

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06106・19K21225

研究課題名（和文）脳内 HMGB1 機能制御に立脚した脳移行性低分子鎮痛薬の開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic agents targeting HMGB1 in brain.

研究代表者

中村 庸輝（Nakamura, Yoki）

広島大学・医系科学研究科（薬）・助教

研究者番号：60711786

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：マウス脳室内へ high mobility group box-1 (HMGB1) を投与することにより、数週間わたる機械的刺激に対する反応性の増大が観察された。以上の結果は、脳内における HMGB1 が上昇する病態において疼痛が惹起される可能性が示唆された。そこで、疼痛症状が観察されることに加え、脳内 HMGB1 が増加する可能性が推察されるパーキンソン病モデルマウスを確立し、脳内 HMGB1 の機能を抑制した結果、疼痛症状を有意に改善した。さらに、この疼痛抑制効果は、疼痛症状発症期ではなく、疼痛症状維持期において有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、脊髄などと同様に脳内の HMGB1 も疼痛の調節機構に関与する可能性を明らかにした。さらに、これまでに有効な治療法が確立されていなかったパーキンソン病などの神経変性疾患に付随する疼痛症状の根底にあるメカニズムの一端を HMGB1 が担っている可能性が示唆された。脳内 HMGB1 を新規鎮痛薬の創薬ターゲットとするための基礎的知見を提供し、治療法の確立されていない難治性疼痛に対する創薬開発への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Previous studies reported that high mobility group box-1 (HMGB1) in spinal dorsal horn and around injured-sciatic nerve plays an important role in both induction and maintenance phases of chronic pain. However, it is unclear whether HMGB1 in brain is involved in pain regulation. Here, we found that intraventricular injection with recombinant HMGB1 induced mechanical hypersensitivity. Moreover, inhibition of HMGB1 function in brain can ameliorate the maintenance, not induction, phase of mechanical hypersensitivity with 6-hydroxy dopamine model of Parkinson's disease in mouse. These data suggested that blocking HMGB1 function could prove to be a potent therapeutic strategy for the treatment of refractory pain associated with neurodegenerative disorders.

研究分野：神経薬理学、疼痛学、創薬研究

キーワード：HMGB1 慢性疼痛 DAMPs 脳内疼痛制御機構 脳内炎症 パーキンソン病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非ヒストン性クロマチン結合タンパク質である high mobility group box 1 (HMGB1) は、通常は核内に存在しているが、病態時に能動的または受動的に細胞外へ漏出し、炎症を惹起することが報告されている。これまでに細胞外の HMGB1 は、敗血症、糖尿病、脳卒中、パーキンソン病、アルツハイマー病、慢性疼痛など様々な疾患の発症・維持に関与していることが報告されており、新規治療薬ターゲットとして注目されている。当研究室ではこれまでに HMGB1 と神経障害性疼痛に着目し以下を明らかにしてきた。

- (1) 坐骨神経周囲ヘリコンビナント HMGB1 (rHMGB1) を投与することにより、48 時間以上続く機械的アロディニアが観察された。
- (2) 傷害した坐骨神経周囲において HMGB1 が有意に増加した。
- (3) 坐骨神経傷害時に惹起される機械的アロディニアは神経傷害部位へ HMGB1 中和抗体を投与することにより抑制された。
- (4) 脊髄腔内へ rHMGB1 を投与することにより、48 時間以上続く機械的アロディニアが観察された。
- (5) 坐骨神経傷害時に惹起される機械的アロディニアは脊髄腔内へ HMGB1 中和抗体を投与することにより抑制された。

以上より、HMGB1 が神経傷害部位や脊髄において疼痛の惹起に関与する可能性を報告してきた (Zhang FF et al., *J Neurochem.* 2016; Morioka N et al., *J Neurochem.* 2019)。一方で、副症状として慢性疼痛を呈するパーキンソン病や脳卒中患者の脳内で細胞外 HMGB1 量が増加する可能性が報告されているが、脳内における HMGB1 の疼痛への関与には不明な点が多く残っている。

2. 研究の目的

本研究課題では以下を目的とする。

- (1) 脳内 HMGB1 の疼痛制御への関与を明らかにすること。
- (2) パーキンソン病モデルマウスの脳内 HMGB1 の役割を明らかにすること
- (3) 脳内 HMGB1 の機能を抑制する抗体や化合物が慢性疼痛に対する新規治療法としての有用性を明らかにすること。

3. 研究の方法

- (1) 実験動物: ddY 系雄性マウスを使用した。マウスは恒温、恒湿かつ、12 時間-12 時間の明暗サイクルの環境下にて飼育し、水と飼料は自由に摂取させた。
- (2) 薬物投与: rHMGB1 または対照群となるリン酸緩衝液 (PBS) は脳室内へ投与した。パーキンソン病モデルマウスは 6-ヒドロキシドパミン (6OHDA) を右側線条体のニカ所へ局所投与することによって作製した。HMGB1 中和抗体は腹腔内投与または経鼻投与した。
- (3) 疼痛閾値測定: 機械的アロディニアは、von Frey filament を用いた後肢足底に対する機械的刺激に対する逃避行動から測定した。
- (4) 運動機能測定: パーキンソン病モデルマウスの運動機能はポールテストにより測定した。
- (5) 免疫組織染色: パーキンソン病モデルマウスの黒質緻密部におけるドパミン神経の脱落はドパミン神経マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼの染色によって確認した。

4. 研究成果

- (1) 脳室内 HMGB1 投与による疼痛閾値への影響
マウス脳室内へ 5 または 50 ng の HMGB1 を投与し 7 日後に疼痛閾値を測定したところ、PBS 投与群と比較し両濃度とも有意な疼痛閾値の低下が観察された。さらに、HMGB1 投与 (5 ng) による機械的疼痛閾値の低下は、投与 14 日後まで観察されたが、21 日後には対照群と同等に回復した。また、この反応は両側の後肢において確認された。以上の結果より、脳内における細胞外 HMGB1 濃度の上昇は一過的な機械的アロディニアを引き起こす可能性が示唆された。
- (2) パーキンソン病モデルマウスにおける機械的アロディニアの測定
線条体への 6OHDA 投与 27 日後においてポールテストの値が有意に増加し、運動機能障害が観察された。さらに、非投与側と比較し 6OHDA 投与側の黒質緻密部におけるチロシンヒドロキシラーゼの染色は有意に減少した。以上より、パーキンソン病モデルマウスが確立されたことを確認した。さらに、6OHDA 投与 28 日後において、疼痛閾値を測定したところ、興味深いことに両側の後肢の疼痛閾値の低下が認められ、機械的アロディニアの発症が観察された。また、この疼痛閾値の低下は 6OHDA 投与の 7 日後より観察され、少なくとも 56 日後まで持続した。
- (3) パーキンソン病モデルマウスにおける HMGB1 中和抗体の経鼻投与の効果
上記の (2) の結果から、ドパミン神経細胞死によって細胞外 HMGB1 濃度が上昇し、疼痛を惹起する可能性を考えた。そこで、HMGB1 中和抗体を腹腔内へ投与したが、パーキンソン病モデルマウスの機械的アロディニアに改善効果は認められなかった。次に、中枢移行性が高い投

与方法と考えられる経鼻投与を用いて HMGB1 中和抗体を処置した結果、HMGB1 中和抗体投与は有意に疼痛閾値の低下を改善させた。一方で、HMGB1 中和抗体の経鼻投与はパーキンソン病モデルマウスの運動機能障害や黒質緻密部のドパミン神経細胞の脱落へは影響を及ぼさなかった。以上の結果から、脳内 HMGB1 は副症状としての機械的アロディニアを惹起し、HMGB1 中和抗体の経鼻投与が新規治療法となる可能性が示唆されたが、パーキンソン病の運動機能障害等は改善させることができなかった。

本研究課題は、脳内 HMGB1 の機能を抑制する抗体または低分子化合物が慢性疼痛に対する新規治療法となる可能性を明らかにした。さらに、経鼻投与によって、脳内移行性が改善されることから、これまで脳移行性が問題となっていた化合物についても重要な治療薬候補となる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hisaoka-Nakashima Kazue, Tomimura Yoshiaki, Yoshii Toshiki, Ohata Kazuto, Takada Naoki, Zhang Fang Fang, Nakamura Yoki, Liu Keyue, Wake Hidenori, Nishibori Masahiro, Nakata Yoshihiro, Morioka Norimitsu	4. 巻 92
2. 論文標題 High-mobility group box 1-mediated microglial activation induces anxiodepressive-like behaviors in mice with neuropathic pain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 347 ~ 362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.02.005	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大畑 一努, 中島 一恵, 吉井 稔紀, 中村 庸輝, 劉 克約, 和氣 秀徳, 西堀 正洋, 仲田 義啓, 森岡 徳光
2. 発表標題 神経障害性疼痛マウスの不安・うつ様行動に対するHMGB1中和抗体の効果に関する検討
3. 学会等名 第30回創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura Y, Nakashima K, Morioka N
2. 発表標題 The possibility of HMGB1 as a therapeutic target for neuropathic pain.
3. 学会等名 9th International DAMPs and Alarmins Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kochi T, Nakamura Y, Nakashima K, Liu K, Wake H, Nishibori M, Irifune M, Morioka N
2. 発表標題 Perineural treatment with anti-HMGB1 antibody alleviates trigeminal neuropathy in mouse with chronic constriction injury of distal infraorbital nerve.
3. 学会等名 9th International DAMPs and Alarmins Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 HMGB1中和抗体の局所投与が三叉神経ニューロパチーモデルマウスの疼痛行動に与える影響の検討
2. 発表標題 河内 貴弘、中村 庸輝、中島 一恵、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、入船 正浩、森岡 徳光
3. 学会等名 第31回創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 紋子、中村 庸輝、中島 一恵、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 HMGB1坐骨神経局所投与は脊髄ミクログリアの活性化を介して機械的アロディニアを引き起こす
3. 学会等名 第31回創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 庸輝、河内 貴弘、中島 一恵、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、入船 正浩、森岡 徳光
2. 発表標題 High mobility group box-1 は三叉神経傷害に起因する痛覚異常の発症に寄与する
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 紋子、中村 庸輝、中島 一恵、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 坐骨神経におけるhigh mobility group box-1を介した仏痛誘発メカニズムの検討
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河内 貴弘、中村 庸輝、中島 一恵、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、入舩 正浩、森岡 徳光
2. 発表標題 眼窩下神経慢性絞扼モデルマウスに対する神経傷害部位へのHMGB1中和抗体投与は三叉神経領域における疼痛様行動を抑制する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 庸輝、河内 貴弘、中島 一恵、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、入舩 正浩、森岡 徳光
2. 発表標題 High mobility group box-1 は三叉神経ニューロパチーを誘発する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森岡 徳光、中村 庸輝、中島 一恵
2. 発表標題 神経障害性疼痛におけるグリア細胞制御を介したhigh mobility group box-1の多彩な役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村庸輝、中島一恵、森岡徳光	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社 北隆館	5. 総ページ数 150
3. 書名 別冊 B10 Clinica 慢性炎症と疾患	

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学大学院・医系科学研究科・薬効解析科学研究室
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/pha/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----