

201015003A

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「HMGB1」
に対する分子標的抗体薬の臨床応用研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23（2011）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 | ----- | 1 |
| II. 分担研究報告 | | |
| 1. 脳梗塞モデルに関する研究 | ----- | 7 |
| 高橋 英夫、劉 克約 (資料) ラット脳梗塞モデルに関する研究 | | |
| 2. 抗 HMGB1 抗体の毒性試験 | ----- | 31 |
| 吉野 正、松川 昭博、西堀 正洋 (資料) 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 | | |
| 3. 粥状動脈硬化症モデルに関する研究 | ----- | 99 |
| 槇野 博史、森 秀治、高橋 英夫 (資料) マウス粥状動脈硬化症モデルに関する研究 | | |
| 4. サル脳梗塞モデルに関する研究 | ----- | 109 |
| 伊達 勲、武田 吉正 (資料) ニホンザルの脳梗塞モデルに関する研究 | | |
| 5. 標識抗体の作製と生体内動態解析 | ----- | 121 |
| 榎本 秀一、劉 克約、西堀 正洋 (資料) ^{64}Cu -DOTA 標識抗体の作製と生体内動態解析 | | |
| 6. 抗 HMGB1 単クローン抗体の大量精製 | ----- | 129 |
| 友野 靖子、森 秀治 (資料) 抗体精製のプロトコールと抗 HMGB1 自己抗体の検出 | | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 137 |
| 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に関する研究

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

ラットを用いた抗 HMGB1 ラット単クローン抗体の急性単回及び反復投与毒性実験の結果、一般状態、血球細胞、血液生化学、尿検査、重要臓器の病理所見のいずれにおいても重大な有害作用は出現しなかった。試験管内 BBB 系を用いて、抗体の BBB 保護効果を証明した。抗体の ^{64}Cu -DOTA 標識化に成功し、抗体の生体内動態を PET 撮像した。ニホンザルの脳梗塞を低侵襲動脈血管内アプローチで作製した。

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）
槇野博史（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）
榎本秀一（岡山大院医歯薬学・教授）
武田吉正（岡山大院医歯薬学・講師）
森秀治（就実大学薬学部・教授）
友野靖子（重井医学研究所）

にする必要がある。

平成 21 年度の研究によって、3 種類の抗 HMGB1 単クローン抗体のエピトープを決定し、カイネティクス解析を行なった。それら抗体の中から、抗原の特異的認識と親和性に基づき、治療抗体が選択された。脳虚血後の脳血管透過性の亢進メカニズムに血液脳関門の構造破綻が関与することが平成 21 度に明らかにされた。

本年度の研究では、血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトからなる *in vitro* BBB 系を用いて、組換え体 HMGB1 と抗 HMGB1 抗体の *in vitro* BBB 系に対する直接作用を機能的ならびに形態的に評価し、抗 HMGB1 抗体の作用機序がこれまでの治療薬とは全く異なることを明らかにする。ラットの反復投与毒性実験を実施し、急性単回投与の結果と併せて安全性に関する情報を得る。前年度成功しなかった治療抗体の標識体作製を試み、生体内動態解析に用いる。アテローム動脈硬化症マウスの局所血管炎症に関する詳

A. 研究目的

申請者は、脳梗塞、アテローム動脈硬化症、脳血管攣縮などに共通して関与する重要な新規メディエーターとして、細胞核由来の「HMGB1」を疾患モデル動物を用いて同定している。この鍵分子に対する特異的単クローン抗体治療を臨床現場に迅速かつ効率的に応用していくために、有効性と安全性を確立し、現行治療薬との作用機序の違いを明確

しい解析データを得る。ニホンザルを実験動物とした動脈バルーンカテーテル法による低侵襲脳梗塞モデルの作製を試み、これまで指摘されているげっ歯類、霊長類間の病態における差について検討する。

B. 研究方法

1. 試験管内BBB系(ラット血管内皮細胞、血管周皮細胞、アストログリア細胞の共培養系)を用いた組換え体ヒト HMGB1 の活性評価と抗 HMGB1 抗体効果の解析
2. ラット MCAO モデルで BBB 破綻の透過型電子顕微鏡による観察と抗 HMGB1 抗体効果の評価:HMGB1 トランスロケーション、体液中への移行、アクアポリン4 発現との関連
3. 抗 HMGB1 単クローン抗体 (#10-22) の急性反復投与毒性試験
4. 抗 HMGB1 抗体の ^{64}Cu -DOTA による標識と抗体の生体内動態解析への応用
5. ニホンザルを用いた低侵襲動脈バルーンカテーテル法による脳梗塞モデルの作製
6. マウスアテローム動脈硬化症モデルにおける炎症局所遺伝子発現と抗 HMGB1 抗体の慢性投与効果の解析

C. 研究結果

抗 HMGB1 単クローン抗体 (#10-22) を 0.75 mg/kg -3.0 mg/kg の用量で、6 日間ラットに連続静脈内投与し、一般状態、体重変化、食餌摂取量、血球細胞検査、血液生化学検査、尿検査、全身 47 臓器の病理学的検査を行なった。その結果、抗 HMGB1 単クローン抗体の投与は、対照抗体の投与群と比較し、如何なる有害な作用も惹起しなかった。

ラット 2 時間中大脳動脈閉塞・再灌流 3 時間の時点で電顕観察をおこなうと、血液—脳

関門の形態的破綻がすでに著明であることがわかったが、抗 HMGB1 抗体治療は、虚血により齎される形態変化を著明に抑制した。ヒト組換え体 HMGB1 は、*in vitro* BBB 系において、血管内皮細胞と周皮細胞の形態変化を伴う血管透過性亢進と電気抵抗の低下を齎したが、抗 HMGB1 抗体の添加はこれを抑制することができた。MRI による撮像で、対照動物に認められる再灌流早期 3 時間からの脳浮腫像が抗体治療によって著明に抑制された。脳浮腫 (血液から脳への水成分の移動) に関与するアクアポリン-4 の蛋白発現のレベルでも、抗体効果は支持された。

^{64}Cu -DOTA を用いて、抗原結合性 (60-70%) を保持した抗体の標識化に成功した。この標識抗体あるいは対照標識抗体をラット MCAO モデルに投与し、PET 撮像に成功した。ニホンザルを用いて、動脈バルーンカテーテル法による中大脳動脈 2 時間閉塞・再灌流モデルを作成した。本モデルでニホンザル脳虚血における HMGB1 トランスロケーションを証明した。

アテローム動脈硬化症マウスの炎症病態における HMGB1 の関与と抗 HMGB1 抗体の効果を明らかにするとともに、重要な遺伝子発現変化を検出することに成功した。

D. 考察

抗 HMGB1 単クローン抗体 (#10-22) の急性反復投与毒性実験結果と、昨年度に実施した急性単回投与毒性実験の結果を併せて考えると、検査した用量の範囲で抗 HMGB1 単クローン抗体は安全であると結論できる。

ラット脳梗塞における抗 HMGB1 抗体の作用機序は、脳虚血急性期に神経細胞の細胞核から細胞外スペースに放出された HMGB1 による BBB 構造の機能的ならびに形態的破綻を防止する効果が重要であると

考えられた。BBB の破綻の結果生じる脳浮腫の時間経過は、これまで考えられていたよりも速やかであり、より早期の抗体治療介入が本治療法の場合にも必要であることがわかった。

抗原結合性を保持した ^{64}Cu -DOTA 標識抗体は、PET 撮像による生体内動態解析に有用であることがわかったが、次年度の研究において、さらに詳しい情報を収集する予定である。

E. 結論

抗 HMGB1 抗体は、強い BBB 保護効果を持っており、これまでの治療薬とは全く異なる作用機序であると結論できる。抗 HMGB1 単クローン抗体 (#10-22) は急性単回及び反復投与毒性実験で著明な有害作用は検出されず、新規治療法として有望である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Takahashi HK, Mori S, Liu K, Wake H, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M. β_2 -adrenoceptor stimulation inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. **Eur J Pharmacol.**, 627:313-7, 2010.
- ② Ohashi 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. **Clin Immunol**, 134:345-353, 2010.
- ③ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M. Effect of nicotine on advanced glycation end products-induced immune response in human monocytes. **J Pharmacol Exp Ther**, 332 :1013-1021, 2010.
- ④ Takahashi 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. **J Pharmacol Exp Ther**, 334 : 964-72, 2010.
- ⑤ Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Sadamori H, Matsuda H, Yagi T, Yoshino T, Mori S, Nishibori M. Histamine inhibits adhesion molecule expression in human monocytes, induced by advanced glycation end products, during the mixed lymphocyte reaction. **Br J Pharmacol**, 160 : 1378-86, 2010.
- ⑥ Mori S, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Zhang J, Liu R, Yoshino T and Nishibori M. Ciprofloxacin inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. **Br J Pharmacol**, 161:229-40, 2010.
- ⑦ Adachi N, Liu K, Ninomiya K, Matsuoka E, Motoki A, Irisawa Y, Nishibori M. Reduction of the infarct size by simultaneous administration of l-histidine and diphenhydramine in ischaemic rat brains. **Resuscitation**, 82(2):219-21, 2011.
- ⑧ Kanellakis 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. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 31 (2):313-9, 2011.
- ⑨ Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake K, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M. Anti-HMGB1 mAb Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemia-Induced Disruption in Rats. **Stroke**. In press.

2. 学会発表

1) 国際学会

- ① Nishibori M, Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S. A novel anti-HMGB1 treatment for brain infarction: protection of BBB disruption. The 4th international HMGB1 symposium signals of tissue damage, Helsinki, 2010.
 - ② Liu K, Zhang J, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Maruo T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M. Disruption of BBB in rat MCAO and a protective effect of anti-HMGB1 antibody. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Denmark, 2010.
 - ③ Liu R, Mori S, Wake H, Zhang J, Liu K, Izushi Y, Okamura M, Takahashi HK, Nishibori M. Establishment of in vitro binding assay of HMGB1 and S100A12 to RAGE: Effects of heparin and domain peptides on the binding. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Denmark, 2010.
 - ④ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Nishibori M. Prostaglandin E2 inhibits advanced glycation end products-induced activation of human monocytes. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Denmark, 2010.
 - ⑤ Wake H, Mori S, Takahashi HK, Liu K, Nishibori M. Histidine-rich glycoprotein inhibits the angiogenic response induced by the combination of high mobility group box 1 and heparin in matrigel plug assay. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Denmark, 2010.
 - ⑥ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Nishibori M. Advanced glycation end products induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. 14th International Congress Of Immunology, Japan, 2010.
 - ⑦ Wake H, Mori S, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M. Heparin regulates the HMGB1-induced angiogenesis in matrigel plug assay. 14th International Congress Of Immunology, Japan, 2010.
 - ⑧ Liu K, Zhang J, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Maruo T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M. Anti-high mobility group box1 monoclonal antibody protects blood-brain barrier from ischemic insult in rat. 14th International Congress Of Immunology, Japan, 2010.
- ### 2) 国内学会
- ① 和氣秀徳, 森 秀治, 劉 克約, 高橋英夫, 西堀正洋. 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.
 - ② 岡村 舞, 和氣秀徳, 劉 瑞, 劉 克約, 出石恭久, 高橋英夫, 西堀正洋. 試験管内における HMGB1 と sRAGE 結合実験系の確立と HMGB1 ドメインペプチドの効果の検討. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
 - ③ 劉 瑞, 森 秀治, 和氣秀徳, 張 継勇, 劉 克約, 出石恭久, 高橋英夫, 西堀正洋. HMGB1, S100A12 と RAGE の結合モデルに対する heparin の影響. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
 - ④ 高橋英夫, 劉 克約, 和氣秀徳, 森 秀治, 西堀正洋. 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ディン E2 の効果. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
 - ⑤ 出石恭久, 和氣秀徳, 劉 克約, 高橋英夫, 森 秀治, 西堀正洋. RAGE と急性肺障害. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
 - ⑥ 劉 克約, 張 継勇, 高橋英夫, 友野靖子, 和氣秀徳, 大塚愛二, 森 秀治, 西堀正洋. 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.
 - ⑦ 西堀正洋. 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.
 - ⑧ 張 継勇, 高橋英夫, 劉 克約, 和氣秀徳, 劉 瑞, 森 秀治, 西堀正洋. Histamine inhibits advanced glycation end product-induced adhesion molecule expression on monocytes during human mixed lymphocyte reaction. 第 117 回日本薬理学会近畿部会, 徳島, 2010.

- ⑨ 高橋英夫, 劉 克約, 和氣秀徳, 森 秀治, 西堀正洋 . 移植術後糖尿病に対するヒスタミンの効果の基礎検討. 第 14 回日本ヒスタミン学会, 神奈川, 2010.
- ⑩ 劉 克約, 張 継勇, 和氣秀徳, 高橋英夫, 森 秀治, 西堀正洋. 脳虚血早期における HMGB1 の動態. 第 118 回日本薬理学会近畿部会, 大阪, 2010.
- ⑪ 劉 克約, 張 継勇, 和氣秀徳, 高橋英夫, 森 秀治, 西堀正洋 . Early translocation and release of HMGB1 in ischemic brain in rats . 第 84 回日本薬理学会年会, 神奈川, 2011.
- ⑫ 和氣秀徳, 森 秀治, 劉 克約, 高橋英夫, 西堀正洋 . HMGB1-heparin complex induced angiogenesis through the induction of VEGF-A expression 第 84 回日本薬理学会年会, 神奈川, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① 特願 2010-214019, RAGE と AGE の結合剤のスクリーニング方法, 西堀正洋他.
- ② 特願 2010-270133, 外傷性神経障害治療剤, 西堀正洋他.
- ③ アメリカ合衆国出願 12/654790, 脳浮腫抑制剤, 西堀正洋他.
- ④ WIPO 出願 PCT/JP2010/066683, アテローム動脈硬化抑制剤, 二祖彫り正洋他.

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

脳梗塞モデルに関する研究

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
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 MCAO モデルで HMGB1 トランスロケーションを詳細に明らかにした。ラット脳血管内皮細胞、周皮細胞、アストログリアから構成された試験管内 BBB 系を用いて、組換え体 HMGB1 の BBB に対する作用と、抗 HMGB1 抗体の BBB 保護効果を証明した。抗体の ^{64}Cu -DOTA 標識化に成功し、抗体の生体内動態を PET 撮像した。ニホンザルの脳梗塞を低侵襲動脈血管内アプローチで作製し、HMGB1 トランスロケーションを評価した。

A. 研究目的

脳虚血後の脳血管透過性の亢進メカニズムに血液脳関門の構造破綻が関与することが平成 21 年度に明らかにされた。本年度の研究では、血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトからなる *in vitro* BBB 系を用いて、組換え体 HMGB1 の人工 BBB に対する直接作用を機能および形態的に評価し、抗 HMGB1 抗体の作用機序がこれまでの治療薬とは全く異なることを明らかにする。本年度、分担研究者の榎本によって作製された ^{64}Cu -DOTA 標識抗体のラット生体内動態を PET 撮像により検討する。分担研究者の伊達、武田によって低侵襲動脈血管内アプローチで作製されたサル脳梗塞モデルにおいて、HMGB1 トランスロケーションを検討する。

B. 研究方法

1. 新生ラット脳血管内皮細胞、周皮細胞、アストログリアからなる試験管内 BBB 培養

系を用いて、組換え体ヒト HMGB1 の BBB に対する作用を、経内皮細胞電気抵抗とアルブミン漏出によって評価し、それに対する抗 HMGB1 抗体効果を明らかにする。

2. ^{64}Cu -DOTA 標識抗体をラット尾静脈より投与し、生体内動態を PET 撮影する。

3. 低侵襲動脈血管内アプローチで作製されたニホンザル脳梗塞モデルにおいて、脳固定後のパラフィン包埋切片を用いて、虚血脳部位 HMGB1 トランスロケーションを評価する。

C. 研究結果

組換え体ヒト HMGB1 は、濃度依存的に血管内皮・周皮細胞層の電気抵抗を低下させ、アルブミン漏出を促進した。抗 HMGB1 抗体との前処置によって、組換え体ヒト HMGB1 の活性は抑制された。3 種類の細胞層のうち、血管内皮細胞層と周皮細胞層に収縮性の形態変化が認められたが、アストログリア細胞層には著明な変化はなかった。

HMGB1 結合性を有する ^{64}Cu -DOTA 標識抗 HMGB1 抗体を 60 μg ラット尾静脈より投与し、18 時間後に PET 撮影した。その結果、対照抗体および抗 HMGB1 抗体は、虚血側脳に高濃度分布することが明らかになった。血液中抗体を脱血処理により除いたのち、脳切片を用いたオートラジオグラフィを行ったところ、抗体の脳内移行は、対照抗体の方が多いたことが分かった。

動脈バルーンカテーテル法により、ニホンザル中大脳動脈を 2 時間閉塞し、脳梗塞を作製した。パラフィン包埋切片における検討で、虚血コアから HMGB1 陽性構造が消失し、相対虚血領域では、細胞質に HMGB1 陽性像を有する神経細胞が見出された。

D. 考察

組換え体 HMGB1 は、試験管内 BBB 培養系において、血管内皮細胞と周皮細胞に直接的に作用すると考えられる。in vivo の条件下でも、神経細胞核から細胞外に放出された HMGB1 は同様の直接作用によって、BBB 構造の破綻と血管透過性の亢進を生じる可能性が強く示唆される。したがって、抗 HMGB1 抗体は、細胞外に放出された HMGB1 の中和に働くことによって BBB の機能的、構造的な維持に働くと考えられる。このように、抗 HMGB1 抗体の作用機序は、既知薬とは全く異なると結論できる。

HMGB1 結合性を保持した ^{64}Cu -DOTA 標識抗 HMGB1 抗体は、虚血側脳に高濃度存在したが、脳内移行は対照抗体と比較し、必ずしも高いということにはなかった。今回投与した 60 μg の用量によって、すでに治療効果を発揮した可能性が推測される。

動脈バルーンカテーテルを用いた中大脳動脈 2 時間閉塞のニホンザル脳梗塞モデルにおいても、ラット虚血脳で見られたのと同

様の神経細胞内 HMGB1 のトランスロケーションが観察された。

E. 結論

抗 HMGB1 抗体は、BBB の維持に働くことによって脳の虚血障害ならびに脳梗塞への進展を防止できる新規機序の脳梗塞治療薬となる可能性が高い。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Takahashi HK, Mori S, Liu K, Wake H, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M. β_2 -adrenoceptor stimulation inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Pharmacol.* 627:313-7, 2010.
- ② Ohashi 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. *Clin Immunol.* 134:345-353, 2010.
- ③ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M. Effect of nicotine on advanced glycation end products-induced immune response in human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 332:1013-1021, 2010.
- ④ Takahashi 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. *J Pharmacol Exp Ther.* 334:964-72, 2010.

- ⑤ Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Sadamori H, Matsuda H, Yagi T, Yoshino T, Mori S, Nishibori M. Histamine inhibits adhesion molecule expression in human monocytes, induced by advanced glycation end products, during the mixed lymphocyte reaction. **Br J Pharmacol**, 160 : 1378-86, 2010.
- ⑥ Mori S, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Zhang J, Liu R, Yoshino T and Nishibori M. Ciprofloxacin inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. **Br J Pharmacol**, 161:229-40, 2010.
- ⑦ Adachi N, Liu K, Ninomiya K, Matsuoka E, Motoki A, Irisawa Y, Nishibori M. Reduction of the infarct size by simultaneous administration of l-histidine and diphenhydramine in ischaemic rat brains. **Resuscitation**, 82(2) :219-21, 2011.
- ⑧ Kanellakis 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. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 31 (2):313-9, 2011.
- ⑨ Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake K, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M, Anti-HMGB1 mAb Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemia-Induced Disruption in Rats. **Stroke**. In press.
2. 学会発表
- 1) 国際学会
- ① Nishibori M, Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S. A novel anti-HMGB1 treatment for brain infarction: protection of BBB disruption. The 4th international HMGB1 symposium signals of tissue damage, Helsinki, 2010.
- ② Liu K, Zhang J, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Maruo T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M. Disruption of BBB in rat MCAO and a protective effect of anti-HMGB1 antibody. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Denmark, 2010.
- ③ Liu R, Mori S, Wake H, Zhang J, Liu K, Izushi Y, Okamura M, Takahashi HK, Nishibori M. Establishment of in vitro binding assay of HMGB1 and S100A12 to RAGE: Effects of heparin and domain peptides on the binding. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Denmark, 2010.
- ④ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Nishibori M. Prostaglandin E2 inhibits advanced glycation end products-induced activation of human monocytes. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Denmark, 2010.
- ⑤ Wake H, Mori S, Takahashi HK, Liu K, Nishibori M. Histidine-rich glycoprotein inhibits the angiogenic response induced by the combination of high mobility group box 1 and heparin in matrigel plug assay. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, Denmark, 2010.
- ⑥ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Nishibori M. Advanced glycation end products induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. 14th International Congress Of Immunology, Japan, 2010.
- ⑦ Wake H, Mori S, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M. Heparin regulates the HMGB1-induced angiogenesis in matrigel plug assay. 14th International Congress Of Immunology, Japan, 2010.
- ⑧ Liu K, Zhang J, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Maruo T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M. Anti-high mobility group box1 monoclonal antibody protects blood-brain barrier from ischemic insult in rat. 14th International Congress Of Immunology, Japan, 2010.
- 2) 国内学会
- ① 和氣秀徳, 森 秀治, 劉 克約, 高橋英夫, 西堀正洋. HMGB1 はへ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.
- ② 岡村 舞, 和氣秀徳, 劉 瑞, 劉 克約, 出石恭久, 高橋英夫, 西堀正洋. 試験管内における HMGB1 と sRAGE 結合

- 実験系の確立と HMGB1 ドメインペプチドの効果の検討. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
- ③ 劉 瑞, 森 秀治, 和氣秀徳, 張 継勇, 劉 克約, 出石恭久, 高橋英夫, 西堀正洋. HMGB1, S100A12 と RAGE の結合モデルに対する heparin の影響. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
- ④ 高橋英夫, 劉 克約, 和氣秀徳, 森 秀治, 西堀正洋. 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ディン E2 の効果. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
- ⑤ 出石恭久, 和氣秀徳, 劉 克約, 高橋英夫, 森 秀治, 西堀正洋. RAGE と急性肺障害. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
- ⑥ 劉 克約, 張 継勇, 高橋英夫, 友野靖子, 和氣秀徳, 大塚愛二, 森 秀治, 西堀正洋. 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.
- ⑦ 西堀正洋. 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.
- ⑧ 張 継勇, 高橋英夫, 劉 克約, 和氣秀徳, 劉 瑞, 森 秀治, 西堀正洋. Histamine inhibits advanced glycation end product-induced adhesion molecule expression on monocytes during human mixed lymphocyte reaction. 第 117 回日本薬理学会近畿部会, 徳島, 2010.
- ⑨ 高橋英夫, 劉 克約, 和氣秀徳, 森 秀治, 西堀正洋. 移植術後糖尿病に対するヒスタミンの効果の基礎検討. 第 14 回日本ヒスタミン学会, 神奈川, 2010.
- ⑩ 劉 克約, 張 継勇, 和氣秀徳, 高橋英夫, 森 秀治, 西堀正洋. 脳虚血早期における HMGB1 の動態. 第 118 回日本薬理学会近畿部会, 大阪, 2010.
- ⑪ 劉 克約, 張 継勇, 和氣秀徳, 高橋英夫, 森 秀治, 西堀正洋. Early translocation and release of HMGB1 in ischemic brain in rats. 第 84 回日本薬理学会年会, 神奈川, 2011.
- ⑫ 和氣秀徳, 森 秀治, 劉 克約, 高橋英夫, 西堀正洋. HMGB1-heparin complex induced angiogenesis through the induction of VEGF-A expression 第 84 回日本薬理学会年会, 神奈川, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- ① 特願 2010-214019, RAGE と AGE の結合剤のスクリーニング方法, 西堀正洋他.
- ② 特願 2010-270133, 外傷性神経障害治療剤, 西堀正洋他.
- ③ アメリカ合衆国出願 12/654790, 脳浮腫抑制剤, 西堀正洋他.
- ④ WIPO 出願 PCT/JP2010/066683, アテローム動脈硬化抑制剤, 二祖彫り正洋他.
2. 実用新案登録
- 該当なし
3. その他
- 該当なし

脳梗塞モデルに関する研究

高橋 英夫、劉 克約

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。前年度の研究において、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。本年度の研究では、脳虚血後の細胞種特異的な 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 の脳脊髄液あるいは血中への移行を測定する。試験管内血液—脳関門 (BBB) 培養細胞実験系を用いて、組換え体 HMGB1 の個々の細胞構成要素 (血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイト) に対する直接作用と BBB 機能に対する効果を明らかにし、抗 HMGB1 抗体効果を評価する。

結果と考察：

HMGB1 トランスロケーション

前年度に検討されたラット脳虚血時の HMGB1 トランスロケーションを、さらに細胞種について詳しく調べるために、神経細胞 (MAP-2, NeuN)、アストログリア細胞 (Glial Fibrillary Acid Protein)、ミクログリア (Iba1) マーカーと HMGB1 の蛍光二重染色を脳虚血後に経時的に固定した脳標本について実施した。

その結果、虚血領域では、大脳皮質、線条体ともに MAP-2/NeuN 陽性の神経細胞内において、虚血後早期から神経核→核膜直下→細胞質→細胞形質膜への HMGB1 局在変化が生じていることが明らかになった。再灌流 1 2 時間後には、虚血コア領域から、神経細胞内 HMGB1 は消失していた (図 1-3)。一方、GFAP 陽性アストログリア細胞では、大脳皮質、線条体のいずれ虚血領域でも著明な

トランスロケーションは再灌流12時間まで観察されなかった(図2)。Iba1陽性のミクログリアでは、再灌流後6-12時間後に核内HMGB1染色が増強している細胞が認められた(図2)。以上の蛍光二重染色の結果は、細胞核からのHMGB1の局在変化は、虚血脳領域の神経細胞で主として生じること、そのような変化が、アストログリア細胞や、ミクログリアでは、顕微鏡観察のレベルでは殆ど見出されないことを示した。

HMGB1の脳脊髄液、血中への移行

脳虚血・再灌流後の脳脊髄液(CSF)中へのHMGB1の移行を、Elisa(Sino test)による測定と、Western blotting法で検討した。虚血前レベルは、3 ng/mlと低値であったが、再灌流後10 ng/ml(2時間)、15 ng/ml(12時間)と時間依存性に上昇が認められ、前値の5倍に達した(図4)。抗HMGB1単クローン抗体(200 µg, i.v./ラット)の投与により、この上昇は65%抑制された。脳脊髄液中でのHMGB1の上昇は、Western blottingでも確認された。

脳虚血・再灌流後の血中HMGB1レベルの変化をElisaで検討した。虚血前値は2 ng/mlと低値であったが、再灌流12時間後には10 ng/mlまで上昇した。この上昇は、CSF中HMGB1の場合と同様に、抗HMGB1単クローン抗体(200 µg, i.v./ラット)の投与により、ほぼ完全に抑制された(図4)。以上の結果から、神経細胞内のトランスロケーションによって細胞核から動員されたHMGB1は、細胞間質液中へ放出され、さらに脳脊髄液(CSF)、血液中へ移行することが強く示唆された。

In vitro BBB

ラット新生児脳から調整された血管内皮細胞、血管周皮細胞、アストログリア細胞の初代培養を図8に示すように配置したin vitro血液-脳関門(BBB)系を用いて、組換え体ヒトHMGB1のin vitro BBB系に対する作用を検討した。図8に示す下室(BBB構築では脳側)に組換え体HMGB1を最終濃度1 µg/mlと5 µg/mlとなるように添加し、30分後の上下室間の電気抵抗値の変化を測定した(図9)。さらに、上室にエバンスブルー・ウシ血清アルブミン複合体を添加し、下室への漏出量をその30分後に定量した。抗HMGB1単クローン抗体の効果を検討するときには、組換え体HMGB1と抗HMGB1単クローン抗体を予めインキュベートしてから添加した。その結果、組換え体ヒトHMGB1は、濃度依存的に血管内皮細胞、周皮細胞の電気抵抗を低下させ、同時にエバンス

ブルー・アルブミンの漏出量を増加させた (図 10)。これらの HMGB1 の効果は、抗 HMGB1 単クローン抗体の添加で抑制された。組換え体 HMGB1 はまた、ファロイジンローダミン染色で細胞形態を観察した時、血管内皮細胞と周皮細胞に対し、細胞長軸方向の収縮性変化を惹起することが明らかとなった (図 11)。

以上の *in vitro* BBB 系を用いた実験結果から、HMGB1 の血管内皮細胞と周皮細胞に対する直接作用が示された。したがって、*in vivo* 脳虚血条件下に神経細胞核から細胞外へ放出される HMGB1 は、直接血管内皮細胞と周皮細胞に働き、血管透過性亢進に働くことが強く示唆された。

Glutamate microdialysis

ラットの線条体 (Bregma より 0.25 mm 後方, 4.0 mm 側方, 7.0 mm 深さ) に微小透析用プローブを脳固定手術装置を用いて頭蓋骨上に歯科用セメントで固定し、脳虚血後の細胞外グルタミン酸濃度を経時的に測定した。2 時間の虚血中、対照動物の線条体細胞外グルタミン酸濃度は、基礎分泌レベルから約 5 倍の 75 nM にまで上昇した。再灌流後、グルタミン酸レベルは一旦低下したあと上昇し、再灌流 6 時間後まで一定レベルが継続した。これに対し、抗 HMGB1 単クローン抗体治療を施したラットでは、再灌流後のグルタミン酸レベルが有意に低下し、その効果は、再灌流 6 時間後まで持続した (図 13)。

水浮腫とアクアポリン-4 (AQ-4) 発現

脳の水分浮腫は、脳重量に占める水分含量比 (%) で評価した。測定した、大脳皮質、線条体、視床、視床下部、海馬の何れにおいても対照動物では有意に水分含量の増加が観察されたが、抗 HMGB1 単クローン抗体の投与によって、水分含量の増加は有意に抑制された (図 5)。脳浮腫形成に関与することが示唆されている水チャンネル AQ-4 の蛋白発現について虚血脳領域で検討したところ、大脳皮質、線条体何れの脳部位でも、血管壁における AQ-4 発現の上昇と抗 HMGB1 単クローン抗体による抑制が観察された (図 6)。以上の結果から、抗 HMGB1 単クローン抗体は、脳の浮腫を AQ-4 発現抑制を介して制御する可能性が示唆された。

Western blotting

大脳皮質と線条体の虚血コア領域から、Western blotting 用サンプルを調整し、この領域における HMGB1 含量の変動を調べた。虚血コア領域においては、

HMGB1 の含量低下が著明であり、その程度は線条体において顕著であった。抗 HMGB1 単クローン治療によって、この低下は有意に抑えられた。先述の HMGB1 トランスロケーションの結果と併せて考えると、虚血コアでは HMGB1 のトランスロケーションによる細胞外への放出等により、局所含量が著明に低下すると推測することができる。

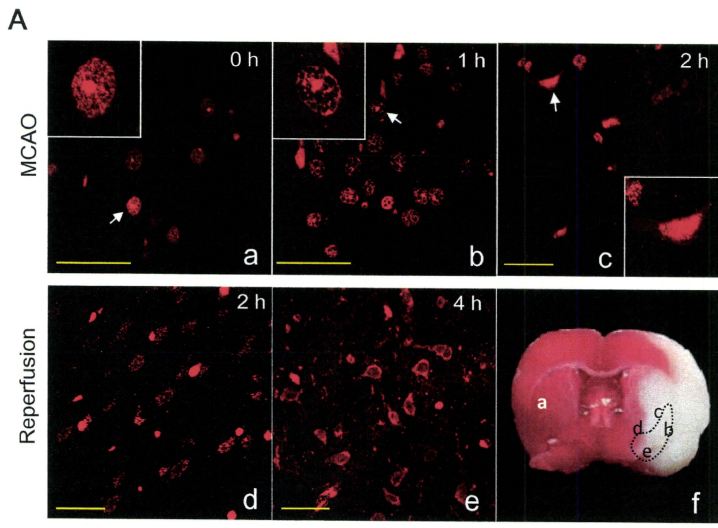
Elisa への干渉

血中 HMGB1 の測定において、治療抗体として用いた抗 HMGB1 単クローン抗体 (#10-22) が、Elisa 測定に影響しないかどうかを確かめておく必要がある。そこで、組換え体標準品と脳 HMGB1 の Elisa 測定において、抗 HMGB1 単クローン抗体 (#10-22, #11-19) と対照抗体 (抗 KLH 抗体) のアッセイ系への添加効果について検討した (図 14)。結果は、調査した HMGB1 の濃度範囲において、抗 HMGB1 抗体 (#10-22, #11-19) (1,10 µg/ml) はいずれも Elisa 測定に影響しなかった。同様に、同濃度の対照抗体の添加も影響がなかった。以上の結果から、血中 HMGB1 の測定において、治療に用いた抗 HMGB1 抗体と対照抗体 (抗 KLH 抗体) はいずれも干渉効果を持たないことがわかり、治療群における血中 HMGB1 レベルの低下は真の低下であると結論できる。

4-Hydroxynonenal (4-HNE)

脂質膜の酸化ストレスによる修飾で、脂質過酸化物質 4-HNE の形成と、それによる生体成分の修飾が生じる。血中 4-HNE adducts の測定により、生体膜脂質の酸化ストレスについて情報を得ることができる。本 MCAO モデルにおいて、再灌流 6 時間後の血中 4-HNE adducts を測定すると、健常動物の 150% に達していることがわかる (図 15)。これに対し、抗 HMGB1 単クローン抗体治療は、その上昇を 60% 抑制することが分かった (図 15)。

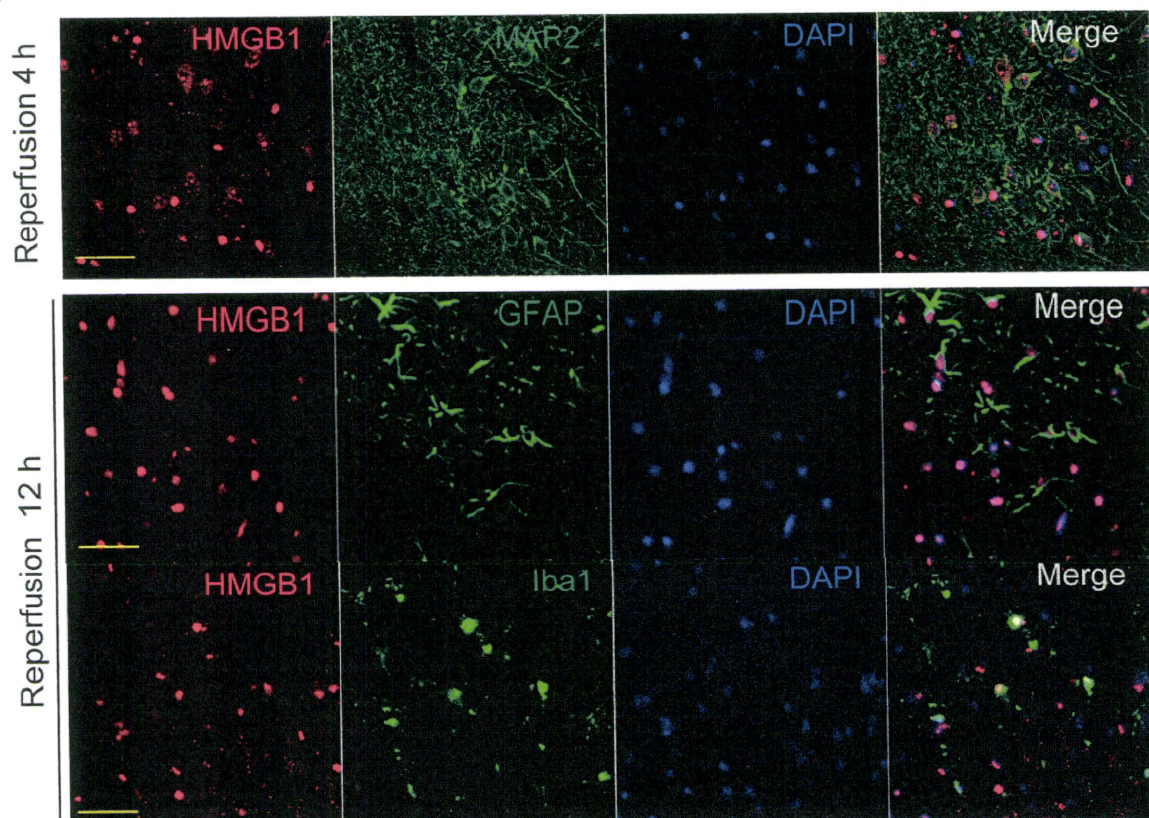
標識抗体の作製と生体内動態の PET 画像解析については、分担研究者榎本秀一から報告される。ニホンサル脳梗塞モデルについては、分担研究者伊達勲ならびに武田吉正から報告される。



赤色蛍光:HMGB1

図1 MCAOラット脳的时间依存的なHMGB1トランスロケーション

B



赤色蛍光: HMGB1
緑色蛍光: 細胞マーカー
青色蛍光: DAPI

図2 MCAOラット脳の細胞特異的なHMGB1トランスロケーション

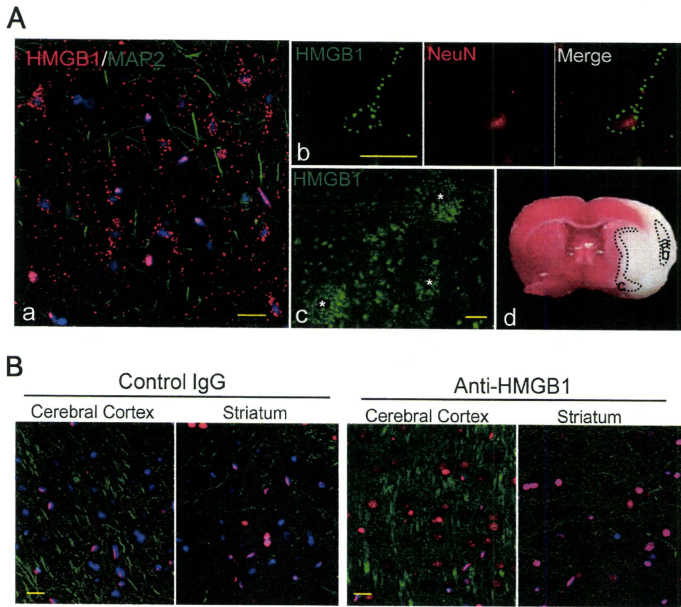


図3 虚血脳HMGB1トランスロケーションと抗HMGB1抗体の効果

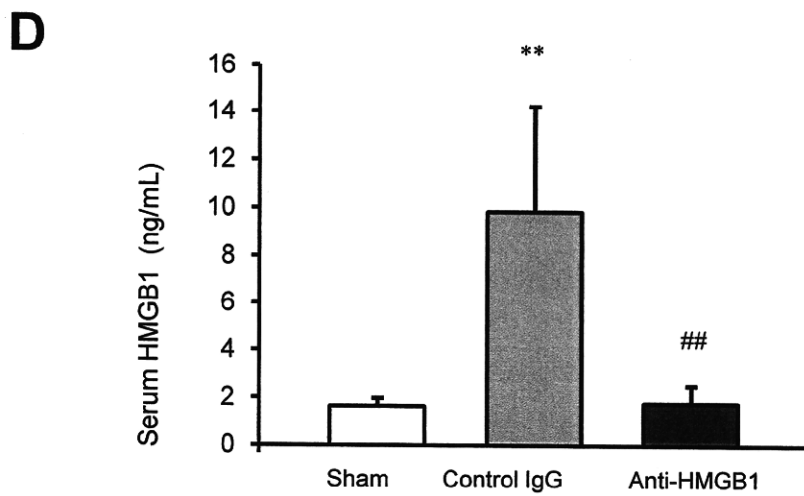
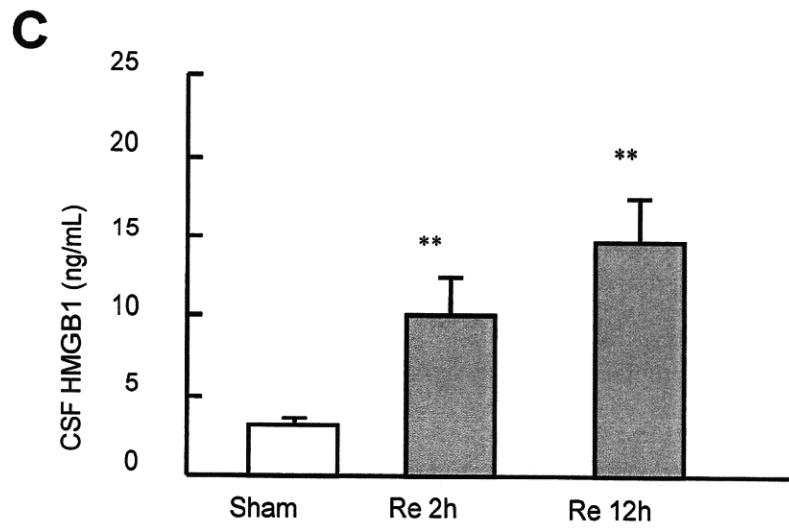


図4 MCAOラットのCSFと血中へのHMGB1移行

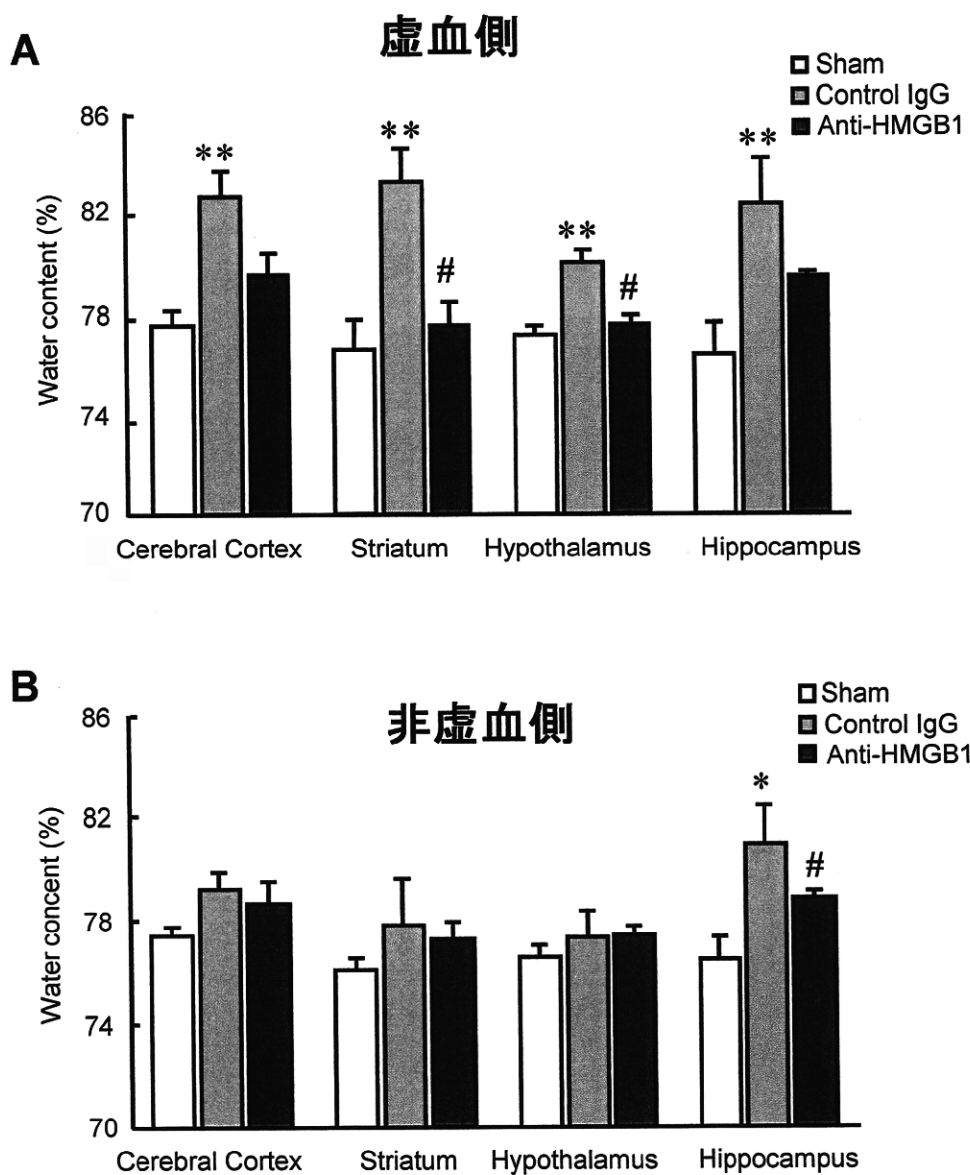


図5 MCAOラットの脳水分含量と抗HMGB1抗体の効果