

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	神田 恵
<p>学位論文題目</p> <p>Gene transfer of glutamic acid decarboxylase 67 by HSV vectors suppresses neuropathic pain induced by HIV gp120 combined with ddC in rats</p> <p>(Herpes simplex virus ベクターを用いたグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD67) の遺伝子導入は、HIVエンベロープ蛋白 gp120 と抗レトロウイルス薬 ddC により誘発されたラットの神経障害性疼痛を抑制する)</p> <p>共著者名</p> <p>Hirotsugu Kanda, Wan Huang, Shue Liu, Hyun Yi, Keith A. Candiotti, David A. Lubarsky, Roy C. Levitt, Shuanglin Hao</p> <p>Anesthesia &amp; Analgesia 掲載予定 (まだ掲載されていないが、掲載証明を添付)</p> <p>研究目的</p> <p>痛みを伴うHIV関連性感覚神経障害は、HIV感染関連の遠位性感覚神経性多発ニューロパシーと抗レトロウイルス療法の神経毒によるニューロパシーから構成される。現在のHIV患者に対する薬物療法は、部分的な鎮痛をもたらすのみの効果である。HIV関連性神経障害性疼痛の神経病理学的なメカニズムはほとんど明らかになっていないが、末梢神経傷害後のGABA作動系抑制系の減少が報告されている。本研究では、HIVgp-120と抗レトロウイルス療法が脊髄のGABA作動性抑制系を減弱させ、GABA作動系抑制系の正常化によりラットのHIV関連性神経障害性疼痛を抑制するかどうかを調査した。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

遺伝子組み換えのHIV-1エンベロープ蛋白であるgp120をラットの坐骨神経に投与し、抗レトロウイルス薬剤の1つであるddcを投与し、gp120とddc投与の1週間後に、GAD67をコードするHerpes simplex virus (HSV)ベクターのQHGAD67もしくは、コントロールベクターであるQ0ZHGをラットの後ろ足の足底部皮下に注射した。機械刺激閾値はvan Freyフィラメントを後ろ足に使用して測定し、up-and-down法を用いた。神経障害性疼痛における薬剤のくも膜下投与の影響を調べるため、麻酔下にくも膜下カテーテルを挿入し、GABAレセプター作動薬であるmuscimolとbaclofenをくも膜下に投与した。gp120投与と同側のL4-5のDRGおよび脊髄を迅速に取り出し、ウェスタンブロット法を用いてGAD67の発現を調査した。一次抗体はmouse anti GAD67 と mouse anti- $\beta$ -actinを使用した。二次抗体に浸した後、chemiluminescence solutionを用いて検出した。プロットの定量化は化学発光法を用いて行った。MitoSox Red(ミトコンドリアのスーパーオキシドの指標)をくも膜下投与し、蛍光顕微鏡を用いて脊髄のMitoSox陽性細胞を調べた。脊髄後角のGABA、pCREB、pC/EBP $\beta$ の分布を免疫染色法で調べた。一次抗体は、rabbit anti-GABA、rabbit anti-pCREB、anti-pC/EBP $\beta$ を用い、二次抗体はfluorescent anti-rabbit IgGを用いた。化学発光によるGABA免疫反応(GABA-IR)、pCREBの免疫反応(pCREB-IR)、C/EBP $\beta$ の免疫反応(pC/EBP $\beta$ -IR)の画像は顕微鏡に取り込まれ、画像中の密度をImage Jソフトウェアを用いて分析した。

## 成 績

QHGAD67による治療群は、コントロール群に比べてベクター注入の3日後より有意に機械的閾値が上昇した。抗アロディニア作用は、28日以上継続した。QHGAD群のArea under the curves (AUC)は、Q0ZHG群のそれよりも有意に高い値を示した。Q0ZHGを接種した疼痛モデルのラットのDRGと脊髄の両方において、コントロール群に比較してGAD67が有意に減少した。また、QHGADを接種した疼痛モデルのラットは、Q0ZHGを接種した疼痛モデルのラットに比べ、有意にGAD67が上昇した。

疼痛群(gp120/ddC+Q0ZHG)の脊髄後角のMitoSox陽性神経の数は、コントロール群(sham/sal+Q0ZHG)に比べ有意に増加した。治療群(gp120/ddC+QHGAD)のMitoSox陽性神経の数は疼痛群に比べ有意に減少した。脊髄後角の疼痛群(gp120/ddC+Q0ZHG)のGABA-IR陽性神経の数は、コントロール群(sham/sal+Q0ZHG)に比べ有意に低かった。治療群(gp120/ddC+QHGAD)のGABA-IR陽性神経の数は、疼痛群に比べ有意に増加した。脊髄後角のpCREB-IRの密度は、コントロール群(sham/sal+Q0ZHG)に比べ有意に増加した。治療群(gp120/ddC+QHGAD)のpCREB-IR密度は疼痛群に比べ有意に減少した。脊髄後角のpC/EBP $\beta$ -IRの密度は、コントロール群(sham/sal+Q0ZHG)に比べ有意に増加した。治療群(gp120/ddC+QHGAD)のpC/EBP $\beta$ -IR密度は疼痛群に比べ有意に減少した。

## 考 案

脊髄損傷モデルと糖尿病モデルの実験動物において、GAD67をコードするHSVベクターが鎮痛作用をもたらすことがこれまでも報告されている。神経障害性疼痛の複雑なメカニズムにおいて、神経損傷は脊髄のGABA作用性抑制系の減弱を引き起こし、異常な疼痛感覚と諸症状が現れる。今回の研究では、HIVgp120とddcを用いた神経障害性疼痛モデルでGAD67とGABAの発現が抑制されることが示された。最近の報告では、活性酸素が神経障害性疼痛の持続に関与することが述べられている。酸化ストレスは多くの複合体の活性化を引き起こし、相互関係にあるシグナル伝達を惹起する。フリーラジカルは慢性疼痛を媒介することが報告されており、ミトコンドリアの酸化リン酸化反応により産生されたスーパーオキシドは、活性酸素の大部分を占める。カプサイシンによる疼痛モデルは、活性酸素の活動部位を確認する優れたモデルである。活性酸素のスキャベンジャーはカプサイシンに誘発された二次的痛覚過敏を抑制することが報告されており、このことより活性酸素は脊髄に関連することが推察される。さらに他の疼痛モデルにおいても、活性酸素の蓄積の大部分が脊髄後角のミトコンドリアで認められている。gp120、ddcモデルについても同様に、活性酸素が増加することが報告されている。増加した活性酸素が、脊髄膠様質でGABA抑制系作用を減弱させる報告はあるが、GABA抑制系が活性酸素を抑制するかどうかはほとんど報告されていない。今回の研究で、HIVgp120とddcを用いた神経障害性疼痛モデルの脊髄で増加したミトコンドリアのスーパーオキシドは、HSVベクターにより発現したGAD67によって減少した。このことは、GABA抑制系が脊髄ミトコンドリアのスーパーオキシド産生を抑制することを示した。神経活動により、CREBはリン酸化によって活性化する(pCREB)。次にpCREBは特異的な遺伝子のトリガーとなるプロモーター部位に結合し、それにより長期間のシナプス可塑性がもたらされる。侵害受容器からの求心性の活性化は、脊髄後角神経での翻訳とCREBが媒介する転写の調節を介し中枢性感作に寄与する。pCREBは疼痛を有するHIV患者の脊髄後角で増加する。GABA作動薬は、疼痛のある糖尿病モデルのラットのpCREBを減少させる。本研究では、HIV-gp120とddcの疼痛モデルの脊髄でのpCREBの増加と、HSVベクターにより発現したGAD67によるpCREBの減少を示した。C/EBP $\beta$ は転写因子であり、CNSを含んだ様々な組織で細胞の成長と炎症反応の喚起に関連する。今回の研究では、疼痛モデルの脊髄において増加したpC/EBP $\beta$ は、GAD67を発現するHSVベクターによって抑制された。我々の見識では、本研究はGABA作動性抑制系にC/EBP $\beta$ が関連することを述べた最初の報告である。なお、HSVベクターは、脊髄内で経シナプス性にGABA neuronの活動をup-regulationした可能性についても考慮する必要がある。

## 結 論

本研究により、疼痛モデルのラットでGAD67を発現するHSVベクターによる遺伝子治療により脊髄のミトコンドリアの活性酸素と転写因子を抑制し、HIV関連性疼痛を減弱させることを示した。GAD67を発現するHSVベクターによる遺伝子治療は、HIV患者の神経障害性疼痛の治療に有用である可能性が示唆された。

#### 引 用 文 献

1. Huang W, Zheng W, Liu S, Zeng W, Levitt RC, Candiotti KA, Lubarsky DA, Hao S. HSV-mediated p55TNFSR reduces neuropathic pain induced by HIV gp120 in rats through CXCR4 activity. *Gene Ther* 2014;21:328-36.
2. Huang W, Zheng W, Ouyang H, Yi H, Liu S, Zeng W, Levitt RC, Candiotti KA, Lubarsky DA, Hao S. Mechanical allodynia induced by nucleoside reverse transcriptase inhibitor is suppressed by p55TNFSR mediated by herpes simplex virus vector through the SDF1alpha/CXCR4 system in rats. *Anesth Analg* 2014;118:671-80.
3. Hao S, Mata M, Wolfe D, Huang S, Glorioso JC, Fink DJ. Gene transfer of glutamic acid decarboxylase reduces neuropathic pain. *Ann Neurol* 2005;57:914-8

#### 参 考 论 文

1. Wallace VC, Blackbeard J, Segerdahl AR, Hasnie F, Pheby T, McMahon SB, Rice AS. Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral-associated neuropathic pain. *Brain* 2007;130:2688-702.
2. Yowtak J, Lee KY, Kim HY, Wang J, Kim HK, Chung K, Chung JM. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain* 2011;152:844-52.
3. Liu J, Wolfe D, Hao S, Huang S, Glorioso JC, Mata M, Fink DJ. Peripherally delivered glutamic acid decarboxylase gene therapy for spinal cord injury pain. *Mol Ther* 2004;10:57-66.
4. Schwartz ES, Kim HY, Wang J, Lee I, Klann E, Chung JM, Chung K. Persistent pain is dependent on spinal mitochondrial antioxidant levels. *J Neurosci* 2009;29:159-68.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	神田 恵
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <span>審査委員長 高草木 薫</span>  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <span>審査委員 伊藤 浩</span>  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <span>審査委員 鎌田 恭輔</span>  </div>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;"><b>Gene transfer of glutamic acid decarboxylase 67 by HSV vectors suppresses neuropathic pain induced by HIV gp120 combined with ddC in rats.</b></p> <p>日本語訳；ヘルペス単純ウイルスベクターを用いたグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD67）の遺伝子導入は、HIV エンベロープ蛋白 gp120 と抗レトロウイルス薬 ddC により誘発されたラットの神経障害性疼痛を抑制する</p>			
<p>本研究は HIV 感染性症における疼痛に対する新規治療法を確立するための基礎研究である。そこで、HIV-envelope 蛋白と抗 retro-virus 薬を用いて神経障害モデルラットを作成すること、次いで、HSV-vector でグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD67) を遺伝子導入がモデルラットの疼痛を抑制できるか否か、の 2 点について検討した。</p> <p>学位申請者らは、HIV-envelope 蛋白と抗 retro-virus 薬を坐骨神経内に投与し、神経障害ラット疼痛モデルの作成に成功し、脊髄後角の GABA 作動性鎮痛システムが障害されていることを発見した。次いで、GAD67 を発現する HSV-vector の接種が、脊髄 GABA neuron の増加、ミトコンドリア super-oxide の減少、pCREB, pC/EBPβ などの疼痛関連分子の減少などを誘発することを証明した。これらの成績は、本モデルラットでは脊髄の GABA 作動性鎮痛システムの機能が低下していること、そして、GAD67 を発現する HSV-vector は、このシステムを賦活化して痛覚二次ニューロンの活動を抑制することを示唆する。従って、本研究は、HIV 感染症の疼痛に対する HSV-vector 療法の有効性を示すものである。</p> <p>学位申請者は、本論文に関する各審査委員の査問に対して、真摯かつ豊富な知識に基づいて適切に対応した。従って、申請者は旭川医科大学博士課程を修了するに相応しいと判断した。なお、本論文は既に掲載が決定している。しかし、研究成績に対する解釈には他の可能性があることを審査員は指摘し、申請者本人も十分納得・理解した旨を付け加える。</p>			