

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21184

研究課題名(和文)重症インフルエンザ肺炎における抗HMGB-1抗体の治療効果の検討

研究課題名(英文)Therapeutic effects of anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody for influenza A virus (H1N1)- induced pneumonia

研究代表者

野坂 宜之 (Nosaka, Nobuyuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30713961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：近い将来発生しうるインフルエンザ・パンデミックに向け、新たな治療戦略の選択肢の確立が必要だ。我々はHigh Mobility Group Box-1(以下、HMGB1)という炎症物質に注目し、重症インフルエンザ肺炎モデルに対する抗HMGB1抗体の治療効果を検討した。抗HMGB1モノクローナル抗体単独でマウス重症インフルエンザ肺炎を軽症化させ致死率を改善させた。抗ウイルス薬単独では50%救命できない重症インフルエンザ肺炎モデルでも、抗HMGB1抗体併用により致死率が有意に改善した。なお、本抗体による有害事象は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Provision for an influenza pandemic is an urgent issue. We aimed to evaluate the therapeutic effects of anti-high mobility group box-1 (HMGB1) monoclonal antibody (mAb) treatment on severe pneumonia induced by influenza A virus in mice. Anti-HMGB1 mAb significantly improved the survival rate of mice with severe influenza pneumonia with attenuated histological changes in the lungs. In addition, anti-HMGB1 mAb also improved the survival rate of mice with influenza pneumonia with 50% lethality even with anti-influenza drug administration. There were no adverse effects found by anti-HMGB1 mAb administration.

研究分野：小児集中治療、小児感染症、インフルエンザ

キーワード：インフルエンザ肺炎 HMGB-1 抗体治療

## 1. 研究開始当初の背景

2009年に発生したインフルエンザ・パンデミックでは、ウイルスの病原性は比較的弱かったものの、小児を中心に集中治療を要する重症呼吸不全患者が多発した。近い将来再び発生しうるインフルエンザ・パンデミックに向け、公衆衛生、診断、治療、搬送など医療のさまざまな側面において対策を講じておく必要がある。特に治療の側面においては、既存の抗ウイルス薬の効果が低い耐性株や新型ウイルスの出現が危惧されており、抗ウイルス薬をサポートする複数の選択肢を準備しておくことが重要と考えられる。

HMGB-1(High-mobility group box-1)は炎症性サイトカイン様因子として振る舞う25kDaの核内DNA結合タンパク質である。HMGB-1は当初、核内に局在し遺伝子転写制御やクロマチン構造の維持、DNA修復に機能する非ヒストンタンパク質として発見されたが、最近には殊にその炎症性メディエーターとしての機能に注目が集まり、敗血症などの急性疾患から悪性腫瘍などの慢性疾患に至る幅広い炎症病態への関与が報告されている。感染などにより活性化されたマクロファージ/単球からHMGB-1は能動的に、あるいは壊死細胞から受動的に細胞外へ放出され、RAGE(receptor for advanced glycation endproducts)など免疫細胞上の受容体に結合し炎症を増幅することが知られている。近年、抗HMGB-1抗体が敗血症や頭部外傷などの病態改善に有効であることが示され、注目を集めている。

2009 A(H1N1)インフルエンザウイルスによる重症肺炎を呈した小児患者において、血清中HMGB-1の増加を認めその病態形成への関与が示された。しかし、インフルエンザ肺炎における抗HMGB-1抗体の治療薬としての可能性を検討した報告は存在しない。そこで我々は重症インフルエンザ肺炎の病態にHMGB-1が深く関与していると考え、抗HMGB-1抗体による治療可能性の検討を着想した。

## 2. 研究の目的

重症インフルエンザ肺炎における抗HMGB-1抗体の役割を解明し、新たな治療選択肢の可能性を探ること。

## 3. 研究の方法

(1)インフルエンザ肺炎モデルマウス(インフルエンザAウイルスPR8株(H1N1), 100PFU, 1×MLD50)を対照群と抗HMGB-1モノクローナル抗体投与群に分け、感染後1、24、48時間後に対照抗体(抗*Keyhole Limpet*ヘモサイアニンモノクローナル抗体)または抗HMGB-1モノクローナル抗体(#10-22、免疫グ

ロブリンG<sub>2a</sub>)をそれぞれ2mg/kgずつ尾静脈に投与し、感染後28日までの生存率を解析した。さらに、感染後3日、5日、7日、10日目に血漿と気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、各種サイトカインやヒドロペルオキシドを測定した。さらに肺の病理学的解析を施行し、ウイルスDNAコピー数を測定した。

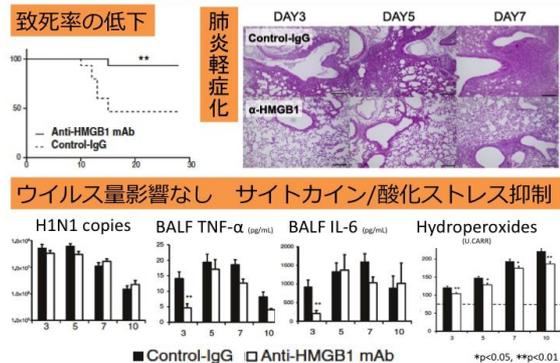
(2)ペラミビル投与(感染後2日、3日目の2回、各10mg/kg)でも50%致死のインフルエンザ肺炎モデルマウス(インフルエンザAウイルスPR8株(H1N1), 1500PFU, 10×MLD50)を対照抗体(抗*Keyhole Limpet*ヘモサイアニンモノクローナル抗体)群と抗HMGB-1モノクローナル抗体投与群に分け、感染後2日、3日、4日目に対照抗体または抗HMGB-1モノクローナル抗体をそれぞれ7.5mg/kgずつ尾静脈に投与し、感染後28日までの生存率を解析した。実験(1)と同様にDay5,7に血漿とBALFを採取し、各種サイトカインやヒドロペルオキシドを測定した。さらに肺の病理学的解析を施行し、ウイルスDNAコピー数を測定した。

(3)実験1の残血清を用い、血液生化学検査を施行し、対照群と抗HMGB1抗体投与群で比較を行い、安全性を評価した。

## 4. 研究成果

(1)インフルエンザ肺炎モデルにおける抗HMGB-1抗体の治療効果

### 抗HMGB-1抗体による単独効果

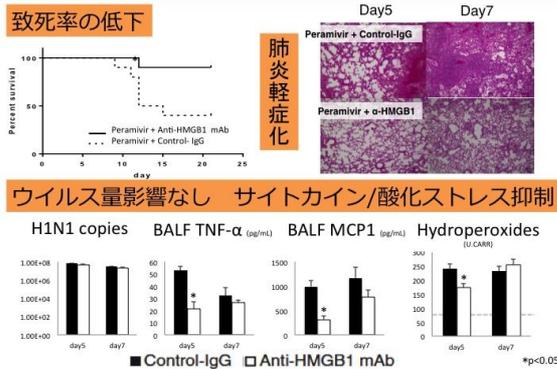


抗HMGB-1抗体投与群で対照群と比較し有意に生存率が高かった。一方で肺組織中のウイルスDNAコピー数に両群間で有意差は認めなかった。対照群では感染後3日目以降、びまん性浮腫・肺胞と肺間質への炎症細胞浸潤・出血・気道の肥厚が認められた。抗HMGB-1抗体投与群ではこれらの肺組織学的変化が軽減していた。抗HMGB-1抗体投与群のBALF中IL-6、TNF-αおよびCXCL1濃度は感染後3日目において対照群と比較して明らかに低値であった。また、RAGEのメッセンジャーRNAの発現は感染後3日目で有意に抑制され、BALF中の可溶性RAGE濃度は感染後5日、7日、10日目で有意に低値を示した。さらに感

染後3日目以降、血清ヒドロペルオキシド濃度は抗HMGB-1抗体投与群では対照群と比較して有意に低値を示した。(Critical Care 19:249, 2015を参照)

(2)抗インフルエンザ薬抵抗性インフルエンザ肺炎モデルにおける抗HMGB1抗体の併用効果

### 抗ウイルス薬と抗HMGB-1抗体の併用効果



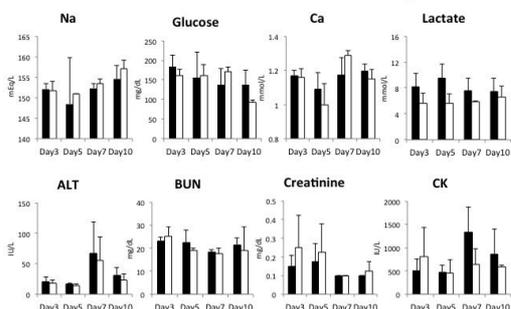
抗HMGB-1抗体投与群で対照群と比較し有意に生存率が高かった。感染後5日目における肺組織中のウイルスDNAコピー数に両群間で有意差は認めなかった。抗HMGB-1抗体投与群で肺の組織学的変化が有意に軽症化した。感染後5日目における抗HMGB-1抗体投与群のBALF中TNF- $\alpha$ 、G-CSF、KC、MCP1、MIP1a、RANTES濃度は対照群と比較して有意に低値であった。さらに血清ヒドロペルオキシド濃度は抗HMGB-1抗体投与群では対照群と比較して有意に低値を示した。(現在、論文投稿中)

以上を要約すると、抗HMGB-1抗体はインフルエンザウイルスコピー数を抑制しない一方で、インフルエンザ肺炎の病態形成に関与するサイトカインや酸化ストレスの産生を抑制して肺炎を軽症化させ、生存率改善に寄与したと考えられる。

(3)抗HMGB1抗体投与による安全性評価

### 抗HMGB-1抗体による安全性

■ Control-IgG □ α-HMGB-1  
横軸はインフルエンザAウイルス/PR8 100PFU (1 MLD<sub>50</sub>) 投与後日数



抗HMGB1抗体投与群で有意な異常所見を呈した生化学検査項目はなかった。(図は一部抜粋)

HMGB-1のアミノ酸配列はマウスとヒトの間で99%相当である。したがって、本研究結果は十分にヒトに応用できると考えられる。抗HMGB-1モノクローナル抗体は重症インフルエンザ肺炎の治療薬として期待できる。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nosaka N, Yashiro M, Yamada M, Fujii Y, Tsukahara H, Liu K, Nishibori M, Matsukawa A, Morishima T. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody treatment provides protection against influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. *Crit Care* 19:249, 2015. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

畑山一貴 野坂宜之 吉川知伸 藤井洋輔 八代将登 塚原宏一 森島恒雄. 重症インフルエンザ肺炎に対する抗HMGB-1抗体の治療効果と副作用. 第48回日本小児感染症学会学術集会 2016年11月20日. 岡山コンベンションセンター(岡山市)

Nosaka N. Therapeutic effects of anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody for influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia.

4<sup>th</sup> International Conference and Exhibition on Lung & Respiratory Care. 2016年8月1日 マンチェスター(英国)

野坂宜之 八代将登 藤井洋輔 塚原宏一 森島恒雄. インフルエンザ肺炎モデルにおける抗HMGB1抗体の治療効果. 第118回日本小児科学会学術集会 2015年4月18日 大阪国際会議場(大阪市)

Nosaka N. Therapeutic Effects of Anti-High Mobility Group Box-1 Monoclonal Antibody for Influenza A virus (H1N1)-induced Pneumonia. The 11<sup>th</sup> Asian Society for Pediatric Research 2015. 2015年4月16日 大阪国際会議場(大阪市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: インフルエンザ治療剤  
発明者: 西堀正洋、劉克約、塚原宏一、森島恒雄、八代将登、野坂宜之、畑山一貴  
権利者: 岡山大学  
番号: 2016-47807  
出願年月日: 平成28年3月11日  
国内外の別: 国内出願

取得状況(計0件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

野坂 宜之 (NOSAKA, Nobuyuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30713961

### (2)研究協力者

森島 恒雄 (MORISHIMA, Tsuneo)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・特命教授

西堀 正洋 (NISHIBORI, Masahiro)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

塚原 宏一 (TSUKAHARA, Hirokazu)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

松川 昭博 (MATSUKAWA, Akihiro)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

劉 克約 (LIU, Keyue)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

八代 将登 (YASHIRO, Masato)

岡山大学・大学病院・助教

山田 睦子 (YAMADA, Mutsuko)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究員

畑山 一貴 (HATAYAMA, Kazuki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生