

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 2 9 年 6 月 9 日現在

機関番号：3 4 4 1 9

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：2 6 4 6 0 7 1 0

研究課題名（和文）核内蛋白HMGB1を標的とする癌化学療法誘起神経障害性疼痛と内臓痛の予防と治療

研究課題名（英文）Prevention and treatment of chemotherapy-induced neuropathic pain and visceral pain by targeting HMGB1, a nuclear protein

研究代表者

川畑 篤史（KAWABATA, Atsufumi）

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：2 0 1 7 7 7 2 8

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000 円

研究成果の概要（和文）：核内蛋白HMGB1はdamage-associated molecular patternsとして、病態時に細胞外に放出される。今回は、癌化学療法誘起神経障害性疼痛および内臓痛におけるHMGB1の役割を解析した。その結果、HMGB1は、RAGE、Toll-like receptor 4、CXCR4などの細胞膜受容体を介して癌化学療法誘起神経障害性疼痛や膵炎に伴う膵臓痛の発症および維持に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：HMGB1, a nuclear protein, is released into the extracellular space and plays a role as one of damage-associated molecular patterns in pathological conditions. Here we analyzed the role of HMGB1 in chemotherapy-induced neuropathic pain and visceral pain. Our data indicate that HMGB1 participates in the development and maintenance of chemotherapy-induced neuropathic pain and pancreatitis-related pain.

研究分野：薬理学

キーワード：HMGB1 RAGE CXCR4 Toll-like receptor 4 トロンボモジュリン 神経障害性疼痛 内臓痛 膵臓痛

## 1. 研究開始当初の背景

核内タンパク high mobility group box 1 (HMGB1) は、壊死細胞から受動的に放出されるほか、マクロファージなどの細胞によって分泌され、周辺細胞の細胞膜に存在する receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)、Toll-like receptor (TLR) 4、TRR2などを介して炎症反応を促進することが知られていた。一方、外科的手術により作製した神経障害性疼痛モデルラットにおいて、HMGB1が関与する可能性を示唆する報告があったが、他のモデルにおける痛みの発現における HMGB1 の役割や標的分子についてはほとんど分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

我々は、H<sub>2</sub>S による Cav3.2 T 型カルシウムチャネルの活性化が神経障害性疼痛や各種内臓痛に関与することを明らかにしている<sup>1-6</sup>。また最近、局所炎症時に細胞外に放出される核内タンパクの HMGB1 が痛覚過敏の発現に関与すること、さらに HMGB1 を不活化する遺伝子組換えヒト可溶性トロンボモジュリン (rhsTM) がこの痛覚過敏を抑制すること<sup>7</sup>を報告した。本研究では、癌化学療法誘起神経障害性疼痛と各種内臓痛の病態に HMGB1 が H<sub>2</sub>S/Cav3.2 系の上流シグナルとして関与するか否かを検討し、細胞外 HMGB1 の由来と標的分子を明らかにした上で、その分子制御メカニズムを解析した。また、HMGB1 を不活化する rhsTM や抗 HMGB1 中和抗体を用いて、癌化学療法誘起神経障害性疼痛や各種内臓痛を予防または治療できるか否かを検証した。

## 3. 研究の方法

(1) マウスにおいて HMGB1 足底内投与により誘起される機械的アロディニアに関する HMGB1 標的分子の解析

ddY マウスの足底内へ牛胸腺由来 HMGB1 (bt-HMGB1)、all-thiol HMGB1 (at-HMGB1) または disulfide HMGB1 (ds-HMGB1) を投与し、侵害受容閾値を von Frey 法により測定した。

(2) ラットのがん化学療法誘起神経障害性疼痛の発症および維持における HMGB1 の役割に関する検討

Wistar ラットにパクリタキセル (PCT) 2 mg/kg を 2 日に 1 回、計 4 回腹腔内投与、あるいはビンクリスチン (VCR) 0.1 mg/kg を一週間に 5 回、計 10 回腹腔内投与することで神経障害性疼痛を誘起し、侵害受容閾値を足圧法または von Frey 法で測定した。

タンパク量は Western blot 法で測定し、タンパク分布は免疫染色法で調べた。

(3) 急性膵炎モデルマウスの膵臓痛へのマクロファージ由来 HMGB1 の関与についての検

討

ddY 系マウスに cerulein 50 mg/kg を 1 時間に 1 回、計 6 回腹腔内投与することで急性膵炎を誘起し、膵臓痛は von Frey 法で上腹部における関連痛覚過敏を検出することで評価した。膵炎の程度は、膵湿重量、血中アミラーゼ活性および膵病理切片観察により評価した。

タンパク量は Western blot または ELISA 法で測定し、マクロファージ浸潤は F4/80 免疫染色により調べた。

## 4. 研究成果

(1) マウスにおいて HMGB1 足底内投与により誘起される機械的アロディニアに関する HMGB1 標的分子の解析

bt-HMGB1 誘起アロディニア (図 1)

bt-HMGB1 100 ng の足底内投与によりアロディニアが誘起され、これは RAGE を阻害する低分子量ヘパリン (LMWH) あるいは可溶性 RAGE により部分的にはあるが有意に抑制されたが、TLR4 阻害薬 LPS-RS や CXCR4 拮抗薬 AMD3100 ではほとんど抑制されなかった。

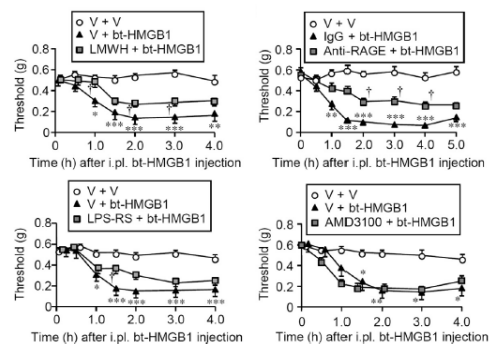


図 1 マウスにおける bt-HMGB1 誘起アロディニアとそれに及ぼす阻害薬の影響

at-HMGB1 および ds-HMGB1 により誘起されるアロディニア (図 2)

マウスにおいて at-HMGB1 は 100 ng、ds-HMGB1 は 10 ng の足底内投与でアロディニアを誘起し、at-HMGB1 の効果は RAGE を阻害する LMWH で、また、ds-HMGB1 の効果は TLR4 拮抗薬 LPS-RS で阻止された。

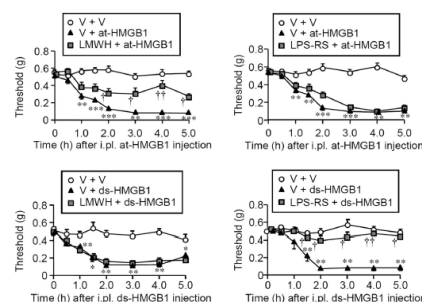


図 2 マウスにおいて at-HMGB1 あるいは ds-HMGB 足底内投与によって誘起されるアロディニアとそれに及ぼす阻害薬の影響

## 考察・結論

これらの結果より、末梢組織において at-HMGB1 は RAGE を介して、また ds-HMGB1 は TLR4 を介して機械的アロディニアを誘起することが明らかとなった。

## (2) ラットのがん化学療法誘起神経障害性疼痛の発症および維持における HMGB1 の役割に関する検討

PCT あるいは VCR 誘起神経障害性疼痛への HMGB1 の関与

ラットにおいて PCT あるいは VCR により誘起される神経障害性疼痛の発現は、抗 HMGB1 中和抗体 (図 3, 4) あるいは HMGB1 不活性化作用を有するヒト遺伝子組換え可溶性トロンボモジュリン (TM) の反復投与により阻止された。また、PCT あるいは VCR 誘起神経障害性疼痛成立後に抗 HMGB1 中和抗体および TM を投与した場合にも痛みは軽減された。

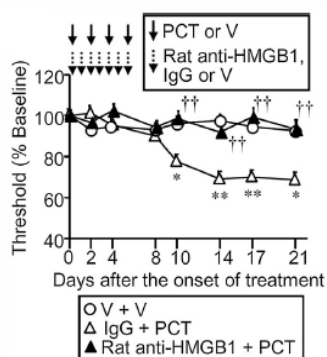


図 3 ラット PCT 誘起神経障害性疼痛に対する抗 HMGB1 中和抗体反復投与の影響

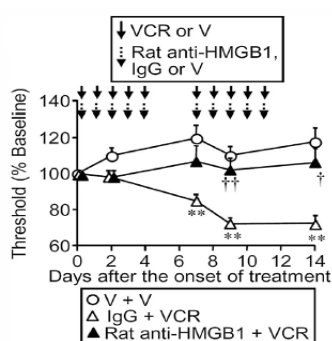


図 4 ラット VCR 誘起神経障害性疼痛に対する抗 HMGB1 中和抗体反復投与の影響

PCT あるいは VCR 誘起神経障害性疼痛に関与する HMGB1 標的分子

HMGB1 の標的分子として知られている TLR4 と RAGE の関与を検討するため、TLR4 拮抗薬である LPS-RS および RAGE 拮抗作用を有する LMWH の効果を調べた。その結果、いずれによっても PCT あるいは VCR により誘起される神経障害性疼痛が有意に抑制された (図 5)。

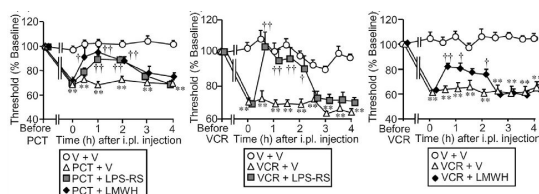


図 5 PCT あるいは VCR により誘起される神経障害性疼痛に対する TLR4 拮抗薬と RAGE 拮抗薬の影響

PCT あるいは VCR 誘起神経障害性疼痛ラットにおける HMGB1 と関連タンパクの挙動

血中 (図 6) あるいは坐骨神経や後肢組織中の HMGB1 量は PCT あるいは VCR 処置によって変化しなかった。一方、後根神経節 (DRG) 中の HMGB1 量は減少していた。

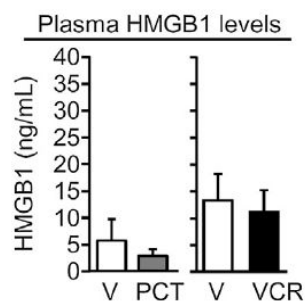


図 6 PCT あるいは VCR 処置ラットにおける血中 HMGB1 濃度

次に、PCT 処置マウスの坐骨神経において免疫染色を行ったところ、神経細胞やシュワン細胞に HMGB1, RAGE あるいは TLR4 が局在していることが判明した。

## 考察・結論

これらの結果より、PCT や VCR などの抗がん薬により誘起される神経障害性疼痛には、内因性 HMGB1 による TLR4 や RAGE の活性化が関与することが明らかとなった。

## (3) 急性膵炎モデルマウスの膵臓痛へのマクロファージ由来 HMGB1 の関与について

セルレイン誘起急性膵炎に伴う膵臓痛へのマクロファージ由来 HMGB1 の関与

セルレイン処置マウスでは、膵湿重量増加や血中アミラーゼ増加とともに上腹部における関連痛覚過敏が認められ、これらのうち関連痛覚過敏のみが抗 HMGB1 中和抗体あるいは TM の前投与により阻止された。また、マクロファージからの HMGB1 遊離を阻害する ethyl pyruvate、マクロファージ阻害薬 minocycline あるいはマクロファージ枯渇薬リボソーム化 clodronate によっても関連痛覚過敏は抑制された。さらに、セルレイン処置マウスの膵臓組織内にマクロファージの浸潤・集積が見られた。

セルレイン誘起急性膵炎に伴う膵臓痛に対する HMGB1 標的分子拮抗薬の効果

HMGB1 標的分子のうち、TLR4 拮抗薬は明確な効果を示さなかったが、RAGE 拮抗薬と CXCR4 拮抗薬はセルレイン誘起膵炎に伴う関連痛覚過敏を抑制した。

セルレイン誘起急性膵炎発症に伴うタンパク量変化

セルレイン 6 回投与によって作製した今回の膵炎モデルでは、血中および膵組織中の HMGB1 量に有意な増加は見られなかった。一方、膵組織では、RAGE、CXCR4 および CXCL12 の発現量が増加していた。

#### 考察・結論

これらの結果より、セルレイン誘起急性膵炎に伴う膵臓痛の発症には、マクロファージ由来 HMGB1 による RAGE および CXCR4 の活性化が関与することが明らかとなった。

#### (4) まとめ

本研究により、がん化学療法誘起神経障害性疼痛および急性膵炎に伴う膵臓痛の発症には内因性 HMGB1 が関与することが明らかとなった。これらの知見は、これまでよくわかっていなかった HMGB1 による疼痛伝達調節に関与する分子メカニズムを解明する上で重要であり、国内外の関連分野の研究に大きなインパクトを与えるものである。今後、さらに研究を進めていくことで、創薬に向けた展開が期待できる。

#### <引用文献>

- Kawabata et al., Pain 130, 302 (2007)  
Maeda, Kawabata et al., Pain 142,127 (2009)  
Matsunami, Kawabata et al., Gut 58, 751 (2009)  
Nishimura, Kawabata et al., Gut 58, 762 (2009)  
Matsunami, Kawabata et al., Br J Pharmacol 167, 917 (2012)  
Okubo, Kawabata et al., Neuroscience 188, 148 (2011)  
Tanaka, Kawabata et al., Br J Pharmacol 79, 112(2013)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計2件)

Nishida, T., Tsubota, M., Kawaishi, Y., Yamanishi, H., Kamitani, N., Sekiguchi, F., Ishikura, H., Liu, K., Nishibori, M., Kawabata, A., Involvement of high mobility group box 1 in the development and maintenance of

chemotherapy-induced peripheral neuropathy in rats, Toxicology, 査読有、365 巻, 2016, 48-58.

DOI: [10.1016/j.tox.2016.07.016](https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.07.016)

Yamasoba, D., Tsubota, M., Domoto, R., Sekiguchi, F., Nishikawa, H., Liu, K., Nishibori, M., Ishikura, H., Yamamoto, T., Taga, A., Kawabata, A., Peripheral HMGB1-induced hyperalgesia in mice: redox state-dependent distinct roles of RAGE and TLR4. J. Pharmacol. Sci., 査読有、vol 130, 2016, 139-142.

DOI: [10.1016/j.jphs.2016.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.01.005)

#### [学会発表](計 12 件)

Kawabata, A., Roles of TLR4 and RAGE targeted by high mobility group box 1 in inflammatory and chemotherapy-induced peripheral neuropathy, Topical Workshop "Toll-Like Receptor Pain Mechanisms" in 16th World Congress on Pain. 2016, 9, 26-30, Yokohama, パシフィコ横浜.

川畑篤史, HMGB1 研究の新展開 ~免疫系と神経系のクロストークにおける役割~, 第 31 回日本救命医療学会総会・学術集会 イブニングセミナー. 2016, 9, 16-17, 福岡, アゴーラ福岡山の上ホテル&スパ ザ マーカススクエア福岡.

川畑篤史, トロンボモジュリンアルファの内臓痛治療への応用、第 44 回日本潰瘍学会 シンポジウム「医薬品の消化器病への適用拡大における理論構築 ~これぞ消化器薬理の力」. 2016, 9, 2-3, 旭川, 旭川グランドホテル.

Kawabata, A., Irie, Y., Tsubota, M., Sekiguchi, F., Ishikura, H., Nishibori, M., High mobility group box 1 mediates pancreatic pain in mice, Physiology 2016, 2016, 7, 28-31, Dublin, Ireland.

Irie, Y., Tsubota, M., Sekiguchi, F., Ishikura, H., Nishibori, M., Kawabata, A., Macrophage-derived high mobility group box 1 participates in the development and maintenance of pancreatic pain through the activation of RAGE and CXCR4 in mice with cerulein-induced acute pancreatitis, Neuroscience 2015, 2015, 10, 17-21, Chicago, USA.

Kawabata, A., Tsubota, M., Yamaguchi, K., Hiramoto, S., Sekiguchi, F., Tanaka, J., Ishikura, H., Nishibori, M., Bladder pain accompanying cyclophosphamide-induced mouse cystitis involves HMGB1 release upstream of the

cystathionine-gamma-lyase/H2S/Cav3.2 pathway in the bladder tissue, Neuroscience 2015, 2015, 10, 17-21, Chicago, USA.

川畑篤史、内臓痛の新しい治療標的分子：T型Ca<sup>2+</sup>チャネルとHMGB1、生体機能と創薬シンポジウム 2015. 2015, 8, 27-28, 船橋, 日本大学.

山嶋大智、関由加里、山西広樹、坪田真帆、関口富美子、八木秀樹、益子 高、西堀正洋、川畑篤史、マクロファージ由来HMGB1はNF-κB系を介して炎症性痛覚過敏に寄与する. 第88回日本薬理学会年会. 2015, 3, 18-20, 名古屋, 名古屋国際会議場.

Kawabata, A., Kawaishi, Y., Nishida, T., Yamanishi, H., Kamitani, N., Tsubota, M., Sekiguchi, F., Ishikura, H., Nishibori, M. High mobility group box 1 as a target for prevention and therapeutic treatment of chemotherapy-induced neuropathic pain. Pharmacology 2014. 2014, 12, 16-28, London, UK.

山嶋大智、関由加里、山西広樹、坪田真帆、関口富美子、八木秀樹、益子 高、西堀正洋、川畑篤史、マクロファージ由来HMGB1の炎症性痛覚過敏への関与と分子作用メカニズムの解析. 第126回日本薬理学会近畿部会 2014, 10, 24, 和歌山, 和歌山県 JA ビル.

Kawabata, A., Kawaishi, Y., Nishida, T., Yamanishi, H., Kamitani, N., Tsubota, M., Ishikura, H., Sekiguchi, F., Nishibori, M. Prevention and reversal of chemotherapy-induced neuropathic pain by HMGB1 neutralization in rodents. 9th FENS Forum of European Neuroscience, 2014, 7, 5-9, Milan, Italy.

坪田真帆、川畑篤史、結腸の疼痛および炎症におけるガス状情報伝達物質硫化水素の役割、日本薬学会第134年会 シンポジウム「若手薬理学者が開拓する難治性疾患の克服を目指した次世代創薬・育薬研究」2014, 3, 27-30, 熊本, 熊本大学.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/byoutai/index.files/byoutai.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川畑 篤史 (KAWABATA, Atsufumi)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：20177728

### (2) 研究分担者

関口 富美子 (SEKIGUCHI Fumiko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：90271410

坪田 真帆 (TSUBOTA Maho)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：90510123