

シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 高山 昭三 殿

報告者氏名： 野中 美希



研究課題：抗がん剤の副作用を改善するための新規薬剤開発に関する研究
(テーマ) がん患者の QOL 向上そのための基礎研究を臨床開発につなげる橋渡し研究

研究期間： 自 平成 27 年 8 月 1 日

至 平成 28 年 3 月 31 日

研究指導者： 氏名 上園 保仁



公益財団法人 がん研究振興財団

HOPE シニアリサーチフェロー
H27 年度 研究成果報告書

国立がん研究センター研究所 がん患者病態生理研究分野
野中 美希
(研究指導者: 国立がん研究センター研究所
がん患者病態生理研究分野 分野長 上園 保仁)

要旨

ドキソルビシン (DOX) は、様々な新規抗がん剤が開発されている現在においても重要な抗がん剤として多くのがん腫に使用されている。しかし、腫瘍以外の組織、特に心筋組織への重篤な有害作用を持つため、その使用が制限されている。現在のところ、DOX の心毒性に対する画期的な予防薬および症状改善薬は見当たらず、その開発が求められている。摂食促進ホルモンであるグレリンには、アシル化修飾のないデスアシルグレリンがあり、同分子はグレリン受容体への結合能はない。しかし、デスアシルグレリンが近年、心機能改善効果を有する可能性が示唆されてきた。その分子メカニズムについては、特異的受容体が未だ同定されていないため明らかとなっていない。そこで本研究では、DOX による心筋障害および心筋アポトーシスへのグレリン、デスアシルグレリンの効果を比較検討するために、ラット心筋由来 H9C2 細胞を用いた *in vitro* 実験および C57/BL6 マウスを用いた *in vivo* 実験により評価を行った。H9C2 細胞に DOX (0-1 μM) とグレリン (1 μM) あるいはデスアシルグレリン (1 μM) を 72 時間同時処置すると、グレリン、デスアシルグレリンとともに DOX 単独処置で認められる細胞障害を有意に抑制し、その効果はデスアシルグレリンが優位であった。Caspase 3/7 kit を用いたアポトーシスアッセイでは、DOX による細胞障害はアポトーシスによるものであり、グレリン、デスアシルグレリンは、DOX によるアポトーシスを有意に抑制した。マウスを用いた *in vivo* 実験では、DOX によっておこる心筋収縮力の低下を、デスアシルグ

レリンが抑制することが認められた。以上より、グレリン、デスアシルグレリンは *in vitro*において、DOX 誘発性心毒性に対して細胞障害、アポトーシスを抑制し、さらにデスアシルグレリンは *in vivo*での心筋収縮力の低下を抑制する可能性が示唆された。

今後 DOX の心毒性改善薬候補としてのグレリン、デスアシルグレリンの可能性をさらに明らかにしていく。

序

分子標的薬をはじめ抗がん剤の中には心毒性や心血管系に副作用のあるものが少なからず認められており (*Nat Clin Pract Oncol.*, 2008; **5**: 655-667.; *Circ J.*, 2010; **74**: 1779-1786.)、時としてその心毒性は致死的であり、がん患者の Quality of life (QOL) の著しい低下を招く。中でも、アントラサイクリン系薬剤のドキソルビシン (DOX) は古くから使用されている薬剤であり、最も強力で広い抗腫瘍効果をもつ抗がん性抗生素質の一つであるが、その卓越した有効性にもかかわらず、心毒性、特に累積投与量に依存して発症する DOX 心筋症のリスクから治療継続の制限を余儀なくされることが多い。DOX 最終投与後から約 1 年における心機能低下・心不全発症頻度は 3~26% (*Am Coll Cardiol.*, 2009; **53**: 2231-2247.) であり、心不全は不可逆性の病変であるため、発症した場合、奏功する治療薬は現在のところ報告されていない。抗がん剤治療中において嘔気、脱毛といった辛い症状に加え、口内炎、神経性疼痛といった耐え難い痛みに苦しむ患者が、がん治癒後その苦しみから解放され快適な生活を送り、さらに命に直結するような循環器系の副作用を回避するためにも、DOX による心筋症を予防できる薬剤の開発は急務である。

摂食亢進ホルモンであるグレリンは胃から産生される成長ホルモン放出ペプチドで、アシル化修飾を受けているものがグレリン、受けていないものがデスマシルグレリンである (*Nature.*, 1999; **402**: 656-660.)。アシル化修飾のないデスマシルグレリンは

これまで、単にグレリンの不活性型と考えられていたが、近年デスアシルグレリンも様々な生理活性作用を有し、DOX による心筋アポトーシスを抑制することが *in vitro*、*in vivo* 研究で報告され (*J Cell Biol.*, 2002; **159**: 1029-1037.; *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2014; **306**: E311-323.)、心筋症予飭能を有することが期待されている。しかし、デスアシルグレリンはグレリン受容体への結合能はなく、加えて特異的受容体は未だに同定されておらず、詳細な作用メカニズムについて不明な点が多い。そこで、本研究ではラット心筋由来 H9C2 細胞を用いて、*in vitro* における DOX 誘発性心毒性に対するグレリン、デスアシルグレリンの効果を比較検討するとともに、併せてデスアシルグレリンは *in vivo* における治療につながる作用メカニズムの解明について検討を行った。

実験方法

1) 細胞培養

ラット心筋由来 H9C2 細胞は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医化学分野岸田昭世先生より譲渡いただいた。また、グレリン、デスマシルグレリンががん細胞に増殖作用を示すか検討するために用いたヒト肺腺がん由来細胞 PC9 細胞も岸田昭世先生より譲渡いただいた。培地については、H9C2 細胞は 10%FBS、5%P/S を含む high glucose の Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Wako, Japan)、PC9 細胞は 10%FBS、5%P/S を含む Roswell Park Memorial Institute media (RPMI-1640) (Wako, Japan) を使用し、37°C、5%CO₂ の incubator にて培養を行った。

2) 細胞増殖・障害・生存アッセイ

H9C2 細胞、PC9 細胞とともに 96 ウェルプレートに 0.5×10^4 cells/well 播種し、24 時間培養後 DOX (Wako, Japan) 0-1 μM とグレリンまたはデスマシルグレリン (Peptide Institute, Inc., Japan) 1 μM を 72 時間処置した。細胞増殖および障害像を、市販の CO₂ インキュベータ内でタイムラプス画像を全自動で取得・データ解析することができる IncuCyte ZOOM® live-cell imaging (Essen BioScience, Ltd., Japan) に静置し、1 時間ごとに撮影を行い、定量を行った。DOX 処置後 72 時間の細胞を、IncuCyte ZOOM® live-

cell imaging から取り出し、細胞生存アッセイキットである Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japan) を 96 ウェルプレートに添加した 3 時間後に、プレートリーダー (Synergy H1 and Gen5 2.0 software, Bioteck, USA) にて、吸光度 (450 nm) の測定を行った。

3) アポトーシスアッセイ

細胞を 0.5×10^4 cells/well で播種し、DOX、グレリンまたはデスマシルグレリン処置を行った 96 ウェルプレートに CellPlayer 96-Well Kinetic Caspase-3/7 Apoptosis Assay Kit (Essen BioScience, Ltd., Japan)を添加し、 IncuCyte ZOOM® live-cell imaging にて 2 時間ごとに撮影を行い 72 時間まで観察した。このアッセイキットは Caspase3/7 による cleavage site を持った化合物が使用されており、 Caspase3/7 が細胞内で発現すると、化合物が切断され化合物内の Dye 部分が遊離して核へ移行できるようになり、DNA に結合することで蛍光を発するというメカニズムとなっている。つまり蛍光強度の測定がアポトーシスの程度を示す。これらの情報をもとに、 IncuCyte 内の解析システムで定量し、測定を行った。

4) 動物実験

実験動物は 7 週齢で購入した雄性 C57BL/6 マウス（Japan SLC, Inc., Japan）を用い、室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50±10%、明暗条件 12 時間サイクルの一般飼育室に 1 週間馴化後、8 週齢のマウスを実験に供した。実験群は DOX (15 mg/kg) 投与前日より vehicle (生理食塩水) を 1 日 2 回投与した群 (DOX 投与群, N = 3) と、DOX 投与前日より デスアシルグレリン (100 µg/kg) を 1 日 2 回投与した群 (デスアシルグレリン投与群, N = 3) の 2 群とした。DOX は腹腔内へ 1 回投与を行い、vehicle、デスアシルグレリンとともに皮下投与を行った。デスアシルグレリン投与開始日を pre-treatment とし、DOX 投与を行った日を Day0 とした。pre-treatment、Day0、DOX 投与 3 (Day3)、7 (Day7) 日後に心エコー測定を行い、Day7 で全てのマウスを安楽死後、心臓と肺を摘出し、重量測定を行い、心臓は生化学実験用のサンプルに調製した。本研究では、マウスの心機能評価を行う必要があるが、申請者が所属する国立がん研究センター研究所内には心機能評価を行う設備がないため、動物実験は全て順天堂大学医学部薬理学講座（呉林なごみ先生による指導）にて行った。本研究に必要な動物実験の実施については、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)に基づいて制定された順天堂大学動物実験等管理規則を遵守し、順天堂大学医学部実験動物委員会、ならび

に国立がん研究センター動物実験倫理委員会に計画書を提出し、審査を受け許可された後に行った。

5) 心エコー測定

M-mode 心エコー (Vevo[®]2100, Primetech Corporation, Japan) はイソフルラン吸入麻酔下にて測定を行った。

6) 統計解析

データは全て mean \pm SEM で表記し、2 群の比較には unpaired または paired t-test を用い、等分散でない場合は Welch's correction によって解析を行った。3 群以上の群は one-way anova test 後 Dunnett's comparison test を用いて多重検定を行った。

結果

1) H9C2 細胞における DOX 誘発性細胞障害に対するグレリン・デスアシルグレリンの効果

DOX 0-1 μ M とグレリン、デスアシルグレリン 1 μ M を H9C2 細胞に処置し、IncuCyte ZOOM[®] live-cell imaging で細胞増殖および細胞障害を 72 時間観察後、DOX 誘

発性心毒性に対してグレリン、デスアシルグレリンが心筋保護効果を有するか否かを検討するために、Cell Counting Kit-8 を用い評価を行った。DOX72 時間処置により用量依存的に細胞障害および細胞死が起こった (Fig.1A-C)。一方、グレリン、デスアシルグレリンにより、DOX 誘発性細胞障害および細胞死は有意に低下し、その効果はデスアシルグレリンにおいてより優位であった (Fig.1 A-C)。H9C2 細胞においてグレリン、デスアシルグレリン単独処置により細胞増殖が観察されたが、ヒト肺腺がん由来細胞である PC9 細胞では、それらによる細胞増殖は観察されなかった (Fig.1 D)。

2) H9C2 細胞における DOX 誘発性アポトーシスに対するグレリン・デスアシルグレリンの効果

アポトーシスアッセイの結果より、DOX によって起こる細胞死はアポトーシスによるものであることが明らかとなった (Fig.2 A, B)。アポトーシスアッセイの結果も細胞障害、細胞死の結果と同様に、グレリン、デスアシルグレリンにおいて DOX 誘発性心毒性に対して保護効果を示し、特にデスアシルグレリンにおいてその効果は高かった (Fig.2 A, B)。

3) *in vivo* における DOX 誘発心毒性に対するグレリン、デスアシルグレリンの効果

DOX 投与群、デスアシルグレリン投与群のどちらの群においても、DOX 投与後 7

日において体重の低下が認められ、デスアシルグレリン投与群においては投与開始前と比べ有意に低下した (Table 1)。しかし、その差は非常に小さいものであり、今後例数の増加に伴い、有意差は消失することも考えられる。また、心重量・肺重量は、DOX 投与群に比べデスアシルグレリン投与群において有意に低下した (Fig.3 A, B)。

DOX 投与群では、Day7において、左室の収縮末期径 (LVED, s) が投与開始時に比べ有意に拡大しており、また収縮機能の指標となる左室駆出率 (EF) の低下が認められた (Table 1)。一方、デスアシルグレリン投与群では DOX 投与によって起こる収縮機能低下が抑制された (Table 1)。

以上の結果より、グレリン・デスアシルグレリンは *in vitro* において DOX 誘発性心毒性に効果を示し、さらにデスアシルグレリンは *in vivo* においても治療効果を発揮することが明らかとなった。

考察

DOX による心毒性は、ミトコンドリア機能の破壊、ならびに活性酸素種の産生によって心筋アポトーシスが引き起こされる等、様々なメカニズムが提唱されている (*Chem Res Toxicol.*, 2010; **23**, 6-10.; *Adv Exp Med Biol.*, 2012; **942**, 385-419.; *Med Res Rev.*, 2014; **34**, 106-135.)。近年、DOX による心筋症は、Top2 β を介して活性酸素種産生を増やし、心不全へと進展することが明らかとなった (*Nature*, 2012; **18**, 1639-1642)。現在

DOX 治療を行った約 3 割の患者に心機能低下が起こることが報告されており (*Am*

Coll Cardiol., 2009; **53**: 2231-2247.)、その予防薬は上市されていない。

DOX 治療を受けているがん患者の血漿中定常 DOX 濃度は、0.025~0.25 μM であり

(*Pharmacol Rev.*, 2004; **56**, 185-229.)、*in vitro* 実験においては、患者の血中 DOX 濃度

と差異のない範囲 (0.1~1 μM) を用いた。H9C2 細胞を用いた *in vitro* 実験では、血中

DOX 濃度範囲内である 0.1、0.3 μM において、グレリン、デスアシルグレリンとともに

DOX 誘発性の細胞障害、細胞死を抑制し、さらにデスアシルグレリンは 0.5 μM の高

濃度 DOX 処置細胞においても効果を示した。また、グレリン、デスアシルグレリン

による DOX 誘発性細胞障害および細胞死の抑制は、アポトーシスを抑制することに

よって起こっていることを明らかにした。グレリン、デスアシルグレリンによる DOX

誘発性心毒性の抑制効果のメカニズム解明は、今後研究を進めていく予定であるが、

in vitro 実験に供した H9C2 細胞には、グレリン受容体である GHSR1a は発現していない

(*J Cell Biol.*, **159**:1029-1037, 2002.; *Pharmacol Rev.*, 2014; **66**, 984-1001.)。加えて、デ

スアシルグレリンは、GHSR1a への結合能はない (*Nature.*, 1999; **402**, 656-660.)。現在

までにデスアシルグレリン特異的受容体は明らかとなっていないことから、本研究で

見出されたデスアシルグレリンによる、DOX の細胞障害、細胞死およびアポトーシス

抑制効果は、H9C2 細胞にデスアシルグレリン特異的受容体が発現している可能性を強く示唆する。また、H9C2 細胞にはグレリン受容体が発現していないが、グレリン、デ

スアシルグレリンとともに同様の効果を持つことから、グレリン、デスアシルグレリンを共通に結合するサイト、もしくは受容体が同細胞には存在し、H9C2 細胞でのデスアシルグレリン特異的受容体と両者を結合しうる受容体との結合能の違いにより、抑制効果に差が出ている可能性も考えられる。いずれにせよ、これらの細胞をソースとし、デスアシルグレリン特異的受容体を見出せる可能性は極めて高く、長年明らかとなっていないデスアシルグレリン受容体を同定できる可能性を秘めている。がん患者病態生理研究分野は、G protein-coupled receptor (GPCR) を含めたすべての細胞膜受容体活性を評価できる CellKey アッセイシステムを所有しており、この CellKey システムは、新規受容体スクリーニング法の一つとして、当研究分野を始めとして発展応用してきた (*J Pharmacol Sci.*, **126**, 302-309, 2014.)。したがって、同システムを用い、デスアシルグレリン感受性タンパク（デスアシルグレリン受容体）の同定を行えば、同受容体を介したデスアシルグレリンの効果の詳細な解明が可能となり、ひいては DOX 心毒性に対する新規予防薬の臨床開発につながるものと期待している。

抗がん剤治療は予定治療であるため、*in vivo* 実験ではデスアシルグレリン投与による DOX 心毒性予防効果を検討する目的で、デスアシルグレリン投与を DOX 投与前日より開始した。DOX 投与群ではデスアシルグレリン投与群に比べ心重量、肺重量の増加が認められ、さらに収縮機能の著しい低下が認められたが、デスアシルグレリン投

与によりその影響は軽減することができた。DOX 投与による左室内腔の拡張もデスマシルグレリン投与群において抑制傾向となったが、まだ実験個体数が少なくバラつきが大きいため、有意な差は認められなかったものと考えられる。今後例数を増やし DOX 心毒性に対するデスマシルグレリンの治療効果についてさらなる検討が必要である。また、*in vivo* 実験に供したマウスの心筋サンプルは、生化学実験（ウェスタンブロット解析およびリアルタイム RT-PCR）に使用するため採取しており、今後デスマシルグレリンが DOX によって惹起される心機能障害を抑制するメカニズムを解析するために用いる予定である。

以上本研究より、DOX 心毒性に対してグレリン、デスマシルグレリンは治療効果を持つ可能性のある薬剤となることが考えられ、特にデスマシルグレリンは新規 DOX 心筋症予防薬として有力な候補になり得ると考えられる。しかしながら、本研究結果は作用メカニズムの解明にまで至っていないため、今後作用メカニズムを含めた詳細な機能解析ならびに既存の心不全治療薬との比較による治療効果の有益性についての慎重な検討が必要であると考える。

シニア・リサーチフェロ一期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

近年、がん患者の循環器動態の把握ならびに治療の有効性の促進化の点より、心臓

腫瘍学 cardio-oncology という学際領域が確立し、臨床現場でもその取り組みが開始されている。がんサバイバーのフォローアップも含めた心機能の管理とがん治療の両立が注目されている昨今、がん治療の副作用として起こる心毒性は、抗がん剤治療の制限につながるのみならず、生命維持を行う主要臓器としての心臓は、命に直結する場合が多いことを念頭に置くべきである。申請者はこれまで循環器薬理学を専門領域として研究を行ってきたが、がん患者が生きる希望を持てる研究として、抗がん剤、分子標的薬等のがん治療による副作用としての心毒性軽減を行うことは喫緊の課題であり、このシニア・リサーチフェローでの研究を通じて cardio-oncology につながる問題の解決に携わりたく、今回の応募に至った。今年度の研究成果において、グレリン、デスアシルグレリンが DOX 誘発性心毒性に対して一定の治療効果を持つ可能性を示したが、現在のところ DOX 心毒性に対する抑制効果の作用メカニズムや機能的な変化については明らかにできていない。これらの点を今後明らかにすることで、DOX 心毒性に苦しむがん患者を救う予防薬を開発したいと考え、次年度も同課題の継続、発展研究という形で申請を応募したいと考えている。本研究は、グレリン、デスアシルグレリンが抗がん剤である DOX の心毒性を軽減するかを検討することを目的とし、さらにデスアシルグレリンについては臨床薬剤開発にあたり重要な情報となる特異的受容体の同定を目指している。これらの目的を達成するために、順天堂大学医学部薬理学講座の吳林なごみ先生（心機能評価）、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医化学

分野岸田昭世先生（デスマシルグレリン受容体クローニング）、国立循環器病研究センター研究所の所長である寒川賢治先生ならびに再生医療部室長細田洋司先生（グレリン発見者であり循環器系実験の専門家）方からご助言、ご指導を仰ぐことのできる研究体制を整えている。各先生方より本研究についてのチェックをいただきながら、がん研究センターのシニア・リサーチフェローとして、センターのみならず幅広い研究分野の先生方との交流を行い、さらにステップアップできる環境作りを行っている。

この研究体制をさらに充実させ、発展させることで同研究課題の研究成果が加速化されるものと確信している。また、本研究を通じて、これまで以上にがんと心臓、心機能との関係についてますます興味を持つようになり、シニア・リサーチフェローとしての研究を前に進めるため、平成28年度の文部科学省科研費、若手研究Bに『がん悪液質時的心機能評価と、心機能改善薬の開発を目指す』内容の申請を提出していたところ、今春採択の運びとなった。本邦では循環器管理とがん治療に関する研究、臨床の整備が欧米に比べ遅れているのが実情であり、本研究課題の実績を通して、同研究がその先駆けとなれるよう精進したい。がん自体および抗がん剤の副作用等で起こる心機能障害で苦しむ全てのがん患者に、QOLを向上させる手法の新規開発ということで希望を持ってもらえるような研究を今後も真摯に進めていきたい。

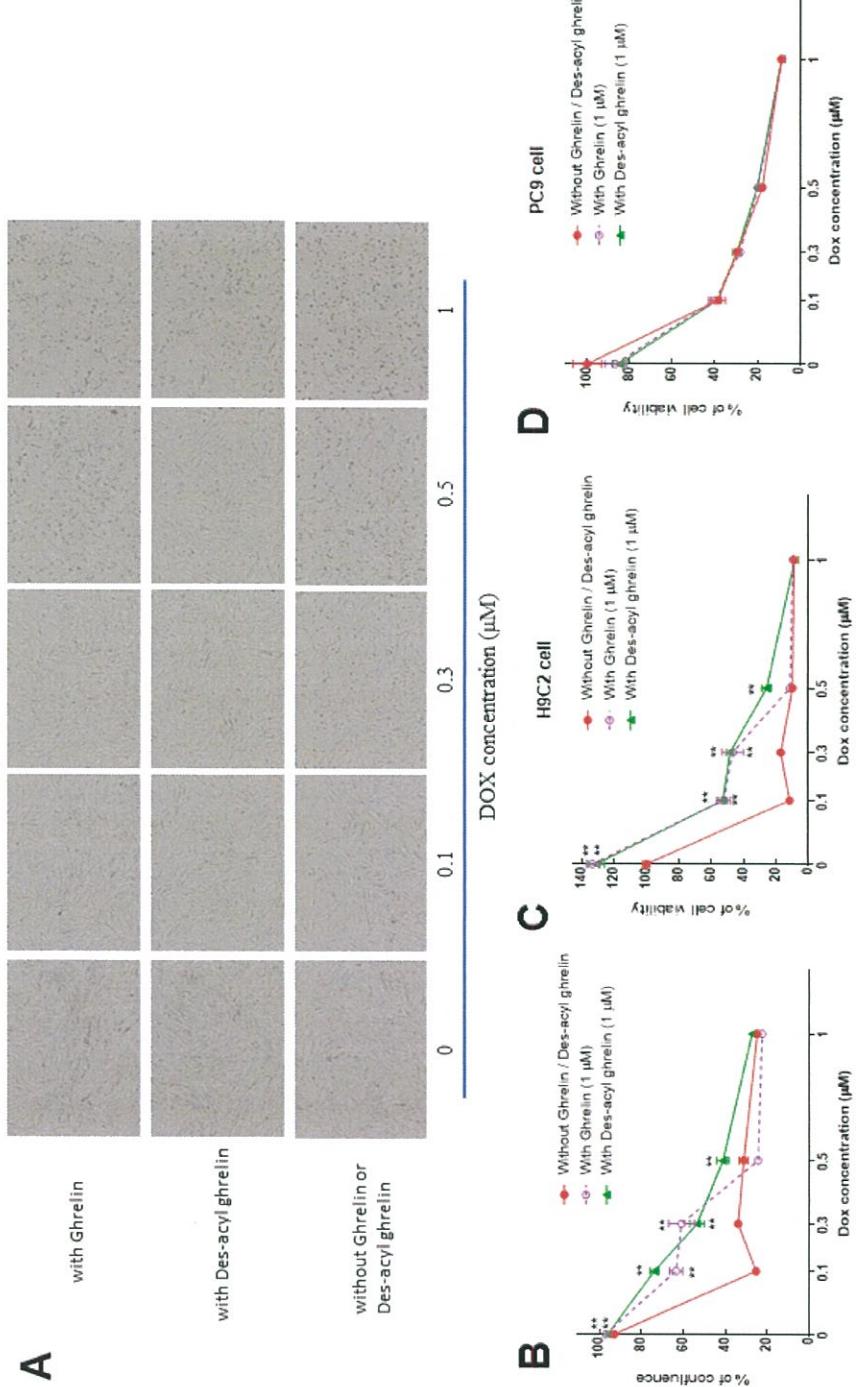


Fig.1 Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin treatment of H9C2 cardiomyocytes on the DOX-induced cell damage and cell death. (A) H9C2 cells were treated with Dox for 72h with or without ghrelin or des-acyl ghrelin. Images from the ZOOM® live-cell imaging with H9C2 cell were shown. (B) Ghrelin and des-acyl ghrelin protected against DOX-induced cell damage and cell death in H9C2 cardiomyocytes. The cell confluent were calculated using the IncuCyte ZOOM® live-cell imaging. **p < 0.01 for each group versus DOX treatment (one-way ANOVA followed by the post hoc Dunnett's comparison test); N=5 / each groups. (C) The surviving numbers of cells were measured using the Cell Counting Kit-8. **p < 0.01 for each group versus DOX treatment (one-way ANOVA followed by the post hoc Dunnett's comparison test); N=4 of H9C2 cardiomyocytes and, (D) N= 3 of PC9 cell in each group.

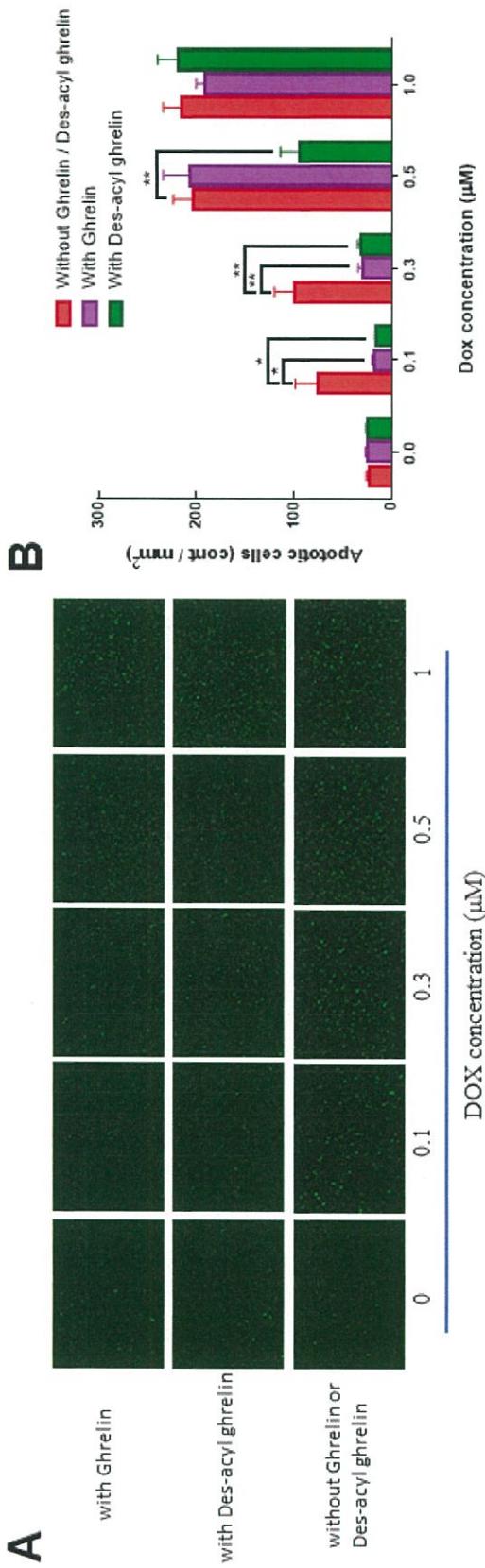
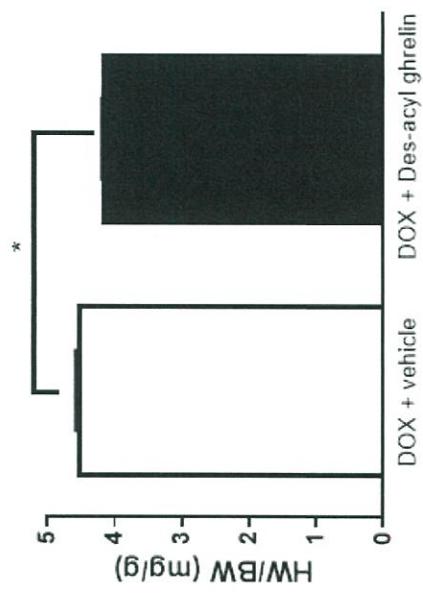


Fig. 2 Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin treatment of H9C2 cardiomyocytes on the DOX-induced apoptosis. Dox with or without ghrelin or des-acyl ghrelin were treated for 72h, and apoptotic cells were analyzed by the IncuCyte ZOOM® using CellPlayer 96-well Caspase-3/7 apoptosis assay kit. (A) Images from the ZOOM® live-cell imaging with H9C2 cell were shown. (B) Ghrelin and des-acyl ghrelin significantly inhibited the DOX-induced apoptosis. *p < 0.05, **p < 0.01 for each group versus DOX treatment (one-way ANOVA followed by the post hoc Dunnett's comparison test); N=4-5 / each groups.

A



B

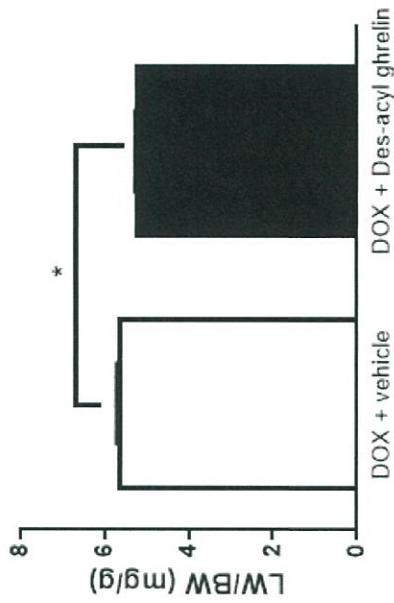


Fig.3 Effects of des-acyl ghrelin treatment on the DOX-treated mice. Mice were treated with DOX (15 mg/kg, i.p.) with des-acyl ghrelin (100 µg/kg, s.c., BID) or vehicle (saline, s.c., BID). (A) Effects of des-acyl ghrelin treatment on the heart and (B) lung weight of DOX-treated mice (N=3 mice/group). *p < 0.05 vs. vehicle treatment (unpaired t-test).

Table 1. Echocardiographic parameters.

	DOX + vehicle-treated		DOX + Dec-acyl ghrelin-treated (100 µg / kg / BID)	
	pre-treatment	Day 7	pre-treatment	Day 7
No. of mice	3	3	3	3
BW, g	23 ± 0.42	22 ± 0.12	23 ± 0.55	22 ± 0.52*
HR, bpm	419 ± 12	441 ± 27	350 ± 27	417 ± 41
IVST, d, mm	0.76 ± 0.03	0.79 ± 0.08	0.73 ± 0.03	0.67 ± 0.06
LVED, d, mm	3.58 ± 0.12	4.02 ± 0.22	3.69 ± 0.20	3.62 ± 0.29
LVED, s, mm	2.20 ± 0.07	3.06 ± 0.18*	2.40 ± 0.16	2.50 ± 0.21
LVPW, d, mm	0.71 ± 0.08	0.61 ± 0.05	0.77 ± 0.10	0.70 ± 0.02
LVPW, s, mm	0.96 ± 0.10	0.77 ± 0.06	1.00 ± 0.07	0.89 ± 0.05
EF, %	70 ± 2	48 ± 2*†	65 ± 1	59 ± 2

BW, body weight; HR, heart rate; IVST, interventricular septal wall thickness; LV, left ventricular; LVED, d, LV end-diastolic dimension; LVED, s, LV end-systolic dimension; LVPW, d, LV end-diastolic posterior wall thickness; LVPW, s, LV end-systolic posterior wall thickness; FS, fractional shortening; EF, ejection fraction.

*p < 0.05 vs. the value before treatment (paired t-test); † p < 0.05 vs. vehicle treatment (unpaired t-test).