

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06608

研究課題名(和文) 血栓止血系分子とHMGB1の相互干渉による疼痛制御のメカニズムと臨床的意義の解明

研究課題名(英文) Study on pain modulation by the interaction of coagulation factors with HMGB1 and its clinical relevance

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：化学療法誘発性末梢神経障害(CIPN)等の発症に核内タンパクHMGB1の細胞外放出が関与し、内皮トロンボモジュリン(TM)がトロンビン(TB)依存性にHMGB1を不活性化してCIPN発症を阻止すると。この研究成果に基づき、TBの活性や産生能の低下が難治性疼痛の増悪因子となる可能性を検証した。その結果、マウスにおいてCIPN、ブチレート誘起結腸過敏(BICH)、糖尿病性末梢神経障害に対する可溶性TMの抑制効果が抗凝固薬により消失すること、抗凝固薬自体がCIPNやBICHを増悪させることを証明し、さらに、ヒトのCIPNも抗凝固薬で増悪することを検証して血液凝固系による痛み制御に関する新知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の遂行により、多様な難治性疼痛の発症に核内タンパクHMGB1が関与すること、HMGB1を不活性化するトロンボモジュリン/トロンビン(TB)系が痛みを抑制的に制御していることを再確認し、TBの活性・産生を抑制する抗凝固薬が各種難治性疼痛を増悪させることを明らかにすることができた。今回検証した「血液凝固系による痛み制御」は、これまでにない新しい概念であり、「抗凝固薬による痛み増悪」は臨床的に極めて重要な新知見で、社会的意義は極めて大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that intractable pain including chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) involves extracellular release of nuclear HMGB1, and that endothelial thrombomodulin (TM) prevents CIPN by inactivating HMGB1 in a thrombin (TB)-dependent manner. We thus tested the hypothesis that inhibition of TB activity or production might aggravate intractable pain. Our data demonstrated that anticoagulants cancelled the preventive effect of soluble TM on CIPN, butyrate-induced colonic hypersensitivity (BICH) and diabetic peripheral neuropathy, and also aggravated CIPN and BICH. Moreover, our clinical data analyses ascertained the aggravation of CIPN by anticoagulants in humans. Thus, our study unveiled the pain modulation by the blood coagulation system.

研究分野：薬理学

キーワード：痛み 化学療法誘発性末梢神経障害 トロンボモジュリン 内臓痛 抗凝固薬 トロンビン 結腸過敏 糖尿病性末梢神経障害

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我々は、化学療法誘発性末梢神経障害 (CIPN) 膵炎や膀胱炎に伴う内臓痛などの難治性疼痛の発症に、マクロファージ、壊死細胞などから細胞外に放出された核内タンパク HMGB1 による RAGE や TLR4 の活性化が関与することを明らかにしていた。また、血管内皮に発現するトロンボモジュリン (TM) やその遺伝子組換えタンパク TM がトロンビン (TB) 依存性に HMGB1 を不活性化することで難治性疼痛の発症を阻止することを報告していた。一方、TM/TB 系によって protein C (PC) から産生される activated PC (APC) や、TAFI から産生される活性型 TAFI (TAFIa) も CIPN を含む難治性疼痛の発症抑制に寄与するとの知見も得られていた。このように TM/TB 系は血液凝固活性の制御以外に、病的痛みの発症の調節にも重要な役割を果たす可能性を示唆する基礎研究知見が蓄積されていた。

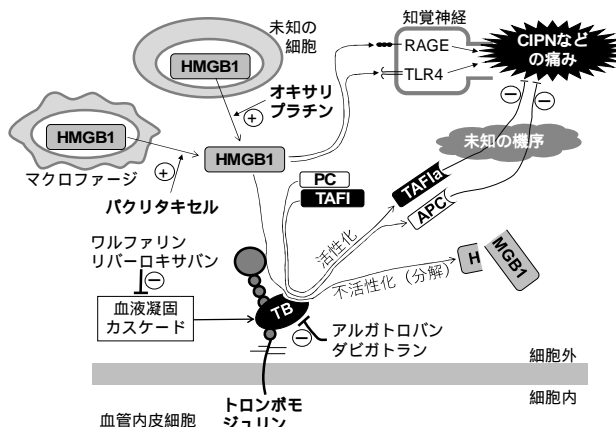


図1 CIPN等の難治性疼痛発現におけるHMGB1とトロンビン (TB)/トロンボモジュリン系の役割

2. 研究の目的

上述の様に、各種難治性疼痛の発症における HMGB1 の役割と、TM や TM の TB 依存性 HMGB1 不活性化を介する難治性疼痛制御メカニズムをさらに詳細に検討した。さらに、TB の活性を阻害するアルガトロバン (AT) やダビガトラン、産生を阻害するビタミン K 拮抗薬ワルファリンや第 Xa 因子直接阻害薬リバーロキサバンなどの抗凝固薬が、TM の難治性疼痛抑制効果を減弱させ、さらに、それ自身で難治性疼痛を増悪させる可能性があるのではないかと考え、これを検証するための基礎・臨床統合的研究を実施した。

3. 研究の方法

パクリタキセル(PCT)投与マウス CIPN モデルでの検討: マウスに PCT (1 mg/kg/2 days) を 4 回投与することで CIPN を誘発し、von Frey 法で機械的アロディニアの発症をモニターした。

オキサリプラチン(OHP)投与マウス CIPN モデルでの検討: マウスに OHP (1 または 5 mg/kg) を単回投与することで CIPN を誘発し、機械的アロディニアの発症をモニターした。また、四塩化炭素またはエタノール投与により肝障害を誘発させた場合の影響も検討した。

ボルテゾミブ (BTZ) 投与マウス CIPN モデルでの検討: マウスに BTZ (0.1 または 0.4 mg/kg) を 6 回 (days 0, 2, 5, 7, 9, 12) 反復投与することで CIPN を誘発し、機械的アロディニアの発症をモニターした。

ビンクリスチン(VCR)投与マウス CIPN モデルでの検討: マウスに VCR (0.02 または 0.2 mg/kg) を週に 5 日、2 週間計 10 回投与することで CIPN を誘起し、機械的アロディニアの発症をモニターした。

ブチレート誘起マウス結腸過敏 (BICH)モデルでの検討: マウスの結腸内にブチレート 20 μmol を 1 日に朝夕 2 回、3 日連続投与することで結腸痛モデルを作製し、von Frey 法で下腹部における関連痛覚過敏を評価した後、200 μL の結腸内水注入により結腸伸展刺激を与えた場合の侵害受容行動をカウントした。

レプチン受容体変異 db/db マウス (2 型糖尿病モデル) での検討: db/db マウスにおける機械的アロディニアの発症をモニターした。

各種モデル細胞株を用いた検討: マクロファージ (M) 様 RAW64.7 細胞、神経様 NG108-15 細胞、肝実質様 HepG2 細胞、肝クッパ 細胞様 ImkC 細胞、肝星細胞様 HSC-T6 細胞などを用いて in vitro での検討を実施した。

臨床データ解析: 生長会府中病院、兵庫医大病院または関大医大病院の診療録、さらに米国 FDA の有害事象自発報告データベース (FAERS) を用いて統計学的な解析を行った。

4. 研究成果

OPCT による CIPN 発症における神経由来 ATP の関与について: PCT 投与マウスにおける CIPN には M 由来 HMGB1 が関与することを既に報告しているが、今回の研究により、PCT によって神経

細胞から遊離される ATP が、P2X₇ および P2X₄ 受容体を介して後根神経節 (DRG) や坐骨神経 (SN) への M 浸潤蓄積を誘起し、PCT による M からの HMGB1 遊離を促進し、CIPN 発症において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

OHHP による CIPN 発症に及ぼす肝障害の影響に関する臨床・基礎統合的研究による解析結果： 病院の診療録を統計解析したところ、OHHP を含むレジメンで治療を開始した後に軽度の肝障害検査マーカーが上昇した患者では、その後、CIPN が重症化することを見出された。そこで動物実験による検証を行ったところ、OHHP 投与マウスにおける CIPN 発症は、四塩化炭素あるいはエタノール投与により肝障害を誘発することで増悪することが判明し、これには肝細胞から細胞外に放出された HMGB1 が関与することを明らかにした。

OBTZ による CRPN への M 由来 HMGB1 の関与と TM/TB 系による制御について： BTZ 投与マウスにおける CIPN 発症に、M 由来 HMGB1 が関与することを新たに見出し、さらに BTZ による M

からの HMGB1 遊離に caspase 活性化が関与することを明らかにした。また、トロンビン依存性に HMGB1 を不活性化する TM が BTZ による CIPN 発症を抑制することを証明し、抗トロンビン薬であるアルガトロパン (AT) が、TM の抗 CIPN 効果を消失させる他、それ自身で CIPN 発症を促進することを明らかにした (図 2A, B)。

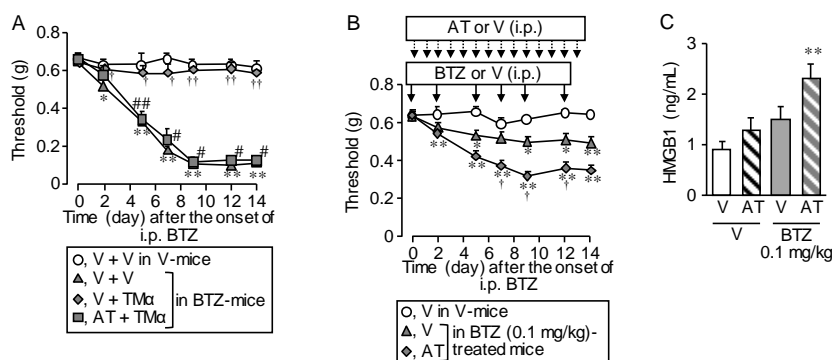


図2 ボルテゾミブ (BTZ) 投与マウスにおける CIPN発症に及ぼすトロンボモジュリンアルファ (TM) のトロンビン依存性抑制効果 (A) と、抗トロンビン薬アルガトロパン (AT) によるCIPN増悪 (B)および血中HMGB1濃度上昇 (C)

OVCR による CRPN への M およびシュワン細胞由来 HMGB1 の関与と TM/TB 系による制御について： VCR 投与マウスにおける CIPN 発症に、M およびシュワン細胞由来 HMGB1 が関与することを新たに見出した。また、トロンビン依存性に HMGB1 を不活性化する TM が VCR による CIPN 発症を抑制することを証明し、抗トロンビン薬であるアルガトロパン (AT) が、TM の抗 CIPN 効果を消失させる他、それ自身で CIPN 発症を促進することを明らかにした。

OBICH への M 由来 HMGB1 の関与と TM/TB 系による制御について： マウスにおいて butyrate を繰返し結腸内投与することで結腸炎症を伴わない結腸過敏、すなわち BICH が発症することを確認し、BICH の発症に M および腸グリア細胞由来 HMGB1 が関与することを新たに見出した。また、トロンビン依存性に HMGB1 を不活性化する TM が BICH 発症を抑制することを証明し、抗トロンビン薬であるアルガトロパン (AT) が、TM の抗 BICH 効果を消失させる他、それ自身で BICH を増悪させることを明らかにした (図 3A, B)。

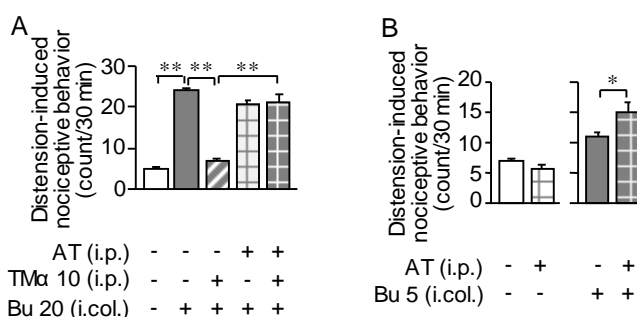


図3 マウスにおけるブチレート (Bu) 誘起結腸伸展過敏に対するトロンボモジュリンアルファ (TM) のトロンビン依存性抑制効果 (A) と、抗トロンビン薬アルガトロパン (AT) による結腸過敏増悪 (B)

OLEP による CRPN への M 由来 HMGB1 の関与と TM/TB 系による制御について： レプチン受容体変異 db/db マウスにおいて、週齢と共に体重増加と高血糖を伴う 2 型糖尿病が発症し、その後、DPN が認められた。この DPN 発症に、マクロファージ等から遊離される HMGB1 が関与することを新たに見出された。さらに、また、抗トロンビン薬であるアルガトロパン (AT) が、TM の DPN 抑制効果を消失させることを確認し、TM の効果がトロンビン依存性であることを証明した。しかし、AT 自身で DPN を増悪させる現象は見られなかった。

OPCT 投与ががん患者における CIPN 発症に及ぼす血液凝固能低下と経口抗凝固薬服用の影響について： 病院の診療録および FAERS データを統計学的に解析した結果、PCT 投与ががん患者のうち、

血液凝固能が低下（PT や APTT が延長）している患者では CIPN 重症化率が有意に高いことが判明し、さらに経口抗凝固薬を服用している患者において CIPN 発症率が有意に高いことが明らかとなった。

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 3件）

1. 著者名 Tsubota Maho, Miyazaki Takaya, Ikeda Yuya, Hayashi Yusuke, Aokiba Yui, Tomita Shiori, Sekiguchi Fumiko, Wang Dengli, Nishibori Masahiro, Kawabata Atsufumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Caspase-Dependent HMGB1 Release from Macrophages Participates in Peripheral Neuropathy Caused by Bortezomib, a Proteasome-Inhibiting Chemotherapeutic Agent, in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2550 (1-19)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10102550	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 Miyamoto Tomoyoshi, Domoto Risa, Sekiguchi Fumiko, Kamaguchi Riki, Nishimura Rika, Matsuno Misato, Tsubota Maho, Fujitani Masanori, Hatanaka Shigekatsu, Koizumi Yuichi, Wang Dengli, Nishibori Masahiro, Kawabata Atsufumi	4. 巻 148
2. 論文標題 Development of hepatic impairment aggravates chemotherapy-induced peripheral neuropathy following oxaliplatin treatment: Evidence from clinical and preclinical studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 315 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.01.006	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 Domoto Risa, Sekiguchi Fumiko, Kamaguchi Riki, Iemura Maiko, Yamanishi Hiroki, Tsubota Maho, Wang Dengli, Nishibori Masahiro, Kawabata Atsufumi	4. 巻 148
2. 論文標題 Role of neuron-derived ATP in paclitaxel-induced HMGB1 release from macrophages and peripheral neuropathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 156 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.11.003	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26件（うち招待講演 7件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岸本彩野、堂本莉紗、関千咲斗、松永浩明、松本亜紗菜、坪田真帆、関口富美子、友野靖子、西堀正洋、川畑篤史
2. 発表標題 抗血小板薬はオキサリプラチン誘起末梢神経障害 (OIPN) を抑制する: OIPN発症における血小板由来HMGB1の役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野遥、佐久間海地、富田詩織、坪田真帆、友野靖子、西堀正洋、川畑篤史
2. 発表標題 2型糖尿病マウスにおいてthrombomodulin alfaはHMGB1と補体C5aを不活性化することで有痛性末梢神経障害を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川畑篤史
2. 発表標題 HMGB1を標的とする化学療法誘発性末梢神経障害の予防
3. 学会等名 シンポジウム「末梢神経」、痛み研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川畑篤史
2. 発表標題 化学療法誘発性末梢神経障害とHMGB1について
3. 学会等名 第38回創薬・薬理フォーラム岡山（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川畑篤史
2. 発表標題 創薬と薬物療法適正化に向けた臨床薬学と薬理学の統合的研究アプローチ
3. 学会等名 シンポジウム「薬学のなかの薬理学：医薬研究の多様なアプローチ」、第96回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本彩野、堂本莉紗、松永浩明、松本亜紗菜、坪田真帆、関口富美子、王登莉、西堀正洋、川畑篤史
2. 発表標題 オキサリプラチン誘起末梢神経障害（OIPN）への血小板由来HMGB1の関与：抗血小板薬のOIPN予防効果について
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田島和樹、圓尾賢悟、坪田真帆、王登莉、西堀正洋、南達郎、伊藤彰敏、川畑篤史
2. 発表標題 マウスにおける補体アナフィラトキシンC5a誘起アロディニアの発現メカニズムについて
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 圓尾賢悟、池田裕哉、坪田真帆、王登莉、西堀正洋、南達郎、伊藤彰敏、川畑篤史
2. 発表標題 活性化protein Cはproteinases-activated receptor 1 を介して神経障害性疼痛を抑制する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 圓尾賢悟、池田裕哉、坪田真帆、王登莉、西堀正洋、南達郎、伊藤彰敏、川畑篤史
2. 発表標題 活性化プロテインCは神経障害性疼痛を抑制する：Proteinase-activated receptor-1（PAR1）の関与について
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	岸本彩野、堂本莉紗、松永浩明、松本亜紗菜、坪田真帆、関口富美子、王登莉、西堀正洋、川畑篤史
2. 発表標題	Oxaliplatin誘起末梢神経障害には血小板由来HMGB1が関与する
3. 学会等名	第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	富田詩織、中野遥、坪田真帆、田中雅幸、打谷和記、村中達也、川畑篤史
2. 発表標題	糖尿病性末梢神経障害はthrombin依存的にthrombomodulin alfaによって抑制され抗凝固薬によって増悪する：基礎・臨床融合研究による新知見
3. 学会等名	第95回日本薬理学会年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	圓尾賢悟、田島和樹、坪田真帆、西堀正洋、川畑篤史
2. 発表標題	Thrombomodulin alfaによるoxaliplatin誘起末梢神経障害発症抑制作用に関与するメカニズムの解析：HMGB1不活性化作用とprotein C及びTAFI活性化作用の寄与について
3. 学会等名	生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	佐々木花菜、Shin Eunkyung、野中結、梶谷梨絵、坪田真帆、西堀正洋、川畑篤史
2. 発表標題	Butyrate誘起過敏性腸症候群モデルにおける結腸過敏へのマクロファージおよび腸管グリア細胞由来HMGB1の関与
3. 学会等名	生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 坪田真帆、川畑篤史
2. 発表標題 オキサリプラチン誘起末梢神経障害の発症メカニズムの解析 HMGB1および内因性トロンボモジュリン/トロンピンの役割
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野遥、富田詩織、坪田真帆、川畑篤史
2. 発表標題 トロンボモジュリンアルファは2型糖尿病db/dbマウスにおける有痛性末梢神経障害をトロンピン依存性に抑制する：ストレプトゾシン誘発1型糖尿病モデルとの違いについて
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田島和樹、圓尾賢悟、坪田真帆、西堀正洋、川畑篤史
2. 発表標題 オキサリプラチン誘起末梢神経障害への補体C5aの関与
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 圓尾賢悟、坪田真帆、田島和樹、関口富美子、西堀正洋、南 達郎、伊藤彰敏、川畑篤史
2. 発表標題 Thrombomodulin alfaのoxaliplatin誘発性末梢神経障害抑制作用発現におけるHMGB1不活性化とprotein C及びTAFI活性化の相対的重要性と下流シグナル分子の解析
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田詩織、中野遥、坪田真帆、田中雅幸、打谷和記、村中達也、川畑篤史
2. 発表標題 糖尿病性末梢神経障害はthrombin依存的にthrombomodulin alfaによって抑制され抗凝固薬によって増悪する：基礎・臨床融合研究による新知見
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 圓尾賢悟、坪田真帆、田島和樹、関口富美子、西堀正洋、南 達郎、伊藤彰敏、川畑篤史
2. 発表標題 Thrombomodulin/thrombin系で産生されるTAFIa/carboxypeptidase Bは補体成分C5aを不活性化することでoxaliplatin誘発性末梢神経障害を抑制する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪田真帆、佐々木花菜、Shin Eunkyung、岡村悠太、堂本莉紗、関口富美子、岡田 卓哉、豊岡 尚樹、川畑篤史
2. 発表標題 Butyrate誘起結腸過敏へのマクロファージおよび腸グリア細胞由来HMGB1の関与とRAGE拮抗薬azeli ragonおよびリウマチ・炎症性腸疾患治療薬sulfasalazineの効果
3. 学会等名 第143回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川畑篤史
2. 発表標題 痛みと血液凝固系
3. 学会等名 シンポジウム「痛みの多面性：難治性疼痛に関与する多様な生体システムについて」、生体機能と創薬シンポジウム2023（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kawabata Atsufumi
2. 発表標題 Role of HMGB1 and thrombin/thrombomodulin in somatic and visceral pain processing
3. 学会等名 Symposium “HMGB1 and proteinases in inflammation and pain: possible druggable targets” , 19th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐久間海地、中野遥、大東麻哉、岩根詩織、坪田真帆、関口富美子、友野靖子、西堀正洋、川畑篤史
2. 発表標題 遺伝性および高脂肪食摂取による2型糖尿病モデルマウスにおける有痛性末梢神経障害に対するthrombomodulin alfa の抑制効果：HMGB1と補体C5aの不活性化が関与する可能性について
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川畑篤史
2. 発表標題 閉経によるエストロゲン減少と化学療法誘発性末梢神経障害
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会、シンポジウム「性ホルモンと痛み・痒み」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 迫 桃子, 青木葉優衣, 谷津健太, 関口富美子, 坪田真帆, Wang Dengli, 西堀正洋, 川畑篤史
2. 発表標題 抗がん剤vincristine誘起末梢神経障害の発現におけるマクロファージおよびSchwann細胞由来HMGB1と局所血液凝固系の相反する役割
3. 学会等名 第144回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮本朋佳、桂木聡子、木村 健、川畑篤史
2. 発表標題 パクリタキセル投与がん患者において血液凝固能低下及び抗凝固薬の併用が化学療法誘発性末梢神経障害に及ぼす影響
3. 学会等名 本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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
研究分担者	関口 富美子 (Sekiguchi Fumiko) (90271410)	近畿大学・薬学部・准教授 (34419)	
研究分担者	坪田 真帆 (Tsubota Maho) (90510123)	近畿大学・薬学部・講師 (34419)	

	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
研究協力者	宮本 朋佳 (Miyamoto Tomoyoshi)	兵庫医科大学・薬学部・助教	

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