

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18476

研究課題名(和文) 三叉神経ニューロパチー発症機序解明に基づく難治性疼痛予防法の開発

研究課題名(英文) Prevention of trigeminal neuropathy based on an understanding of the pathogenesis mechanisms

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：外傷性三叉神経ニューロパチー(PTTN)は智歯の抜歯、顔面領域の手術などで三叉神経を損傷した際に頻発する難治性疼痛の一種である。High mobility group box-1(HMGB1)は、損傷細胞から漏出し、各種受容体の活性化を介して、炎症を増悪させる。そこで、本研究課題は、病態モデルマウスを用いて、HMGB1のPTTNへの関与を検討した。その結果、HMGB1中和抗体やRAGE阻害薬の前処置がPTTNモデルマウスにおける疼痛様症状の発症を抑制した。以上の結果から、HMGB1はRAGEの活性化を介して本病態の発症に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三叉神経ニューロパチーは智歯の抜歯、顔面領域の手術などで三叉神経を損傷した際に頻発する難治性疼痛の一種である。本研究課題は、神経損傷時にhigh mobility group box-1(HMGB1)が漏出・遊離し、最終糖化産物受容体(RAGE)の活性化を介して、本病態を発症させることを明らかとした。本病態の発症確率は、その術式の難易度に依存しており、これは術前の検査によって推測することが可能である。以上より、難易度の高い術式が必要な患者に対して、HMGB1機能を阻害する薬物やRAGE阻害薬を前処置することで、三叉神経ニューロパチーの発症を予防できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Post-traumatic trigeminal neuropathy (PTTN) is a kind of chronic pain caused by damage to the trigeminal nerve and is refractory to commonly used analgesics. High mobility group box-1 (HMGB1) is categorized alarmins/damage-associated molecular patterns. HMGB1 passively diffused from damaged cells causes inflammation via activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) or receptor for advanced glycation endproducts (RAGE). Therefore, the current study investigated whether HMGB1 is involved in the PTTN onset. The pain-like behaviors in PTTN mice were blocked by pretreatment with an anti-HMGB1 antibody. Moreover, pretreatment with a RAGE inhibitor, but not a TLR4 inhibitor, also inhibited the PTTN onset. These results suggested that HMGB1 plays a crucial role in PTTN onset via RAGE activation. Thus, the anti-HMGB1 nAb and the RAGE inhibitor could be a novel therapeutic target for inhibiting the onset of PTTN.

研究分野：中枢神経薬理学

キーワード：三叉神経ニューロパチー HMGB1 ミクログリア 慢性疼痛 マクロファージ 中和抗体

1. 研究開始当初の背景

三叉神経ニューロパチーは、智歯の抜歯、顔面領域の手術時の三叉神経の損傷により頻発し、知覚過敏、知覚鈍麻、またはその両方を呈する難治性感覚異常の一種である。本疾患はオピオイドや非ステロイド性抗炎症薬など既存の鎮痛薬に抵抗性を示すことが多く、新規治療法の開発が急務である。一方で、その発症リスクは、術式の難易度や術前のレントゲン検査等の所見より推定することが可能であり、本疾患の発症を予防・抑制するために、術前からの治療介入も可能と考えられるが有効な予防方策は確立されていない。

High-mobility group box-1 (HMGB1) は、非ヒストン性クロマチン結合タンパク質であり、ほとんどの細胞の核内に存在する。一方で、HMGB1 は、ダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns: DAMPs) の一種に分類され、細胞損傷により受動的に、活性化細胞より能動的に、細胞外へ漏出・遊離し、Toll 様受容体 (Toll-like receptor 4: TLR4)、最終糖化産物受容体 (Receptor for advanced glycation endproducts: RAGE) を活性化させ、炎症性サイトカイン様作用を示すことが報告されている。これまでに、我々は坐骨神経の損傷時に発症する神経障害性疼痛の病態形成に HMGB1 が重要な役割を果たすことを報告してきたが、三叉神経ニューロパチーとの関連性は不明なままであった。

ブレガバリンなどのガバペンチノイドは、カルシウムチャネルの $\alpha 2\delta$ サブユニットへ結合し、チャネル機能を抑制する。これらの薬物は、神経障害性疼痛に対して鎮痛効果を発揮することが示され、臨床現場で広く使用されている。一方で、ガバペンチノイドは、鎮痛作用だけでなく、鎮静作用も有しており傾眠、ふらつきなどの副作用を呈することも報告されている。近年、新たに開発されたガバペンチノイドであるミロガバリンは、 $\alpha 2\delta$ -1 サブユニットに対する選択性が向上し、鎮静作用が生じにくい鎮痛薬として期待されている。しかし、これまでに三叉神経ニューロパチーに対する効果を検討した基礎研究は存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究課題は、遠位眼窩下神経を絞扼した三叉神経ニューロパチーモデルマウス (Distal infraorbital nerve chronic constriction injury: dIoN-CCI) を作製し、1) HMGB1 と本病態の関連性を明らかとし、新規創薬標的としての有用性を評価すること、2) 近年、新たに開発されたミロガバリンの本病態に対する有効性を評価することを目的とし、各種検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 三叉神経ニューロパチーモデルマウスの作製

ddY 系の雌性及び雄性マウスを使用し、三叉神経の側枝である遠位眼窩下神経を絹糸で絞扼し、dIoN-CCI マウスとした。また、神経の露出のみを行ったマウスを対照手術群とした。

(2) 顔面の毛繕い時間の測定

神経損傷 7 日後に、各種マウスをアクリルチャンバーに馴化させ、10 分間あたりの顔面を毛繕いする時間を測定した。

(3) 冷刺激に対する反応の解析

神経損傷 13 日後に、各種マウスをアクリルチャンバーに馴化させ、15 μ L のアセトンを経験側顔面へ処置し、1 分間あたりの反応時間 (アセトン処置部を触るなどの気にする時間) を測定した。

(4) 薬物の投与

三叉神経ニューロパチーの発症予防効果を検討する目的で、神経損傷直後と損傷 2 日後に神経損傷部位へ各種薬物を処置した。また、HMGB1 中和抗体 (100 ng)、TLR4 受容体阻害薬である TAK242 (5 nmole)、RAGE 阻害薬である FPS-ZM1 (5 nmole) を使用した。

発症後の感覚異常に対する効果を検討する目的で、ミロガバリン (2, 5, 10 mg/kg) を腹腔内投与し、各種疼痛様行動に対する影響も観察した。

(5) 免疫組織化学染色

神経損傷 14 日後に、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い、脊髄路核尾側亜核 (Sp5C) より凍結切片を作製した。作製した凍結切片を用いて、Iba1 抗体によりミクログリアを染色し解析を行った。

(6) 条件付け場所嗜好性試験 – 鎮痛薬に対する嗜好性の評価

疼痛症状を有するマウスは、鎮痛薬の投与によって痛みが緩和されることから、鎮痛薬を投与された場所を記憶し、場所嗜好性を獲得することが知られている。黒色で床面が滑らかな容器と白色で床面が粗い容器の 2 つの異なる素材からなる連結容器を使用した。試験 1 日目において、それぞれの容器を自由に往来できる条件にて馴化を行い、その際の滞在時間が短い容器を鎮痛薬投与容器とした。試験 2、4 日目において、午前中に生理食塩水を、午後ミロガバリン (2 mg/kg) を投与し、試験 3、5 日目において、午前中にミロガバリンを、午後生理食塩水を投与し、それぞれの容器に 45 分間静置した。試験 6 日目において、それぞれの容器を自由に往来できる条件とした後に、各容器の滞在時間を計測し、場所嗜好性の有無を解析した。

(7) オープンフィールド試験

赤外線センサーにて行動量を数値化できる容器へマウスを入れ、5 分間の探索行動を解析した。また、赤外線センサーのカウント数を自発行動量とし定量した。

4. 研究成果

三叉神経ニューロパチーモデルにおける疼痛様行動の評価として汎用される、顔面毛繕い時間と冷刺激に対する反応性を測定した。その結果、雄性の dIoN-CCI マウスは、対照群と比較し、両試験において有意な増加が観察され、三叉神経の損傷による顔面感覚異常が生じている可能性が示唆された。さらに、Sp5C におけるミクログリアの体積が増加し、活性化していることが認められた。以上より、遠位眼窩下神経の損傷に起因する三叉神経ニューロパチーが惹起されたと考えられる。

次に、dIoN-CCI マウスにおける顔面感覚異常の発症に対する HMGB1 の関与を検討するために、HMGB1 中和抗体の効果を検討した。神経損傷直後と 2 日後に抗体を神経損傷部位へ投与した結果、神経損傷後に観察された顔面毛繕い時間の増加と冷刺激に対する反応性の過敏化は、共に統計学的に有意に抑制された。さらに、本中和抗体の投与は、Sp5C におけるミクログリアの活性化も抑制した。以上の結果から、三叉神経損傷時の HMGB1 の細胞外への漏出が本病態の形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

三叉神経ニューロパチーの患者は女性に多いことも報告されていることから、雌性 dIoN-CCI マウスに対する HMGB1 中和抗体の効果も検討した。その結果、冷刺激に対する反応性の増加、Sp5C におけるミクログリアの活性化に対しては抑制効果が観察された一方で、顔面毛繕い時間には統計学的に有意な効果は観察されなかった。この結果から、雌性マウスの本病態の疼痛様行動の発症においては、HMGB1 以外の何らかの因子が重要である可能性や、毛繕い時間が不安などによっても増加することから、疼痛以外の要因の影響を受けている可能性が考えられるため、さらに異なる疼痛様行動の指標を用いて検討する必要がある。

さらに、HMGB1 が本病態を発症させるための責任受容体を明らかにする目的で、TLR4 阻害薬である TAK242 及び RAGE 阻害薬である FPS-ZM1 を、雄性 dIoN-CCI マウスへそれぞれ処置し、疼痛様行動の抑制効果を検討した。FPS-ZM1 を処置した結果、疼痛様行動は共に有意に抑制された。一方で、TAK242 の処置では、統計学的に有意な抑制効果は観察されなかった。さらに、FPS-ZM1 の処置は Sp5C におけるミクログリアの活性化も有意に抑制し、HMGB1 中和抗体と同様の効果が観察された。以上の結果から、損傷神経周囲に漏出した HMGB1 は RAGE の活性化を介して、三叉神経ニューロパチーの病態を発症させる可能性が示唆された。従って、本病態を発症するリスクが高いと推察される症例においては、HMGB1 中和抗体や RAGE 阻害薬を手術時に投与することで、難治性感覚異常の発症を抑制できると考えられる。

最後に、雄性 dIoN-CCI マウスが呈する疼痛様症状に、新規ガバペンチノイドであるミロガバリンの治療効果を検討した。ミロガバリンを腹腔内へ投与した結果、dIoN-CCI マウスで認められる顔面毛繕い時間の増加、冷刺激に対する反応性の過敏化は、今回用いた全ての投与濃度において十分な抑制効果が観察された。また、2 mg/kg のミロガバリン投与に対する条件付け場所嗜好性試験を行った結果、雄性 dIoN-CCI マウスは生理食塩水を投与した容器と比較し、ミロガバリンを投与した容器への滞在時間が有意に延長した。一方で、対照手術群のマウスでは、このような場所嗜好性の獲得は認められなかった。従って、対照手術群において、嗜好性が確認されなかったことから、薬物に対する依存性ではなく、dIoN-CCI マウスにおける疼痛がミロガバリンの処置により緩和され、鎮痛薬投与容器へ嗜好性を示したと考えられる。さらに、オープンフィールド試験を用いてミロガバリン投与が自発運動量に与える影響も検討した。その結果、今回用いた最も高い投与濃度である 10 mg/kg においても自発運動量の低下は観察されず、ガバペンチノイドの代表的な副作用である鎮静効果は確認されなかった。以上の結果から、ミロガバリンは、すでに発症した三叉神経ニューロパチー患者の治療に対して有効な治療選択肢である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura Yoki, Fukuta Ayako, Miyashita Keita, Zhang Fang Fang, Wang Dengli, Liu Keyue, Wake Hidenori, Hisaoka-Nakashima Kazue, Nishibori Masahiro, Morioka Norimitsu	4. 巻 186
2. 論文標題 Perineural high-mobility group box 1 induces mechanical hypersensitivity through activation of spinal microglia: Involvement of glutamate-NMDA receptor dependent mechanism in spinal dorsal horn	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114496 ~ 114496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2021.114496	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 該当する
1. 著者名 Kochi Takahiro, Nakamura Yoki, Ma Simeng, Hisaoka-Nakashima Kazue, Wang Dengli, Liu Keyue, Wake Hidenori, Nishibori Masahiro, Irifune Masahiro, Morioka Norimitsu	4. 巻 26
2. 論文標題 Pretreatment with High Mobility Group Box-1 Monoclonal Antibody Prevents the Onset of Trigeminal Neuropathy in Mice with a Distal Infraorbital Nerve Chronic Constriction Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2035 ~ 2035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26072035	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 Sato Fumiaki, Nakamura Yoki, Ma Simeng, Kochi Takahiro, Hisaoka-Nakashima Kazue, Wang Dengli, Liu Keyue, Wake Hidenori, Nishibori Masahiro, Morioka Norimitsu	4. 巻 145
2. 論文標題 Central high mobility group box-1 induces mechanical hypersensitivity with spinal microglial activation in a mouse model of hemi-Parkinson's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 112479 ~ 112479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2021.112479	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 Kochi Takahiro, Nakamura Yoki, Ma Simeng, Uemoto Suzuna, Hisaoka-Nakashima Kazue, Irifune Masahiro, Morioka Norimitsu	4. 巻 425
2. 論文標題 Mirogabalin alleviates nociceptive hypersensitivity without causing sedation in a mouse model of post-traumatic trigeminal neuropathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 113829 ~ 113829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbr.2022.113829	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13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

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、入船 正浩、森岡 徳光
2. 発表標題 HMGB1 中和抗体の局所投与はマウス遠位眼窩下神経慢性絞扼により発生する 顔面感覚異常の発症を予防する
3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 史爽、中村 庸輝、麻 思萌、河内 貴弘、中島 一恵、王 登莉、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 HMGB1中和抗体はパーキンソン病モデルマウスに付随する疼痛を緩和する
3. 学会等名 第138回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮下 佳大、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は脊髄後角NMDA受容体を介して疼痛を惹起する
3. 学会等名 第59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 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、入船 正浩、森岡 徳光
2. 発表標題 三叉神経ニューロパチー発症に対する抗 high mobility group box-1 中和抗体の予防効果
3. 学会等名 第42回日本疼痛学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 史爽、中村 庸輝、麻 思萌、河内 貴弘、中島 一恵、王 登莉、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 パーキンソン病モデルマウスにおいて脳脊髄液中 high mobility group box-1 増加は知覚異常を惹起する
3. 学会等名 第34回創薬・薬理フォーラム岡山
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 high mobility group box-1 の多彩な役割と創薬への展開
3. 学会等名 第138回日本薬理学会近畿部会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 史爽、中村 庸輝、麻 思萌、河内 貴弘、中島 一恵、王 登莉、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 パーキンソン病における痛覚過敏へのhigh mobility group box-1中和抗体の抑制効果
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 史爽、中村 庸輝、麻 思萌、河内 貴弘、中島 一恵、王 登莉、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 パーキンソン病に付随する疼痛に対する high mobility group box-1 の役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森岡 徳光、中村 庸輝、中島 一恵
2. 発表標題 慢性疼痛によるストレスがもたらす情動・認知機能異常へのhigh mobility box-1とミクログリアの関与
3. 学会等名 第43回 日本生物学的精神医学会 第51回 日本神経精神薬理学会 合同年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 史爽、中村 庸輝、麻 思萌、河内 貴弘、中島 一恵、王 登莉、劉 克約、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 HMGB1はパーキンソン病関連性疼痛の維持に寄与する
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 庸輝、佐藤 史爽、麻 思萌、河内 貴弘、中島 一恵、王 登莉、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 High mobility group box 1 はパーキンソン病における機械的アロディニアの発症に寄与する
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 庸輝、佐藤 史爽、山野 樹一、中島 一恵、王 登莉、劉 克約、和氣 秀徳、西堀 正洋、森岡 徳光
2. 発表標題 パーキンソン病における中枢性 HMGB1 は縫線核の神経活動を低下させる
3. 学会等名 第36回 創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 麻 思萌、中村 庸輝、河内 貴弘、中島 一恵、森岡 徳光
2. 発表標題 RAGE 阻害薬は三叉神経損傷後の疼痛様行動の発症を予防する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 末梢神経障害を予防または治療するための医薬組成物	発明者 中村庸輝、森岡徳光	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-28595	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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 https://pha.hiroshima-u.ac.jp/ ORCID https://orcid.org/0000-0001-9226-676X RESEARCH ID https://publons.com/researcher/2197743/yoki-nakamura/
--

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