

論 文 要 旨

Up-regulation of matrix metalloproteinase-3 in the dorsal root ganglion of rats with paclitaxel-induced neuropathy

〔パクリタキセルによる末梢神経障害ラットの脊髄後根神経節におけるマトリックスメタロプロテアーゼ3の発現増加〕

西田 健太郎

【序論および目的】

Taxus brevifolia の樹皮抽出液から単離された paclitaxel は、細胞内微小管を安定化することにより、細胞分裂を阻害する抗悪性腫瘍薬の一つとして、臨床で使用されている。しかし、副作用として末梢神経障害や白血球減少症が高頻度に発生し、特に末梢神経障害は、用量規制因子であるため、患者 QOL を著しく低下させることが問題となっている。

近年、paclitaxel による末梢神経障害モデルラットの脊髄後根神経節において、マクロファージの集積・活性化が報告された。また、神経傷害性疼痛モデル動物において、マクロファージを枯渇させることにより、痛覚過敏が減弱されると報告された。これらのことより、脊髄後根神経節におけるマクロファージの集積・活性化は、痛みの形成・維持に関与していると考えられる。しかしながら、マクロファージの集積・活性化の機序については未だ不明である。

本研究では、paclitaxel による末梢神経障害の脊髄後根神経節において、マクロファージ活性化に関与する候補遺伝子を探るために、末梢神経障害モデルラットを作成し、マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、候補分子の詳細な検討を *in vivo* 並びに *in vitro* レベルで行った。

【材料および方法】

SD 系ラット (200-300 g) に paclitaxel (32 mg/kg) を腹腔内投与し、末梢神経障害モデルラットを作製した。末梢神経障害の行動学的評価は、von Frey 式 dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile) による機械刺激試験にて行った。また、脊髄後根神経節における傷害の影響を調べるために、抗 ATF3 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

Paclitaxel による末梢神経障害モデルラットの後根神経節における網羅的遺伝子発現解析は、Rat Genome 230 2.0 を用いたクラボウ DNA マイクロアレイ解析にて行った。また、後根神経節でのマトリックスメタロプロテアーゼ 3 (MMP-3) 発現は半定量 RT-PCR 法、ウエスタンブロット法及び免疫組織染色により検討した。さらに、マクロファージ活性化への MMP-3 の影響を検討するため、活性酸素蛍光検出試薬 (Hydroxyphenyl Fluorescein, HPF) による蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡で検出した。

【結果】

Paclitaxel による末梢神経障害モデルラットの作成を行い、末梢神経への影響を行動学的に評価した。von Frey 式機械刺激試験にて検討したところ、paclitaxel 投与 1 日目には、対照群と paclitaxel 投与群に痛覚閾値の変化は認められなかった。しかし、10 日目では対照群に比べ、paclitaxel 投与群において、痛覚閾値の低下が認められた。続いて paclitaxel による末梢神経障害モデルラットの後根神経節における神経傷害を既報に基づき抗 ATF3 抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、paclitaxel 投与群において、有意な ATF3 陽性の核数の増加が認められた。

続いて、確立した末梢神経障害モデルラットの後根神経節の mRNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、MMP-3 やマクロファージ関連遺伝子 (CD163) の発現が有意に増加していた。次に、MMP-3 の mRNA 並びにタンパク質発現をそれぞれ半定量的 RT-PCR 法、ウエスタンブロット法にて解析し、mRNA 発現の増加した MMP-3 は、タンパク質レベルで活性化されていることを明らかにした。

さらに、免疫組織染色により、MMP-3 様免疫活性は、神経細胞の細胞体で認められた。しかし、Iba1 様免疫活性とは共存関係を示さなかった。免疫組織染色を用い、経時的な MMP-3 並びに Iba1 様免疫活性を検討したところ、paclitaxel 投与 6 日目において MMP-3 様免疫活性が神経細胞体において認められた。一方、Iba1 様免疫活性陽性細胞は、10 日目の対照群に比べ、6 日目の paclitaxel 投与群では変化しなかったが、8 日目並びに 10 日目においては増加していた。

最後に、*in vitro* 実験系を用いて、MMP-3 のマクロファージ活性化への影響を検討し、MMP-3 がマクロファージを活性化し、活性酸素種を発生することが明らかとなった。

【結論及び考察】

この研究では、paclitaxel による末梢神経障害モデル動物を確立し、その後根神経節の網羅的遺伝子発現解析を行い、増加した遺伝子の中で MMP-3 に注目した。既報より、paclitaxel 投与ラットの後根神経節においてマクロファージが集積すること、マクロファージを枯渇させた神経傷害性疼痛モデルラットでは、疼痛行動が減弱されることが明らかとなっている。したがって、本研究は、後根神経節におけるマクロファージの集積・活性化のメカニズムを解明することにより、抗がん剤による末梢神経障害の新たな作用機序に基づく治療薬の開発につながる可能性を有している。

はじめに、paclitaxel 処理したラットにおける末梢神経障害を行動学的 (von Frey 試験) 並びに免疫組織化学的解析を行い、知覚神経異常を認める末梢神経障害モデル動物を作成した。そのモデルラットの後根神経節における網羅的遺伝子発現解析を行い、有意に増加した遺伝子の中で MMP-3 に注目した。これまでに、*In vitro* において、MMP-3 はミクログリア細胞を活性化することが報告されている。今回の研究により、後根神経節における MMP-3 の発現局在は、大型神経細胞体において認められた。しかし、シュワン細胞、マクロファージ及び衛星細胞において認められなかった。また、後根神経節における経時的 MMP-3 並びに Iba1 (マクロファージマーカー) の発現を検討した。MMP-3 陽性の神経細胞体は paclitaxel 投与 6 日目で認められた。一方、Iba1 陽性細胞 (マクロファージ) の細胞密度の増加は、paclitaxel 投与 8 日目より観察された。すなわち、神経細胞体において増加する MMP-3 は、マクロファージの集積より以前に認められた。さらに、*in vitro* において、MMP-3 はマクロファージを活性化させ、活性酸素種を誘導した。これらの結果より、paclitaxel による末梢神経障害では、後根神経節における MMP-3 の増加とそれに伴うマクロファージの活性化が起きていると考えられた。したがって今後、MMP-3 の活性阻害が新たな治療標的になる可能性を有することが示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 45 号	学位申請者	西田 健太郎
審査委員	主査	秋山 伸一	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	中河 志朗	副査 宮田 篤郎
	副査	夏越 祥次	副査 西山 賢龍

Up-regulation of matrix metalloproteinase-3 in the dorsal root ganglion of rats with paclitaxel-induced neuropathy

(パクリタキセルによる末梢神経障害ラットの脊髄後根神経節におけるマトリックスメタロプロテアーゼ3の発現増加)

抗悪性腫瘍薬 paclitaxel (Taxol[®]) の人体への投与によって、刺痛、しびれ感、知覚麻痺、冷覚過敏などを症状とする神経系の副作用 (末梢神経障害) が臨床上問題となっている。末梢神経障害の原因としては、神経細胞の微小管障害による軸索障害説が考えられている。一方、paclitaxel による末梢神経障害患者に微小管障害が認められないとする報告もあり、未だ特定の原因は明らかにされていない。近年、paclitaxel を投与したラットの脊髄後根神経節において、マクロファージの集積および活性化が報告され、脊髄後根神経節内における神経細胞と非神経細胞との相互作用が末梢神経障害に関与するという説 (神経節障害説) が示された。しかしながら、マクロファージ集積および活性化のメカニズムは不明である。

本研究では、マクロファージを活性化させる因子の探索を目的として検討を行い、以下の知見を得た。

① Paclitaxel による末梢神経障害ラットの脊髄後根神経節における網羅的遺伝子発現解析を行った。増加した遺伝子の中から、培養ミクログリア細胞を活性化し TNF- α (炎症メディエーターの一つ) を誘導させるとの報告がある matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) に注目した。

In vivo において、paclitaxel 投与により、

- ② MMP-3 mRNA 発現および活性型 MMP-3 タンパク質が増加した。
- ③ MMP-3 は脊髄後根神経節の大型神経細胞の細胞体に局在していた。
- ④ MMP-3 の発現増加時期はマクロファージの集積より時間的に先行していた。

In vitro において、

- ⑤ 活性型 MMP-3 は Raw264 マクロファージ細胞を活性化し、活性酸素を発生させた。

今回の結果から、paclitaxel による末梢神経障害ラットの脊髄後根神経節において、MMP-3 の発現が増加することを明らかにし、*in vivo* において、MMP-3 の増加はマクロファージを活性化させていると推察された。これまでに、神経を損傷させた疼痛モデルラットにおいて、マクロファージの枯渇により、痛覚過敏行動が改善されることが報告されている。故に、MMP-3 の発現増加は、マクロファージの集積が関与する末梢神経障害の引き金になる可能性があると考えられる。

本研究は、paclitaxel を投与したラットの脊髄後根神経節において、初めて網羅的遺伝子発現解析を行い、MMP-3 の発現増加を明らかにした。Paclitaxel は使用頻度の高い抗悪性腫瘍薬の一つであり、本研究成果は MMP-3 を新たな標的とした paclitaxel による末梢神経障害の治療への可能性を示した点が臨床的に意義深い。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 45 号		学位申請者	西田 健太郎
審査委員	主査	秋山 伸一	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	中河 志朗	副査	宮田 篤郎
	副査	夏越 祥次	副査	西山 賢龍

主査および副査の5名は、平成20年6月10日、学位申請者 西田 健太郎 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 本研究で使用した paclitaxel の投与量は、どのように決めたのか？

(回答) Authier らの報告に基づき 32 mg/kg とした。

質問2) von Frey test はアロディニアを検討したことになるのではないか？

(回答) 本検討と同様の装置を用いた機械刺激試験として Motta らの報告があり、その報告では mechanical hyperalgesia として解釈している。また、IASP による痛覚過敏の定義は、"An increased response to a stimulus which is normally painful." である。一方、アロディニアの定義は、" Pain due to a stimulus that does not normally provoke pain." である。故に、本検討における機械刺激試験は痛覚過敏であると判断した。

質問3) 機械刺激試験で1日目と10日目の結果を示しているが、10日目までの途中経過は検討していないのか？

(回答) 今回の投与量 32 mg/kg では検討していない。しかし、paclitaxel 8 mg/kg による検討は実施しており、3日目では痛覚過敏が認められないが、6日目より痛覚過敏を認めている。

質問4) Paclitaxel が MMP-3 を誘導するメカニズムは何か？

(回答) 申請者は、培養神経細胞 (PCI2, SH-SY5Y 及び Neuro-2a) に paclitaxel を作用させ、MMP-3 の誘導について検討を行った。その結果、いずれの細胞においても MMP-3 の誘導は認められなかった。したがって、少なくとも paclitaxel が直接神経細胞に影響している可能性は低いと考えられる。しかしながら、上記3種の培養神経細胞はいずれも株化された細胞であるため、脊髄後根神経節の初代培養神経細胞を用いた実験では異なる結果となる可能性は否定できない。

質問5) Paclitaxel による直接障害とマクロファージによる障害では、どちらの寄与が大きいと考えるか？

(回答) Wiernik らにより、paclitaxel による末梢神経障害患者の腓腹神経生検で軸索やシュワン細胞において微小管の凝集は認めないと報告されている。また *In vitro* 試験において、軸索輸送は臨床的な paclitaxel の用量 854 ng/mL で障害されないと報告されている。一方、高用量の paclitaxel 10 µg/mL では軸索輸送阻害が報告されている。以上のことから、paclitaxel の用量が高い場合は直接作用の寄与が高く、低用量ではマクロファージによる障害の寄与が高いと考えている。

質問6) MMP-3 阻害剤を *in vivo* で使用した報告又はデータはないのか？

(回答) Paclitaxel による末梢神経障害モデルでの MMP-3 阻害剤を用いた報告はない。しかし、神経損傷モデルにおいて、MMP-3 阻害活性を有する minocycline の投与が痛覚過敏やアロディニアを減弱させることが報告されている。また、予備実験の段階であるが、申請者は minocycline を用いた検討を行い、paclitaxel による痛覚過敏の改善傾向を認めている。

最終試験の結果の要旨

質問7) 臨床では、paclitaxel 投与後3-4日目に末梢神経障害が生じる場合が多い。今回の実験では10日目で認めているが、この違いをどう考えるのか？

(回答) 検出感度の違いによると考えている。今回は動物の機械刺激に対する反応を指標としている。一方、臨床では症状から末梢神経障害を容易に疑うことができる。したがって、ヒトでは、動物よりも初期段階から末梢神経障害を判断することができると思う。

質問8) 臨床上 paclitaxel による化学療法ではステロイドを前処置するが、ステロイドはマクロファージの遊走を抑える作用があるのか？

(回答) ステロイドの作用として、好中球遊走抑制、抗炎症及び免疫抑制等がある。したがって、臨床上はステロイドによりマクロファージの遊走を抑えていると考えられる。

質問9) Paclitaxel による MMP-3 の発現増加は、脊髄後根神経節に特異的であるのか？ 脳の神経細胞では検討したのか？

(回答) 脊髄における検討を行ったが、MMP-3 の発現増加は認められなかった。したがって、脊髄よりも後根神経節に特異的であると考えられる。また、培養神経細胞を用いて検討を行ったが、MMP-3 の発現増加は認められなかった。

質問10) 今回の末梢神経障害ラットでマクロファージの集積や MMP-3 の発現増加はいつまで持続するのか？

(回答) Paclitaxel 8 mg/kg による末梢神経障害ラットにおいて、28日目まではマクロファージの集積や MMP-3 の発現増加が認められたが、84日目(12週間)ではいずれについても認められなかった。

質問11) ATF3 はどのような作用を示すのか？

(回答) ATF3 は、放射線、紫外線、TNF- α など様々な刺激に応答する誘導型転写因子である。2000年 Tsujinori により、脊髄後根神経節における神経傷害マーカーとなることが報告された。また、paclitaxel による末梢神経障害ラットにおいても ATF3 陽性細胞数の増加が報告された。

質問12) 治療にはどの部分が標的になりうるのか？

(回答) MMP-3 の酵素活性を阻害する部分が標的になると考える。なぜなら、マクロファージの活性化を抑制することができるためである。神経損傷モデルラットにおいて、マクロファージを枯渇させると痛覚過敏行動が改善されると報告されている。故に、MMP-3 阻害によるマクロファージの活性化抑制は、痛覚過敏行動を改善できると考えられる。

質問13) Minocycline の神経節への局注はしたのか？

(回答) 後根神経節への局所投与は行っていない。Minocycline は組織移行性の高い薬物であるため、予備試験においては経口投与にて行った。しかし、経口投与に比べ、局所投与をすることで minocycline の効果を直接検討することができるため今後検討したいと考える。

質問14) *In vitro* 試験において、MMP-3 がマクロファージを活性化させるメカニズムは？

(回答) 本検討より、MMP-3 の酵素活性が重要であることが明らかとなった。マクロファージ細胞内での活性化メカニズムについては今後の検討課題である。現在、アポシニン(NADPH オキシダーゼ阻害薬)による検討を行っている。

質問15) 本研究で申請者自身に関与したものはどの実験か？

(回答) 本研究で申請者は、外注したマイクロアレイ解析を除く、全ての実験に関与した。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。