

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590539

研究課題名 (和文) B細胞リンパ腫の新規抗体医薬の開発

研究課題名 (英文) A novel anti-HMGB1 Ab therapy for treatment of B-cell lymphoma

研究代表者

高橋 英夫 (TAKAHASHI HIDEO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60335627

研究成果の概要 (和文) : RAGE ligand である HMGB1 は、壊死組織から、もしくはある種の刺激で単球・マクロファージからサイトカインのごとく分泌され、免疫応答に関与している。B 細胞リンパ腫の濾胞は HMGB1 を強発現していた。HMGB1 は、ヒト悪性リンパ腫 B 細胞 cell line の増殖を誘導した。B 細胞リンパ腫の発生原因は、単球・マクロファージによる B 細胞の増殖と分化異常である。RAGE ligand である、HMGB1 や AGE は単球を活性化した。故に、抗 HMGB1 抗体は B 細胞リンパ腫の増殖を抑制すると考えた。

研究成果の概要 (英文) : A RAGE ligand, HMGB1, which is released from nuclei of necrotic cells and macrophages, acts as a cytokine and plays roles in immune response. HMGB1 is involved in the progression of B-cell lymphoma. The progression depends on the monocyte/macrophage activation. RAGE ligands, HMGB1 and AGEs, activates monocyte/macrophage. Therefore, anti-HMGB1 Ab may inhibit the progression of B-cell lymphoma.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：HMGB1、RAGE、B 細胞リンパ腫、単球・マクロファージ、活性酸素、接着分子、AGE、オートコイド

1. 研究開始当初の背景

日本人の悪性リンパ腫は、非ホジキンリンパ腫 (NHL) が 95% を占め、その内 B 細胞リ

ンパ腫が 70～80% を占める。2005 年度の調査では、日本の NHL 患者数は約 40,000 人、新規患者数約 10,000 人、死亡数は約 8,000

人である。一方、米国では60歳以降の症例の大半がNHLで、2006年度の患者数は約330,000人、新規患者数約58,000人、年間死亡数約19,000人、生存率は1年80%、5年60%、10年50%である。人種を問わず、大半のNHL患者が徐々に進行する遅延型過敏反応か細胞性免疫の障害を有しており、進行期には液性免疫あるいはB細胞機能も抑制される。悪液質が一般的にみられ、患者はしばしば敗血症で死亡する。治療法は、化学療法と放射線療法であり、化学療法としてCHOP療法が主体で、CHOP療法と放射線療法との併用で、50~60%の治癒率と報告されている。濾胞性リンパ腫に対する抗CD20モノクローナル抗体rituximabの効果が期待されていて、rituximab+CHOPが定着しつつある。市場面でも2001年度世界売上が約1450億円と巨額なだけでなく、前年比90%という発売後数年の製品としては顕著な伸びから、悪性リンパ腫の新しい治療法に対する期待がいかに大きいかが実証された。しかし、rituximab+CHOPの併用による寛解率は、B細胞リンパ腫では60~70%と、まだ有効な治療薬は開発されていないと考えられる。

High mobility group box1 (HMGB1)は、元々クロマチンに結合する構造蛋白あるいは遺伝子の転写・調節に関与する核内蛋白として知られてきたが、壊死組織から、もしくはある種の刺激で単球・マクロファージから細胞外にサイトカインのごとく分泌され、免疫応答に大きく関与していることが近年の研究で明らかになった。また、申請者らは、HMGB1が脳梗塞やくも膜下出血の増悪因子で、抗HMGB1抗体で脳梗塞巣の形成と運動機能障害を抑制できることを報告し

(FASEB Journal in press)、脳梗塞とくも

膜下出血の抗体療法としてそれぞれ**特許第3876325号、3882090号**という成果を得た。

さらに、HMGB1は悪性腫瘍の増殖に関与しており、悪性リンパ腫、大腸癌、卵巣癌などでは、腫瘍細胞自身がHMGB1を分泌している。糖化最終産物受容体(RAGE)は、HMGB1、糖化最終産物(AGE)、S100蛋白などをリガンドとし、細胞の増殖・運動・分化・アポトーシス及び炎症に関与している。大腸癌、胃癌、前立腺癌、口腔扁平上皮癌では、RAGEが発現し、癌細胞の浸潤・転移能を促進し、宿主免疫能に影響を与え、癌の発生から転移に至る過程で促進的な役割を果たす。しかし、悪性リンパ腫におけるHMGB1とRAGEの役割は未だ不明である。申請者らはヒト抗HMGB1抗体を精製し、リンパ節組織を免疫染色した。B細胞リンパ腫のうち濾胞性リンパ腫の濾胞はHMGB1を強発現していた。ヒトHMGB1を精製し、ヒト悪性リンパ腫由来のB細胞cell lineに添加刺激したところ、HMGB1は細胞増殖を誘導した。さらに、ヒト抗RAGE抗体や可溶性RAGE(sRAGE)を精製し、HMGB1の効果に対するRAGEの関与を検討したところ、抗RAGE抗体とsRAGEはHMGB1の増殖誘導効果を抑制した(**特許出願準備中**)。また、HMGB1はB細胞膜表面上のRAGE発現を誘導していた。従って、濾胞性リンパ腫におけるB細胞の増殖にHMGB1とRAGEが関与し、さらにHMGB1はその受容体であるRAGE発現にポジティブフィードバックをかけていることが示唆される。B細胞リンパ腫の発生原因はまだ不明だが、リンパ節におけるB細胞の増殖と分化異常であることは確かである。

2. 研究の目的

本研究は、B細胞の分化へのHMGB1の関与を

B細胞 cell line をもちいて解明し、その知見を基に新規抗体医薬の開発を目的としている。従って本研究はリンパ節におけるB細胞の分化メカニズムの解明と、新しいB細胞リンパ腫の治療薬開発を進めるための薬理的な研究という性質を併せ持つ。

3. 研究の方法

(1) 悪性リンパ腫患者のリンパ節組織の抗HMGB1抗体と抗RAGE抗体による免疫染色をする。組織のHMGB1とRAGE mRNA発現の解析をする。(2) 各種悪性リンパ腫ヒト cell line に対するHMGB1の増殖誘導効果の検討をする。増殖に対するRAGEの関与について検討をする。(3) 組織の免疫染色と cell line を用いた検討の結果から、HMGB1とRAGEが関与する悪性リンパ腫の種類を病理学的に特定する。(4) HMGB1に反応する cell line のHMGB1とRAGEの免疫染色とmRNA解析を行う。(5) HMGB1が高発現し、増殖にRAGEが関与している cell line の培養上清中のHMGB1をELISA法とWestern blot法で測定する。(6) B細胞の増殖と未熟B細胞から成熟B細胞への分化にアポトーシスを防ぐ機能のある *bcl-2* が関係している。*bcl-2* の発現についても免疫染色とWestern blot法で測定し検討する。(7) Cell line の増殖抑制効果において、抗HMGB1抗体、抗RAGE抗体、sRAGEと、既存のCHOPやrituximabといった薬の効果の差について比較検討する。(8) 開発中の低分子化合物誘導体の cell line の増殖抑制効果について検討する。

4. 研究成果

申請者らは抗HMGB1抗体を精製し、リンパ節組織を免疫染色した。B細胞リンパ腫の濾胞はHMGB1を強発現していた。HMGB1を精製し、ヒト悪性リンパ腫由来のB細胞 cell line に添加刺激したところ、HMGB1は細胞増殖を誘導した。さらに、抗RAGE抗体、抗HMGB1抗体、可溶性RAGE (sRAGE) を精製し、抗HMGB1抗体、抗RAGE

抗体とsRAGEはHMGB1の増殖誘導効果を抑制した。ヒト悪性リンパ腫 cell line を抗RAGE抗体によりRAGEの蛍光染色を行うとRAGEが発現し、HMGB1で発現増強した。B細胞リンパ腫の発生原因は、リンパ節濾胞におけるB細胞の増殖と分化異常であり、単球・マクロファージは濾胞でB細胞の増殖と分化を調節していると考えられている。悪性リンパ腫患者のリンパ節組織において、単球・マクロファージにHMGB1が発現していた。RAGEのligandである、HMGB1やAGEは、単球を活性化し、細胞内の活性酸素を産生誘導して、細胞膜上の接着分子発現を誘導した。細胞内の活性酸素がセカンドメッセンジャーとして働き、接着分子発現を誘導していた。こういった単球・マクロファージ活性化は、ヒスタミンやプロスタグランディンE2などのオータコイドで抑制された。これらのオータコイドは単球・マクロファージより産生され、B細胞の増殖と分化へ何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられる。単球・マクロファージの細胞膜上の接着分子は、B細胞の増殖と分化に関与していると考えられていて、以上のことは、B細胞の増殖と分化のメカニズムを示唆する。HMGB1は、単球・マクロファージの活性化し、液性免疫の機構を作動させていると考えた。

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 Takahashi HK, Mori S, Liu K, Wake H, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori, M. : beta(2)-adrenoceptor stimulation inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear

- cells. **Eur J Pharmacol.** 627:313-317, 2010
- ② Ohashi K, Takahashi HK, Mori S, Liu K, Wake H, Sadamori H, Matsuda H, Yagi T, Yoshino T, Nishibori M, Tanaka N: Advanced glycation end products enhance monocyte activation during human mixed lymphocyte reaction. **Clin Immunol** 134:345-353, 2010
- ③ Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Sadamori H, Matsuda H, Yagi T, Yoshino T, Mori S, Nishibori M: Histamine inhibits advanced glycation end product-induced adhesion molecule expression on monocytes during human mixed lymphocyte reaction **Br J Pharmacol.** 160:1378-1386, 2010
- ④ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M: Effect of nicotine on advanced glycation end products-induced immune response in human monocytes. **J Pharmacol Exp Ther.** 332:1013-1021, 2010
- ⑤ Takahashi HK, Zhang J, Mori S, Liu K, Wake H, Liu R, Sadamori H, Matsuda H, Yagi T, Yoshino T, Nishibori M: Prostaglandin E2 inhibits advanced glycation end product-induced adhesion molecule expression on monocytes, cytokine production and lymphocyte proliferation during human mixed lymphocyte reaction. **J Pharmacol Exp Ther.** 334:964-972, 2010
- ⑥ Wake H, Mori S, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M: High mobility group box 1 complexed with heparin induced angiogenesis in a matrigel plug assay. **Acta Med Okayama** 63:249-262, 2009
- ⑦ Wake H, Mori S, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M: Histidine-rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin-induced angiogenesis in matrigel plug assay. **Eur J Pharmacol.** 623:89-95, 2009
- ⑧ Liu R, Mori S., Wake H, Zhang J, Liu K, Izushi Y, Takahashi HK, Peng B, Nishibori M: Establishment of in vitro binding assay of high mobility group box-1 and S100A12 to receptor for advanced glycation endproducts: heparin's effect on binding. **Acta Med Okayama** 63:203-211, 2009
- ⑨ Takahashi HK, Mori S, Wake H, Liu K, Yoshino T, Ohashi K, Tanaka N, Shikata K, Makino H, Nishibori M: Advanced glycation end products subspecies-selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. **J Pharmacol Exp Ther.** 330:89-98, 2009
- ⑩ Wake H, Takahashi HK, Mori S, Liu K, Yoshino T, Nishibori M: Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. **J Pharmacol Exp Ther** 330:826-833, 2009
- ⑪ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M: Prostaglandin E2 inhibits advanced glycation end product-induced adhesion molecule expression, cytokine production, and lymphocyte proliferation in human peripheral

blood mononuclear cells. J

Pharmacol Exp Ther. 331:656-670, 2009

- ⑫ Nishibori M, Takahashi HK, Katayama H, Mori S, Saito S, Iwagaki H, Tanaka N, Morita K, Ohtsuka A: Specific removal of monocytes from peripheral blood of septic patients by polymyxin B-immobilized filter column. **Acta Med Okayama**. 63:65-69, 2009

[学会発表] (計4件)

① Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Nishibori M: Advanced glycation end products induce adhesion molecule expression and cytokine production in human PBMC **第14回国際免疫学会** (神戸, 8月22日~27日, 2010)

② Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Nishibori M: Prostaglandins E₂ inhibits advanced glycation end products-induced activation of human monocytes **第16回国際薬理学会** (コペンハーゲン, 7月17日~23日, 2010)

③ 高橋英夫, 劉克約, 和氣秀徳, 森秀治, 西堀正洋 AGE-2 と AGE-3 誘導性のヒト単球の活性化に対するプロスタグランジン E₂ の効果 **第83回日本薬理学会年会** (大阪, 3月16日~18日, 2010)

④ 高橋英夫, 森秀治, 劉克約, 和氣秀徳, 西堀正洋 **第82回日本薬理学会年会** (横浜, 3月16日~18日, 2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

1. 名称: 外傷性神経障害治療剤
発明者: 西堀正洋, 森秀治, 高橋英夫, 和氣秀徳, 劉克約, 伊達勲, 大熊佑, 友野靖子
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2010-214019

出願年月日: 22年12月23日

国内外の別: 国内

2. 名称: RAGE と AGE の結合抑制剤のスクリーニング方法

発明者: 西堀正洋, 森秀治, 高橋英夫, 和氣秀徳, 劉克約

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-214019

出願年月日: 22年9月24日

国内外の別: 国内

3. 名称: アテローム動脈硬化抑制剤

発明者: 西堀正洋, 高橋英夫, 森秀治, 劉克約, 友野靖子, ベイカーメディカルリサーチインスティテュート

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2009-223472

出願年月日: 21年9月28日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋英夫 (TAKAHASHI HIDEO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 60335627

(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

吉野正 (YOSHINO TADASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 70183704

(3) 連携研究者

なし