

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	Ntogwa Mpumelelo
論文題目	Mechanisms of HIV-induced peripheral neuropathic pain by focusing on Schwann cell-macrophage interaction		
(論文内容の要旨)			
<p>Distal sensory neuropathy (DSN) with symptoms including spontaneous pain, hyperalgesia, allodynia and numbness occurs in 50% of patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). HIV strains are divided into macrophage-tropic R5 strain and T-cell line tropic X4 strain. Accumulating evidence suggest that X4 strain is primarily involved in HIV DSN pathogenesis via the CD4-CXCR4 chemokine receptor complex. However, it remains controversial whether HIV can infect neurons that do not express CD4. Recently, it is reported that macrophage accumulation around peripheral nerves is observed in patients with HIV DSN, and the HIV envelope protein glycoprotein 120 (HIV gp120) is involved in the development of pain. In this study, I examined the roles of macrophage-mediated neuroinflammation in the HIV DSN pathogenesis by using X4 gp120-induced neuropathic pain mouse model (Chapter I), and determined the regulators of X4 gp120-induced macrophage recruitment to peripheral nerves by focusing on interactions between macrophages and Schwann cells (Chapter II).</p>			
Chapter I. Roles of macrophages in pain-like behaviors in X4 gp120-induced HIV DSN mouse model			
<p>For the mouse model of HIV DSN, the right sciatic nerve (ipsilateral) of C57BL/6J mice was exposed topically to X4 strain gp120 IIIB (13 nM) or gp120 MN (13 nM) by loosely wrapping oxidized cellulose gauze. Perineural application of gp120 IIIB or MN induced mechanical hypersensitivity in the ipsilateral hindpaw 7–28 days after the application. Likewise, perineural application of gp120 IIIB elicited spontaneous pain-like behaviors (flinching, scratching, biting and licking) against the ipsilateral hindpaw 7 days after the application. Flow cytometry and immunohistochemical studies revealed increased infiltration of bone marrow-derived macrophages into the parenchyma of the ipsilateral sciatic nerves and dorsal root ganglia (DRG) 7 days after gp120 IIIB or MN application. Neither pain-like behaviors nor macrophage infiltration was observed in the contralateral hindpaw.</p>			
<p>Next, the effects of clodronate liposomes, a well-characterized macrophage depleting compound, on gp120 IIIB-induced pain-like behaviors were investigated. Flow cytometry and immunohistochemical studies confirmed that clodronate treatment markedly decreased macrophages on the ipsilateral sciatic nerve and DRG in gp120 IIIB-treated mice. Under these conditions, chemical deletion of circulating macrophages by clodronate treatment significantly inhibited gp120 IIIB-induced mechanical hypersensitivity and spontaneous pain-like behaviors.</p>			
<p>These findings suggest that recombinant X4 HIV-1 gp120 delivered directly to the mouse sciatic nerve induced both mechanical hypersensitivity and spontaneous pain-like behaviors, and infiltration of macrophages into the peripheral nerves is associated with the development of pain-like behaviors.</p>			
Chapter II. Roles of Schwann cell-derived CXCL1 in X4 HIV gp120-induced macrophage infiltration and pain-like behaviors			
<p>We investigated the mechanisms underlying X4 HIV gp120-induced macrophage infiltration into peripheral neurons using primary cultured cells and HIV DSN mouse model. A cell migration assay using the macrophage cell line RAW 264.7 showed no chemotactic response in culture medium containing gp120 IIIB or gp120 MN (5 nM), and toward conditioned medium collected from rat primary</p>			

cultured DRG neurons treated with gp120 IIIB or MN (5 nM) for 3 days. By contrast, RAW 264.7 cells demonstrated significant chemotactic responses toward conditioned medium from rat primary cultured Schwann cells treated with either gp120 IIIB or MN, although gp120 IIIB or MN did not affect Schwann cell viability, morphology, or differentiation state, despite expression of CXCR4. These results suggest that Schwann cell-derived soluble factors may recruit macrophages in response to X4 gp120 exposure. Thus, alterations in gene expression for cytokines and chemokines were analyzed by DNA array analysis. Among the 89 genes examined, six genes were upregulated in gp120 IIIB-treated Schwann cells, and then verified with a real-time PCR assay. Among them, significant mRNA upregulation of CXCL1, a chemoattractant of macrophages and neutrophils, was confirmed. Furthermore, the chemotactic response of RAW 264.7 cells toward culture medium containing CXCL1 (50 nM) was confirmed. Similar to gp120 IIIB or MN, perineural application of recombinant CXCL1 elicited both mechanical hypersensitivity and spontaneous pain-like behaviors accompanied by macrophage infiltration to the peripheral nerves. Furthermore, the repeated injection of CXCR2 (receptor for CXCL1) antagonist SB220052 (4 mg/kg) or CXCL1 neutralizing antibody prevented both pain-like behaviors and macrophage infiltration in gp120 IIIB-treated mice.

These results suggest that Schwann cell-derived CXCL1, secreted in response to X4 gp120 exposure, is responsible for macrophage infiltration into peripheral nerves, and is thereby associated with pain-like behaviors in mice.

Taken together, the present study suggests that the HIV envelope protein X4 gp120 elicits a neuroinflammatory response by promoting CXCL1-mediated cell-cell interactions between Schwann cells and macrophages. These macrophages ultimately converged on neurons to induce mechanical hypersensitivity and spontaneous pain-like behaviors. These new findings will lead to the development of novel therapeutic drugs for HIV DSN.

(論文審査の結果の要旨)

痛覚過敏、アロディニアやしびれなどを主症状とした感覚神経障害 (Distal Sensory Neuropathy, DSN) は、ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 感染者の 50%において発症することが知られている。HIV は細胞への感染経路および細胞選択性から、X4 あるいは R5 strain に分類され、特に HIV DSN の発症には、CD4-CXCR4 複合体を介して細胞に侵入する X4 strain が関与すると考えられている。しかしながら、その発症機序には不明な点が多いため、根本的な治療法は存在しない。近年、HIV DSN の発症患者において末梢神経周囲にマクロファージの集積が認められること、ならびに HIV エンベロープタンパク質 glycoprotein 120 (HIV gp120) が疼痛発現に関与する可能性が指摘されている。これらの報告に基づき、X4 HIV gp120 によって引き起こされる神経炎症性の反応が、HIV DSN 発症の一因であると仮説を立てた。本研究では、髄鞘を形成するシュワン細胞とマクロファージの細胞間相互作用に着目してこの仮説を検証し、X4 HIV gp120 による HIV DSN の発症機序について以下の新知見を得た。

第一章 HIV DSN モデルマウスの作製と疼痛発現におけるマクロファージの関与

C57BL/6J マウスの坐骨神経 (右後肢: ipsilateral 側) に、酸化セルロースガーゼを担体として、X4 strain HIV エンベロープタンパク質である gp120 IIIB (13 nM)、gp120 MN (13 nM) あるいは 0.1%アルブミン溶液 (溶媒対照群) を局所投与し、HIV DSN モデルマウスを作製した。本モデルマウスを用いて、von Frey 試験法により機械過敏応答における閾値の変化について検討した結果、ipsilateral 側において、gp120 III B あるいは gp120 MN 局所投与 7 日後から 28 日後まで持続する、機械的アロディニアの出現を認めた。さらに、gp120 IIIB あるいは gp120 MN 局所投与 7 日後において、自発痛関連行動 (flinching, scratching, biting, licking) の有意な増加が観察された。次に、同モデルマウスから坐骨神経標本を作製して、マクロファージの集積について免疫組織科学的な検討を行った。その結果、gp120 IIIB の局所投与 7 日後に、ipsilateral 側の坐骨神経軸索および脊髄後根神経節 (Dorsal Root Ganglia, DRG) の実質において、造血幹細胞由来の末梢マクロファージが多数浸潤していることを確認した。なお、上述の疼痛行動やマクロファージの集積は、gp120 を投与していない左後肢 (contralateral 側) では、いずれの群においても全く観察されなかった。さらに、末梢マクロファージの除去剤であるクロドロン酸内包リポソームを用いて、坐骨神経内で増加したマクロファージの HIV DSN 発症における関与について検討を行った。まず、クロドロン酸内包リポソームをマウスに反復腹腔内投与した後に、flow cytometry により末梢マクロファージが除去されたことを確認した。このような条件下では、gp120 IIIB 誘発機械的アロディニアおよび自発痛関連行動はほぼ完全に抑制された。以上の結果より、X4 HIV gp120 によって機械的アロディニアや自発痛が惹起されることが明らかとなった。また、これらの疼痛関連行動は、末梢神経に浸潤したマクロファージによって媒介されていることが明らかになった。

第二章 X4 HIV gp120 によるマクロファージの遊走におけるシュワン細胞由来 CXCL1 の役割

本研究では、初代培養細胞実験系および上述の HIV DSN モデルマウスを用いて、

X4 HIV gp120 によるマクロファージの遊走に関わる機序の解明を試みた。マクロファージ細胞株 RAW 264.7 を用いて細胞遊走アッセイを実施した結果、gp120 IIIB (5 nM)あるいは gp120 MN (5 nM) 含有培地には遊走性を示さなかった。同様に、gp120 IIIB (5 nM) あるいは gp120 MN (5 nM) を 3 日間処置したラット由来初代培養 DRG 神経細胞の培養上清に対して、RAW 264.7 は遊走反応を示さなかった。それに対し、gp120 IIIB (5 nM)あるいは gp120 MN (5 nM)を処置したラット坐骨神経由来初代培養シュワン細胞の培養上清に対して、RAW 264.7 は遊走反応を示した。これらの結果から、第一章で確認したマクロファージの浸潤には、軸索を髄鞘化するシュワン細胞からの分泌因子が重要な役割を果たすと考えられた。そこで、gp120 IIIB 処置後の初代培養シュワン細胞におけるサイトカイン・ケモカインの発現変化について、DNA アレイ解析を行った。その結果、対照群と比較して、gp120 IIIB 処置群では、免疫細胞遊走因子として知られる CXCL1 が有意に増加していることを見出した。さらに、CXCL1 の組換えタンパク質 (50 nM) 含有培地に対する RAW 264.7 の遊走反応、ならびに同タンパク質 (50 nM) の坐骨神経への局所投与による、マクロファージの浸潤を伴った機械的アロディニアや自発痛関連行動の発現を確認した。Gp120 IIIB の局所投与 7 日後に認められる、坐骨神経へのマクロファージの浸潤および機械的アロディニアは、CXCL1 の受容体である CXCR2 の阻害薬 SB220052 (4 mg/kg) を gp120 IIIB 投与前後に反復腹腔内投与することで、ほぼ完全に抑制された。以上の結果より、X4 HIV gp120 は髄鞘形成シュワン細胞に作用して、同細胞での CXCL1 発現増加および細胞外分泌を誘導し、末梢マクロファージの浸潤を惹起していることが明らかとなった。

以上、本研究の結果より、HIV エンベロープタンパク質である X4 gp120 は、CXCL1 を介したシュワン細胞とマクロファージの細胞間相互作用を促進することにより、神経炎症性の反応を惹起することが示唆された。また、このような反応が、機械的アロディニアや自発痛の一因であることが明らかとなった。これらの新規知見は、未だ確立されていない HIV DSN のメカニズムに基づいた根本治療法の開発に直結すると考えられる。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 3 年 2 月 9 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降