

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索するために、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。