

氏名	にしだ たけし 西田 武司		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1654 号		
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 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	Involvement of high mobility group box 1 in the development and maintenance of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in rats （ラットにおける化学療法により誘発された末梢神経障害の発生と維持への High mobility group box 1 (HMGB1) の役割）		
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 山浦 健
		福岡大学	准教授 角田 俊之

内 容 の 要 旨

【目的】

癌化学療法で使用されるビンカアルカロイド系、タキサン系、白金錯体などの抗癌薬は神経障害性疼痛を副作用として誘起し、その結果患者 QOL や治療の中断などの原因となっている。しかし神経障害の発生機序として、抗癌薬による微小管障害、脱髄、細胞体への直接障害などが考えられているが明確になっていない。核内蛋白質のひとつである High mobility group box 1 (HMGB1) は壊死細胞や活性化マクロファージなどの炎症細胞から放出され、autocrine あるいは paracrine 的に Receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) や toll-like receptor 4 (TLR4) を活性化し、サイトカイン遊離などを介して炎症反応を促進する damage-associated molecular patterns (DAMPs) の一つとして注目されている。HMGB1 が体性痛覚過敏やシクロフォスファミド膀胱痛、あるいは外科的神経損傷における神経障害性疼痛モデルの病態などに関与することが報告されている。この HMGB1 が化学療法剤で誘起される神経障害性疼痛への関与の検討および、HMGB1 の活性を抑制すると考えられる HMGB1 への抗体や、HMGB1 を吸着分解する遺伝子組換えヒト可溶性トロンボモジュリン (rhsTM) の化学療法誘起性神経障害性疼痛に対する効果を検討する。

【対象と方法】

対象として雄性ラット (Wistar rat) を使用した。化学療法誘起性神経障害モデルの作成および対照群を比較検討した。①ビンクリスチン (VCR)、パクリタキセル (PCT) による神経障害性疼痛モデルの作成：ビンクリスチン 0.1mg/kg の 2 週間で総計 10 回の腹腔内投

与、パクリタキセル 2mg/kg の隔日総計 4 回の腹腔内投与により作成いずれも対照群も作成した。神経障害性疼痛の評価は疼痛閾値測定を行動観察実験である paw pressure test を用いて hyperalgesia (痛覚過敏) を、von Frey test による up down 評価での 50%threshold により allodynia (異痛症) を評価した。②神経障害性疼痛ラットにおける HMGB1 の関与の検討および rhsTM の影響の検討：HMGB1 への直接的アンタゴニストとして抗 HMGB1 抗を神経障害性疼痛モデルラットへ 1mg/kg 単回腹腔内投与、HMGB1 の標的分子として広く認知されている TLR4、RAGE へのそれぞれに阻害作用を有する Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides*(LPS-RS)、Low molecular weight heparin(LWMH) をラットへそれぞれ 50 μ g/paw、10 μ g/paw を単回足底内投与し、神経障害性疼痛への影響を上記同様に評価し、検討した。③神経障害性疼痛の発生段階における抗 HMGB1 抗体、および rhsTM の投与による影響の検討：神経障害性疼痛モデルの作成時に VCR、PCT をそれぞれ投与する 30 分前に抗 HMGB1 抗体を 1mg/kg、rhsTM を 1, 3, 5, 10mg/kg 腹腔内投与し、疼痛閾値足底を対照群と比較し、検討した。

【結果】

VCR および PCT により発生した神経障害性疼痛は、抗 HMGB1 抗体、LPS-RS、LWMH、および rhsTM のモデルへの投与によっていずれも一過性の痛覚過敏、異痛症の有意な疼痛閾値の回復として確認された。また、発生段階における抗 HMGB1 抗体と rhsTM の繰り返し投与により神経障害性疼痛の発生は rhsTM 1mg/kg 以外で有意に痛覚過敏、異痛症の疼痛閾値の維持が確認され、神経障害性疼痛の発生が抑制された。

【結論】

化学療法誘起性神経障害による神経障害性疼痛には HMGB1 への直接的な阻害物質および HMGB1 の標的分子へのアンタゴニストに投与より疼痛閾値の改善あるいは発生そのものの抑制効果が確認され、HMGB1 の関与が示された。また、HMGB1 を分離吸着するトロンボモジュリン製剤は疼痛抑制および神経障害性疼痛の発生を予防できる可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

がん化学療法剤として臨床で広く用いられているパクリタキセル・ビンクリスチンは神経障害性疼痛を惹起する。本論文は、パクリタキセル・ビンクリスチン誘起神経障害性疼痛モデルラットを作製し、疼痛発現に致死的炎症性メディエーターである High Mobility Group Box (HMGB)1 が関与している事を明らかにした。加えて、可溶性遺伝子組み換え型ヒトトロンボモジュリン(recombinant human soluble thrombomodulin, rhsTM) 製剤が HMGB1 の作用を抑制することにより、神経障害性疼痛に対する鎮痛効果を発揮することも明らかにした。

1) 斬新さ

今回の検討は HMGB1 が抗がん薬によって発症する神経障害性疼痛に関与する事、ならびに、播種性血管内凝固症候群に対する抗凝固薬として認可されている rhsTM が HMGB1 の作用を抑制することで抗がん薬による神経障害性疼痛を軽減したことを証明したが、過去にこのような報告は無く斬新である。

2) 重要性

抗がん薬であるビンカアルカロイド系、タキサン系、白金錯体などの主な副作用に、神経障害性疼痛があり、これが治療の中断や QOL 低下の原因となっている。今回の検討結果から、rhsTM が神経障害性疼痛の治療効果のみならず予防的効果を発揮することが明らかとなったことは極めて重要な知見である。

3) 研究方法の正確性

今回の検討に用いたパクリタキセル・ビクリスチン誘起神経障害性疼痛モデルラットは既に確立したモデルである。また、痛みの評価に使用した痛覚過敏評価・異痛症評価の評価方法も既に確立されたものである。さらに、組織中の HMGB1 発現は市販の電気泳動法用キットを用いてウェスタンブロッティング法により測定した。

以上より研究方法の正確性は十分に担保されている。

4) 表現の明瞭性

既存の手法を用いた評価で明確な論文として完成させており、定評のある学術誌である Toxicology に原著論文として採用された。

よって、本論文は明瞭に表現されている。

5) 主な質疑応答

Q1) パクリタキセル、ビクリスチン誘起神経障害性疼痛に対して、低分子ヘパリンやトロンボモジュリン製剤を後投与した場合、一過性に疼痛が緩和される理由はどのように考えればいいのでしょうか、またその時間がわずか 30 分程度しか効果がない理由をどのように考えていますか。

A1) 考察として 2 点考えています。一つ目は、低分子ヘパリンとトロンボモジュリン製剤の半減期が比較的短い（低分子ヘパリン半減期： $T_{1/2}$ 約 2 時間、トロンボモジュリン製剤： $T_{1/2\alpha}$ 約 4 時間、 $T_{1/2\beta}$ 約 20 時間；二相性の消失が確認されている。）ために、低分子ヘパリンやトロンボモジュリン製剤の効果がなくなり、疼痛が再度出現する可能性です。もう一つは、局所における HMGB1 による疼痛シグナルをキャンセルしたとしても、後根神経節

や活性化マクロファージなどから持続的に HMGB1 が放出されているために疼痛が再燃する可能性が考えられます。

Q2) モデル(PCT / VCR 処理ラット)の後根神経節において、HMGB1 の発現量が低下している理由をどのように考えますか。

A2) 今回実施した免疫染色法の結果から、後根神経節に発現した HMGB1 はシュワン細胞を經由して炎症および疼痛が生じた神経終末や末梢組織へ移動したのではないかと推察しています。その結果、後根神経節での HMGB1 の発現量が低下したと推察しています。

Q3) トロンボモジュリン製剤の D1 ドメインは HMGB1 と、どのようなたんぱく相互作用により吸着・分解されるのですか。

A3) これまでの報告では、トロンボモジュリンの D1 ドメインに HMGB1 が結合し、分解することが判明しています。これは免疫沈降法により証明されています。また、この作用はトロンビンがトロンボモジュリンの D2 ドメインに結合することで生じることが判明しています。恐らく、トロンボモジュリン製剤も同様に、D1 ドメインに HMGB1 が結合し、分解されると思われます。

Q4) 各種モデルにおける、血算、生化学などで炎症のマーカーの値などの検討は行いましたか。

A4) 今回は白血球数や CRP, IL-6 等の血算、生化学による炎症性マーカーの評価は実施していません。

Q5) 疼痛部位の病理所見で炎症を示す所見はあったでしょうか。

A5) 今回の実験では病理標本の作製は実施していません。今後検討する必要があると考えています。しかし、神経終末の周囲の非常に狭い空間で HMGB1 の持続的放出による疼痛の発生が起こっていると考えられるため、病理組織での観察は難しいと考えています。

Q6) 各種モデルは神経障害性疼痛であるが、運動神経に損傷はないと考えていいのでしょうか。

A6) 今回の実験は運動神経障害の評価は実施していません。しかし、モデルラットとコントロールラットの間で観察期間中に明らかな運動障害、可動制限などの差は認められていません。

Q7) パクリタキセル、ビンクリスチンの投与量は通常人間に投与する量と比較して多いでしょうか。

A7) 臨床でのパクリタキセル、ビンクリスチン投与スケジュールは通常、1 回投与の後に数週間の休薬期間が設けられています。一方、今回作成した神経障害性疼痛モデルでのパクリタキセル、ビンクリスチン投与は連日投与を行いました。よって、実験で用いた投与

量は通常臨床で投与する量より体重換算で多い投与量（概算で、パクリタキセルにおいて約2～10倍、ビンクリスチンにおいて約7～30倍）となっています。

Q8) HMGB1 自体が痛みの誘因物質という認識でいいと考えますか。また分子量はどの程度でしょうか。

A8) 今回の実験結果から HMGB1 が痛みの誘因物質と考えています。それを裏付けるデータとして今回の検討結果において抗 HMGB1 中和抗体やトロンボモジュリン製剤の前投与で痛みの出現は抑えられていました。また HMGB1 の分子量は25kDの大きさとされています。

本論文は、斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭性において優れており、学位論文に値すると評価された。