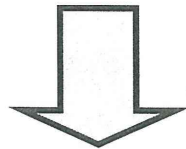


脳外傷治療の現状

脳外傷急性期には、呼吸と循環の管理による全身状態の機能維持が図られる。脳外傷急性期には脳浮腫が発生するため、これを防ぐ目的で高浸透圧グリセロールやマンニトールの点滴治療、あるいはバルビツール酸による代謝抑制や低体温療法等が試みられるが、一般的治療法とは言いがたく、**その有効性についてのエビデンスはない**。その他、脳損傷に起因する脳浮腫・脳障害に有効な薬物は見出されていない。つまり、**脳外傷急性期の脳障害に対するエビデンスのある治療法は現在まで存在しない**。



新規治療法開発の高いニーズ

実験プロトコール

動物：Wister 系 雄性ラット

脳外傷の種類：液体パーカッション傷害

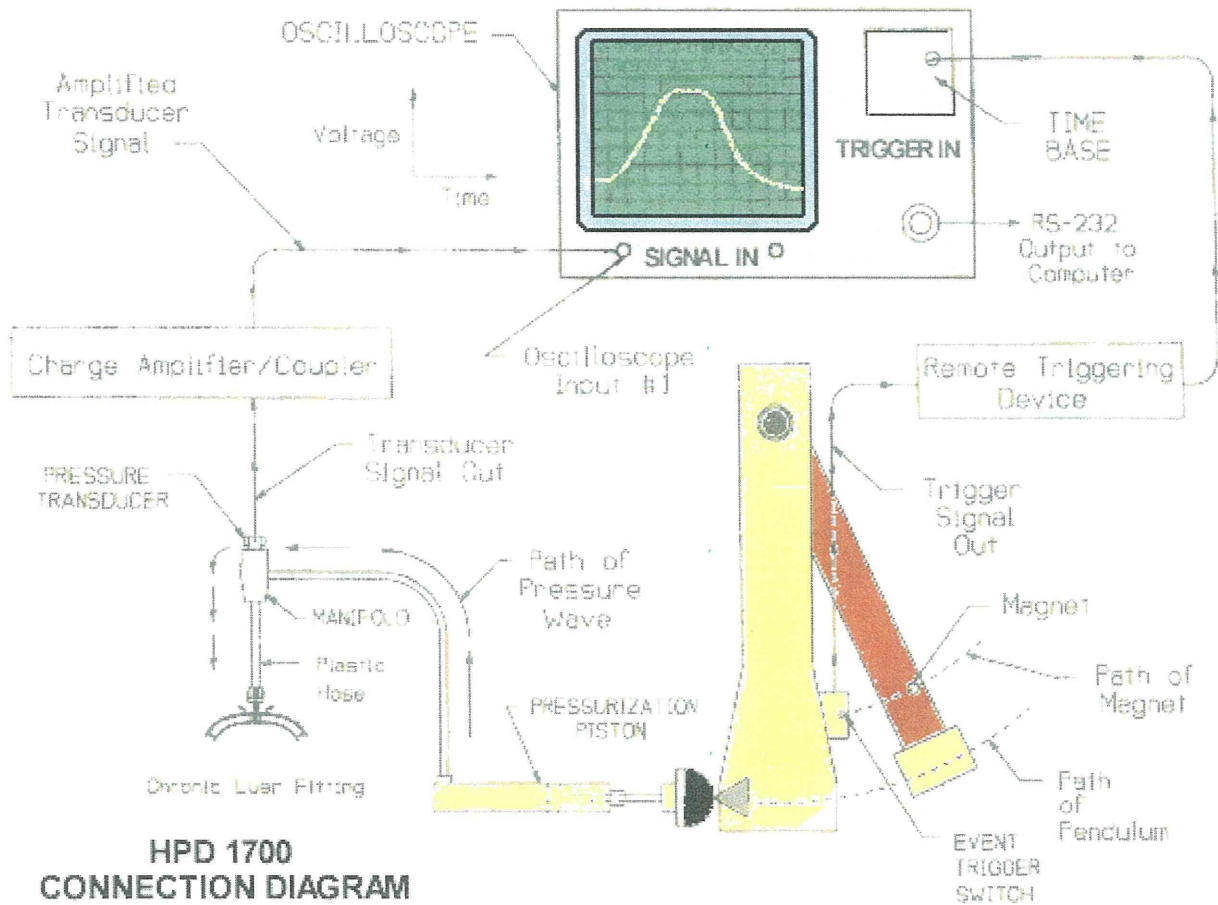
実験前日

- ペントバルビタール麻酔下に頭頂部頭蓋骨にパーカッション用の穴をあけ、Holeにフィットするガイドシリンダーを固定する。

実験当日

- パーカッション傷害作成装置（ドラゴンフライ）で、出力が2.2-2.6atmとなるようにセットし、脳硬膜上から衝撃を加える。個々のラットに加えられた衝撃度はモニターによって記録する。
- パーカッション傷害5分後に、抗HMGB1抗体あるいは対照抗体を各1 mg/kg 尾静脈から投与する。6時間後に同量の抗体投与を行う。

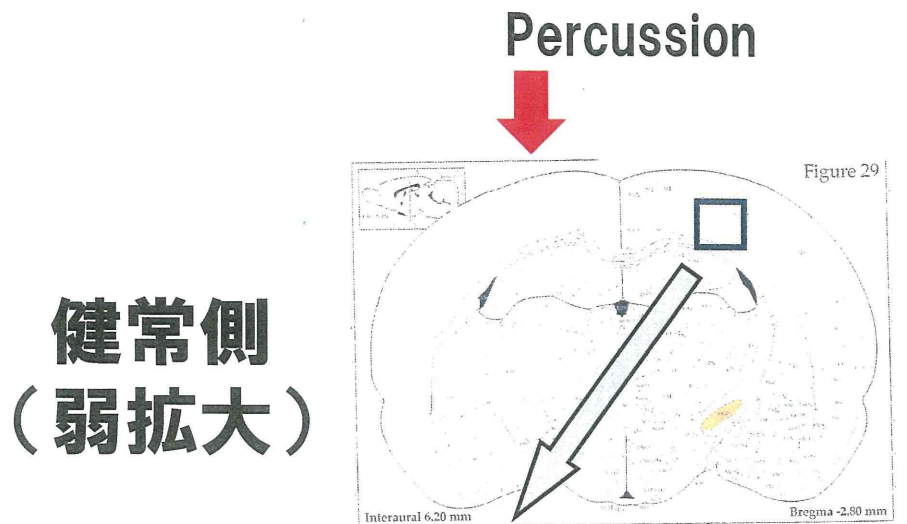
パーカッション傷害作製の概要



脳障害の評価項目

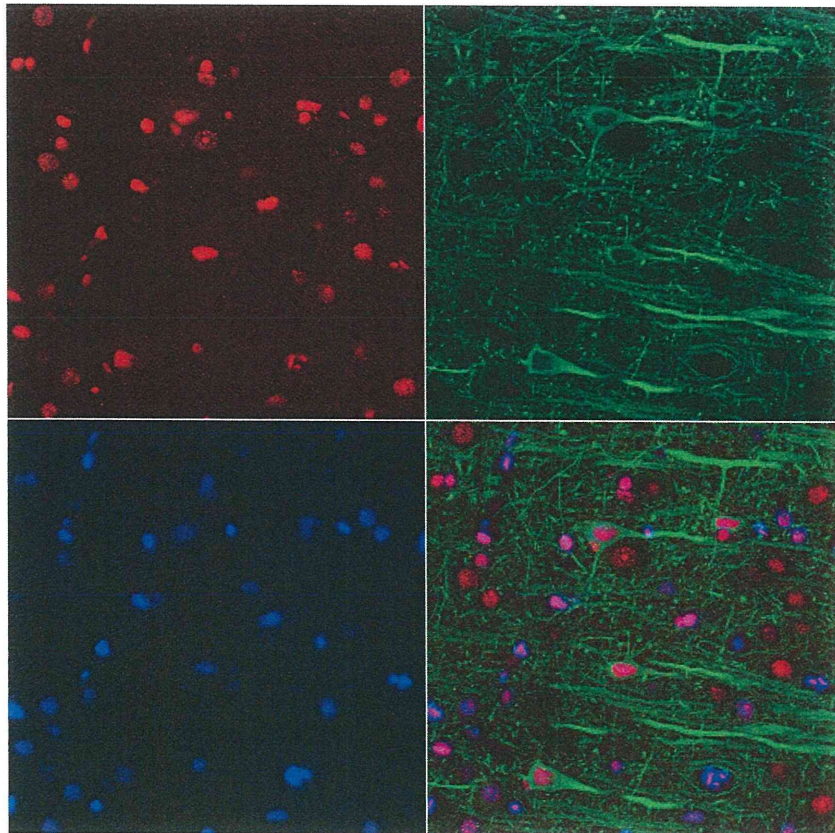
- HMGB1トランスロケーション
- 血液脳関門構造 (TEM) 観察
- 血液脳関門透過性測定
- 神経症状の測定 (運動麻痺)
ロータロッド法
シリンダー法
- 神経細胞死
- 局所ミクログリアの活性化評価
- 反応性アストログリアの評価
- 血中HMGB1レベルの測定
- 炎症反応関連遺伝子発現

脳外傷後のHMGB1トランスロケーション



HMGB1 (赤)

MAP-2 (緑)



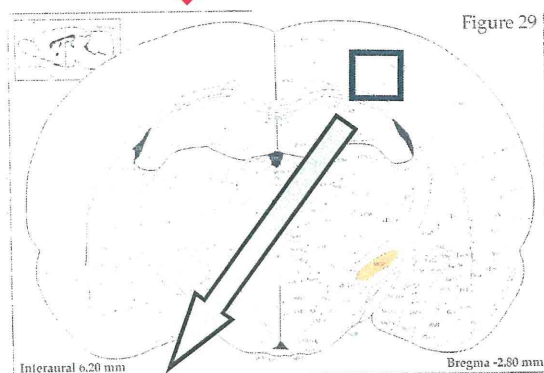
DAPI (青)
細胞核

脳外傷後のHMGB1トランスロケーション

Percussion

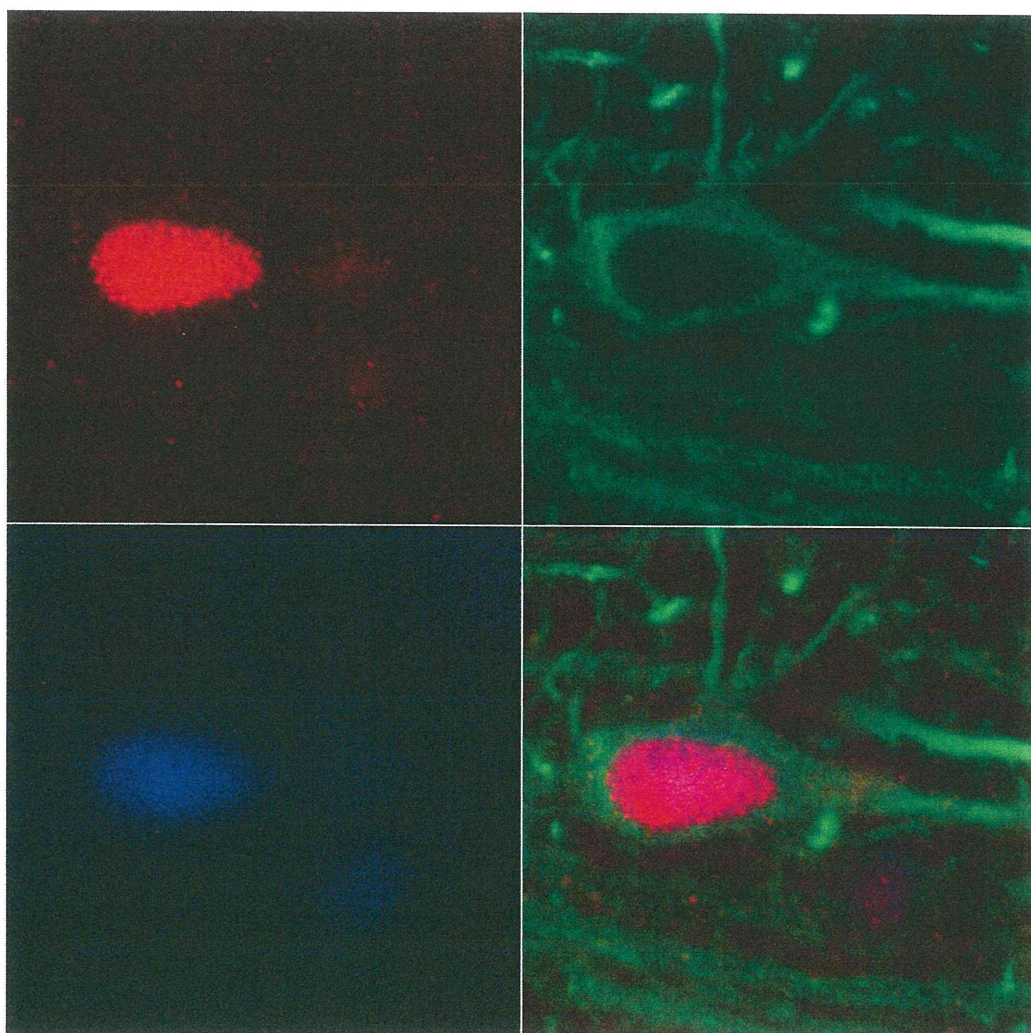


健常側
(強拡大)



HMGB1 (赤)

MAP-2 (緑)



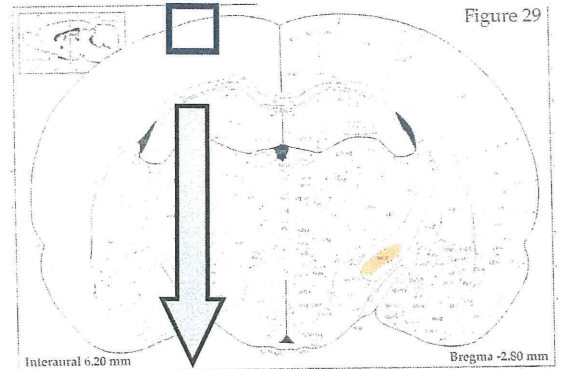
DAPI (青)
細胞核

脳外傷後のHMGB1トランスロケーション

Percussion

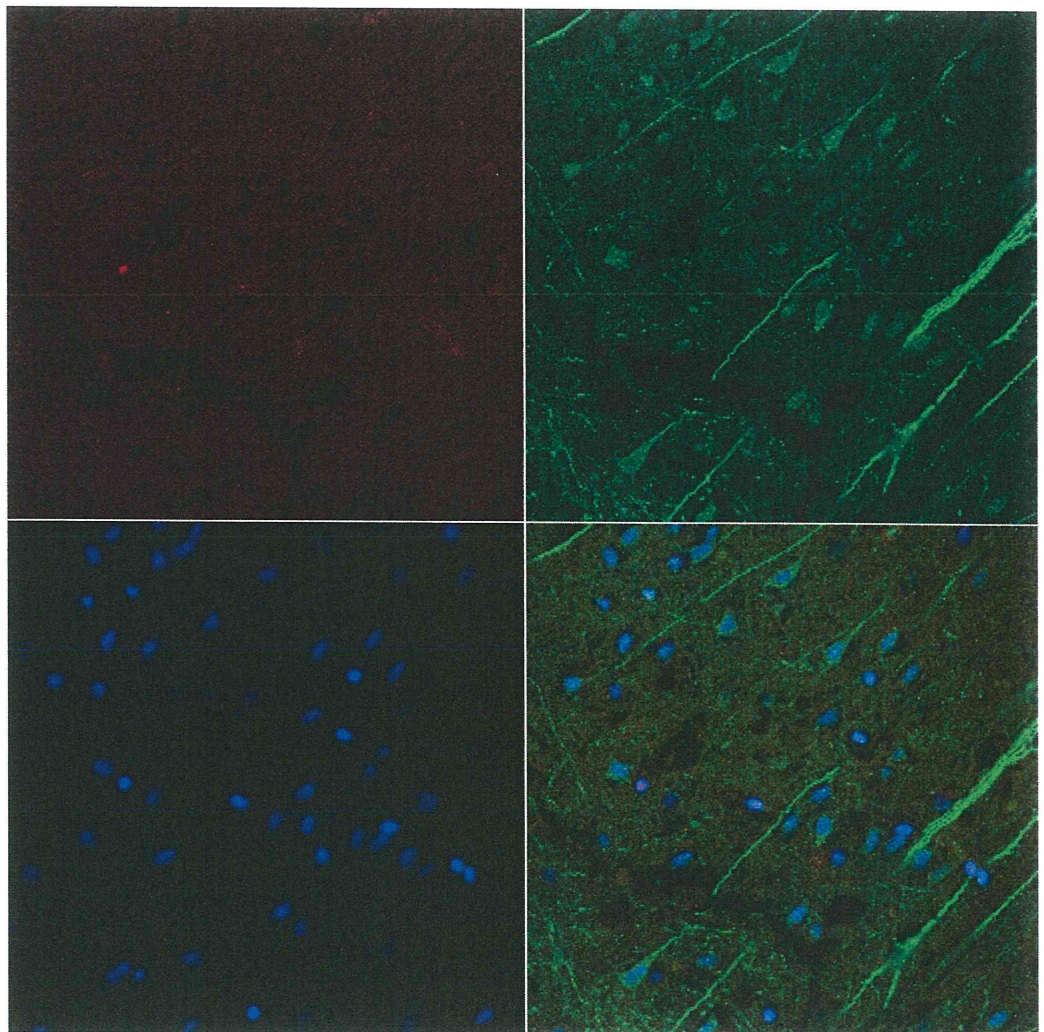


傷害側
(弱拡大)



HMGB1 (赤)

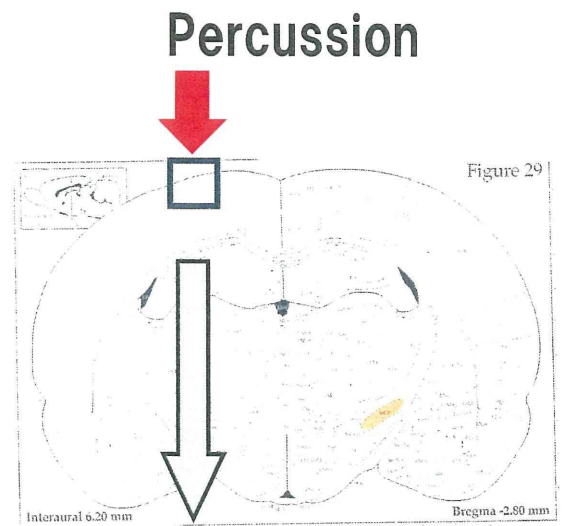
MAP-2 (緑)



DAPI (青)
細胞核

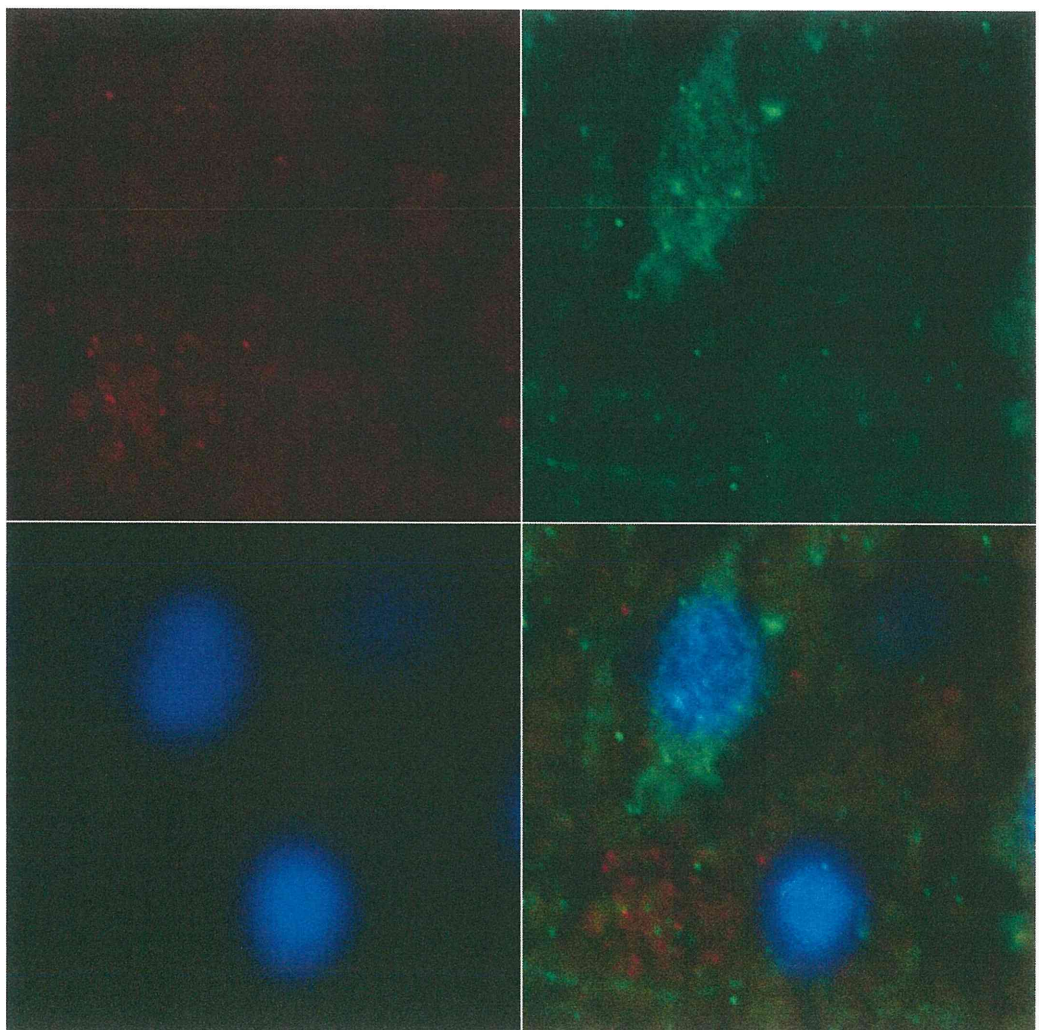
脳外傷後のHMGB1トランスロケーション

傷害側
(強拡大)



HMGB1 (赤)

MAP-2 (緑)



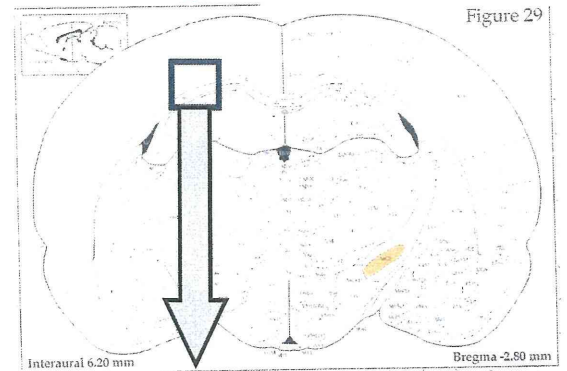
DAPI (青)
細胞核

脳外傷後のHMGB1トランスロケーション

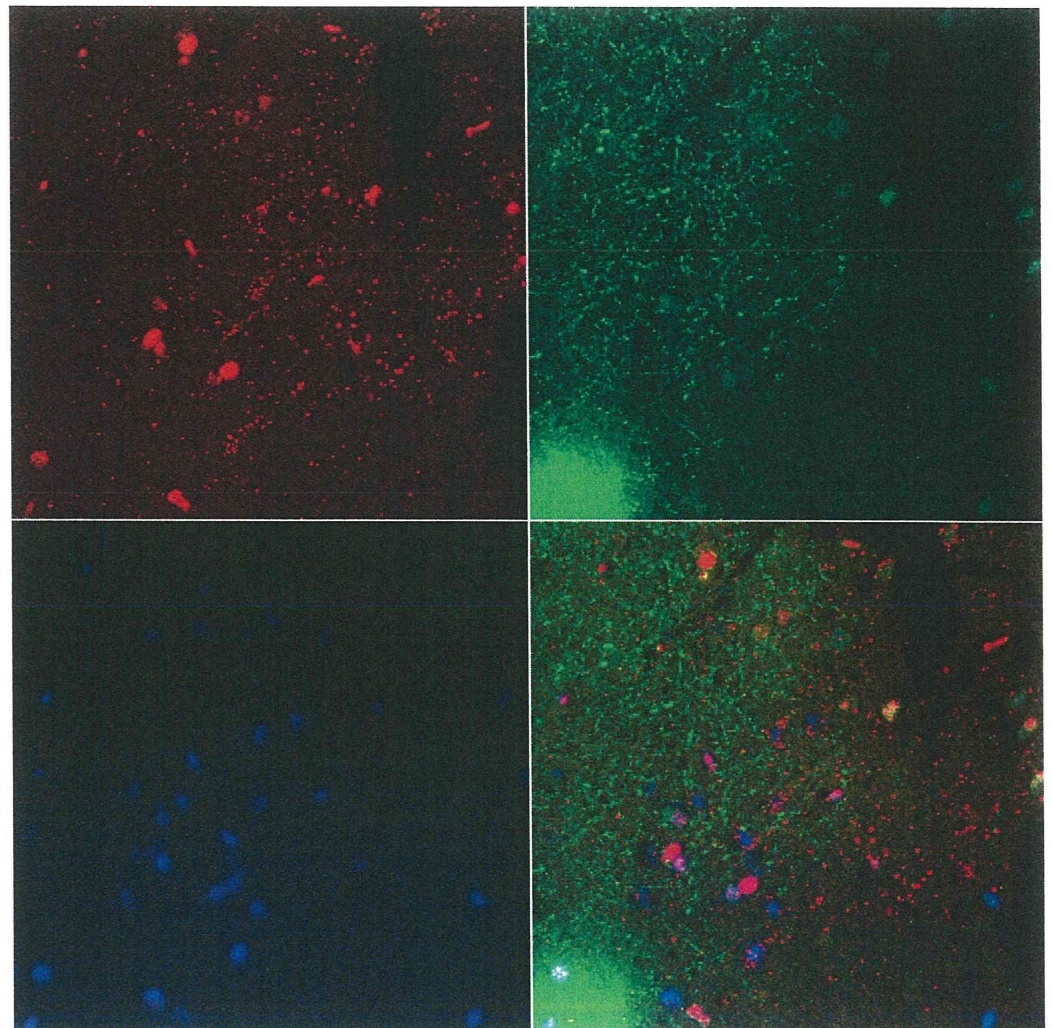
傷害側
周辺部分
(弱拡大)

HMGB1 (赤)

Percussion



MAP-2 (緑)

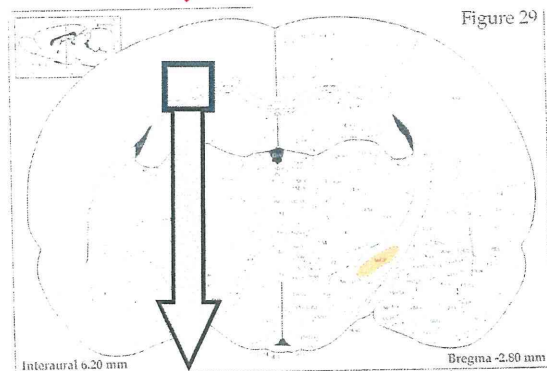


DAPI (青)
細胞核

脳外傷後のHMGB1トランスロケーション

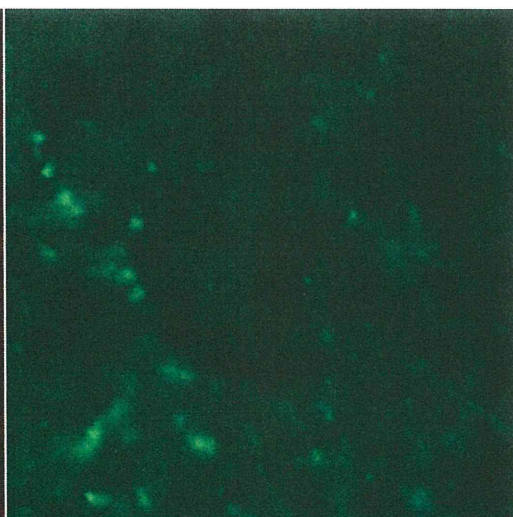
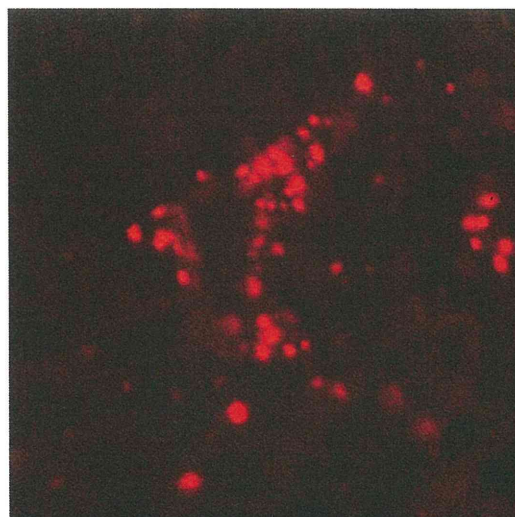
傷害側
周辺部分
(強拡大)

Percussion

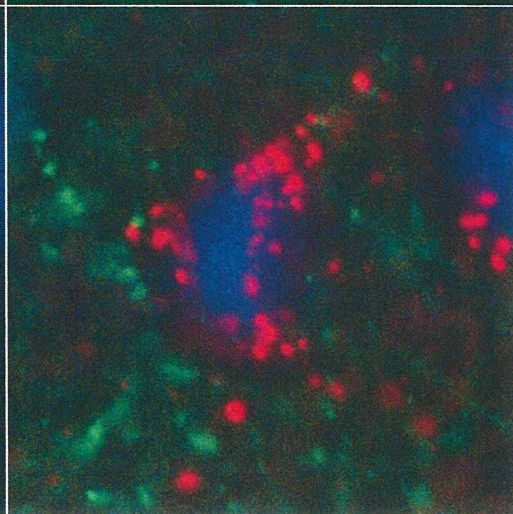
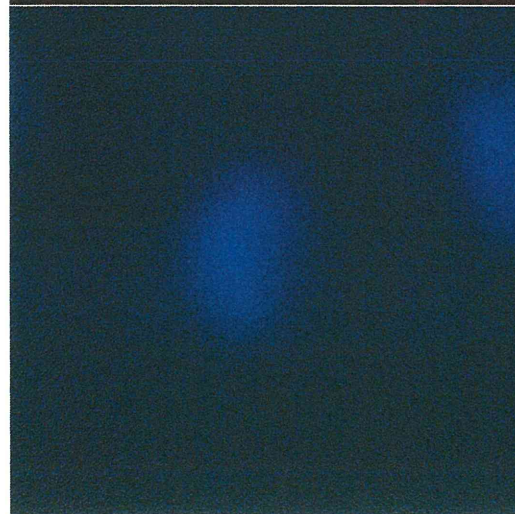


HMGB1 (赤)

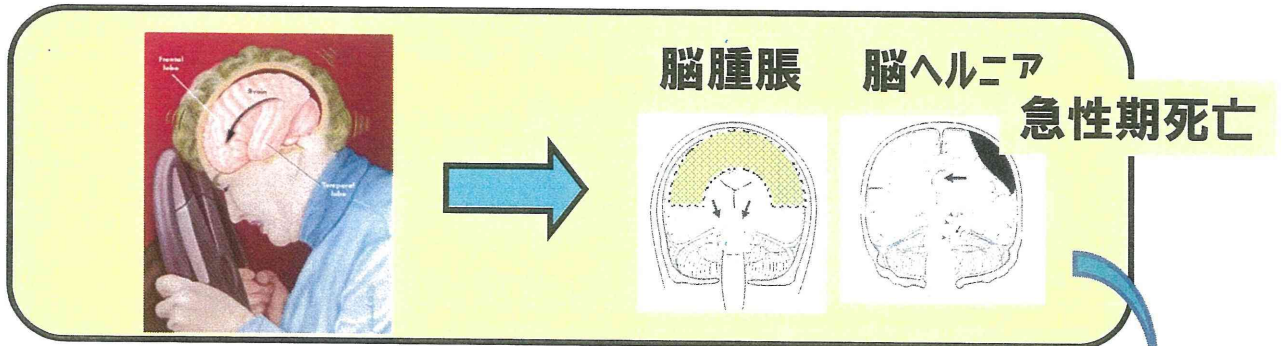
MAP-2 (緑)



DAPI (青)
細胞核



脳外傷後の脳腫脹は制御できるか？



特願2010-270133
 外傷性神経障害治療剤
 西堀正洋 他

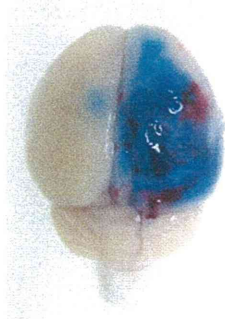
● **神経後遺症**
 運動・認知精神機能低下
 人格変化
 外傷後てんかん
 パーキンソン病
 アルツハイマー病

脳外傷モデル

対照抗体

抗HMGB1抗体

色素漏出により
 脳血管透過性
 亢進を示す

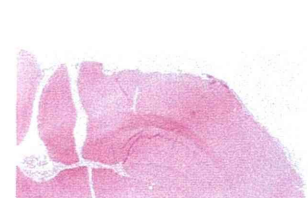
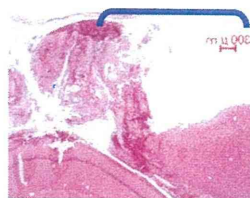


対照抗体

抗HMGB1抗体

対照抗体

抗HMGB1抗体



T2強調 MRI 画像

HE 染色

脳外傷急性期治療薬

- 呼吸・循環の全身管理が主。
- 頭蓋内圧低下・脳浮腫抑制の目的で使用されるマンニトール、グリセロールはグレードCの推奨度。



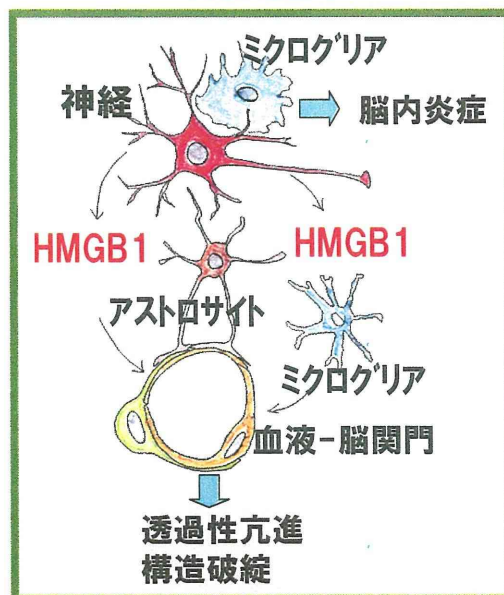
エビデンスを伴った急性期治療法は殆どない。
有望な開発薬もない。



・抗HMGB1抗体

オンリーワン&
ナンバーワンの可能性

Neurovascular Unitと HMGB1



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

ヒト抗 HMGB1 単クローン抗体の作製

研究分担者 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
楨野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
和田 淳 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究要旨

同意の得られたヒト自己免疫疾患患者の血中抗 HMGB1 自己抗体の Elisa によるスクリーニングで、自己抗体陽性患者を同定することに成功した。これらの患者細胞から、陽性クローンのスクリーニングを行い1クローンを得たが、産生された抗体は低親和性であった。抗 HMGB1 ラット単クローン抗体（#10-22）を、脳梗塞、アテローム動脈硬化症、脳外傷治療用抗体として継続して大量作製した。

A. 研究目的

抗 HMGB1 完全ヒト抗体の作製に向けて、自己免疫疾患患者群から自己抗体産生患者を Elisa スクリーニングで同定する。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36名の患者について実施する。ラット脳梗塞、マウスアテローム性動脈硬化症、ラット脳外傷モデル実験に供するため、引き続き治療用抗体として抗 HMGB1 ラット単クローン抗体（#10-22）を大量産生・精製する。

B. 研究方法

1. 病院倫理審査委員会で承認された内容をもとに、インフォームドコンセントの得られた自己免疫疾患患者群から自己抗体産生患

者をサンドイッチ Elisa 法でスクリーニングで同定する。同時に HMGB1 の固相化プレートを使った Elisa を実施し、両法による測定値を比較する。

2. 前年度までに確立した精製法で、抗 HMGB1 ラット単クローン抗体（#10-22）を大量産生・精製する。

C. 研究結果

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 を中心とした自己免疫疾患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。ようやく増殖性が維持された1クローンを得たが、産生抗体の親和性は極めて低いと判定された。

D. 考察

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つた。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。

E. 結論

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。新しい作製法を検討すべきである。抗 HMGB1 ラット単クローン抗体 (#10-22) の供給体制は整備されている。

F. 健康危険情報

該当なし

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.

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. 実用新案登録
該当なし
- 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. その他
該当なし
- 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 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.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
- ⑧ 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.
- ⑨ 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

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

サル脳梗塞モデルと抗体の生体内動態に関する研究

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
榎本 秀一 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
武田 吉正 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・講師
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

研究要旨

ニホンザルの大腿動脈から動脈バルーンカテーテルを挿入し、中大脳動脈起始部でバルーンを膨らませて虚血状態とした。血流再開 48 時間後に深麻酔下にサル脳を灌流固定し脳組織障害を評価した。抗 HMGB1 抗体を ^{64}Cu -DOTA で標識し、MCAO ラットの尾静脈から投与後の生体内動態について解析を行った。

A. 研究目的

ニホンザルを用いて低侵襲の血管内バルーンカテーテル法による中大脳動脈閉塞・再灌流モデルを作製し、脳障害について明らかにする。

前年度ラベル化に成功した ^{64}Cu -DOTA 標識抗体の MCAO ラット生体内動態を詳しく解析する。

B. 研究方法

1. 日本バイオリソースから供給を受けたニホンザルにケタミンを筋注し、全身麻酔の上血管撮影を行いながら、カテーテルを腹部大動脈～大動脈弓を經由し、総頸動脈～内頸動脈にカテーテルを進めたのち、中大脳動脈起始部でバルーンを拡張し、2 時間の血行遮断を行う。その後、バルーンを収縮させ、再灌流状態とする。再灌流 48 時間後、サルを

深麻酔により安楽死させホルマリン灌流で脳を固定した。

2. 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、虚血脳部位神経障害と HMGB1 トランスロケーションを評価する。

3. 抗 HMGB1 ラット単クローン抗体に DOTA 修飾を施し、 ^{64}Cu で標識する。標識抗体の一定量を MCAO ラットに投与し、PET 撮像する。

4. ^{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。結果を解析する。

C. 研究結果

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したところ、前頭葉から線条体にかけての虚血コアから HMGB1 陽性構造が消失していた。その周辺の相対虚血領域では、細胞質に HMGB1 陽性像を有する神経細胞が見出された。虚血側の血管壁内に、非常に強い HMGB1 免疫陽性像が認められたが、細胞種については同定できなかった。

MCAO の脳虚血部位に対照抗体、抗 HMGB1 抗体ともに集積する像が PET 撮像で得られた。集積量は、抗 HMGB1 抗体の方が高い傾向であった。脱血後の脳スライスを用いたオートラジオグラフィでは逆に、対照抗体の脳内移行が多い傾向にあった。末梢臓器では、対照抗体では投与後早期から肝臓で高い陽性像観察されたが、治療抗体では心臓と肺が高かった。シンチレーションカウントによる各臓器における標識体の分布では、PET 撮影の結果と一致するデータが得られた。また、脳虚血手術時の傷部位に一致する強い陽性シグナルが観察された。

D. 考察

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虚血部位依存的な神経細胞内 HMGB1 のトランスロケーションが観察された。ラットで認められたような時間依存性がニホンザルでも見られるかどうかは、さらに検討が必要である。

⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体は、生体内動態の研究に十分使用できることが明らかとなった。生体内動態ならびに脳内移行の問題に関しては、さらに個体数を増やして解析する必要がある。

E. 結論

ニホンザルの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虚血部位依存的な神経細胞内 HMGB1 のトランスロケーションが生じることがわかった。⁶⁴Cu-DOTA 標識抗 HMGB1 抗体は、生体内動態の解析に使用できる。

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

該当なし

2. 学会発表

1) 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 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.
- ⑥ 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.

- ⑦ 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.

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

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shichida T., et al.	Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain.	<i>Nature Medicine</i>			in press
Okuma Y., et al.	Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Therapy for Traumatic Brain Injury	<i>Annals of Neurology</i>			in press
Zhang J., et al.	Anti-high Mobility Group Box-1 Monoclonal Antibody Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemia-Induced Disruption in Rats.	<i>Stroke</i>	42(5)	1420-1428	2011
Kanellakis P., et al.	High-Mobility Group Box Protein 1 Neutralization Reduces Development of Diet-Induced Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice	<i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i>	31(2)	313-319	2011
Adachi N., et al.	Reduction of the infarct size by simultaneous administration of l-histidine and diphenhydramine in ischaemic rat brains.	<i>Resuscitation</i>	82(2)	219-221	2011
Terada S., et al.	Gene Expression and Localization of High-mobility Group Box Chromosomal Protein-1 (HMGB-1) in Human Osteoarthritic Cartilage	<i>Acta Med Okayama,</i>	65(6)	369-377	2011
Yang H., et al.	Deleterious Role of Anti-high Mobility Group Box 1 Monoclonal Antibody in Retinal Ischemia- reperfusion Injury.	<i>Current Eye Research</i>	36(11)	1037-1046	2011

その他

発表者氏名	タイトル名	発行元
西堀正洋 松井秀樹 藤原俊義	厚生労働省大型研究費研究成果報告 現代の魔法の弾丸「分子標的治療」 ●脳梗塞 ●脳腫瘍 ●消化器癌	岡山大学医学部医学科

研究成果の刊行物・別刷