投与前，投与後約1時間（投与後30分～1.5時間）に一般状態の観察および生死の確認を行った。体重は投与1，3および7日に測定し，剖検日には最終体重も測定した。食餌摂取量は、投与1，3および7日に測定した。13～15時に飼料を入れた給餌器を秤量してケージにセットし，翌日の同時間帯に給餌器をケージから取り出して残量を秤量した。なお，摂餌量の表示日は，残量の測定日とした。

眼科的検査は、投与開始前および投与1週（投与前の時間帯）に実施した．投与開始前は全例について，投与1週の検査は抗KLH抗体投与群および抗HMGB1抗体投与の3 mg/kg群の全例について検査を行った。外観を肉眼的に観察したのち，直像検眼鏡（アルファプラス検眼鏡，ハイネ社）を用いて対光反射を確認した。散瞳剤（ミドリン®P点眼液，参天製薬株式会社）の点眼後，スリットランプ（SL-15，興和株式会社）を用い，角膜，虹彩，結膜，水晶体および硝子体の観察を行った。次いで眼底カメラ（RC-2，興和株式会社）を用いて眼底の観察を行った。

尿検査は、投与1週に実施した。代謝ケージを用いて8～11時の時間帯（その日の投与前の時間帯）の新鮮尿を採取し，引き続き約24時間蓄積尿を採取した。採尿日の給餌は新鮮尿採取後に行い，飲水は通常通り与えた。電解質測定用の蓄積尿は測定まで超低温フリーザー（許容範囲：-90～-65°C，実測値：-84.2～-74.5°C）内で凍結保存した。

血液学的検査は、投与期間終了時の剖検時に実施した。ペントバルビタール・ナトリウム30 mg/kgを腹腔内に投与して麻酔した後，後大静脈腹部より血液約2 mLを採取した。血液凝固系検査には，3.8 w/v%クエン酸ナトリウム0.1 mLを入れた試験管に血液0.9 mLを分注し，1,870×gで15分間遠心分離（設定温度4°C）して得られる血漿を用いた。他の検査には，残りの血液をEDTA-2K 2 mg加採血ビン（SB-41，シスメックス株式会社）に分注したものを用いた。動物は，採血前に16～19時間絶食させた。

血液性科学的検査は、投与期間終了時の剖検時に実施した。
血液学的検査用の採血に引き続き，深麻酔下に後大静脈腹部より採取した血液2～4 mLを室温で約60分間放置後，1,870×gで10分間遠心分離（設定温度4°C）して得られる血清を用いた。血清は測定まで超低温フリーザー（許容範囲：-90～-65°C，実測値：-84.2～-74.5°C）内で凍結保存した。
投与期間終了時の採血後に，放血致死させ，速やかに解剖してすべての器官お

よび組織について異常の有無を検査した。剖検後，下記の器官重量（絶対重量）を測定し，剖検日の体重を基に体重比器官重量（相対重量）を算出した。

脳，下垂体，顎下腺（舌下腺を含む），甲状腺（上皮小体を含む），心臓，肺（気管支を含む），胸腺，肝臓，脾臓，腎臓，副腎，精嚢，前立腺，精巣，精巣上体

以下の各器官および組織を 10 vol%中性緩衝ホルマリン溶液（ただし，眼球および視神経はダビドソン液で，精巣および精巣上体はブアン液でそれぞれ前固定）で固定して保存した．抗 KLH 抗体投与群，並びに抗 HMGB1 抗体投与の 1.5 および 3 mg/kg 群については，パラフィン切片としたのち，ヘマトキシリン･エオジン染色を施して鏡検した．両側性の器官は両側とも保存（ただし，大腿骨，皮膚，乳腺，坐骨神経および大腿二頭筋は右側のみ保存）し，検査は右側（ただし,上皮小体については左右のいずれか）について実施した．特殊染色は不要と判断したため実施しなかった．

大脳，小脳，延髄，下垂体，脊髄（胸部），眼球，視神経，ハーダー腺，下顎部リンパ節，顎下腺，舌下腺，耳下腺，甲状腺，上皮小体，心臓，肺（気管支を含む），気管，舌，胸腺，肝臓，膵臓，脾臓，腎臓，副腎，食道，胃，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，腸間膜リンパ節，膀胱，精嚢，前立腺，精巣上体，精巣，大腿骨，大腿骨骨髄，胸骨，胸骨骨髄，乳腺，皮膚（下腹部），大動脈（胸部），坐骨神経，大腿二頭筋，投与部位

結果：

一般状態の観察結果を **Table1** に示す。抗 KLH 抗体投与群および抗 HMGB1 抗体投与群とも投与期間を通して，死亡例の発生はなかった。体重変化を Figure 1 および Table 2 に示した。抗 HMGB1 抗体投与各群とも抗 KLH 抗体投与群とほぼ同様の体重推移を示し，抗 HMGB1 抗体投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。食餌摂取量の結果を Figure 2 および Table 3 に示した。抗 HMGB1 抗体投与各群とも抗 KLH 抗体投与群とほぼ同様の摂餌量推移を示し，抗 HMGB1 抗体投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。以上のように、抗 HMGB1 抗体 0.75 - 3.0 mg/kg 一週間投与によって、一般状態、体重、食餌摂取量には、対照群の抗 KLH 抗体投与群と差がなかった。血液細胞検査、血液生化学検査、尿検査、全身４７臓器の病理学的検査は、現在進行中である。

結論：

抗 HMGB1 抗体のラットへの単回投与ならびに反復１週間投与によって、毒性試験を実施した。これまでの解析においては、病理学的所見は全く見当たらず、抗 HMGB1 抗体治療の安全性がラットにおいては確認されたと考える。反復投与後の血液サンプルの解析と病理学的解析を継続して進め、毒性試験を完成させる。

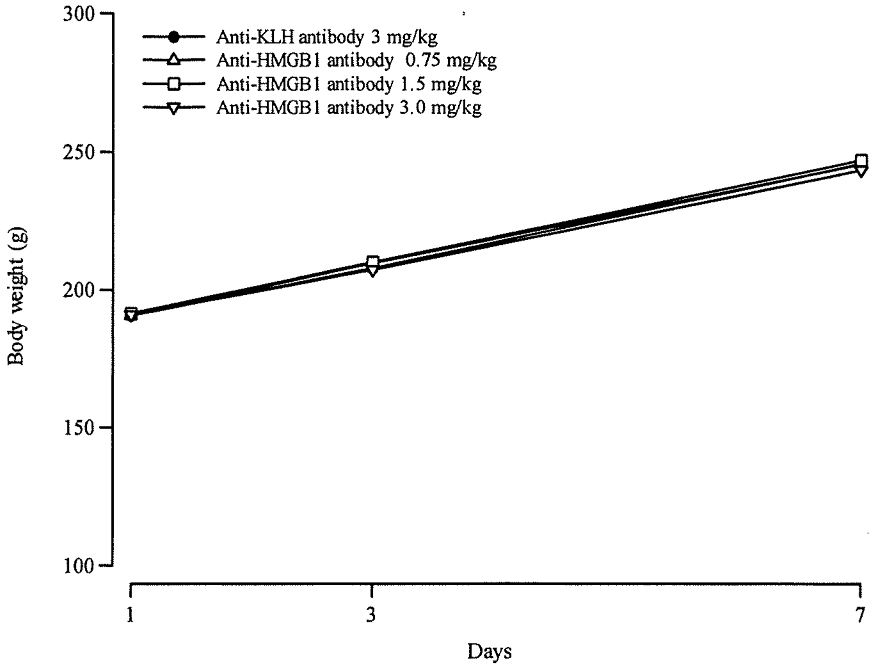


Figure 1 Body weight changes

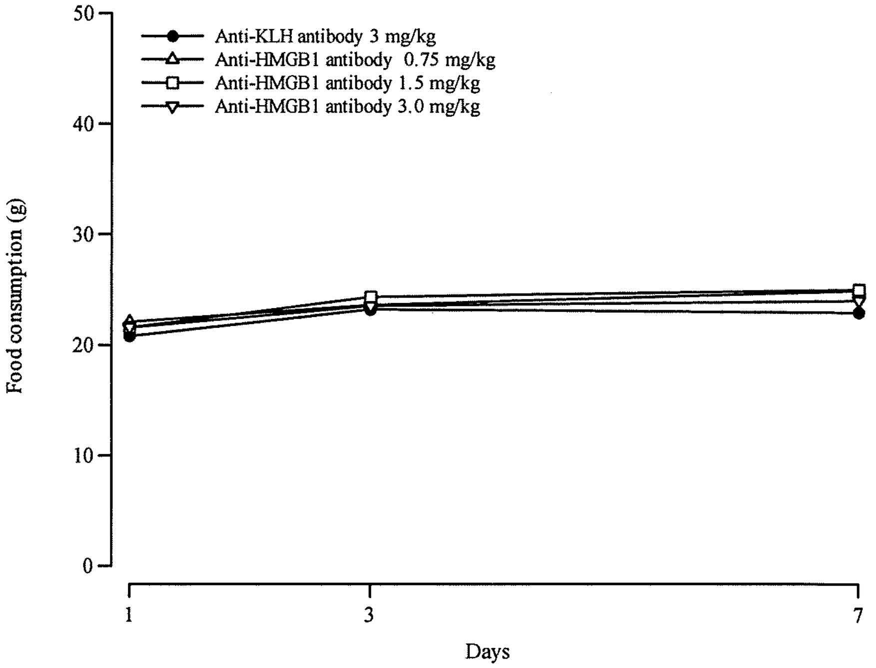


Figure 2 Food consumption

Table 1 Clinical signs

Group and dose	Clinical sign	Days													
		1		2		3		4		5		6		7	
		PRE	1 hr	PRE	1 hr	PRE	1 hr	PRE	1 hr	PRE	1 hr	PRE	1 hr	PRE	1 hr
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	Number of examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	5	6	5	6	5	6	6
	Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	Number of examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	0	6	2	6	2	6	2
	Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	6	0	4	0	4	0	4
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	Number of examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	1	6	3	6	6	6	6
	Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	5	0	3	0	0	0	0
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	Number of examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	2	6	3	6	5	6	6
	Reddish urine	0	0	0	0	0	0	0	4	0	3	0	1	0	0

Table 2 Body weights

Group and dose		Body weight (g) on day		
		1	3	7
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	N	6	6	6
	Mean	190.6	207.9	245.6
	S.D.	±4.6	±6.8	±8.5
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	N	6	6	6
	Mean	190.7	209.6	245.5
	S.D.	±3.0	±4.2	±7.0
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	N	6	6	6
	Mean	191.4	210.1	246.9
	S.D.	±5.1	±5.6	±6.6
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	N	6	6	6
	Mean	190.9	207.3	243.4
	S.D.	±5.9	±6.8	±9.6

Not significantly different from Anti-KLH antibody group.

Table 3 Food consumption

Group and dose		Food consumption (g) on day 1	3	7
Anti-KLH antibody 3 mg/kg	N	6	6	6
	Mean	20.8	23.2	22.9
	S.D.	±2.1	±2.8	±1.0
Anti-HMGB1 antibody 0.75 mg/kg	N	6	6	6
	Mean	22.1	23.6	24.9
	S.D.	±0.9	±1.6	±1.4
Anti-HMGB1 antibody 1.5 mg/kg	N	6	6	6
	Mean	21.6	24.3	25.0
	S.D.	±2.2	±1.9	±1.4
Anti-HMGB1 antibody 3.0 mg/kg	N	6	6	6
	Mean	21.6	23.5	24.0
	S.D.	±1.5	±1.8	±1.8

Not significantly different from Anti-KLH antibody group.

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　槇野　博史　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨：粥状硬化巣に一致して、HMGB1 の発現が高いことが明らかになった。抗 HMGB1 抗体の治療によって、ApoE ノックアウトマウスにおける動脈硬化症が抑制され、治療的有効性が証明された。動脈閉塞と血中 HMGB1 濃度に相関がみられた。

研究分担者氏名

省略

A．研究目的

動脈硬化症は、生活習慣病において症状を顕在化させることなしに進行し、また一定以上の進行をきたすと、脳梗塞、心筋梗塞、腎障害などの重大疾患発症の原因となる。したがって、その発症を的確に検査し、新しい治療法を確立することが、臨床医学上極めて重要である。本年度の研究において、動脈硬化症局所における HMGB1 の発現をマウスの動脈硬化症モデルで検討し、強い動脈硬化症の結果起こってくる動脈血管閉塞性疾患患者における血漿 HMGB1 測定の診断学的意義の検討を行う。これらの研究によって、ヒト動脈硬化症に対する治療薬としての抗体薬開発に向けて、基本情報を得る。

B．研究方法

６週齢の ApoE ノックアウトマウスに 20 %脂質含有高脂肪食を負荷し、８週間飼育することで動脈硬化症を発症させる。このモデルマウスをホルマリンで灌流固定し、大動脈起始部の粥状動脈硬化巣を抗 HMGB1 抗体で免疫染色する。動脈閉塞性疾患の患者から採血し、血漿を分離する。血漿中 HMGB1 レベルを ELISA で測定する。別途臨床検査で測定された血漿フィブリノーゲン値と HMGB1 値の相関性の解析を行う。

さらに、臨床的重症度の評価であるフォンテーングレードと血漿 HMGB1 の相関を統計学的に検討する。

（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

６週齢の ApoE ノックアウトマウスに 20 %脂質含有高脂肪食を負荷し、マウス動脈硬化症モデルを作成した。高脂肪食開始後の８週の時点で組織をホルマリン固定し、大動脈起始部のアテローム性動脈硬化巣を含む動脈血管を抗 HMGB1 抗体で免疫染色した。その結果、アテローム性動脈硬化巣に一致して HMGB1 陽性構造が強陽性であり、それらは、内膜層内泡沫細胞内とその周辺領域に広がって認められた。この観察結果から、泡沫細胞は HMGB1 蛋白を高発現しており、その一部は細胞外へ放出されている可能性が示唆された。動脈閉塞性疾患患者で測定されたヒト血漿 HMGB1 レベルは、臨床フォンテーヌグレードの評価と相関することがわかった。さらに、血漿 HMGB1 とフィブリノーゲンが正の相関を示すことが明らかにされた。

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　槇野　博史　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨
省略

研究分担者氏名

省略

D．考察
マウスの粥状動脈硬化巣局所ではHMGB1が高発現しており、それらは泡沫細胞内とその周辺領域に認められたことから、神経細胞で観察したような細胞核から、細胞質分画、さらに細胞外スペースへと向かうトランスロケーションが泡沫細胞でも起こっている可能性が強く示唆された。その一部が、血中へと拡散逸脱した場合には、血漿HMGB1レベルが上昇する可能性がある。これを検証するため、ヒトの動脈硬化性疾患の一つである閉塞性動脈硬化症の患者血中のHMGB1レベルが測定された。その結果、閉塞性動脈硬化症の患者では、臨床的重症度が上がるにしたがって血漿HMGB1レベルが上昇することが明らかにされた。この時、２つの可能性が考えられる。一つは、全身の動脈硬化巣が血漿HMGB1の供給源となっている可能性であり、もう一つは、動脈硬化を生じる患者では重症度により血漿HMGB1は高値となるが動脈硬化巣は血中HMGB1の取り込み部位になるという可能性である。いずれの場合も、動脈硬化の進行と血漿HMGB1レベルには正の相関が存在することには変わりはなく、血漿HMGB1は、動脈硬化症の新しい指標になる可能性がある。血漿フィブリノーゲンとHMGB1の正の相関は、血漿HMGB1レベル検査が閉塞性動脈硬化症の重症度判定にも利用できる可能性を示唆する。

E．結論
アテローム動脈硬化巣局所にはHMGB1が高濃度存在しており、泡沫細胞自身による産生と血中HMGB1取り込みの両方の可能性が考えられた。血漿HMGB1レベルは、血漿フィブリノーゲンレベルと相関し、動脈硬化性血管閉塞の重症度を反映する新しいマーカー蛋白となり得ることが強く示唆された。

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. 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.

H．知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当無し

粥状動脈硬化症モデルに関する研究

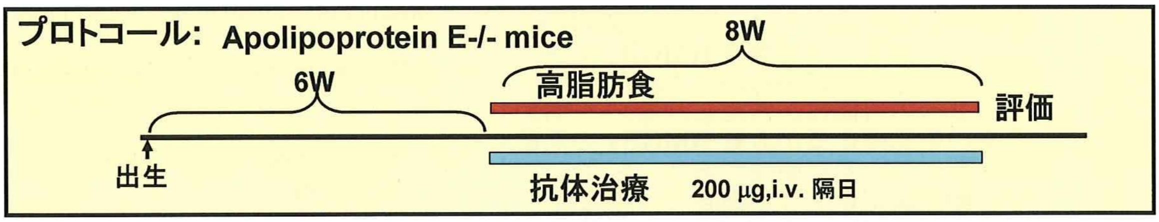
槇野博史

目的：

動脈硬化症は、生活習慣病において症状を顕在化させることなしに進行し、また一定以上の進行をきたすと、脳梗塞、心筋梗塞、腎障害などの重大疾患発症の原因となる。したがって、その発症を的確に検査し、新しい治療法を確立することが、臨床医学上極めて重要である。本年度の研究において、動脈硬化症局所における HMGB1 の発現をマウスの動脈硬化症モデルで検討し、強い動脈硬化症の結果起こってくる動脈血管閉塞性疾患患者における血漿 HMGB1 測定の診断学的意義の検討を行う。これらの研究によって、ヒト動脈硬化症に対する治療薬としての抗体薬開発に向けて、基本情報を得る。

方法と結果：

ApoE ノックアウトマウスに生後６週目から高脂肪食（脂質２０％含有）を８週間負荷し、粥状動脈硬化症を発症させる。このモデル動物を用いて、抗 HMGB1 単クローン抗体の投与効果を検討した。抗 HMGB1 抗体あるいは対照抗体は、200 μg の用量を１日間隔で静脈内投与した。実験プロトコールを下図に示す。



モデルマウスをホルマリンで灌流固定し、大動脈起始部の粥状動脈硬化巣を抗 HMGB1 抗体で免疫染色する。動脈閉塞性疾患の患者から採血し、血漿を分離する。血漿中 HMGB1 レベルを ELISA で測定する。別途臨床検査で測定された血漿フィブリノーゲン値と HMGB1 値の相関性の解析を行う。さらに、臨床的重症度の評価であるフォンテーングレードと血漿 HMGB1 の相関を統計学的に検討する。

6週齢のApoEノックアウトマウスに20％脂質含有高脂肪食を負荷し、マウス動脈硬化症モデルを作成した。高脂肪食開始後の8週の時点で組織をホルマリン固定し、大動脈起始部のアテローム性動脈硬化巣を含む動脈血管を抗HMGB1抗体で免疫染色した（Figure 1)。その結果、アテローム性動脈硬化巣に一致してHMGB1陽性構造が強陽性であり、それらは、内膜層内泡沫細胞内とその周辺領域に広がって認められた（Figure 1)。この観察結果から、泡沫細胞はHMGB1蛋白を高発現しており、その一部は細胞外へ放出されている可能性が示唆された。動脈閉塞性疾患患者で測定されたヒト血漿HMGB1レベルは、臨床フォンテーヌグレードの評価と相関することがわかった。さらに、血漿HMGB1とフィブリノーゲンが正の相関を示すことが明らかにされた。

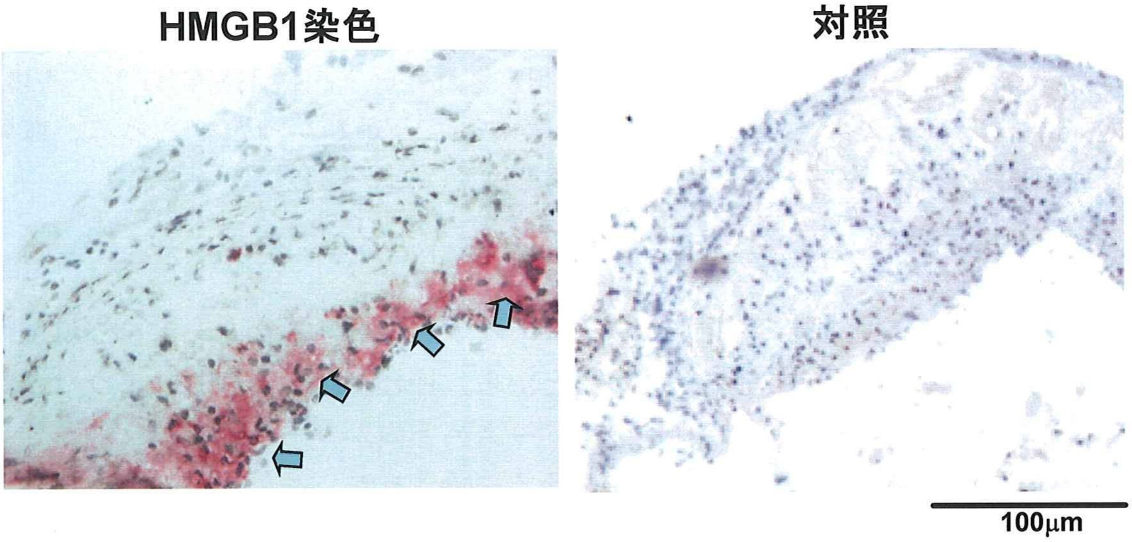
考察と結論：

マウスの粥状動脈硬化巣局所ではHMGB1が高発現しており、それらは泡沫細胞内とその周辺領域に認められたことから、神経細胞で観察したような細胞核から、細胞質分画、さらに細胞外スペースへと向かうトランスロケーションが泡沫細胞でも起こっている可能性が強く示唆された。その一部が、血中へと拡散逸脱した場合には、血漿HMGB1レベルが上昇する可能性がある。これを検証するため、ヒトの動脈硬化性疾患の一つである閉塞性動脈硬化症の患者血中のHMGB1レベルが測定された。その結果、閉塞性動脈硬化症の患者では、臨床的重症度が上がるにしたがって血漿HMGB1レベルが上昇することが明らかにされた。この時、2つの可能性が考えられる。一つは、全身の動脈硬化巣が血漿HMGB1の供給源となっている可能性であり、もう一つは、動脈硬化を生じる患者では重症度により血漿HMGB1は高値となるが動脈硬化巣は血中HMGB1の取り込み部位になるという可能性である。いずれの場合も、動脈硬化の進行と血漿HMGB1レベルには正の相関が存在することには変わりはなく、血漿HMGB1は、動脈硬化症の新しい指標になる可能性がある。血漿フィブリノーゲンとHMGB1の正の相関は、血漿HMGB1レベル検査が閉塞性動脈硬化症の重症度判定にも利用できる可能性を示唆する。

アテローム動脈硬化巣局所にはHMGB1が高濃度存在しており、泡沫細胞自身による産生と血中HMGB1取り込みの両方の可能性が考えられた。血漿HMGB1レベルは、血漿フィブリノーゲンレベルと相関し、動脈硬化性血管閉塞の重症度を反映する新しいマーカー蛋白となり得ることが強く示唆された。

Figure 1

Apolipoprotein E-/- mice：高脂肪食負荷



HMGB1（赤色染色、⇧）は、内膜層の細胞に染色が認められ、また動脈硬化巣に瀰漫性に広がっている。

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　伊達　勲　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨：ラットの脳梗塞モデルにおいて著効を示したHMGB1を標的とする抗体療法を、ウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルに応用した。ウサギの抗HMGB1抗体投与は、クモ膜下出血後の脳底動脈の血管攣縮を５０％抑制した。脳室上衣細胞層に発現するHMGB1のトランスロケーションが抗体投与で抑制された。

研究分担者氏名

省略

A．研究目的

クモ膜下出血後の脳血管攣縮は、脳外科領域における未解決の重要課題である。これまで動脈血管壁平滑筋に発現する受容体や細胞内収縮シグナル伝達系をターゲットにした薬物が多数開発され、臨床応用が試みられてきたが、大きな臨床効果を発揮する薬物は未だ見出されていない。本研究では、ラットの脳梗塞モデルにおいて著効を示したHMGB1を標的とする抗体療法をウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルに応用し、その効果の評価と作用機序解析を行う。

B．研究方法

体重3-3.5 kg のニュージーランド白色雄性ウサギを実験に用いた。ウサギのクモ膜下出血は、大槽から１ｍｌの髄液を抜いた後、３ｍｌの自己血を大槽内に注入することによって作製した。クモ膜下出血作製５－７日前に脳血管造影を行い、クモ膜下出血作製３日後に再度脳血管造影を実施し、脳底動脈９箇所における血管収縮率をX 線画像から算出した。抗HMGB1 抗体あるいは対照の抗*Keyhole limpet* hemocyanin 抗体は、クモ膜下出血作製後１時間と２５時間の時点で各2 mg 投与した。

血管造影完了後、ウサギは深麻酔下に脱血致死させ、摘出脳底動脈領域をホルマリン固定した。固定組織をパラフィン包埋切片とし、ヘマトキシリン－エオジン染色ならびに抗HMGB1染色を施した。

（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

本プロトコールによるクモ膜下出血で、出血後３日目で対照群ウサギの脳底動脈において収縮率約４０％の血管攣縮を再現性よく誘導できた。無処置のウサギでも収縮率は約４０％であったことから、対照抗体には薬理作用は認められないと結論された。一方、抗HMGB1抗体投与群では、血管収縮率は１９％に留まっていた。統計学的解析で、抑制効果は対照抗体投与群ならびに無処置群と比較し有意の効果であると判定された。血管断面のヘマトキシリン－エオジン染色標本では、３群間で特徴的な差は見出されなかった。HMGB1を血攣攣縮の極期であるクモ膜下出血３日目に免疫染色すると、健常ウサギで認められた第４脳室上衣細胞層の強陽性構造が、対照群ならびに無処置群では殆ど認められなくなっており、一方、抗HMGB1抗体投与群では、よく免疫陽性構造が保存されていることがわかった。

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　伊達　勲　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨
省略

研究分担者氏名

省略

D．考察
虚血ラット脳で認められた神経細胞からの HMGB1 放出は、クモ膜下出血後３日目のウサギ脳では、著明ではなかった。一方、第４脳室上衣細胞層からの HMGB1 の消失は、クモ膜下出血後にこの細胞から細胞外への放出がおこることを示唆する所見である。ウサギモデルで、略一定の強さの血管攣縮を誘導することに成功したが、無処置ウサギと対照抗体処置群とで攣縮に差がなかったことから、対照抗体には薬理作用はないと結論できる。抗 HMGB1 抗体は、無処置あるいは対照抗体処置ウサギで認められた攣縮を略５０％抑制した。この抑制効果は、これまでに報告されている治療薬候補のなかでトップクラスの成績である。

E．結論
抗HMGB1抗体治療法は、ウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルにおいて、極めて優れた効果を発揮した。薬物投与法はクモ膜下出血後の静脈内投与であり、ヒト臨床における応用において無理のない投与法である。したがって、本抗体治療法は新しい脳血管攣縮治療薬として有望であると結論された。

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
該当無し
2.　学会発表
該当無し

H．知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
1. 脳血管攣縮抑制薬
特許3882090号
PCT/JP2007/60231　WO2007/135992

クモ膜下出血後の脳血管攣縮モデルに関する研究

伊達　勲

目的：

クモ膜下出血後の脳血管攣縮は、脳外科領域における未解決の重要課題である。これまで動脈血管壁平滑筋に発現する受容体や細胞内収縮シグナル伝達系をターゲットにした薬物が多数開発され、臨床応用が試みられてきたが、大きな臨床効果を発揮する薬物は未だ見出されていない。本研究では、ラットの脳梗塞モデルにおいて著効を示した HMGB1 を標的とする抗体療法をウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルに応用し、その効果の評価と作用機序解析を行う。

方法と結果：

体重 3-3.5 kg のニュージーランド白色雄性ウサギを実験に用いた。ウサギのクモ膜下出血は、大槽から１ｍｌの髄液を抜いた後、３ｍｌの自己血を大槽内に注入することによって作製した（下表）。クモ膜下出血作製５－７日前に脳血管造影を行い、クモ膜下出血作製３日後に再度脳血管造影を実施し、脳底動脈９箇所における血管収縮率を X 線画像から算出した。抗 HMGB1 抗体あるいは対照の抗 *Keyhole limpet* hemocyanin 抗体は、クモ膜下出血作製後１時間と２５時間の時点で各 2 mg 投与した。血管造影完了後、ウサギは深麻酔下に脱血致死させ、摘出脳底動脈領域をホルマリン固定した。固定組織をパラフィン包埋切片とし、ヘマトキシリンーエオジン染色ならびに抗 HMGB1 染色を施した。

ウサギ　クモ膜下出血（SAH）モデル

Material and Methods

Rabbit（3~3.5kg）
全てのウサギにつき、脳血管撮影（pre）施行(実験前5－7日）
[SAHモデル]
大槽よりCSFを1 ml排出後、central ear arteryより採取した動脈血
3 mlを注入

Group ①：SAH　無処置
Group ②：SAH＋コントロール抗体（Rat IgG）静注
Group ③：SAH＋抗HMGB1ラット単クローン抗体静注
[静注方法]
SAHモデル作成の1時間後・25時間後に2.0mg（約0.5ml）ずつ
2回静注
Day 3に脳血管撮影（post）し、preと脳底動脈径を比較

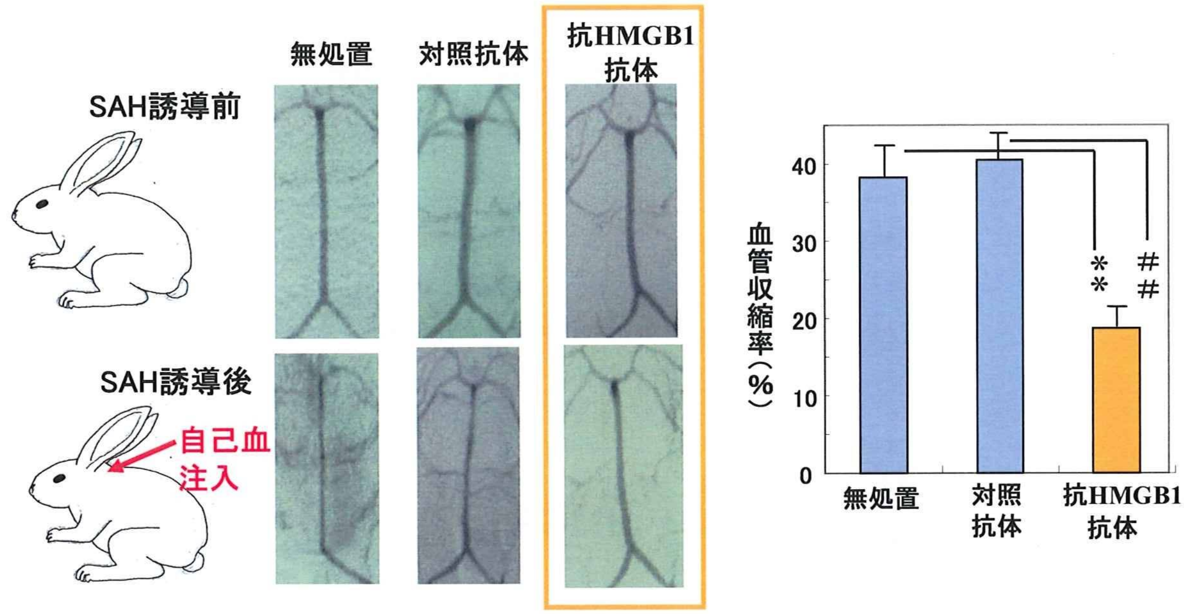
本プロトコールによるクモ膜下出血で、出血後３日目で対照群ウサギの脳底動脈において収縮率約４０％の血管攣縮を再現性よく誘導できた（Figure 1)。無処置のウサギでも収縮率は約４０％であったことから、対照抗体には薬理作用は認められないと結論された。一方、抗 HMGB1 抗体投与群では、血管収縮率は１９％に留まっていた（Figure 1)。統計学的解析で、抑制効果は対照抗体投与群ならびに無処置群と比較し有意の効果であると判定された。血管断面のヘマトキシリン－エオジン染色標本では、３群間で特徴的な差は見出されなかった。HMGB1 を血攣攣縮の極期であるクモ膜下出血３日目に免疫染色すると、健常ウサギで認められた第４脳室上衣細胞層の強陽性構造が、対照群ならびに無処置群では殆ど認められなくなっており、一方、抗 HMGB1 抗体投与群では、よく免疫陽性構造が保存されていることがわかった（Figure 2)。

考察と結論：

虚血ラット脳で認められた神経細胞からの HMGB1 放出は、クモ膜下出血後３日目のウサギ脳では、著明ではなかった。一方、第４脳室上衣細胞層からの HMGB1 の消失は、クモ膜下出血後にこの細胞から細胞外への放出がおこることを示唆する所見である。ウサギモデルで、略一定の強さの血管攣縮を誘導することに成功したが、無処置ウサギと対照抗体処置群とで攣縮に差がなかったことから、対照抗体には薬理作用はないと結論できる。抗 HMGB1 抗体は、無処置あるいは対照抗体処置ウサギで認められた攣縮を略５０％抑制した。この抑制効果は、これまでに報告されている治療薬候補のなかでトップクラスの成績である。

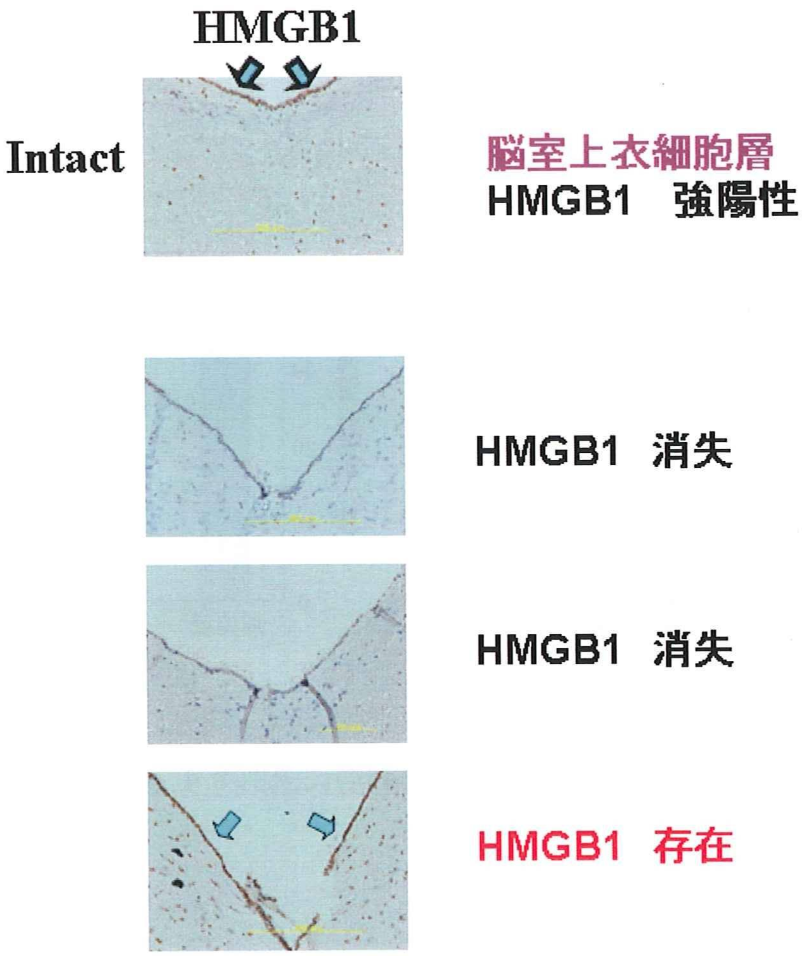
抗 HMGB1 抗体治療法は、ウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルにおいて、極めて優れた効果を発揮した。薬物投与法はクモ膜下出血後の静脈内投与であり、ヒト臨床における応用において無理のない投与法である。したがって、本抗体治療法は新しい脳血管攣縮治療薬として有望であると結論された。

Figure 1



●抗HMGB1抗体は脳血管攣縮を著明に抑制する

Figure 2



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　友野　靖子　重井医学研究所分子細胞生物部門・室長

研究要旨：最適の治療用抗 HMGB1 ラット単クローン抗体(#10-22) の大量発現・精製法を確立した。精製は、アフィニティとゲル濾過の２段階精製で、高純度の抗体精製を可能にした。高純度精製抗体を用いて、抗原エピトープを決定し、抗体の親和性を測定した。

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。

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。

（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替え体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。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、1.5x 10-8M, 3x10-7M, 2.2x10-7M と算出された。

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　友野　靖子　重井医学研究所分子細胞生物部門・室長

研究要旨

省略

研究分担者氏名

省略

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。

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。

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

該当無し

2.　学会発表

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.平成 22 年 3 月：大阪国際会議場

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.科学技術振興機構による特許群認定
特許群番号Ｇ10-0040
4.アテローム動脈硬化抑制剤
特願2009-223472