

## 2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	<b>オキサリプラチン癌化学療法における眼症状発生メカニズムの解明 -角膜神経興奮性異常とマスト細胞活性化を基軸とした新たな提唱-</b>
キーワード	① がん化学療法、② 副作用、③ 角膜神経

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	キヨイ タケシ 清井 武志
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	金沢医科大学 医学部 薬理学・助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	金沢医科大学 医学部 薬理学・助教
プロフィール	前職の大学技術職員（実験病理、蛍光イメージング、電子顕微鏡関連業務を担当）を経て、2021年8月より現職に赴任しました。現在は、角膜感覚神経による前眼部の機能維持に関する研究を神経科学的な視点より進めています。抗悪性腫瘍薬の副作用として生じる眼症状やドライアイを研究題材としており、末梢の前眼部のみならず、角膜感覚神経の細胞体が存在する三叉神経節および投射先の三叉神経核も調査対象としています。常に研究成果をもって社会に貢献する研究者を目指します。

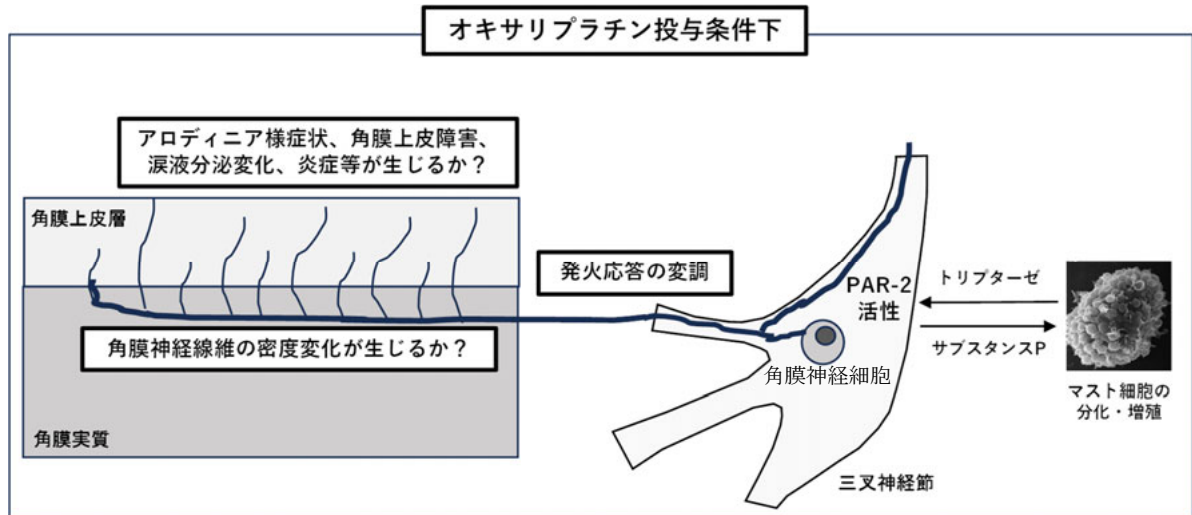
### 1. 研究の概要

白金製剤に分類されるオキサリプラチンを用いた癌化学療法では、一般的に感覚異常、知覚不全などの末梢神経障害が副作用として問題となる。また近年、オキサリプラチン投与患者で角膜における神経線維の密度が増加傾向であることが指摘されており、末梢神経障害の程度と相関することが示唆されている。しかしながら、神経線維の分布変化が眼症状にどのような影響を及ぼすのかは明らかにされていない。角膜で高密度に分布する神経線維は、眼表面の知覚のみならず角膜上皮層の恒常性維持や涙液分泌に関与することからも、神経線維の形態変化に伴う機能的な役割を理解することは重要である。

一方で、オキサリプラチンを用いた癌化学療法時に生じる皮膚アロディニア（疼痛を伴う感覚異常）は、その発症に後根神経節におけるマスト細胞の分化・増殖および活性化の関与が指摘されている。感覚神経C線維から遊離されるサブスタンスPは、マスト細胞の受容体を介してトリプターゼを含む各種メディエーターを遊離する。そして、遊離トリプターゼが感覚神経の protease-activated receptor (PAR-2)を活性化し、感覚神経の発火応答に変調をきたすことが次第に明らかになってきた。しかしながら、同様に求心性一次感覚神経である角膜感覚神経の細胞体が存在する三叉神経節においては、マスト細胞によるそのような調節機構を有するのかが不明である。

本研究では、実験動物（ラット）へのオキサリプラチン投与試験を実施し、三叉神経節においても後根神経節と同様、マスト細胞の分化・増殖および活性化を介した感覚神経の変調と、前眼部にアロディニア様症状を生じ得るのかについて考察を試みた。

図1) 本研究課題の概要図



## 2. 研究の動機、目的

現在、オキサリプラチンを含むいくつかの抗悪性腫瘍薬の副作用として生じる眼症状（上皮障害、眼痛、涙液分泌異常、炎症など）について、神経因性要素に着目した成因解明を目指している。癌化学療法時に生じる眼症状は、癌患者の生活の質（QOL）を著しく低下させることから、その発生メカニズムを解明して適切な対処法を確立することは喫緊の課題である。

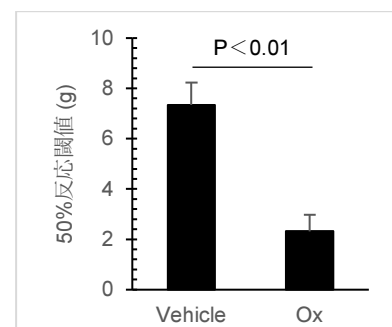
本研究では、実験動物（ラット）へのオキサリプラチン投与試験を実施し、角膜の神経線維の分布変化と、それに伴う前眼部の知覚異常、涙液分泌異常、上皮障害等が生じるのかを検証した。また、三叉神経節における神経炎症とマスト細胞の分布様式についても組織学的な変化が生じているのかを調査した。「オキサリプラチンによる、マスト細胞の活性化を介した角膜感覚神経の興奮異常が眼症状に影響を及ぼす」という、これまで検討されてこなかった独自の切り口から抗悪性腫瘍薬による眼症状のメカニズム解明にアプローチした（図1）。

## 3. 研究の結果

### ➤ 動物モデルの確立

6週齢 Wistar ラットを用いて、オキサリプラチン投与群（Ox 群）とコントロール群（Vehicle 群）との眼症状について比較を行った。Ox 群では5%グルコースに溶解した4 mg/kg オキサリプラチンを週2回（計4週間）、Vehicle 群では5%グルコースを同期間、腹腔投与を行った。投与期間経過後に von Fray 試験を実施し、Ox 群では後足に痛覚過敏を認めたことから、本動物モデルはオキサリプラチン誘発性の末梢神経障害モデルとして成立していると判断した（図2）。

図2) 後足の疼痛試験



### ➤ 前眼部の解析

はじめに、前眼部の症状を確認するため、痛みや不快感の指標となる瞬目回数、フェーノールレッド糸を用いた涙液量、フルオレセイン染色による上皮障害スコアを計測したところ、2群間で有意差を認めなかった（図3-a-c）。また、角膜を含む眼表面の組織学的解析においても、上皮障害、炎症像および神経線維の密度（図3-d）について、2群間で有意差を認めなかった。以上のことから、本動物モデルは行動学および組織学的な違いを前眼部に認めなかった。

図 3-a) 瞬目回数

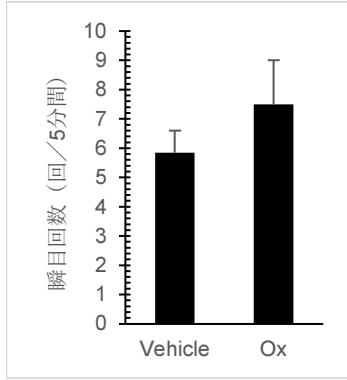


図 3-b) 涙液量

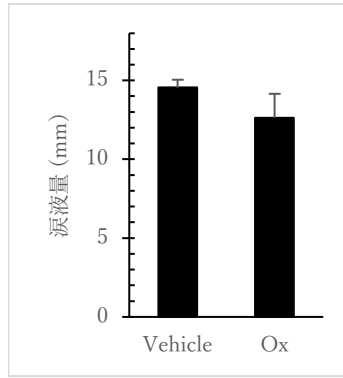


図 3-c) 角膜上皮障害スコア

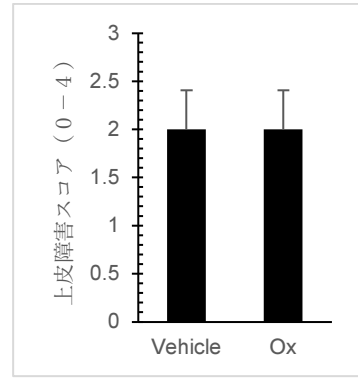
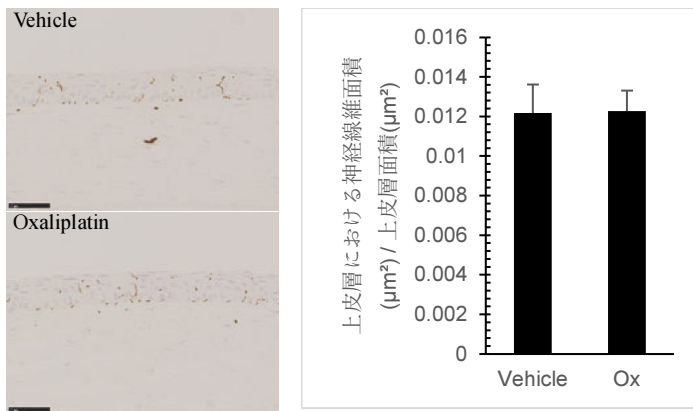


図 3-d) 角膜上皮層における神経線維面積率 ( $\beta$ 3-Tubulin 免疫染色)



### ➤ 三叉神経節の解析結果

三叉神経節の免疫組織学的解析により、神経炎症マーカーである GFAP 陽性アストロサイトおよび Iba1 陽性ミクログリアの発現は、2 群間で有意差を認めなかった。また、Mast cell tryptase 陽性のマスト細胞数も 2 群間で有意差を認めなかった。(図 4 a-c)。

図 4-a) GFAP 陽性面積率 (アストロサイト)

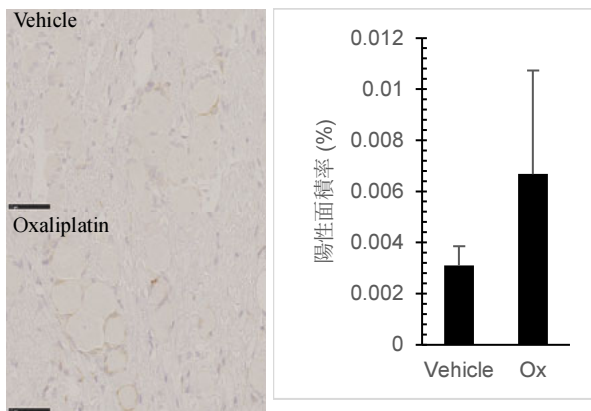


図 4-b) Iba1 陽性面積率 (ミクログリア)

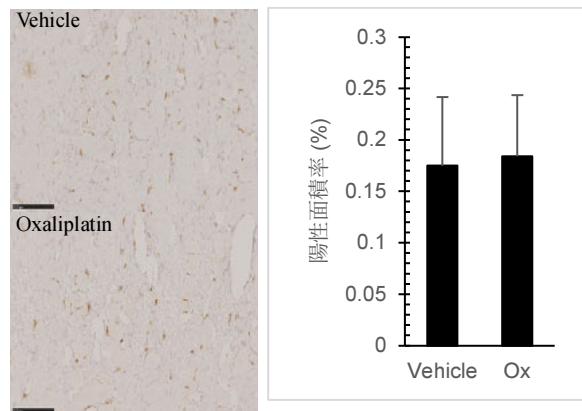
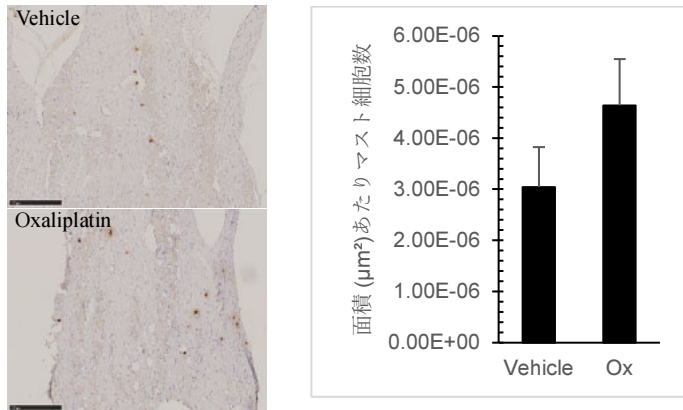


図 4-c) 面積あたりの Mast cell tryptase 陽性細胞数 (マスト細胞)



#### 4. 研究者としてのこれからの展望 (考察を含む)

今回作製したオキサリプラチン誘発性の末梢神経障害モデルラットでは、前眼部の異常を検出することができませんでした。また、三叉神経節における神経炎症マーカーとマスト細胞数の増加を予想していましたが、2群間で差を認めませんでした。近年、オキサリプラチンの投与を行ったマウスの三叉神経節において、神経活動マーカーの指標である c-Fos の発現上昇が報告されています (Pereira *et al*, 2021)。したがって、オキサリプラチン投与により三叉神経節の感覚神経細胞に何らかの変調をきたす可能性は完全に否定できません。引き続き追試を行うと共に、三叉神経節の感覚神経細胞を単離して作製する初代培養細胞を用いて、より詳細な解析を進めたいと考えています。

後根神経節の感覚神経細胞においては、オキサリプラチン投与により温度感受性侵害受容チャネル (TRPV1、TRPM8 および TRPA1 など) の生理活性に変化を生じることが明らかになっています。また近年、TRP チャネルを介した神経細胞の応答異常が、眼痛や不快感などの感覚制御のみならず、涙液分泌異常や炎症を伴う上皮障害にも影響を及ぼすことに関心が高まっています。オキサリプラチン投与は後根神経節のみならず、「三叉神経節の感覚神経細胞においても、温度感受性侵害受容チャネルの変調を介した応答異常を生じさせるのか」という問いも同時に掲げて調査を進める予定です。

#### 5. 支援者 (寄付企業等や社会一般) 等へのメッセージ

本研究は、臨床現場の癌化学療法時に問題となる、副作用としての眼症状について新たな知見を得るための基礎研究です。本助成を受けて開始した実験動物へのオキサリプラチン単剤の投与試験では、眼症状の副作用に関わる顕著な所見を得ることができませんでした。実際の臨床現場では癌患者の背景は多様で、複数種類の投薬を組み合わせたレジメンで治療が行われています。そのため、どこに眼症状の副作用の成因があるのかを理解するのは単純ではありません。今回得られたネガティブなデータもまた貴重で新たな発見であることに相違なく、今後の研究計画の立案と遂行に向けて大いに役立ちます。どのようなメカニズムで抗悪性腫瘍薬による眼症状が生じるのかを明らかにするため、さらに詳細な解析を進めます。将来的には得られた研究成果を基軸として、癌化学療法時の副作用の緩和に資する対処法の確立に繋がりたいと考えています。ご支援いただき、誠に有難うございました。