

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	林 健太郎
<p style="text-align: center;">学 位 論 文 題 目</p> <p>Role of Tumor Necrosis Factor Receptor 1---Reactive Oxygen Species---Caspase 11 Pathway in Neuropathic Pain Mediated by HIV gp120 with Morphine in Rats (HIV gp120とモルヒネにより誘発された神経障害性疼痛モデルラットにおけるTNFR1-活性 酸素種-カスパーズ11経路の役割)</p> <p style="text-align: center;">共 著 者 名</p> <p>Hyun Yi, Xun Zhu, Shue Liu, Jun Gu, Keiya Takahashi, Yuta Kashiwagi, Marta Pardo, Hirotsugu Kanda, Heng Li, Roy C. Levitt, Shuanglin Hao Anesthesia & Analgesia 掲載予定</p> <p style="text-align: center;">研 究 目 的</p> <p>HIV患者では慢性疼痛が問題となるが、鎮痛目的にオピオイド投与を繰り返すと神経障害性疼痛が増悪することが示されている。しかし、HIVにおいてオピオイドが痛みを増悪させる明確な分子生物学的機序は解明されていない。TNFαはHIV関連慢性疼痛に関与することが報告されており、モルヒネの慢性使用により神経炎症が起こり、TNFαのような炎症誘発因子が放出されることが知られている。脊髄のミトコンドリア活性酸素は、痛みのモデルにおいて注目されており、HIV gp120はTNFαとTNF受容体(TNFR1)を介してROS発生を引き起こす。しかし、TNFR1をトリガーとしたミトコンドリアROS発生の明確な機序は未だ不明である。非古典的インフラマソームであるcaspase-11は、炎症反応の活性化因子および制御因子であり、ROSで活性化され、様々な疾患に関与している。しかし、神経障害性疼痛におけるcaspase-11の役割とその上流の因子は未だ明らかではない。本研究は、gp120とモルヒネにより引き起こされた神経障害性疼痛において、脊髄におけるTNFR1-mtROS-caspase-11経路が重要な役割を担っていると仮定し、これを証明する。</p> <p style="text-align: center;">材 料 ・ 方 法</p> <p>生後7-8週、200-240gのオスラットを対象とした。薬剤投与のため、くも膜下腔にカテーテルを留置した。カテーテルは環椎後頭膜より尾側へ約8.5cm挿入し、先端は腰膨大部（第2-4腰髄）に位置させた。神経障害性疼痛モデルを作成するために、gp120 0.2μg、モルヒネ3μgを1日1回、5日間投与した。gp120、モルヒネ投与開始から10日目に神経障害性疼痛モデルが確立されたことを確認した後に、各種介入実験を開始した。</p>			

神経障害性疼痛治療モデルでは、TNFR1 AS-ODN(10 μ g、30 μ g、100 μ g)を24時間毎5日間、Mito-Tempol(5 μ g、15 μ g、50 μ g)は1回、caspase-11 siRNA (3 μ g、10 μ g、30 μ g)を24時間毎2日間投与した。

行動学的解析は、Von Frey testで機械刺激性アロディニア閾値を評価し、Hotplate testで温熱性痛覚潜時を評価した。

ウェスタンブロット法では、ラット脊髄後角組織またはB35神経細胞を蛋白溶解バッファーに溶解後、得られた蛋白をPVDF膜に転写、一次抗体(抗TNFR1、抗caspase-11、抗 β -actin)を含んだ溶液で振盪させた。その後PVDF膜は2次抗体に浸され、化学発光を用いて検出した。

免疫染色法では、脊髄の冷凍切片を1次抗体(抗NeuN、抗GFAP、抗OX42、抗TNFR1、抗caspase-11)を加え振盪、その後、蛍光色素で標識された2次抗体を加え室温で2時間振盪した。蛍光顕微鏡によって観察し画像を保存した。

脊髄後角におけるミトコンドリア活性酸素の画像化ではMitSox red 33 μ Mをくも膜下カテーテルより注入、90分後にL4-L5領域の脊髄を採取し冷凍切片を蛍光顕微鏡で観察、画像を保存した。

細胞培養では、B35神経細胞を用いた。caspase-11に対するMito-Tempolの影響を確認するために、B35神経細胞にrTNF α を加え6時間培養した。Mito-Tempol群はrTNF α を加える1時間前にMito-Tempolを加えた。処理した細胞を回収しウェスタンブロットに用いた。

成 績

行動学的解析では、gp120とモルヒネの5日間投与により、von Frey test、Hotplate testにおいて、機械刺激性アロディニア閾値の低下と温熱性痛覚潜時の短縮が認められ、この神経障害性疼痛は5日目から21日目まで続いた。AS-TNFR1、Mito-Tempol、caspase-11 siRNAは機械刺激性アロディニア閾値の低下と温熱性痛覚潜時の短縮を改善した。

ウェスタンブロット法では神経障害性疼痛モデルラットはshamに比べて有意に脊髄後角にしているTNFR1、caspase-11の発現が増加していた。また、Mito-Tempolはcaspase-11の発現増加を抑制した。B35神経細胞の培養細胞を用いたウェスタンブロット法では、rTNF α の投与でcaspase-11の発現が増加し、Mito-Tempolを加えるとcaspase-11の発現増加が抑制された。

免疫染色法ではTNFR1、caspase-11ともに神経細胞での発現増加が認められ、アストロサイト、ミクログリアでの発現は認められなかった。TNFR1とMitSox red陽性細胞は共局在しており、またcaspase-11とMitSox陽性細胞は共局在しており、さらにTNFR1とcaspase-11は共局在していた。

考 案

HIV関連慢性疼痛の原因となるHIV gp120は、TNF α などの炎症誘発因子を増加させる。そして、モルヒネなどのオピオイドを繰り返し使用すると神経炎症、炎症誘発因子の増加により慢性疼痛が増悪すると考えられている。また、ミトコンドリア活性酸素は痛みのモデルにおいて重要な役割を果たし、gp120はTNF α とTNFR1を介してROSを発生させる。我々は、gp120とモルヒネによる神経障害性疼痛モデルにおいて、脊髄後角の神経細胞でTNFR1、ミトコンドリア活

性酸素の発現が増加し、TNFR1の阻害、ミトコンドリア活性酸素スカベンジャー投与により、機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏が改善することを示した。

インフラマソームは感染、痛み、ストレスに対する反応過程において発生する細胞性タンパク質複合体として知られ、近年、非古典的インフラマソームのcaspase-11は多くの疾患において重要な役割を果たすと注目されている。caspase-11は炎症反応の活性化因子および制御因子であり、痛みに対する慢性的なオピオイド使用は、このインフラマソームの活性化を介して疼痛を増悪させると推察された。本研究の神経障害性疼痛モデルにおいて、脊髄後角の神経細胞にcaspase-11発現が増加することを確認し、その阻害により機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏が改善した。さらに、rTNF α で処理した培養神経細胞において、caspase-11の発現増加を確認し、ミトコンドリア活性酸素スカベンジャー投与によりcaspase-11発現増加は抑制された。

また、TNFR1、ミトコンドリア活性酸素、caspase-11は脊髄後角の神経細胞に共局在することが確認し、TNFR1-mtROS-caspase-11経路が神経障害性疼痛において重要であることが明らかとなった。

結 論

gp120とモルヒネによる神経障害性疼痛モデルにおいて、脊髄のTNFR1、ミトコンドリア活性酸素、caspase-11の増加が認められ、TNFR1の抑制により酸化ストレスは減少し、ミトコンドリア活性酸素スカベンジャーであるMito-Tempolはcaspase-11発現を減少させる。これらの結果は、慢性疼痛モデルにおいて、TNFR1-mtROS-caspase-11経路が重要な役割を担っていることを示唆した。




引用文献

1. Yi YS.
Caspase-11 Non-Canonical Inflammasome: Emerging Activator and Regulator of Infection-Mediated Inflammatory Responses.
Int J Mol Sci 2020; 21.
2. Zheng W, Ouyang H, Zheng X, et al.
Glial TNF α in the spinal cord regulates neuropathic pain induced by HIV gp120 application in rats.
Molecular pain 2011; 7: 40
3. Schwartz ES, Lee I, Chung K, Chung JM.
Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice.
Pain 2008; 138: 514-24

参考文献

1. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, et al.
Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11.
Nature 2011; 479: 117-21
2. Yi H, Liu S, Kashiwagi Y, et al.
Phosphorylated CCAAT/Enhancer Binding Protein β Contributes to Rat HIV-Related Neuropathic Pain: In Vitro and In Vivo Studies.
Neurosci 2018; 38: 555-74
3. Shi Y, Yuan S, Tang SJ.
Morphine and HIV-1 gp120 cooperatively promote pathogenesis in the spinal pain neural circuit.
Molecular pain 2019; 15: 1-11

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	林 健太郎
審査委員長 高草木 薫 			
審 査 委 員 伊藤 浩 			
審 査 委 員 中山 恒 			
学 位 論 文 題 目			
Role of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 --- Reactive Oxygen Species --- Caspase 11 Pathway in Neuropathic Pain Mediated by HIV gp 120 with Morphine in Rats			
HIV gp 120 とモルヒネにより誘発された神経障害性疼痛モデルラットにおける TNFRI - 活性酸素種 - カスパーズ 11 経路の役割			
Journal of Neural Transmission. Vol. 128, 27-36; 2021			
(審査評価・結果のみとし, 800字以内で提出すること。)			
<p>後天性免疫不全症候群 (AIDS) 患者の疼痛にはモルヒネによる緩和治療が適応される。しかし, モルヒネ投与がさらなる神経障害性疼痛を誘発することが明らかとなった。加えて, AIDS 患者の寿命も延びたことから, モルヒネ誘導性神経障害性疼痛は同疾患治療上の重要課題となっている。林氏らの研究は, モルヒネ投与に伴う AIDS 患者の神経性疼痛の分子機構の解明とその治療基盤の確立を目指すことである。</p> <p>林らは, ラットの脊髄腔に留置したカテーテルを介して AIDS ウイルスのエンベロープタンパク gp120 とモルヒネによって, AIDS モデルラットを作成した。このモデル動物では, von Frey test における機械刺激性アロディニア閾値の低下と Hotplate test における温熱性痛覚潜時の短縮が認められた。また, 痛覚刺激に反応する脊髄後角の神経細胞においては, ① TNFRI の発現亢進, ② ミトコンドリアからの ROS 産生の増加, ③ Caspase11 の活性増強を確認した。一方, TNFRI のアンチセンスオリゴ, Caspase11 の RNAi, ROS スカベンジャー MITO-TEMPOL の投与によって, モデル動物の痛覚過敏性が回復した。これらの成績から, 林らは, 脊髄後角における TNFRI-ROS-Caspase11 経路の活性化が, AIDS 患者におけるモルヒネ誘導性神経性疼痛の分子機構の一部である可能性を示した。</p> <p>各審査委員は, 学位申請者である林健太郎氏に個別に査問を実施した。同氏は, 本論文の研究構想, 実験操作, データの解釈に加えて, 関連領域における様々な試問に対して適切に回答すると共に, 令和 5 年 1 月 24 日開催の博士論文発表会においても明瞭な発表と質疑応答を実践した。以上より, 各審査委員は, 林健太郎氏が当該分野において十分な専門的知識と学力を有すると共に, 本論文が学位(博士)論文に資すると判断した。</p>			