

博士論文(要約)

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)

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

飯田高史

(Hyun Yi, Shue Liu, Wan Huang, Hirotsugu Kanda,  
David A. Lubarsky, Shuanglin Hao)

## 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- $\beta$ -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 のスカベンジャーである 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 のスカベンジャーである 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 $\alpha$  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。