

平成 21 年 4 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590534

研究課題名（和文） 病巣指向性の複合型抗体による脳梗塞の治療法開発

研究課題名（英文） Development of antibody therapy for brain infarction

研究代表者

劉 克約 (RYU KATSUYAKU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40432637

研究成果の概要：

わが国では、脳血管障害は死因上位を占め、有効な治療法開発が望まれて久しい現状である。申請者らは、起炎性の新規活性物質 HMGB1 に注目し、特異的抗 HMGB1 単クローン抗体の治療法を開発した。ラット中大脳動脈 2 時間閉塞再灌流の脳梗塞モデルを用いて、単クローン抗体の治療効果及びメカニズムを検討した。その結果、抗 HMGB1 単クローン抗体の末梢投与は脳梗塞巣を縮小し、運動麻痺症状を改善し、脳浮腫の進行を止めることが示唆された。虚血側の特定の視床下部領域、特にストレス応答に関連する脳部位で、HMGB1 が発現誘導されていることが分かった。これらの知見は、虚血再灌流の脳障害に対する、抗 HMGB1 単クローン抗体の有効性を強く示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：脳梗塞、抗体治療、ミクログリア、血液脳関門

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、その内約 60 %は脳梗塞によるものである。一旦脳梗塞を発症すると壊死した脳組織

の機能が損なわれるため、たとえ生命を取り留めた場合でも運動麻痺、感覚障害、言語障害あるいは認知障害など重大な後遺症を残す場合が多い。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、脳梗塞の急性期治療薬として、組換え体 t-PA やラジカルスカベンジャーのエダラボンが臨床応用されているが、有効治療時間帯の制限や虚血再灌流障害あるいは副作用等の問題があり、真に有効な治療法開発が望まれて久しい。

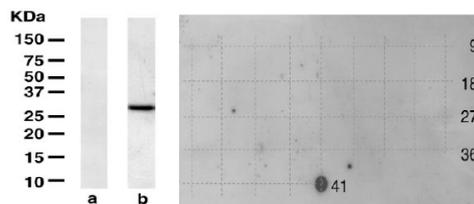
2. 研究の目的

申請者らは、脳梗塞巣が起炎性応答の関与によって、初期の限局性コアから相対的虚血部に向かって拡大形成されることに注目し、この梗塞巣拡大過程を標的とする創薬を開始した。まず、起炎性の新規活性物質 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 時間閉塞再灌流モデルにおいて病巣指向性があり、それ自身で梗塞抑制に極めて有効に働く抗 HMGB1 単クローン抗体を見出した。

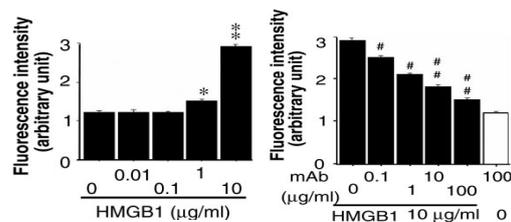
3. 研究の方法

ウィスター系雄性ラットを用いて、吸入麻酔下にシリコンコーティングした 4.0 ナイロン糸の塞栓子を内頸動脈に挿入し、中大脳動脈起始部を 2 時間閉塞した後、再灌流した。再灌流直後、6 時間後に抗 HMGB1 抗体または対照抗体を投与し (200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{iv}$) 治療効果を比較検討した。

(1) 1 種類の単クローン抗体の特性の検討
抗 HMGB1 単クローン抗体 (#10-22) は、HMGB1 抗原ペプチッド配列の 41 のところに結合していることが分かった。



HMGB1 はヒトの単球を刺激して ICAM-1 の発現を増加させた。単クローン抗体を添加すると、抗体濃度依存性に増加を抑制した。



(2) 脳梗塞巣体積及び運動機能の評価

① 虚血再還流後 24 時間あるいは 48 時間に脳を取り出す。視交差と乳頭体尾端との間で脳を 2 mm の厚さにスライスし、TTC 染色をし、脳梗塞巣の体積を測った。

② 運動機能はロタロッドテストにより評価を行った。回転のスピードにより運動機能を 3 段階に分けた。手術の 3 日前、動物に学習をさせて、再還流後 6 時間、12 時間、24 時間各時間でテストを行い、同時に点数をつけて片麻痺症状を評価した。

(3) HE 染色及び HMGB1 の免疫染色による組織学的評価

(4) 血管透過性、MMP 活性、ミクログリア活性化の変化

虚血再還流 3 時間後、血管透過性をエバンズブルー漏出を指標として抗 HMGB1 単クローン抗体の効果を評価した。Gelatin zymography 法により、虚血側と非虚血側のマトリックス分解酵素 (MMP-9, MMP-2) を検出した。

(5) サイトカイン誘導の情報

虚血再還流 6 時間後、大脳皮質と線条体について非虚血側、ペナンプラ、梗塞巣から一定面積を打ち抜きによりサンプリングした。総 RNA を抽出し、Real-time PCR で、

7種類の炎症因子の発現量を β -actinを対照として定量化した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞病巣の体積の縮小

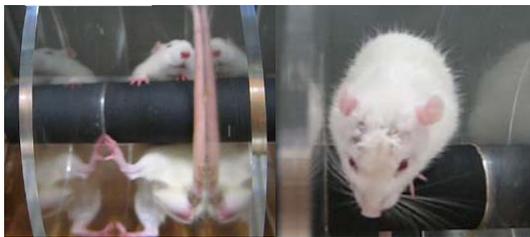
TTC染色で脳梗塞病巣の体積が対照群と比較した。抗HMGB1抗体の投与によって再灌流24時間後90%、48時間後70%の抑制を示した。



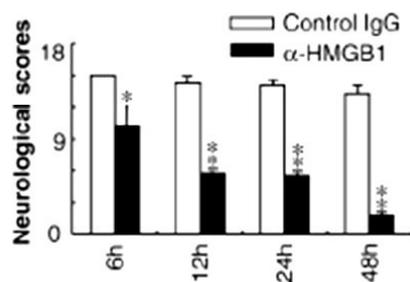
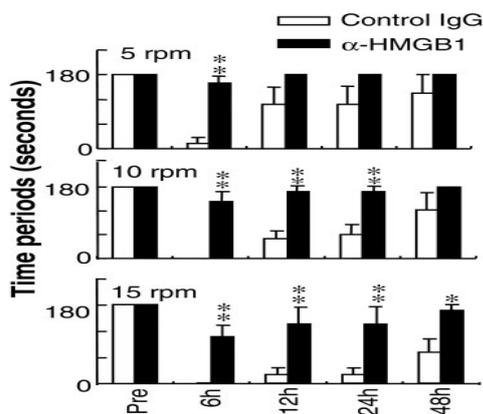
Control IgG treatment α -HMGB1 treatment

(2) 運動機能と片麻痺症状の回復効果

抗HMGB1抗体投与群は、運動機能及び片麻痺の改善が認められた。

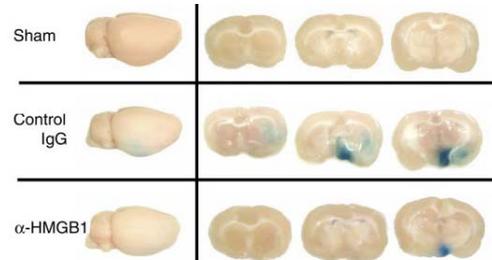


ロタロッド運動機能テスト

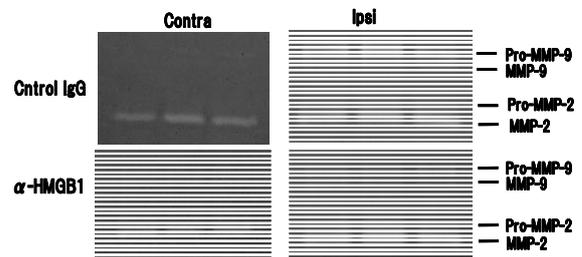


(3) 血管透過性、MMP活性、ミクログリア活性の抑制

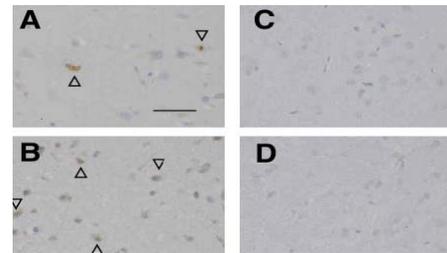
抗HMGB1抗体投与により、血管透過性の亢進及びMMP-9の活性を著しく抑制した。



Evans blue の漏出



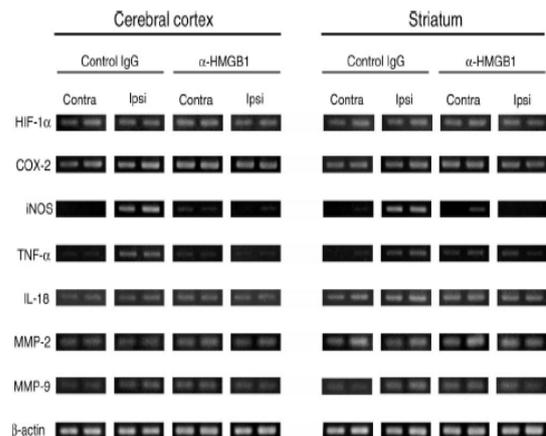
マトリックス分解酵素MMPの活性



ミクログリアの活性化

(4) サイトカイン誘導の抑制

抗HMGB1抗体投与群は、炎症性サイトカインTNF- α 及びiNOSの誘導を抑制したことを確認できた。



脳虚血後の神経細胞障害から細胞死に至る過程には、細胞内カルシウム濃度の上昇、興奮性神経伝達物質の放出、アシドーシス、フリーラジカル等、様々な因子が報告されている。我々の結果により、虚血性脳細胞機能障害の進行に対して、HMGB1 が深く関与していることを確認できた。壊死した細胞核から放出された HMGB1 は、単球、好中球を活性化して、炎症を引き起こす。炎症反応によって、血管内皮細胞の障害から、血液—脳関門の透過性の増加、脳浮腫の発生と促進にいたる一連の生体反応において、HMGB1 は、重大な働きをする。抗 HMGB1 抗体の中和作用で、ミクログリア、MMPs, TNF- α , iNOS 等炎症因子の活性化を抑制することにより、早期の虚血障害の進行が抑えられたことを示唆した。

本研究は、脳梗塞病態形成において極めて重要な働きをする標的分子を見出したことを意味しており、抗 HMGB1 単クローン抗体自身が非常に優れた抗体医薬となり得る可能性を強く示唆している。

本研究は、新規性の高い有効な脳梗塞治療法として特許第 3876325 号という成果を取得し、脳梗塞に対する抗 HMGB1 単クローン抗体の治療効果については FASEB Journal に『Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats.』として報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Alleviation of ischemia-induced brain edema by activation of the central histaminergic system in rats. Irisawa Y, Adachi N, Liu K, Arai T, Nagaro T. J Pharmacol Sci. Sep;108(1) 112-23(2008) 査

読有

2. Suppression of ischaemia-induced cytokine release by dimaprit and amelioration of liver injury in rats. Motoki A, Adachi N, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M, Yorozuya T, Arai T, Nagaro T. Basic Clin Pharmacol Toxicol. Apr;102(4) 394-8(2008) 査読有

3. Effects of HMGB1 on ischemia reperfusion injury in the rat heart. Oozawa S, Mori S, Kanke T, Takahashi H, Liu K, Tomono Y, Asanuma M, Miyazaki I, Nishibori M, Sano S. Circ J. Jul; 72(7) 1178-84(2008) 査読有

4. Stimulation of adenosine A2A receptor inhibits LPS-induced expression of intercellular adhesion molecule 1 and production of TNF-alpha in human peripheral blood mononuclear cells. Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, Kanke T, Liu K, Yoshino T, Sendo T, Nishibori M, Tanaka N. Shock. Feb;29(2) 154-9(2008) 査読有

5. Inducible histamine protects mice from hepatitis through H2-receptor stimulation. Mori S, Takahashi HK, Nishibori M. Yakugaku Zasshi. Feb; 128(2) 247-53(2008) 査読有

6. 劉克約、森 秀治、高橋 英夫、西堀 正洋、ラット中脳動脈閉塞・再灌流モデルにおける抗 HMGB1 単クローン抗体の治療効果、岡山医学会雑誌 第 120 巻第 3 号 271-277 頁 2008 年 査読有

7. Recovery of brain dopamine metabolism by branched-chain amino acids in rats with acute hepatic failure. Deshpande G, Adachi N, Liu K, Motoki A, Mitsuyo T, Nagaro T, Arai T. J Neurosurg Anesthesiol. Oct;19(4) 243-8 (2007) 査読有

8. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M. FASEB J. Dec; 21(14)3904-16(2007) 査読有

9. Action profiles of statins and calcineurin inhibitors during human mixed lymphocyte reaction. Takahashi HK, Iwagaki H, Yagi T, Kanke T, Liu K, Yoshino T, Tanaka N, Nishibori M. Clin Immunol. Jun;123(3) 324-32(2007) 査読有

10. The immunosuppressive effects of nicotine during human mixed lymphocyte reaction. Takahashi HK, Iwagaki H, Hamano R, Kanke T, Liu K, Sadamori H, Yagi T, Yoshino T, Tanaka N, Nishibori M. Eur J Pharmacol. Mar 15;559(1) 69-74(2007) 査読有

11. Effect of amodiaquine, a histamine N-methyltransferase inhibitor, on, Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide-induced hepatitis in mice. Yokoyama A, Mori S, Takahashi HK, Kanke T, Wake H, Nishibori M

Eur J Pharmacol. Mar 8;558(1-3) 179-84(2007) 査読有

12. Effect of adenosine receptor subtypes stimulation on mixed lymphocyte reaction. Takahashi HK, Iwagaki H, Hamano R, Kanke T, Liu K, Sadamori H, Yagi T, Yoshino T, Sendo T, Tanaka N, Nishibori M. Eur J Pharmacol. Jun 14;564(1-3) 204-10(2007) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 劉克約 (他)
ラット中脳動脈閉塞・再灌流モデルにおける BBB と抗 HMGB1 抗体の効果
第 81 日本薬理学会
2009 年 3 月 18 日 パシフィコ横浜

2. 劉克約 (他)
ラット中脳動脈閉塞・再灌流モデルにおける BBB 破綻と抗 HMGB1 単クローン抗体の治療効果
第 113 回日本薬理学会近畿部会
2008 年 6 月 20 日 岡山

3. 劉克約 (他)
ラット中脳動脈閉塞・再灌流モデルにおける抗 HMGB1 単クローン抗体の治療効果
第 80 回薬理学会
2008 年 3 月 17 日 パシフィコ横浜

4. 西堀 正洋 (他)
A novel anti-inflammatory transient of acute brain infarction by anti-HMGB1 monoclonal antibody.
Neuroscience Meeting
2007 年 11 月 8 日 アメリカ サンディエゴ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

劉 克約 (RYU KATSUYAKU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40432637

(2) 研究分担者

西堀 正洋 (NISHIBORI MASAHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50135943

(3) 連携研究者

なし