

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659687

研究課題名（和文） 脳外傷急性期の治療法開発

研究課題名（英文） Development of therapy for acute traumatic brain injury

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

High mobility group box-1 (HMGB1) は、組織障害に由来する炎症惹起物質として、今大きな注目を集めている。研究者は、これまで取り組んできた脳虚血や脳血管攣縮に対する抗 HMGB1 抗体の治療効果に大きなヒントを得て、現在治療法のない交通事故や転落事故後の脳外傷に対する抗体治療の応用について検討した。

その結果、ラットの脳外傷後に局所の神経細胞の核から細胞外へと HMGB1 が放出されること、HMGB1 の活性を抗 HMGB1 抗体の投与で中和すると、血管-脳関門の破綻が抑制され、脳浮腫が著明に抑制できることを実験的に証明した。抗 HMGB1 抗体による脳外傷治療は有望である。

研究成果の概要（英文）：

High mobility group box-1 (HMGB1) has been paid much attention as an important damage-associated molecular pattern. I established anti-HMGB1 antibody therapy for ischemic brain injury and brain vasospasm. In the present study, I examined whether anti-HMGB1 antibody therapy may exert beneficial effects on traumatic brain injury in rats. The results showed that HMGB1 in neurons at injured site was translocated and released into extracellular space. The administration of anti-HMGB1 antibody inhibited the disruption of blood-brain barrier and resulting brain edema. Anti-HMGB1 antibody therapy will be beneficial for the treatment of traumatic brain injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳外傷・血液-脳関門・HMGB1・脳浮腫・抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

脳外傷は、各種事故を最大の原因とし、脳外科臨床あるいは救急医療において頻繁に遭遇する疾患病態である。しかし、脳外傷によって生じる脳浮腫と随伴する神経障害に対しエビデンスのある有効な治療法は、現在存在しない。申請者は、これまで脳虚血とその後には発生する脳梗塞の研究に従事し、ラッ

トモデルで脳虚血急性期には、脳神経細胞から Damage-associated Molecular Patterns の一つである新規サイトカイン HMGB1 が細胞外に放出され、血液-脳関門 (BBB) の破綻を惹起することを見出している。この時、自家作製した中和活性を有する抗 HMGB1 単クローン抗体を治療薬として投与すると、脳梗塞巣のサイズを著明に縮小し、運動麻痺の神

経症状を劇的に改善することを報告した (Liu et al, FASEB J, 2007)。これらの知見は、脳虚血時に神経細胞から放出される HMGB1 が、BBB 破綻を介し脳内炎症を促進していることを強く示唆している。さらに、ウサギのクモ膜下出血後脳血管攣縮モデルで、抗 HMGB1 抗体治療が血管攣縮を著明に防止できることを示した。これらの脳血管疾患に対する治療法の開発は、特許としても成立させた (特許第 3876325 号, PCT/JP2006/ 320346, WO2007/049468, 脳梗塞抑制剤, 西堀正洋他; 特許第 3882090 号, PCT/JP2006/320346, WO 2007/049468, 脳血管攣縮抑制剤, 西堀正洋他)。その後、アテローム動脈硬化症炎症巣における HMGB1 の単球浸潤と血管内皮細胞活性化に果たす役割と、抗 HMGB1 抗体の治療効果を合わせて示した (Kanellakis et al, ATVB, in press; 特願 2009-223472)。これらの特許群は (独) 科学技術振興機構より高い評価を受け、戦略的支援の対象として認定 (G010-0040) された。さらに、(社) 発明協会からは、脳梗塞の新規抗体治療法の発明に対し、平成 21 年度 21 世紀発明奨励賞が与えられた。このように、炎症反応制御のための適切な標的分子の発見と、動物モデルでの抗体薬の薬効評価という申請者らの手法は、極めて有効に働いてきた。

脳虚血時と脳外傷時に生じる BBB の変化は、電子顕微鏡観察による形態観察レベルできわめて類似していることがわかってきた。そこで、申請者はラットの液体パーカッション脳外傷モデルを使ってパイロット的に神経細胞 HMGB1 の動態を観察したところ、脳虚血時と酷似するトランスロケーションパターンを得た。

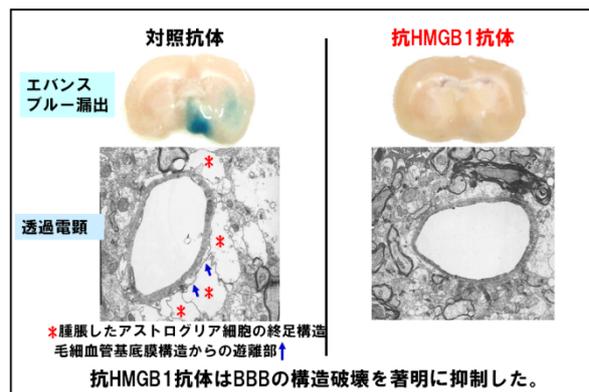
2. 研究の目的

脳外傷は、各種事故を最大の原因とし、救急医療あるいは脳外科臨床において頻繁に遭遇する疾患病態である。しかし、脳外傷によって生じる脳浮腫と随伴する神経障害に対しエビデンスのある有効な治療法は、現在存在しない。申請者は、脳虚血時の血液-脳関門 (BBB) の構造破壊 (アストログリア細胞の終足腫脹と、基底膜からの解離) と脳外傷後のそれとが形態的にきわめて類似していることに着目した。すでに脳虚血急性期には、脳神経細胞から Damage-associated Molecular Patterns の一つである新規サイトカイン HMGB1 が細胞外に放出され、BBB の破綻を惹起することを見出している。本研究では、1) 脳外傷時に HMGB1 が同様の動態を示すかどうか、2) 血清 HMGB1 がヒト脳外傷のマーカーとして有効かどうか、3) 抗 HMGB1

抗体が脳外傷治療に有効かどうかを検討する。

3. 研究の方法

ラットの液体パーカッション脳外傷モデルを用いて、脳外傷における HMGB1 動態と抗 HMGB1 単クローン抗体の治療効果を評価する。個々のラットに対する衝撃の強さは、個体ごとにモニター後、無作為割付し、さらに対照群と抗体治療群は評価者がブラインド評価となるよう計画する。まず、受傷局所とその周辺領域における神経性 HMGB1 の動態を共焦点レーザー顕微鏡観察で明らかにする。脳血管透過性の評価はアルブミン漏出定量で実施する。脳挫傷に伴う神経症状の評価は、ロータロッド法、シリンダー法、スコアリング法を併用して行なう。BBB の構造変化は、透過型電子顕微鏡観察で評価する。その他、局所の神経細胞死数、ミクログリア、アストログリアの活性化をそれぞれマーカーを用いて定量化する。ラットモデルおよび脳外傷患者血中に逸脱する HMGB1 を定量し、脳傷害の程度と血中レベルの上昇の相関関係を解析する。



上の写真に示したのは、脳虚血時の BBB 透過性亢進とその時の毛細血管微細構造変化の電子顕微鏡像である。この BBB 構造変化が遊離された HMGB1 によってもたらされることを、in vitro BBB システムを利用することで、証明した。抗 HMGB1 抗体の投与によって、BBB の構造変化と透過性亢進が、著明に抑制された (Liu et al, FASEB J, 2007) (写真右)。本研究における脳外傷モデルでも同様の BBB 構造破綻が生じることが強く予想される。

(1) Wistar 系雄性ラットを用いて、パーカッションインジュリー装置で麻酔下に脳打撃傷害を作製する。衝撃の強さは、圧トランスデューサーでモニタリングする。急性期中等度の麻痺症状を呈する条件を決定する。受傷直後とさらに 6 時間後に抗 HMGB1 抗体を投与する。対照動物には、抗 Keyhole limpet hemocyanin 抗体を投与する。投与用量は、

脳梗塞で著効を示した 200 μ g/rat (約 800 μ g/kg) を標準用量としてスタートし、さらにその 2/3 あるいは 1/3 量でも試みる。実験のデザインとして、モデル作製 (大学院生、大熊佑)、抗体投与 (劉克約助教) と神経症状評価 (実験補助者) をそれぞれ別の人が担当するようブラインド化し、先入観が入らない設計とする。

(2) 神経学的評価は、受傷後経時的に麻痺症状シリンダー法およびロータロッド法で運動麻痺症状を定量する。

(3) 受傷後、脳標本を組織学的検討用 (大熊佑院生担当) に作成する。受傷後の時間として、6、12、24 および 72 時間後の変化を経時的に検討する。ペントバルビタールナトリウムによる深麻酔科下に、経心臓的にホルマリン灌流で脳を固定し、パラフィン包埋切片を作製する。脳の薄切切片をヘマトキシリン・エオジン染色あるいは、HMGB1, GFAP, MAP2, Iba1 などの多重染色を施す。抗体効果は、神経細胞数、壊死領域の面積、海馬の遅発性細胞死、グリオシス、ミクログリア細胞活性化等を指標として評価する。

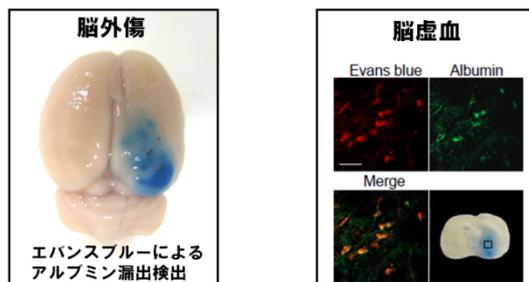
(4) 受傷後、エバンスブルーを経静脈投与し、脳血管透過性を測定する (下写真)。静注後 3 時間後に、深麻酔下に心臓より生理食塩水を灌流し、血中色素を除去する。虚血側と非虚血側に脳を分離し、脳組織を処理する。脳ホモジネートからエバンスブルーを酸抽出し、定量する。脳湿重量当りの色素量を算出し、抗体による治療効果を評価する。

(5) 脳外傷後の HMGB1 動態の全容を明らかにする。電子顕微鏡標本を作製し、外傷後の BBB 形態変化をアストロサイトのエンドフィート腫脹、基底膜からの遊離、内皮細胞タイトジャンクションの解離に注目し評価する。抗体効果を BBB の形態維持の観点で評価する。

(6) 脳外傷モデルラットから経時的に採血し、血漿中 HMGB1 を Elisa を用いて測定する。脳傷害に用いる衝撃の強度と血漿中 HMGB1 の上昇の程度について相関の有無を解析する。

(7) 下の写真に示すように、脳虚血により血管透過性が亢進した脳部位では、脳実質内に漏出したアルブミンをエバンスブルーの蛍光によって観察することができることに申請者は気付いた。実際、その蛍光がアルブミンに移動を示していることは、抗アルブミン特異抗体による二重染色で確認した (下マージ写真)。非常に驚いたことに、漏

出したアルブミンの大部分は、虚血部位の神経細胞に取り込まれていた。同様のアルブミン動態を脳外傷局所で監察し、抗体投与効果を評価する。



(8) 抗 HMGB1 の有効治療時間帯を決定するために、受傷後の治療開始時間を、直後、3 時間後、6 時間後とし、血管透過性の亢進を指標に結果を評価する。

4. 研究成果

申請者は、中大脳動脈の 2 時間閉塞・再灌流によって生じるラット脳梗塞に対し、代表的組織損傷由来警告信号分子である High Mobility Group Box-1 (HMGB1) を標的とする抗体医薬が極めて優れた効果を示すことをすでに明らかにしてきた。抗体の作用機序解析と内因性 HMGB1 の作用解析の結果、虚血障害によって神経細胞の核から放出される HMGB1 が、脳組織に特有の血液-脳関門 (BBB) 血管構造に働き、BBB の機能ならびに構造破綻につながることを実験的に証明してきた。上記の知見から、脳虚血と同様の BBB 破綻を来す可能性のある疾患病態として脳外傷時の脳浮腫を考え、本研究に取り組んだ。まず、Wister 系雄性ラットを用いて、パーカッションインジュリー装置で麻酔下に脳打撃傷害を作製した。受傷圧を 2.2-2.6 Atm とすることで、中等度の神経障害モデルを作製した。受傷部位の HMGB1 動態を観察した結果、受傷直後から神経細胞内特異的にトランスロケーションが生じていた。受傷直後とさらに 6 時間後に抗 HMGB1 抗体を尾静脈から投与した。受傷 6 時間後に脳血管透過性をエバンスブルー色素の脳内漏出で評価したところ著明な抑制が観察された。抗体の効果は 0.33 mg/kg、0.66 mg/kg、1 mg/kg と用量依存적であり、治療有効時間帯は受傷後 3 時間と推定された。ヘマトキシリン・エオジン染色で打撃局所を観察すると、対照動物では 24 時間後に細胞死に陥った神経が多数観察されたのに対し、抗 HMGB1 抗体治療群では、神経細胞死が著明に抑制されていた。以上の知見から、脳外傷後の脳浮腫はこれまで考えられてきた以上に生物学的生体反応の性質を持っており、その反応を担う因子として HMGB1 が極めて重要であることが明らかになると共に、抗 HMGB1 抗体治療が有望な治療法とな

りうることを示された。

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3件)

(1) Takahashi HK, Sadamori H, Liu K, Wake H, Mori S, Yoshino T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Nishibori M. Role of cell-cell interactions in high mobility group box 1 cytokine activity in human peripheral blood mononuclear cells and mouse splenocytes. **Eur J Pharmacol**, 査読有, 701: 194-202, 2013. (DOI:10.1002/ana.23602)

(2) Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K & Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. **Nature Med**, 査読有, 18(6), 911-917, 2012. (DOI:10.1038/nm.2749)

(3) Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Otani N, Tomura S, Shima K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M. Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. **Ann Neurol**, 査読有, 72(3):373-84, 2012. (DOI:10.1016/j.ajph.2012.11.058)

[学会発表] (計18件)

- ①大熊佑、外傷性脳傷害に対する抗 High Mobility Group Box-1 (HMGB-1) 抗体治療、第 86 回日本薬理学会年会、2013. 3. 28、横浜
- ②大島佳奈、ヒト PBMC、マウス脾臓細胞における HMGB1 活性が及ぼす細胞間相互作用の役割、第 86 回日本薬理学会年会、2013. 3. 23、福岡
- ③大熊佑、外傷性脳傷害に対する抗 HMGB1 抗体治療、第 86 回日本薬理学会年会、2013. 3. 23、福岡
- ④劉克約、ピルカルピンで誘発癲癇モデルにおける抗 HMGB1 単クローン抗体の効果、第 86 回日本薬理学会年会、2013. 3. 22、福岡
- ⑤大熊佑、血管内アプローチを用いた低侵襲サル中大脳動脈閉塞モデルの作製法、第 38 回日本脳卒中学会総会、2013. 3. 22、東京
- ⑥中村庸輝、ラット坐骨神経部分結紮によって骨髄後角で増加する High mobility group box 1 は神経因性疼痛を維持させる、第 86 回

日本薬理学会年会、2013. 3. 21、福岡
⑦大熊佑、外傷性脳傷害に対する抗 high mobility group box-1 (HMGB-1) 抗体治療、第 37 回日本脳神経外傷学会、2013. 3. 8、名古屋

⑧西堀正洋、抗 HMGB1 抗体による脳外傷の治療、第 3 回 HMGB1 シンポジウム (招待講演)、2013. 2. 28、松本

⑨大熊佑、抗 high mobility group box-1 (HMGB1) 抗体の頭部外傷モデルにおける神経保護効果の可能性、第 18 回日本脳神経外科救急学会、2013. 2. 9、弘前

⑩大熊佑、血管内アプローチを用いた低侵襲サル中大脳動脈閉塞モデルの作製法、第 28 回日本脳神経血管内治療学会学術総会、2012. 11. 16、仙台

⑪大島佳奈、HMGB1 誘導性のヒト単球の活性化に対するヒスタミンの効果、第 16 回日本ヒスタミン学会、2012. 10. 19、岡山

⑫大熊佑、Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. **Neuroscience 2012**、2012. 10. 16、New Orleans, USA

⑬大熊佑、頭部外傷モデルを用いた抗 High Mobility Group Box-1 (HMGB1) 抗体の神経保護効果の検討、第 13 回日本分子脳神経外科学会、2012. 9. 21、熊本

⑭大熊佑、抗 HMGB1 単クローン抗体によるラット頭部外傷モデルの治療、第 35 回日本神経科学大会、2012. 9. 18、名古屋

⑮西堀正洋、HMGB1 を標的とする脳血管疾患の抗体治療法開発、第 22 回脳血管シンポジウム (招待講演)、2012. 9. 8、大阪

⑯西堀正洋、抗 High Mobility Group Box-1 抗体による脳梗塞、脳外傷、脳血管攣縮治療、生体機能と創薬シンポジウム 2012 (招待講演)、2012. 8. 30、神戸

⑰西堀正洋、抗 HMGB1 抗体の臨床応用と創薬プラットフォーム構築、イノベーション研究会 (招待講演)、2012. 8. 2、大阪

⑱大熊佑、頭部外傷モデルを用いた抗 HMGB1 抗体の神経保護効果の検討、第 121 回日本薬理学会近畿部会、2012. 6. 29、徳島

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：好中球活性化調節剤

発明者：西堀正洋 外5名

権利者：岡山大学

種類：特許

番号：特願 2012-129232 号

出願年月日：2012年6月6日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：B細胞悪性リンパ腫治療薬
発明者：西堀正洋 外6名
権利者：岡山大学、医療法人創和会
種類：特許
番号：特許第5224325号
取得年月日：2013年3月22日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

劉 克約 (LIU KEYUE)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：40432637

和氣 秀徳 (WAKE HIDENORI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：60570520

(3) 研究協力者

大熊 佑 (OKUMA YU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
博士課程院生