

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18258

研究課題名(和文) HIV関連神経障害モデルラットを用いた神経障害性疼痛の機序解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of neuropathic pain using HIV-related neuropathy model rats and its application to treatment

研究代表者

佐藤 泉 (Sato, Izumi)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：70624196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HIV関連神経障害性疼痛に対する漢方薬の有効性を確かめるため、坐骨神経をHIV-1エンベロープ蛋白であるgp120に暴露させて作成したHIV関連神経障害性疼痛モデルラットに手術当日より牛車腎気丸を含む食餌、もしくは通常の食餌を与え、behavior testで疼痛閾値の評価を行ったところ、牛車腎気丸投与群で疼痛閾値が有意に改善した。
また、手術後14日目にモデルラットの脊髄を摘出し、脊髄後角におけるグルタミン酸デカルボキシラーゼ67(GAD67)の発現量をWestern blottingを用いて調べたところ、牛車腎気丸投与群でのGAD67の発現量は、コントロール群よりも有意に高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、動物行動学試験により牛車腎気丸がHIV関連神経障害に有効である可能性が示唆された。また、Western blottingの結果より、牛車腎気丸を投与することで、gp120によりダウンレギュレートされた脊髄後角におけるGAD67の発現が回復することが、HIV誘発性アロディニアを緩和することに関与していることが示唆された。このことは、HIV関連神経障害性疼痛のみならず様々な神経障害性疼痛の機序を解明する糸口となり、有効な治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to confirm the effectiveness of Kampo medicine for HIV-related neuropathic pain, we fed the diet with Goshajinkigan(GJG) or the normal diet to the HIV-related neuropathic pain model rat prepared by exposing the sciatic nerve to the HIV-1 envelope protein gp120 from the day of surgery. The pain threshold, evaluated by the behavior test, was significantly improved in the GJG-treated group.
In addition, on postoperative day 14, the spinal cord of the model rat was removed, and the expression level of glutamate decarboxylase 67 (GAD67) in the dorsal horn of the spinal cord was examined using Western blotting, the expression of GAD67 in the GJG treated group was significantly higher than that in the control group.

研究分野：麻酔科

キーワード：HIV関連神経障害性疼痛 漢方薬 GAD67

1. 研究開始当初の背景

(1) HIV 関連神経障害の現状とこれまでの報告

近年、多剤併用療法 (HAART) の発達により HIV に感染してもエイズの発症を大幅に遅らせることが可能となった。とはいえ、今尚、世界中には多くの HIV 感染者がおり、年間 100 万人以上が HIV 関連の原因で死亡している。HIV 感染者の 30% に様々な神経障害を合併しているといわれるが、その実態については未解明の点が多く、治療法も確立されていない。一方、HIV 感染に伴うもの以外の神経障害性疼痛についてもそのメカニズムは未解明の点が多い。今後、高齢化に伴いその罹患数は増加の一途を辿ることが予想され、治療法の確立は急務である。HIV 関連を含む各種神経障害性疼痛においてはメカニズムにおいて共通点があり、治療も応用が可能であると考えられる。

(2) 神経障害性疼痛と漢方薬

様々な神経障害性疼痛に対し、漢方薬の有用性が報告されている。中でも効果のある漢方薬として牛車腎気丸の有用性がいくつかの臨床試験で示され、実臨床でも頻用されており、基礎研究においても作用機序の一部が解明されている。牛車腎気丸の他にも末梢神経障害に有効な漢方薬の報告はあるが、十分なエビデンスは確立していない。西洋医学的治療で対応できない様々な神経障害性疼痛に対し、漢方治療が有効であったという報告は多く、今後、エビデンスの確立が期待される。

2. 研究の目的

HIV 関連神経障害モデルラットを用いて神経障害性疼痛の機序を探り、漢方治療の有効性を検討することを目的とする。まず、HIV 関連神経障害の特徴や本邦における HIV 感染の現状について調査するために患者にアンケート調査を行う。並行して HIV 関連神経障害モデルラットに漢方薬を投与し、動物行動学試験にて効果を確認する。また、脊髄後角の検体を用いて分子生物学的に鎮痛機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) HIV 感染患者に対するアンケート調査

本学 (旭川医科大学) のみでは対象患者数が少ないため、多数の HIV 感染患者の診療を行っている北海道大学血液内科の協力を得て、実際の HIV 感染患者にアンケート調査を行い、HIV 関連神経障害の特徴や本邦における HIV の現状について調査を行った。

(2) 漢方薬による HIV 関連神経障害の治療の可能性と分子生物学的機序の解明

① 実験動物

動物実験は旭川医科大学の動物実験委員会によって承認された。生後 11 週のオスの Sprague Dawley ラット (200~250 g) を使用し、手術の前に 1 週間、環境に慣らした。食事と水分は自由に摂取可能とし、7:00-19:00 の 12 時間サイクルでライトコントロールを行った。

② 疼痛モデルの作成

疼痛モデルの作成は生後 12 週目に行った。麻酔下で左坐骨神経を露出させ、酸化再生セルロースの小片を、gp120 群では 40ng の gp120(Immunodiagnotics, Bedfoed, MA) を入れた 0.1% ウシ血清ア

ルブミン(BSA)を含む生理食塩水、Sham 群では 0.1%BSA を含む生理食塩水の中に予め浸した。坐骨神経をセルロースの小片でゆるく包み、4/0 縫合糸で閉創した。

③ 漢方薬の投与

ラットを最初に無作為に gp120 (HIV 関連神経因性疼痛) 群、牛車腎気丸 (GJG) 投与 gp120 群、偽手術群、および GJG 投与偽手術群の 4 群のうちの 1 つに割り当てた。手術日より GJG 群には 4% (w/w) 牛車腎気丸を含む食餌を与え、GJG 非投与群には通常の食餌を与えた。

④ 動物行動学的試験

手術の前日、手術日、手術の 7、14、21、28、35、42、49、および 56 日後に、全ラットの摂餌量および体重を記録した。機械的アロディニアは、von Frey フィラメントを用いた段階的機械的刺激に対する足引っ込み反応の閾値を調べる上下法を用いて、手術の前日、手術日、手術の 7、14、21、28、35、42、49、56 日後に評価した。

⑤ Western blot 法

手術後 14 日目に第 4-5 腰神経が起始する脊髄後角を検体として採取し、Western Blot 法を用いて GAD67 の発現量を調べた。

⑥ 統計処理

実験結果は、二元配置反復測定分散分析 (ANOVA) を用いて評価した。群間の差異は、Bonferroni 事後検定でさらに分析した。P 値 < 0.05 を統計的に有意とした。

4. 研究成果

(1) HIV 感染患者に対するアンケート調査

2017 年 9 月より 2019 年 9 月の調査期間 (日本麻酔科学会第 68 回学術集会発表時点) において、合計 203 名の HIV 感染患者よりアンケートの回答を得た (回収率 43.9%)。「体のどこかに痛みがある」と回答したのは 70 名 (34.5%)、「体のどこかにしびれがある」と回答したのは 50 名 (24.6%)であった。AIDS を発症した患者は 71 名であった (35.0%)。本研究では、HIV 感染との直接的な因果関係は明らかではないが、体のどこかに痛みやしびれを自覚する患者が 25~35%程度含まれていた。HIV 感染患者の約 10~30%に HIV に関連した神経障害性疼痛を有するという欧米の報告に近い割合で、本邦においても HIV 関連神経障害性疼痛の患者が存在している可能性が示唆された。

(2) 漢方薬による HIV 関連神経障害の治療の可能性と分子生物学的機序の解明

① ラット HIV 関連神経障害性モデルに対する牛車腎気丸の効果

漢方薬は様々な神経障害性疼痛に対して有用性が示されている牛車腎気丸を用いた。ラットを無作為に HIV 関連神経障害性疼痛モデル群、牛車腎気丸投与 HIV 関連神経障害性疼痛モデル群、偽手術群、牛車腎気丸投与偽手術群の 4 群に割り当て、牛車腎気丸投与 HIV 関連神経障害性疼痛モデル群、牛車腎気丸投与偽手術群には手術日より牛車腎気丸の投与を行った。Von Frey フィラメントによる疼痛閾値評価では、HIV 関連神経障害性疼痛モデル群と比較して牛車腎気丸投与 HIV

関連神経障害性疼痛モデル群で機械的閾値が有意に改善することが確認された（図1）。これにより牛車腎気丸が HIV 関連神経障害性疼痛に有効である可能性が示唆された。

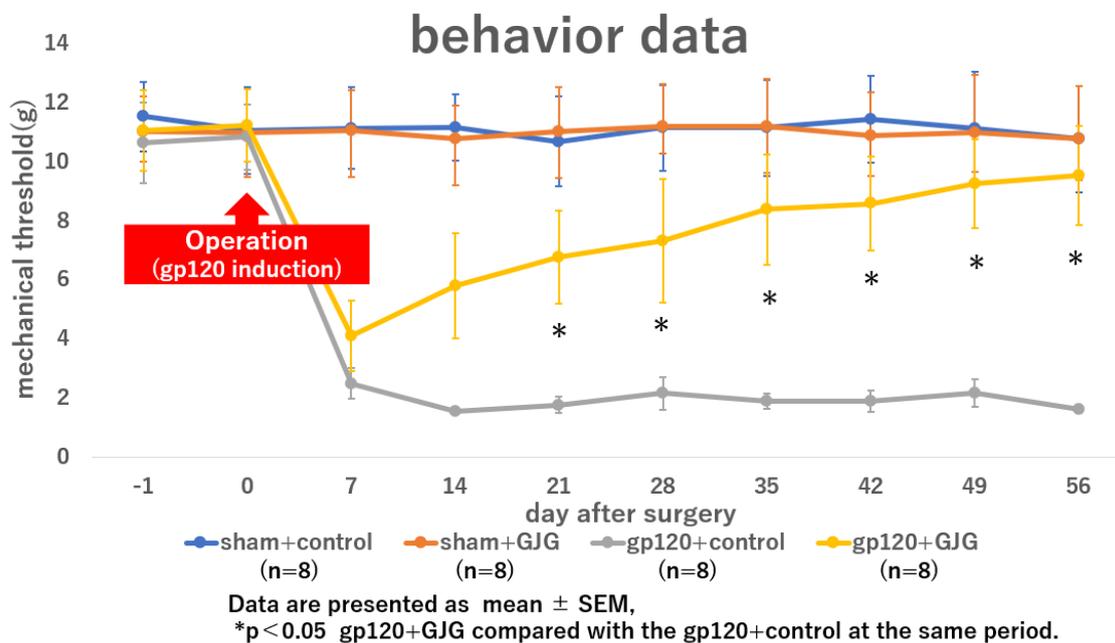


図1. ラット HIV 関連神経障害性モデルに対する牛車腎気丸の効果
HIV 関連神経障害モデルラットに牛車腎気丸を投与し、疼痛閾値の改善を認めた。

② 脊髄後角における GAD67 発現に対する牛車腎気丸の効果

手術後 14 日目にモデルラットの脊髄後角を摘出し、 γ -アミノ酪酸 (GABA) 合成の主要酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ 67 (GAD67) の発現量を Western blotting を用いて調べたところ、牛車腎気丸投与 HIV 関連神経障害群での GAD67 の発現量は、コントロール群での発現量よりも有意に高かった (図2)。この結果より、牛車腎気丸を投与することで、gp120 によりダウンレギュレートされた脊髄後角における GAD67 の発現が回復することが示唆され、このことが HIV 誘発性アロディニアを緩和することに関与している可能性が考えられた。今後さらなる検討は必要であるが、牛車腎気丸が GABA 作動性システムに関与して神経障害性疼痛を軽減させる可能性が考えられた。

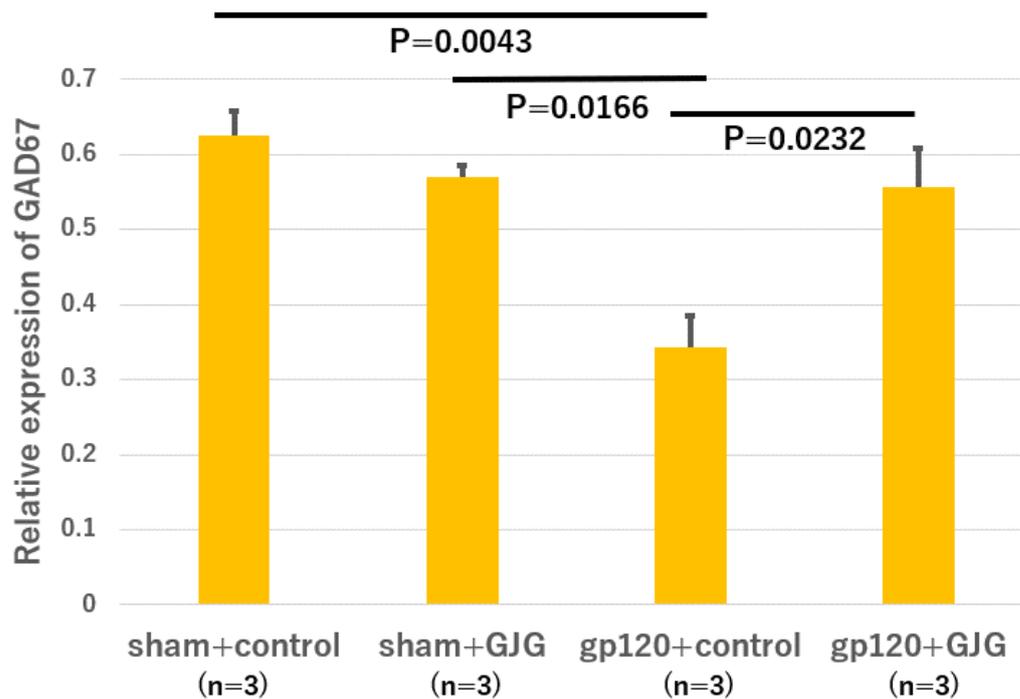


図2. 脊髄後角における GAD67 の相対発現量

mean ± SEM. * $P < 0.05$ one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test.

HIV 関連神経障害モデルラット (gp120 群) における GAD67 の相対的発現量は、sham 群および牛車腎気丸 (GJG) 投与 sham 群よりも有意に低かった。対照的に、GJG 投与 gp120 群における GAD67 の相対的発現量は、gp120 群における GAD67 の相対的発現量よりも有意に高かった。

本研究により得られた成果は HIV 関連神経障害性疼痛のみならず様々な神経障害性疼痛の機序を解明する糸口となり、有効な治療法の開発につながる可能性がある。

<引用文献>

- ① Muh Akbar Bahar, Tsugunobu Andoh, Keisuke Ogura, Yoshihiro Hayakawa, Ikuo Saiki, Yasushi Kuraishi. Herbal medicine goshajinkigan prevents paclitaxel-induced mechanical allodynia without impairing antitumor activity of paclitaxel. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013:849754.
- ② Masato Tawata, Akihiro Kurihara, Kiyooki Nitta, Eiichi Iwase, Naoya Gan, Toshimasa Onaya. The effects of goshajinkigan, a herbal medicine, on subjective symptoms and vibratory threshold in patients with diabetic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1994; 26: 121–128.
- ③ Miho Nakanishi, Aya Nakae, Yuki Kishida, Kousuke Baba, Noriko Sakashita, Masahiko Shibata, Hideki Yoshikawa, Keisuke Hagihara. Go-sha-jinki-Gan (GJG) ameliorates allodynia in chronic constriction injury-model mice via suppression of TNF- α expression in the spinal cord. *Mol Pain.* 2016; 12
- ④ Uri Herzberg, Jacqueline Sagen. Peripheral nerve exposure to HIV viral envelope protein gp120 induces neuropathic pain and spinal gliosis. *Journal of Neuroimmunology.* 116(2001) 29–39

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤 泉, 小野寺 美子, 神田 恵, 安濃 英里, 神田 浩嗣, 国沢 卓之
2. 発表標題 HIV関連神経障害性疼痛に対する牛車腎気丸の効果
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会 第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Izumi Sato, Yoshiko Onodera, Megumi Kanao-Kanda, Eri Anno, Hirotsugu Kanda, Takayuki Kunisawa.
2. 発表標題 Go-sha-jinki-Gan suppresses neuropathic pain induced by perineural HIV gp120
3. 学会等名 ANESTHESIOLOGY 2019 Annual Meeting - American Society of Anesthesiologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------