

2011400/A

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23年度 総括研究報告書

平成24（2012）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
西堀 正洋		
II. 分担研究報告		
1. 脳梗塞モデルに関する研究	—————	7
劉 克約 他		
2. 動脈硬化症に関する研究	—————	27
槇野 博史 他		
3. 脳外傷モデルに関する研究	—————	37
伊達 勲 他		
4. ヒト抗 HMGB1 単クローン抗体の作製	—————	53
森 秀治 他		
5. サル脳梗塞モデルと抗体の生体脳動態に関する研究	—————	57
伊達 勲 他		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	61
IV. 研究成果の刊行物・別冊		

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

虚血脳神経細胞内への能動的アルブミン輸送の可能性を見出した。動脈硬化性末梢動脈疾患患者 81 名の血中 HMGB1 値が疾患重篤度と相関した。抗 HMGB1 抗体の新しい適応症として、脳外傷急性期の脳腫脹と神経障害を見出し、用量探索試験を実施した。ヒト自己免疫疾患患者からインフォームドコンセント後提供された末梢血を用いて、抗 HMGB1 抗体産生 B 細胞クローンの探索を 36 名の患者について実施した。

研究分担者

高橋英夫（近畿大学医学部・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）
和氣秀徳（岡山大学院医歯薬学・助教）
森秀治（就実大学薬学部・教授）
友野靖子（重井医学研究所・室長）
和田淳（岡山大学院医歯薬学・准教授）
大塚愛二（岡山大学院医歯薬学・教授）

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にする必要がある。さらに、抗炎症戦略に基づき、新規の臨床適応疾患を見出せる可能性がある。

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。

平成 22 年度の研究で、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した。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た。前年度成功しなかった治療抗体の標識体作製を⁶⁴Cu-DOTAを用いて試み、生体内動態解析に成功した。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しい解析データを得た。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を開始した。

平成23年度は、BBBの透過性亢進機序とならんで、アルブミン漏出の機序解析、神経細胞へのアルブミンの取り込み、細胞代謝と密接に関連すると予想されるHMGB1の神経細胞内局在変化に伴う細胞内小器官への移動のパターン解析を抗HMGB1抗体作用機序解析として実施する。

アテローム性動脈硬化症による末梢動脈疾患(PAD)の患者について、血中HMGB1値と臨床重症度評価、血液生化学測定値との相関関係を解析する。

抗HMGB1完全ヒト抗体を作製する。ヒト自己免疫疾患患者からインフォームドコンセント後提供された末梢血を用いて、抗HMGB1抗体産生B細胞クローンの探索を40名の患者について実施する。

新規抗HMGB1抗体適応疾患として、ラット脳外傷モデルで検証評価を実施する。

B. 研究方法

1. ラットMCAO2h/再灌流モデルを使って、アルブミン漏出の機序解析、神経細胞へのアルブミンの取り込み、細胞代謝と密接に関連すると予想されるHMGB1の神経細胞内局在変化に伴う細胞内小器官への移動のパターン解析を実施する。
2. アテローム性動脈硬化症による末梢動脈疾患(PAD)の患者血中HMGB1のElisaによる測定と臨床症状及び臨床検査

値との相関解析を実施する。

3. 抗HMGB1完全ヒト抗体を作製する。
Elisaスクリーニングにより力価確認された抗HMGB1抗体産生B細胞クローンの特性を解析する。
4. 抗HMGB1抗体を⁶⁴Cu-DOTAで標識し、抗体の生体内動態を解析する。
5. ラットFluid percussion injuryモデルを作製し、抗HMGB1抗体の神経保護効果を評価する。

C. 研究結果

ラットMCAO2h/再灌流モデルにおいて、虚血脳部位における血管透過性の亢進は、エバンスブルーの静脈注射による脳実質内への移行で測定されたが、エバンスブルーの自家蛍光で漏出エバンスブルー/アルブミン複合体の動態を蛍光顕微鏡下に観察すると、蛍光は主に神経細胞に高濃度存在していることがわかった。エバンスブルーを投与することなく内因性のアルブミンの免疫染色を試みると、細胞外領域全体に薄い陽性像が認められるのみで、エバンスブルーを負荷した時とは明らかにパターンが異なっていた。この知見は、エバンスブルー/アルブミン複合体の漏出を血管透過性亢進の指標とするときに注意が必要であることを示唆している。一方、複合体の神経細胞内における存在は、複合体に対する積極的な取り込み機構の存在を推定させる所見である。アルブミンの新しい機能を示唆するもので注目される。

脳虚血後の神経細胞内HMGB1のトランスロケーションは、免疫蛍光二重染色法と免疫電顕の手法で解析した。その結果、神経細胞核内のHMGB1は細胞質に出た後、細胞内小器官のミトコンドリアとペルオキシゾームに局在することがわかった。この知見は、これら細胞内小器官に移行した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可能性を示唆するものである。

アテローム動脈硬化症により末梢動脈疾患 (Peripheral arterial disease, PAD) となった81名の患者と健常人10名について、血圧、ABI、喫煙歴、高血圧病治療歴、糖尿病治療歴、高脂血症治療歴、白血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数、活性化トロンボプラスチン時間、フィブリノーゲン、CRP および血中 HMGB1 の測定をおこない解析した。その結果 ABI や Fontaine 分類による臨床重症度と血中 HMGB1 レベルに相関があることが明らかとなった。測定された他の因子群との相関性解析の結果、血中 HMGB1 は APTT や CRP とは相関しなかったが、フィブリノーゲンと相関することが明らかとなった。

完全ヒト抗体を得るためのプロトコールとして、文献的に抗 HMGB1 自己抗体が報告されている SLE 患者から末梢血の提供を受け、単核球標本を作成後、抗 HMGB1 産生 B 細胞を探索した。一定基準値以上の Elisa 値を目安にクローニングした。Elisa 法は HMGB1 のプレート固相化ではなく、サンドイッチ法を用いた。その結果、患者血清の段階では弱い陽性反応が見られた場合でも、単核球標本培養後の培養上清では、特異的反応と判定されるクローンは極稀で、その力価も極めて低かった。

前年度に ^{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が、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 撮像した結果を解析した。前年度にニホンザルの、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・再灌流モデルで得た標本を詳しく検討した。

ラットの Fluid percussion による脳外傷モデルを作製し、抗 HMGB1 抗体の効果を脳血管透過性、BBB 形態、炎症関連分子の発現、協調運動、片麻痺の観点から評価した。その結果、外傷後1週間までの観察で、いずれの項目に対してもよい効果が現れていることが証明された。

D. 考察

脳虚血時に見られる脳血管の透過性亢進は、これまでエバンスブルーの静注による脳内漏出測定法が一般的に用いられてきたが、アルブミンの動態解析については、より細やかな分析が必要である。エバンスブルー/アルブミン複合体は、MAP-2 染色の減弱した神経細胞に取り込まれる傾向がみられ、神経障害の程度との相関性が示唆された。虚血神経細胞内の HMGB1 トランスロケーションは、ある時間経過のなかでミトコンドリアとペルオキシゾームに集積した。このことは、HMGB1 が神経細胞の代謝過程に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆する。

これまで、フィブリノーゲンは PAD の重症度と相関することが報告されている。本研究により、フィブリノーゲンに加えて、血中 HMGB1 も PAD の重症度を反映するよい臨床マーカーとなりうることが証明された。

自己免疫 (SLE) 患者の血清の中には、低いレベルの抗 HMGB1 抗体価を Elisa で示すものが存在したが、それら患者から得られた末梢単核球標本からは、高親和性抗 HMGB1 抗体分泌 B 細胞クローンを得ることはできなかった。得られた抗体は非常にアフィニティの低い抗体であった。

Fluid percussion を用いて作製されたラット脳外傷モデルで抗 HMGB1 抗体は脳腫脹、神経細胞の脱落、運動機能障害のいずれに対しても劇的な効果を示した。有効治療時

間帯は受傷後3時間は保たれており、十分臨床治療に応用できると判断される。抗HMGB1抗体の適応疾患として、脳梗塞、アテローム動脈硬化症、クモ膜下出血後の脳血管攣縮に加えて、脳外傷が考慮されるべきである。

E. 結論

血中HMGB1レベルの測定はPADの重症度を判定するよい臨床マーカーになりうる。SLEなどの自己免疫疾患の患者から高親和性の抗HMGB1抗体産生B細胞を得ることは難しい。抗HMGB1抗体による新しい適応疾患として脳外傷が見出された。急性脳腫脹に対しエビデンスを伴った治療法が存在しない現状で、抗HMGB1抗体は極めて有望な治療法になる可能性を持っている。

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 Shichida T., Hasegawa E., Kimura A., Morita R., Sakaguchi R., Takada I., Sekiya T., Ooboshi H., Kitazono T., Yanagawa T., Ishii T., Takahashi H., Mori S., Nishibori M., Kuroda K., Miyake K., Akira S., Yoshimura A., Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. **Nature Medicine**, in press.
- ② Okuma Y., Liu K., Wake H., Zhang J., Maruo T., Date I., Yoshio T., Ohtsuka A., Otani N., Tomura S., Shima K., Yamamoto Y., Yamamoto H., Takahashi H., Mori S., Nishibori M., Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Therapy for Traumatic Brain Injury. **Annals of Neurology**, in press.
- ③ Terada S., Yoshida A., Nasu Y., Mori S., Tomono Y., Tanaka M., Takahashi H., Nishibori M., Ozaki T., Nishida K. Gene Expression and Localization of

High-mobility Group Box Chromosomal Protein-1 (HMGB-1) in Human Osteoarthritic Cartilage. **Acta Med. Okayama**, 65(6), 369-377, 2011.

- ④ Yang H, Hirooka K, Liu Y, Fujita T, Fukuda K, Nakamutra T, Itano T, Zhang J, Nishibori M, Shiraga F. Deleterious Role of Anti-high Mobility Group Box 1 Monoclonal Antibody in Retinal Ischemia-reperfusion Injury. **Current Eye Research**, 36(11), 1037-1046, 2011.
 - ⑤ Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake K, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M. Anti-high Mobility Group Box-1 Monoclonal Antibody Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemia-Induced Disruption in Rats. **Stroke**. 42(5): 1420-1428, 2011.
 - ⑥ 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.
 - 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.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 国際学会
 - ① Hideo Kohka Takahashi, Shuji Mori, Atsuko Niwa, Masaki Tabuchi, Kyoko Nakamura, Kana Ohshima, Masahiro Nishibori, AGE-2 and AGE-3 induce monocyte activation. 第19回国際マクロファージ分子細胞生物学シンポジウム合同開催国際会議・第76回日本インターフェロン・サイトカイン学会. 大阪. 2011.5.27.
 - 2) 国内学会
 - ① 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. 岡山脳研究セミナー, 講演. 岡山, 2011.6.25.

- ② 劉克約, 張 繼勇, 和氣秀徳, 大塚愛二, 森 秀治, 高橋英夫, 西堀正洋. 抗 HMGB1 抗体は脳虚血誘発性の血液-脳関門破綻を防ぐ. 第 119 回日本薬理学会近畿部会, 愛知, 2011.7.8.
- ③ 西堀正洋, 劉克約, 張繼勇, 和氣秀徳, 大塚愛二, 吉野正, 伊達勲, 高橋英夫, 森秀治. HMGB1 単クローン抗体によるラット MCAO 誘発脳梗塞の治療. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 札幌, 2011.9.6.
- ④ 西堀正洋, 張繼勇, 劉克約, 和氣秀徳, 高橋英夫, 森秀治, 大塚愛二. 抗 HMGB1 単クローン抗体はラット脳虚血による血液-脳関門の破綻を制御する. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9.17.
- ⑤ 和氣秀徳, 森秀治, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋. 高ヒスチジン糖タンパク質は HMGB1-ヘパリン複合体誘導血管新生を抑制する. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9.23.
- ⑥ 西堀正洋. 抗 HMGB1 単クローン抗体による虚血性脳障害の治療. 第 12 回日本分子脳神経外科学会・日本脳神経外科学会第 70 回学術総会合同シンポジウム, 招待講演. 横浜, 2011.10.14.
- ⑦ 和氣秀徳, 森秀治, 高橋英夫, 西堀正洋, HRG の HMGB1-ヘパリン複合体誘導性血管新生調節機構, 第 120 回日本薬理学会近畿部会, 京都, 2011.11.11.
- ⑧ 西堀正洋. 炎症性サイトカイン HMGB1 をターゲットにした新規脳梗塞治療抗体-抗体治療の展開. 平成 23 年度バイオビジネスアワード JAPAN, 講演. 大阪, 2012.2.17.
- ⑨ 福安悠介, 劉克約, 和氣秀徳, 西村義人, 勅使川原匡, 西堀正洋. 虚血時脳神経細胞内 HMGB1 は、核からペルオキシソーム/ミトコンドリアに移動する. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012.3.14.
- ⑩ 劉克約, 張繼勇, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. 虚血時の BBB 透過性亢進を濾出した Evans blue/Albumin の追跡検討. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012.3.14.
- ⑪ 和氣秀徳, 森秀治, 高橋英夫, 劉克約, 勅使川原匡, 西堀正洋. 高ヒスチジン糖タンパク質は HMGB1-ヘパリン複合体誘導血管新生を抑制する. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012.3.15.
- ⑫ 森岡祐太, 友野靖子, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. ラットリンパ節細胞を用いた抗 AGE モノクローナル抗体の作製. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012.3.16.
- ⑬ 周京秀, 渋谷恵, 和氣秀徳, 劉克約, 森岡祐太, 岡村舞, 森秀治, 西堀正洋. マクロファージによる Advanced glycation end product (AGE) の細胞内取り込み. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012.3.16.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

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 劉 克約 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
和気 秀徳 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
高橋 英夫 近畿大学医学部・教授

研究要旨

ラット MCAO モデルで神経細胞内の HMGB1 トランスロケーションを、細胞小器官のレベルで解析し、核内からペルオキシゾームならびにミトコンドリアへの移行を明らかにした。ラット脳血管の透過性亢進に伴うアルブミン漏出と神経細胞への取り込みを証明した。⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体を用いて、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。平成 22

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した。平成 22 年度、分担研究者の榎本によって作製された ⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体のラット生体内動態を PET 撮影により解析する。本年度ラット MCAO モデルで神経細胞内の HMGB1 トランスロケーションを、免疫二重染色法と免疫電子顕微鏡法を用いて細胞小器官のレベルで解析する。脳血管の透過性亢進に HMGB1 が関与することを平成 22 年度に明らかにしたが、脳内へ移行したアルブミンが

神経細胞に取り込まれるという新規知見が得られたので、神経細胞障害との関連性を追求する。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さらに検討する。

B. 研究方法

1. 免疫二重染色法で HMGB1 各種細胞小器官マーカーを染色し、神経細胞核からの HMGB1 トランスロケーションの経路を解析する。
2. 1. で得られた知見のもとに免疫電顕法で、細胞小器官と HMGB1 の局在の関係を明らかにする。
3. エバンスブルー/アルブミン複合体の脳血管からの漏出と神経細胞への取り込みを解析する。一方、内因性アルブミンの動態との比較を行う。

C. 研究結果

ラット MCAO モデルで神経細胞内の HMGB1 トランスロケーションを、細胞小器官のレベルで解析し、リソソーム、エンドゾーム、小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、ペルオキシゾームのマーカー蛋白質との免疫二重染色を試みた。その結果、核内から細胞質に移行した HMGB1 はペルオキシゾームならびにミトコンドリアへ移行することを明らかにした。また、HMGB1 の免疫電顕染色によって、HMGB1 陽性金コロイド粒子は、それぞれペルオキシゾームならびにミトコンドリア粒子内に存在することがわかった。以上の結果から、一旦細胞質に出た HMGB1 はペルオキシゾーム膜ならびにミトコンドリア外膜を越えて小器官内に輸送される可能性が示唆された。

エバンスブルー/アルブミン複合体の動態は、エバンスブルーの蛍光で追跡された。ラット MCAO 2 時間後の虚血脳領域、特に線条体では広範囲にエバンスブルーの漏出が認められ、強陽性の所見は神経に一致していた。この観察所見は、エバンスブルー/アルブミン複合体が神経細胞に積極的に輸送される可能性を示唆するものである。エバンスブルー蛍光は核内にも観察されたことから、神経細胞への取り込み後は、核内へも輸送される可能性が浮上した。エバンスブルー投与した動物脳を固定後抗アルブミン抗体でアルブミンの局在を検討したところ、ほぼエバンスブルー蛍光と一致する分布が観察されたが、神経細胞の核内は陰性であった。一方、エバンスブルーを投与していない場合には、アルブミンの漏出量は少なく、また神経細胞の明瞭な染色像は得られなかった。以上の結果から、エバンスブルー投与の有無によって血清アルブミンの漏出動態は異なってくるものが強く示唆された。

D. 考察

これまでの研究で観察されてきた、虚血脳における HMGB1 トランスロケーションを詳細に解析した。その結果、虚血脳の神経細胞核内 HMGB1 は虚血初期(0-2 時間)の時点ですでに角膜周辺に集合を開始しており、神経虚血に伴う極めて速やかな応答であることがわかる。一端細胞質に移行した HMGB1 は、ペルオキシゾームと一部ミトコンドリア内部へと移行する像が、免疫蛍光二重染色と免疫電顕法によって得られた。この結果は、これら細胞内小器官へ移行した HMGB1 が、虚血神経細胞の代謝調節に何らかの役割を果たすことを強く示唆する。

脳血管透過性亢進を測定する一般的手技として定着しているエバンスブルー漏出測定は、簡便なアルブミン漏出の測定法ではあるが、エバンスブルーの負荷のあるなしで、漏出するアルブミン量に違いがある可能性が推測された。エバンスブルー/アルブミン複合体は、血液-脳関門と虚血領域の神経細胞内へ積極的に輸送されている可能性があり、新しい DDS 系として活用できるかもしれない。

E. 結論

虚血脳の神経細胞における HMGB1 トランスロケーションは、細胞核から細胞質へ出た HMGB1 が、ミトコンドリアとペルオキシゾームを経由して細胞外へ放出される可能性が示唆された。虚血脳部位でのアルブミン漏出は、エバンスブルーの負荷の有無で異なっている可能性があり、新規 DDS の観点から興味深い。

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 Shichida T., Hasegawa E., Kimura A., Morita R., Sakaguchi R., Takada I., Sekiya T., Ooboshi H., Kitazono T., Yanagawa T., Ishii T., Takahashi H., Mori S., Nishibori M., Kuroda K., Miyake K., Akira S., Yoshimura A., Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nature Medicine*, in press.
 - ② Okuma Y., Liu K., Wake H., Zhang J., Maruo T., Date I., Yoshio T., Ohtsuka A., Otani N., Tomura S., Shima K., Yamamoto Y., Yamamoto H., Takahashi H., Mori S., Nishibori M., Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Therapy for Traumatic Brain Injury. *Annals of Neurology*, in press.
 - ③ Terada S., Yoshida A., Nasu Y., Mori S., Tomono Y., Tanaka M., Takahashi H., Nishibori M., Ozaki T., Nishida K. Gene Expression and Localization of High-mobility Group Box Chromosomal Protein-1 (HMGB-1) in Human Osteoarthritic Cartilage. *Acta Med. Okayama*, 65(6), 369-377, 2011.
 - ④ Yang H., Hirooka K., Liu Y, Fujita T, Fukuda K, Nakamutra T, Itano T, Zhang J, Nishibori M, Shiraga F. Deleterious Role of Anti-high Mobility Group Box 1 Monoclonal Antibody in Retinal Ischemia- reperfusion Injury. *Current Eye Research*, 36(11), 1037-1046, 2011.
 - ⑤ Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake K, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M. Anti-high Mobility Group Box-1 Monoclonal Antibody Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemia-Induced Disruption in Rats. *Stroke*. 42(5): 1420-1428, 2011.
 - ⑥ 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.
 - 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.
- ### 2. 学会発表
- 1) 国際学会
 - ① Hideo Kohka Takahashi, Shuji Mori, Atsuko Niwa, Masaki Tabuchi, Kyoko Nakamura, Kana Ohshima, Masahiro Nishibori, AGE-2 and AGE-3 induce monocyte activation. 第19回国際マクロファージ分子細胞生物学シンポジウム合同開催国際会議・第76回日本インターフェロン・サイトカイン学会. 大阪. 2011.5.27.
 - 2) 国内学会
 - ① 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. 岡山脳研究セミナー, 講演. 岡山, 2011.6.25.
 - ② 劉克約, 張 継勇, 和氣秀徳, 大塚愛二, 森 秀治, 高橋英夫, 西堀正洋. 抗 HMGB1 抗体は脳虚血誘発性の血液-脳関門破綻を防ぐ. 第119回日本薬理学会近畿部会, 愛知, 2011.7.8.
 - ③ 西堀正洋, 劉克約, 張継勇, 和氣秀徳, 大塚愛二, 吉野正, 伊達勲, 高橋英夫, 森秀治. HMGB1 単クローン抗体によるラット MCAO 誘発脳梗塞の治療. 第47回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 札幌, 2011.9.6.
 - ④ 西堀正洋, 張継勇, 劉克約, 和氣秀徳, 高橋英夫, 森秀治, 大塚愛二. 抗 HMGB1 単クローン抗体はラット脳虚血による血液-脳関門の破綻を制御する. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9.17.
 - ⑤ 和氣秀徳, 森秀治, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋. 高ヒスチジン糖タンパク質は HMGB1-ヘパリン複合体誘導血管新生を抑制する. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011.9.23.
 - ⑥ 西堀正洋. 抗 HMGB1 単クローン抗体による虚血性脳障害の治療. 第12回日本分子脳神経外科学会・日本脳神経外科学会第70回学術総会合同シンポジウム, 招待講演. 横浜, 2011.10.14.

- ⑦ 和氣秀徳, 森秀治, 高橋英夫, 西堀正洋, HRG の HMGB1-ヘパリン複合体誘導性血管新生調節機構, 第 120 回日本薬理学会近畿部会, 京都, 2011.11.11.
- ⑧ 西堀正洋. 炎症性サイトカイン HMGB1 をターゲットにした新規脳梗塞治療抗体-抗体治療の展開. 平成 23 年度バイオビジネスアワード JAPAN, 講演. 大阪, 2012.2.17.
- ⑨ 福安悠介, 劉克約, 和氣秀徳, 西村義人, 勅使川原匡, 西堀正洋. 虚血時脳神経細胞内 HMGB1 は、核からペルオキシソーム/ミトコンドリアに移動する. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012.3.14.
- ⑩ 劉克約, 張継勇, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. 虚血時の BBB 透過性亢進を濾出した Evans blue/Albumin の追跡検討. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012.3.14.
- ⑪ 和氣秀徳, 森秀治, 高橋英夫, 劉克約, 勅使川原匡, 西堀正洋. 高ヒスチジン糖タンパク質は HMGB1-ヘパリン複合体誘導血管新生を抑制する. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012.3.15.
- ⑫ 森岡祐太, 友野靖子, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. ラットリンパ節細胞を用いた抗 AGE モノクローナル抗体の作製. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012.3.16.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

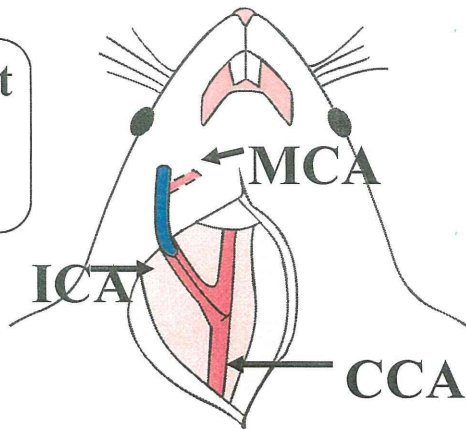
脳虚血におけるBBBの破綻及び濾出したアルブミンの追跡

方法

- ラットのMCAOモデルを用いて、再灌流直後、尾静脈からEvans blue或は抗体を投与し、再灌流後3時間、心臓から灌流固定した。
- 虚血の条件で濾出されたEvans blue/albumin複合体の局在を解明するため、アルブミン(anti-Rat Albumin sheep-poly-Ab)、ニューロン(anti-MAP2 Rabbit-poly-Ab)、アストロサイト(anti-GFAP Rabbit-poly-Ab)、ミクログリア(anti-Iba1 Rabbit-poly-Ab)のマーカーを用いて、組織免疫染色した。
- 共焦点レーザ顕微鏡(LSM 510 confocal imaging system)を用いて、観察した。

MCAO procedure

- Wistar rat
- Male
- 250-300g



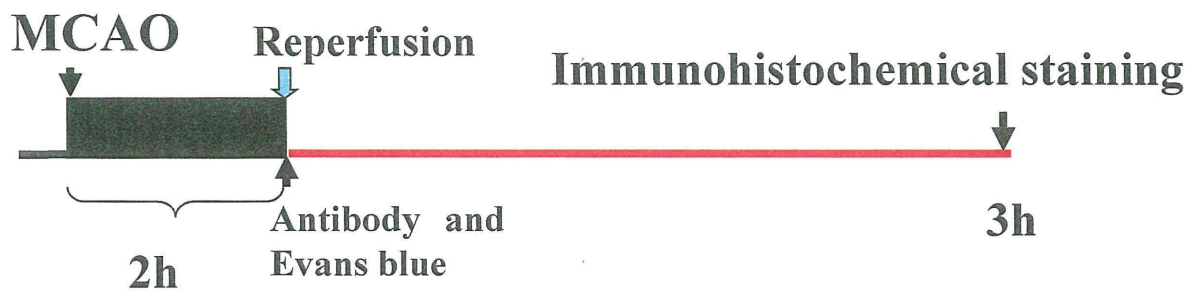
0.30-0.34 mm



18 mm



Silicone-coated
nylon thread (4·0)

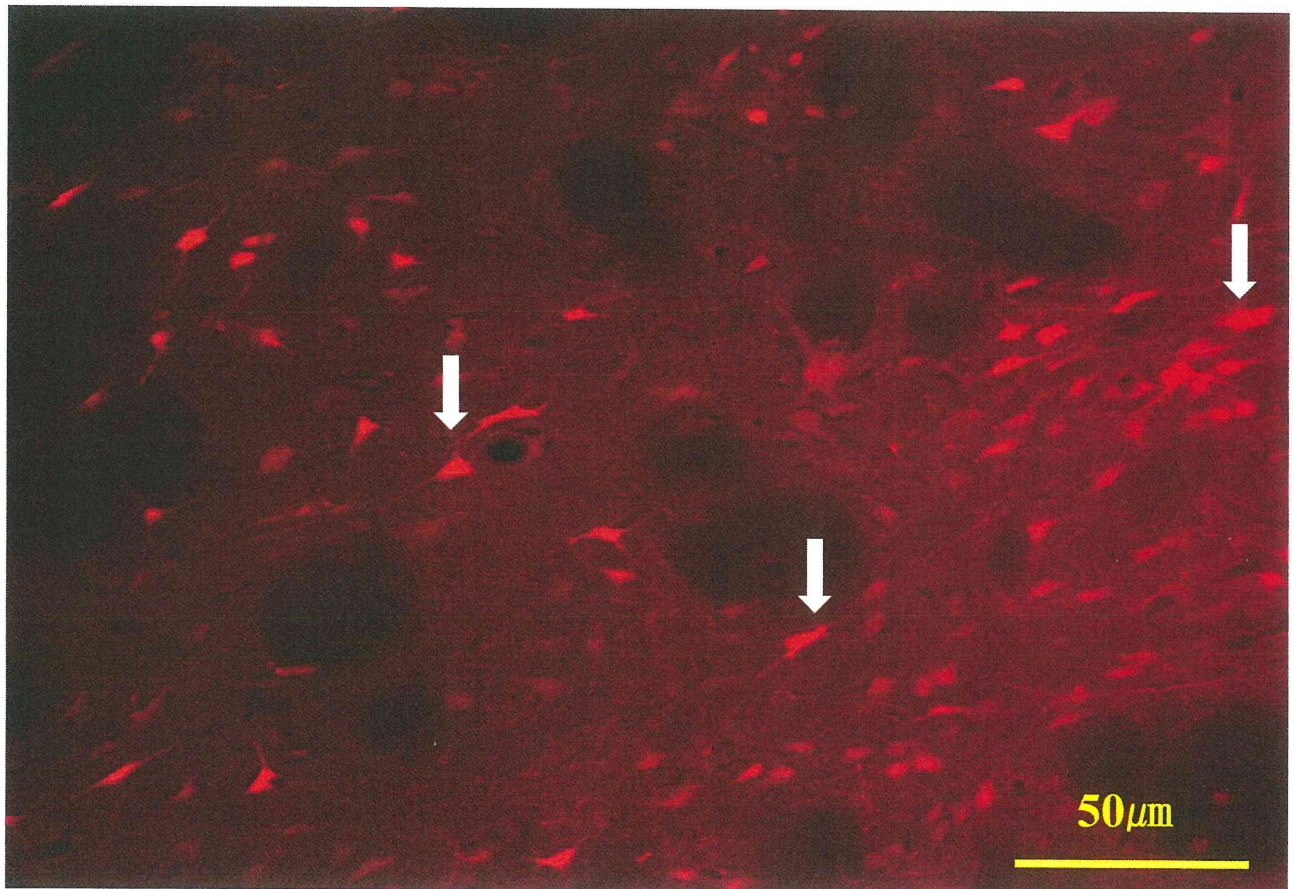
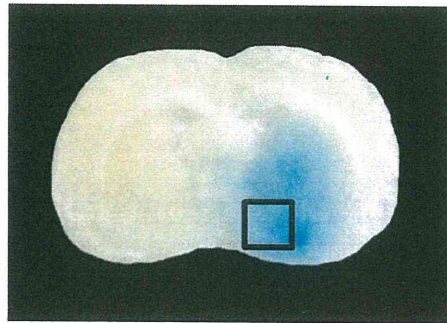


蛍光免疫染色のプロトコール

ミクروسライス装置で、ホルマリン固定した脳組織を10～50 μ m厚さ切片を作った。

1. 洗淨 (10mM TBS plus 0.025% Triton X-100 pH7.5) で5分/3回。
2. ブロッキング液滴下。
1% BSA, 10% Goat serum, in 10mM TBS 室温 2hr。
0.2% Collagen in 10mM TBS (Albumin)
3. 一次抗体滴下。
4 $^{\circ}$ C 振動しながら24hr反応させる。
4. 洗淨T-TBSで5分/3回。
5. 二次抗体滴下。
室温で振動しながら1.5hr反応させる。
6. 洗淨T-TBSで5分/3回。
7. DAPI 300 μ M \rightarrow 1/1000 PBSで希釈。 5分
8. 洗淨 5分/2回。
9. 水洗う 3分
10. 封入。

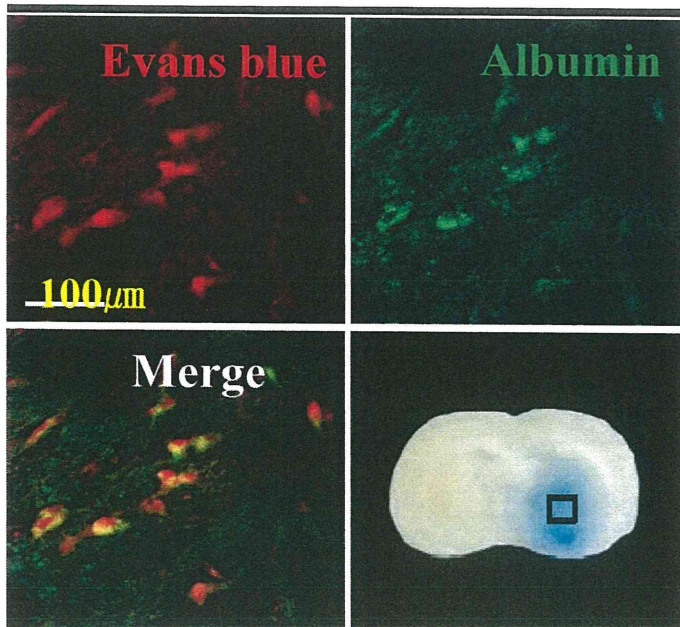
MCAOラット脳のエバンスブルー/アルブミン 複合体の追跡



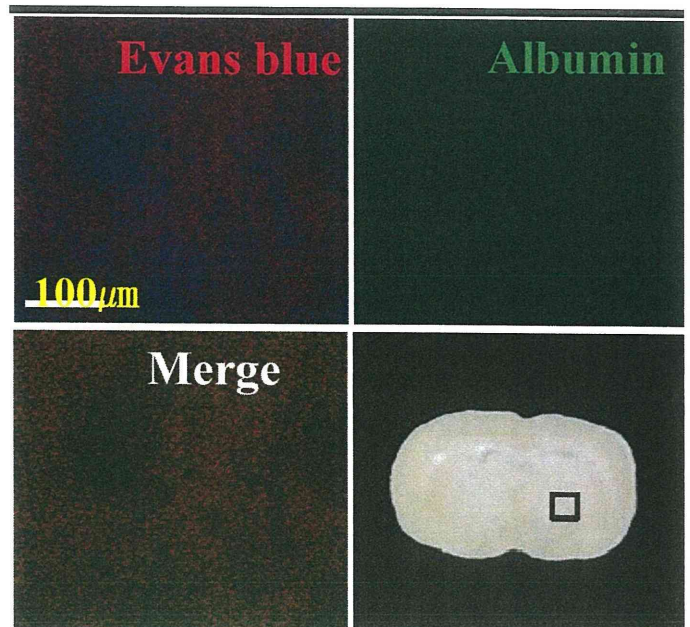
虚血領域に濾出されたエバンスブルー/アルブミン複合体は
ニューロン内に高濃度局在する(矢印)。

MCAOラット脳のエバンスブルーと アルブミンの局在

Control IgG

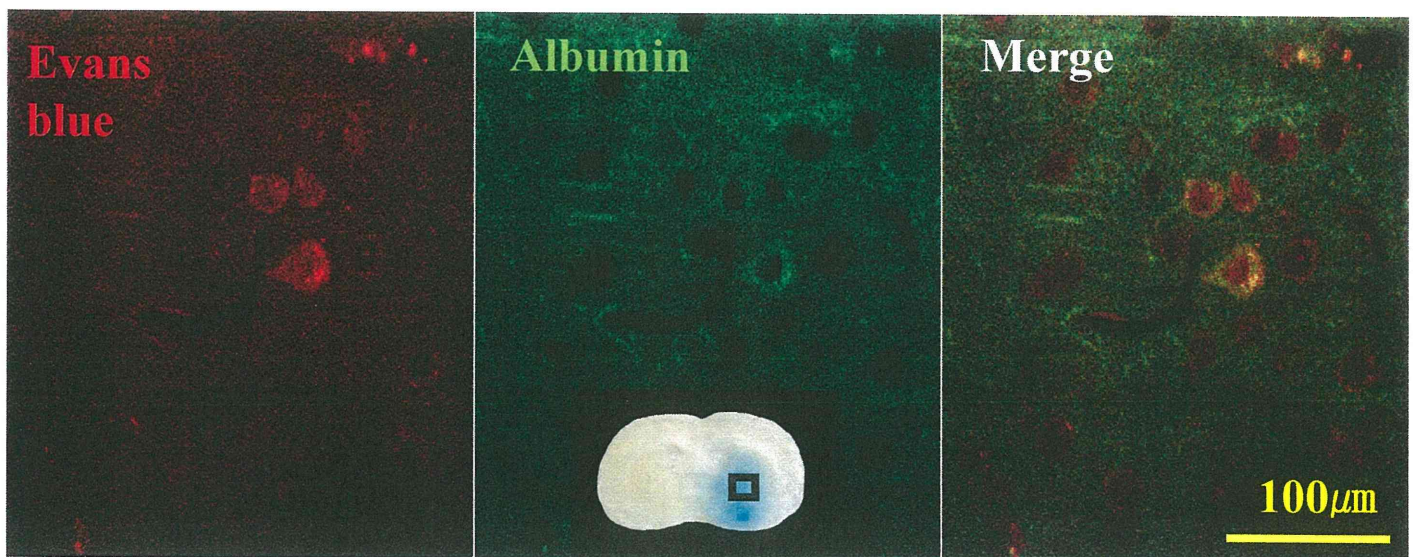


Anti-HMGB1



アルブミンの免疫染色
赤色蛍光：エバンスブルー
緑色蛍光：アルブミン
エバンスブルーはニューロンの核まで染めた。

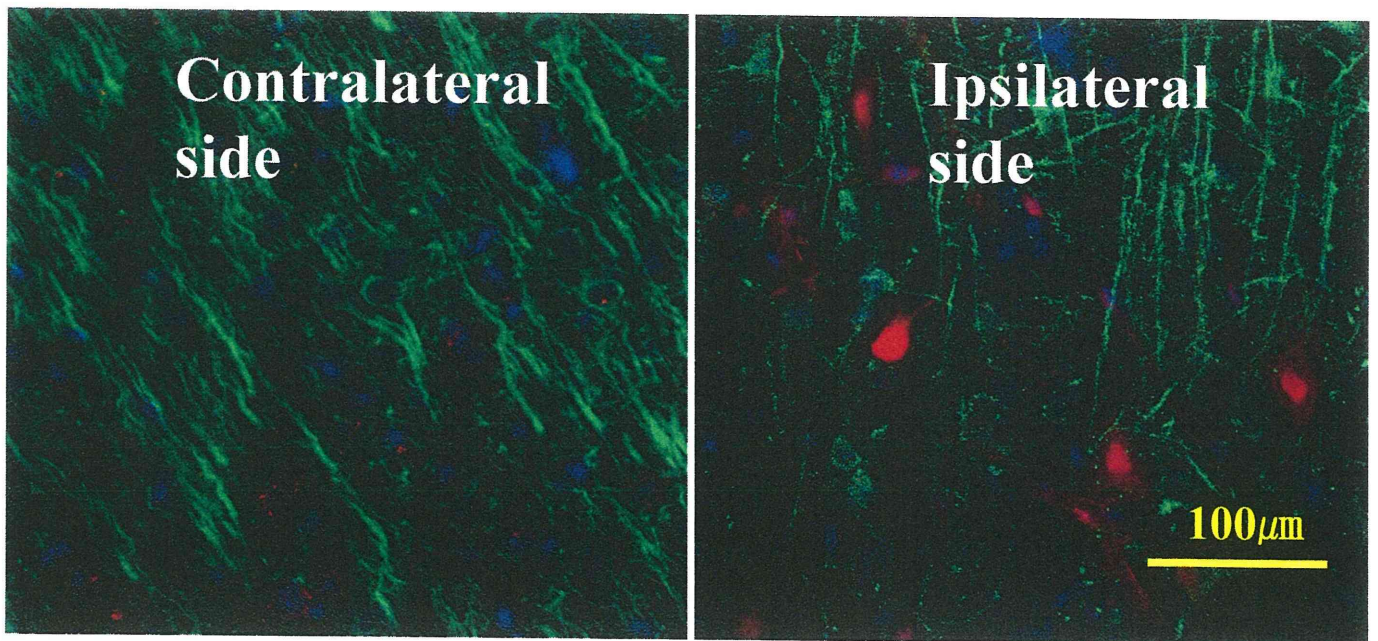
MCAOラット脳のエバンスブルーと アルブミンの局在



アルブミンの免疫染色

赤色蛍光： エバンスブルー 緑色蛍光： アルブミン

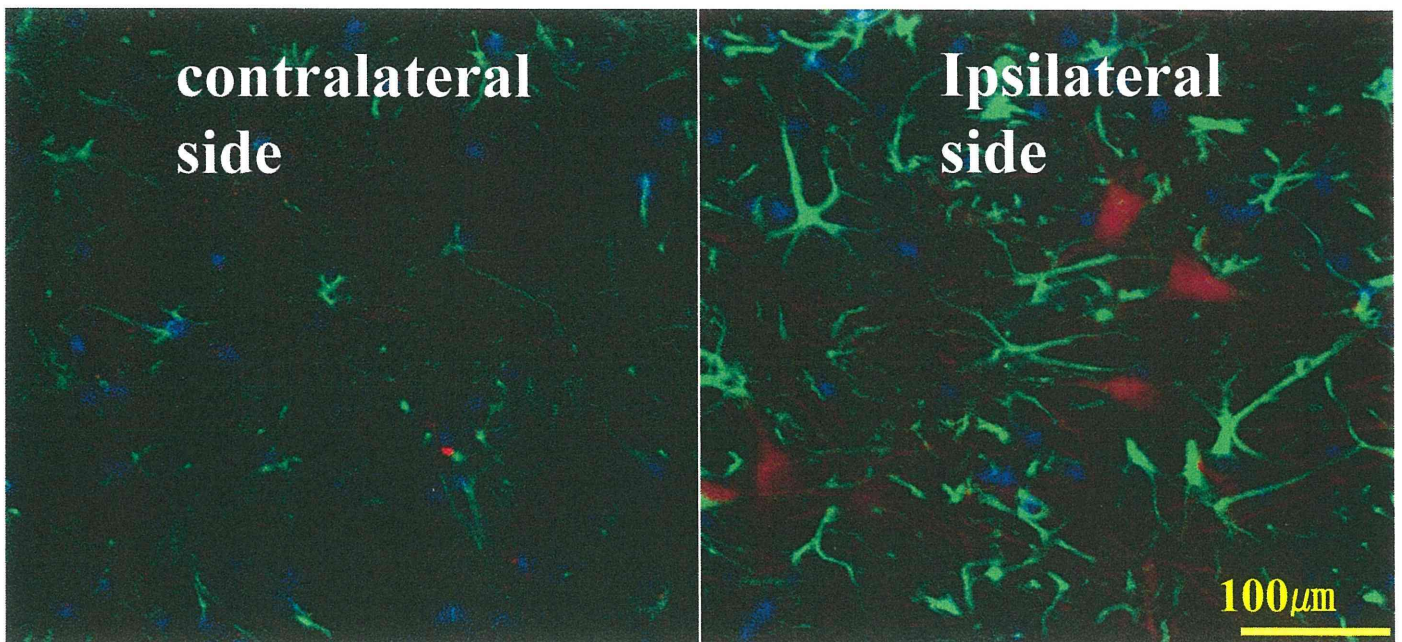
MCAOラット脳のエバンスブルー とアルブミンの局在



ニューロンの免疫染色

赤色蛍光： エバンスブルー 緑色蛍光： ニュロン細胞マーカー
青色蛍光： DAPI

MCAOラット脳のエバンスブルーと アルブミンの局在



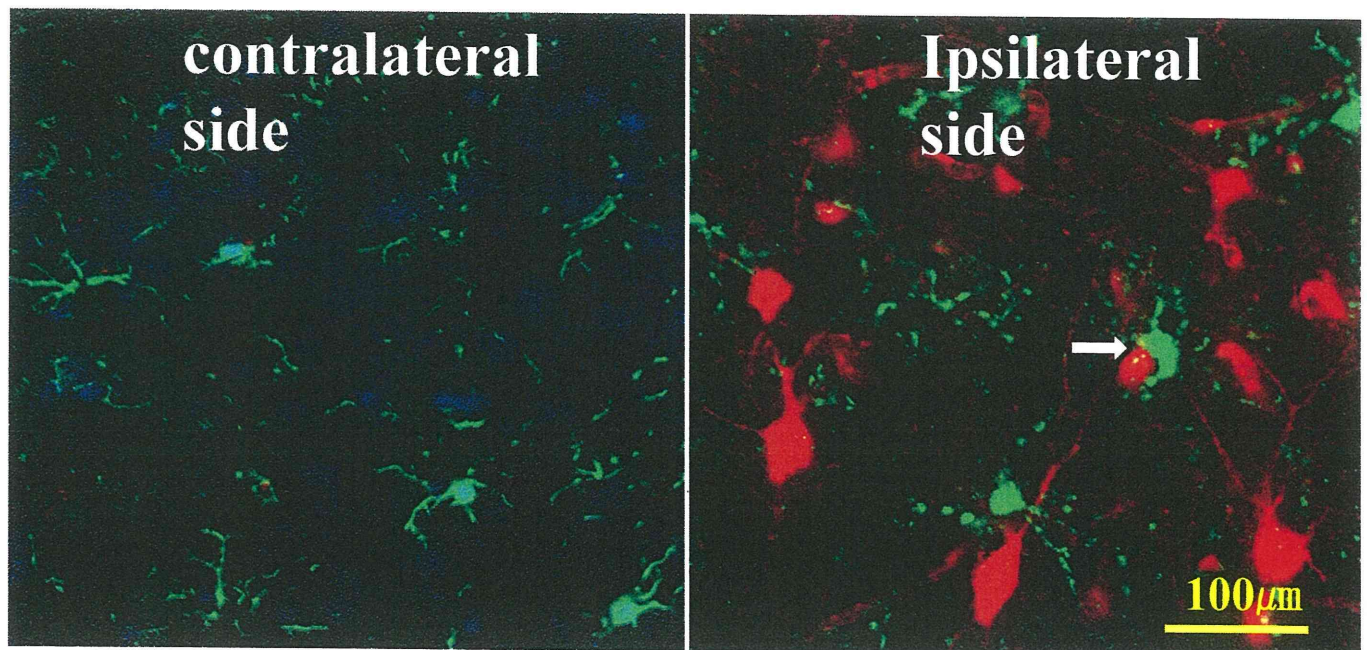
アストロサイトの免疫染色

赤色蛍光： エバンスブルー 緑色蛍光： GFAP

青色蛍光： DAPI

非虚血領域と比較し、虚血後数時間でアストロサイトの突起構造は一過性に著明に腫脹する

MCAOラット脳のエバンスブルーと アルブミンの局在



ミクログリアの免疫染色

赤色蛍光： エバンスブルー 緑色蛍光： Iba1 青色蛍光： DAPI
ミクログリアの中に複合体陽性ニューロンに接着するものが存在する