

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09046

研究課題名(和文) RAGEを標的とする神経障害性疼痛および内臓痛に対する新しい治療戦略の構築

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy targeting RAGE for treatment of peripheral neuropathy and visceral pain

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：RAGEを標的とする難治性疼痛治療薬のシーズを開発するため、神経障害性疼痛および内臓痛の動物モデルを作成して既存のRAGEの有効性を確認した。ついで、中分子量ヘパリンフェニルアラニン(MMWHI-F)がRAGEを選択的に遮断し難治性疼痛を抑制することを証明した。さらに、インシリコ解析により同定した低分子化合物がRAGE-RAGE bindingを阻害することを証明し、新規RAGE拮抗薬開発のためのシーズになりうることを示唆した。以上、本研究によって高分子および低分子RAGE拮抗薬が痛みの治療に有用であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、アルツハイマー病の予防・治療を目的とするいくつかのRAGE拮抗薬の開発が試みられてきたが、まだ臨床応用には至っていない。本研究では、RAGEが難治性疼痛の治療標的分子になりうることを証明して、高分子および低分子のRAGE拮抗薬のシーズを得ることができた。現在、モルヒネ、プレガバリンなどが効かない難治性慢性疼痛を訴える患者が多数存在することを考慮すると、今回得られた知見は社会的にもインパクトのあるものであると考える。

研究成果の概要(英文)：To develop seeds for development of medicines targeting RAGE for treatment of intractable pain, the present study first ascertained the involvement of RAGE in neuropathic and visceral pain using animal models. We then demonstrated that middle-molecular-weight-heparinylphenylalanine suppressed intractable pain possibly through selective blockade of RAGE. Our in silico analysis identified a small molecule compound that inhibits AGE-RAGE binding and is useful as a seed compound for novel RAGE blocker development. Together, our study identified both large and small molecules as RAGE blockers, which would be useful for pain treatment.

研究分野：神経・疼痛・炎症薬理学

キーワード：疼痛の発生・増強機序 RAGE HMGB1 末梢神経障害 内臓痛

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Advanced glycation end products (AGE) の細胞膜受容体として見いだされた receptor for AGE (RAGE)は、糖尿病の慢性合併症の病態に関与する。この RAGE は AGE 以外に、組織損傷や炎症などに伴って細胞外へ放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs)の 1 つである核内タンパク質 high mobility group box 1 (HMGB1)やグリア細胞などに由来するタンパク質 S100B などによっても活性化され、「酸化ストレス増強、Ras/MAPK 系および NF- $\kappa$ B 系の活性化」などのシグナルを介して炎症反応を増悪させる。研究開始当初、RAGE が炎症性細胞以外に、神経細胞やシュワン細胞などに発現し、痛みの情報伝達に関与する可能性が指摘されていた。しかし、国内外において RAGE を標的とした難治性疼痛治療薬の開発を目指す本格的な研究は行われていなかった。我々は、末梢組織において細胞外へ放出された内因性 HMGB1 が、炎症性体性痛覚過敏、がん化学療法誘起神経障害性疼痛、間質性膀胱炎に伴う膀胱痛に関与することを明らかにし、末梢組織において RAGE が HMGB1 の標的分子として痛みの発現に重要な役割を果たすことを見出していた。

### 2. 研究の目的

我々は、神経障害性疼痛や内臓痛などの難治性疼痛の克服を目指した研究を展開し、Cav3.2 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルや HMGB1 を標的分子とする新しい治療戦略を考案してきた。特に、壊死細胞から受動的に、またマクロファージや神経細胞などから能動的に細胞外へ放出される HMGB1 が、パクリタキセルやビンクリスチンにより誘起される神経障害性疼痛、シクロホスファミド誘起膀胱炎に伴う膀胱痛、セルレイン誘起膵炎に伴う膵臓痛、サブスタンス P 膀胱内注入誘起膀胱痛、ブチレート誘起結腸痛覚過敏などに関与するとの知見を既に得ている。HMGB1 は分子内に3つのシステイン残基を有するが、そのすべてが還元状態にある all-thiol 型 HMGB1 (at-HMGB1) として細胞外に放出され、その後、酸化状態では2つのシステイン残基が分子内でジスルフィド結合して disulfide 型 HMGB1 (ds-HMGB1) へ変換される。我々は、末梢局所において at-HMGB1 は RAGE を、ds-HMGB1 は Toll-like receptor 4 (TLR4) を活性化することで、痛覚過敏を誘起することを既に証明している。また、HMGB1 の関与が証明された上記難治性疼痛モデルでは、RAGE が TLR4 とともに HMGB1 の標的分子として中心的役割を果たしていることを明らかにしている。これまで我々は、抗 HMGB1 中和抗体やトロンボモジュリンアルファ (遺伝子組換えヒト可溶性トロンボモジュリン) などの高分子化合物により HMGB1 を不活性化することで、難治性疼痛を予防・治療できることを証明してきたが、慢性疼痛の治療では、より低コストで経口投与可能な薬を開発することが望まれている。そこで、今回は、HMGB1 の最も重要な標的分子の1つである RAGE を阻害する低コストあるいは低分子の化合物を見出し、臨床治療への応用を目指す研究を行うことにした。本研究では、最初に、各種難治性疼痛モデルにおいて、既存の RAGE 阻害薬を用いて、治療標的分子としての可能性を再評価する。次に、RAGE を阻害するヘパリンの誘導体を用いる検討、既存の低分子 RAGE 拮抗薬 FPS-ZM1 および azeliragon の構造を元にしたドラッグリポジショニング研究、さらに AGE-RAGE 結合様式のインシリコ解析による新規低分子 RAGE 拮抗薬のシード化合物の検索などを行った。

### 3. 研究の方法

(1) 各種難治性疼痛モデルにおける既存の RAGE 阻害薬の予防・治療効果の評価：難治性疼痛モデルとして、マウスにおける抗がん薬オキサリプラチン (5 mg/kg) 単回腹腔内投与により誘発される末梢神経障害モデルおよびサブスタンス P (6 nmol, 30 分、2 回) 膀胱内投与により誘発される膀胱痛症候群モデルにおいて、抗 HMGB1 中和抗体と、RAGE 拮抗作用を有する低分子ヘパリンおよび FPS-ZM1 の効果を検討した。痛みの閾値は von Frey 法で測定した。

(2) RAGE 拮抗薬候補物質としての中分子量ヘパリンフェニルアラニン誘導体 (中分子量ヘパリンフェニルアラニン; MMWH-F) の評価：MMWH-F の抗 IIa, Xa 活性および AGE-RAGE 結合阻害活性を、各アッセイキットを用いて評価した。また、マウスにおいて、RAGE の関与が証明されている at-HMGB1 足底内投与誘起アロディニア、オキサリプラチン誘起アロディニアおよびブチレート反復結腸内投与誘起結腸痛覚過敏に対する MMWH-F の効果を調べた。

(3) 上市医薬品から RAGE 拮抗薬候補物質を検索するドラッグリポジショニング研究：既知の RAGE 拮抗薬である FPS-ZM1 および azeliragon 両方に類似性の高い既存の上市医薬品の探索は、統合計算化学システム molecular operating environment (MOE)を用いて行った。構造式の類似性は MACCS key を、特性の類似性は 2 次元ファーマコフォア・フィンガープリント法のひとつである typed-atom graph distance (TGD)を使用して解析し、どちらも類似度 0.7 を基準として FPS-ZM1 および azeliragon と類似度の高い医薬品を抽出した。インシリコ解析で選択した既存医薬品の RAGE 拮抗候補物質について、at-HMGB1 足底内投与誘起アロディニアに対する効果と AGE-RAGE 結合阻害活性を評価した。

(4) RAGE 結合モデルからインシリコ解析によりデザインした RAGE 拮抗薬候補物質の評価：インシリコ解析により化合物ライブラリーより数個の RAGE 拮抗薬候補物質を選択し、AGE-

RAGE 結合に対する阻害作用の有無を評価する。

#### 4. 研究成果

(1) オキサリプラチン (OHP) 誘発性末梢神経障害モデルマウスにおける抗 HMGB1 中和抗体および RAGE 拮抗薬 FPS-ZM1 および低分子量ヘパリン (LMWH) の予防及び治療効果について：マウスに OHP (5 mg/kg) を単回腹腔内投与すると、投与後早期より 7 日以上持続する機械的アロディニアが検出され、このアロディニアの発症は抗 HMGB1 中和抗体 1 mg/kg を腹腔内前投与することで阻止され (図 1A)、発症後に投与することで一時的にはあるが有意に減弱された (図 1B)。

同様に、RAGE 拮抗作用を有する FPS-ZM1 (1 mg/kg) あるいは LMWH (2.5 mg/kg) を腹腔内投与した場合も同様の予防および治療効果が認められた (図 2)。さらに、RAGE 以外の HMGB1 標的分子のうち、TLR4 拮抗薬の LPS-RS (0.5 mg/kg) と TAK-242 (3 mg/kg)、また CXCR4 拮抗薬の AMD3100 (8 mg/kg) の腹腔内投与を行ったときにも同様の予防および治療効果が検出された (図 2)。

(2) サブスタンス P (SP) 膀胱内投与誘起膀胱痛症候群モデルマウスにおける抗 HMGB1 中和抗体および RAGE 拮抗薬 FPS-ZM1 および低分子量ヘパリン (LMWH) の予防及び治療効果について：SP 膀胱内投与によって、明確な膀胱の浮腫や炎症は検出されなかったが (図 3B,C)、下腹部尿道口付近において遅発性 (24 時間後) 関連痛覚過敏が検出された (図 3A)。この SP 誘起関連痛覚過敏の発症は、抗 HMGB1 中和抗体 (Ab) あるいは RAGE 拮抗作用を有する LMWH の前投与により有意に抑制された (図 4)。

(3) RAGE 拮抗薬候補物質としての中分子ヘパリンフェニルアラニン誘導體 (MMWH-F) の効果：初めに、AGE-RAGE 結合に及ぼす未分画ヘパリン (HE)、中分子ヘパリン (MMWH)、LMWH および MMWH-F の阻害効力を比較検討したところ、阻害効力は MMWH-F >> MMWH ≈ HE > LMWH となり、MMWH-F の IC<sub>50</sub> 値は、0.01 μg/mL であった (図 5)。一方、IIa 因子 (トロンピン) 活性に対する阻害効力を比較したところ、HE > MMWH ≈ LMWH >> MMWH-F となり、Xa 因子活性に対する阻害効力は HE > MMWH > LMWH >>> MMWH-F となり、MMWH-F は IIa や Xa 因子に対する阻害活性をほとんど持たない RAGE 拮抗薬であることが強く示唆された。

そこで、RAGE の関与が示唆されている疼痛モデルにおいて、MMWH-F が効力を発揮するか否かを検討した。その結果、MMWH-F (1.25 mg/kg) の腹腔内投与によって、マウスにおける at-HMGB1 (100

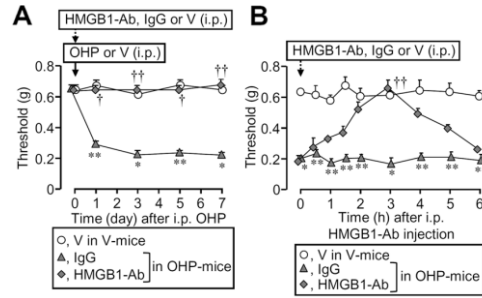


図 1 オキサリプラチン誘発性末梢神経障害マウスにおける抗 HMGB1 中和抗体の効果。HMGB1-Ab, 中和抗体; IgG, 非免疫 IgG; V, 溶媒。

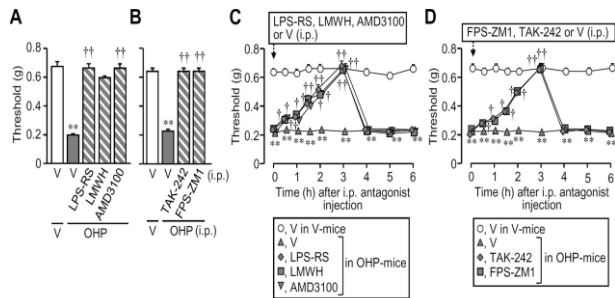


図 2 オキサリプラチン (OHP) 誘発性末梢神経障害マウスにおける HMGB1 受容体拮抗薬の効果。

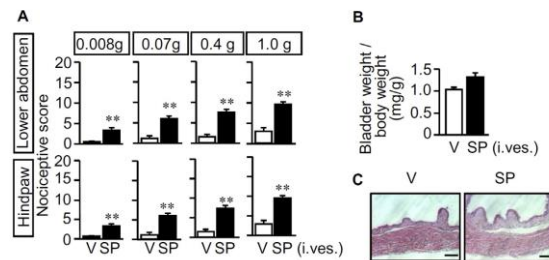


図 3 マウスにおけるサブスタンス P (SP) 膀胱内投与による関連痛覚過敏の発現。

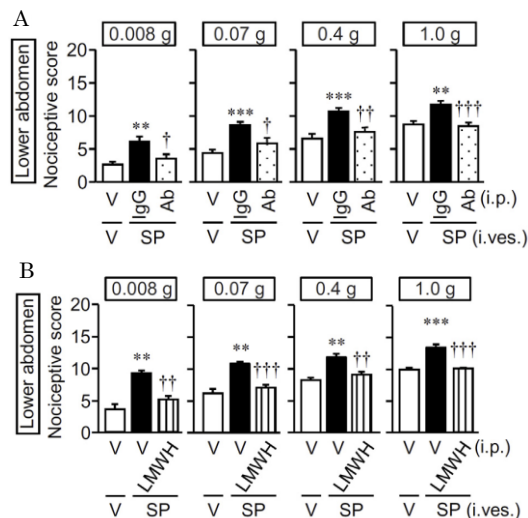


図 4 サブスタンス P (SP) 膀胱内投与による関連痛覚過敏に対する抗 HMGB1 中和抗体および RAGE 拮抗薬 LMWH の効果。

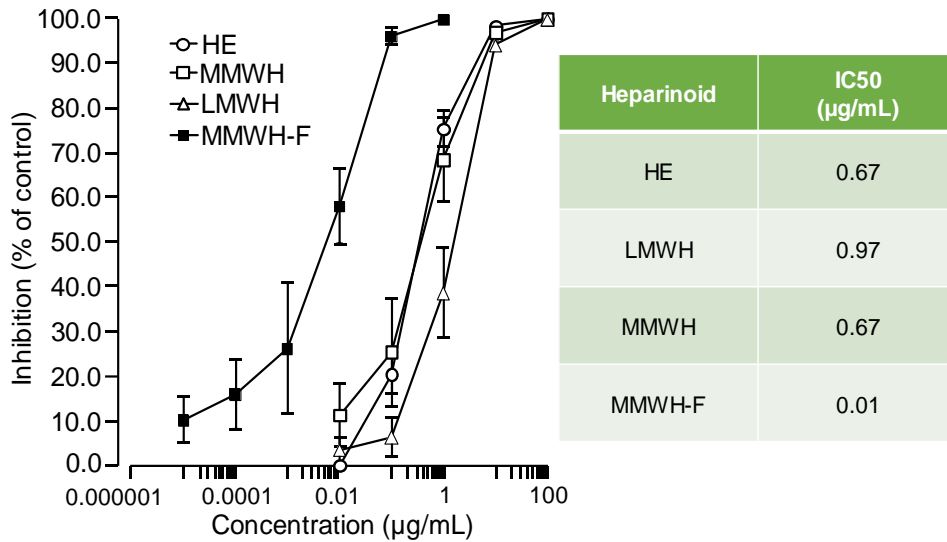


図5 AGE-RAGE結合に対するヘパリン類の阻害効果。

ng 足底内投与)によるアロディニア (図6) および OHP (5 mg/kg 腹腔内投与) 誘起アロディニア (図7) が阻止された。また、ブチレート (20 µmol x 2/day、3日間反復結腸内投与) 誘起結腸痛モデルマウスにおいて、MMWH-F (1.25 mg/kg) をブチレート投与前に反復腹腔内投与すると、200 µL 結腸内注入による侵害受容行動の増加 (結腸痛覚過敏) が有意に抑制された (図8)。また、同様にブチレート投与を行ってモデルが成立した後に MMWH-F (1.25 mg/kg) を単回投与しても結腸痛覚過敏が有意に抑制された (図9)。

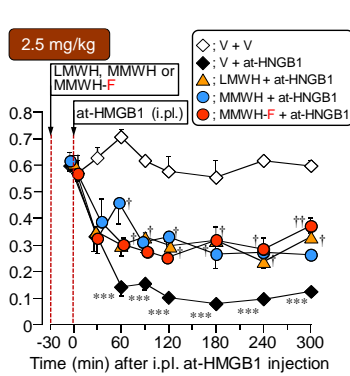


図6 マウスにおける at-HMGB1 (100 ng 足底内投与) 誘起アロディニアに対する MMWH-F、MMWH および LMWH (それぞれ 2.5 mg/kg 腹腔内投与) の効果

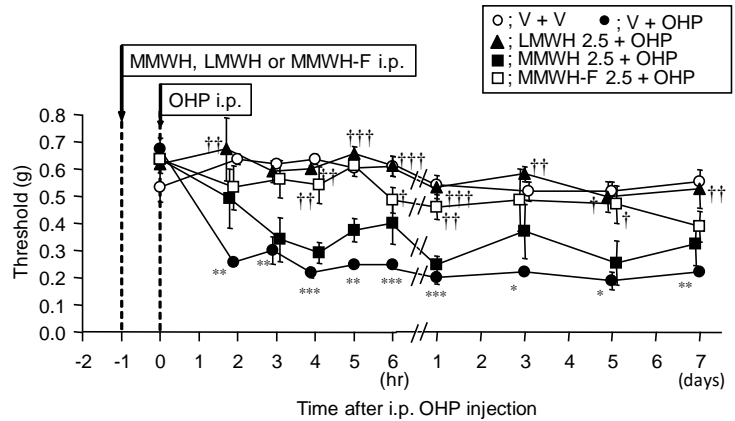


図7 オキサリプラチン (OHP; 5 mg/kg 腹腔内投与) 誘発性末梢神経障害マウスに対する MMWH-F、MMWH および LMWH (それぞれ 2.5 mg/kg 腹腔内投与) の予防効果。

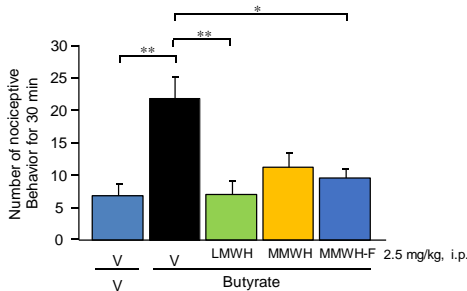


図8 ブチレート (20 µmol x 2/day、3日間反復結腸内投与) 処置マウスにおける結腸痛覚過敏に対する MMWH-F、MMWH および LMWH (それぞれブチレート投与前に毎回 2.5 mg/kg 腹腔内投与) の予防効果。無麻酔下マウスの結腸内へ水 200 µL 注入後の侵害受容行動をカウントした。

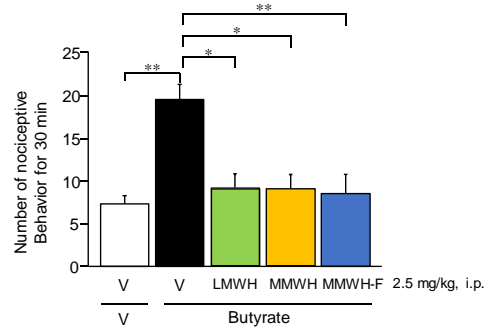


図9 ブチレート (20 µmol x 2/day、3日間反復結腸内投与) 処置マウスにおける結腸痛覚過敏に対する MMWH-F、MMWH および LMWH (それぞれ結腸痛覚過敏成立後 2.5 mg/kg 単回腹腔内投与) の治療効果。無麻酔下マウスの結腸内へ水 200 µL 注入後の侵害受容行動をカウントした。



(4) 上市医薬品から RAGE 拮抗薬候補物質を検索するドラッグリポジショニング研究の結果：統合計算化学システム molecular operating environment (MOE)を用いて、FPS-ZM1 および azeliragon と類似度の高い医薬品を検索したところ、第二世代抗ヒスタミン薬の azelastine を含む数種の医薬品が最適化合物として抽出されたが、AGE-RAGE 結合を阻害するものは見いだせなかった。

(5) RAGE 結合モデルからインシリコ解析によりデザインした RAGE 拮抗薬候補物質の評価結果：AGE-RAGE 結合の X 線結晶解析のデータに基づいて実施したインシリコ解析によって、化合物ライブラリーから 8 つの RAGE 拮抗薬候補物質、KTGrNS-1~8 を選択した。AGE-RAGE 結合に対する阻害作用を調べたところ、陽性コントロールの azeliragon (AZG) 100  $\mu$ M でほぼ 100%の阻害活性が認められ (図 10)、8 つの RAGE 拮抗薬候補物質のうち、KTGrNS-5 が最も阻害活性が強く、100  $\mu$ M で約 70%程度の抑制作用を示した (図 10)。

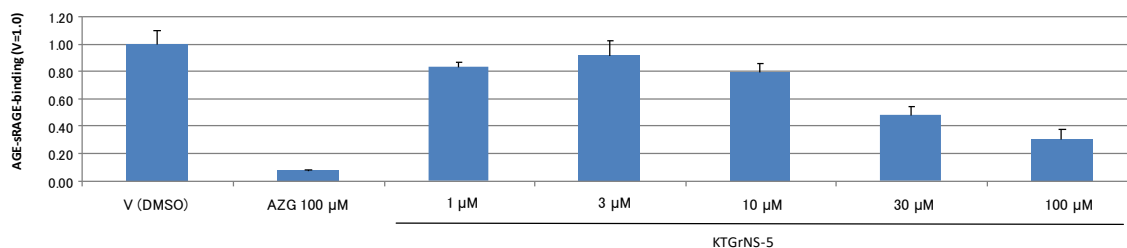


図 10 AGE-RAGE 結合に対する既知の RAGE 拮抗薬 azeliragon (AZG)と新規 RAGE 拮抗薬候補物質 KTGrNS-5 の阻害作用。

(6) まとめと今後の研究展開：本研究課題では、RAGE がマクロファージなどから遊離される HMGB1 の主たる受容体として化学療法誘発性末梢神経障害、膀胱痛症候群、過敏性腸症候群などの発症に関与し痛みの治療標的分子になりうること (図 11) を検証した上で、MMWH-F が RAGE 選択的拮抗作用を持ち、難治性疼痛治療薬として有用であることを実証することができた。一方、当初の計画では、既存の RAGE 拮抗薬のインシリコ構造解析による上市医薬品のドラッグリポジショニング研究、あるいは AGE-RAGE 結合の X 線結晶解析結果データに基づくインシリコスクリーニングによる低分子 RAGE 拮抗薬の検索を行った後、構造展開をする予定であったが、RAGE 活性化に伴う特異的なシグナルを検出するのに時間を要したため最終目標までは到達できなかった。しかし、今回実施したインシリコスクリーニングから見出した KTGrNS-5 は RAGE 拮抗薬開発のためのシーズとして極めて有用である。今後、この化合物の構造展開を行い、より効力が強い選択的 RAGE 拮抗薬の開発を実現するための研究をさらに進めていきたい。

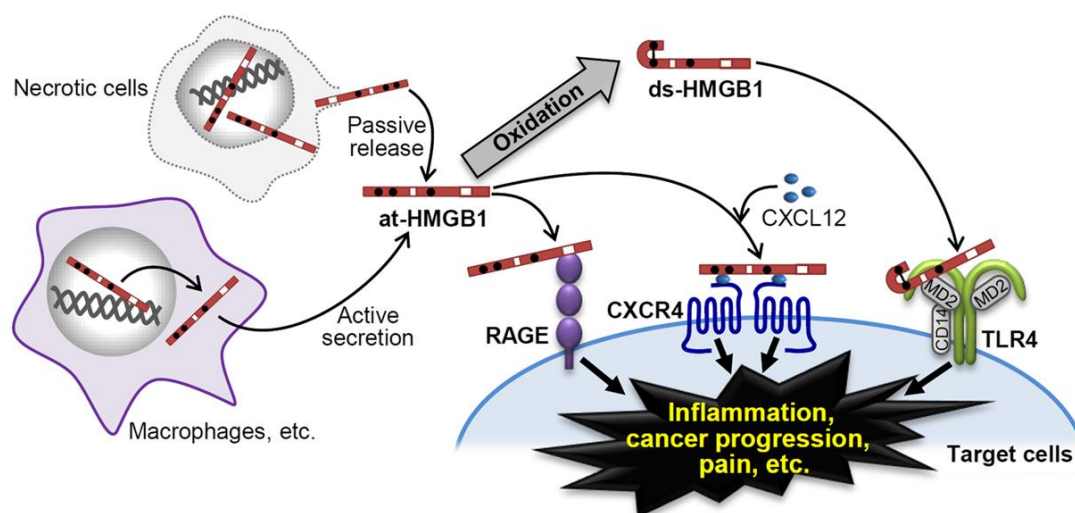


図 11 痛み、炎症、がんの病態に関与する HMGB1 の標的分子としての RAGE、CXCR4 および TLR4 の役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 1. Tsujita, R., Tsubota, M., Sekiguchi, F., Kawabata, A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of high mobility group box 1 and its modulation by thrombomodulin/thrombin axis in neuropathic and inflammatory pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.15091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2. Irie, Y., Tsubota, M., Maeda, M., Hiramoto, S., Sekiguchi, F., Ishikura, H., Wake, H., Nishibori, M., Kawabata, A.	4. 巻 143(2)
2. 論文標題 HMGB1 and its membrane receptors as therapeutic targets in an intravesical substance P-induced bladder pain syndrome mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 112-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 3. Tsubota, M., Fukuda, R., Hayashi, Y., Miyazaki, T., Ueda, S., Yamashita, R., Koike, N., Sekiguchi, F., Wake, H., Wakatsuki, S., Ujiie, Y., Araki, T., Nishibori, M., Kawabata, A.	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-019-1581-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 脇谷航平, 関口富美子, 坪田真帆, 中村真也, 仲西功, 川畑篤史
2. 発表標題 AzelastineはRAGEが関与する化学療法誘起末梢神経障害の発症を抑制する - ドラッグ・リプロファイリング/リポジショニング研究からの知見
3. 学会等名 第133回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川裕之、上野山桐子、関口富美子、坪田真帆、岡田卓哉、豊岡尚樹、川畑篤史
2. 発表標題 がん化学療法誘起末梢神経障害モデルマウスにおける中分子ヘパリニルフェニルアラニンの抗アロディニア作用
3. 学会等名 第133回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 脇谷航平、関口富美子、坪田真帆、中村真也、仲西功、川畑篤史
2. 発表標題 RAGEを標的とした化学療法誘起末梢神経障害治療薬の探索： In silicoドラッグ・リプロファイリング/リポジショニングからのアプローチ
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川裕之、上野山桐子、関口富美子、坪田真帆、岡田卓哉、豊岡尚樹、川畑篤史
2. 発表標題 中分子ヘパリニルフェニルアラニンは化学療法誘起末梢神経障害を抑制する
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishikawa, H., Uenoyama, K., Sekiguchi, F., Tsubota, M., Kawabata, A.
2. 発表標題 Middle molecular weight heparinylphenylalanine is an analgesic with reduced risk of hemorrhage
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東本紅瑠美、上野山桐子、西川裕之、関口富美子、坪田真帆、岡田卓哉、豊岡尚樹、川畑篤史
2. 発表標題 中分子ヘパリニルフェニルアラニンのRAGE阻害活性とマウスにおけるoxaliplatin誘発性末梢神経障害およびbutyrate誘起結腸痛に対する抑制作用
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawabata, A.
2. 発表標題 Role of ATP/HMGB1/RAGE and H2S/Cav3.2 axes in cystitis-related bladder pain
3. 学会等名 National Institute of Physiological Sciences International Workshop on Frontiers in Defensive Survival Circuit Research (痛み研究会2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawabata, A.
2. 発表標題 Neuroimmune crosstalk in neuropathic and visceral pain: HMGB1 and ATP as key mediators
3. 学会等名 シンポジウム(英語) “Neuroimmune crosstalk and pain”, 第93回日本薬理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東本久瑠美、上野山桐子、西川裕之、関口富美子、坪田真帆、豊岡尚樹、川畑篤史
2. 発表標題 RAGE阻害活性を有する中分子ヘパリニルフェニルアラニンはマウスにおけるoxaliplatin誘発性末梢神経障害およびbutyrate誘起結腸痛を抑制する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020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
連携研究者	関口 富美子  (Sekiguchi Fumiko)  (90271410)	近畿大学・薬学部・准教授   (34419)	
連携研究者	坪田 真帆  (Tsubota Maho)  (90510123)	近畿大学・薬学部・講師   (34419)	
連携研究者	豊岡 尚樹  (Toyooka Naoki)  (10217565)	富山大学・工学部・教授   (13201)	