS 溶液とした.

7.2　TRPA1 ノックダウンモデルの作製

動物を pentobarbital（50mg/kg, i.p.）麻酔下で脳定位固定装置に固定後，後頭部の皮膚を 1.5 cm 程度切開した．環椎後頭部を 5 mm 切開し，脳脊髄液の湧出を確認した後，腹部を持ち上げながら，クモ膜下腔より soft tube を先端が L_4 に達するまで挿入した．ALZET® MINI - OSMOTIC PUMP MODEL 2001（投与

容量：1.0 µL/h，投与期間：1 week）へ AS，MS 溶液を 200 µL 充填し，挿入したカテーテルと結合させ，皮下に埋め込んだ．Soft tube の皮膚側終末部位は生体用アロンアルファ®で固定し，切開部分を縫合した．なお，AS 投与動物を TRPA1 ノックダウンモデルとし，MS 投与動物を対照群とした．

7.3　TRPA1 ノックダウンによる TRPA1 タンパク発現量の低下の確認

TRPA1 AS あるいは MS を 3 日間持続投与後，本章 4 DRG における TRPA1 タンパクの発現に及ぼす oxaliplatin の影響の項に準じて oxaliplatin 投与後 2 日目の DRG を採取し，Western Blot 法にて TRPA1 タンパクの発現量を測定した．発現量は，5% glucose 投与群における発現量を 100% とした相対値を算出した．

本項実験に用いた動物は以下の処置をした（Fig.5 参照）．

- 5% glucose 投与群：Osmotic pump による perfusion buffer の持続投与 + 持続投与 3 日目に 5% glucose を腹腔内単回投与
- AS 投与群：Osmotic pump による AS 溶液持続投与 + 持続投与 3 日目に oxaliplatin 6mg/kg を腹腔内単回投与
- MS 投与群：Osmotic pump による MS 溶液持続投与 + 持続投与 3 日目に oxaliplatin 6mg/kg を腹腔内単回投与

7.4　Oxaliplatin 誘発冷感刺激過敏反応に及ぼす TRPA1 ノックダウンの影響

TRPA1 AS により TRPA1 をノックダウンした動物を用い，本章 3 冷感刺激誘発による逃避反応へ及ぼす oxaliplatin の影響の項に準じて，acetone spray test を実施した．TRPA1 AS あるいは MS を 3 日間持続投与後，oxaliplatin 6 mg/kg を単回腹腔内投与し，oxaliplatin 投与前（Day 0）及び投与後 1, 2, 4, 7 日目（それぞれ Day 1，Day 2，Day 4，Day 7）に観察を実施した．

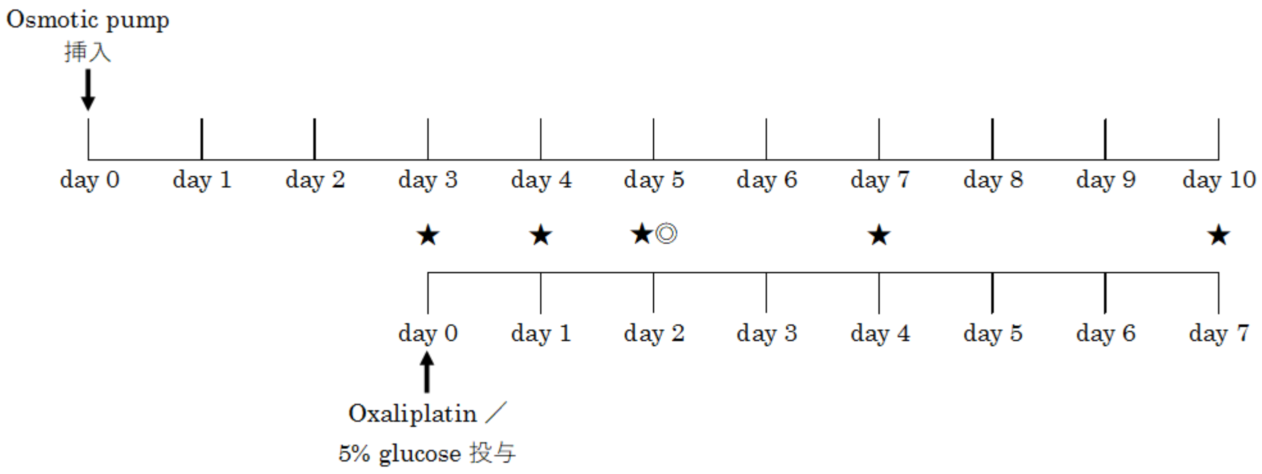
本項実験に用いた動物は以下の処置をした（Fig.5 参照）．

- AS 投与群：Osmotic pump による AS 溶液持続投与 + 持続投与 3 日目に oxaliplatin 6mg/kg を腹腔内単回投与
- MS 投与群：Osmotic pump による MS 溶液持続投与 + 持続投与 3 日目に oxaliplatin 6mg/kg を腹腔内単回投与

7.5　統計処理

測定結果はいずれも平均値 ± 標準誤差（mean ± SEM.）で示した．F 検定により分散の均一性を検定し，等分散の場合には Student の t 検定を，不等分散の

場合には Aspin-Welch の t 検定を実施した．なお，有意差定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判断した．



★…Acetone spray test，◎…Western Blot

Fig.5　実験 time course

8 Oxaliplatin が DRG における TRPA1 と p38 MAPK の共発現に及ぼす影響と p38 MAPK 阻害剤が oxaliplatin 誘発冷感刺激過敏に及ぼす影響

8.1 実験材料及び試薬調製

8.1.1 実験材料

Anti - Digoxigenin - Fluorescein，Fab fragments（11207741910，Roche）

Anti - Rabbit IgG （H+L）, F(ab')2 Fragment（Alexa Fluor® 594 Conjugate, R37117，Thermo Fisher Scientific）

Phospho - p38 MAPK （Thr180／Tyr182）（3D7） Rabbit mAb（#9215S, Cell Signaling Technology）

SB203580 （A.G.Scientific）：p38 MAPK 阻害剤

8.1.2 SB203580 溶液の調製

p38 MAPK 阻害剤である SB203580 5mg を 20% DMSO 10mL に溶解し，500 μg/mL とした．

8.2 DRG 凍結ブロックの作製

Oxaliplatin 6 mg/kg あるいは 5% glucose 溶液の投与後 2 日目（Day 2）に，動物を pentobarbital（50 mg/kg, i.p.）により深麻酔した．本章 5.3 DRG 凍結ブロックの作製の項に準じて DRG を採取し，25% sucrose / PBS 溶液に終夜浸漬した後，常法に従って DRG を包埋し，試料とした．試料は使用まで -80℃にて保存した．

8.3 ISHH と蛍光免疫染色法を用いた TRPA1 とリン酸化により活性化した p38（phosphorylated protein 38：p-p 38）MAPK の共染色

試料からクライオスタットを用いて 10 μm の薄切切片を作製し，MAS コーティングスライドガラス（松浪硝子工業）に貼り付け，37℃で終夜風乾した．その後，本章 5.4 in situ hybridazation の項に準じて処理をした．その際，抗体反応液には anti-DIG-fluorescein, Fab fragments [200 μg/mL]：ブロッキング buffer=1：50 を用い，添加後，室温で 5～6 時間反応させた．その後，一次抗体である Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)(3D7) Rabbit mAb：抗体希釈液 （5.1.18 参照）＝1：50 を滴下し，4℃で終夜インキュベートした．PBS にて 10 分間，3 回洗浄後，二次抗体（Anti - Rabbit IgG （H+L），F(ab')2 Fragment（Alexa Fluor® 594 Conjugate：抗体希釈液= 1：100）をスライドグラスに滴下し，室温にて 1 時間インキュベートした．PBS にて 10 分間，3 回洗浄後，切片周辺の水分を除去し，Aqua / Poly Mount（Polysciense）を用いて封入した．

8.4　p38 MAPK 阻害剤の持続投与

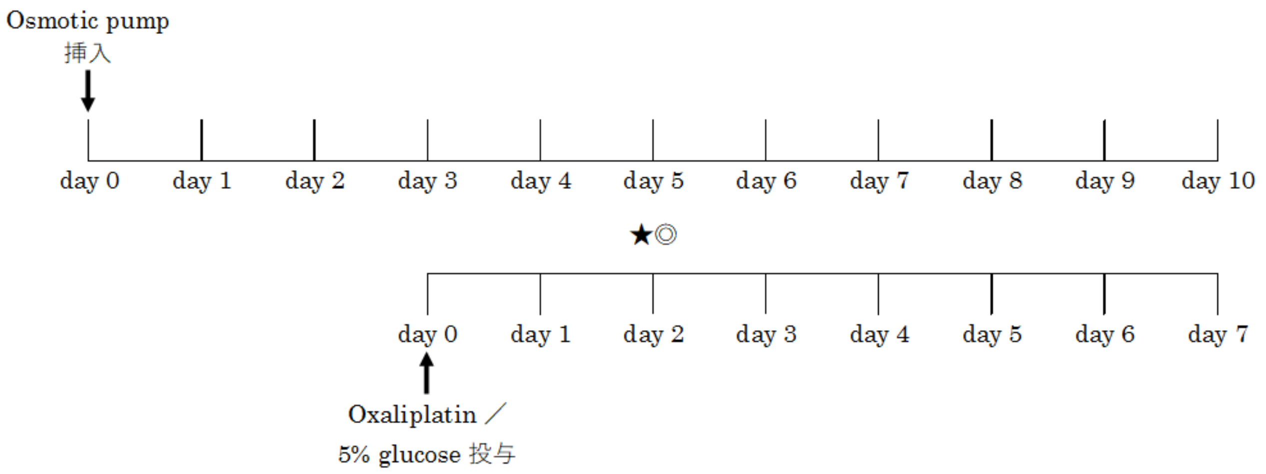
動物を pentobarbital（50mg/kg, i.p.）麻酔下で脳定位固定装置に固定後，後頭部の皮膚を 1.5 cm 程度切開した．環椎後頭部を 5 mm 切開し，脳脊髄液の湧出を確認した後，腹部を持ち上げながら，クモ膜下腔より soft tube を先端が L_4 に達するまで挿入した．ALZET® MINI - OSMOTIC PUMP MODEL 2001（投与容量：1.0 μL/h，投与期間：1 week）へ SB203580 溶液を 200 μL 充填し，挿入したカテーテルと結合させ，皮下に埋め込んだ．Soft tube の皮膚側終末部位は生体用アロンアルファ®で固定し，切開部分を縫合した．

8.5　Oxaliplatin 誘発冷感刺激過敏反応に及ぼす p38 MAPK 阻害の影響

p38 MAPK 阻害剤を持続投与した動物を用い，本章 3 冷感刺激誘発による逃避反応へ及ぼす oxaliplatin の影響の項に準じて，acetone spray test を実施した．SB203580 を 3 日間持続投与後，oxaliplatin 6 mg/kg を単回腹腔内投与し，oxaliplatin 投与後 2 日目（Day 2）に観察を実施した．

本項実験に用いた動物は以下の処置をした（Fig.6 参照）．

- DMSO 投与群：Osmotic pump による 20% DMSO 持続投与
- DMSO + 5% glucose 投与群：Osmotic pump による 20% DMSO 持続投与 ＋ 持続投与 3 日目に 5% glucose を腹腔内単回投与
- DMSO + Oxaliplatin 投与群：Osmotic pump による 20% DMSO 持続投与 ＋ 持続投与 3 日目に oxaliplatin 6mg/kg を腹腔内単回投与
- SB203580 ＋ Oxaliplatin 投与群：Osmotic pump による SB203580 溶液持続投与 ＋ 持続投与 3 日目に oxaliplatin 6mg/kg を腹腔内単回投与



★…Acetone spray test，◎…in situ hybridazation

Fig.6　実験 time course

8.6　データ解析・統計処理

個々の p-p38 MAPK 陽性細胞につき，その面積の 50% 以上が TRPA1 mRNA とも染色されているものを共染色と判定し，p-p38 MAPK 陽性細胞における共染色細胞数の割合を算出した．　また，TRPA1 発現細胞の面積を測定し，面積 200 μm^2 ごとの発現細胞を計数した．

蛍光免疫染色法を用いた検討における統計処理は F 検定により分散の均一性を検定し，等分散の場合には Student の t 検定を，不等分散の場合には Aspin-Welch の t 検定を実施した．なお，有意差検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した．

Acetone spray test における測定結果はいずれも平均値 ± 標準誤差（means ± SEM）で表現した．群間の有意差は，Bartlett 法により分散の均一性を検定し，一元配置分散分析を経て Dunnett の多重比較検定を実施した．検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した．

結　果

1　冷感刺激誘発による逃避反応へ及ぼす oxaliplatin の影響

対照群である 5% glucose 投与群では，acetone による冷感刺激に対する逃避行動出現率は，Day 0 から Day 7 までそれぞれ 15.0 ± 5.0%，10.0 ± 5.8%，20.0 ± 0.0%，15.0 ± 5.0%，20.0 ± 8.2%，15.0 ± 5.0%，15.0 ± 5.0% 及び 20.0 ± 8.2% であり，観察期間を通じて大きな変化はみられなかった．また，oxaliplatin 1 mg/kg 投与群では，Day 0 からそれぞれ 25.0 ± 5.0%，15.0 ± 9.6%，25.0 ± 9.6%，20.0 ± 0.0%，20.0 ± 11.5%，20.0 ± 8.2%，10.0 ± 5.8% 及び 15.0 ± 5.0% であり，対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった．Oxaliplatin 3 mg/kg 投与群では，Day 0 から 25.0 ± 9.6%，20.0 ± 8.2%，25.0 ± 5.0%，35.0 ± 5.0%，35.0 ± 15.0%，40.0 ± 8.2%，45.0 ± 5.0% 及び 40.0 ± 0.0% となり，Day 3，5，6，7 において有意な逃避反応率の増加がみられた．さらに Oxaliplatin 6 mg/kg 投与群では，Day 0 から 20.0 ± 0.0%，25.0 ± 5.0%，55.0 ± 5.0%，50.0 ± 5.0%，45.0 ± 5.0%，60.0 ± 0.0%，　55.0 ± 5.0 % と反応率の増加が観察され, Day 1 から Day 7 までのすべての逃避反応率が統計学的に有意であった（Fig.7）.

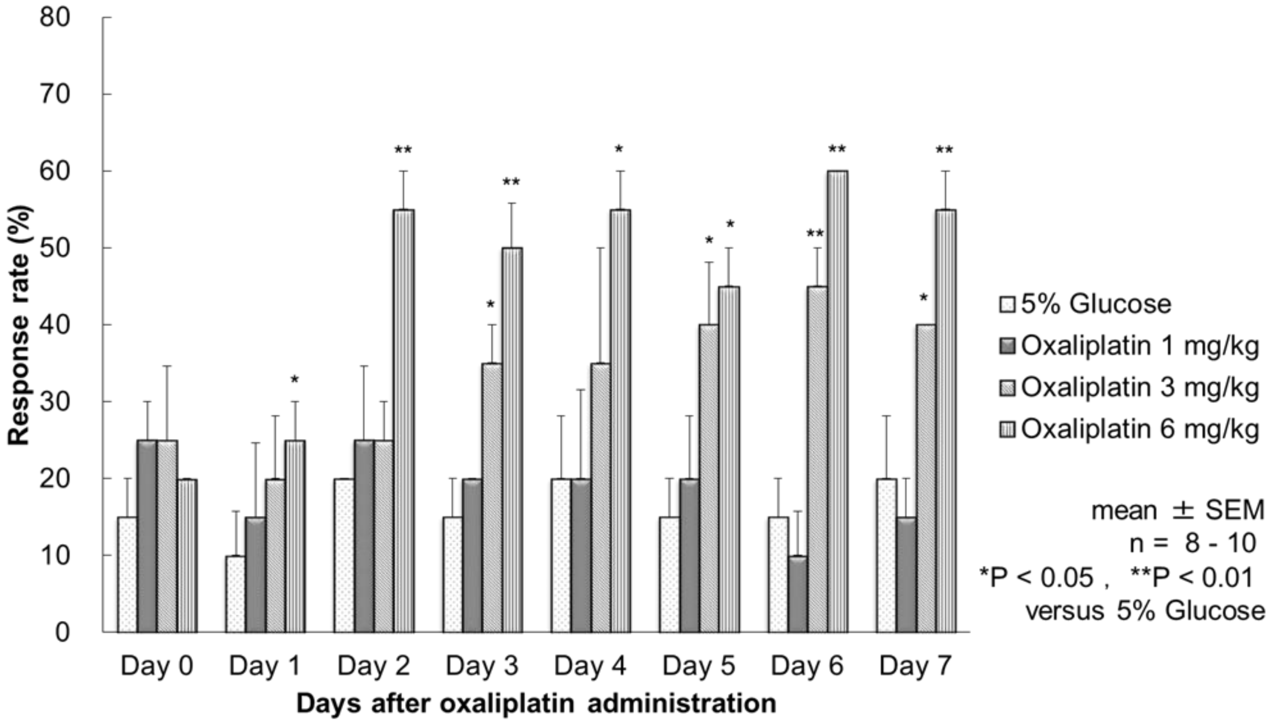


Fig.7　冷感刺激誘発逃避行動に及ぼす Oxaliplatin の影響

2　DRG における TRPA1 タンパクの発現に及ぼす oxaliplatin の影響 - Western blot 法を用いた検討 –

TRPA1 タンパクは，投与前（Day 0：100.0 ± 5.8%）と比較して，oxaliplatin 6 mg/kg の投与により Day 2（116.1 ± 10.7%），Day 4（123.9 ± 13.3%），Day 7（114.0 ± 10.0%）において有意な発現量の増加が観察された．しかし，Day 1（107.1 ± 6.3%）における発現量の増加は明確ではなく，統計学的な有意差はみられなかった（Fig.8）.

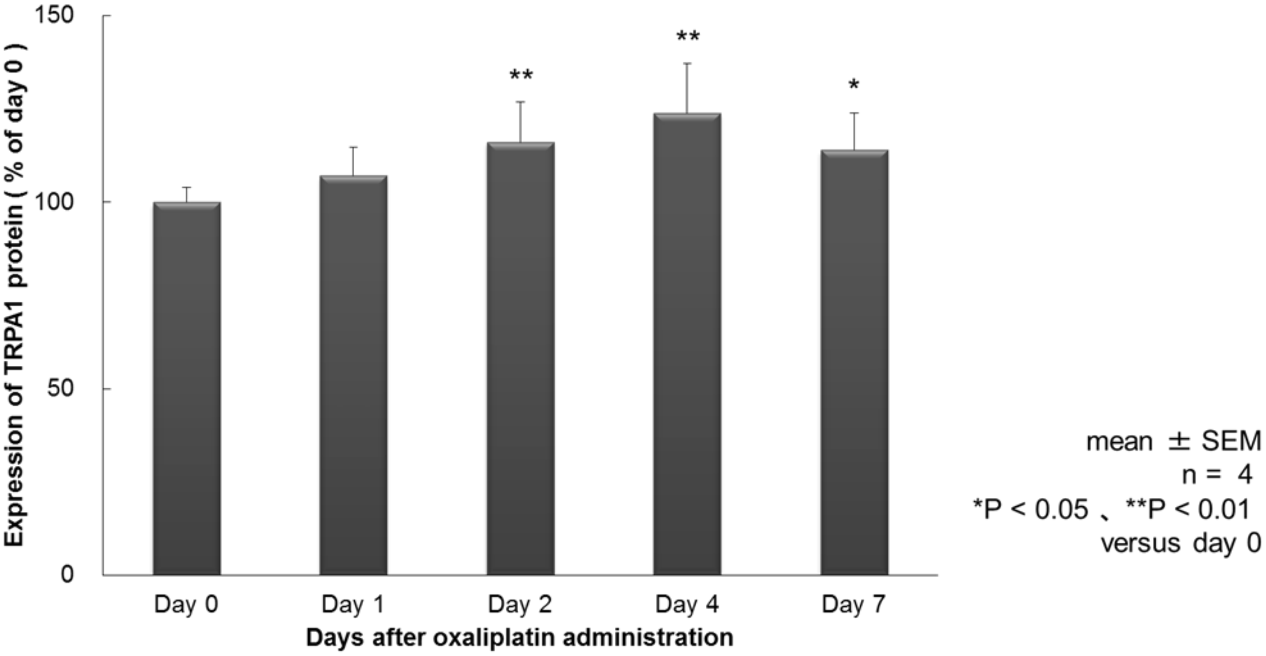


Fig.8　ラット DRG における TRPA1 タンパク発現量に及ぼす oxaliplatin の影響

3　DRG における TRPA1 mRNA の発現に及ぼす oxaliplatin の影響 ‐ ISHH 法を用いた検討 –

DRG はその断面積の大きさにて小型細胞（≦600 μm²），中型細胞（601‐1200 μm²），大型細胞（＞1200 μm²）と定義されている[11]．また，一次求心性神経のうち，温痛覚の伝導に関与する侵害受容性線維として Aδ 及び C 線維が知られており, 各線維の細胞体として DRG 小型細胞（C 線維）・中型細胞（Aδ 線維）存在している[11]．

Oxaliplatin 投与後 2 日目の DRG 細胞における TRPA1 mRNA の発現分布について検討したところ，5% glucose 投与群では，TRPA1 mRNA 陽性細胞の 68.8% が小型細胞であった．Oxaliplatin 投与群では，TRPA1 mRNA 陽性細胞全体の 75.9% が小型細胞であり，その発現数及び DRG 全細胞数に対する占有率は増加した（Fig.9）．

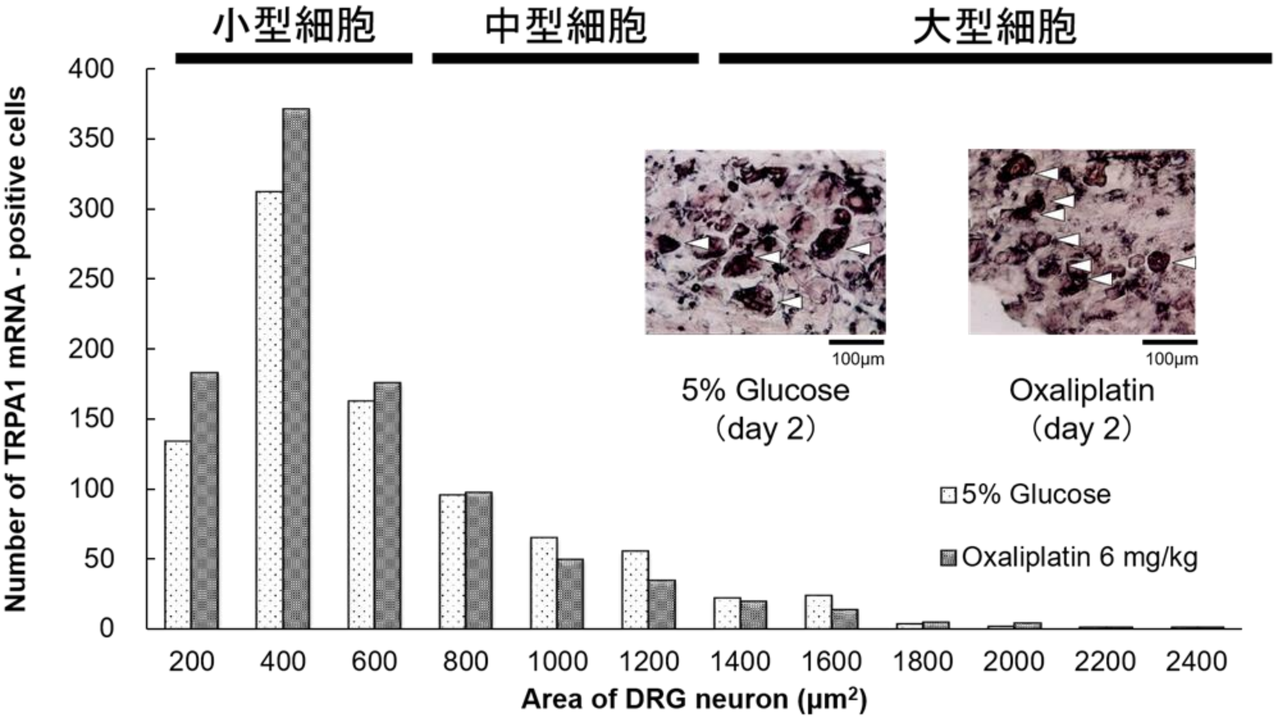


Fig.9　Oxaliplatin が TRPA1 mRNA 発現細胞に及ぼす影響（ISHH 法）

次に，DRG における TRPA1 mRNA 陽性細胞数に及ぼす oxaliplatin の影響について，経時的に検討した．その結果，DRG 全細胞数に対する TRPA1 mRNA 陽性細胞数は，oxaliplatin 投与群にて Day 1（45.5 ± 3.9%），Day 2（53.0 ± 8.7%）及び Day 4（40.4 ± 7.0%）において有意に増加したが，Day 7（31.2 ± 3.4%）では明確な差はみられず，対照群（27.9 ± 5.8%）と同程度であった（Fig.10）．

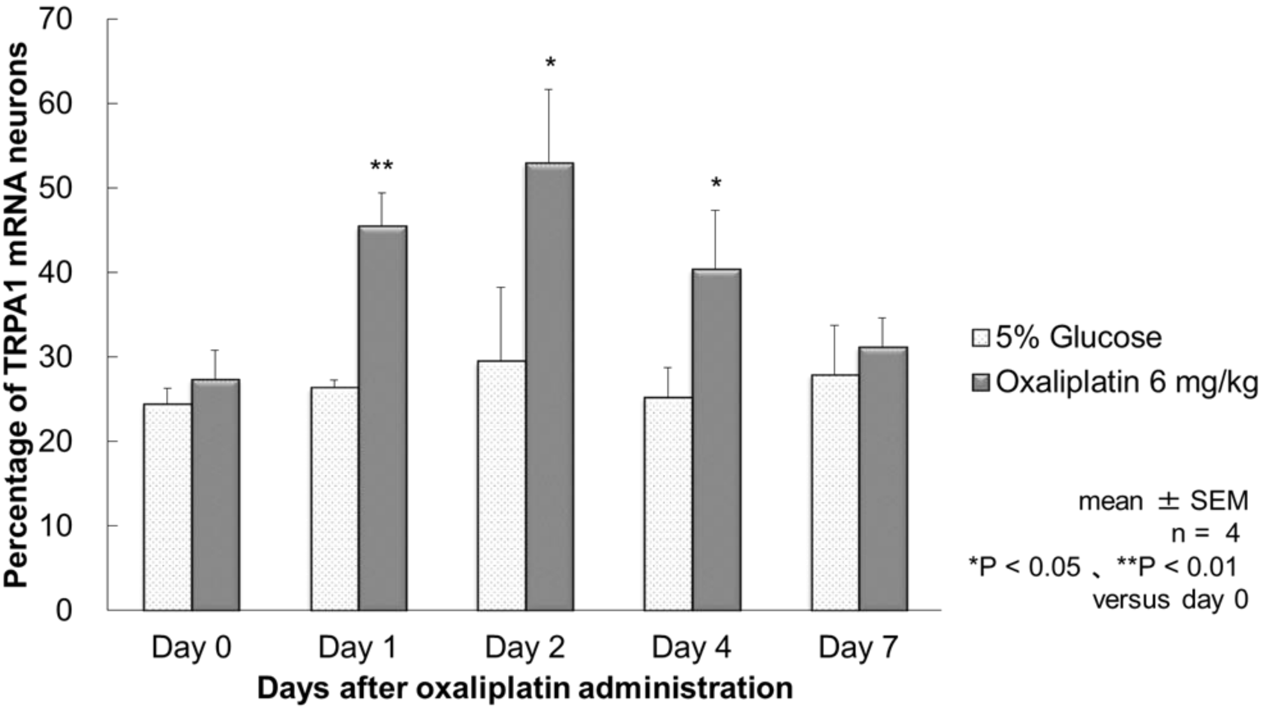


Fig.10　Oxaliplatin が TRPA1 mRNA 発現に及ぼす影響（ISHH 法，経時的変化）

4　DRG における TRPA1 発現細胞数に及ぼす oxaliplatin の影響 ‐ 蛍光免疫染色法による検討 –

蛍光免疫染色法を用いて，oxaliplatin 投与後 2 日目の TRPA1 と IB4 との二重染色による検討を行った．IB4 は，DRG 小型細胞に発現している糖鎖（D‐ガラクトシル残基）を選択的に認識する[21,22]．IB4 にて認識される DRG 小型細胞は C 線維の細胞体であり，oxaliplatin 投与による TRPA1 との共発現量への影響を検討した．

5% glucose 投与群と比較して，oxaliplatin 投与群では TRPA1 陽性細胞数の増加が確認された．さらに，TRPA1 と IB4 が共発現している割合は，5% glucose 投与群では 45.8 ± 5.0% であるのに対し，oxaliplatin 投与群では 64.7 ± 3.9% と有意な上昇が確認された（Fig.11）．

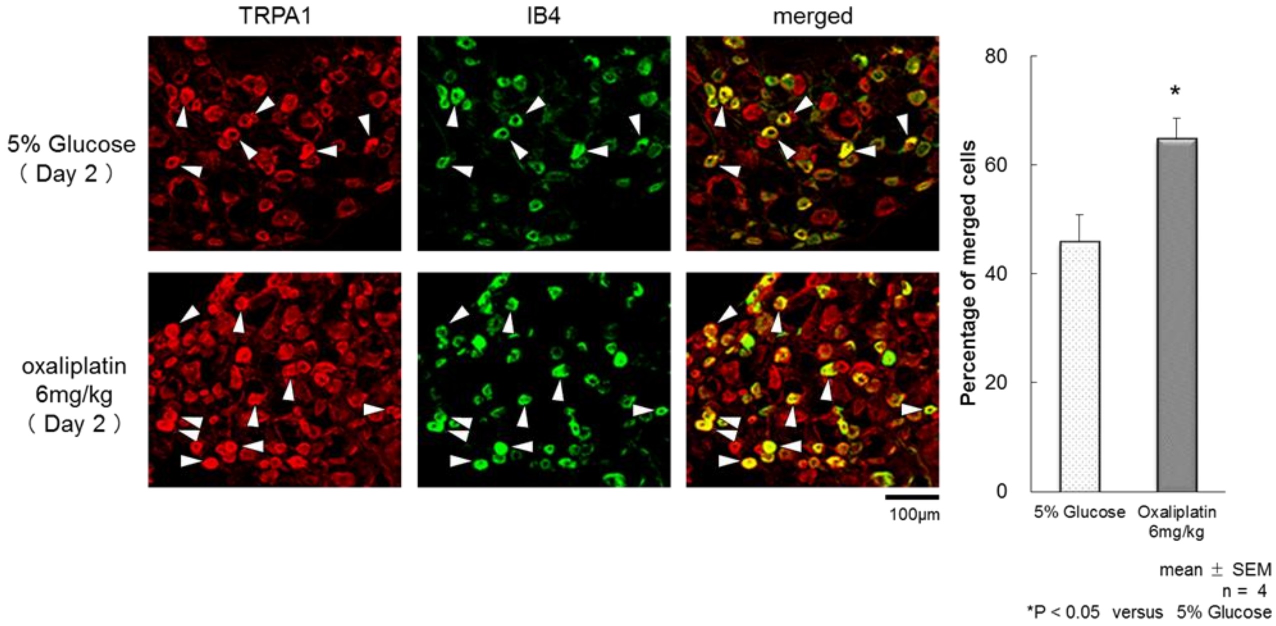


Fig.11　Oxaliplatin が TRPA1 発現細胞数に及ぼす影響（蛍光免疫染色法）

5　TRPA1 ノックダウンが oxaliplatin 誘発冷感刺激過敏反応に及ぼす影響

Water / acetone spray test において，室温の水（22℃）の噴霧による刺激に対しては，MS，AS 投与群のいずれも反応性に差はみられなかった．しかし，acetone による刺激に対しては，MS 投与群では Day 1（54.3 ± 14.4%），Day 2（67.3 ± 5.4%），Day 4（58.4 ± 7.4%），Day 7（53.0 ± 8.0%）と，Day 2 をピークとする逃避反応率の増加が認められた．この増加は AS の投与により顕著に抑制され，その逃避反応率は Day 1（20.0 ± 11.4%），Day 2（14.3 ± 11.4%），Day 4（20.9 ± 9.0%），Day 7（22.9 ± 10.8%）であった．Day 1，Day 2 及び Day 4 においては，MS 群に対する統計学的な有意差が認められた（Fig.12a，12b）.

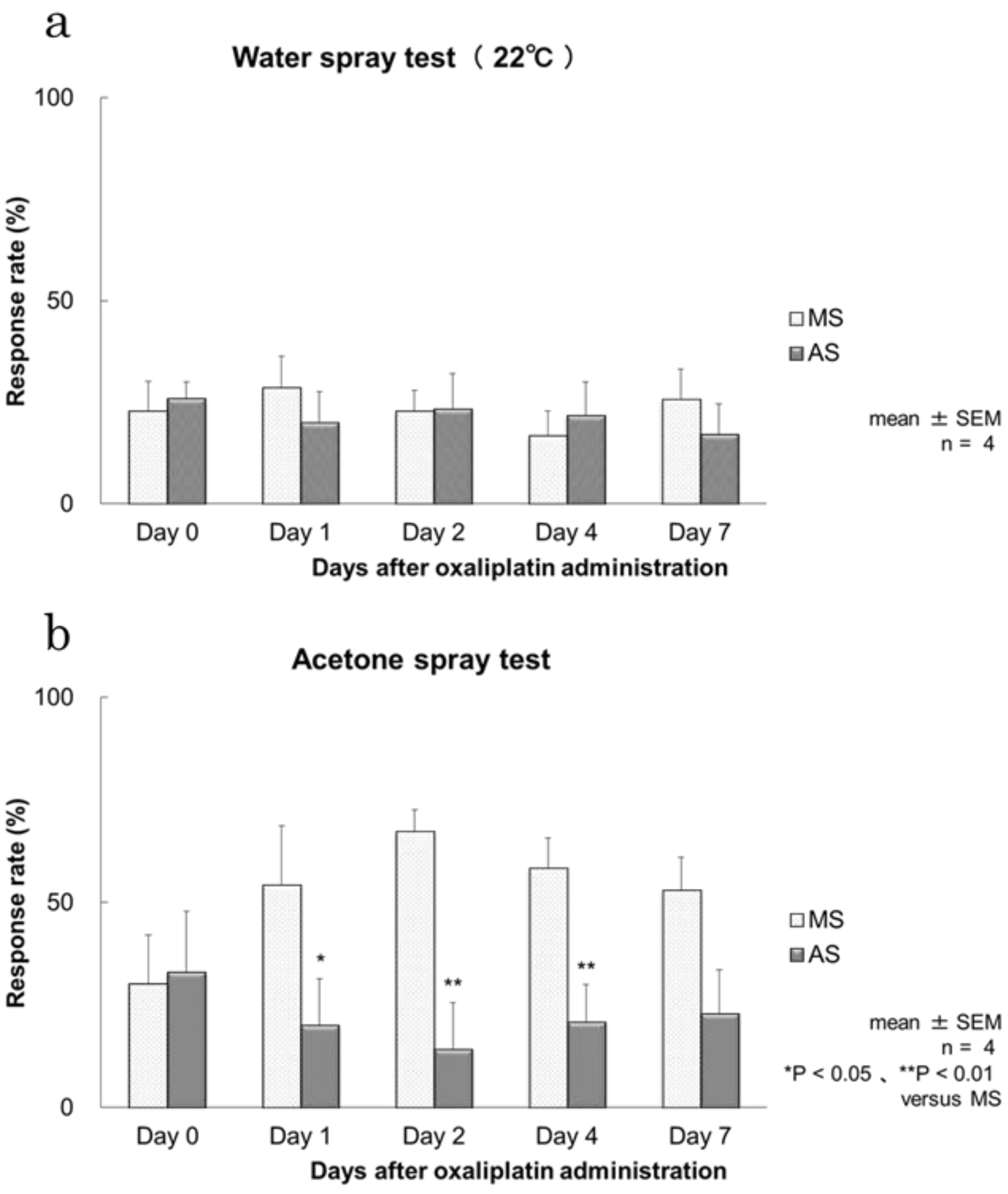


Fig.12 TRPA1 ノックダウンが oxaliplatin 誘発冷感刺激過敏反応に及ぼす影響

Oxaliplatin 投与後 2 日目における AS 群及び MS 群の DRG での TRPA1 タンパクの発現量は，5% glucose 投与群の発現量を 100% とした場合，MS 群では 89.8 ± 8.5%，AS 群では 61.0 ± 11.0% となり，AS 処置による TRPA1 タンパク発現量の有意な減少が確認された（Fig.13）.

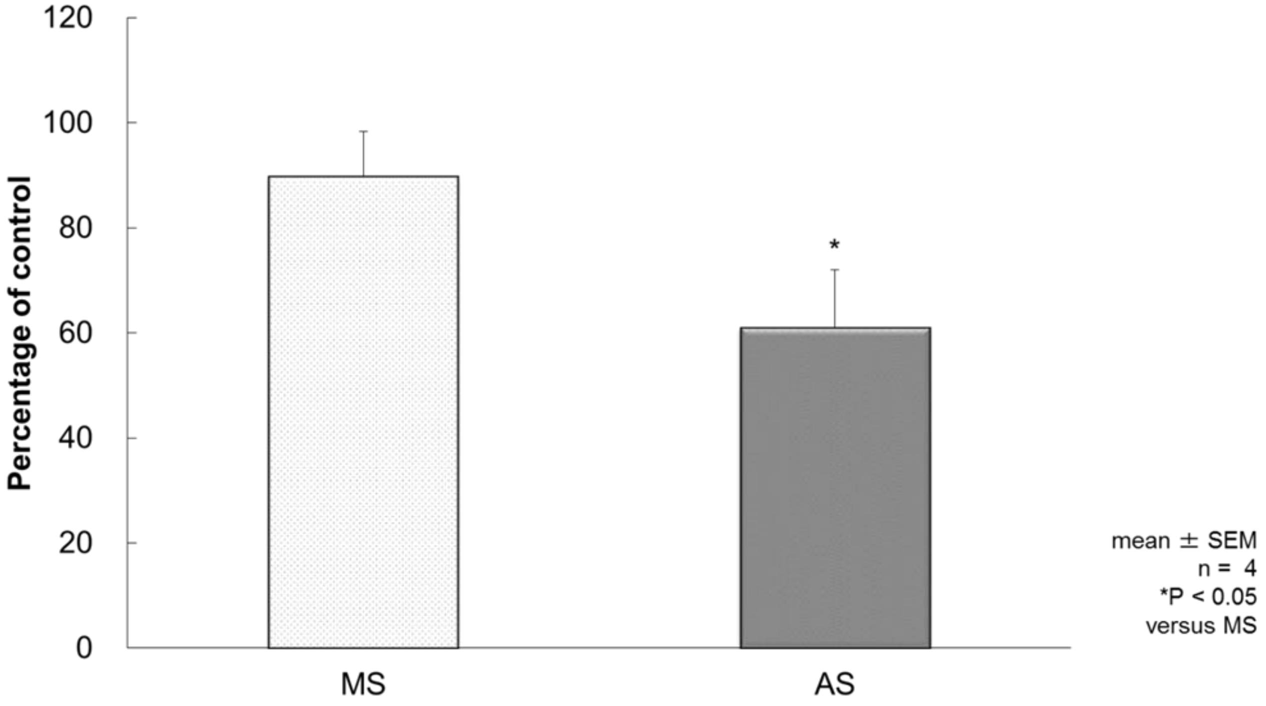


Fig.13　TRPA1 ノックダウンによる TRPA1 タンパク発現量の変化

6　Oxaliplatin が DRG における TRPA1 と p38 MAPK の共発現に及ぼす影響と p38 MAPK 阻害剤が oxaliplatin 誘発冷感刺激過敏に及ぼす影響

蛍光免疫染色法を用いて, oxaliplatin 投与後 2 日目の TRPA1 mRNA と p-p38 MAPK との二重染色による検討を行った．5% glucose 投与群と比較して，oxaliplatin 投与群では，TRPA1 と IB_4 が共発現している割合は，5% glucose 投与群では 36.7 ± 5.0% であるのに対し, oxaliplatin 投与群では 59.6 ± 3.9% と有意な上昇が確認された (Fig.14)．

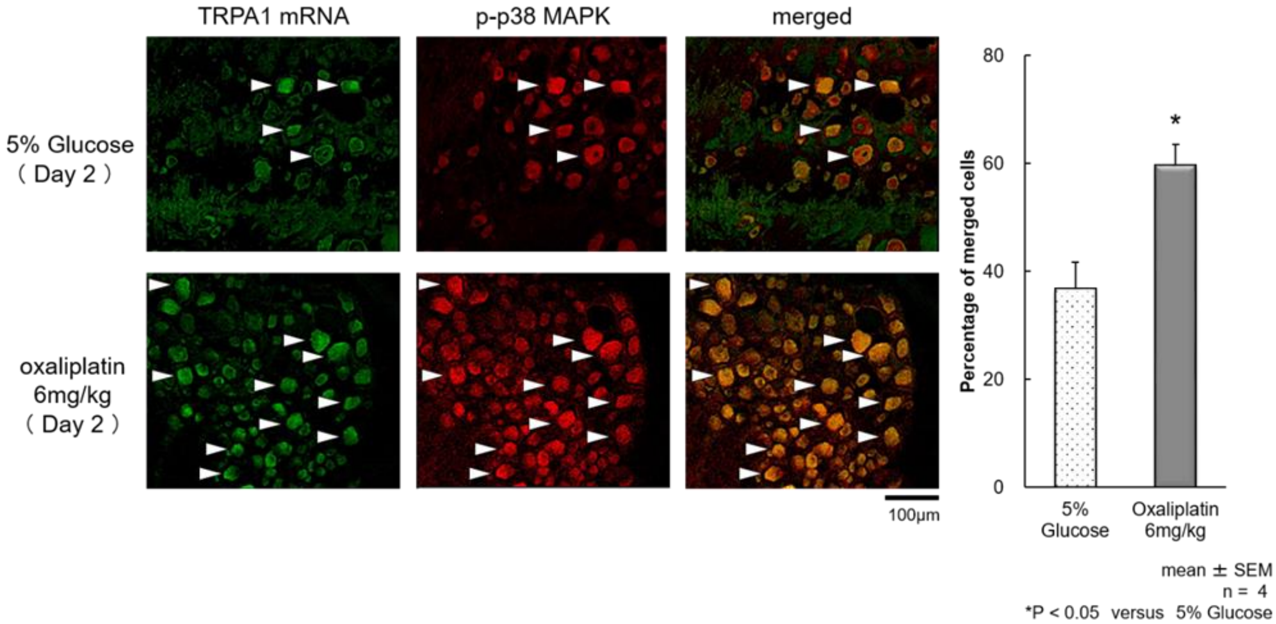


Fig.14　Oxaliplatin が TRPA1 と p-p38 MAPK の共発現に及ぼす影響
（蛍光免疫染色法）

Oxaliplatin 投与後 2 日目の DRG 細胞における TRPA1 mRNA と p-p38 MAPK の共発現している細胞分布について検討したところ, 5% glucose 投与群と比べ, oxaliplatin 投与群にて主に断面積 600 μm² 以下の小型細胞にて増加した（Fig.15）. 加えて, Oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応に及ぼす p-p38 MAPK 阻害剤の影響を, acetone spray test により検討した（Day 2）. DMSO 投与群及び DMSO＋5% glucose 投与群における逃避反応率はそれぞれ 16.4 ± 11.7%, 23.3 ± 8.3% であったのに対し, DMSO＋Oxaliplatin 投与群では 88.0 ± 6.6% を示し, 有意な逃避反応率の増加がみられた. しかし, p38 MAPK 阻害剤である SB203580 ＋ Oxaliplatin 投与群における逃避反応率は 28.1 ± 12.3% となり, 統計学的に有意な減少が認められた（Fig.16）.

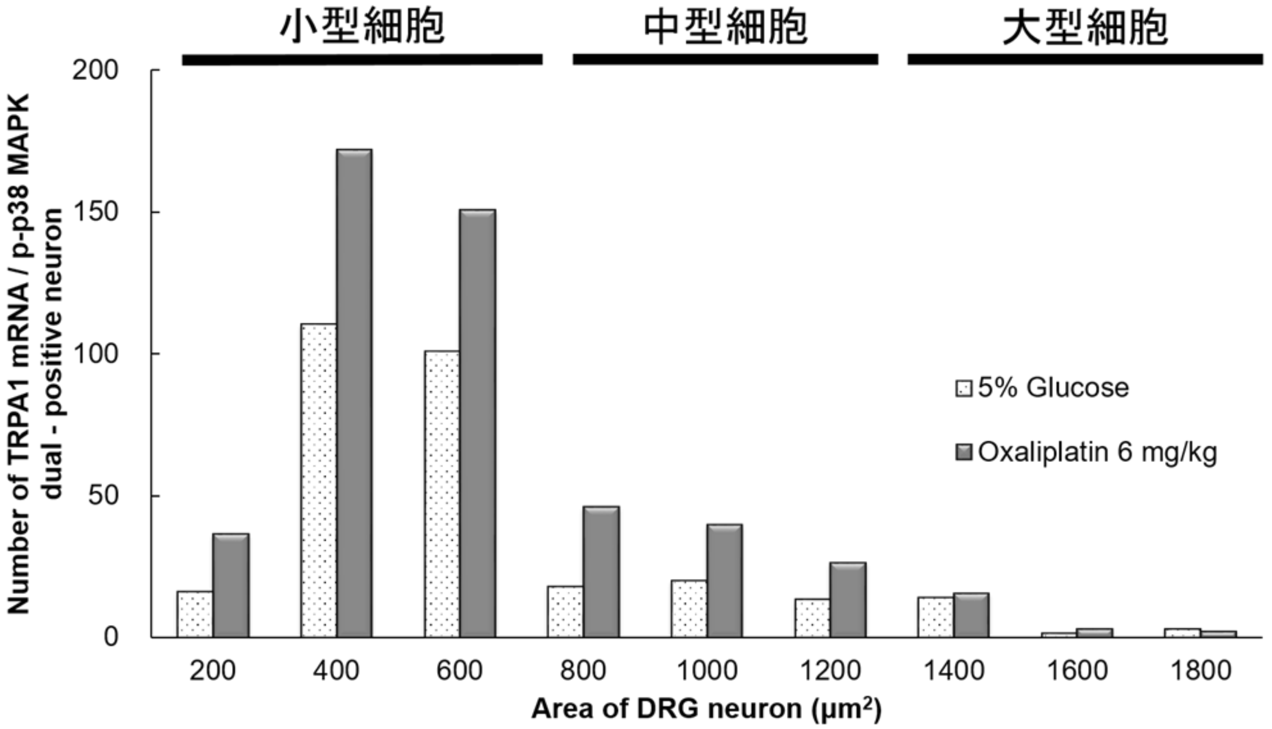


Fig.15　Oxaliplatin が TRPA1 と p-p38 MAPK の共発現分布に及ぼす影響

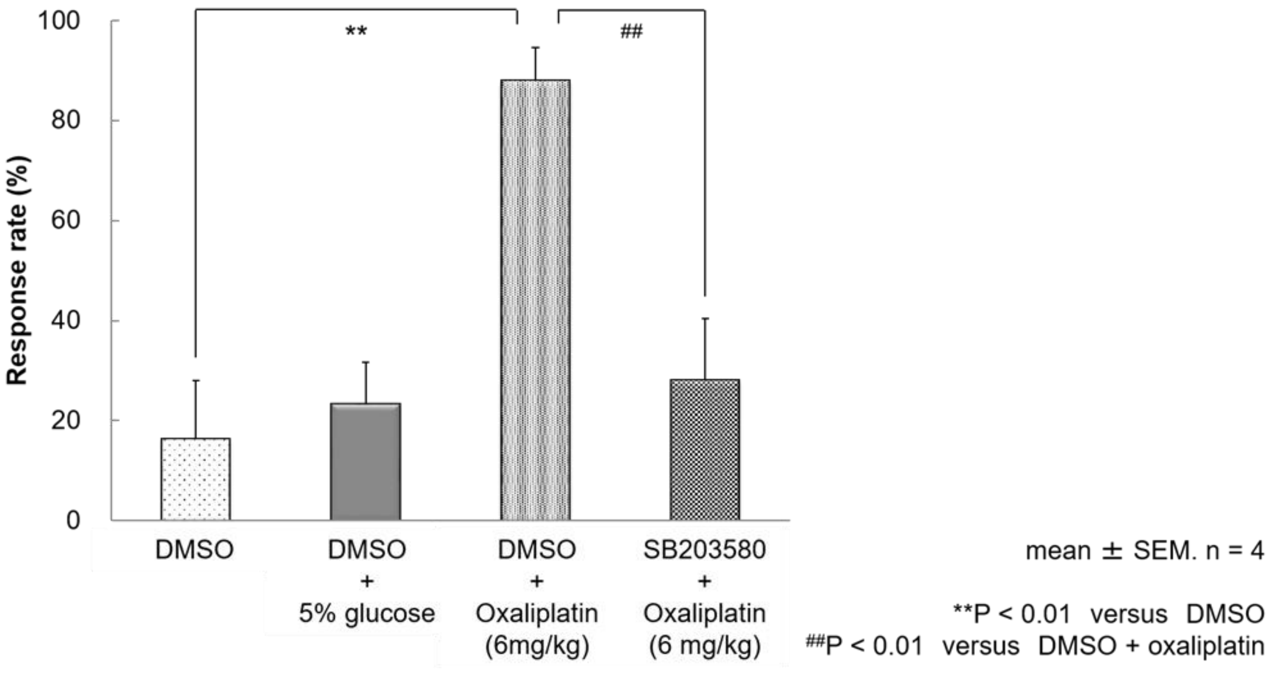


Fig.16　Oxaliplatin 誘発冷感刺激過敏症状に p-p38 MAPK 阻害剤が及ぼす影響

考　察

本研究において，ラットに oxaliplatin を単回腹腔内投与することにより，投与早期（Day 1～Day 2）から冷感刺激に対する逃避反応率の増加が用量依存的にみられた．これまでに，ラットに対する oxaliplatin の単回もしくは複数回投与は，冷感刺激に対して過敏反応を生じさせることが報告されており [23,24]，今回も同様な結果が得られたと考えられる．ヒトでは，oxaliplatin 投与後 3～4 日以内に一過性かつ徐々に改善する冷感過敏症状が出現するが，動物においては単回投与後 1 日目より継続した冷感過敏反応を示すことが報告されている [23,25-27]．これらの違いは，投与量及び投与経路，投与期間等が異なるためと考えられる．

TRPA1 は温度感受性 TRP チャネルであり，17℃以下の侵害性冷刺激によって活性化されることが報告されている [11]．著者は，oxaliplatin を単回腹腔内投与したラットから摘出した DRG において，投与後 1～4 日目まで TRPA1 mRNA の発現増加することを報告した（Fig.2）[13]． Oxaliplatin の処置は，TRPA1 mRNA の発現を増加させることが培養 DRG 細胞を用いた検討において報告されている [8,9]が，本研究では，oxaliplatin による in vivo における TRPA1 mRNA の経時的な発現増加作用を，ISHH 法を用いて証明した．さらに本研究では，oxaliplatin の投与後 2 日目から 7 日目にかけて，TRPA1 タンパク発現の有意な増加が確認されたとともに，このタンパクの増加は acetone spray test における冷感刺激に対する逃避反応率の増加とほぼパラレルに推移した．これらのことから，oxaliplatin により誘発される冷感過敏反応には，TRPA1 が関与している可能性が示唆された．

Oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応に対する TRPA1 の関与を ISHH 法及び蛍光免疫染色法によって詳細に検討した．その結果，TRPA1 mRNA は主に小型細胞において発現し，oxaliplatin はその発現を促進することが明らかとなった．また，oxaliplatin の投与によって TRPA1 mRNA の発現が増加する時期は，acetone spray test で逃避反応率が増加するタイミングや，real - time PCR で得られた結果とほぼ同様であった [10]．さらに蛍光免疫染色法を用いた検討では, TRPA1 と IB_4 が認識する DRG 小型細胞との共発現が, oxaliplatin により有意に増加した．IB_4 は，DRG 小型細胞に発現している糖鎖（D - ガラクトシル残基）を選択的に認識する [21]．DRG 小型細胞の大部分は無髄軸索である C 線維の細胞体であることが知られているが，ラット DRG における TRPA1 mRNA は，C 線維に多く発現することが報告されている [8,28]．従って本研究結果は，oxaliplatin 誘発によるラットの冷感過敏反応には，求心性感覚神経の C 線維における TRPA1 mRNA あるいは TRPA1 タンパクの増加が関与していることを示唆するものである．また TRPA1 mRNA は，C 線維以外に細い有髄軸索である Aδ 線維（DRG 中型細胞）にも多く発現することが報告されている [8,28]．Aδ 線維も一次求心性の感覚神経として，速く鋭い刺痛を

伝達することが広く知られていることから，oxaliplatin 誘発による冷感過敏反応の形成，維持に関与している可能性がある．今後は，Aδ線維を含めたこれらの神経線維と，冷感過敏反応との関連性についてさらに詳細な検討を実施したい．

また oxaliplatin と同様に，末梢神経障害を惹起する抗悪性腫瘍薬として paclitaxel が知られている．Paclitaxel は，痛みの受容に関わる TRPV1 を DRG のみではなく，末梢の自由神経終末においても増加させることが報告されており，この増加には軸索輸送を介した機序の関与が推測されている[29)]．Oxaliplatin でも同様の機序により，末梢の自由神経終末において TRPA1 の発現を増加させる可能性があることから，oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応の発症機序を解明するためには，表皮近傍の感覚受容から神経伝達に至る経路に及ぼす影響についても精査が必要と考えられる．

本研究では，アンチセンス法による TRPA1 ノックダウンモデルを用いた検討も実施した．その結果，TRPA1 のノックダウンにより，oxaliplatin 誘発による冷感過敏反応の増加は顕著に抑制された．また，この TRPA1 ノックダウンモデルでは，TRPA1 タンパクの発現が有意に抑制されていることも確認された．Oxaliplatin 投与により TRPA1 タンパクの発現増加が示唆されることは前述したが，同実験においては，MS 投与群において TRPA1 タンパクの発現増加は観察されなかった．このことは使用動物に対し，クモ膜下腔内へ soft tube の挿入や溶液投与など侵襲性の高い処置を行っていることが影響していると考えられる．さらに，脊髄神経結紮モデルラットを用いた検討では，TRPA1 antisense のクモ膜下腔内投与により，冷感刺激に対する過敏反応が抑制されることが報告されている[30)]．これらの結果は，TRPA1 が oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応の発生に関与していることを強く支持するものである．

TRPA1 の発現制御には，細胞内シグナル伝達系のひとつである MAPK カスケードのうち，p38 MAPK の関与が示唆されている[11,12)]．本研究では，蛍光免疫染色法及び p38 MAPK 阻害薬を用いた行動試験により oxaliplatin 誘発の冷感刺激過敏症状へ及ぼす影響を検討した．その結果，蛍光免疫染色法を用いた検討では，TRPA1mRNA と p-p38 MAPK との共発現が oxaliplatin により有意に増加し，p-p38 MAPK により，oxaliplatin 誘発による冷感過敏反応の増加は顕著に抑制された．フロイント完全アジュバントの投与により作製された冷感刺激過敏モデルラットや，ラットを冷感刺激した直後に摘出した DRG 細胞において，TRPA1 と p-p38 MAPK の共発現の増加が報告されていることからも，冷感刺激は p38 MAPK の活性化を亢進することで TRPA1 の発現を増加させていることが推測される[11)]．

以上のことから，oxaliplatin により誘発される末梢神経障害には，温度感受性イオンチャネルである TRPA1 の増加が密接に関連していると推測された．さらに，TRPA1 の発現に影響する因子として，tropomyosin receptor kinase A（TrkA）が挙げられる．TrkA は，神経細胞の生存維持や神経突起の伸長促進作用，神経伝達物質の合成促進作用などを示す

神経成長因子（nerve growth factor : NGF）の高親和性受容体であり，NGF の作用は TrkA の活性化を介して発現することが知られている．この TrkA の mRNA は，ラットの DRG において TRPA1 と共発現していることが報告されている [12,28] ことから，TrkA が冷感刺激により増加し，過敏反応の発現に関与している可能性も考えられる．今後は，TrkA など TRPA1 の発現に寄与する細胞内シグナル伝達系に及ぼす影響を明らかにすることで，oxaliplatin による末梢神経障害発症機序のさらなる解明や，新規治療薬を探索する一助となるものと考えられる．

第 2 章　Oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応に対する電位依存性カルシウムチャネル $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの関与

緒　言

「化学療法による神経障害」は，神経障害性疼痛の一部として整理されており，神経障害性疼痛薬物療法ガイドライン[2]では，薬物治療の第一選択薬として電位依存性カルシウムチャネル（以下，Ca_v）$\alpha_2\delta$ リガンドである gabapentinoids（pregabalin，gabapentin）や，三環系抗うつ薬として nortriptyline や amitriptyline が挙げられている．

$Ca_v\alpha_2\delta$ リガンドである pregabalin，gabapentin は，γ-アミノ酪酸（GABA）に類似した構造を有するが，GABA 受容体（$GABA_A$，$GABA_B$）には結合せず，GABA の代謝や取り込みへの急性的な作用はないとされている[31,32]（Fig.17）．$Ca_v\alpha_2\delta$ リガンドは，過剰に興奮した興奮性神経系において，$Ca_v\alpha_2\delta$ サブユニットと結合し，シナプス前における Ca^{2+} の流入を低下させ，各種興奮性神経伝達物質の放出を抑制することにより鎮痛作用を発揮すると考えられている[33]．Ca_v は，Ca^{2+} が透過するポアを形成している α_1 と，補助サブユニットである α_2，β，γ，δ で構成されている[34]．その中で α_2 と δ の各サブユニットは結合した形で存在しており，哺乳類では $\alpha_2\delta$-1 から $\alpha_2\delta$-4 の 4 つのアイソフォームが存在する[35]．そのうち，$Ca_v\alpha_2\delta$ リガンドである gabapentin は，$\alpha_2\delta$-1 サブユニットにより高い親和性を有することが報告されている[36]．

ラットを用いた検討において，脊髄神経結紮による神経障害性疼痛モデル，あるいはタキサン系抗悪性腫瘍薬である paclitaxel の投与は，機械刺激に対する過敏反応を惹起させたとともに，DRG における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA 及びタンパクの発現を増加させたことが報告されている[9]．また $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットは，主に一次神経終末の存在する脊髄後角表層において発現していることが確認されている[9,37,38]．脊髄後角の表層（I 層）に存在するニューロンは，主に Aδ 線維及び C 線維によって伝えられる侵害刺激に応答することから，$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットは神経障害性疼痛の発症に深く関与していると推測されている．

著者は本学修士論文にて，oxaliplatin と $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットとの関連性について検討した結果，oxaliplatin がラット DRG の $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA を増加させることを明らかにした[13]．そこで本研究では，oxaliplatin が $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットに及ぼす影響についてラット脊髄を用いて精査するとともに，神経障害性疼痛の第一選択薬であり，$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットとの結合を介して作用を発現するとされる pregabalin の冷感刺激過敏反応に対する抑制作用について検討した．

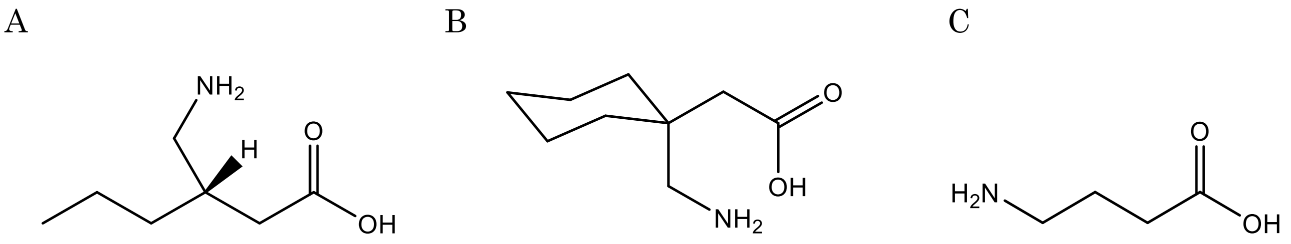


Fig.17　A. pregabalin，B. gabapentin，C. γ-アミノ酪酸（GABA）の各構造式

実験材料及び実験方法

1　実験動物

第 1 章，1 実験動物の項に準じ，Wistar 系雄性ラットを使用した．

2　薬物の調製方法

2.1　投与薬物

Oxaliplatin 注射液（エルプラット®点滴静注用 100 mg，ヤクルト本社）

Pregabalin（SIGMA-ALDRICH）

2.2　薬物調製

Oxaliplatin は，5% glucose 溶液にて 2 mg/mL に用時調製した．Pregabalin は，精製水にて 37.5 mg/mL に用時調製した．

3 Oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応に及ぼす $Ca_v\alpha_2\delta$-1 リガンドの影響

3.1 薬物投与

群構成として，5% glucose 溶液投与群（control），oxaliplatin 6 mg/kg 投与群，5% glucose 溶液 + pregabalin 50 mg/kg 投与群及び oxaliplatin + pregabalin 50 mg/kg 投与群を設定した．Oxaliplatin を単回腹腔内投与し，投与後 4 日目（Day 4）において acetone spray test を実施した．Pregabalin は，acetone spray test の実施 30 分前に単回経口投与した.

3.2 Acetone spray test

第 1 章 3.2 Acetone spray test の項に準じ，acetone の総噴霧回数に対する逃避行動の発生率を算出した.

3.3 統計処理

測定結果は，いずれも平均値 ± 標準誤差（means ± SEM）で表現した．群間の有意差検定は, 一元配置分散分析を経て Tukey-Kramer の多重比較検定を実施した．検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した.

4　脊髄 $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA の発現に及ぼす oxaliplatin の影響

4.1　実験材料

Ethanol（和光純薬工業）

Prime Script™ RT - PCR Kit（タカラバイオ）

Total RNA isolation NucleoSpin® RNA（タカラバイオ）

TRI® Reagent（SIGMA-ALDRICH）

UltraPure™ Agarose - 1000（Invitrogen）

RT-PCR に用いる $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット（Forward : 5'-gaactcaactggacaagtgcct -3', Reverse : 5'- gccatccactgaataggtcctc -3'）及び β-actin（Forward : 5'- caggtcatcactatcggcaatg -3', Reverse : 5'-gagactacaacttacccaggaaggaa -3'）の各 primer は，SIGMA-ALDRICH ライフサイエンス事業部へ作製を依頼した

4.2　Total RNA の抽出

Oxaliplatin 6 mg/kg の投与前（Day 0）ならびに腹腔内投与後 2, 4 及び 7 日目（それぞれ Day 2, Day 4 及び Day 7）に，動物を pentobarbital（50 mg/kg, i.p.）麻酔下で断頭放血致死させた．背部を切開後，椎骨を摘出して L_{4-6} の脊髄を採取し，ピンセットと眼科剪刀を用いてトリミングを行い，余分な結合組織を除去した．この脊髄から，TRI® Reagent を用いて total RNA sample を抽出した．Total RNA sample の波長 260 nm における吸光度を分光光度計（Pharmacia Biotech, Ultroapec® 3000）を用いて測定し，RNA 濃度を算出した．なお，1 sample の調製につき 3 匹の動物を使用した．

4.3　RT-PCR

cDNA 合成は，Prime Script™ RT - PCR Kit を用いて行った．本章 4.2 項で得られた total RNA sample 100 ng を用い，Thermal Cycler Dice（タカラバイオ, Model TP 600）にて，65℃・5 分間反応させた．その後，氷冷下にて Kit に添付の緩衝液・酵素類を添加後，42℃・30 分間，95℃・5 分間反応させた．反応溶液に $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットに特異的な Primer 等を添加した後，反応条件を 94℃・30 秒間，50℃・30 秒間，72℃・1 分間 / 1 cycle とし，30 cycles 施行した．TRPA1 mRNA の発現量は β-actin の発現量で補正し，Day 0 群を 100% とした相対値を算出した．なお，PCR 産物は，電気泳動を用いて定性的確認を行った．

4.4　統計処理

測定結果は，いずれも平均値 ± 標準誤差（means ± SEM）で表現した．群間の有意差検定は, 一元配置分散分析を経て Dunnett の多重比較検定を実施した. また, 検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した.

5　脊髄における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットタンパクの発現に及ぼす oxaliplatin の影響

5.1　実験材料及び試薬調製

5.1.1　実験材料

Anti- $Ca_v\alpha_2\delta$-1（extracellular）（anti - $Ca_v\alpha_2\delta$-1 antibody : ACC-015, Alomone Labs）

他の試薬は，第 1 章，4.1.1 の項に準じた．

5.1.2　試薬調製

第 1 章，4.1.2～4.1.10 の項に準じ，試薬を調製した．

5.2　ラット脊髄からのタンパク抽出

Oxaliplatin 6 mg/kg の投与前（Day 0）ならびに腹腔内投与後 2, 4 及び 7 日目（それぞれ Day 2, Day 4 及び Day 7）に，動物を pentobarbital（50 mg/kg, i.p.）麻酔下で断頭放血致死させ，本章 4.2 項に準じて脊髄を採取した．この脊髄に lysis buffer 200 µL を加えてホモジナイズし，15,000 ×g，4℃，30 分間遠心分離した．上清を分取して試料とし，使用まで -80℃にて保存した．

5.3　タンパク質の定量

タンパク質の定量は，第 1 章，4.3 タンパク質の定量の項に準じて実施した．

5.4　SDS - PAGE 電気泳動

第 1 章，4.4 SDS -ポリアクリルアミドゲル（SDS - PAGE）電気泳動に準じて操作を実施した．

5.5　Western Blot 法

一次抗体として anti - $Ca_v\alpha_2\delta$-1 antibody を使用した以外は，第 1 章，4.5 Western Blot 法の項に準じて操作を実施した．

5.6　統計処理

測定結果は，いずれも平均値 ± 標準誤差（means ± SEM）で表現した．群間の有意差検定は，一元配置分散分析を経て Dunnett の多重比較検定を実施した．また，検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した．

6 Oxaliplatin が脊髄後角における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットへ及ぼす影響 - 蛍光免疫染色法を用いた検討 –

6.1 実験材料及び試薬調製

6.1.1 実験材料

Anti-Calcium Channel（$\alpha_2\delta$-1 Subunit）antibody produced in rabbit（anti - $Ca_v\alpha_2\delta$-1 antibody：C5105, SIGMA-ALDRICH）

Anti-Rabbit IgG（whole molecule）- FITC antibody produced in goat（FITC - conjugated anti - rabbit IgG：F9887, SIGMA-ALDRICH）

他の試薬は，第 1 章，6.1.1 の項に準じた．

6.2 脊髄凍結ブロックの作製

Oxaliplatin 6 mg/kg の投与前（Day 0）ならびに腹腔内投与後 2, 4 及び 7 日目（それぞれ Day 2, Day 4 及び Day 7）に，pentobarbital（50 mg/kg, i.p.）麻酔下で動物を背位に固定し，第 1 章 5.3 DRG 凍結ブロックの作製の項に準じて灌流固定を実施した．本章 4.2 Total RNA の抽出の項に準じて脊髄を採取し，25% sucrose / PBS 溶液（第 1 章，6.1.2 参照）に終夜浸漬した後，常法に従って脊髄を包埋し，試料とした．試料は使用まで -80℃にて保存した．

6.3 蛍光標識抗体を用いた免疫組織化学的染色

一次抗体として anti - $Ca_v\alpha_2\delta$-1 antibody（200 倍希釈），二次抗体として FITC - conjugated anti - rabbit IgG（200 倍希釈）を使用したこと，二次抗体のインキュベート条件が室温下 2 時間であったことを除き，第 1 章，6.3 蛍光標識抗体を用いた免疫組織化学的染色の項に準じて操作を行った．

6.4 鏡検の実施

共焦点レーザー蛍光顕微鏡（FLUOVIEWFV 300，Olympus）を用い，FITC を励起波長 488 nm，蛍光波長 530 nm で緑色に発色させて観察した．観察時は 10, 40 倍の対物レンズ，10 倍の接眼レンズを用いた．

6.5 データ解析・統計処理

染色写真より，個々の DRG 神経細胞について単位面積当たりの蛍光強度を測定した．蛍光強度は，バックグランドを計測し，その 3 倍以上の強度を持つ細胞を Positive と考え，蛍光強度を算出した．また，蛍光強度は ImageJ 1.46.（Wayne Rasband (NIH)）を用いて Mean gray value（平均輝度）を計測して分析した．

結果は，5% glucose 投与群の平均値を 100% として変化率を算出し，平均値 ± 標準誤差（means ± SEM）で表現した．群間の有意差検定は，一元配置分散分析を経て Dunnett の多重比較検定を実施した．また，検定は両側で実施し，$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した．

結　果

1　Oxaliplatin 誘発による冷感刺激過敏反応に及ぼす $Ca_v\alpha_2\delta$-1 リガンドの影響

Oxaliplatin誘発による冷感刺激過敏反応に及ぼすpregabalinの影響を, acetone spray test により検討した（Day 4）．対照群である 5% glucose 投与群における逃避反応率は 41.4 ± 7.5% であったのに対し，oxaliplatin 投与群では 87.2 ± 7.2% を示し，有意な逃避反応率の増加がみられた．この増加は pregabalin の投与により 26.7 ± 5.6% となり，統計学的に有意な減少が認められた．なお，5% glucose + pregabalin 投与群における逃避反応率は 37.5 ± 6.0% であり，pregabalin の単独処置による過剰な逃避反応の抑制はみられなかった（Fig.18）．

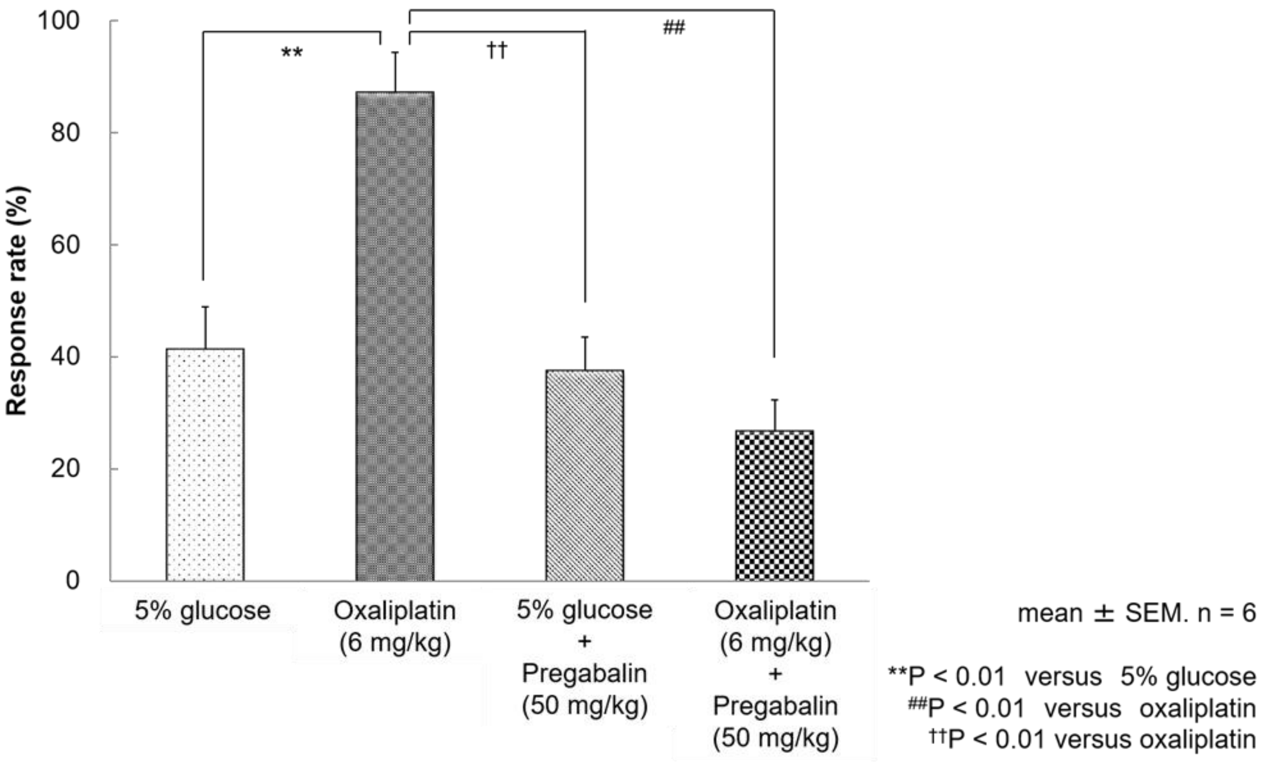


Fig.18　Oxaliplatin 誘発冷感刺激過敏反応に及ぼす pregabalin の影響

2　脊髄 $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA の発現に及ぼす oxaliplatin の影響

Oxaliplatin 6 mg/kg の投与により，$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA の発現量は投与前（Day 0：100.0 ± 1.6%）と比較して Day 2 で 119.0 ± 2.9%，Day 4 で 138.5 ± 13.9% となり，いずれも統計学的に有意な増加が観察された．しかし，Day 7 における発現量は，Day 0 と同程度（103.8 ± 14.6 %）であった（Fig.19）．

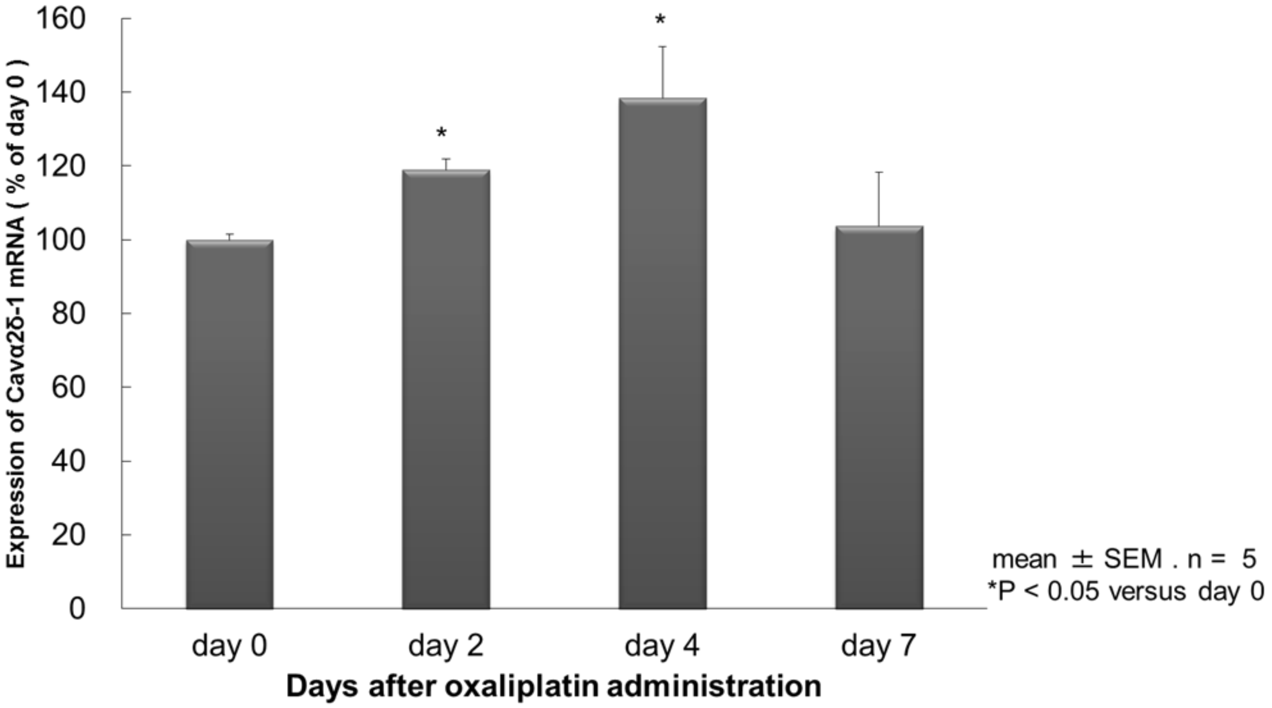


Fig.19　ラット脊髄における $Ca_v\alpha_2\delta$-1mRNA 発現量に及ぼす oxaliplatin の影響

3　脊髄における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットタンパクの発現に及ぼす oxaliplatin の影響

$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットタンパクの発現量は，oxaliplatin 投与前（Day 0 : 100.0 ± 8.3 %）と比較し，Day 2 で 184.3 ± 18.5%，Day 4 で 218.6 ± 26.9% と有意な増加が観察された．Day 7 においても高い発現量（130.6 ± 24.4%）がみられたが，Day 0 に対する統計学的な有意差は認められなかった（Fig.20）.

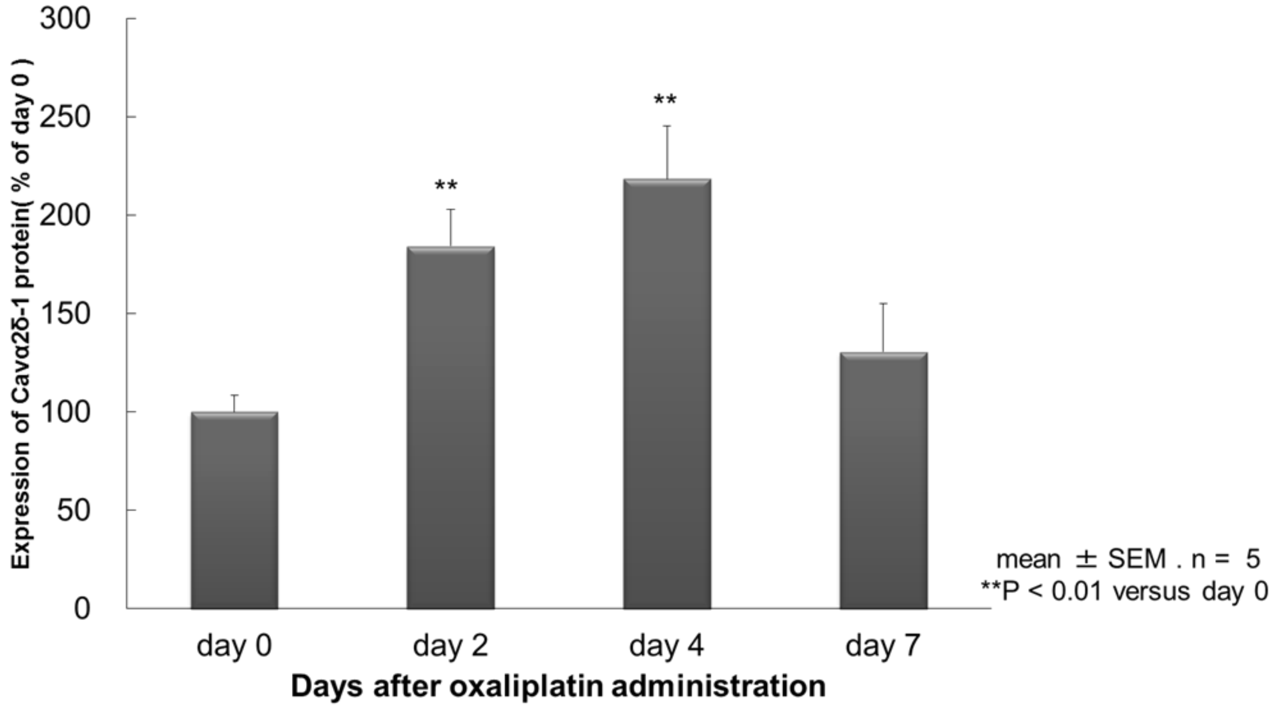


Fig.20　ラット脊髄における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 タンパク発現量に及ぼす oxaliplatin の影響

4　Oxaliplatin が脊髄後角における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットへ及ぼす影響 - 蛍光免疫染色法を用いた検討 -

一次求心性神経のうち，温痛覚の伝導に関与する侵害受容性線維として Aδ 及び C 線維が知られており，刺激の伝導は脊髄後角表層（I 及び II 層）にて主に行われる（Fig. 21，点線上部）ことから，蛍光免疫染色法を用いてその局在について検討した．脊髄後角における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの蛍光輝度は，oxaliplatin 投与前（Day 0 : 100.0 ± 8.3%）と比較し，Day 2 で 130.6 ± 16.1%，Day 4 で 143.1 ± 12.2% となり，有意な増加が観察された．Day 7 においても，Day 0 と比較して高い発光輝度（119.5 ± 13.7%）がみられたが，統計学的な有意差は認められなかった（Fig.22）．

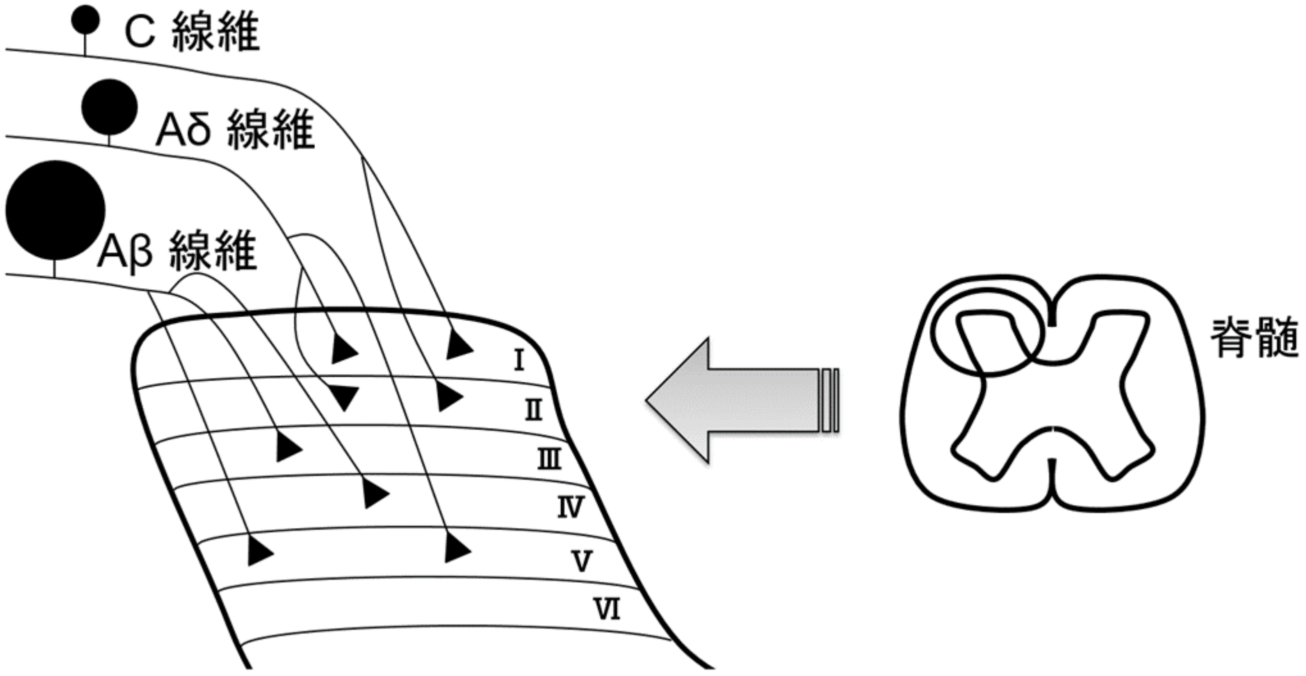


Fig.21　脊髄における一次ニューロンの入力部位

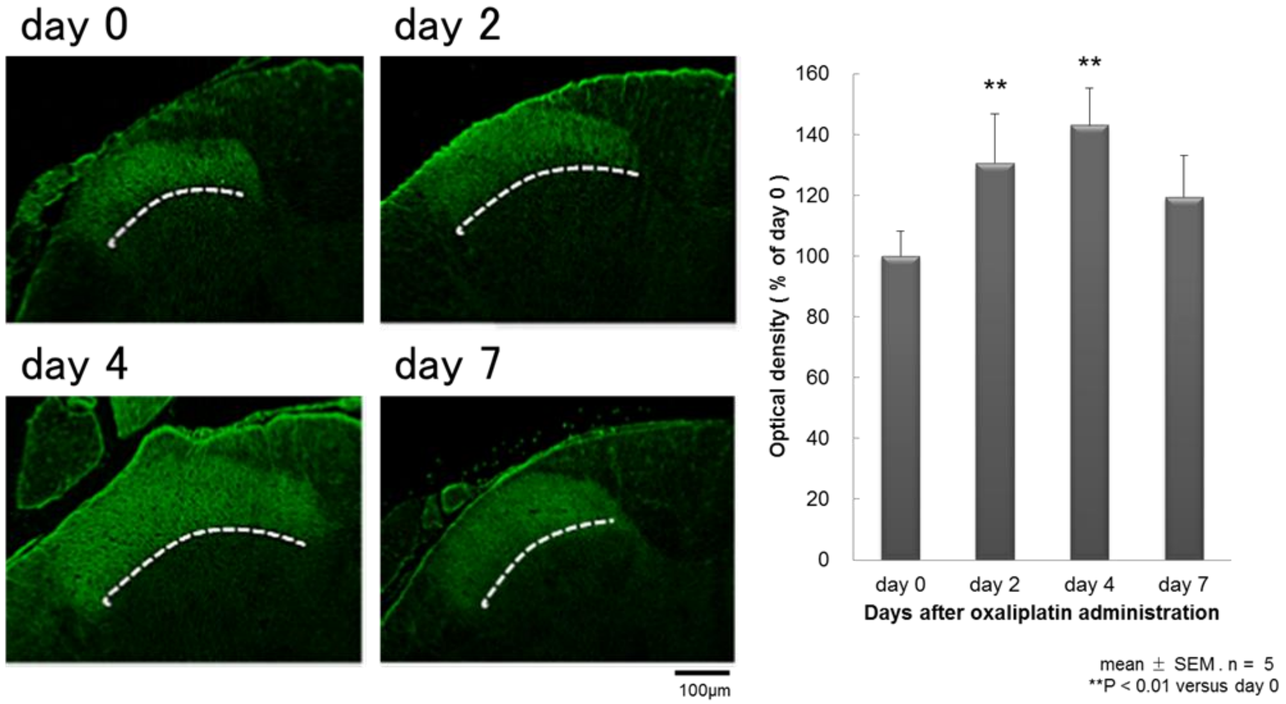


Fig.22　ラット脊髄後角における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの発現に及ぼす oxaliplatin の影響

考　察

第1章及び第2章において，oxaliplatin は acetone による冷感刺激に対する過敏反応を誘発することを示したが，pregabalin は過敏反応を減弱させることが確認された．Pregabalin は神経障害性疼痛に対する第一選択薬であり，臨床上においてもその有用性は報告されている[2,39]．従って，pregabalin の作用部位である $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットは，oxaliplatin による冷感刺激過敏反応の発生・維持に関与している可能性が推測される．今回は，oxaliplatin が $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットに及ぼす影響について，求心性感覚神経終末の存在する脊髄を中心とした検討を実施した．

Paclitaxel は，oxaliplatin と同様に副作用として神経障害を誘発する抗悪性腫瘍薬として知られているが，その投与によりラット DRG の $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA 及びタンパクの発現を増加させることが報告されている[9,40]．また Bauer らは，神経障害性疼痛の維持や pregabalin による疼痛の緩和には，DRG から脊髄後角における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの順行性輸送が重要であると提唱している[41]．そこで本研究では，oxaliplatin がラット脊髄における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA 及びタンパクの発現に及ぼす影響について検討した．その結果，oxaliplatin は $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA 及びタンパク発現量のいずれも増加させることが明らかとなった．$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの神経障害への関与については，$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの発現を増加させたトランスジェニックマウスでは，脊髄後角において過興奮性がみられること[36,41]や，神経を直接障害することにより作製された神経障害モデルラットでは，脊髄において $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの発現が増加している[43,44]など，これまでにいくつかの報告がなされている．またこれらの報告では，いずれも $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの発現増加を介した異痛症（allodynia）が発症するとされている．本研究においては，$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの発現増加は，異痛症（allodynia）のみでなく，oxaliplatin 誘発による冷感刺激に対する過敏反応の形成にも関与している可能性が示唆された．

侵害刺激の感知は，DRG あるいは三叉神経節に細胞体が存在する感覚神経により伝達され，ほとんどは脊髄後角表層に終止する．また，一次求心性神経は伝える感覚の種類により，脊髄後角表層内の異なる層に終止することも知られている．これらのことから，脊髄後角表層における感覚刺激に対する刺激伝達機能の変化は，疼痛の発症，維持に大きく関与していることが推測される．そこで本研究では，oxaliplatin が脊髄後角における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットに及ぼす影響について，蛍光免疫染色法を用いて検討した．その結果，oxaliplatin は脊髄後角の表層において，$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの発現を増加させることが明らかとなった．

脊髄後角表層の興奮は，主に一次求心性感覚神経である Aδ 及び C 線維によって伝えられる侵害刺激に応答して発生する[45]．また，求心性感覚神経はサブスタンス P や

カルシトニン遺伝子関連ペプチド（calcitonin gene-related peptide : CGRP）といった神経ペプチドを伝達物質として，刺激を二次ニューロンへと伝える．この際，TRP は細胞外 Ca^{2+}イオンの細胞内流入を促進することにより，サブスタンス P の遊離を増加させることが報告されている [46,47)]．このことから，神経伝達時において末梢神経障害を誘発する過剰な興奮が成立するためには，TRP の増加のみではなく，Ca^{2+} を神経細胞内に取り込む機構も活性化される必要があると考えられる．実際に，副作用として末梢神経障害を生じる paclitaxel は，ラットの小型，中型 DRG 神経細胞における電位依存性 Ca^{2+} チャネルの電流量を顕著に増加させることが報告されている [10)]．本研究では，oxaliplatin が Ca^{2+} チャネルの電流量に及ぼす影響は不明ではあるが, oxaliplatin が脊髄における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの mRNA 及びタンパクの発現量をいずれも増加させたこと，またこの増加が脊髄後角表層にで観察されたことから，一次求心性感覚神経において電位依存性 Ca^{2+} チャネルの発現が増加し，Ca^{2+} イオンの細胞内流入が促進されたことが，冷感刺激過敏反応の成立に関与していると推測された [48)]．この仮説は，タキサン系抗がん剤である paclitaxel 投与により $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA 及びタンパクの発現量の増加に伴う Ca_v 電流量の増加が報告されていることからも支持されるものである [10)]．

また，これまでに著者は，oxaliplatin がラット DRG においても $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA の発現を増加させることを報告している [13)]．このことは，TRPA1 と同様に，oxaliplatin が C 線維あるいは Aδ 線維における電位依存性 Ca^{2+}チャネルの発現を増加させていることを示すものである．従って，$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの発現部位や，電位依存性 Ca^{2+} チャネルの電流量に及ぼす影響といった機能的指標について精査を加えることにより, oxaliplatin 誘発による末梢神経障害に対する $Ca_v\alpha_2\delta$ リガンドの関与がより明確となると考えられる．

以上の結果より，oxaliplatin により誘発される冷感刺激過敏反応には，脊髄後角表層における $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの発現増加が寄与していることが示唆された．

結　論

1　Oxaliplatin は，ラット DRG における TRPA1 の mRNA 及びタンパクの発現をいずれも有意に上昇させた．また，TRPA1 のノックダウンにより冷感刺激過敏反応は減弱した．さらに，TRPA1 の発現増加は DRG の小型細胞（主に C 線維の細胞体）において顕著であった．このことは，oxaliplatin が低温で活性化される TRPA1 を増加させることにより，冷感刺激に対する過敏反応を誘発していることを示唆している．

2　Oxaliplatin は，ラット脊髄において $Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニット mRNA 及びタンパクの発現をいずれも有意に上昇させた．また，$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの増加は脊髄後角の表層に見られた．このことは，oxaliplatin による冷感刺激過敏反応の誘発には，$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットの発現増加も関与している可能性を示している．

3　TRPA1 は，神経細胞内への Ca^{2+} の流入を促進すると考えられていることから，oxaliplatin により増加した TRPA1 による Ca^{2+} の流入促進は，同じく oxaliplatin により過剰に発現した電位依存性 Ca^{2+} チャネルによってさらに増強されている可能性が推測される．$Ca_v\alpha_2\delta$-1 サブユニットに結合する pregabalin は，神経障害性疼痛に対する第一選択薬であるが，oxaliplatin 誘発による末梢神経障害に対しては，電位依存性 Ca^{2+}チャネルの遮断薬のみではなく，TRPA1 を選択的に遮断・抑制する薬物の併用がより効果的であると考えられることから，今後の研究を進展させたい．

上記の内容は，以下の雑誌に投稿した．

Yamamoto K，Chiba N，Chiba T，Kambe T，Abe K，Kawakami K，Utsunomiya I，Taguchi K ; Transient receptor potential ankyrin 1 that is induced in dorsal root ganglion neurons contributes to acute cold hypersensitivity after oxaliplatin administration. Mol Pain，**11(1): 69** (2015).

Yamamoto K，Tsuboi M，Kambe T，Abe K，Nakatani Y，Kawakami K，Utsunomiya I，Taguchi K ; Oxaliplatin administration increases expression of the voltage-dependent calcium channel α2δ-1 subunit in the rat spinal cord. J Pharmacol Sci，**130(2)**，117 - 122 (2016).

引用文献

1) 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」(2014)
2) The Committee for the Guidelines for the Pharmacologic Management of Neuropathic Pain of JSPC, Guidelines for the Pharmacologic Management of Neuropathic Pain, Shinko Trading Co. Ltd. (2011).
3) Micetich KC, Barnes D, Erickson LC ; A comparative study of the cytotoxicity and DNA-damaging effects of cis-(diammino)(1,1 - cyclobutanedicarboxylato)-platinum (II) and cis-diamminedichloroplatinum (II) on L1210 cells. Cancer Res, **45(9)**, 4043 - 4047 (1985).
4) Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S, Oxaliplatin - related neurotoxicity. Crit Rev Oncol Hematol, **59(2)**, 159 - 168 (2006).
5) Lehky TJ, Leonard GD, Wilson RH, Grem JL, Floeter MK, Oxaliplatin-induced neurotoxicity: acute hyperexcitability and chronic neuropathy. Muscle Nerve, **29(3)**, 387 - 392 (2004).
6) de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A, Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first - line treatment in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol, **18(16)**, 2938 - 2947 (2000).
7) Adelsberger H, Quasthoff S, Grosskreutz J, Lepier A, Eckel F, Lersch C, The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na+ channel kinetics on rat sensory neurons. Eur J Pharmacol, **406(1)**, 25 - 32 (2000).
8) Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, Ahn DK, Bae YC, Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. J Comp Neurol, **518(5)**, 687 - 698 (2010).
9) Descoeur J, Pereira V, Pizzoccaro A, Francois A, Ling B, Maffre V, Couette B, Busserolles J, Courteix C, Noel J, Lazdunski M, Eschalier A, Authier N, Bourinet E, Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. EMBO Mol Med, **3(5)**, 266 - 78 (2011).
10) Kawakami K, Chiba T, Katagiri N, Saduka M, Abe K, Utsunomiya I, Hama T, Taguchi K, Paclitaxel increases high voltage-dependent calcium channel current in dorsal root ganglion neurons of the rat. J Pharmacol Sci, **120(3)**, 187 - 195 (2012).
11) Mizushima T, Obata K, Katsura H, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Mashimo T, Noguchi K, Noxious cold stimulation induces mitogen-

activated protein kinase activation in transient receptor potential (TRP) channels TRPA1 - and TRPM8 - containing small sensory neurons. Neuroscience, **140(4)**, 1337 - 1348 (2006).

12) Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K, TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. J Clin Invest, **115(9)**, 2393 - 2401 (2005).
13) 山本健，平成 20 年度昭和薬科大学修士学位論文（2009）.
14) Gees M, Owsianik G, Nilius B, Voets T, TRP channels. Compr Physiol, **2(1)**, 563 - 608 (2012).
15) Tominaga M, Caterina MJ, Thermosensation and pain. J Neurobiol, **61(1)**, 3 - 12 (2004).
16) Obata K, Noguchi K, MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. Life Sci, **74(21)**, 2643 - 2653. (2004)
17) Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K, Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. Eur J Neurosci. **20(11)**, 2881 - 2895 (2004)
18) Mizushima T, Obata K, Katsura H, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, Mashimo T, Noguchi K. Intensity-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 in sensory neurons contributes to pain hypersensitivity. J Pharmacol Exp Ther. **321(1)**, 28-34 (2007)
19) Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM, Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. Pain, **59(3)**, 369 - 376 (1994).
20) Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D, Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. Nature, **427(6971)**, 260 - 265 (2004).
21) Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Waxman SG, Okuse K, Lawson SN. Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. J Neurosci. **26(27)**, 7281 - 7292 (2006)
22) Breese NM, George AC, Pauers LE, Stucky CL. Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. Pain, **115(1-2)**, 37-49 (2005)
23) Ling B, Coudoré-Civiale MA, Balayssac D, Eschalier A, Coudoré F, Authier N,

Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. Toxicology, **234(3)**, 176 - 184 (2007).

24) del Camino D, Murphy S, Heiry M, Barrett LB, Earley TJ, Cook CA, Petrus MJ, Zhao M, D'Amours M, Deering N, Brenner GJ, Costigan M, Hayward NJ, Chong JA, Fanger CM, Woolf CJ, Patapoutian A, Moran MM, TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. J Neurosci, **30(45)**, 15165 - 15174 (2010).

25) Zhao M, Isami K, Nakamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S, Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. Mol Pain, **8, 55** (2012).

26) Ling B, Coudoré F, Decalonne L, Eschalier A, Authier N, Comparative antiallodynic activity of morphine, pregabalin and lidocaine in a rat model of neuropathic pain produced by one oxaliplatin injection. Neuropharmacology, **55(5)**, 724 - 728 (2008).

27) Aoki M, Kurauchi Y, Mori A, Nakahara T, Sakamoto K, Ishii K, Comparison of the effects of single doses of elcatonin and pregabalin on oxaliplatin-induced cold and mechanical allodynia in rats. Biol Pharm Bull, **37(2)**, 322 - 326 (2014).

28) Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K, Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with Aδ/C-fibers and colocalization with trk receptors. J Comp Neurol, **493(4)**, 596 - 606 (2005).

29) Hara T, Chiba T, Abe K, Makabe A, Ikeno S, Kawakami K, Utsunomiya I, Hama T, Taguchi K, Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion. Pain, **154(6)**, 882 - 889 (2013).

30) Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Sakagami M, Noguchi K, Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. Exp Neurol, **200(1)**, 112 - 123 (2006).

31) Lanneau C, Green A, Hirst WD, Wise A, Brown JT, Donnier E, Charles KJ, Wood M, Davies CH, Pangalos MN, Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. Neuropharmacology, **41(8)**, 965 - 975 (2001).

32) Jensen AA, Mosbacher J, Elg S, Lingenhoehl K, Lohmann T, Johansen TN, Abrahamsen B, Mattsson JP, Lehmann A, Bettler B, Bräuner-Osborne H, The anticonvulsant gabapentin (neurontin) does not act through gamma-aminobutyric acid-B receptors. Mol Pharmacol, **61(6)**, 1377 - 1384 (2002).

33) Hoppa MB, Lana B, Margas W, Dolphin AC, Ryan TA, α2δ expression sets presynaptic calcium channel abundance and release probability. Nature, **486(7401)**,

122 - 125 (2012).
34) Arikkath J, Campbell KP, Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. Curr Opin Neurobiol, 13(3), **298 - 307** (2003).
35) Geisler S, Schöpf CL, Obermair GJ, Emerging evidence for specific neuronal functions of auxiliary calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits. Gen Physiol Biophys, **34(2)**, 105 - 18 (2015).
36) Marais E, Klugbauer N, Hofmann F, Calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits-structure and Gabapentin binding. Mol Pharmacol, **59(5)**, 1243 - 1248 (2001).
37) Li CY, Zhang XL, Matthews EA, Li KW, Kurwa A, Boroujerdi A, Gross J, Gold MS, Dickenson AH, Feng G, Luo ZD, Calcium channel alpha 2 delta 1 subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. Pain, **125(1-2)**, 20 - 34 (2006).
38) Bauer CS, Nieto - Rostro M, Rahman W, Tran-Van-Minh A, Ferron L, Douglas L, Kadurin I, Sri Ranjan Y, Fernandez-Alacid L, Millar NS, Dickenson AH, Lujan R, Dolphin AC, The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha 2 delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha 2 delta ligand pregabalin. J Neurosci, **29(13)**, 4076 - 4088 (2009).
39) Saif MW, Syrigos K, Kaley K, Isufi I, Role of pregabalin in treatment of oxaliplatin-induced sensory neuropathy. Anticancer Res, **30(7)**, 2927 - 2933 (2010).
40) Matsumoto M, Inoue M, Hald A, Xie W, Ueda H, Inhibition of paclitaxel-induced A-fiber hypersensitization by gabapentin. J Pharmacol Exp Ther, **318(2)**, 735 - 740 (2006).
41) Bauer CS, Nieto-Rostro M, Rahman W, Tran-Van-Minh A, Ferron L, Douglas L, Kadurin I, Sri Ranjan Y, Fernandez-Alacid L, Millar NS, Dickenson AH, Lujan R, Dolphin AC, The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha2delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha2delta ligand pregabalin. J Neurosci, **29(13)**, 4076 - 4088 (2009).
42) Nguyen D, Deng P, Matthews EA, Kim DS, Feng G, Dickenson AH, Xu ZC, Luo ZD, Enhanced pre-synaptic glutamate release in deep-dorsal horn contributes to calcium channel alpha-2-delta-1 protein-mediated spinal sensitization and behavioral hypersensitivity. Mol Pain, **12, 5: 6** (2009).
43) Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, Yaksh TL, Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. J Neurosci, **21(6)**, 1868 - 1875 (2001).
44) Boroujerdi A, Kim HK, Lyu YS, Kim DS, Figueroa KW, Chung JM, Luo ZD, Injury

discharges regulate calcium channel alpha - 2 - delta-1 subunit upregulation in the dorsal horn that contributes to initiation of neuropathic pain. Pain, **139(2)**, 358 - 366 (2008).

45) Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D, Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell, **139(2)**, 267 – 284 (2009).

46) Miyano K, Tang HB, Nakamura Y, Morioka N, Inoue A, Nakata Y, Paclitaxel and vinorelbine, evoked the release of substance P from cultured rat dorsal root ganglion cells through different PKC isoform-sensitive ion channels. Neuropharmacology, **57(1)**, 25 - 32 (2009).

47) Tang HB, Inoue A, Iwasa M, Hide I, Nakata Y, Substance P release evoked by capsaicin or potassium from rat cultured dorsal root ganglion neurons is conversely modulated with bradykinin. J Neurochem, **97(5)**, 1412 - 1418 (2006).

48) Ji G, Zhou S, Carlton SM, Intact Adelta-fibers up-regulate transient receptor potential A1 and contribute to cold hypersensitivity in neuropathic rats. Neuroscience, **154(3)**, 1054 – 1066 (2008).

謝　辞

本論文の主査を御願い致しました臨床薬学教育研究センター応用薬物治療部門・濵本知之教授，副査を御願い致しました薬品作用学教育堀口研究室・堀口よし江教授，薬物治療学研究室・水谷顕洋教授に謹んで御礼申し上げます.

本研究を遂行するに際し，終始丁寧な御指導・御鞭撻を賜り，本論文の御校閲を賜りました，田口恭治名誉教授に厚く御礼申し上げます.

本研究の実施にあたり，御指導・御教示を賜りました日本薬科大学生命医療薬学分野・阿部賢志准教授，薬理学研究室・神戸敏江講師に厚く御礼申し上げます.

さらに，多大な御協力を頂きました臨床薬学教育研究センター医薬品情報部門・山本美智子教授，学習支援室・宇都宮郁教授，日本薬科大学薬学教育推進センター・千葉輝正助教，薬品作用学教育田口研究室の皆様，臨床薬学教育研究センターの先生方に深く感謝致します.

最後に，今日に至るまで様々な面から支えてくれた家族にも心から感謝します.