

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590337

研究課題名(和文)新規作用機序をもつ高血圧症治療薬開発の基礎的研究

研究課題名(英文)Basic scientific research for formulating drugs for treatment of hypertension

## 研究代表者

高橋 英夫 (TAKAHASHI, Hideo)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：60335627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：High mobility group box1(HMGB1)は、免疫応答に大きく関与している。申請者らは、HMGB1が脳梗塞、アテローム性動脈硬化症などの原因因子で、抗HMGB1抗体でこれらを抑制できることを報告した。HMGB1の高血圧症の病態生理への関与はまだ明らかではないので、脳卒中易発症高血圧症自然発症ラット(SHRSP)を用いて検討してきた。血管内皮細胞障害が高血圧症の原因であるが、HMGB1の血管内皮細胞障害は確認出来なかったが、好中球活性化が血管内皮細胞障害を誘導する機序を解明することが出来た。好中球活性化制御因子を特定したので、高血圧症新規治療薬の開発に向けた研究を継続する。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that high mobility group box1 (HMGB1) plays roles in immune response. We have reported that anti-HMGB1 Ab inhibited the progression of brain infarction and atherosclerosis. However, little is known whether HMGB1 induces the vascular injury, we investigated the involvement of HMGB1 in the endothelial dysfunction and injury using stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). It is well known that the endothelial dysfunction and injury induces hypertension. Although we could not prove the effect of HMGB1 on the endothelial dysfunction and injury, during this project, we found the mechanism of neutrophil-induced endothelial dysfunction and injury. Moreover, we found a mediator which inhibited the activation of neutrophil. Therefore, we continue the promotion of basic scientific research for formulating drugs for treatment of hypertension.

研究分野：薬理学

キーワード：High mobility group box1 SHR 高血圧症 抗HMGB1抗体

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

高血圧症の病態生理には、炎症反応が関与すると考えられている。しかし、その実態解明は遅れており、降圧薬の選択による治療が主体となっているが、十分な治療効果を持っているとは考えられない。

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、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。HMGB1の受容体として、toll-like receptor (TLR)-2、TLR-4、receptor for advanced glycation end product (RAGE)がある。

HMGB1の高血圧症への関与はまだ明らかではないが、申請者らは、HMGB1が脳梗塞、くも膜下出血、アテローム性動脈硬化症などの生活習慣病の原因因子で、抗HMGB1抗体でこれらを抑制できることを報告し(Liu, Takahashi et al. FASEB J 2007; Zhang, Takahashi et al. Stroke 2011; Bobik, Takahashi et al. Circulation 2009)、これらの疾患の抗体療法として特許成立させた(特許第3876325号:脳梗塞抑制剤、特許第3882090号/脳血管攣縮抑制剤)。これらの特許群は(独)科学技術振興機構(JST)より、戦略的支援の対象として認定(G010-0040)され、(社)発明協会より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。申請者らの、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手法は、大変有効と考えた。

### (2) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

申請者らは、ヒト本態性高血圧症のモデ

ル動物として高血圧症自然発症モデル動物 SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rat)を用いて、高血圧症の病態生理について検討してきた。

その結果、ヒト本態性高血圧症における臓器障害発症因子である TNF- $\alpha$ などを増加することがわかった。HMGB1はこれらの因子を介する炎症反応のより上流に存在し、複雑なカスケードをスタートさせていると考えられている。従って、高血圧症の病態生理に関与している、より上流の原因因子にHMGB1が予想され、本研究を着想した。

### (3) この研究の発展性について

申請者らは、中和活性を持つ、ラット由来の抗HMGB1モノクローナル抗体を作製し、保有し、モデル動物を用いた高血圧症への治療効果を十分に検討できると考えた。さらに、当時我が国のベンチャー社と完全ヒト抗体の共同開発していた。

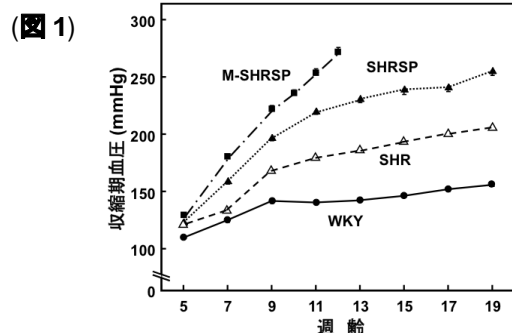
## 2. 研究の目的

わが国の死因の2, 3位を占める心疾患と脳血管疾患や上位を占める腎不全は、高血圧症などの生活習慣病を基礎疾患として発症する。従って高血圧症の予防、進行防止をはかることがわが国の保健医療において喫緊の課題である。高齢者高血圧症治療では、現行の降圧薬の選択による治療により死亡率、脳血管障害、虚血性心疾患などの減少がみられるが、高血圧症の原因に対する根治療法ではなく、十分な効果を持つとはいえない。本研究は、ターゲットバリデーションによる新規高血圧症治療薬の開発をする為の、高血圧症の病態メカニズムに関与する原因因子の特定を目的とした。

## 3. 研究の方法

高血圧症増悪とHMGB1発現量増加の相関高血圧症自然発症モデル動物SHRSP(図1)を用いて、モデル動物3系統とコントロール

動物である Wistar Kyoto ラット(WKY)の血管と脳での HMGB1 発現と血清中の HMGB1 発現の経時的変化を検討した。



#### SHRSP による生存率延長機序の解析

本モデルは高血圧症合併症である脳卒中を発症する。高血圧症の治療法開発を戦略的に行う為には、脳卒中予防と障害治療を視野に入れた治療薬開発を行わなければならない。SHRSP は生後約 13 週齢で脳卒中を発症し、直後は脳組織に大小の出血巣と壊死像と障害部周囲に M1 マクロファージ増加等の障害所見を認めた。回転装置付ケージを用いた自発的運動 voluntary exercise(VE)による生存率延長モデルを開発して、治療薬開発のポジティブコントロールとする。

ヒト化抗 HMGB1 モノクローナル抗体作製  
国内ベンチャー社との共同開発

高血圧症発症メカニズムに関する原因因子の特定

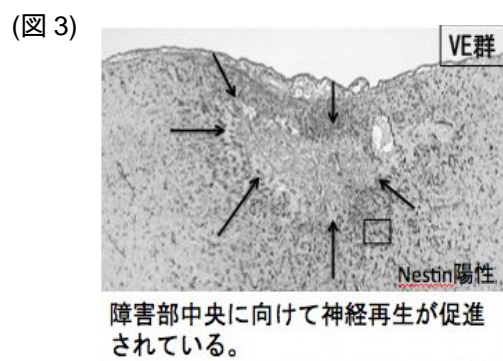
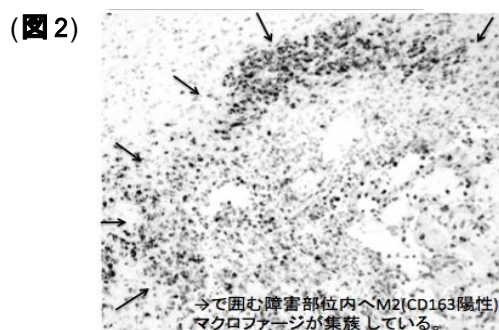
同じく、高血圧症の治療法開発を戦略的に行う為には、高血圧症発症メカニズムを探索する必要がある。その中心は血管内皮細胞障害である。血管内皮細胞障害抑制因子の探索を行う。

#### 4. 研究成果

高血圧症自然発症モデル動物を用いた検討の結果、HMGB1 が脳組織障害に関与することがわかった。高血圧症進行の際の血管組織変化に対する直接的関与は確認出来なかった。

本モデルを用いた長期観察では、VE 群では発症以降の経過を見ると、非運動群に比べて著明にエネルギーバランスと生存率が改善し ( Niwa, Takahashi et al, Brain Struct Funct. in press)、神経性身体障

害が抑制された。VE 群の生存例では脳組織障害部の M2 マクロファージ増加(図 2)、神経幹細胞の増加(図 3)と血管系やグリア系細胞(neurovascular unit)の修復を認めた。

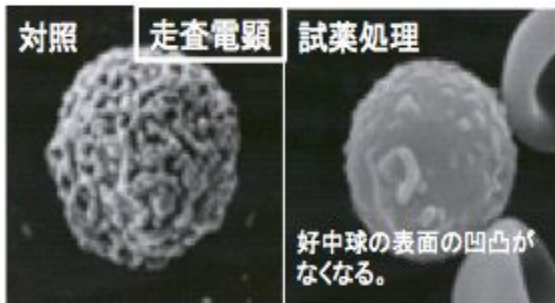


また、VE 群の再生部位には、核外 HMGB1 が存在を認めた。脳卒中後 HMGB1 は脳神経再生を誘導して生存率を向上させていることを示唆したが、その作用機序としてマクロファージのフェノタイプである、M2 マクロファージを介する再生が関与していると考えた。

ヒト化抗 HMGB1 モノクローナル抗体を国内ベンチャー社との共同開発によって成功した。同抗体は、HMGB1 と高親和性を示し、敗血症モデルでは低用量から強力な中和活性を持つことがわかった。

共同研究グループで、抗 HMGB1 抗体にかわる、HMGB1 の作用を調節する化合物開発が出来た(PCT/JP2013/64779)。HMGB1 の作用を検討することで、好中球活性化が血管内皮細胞障害を誘導する機序を解明することが出来た。好中球活性化を制御する因子を特定できた(図 4)ので、今後は、好中球活性化を抑制して、血管障害、更には高血圧症新規治療薬の開発に向けた研究を継続して行う。

(図4)



<引用文献>

Liu K, Takahashi HK, Nishibori M, et al. (代表者 11 人中 3 番目) Anti-high mobility group box 1 Monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. **FASEB J** 21:3904-3916, 2007.

Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Nishibori M, et al. (代表者 12 人中 2 番目、共同筆頭) Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. **Stroke**. 42 :1420-28, 2011.

Bobik A, Takahashi HK, Liu K, Nishibori M, et al. (代表者 10 人中 8 番目) A Proatherogenic Role for HMGB1 in Atherosclerosis. **Circulation**, 120:S1155, 2009.

Niwa A, Nishibori M, Liu K, Takahashi H., et al. (代表者 10 人中 10 番目) corresponding author) Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle.

Brain Struct Funct. 2015 in press.

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 5 件)

Okuma Y, Liu K, Wake H, Liu R, Nishimura Y, Zhong H, Teshigawara K, Haruma J, Yamamoto Y, Yamamoto H, Date I, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M. Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction. **Neuropharmacology**, 2014,85: 18-26. 査読有 doi: 10.1016/j.neuropharm.

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**, 2013,718:305-313, 査読有 doi: 10.1016/j.ejphar.2013.08.017

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**, 2013,701:194-202, 査読有. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.11.058.

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**, 2012, 72:373-384, 査読有. doi: 10.1002/ana.23602.

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**, 2012, 18, 911-17, 査読有. doi: 10.1038/nm.2749.

〔学会発表〕(計 2 件)

第 34 回癌免疫外科研究会特別招聘講演: ホメオスタシス機構と創薬, プラザホテル 岡山、高橋英夫、2013

第 62 回日本アレルギー学会シンポジウム特別講演: アレルギー疾患におけるステロイド療法の理論と実際 ステロイド療法と作用機序, リーガロイヤルホテル 大阪、高橋英夫、2012.

〔図書〕(計 1 件)

高橋英夫、中外医学社、Annual Review 呼吸器 2014: ステロイド療法における新たな作用機序

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 好中球活性化に起因する疾患の治療薬、治療方法及び検査方法

発明者: 西堀正洋、森秀治、和氣秀徳、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、阪口政清

権利者: 国立大学法人 岡山大学

種類: 特許

番号: 2013JP064779

出願年月日: 平成 25 年 5 月 28 日

国内外の別: 国外

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

権利者: 国立大学法人 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-546930

出願年月日: 平成 23 年 12 月 1 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 3 件)

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

権利者: 国立大学法人 岡山大学

種類: 特許

番号: 特許第 5467313 号

出願年月日: 平成 21 年 9 月 28 日

取得年月日: 平成 26 年 2 月 7 日

国内外の別: 国内

名称: 脳梗塞抑制剤

発明者: 西堀正洋、森秀治、高橋英夫、友野靖子、足立尚登、劉克約

権利者: 国立大学法人 岡山大学

種類: 特許

番号: 1946774

出願年月日: 平成 19 年 10 月 13 日

取得年月日: 平成 25 年 12 月 4 日

国内外の別: 国外

名称: B 細胞悪性リンパ腫治療薬

発明者: 西堀正洋、高橋英夫、森秀治、吉野正、友野靖子、菅家徹、佐藤康晴

権利者: 国立大学法人 岡山大学

種類: 特許

番号: 特許第 5224325 号

出願年月日: 平成 19 年 10 月 15 日

取得年月日: 平成 25 年 3 月 22 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/pharma/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 英夫 (TAKAHASHI, Hideo)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 60335627

(2) 研究分担者

丹羽 淳子 (NIWA, Atsuko)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 60122082

研究分担者

西堀 正洋 (NISHIBORI, Masahiro)

岡山大学・医歯薬総合研究科・教授

研究者番号: 50135943

研究分担者

劉 克約 (RYU, Katsuyaku)

岡山大学・医歯薬総合研究科・助教

研究者番号: 40432637