

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	飯田 高史
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Spinal CPEB-mtROS-CBP signaling pathway contributes to perineural HIV gp120 with ddC-related neuropathic pain in rats</p> <p>(脊髄のCPEB-ミトコンドリア由来活性酸素(mt-ROS)-CPEB結合蛋白(CBP)の伝達経路は 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に関与する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>Hyun Yi, Shue Liu, Wan Huang, Hirotsugu Kanda, David A. Lubarsky, Shuanglin Hao</p> <p>Experimental Neurology 掲載済 (2016 Jul; 281: 17-27)</p> <p>研 究 目 的</p> <p>逆転写酵素阻害剤(NRTIs)による治療をうけたHIV患者が神経障害性疼痛に罹患する事が知られている。現在は神経毒性をもつNRTIsは抗ウイルス療法として使用されなくなっているものの、今日生存しているHIV患者の多くが過去にこれらの薬剤を投与され、神経障害性疼痛に罹患している。HIV感染とNRTIsが神経障害性疼痛(HIV-SN)を引き起こす正確な機序は解明されていない。一方CPEB、ミトコンドリア活性酸素(mtROS)、CBPは神経免疫疾患に伴う炎症性・神経障害性疼痛に関与することが推測されている。本研究において我々はHIVのエンベロープ蛋白であるgp120とNRTIsの投与によって引き起こされる神経障害性疼痛へのCPEB、mtROS、CBPの関与を調査した。</p>			

材 料 ・ 方 法

ラットの坐骨神経を遺伝子組み換えのHIV-1エンベロープ蛋白であるgp120に暴露させ、NRTIsの1つであるddCを腹腔内投与した。その12日後に、CPEBの発現を抑制するantisense oligodeoxynucleotide (AS-CPEB)を事前にくも膜下に留置したカテーテルより投与した。機械刺激閾値はvon Freyフィラメントを後ろ足に使用して測定し、up-and-down法を用い数値化した。gp120暴露と同側のL4-5の脊髄を迅速に取り出し、ウエスタンブロット法を用いてCPEBの発現を調査した。一次抗体はgoat anti-CPEBとmouse anti- β -actinを使用し、二次抗体に浸した後chemiluminescence solutionを用いて検出した。ブロットの定量化は化学発光法を用いて行った。MitoSox Red(mtROSの指標)をくも膜下に投与し、蛍光顕微鏡を用いて脊髄後角のMitoSox陽性細胞数を調べた。さらに脊髄後角におけるCPEB、CBPの分布とCBP陽性細胞数を免疫染色法で調べた。一次抗体は、goat anti-CPEB、rabbit anti-CBPを用いた。画像中の陽性細胞数をImage Jソフトウェアを用いて分析した。同モデルに対し、ROSのスキャベンジャーであるMitoTempol(Mito-T)を投与し、機械的刺激閾値、脊髄後角のCBPの発現を同様に調べた。また、CBPの発現を抑制するAS-CBPを投与した後の機械的刺激閾値についても調べた。

成 績

CPEB AS-ODN投与によってCPEBの発現を抑制した治療群(gp120/ddC+AS-CPEB)では、疼痛群(gp120/ddC+mmODN)に比べて投与3日目に機械的刺激閾値が有意に上昇し、ウエスタンブロット法においてはCPEBの発現量が疼痛群(gp120/ddC+mmODN)に比べ有意に減少した。免疫染色法において、CPEBの分布は神経細胞の細胞質内であることが確認され、治療群(gp120/ddC+AS-CPEB)では疼痛群(gp120/ddC+mmODN)に比べ、MitoSox陽性細胞数、CBP陽性細胞数の減少が有意であった。一方、Mito-Tを投与した群(gp120/ddC+Mito-T)は疼痛群(gp120/ddC+veh)に比べ、90分後の機械的刺激閾値が有意に上昇し、免疫染色法におけるODN陽性細胞数の減少も有意であった。CBP AS-ODNを投与した群(gp120/ddC+AS-CBP)では、疼痛群(gp120/ddC+mmODN)に比べ、投与3日目に機械的刺激閾値が有意に上昇した。

考 察

我々は、以下を明らかにした。1) AS-ODNによるCPEBやCBPの排除は機械的アロディニアを抑制する。2) mtROSのスキャベンジャーであるMito-Tの投与は機械的刺激閾値を上昇させる。3) CPEBの排除はmtROSとCBP陽性細胞を減少させる。4) Mito-Tの投与は脊髄後角のCBP発現を減少させる。5) 三重免疫染色においてCPEB陽性細胞はMitoSox陽性部位と一致し、MitoSox陽性部位はCBP陽性細胞と一致しており、gp120/ddCによって生じる神経障害性疼痛モデルにおいて、CPEB-mtROS-CBPが重要な役割を担う。HIV関連疼痛はウイルス自体による傷害か、抗

ウイルス薬による傷害で生じるが、臨床症状と病理所見はどちらも類似している。HIV感染者の末梢神経障害は免疫機能が改善し早期の新しい治療や神経毒性のない薬物が使われるようになってからも存在する。gp120は神経毒性と酸素障害、その結果として生じる神経の炎症を引き起こす。複数の薬剤の組み合わせによる優れたウイルスの管理にも関わらず、HIV-SNが持続的に蔓延するのは、低閾値のウイルスの複製やそれに続く同定できないような炎症であっても神経毒性の原因となることを反映している。過去のD-drugの使用は今日生存しているHIV患者の神経因性疼痛の危険因子である。げっ歯類はHIVに直接感染しないために、信頼できるHIV-SNモデルを作成することは困難であった。HIV-SNの病態生理学的特徴は有髄無髄繊維の欠落、リンパ球と活性化したマクロファージの炎症性浸潤、後根神経節へのgp120による神経毒性、後根神経節の前炎症性サイトカイン(TNF α など)、脊髄の神経膠症、ARTを投与しようがしまいが起こるミトコンドリア障害である。gp120とddCの組み合わせは臨床経過をよく表したモデルである。この動物の神経因性疼痛モデルは少なくともHIVによる神経病理と神経疼痛の分子機序の解明においての基礎となる。細胞質ポリアデニル化は活動停止中の翻訳に関するmRNAのポリA鎖が延長し活性化する事である。タンパクの翻訳はmRNAのポリアデニル化とCPEBによる修飾で誘導される。CPEBが痛覚過敏の起因を誘導し、痛みの慢性化を引き起こす可能性をもつ事は興味深い。CPEBのmRNAを標的としたアンチセンスオリゴのクモ膜下への投与はその発現を抑制し、数ヶ月後も存在する痛覚過敏の起因を妨げる。我々はgp120/ddCによって脊髄後角神経細胞内のCPEBの発現が増加する事を発見した。CPEBの欠落はアロディニアを抑制し、既に報告されているように侵害受容の過敏性に携わる。フリーラジカルは慢性疼痛の原因因子である事が示されている。ROSスカベンジャーの抗侵害効果はカプサイシンによる二次痛覚過敏で知られている。さらに異なった疼痛モデルにおいてROSの蓄積は脊髄後角神経細胞のミトコンドリアで認められた。gp120やddCは活性酸素の誘導や増強に関与する。我々は最近の研究でHIV-NPでは脊髄のmtROSが増加する事を論証した。本研究ではさらにmtROSのスカベンジャーであるMito-Tが機械的アロディニアを減少させる事を示した。CBPはクロマチンの修飾を介した転写活性因子であるリジンアセチルトランスフェラーゼとの強い関係がある。最近の研究ではラットの坐骨神経を障害する事で脊髄のCBPの発現が増加する事が論じられている。我々はgp120/ddCが脊髄後角のCBPを増加させ、CBPの排除は機械的刺激閾値を上昇させる事を発見した。

結 論

gp120/ddCによる神経因性疼痛にCPEB、ROS、CBPが重要な役割をしている。gp120/ddCは脊髄後角のCPEBによるmtROS-CBPの伝達経路の誘引となる。これはHIV-NPの治療と分子機序の新しい知見である。





引 用 文 献

1. Kim H.K., Park S.K., Zhou J.L., Tagliatalata G., Chung K., Coggeshall R.E., Chung J.M., Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 2004; 111, 116-124.
2. Bogen O., Alessandri-Haber N., Chu C., Gear R.W., Levine J.D., Generation of a pain memory in the primary afferent nociceptor triggered by PKCepsilon activation of CPEB. *J. Neurosci.* 2012; 32, 2018-2026.
3. Ferrari L.F., Bogen O., Levine J.D., Role of nociceptor alphaCaMKII in transition from acute to chronic pain (hyperalgesic priming) in male and female rats. *J. Neurosci.* 2013; 33, 11002-11011.

参 考 论 文

1. Kanda H., Liu S., Iida T., Yi H., Huang W., Levitt RC., Lubarsky D.A., Candiotti K.A., Hao S., Inhibition of mitochondrial fission protein reduced mechanical allodynia and suppressed spinal mitochondrial superoxide induced by perineural HIV gp120 in rats. *Anesth. Analg* 2016; 122, 264-272.
2. Kanda H, Kanao M, Liu S, Yi H, Iida T, Levitt RC, Candiotti KA, Lubarsky DA, Hao S., HSV vector-mediated GAD67 suppresses neuropathic pain induced by perineural HIV gp120 in rats through inhibition of ROS and Wnt5a. *Gene Ther.* 2016; 23(4):340-8.
3. Kanao M., Kanda H., Huang W., Liu S., Yi H., Candiotti K.A., Lubarsky D.A., Levitt R.C., Hao S., Gene Transfer of Glutamic Acid Decarboxylase 67 by Herpes Simplex Virus Vectors Suppresses Neuropathic Pain Induced by Human Immunodeficiency Virus gp120 Combined with ddC in Rats. *Anesth. Analg.* 2015; 120, 1394-1404.

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	飯田 高史
審査委員長 高草木 薫 			
審査委員 山本 明美 			
審査委員 東 信良 			
審査委員 			
<h3 style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</h3> <p style="margin: 10px 0 0 0;"> Spinal CPEB-mtROS-CBP signaling pathway contributes to perineural HIV gp120 with ddC-related neuropathic pain in rats （脊髄の CPEB-ミトコンドリア由来活性酵素 (mt-ROS)-CPEB 結合蛋白(CBP)の伝 達経路は 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に関与する） </p> <p style="margin: 10px 0 0 0; text-align: center;"> Experimental Neurology 2016: 281: 17-27 </p>			
<h4 style="margin: 0;">I. 学位論文の概要</h4> <p style="margin: 5px 0 0 0;"> HIV 感染の治療として抗ウイルス薬である逆転写酵素阻害薬 (NRTIs) の投与を受けた患者には神経障害性疼痛が出現する. この疼痛発現のメカニズムを解明するため, 学位申請者らは HIV envelope 蛋白である gp120 と NRTIs の一種である ddC の投与により神経障害性疼痛を発現する実験モデル動物(ラット)を作成し, 脊髄後角の感覚性二次ニューロン障害に伴う疼痛発現の分子機構を解析した. </p> <p style="margin: 5px 0 0 0;"> 二次ニューロンの障害を誘発させる仕組みには, ① 細胞質ポリアデニル基けつごう (CPEB) の発現, ② ミトコンドリア活性酸素 (mtROS) の上昇に伴うミトコンドリア障害, ③ CREB 結合蛋白 (CBP) 活性の上昇の三者が関与すると推定されている. 学位申請者らは, 分子遺伝学的手法・免疫組織学的手法・神経生理学的手法を用いて, 脊髄後角・感 </p>			

覚性二次ニューロンにおいて、これらの一連の(CPEB-mtROS-CBP 伝達経路)炎症性メカニズムが働くことにより、神経障害性疼痛が誘発されることを証明した。特に、CPEBの mRNA のアンチセンスヌクレオチドの髄腔内投与が、この伝達経路の反応を抑制し、慢性疼痛を長期に渡って抑えたことは、同手法が HIV 神経障害性疼痛に対する遺伝子治療に有用であることを示唆する。

II. 学位論文に対する審査結果

本研究は、学位申請者である飯田高史氏が米国留学中(マイアミ大学麻酔科学講座)に実施した研究をまとめたものである。解析に用いた手法は多岐に渡り、同氏はその解析ならびに論文作成に中心的役割を果たしたことは明らかである。

飯田氏は、神経生理学、皮膚科学、循環器外科学を専門とする各審査員の査問に際して真摯な態度で臨むと共に、難解な質問に対して的確な回答で対応した。その結果、同氏は、幅広い臨床医学および基礎医学の知識を有していることが明らかとなった。従って、各審査員は、同氏が旭川医科大学の学位(博士)に十二分に相応しいと判断した。

なお、本論文は 2016 年 *Experimental Neurology* 誌に掲載されている旨を追記する。