

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 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590594

研究課題名（和文） 単クローン抗体による脳梗塞及び脳浮腫の治療法開発

研究課題名（英文） Development of monoclonal antibodies therapy for cerebral infarction and cerebral edema

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

High mobility group box1(HMGB1)は、壊死細胞核から細胞外へ放出される新規サイトカイン分子である。申請者は、HMGB1を標的とする抗体医薬を発想し、すでにラット中大脳動脈2時間閉塞・再灌流モデルを用いて、抗 HMGB1 単クローン抗体の劇的な脳梗塞の改善、脳浮腫の抑制作用を明らかにしてきた。虚血再灌流の脳障害に対して、抗 HMGB1 抗体は BBB 構造・機能の保護を中心として多数の炎症応答反応を抑制することで、脳梗塞の進行を止め、脳を保護したことを解明した。

研究成果の概要（英文）：High mobility group box1(HMGB1) originally identified as an architectural nuclear protein exhibits an inflammatory cytokine-like activity in the extracellular space. We showed that treatment with anti-HMGB1 monoclonal antibody (mAb) remarkably ameliorated brain infarction and edema induced by 2-hours middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats, even when the mAb was administered after reperfusion. Our results indicated that anti-HMGB1 mAb efficiently inhibited the development of brain edema through the protection of blood-brain barrier (BBB) structure in the ischemic region.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：脳梗塞、脳浮腫、抗体医薬、血液脳関門、炎症、HMGB1

1. 研究開始当初の背景

日本人の三大疾患とは、ガン、心筋梗塞、そして脳卒中と言われ、脳卒中の6～7割が脳梗塞で占められる。我々は脳梗塞巣が脳内炎症反応の関与によって、初期の脳障害から拡大形成されることに注目し、起炎性の活性物質HMGB1に着目し

た。HMGB1抗原特異的で、高親和性結合をする単クローン抗体を作製し治療用抗体として選択した。ラット中大脳動脈2時間閉塞・再灌流の脳梗塞モデルにおいて、極めて有効に働く抗体を以前の研究で見出した。現在、脳卒中中等の脳損傷

により発生する脳浮腫の薬物治療は、グリセオール、マニトール等の高浸透圧溶液の点滴静注であるが、利尿作用により血漿中の水分を減少させ、その結果高Na血症、低K血症、溶血、心不全等の副作用を起こす恐れがある。そのため、末梢組織での体液バランスには影響を与えないような、新たな薬物の開発が望まれている。

2. 研究の目的

脳虚血・再灌流障害早期に虚血領域のBBB透過性の亢進にはサイトカイン(IL-1 β 、TNF- α)、VEGF、NOを含むいくつかの因子の産生が深く関与していることが報告されている。現在、HMGB1は生体警告信号分子の代表と考えられ注目される炎症性サイトカインである。近年、敗血症、急性肺障害、リウマチ等炎症性病態の誘導、進行と関連があることが明らかにされている。さらに脳虚血におけるHMGB1の病理学的役割が注目される。健常成人と比較し、脳梗塞患者の血清中HMGB1は高レベル持つことも報告された。これらの結果より虚血早期において、HMGB1の神経細胞からの放出は炎症応答の最初期ステージで生じるのではないかと考えられる。以前の研究結果より、虚血・再灌流3時間後、Evans blueの濾出を指標した血管透過性の亢進は抗HMGB1単クローン抗体の中和作用で抑制されたことから、血液-脳関門(BBB)破綻を促進する要因としてHMGB1が重要な役割を持っていると考えられた。

3. 研究の方法

ウイスター系雄性ラットを用いて、吸入麻酔下にシリコンコーティングした4.0ナイロン糸の塞栓子を内頸動脈に挿入し、中大脳動脈起始部を2時間閉塞した後、再灌流した。再灌流直後に抗HMGB1抗体または対照抗体を投与し((800 μ g/kg/iv) BBBの保護効果及びメカニズムを検討した。

(1)抗HMGB1単クローン抗体の特性の検討得ら

れた3クローンについてドットプロットングによりエピトープを決定した。

(2)脳虚血後、生体内におけるHMGB1の変化
HMGB1測定Elisaキットを用いて、モデル動物の血液中、脳脊髄液中のHMGB1濃度を測定した。

(3)脳虚血におけるHMGB1の脳内局在
HMGB1の免疫染色はmouse anti-HMGB1抗体またはrabbit anti-HMGB1抗体を使用した。ニューロン、アストログリア、ミクログリア細胞のマーカーとしてMAP-2、GFAP、Iba1を用いて二重蛍光染色した。

(4)脳浮腫における抗HMGB1単クローン抗体の効果

虚血・再灌流3時間後、虚血側と非虚血側の大脳皮質、線条体、視床下部、海馬の組織の水分含量を求めた。

(5)MRI(T2強調)を用いて脳浮腫の経時的な形成の観察

(6)培養系BBBキットを用いてHMGB1の血管透過性作用の検討

ファーマコセル株式会社が開発した世界初である生体の複雑な血液-脳関門(BBB)と近似的な機能を持つ培養系モデルを用いて、虚血再灌流障害によりBBB透過性亢進のメカニズムと抗HMGB1抗体の効果を検討した。

(7)透過性電子顕微鏡を用いて脳の微小血管の観察

(8)虚血性脳浮腫におけるHMGB1由来ペプチドの役割及びメカニズムの解析

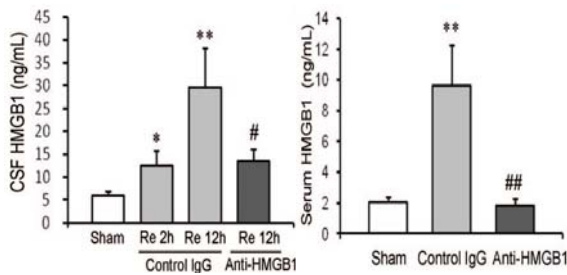
活性の最小単位を追求した人工合成のペプチドを作製し脳血管透過性亢進作用を検討した。

4. 研究成果

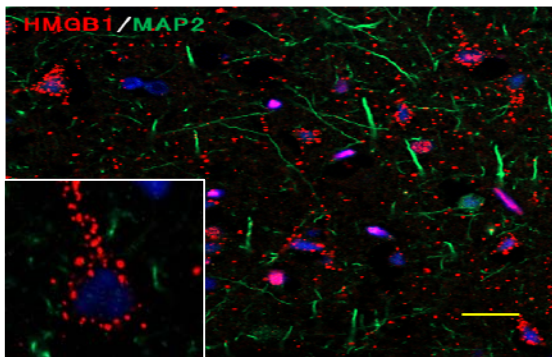
(1)3つの単クローン抗体のエピトープの決定を行った。その結果、#10-22はHMGB1の末端配列を他の2クローン(#11-19, #4-1)はB-box内の共通配列を認識した。プラズモン共鳴法による親和性の解析で#10-22が最も

親和性の高い抗体であることが分かった。

(2) HMGB1 enzyme-linked immunosorbent assay キットを用いて、血液中、脳脊髄液中のHMGB1濃度を測定した。再灌流12時間後HMGB1の血中濃度は明らかに上昇した。一方、脳脊髄液中のHMGB1濃度は時間依存性上昇した(図1)。これらHMGB1の上昇は抗HMGB1単クローン抗体の投与で有意に抑制した。

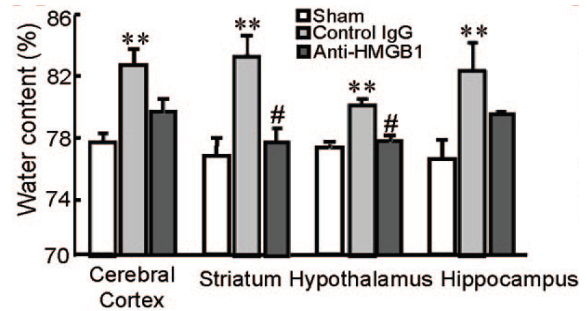


(3) HMGB1抗原免疫染色の結果より、健常ラット脳においては、HMGB1抗原はニューロンとグリア細胞の核内に拡散性に局在しているが、虚血脳で、線条体及び頭頂葉から側頭葉大脳皮質領域で、ニューロンの核内に局在したHMGB1抗原は核膜部位に集積後、細胞質へ時間依存性に移行した。さらに、細胞質に移行したHMGB1は時間経過とともに細胞形質膜上に顆粒状の形態で配列する像が観察された(図2)。このような変化は抗HMGB1単クローン抗体投与によって抑制された。

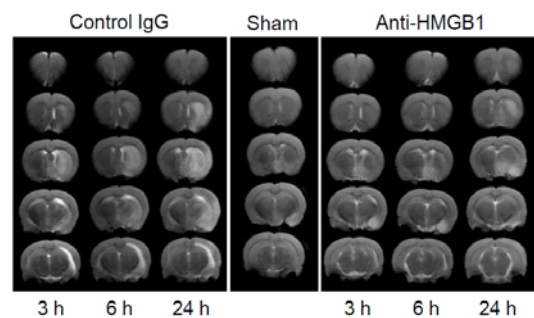


(4) 健常ラットの大脳皮質、線条体、視床下部、海馬各部位の脳組織水分含量は約76~78%で、虚

血・再灌流障害によって82.8%, 83.3%, 80.0%, 82.3%に増加した。抗HMGB1単クローン抗体投与群は各部位の脳組織水分含量の増加を抑制した(図3)。再灌流3時間後、大脳皮質、線条体のAQP4の陽性反応像は抗HMGB1単クローン抗体投与によって著明に抑制された。

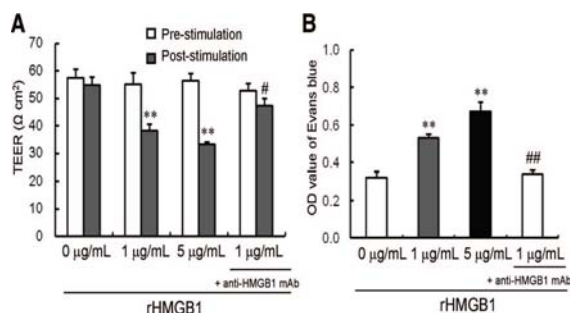


(5) 臨床で最も使われる非侵襲的な検査方法MRI (T2強調)を用いて、虚血・再灌流後3時間、6時間、12時間、24時間の時点で経時的な脳浮腫の形成を観察した。脳組織水分含量の結果と同様に虚血・再灌流後3時間から時間依存性な脳浮腫の進行が明らかにされた。抗HMGB1単クローン抗体を投与すると脳浮腫の拡大が抑制された(図4)。

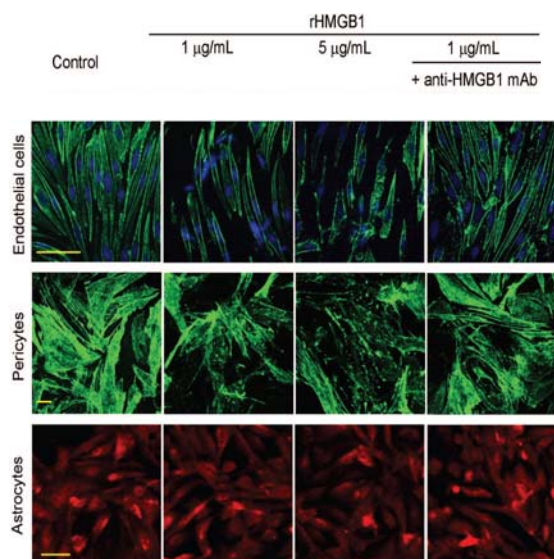


(6) 培養系BBBキットの実験ではHMGB1組み換え体(rHMGB1)を脳側に添加し、Evans blue-albuminを血管側に添加した。インキュベーション1時間後、脳側へ漏出したEvans blue-albuminあるいはバリアー機能を測定する指標として電気抵抗値を測定した。rHMGB1添加によって濃度依存的に抵抗値が低下すること(図

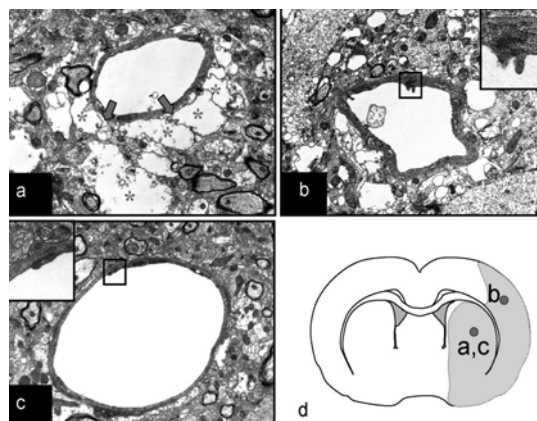
5.A)、脳側へ濾出したEvans blue-albuminを増加すること(図5.B)が分かった。



抗HMGB1単クローン抗体を添加することでこのような変化が抑制された。実験終了時点で血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトの3種類のBBBの構成細胞をファロイジン染色し、レーザー顕微鏡で細胞の形態を観察した。血管内皮細胞とペリサイトは、rHMGB1の添加によって細胞の収縮性変化と細胞間の隙間が広がった像が見られた。アストロサイトは眼立つ変化が見られなかった(図6)。



(7)虚血・再灌流3時間後、透過型電子顕微鏡で観察した結果。脳微小血管は二つの変化が見られた。①アストロサイト終足の腫脹(図7a)。②タイト結合の解離(図7b)。③抗体投与群はこのような変化が見られなかった(図7c)。



(8) ラット脳虚血・再灌流モデルに活性の最小単位を追求した人工合成のHMGB1由来ペプチドを投与した3時間後から激しい脳浮腫を発症した。脳浮腫病態の進行、増悪とHMGB1の影響が大きく関与していることが示唆された。

抗HMGB1単クローン抗体による治療は、虚血早期に動員されるHMGB1のトランスロケーションを抑え、さらにHMGB1によって血液-脳関門の構造的ならびに機能的破綻を抑制できることを明らかにした。これまでの脳梗塞治療薬とは作用機序の全く異なる抗HMGB1抗体は、新規治療薬として臨床応用が強く期待される。これらの研究結果についてはStroke に「Anti-HMGB1 mAb protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats」として報告した。

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 14 件)

- ①Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. Stroke. 42(5):1420-8, 2011 査読有

- ②Kanellakis P, Agrotis A, Kyaw TS, Koulis C, Ahrens I, Mori S, Takahashi HK, Liu K, Peter K, Nishibori M, Bobik A.
High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. 査読有
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31(2):313-9, 2011
- ③Mori S, Wake H, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M.
Anti-Sp100 antibody 査読有
Nihon Rinsho. 68 Suppl 6:711-3. 2010
- ④Takahashi 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. 査読有
J Pharmacol Exp Ther. 34(3):964-72, 2010
- ⑤Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M. Effect of nicotine on advanced glycation end product-induced immune response in human monocytes. 査読有
J Pharmacol Exp Ther. 332(3):1013-21, 2010
- ⑥Ohashi 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. 査読有
Clin Immunol. 134(3):345-53, 2010
- ⑦Takahashi HK, Mori S, Liu K, Wake H, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M.
Beta2-adrenoceptor stimulation inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. 査読有
Eur J Pharmacol, 627(1-3):313-7, 2010
- ⑧Wake H, Mori S, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M.
High mobility group box 1 complexed with heparin induced angiogenesis in a matrigel plug assay. 査読有
Acta Med Okayama, 63(5):249-62, 2009
- ⑨Wake 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. 査読有
Eur J Pharmacol, 623(1-3):89-95, 2009
- ⑩Liu 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. 査読有
Acta Med Okayama, 63(4):203-11, 2009
- ⑪Takahashi 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 査読有
J Pharmacol Exp Ther, 331(2):656-70, 2009
- ⑫Wake H, Takahashi HK, Mori S, Liu K, Yoshino T, Nishibori M.
Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. 査読有
J Pharmacol Exp Ther, 330(3):826-33, 2009
- ⑬Takahashi 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. 査読有
J Pharmacol Exp Ther, 330(1):89-98, 2009
- ⑭Mori S, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M.
Therapeutic effect of anti-nucleokine monoclonal antibody on ischemic brain infarction 査読有
Yakugaku Zasshi, 129(1):25-31, 2009

〔学会発表〕(計 7 件)

①劉 克約(他)

抗 HMGB1 抗体は脳虚血誘発性の血液-脳関門破綻を防ぐ

第 119 回日本薬理学会近畿部会

2011 年 7 月 8 日:愛知県産業労働センター

②劉 克約(他)

脳虚血早期における HMGB1 の動態

第 84 回日本薬理学会年会

2011 年 3 月 22 日:パシフィコ横浜

③劉 克約(他)

ヒスチジンとジフェンヒドラミン併用による脳梗塞縮小効果

第 14 回日本ヒスタミン学会

2010 年 10 月 24 日:神奈川川崎グランドホテル

④劉 克約(他)

Anti-high mobility group box1 monoclonal antibody protects blood-brain barrier from ischemic insult in rat.

14th International Congress Of Immunology

2010 年 8 月 26 日:Kobe International Exhibition Hall, Kobe, Japan.

⑤劉 克約(他)

Disruption of BBB in rat MCAO and a protective effect of anti-HMGB1 antibody.

16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology

2010 年 7 月 19 日:Bella Center Copenhagen, Denmark

⑥劉 克約(他)

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 年 3 月 18 日:大阪国際会議場

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3 件)

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:特願

番 号:特願 2010-270133

出願年月日:H22 年 12 月 3 日

国内外の別:国内

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:特願

番 号:特願 2010-214019

PCT/JP2011/071669

出願年月日:H22 年 9 月 24 日

国内外の別:国内、国外

名 称:アデローム動脈硬化抑制剤

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:岡山大学

種 類:特願

番 号:特願 2009-223472

PCT/JP2010/066683

出願年月日:H21 年 9 月 28 日

国内外の別:国内、国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(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

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

(H23 のみ)

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