

令和元年5月20日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11211

研究課題名(和文) 外傷性嗅覚障害に対する抗HMGB1抗体療法確立のための基礎研究

研究課題名(英文) Anti-high mobility group box 1 antibody suppresses local inflammatory reaction and facilitates olfactory nerve recovery following injury

研究代表者

西田 幸平 (Nishida, Kohei)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：10456733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに外傷性嗅覚障害モデルマウスを用いて、嗅神経切断後の神経再生が局所炎症の程度に依存することと、炎症急性期にステロイド薬やIL-6受容体抗体、TNF- $\alpha$ 阻害薬を用いて消炎治療を施行すれば、嗅覚機能回復が良好になることを報告してきた。今回、細胞核内タンパク質であり、細胞損傷により細胞外へ放出されると炎症性メディエーターとなるHMGB1 (High mobility group box 1) をその特異的抗体で抑制すると、前者と同様に炎症反応を抑制し、嗅覚機能の回復が促進されることを確認した。よって、抗HMGB1抗体は外傷性嗅覚障害の治療薬として有用である可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実地臨床において、脊髄損傷のない頭部外傷急性期のステロイド薬投与は、頭部外傷の管理、治療ガイドライン上、感染や他の副作用への懸念を理由に推奨されておらず、また、抗IL-6受容体抗体、TNF- $\alpha$ 阻害薬は、低頻度であるものの、過剰な免疫抑制による重症感染症発症の副作用があり、より安全な薬物の探求が望まれていた。一方、抗HMGB1抗体投与による副作用はこれまでに報告がない。今回の結果は、外傷後急性期の抗HMGB1抗体投与が嗅神経切断後の嗅神経再生促進と嗅覚機能回復に有効であることを示した。よって、この安全な抗HMGB1抗体の臨床応用は外傷性嗅覚障害の予後成績向上に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Refractory olfactory dysfunction is a common finding in head trauma due to olfactory nerve injury. Anti-inflammatory treatment using steroids is known to contribute to functional recovery of the central and peripheral nervous systems in injury models, while there is a concern that steroids can induce side effects. The present study examines if the inhibition of proinflammatory cytokine, high mobility group box 1 (HMGB1), can facilitate olfactory functional recovery following injury.

Anti-HMGB1 antibody-injected mice showed significantly smaller areas of injury-associated tissue, fewer astrocytes and macrophages/microglia, and an increase in regenerating nerve fibers. Both an olfactory avoidance behavioral test and evoked potential recordings showed improved functional recovery in the anti-HMGB1 antibody-injected mice. These findings suggest that inhibition of HMGB1 could provide a new therapeutic strategy for the treatment of olfactory dysfunction following head injuries.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：嗅覚

## 1. 研究開始当初の背景

近年、嗅覚に関する基礎研究がめざましく進歩しており、この分野からはその研究成果により 2004 年には Axel 博士、Buck 博士というノーベル医学生理学賞受賞者を輩出しているほどである。この発展に伴い、耳鼻咽喉科領域においても嗅覚障害患者の数とこの診療に取り組む施設が年々増加しており、嗅覚障害に対する医療の重要性が高まっている。これまで嗅覚障害は予後が悪いというイメージを持たれてきたが、本来嗅神経は他の脳神経とは異なり、強い再生能力を備えていて、鼻副鼻腔炎が原因の炎症性嗅覚障害の改善率は 70～80%と実は高いことも報告されている(小林正佳・他:日耳鼻 108:986-995, 2005)。その一方で、嗅神経の物理的損傷が原因である外傷性嗅覚障害の予後は悪く、交通外傷が原因の嗅覚障害の改善率は 10～50%と低い(小林正佳:JOHNS 25:1343-1349, 2009)。

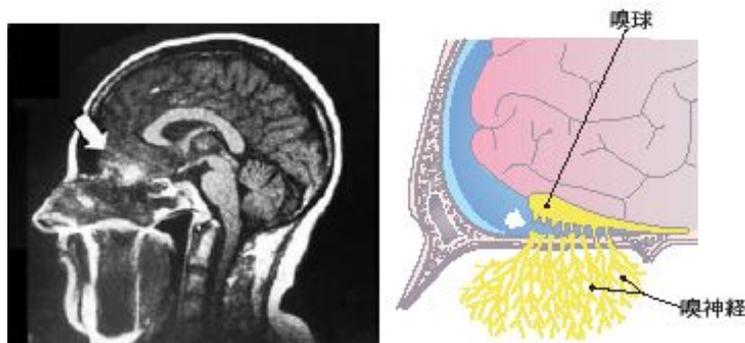


図1 頭部外傷後の嗅覚脱失例の脳 MRI 所見(左図・矢印が傷害箇所)と頭部外傷時の嗅神経切断のシエーマ(右図)

外傷性嗅覚障害の予後改善を目的として、マウスなどの実験動物の嗅神経を切断して外傷性嗅覚障害モデルを作製し、その神経再生に注目した研究報告がある。中でも、Kobayashi と Costanzo (Chem Senses 34: 573-580, 2009) は、嗅神経切断後の神経再生が局所傷害の重症度と炎症の強度に依存すること、またこの局所炎症に対して傷害急性期にステロイド薬投与による消炎治療を施行すれば、マクロファージなどの炎症細胞浸潤とグリア瘢痕形成を抑制し、嗅神経再生が促進されることを明らかにしている。しかし、実際の臨床応用を想定した場合、現在救急医療の現場では、脊髄損傷例は別として、頭部外傷の管理、治療ガイドラインに、ステロイド薬の使用は推奨されておらず、むしろステロイド薬による感染や他の副作用を懸念する意見が多いので、ステロイド薬による外傷性嗅覚障害治療は困難と考えられる。

近年、外傷性の脳損傷時に組織内にあらわれて脳浮腫を促進し、脳神経組織の障害を促進する物質として high molecule group box-1 (HMGB1) が注目されている。HMGB1 は DNA 結合タンパクで、頭部外傷のほか敗血性ショック、急性肺障害、出血性ショックによる多臓器不全症などの重症病態下において、壊死細胞の核内から放出され、また活性化されたマクロファージや血小板からも分泌されて、Receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) を介して病床局所や血中に出現して炎症を増悪させることが知られている(Okuma et al. Ann Neurol 72: 373-384, 2012)。最近、脳浮腫、脊髄損傷モデル動物を用いた実験で、この HMGB1 の中和抗体投与により、脳、脊髄の浮腫が抑制され、脳組織障害の抑制、脊髄再生が促進されたという報告がある(Kikuchi et al. Exp Therapeutic Med 2: 767-770, 2011)。

現時点でHMGB1抑制による嗅神経系の再生を研究した報告はまったくない。しかし、上記の研究背景を考慮すると、外傷性嗅覚障害の治療に抗HMGB1抗体を導入すれば、局所炎症が抑制され、外傷性嗅覚障害例の嗅覚改善率と予後の向上が理論的に可能であると期待できる。

## 2. 研究の目的

今回の研究は、外傷性嗅覚障害モデル動物を用いて、嗅神経切断後の嗅神経再生促進に抗HMGB1抗体が有効であるかどうかを明らかにする。具体的には、まず嗅神経切断マウスの嗅球でHMGB1が細胞外組織に局在しているかを分子生物学的手法で確認し、次に抗HMGB1抗体が嗅神経切断後の局所炎症を抑制して再生嗅神経が嗅球の糸球体を再支配するのを促進するかどうかを、コントロールと比較して組織学的に調べた。また、嗅球を再支配した嗅神経系が機能的回復を成しているかどうかについても、まず電気生理学的手法を用いて神経伝導の回復を確認し、さらに実験動物に対するにおいの嫌悪学習手段を用いた行動学的実験を行い、実際に嗅神経切断後に低下した嗅覚機能が、高い改善率で機能回復するかどうかも確認した。

## 3. 研究の方法

まず最初に、嗅神経再生の組織学的検討を施行した。

実験動物として、組織学的に嗅神経を容易に視覚的に確認可能な遺伝子組み換えマウスであるOMP-tau-lacZマウスを用いた。マウスにペントバルビタールを腹腔内注射して全身麻酔し、固定器で固定した。前頭開頭を行い、嗅球と篩板を露出させて、ステンレスカッターを一側の篩板と嗅球との間に挿入して嗅神経を切断した(図2)。対側はコントロールとして神経切断を行わずにおいておいた。止血後、閉頭し、動物を覚醒させた。

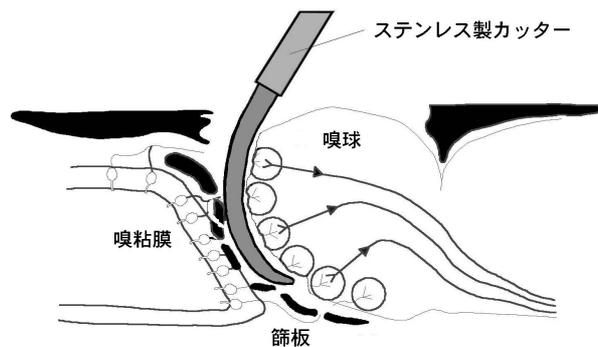


図2 嗅神経切断実験のシエーマ

手術直後に、抗HMGB1抗体を腹腔内注射した。低用量、高用量の2種類の投与群とコントロールとして生食投与群の3群を設けた。

術後5日目、14日目、42日目、100日目に、それぞれマウスをパラホルムアルデヒドで還流固定し、頭部骨をEDTAで脱灰後、組織切片を作成し、各種染色を行い、CCDカメラでデジタル画像化し、嗅神経の再生、グリア瘢痕形成、炎症マーカーとしてマクロファージの局所浸潤などの程度を定量化して測定した。なお、嗅神経の確認にはX-Gal染色にて嗅神経と嗅球の糸球体を可視化した。グリア瘢痕と組織全体の確認にはニュートラルレッド染色を用いた。またグリア瘢痕内の

活性化星状膠細胞の確認には抗GFAP抗体を用いた免疫染色を行った。マクロファージの確認にはマクロファージ特異的な抗CD68抗体で免疫染色を行い、確認した。

次に、行動学的実験による嗅覚検査で嗅覚機能の回復について検証を施行した。まず、マウスに0.01%ナラマイシン(シクロヘキサミド)水溶液を用いて味覚を利用したにおい条件付けの嫌悪学習を行った。嫌悪学習に成功したマウスに対して、嗅神経切断とその後の抗HMGB1抗体投与を行い、経日的にナラマイシンに対する忌避行動の程度を確認し、嗅覚機能の回復の有無を確認した。

最後に、抗HMGB1抗体による嗅神経再生促進を電気生理学的に検証した。全身麻酔下で嗅神経切断手術と抗HMGB1抗体投与をOMP-tau-lacZマウスに施行し、術後100日目に同様にマウスに麻酔し、固定器に固定し、再開頭した。鼻骨も一部削開し、鼻腔を露出させ、鼻腔の嗅粘膜に刺激電極を当て、嗅球内に記録電極を挿入し、神経の電場電位(Field potential)記録を行い、神経伝導の回復の有無を確認した。

#### 4 . 研究成果

抗HMGB1抗体は嗅神経切断後の局所でマクロファージの浸潤とグリア瘢痕形成を投与量依存性に抑制した。そして、その抑制に比例して、嗅神経再生が促進されたのを組織学的に確認した。

行動学的実験では、生食投与のコントロール群は嗅覚機能回復が不十分であったのに対して、エタネルセプト投与群は有意に嗅覚機能の回復が認められた。

電気生理学的実験では、生食投与のコントロール群は神経伝導の回復が不十分であったのに対して、抗HMGB1抗体投与群は有意に神経伝導の回復が認められた

以上から、HMGB1阻害により、嗅覚は神経の形態的再生だけではなく、機能的再生も促進されることを明らかにした。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kobayashi M, Tamari K, Al Salihi MO, Nishida K, Takeuchi K. Anti-high mobility group box 1 antibody suppresses local inflammatory reaction and facilitates olfactory nerve recovery following injury. J Neuroinflammation, 査読有, 15: 124, 2018.

〔学会発表〕(計 7 件)

小林正佳, 玉利健悟, Mohammed Omar Al Salihi, 西田幸平, 竹内万彦. 抗 HMGB1 抗体を用いた局所炎症制御による外傷性嗅覚障害後の嗅覚機能回復促進. 第 36 回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会(一般演題). 2018年8月25日. 大阪市.

Kobayashi M. New strategy for treatment of traumatic olfactory dysfunction. 27th Congress of the European Rhinologic Society (ERS) / 37th International Society of Inflammation and Allergy of the Nose (ISIAN) / 19th International Rhinology Society Meeting 2018 (招待講演). 2018年4月26日. London, UK

Kobayashi M, Tamari K, Al Salihi MO, Nishida K, Takeuchi K. Anti-high mobility group box 1 antibody suppresses local inflammatory reaction and ameliorates olfactory nerve recovery following injury. 40th Association for Chemoreception Sciences (AChemS) (一般演題). 2018年4月19日. Bonita Springs, Florida, USA.

小林正佳, 玉利健悟, Mohammed Omar Al Salihi, 西田幸平, 竹内万彦. 抗 HMGB1 抗体を用いた外傷性嗅覚障害の治療戦略. 第 171 回日本耳鼻咽喉科学会東海地方部会連合講演会(一般演題). 2017 年 12 月 17 日. 岐阜市.

小林正佳, 玉利健悟, Mohammed Omar Al Salihi, 西田幸平, 竹内万彦. 抗 HMGB1 抗体による外傷性嗅覚障害マウスの嗅覚回復促進. 第 56 回日本鼻科学会(一般演題). 2017 年 9 月 29 日. 甲府市.

小林正佳, 玉利健悟, 西田幸平, 竹内万彦. 抗 HMGB1 抗体を用いた局所炎症制御による外傷性嗅覚障害後の嗅覚機能回復. 日本味と匂学会第 51 回大会(一般演題). 2017 年 9 月 25 日. 神戸市.

小林正佳. 神経性嗅覚障害の治療法開発. 第 118 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(招待講演). 2017 年 5 月 18 日. 広島市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：小林 正佳

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, Masayoshi)

所属研究機関名：三重大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 80343218

研究分担者氏名：玉利 健悟

ローマ字氏名：(TAMARI, Kengo)

所属研究機関名：三重大学

部局名：教養教育院

職名：特任講師（教育担当）

研究者番号（8桁）：90585176

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。