

氏名（本籍） たなか じゅんいち
田中 潤一 (福岡県)

学位の種類 博士（医学）

報告番号 甲第 1489 号

学位授与の日付 平成 26 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

Recombinant human soluble thrombomodulin prevents peripheral HMGB1-dependent hyperalgesia in rats

（遺伝子組み換え型ヒト可溶性トロンボモデュリンはラットにおいて末梢の HMGB1 依存性痛覚過敏を阻害する）

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	石倉 宏恭
（副査）	福岡大学	教授	坪井 義夫
	福岡大学	教授	比嘉 和夫
	福岡大学	教授	藤井 誠

目的

核内蛋白である High-mobility group box 1 (HMGB1)は炎症反応によって細胞外に放出され、更なる炎症や組織障害を誘発する。加えて、HMGB1 は痛みの伝達にも関与している事が報告されている。一方、日本において播種性血管内凝固(disseminated intravascular coagulation ; DIC)の治療薬として認可されている Recombinant human soluble thrombomodulin (rhsTM) は抗凝固作用のみならず、N末端 D1 ドメイン(lectin-like domain)が HMGB1 を吸着分解することで抗炎症作用を有している事が判明している。しかし、rhsTM が HMGB1 によって生じる炎症性疼痛に対して如何なる作用を有しているかの報告はこれまでない。今回我々は、末梢組織での HMGB1 が痛覚過敏に関与しているか否か、また rhsTM が痛覚過敏に対して効果を認めるか否かについて検討した。

対象と方法

雄性 wistar ラットを用いて実験を行った。ラットの左後肢へ HMGB1 あるいは lipopolysaccharide (LPS)を投与し、炎症性疼痛モデルを作成した。疼痛は機械的痛覚過敏及び熱痛覚過敏により評価した。炎症性浮腫の指標はラット後肢の厚さを計測することによって判定した。このラット炎症性疼痛モデルに対して、rhsTM や HMGB1 中和抗体を投与し、各々の痛覚過敏や炎症性浮腫に対する薬剤効果を評価した。さらに、足底組織と血清の HMGB1 蛋白量の測定も合わせて実施した。

結果

(1)HMGB1 の左後肢足底内投与によって痛覚過敏と炎症性浮腫を認めた。この HMGB1 誘起痛覚過敏は 0.1-1mg/kg の rhsTM 投与によって有意($P<0.01$)に抑制されたが、浮腫は一部抑制する所見が認められるのみであった。(2)炎症性疼痛における HMGB1 の役割を明らかにするため LPS 誘起炎症性疼痛モデルに対する HMGB1 中和抗体の効果を検討した。HMGB1 中和抗体 50 μg 足底内投与により、痛覚過敏は有意($P<0.01$)に抑制された。一方、浮腫は HMGB1 中和抗体 50 μg 投与では抑制されなかったが、HMGB1 中和抗体 100 μg 投与によって抑制傾向を示した。(3)HMGB1 足底内投与によって組織学的には多核球浸潤を伴う軽度の炎症所見を認め、LPS 足底内投与では多核球浸潤に加えて浮腫を伴う軽度の炎症所見を認めた。(4) 0.01-1mg/kg の低用量 rhsTM 全身投与は、LPS により誘起される痛覚過敏を有意($P<0.01$)に抑制したが浮腫は抑制しなかった。一方、10mg/kg の高用量 rhsTM 全身投与は、痛覚過敏と浮腫の両方を有意(痛覚過敏: $P<0.01$ 、浮腫: $P<0.05$)に抑制した。(5)LPS 投与 1 時間後に測定した足底組織中の HMGB1 蛋白量には変化を認めなかったが、投与 5 時間後に測定し

た HMGB1 蛋白量は有意($P<0.05$)に減少した。血清中の HMGB1 は LPS 投与 1 時間後で変化を認めず、投与 5 時間後には増加傾向を示した。

(6)LPS 投与 5 時間後に測定した、足底組織における HMGB1 およびその受容体である receptors for advanced glycation end products (RAGE)、toll-like receptor-4 (TLR4)の mRNA レベルに変化は認められなかった。

考察

HMGB1 投与によって痛覚過敏及び浮腫が生じ、この痛覚過敏を rhsTM が抑制したこと、及び HMGB1 中和抗体によって LPS 誘起痛覚過敏が抑制されたこと(1,2)から、末梢組織において HMGB1 が炎症性疼痛における重要な役割を担っている事が示唆された。一方、rhsTM が HMGB1 や LPS によって誘起された疼痛を有意に抑制したという結果(1,4)は、rhsTM が鎮痛薬として利用可能である可能性を示した。結果(5,6)より足底組織中の HMGB1 蛋白量は LPS 投与によって有意($P<0.05$)に減少したが、mRNA レベルでの変化は認められなかった。これは炎症促進刺激によって足底組織や細胞から HMGB1 が放出された結果であり、あらたな HMGB1 の産生や HMGB1 の受容体である RAGE, TLR4 の up regulation は生じていないと考えられる。また、結果(3)より、LPS 投与による浮腫は、HMGB1 以外に別の pro-inflammatory mediator が関与している可能性が示唆された。

結論

本研究の結果より、我々は核内蛋白である HMGB1 が末梢組織における痛覚過敏の key mediator である事を見出した。また、低用量の rhsTM 投与は HMGB1 を吸着分解することで鎮痛効果を発揮し、高用量の rhsTM 投与は HMGB1 の吸着分解に加えて LPS を吸着することで、炎症性浮腫も抑制したのではないかと考えた。

審査の結果の要旨

本論文は、核内DNA結合蛋白であるHMGB1(high-mobility group box 1)の炎症性疼痛への関与について検討した。加えて、DIC(disseminated intravascular coagulation；播種性血管内凝固)治療薬であるrhsTM(Recombinant human soluble thrombomodulin；商品名 リコモデュリン®)はHMGB1に対して吸着分解作用を持つことから、rhsTMが炎症性痛覚過敏に対して効果を発揮するのではないかという仮説のもとに検討を加えた。

1. 斬新さ

HMGB1が末梢組織の炎症性疼痛に関与するという新しい知見を証明した最初の報告である。さらに、DIC治療薬であるrhsTMがHMGB1による炎症性痛覚過敏を抑制する事を証明した初めての報告でもある。

2. 重要性

DIC治療薬として販売されているrhsTMが、HMGB1を介した炎症性疼痛を有意に抑制するという結果を示した。この結果はHMGB1をターゲットにした鎮痛薬の創薬の可能性を示したという点で重要である。

3. 実験方法の正確性

ラット炎症性疼痛モデルとして確立しているLPS(lipopolysaccharide)足底内投与モデルを使用し、痛覚閾値測定や炎症性浮腫の評価も多くの研究で採用されている方法で行った。また、足底組織の組織学的検討(HE染色)も標準的方法で行った。

4. 表現の明確さ

rhsTMという比較的新しい薬剤を用いて、複雑な機序である炎症反応に関する実験結果を明確な論文として完成させ、HMGB1が末梢組織における炎症性疼痛に関与していること、ならびにrhsTMがHMGB1を吸着分解することによって鎮痛効果を示す事を世界で初めて報告した。この論文は定評ある学術誌であるBritish Journal of Pharmacology (IF 5.067) に原著論文として既に掲載されている。

5. 主な質疑応答

Q: Cox2やブラジキニン、ヒスタミンなど種々のメディエーターが存在するが、今回のHMGB1は他のメディエーターよりも痛みに大きな影響を与えているのか？

A: 確かに痛みに関するメディエーターは多く存在する。今回の検討からHMGB1も少なからず痛みに関与しているメディエーターである事が判明した。しかし、現時点においてほかの多くのメディエーターと比較して痛みに関与する程度がどの位かについての、詳細な説明はされていない。

Q: RAGE(receptors for advanced glycation end products)が関与しているということだが他のレセプターは？

A: 本実験ではレセプターに関しての詳細な検討は行っていない。我々が実施したマウスの膀胱痛の検討ではRAGEをブロックすると痛みを抑制したという結果が得られた。

Q: TLR-4(toll-like receptor-4)と RAGE は末梢神経に発現しているのか？過去の報告はあるのか？

A: controversialである。神経周囲に他のtarget cellが存在しているかもしれない。

Q: 疼痛と浮腫ではメディエーターが違うという考察であったが、レセプターからの反応の違いに文献的見解は無いのか？

A: 末梢組織での炎症性疼痛に対する検討自体が本研究以外に報告が無い。

Q: 臨床的にどのような状況を考えているか？

A: 本実験がそのまますぐに臨床に結び付けるのは難しい。今回の炎症性疼痛に対する検討はrhsTM前投与にて実施した。rhsTMを後投与しても効果は十分期待できると思われる。しかし、rhsTMの薬価は1V=約6mg=¥38,000と高額のため、そのまま炎症性疼痛の鎮痛薬として使用する事は現実的ではない。しかしながら、現在抗がん剤の副作用で認める神経障害性疼痛に対するrhsTMの鎮痛効果を検討中であり、将来的な臨床応用も視野に入れて実験を行っている。

その他、いくつか質問やコメントがあったが、発表者はいずれについても的確に応答した。

以上、内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ及び結論、質疑応答の結果を踏まえ、審査員全員での討議の結果、本論文は学位論文に値すると評価された。