

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790601

研究課題名(和文) 抗HMGB1抗体を用いた広域スペクトル抗腫瘍薬の開発とその作用機序の解明

研究課題名(英文) The development of broad-spectrum antitumor agents with anti-HMGB1 antibody and clarification of its action mechanism

研究代表者

和氣 秀徳 (WAKE, HIDENORI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60570520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞株をマウスの背部皮下に移植した担癌マウスに浸透圧ポンプを用いて、抗HMGB1モノクローナル抗体を持続投与したところ、コントロールと比較して抗HMGB1抗体投与群において、有意に腫瘍増殖の抑制が見られた。また、抗HMGB1抗体投与群の腫瘍組織中の新生血管密度がコントロールと比較して有意に減少していた。しかしながら、免疫不全マウスを用いた担癌マウスモデルでは、抗HMGB1抗体に抗腫瘍効果は認められなかったため、抗HMGB1抗体の抗腫瘍効果は直接的な作用ではなく、リンパ球等を介した免疫反応による効果である可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：The osmotic pump continuous dosing of anti-HMGB1 antibody for 7 days significantly reduced tumor growth in mouse tumor graft model, whereas the same dose of anti-KLH antibody (control) had no effect on tumor growth. In the group treated with anti-HMGB1 antibody, the number of CD31-positive blood vessel in tumor tissue was significantly decreased in comparison with the number by treatment with anti-KLH antibody. However, the administration of anti-HMGB1 antibody had no effect on tumor growth in tumor graft model using immune-deficient mice. These data suggested that anti-HMGB1 antibody reduced tumor growth not directly but through immune response.

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：薬物治療学 抗体医薬 抗腫瘍薬 HMGB1

1. 研究開始当初の背景

癌は日本人の死因の第一位であり、その治療を目的とした医薬の開発が急務である。現在使用されている抗腫瘍薬は副作用が強く、癌患者の quality of life (QOL) は著しく低下する傾向にある。その中でも近年登場してきた抗体を用いた抗腫瘍薬は副作用が少なく、患者の QOL 向上に貢献している。しかしながら、現在認可されている抗腫瘍抗体薬は、抗体の標的となる分子が発現している腫瘍にしか効果が無く、患者のごく一部でしか効果が期待できない。

本研究で使用する抗 HMGB1 モノクローナル抗体 (#10-22) の標的分子である HMGB1 は、腫瘍の増殖や転移に関与し、様々な腫瘍から分泌されることが知られている。さらに、HMGB1 は全ての細胞の核内に存在しているという特徴から、癌の壊死巣の形成に伴い腫瘍の周囲に放出される可能性が考えられる。したがって、ほぼ全ての癌から HMGB1 が放出される可能性が考えられ、抗 HMGB1 モノクローナル抗体は広い範囲の腫瘍に対して効果があると期待される。

申請者は HMGB1 が血管新生促進に関与しており、同じく血管新生因子である VEGF の上流に位置していることを証明する論文を発表した (Wake et al., Eur J Pharmacol, 2009; Acta Medica Okayama, 2009)。マトリゲル血管新生モデルを用いて HMGB1 の血管新生誘導効果を検討したところ、HMGB1 単独、若しくはヘパリン単独では血管新生は誘導されず、HMGB1 とヘパリンを混合した群において血管新生が強く誘導された。これは、ヘパリン結合性のある HMGB1 は HMGB1 単独であるとマトリゲル中のヘパリン硫酸鎖にトラップされマトリゲル周囲に刺激を伝えることができないが、HMGB1・ヘパリン複合体は、マトリゲル中のヘパリン硫酸鎖にトラップされることなく周囲組織に刺激を伝えることができた為であると考えられる。つまり、HMGB1 はヘパリンやヘパリン硫酸によって刺激の伝達を調節されている可能性がある。また、マトリゲルの周囲皮膚組織を用いて mRNA の発現を調べたところ、HMGB1・ヘパリン混合群において血管新生誘導因子として知られている VEGF-A120、TNF- α の mRNA の増加が確認された。

以上の結果から、現在大腸癌に使用されているアバチン(抗 VEGF 抗体)の抗血管新生効果と同様の効果を抗 HMGB1 抗体が持つ可能性が強く示唆された。また、HMGB1 はマクロファージの腫瘍内浸潤を阻害し、腫瘍の増殖を阻害する免疫系を抑制することが知られており、抗 HMGB1 モノクローナル抗体は血管新生阻害だけでなく、マクロファージの腫瘍内浸潤を促進する効果もあると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、抗 HMGB1 モノクローナル抗体の抗腫瘍効果について検討し、抗腫瘍効果の認められる腫瘍のタイプを検索する。さらには、その抗腫瘍効果の作用機序について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 昆虫細胞発現系を用いた組換え HMGB1 タンパク質の発現と精製

HMGB1 に対する抗体を作成するには、抗原が必要である。組換え HMGB1 タンパク質を作製する為、まず HMGB1 遺伝子を昆虫細胞発現用プラスミドに組み込み HMGB1 発現プラスミドを作製した。そのプラスミドを昆虫細胞に導入し、HMGB1 発現用バキュロウイルスを作製した。さらに、そのウイルスを昆虫細胞に感染させることで、HMGB1 を強制発現させた。以上の手法により得られた組換え HMGB1 はヒスチジンタグを N 末端に結合した形で発現するようにデザインされているため、Ni-NTA アガロースを用いたアフィニティ精製を行い、精製組換え HMGB1 タンパク質を得た。

(2) ラット由来抗 HMGB1 抗体の作成と大量精製

HMGB1 とアジュバントのエマルジョン溶液をラットフットパッドに注射し免疫を行った。3 週間後ラットリンパ節を摘出し細胞を調整した。そのラットリンパ節細胞とミエローマ細胞をフュージョンし、適切に融合した細胞をスクリーニングした。融合細胞をクローニングし、培養した上清を回収し、MEP HyperCel を用いたアフィニティ精製により抗 HMGB1 抗体を含む IgG フラクシオンを精製した。

(3) Colon26 大腸癌細胞株を用いた担癌マウスの作製

マウスの背部皮下に Colon26 大腸癌細胞株 (2×10^5 cells) を移植し、1 週間腫瘍が生着するのを待った。マウスの系統は BALB/c を用いた。

(4) 免疫不全マウスを用いた担癌モデルマウスの作製

マウスの背部皮下に A549 肺癌細胞株 (2×10^5 cells) を移植し、1 週間腫瘍が生着するのを待った。マウスの系統は C.B17/lcr-scid (免疫不全) を用いた。

(5) B16 メラノーマ細胞株を用いた担癌マウスの作製

マウスの背部皮下に B16 メラノーマ細胞株 (4×10^5 cells) を移植し、2 週間腫瘍が生着するのを待った。マウスの系統は C57BL6/J を用いた。

(6) 担癌マウスへのラット抗 HMGB1 モノクローナル抗体投与方法の検討

作製した担癌マウスに抗体をオスモティックポンプを用いた持続皮下投与 (抗体を充てんしたポンプをマウス背部皮下に埋め込む) ($0.5 \mu\text{g}/\text{hour}$ 1week)、静脈内投与 ($400 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 週 2 回 4 週間)、腫瘍内投与 ($200 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 週 2 回 4 週間) を行った。週に 2 回腫瘍径を計測し腫瘍体積を算出した ($\pi/6 \times \text{length} \times (\text{width})^2$)。体重も同時に計測した。

(7) 腫瘍血管新生に対するラット抗 HMGB1 モノクローナル抗体の効果

抗体投与開始後 28 日目にマウスをサクリフェイスし、10%ホルマリンで固定した。パラフィン包埋後 $5 \mu\text{m}$ 厚に薄切し、スライドガラスへ進展した後、脱パラを行った。クエン酸抗原賦活液にスライドを浸し、120、20 分間オートクレーブにより熱処理を行い、抗原賦活を行った。抗 CD31 一次抗体 (血管内皮マーカーに対する抗体) を 4、overnight 反応させ、洗浄を行い、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を室温で 2 時間反応させた。洗浄を行った後、 $\text{DAB} + \text{H}_2\text{O}_2$ をスライドガラスへ滴下し、血管内皮を染色した。血管密度はランダムに抽出した 5 視野中に存在する CD31 陽性血管数を計測することで算出した。

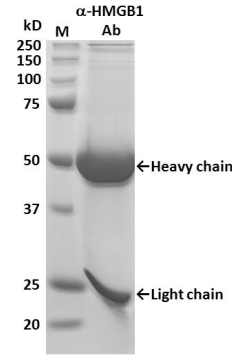
(8) EA.hy926 血管内皮細胞株を用いた血管形成に対する HMGB1 の効果

96 ウェルプレートにマトリゲルをコーティングした。その上に血管内皮細胞を播種し、種々の試薬を添加し、チューブフォーメーションの程度を観察した。

4. 研究成果

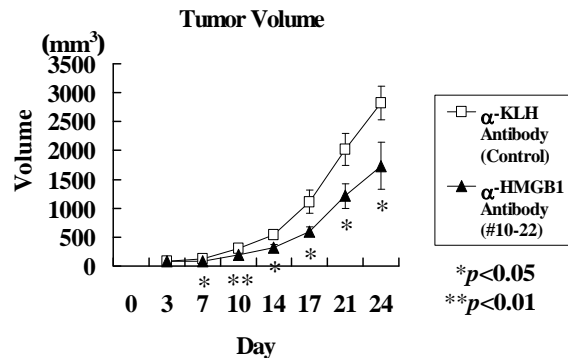
最初に、担癌マウスに投与するために必要となる抗 HMGB1 モノクローナル抗体の大量精製を行った。抗 HMGB1 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞培養上清を回収し、MEP HyperCel レジンをういてアフィニティークロマトグラフィーを行い、大量の抗 HMGB1 モノクローナル抗体を得た (図 1)。

(図 1)



抗体投与方法、投与量を検討するために、Colon26 細胞株担癌マウス (BALB/c) をういて投与方法の違いによる腫瘍増殖抑制効果の有無を確認した。オスモティックポンプによる持続投与 ($0.5 \mu\text{l}/\text{hour}$ 、7 日間) においては抗腫瘍効果が認められたが (図 2)、静脈内投与 2 回/week (4 週間) では抗腫瘍効果が得られず、抗体がラット由来の抗体であったためか、アナフィラキシーショックにより 4 週目の投与時にすべて死亡した。また、アナフィラキシーによる反応を回避するために SCID マウス (機能的な T 細胞、B 細胞が欠如しており、免疫グロブリンもほとんど産生されない) をういて静脈内投与 2 回/week (4 週間) も行ったが、抗腫瘍効果は得られなかった。このことより、抗 HMGB1 抗体の抗腫瘍効果には免疫系細胞が関与している可能性が示唆された。

(図 2)



さらに、Colon26 細胞株以外の細胞株に対して抗 HMGB1 抗体の抗腫瘍効果を確認した。抗 HMGB1 抗体は B16 細胞株担癌マウス (C57BL/6) に対しては腫瘍の増殖を抑制したが、SCID マウスを用いた A549 細胞株担癌マウスにおいては、抗腫瘍効果は認められなかった。SCID マウスを用いたアッセイは免疫系の不全が原因で抗腫瘍効果が発揮されなかったと考えられる。

Colon26 細胞株担癌マウス (BALB/c) に

オスモティックポンプを用いて抗体を持続投与(0.5 μ l/hour, 7日間)したマウス(BALB/c)より摘出した腫瘍を固定し、パラフィンブロックを作製し、組織染色を行ったところ、対照抗体投与群と比べて抗HMGB1モノクローナル抗体投与群の腫瘍内新生血管が優位に減少しており、HMGB1が腫瘍血管新生に何らかの関わりがあることが示唆された。

そこで、血管内皮細胞に対する、HMGB1と抗HMGB1モノクローナル抗体の効果を確認するために、血管内皮細胞株(EA.hy926細胞)を用いたin vitroチューブフォーメーションアッセイ(試験管内血管新生試験)を行った。しかしながら、HMGB1単独添加群はバッファコントロール群と比べてチューブフォーメーションに優位な差は認められなかった。

以上の結果より、抗HMGB1抗体はHMGB1を中和することで腫瘍血管新生を抑制し、腫瘍増殖が抑えられると考えられた。また、血管新生にはHMGB1単独での作用ではなく、他の生体因子との相互作用が関連していると考えられる。

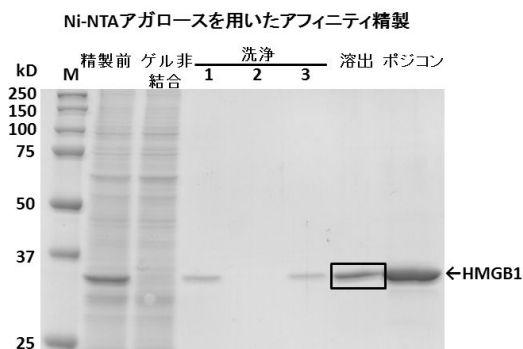
今回、担癌マウスに静脈内投与によりラット由来抗HMGB1抗体を投与したところアナフィラキシーを起こし死亡したため、SCIDマウスで抗体効果を観察したが抗腫瘍効果が見られず、投与方法は最初に設定したオスモティックポンプによる投与に決定した。しかしながら、この方法であるとオスモティックポンプからの投与量が少なく、抗腫瘍効果も弱かった。この為、投与方法を腫瘍内投与に変更してみたが、ラット由来の抗体を顕著な抗腫瘍効果が現れるまで投与するとやはりアナフィラキシーショックが起こった。

以上の理由より、この問題を根本的に解決するにはマウス由来の抗HMGB1抗体を作製しなければならないと考え、マウスモノクローナル抗体作製に着手した。抗体作製には免疫を行うための抗原が大量に必要な為、バキュロウイルス発現系を用いてHisタグ付きリコンビナントHMGB1を強制発現させた、さらにNi-NTAアガロースゲルを用いてアフィニティ精製を行い精製リコンビナントHMGB1を得た(図3)。この操作を抗体作製に必要な量が取れるまで繰り返した。今後、この抗原を免疫しマウス由来のモノクローナル抗体を作製していく。

本研究により、抗HMGB1抗体は少なくとも2種類の腫瘍には抗腫瘍効果が存在することが明らかとなり、さらに他の種類の腫瘍への抗腫瘍効果が期待される。また、抗腫瘍効果の一因として血管新生だけではなく、免疫系細胞の関与も明らか

かにしつつあり、アバスチンのように血管新生活性だけでなく、複数の効果により抗HMGB1抗体は腫瘍増殖を抑制すると思われる。以上のことから、抗HMGB1抗体は既存の抗体医薬品より優位な抗体医薬として開発されうると期待される。

(図3)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takahashi H, Sadamori H, Teshigawara K, Niwa A, Liu K, Wake H, Mori S, Yoshino T, Nishibori M. Histamine inhibits high mobility group box 1-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *Eur J Pharmacol.* 718: 305-313, 2013. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.08.017 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

劉克約、王登莉、和氣秀徳、勅使川原匡、高橋英夫、森秀治、西堀正洋、コラゲナーゼで誘発脳内出血モデルにおける抗HMGB1単クローン抗体の効果、第87回日本薬理学会年会、2014年3月20日、仙台国際センター(仙台)

Nishibori M, Okuma Y, Liu K, Wake H, Maruo T, Teshigawara K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ohtsuka A, Yoshino T, Otani N, Tomura S, Shima K, Takahashi H, Date I, Mori S. Anti-HMGB1 Monoclonal Antibody Therapy for Traumatic Brain Injury in Rats, Merinoff World Congress 2013: HMGB1, 2013年10月9日, Feinstein Institute for Medical Research, New York, USA

Nishibori M, Liu K, Okuma Y, Wake H, Teshigawara K, Takahashi H, Date I, Mori S. Protection of BBB disruption in

ischemic and traumatic injuries by anti-HMGB1 monoclonal antibody, Signalling in the Blood-Brain Barriers, 2013年9月12-14日, Hotel Kapitany, Sumeg, Hungary

劉克約、富麗、和氣秀徳、勅使川原匡、西堀正洋、ピルカルピンで誘発癱瘓モデルにおける抗 HMGB1 単クローン抗体の効果、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 03 月 22 日、福岡国際会議場（福岡）

和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋、高ヒスチジン糖タンパク質の好中球走化性に対する影響、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 03 月 21 日、福岡国際会議場（福岡）

Okuma Y, Liu K, Wake H, Maruo T, Teshigawara K, Tomura S, Otani N, Shima K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Takahashi H, Mori S, Date I, Nishibori M. Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury, Neuroscience 2012, 2012 年 10 月 16 日, New Orleans Morial Convention Center, New Orleans, USA

大熊佑、劉克約、和氣秀徳、勅使川原匡、高橋英夫、森秀治、伊達勲、西堀正洋、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 年 06 月 29 日、あわぎんホール（徳島）

和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋、高ヒスチジン糖タンパク質は HMGB1-ヘパリン複合体誘導血管新生を抑制する、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、国立京都国際会館（京都）

和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、西堀正洋、HRG の HMGB1 - ヘパリン複合体誘導性血管新生調節機構、第 120 回日本薬理学会近畿部会、2011 年 11 月 11 日、ホテルグランヴィア京都（京都）

和氣秀徳、森秀治、劉克約、高橋英夫、西堀正洋、高ヒスチジン糖タンパク質は HMGB1-ヘパリン複合体誘導血管新生を抑制する、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、国立京都国際会館（京都）

6 . 研究組織

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

(2)研究協力者
西堀 正洋 (NISHIBORI MASAHIRO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50135943

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

高橋 英夫 (TAKAHASHI HIDEO)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：60335627

森 秀治 (MORI SHUJI)
就実大学・薬学部・教授
研究者番号：50220009