

200917010A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMG B1」
に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究に
関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22(2010)年 5月

研究代表者

西 堀 正 洋

目 次

I. 総括研究報告	
生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」 に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究 西堀 正洋	1
II. 分担研究報告	
1. 脳梗塞モデルに関する研究 劉 克約、高橋 英夫、森 秀治 (資料) 脳梗塞モデルに関する研究	6
2. 抗HMGB1抗体の毒性試験に関する研究 吉野 正、松川 昭博 (資料) 1. 抗HMGB1単クローン抗体のラットにおける 単回静脈内投与毒性試験 2. 抗HMGB1単クローン抗体のラットにおける 1週間反復静脈内投与毒性試験	25
3. 粥状動脈硬化症モデルに関する研究 槇野 博史 (資料) 粥状動脈硬化症モデルに関する研究	46
4. クモ膜下出血後の脳梗塞攣縮モデル に関する研究 伊達 勲 (資料) クモ膜下出血後の脳血管攣縮モデルに 関する研究	51
5. 抗HMGB1単クローン抗体の大量精製法の確立と 抗体特性解析に関する研究 友野 靖子、森 秀治 (資料) 抗HMGB1単クローン抗体の大量精製法の 確立と抗体特性解析に関する研究	57
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究代表者 西堀 正洋 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨:ラット抗 HMGB1 単クローン抗体の特徴付け、虚血脳
の血液-脳関門の破綻と抗体効果の解析、ラットへの抗体単
回・反復投与による毒性試験、マウス動脈硬化症モデルにおける
抗体慢性投与効果の証明、ウサギクモ膜下出血後の脳血管攣縮に
おける抗体効果の証明を完了した。

研究分担者

高橋英夫（岡山大院医歯薬学・准教授）
劉 克約（岡山大院医歯薬学・助教）
横野 博史（岡山大院医歯薬学・教授）
松川 昭博（岡山大院医歯薬学・教授）
伊達 勲（岡山大院医歯薬学・教授）
吉野 正（岡山大院医歯薬学・教授）
森 秀治（就実大学薬学部・教授）
友野 靖子（重井医学研究所
分子細胞生物部門・室長）

A. 研究目的

抗 HMGB1 抗体治療をヒト脳梗塞急性期の治療薬として臨床応用するために、現行の治療薬である組織型プラスミノゲンアクチベータやエダラボンとの違いを作用機序、有効性、安全性全ての面から明確にする必要がある。本研究では、抗体の特性解析から最適抗体を選定し、脳虚血後の超急性期から生じると考えられる血液-脳関門の破綻に特に焦点をあて、抗体効果を解析した。安全性につながる毒性試験は、単回ならびに反復投与を実施した。脳血管攣縮ならびに脳動脈硬化症への応用可能性をモデル動物で証明した。

B. 研究方法

3種類の抗 HMGB1 単クローン抗体のエピトープを決定し、抗原に対する親和性を表面プラズモン共鳴法で測定した。3種類のクローン抗体から最適のクローンを選出した。Wistar 系雄性ラットの中大脳動脈閉塞・再灌流モデルを用いて、虚血後の血液-脳関門（血管内皮細胞の緻密結合、細胞内小器官、アストログリア細胞の終足、基底膜構造）を、透過型電子顕微鏡で観察した。

アストログリア細胞の終足腫脹を定量化し、関門構造の破綻の指標とした。抗 HMGB1 抗体あるいは抗 *Keyhole limpet hemocyanin* 抗体（対照抗体）を再灌流直後に静脈内投与し、血液-脳関門破綻に対する抗体効果を比較した。脳浮腫の T2 強調-MRI 解析では、再灌流 3 時間から測定を開始し、6、12、24 時間、7 日で MRI 測定した。ApoE ノックアウトマウスに高脂肪食を負荷する動脈硬化症モデルを用いて、慢性的な抗 HMGB1 抗体投与が、粥状硬化巣発生を抑制できるかどうかを検証した。ウサギの自己血の大槽内投与によって誘導される脳底動脈血管攣縮に対する抗体投与の効果を検証した。急性単回ならびに反復投与による毒性試験をラットを用いて行なった。

（倫理面への配慮）

動物実験は岡山大学動物実験委員会の許可を受けた後、指針に基づき実施した。

C. 研究結果

HMGB1 抗原特異性ならびに抗原親和性の観点から、治療抗体として HMGB1 の C 末端領域を認識する #10-22 クローン抗体を選んだ。ラットの中大脳動脈 2 時間閉塞・再灌流モデルにおいて、再灌流 3 時間の時点ですでに血液-脳関門の広範な破綻が透過型電子顕微鏡観察で明らかになった（血管内皮細胞の緻密結合の解離、細胞内小器官の形態変化、アストログリア細胞の終足腫脹、基底膜構造の膨化）。

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究代表者 西堀 正洋 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨
省略

研究分担者

省略

対照群で見られた以上の血液-脳関門の形態的变化は、200 µg の抗 HMGB1 抗体の 1 回尾静脈内投与で約 70% 抑制された。このように抗 HMGB1 抗体は、血液-脳関門の構造的維持に強く働くことが明らかにされた。脳虚血-再灌流 3、6、24 時間後に経時的に撮影された T2 強調 MRI では、対照群動物の虚血側の線条体を中心とする領域の浮腫が 3 時間以降に著明になるのが観察されたが、抗 HMGB1 抗体による治療群では、それらの画像上変化が顕著に抑制された。ApoE ノックアウトマウスに高脂肪食を負荷して作成した粥状動脈硬化症では、抗 HMGB1 抗体の 8 週間、慢性投与によってその形成が著明に抑制された。さらに、ウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルでは、抗 HMGB1 抗体投与が、脳室上衣細胞層からの HMGB1 遊離を抑制し、血管攣縮を強く寛解する可能性が示唆された。

D. 考察

特異的抗原認識と高親和性の観点から治療抗体が選ばれた。脳虚血急性期、特に再灌流 3 時間以内に広範な血液-脳関門の構造的破綻が生じていることが、電子顕微鏡観察で明らかにされた。

血液-脳関門の破綻部位では血管透過性の亢進が招来される。その結果脳浮腫が形成され、脳内圧の上昇から脳神経組織は障害の悪循環に陥ると想像される。このような血液-脳関門の構造的破綻をトリガーとする脳浮腫の進行が、虚血超急性期に起こるとすると、治療的介入はこの時点までに開始される必要があるし、この構造破綻に有効である必要がある。抗 HMGB1 抗体治療は、再灌流直後に投与されると、アストログリア細胞の終足腫脹を著明に抑制し、血管内皮細胞のタイトジャンクションの構造を保つ働きをした。さらに、抗 HMGB1 抗体はマイクロスロンブスの形成を抑制した。T2 強調 MRI によって経時的に脳浮腫を観察すると、線条体領域では再灌流 3 時間で浮腫像が観察され、電子顕微鏡による解析結果と一致した。T2 強調 MRI 画像上も、抗 HMGB1 抗体投与の効果は明らかに観察された。これらの知見から、抗 HMGB1 抗体は脳虚血急性期の血液-脳関門の構造的破綻を効率よく抑制し、脳梗塞巣の形成を阻止すると強く示唆された。

ApoE ノックアウトマウスでは、動脈硬化巣局所に HMGB1 が高発現しており、この局所 HMGB1 が炎症増悪に働く可能性が示唆された。抗 HMGB1 抗体の 8 週間慢性投与は、動脈硬化巣形成を著明に抑制した。ウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルでは、これまで報告されているのと同程度の血管攣縮がクモ膜下出血 3 日目まで観察された。抗 HMGB1 抗体投与は、上衣細胞層からの HMGB1 の消失を抑制し、急性 2 回投与（各 2 mg）

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究代表者 西堀 正洋 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨
省略

研究分担者
省略

で血管攣縮も50%抑制した。
以上の結果から、抗HMGB1抗体治療は、ヒト臨床において動脈硬化巣の形成進展とクモ膜下出血後の脳血管攣縮に応用できる可能性を有する。薬用量の5倍量の急性単回投与では、行動学的、病理学的に毒性作用は検出されなかった。また、抗体の反復投与(0.75-3.0 mg/kg, i.v. x6)によっても明らかな毒性作用は観察されなかった。反復投与後にサンプリングされた血液細胞、血漿、固定組織について、さらに詳しい解析を予定している。

E. 結論

抗HMGB1抗体治療法は、血液-脳関門の保護効果において、極めて優れた効果を発揮した。脳虚血後の血液-脳関門の破綻は急速であり、これを防止するための治療はできるだけ早期に開始される必要がある。抗HMGB1抗体の静脈内投与は極めて簡便な投与方法であり、脳内出血に対する有効性が証明されれば、クモ膜下出血を含む脳卒中全体に対する適用が可能となる。この観点からの検討も重要である。クモ膜下出血後の脳血管攣縮や動脈硬化症の進展防止も、抗HMGB1抗体治療のよい治療対象となりうる。単回ならびに反復投与による毒性試験の結

果、これまでに毒性を疑わせる所見は認められていない。実用化開発にとって、極めて重要な知見である。

F. 健康危険情報

健康に害を及ぼすような事案は発生しなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Nishibori M,et al. Specific removal of monocytes from peripheral blood of patients by polymyxin b-immobilized filter column. *Acta Med Okayama*, 63:65-69, 2009.

2.Takahashi HK et al. 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.

3. Wake H et al.Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes.*J Pharmacol Exp Ther*, 330:826-33, 2009.

4. Liu R et al.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. *Acta Med Okayama*, 63:203-11, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究代表者 西堀 正洋 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨
省略

研究分担者

省略

5. Wake H et al. Histidine-rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin -induced angiogenesis in matrigel plug assay. *Eur J Pharmacol*, 623:89-95, 2009.
6. Takahashi HK et al. 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.
7. Wake H et al. High mobility group box 1 complexed with heparin induced Angiogenesis in a matrigel plug assay. *Acta Med Okayama*, 63:249-62, 2009.
8. 森 秀治, 西堀正洋
抗体医薬が切り拓く先端医療
薬学雑誌, 129(1):1-2, 2009.
9. 西堀正洋, 高橋英夫, 森 秀治
High Mobility Group Box-1 を治療標的とする脳梗塞治療
日薬理誌, 134:271-275, 2009.

2. 学会発表
1. 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 回国際バイオフィォーラム, 東京, 2009.
2. 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, 名古屋, 2009.
3. Early translocation and release of HMGB1 in ischemic brain in rats
第 115 回日本薬理学会近畿部会, 金沢, 2009.
4. HMGB1 はへパリン依存的に血管新生を誘導する
第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.
5. 抗体医薬による脳血管疾患治療と創薬プラットフォーム構築
第 37 回薬物活性シンポジウム, 仙台, 2009.
6. AGE-2 と AGE-3 誘導性のヒト単球の活性化に対するヒスタミンの効果
—続報—
第 13 回日本ヒスタミン学会, 仙台, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究代表者 西堀 正洋 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨
省略

研究分担者

省略

7. AGE-2 と AGE-3 誘導性のヒト単球の活性化に対するプロスタグランジン E2 の効果
第 116 回日本薬理学会近畿部会，大津，2009.
8. AGE-2 と AGE-3 誘導性のヒト単球の活性化に対するプロスタグランジン E2 の効果
第 83 回日本薬理学会年会，大阪，2010.
9. 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，岡山，2010.
10. 今なぜ「分子標的薬」なのか？
オーバービュー
第 130 年会日本薬学会，岡山，2010.
11. 「分子標的治療の新たなる射程」治療分子標的としての HMGB1 と創薬
第 130 年会日本薬学会，岡山，2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 1. 脳梗塞抑制剤 特許第3876325号
PCT/JP2006/320436 WO2007/049468
 2. 脳血管攣縮抑制剤 特許3882090号
PCT/JP2007/60231 WO2007/135992
 3. アテローム動脈硬化抑制剤
特願2009-223472
 4. 科学技術振興機構による特許群認定
特許群番号 G10-0040

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 劉 克約 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究要旨：ラットの中大脳動脈 2 時間閉塞—再灌流の脳梗塞モデルにおいて、再灌流早期に血液—脳関門の構造破綻が生じることを透過型電子顕微鏡観察で明らかにした。一致する所見を MRI で得た。抗 HMGB1 抗体治療がそれらを著明に防ぎうる治療法であることを示した。

研究分担者氏名

省略

A. 研究目的

抗 HMGB1 抗体治療をヒト臨床に応用可能とするためには、多様なヒト臨床患者の中で、どのような患者を積極的治療対象とするのが、重要な問題である。治験においては、薬物評価においてどのような患者を対象とした治療プロトコルを作るか、という問題と密接に関係してくる。それに対するアイデアを得るには、前臨床研究における作用機序の探索が重要である。本研究では、脳虚血後の超急性期から生じると考えられる血液—脳関門の破綻に特に焦点をあて、構造の破綻に関する解析を透過型電子顕微鏡観察で、機能的血管透過性亢進の測定を MRI 画像解析によって実施した。

B. 研究方法

Wistar 系雄性ラットの中大脳動脈起始部を、シリコンコーティングしたナイロン縫合糸を塞栓子として 2 時間閉塞した。再灌流後 3 時間の時点で、電子顕微鏡標本用に脳を灌流固定した。透過型電子顕微鏡用切片を作製し、血液—脳関門（血管内皮細胞の緻密結合、細胞内小器官、アストログリア細胞の終足、基底膜構造）を観察した。特にアストログリア細胞の終足腫脹を定量化し、関門構造の破綻の指標とした。

抗 HMGB1 抗体あるいは抗 *Keyhole limpet hemocyanin* 抗体（対照抗体）を再灌流直後に静脈内投与し、血液—脳関門破綻に対する抗体効果を比較した。脳浮腫の T2 強調 MRI 解析では、再灌流 3 時間から測定を開始し、6、12、24 時間、7 日で MRI 測定した。

（倫理面への配慮）

動物実験は岡山大学動物実験委員会の許可を受けた後、指針に基づき実施した。

C. 研究結果

線条体と視床下部領域では毛細血管に終わるアストログリアの終足構造が、再灌流 3 時間の時点ですでに著明に腫脹していることがわかった。腫脹した終足内には、ミトコンドリアや小胞体構造はほとんど認められず、これら細胞内小器官が細胞体方向へ移動していることが強く示唆された。また、アストログリア終足の細胞形質膜がしばしば毛細血管基底膜から遊離している像が観察された。毛細血管基底膜は、電子密度が低下し、膨化していた。対照群で見られた以上の血液—脳関門の形態的变化は、200 µg の抗 HMGB1 抗体の 1 回尾静脈内投与で約 70% 抑制された。このように抗 HMGB1 抗体は、血液—脳関門の構造的維持に強く働くことが明らかにされた。脳虚血—再灌流 3、6、24 時間後に経時的に撮影された T2 強調 MRI では、対照群動物の虚血側の線条体を中心とする領域の浮腫が 3 時間以降に著明になるのが観察されたが、抗 HMGB1 抗体による治療群では、それらの画像上変化が顕著に抑制された。

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 劉 克約 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究要旨
省略

研究分担者氏名

省略

D. 考察

脳虚血急性期、特に再灌流3時間以内に広範な血液-脳関門の構造的破綻が生じていることが、電子顕微鏡観察で明らかにされた。血液-脳関門の破綻部位では血管透過性の亢進が招来される。その結果脳浮腫が形成され、脳内圧の上昇から脳神経組織は障害の悪循環に陥ると想像される。このような血液-脳関門の構造的破綻をトリガーとする脳浮腫の進行が、虚血超急性期に起こるとすると、治療的介入はこの時まで開始される必要があるし、この構造破綻に有効である必要がある。抗HMGB1抗体治療は、再灌流直後に投与されると、アストログリア細胞の終足腫脹を著明に抑制し、血管内皮細胞のタイトジャンクションの構造を保つ働きをした。さらに、抗HMGB1抗体はマイクロスロンブスの形成を抑制した。T2強調MRIによって経時的に脳浮腫を観察すると、線条体領域では再灌流3時間で浮腫像が観察され、電子顕微鏡による解析結果と一致した。T2強調MRI画像上も、抗HMGB1抗体投与の効果は明らかに観察された。

E. 結論

抗HMGB1抗体治療法は、血液-脳関門の保護効果において、極めて優れた効果を発揮した。脳虚血後の血液-脳関門の破綻は急速であり、これを防止するための治療はできるだけ早期に開始される必要がある。抗HMGB1抗体の静脈内投与は極めて簡便な投与方法であり、脳内出血に対する有効性が証明されれば、クモ膜下出血を含む脳卒中全体に対する適用が可能となる。この観点からの検討も重要である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Nishibori M,et al. Specific removal of monocytes from peripheral blood of septic patients by polymyxin b-immobilized filter column. *Acta Med Okayama*, 63:65-69, 2009.

2.Takahashi HK et al. 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.

3. Wake H et al.Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes.*J Pharmacol Exp Ther*, 330:826-33, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 劉 克約 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究要旨：
省略

研究分担者氏名

省略

4. Liu R et al. 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. *Acta Med Okayama*, 63:203-11, 2009.
 5. Wake H et al. Histidine-rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin -induced angiogenesis in matrigel plug assay. *Eur J Pharmacol*, 623:89-95, 2009.
 6. Takahashi HK et al. 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.
 7. Wake H et al. High mobility group box 1 complexed with heparin induced Angiogenesis in a matrigel plug assay. *Acta Med Okayama*, 63:249-62, 2009.
2. 学会発表
1. 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，名古屋，2009.

2. 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，大阪，2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
脳血管攣縮抑制剤 特許3882090号
PCT/JP2007/60231 WO2007/135992

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 高橋 英夫 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究要旨：虚血中並びに後の脳内 HMGB1 トランスロケーションを明らかにした。抗 HMGB1 抗体治療は、HMGB1 トランスロケーションを防ぎうる治療法であることを示した。血中 HMGB1 の解析から、抗 HMGB1 抗体はクリアランス促進に働くことも証明した。

研究分担者氏名

省略

A. 研究目的

これまでに研究されてきた活性物質の中でも、HMGB1 はひとときユニークな存在である。つまり、健常状態では細胞核内に局在し、クロマチン構造維持、転写制御、あるいは DNA 修復に働く因子が、一旦細胞に低酸素等の刺激が加わることで忽ちに局在を変え、核内から細胞質、さらに核外へと輸送されると想像されている。そして一旦細胞外へ放出された因子は、サイトカイン様の活性を發揮する。このような特徴的な挙動と活性発現のパターンは、ホルモン、神経伝達物質、オートコイド、他のサイトカイン類とも全く異なった性格のものであり、HMGB1 の特徴を際立たせている。本研究では、脳虚血後の HMGB1 トランスロケーションの実態を明らかにし、さらに HMGB1 の体液中への移行を測定する。抗 HMGB1 抗体の投与が、これらトランスロケーションと体液中動態をどのように変化させるのかを明らかにする。

B. 研究方法

Wistar 系雄性ラットの中大脳動脈起始部を、シリコンコーティングしたナイロン縫合糸を塞栓子として 2 時間閉塞した。中大脳動脈閉塞中ならびに再灌流後異なった時点でラット脳を灌流固定した。

固定した脳をパラフィン包埋し、薄切切片としたのち、HMGB1 抗原の免疫組織染色をおこなった。神経のマーカーとして、NeuN あるいは MAP2, アストログリアのマーカーとして GFAP, ミクログリアのマーカーとして Iba1 で 2 重染色をおこない、核染色には DAPI を用いた。HMGB1 の脳脊髄液内への移行は、大槽から髄液を採取し、ELISA で濃度を測定した。血液への移行は、大静脈より採血した血中濃度を ELISA をもちいて測定した。

（倫理面への配慮）

動物実験は岡山大学動物実験委員会の許可を受けた後、指針に基づき実施した。

C. 研究結果

健常ラット脳においては、HMGB1 抗原は神経細胞とグリア細胞の核内に拡散性に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 2 時間閉塞による脳虚血で、線条体および頭頂葉～側頭葉大脳皮質領域で、神経細胞の核内に局在した HMGB1 は核膜部位に集積後、細胞質へと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のが観察された。

このような局在変化は個々の神経細胞間で時間的な差があった。また GFAP 陽性アストログリアや Iba1 陽性ミクログリア細胞では変化は微小であった。

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 高橋 英夫 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究要旨
省略

研究分担者氏名

省略

以上の結果から、虚血早期から神経細胞内の HMGB1 の局在変化が劇的に生じることが明らかとなった。

脳虚血コアの脳領域からは、12時間以降 HMGB1 免疫陽性構造が消失していくので、神経細胞における HMGB1 のトランスロケーションは最終的には細胞外放出とその後の処理によって終わるものと推測された。

脳脊髄液中の HMGB1 濃度は時間依存的に上昇した。また、血清中 HMGB1 も再灌流後著明に上昇していたが、抗 HMGB1 抗体の投与によって偽手術群のレベルにまで低下した。

D. 考察

虚血中においてもすでに神経細胞核内の HMGB1 はトランスロケーションを起こしていることが示された。その後、細胞質さらに細胞外へと移行することが経時的観察から明らかにされた。トランスロケーションの主体となっているのは神経細胞であり、脳部位における時間パターンには差が認められた。

抗 HMGB1 抗体治療は、脳内 HMGB1 トランスロケーションを防ぎうる治療法であることが示された。

血中 HMGB1 の解析から、薬物として投与された抗 HMGB1 抗体は、血中 HMGB1 と複合体を形成し、その後複合体が取り込み細胞で処理される可能性が強く示唆された。つまり、本実験で使用された抗 HMGB1 抗体は、血中 HMGB1 クリアランス促進に働く抗体であると結論される。

E. 結論

脳虚血後の極めて早期から、神経細胞内を中心として HMGB1 のトランスロケーションが生じる。細胞核内から、細胞質、さらに細胞外へと放出された HMGB1 の一部は脳脊髄液や血液中に移行する。抗 HMGB1 抗体治療は、HMGB1 のトランスロケーションそのものを防ぎうる治療法であることを示した。血中 HMGB1 の解析から、抗 HMGB1 抗体は血中 HMGB1 のクリアランス促進に働くことを証明した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishibori M, et al. Specific removal of monocytes from peripheral blood of septic patients by polymyxin b-immobilized filter column. *Acta Med Okayama*, 63:65-69, 2009.

2. Takahashi HK et al. Advanced glycation end products subspecies-selectively induce

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 高橋 英夫 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究要旨
省略

研究分担者氏名

省略

adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 330:89-98, 2009.

3. Wake H et al. Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 330:826-33, 2009.

4. Liu R et al. 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. *Acta Med Okayama*, 63:203-11, 2009.

5. Wake H et al. Histidine-rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin-induced angiogenesis in matrigel plug assay. *Eur J Pharmacol*, 623:89-95, 2009.

6. Takahashi HK et al. 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.

7. Wake H et al. High mobility group

box 1 complexed with heparin induced angiogenesis in a matrigel plug assay. *Acta Med Okayama*, 63:249-62, 2009.

8. 西堀正洋, 高橋英夫, 森 秀治
High Mobility Group Box-1 を治療標的とする脳梗塞治療
日薬理誌, 134:271-275, 2009.

2. 学会発表

1. 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, 名古屋, 2009.

2. 抗体医薬による脳血管疾患治療と創薬プラットフォーム構築
第37回薬物活性シンポジウム, 仙台, 2009.

3. AGE-2 と AGE-3 誘導性のヒト単球の活性化に対するヒスタミンの効果
—続報—
第13回日本ヒスタミン学会, 仙台, 2009.

4. AGE-2 と AGE-3 誘導性のヒト単球の活性化に対するプロスタグランジン E2 の効果
第116回日本薬理学会近畿部会, 大津, 2009.

5. AGE-2 と AGE-3 誘導性のヒト単球の活性化に対するプロスタグランジン E2 の効果
第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 高橋 英夫 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究要旨
省略

研究分担者氏名

省略

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1.脳梗塞抑制剤 特許第3876325号
PCT/JP2006/320436 WO2007/049468
- 2.脳血管攣縮抑制剤 特許3882090号
PCT/JP2007/60231 WO2007/135992
- 3.アテローム動脈硬化抑制剤
特願2009-223472
- 4.科学技術振興機構による特許群認定
特許群番号G 10-0040

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 森 秀治 | 就実大学薬学部・教授

研究要旨：HMGB1に対する3つのラット単クローン抗体(#10-22, #11-19, #4-1)の大量発現・精製法を確立した。精製は、アフィニティ、ゲル濾過の2段階精製で、高純度の抗体精製を可能にした。表面プラズモン共鳴法を用いて、抗体と癩尾を評価した。マイクロタイタープレートを用いたHMGB1-sRAGE 結合実験系を構築した。

研究分担者氏名

省略

A. 研究目的

ラットにHMGB1を完全フロイントアジュバントとともに投与し、免疫成立後にリンパ節より採取したBリンパ球とマウスミエローマ細胞の融合細胞より、抗HMGB1抗体産生クローンを既に得ている。これらの細胞を効率よく培養し、大量の分泌抗体を簡便に精製する方法を確立する。HMGB1の全長にわたる15アミノ酸長の人工合成ペプチドを用いて、エピトープを決定する。さらに、表面プラズモン共鳴法を用いて、抗体の平衡解離定数を測定する。組み換え体ヒト蛋白を作成し、マイクロタイタープレートを用いたHMGB1-sRAGE 結合実験系を構築する。これを用いて抗体の結合阻害実験を可能にする。

B. 研究方法

得られた3つのラット単クローン抗体と、対照抗体として用いる抗 *Keyhole limpet hemocyanin* 抗体 (IgG2a, IgG1サブクラス) の精製法を検討する。まず、MepHypercel への結合条件と洗浄ならびに溶出条件を検討する。特に、抗体の回収率を上げるための溶出条件に留意する。抗体認識エピトープの決定では、複数種のナイロン膜を用いて、検出を検討する。

抗体の平衡解離定数の測定には、表面プラズモン共鳴法（ビアコア、GE社製）を用いるが、抗原の固相化法として、ビアコアチップへのHMGB1直接結合と、抗体を介したキャプチャー法の両方を試みる。組み換え体ヒトHMGB1ならびにsRAGE蛋白を大腸菌発現系で作成し、マイクロタイタープレートを用いた両者の結合実験系を構築する。

（倫理面への配慮）
該当無し

C. 研究結果

MepHypercel への5種類の単クローン抗体の結合条件を調べ、pH6.5~9.0の条件において、よい結合が得られることを確認した。洗浄は50 mM Tris-HCl, pH7.5で、溶出はpH 3.5のクエン酸ナトリウム緩衝液とした。当初、pH4.0のクエン酸ナトリウム緩衝液を用いたが、クローン抗体によっては、この条件で溶出効率が低いことがわかった。エピトープ決定に用いた3種類のナイロン膜の内、Ultra Bind Membrane が特異的検出において、最も優れていた。#10-22は、HMGB1のC末端配列を認識した。一方、#11-19と#4-1クローンはともに、B-Box内のLKEKYEKDIA配列を認識した。ビアコアを用いた抗体親和性の測定では、抗原の直接カップリング法では、抗体の結合が検出されなかった。そこで、抗原としてヒスチジンタグ付き組み換え体HMGB1を作製し、抗ヒスタグ抗体による抗原キャプチャー法を用いることとした。

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 森 秀治 就実大学薬学部・教授

研究要旨

省略

研究分担者氏名

省略

この抗原固相化法により、#10-22、#11-19と#4-1各クローンの平衡解離定数はそれぞれ、 $1.5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $3 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $2.2 \times 10^{-7} \text{M}$ と算出された。組み換え体ヒトHMGB1ならびにsRAGE蛋白を大腸菌発現系で作成した。HMGB1、sRAGEはGSTとの融合蛋白やヒスチジンタグ付きなど、種々のフォームの組み換え体蛋白を作製した。マイクロタイタープレートを用いた両者の結合条件を種々検討し、両者の濃度依存的、飽和性の結合条件を見出すことができた。

D. 考察

回転培養装置を用いて、ハイブリドーマ細胞の効率的な培養が可能であった。培養上清からの抗体精製法では、MepHypercelからの溶出に通常より、低いpH(3.5)の緩衝液を使用することで、回収率を上昇させることができた。#10-22抗体の認識エピトープはHMGB1のC末端配列であり、この配列はHMGファミリーの中でもHMGB1に特異的な配列であった。一方、#11-19と#4-1クローンの認識エピトープは、HMGB2にも存在する配列であった。さらに、平衡解離定数の測定から、#10-22クローン抗体の親和性が最も高いことがわかった。

以上の結果から、脳梗塞その他の疾患治療抗体として、#10-22クローン抗体が最も優れていると判断した。組み換え体ヒトHMGB1あるいはsRAGE蛋白をマイクロタイタープレートに固相化し、ブロッキング条件、各蛋白濃度、結合時間、洗浄法などを種々検討し、両者の濃度依存性、飽和性の結合を検出することに成功した。

E. 結論

ハイブリドーマ細胞の安定的で効率のよい培養法を確立し、高濃度の抗体を含む培養上清を得ることができた。これをスターティング材料として、疎水結合アフィニティカラムとゲル濾過カラムクロマトグラフィー法で、高純度の抗体を精製できるように条件を確立した。得られた単クローンの内、1種類(#10-22)がHMGB1特異的抗体であり、かつ親和性が最も高いことが明らかにされた。以上の結果から、治療抗体として#10-22が優れていると結論された。マイクロタイタープレートを用いたHMGB1-sRAGE結合実験系を構築した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Nishibori M,et al. Specific removal of monocytes from peripheral blood of septic patients by polymyxin b-immobilized filter column. *Acta Med Okayama*, 63:65-69, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 森 秀治 | 就実大学薬学部・教授

研究要旨

省略

研究分担者氏名

省略

2. Takahashi HK et al. 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.
3. Wake H et al. Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 330:826-33, 2009.
4. Liu R et al. 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. *Acta Med Okayama*, 63:203-11, 2009.
5. Wake H et al. Histidine-rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin -induced angiogenesis in matrigel plug assay. *Eur J Pharmacol*, 623:89-95, 2009.
6. Takahashi HK et al. 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.

7. Wake H et al. High mobility group box 1 complexed with heparin induced Angiogenesis in a matrigel plug assay. *Acta Med Okayama*, 63:249-62, 2009.
8. 森 秀治, 西堀正洋
抗体医薬が切り拓く先端医療
薬学雑誌, 129(1):1-2, 2009.
9. 西堀正洋, 高橋英夫, 森 秀治
High Mobility Group Box-1 を治療標的とする脳梗塞治療
日薬理誌, 134:271-275, 2009.
2. 学会発表
1. Early translocation and release of HMGB1 in ischemic brain in rats
第115回日本薬理学会近畿部会, 金沢, 2009.
2. HMGB1 はヘパリン依存的に血管新生を誘導する
第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009.
3. 抗体医薬による脳血管疾患治療と創薬プラットフォーム構築
第37回薬物活性シンポジウム, 仙台, 2009.
4. AGE-2 と AGE-3 誘導性のヒト単球の活性化に対するプロスタグランジン E2 の効果
第116回日本薬理学会近畿部会, 大津, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病増悪フェーズの鍵分子「HMGB1」に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

研究分担者 森 秀治 | 就実大学薬学部・教授

研究要旨

省略

研究分担者氏名

省略

5. AGE-2 と AGE-3 誘導性のヒト単球の活性化に対するプロスタグランジン E2 の効果
第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
6. HMGB1 はヘパリン存在下で血管新生を誘導する
第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
7. 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, 大阪, 2010.
8. シンポジウム「分子標的治療の新たなる射程」今なぜ「分子標的薬」なのか? オーバービュー
日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010.
9. シンポジウム「分子標的治療の新たなる射程」治療分子標的としての HMGB1 と創薬
日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 脳梗塞抑制剤 特許第3876325号
PCT/JP2006/320436 WO2007/049468
2. 脳血管攣縮抑制剤 特許3882090号
PCT/JP2007/60231 WO2007/135992
3. アテローム動脈硬化抑制剤
特願2009-223472
4. 科学技術振興機構による特許群認定
特許群番号 G 10-0040

脳梗塞モデルに関する研究

劉 克約、高橋 英夫、森 秀治

目的：

抗 HMGB1 抗体治療をヒト臨床に応用可能とするためには、多様なヒト臨床患者の中で、どのような患者を積極的治療対象とするのかが、重要な問題である。治験においては、薬物評価においてどのような患者を対象とした治療プロトコールを作るか、という問題と密接に関係してくる。それに対するアイデアを得るには、前臨床研究における作用機序の探索が重要である。本研究では、脳虚血後の超急性期から生じると考えられる血液—脳関門の破綻に特に焦点をあて、構造の破綻に関する解析を透過型電子顕微鏡観察で、機能的血管透過性亢進の測定を MRI 画像解析によって実施した。これまでに研究されてきた活性物質の中でも、HMGB1 はひとときユニークな存在である。つまり、健常状態では細胞核内に局在し、クロマチン構造維持、転写制御、あるいは DNA 修復に働く因子が、一旦細胞に低酸素等の刺激が加わることで忽ちに局在を変え、核内から細胞質、さらに核外へと輸送されると想像されている。そして一旦細胞外へ放出された因子は、サイトカイン様の活性を発揮する。このような特徴的な挙動と活性発現のパターンは、ホルモン、神経伝達物質、オートコイド、他のサイトカイン類とも全く異なった性格のものであり、HMGB1 の特徴を際立たせている。本研究では、脳虚血後の HMGB1 トランスロケーションの実態を共焦点レーザー顕微鏡による細胞内局在変化を克明に追うことで明らかにし、さらに HMGB1 の体液中への移行を測定する。抗 HMGB1 抗体の投与が、これらトランスロケーションと体液中動態をどのように変化させるのかを明らかにする。

方法と結果：

Wistar 系雄性ラットの中大脳動脈起始部を、シリコンコーティングしたナイロン縫合糸を塞栓子として 2 時間閉塞した。再灌流後 3 時間の時点で、電子顕微鏡標本用に脳を灌流固定した。透過型電子顕微鏡用切片を作製し、血液—脳関門（血管内皮細胞の緻密結合、細胞内小器官、アストログリア細胞の終足、基底膜構造）を観察した。特にアストログリア細胞の終足腫脹を定量化し、関

門構造の破綻の指標とした(Figure 1)。抗 HMGB1 抗体あるいは抗 *Keyhole limpet hemocyanin* 抗体 (対照抗体) を再灌流直後に静脈内投与し、血液-脳関門破綻に対する抗体効果を比較した。脳浮腫の T2 強調-MRI 解析では、再灌流 3 時間から測定を開始し、6、12、24 時間、7 日で MRI 測定した(Figure 2)。

線条体と視床下部領域では毛細血管に終わるアストログリアの終足構造が、再灌流 3 時間の時点ですでに著明に腫脹していることがわかった(Figure 1)。腫脹した終足内には、ミトコンドリアや小胞体構造はほとんど認められず、これら細胞内小器官が細胞体方向へ移動していることが強く示唆された。また、アストログリア終足の細胞形質膜がしばしば毛細血管基底膜から遊離している像が観察された(Figure 1)。毛細血管基底膜は、電子密度が低下し、膨化していた。対照群で見られた以上の血液-脳関門の形態的变化は、200 μg の抗 HMGB1 抗体の 1 回尾静脈内投与で約 70%抑制された。このように抗 HMGB1 抗体は、血液-脳関門の構造的維持に強く働くことが明らかにされた。脳虚血-再灌流 3、6、24 時間後に経時的に撮影された T2 強調 MRI では、対照群動物の虚血側の線条体を中心とする領域の浮腫が 3 時間以降に著明になるのが観察されたが、抗 HMGB1 抗体による治療群では、それらの画像上変化が顕著に抑制された(Figure 2)。

中大脳動脈閉塞中ならびに再灌流後異なった時点でラット脳を灌流固定した。固定した脳をパラフィン包埋し、薄切切片としたのち、HMGB1 抗原の免疫組織染色をおこなった。神経のマーカーとして、NeuN あるいは MAP2, アストログリアのマーカーとして GFAP, ミクログリアのマーカーとして Iba1 で 2 重染色をおこない、核染色には DAPI を用いた(Figure 3)。HMGB1 の脳脊髄液内への移行は、大槽から髄液を採取し、ELISA で濃度を測定した。血液への移行は、大静脈より採血した血中濃度を ELISA をもちいて測定した。

健常ラット脳においては、HMGB1 抗原は神経細胞とグリア細胞の核内に拡散性に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(Figure 3)。中大脳動脈 2 時間閉塞による脳虚血で、線条体および頭頂葉～側頭葉大脳皮質領域で、神経細胞の核内に局在した HMGB1 は核膜部位に集積後、細胞質へと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のが観察された(Figure 4)。このような局在変化は個々の神経細胞間で時間的な差があった。また GFAP