

慢性疼痛発症に関与する炎症・侵害受容増幅因子 HMGB1 の 血中動態解析に基づく客観的評価法の確立

研究代表者 西堀 正洋 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・特命教授

研究要旨

本研究は、「血中 HMGB1 レベルが疾患横断的な慢性疼痛患者の簡便な客観的評価法になる」との仮説を実証することを目的とする。臨床におけるそれぞれ基礎疾患の異なる慢性疼痛患者約 200 名の血中 HMGB1 レベルの測定により、臨床症状との連関について情報を集積・解析し、客観性と有用性を備えた評価法となり得るか否かを判定する。

現象論のレベルでヒトの疼痛知覚と血中 HMGB1 値の関係を示すことにより、痛みの客観的評価法を臨床現場に提示することができ、将来的なガイドライン作成への貢献が期待される。

研究分担者

森松 博史

（岡山大学学術研究院医歯薬学域・教授）

松岡 義和

（岡山大学病院集中治療部・助教）

荒川 恭佑

（岡山大学病院麻酔科蘇生科・助教）

渡邊 政博

（就実大学薬学部・講師）

研究協力者

友野 靖子（研究員）

劉 克約（研究員）

妹尾 悠祐（大学院生）

とも稀ではない。このような痛みの状態では、仕事や学業を継続することが困難になるだけでなく、最低限の社会生活を営むことすら難しくなる。これまで世界的に、痛み知覚に関与する分子群を解析し、それに基づく治療薬開発が実施され、またリポジショニング薬が登場してきたが、著効する薬物は存在せず、また痛みの軽減を評価するための簡便な客観的評価法は確立されていない。

研究代表者の西堀は、生体における炎症反応の研究を 20 年以上継続し、急性・慢性炎症が痛み知覚の増幅系として働く機序について多くの知見を報告してきた（Nishibori et al., JPS, 2019; Cells, 2020）。特に、神経やその

A. 研究目的

がん性疼痛や神経障害性疼痛では、持続的激痛から自殺念慮が生じるこ

周囲組織に由来する核内タンパク HMGB1 の組織損傷に伴う挙動と、細胞外に放出された HMGB1 の痛み知覚の増幅現象に関し、分子レベルから個体レベルの認知機能までを対象として解析してきた。一連の研究で、西堀が作製した抗 HMGB1 単クローン抗体が、HMGB1 の働きを効率的に中和し、炎症増幅と侵害受容増幅の双方に作用した結果、極めて高い鎮痛効果を発揮することを動物の疼痛モデルで見出した (J Neurochem, 2016; 2019; Neuropharmacol, 2018 ほか)。その鎮痛作用は、急性期のみでなく慢性期にも及ぶ (Biomed Pharmacother, 2022)。この時、炎症や神経組織損傷に応じて、血中 HMGB1 値が上昇することも観察した。以上の発見は、世界的な独創性を有している。既に抗 HMGB1 単クローン抗体治療の実用化に向け、抗体の国際的特許 (JP6247646, US9550825, EP2949675, ZL201380071400.5) を取得済みで、治療用ヒト化抗体も独自に作製 (橋渡し研究加速ネットワークプログラム・H27) した。

本研究は上記の背景のもとに、「血中 HMGB1 レベルが疾患横断的な慢性疼痛患者の簡便な客観的評価法になる」との仮説を実証することを目的とする。臨床におけるそれぞれ基礎疾患の異なる慢性疼痛患者 200 名の血中 HMGB1 レベルの測定により、臨床症状との連関について情報を集積・解析し、客観性と有用性を備えた評価法

となり得るか否かを判定する (資料 1 参照)。

B. 研究方法

岡山大学病院麻酔科蘇生科ペインセンター外来を新たに受診する慢性疼痛患者 200 名を対象に、痛みの病態別に 5 群に分類 (末梢神経障害性疼痛、中枢性神経障害性疼痛、変形性脊椎疾患、術後遷延痛、要因不明の難治性疼痛) の上、各患者の痛み強度 (VAS/BPI) ・心理的評価 (HADS/PCS)、QOL アンケート (EQ-5D) および血液検査により血中 HMGB1 測定 (副次評価項目: オキシトシン、コルチゾール、シスタチン C) を行う。これらは、同意取得時 (全項目) と 1 ヶ月目 (HADS/PCS と EQ-5D を除く)、3 か月目 (HADS を除く) で実施し、解析する (資料 2 参照)。

血中 HMGB1 値の測定は、2 つのアッセイ法 (Shino-test Elisa と自家製 Elisa) を用いる。自家製の Elisa 法は、エピトープの異なる 3 つのラット単クローン抗体 (#11-19, #4-1, エピトープは HMGB1 の B-Box 内; #10-22, エピトープは HMGB1 の C 末端配列) と、クローン #10-22 の遺伝子配列から作製したヒト化抗 HMGB1 抗体 (OKY-001) の 4 種類を用いて検討し、固相化する抗体と、HRP-標識の検出抗体の最適な組み合わせを選抜する。Elisa 用標準 HMGB1 は、sf9 細胞を用いて LPS-free の精製品を作製する。

また、市販（Shinotest）の Elisa 法と自家製 Elisa 法の感度について比較検証を実施する。

（倫理面への配慮）

本臨床研究は、岡山大学倫理審査委員会の審査・承認を得た上で開始する。

本研究は、人体から採取された試料・情報を用い、その採取に軽微な侵襲性を有するため、倫理指針に則り、同意取得の上実施する。研究責任者または研究分担者は、岡山大学倫理審査委員会で承認の得られた同意説明文書を用いて十分な説明を行い、研究対象者の自由意思による同意を文書で取得する。

本研究で収集した試料・情報には、研究独自の番号を付し、研究対象者の氏名、生年月日などの情報が漏れないよう取扱いに注意する。収集した試料は、岡山大学バイオバンクに保存し、必要に応じ必要量を麻酔・蘇生学教室に移す。

本研究は日常診療による観察研究であるが、HMGB1、オキシトシン、コルチゾール、シスタチン C の測定は研究目的で実施する。患者は採血回数が最大で 3 回増加し、1 回あたりの採血量が 7 ml 増加する。しかし、これらは研究対象者の症状や治療経過に影響を与えないものと考えられる。採血時には血管迷走神経反射のリスクがあるが、頻度は低い。採血時には、研究対象者の体調をよく確認し、不調で

あれば、採血を中止する。また、過去に血管迷走神経反射を起こしたことがある研究対象者は、臥位で採血する。

C. 研究結果

臨床研究は、前記倫理委員会の承認を得て 10 月より同意取得・検体収集を開始した。令和 5 年 3 月末までに、25 症例、49 検体（1 ヶ月後および 3 ヶ月後採血を含む）の登録を得た。

HMGB1 測定については、前述の 4 種類の単クローン抗体から、自家製 Elisa のサンドイッチ法に用いる 2 種類の抗体を選抜した（#4-1、OKY-001）（資料 3 表 1・図 1 参照）。標準品の測定に関して、自家製 Elisa と市販品 Shino-test Elisa で感度に大きな違いがないことを確認した（資料 3 図 2 参照）。

2 月末までに得られた患者検体の測定を実施したところ、両方の測定値に若干の食い違いがあることが見い出され、その解消に向けた検討を次年度の課題とした。

D. 考察

令和 4 年度は、コロナ感染の影響もあり、予想したより患者登録のスピードが遅かったが、コロナの鎮静化を追い風として、登録数増加に取り組む。

令和 4 年度に実施した 2 つの Elisa 法による患者サンプルの測定で、若干の食い違いが出た問題を検討するため、患者サンプルの集積を止めること

なく、測定法のレベルで解決を図る。
検討項目として、血液希釈液中に低濃度海面活性剤を添加し、その効果を明らかにする。

E. 結論

令和5年度にできるだけ多くの患者登録と検体収集を継続する。令和6年度の前半までに全症例登録を完了させ、測定・解析を終え、情報発信を測る。

現象論のレベルでヒトの疼痛知覚と血中 HMGB1 値の関係を示すことにより、痛みの客観的評価法を臨床現場に提示することができ、将来的なガイドライン作成への貢献が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Gao S, Liu K, Ku W, Wang D, Wake H, Qiao H, Teshigawara K, Nishibori M. Histamine induced high mobility group box-1 release from vascular endothelial cells through H1 receptor. **Front Immunol.**, 13:930683, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.930683.

2. 学会発表

該当なし

(参考：関連する研究発表)

1. 論文発表

Hisaoka-Nakashima K, Ohata K, Yoshimoto N, Tokuda S, Yoshii N, Nakamura Y, Wang D, Liu K, Wake H, Yoshida T, Ago Y, Hashimoto K, Nishibori M., Morioka N. High-mobility group box 1-mediated hippocampal microglial activation induces cognitive impairment in mice with neuropathic pain. **Exp Neurol.**, 335:114146, 2022.

2. 学会発表

中野遥, 佐久間海地, 冨田詩織, 坪田真帆, 友野靖子, 西堀正洋, 川畑篤史.
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. 日本薬学会第 143 年会 (札幌). 令和 5 年 3 月 28 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

新規出願および登録はなし

2. その他

(本研究課題に関連する知的財産)

発明の名称：ヒト化抗 HMGB1 抗体もしくはその抗原結合性断片

特願 2013-013602 (2013/01/28)

特願 2014-558456 (2015/05/13)

特許第 6247646 号 (2017/11/24)

WO2014/115430 (2017/1/26)

US9550825 (2017/01/24)

CN104955846 (2018/12/04)

EP2949675 (2021/03/31)

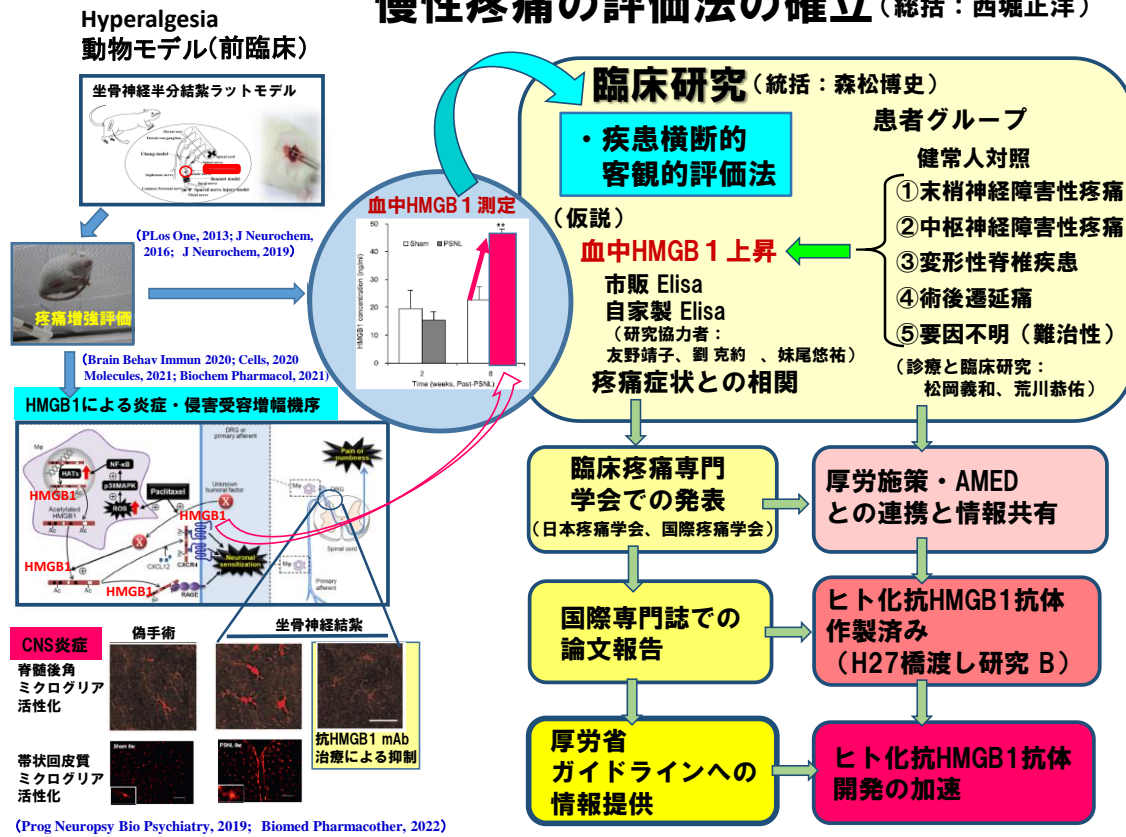
発明者：高田賢蔵、寅嶋崇、西堀正洋
出願人：株式会社イーベック、岡山大学

I. その他

「痛みセンターを中心とした慢性疼痛診療システムの均てん化と診療データベースの活用による医療向上を目指す研究」(代表：矢吹省司先生・福島県立医科大学)の研究班と連携して、本事業の推進を図る。

令和4年5月15日(日)および令和5年3月19日(日)に実施された班会議に参加し、研究発表を行い、情報共有を図るとともに今後の課題を確認した。

慢性疼痛の評価法の確立 (総括：西堀正洋)



《臨床研究の概要》

研究代表者： 森松 博史

研究分担者： 西堀 正洋、松岡 義和、荒川 恭佑 研究協力者： 妹尾 悠祐ほか

研究目的： 本研究の目的に準じる。

参加診療機関： 岡山大学病院

対象： 慢性疼痛の患者 200 人(病態の内訳は下表参照、それぞれの人数は定めない)と
健常者 30 人

	病態別分類	代表的疾患名
①	末梢神経障害性疼痛	帯状疱疹後神経痛 糖尿病性神経障害 三叉神経痛など
②	中枢性神経障害性疼痛	脊髄障害性疼痛 脳卒中後疼痛など
③	変形性脊椎疾患	腰部・頸部脊柱管狭窄症 腰椎・頸椎椎間板ヘルニア 変形性腰椎・頸椎症など
④	術後遷延痛	開胸術後疼痛症候群 乳房切除後疼痛症候群 脊椎手術後疼痛症候群など
⑤	要因不明の難治性疼痛	線維筋痛症 会陰部痛など

観察および検査項目： ○実施日・検査日（通常診療）

●実施日・検査日（本研究のために実施）

検査項目	患者			健常者
	研究開始日	1ヶ月目	3ヶ月目	研究開始日
同意取得	●			●
VAS / BPI	○	●	○	●
PCS	○		○	●
HADS	○			●
EQ-5D	○		○	●
血液検査 ・HMGB1 ・オキシトシン ・コルチゾール ・シスタチン C	●	●	●	●

血液検査は 1 回 7ml の採血とする。溶血に注意し、遠心後血漿を最大 6 分割して測定時まで凍結保存する。測定時には、保存血漿を溶解し、Elisa kit (Shino-test) と自家製 Elisa で、HMGB1 の測定を実施する。測定に先立ち、両者の方法による測定値が相関・近似することを確認する。オキシトシンは測定キットで測定する。コルチゾールとシスタチン C は株式会社 L S I メディエンスに送付し測定する。

成人健常者と患者グループの血中 HMGB1 値についての比較を実施する。各患者の痛みスコアの変動と血中 HMGB1 値の変動について解析する。

インフォームドコンセント：

厚労科研における調査研究の目的について、あらかじめ患者本人に説明し、痛みの評価への協力と採血への同意を文書を用いて取得する。

3つの単クローン抗体の比較

Clone	Epitope	Specificity	SPR (Kd)
#10 -22 (IgG2a)	C terminal EEEDDDDE	HMGB1	$1.5 \times 10^{-8} \text{ M}$
#11 -19 (IgG2a)	B - box	HMGB1/2	$3.0 \times 10^{-7} \text{ M}$
#4 -1 (IgG1)	B - box	HMGB1/2	$2.2 \times 10^{-7} \text{ M}$

表 1

ヒト化
OKY-001

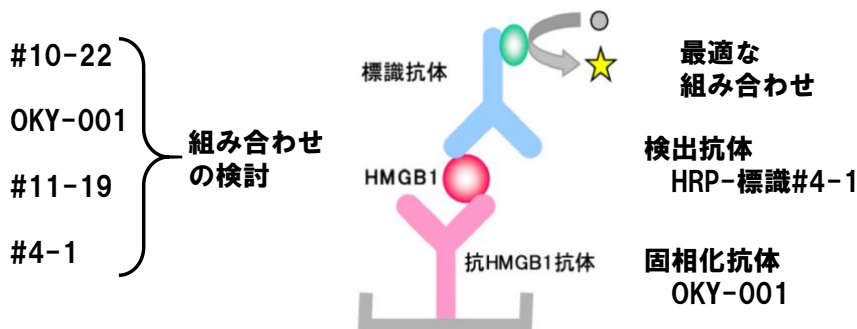
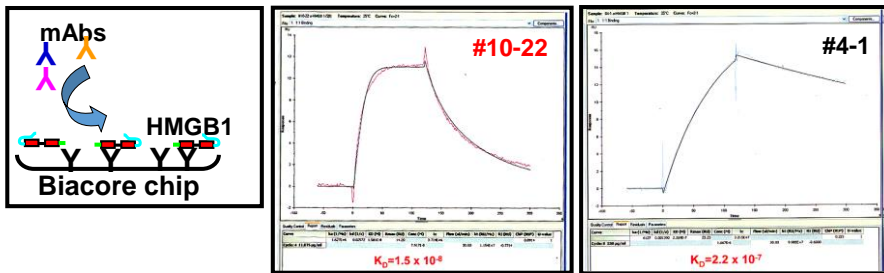


図 1

自家製とShinotestのElisa法による2回の標準品測定

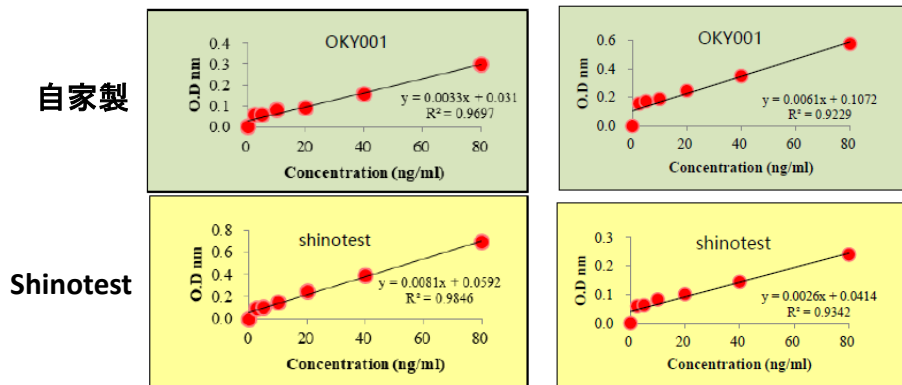


図 2