

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月13日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390071

研究課題名（和文）ヌクレオカインHMGB1由来ペプチドの脳血管透過性亢進作用の機序
解明研究課題名（英文）Mechanism for HMGB- or HMGB1-derived peptide-induced increase in
BBB permeability

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）：Damage-associated molecular pattern である High mobility group box-1 (HMGB1) は、虚血脳神経細胞や脳外傷局所の神経細胞核から細胞質を経て細胞外へ放出された。放出された HMGB1 は、血管内皮細胞、周皮細胞に働き、収縮性反応を誘導して脳血管透過性を亢進させた。HMGB1 由来ペプチドに、低血圧誘導その他の活性を見出した。抗 HMGB1 単クローン抗体は脳外傷時の脳血管透過性亢進と炎症反応を抑制した。

研究成果の概要（英文）：A representative damage-associated molecular pattern, high mobility group box-1 (HMGB1), was released from neuronal nuclei to extracellular space via cytosol after ischemia or traumatic brain injury. The released HMGB1 induced contractile response in vascular endothelial cells and pericytes leading to the increased permeability of BBB. Among HMGB1-derived peptides, some had plural activities. Anti-HMGB1 monoclonal antibody inhibited the BBB permeability and inflammatory responses induced by traumatic brain injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：HMGB1、脳血管透過性、脳浮腫、

1. 研究開始当初の背景

High mobility group box-1 (HMGB1) は、中大脳動脈閉塞によって誘導した虚血脳において神経細胞から細胞外へ放出され、血管透過

性の亢進、メタロプロテアーゼの活性化、ミクログリアの活性化などの起炎性の反応を駆動する。一方、抗HMGB1単クローン抗体の投与は、これら炎症性反応を抑制し脳梗塞巣を縮

小するだけでなく、協調運動などの神経症状を改善した。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに抗HMGB 1 抗体を用いて明らかにされたHMGB 1を標的とする脳虚血と脳血管透過性亢進治療法の有効性の知見に基づき、HMGB 1とHMGB 1由来ペプチドの脳血管透過性亢進の作用機序を明らかにする。さらに、HMGB 1由来ペプチドの新規活性を合成ペプチドを用いて探索する。抗HMGB 1抗体の医薬としての適応を拡大する目的で、脳血管透過性亢進をきたす脳外傷に対する有効性を評価する。

3. 研究の方法

(1) ラット脳血管内皮細胞、アストログリア細胞、ペリサイトの共培養からなる人工血液脳関門 (人工BBB) 培養系を用いて、組み換え体ヒトHMGB 1のBBBに対する作用の解析

(2) HMGB1の内部配列に対応する15アミノ酸残基長ペプチドのRAGE受容体アッセイにおける活性評価

(3) 脳外傷時の HMGB1 動態と脳血管透過性亢進に対する抗 HMGB1 抗体投与効果の評価

4. 研究成果

抗体医薬の有効性から脳梗塞治療の標的分子として同定した HMGB1 の内部配列に対応する 15 アミノ酸残基長のペプチドを HMGB1 の全長にわたって人工合成した。一方、HMGB1 とその受容体候補の一つである Receptor for Advanced Glycation Endproduct (RAGE) の細胞外ドメイン (sRAGE) を組み換え体蛋白として発現・精製し、マイクロタイタープレート内で受容体・リガンド結合実験系を構築した。HMGB1 をマイクロタイタープレート上に固相化し、液相にヒスチジンタグ付 sRAGE を添加し、一定時間インキュベートした後、フリーの RAGE を洗浄で除き、結合した sRAGE を NiNTA-HRP で検出して定量化した。さらに、RAGE の他のリガンドの一つである、Advanced

Glycation Endproduct (AGE-2, AGE-3) と sRAGE の結合実験系を確立した。この 2 つの結合実験系を用いて 40 種類の合成ペプチドの結合に対する影響を検討したところ、3 種類のペプチドに興味深い活性が見出された。その一つは、AGE-2/3-sRAGE 結合を著明に阻害する活性を有するペプチド 1 であった。このペプチド 1 を 5mg/kg, i. v. の用量で、ラット中大脳動脈閉塞 2 時間後、再灌流時に投与すると、通常脳梗塞形成がまだ生じない再灌流後 6 時間の時点で、すでにかんりの体積の梗塞巣が完成することがわかった。動脈血圧の測定で、このペプチドの静脈内投与の直後から、約 1 時間にわたる血圧低下効果が観察された。また、対照ペプチドとして合成した鏡面配列のペプチドにおいても、同様の持続性の低血圧誘導と著明な脳梗塞の増悪が明らかとなった。これらの結果は、その受容体関連機構についてはさらに検討が必要であるが、両ペプチドによる動脈血圧低下が、局所血流のさらなる低下を招き、その結果として数時間後に生じる脳壊死を加速したものと推察された。

HMGB1 由来のペプチドの性質をさらに明らかにするために、HMGB1 の受容体の一つである Receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) と、もう一つ別のリガンドである Advanced glycation endproduct (ウシ血清アルブミンの最終糖化産物) の試験管内結合実験系を構築し、それに対する HMGB1 由来のペプチドの効果について検討した。その結果、AGE-可用性 RAGE 結合を促進する 2 つのペプチドと AGE-可用性 RAGE 結合を阻害する一つのペプチドを同定した。個々のペプチドの作用は、AGE1, AGE2, AGE3, AGE4, AGE5 いずれのリガンドを用いた場合も共通していた。AGE-可用性 RAGE 結合を阻害したペプチドは、低血圧状態を惹起し、中大脳動脈閉

塞・再灌流によるラット脳梗塞を増悪したペプチドと一致した。

HMGB1 の脳血管透過性亢進作用を *in vitro* で検討するモデルとして、ラット脳血管内皮細胞、アストログリア細胞、ペリサイトの共培養系からなる人工血液脳関門（人工 BBB）培養系を導入した。この *in vitro* 血液—脳関門培養系(BBB)を用いて、血管透過性に対する HMGB1 の効果を検討した。本試験管内 BBB 系は、孔径 0.4 ミクロン、厚さ 10 ミクロンのポリエステル人工膜によって上室と下室に隔てられており、ポリエステル膜上に血管内皮細胞が単層培養され、ポリエステル膜を隔てて周皮細胞が反対側に接着する。さらに下室の底面にアストログリア細胞が単層培養されている。この *in vitro* BBB 実験系において、下室に昆虫細胞 Sf9 を使って作製した LPS-free のヒスタグ付きヒト組換え体 HMGB1 を、1 あるいは 10 μ g/ml 添加し、上下室間の電気抵抗の変化とエバンスブルー標識ウシ血清アルブミンの漏出を測定したところ、組換え体 HMGB1 は、濃度依存的に血管透過性を亢進させ、電気抵抗を低下させることが明らかとなった。HMGB1 の C 末端配列を認識する単クローン抗体を予め組換え体 HMGB1 とともにプレインキュベーションしておく、HMGB1 の血管透過性亢進作用ならびに電気抵抗減弱作用は抑制された。このとき、それぞれの細胞層の構造変化を F-actin のファロイジン染色で観察したところ、血管内皮細胞と周皮細胞に収縮性の変化が認められ、細胞間隙の形成が生じていた。一方、底面のアストログリアをエバンスブルーによる蛍光染色で観察したところ、アストログリアには著明な形態変化は認められなかった。以上の結果から、*in vivo* で観察された HMGB1 による脳血管の透過性亢進は、HMGB1 が脳血管内皮細胞と周皮細胞に直接作用し

た結果であることが強く示唆された。

虚血と同様に脳血管の透過性を亢進させる病態として、Fluid percussion による脳外傷モデルを作製した。受傷部の神経脱落、局所脳浮腫、血液—脳関門の構造的破綻が生じていることを、それぞれ Nissl 染色、エバンスブルー漏出測定、透過電子顕微鏡観察で確認した。受傷後、6、12 時間後に脳を固定し、HMGB1 トランスロケーションについて共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織化学的染色法で観察をおこなった。受傷部位では、衝撃を受けた方向に一致して神経細胞内の HMGB1 が消失していた。これらの神経細胞内では、MAP-2 免疫陽性構造も低下していた。それに対し、アストログリア細胞とミクログリア細胞の核内 HMGB1 は受傷部位でもよく保持されていた。抗 HMGB1 単クローン抗体あるいは対照抗体(anti-KLH, IgG2a)を、1mg/kg 経静脈的に脳外傷受傷直後と 6 時間後の 2 回投与し、脳血管透過性亢進に対する効果をアルブミン（エバンスブルー）漏出の抑制効果で評価した。その結果、抗 HMGB1 抗体はエバンスブルーの漏出を 85%抑制した。以上の結果から、抗 HMGB1 抗体は脳外傷急性期の脳血管透過性亢進も極めて有効に抑制できる治療薬であることがわかった。

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 13 件)

- ① Shichida T., Nishibori M., et al. (18 名、14 番目) Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. **Nature Medicine**, in press. (査読有)
- ② Okuma Y., Liu K., Wake H., Nishibori M., et al. (16 名、16 番目), Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Therapy for Traumatic Brain Injury. **Annals of Neurology**, in press. (査読有)

③Zhang J, Liu K, Wake H, Nishibori M. et al. (11名、11番目) Anti-high Mobility Group Box-1 Monoclonal Antibody Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemia-Induced Disruption in Rats. **Stroke**. 42(5): 1420-1428, 2011. (査読有)

④Kanellakis P, Liu K, Nishibori M, et al. (11名、10番目) Bobik A. High-Mobility Group Box Protein 1 Neutralization Reduces Development of Diet-Induced Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 31 (2) : 313-9, 2011. (査読有)

⑤Adachi N, Liu K, Nishibori M. et al. (7名、7番目) Reduction of the infarct size by simultaneous administration of l-histidine and diphenhydramine in ischaemic rat brains. **Resuscitation**, 82 (2) :219-21, 2011. (査読有)

⑥Mori S, Liu K, Wake H, Nishibori M. et al. (8名、8番目) Ciprofloxacin inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. **Br J Pharmacol**, 161:229-40, 2010. (査読有)

⑦Zhang J, Liu K, Wake H, Nishibori M. et al. (11名、11番目) Histamine inhibits adhesion molecule expression in human monocytes, induced by advanced glycation end products, during the mixed lymphocyte reaction. **Br J Pharmacol**, 160 : 1378-86, 2010. (査読有)

⑧ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Nishibori M. et al. (11名、11番目) 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 : 964-72, 2010. (査読有)

⑨Takahashi HK, Liu K, Wake H, Nishibori M et al. , (8名、8番目) Effect of nicotine on advanced glycation end product-induced immune response in human monocytes. **J Pharmacol Exp Ther**, 332:1013-1021, 2010. (査読有)

⑩Ohashi K, Liu K, Wake H, Nishibori M et al. , (11名、10番目) Advanced glycation

end products enhance monocyte activation during human mixed lymphocyte reaction. **Clin Immunol**, 134:345-353, 2010. (査読有)

⑪Takahashi HK, Liu K, Wake H, Nishibori M et al. , (8名、8番目) Prostaglandins E2 inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression, cytokine production and lymphocyte proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. **J Pharmacol Exp Ther**, 331:656-670, 2009. (査読有)

⑫Wake H, Takahashi HK, Liu K, Nishibori M et al. , (6名、6番目) Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. **J. Pharmacol Exp Ther**, 330:826-33, 2009. (査読有)

⑬Takahashi HK, Wake H, Liu K, Nishibori M et al. , (10名、10番目) 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. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

①西堀正洋, 抗HMGB1単クローン抗体はラット脳虚血による血液-脳関門の破綻を制御する, 第34回日本神経科学大会, 2011.9.17, パシフィコ横浜.

②劉克約, 西堀正洋, 他4名, 脳虚血早期におけるHMGB1の動態, 第84回日本薬理学会年会, 神奈川, 2011.3.22, パシフィコ横浜.

③Liu K, Anti-high mobility group box1 monoclonal antibody protects blood-brain barrier from ischemic insult in rat, 14th International Congress Of Immunology, 2010.8.26, Kobe International Exhibition Hall.

④Liu K, Nishibori M. Disruption of BBB in rat MCAO and a protective effect of anti-HMGB1 antibody. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 2010.7.19, Bella Center Copenhagen, Denmark.

⑤Nishibori M, 他10名. A novel anti-HMGB1 treatment for brain infarction: protection of BBB disruption. The 4th international HMGB1 symposium signals of tissue damage, Helsinki, 2010.6.23, University Main

Building Helsinki, Finland.

⑥西堀正洋, 抗体医薬による血管疾患治療と創薬プラットフォーム構築, 第 130 年会日本薬学会, 2010. 3. 30, 岡山コンベンションセンター他.

⑦劉 克約, 西堀正洋, 他 6 名, ラット中大脳動脈閉塞・再灌流モデルにおける抗 HMGB1 単クローン抗体の効果: 脳血管透過性亢進に対する影響, 第 83 回日本薬理学会年会, 2010. 3. 18, 大阪国際会議場.

⑧ Alex Bobik, Nishibori M, 他 8 名, A Proatherogenic Role for HMGB1 in Atherosclerosis. American Heart Association Meeting, Orland, Florida, USA, 2009. 11. 18, Orange County Convention Center.

⑨西堀正洋, 他 6 名, 脳虚血時における HMGB1 動態の初期変化, 第 32 回日本神経科学大会, 2009. 9. 17, 名古屋国際会議場.

⑩西堀正洋, HMGB1 を標的とした抗体医薬による脳梗塞の新規治療法, 第 8 回国際バイオフォーラム, 2009. 7. 3, 東京ビックサイト.

[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: 西堀正洋他 7 名

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-270133

出願年月日: 22 年 1 月 3 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: 西堀正洋他 4 名

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-214019

番号 (国際): PCT/JP2011/071669

出願年月日: 22 年 9 月 24 日

国内外の別: 国内、国際

③名称: アテローム動脈硬化抑制剤

発明者: 西堀正洋他 5 名

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2009-223472

番号 (国際): PCT/JP2010/066683

出願年月日: 21 年 9 月 28 日

国内外の別: 国内、国際

[その他]

ホームページ等

<http://www.cc.okayama-u.ac.jp/~pharmaco>

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 (RYU KATSUYAKU)

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

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

(H21~H22 まで)

(3) 連携研究者