

20114001B

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21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者

西 堀 正 洋

平成24（2012）年5月

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	—————	11
劉 克約 他		
2. 粥状動脈硬化症モデルと ヒト末梢動脈疾患に関する研究	—————	17
榎野 博史 他		
3. 脳血管攣縮と脳外傷モデルに関する研究	—————	19
伊達 勲 他		
4. 抗 HMGB1 抗体の毒性試験に関する研究	—————	21
吉野 正 他		
5. 抗 HMGB1 単クローン抗体の大量精製法の確立と 抗 HMGB1 ヒト抗体の作製	—————	23
森 秀治 他		
6. ⁶⁴ Cu-DOTA 標識抗体の作製と生体内動態解析	—————	25
榎本 秀一 他		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	27
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）
総合研究報告書

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： 本研究は、動脈硬化症、脳梗塞、糖尿病などの生活習慣病の基礎病態に共通して関与する新規メディエーターとして同定された細胞核由来の「HMGB1」を標的とする抗体医薬の開発研究である。3つの単クローン抗体から治療抗体を選択した。脳梗塞、アテローム動脈硬化症、脳血管攣縮、脳外傷に対する抗体投与の効果を証明し、作用機序を解明した。抗体の放射標識に成功し、PET 撮像により生体内動態を明らかにした。急性単回ならびに反復投与毒性試験を実施し、急性投与の安全性を確認した。血中 HMGB1 の臨床検査マーカーとしての意義を明らかにした。

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）
榎野博史（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）
和田淳（岡山大院医歯薬学・准教授）
大塚愛二（岡山大院医歯薬学・教授）

A. 研究目的

わが国の死因の2、3位を占める心疾患と脳血管疾患や上位を占める腎不全は、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、高血圧症などの生活習慣病を基礎疾患として発症する。従って、これら生活習慣病の予防と進行防止をはかることが高齢化社会のわが国の保健医療において喫緊の課題となっている。特に、脳申請者は、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血管疾患や重篤な心疾患は、要介護や寝たき

りの主要な原因となり、社会経済的損失は計り知れない。しかし、これらの生活習慣関連疾患群の進行を防止し、急性増悪的破綻を最小化する臨床治療法の開発は、殆ど進んでいない。

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、本研究において抗体治療の有効性を詳細に検証し、その作用機序を解明するとともに、現行治療薬との違いを明確にする必要がある。効果の検証と並んで重要な安全性に関しては、急性単回ならびに反復投与実験によって安全性を確立する。放射性標識された治療抗体を用いて Positron Emission Tomography (PET) 解析を実施することによって、実験動物における抗体分子の生体内動態を明らかにする。さらに、各種病態に内在する炎症性過程の理解に基づき、抗 HMGB1 抗体治療の新規の臨床適応疾患を見出す。ヒト動脈硬化症病態における疾患マーカーとしての意義を評価するため、Peripheral arterial disease (PAD) 患者の臨床重篤度と血中 HMGB1 レベルの相関性ならびに他の因子群との相関性解析を実施する。

B. 研究方法

1. 単クローン抗体の特徴付け

現在自家製で保有する3種類のラット抗HMGB1単クローン抗体のエピトープマッピングを、5アミノ酸残基ずつずらした15アミノ酸残基長ペプチドをナイロン膜上に固相化し、抗体によるドットブロット検出を行なった。各単クローン抗体の抗原に対する親和性は、表面プラズモン共鳴法(Biacore)で測定した。

2. ラットMCAO2h/再灌流モデルにおける解析

① Wistar系雄性ラットの中大脳動脈2時間閉塞・再灌流モデルを用いて、虚血後の血液-脳関門(血管内皮細胞の緻密結合、細胞内小器官、アストログリア細胞の終足、基底膜構造)を、透過型電子顕微鏡で観察した。アストログリア細胞の終足腫脹を定量化し、関門構造の破綻の指標とした。抗HMGB1抗体あるいは抗*Keyhole limpet hemocyanin*抗体(対照抗体)を再灌流直後に静脈内投与し、血液-脳関門破綻に対する抗体効果を比較した。脳浮腫のT2強調MRI解析では、再灌流3時間から測定を開始し、6、12、24時間、7日でMRI測定した。機能的な脳血管透過性の亢進は、尾静脈からエバンスブルーを静注し、脳内へのエバンスブルー/アルブミン複合体の漏出で評価した。アクアポリン4の発現は、免疫組織化学的に行なった。

② HMGB1トランスロケーションと神経細胞内顆粒状構造物の同定を免疫二重染色法と免疫電顕法で解析した。HMGB1の体液中への移行に関し、脳脊髄中と血中HMGB1をそれぞれ測定することで情報を得た。また、虚血後脳のHMGB1レベルの変化はウェスタンブロットで検出した。

③ エバンスブルーを使って、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のパターン解析を実施した。

3. 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

上記培養系を用いて、組換え体ヒトHMGB1の血管透過性亢進作用を、血管内皮細胞を挟む両室間の電気抵抗変化とアルブミン漏出量で評価した。また、組換え体ヒトHMGB1で処理後の血管内皮細胞、血管周皮細胞、アストログリア細胞のそれぞれの形態を光学顕微鏡下に観察・評価した。

4. 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

6週齢のApoEノックアウトマウスに高脂肪食を8週間負荷し、アテローム動脈硬化症を発症させた。抗体は400µg/mouseの投与量を高脂肪食負荷期間中、1週間に2回投与した。8週間後の大動脈起始部の動脈硬化巣の大きさ、泡沫細胞数、樹状細胞浸潤数、T細胞浸潤数、炎症性サイトカイン発現等について、抗HMGB1抗体治療群と対照抗体治療群で比較した。

5. 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

6. 抗HMGB1完全ヒト抗体を作製

Elisaスクリーニングにより力価確認された自己免疫疾患患者の末梢単核球から、抗HMGB1抗体産生B細胞クローンを探索し、それらの抗体特性を解析する。

7. 抗HMGB1抗体の⁶⁴Cu-DOTA標識体作成と抗体の生体内動態の解析

抗HMGB1抗体と対照抗体をDOTA修飾し、⁶⁴Cuを結合させることで、放射標識抗体を得た。⁶⁴Cu-DOTA標識抗体をMCAOラットに投与し、投与後の生体内動態をPositron Emission Tomography(PET)撮影することで解析した。

8. 抗HMGB1単クローン抗体(#10-22)の急性単回ならびに反復投与毒性試験

ラットで有効用量として設定した抗HMGB1単クローン抗体(#10-22)1.6mg/kgの約6倍量に相当する10mg/kgを

2回に分けて投与し、一全身状態と剖検による病理学的検討を実施した。さらに、0.75~3.0 mg/kg の用量での投与を7日間連続し、8日目に尿、血液細胞、血液生化学、剖検、器官重量の各検査と、全身49組織の病理組織検索を実施した。

9. 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

ニホンザルを用いて、低侵襲の血管内動脈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、脳梗塞巣形成と HMGB1 トランスロケーションについて明らかにする。

10. ラット Fluid percussion injury モデルの作製と抗 HMGB1 抗体の神経保護効果の評価

C. 研究結果

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された。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。神経細胞外に放出される途上で、これら細胞内小器官が関与することが示唆された。脳脊髄液と血漿中 HMGB1 の測定で、時間依存的な上昇が認められた。脳神経細胞由来の HMGB1 が拡散性にこれら体液スペースに到達した可能性が示唆された。

ラット MCAO2h/再灌流モデルにおける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明らかにされた。つまり、透過型電子顕微鏡で観察すると、再灌流3時間後ですでに著明なアストログリアの突起腫脹と血管基底膜からの細胞膜解離、血管内皮細胞の形態変化

などが認められた。脳血管の透過性を再灌流3-6時間で測定すると、著明に亢進していることがわかった。このように、虚血早期において血液・脳関門の透過性亢進と構造的破綻が生じていることがわかった。

ラット脳血管内皮細胞、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た。その結果、組換え体 HMGB1 は、濃度依存的に血管内皮細胞・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、組換え体 HMGB1 の添加によって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。以上の結果から、HMGB1 は血管内皮細胞と周皮細胞に直接的に作用し収縮性変化を惹起する結果、血管透過性を亢進させると推定された。

エバンスブルーの漏出抑制で示された抗 HMGB1 抗体の MCAO モデルでの作用は、T2-強調 MRI 画像でも確認された。虚血再灌流 3,6,24 時間後に経時的に撮像された T2-強調 MRI で、3 時間後にすでにハイデンシティの脳浮腫部分が出現し、それが 24 時間まで拡大することがわかった。抗 HMGB1 抗体の投与は、脳浮腫形成を著明に抑制した。

BBB の破綻につながる要素として、BBB 基底膜の消化の問題がある。基底膜の消化に関し最も重要と考えられる MMP-9/2 の活性をザイモグラフィで検出したところ、対照群では虚血側に酵素活性の誘導が強く認められたが、抗 HMGB1 抗体の投与群では、低いレベルに抑制されていた。炎症関連分子群の mRNA 発現も定量的 PCR で解析したところ、TNF- α や iNOS など起炎性応答に強く関与する遺伝子群の発現が抗体治療で抑制された。

上述された抗 HMGB1 抗体による脳浮腫の抑制や BBB 構造の維持は、ミクログリア細胞の活性化抑制を伴っており、広範囲の神経細胞が生存維持された。このことと一致して、運動麻痺の神経症状も劇的に改善された。抗 HMGB1 抗体の有効治療時間帯の検討で、発症後 4 時間まで治療が有効であることが

わかった。

ラット MCAO2h/再灌流モデルにおいて、虚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、エバンスブルーを投与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。

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ることを免疫組織学的に明らかにした。抗 HMGB1 単クローン抗体の 8 週間連続投与によって、対照マウスで認められる粥状動脈硬化巣の形成が約半分に縮小し、集積する単球も有意に低下することがわかった。さらに、樹状細胞数、CD4 陽性 T リンパ球数、遊走平滑筋細胞数、VCAM-1、MCP-1 発現が有意に低下することがわかった。組み換え体 HMGB1 を使った単球遊走活性試験から、HMGB1 には単球遊走活性があることがわかった。抗 HMGB1 抗体の慢性投与は、血中総コレステロール、HDL、LDL-コレステロール、中性脂肪の各値には影響しなかった。

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 名の患者と健康人 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。

抗 HMGB1 完全ヒト抗体を作製するために、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。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、結果として HMGB1 特異性が確実であったクローンは 1 クローンのみであり、その力価も極めて低かった。

抗原結合能を 60 % 維持した DOTA 修飾抗体の作製条件を得ることができた。 ^{64}Cu -DOTA 標識抗体をゲル濾過カラムを用いてフリーの ^{64}Cu から分離することができた。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 撮像した結果を解析した。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 抗体の方が多い傾向であった。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。

ラットの脳梗塞モデル実験で使用された抗 HMGB1 抗体用量の 5 倍量の投与後の急性毒性試験を実施した。脳、心臓、肺、肝臓、胃、小腸、大腸、腎臓、脾臓などの主要臓器について光学顕微鏡下に病理所見を検索したが、異常所見は認められなかった。抗 HMGB1 単クローン抗体 0.75, 1.5, 3.0

mg/kg の 6 日間連続静脈内投与は、対照抗体投与と比較し、ラットの一般状態、体重増加、食餌摂取量のいずれにおいても、有意の差を生じることはなかった。

抗体投与 7 日目で調べた、赤血球数、ヘマトクリット、白血球数、白血球分類、血小板数、APTT、PT は、対照群といずれの投与用量の抗 HMGB1 抗体投与群で差はなく、すべて正常値の範囲内であった。血液生化学検査項目の総蛋白、グロブリン、アルブミン、ビリルビン、AST、ALT、ALP の何れにも、両群間で有意の差はなく、すべて正常値の範囲内であった。尿検査に両群間で差はなかった。心臓、腎臓、肝臓、肺、脳、膵臓、胃、小腸、大腸、前立腺、膀胱を含む全身 49 組織臓器の病理学的検索の結果、抗 HMGB1 抗体のいずれの用量においても異常所見は認められなかった。以上の結果から、治療用に使用した抗 HMGB1 抗体は、本投与量の範囲では安全に使用できることが強く示唆された。

ニホンザルの低侵集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・再灌流モデルを作製した。虚血 48 時間後の脳において、ラットで見られたのと同様の HMGB1 トランスロケーションが明らかとなった。

ラットの Fluid percussion (2.2-2.6 atm) による脳外傷モデルを作製した。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。特に、急性期の脳血管透過性の抑制と脳浮腫抑制作用は極めて強いと判定された。抗体の投与量と効果の関係を検討した所、1 mg/kg の投与量で最大効果（抑制率 85%）を示し、0.67mg/kg、0.33 mg/kg では抑制率がそれぞれ 50%と 30%であった。有効治療時間帯についても検討し、1 mg/kg の投与量で、受傷後 3 時間の時点での治療で 60%の抑制が得られた。

D. 考察

抗 HMGB1 抗体の作用機序がこれまでの脳梗塞治療薬とは全く異なることを明らかにした。内因性 HMGB1 は虚血初期殆どが

神経細胞から放出されているが、細胞外に出た HMGB1 は、BBB の構成細胞である血管内皮細胞と周皮細胞に直接作用し、収縮性変化を惹起する可能性が *in vitro* BBB 培養系を使って示唆された。抗 HMGB1 抗体は、HMGB1 の BBB に対するこのような直接作用を遮断すると推定された。さらに抗体治療は、MMP-9/2 の活性化抑制、ミクログリアの活性化抑制、炎症関連分子の遺伝子発現抑制など、多段階的な抑制作用によって脳梗塞巣を縮小すると考えられる。このような特徴は、既存薬には見られないものであり、抗 HMGB1 抗体の優秀性を示唆している。

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。

アテローム動脈硬化症発症マウスに対する抗 HMGB1 抗体の慢性投与は、アテロームプラークの縮小、泡沫細胞の減少、浸潤 T リンパ球・樹状細胞の低下と炎症抑制に働くことが明らかにされた。このように、HMGB1 はある種の慢性炎症病態でも重要な働きをしていることが強く示唆され、アテローム動脈硬化症でも疾患治療のよい標的分子になることがわかった。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。ヒトの臨床病態解析と血中 HMGB1 の測定により、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ということが証明された。

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。臨床治療に

応用できるヒト抗体を得るために、新しいアプローチが求められる。

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

抗 HMGB1 抗体は、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、脳外傷の新規治療法として極めて有望である。脳内炎症の抑制には BBB の機能・構造的破綻を抑制する作用が重要である。抗 HMGB1 抗体は、ラット急性投与に関しては、安全に使える薬物と判断できる。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): 13-9, 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.
8. 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.

9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Nishibori M, et al. Specific removal of monocytes from peripheral blood of septic patients by polymyxin b-immobilized filter column. *Acta Med Okayama*, 63:65-69, 2009.
 15. 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.
 16. Wake H et al. Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 330:826-33, 2009.
 17. Liu R et al. Establishment of in vitro binding assay of high mobility group box-1 and S100A12 to receptor for advanced glycation endproducts: heparin's effect on binding. *Acta Med Okayama*, 63:203-11, 2009.
 18. Wake H et al. Histidine-rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin -induced angiogenesis in matrigel plug assay. *Eur J Pharmacol*, 623:89-95 , 2009.
 19. Takahashi HK et al. Prostaglandins E2 inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression, cytokine production and lymphocyte proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 331:656-670, 2009.
 20. Wake H et al. High mobility group box 1 complexed with heparin induced Angiogenesis in a matrigel plug assay. *Acta Med Okayama*, 63:249-62, 2009.
 21. 森 秀治, 西堀正洋, 抗体医薬が切り拓く先端医療, *薬学雑誌*, 129(1):1-2, 2009.
 22. 西堀正洋, 高橋英夫, 森 秀治, High Mobility Group Box-1 を治療標的とする脳梗塞治療, *日薬理誌*, 134:271-275, 2009.
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, 2011.
 2. 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.
 3. 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.
4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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. 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.
 2. 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. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 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.
 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. 抗 HMGB1 抗体による脳梗塞治療. 第 84 回日本薬理学会年会シンポジウム, 横浜, 2011.
 11. 劉克約, 張繼勇, 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 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-ヘパリン複合体は VEGE-A の発現を介して血管新生を誘導する. 第 84 回日本薬理学会年会, 神奈川, 2011.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 劉瑞, 森秀治, 和氣秀徳, 張繼勇, 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.
20. 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ジン E2 の効果. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.
21. 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.
22. 劉克約, 張繼勇, 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.
23. 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, 招待特別講演, 岡山, 2010.
24. 西堀正洋. 今なぜ「分子標的薬」なのか? 第 130 年会日本薬学会シンポジウム, 岡山, 2010.
25. 張繼勇, 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.
26. 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.
27. 西堀正洋. 脳虚血急性期の BBB 破綻と抗 HMGB1 抗体による脳梗塞治療. 第 6 回次世代バイオマーカー研究会, 講演, 岡山, 2010.
28. 劉克約, 張繼勇, 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.
29. 張繼勇, 劉克約, 和氣秀徳, 高橋英夫, 森秀治, 大塚愛二, 西堀正洋. Early translocation and release of HMGB1 in ischemic brain in rats. . 第 115 回日本薬理学会近畿部会, 金沢, 2009.
30. 西堀正洋. HMGB1 を標的とした抗体医薬による脳梗塞の新規治療法. 第 8 回国際バイオフォーラム, 東京, 2009.
31. 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. 脳虚血時における HMGB1 動態の初期変化. 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 2009.
32. 高橋英夫, 森秀治, 劉克約, 和氣秀徳,

- 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ヒスタミンの効果—続報—. 第 13 回日本ヒスタミン学会, 仙台, 2009.
33. 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. 抗体医薬による脳血管疾患治療と創薬プラットフォーム構築. 第 37 回薬物活性シンポジウム, 仙台, 2009.
34. 和氣秀徳, 森秀治, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋. HMGB1 はヘパリン依存的に血管新生を誘導する. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.
35. 高橋英夫, 森秀治, 劉克約, 和氣秀徳, 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 116 回日本薬理学会近畿部会, 大津, 2009.
36. 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. Establishment of in vitro binding assay of HMGB1 and S100A12 to RAGE: heparin's effect on the binding. 第 116 回日本薬理学会近畿部会, 大津, 2009.
37. 出石恭久, 和氣秀徳, 劉克約, 森秀治, 高橋英夫, 西堀正洋. 肺における Receptor for advanced glycation end products の存在様式の検討. 第 116 回日本薬理学会近畿部会, 大津, 2009.
- 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 No.12/654790, 脳浮腫抑制剤, 西堀正洋他.
- ④ WIPO 出願 PCT/JP2010/066683, テローム動脈硬化抑制剤, 西堀正洋他.
2. 実用新案登録
- 該当なし
3. その他

脳梗塞モデルに関する研究

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HMGB1トランスロケーション経路を詳細に明らかにした。抗HMGB1抗体の効果を、BBBの構造と機能保護、炎症関連因子発現抑制の観点から解析した。試験管内BBB培養系で組換え体HMGB1の作用と抗HMGB1抗体効果を証明した。HMGB1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、虚血脳部位特異的なHMGB1トランスロケーションを証明した。抗HMGB1抗体治療の治療有効時間帯を決定した。

A. 研究目的

ラットMCAO脳梗塞モデルを用いて、抗HMGB1抗体の梗塞縮小効果の詳細を明らかにする。

B. 研究方法

1. ラットMCAO2時間モデルを作製し、抗HMGB1抗体の効果を以下の観点から解析した。HMGB1トランスロケーション；BBB透過性；BBB構造（電顕）；T2強調MRI；運動麻痺神経症状；炎症分子遺伝子発現；神経細胞死；ミクログリア活性化；HMGB1標的細胞。

2. 低侵襲動脈血管内バルーンカテーテルアプローチによってニホンザル脳梗塞モデルを作製した。

C. 研究結果

ラットMCAOで神経細胞核内のHMGB1は、細胞質、ペルオキシソーム、ミトコンドリアを経由して細胞外へ放出されることを見出した。HMGB1は、BBBを構成する血管内皮細胞と周皮細胞に収縮性変化をもたらし、BBBを破綻させることを明らかにし、抗HMGB1抗体がBBB保護を介して脳内炎症反応ならびに神経障害を軽減することを強く示唆した。抗HMGB1抗体治療の治療有効時間帯が発症後4時間であることを示した。低侵襲動脈血管内バルーン

カテーテル法によりニホンザルを使って脳梗塞を作製した。

D. 考察

抗HMGB1抗体治療は、既存の血栓溶解薬やラジカルスカベンジャーとは作用機序の全く異なる新規BBB保護薬であることが示された。BBB保護とともに、炎症関連分子の発現抑制とミクログリア活性化抑制作用が加わることによって、強力な脳梗塞治療薬となることが強く示唆された。作製されたニホンザル脳梗塞モデルは、今後の研究に有用である。

E. 結論

抗HMGB1抗体は、既存薬とは作用機序の全く異なる、非常に優れた脳梗塞治療薬になりうる。

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

- 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): 13-9, 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Nishibori M, et al. Specific removal of monocytes from peripheral blood of patients by polymyxin b-immobilized filter column. *Acta Med Okayama*, 63:65-69, 2009.
 15. 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.
16. Wake H et al. Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 330:826-33, 2009.
 17. Liu R et al. Establishment of in vitro binding assay of high mobility group box-1 and S100A12 to receptor for advanced glycation endproducts: heparin's effect on binding. *Acta Med Okayama*, 63:203-11, 2009.
 18. Wake H et al. Histidine-rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin -induced angiogenesis in matrigel plug assay. *Eur J Pharmacol*, 623:89-95, 2009.
 19. Takahashi HK et al. Prostaglandins E2 inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression, cytokine production and lymphocyte proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 331:656-670, 2009.
 20. Wake H et al. High mobility group box 1 complexed with heparin induced Angiogenesis in a matrigel plug assay. *Acta Med Okayama*, 63:249-62, 2009.
 21. 森 秀治, 西堀正洋, 抗体医薬が切り拓く先端医療, *薬学雑誌*, 129(1):1-2, 2009.
 22. 西堀正洋, 高橋英夫, 森 秀治, High Mobility Group Box-1 を治療標的とする脳梗塞治療, *日薬理誌*, 134:271-275, 2009.
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, 2011.
 2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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. 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.
2. 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. 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.
4. 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.
5. 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.
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.
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.
8. 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.
9. 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.
10. 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. 抗 HMGB1 抗体による脳梗塞治療. 第 84 回日本薬理学会年会シンポジウム, 横浜, 2011.
11. 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 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-ヘパリン複合体は VEGF-A の発現を介して血管新生を誘導する. 第 84 回日本薬理学会年会, 神奈川, 2011.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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, 招待特別講演, 岡山, 2010.
24. 西堀正洋. 今なぜ「分子標的薬」なのか? 第 130 年会日本薬学会シンポジウム, 岡山, 2010.
25. 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.
26. 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.
27. 西堀正洋. 脳虚血急性期の BBB 破綻と抗 HMGB1 抗体による脳梗塞治療. 第 6 回次世代バイオマーカー研究会, 講演, 岡山, 2010.
28. 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.
29. 張継勇, 劉克約, 和氣秀徳, 高橋英夫, 森秀治, 大塚愛二, 西堀正洋. Early translocation and release of HMGB1 in ischemic brain in rats . 第 115 回日本薬理学会近畿部会, 金沢, 2009.
30. 西堀正洋. HMGB1 を標的とした抗体医薬による脳梗塞の新規治療法. 第 8 回国際バイオフィォーラム, 東京, 2009.
31. 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. 脳虚血時における HMGB1 動態の初期変化. 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 2009.
32. 高橋英夫, 森秀治, 劉克約, 和氣秀徳, 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ヒスタミンの効果—続報—. 第 13 回日本ヒスタミン学会, 仙台, 2009.
33. 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. 抗体医薬による脳血管疾患治療と創薬プラットフォーム構築. 第 37 回薬物活性シンポジウム, 仙台, 2009.
34. 和氣秀徳, 森秀治, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋. HMGB1 はヘパリン依存的に血管新生を誘導する. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.
35. 高橋英夫, 森秀治, 劉克約, 和氣秀徳, 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 116 回日本薬理学会近畿部会, 大津, 2009.
36. 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. Establishment of in vitro binding assay of HMGB1 and S100A12 to RAGE: heparin's effect on the binding. 第 116 回日本薬理学会近畿部会, 大津, 2009.
37. 出石恭久, 和氣秀徳, 劉克約, 森秀治, 高橋英夫, 西堀正洋. 肺における Receptor for advanced glycation end products の存在様式の検討. 第 116 回日本薬理学会近畿部会, 大津, 2009.
- 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 No.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, 西堀正洋他.

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

粥状動脈硬化症モデルと
ヒト末梢動脈疾患に関する研究

研究分担者 榎野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
伊達 勲 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
大塚 愛二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
吉野 正 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

ヒト末梢動脈疾患(Peripheral arterial disease, PAD) 患者の血中 HMGB1 を測定し、疾患重篤度の評価マーカーとしての可能性を検討した。81名の患者について測定を実施し、血中 HMGB1 が、フィブリノーゲン、ABI などの疾患重篤度の指標と相関することを明らかにした。以上の結果から、血中 HMGB1 が新規の末梢動脈疾患のマーカーとなり得ることが明らかにされた。

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。本研究では、動脈硬化巣炎症における HMGB1 の役割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。

B. 研究方法

1. 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、400 µg の用量を週2回静脈内投与した。

2. Fontain 分類で層化された Peripheral Artery Disease (PAD)患者を対象として血漿中の HMGB1 を測定した。患者の末梢血液を肘静脈より採血した。血球と血漿を分離後、血漿中の HMGB1 と他の因子の測定を行った。個別の患者において、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 等の問診あるいは測定を実施した。HMGB1 の測定は、Sino test の Elisa を用い、製造者の指示するプロトコールに従って測定した。

C. 研究結果

ApoE ノックアウトマウスに高脂肪食負荷して作製したアテローム動脈硬化巣の形成に対し、抗 HMGB1 抗体の投与が硬化巣の縮小をもたらし、硬化巣における炎症応答を抑制することが明らかになった。また、ヒト動脈硬化巣局所では、HMGB1 蛋白質が高発現していることを見出した。

測定された健常人の血中 HMGB1 レベル（平均値 4.6ng/ml）に対し、Fontain I/II（平均値 8.9ng/ml）あるいは Fontain III/IV（平均値 19.5ng/ml）の患者グループでは、有意に高いレベルを示した。また、Fontain I/II グループと Fontain III/IV グループ間にも有意差が認められ、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。

D. 考察

ApoE ノットアウトマウスに高脂肪食を負荷し作成された動脈硬化症では、動脈硬化巣局所に HMGB1 が高発現していた。抗体投与の効果から、局所炎症の形成に HMGB1 が重要な役割を果たすことが、強く示唆された。血管炎症局所での HMGB1 高発現は、局所における産生の亢進と血中 HMGB1 の取り込み亢進が可能性として挙げられる。

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因子である。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。

E. 結論

動脈硬化症の局所炎症において HMGB1 が重要な役割を果たす。血中 HMGB1 はヒト 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明らかにされた。

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, Wake H, Liu K, Yoshino T, Ohashi K, Tanaka N, Shikata K, Makino H, and Nishibori M. 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.
- ② 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.

- ③ 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.
- ④ 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.
- ⑤ 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.
- ⑤ Ozawa et al., Increased plasma levels of high mobility group box 1 protein in patient with peripheral artery disease (submitted).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① WIPO 出願 PCT/JP2010/066683, アテローム動脈硬化抑制剤, 西堀正洋他.