

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590658

研究課題名(和文) 霊長類動物モデルを用いた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 in primate animal mode

研究代表者

劉 克約 (ryu, katsuyaku)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40432637

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)：霊長類動物の脳梗塞モデルを用いて、抗HMGB1単クローン抗体について治療効果とメカニズムを検討した。その結果、抗HMGB1単クローン抗体はBBB構造・機能の保護を中心として脳を保護することを示した。虚血によって、HMGB1は細胞核内から細胞外へトランスロケーションされることが確認された。トランスロケーションされたHMGB1は細胞小器官内に輸送される可能性が示唆された。抗HMGB1単クローン抗体の効果は、虚血早期に動員されるHMGB1のトランスロケーションを抑制することが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：We developed cerebral ischemia and reperfusion injury model using primate animal. In this model, we demonstrated that Anti-HMGM1 monoclonal antibody (mAb) is able to effectively inhibit the development of brain edema in the ischemic region. This edema inhibitory effect is most likely achieved through the protection of the blood brain barrier (BBB) structure in the ischemic region. We also found that HMGB1 was transported from nuclear to the extracellular space likely due to ischemic vascular lesion, and probably transported to the cell organelles as well. The results suggest that the brain tissue protection effect of HMGB1 mAb may be due to its ability to block HMGB1 nuclear-cytoplasmic translocation in the early reperfusion phase following the focal ischemia in the brain tissue.

研究分野：医歯薬学

キーワード：霊長類動物 脳梗塞 脳浮腫 抗体医薬 血液-脳関門 HMGB1

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は日本人の死因の第3位を占め、その内約60%は脳梗塞によるものである。現在、脳梗塞の急性期治療薬として、組換え体 t-PA やラジカススカベンジャーのエダラボンが臨床応用されているが、有効治療時間帯の制限や虚血再灌流障害あるいは副作用等の問題があり、真に有効な治療法開発が望まれて久しい。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。臨床応用を進めるため、霊長類動物を用いた臨床に近い脳梗塞モデルの評価は必要である。我々は臨床で使用されている脳血管内手術の技術を使用され、低侵襲な中大脳動脈閉塞・再灌流モデルを作成した。さらに抗 HMGB1 抗体の神経保護効果、メカニズム及び安全性の確認、必要な情報を集める。

2. 研究の目的

脳虚血・再灌流障害早期に虚血領域の血液脳関門透過性の亢進にはサイトカイン (IL-1、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。虚血における HMGB1 トランスロケーション機構を解明することをめざした。

3. 研究の方法

ニホンザルを用い吸入麻酔下に脳内手術用バルーン付きマイクロワイヤーを移動型血管造影装置で、確認しながら腹大動脈から下行大動脈経由し、内頸動脈にアプローチした。バルーン付きマイクロワイヤーを中大脳動脈領域まで留置し、2時間血流遮断・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)神経保護効果、及びメカニズムを検討した。

(1)ニホンザル、コモン・マーモセットの脳虚血・再灌流モデルで障害後、HMGB1 のトランスロケーションについて調べた。

(2)トランスロケーションされた HMGB1 を追跡検討した。

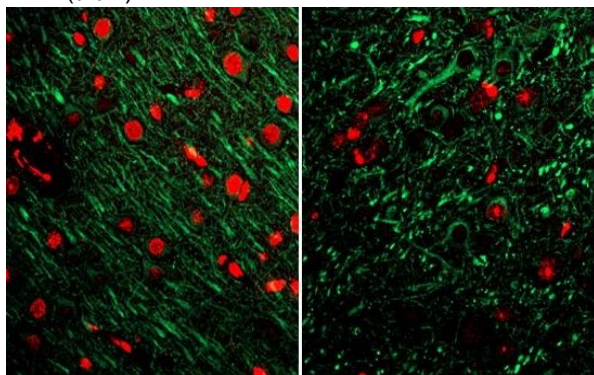
HMGB1 トランスロケーションと神経細胞内顆粒状構造物の同定を免疫二重染色法と免疫電顕法で解析した。

4. 研究成果

(1)脳組織の免疫染色の結果により、モデル動物の脳の非障害側において HMGB1 抗原は神経細胞とグリア細胞の核内に多く局在していることが、共焦点レーザー顕微鏡観察で明らかにされた。中大脳動脈閉塞・再灌流障害によって、虚血領域の神経細胞の核内に局在した HMGB1 は核膜部位に集積後、細胞質へ移行し、細胞外にトランスロケーション像が観

察された (図 1)。

(図 1)

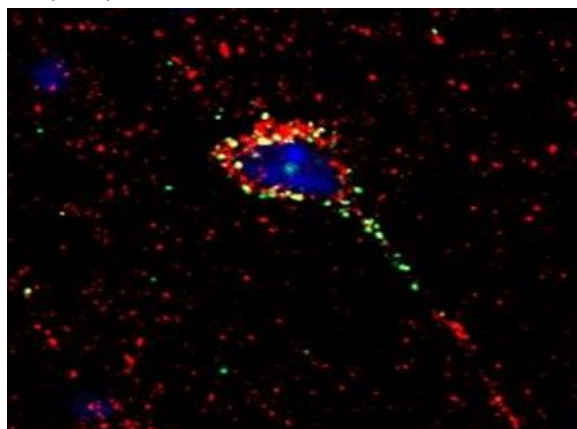


脳非障害例

脳障害例

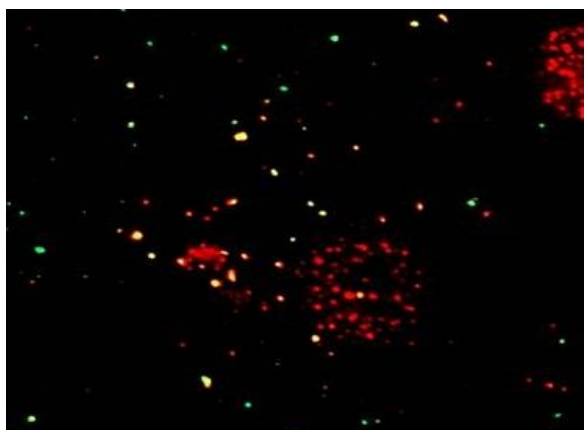
(2) 脳虚血領域に神経細胞核内の HMGB1 は細胞質に出た後、細胞小器官のミトコンドリア (図 2) とペルオキシゾーム (図 3) に局在することが分かった。

(図 2)



赤色-HMGB1 緑色-ミトコンドリア

(図 3)



赤色-HMGB1 緑色-ペルオキシゾーム

マーモセットの低侵襲一過性中大脳動脈閉塞・再灌流モデルで、虚血 48 時間後の脳に

おいて、ラットと同様の HMGB1 トランスロケーションが明らかとなった。HMGB1 の免疫電顕染色で追跡すると、トランスロケーションされた HMGB1 はミトコンドリア外膜を超えて小器官内に輸送される可能性が示唆された。これらの細胞小器官に移行した HMGB1 が低酸素ストレス下にある神経細胞の代謝の制御に関与することが示唆された。抗 HMGB1 抗体治療は、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 6 件)(全て査読有)

1. Liu K, Yorozuya T, Adachi N, Motoki A, Ninomiya K, Mabuchi H, Iwamoto N, Nishibori M. Suppression of peritoneal thickening by histamine in a mouse model of peritoneal scraping. Clin Exp Nephrol, online first 2014. DOI 10.1007/s10157-014-1027-5
2. 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, 85:18-26, 2014. DOI:10.1016/j.neuropharm.2014.05.007.
3. 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. 718:305-13, 2013. DOI:10.1016/j.ejphar.2013.08.017
4. Nakamura Y, Morioka N, Abe H, Zhang FF, Nakashima KH, Liu K, Nishibori M, Nakata Y. Neuropathic pain in rats with a partial sciatic

nerve ligation is alleviated by intravenous injection of monoclonal antibody to high mobility group box-1.

PLoS ONE, 8(8):e73640, 2013.

DOI:10.1371/journal.

5. 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*, 701:194-202, 2013. DOI:10.1016/j.ejphar.2012.11.058
6. 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*, 72(3):373-84, 2012.

[学会発表](計 11 件)

1. 王登莉、劉克約、西堀正洋
抗 HMGB1 抗体による脳内出血とクモ膜下出血後の脳血管攣縮治療
第 88 回日本薬理学会年会 シンポジウム, 名古屋, 2015.
平成 27 年 3 月 18 日: 名古屋国際会議場
2. 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, 仙台, 2014.
平成 26 年 3 月 20 日: 仙台国際センター
3. Nishibori M, Liu K, Takahashi HK, Mori S. Anti-HMGB1 Antibody Therapy for Brain Ischemia, Brain Injury and Neuropathic Pain. *International Drug Development Science & Technology* 2014
平成 26 年 11 月 18 日: Suzhou, China.

4. 劉克約、富麗、和氣秀徳、勅使川原匡、西堀正洋

ビルカルピンで誘発癲癇モデルにおける抗 HMGB1 単クローン抗体の効果

第 86 回日本薬理学会年会, 福岡, 2013.

平成 25 年 3 月 22 日: 福岡国際会議場

5. 大島佳奈、劉克約、和氣秀徳、森秀治、西堀正洋、高橋英夫

ヒト PBMC、マウス脾臓細胞における HMGB1 活性が及ぼす細胞間相互作用の役割

第 86 回日本薬理学会年会, 福岡, 2013.

平成 25 年 3 月 23 日: 福岡国際会議場

6. 大熊佑、劉克約、春間純、高橋英夫、森秀治、西野繁樹、伊達勲、西堀正洋

DAMP としての HMGB1: 脳外傷と肺障害

第 24 回日本急性血液浄化学会学術集会, 札幌, 2013.

平成 25 年 9 月 13-14 日ワークショップ指名発表

7. 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

平成 25 年 10 月 9 日: New York, USA.

8. 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.

平成 25 年 9 月 12-14 日: Sümeg, Hungary.

9. Okuma Y, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Haruma J, Date I, Nishibori M. Glycyrrhizin therapy for traumatic brain injury.

Shanghai BRAIN 2013.

平成 25 年 5 月 22 日: Shanghai, China.

10.大熊 佑、劉克約、春間純、戸村哲、大谷直樹、島克司、高橋英夫、森秀治、西堀正洋、伊達勲

抗 high mobility group box-1 (HMGB1)抗体の頭部外傷モデルにおける神経保護効果の可能性

第18回日本脳神経外科救急学会，弘前，2013.

平成25年2月9日：ベストウエスタンホテルニューシティ弘前

11.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.

平成24年10月15日：New Orleans, USA

【産業財産権】

○出願状況（計3件）

1.名称：インフルエンザ治療剤

発明者：西堀正洋、劉克約、塚原宏一、森島恒雄、八代将登、野坂宜之

権利者：岡山大学

種類：特願

番号：特願 2014-265514

出願年月日：2014/12/26日

国内外の別：国内

2.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：岡山大学

種類：特願

番号：特願 PCT/JP2013/064779,

WO/2013/183494

出願年月日：2013/5/28

国内外の別：国外

3.名称：好中球活性化調節剤

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

権利者：岡山大学

種類：特願

番号：特願 2012-129232

出願年月日：2012/6/6

国内外の別：国内、国外

○取得状況（計1件）

1.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：岡山大学

種類：特願

番号：特願 PCT/JP2013/064779

WO/2013/183494

出願年月日：2013/5/28

取得年月日：2013/12/12

国内外の別：国外

【その他】

ホームページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/pharmaco/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

劉 克約 (RYU KATSUYAKU)

研究者番号：40432637

(2)研究分担者

西堀 正洋 (NISHIBORI MASAHIRO)

研究者番号：50135943

(3)連携研究者