

表1 前臨床/臨床で検討されてきた脳梗塞治療薬の種類

- |                 |
|-----------------|
| 1. 血栓溶解薬        |
| 2. グルタミン酸受容体拮抗薬 |
| 3. カルシウムチャネル阻害薬 |
| 4. 抗炎症薬         |
| 5. 抗酸化薬         |
| 6. 成長因子/栄養因子    |
| 7. その他          |

いる。その中で、抗酸化薬に分類されるラジカルスカベンジャーのNXY-059は、前臨床段階で優れた効果が観察され、最初に実施された治験(2)においても有効性が示唆されたが、最終的に大規模治験で有効性が否定される結果となった(3)。後で触れるが、治験における評価において、脳卒中発症後の治療開始までの時間の要素は極めて重要であり、どのように治験対象患者を設定しそれを把握するかは臨床における重大な問題である。またこれまでの治験は、単剤での有効性を証明しようとするものであったが、脳梗塞病態の複雑性を考慮すると、先述の勧告(1)で示唆されたように前臨床研究レベルから、作用点の異なる2薬を併用する治療法も試みる必要があるかもしれない。

## 2. HMGB1の再発見

1999年、米国のKevin Traceyらの研究グループは、敗血症の晚期メディエータの探索研究の結果、マウスマクロファージ系細胞RAWを用いた培養系でLPS刺激後8時間以後に上清中に放出される因子を見出し、これをタンパクシークエンスによって同定した(4)。同定された因子は、細胞核内に局在するクロマチン結合性の非ヒストンタンパクとして既に見出され、クロマチン構造の維持機能や転写活性調節、DNA修復等に重要な働きをするHMGB1であった。Traceyらは、マウスのLPS致死モデルにおいて抗HMGB1ポリクローナル抗体が生存維持効果を発揮し、組換え体HMGB1タンパクの同時投与は致死性を高めることを明らかにした(4)。さらに、敗血症患者における血中HMGB1レベルの解析から、敗血症患者特に、重症のSeptic shock状態では高値となることを報告した(4)。これらの研究結果からTraceyらは、HMGB1がヒト臨床においてその存在が推定されてきた全身性の炎症応答を惹起する晚期メディエータであるとし、その上昇が敗血症の予後判定マーカーとなる可能性を示唆した。Traceyらの研究は、敗血症治療の領域で注目されただけではなく、直ちに種々の炎症性疾患病態におけるHMGB1の役割が検討され、急性肺損傷(5)、関節リウマチ(6)、肝虚血再灌流障害(7)等で、その関与を裏付ける結果が報告された。これらの研究とならんで、細胞核から細胞外へのHMGB1分泌・放出機序についての研究も進められた。HMGB1の分泌・放出機序は、大きく分けると壊死細胞からの受動的放出と

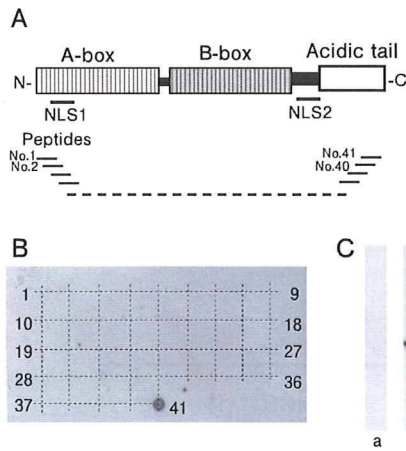
マクロファージ系細胞からの刺激依存的分泌の2様式が存在すると考えられているが、放出後の新規サイトカイン様分子としての特性が明らかにされていった(8)。Traceyらの一連の研究は、核内タンパクを新規のサイトカイン様活性因子と同定し生体警告系の新しいシステムを提唱したこと、また、敗血症を含む炎症性疾患のメディエータであることを示した点において、基礎医学、臨床医学の両面に大きなインパクトを与えた。

## 3. HMGB1と脳梗塞

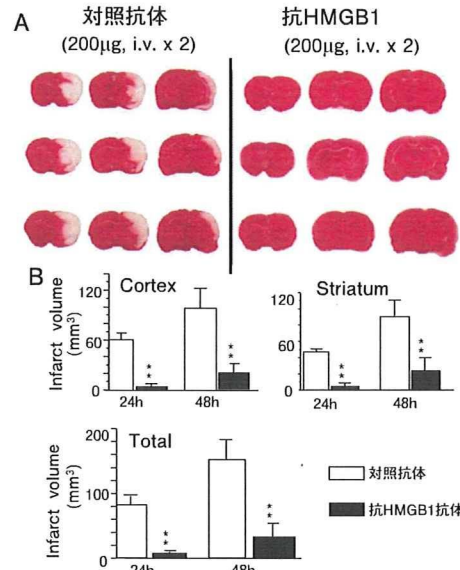
Kimら(9)は、脳虚血後のペナンプラ領域における遺伝子発現の変化につき解析し、発現上昇をきたす遺伝子としてHMGB1遺伝子を同定した。彼らは、*in vivo*でHMGB1タンパク発現を抑制するためshort hairpin RNAを設計し、これをマイクロインジェクションによって局所投与した。そしてshRNA投与局所におけるHMGB1タンパク発現誘導の抑制と局所ミクログリアの活性化ならびにTNF- $\alpha$ 遺伝子発現の抑制が極めて相関すること、その結果、神経細胞死の抑制に繋がることを報告した(9)。

Kimらの研究とは独立して、筆者らは脳梗塞急性期の脳内炎症の進展が最終的に形成される脳梗塞巣の増大に繋がることの仮説のもとに、抗HMGB1単クローナル抗体によるターゲットバリデーションを試みた(10)。まず、複数種類単クローナル抗体を作製し、15アミノ酸残基長の合成ペプチドを用いて個々の抗体のエピトープを決定した。HMGはファミリーを構成しているため、HMGB1特異的抗体としてHMGB1タンパクにのみ存在するC末端領域(DEEEDDDDE)を認識する抗体を選んだ(図1)。ラットの中大脳動脈2時間閉塞一再灌流後の脳梗塞形成に対する本抗体の投与効果は、再灌流直後とさらにその6時間後の末梢尾静脈内投与で検討された。つまり、臨床での使用と同様に卒中発作後の投与プロトコールとした。図2に示すように、再灌流24および48時間後のTriphenyltetrazolium chloride (TTC)を用いた染色で、対照動物では虚血側半球のかなりの範囲に広がる梗塞巣が形成されるのに対し、抗HMGB1抗体投与群ではそれぞれ90%および75%抑制された。梗塞サイズの縮小効果が必ずしも神経症状の改善につながっていないのではないかと動物モデル実験に対する批判があるが(1)、再灌流後24時間まで測定したRota-rod上での歩行時間を指標にした運動麻痺機能の評価でも、著明な運動機能改善効果が証明された(図3)。運動麻痺の程度を姿勢制御の観点からスコア化した神経学的評価でも、同様の結果を得た。以上の結果から、抗HMGB1単クローナル抗体は、卒中発作後の投与によっても脳梗塞サイズの縮小と運動麻痺症状の軽減化を図れる治療法であることがわかる。

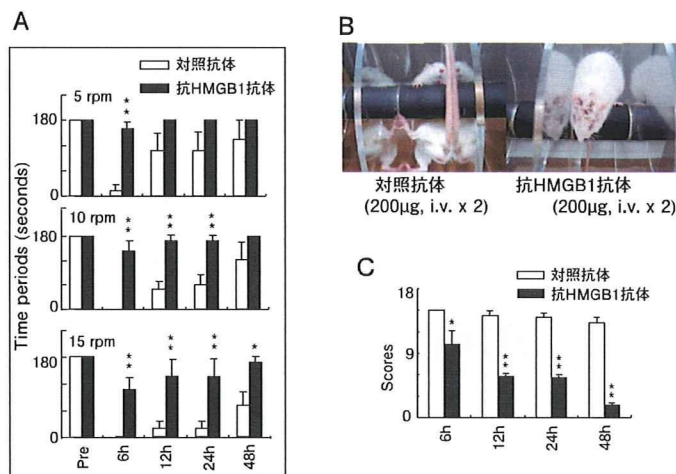
虚血脳におけるHMGB1の局在は再灌流後12時間



**図1 抗HMGB1単クローン抗体** (文献10より改変)  
 A: HMGB1のドメイン構造とエピトープ決定に用いた15アミノ酸残基長の合成ペプチド。NLS:核局在化配列。B:合成ペプチドを用いたエピトープの決定。No.1からNo.41までの合成ペプチド各0.5 $\mu$ gをUltra Bind Membraneに順にスポットし、風乾後、抗HMGB1ラット単クローン抗体(#10-22)、POD標識抗ラットIgGヤギ抗体、ケミルミネッセンス法でプロットした。No.41が陽性反応を示した。C:健全ラット脳ホモジネート上清を抗原とした抗HMGB1ラット単クローン抗体によるウエスタンブロット。レーンa:対照抗体(クラスマツチした抗Keyhole Limpet hemocyanin抗体)、レーンb:抗HMGB1ラット単クローン抗体(#10-22)



**図2 抗HMGB1抗体のラットMCAO脳梗塞に対する効果** (文献10より改変)  
 A:ハロタン麻酔下に、シリコンコーティングを施したナイロン縫合糸を塞栓子として、中大脳動脈(MCA)起始部を2時間閉塞し、その後再灌流した。抗体は再灌流直後とその6時間後の2回、尾静脈より各200 $\mu$ gを投与した。再灌流24時間後、前頭断面の2mm厚脳スライスにTriphenyltetrazolium chlorideによる染色を施し、梗塞部位を白色領域として同定した。各群、3個体のデータを示す。B:再灌流24および48時間後の梗塞領域の体積を、大脳皮質と線条体部位について定量化した。



**図3 抗HMGB1抗体の運動麻痺に対する効果** (文献10より改変)  
 A:ラット脳虚血後、抗体は再灌流直後とその6時間後の2回、尾静脈より各200 $\mu$ gを投与した。すべてのラットは手術前にトレーニングし、最高回転でRota-rod上180秒の歩行ができるようにした。脳虚血手術後の3種類の回転速度によるRota-rodテスト結果を示す。B:6時間後の最高回転でのテスト風景を示す。抗HMGB1抗体治療群は転落せず、一定時間歩行可能であった。C:同実験における運動麻痺症状のスコア化の結果を示す。

で検討され、虚血コア領域では、殆どの細胞核がHMGB1陰性に変化していた(図4)。この知見は、HMGB1が虚血部位細胞の核内から細胞外への放出されることを想像させる。また、抗HMGB1抗体の投与がこのようなHMGB1の消失現象をも抑制した(図4)ことは、細胞外に放出されたHMGB1による細胞

内HMGB1放出促進(ポジティブフィードバック)の機構が存在することを強く示唆している。筆者らの報告のあと、複数のグループからHMGB1の細胞内トランスロケーションならびに消失に関し詳細な報告が相次いだ(11-13)。それらを総合すると、HMGB1の核内から細胞質への移動と、さらに細胞外への放出

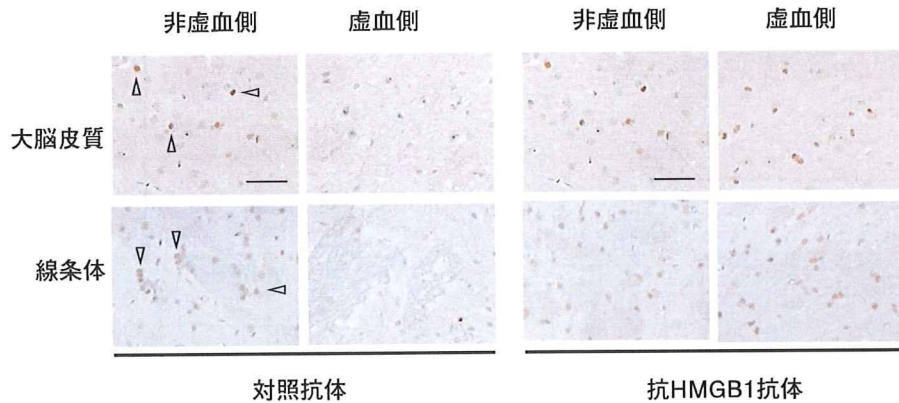


図4 HMGB1の虚血局所からの消失と抗HMGB1抗体投与によるその抑制 (文献10より改変)  
 ラット脳虚血後、抗体は再灌流直後とその6時間後の2回、尾静脈より各200 $\mu$ gを投与した。再灌流12時間後に心室からのフォルマリン灌流で脳を固定し、抗HMGB1抗体による免疫染色を行なった。写真は大脳皮質と線条体における典型的な染色パターンを示す。矢頭：HMGB1陽性の細胞核を示す。スケールバーは50 $\mu$ m。

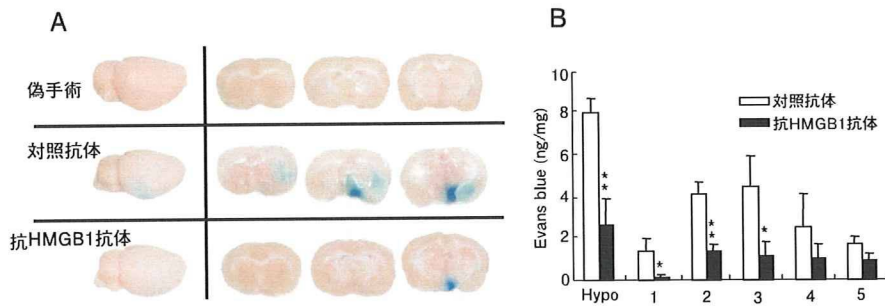


図5 エバンスブルー漏出で示される脳血管透過性の亢進と抗HMGB1抗体投与によるその抑制 (文献10より改変)  
 A: 抗体投与直前にエバンスブルー40 mg/kgを尾静脈より投与し、その3時間後に色素の血管外漏出を観察した。B: 摘出脳を視床下部 (Hypo) と残りの部分 (吻側1-尾側5) にわけ、エバンスブルーを脳組織から抽出後、定量した。

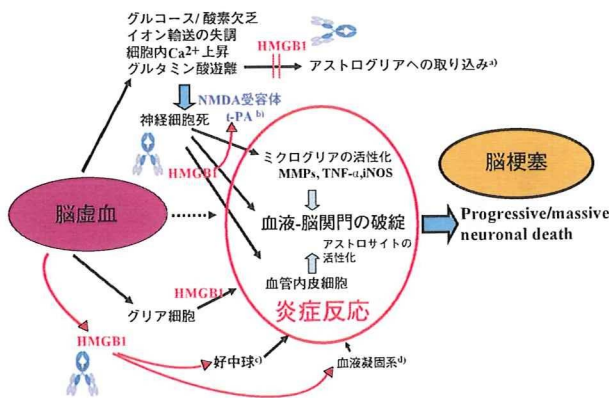


図6 抗HMGB1単クローン抗体の脳梗塞に対する効果の作用機序仮説  
 a) Pedrazziら (20), b) Parkkinenら (21), c) Fanら (22), d) Itoら (23)

は、脳虚血の早期から生じていると推測される。図5に示されるように、エバンスブルーを用いた脳血管の透過性の測定において再灌流3時間の時点で明らかな

透過性の亢進が認められた。また同時点で脳を固定し透過型電子顕微鏡で観察したところ、エバンスブルー(アルブミン)の漏出をきたした脳部位では、血液-脳関門を構成するアストログリア細胞のエンドフィートの腫脹が著明であり、またエンドフィートの細胞形質膜が内皮細胞基底膜から遊離した像がしばしば観察された(投稿準備中)。このように、脳虚血後の脳血管特に血液-脳関門を構成する血管内皮細胞レベルでの著明な変化は、再灌流モデルでは再灌流3時間以内にすでに発生していると考えられる。したがって、この間に生じる重大事象を分子レベルで具体的に解明する地道な作業が求められるが、これまでのモデル動物を用いた研究では、時間を遡行することによって最初期に生じる変化を見出すといった研究は稀であり、そのことは最初期変化を捉えることの実験的困難さの裏返しでもある。ラットモデルにおいて、脳-血液関門の構造的ならびに機能的破綻が再灌流3時間後に顕著に認められることは、臨床におけるt-PAの有効治療時間帯が卒中発作後3時間であることとも一致する。この時間帯を越えるとt-PAの脳内移行が増加し、有



害作用につながる事が十分予想される。抗 HMGB1 抗体による治療は、この最初期応答としての脳血管透過性亢進を抑制することができた。同様に、抗体投与は虚血領域のミクログリアの活性化、MMP-9 タンパク発現、TNF- $\alpha$  および iNOS 発現など脳内炎症の進行を促す種々の要因を抑制した(10)が、これらの観察は、再灌流後 6 - 12 時間後の時点で行われている。再灌流後 3 時間以内に発生する BBB の破綻現象は、文献的報告を含めて最初期応答の一つと捉えることができるが、この時間内に進行する脳血管障害の分子機序をさらに明らかにする必要がある。そのことによって、新規の分子標的が見出される可能性もあると考えられる。Qiu らの観察(13)によると、HMGB1 の細胞内トランスロケーションは中大脳動脈閉塞 1 時間で既にスタートしており、その一部は細胞外へ放出しているように見える。このように、細胞核内にかかなりの量が構成的に発現している HMGB1 は、虚血シグナルのセンシングによって極めて早期に動員されるメディエータの可能性もある。今後、HMGB1 の脳血管透過性亢進に果たす役割の詳細が解明されなければならない。

Hayakawa ら(14)と Kikuchi ら(15)は、ミノサイクリンの脳梗塞抑制作用を、それぞれ HMGB1 の発現抑制と遊離抑制によるものと関連づけた。また、Kikuchi ら(16)は、わが国における脳梗塞治療薬のエダラボンが、HMGB1 のトランスロケーションを抑制することを見出した。このように、既存薬の中にもその作用の一部に HMGB1 の発現や遊離抑制が関与するものが存在するようであり(17)、今後さらに検討を続ける必要がある。HMGB1 の受容体の一つは Receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) であると考えられている(8, 18)。最近、RAGE のノックアウトマウスを用いた脳梗塞実験結果が報告された(19)。それによると、RAGE ノックアウトでは野生型マウスと比較して生じる梗塞塞が小さく、マクロファージ系細胞の活性化が減弱していた。またこの報告の中で、抗 HMGB1 ウサギポリクローナル抗体の腹腔内投与が野生型マウスの脳梗塞を縮小すること、さらに抗体は脳虚血部位に到達していることが免疫組織化学的に示された(19)。このように、脳梗塞急性期における HMGB1-RAGE 系の役割が、徐々に明らかにされてきている。

#### 4. 今後の展望

図 6 に著者らが考える脳梗塞の形成過程と、HMGB1 の関与部位を概念的に示す。著者らの研究から、脳内障害細胞から放出された HMGB1 は、ミクログリアの活性化とアストログリアのエンドフィートの形態変化を惹起し、血液-脳関門の破綻につながっていくことが想像される。マウスのアストログリア細胞膜小胞を用いた試験管内実験で、HMGB1 はグルタ

ミン酸のアストロサイト膜小胞への取り込み抑制作用を持つ可能性が示唆されている(20)。HMGB1 はまた、組織型プラスミノゲンアクチベータを活性化し、プラスミノゲンをプラスミンに変換することが試験管内実験で示されている(21)。細胞外グルタミン酸濃度の上昇によって、神経毒性が発揮されることが予想され、また脳内 t-PA の活性化も神経障害的に働く可能性があることから、これらの作用は脳梗塞塞の拡大に働くことと推測される。さらに、循環血中に放出される HMGB1 (9)は、Toll-like receptor-4 を介する好中球の活性化(22)や血液凝固促進(23)をもたらし可能性があり、すべて脳梗塞の増悪に働くと考えられる。ここで描かれた炎症過程は、循環血中細胞・因子や脳実質細胞と密接な関係をもちながら、相互に増幅するループを形成していると推測される。したがって、著者らが想像するような多段階において作用する可能性のあるサイトカイン様活性因子 HMGB1 の作用を遮断することは、このように複雑なカスケードを抑制するのに必須のアプローチであるかもしれない。また、虚血後最初期における生体反応の中で、血液-脳関門の構造的、機能的破綻がどのような分子メカニズムでもたらされ、如何にしてそれを制御できるかという観点は、単に神経細胞のアポトーシスを抑制するという微視的視点とは異なり、より重要であると考えられる。HMGB1 には、アセチル化、メチル化、リン酸化、ニトロシル化などの化学修飾フォームが存在し、DNA のほかに IL-1 $\beta$  のようなサイトカインや LPS 等と複合体を形成することが示されている(24)。また、RAGE 以外に Toll-like receptor-2/4 を受容体とする可能性が在り(8)、リガンド-受容体相互作用の様相は複雑である。今後の研究に負うところ大である。

#### 文 献

- 1) STAIR. Stroke. 1999;30:2752-2758.
- 2) Lees KR, et al. N Engl J Med. 2006;354:588-600.
- 3) Shuaib A, et al. N Engl J Med. 2007;357:562-571.
- 4) Wang H, et al. Science. 1999;285:248-251.
- 5) Abraham E, et al. J Immunol. 2000;165:2950-2954.
- 6) Taniguchi N, et al. Arthritis Rheum. 2003;48:971-981.
- 7) Tsung A, et al. J Exp Med. 2005;201:1135-1143.
- 8) Lotze M, et al. Nat Rev Immunol. 2005;5:331-342.
- 9) Kim JB, et al. J Neurosci. 2006;26:6413-6421.
- 10) Liu K, et al. FASEB J. 2007;21:3904-3916.
- 11) Faraco G, et al. J Neurochem. 2007;103:590-603.
- 12) Kim JB, et al. J Neurosci Res. 2008;86:1125-1131.
- 13) Qiu J, et al. J Cereb Blood Flow Metab. 2008;28:927-938.
- 14) Hayakawa K, et al. Stroke. 2008;39:951-958.
- 15) Kikuchi K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Apr 18.
- 16) Kikuchi K, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2009 Mar 17.
- 17) Hayakawa K, et al. Neuropharmacology. 2008;55:1280-1286.
- 18) 西堀正洋. 日薬理誌. 2004;124:58.
- 19) Muhammad S, et al. J Neurosci. 2008;28:12023-12031.
- 20) Pedrazzi M, et al. J Neurochem. 2006;99:827-838.
- 21) Parkkinen J, et al. J Biol Chem. 1991;266:16730-16735.
- 22) Fan J, et al. J Immunol. 2007;178:6573-6580.
- 23) Ito T, et al. J Thromb Haemost. 2007;5:109-116.
- 24) Bianchi ME. J Leukoc Biol. 2009;86:573-576.

# How to 発明

## 全国発明表彰受賞者に聞く



平成21年度 21世紀発明奨励賞

脳梗塞を抗体で治療する

「抗体医薬による脳梗塞の新規治療法」の発明（特許第3876325号）

国立大学法人岡山大学

大学院医歯薬学総合研究科 生体制御科学専攻 生体薬物制御学講座 薬理学 教授

西堀 正洋

### 1. 今回の発明に至った経緯

脳梗塞に代表される脳血管疾患は、わが国における死因の第3位にあります。また、脳血管疾患では一命を取り留めた場合も重篤な神経後遺症を残すことが多く、介護を要する患者の原因疾患を調べると、脳血管疾患が圧倒的に多いのです。したがって、患者はもとより、家族にかかる負担も大きく、その予防と有効な治療法の確立は国民保健医療上の重要課題であるといえます。

1990年代から組織型プラスミノゲンによる血栓溶解の研究が進み、日本でも2005年から臨床治療に導入されました。当初から有効な治療薬として大きな期待が寄せられていましたが、治療を開始するまでの時間が脳卒中発作から3時間以内と制限されていることや、脳出血といった副作用への注意から、組織型プラスミノゲンによる急性期治療を受けられる患者さんの割合は、現在必ずしも高くありません。

このような現状から、新しい作用機序による新規薬物に対する期

待が高まっており、多くの新規薬物に関する研究が、最近20年間にわたって続けられています。

しかし一方で、臨床への応用が可能となった薬物はほとんどないという残念な状況が続いているのです。

私たちの研究グループでは、「炎症」をキーワードにいろいろな病気の状態（疾患病態）を理解しようと努めてきました。一見、単純そうに見える病気についても、問い詰めていくとよく分からないことが多く残されています。

脳梗塞の場合にも、脳血管内にできる血栓、あるいは心臓内に生じた血栓が塞栓子となって血管を閉塞し、支配領域の神経組織が壊死するという大まかな病気の理解は正しいのですが、それでは酸素欠乏とエネルギー源の途絶で短時間に神経細胞が死んでしまうかという、必ずしもそうは言い切れません。

また、脳血管に閉塞部位ができるとき、血流量がほとんどゼロになってしまう領域と、30%あるいは50%等と、虚血の状態は部

位によって差があり、そういった相対虚血の領域がどういった運命をたどるのかは、重要な問題でありながらよく分かっていません。

このような問題を明らかにするために、私たちは「虚血時に脳内で生じる時間依存的な炎症反応が、血液—脳関門と呼ばれる脳に特有の血管構築を破綻させ、大きな神経細胞死につながっていく」という仮説を立てました。そして、この脳内炎症を引き起こす可能性のある分子をいくつか想定し、それらの分子に対する単クローン抗体の作製を始めました。特異的抗体によって脳内炎症の過程を制御できるようになれば、結果的に発生する脳梗塞巣を縮小できると考えたのです（図1）。

脳梗塞の研究では、共同発明者である足立尚登博士と劉克約博士が、それまでに多くの実験研究経験を持っていたことも研究を効率的に進めていくのに非常に重要でした。

### 2. 技術の概要

治療標的として選ばれたのは、

新規のサイトカイン分子である High mobility group box-1 (以下、HMGB1) と呼ばれる活性物質です。

この分子は、もともと細胞核内でDNAに結合して存在し、クロマチン構造の維持、遺伝子の転写調節やDNA修復などの機能を果たすのですが、脳虚血下には神経細胞核に存在するHMGB1が細胞外へ放出されます(図2)。そして、細胞外に出たHMGB1は、サイトカイン様の活性を発揮し、脳内炎症の引き金になります。

こういった動態(トランスロケーション)を示すサイトカイン様活性物質は非常に珍しく、既存の活性因子にはない特徴に強い興味を持ちました。

本発明では、HMGB1に対する単クローン抗体を作製し、HMGB1の中和活性を有する抗体がラットの脳梗塞モデルにおいて

著効することを脳梗塞巣の縮小と神経症状の改善の両面で証明しました(図3)。また、分子レベルや個々の細胞レベルでの効果を分析しました。

その結果、抗体治療は、脳毛細血管に特徴的な血液-脳関門の構造と機能の維持に強く働くということが分かってきました。その機序は抗体が脳内ミクログリアの活性化を抑制し、毛細血管基底膜構造の消化に働くマトリックスメタロプロテアーゼ-9の活性発現を抑制するというものです。

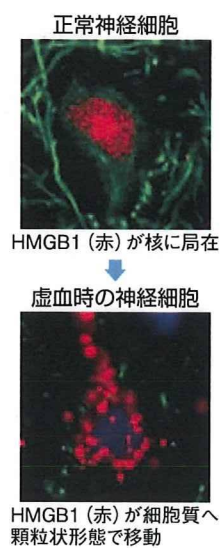
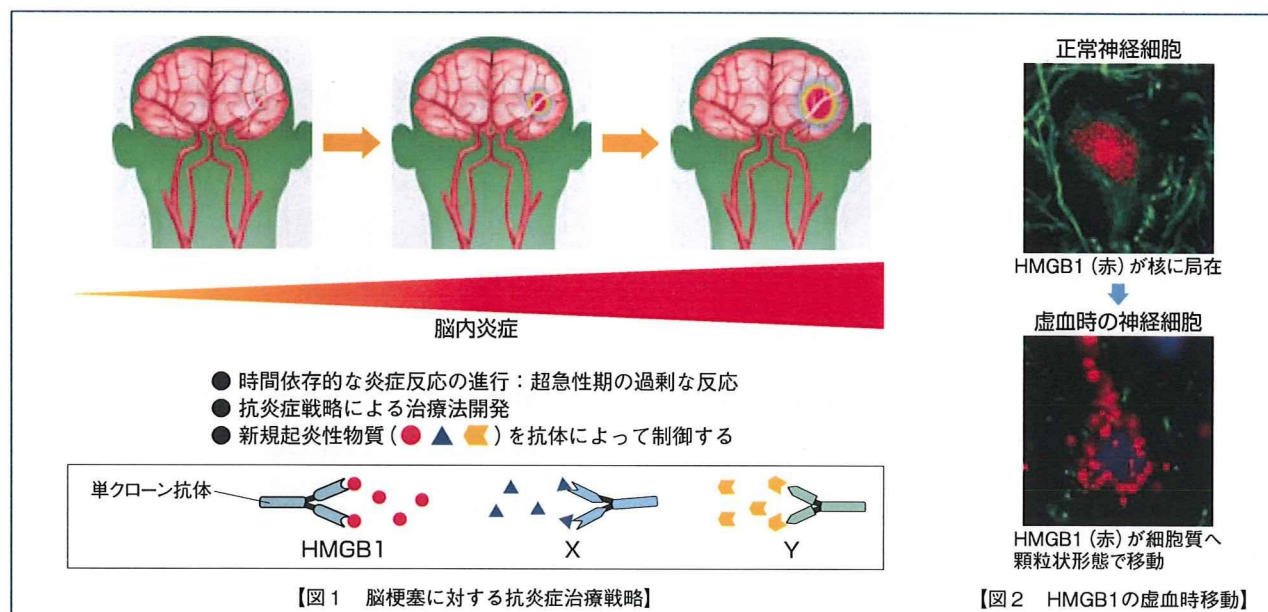
これにより、脳虚血の急性期早期から認められる毛細血管を取り囲むアストログリア細胞の突起の腫脹が、かなり改善できることが電子顕微鏡観察で分かりました。血液-脳関門が構造的ならびに機能的に破綻すると、血しょうタンパク質が脳実質へ漏出するようになり、脳の腫れが起こってきます。

脳虚血後の腫れは、予想していたより速い時間経過で進行すると思いましたが、抗体の投与はそれを著明に抑制しました。

### 3. 技術的課題をどのように克服したか

HMGB1は、進化的に極めて保存性の高いタンパク質で、ほ乳動物間のアミノ酸ホモロジーは99%です。また、HMGB1の遺伝子欠損マウスは出生直後に死亡することから、生存においても必須の因子と考えられます。

したがって、動物にHMGB1を投与して多種類の良い抗体を得ることは難しいと予想されました。実際、得られる単クローン抗体の種類は少なく、本発明につながったクローン抗体が得られたことは、幸運だったと感じています。





#### 4. 失敗談や苦労話

抗体を解析するとき、最もよく用いる手法の一つがウエスタンブロットリングです。私たちが作製した単クローン抗体もスクリーニングの過程でウエスタンブロットリングを行っていました。

抗原として、組み換え体であるHMGB1を使うことが多かったのですが、この時に気がつかなかった問題が、ヒト白血球由来のHMGB1を検出するようになって明らかになってきました。ネイティブタンパクではいろいろな種類の化学修飾が報告されています。おそらくそのために、ウエスタンブロットリングでのネイティブHMGB1の認識に、これまで組み換え体のHMGB1では起こらなかったばらつきが見られるようになりました。極端な場合には、認識そのものがほとんど減弱してしまうということもありました。

当初は、実験手技上の問題を疑っていましたが、その理由が抗原の構造の特殊性にあるのではと考えるようになってきました。この問題は、今後も検討し解決していかなくてはならない課題となっています。

#### 5. 研究・開発の“やりがい”と“心がけ”

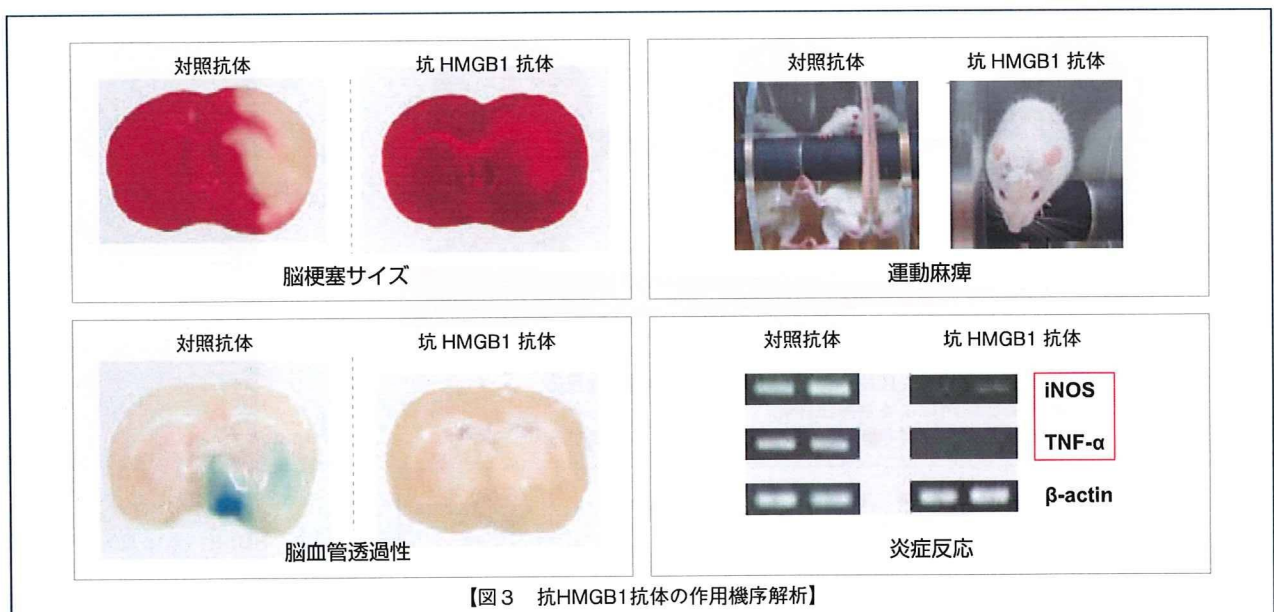
実験研究では、小さな検証を積み重ねていくことが多いと思います。心がけていることは、一つひとつを丁寧に見ていくこと、そして、その過程で得られる予想外の結果や狙いどおりにならないことにも注意を向けるようにすることです。そして、自分たちの工夫で立ち上げた実験系を用いて興味深い結果を得たときには、そのポテンシャルを研究グループ内で十分議論するように努めています。そのなかに研究発展のシーズが潜

んでいる可能性があると考えから

です。  
私たちの研究は、創薬につながる性質のものです。現在、良い治療法がなかったり、難治性と呼ばれる疾患の治療薬開発にかかわれることは、大きな喜びであり、またやりがいがあります。

抗体薬によって脳梗塞を治療するという考えは、5年前では奇異に感じられたかもしれません。しかし、臨床治療におけるいくつかの革新的な成功によって、抗体医薬に対する認識は全く変わってきました。本抗体治療を人の臨床治療に応用すべく、現在は安全性確認を含む研究を続けています。

新規の治療薬の開発には、国民保健と医療経済的観点の両面から大きな期待が寄せられていますので、今後も精進していきたいと思





平成21年度  
**全国発明表彰  
受賞者功績概要**

National Commendation for Invention  
Summary of Winning Entries



主催／社団法人発明協会

後援／文部科学省 経済産業省 特許庁 日本経済団体連合会  
日本商工会議所 日本弁理士会 朝日新聞社



本発明表彰は、皇室の発明奨励に対する特別な思召により毎年御下賜金を拝受し、その御趣旨にそうため、特に功績顕著な発明者に恩賜発明賞を贈呈し、あわせて優れた発明の完成者、その実施者及び発明奨励に関する功労者を表彰することにより、我が国の科学技術の向上と発展に寄与することを目的として行っているものです。

本年も全国より多数の応募、推せんがあり、これらについて数次にわたる厳正な審査を行った結果、第1表彰区分（科学技術的に秀でた進歩性を有し、かつ顕著な実施効果を上げている発明等が対象）として、恩賜発明賞1件3名、特別賞9件34名、発明賞11件42名、第2表彰区分（科学技術的に秀でた進歩性を有し、かつ特許権等の設定登録後3年以内の発明が対象）として、21世紀発明賞1件1名、21世紀発明奨励賞2件12名、また、恩賜発明賞、特別賞を受賞した企業等の代表者に対する発明実施功績賞10件11名、21世紀発明賞、21世紀発明奨励賞を受賞した企業等の代表者に対する21世紀発明貢献賞3件4名、及び発明奨励功労賞8名の受賞が決定いたしました。

平成21年7月

社団法人 **発明協会**

The National Commendation of Invention is an annual concours designed to contribute to the development and advancement of science and technology by formally recognizing creators of particularly outstanding inventions as well as persons highly notable in their ability to exploit and promote inventions. Each year, the Imperial Household extends its special consideration to encourage inventions and graciously provides funding for the Imperial Invention prize, in line with the above mission, to inventors who have made distinguished achievements.

After the strict evaluation of countless entries and recommendations by way of a rigorous screening process, the following awards have been designated for presentation: In the First Commendation Division (intended for inventions possessing scientific and technological excellence in progressivity that have evidenced distinguished results in practice), the Imperial Invention Prize to 1 individuals for 1 project, the Grand Prize to 34 individuals for 9 projects, and the Invention Prize to 42 individuals for 11 projects; in the Second Commendation Division (intended for inventions possessing scientific and technological excellence in progressivity within 3 years from registration of their established patent rights), the 21<sup>st</sup> Century Invention Prize to 1 individual for 1 project and the 21<sup>st</sup> Century Encouragement of Invention Prize to 12 individuals for 2 projects; also, the Invention Practice Service Prize, for representatives of enterprises recipient to the Imperial Invention Prize and the Grand Prize, to 11 individuals for 10 projects; the 21<sup>st</sup> Century Contribution to Invention Prize, for representatives of enterprises recipient to the 21<sup>st</sup> Century Invention Prize and the 21<sup>st</sup> Century Encouragement of Invention Prize, to 4 individuals for 3 projects; as well as the Invention Encouragement Prize to 8 individuals.

July, 2009

Japan Institute of Invention and Innovation

# 目 次

## 《 第 1 表 彰 区 分 》

恩 賜 発 明 賞「液晶テレビの高速応答オーバードライブ技術の発明」	5
内 閣 総 理 大 臣 発 明 賞「熱硬化性繊維強化複合材料の熱溶着技術および一体化成形品の発明」	8
文 部 科 学 大 臣 発 明 賞「先端医療用極細銅合金線の発明」	10
経 済 産 業 大 臣 発 明 賞「シニアモビリティの意匠」	12
特 許 庁 長 官 賞「鉄道車両用セミアクティブ制御装置の発明」	14
発 明 協 会 会 長 賞「メタボローム測定装置の発明」	16
日 本 経 済 団 体 連 合 会 会 長 発 明 賞「移動通信システムの送信電力制御技術の発明」	18
日 本 商 工 会 議 所 会 頭 発 明 賞「放電加工機の制御技術の発明」	20
日 本 弁 理 士 会 会 長 賞「地上デジタル放送伝送技術の発明」	22
朝 日 新 聞 発 明 賞「オフセットオープン式多目的X線撮影装置の意匠」	24
発 明 賞「造影剤を用いずに血管（動静脈、狭窄、瘤）を良好に描出できるMRI装置の発明」	26
発 明 賞「2段式分光器の発明」	28
発 明 賞「ノンフロン型高性能フェノールフォームの発明」	30
発 明 賞「非走査共焦点型高速三次元計測装置の発明」	32
発 明 賞「塩分吸着剤による鉄筋の防錆技術の発明」	34
発 明 賞「トンネル接合磁気抵抗効果型磁気ヘッドの発明」	36
発 明 賞「マルチサイズインク滴の吐出方法の発明」	38
発 明 賞「光と音の新しいインターフェイスによる電子楽器の意匠」	40
発 明 賞「DLC Si被覆小型ITCCクラッチの発明」	42
発 明 賞「ディーゼルエンジン用コモンレールシステムの発明」	44
発 明 賞「経済型ボイラ用高強度鉄合金鋼の発明」	46

## 《 第 2 表 彰 区 分 》

21 世 紀 発 明 賞「サイボーク型ロボット技術の発明」	51
21 世 紀 発 明 奨 励 賞「抗体医薬による脳梗塞の新規治療法の発明」	54
21 世 紀 発 明 奨 励 賞「防誤制御型インバータ技術の発明」	56
《 発 明 奨 励 功 勞 賞 》	61
発 明 奨 励 金 の 贈 呈	66
お 問 合 せ 先	67



## 21世紀発明奨励賞

### 抗体医薬による脳梗塞の新規治療法の発明

(特許第3876325号)



国立大学法人岡山大学  
大学院医歯薬学総合研究科 教授  
西堀 正洋



筑波大学  
薬学部 教授  
森 秀治



国立大学法人岡山大学  
大学院医歯薬学総合研究科 准教授  
高橋 英夫



医療法人創和会 重井医学研究所  
分子細胞生物部門 室長  
友野 靖子



医療法人弘徳会 馬淵診療所  
院長  
足立 尚登



国立大学法人岡山大学  
大学院医歯薬学総合研究科 助教  
劉 克約

本発明は、抗HMGB1単クローン抗体による脳梗塞の治療法に関する発明である。

脳血管障害は我が国の死因の第3位を占めるが、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、血栓溶解薬である組織活性化t-PAやリジカルスカベンジャーが臨床で用いられているが、有効治療時間帯の制限や副作用の問題があり、より汎用性のある治療法



21世紀発明貢献賞  
国立大学法人岡山大学  
学長 千葉 喬三



国立大学法人愛媛大学  
学長 柳澤 康信

が求められている。本発明では、「脳梗塞の時間依存的形成過程においては過剰な炎症反応が存在する」との仮説のもとに、その媒介因子としてのHigh mobility group box1 (HMGB1)に着目し、特異的抗HMGB1単クローン抗体による脳梗塞治療法を発明した。

抗HMGB1単クローン抗体はHMGB1分子内の酸性アミノ酸が連続するテイル領域のC末端を認識する。2時間中大脳動脈血流を遮断するラットの脳梗塞モデルにおいて、本抗体を脳虚血直後とさらに6時間後の2回、各200 $\mu$ gを静脈内へ投与すると、24時間後に形成される脳梗塞巣が90%減少した。その作用機序を解析すると、脳血管の透過性亢進が著明に抑制されていること、虚血脳部位におけるミクログリアの活性化が抑制されていること、さらに誘導性NO合成酵素とTNF- $\alpha$ の発現誘導が抑制されていることが明らかとなった。モデル動物における運動麻痺症状も劇的に改善した。一方、虚血再還流後の脳血流改善効果はごく僅かであった。脳虚血後1週間の時点での生存率の評価でも、抗体治療は良好な結果を示した。

抗HMGB1単クローン抗体による脳梗塞の治療法は、新規の起炎性因子を標的とした抗体医薬の発明であり、既存の治療法とは作用点が全く異なっている。抗体単独での効果も非常に優れているが、既存薬と組み合わせることによって、それぞれの特徴を最大限発揮させる新規治療法になると期待される。本発明を実用化することによって、わが国の保健医療上の重要な課題解決に貢献できる。



# The 21<sup>st</sup> Century Encouragement of Invention Prize

## Invention of antibody drug for the treatment of brain infarction

(PAT. No. 3876325)

Inventors : Masahiro Nishibori      Yasuko Tomono  
                   Shuji Mori                              Naota Adachi  
                   Hideo Takahashi                      Keyue Liu

President : Kyoza Chiba  
 OKAYAMA UNIVERSITY  
 President : Yasunobu Yanagisawa  
 EHIME UNIVERSITY

Brain infarction is one of the major causes of death in advanced countries including Japan. In ischemic stroke, interruption of blood flow by thrombus or embolus induces neuronal death in the ischemic core as a result of the inability to maintain membrane ion gradients in neurons, excitotoxicity due to elevated glutamate levels and disruption of the blood-brain barrier. The penumbra, surrounding the core, receives a relatively low blood supply and develops time-dependent inflammatory responses that can be deleterious to the surviving neurons. Therefore, it is thought that this region can be reversibly rescued and thus could be a target for drug treatment. A diversity of neuroprotective candidate drugs targeting varieties of factors associated with ischemic insult have been subjected to preclinical and clinical studies. Despite these extensive efforts, an effective therapy has not yet been successfully established.

The high mobility group box-1 (HMGB1), originally identified as an architectural nuclear protein, exhibits an inflammatory cytokine-like activity in the extracellular space. HMGB1 was reported to be released from necrotic cells. Therefore, we hypothesized that this factor may be released from plural types of cells in the brain during ischemic insult leading to facilitation of inflammatory response and that the regulation of the activity of HMGB1 may produce a beneficial effect on brain tissue. We

obtained three rat monoclonal antibodies (mAb) against bovine HMGB1 and characterized one clone (#10-22) that recognized C-terminal sequence of HMGB1 protein.

Treatment with this neutralizing mAb (200 µg, twice, i.v.) remarkably ameliorated brain infarction induced by 2-h occlusion of the middle cerebral artery in rats, even when the mAb was administered after the start of reperfusion. Consistent with 90 % reduction in infarct size, the accompanying neurological deficits in locomotor function were significantly improved. Anti-HMGB1 mAb inhibited the increased permeability of the blood-brain barrier, the activation of microglia, the expression of TNF- $\alpha$  and iNOS, and suppressed the activity of MMP-9, whereas it had little effect on blood flow. Immunohistochemical study revealed that HMGB1 immunoreactivity in the cell nuclei decreased or disappeared in the affected areas, suggesting the release of HMGB1 into extracellular space. These results strongly indicated that HMGB1 plays a critical role in the development of brain infarction through the amplification of plural inflammatory responses in the ischemic region and could be an outstandingly suitable target for the treatment. The present invention of neutralizing anti-HMGB1 mAb provides a novel therapeutic strategy for ischemic stroke.

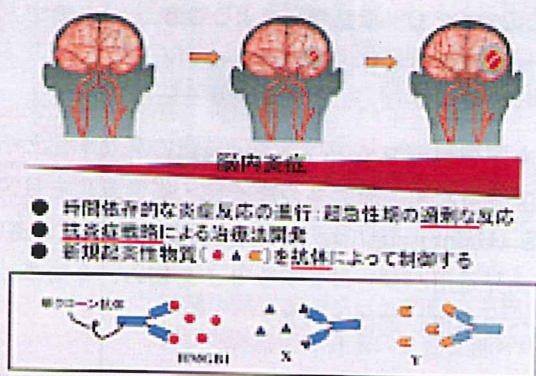


図1 脳梗塞の形成過程と抗体医薬によるその制御

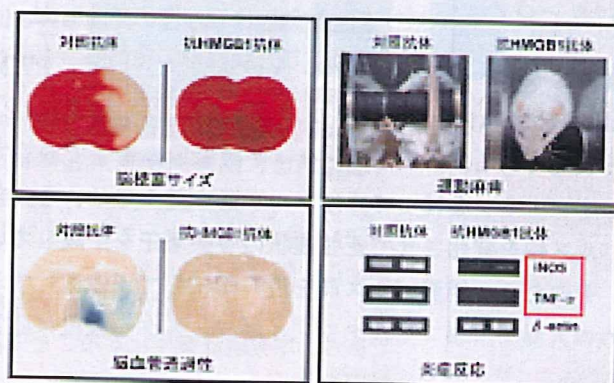


図2 ラットの中大脳動脈2時間閉塞による脳梗塞モデルにおける抗HMGB1抗体の効果



# 社団法人発明協会主催 平成21年度全国発明表彰 21世紀発明奨励賞

抗体医薬による脳梗塞の新規治療法の発明 (特許第3876325号)

国立大学法人岡山大学・  
国立大学法人愛媛大学

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

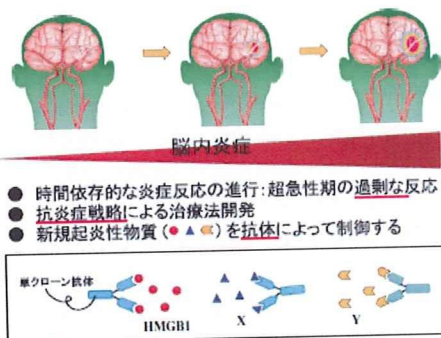


図1 脳梗塞の形成過程と抗体医薬によるその制御

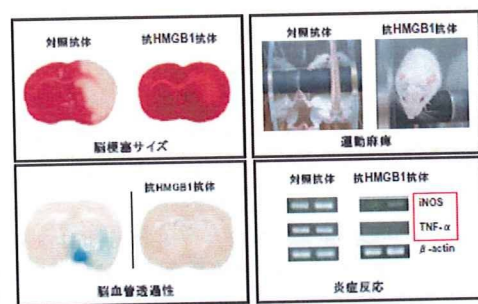


図2 ラットの中大脳動脈2時間閉塞による脳梗塞モデルにおける抗HMGB1抗体の効果

脳血管障害は我が国の死因の第3位を占めるが、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、血栓溶解薬である組換え体t-PAやラジカルスカベンジャーが臨床で用いられているが、有効治療時間帯の制限や副作用の問題があり、より汎用性のある治療法が求められている。

本発明は、脳梗塞の形成過程における過剰な炎症反応の媒介因子としてのHigh mobility group box1(HMGB1)に着目したもので、特異的抗HMGB1単クローン抗体によるHMGB1活性の中和によって、脳血管の透過性亢進、虚血脳部位におけるミクログリアの活性化、誘導性NO合成酵素とTNF- $\alpha$ の発現誘導が、いずれも顕著に抑制できることを示した。抗HMGB1抗体による脳梗塞の治療法は、新規因子を標的とした抗体医薬の発明であり、本発明を実用化することによって、わが国の保健医療上の重要な課題解決に貢献できる。

## 21世紀発明奨励賞

### 抗体医薬による脳梗塞の新規治療法の発明

(特許第3676325号)



国立大学法人岡山大学  
大学院医歯薬学総合研究科 教授  
西堀 正洋



就実大学  
薬学部 教授  
森 秀治



国立大学法人岡山大学  
大学院医歯薬学総合研究科 准教授  
高橋 英夫



医療法人創和会重井医学研究所  
分子細胞生物部門 室長  
友野 靖子



医療法人弘操会馬淵診療所  
院長  
足立 尚登



国立大学法人岡山大学  
大学院医歯薬学総合研究科 助教  
劉 克約

本発明は、抗HMGB1単クローン抗体による脳梗塞の治療法に関する発明である。

脳血管障害は我が国の死因の第3位を占めるが、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、血栓溶解薬である組織型t-PAやリジカルスカベンジャーが臨床で用いられているが、有効治療時間帯の制限や副作用の問題があり、より汎用性のある治療法



発明実施功績賞  
国立大学法人岡山大学  
学長 千葉 喬三



国立大学法人愛媛大学  
学長 柳澤 康信

が求められている。本発明では、「脳梗塞の時間依存的形成過程においては過剰な炎症反応が存在する」との仮説のもとに、その媒介因子としてのHigh mobility group box1 (HMGB1)に着目し、特異的抗HMGB1単クローン抗体による脳梗塞治療法を発明した。

抗HMGB1単クローン抗体はHMGB1分子内の酸性アミノ酸が連続するテイル領域のC末端を認識する。2時間中大脳動脈血流を遮断するラットの脳梗塞モデルにおいて、本抗体を脳虚血直後とさらに6時間後の2回、各200  $\mu$ gを静脈内へ投与すると、24時間後に形成される脳梗塞果が90%減少した(図1)。その作用機序を解析すると、脳血管の透過性亢進が著明に抑制されていること、虚血脳部位におけるミクログリアの活性化が抑制されていること、さらに誘導性NO合成酵素とTNF- $\alpha$ の発現誘導が抑制されていることが明らかとなった(図2)。モデル動物における運動麻痺症状も劇的に改善した。一方、虚血再灌流後の脳血流改善効果はごく僅かであった。脳虚血後1週間の時点での生存率の評価でも、抗体治療は良好な結果を示した。抗HMGB1単クローン抗体による脳梗塞の治療法は、新規の起炎性因子を標的とした抗体医薬の発明であり、既存の治療法とは作用点が全く異なっている。抗体単独での効果も非常に優れているが、既存薬と組み合わせることによって、それぞれの特徴を最大限発揮させる新規治療法になると期待される。本発明を実用化することによって、わが国の保健医療上の重要な課題解決に貢献できる。



