

令和元年6月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08909

研究課題名(和文) 抗HMGB1単クローン抗体による出血性脳卒中の治療薬可能性の検討

研究課題名(英文) Therapeutic Potential of an Anti-High Mobility Group Box1 Monoclonal Antibody in Hemorrhagic stroke

研究代表者

劉 克約 (RYU, katsuyaku)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・非常勤研究員

研究者番号：40432637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1は、壊死細胞核から細胞外へ放出されるサイトカイン分子である。我々は、HMGB1を標的とする抗体医薬を発想し、脳出血、硬膜下出血動物モデルを用いて、抗HMGB1抗体の劇的な脳出血後遅発性脳損傷及び脳血管攣縮の抑制作用を明らかにした。HMGB1の放出によって、脳出血誘発性の二次炎症反応に関連することが確認された。硬膜下出血における血管壁の平滑筋細胞から放出されたHMGB1の働きで血管の収縮を誘導する受容体の発現量が上昇することを示した。抗HMGB1抗体はBBB構造・機能の保護を中心として多数の炎症応答反応を抑制することで、出血性脳卒中の脳障害の進行を止め、脳を保護したことを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、出血性脳障害のメカニズムに、障害によって細胞内から放出されるタンパク質HMGB1が関与することを明らかにした。更に、出血性脳障害の早期における抗HMGB1抗体の優れた治療効果が確認された。出血性脳卒中は死亡率が高く、後遺症も重篤です。特にくも膜下出血を引き起こす遅発性血管攣縮が重大な後遺症の原因となることが多い。これまで、脳内出血による神経、血管障害を抑制する薬物は開発されておらず、抗HMGB1抗体による治療法は実用化に向けた研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：High mobility group box1(HMGB1) originally identified as an architectural nuclear protein exhibits an inflammatory cytokine-like activity in the extracellular space. We showed that treatment with anti-HMGB1 monoclonal antibody (mAb) remarkably ameliorated delayed cerebral vasospasm and brain injury induced by cerebral hemorrhage in rats, even when the mAb was administered after cerebral hemorrhage. Our results indicated that anti-HMGB1 mAb efficiently inhibited the development of delayed brain injury through the block HMGB1 translocation and protection of blood-brain barrier (BBB) structure in the cerebral hemorrhage region.

研究分野：薬理学関連、臨床薬理学、創薬研究

キーワード：出血性脳卒中 血液脳関門 遅発性血管攣縮 抗体医薬 HMGB1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は日本人の死因の第3位を占め、寝たきり要介護の1番の原因である。脳出血は一旦発症すると約1/3の方は重い後遺症が残り、1/3の方が亡くなる。その結果、患者・家族の日常生活回復や社会復帰に要する負担は膨大なものとなり、社会的損失も極めて大きいものがある。現在、脳内及び硬膜下出血の急性期治療法として、血腫除去の外科手術が実施されるが、随伴する脳浮腫に対するエビデンスを伴う薬物治療法はない。脳損傷が炎症反応の関与によって、初期の限局性コアから相対的範囲に向かって拡大形成されることに注目し、この炎症応答過程を標的とする創薬を開始した。まず、起炎性の活性物質 High mobility group box1 (HMGB1) と関連タンパクファミリーに注目し、それらに対する特異的単クローン抗体を作製した。その結果、ラット中大脳動脈 2 時間閉塞・再灌流の脳梗塞モデル及び脳外傷モデルにおいて、臨床治療状況を模倣した脳損傷後の末梢静脈内投与方法で、極めて有効に働く抗体を見出した。脳卒中は、虚血性と出血性に大別できるが本研究では出血性脳損傷(脳内及び硬膜下出血)動物モデルを用いて、出血性脳卒中に対する抗 HMGB1 単クローン抗体の評価を行い、汎用性治療薬としての可能性を検討した。

2. 研究の目的

損傷組織また壊死に向かっている細胞から放出される分子は炎症反応の誘導に関与するダメージ関連分子パターン(damage-associated molecular patterns DAMPs)と呼ばれる。HMGB1は代表的な DAMPs の一つである。出血性脳卒中は、予後不良となる率の極めて高い疾患であり、病理・病態形成に関わる組織・細胞・分子レベルでの機序の解明とともに、真に有効な脳卒中の治療薬が望ましい。近年、HMGB1は敗血症、急性肺障害、リウマチ等炎症性病態の誘導、進行と関連があることが明らかにされている。さらに脳卒中における HMGB1 の病理学的役割が注目される。健常成人と比較し、虚血性脳卒中患者の血清中 HMGB1 は高レベルであることも報告された。これまでの研究結果より、神経細胞から放出される細胞核内タンパク質 HMGB1 が、血液脳関門の破綻と炎症性サイトカイン産生の誘導に働くことを明らかにしました。また、HMGB1 の働きを中和する抗 HMGB1 抗体は、HMGB1 の放出を抑制するとともに抗炎症作用を発揮し、その結果、神経細胞死と麻痺症状を抑えることがわかった。HMGB1 は出血性と虚血性脳卒中における共通点がある重要な因子として働くことが考えたことから出血性脳卒中の動物モデルを用いて、抗 HMGB1 単クローン抗体の治療効果の評価及びメカニズムの解析目的とした。

3. 研究の方法

ラットの脳内及び硬膜下出血モデルを作製した

脳実質出血好発部位である線条体ヘコラゲナーゼを微量投与することにより脳実質出血モデルを作成した。ラット頭蓋骨に小穴を開け、硬膜下に 27G 針を挿入し、動脈より採取した。0.3ml の自家血を 3 分間かけて 注入し、硬膜下出血モデルを作成した。両者とも X 線 CT 装置で血腫を確認し、一定の神経症状を呈する個体を選別し、抗 HMGB1 単クローン抗体の治療効果を評価した。

出血性脳卒中後、生体内における HMGB1 の変化を測定した

ELISA 法を用いて、HMGB1 の血液中レベルを確認し、損傷部位の脳組織中 HMGB1 の含量測定には Western blotting 法を用いた。

出血性脳卒中における HMGB1 の脳内局在を確認した

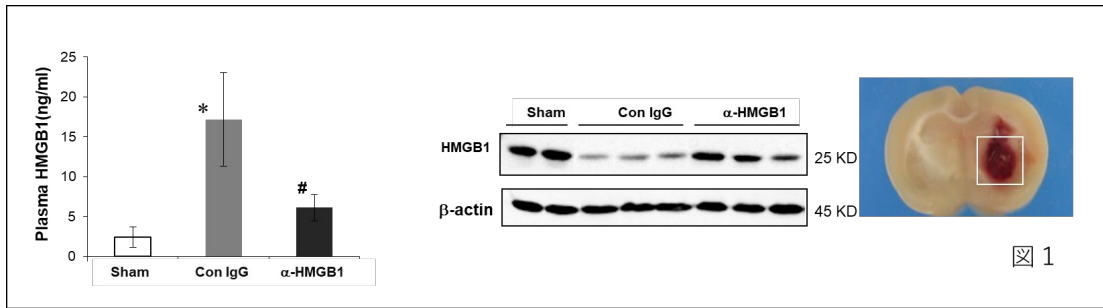
特異抗体による免疫組織化学的検出で、出血、非出血部位、ペナンプラ領域における HMGB1 と関連因子の発現とその時間的变化について情報を得た。

HMGB1 と出血性脳卒中遅発血管攣縮の関連性を検討した

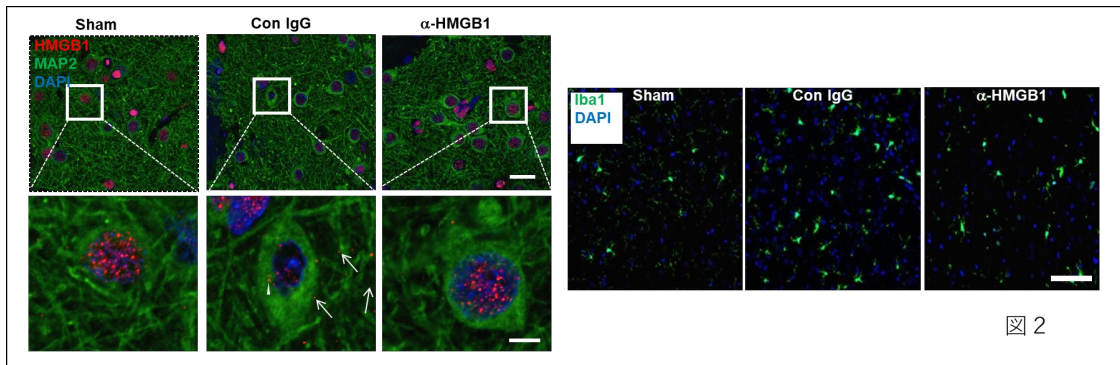
HMGB1 の検出は特異的抗 HMGB1 抗体を使用した。血管平滑筋細胞、アストログリア、ミクログリア細胞のマーカーとして SMA、GFAP、Iba1 を用いて二重蛍光染色した。

4. 研究成果

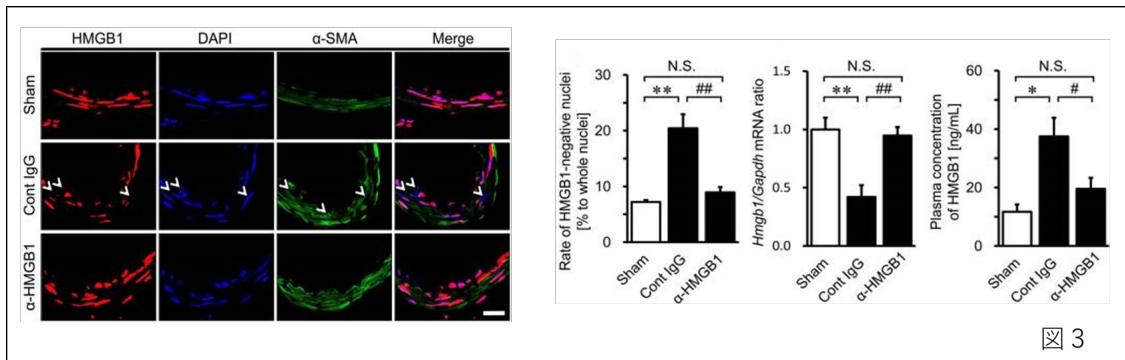
(1) 脳内出血 24 時間後 HMGB1 の血中濃度は明らかに上昇した。一方、損傷部位の脳組織中 HMGB1 の含量が低下した(図 1)。すなわち、脳内出血後、HMGB1 は損傷組織から血中へ移行することを確認できた。これらの知見から脳卒中後には脳損傷による HMGB1 の放出という共通点があることが示唆された。このような HMGB1 の移行は抗 HMGB1 単クローン抗体の投与で有意に止められた(図 1)。



(2) HMGB1 の免疫染色は mouse anti-HMGB1 抗体または rabbit anti-HMGB1 抗体を使用した。免疫染色の結果より、健常ラット脳における HMGB1 は神経細胞の核内に拡散的に局在しているが、脳血腫の周囲領域で、神経細胞の核内に局在している HMGB1 は細胞外へ移行した。脳血腫の周囲領域において神経傷害因子と言われる活性化ミクログリアの細胞数の増加が確認された。このような高発現量の活性化ミクログリアが抗 HMGB1 単クローン抗体の投与で減少した。抗 HMGB1 単クローン抗体の投与は脳出血後の炎症反応を著明に抑制した。(図 2)



硬膜下出血の場合は、血管の収縮とともに拡張能を持つ血管壁における平滑筋細胞から HMGB1 が細胞外へ放出する像が見られた(図 3)。細胞外へ移行した HMGB1 の働きで血管の収縮を誘導する受容体の発現量が上昇することを確認できた。細胞外へ移行した HMGB1 は遅発血管攣縮に繋がる要素として働くことが考えられる(図 4)。



(3) 細胞外へ移行した HMGB1 の働きで血液 脳関門の破綻、脳浮腫の進行、遅発血管収縮の促進、これら一連の増悪が確認できた。抗 HMGB1 単クローン抗体を投与することによってこれらの変化はほぼ 100%抑制された。HMGB1 は、出血性脳卒中における初期の炎症メディエータとして重要な役割を果たすことが考えられた。

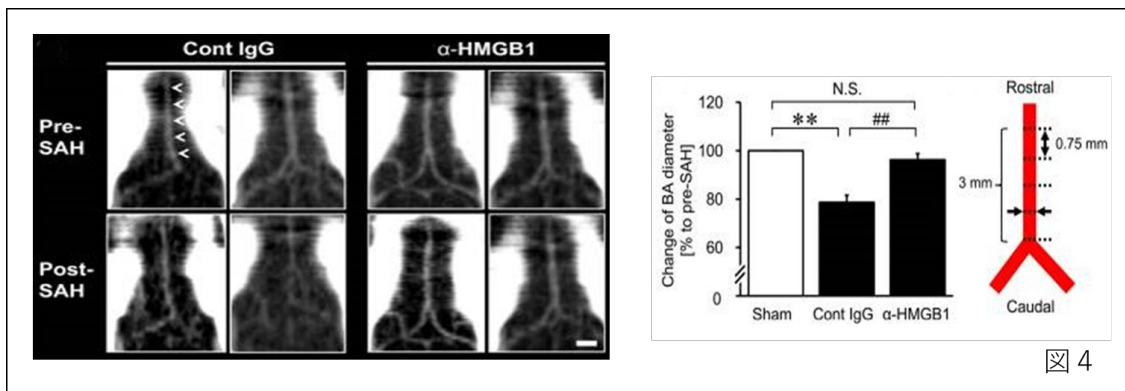


図 4

遅発血管攣縮に対する抗 HMGB 1 単クローン抗体の有効治療時間帯の検討で、発症後 3 時間まで治療が有効であることがわかった。以上の結果より、抗 HMGB1 単クローン抗体投与は、HMGB1 の放出を抑制するとともに抗炎症作用を発揮し、その結果、BBB の構造と機能維持に働き、脳内炎症及び遅発血管収縮を抑制することによって出血性脳卒中の進行を止められた。抗 HMGB1 抗体治療法は脳卒中の中の三つのタイプの急性期の優れた治療法となる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

Hatayama K, Nosaka N, Yamada M, Yashiro M, Fujii Y, Tsukahara H, Liu K, Nishibori M, Matsukawa A, Morishima T.

Combined effect of anti-high-mobility group box-1 monoclonal antibody and peramivir against influenza A virus-induced pneumonia in mice.

J Med Virol., 91(3):361-9, 2019.

doi: 10.1002/jmv.25330 査読有

Hisaoka-Nakashima K, Tomimura Y, Yoshii T, Ohata K, Takada N, Zhang FF, Nakamura Y, Liu K, Wake H, Nishibori M, Nakata Y, Morioka N.

High-mobility group box 1-mediated microglial activation induces anxiodepressive-like behaviors in mice with neuropathic pain.

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry., 92: 347-62, 2019.

doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.02.005. 査読有

Matsuura W, Harada S, Liu K, Nishibori M, Tokuyama S.

Evidence of a role for spinal HMGB1 in ischemic stress-induced mechanical allodynia in mice.

Brain Res., 1687:1-10, 2018

doi: 10.1016/j.brainres.2018.02.026 査読有

Watanabe H, Watanabe KS, Liu K, Hiramatsu S, Zeggar S, Katsuyama E, Tatebe N, Akahoshi A, Takenaka F, Hanada T, Akehi M, Sasaki T, Sada KE, Matsuura E, Nishibori M, Wada J.

Anti-high mobility group box 1 antibody ameliorates albuminuria in MRL/lpr lupus-prone mice.

Mol Ther Methods Clin Dev., 6:31-9, 2017

doi: 10.1016/j.omtm 査読有

Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S.

Advanced glycation end products attenuate the function of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis to regulate the inflammatory response.

Mol Cell Biochem., 434 (1-2) :153-62, 2017

doi: 10.1007/s11010-017-3045-6 査読有

Fu L, Liu K, Wake H, Teshigawara, K, Yoshino T, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M. Therapeutic effects of anti-HMGB1 monoclonal antibody on pilocarpine-induced status epilepticus in mice.

Sci Rep., 7(1):1179, 2017

doi: 10.1038/s41598-017-01325-y 査読有

Wang D, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M.

Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody inhibits hemorrhage-induced brain injury and improved neurological deficits in rats.

Sci Rep., 7:46243, 2017

doi: 10.1038/srep46243 査読有

Horiuchi T, Sakata N, Narumi Y, Kimura T, Hayashi Y, Nagano K, Liu K, Nishibori M, Tsukita S, Yamada T, Katagiri H, Shirakawa R, Horiuchi H.

Metformin directly binds the alarmin HMGB1 and inhibits its proinflammatory activity.

J Biol Chem., 292(20): 8436-46, 2017

doi: 10.1074/jbc.M116.769380 査読有

Zhao J, Wang Y, Xu C, Liu K, Wang Y, Chen L, Wu X, Gao F, Guo Y, Zhu J, Wang S, Nishibori M, Chen Z.

Therapeutic potential of an anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody in epilepsy. Brain Behav Immun., 64:308-19, 2017

doi: 10.1016/j.bbi.2017.02.002 査読有

Haruma J, Teshigawara K, Hishikawa T, Wang D, Liu K, Wake H, Mori S, Takahashi HK, Sugi K, Date I, Nishibori M.

Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody attenuates delayed cerebral

vasospasm and brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats.
Sci Rep., 6: 37755, 2016.
doi: 10.1038/srep37755 査読有
Nishida T, Tsubota M, Kawaishi Y, Yamanishi H, Kamitani N, Sekiguchi F, Ishikura H,
Liu K, Nishibori M, Kawabata A.
Involvement of high mobility group box 1 in the development and maintenance of
chemotherapy-induced peripheral neuropathy in rats.
Toxicology. 365:48-58, 2016.
doi: 10.1016/j.tox.2016.07.016 査読有
Okuma Y, Liu K, Hishikawa T, Hirotsune N, Sugiu K, Nishino S, Nishibori M, Date I.
Transient middle cerebral artery occlusion model in the macaca fuscata using a novel
intravascular technique.
Journal of Neuroendovascular Therapy. 10:121-6, 2016.
doi:10.5797/jnet.oa.2016-0044 査読有
Harada S, Matsuura W, Liu K, Nishibori M, Tokuyama S.
Possible involvement of the HMGB1/RAGE signaling mechanism in the induction of
central post-stroke pain induced by acute global cerebral ischemia.
Brain Res., 1646:433-40, 2016
doi: 10.1016/j.brainres.2016.06.028 査読有
Zhang J, Klufas D, Manalo K, Adjepong K, Davidson JO, Wassink G, Bennet L, Gunn AJ,
Stopa EG, Liu K, Nishibori M, Stonestreet BS.
HMGB1 translocation after ischemia in the ovine fetal brain.
J Neuropathol Exp Neurol. Jun;75(6):527-38, 2016
doi: 10.1093/jnen/nlw030 査読有

〔学会発表〕(計8件)

- (1) Okuma Y, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Mori S, Takahashi HK, Hirotsune N, Nishino S, Nishibori M.
Anti-high mobility group box-1 antibody therapy might prevent cognitive dysfunction after traumatic brain injury. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018
- (2) Nishibori M, Fu L, Wake H, Wang D, Teshigawara K, Liu K, Takahashi HK, Mori S.
Therapeutic effects of anti-HMGB1 monoclonal antibody on pilocarpine-induced status epilepticus in mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018
- (3) Wang D, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M.
Anti-HMGB1 mAb therapy for intracerebral hemorrhage-induced brain injury in rats. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018
- (4) Nishibori M, Gao S, Gao Y, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Mori S.
HMGB1 translocation induced by histamine in vascular endothelial cells in vitro. World Histamine Symposium 2018
- (5) Haruma J, Hishikawa T, Teshigawara K, Liu K, Wang D, Nishihiro S, Takahashi Y, Hiramatsu M, Matsuda Y, Oka T, Arisawa T, Sugiu K, Nishibori M, Date I
Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody attenuates delayed cerebral vasospasm and brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. Vasospasm 2017
- (6) 坂田菜摘、堀内崇弘、鳴海善洋、木村朋寛、林隆史、長野圭介、劉克約、西堀正洋、突田壮平、山田哲也、片桐秀樹、白川龍太郎、堀内久徳
メトホルミンは HMGB1 に直接結合しその炎症促進作用を抑制する
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017
- (7) 西堀正洋、富麗、劉克約、和氣秀徳、高橋英夫、森秀治
抗 HMGB1 抗体はマウスのピロカルピン誘発痙攣における BBB 破綻と脳内炎症からマウスを保護する
第 40 回日本神経科学大会, 千葉, 2017
- (8) 西堀正洋、王登莉、劉克約、和氣秀徳、勅使川原匡、森秀治
ラット脳内出血モデルにおける 2 次性炎症反応と抗 HMGB1 抗体効果
第 37 回日本炎症・再生医学会, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ <http://www.okayama-u.ac.jp/user/pharmaco/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西堀 正洋

ローマ字氏名：NISHIBORI masahiro

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

研究者番号：50135943