

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	神田 浩嗣
<p>学位論文題目</p> <p>Inhibition of Mitochondrial Fission Protein Reduced Mechanical Allodynia and Suppressed Spinal Mitochondrial Superoxide Induced by Perineural Human Immunodeficiency Virus gp120 in Rats</p> <p>(邦題 ; ミトコンドリアのFissionの阻害によるHIV-gp120投与ラットの機械的アロディニアの減弱と脊髄活性酸素の抑制に関する研究)</p> <p>共著者名</p> <p>Shue Liu, Takafumi Iida, Hyun Yi, Wan Huang, Roy C. Levitt, David A. Lubarsky, Keith A. Candiotti, Shuanglin Hao</p> <p>Anesthesia & Analgesia in Press</p> <p>研究目的</p> <p>ミトコンドリアは、多くの細胞もしくは生理的な機能において重要な役割を持つ。ミトコンドリアは動的（もしくは、エネルギーを生じる）細胞器官であり、その融合と分裂は、細胞の伝達と発達や、ミトコンドリアの恒常性を調節している。最も一般的なHIV感覚性ニューロパシーの主訴のひとつに足底部の痛みがある。しかしながら、現在はこのHIVに関連した神経障害性疼痛の分子生物学的機序は明らかになっていない。我々は、今回の研究で、HIVの糖鎖プロテインであるgp120を末梢神経に覆うことで引き起こされた神経障害性疼痛モデルを用い、ミトコンドリアのDrp1の役割を調査した。</p> <p>材料・方法</p> <p>神経障害性疼痛は遺伝子組み換えのHIVエンベロープ蛋白gp120を坐骨神経に投与することで引き起こされた。機械的閾値は、Von Frey フィラメントを用いて測定した。機械的閾値の反応は、AUC (area under curves) を用いて評価した。Drp1 (Dynamin-related protein 1) のアンチセンスオリゴヌクレオチドはくも膜下投与とし、アンチセンスDrp1の他、ミトコンドリアの分裂を阻害するmdivi-1、活性酸素のスキャベンジャーであるphenyl-N-tert-butyl nitronを投与した。脊髄Drp1の発現は、ウエスタンブロット法を用いた。脊髄後角ミトコンドリアのスーパーオキシドは、MitoSoxイメージを用いて評価した。</p>			

成 績

gp120モデルにおいて、くも膜下投与アンチセンスDrp1とmdivi-1(mitochondrial division inhibitor-1)の両方で、機械的アロディニアが減少した。Shamグループでは、アンチセンスDrp1とmdivi-1の両方で、機械刺激閾値は変化しなかった。末梢へのgp120投与によって増加した脊髄のDrp1の発現は、アンチセンスDrp1投与によって抑制された。くも膜下投与phenyl-N-tert-butylnitronは、機械的アロディニアを減弱した。さらに、gp120疼痛モデルで増加した脊髄後角のミトコンドリアのスーパーオキシドが、アンチセンスDrp1もしくはmdivi-1のくも膜下投与によって抑制された。

考 案

ミトコンドリアのFissionは、ミトコンドリアの構造と機能の維持に重要な役割を持つ。今回の研究で、我々は以下について示した。(1) gp120投与による疼痛モデルにおいて、くも膜下投与アンチセンスDrp1とmdivi-1の両方で、機械的アロディニアが減少した。(2) 脊髄のDrp1の発現は、アンチセンスDrp1のくも膜下投与によって減少した。(3)くも膜下投与phenyl-N-tert-butylnitronは、gp120疼痛モデルの機械的アロディニアを減弱した。(4) 脊髄後角のミトコンドリアのスーパーオキシドは、アンチセンスDrp1もしくはmdivi-1のくも膜下投与によって抑制された。

HIV感受性ニューロパシーの一般的によくみられる組織学的特徴は、DRG感覚ニューロンの減少、遠位側における軸索のウォーラー変性、DRGへのHIV感染によるマクロファージの浸潤、'dying back'と呼ばれる感覚神経炎、無髄神経線維の減少であり、痛みのあるHIV患者の脊髄では、グリア細胞の活性化によるグリオーシスと、炎症性サイトカインの放出が見られる。HerzbergとSagenは、坐骨神経をgp120で浸すと早期病理所見で次のことが認められることを報告している。すなわち、著しい軸索の腫脹、神経幹内のTNF α の増加、アストロサイトとミクログリアの活性化の集中が脊髄で認められ、このグリオーシスは、神経障害性疼痛による疼痛行動と並行して持続を認めた。Wallaceらや、他の研究グループは、gp120の坐骨神経投与によるモデルを作成し、そのモデルが神経障害性疼痛による動物行動、DRGへの炎症性細胞の浸潤、脊髄のグリオーシス、表皮内の神経線維密度の減少を引き起こし、これらの特徴は、臨床的シナリオとも一致し、矛盾しない。それゆえ、gp120モデルはHIV関連性のニューロパシーの病態を表すことができる。

組織の破壊や炎症は、しばしば、活性化した侵害受容器や非神経細胞（マクロファージなど）から放出された内因性の因子（TNF α など）の蓄積とともに認められ、それらは傷害された場所の内部に存在もしくは浸出する。第一次求心性神経線維は、脊髄後角に投射し、それは解剖学的にも電気生理学的にも特異的のラミナを構成し、中枢性感作を引き起こす。中枢性感作は、中枢神経系の過剰な興奮の状態の過程でみられ、侵害受容性の伝達の増強をもたらす。慢性疼痛を有するHIV患者および動物で、脊髄後角の中枢性感作は、アストロサイトを刺激し、前炎症性サイトカイン、ケモカインを放出させる。このようなサイトカイン、ケモカイン受容体の過剰な活性化は、HIV関連性神経障害性疼痛の病態において、脊髄後角の神経障害を引き起こす。HIVが引き起こす神経障害性疼痛の、明らかな分子生物学的機序は、明らかになっていない。本研究では、脊髄後角における神経化学的变化に着目し、ミトコンドリアの分裂に関わるタンパクであるDrp1の役割を調査した。

Drp1は、保存Dynamin GTPase superfamilyのひとつである。Drp1は、主に細胞質に存在するが、ミトコンドリアのFissionの際には細胞質からミトコンドリアのFissionの場所の予想される場所まで移動する。加えて、ミトコンドリアの数、形態、動態を制御することは、様々なミトコンドリアの機能を維持するうえで重要である。しかしながら、過度のFissionもしくはfusionがミトコンドリアの機能にどう影響するかは不明である。ばらばらになったミトコンドリアが存在する細胞では、ミトコンドリアのCa²⁺イオンの取り込みとミトコンドリア内のCa²⁺イオンの拡散は減弱していることが報告されており、このことはミトコンドリアのFissionとfusionの不均衡が正常なCa²⁺イオンの恒常性を壊すことを示唆している。ミトコンドリアのfissionによる破片は、高グルコースが引き起こすROSの過剰生産に必要なコンポーネントである。つまり、高グルコース状態に曝される際、ミトコンドリアのfissionを阻害することは周期的なROS産生の変動を妨げるということである。最近の報告では、結果としてROS産生を引き起こすミトコンドリアのCa²⁺イオン取り込みが、慢性疼痛のシナプス可塑性に重要であることが示されている。

酸化ストレスは、多くの複雑かつ相互に関連するシグナル伝達を活性化する。ROS(reactive oxygen species)は脊髄の感作に関連する。過去の報告が、フリーラジカルが慢性疼痛のメディエーターとして関連することを示している。慢性疼痛の病理発生的には、ミトコンドリアの酸化ストレスは、多くの複雑に相互に関連するシグナル伝達の活性化を引き起こす。さらに、さまざまな痛みのモデルにおいて、ROSの蓄積は、主として脊髄後角の神経細胞のミトコンドリアで認められている。ROSスカベンジャーの明らかな鎮痛作用は、カプサイシンによって引き起こされた2次的な感覚過敏のモデルで報告されている。ミトコンドリアの酸化リン酸化より産生されたスーパーオキシドは、神経細胞のROSのほとんどを占める。カプサイシンによって引き起こされた痛みのモデルは、ROSの活動部位を明らかにするよいモデルである。ROSスカベンジャーによる鎮痛作用は、カプサイシンによって引き起こされた2次的感覚過敏のモデルで認められており、このことはROSが脊髄に関連することを示している。最近の報告ではROSは神経障害性疼痛の進行と維持に関連することが示されている。HIVgp120は、ROSの始動と変異に関連している。ミトコンドリアのfissionはROSの過剰生産に欠かせない可能性がある。今回の報告では、Drp1によって制御されている脊髄ミトコンドリアのfissionの機能の阻害が神経障害性疼痛と、ミトコンドリアのスーパーオキシドを減少させた。このことはミトコンドリアのfissionが、HIVgp120によって引き起こされた神経障害性疼痛に重要な役割があることを示す。Fusionを阻害することと、fissionを促進させることにより、酸化ストレスがミトコンドリアの断裂を引き起こすことは報告されている。Kimらは、ミトコンドリアの断片と培養したメラノサイトとメラノーマ細胞でROS産生が増加することと、ROSの伝達経路を介してミトコンドリアがメラニン形成を調節している可能性を報告している。過酸化水素の後足底部への皮下注射は、機械的アロディニアを引き起こし、そしてそれはmdivi-1の皮下投与による前処置により抑制される。しかしながら、in vitroの研究で、ラットの原始海馬細胞の培養において、mdivi-1は酸化ストレスを減少させ、細胞のアポトーシスを減衰させることが報告されている。Drp1がミトコンドリアのROS

産生に欠かせないという更なる根拠として、Drp1とP110が共に見られる点である。P110は、新規的な選択的ペプチドであり、Drp1酵素活性の阻害薬で、P110もミトコンドリアのfissionを阻害し、そしてそれはミトコンドリアが断裂しROSが産生されることを抑制し、ミトコンドリアの膜電位を強化し、ミトコンドリアの整合性を高める。ミトコンドリアのfissionは、てんかん発作の後に増加し、mdivi-1によりミトコンドリアのfissionを阻害すると有意に発作後の酸化ストレスと神経細胞の減少を抑制する。今回の研究で、Drp1タンパクのノックダウンとmdivi-1によるミトコンドリアのfission機能の抑制により、gp120によって引き起こされた痛みのモデルで、脊髄ミトコンドリアのスーパーオキシドが減少することを発見した。このことはミトコンドリアのfissionとそれに続くROS産生が慢性痛に関連するというを示している。

結 論

ミトコンドリアの分裂は神経細胞の構造と機能の維持に重要である。HIVに関連した神経障害性疼痛のメカニズムは、ほとんど解明されていない。今回の研究によりHIVに関連した神経障害性疼痛の病態発生にミトコンドリアの分裂が重要な役割を担っていることを示した。本研究のデータより、HIV蛋白のgp120によって引き起こされた神経障害性疼痛においてミトコンドリアの分裂を抑制することで疼痛が軽減されることを明らかとなった。このことは、HIV患者の慢性疼痛を治療する新しいアプローチの確証となる。

引 用 文 献

1. Hao S. The Molecular and Pharmacological Mechanisms of HIV-Related Neuropathic Pain. *Curr Neuropharmacol.* 2013;11:499-512
2. Wallace, VC, et al. (2007). Pharmacological, behavioural and mechanistic analysis of HIV-1 gp120 induced painful neuropathy. *Pain* 133: 47-63
3. 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




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.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.

3.Luiz F. Ferrari, Adrienne Chum, Oliver Bogen, David B. Reichling, and Jon D. Levine. Role of Drp1, a Key Mitochondrial Fission Protein, in Neuropathic Pain. The Journal of Neuroscience 2011; 31(31):11404 –11410.

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 浩嗣
審査委員長 東 信良 			
審査委員 高草木 薫 			
審査委員 伊藤 浩 			
<h3 style="margin: 0;">学位論文題目</h3> <p style="text-align: center; margin: 10px 0;"> Inhibition of Mitochondrial Fission Protein Reduced Mechanical Allodynia and Suppressed Spinal Mitochondrial Superoxide Induced by Perineural Human Immunodeficiency Virus gp120 in Rats. </p> <p style="text-align: center; margin: 10px 0;"> (邦題：ミトコンドリアの Fission の阻害による HIV-gp120 投与ラットの機械的アロディニアの減弱と脊髄活性酸素の抑制に関する研究) </p>			
<p> Human Immunodeficiency Virus (HIV)の感染者数は、世界的に増加し続けており、その HIV 感染患者の約 30% が HIV 関連神経障害性疼痛を発症するとされているが、その分子生物学的機序は明らかにされていない。神経細胞内のミトコンドリアが抗レトロウイルス薬で発症する神経障害性疼痛に関与するとの報告を受け、本研究では、脊髄後角おける 2 次ニューロン細胞内のミトコンドリアの fission (分裂) に着目し、ミトコンドリアが fission を繰り返すことで起こるとされる活性酸素の増大が神経障害性疼痛のメカニズムであり、その fission を抑制すれば疼痛を軽減できるという作業仮説が立てられた。この仮説に基づき、fission を触媒するタンパクである dynamin-related protein 1(Drp1) をアンチセンス法にて抑制し、その結果、脊髄後角細胞の活性酸素産生が減少して、機械的疼痛閾値が上昇することを証明することを目的とし、ラットを用いて実験を行った。ラットの疼痛モデルは、HIV のエンベロープタンパクである glycoprotein 120 (gp120) をラットの坐骨神経に導入して作成し、機械 </p>			

的疼痛閾値は Von Frey フィラメントを用いた up-and-down 法、Drp1 活性はウエストンブロット法、活性酸素陽性細胞数は特異的マーカーである MitoSOX red を用いた免疫染色法で調査した。結果として、Drp1 を抑制するアンチセンス法を用いた治療群では、疼痛閾値は上昇し、活性酸素陽性細胞数は減少した。結論として、gp120 を用いた疼痛モデルラットにおいて Drp1 を抑制するアンチセンス法を用いた遺伝子導入により、脊髄後角ミトコンドリアの fission が抑制され、HIV 関連神経障害性疼痛が減弱することを示された。

本研究は、HIV 関連神経障害性疼痛のメカニズムとしてミトコンドリアの関与という新たな研究領域を拓くとともに、アンチセンス Drp1 をクモ膜下に投与する遺伝子治療の可能性を示唆しており、今後臨床への応用が期待される。さらに、HIV 関連疼痛以外の神経障害性疼痛への研究展開の可能性を含んだ高い将来性が期待される内容であると考えられる。

また、論文提出者に対する論文内容及び関連領域に対する諮問や論文発表会での質疑に対する応答において、適切かつ明解で示唆に富んだ回答が得られ、研究領域における高い資質を有することが確認された。

以上より、当審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値すると判定した。