

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18791095  
 研究課題名（和文） HMGB 蛋白をターゲットとした ARDS の治療法および治療薬の開発  
 研究課題名（英文） Study of HMGB protein : development of therapy and therapeutic drugs for ALI/ARDS  
 研究代表者  
 上野 博司（UENO HIROSHI）  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：20381975

## 研究成果の概要：

HMGB1、HMGB2 の様々なエピトープを認識するモノクローナル抗体を急性肺傷害モデルマウスに気管内投与すると、HMGB1 と HMGB2 の相同性が最も低い部位をエピトープとする抗体が肺傷害軽減に最も効果的であり、HMGB2 に特異性が高い抗体ほど肺傷害軽減効果は低い。また、健常マウスに HMGB 抗体を投与すると、ほとんどのマウスが死亡することより、HMGB 蛋白は生理的に重要な役割をしていると推察されたが、その役割までは解明できなかった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	900,000	0	900,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	270,000	2,970,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：HMGB 蛋白、急性肺損傷、ARDS、抗 HMGB 抗体、ATP、P2Y 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

急性肺損傷および Acute Respiratory Distress Syndrome（ARDS）は依然として致死率の高い疾患であり、その病態についても不明な点が多く、十分に解明されているとはいえない。ここ 30 年以上にわたり様々な薬物療法が提唱されてきたにもかかわらず、臨床的に有効と認められたものは未だ皆無で

あり、有効な治療法を見出すことが急務である。一方、High mobility group box-1 protein（HMGB1）は従来、転写調節を司る核内タンパクとして認識されていたが、近年、敗血症や Lipopolysaccharide（LPS）による全身傷害の後期メディエーターとして注目されている物質である。エンドトキシンショックの後期に血中の HMGB1 濃度が上昇すると、致死

率が大幅に上がることが示されている (Science 285:248-251,1999)。しかしながら急性肺傷害の病態に HMGB1 がどのように関与するのかを調べた研究はほとんど見当たらなかった。

当時研究代表者を中心として数年来行ってきた研究において、HMGB1 蛋白が急性肺損傷のメカニズムに関係しており、HMGB1 蛋白の過剰発現を抑制することが、急性肺損傷および ARDS の症状軽減につながる事が明らかになった。HMGB1 蛋白をはじめとする HMGB 蛋白ファミリーに注目することが、急性肺損傷の治療につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

研究代表者らのこれまでの研究により、急性肺傷害および ARDS においてその病態の成立に HMGB1 は深く関与しており、肺傷害性に働いていること、抗 HMGB1 ポリクローナル抗体を経気管投与すると肺傷害が有意に軽減することが明らかとなった。一方 HMGB 蛋白には、いくつかの種類が発見されており (HMGB 蛋白ファミリー) その中で HMGB1、HMGB2 が主に全身の炎症反応に関与するとされている。これらの物質は約 40 年前からその存在が知られており、それぞれに相同性があり塩基配列も既に明らかになっている。中でも HMGB1、HMGB2 には約 80% 程度の相同性がある。このため抗 HMGB1 ポリクローナル抗体の投与によりいくつかの種類 HMGB 蛋白が中和されている可能性が大きいと考えられる。そこで本研究では LPS 気管内投与による急性肺傷害モデルマウスに、HMGB1、HMGB2 の様々なエピトープを認識するモノクローナル抗体を投与し、肺傷害の程度を評価する。その上でより効果的で、生理的な状態を損なわない抗体を決定し、急性肺傷害、ARDS の治療薬開発の一助とすること、および、この実験経

過の中で HMGB 蛋白の肺での生理的役割を解明することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗 HMGB1、HMGB2 モノクローナル抗体の効果判定

これまでの研究で、急性肺傷害および ARDS の発症に HMGB1 が関与し、肺傷害性に働くこと、LPS 投与による急性肺傷害モデルマウスに抗 HMGB1 ポリクローナル抗体を経気管投与すると、肺傷害が有意に軽減することを示した (いずれも Am J Resp Crit Care Med 171,2005 掲載予定、accept 済)。一方、抗 HMGB1 ポリクローナル抗体投与によって、HMGB2 をはじめとする相同性のある他の HMGB 蛋白が同時に中和されている可能性が高い。そこで本研究では、はじめに HMGB1、HMGB2 の様々なエピトープを認識するモノクローナル抗体を作成し、LPS 気管内投与による急性肺傷害モデルマウスに経気管的に投与して肺傷害の程度、つまり抗体の効果を評価する。肺傷害の評価に関しては、組織学的検討に加えて、マウスにヒトのアルブミンを静注し、その肺胞側への漏出を測定して Permeability Index を算出し、肺透過性亢進の指標として用いる。モノクローナル抗体の作成に関しては、HMGB1、HMGB2 のそれぞれに特異的なエピトープを認識する抗体や、両者に共通するエピトープを認識する抗体、さらには HMGB 蛋白に広く共通するエピトープを認識する抗体など、様々な種類のものを作成する。モノクローナル抗体作成に関しては他施設との共同開発が必要になる可能性がある。

これらの結果をもとにして、肺傷害軽減効果のあるモノクローナル抗体を選出する。その上で、HMGB1、HMGB2 の塩基配列と照合して肺傷害に関係のある領域を特定する。

(2) HMGB1、HMGB2 の肺内での生理的役割の  
解明

(1) によって、HMGB1、HMGB2 が肺傷害性に  
働く効果部位が解明される。その一方で、肺  
傷害の軽減効果の乏しい抗体、逆に肺傷害を  
助長する抗体も明らかとなる。これらの抗体  
からは、HMGB 蛋白の中で生理的に重要な役割  
を担っており、欠損すると傷害をもたらす種  
類のものが明らかとなる。また、HMGB1、HMGB2  
が生理的役割に重要な意味を持つ効果部位  
の特定が可能となる。

これらの結果をもとにして、生理的役割に重  
要な意味を持つエピトープを認識するモノ  
クローナル抗体を作成して、これらを健常マ  
ウス経気管的に投与する。その肺を組織学的、  
生理学的、病理学的といった様々な観点から、  
健常肺と比較することによって HMGB1、HMGB2  
の持つ生理的役割を解明していく。

(3) 急性肺傷害に対する抗 HMGB1、HMGB2  
モノクローナル抗体投与の安全性の評価

(1)(2) の研究結果から、急性肺傷害  
および ARDS に対して効果的である抗体が選  
出され、投与することによって生理的状态が  
破壊される抗体も選出される。これらの情報  
を統合して、安全に投与できて且つ肺傷害の  
軽減効果のある抗体を選出することが可能  
となる。

次の段階では選出された抗体の安全性を  
さらに検証する。つまり他臓器への影響、長  
期投与による影響等を検討していく必要が  
ある。

#### 4. 研究成果

(1) はじめに HMGB1、HMGB2 の様々なエピ  
トープを認識するモノクローナル抗体を 6 種  
類作成して、LPS 気管内投与による急性肺傷  
害モデルマウスに同時に経気管投与するこ  
とにより肺傷害の程度、つまり抗体の有効性

の評価を行った。現在のところ、抗体投与マ  
ウスの摘出肺の組織学的検討を行うにとど  
まっているが、概ね抗体の有効性が明らかにな  
ってきた。

HMGB Protein は 210 個前後のアミノ酸で構成  
されており、HMGB1 と HMGB2 は約 80% の相同  
性をもつが、両者の相同性が最も低い部位を  
エピトープとする抗体が肺傷害軽減に最も  
効果的であった。この抗体は HMGB1 を最も特  
異的に認識する抗体である。一方、過去の文  
献的には TNF 放出能が最も高いとされる部位  
をエピトープとする抗体は、逆に肺傷害を悪  
化させる結果となった。また、HMGB1 と HMGB2  
の両者に相同性が高い部位をエピトープと  
する抗体は、肺傷害を悪化させる事はなかつ  
たが軽減効果はあまり見られなかった。

なお、肺障害の程度に関しては、組織学的評  
価を用いて行った。

(2)(1) の結果を検証すべく、さらに認  
識するエピトープの異なる 10 種類のモノク  
ローナル抗体を作成し、LPS と同時にマウス  
に気管内投与を行い、主に組織学的手法によ  
り肺傷害の程度について検討を行った。しか  
し、データのばらつきはあるものの、やはり  
HMGB1 により特異的な交代ほど、肺傷害軽減  
効果が高く、HMGB2 に特異性が高い抗体ほど  
肺傷害軽減効果は低いばかりか、肺傷害をさ  
らに悪化させる結果となり、昨年度の結果を  
支持する結果となった。文献的には HMGB2 の  
肺傷害への関与については、現在のところ明  
らかなデータはないが LPS 投与急性肺損傷モ  
デルにおいては、肺保護的に作用している可  
能性が強く示唆された。

(3)(1)(2) の結果を受け、HMGB1 およ  
び HMGB2 の肺における生理的役割を調べるた  
めこれまでに作成したモノクローナル抗体  
を健常マウスに単独投与して検討した。しか  
し、モノクローナル抗体を気管内投与したモ

デルは、程度の差こそあれ、急性肺損傷を惹起し死亡するケースが目立つ結果となった。どの抗体も、投与量を増やせば死亡する割合が増加する傾向にあった。これらの死亡したマウスの肺の組織学的特徴は、著名な肺出血を伴った、好中球浸潤を主体とする急性肺損傷像であった。これにより、HMGB 蛋白は、HMGB1, HMGB2 共に生命維持のために重要な役割を果たしていることは示唆されたが、これ以上のメカニズムの解明を行う手段が無く、生存期間の延長をはかるため、人工呼吸を行ったところ、死亡率の減少は図れなかったが、ATP が肺損傷に重要な役割を果たしていることが分かった。以後モデルを人工呼吸モデルマウスに変更し、そのメカニズムの解明を行い、P2Y 受容体と ATP の肺損傷との関連を検討した。P2Y 受容体阻害薬を肺内投与すると、人工呼吸中の肺損傷の程度が優位に減少した。なお、肺障害の評価は、組織学的評価および Permeability Index を用いた。

## 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)

Hiroki Matsuyama, Fumimasa Amaya, Soshi Hashimoto, Hiroshi Ueno, Satoru Beppu, Mitsuhiko Mizuta, Nobuaki Shime, Akitoshi Ishizaka and Satoru Hashimoto.

Acute lung inflammation and ventilator-induced lung injury caused by ATP via the P2Y receptors: an experimental study.

Respiratory Research, 78, 9, 2008. 査読有

Soshi Hashimoto, Fumimasa Amaya,

Hiroki Matsuyama, Hiroshi Ueno, Shojiro Kikuchi, Masaki Tanaka, Yoshihisa Watanabe, Masahito Ebina, Akitoshi Ishizaka, Sachiko Tsukita, and Satoru Hashimoto.

Dysregulation of lung injury and repair in moesin-deficient mice treated with intratracheal bleomycin.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 295, 566-574, 2008. 査読有

上野博司、松田知之、橋本悟、天谷文昌、北村佳博、黄英文、副島潤子、山田晋吾、石坂彰敏、丸山征郎. エンドトキシン投与急性肺損傷マウスモデルにおける抗HMGB1抗体の効果. 第9回Acute Lung Injury研究会講演集: 42-44, 2006. 査読無

[学会発表](計1件)

松山広樹, 天谷文昌, 橋本壮志, 上野博司, 橋本悟. 人工換気による肺損傷発生における細胞外ATPの関与. 第55回日本麻酔科学会学術集会, 横浜, 2008. 6.12

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

上野 博司 (UENO HIROSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 20381975

(2)研究分担者 該当なし

(3)連携研究者 該当なし