

脳血管攣縮と脳外傷モデルに関する研究

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

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

クモ膜下出血後の脳血管攣縮は、脳外科領域における未解決の重要課題である。ウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルを使い、抗 HMGB1 抗体による治療が著効することを見出した。ラット脳への Fluid percussion による脳外傷モデルを確立した。受傷局所の神経細胞内における細胞核から細胞質、細胞外への HMGB1 の移行を明らかにした。抗 HMGB1 単クローン抗体の投与が、脳血管の透過性亢進、炎症関連分子の発現、BBB の構造破綻を何れも抑制することを明らかにした。抗 HMGB1 単クローン抗体は、運動麻痺を中心とする神経症状も強く抑制した。抗体投与の効果は用量依存的で、受傷後 3 時間の時点でも投与で有意の効果が得られた。脳外傷は抗 HMGB1 抗体のよい適応症になる。

A. 研究目的

クモ膜下出血後の脳血管攣縮は、脳外科領域における未解決の重要課題である。本研究では、ラットの脳梗塞モデルにおいて著効を示した HMGB1 を標的とする抗体療法をウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルに応用し、その効果の評価と作用機序解析を行った。

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。血液脳関門の破綻は、脳外傷後にも認められることから、脳虚血時と同様の HMGB1 トランスロケーションが脳外傷後に生じるかどうか、もし生じていた場合には、脳外傷後の急性脳腫脹に対し抗 HMGB1 抗体治療が有効であるかどうかを調べるのが非常に重要な課題になる。なぜなら、21 世紀の今日まで脳外傷後の急性脳腫脹に有効な薬物治療はいまだ開発されていないからである。

B. 研究方法

1. 体重 3-3.5 kg のニュージーランド白色雄性ウサギを実験に用いた。ウサギのクモ膜下出血は、大槽から 1 ml の髄液を抜いた後、3 ml の自己血を大槽内に注入することによって作製した（下表）。クモ膜下出血作製

5-7 日前に脳血管造影を行い、クモ膜下出血作製 3 日後に再度脳血管造影を実施し、脳底動脈 9 箇所における血管収縮率を X 線画像から算出した。抗 HMGB1 抗体あるいは対照の抗 *Keyhole limpet hemocyanin* 抗体は、クモ膜下出血作製後 1 時間と 2.5 時間の時点で各 2 mg 投与した。

2. 9-11 週齢、250-300g の Wistar 系雄性ラットを用い、GOI 全身麻酔下に Lateral Fluid-Percussion Injury の手法で頭部外傷モデルを作成した。受傷後 5 分後、6 時間後に、抗 HMGB1 抗体、対照抗体をそれぞれ尾静脈から投与した。受傷後 3 時間後、6 時間後、24 時間後に、rotarod test、シリンダーテストにて行動学的評価を行った。EB の漏出から Blood-brain barrier (BBB) permeability を検討した。また、血清 HMGB1 濃度を ELISA 法により検討した。更に、受傷側・対側の脳半球から蛋白、mRNA をそれぞれ抽出し、HMGB1 量を Western blotting 法で、Matrix metalloproteinase を Zymography 法で、炎症関連分子の mRNA 量を real time PCR 法で、それぞれ測定した。また、3 時間後、6 時間後、24 時間後にラットを還流固定の上、

脳パラフィン切片を作製し、hematoxylin-eosin (H.E.)染色、Nissl染色、抗HMGB1抗体・抗MAP2抗体を用いた2重免疫染色を実施した。

C. 研究結果

ウサギのクモ膜下出血モデルで、出血後3日目に対照群の脳底動脈において収縮率約40%の血管攣縮を再現性よく誘導できた。無処置のウサギでも収縮率は約40%であったことから、対照抗体には薬理作用は認められないと結論された。一方、抗HMGB1抗体投与群では、血管収縮率は19%に留まっていたことから、抗HMGB1抗体には、血管攣縮抑制効果があることがわかった。

露出したラット脳硬膜上からの2.2~2.6気圧の液体噴射によって中等度の麻痺症状を誘導できる脳外傷モデルを作製した。局所の神経細胞では神経核から細胞質領域HMGB1の移行が認められた。一定時間後には、血漿HMGB1レベルが上昇することがわかった。以上の結果から脳外傷時のHMGB1トランスロケーションは、脳虚血時のものと極めて似通っていることがわかった。

抗HMGB1抗体投与群において、ロタロッドテストとシリンダーテストで有意な行動学的改善を認めた。また、脳実質内へのエバンスブルー漏出量が著明に抑制された。組織染色では、有意なnecrotic cellの減少を、免疫染色では、HMGB1の細胞外移動の抑制をそれぞれ認めた。

Zymography法によるMMP-2/9の活性測定では、対照動物の傷害側に強い活性誘導を観察したが、抗HMGB1抗体投与によって著明に抑制された。定量的PCR法では、抗HMGB1抗体投与は特に、TNF- α 、iNOS、PAI-1、IL-8Rの発現誘導を抑制した。

D. 考察

抗HMGB1抗体治療法は、ウサギのクモ膜下出血後の血管攣縮モデルにおいて、極めて優れた効果を発揮した。薬物投与法はクモ膜下出血後の静脈内投与であり、ヒト臨床における応用において無理のない投与法である。したがって、本抗体治療法は新しい脳血管攣縮治療薬として有望であると結論できる。

TBIモデルにおいて、抗HMGB1抗体投与は炎症性反応の惹起を抑え、BBBの構造・機

能維持や神経細胞死への誘導を抑え、機能予後を改善させることが示された。今後前臨床研究やHMGB1の頭部外傷に関するメカニズムを含めた更なる検討は必要であるが、抗HMGB1抗体は頭部外傷に対する新しい治療法として極めて有望な治療法である。

E. 結論

抗HMGB1抗体は、BBBの維持と炎症関連分子の発現抑制に働くことによって脳血管攣縮、脳の外傷性障害ならびに脳後遺症への進展を防止できる新規機序の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 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 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*. 42: 1420-1428, 2011.
- ③ Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Otani N, Tamura S, Shima K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M. Anti-HMGB1 monoclonal antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol.*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① 特願 2010-270133, 外傷性神経障害治療剤, 西堀正洋他.

研究分担者 吉野 正 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
松川 昭博 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

抗 HMGB1 抗体 (#10-22) のラットへの急性単回投与、並びに反復投与後の急性毒性試験を実施し、抗体の安全性についての評価を行った。その結果、薬用量の約 5 倍量 (10 mg/kg 体重) の急性単回投与は、脳、心臓、肺、肝臓、胃、小腸、大腸、腎臓、脾臓の何れの臓器においても病理学的に明らかな変化を生じなかった。0.75, 1.5, 3.0 mg/kg の 3 つの用量の連続 6 日間投与後の血液生化学、血球細胞、組織病理、行動薬理学的解析と全身 47 組織の病理学的検討で異常所見はなかった。抗 HMGB1 抗体は、急性投与の範囲で安全に使用できる薬物であると考えられる。

A. 研究目的

抗体医薬を治療薬として開発するには、有効性の確立とならんで通常の低分子薬物と同様の薬物の安全性に関する試験が重要である。そこで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 倍量の単回投与による急性毒性試験と、異なった投与用量の 6 日間反復投与による毒性試験を実施する。これらの試験によって、ヒト治療薬としての開発に向けての基本情報を得る。

B. 研究方法

1. SD 系雄性ラットの尾静脈から 10 mg/kg 体重の用量で抗 HMGB1 単クローン抗体と、対照抗体として抗 *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH) 抗体を 2 回に分けて投与する。投与 7 日後ペントバルビタールナトリウムによる深麻酔下に心臓よりホルマリン灌流し、全身臓器を固定する。パラフィン包埋ブロックを作製した後、薄切切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、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する。

2. ラットに、抗 HMGB1 ラット単クローン抗体 (#10-22, IgG2a サブクラス) を 0, 0.75, 1.5, 3.0 mg/kg の用量で 6 日間連続静脈内投与した。対照として抗 *Keyhole limpet hemocyanin* 抗体 (IgG2a) を 3.0 mg/kg の

用量で同様に投与した。抗体投与ラットの一般状態、体重変化、食餌摂取量を 1 週間チェックし、7 日目に血球細胞、血液生化学、尿検査を実施し、さらにホルマリン固定標本について、全身 47 組織臓器の組織所見を検討する。

C. 研究結果

抗 HMGB1 ラット単クローン抗体 (#10-22) を 10 mg/kg の用量で SD 系雄性ラットに投与したのち、一般状態と体重変化を調べたが対照群と差はなかった。病理学的検査においても、肉眼的異常器官および組織は認められなかった。さらに、脳(大脳皮質、線条体、海馬)、心臓、肺、肝臓、胃、小腸、大腸、腎臓の各臓器では、ヘマトキシリン-エオジンによる組織染色切片の顕微鏡観察で、対照群と抗 HMGB1 抗体投与群の間に差は認められず、病的変化もなかった。

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。

D. 考察

抗 HMGB1 単クローン抗体の 10mg/kg あるいは 0.75, 1.5, 3.0 mg/kg の6日間連続静脈内投与は、調べられた評価項目の何れにおいても対照抗体投与群との間に差はなく、またすべての測定値は正常範囲内にあったことから、急性投与において有害作用を生じることとはなかったと結論できる。

E. 結論

抗 HMGB1 抗体の急性投与は、調べられた用量範囲で有害作用なく安全に使用できる投与方法であると結論できる。

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

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

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

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

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

3種類のラット抗 HMGB1 単クローン抗体のエピトープを同定し、抗原親和性を表面プラズモン共鳴法で決定した。ラット単クローン抗体（#10-22）を治療抗体として選択し、脳梗塞、アテローム動脈硬化症、脳外傷治療用抗体として大量産生・精製系を確立した。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。

A. 研究目的

現有の3種類のラット単クローン抗体の特徴を明らかにし、治療抗体を選択する。治療抗体の大量培養・精製系を確立する。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し、陽性クローンを得る。

B. 研究方法

1. 人工合成した15アミノ酸残基長のペプチドを用いて、3つの単クローン抗体のエピトープを決定した。表面プラズモン共鳴法でそれぞれの抗体の親和性を測定した。
2. 抗 HMGB1 ラット単クローン抗体（#10-22）を、ハイブリドーマ細胞の回転培養、培地から抗体の MepHypercell による精製で大量産生・精製系を確立した。
3. 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 36 名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した。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した。

一定の基準を満たす陽性クローンを得た。

C. 研究結果

抗 HMGB1 単クローン抗体の中でクローン（#10-22）が最も抗原親和性が高かった。また C 末端エピトープから HMGB 2 との交差反応性はないと予想され、治療抗体として選択した。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 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。

E. 結論

ラット単クローン抗体 (#10-22) は、HMGB1 特異的な抗体である。抗 HMGB1 ラット単クローン抗体 (#10-22) の供給体制は整備された。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 細胞を得ることはきわめて難しい。

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): 13-9, 2011.
7. 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.
8. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得.
 - ① 特願 2010-270133, 外傷性神経障害治療剤, 西堀正洋他.
 - ② アメリカ合衆国出願 No.12/654790, 脳浮腫抑制剤, 西堀正洋他.
 - ③ 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

⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体の作製と生体内動態解析

研究分担者 榎本 秀一 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
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

抗 HMGB1 ラット単クローン抗体(#10-22)を抗原結合性を 60 %保持した状態で、DOTA 修飾することに成功した。さらに ⁶⁴Cu を DOTA に結合させた後、ゲル濾過により標識抗体のみを分離し、生体内動態解析のための Positron Emission Tomography (PET) 用プローブとした。この標識抗体と対照抗体を中大脳動脈閉塞・再灌流 (MCAO) モデルラット尾静脈から投与し、生体内分布・動態について評価を行った。

A. 研究目的

抗 HMGB1 ラット単クローン抗体 (#10-22) のビオチン標識化を試みたが、この標識体は抗原結合性を完全に消失することがで明らかとなった。そこで、抗体の標識法として新規に 1,4,7,10- tetraazacyclododecane-*N,N,N',N''*- tetraacetic acid (DOTA) を用いた。修飾抗体の抗原結合性について評価した後、⁶⁴Cu-DOTA 標識を行い、生体内動態解析用 PET プローブとする。ラット MCAO モデルに標識抗体を尾静脈投与し、抗体の脳内移行を含む生体内動態についてのデータを得る。

B. 研究方法

1. DOTA 修飾条件の検討

抗 HMGB1 ラット単クローン抗体 (#10-22) の 1,4,7,10- tetraazacyclododecane-*N,N,N',N''*-tetraacetic acid (DOTA) 修飾条件を、反応基質比、その

他について検討する。

2. 修飾抗体の抗原結合性の評価

作製された修飾抗体の抗原結合性を、組換え体ヒト HMGB1 固相化プレートを用いて評価する。修飾前の抗体結合量との比較で抗

原結合性を評価する。

3. ⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体の作製と分離

サイクロトロンで作製された ⁶⁴Cu を上述の DOTA 修飾抗体と反応させ、⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体を得る。フリーの ⁶⁴Cu を分離するため、ゲル濾過カラムで ⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体の分離を行う。

4. MCAO ラットへの ⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体の投与と PET 撮像

治療用抗体の投与方法と同じ静脈内投与で ⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体を投与し、一定時間後に PET 撮像する。

5. 脱血後脳切片のオートラジオグラフィー

血管内に残る血中 ⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体を脱血と灌流により除いた後、脳スライスを作製し、オートラジオグラフィーを実施する。

C. 研究結果

抗原結合能を 60 % 維持した DOTA 修飾条件を得ることができた。⁶⁴Cu-DOTA 標識抗体をゲル濾過カラムを用いてフリーの ⁶⁴Cu から分離することができた。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ーでは逆に、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

ビオチン標識体とは異なり、抗原結合性を60%保持する今回作製された ^{64}Cu -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。血中動態の解析は、次年度に計画されている。

E. 結論

PET 解析の使用に耐える ^{64}Cu -DOTA 標識抗 HMGB1 抗体を得ることができた。

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

該当なし

2. 学会発表

1. 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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

6. 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.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Takahashi HK., et al.	β_2 -adrenoceptor stimulation inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells.	<i>Eur J Pharmacol</i>	627	313-317	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohashi K., et al.	Advanced glycation end products enhance monocyte activation during human mixed lymphocyte reaction.	<i>Clin Immunol</i>	134	345-353	2010
Takahashi HK., et al.	Effect of nicotine on advanced glycation end product-induced immune response in human monocytes.	<i>J Pharmacol Exp Ther</i>	332	1013-1021	2010
Takahashi HK., et al.	Prostaglandin E2 inhibits advanced glycation end product-induced adhesion molecule expression on monocytes, cytokine production, and lymphocyte proliferation during human mixed lymphocyte reaction.	<i>J Pharmacol Exp Ther</i>	334	964-972	2010
Zhang J., et al.	Histamine inhibits adhesion molecule expression in human monocytes, induced by advanced glycation end products, during the mixed lymphocyte reaction.	<i>Br J Pharmacol</i>	160	1378-1386	2010
Mori S., et al.	Ciprofloxacin inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes.	<i>Br J Pharmacol</i>	161	229-240	2010
Nishibori M., et al.	Specific removal of monocytes from peripheral blood of septic patients by polymyxin b-immobilized filter column.	<i>Acta Med Okayama</i>	63(1)	65-69	2009
Takahashi HK., et al.	Advanced glycation end products subspecies-selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells.	<i>J Pharmacol Exp Ther</i>	330(1)	89-98	2009
Wake H., et al.	Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes.	<i>J Pharmacol Exp Ther</i>	330(3)	826-833	2009
Liu R., et al.	Establishment of in vitro binding assay of high mobility group box-1 and S10A12 to receptor for advanced glycation endproducts: heparin's effect on binding.	<i>Acta Med Okayama</i>	63(4)	203-211	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wake H., et al.	Histidine-rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin-induced angiogenesis in matrigel plug assay.	<i>Eur J Pharmacol</i>	623	89-95	2009
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.	<i>J Pharmacol Exp Ther</i>	331(2)	656-670	2009
Wake H., et al.	High mobility group box 1 complexed with heparin induced angiogenesis in a matrigel plug assay.	<i>Acta Med Okayama</i>	63(5)	249-262	2009
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
西堀正洋, 高橋英夫, 森秀治	High Mobility Group Box-1を治療標的する脳梗塞治療	日本薬理学会雑誌	134	271-275	2009
西堀正洋	「抗体医薬による脳梗塞の新規治療法」の発明	発明 THE INVENTION	107(5)	28-30	2010
西堀正洋	「抗体医薬による脳梗塞の新規治療法」の発明	全国発明表彰受賞者功績概要		54-55	2009

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

新聞等掲載記事

- 平成 21 年 11 月 20 日 山陽新聞朝刊
「独自開発の脳梗塞治療薬 動脈硬化予防に効果」
- 平成 21 年 12 月 9 日 毎日新聞朝刊
「動脈硬化リスクの抑制へ 治療法、マウスで確認」
- 平成 24 年 2 月 27 日 日本経済新聞朝刊
「脳血管の収縮率半減 くも膜下出血で新薬候補」
- 平成 24 年 4 月 18 日 読売新聞朝刊
「岡大、脳浮腫仕組み解明」
- 平成 24 年 4 月 18 日 日本経済新聞 WEB 版
「急性脳浮腫、抗体作り抑制に成功 岡山大」
- 平成 24 年 4 月 21 日 山陽新聞朝刊
「独自開発抗体薬 脳の腫れ抑制」
- 平成 24 年 5 月 14 日 朝日新聞朝刊
「脳の腫れ抑える薬 根本治療の可能性」

研究成果の刊行物・別刷

Nature Medicine (in press)

Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain

Takashi Shichita^{1,2,3}, Eiichi Hasegawa¹, Akihiro Kimura¹, Rimpei Morita¹, Ryota Sakaguchi¹, Ichiro Takada¹, Takashi Sekiya¹, Hiroaki Ooboshi⁴, Takanari Kitazono³, Toru Yanagawa⁵, Tetsuro Ishii⁵, Hideo Takahashi⁶, Shuji Mori⁶, Masahiro Nishibori⁶, Kazumichi Kuroda⁷, Kensuke Miyake⁸, Shizuo Akira⁹, and Akihiko Yoshimura^{1,10}

¹Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan; ²Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan; ³Department of Medicine and Clinical Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan; ⁴Department of Internal Medicine, Fukuoka Dental College Medical and Dental Hospital, Fukuoka 814-0193, Japan; ⁵Majors of Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8575, Japan; ⁶Department of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Okayama 700-8558, Japan; ⁷Division of Microbiology, Nihon University, School of Medicine, Tokyo 173-8610, Japan; ⁸Division of Infectious Genetics, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan; ⁹Laboratory of Host Defense, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan; ¹⁰Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

Corresponding author: Akihiko Yoshimura, PhD

Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of
Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Tel: +81-3-5363-3483

Fax: +81-3-5360-1508

Email address: yoshimura@a6.keio.jp

Running title: Extracellular peroxiredoxins trigger post-ischemic inflammatory
response in the brain

Summary

Post-ischemic inflammation is an essential step in the progression of brain ischemia-reperfusion (I/R) injury. However, the mechanism that activates infiltrating macrophages in the ischemic brain remains to be clarified. Here, we demonstrated that peroxiredoxin (Prx) family proteins released extracellularly from necrotic brain cells function as potent inducers of inflammatory cytokines, including interleukin-23 from macrophages, through TLR2 and TLR4, thereby promoting neural cell death, although intracellular Prxs have been shown to be neuroprotective. The extracellular release of Prx in the ischemic core occurred 12 hours after stroke onset, and neutralization of extracellular Prxs with antibodies effectively suppressed inflammatory cytokine expression and infarct volume growth. In contrast, HMGB1, a well-known damage-associated molecular pattern molecule, was released prior to Prx and played a limited role in post-ischemic macrophage activation. We thus propose that extracellular Prx is a novel danger signal in the ischemic brain and that its blocking agents are potent neuroprotective tools.

150 words

Introduction

Stroke is one of the major causes of death and disability worldwide. The only US Food and Drug Administration (FDA)-approved treatment is tissue plasminogen activator (tPA), a time-dependent therapy that must be given within 4.5 hours of stroke onset. Consequently, there is an unmet need for therapy that could be commenced beyond this time window and that would be aimed at protection rather than clot dissolution¹⁻³.

Post-ischemic inflammation and the infiltration of immune cells are essential for the progression of ischemic brain injury. Recent evidence suggests that various elements of the immune system are intimately involved in all stages of the ischemic cascade, from the acute intravascular events triggered by the interruption of the blood supply to the parenchymal processes leading to brain damage and the ensuing tissue repair⁴⁻⁶. Therefore, the immune system is closely involved in determining the fate of the ischemic brain and the recovery of patients after stroke.

T cells and macrophages infiltrate into the ischemic brain 24 hours after reperfusion and play a pivotal role in the immunomodulation of post-ischemic inflammation in the delayed phase of brain ischemia⁷⁻¹⁰. IL-23 is produced from infiltrating macrophages and induces IL-17-producing T cells. IL-17 is mainly produced from $\gamma\delta$ T cells and promotes delayed ischemic brain damage by promoting neuronal death and the production of inflammatory cytokines on day 3–4^{11,12}.

Despite of intensive study of the inflammatory processes after ischemic brain injury, it remains unknown what kinds of molecules directly activate infiltrating macrophages in the ischemic brain. Toll-like receptors (TLRs) have been implicated as triggers of brain inflammation because mice lacking TLR2 or TLR4 exhibited reduced ischemic brain injury^{13,14}. High mobility group box 1

(HMGB1) protein, heat shock proteins (HSPs), β -amyloid (A β), and others have been reported to be endogenous ligands for TLR and to function as damage-associated molecular patterns (DAMPs)¹⁵⁻¹⁹. Although HMGB1 has been shown to be involved in ischemic brain damage, the extracellular release of HMGB1 decreases in the ischemic core immediately, that is, by 6 hours after onset²⁰. It has not been clarified whether HMGB1 is the major DAMP involved in the activation of infiltrating immune cells or whether other local DAMPs play roles in this process^{6,21-23}. In addition, the triggers for IL-23 production from infiltrating macrophages remain to be determined.

In this study, we identified peroxiredoxin (Prx) family proteins in the brain lysate as a strong inducer of inflammatory cytokines. Prx family proteins had a common α 3-helix region that intensely stimulates TLR2 and TLR4. In a murine brain ischemia model, ischemic stress induced the expression of Prx inside brain cells (intracellular Prx), which has been shown to be neuroprotective, but Prx was also released from necrotic cells into the extracellular compartment, where it functions as a danger signal via TLR2/4. The extracellular release of Prx occurred 12 hours after stroke onset, which coincided with the timing of macrophage infiltration. Neutralization of Prx proteins rather than HMGB1 by specific antibodies resulted in the suppression of inflammatory cytokine expression in the infiltrating immune cells and reduced infarct volume in a TLR2/4-dependent manner. Thus extracellular Prx could be a novel DAMP involved in postischemic inflammation and an ideal therapeutic target for brain ischemia injury.

Results

Peroxi-redoxins are potent IL-23 inducers in the brain lysate

To identify the DAMPs in the brain that are involved in IL-23 induction, bone

marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were cultured with a brain homogenate supernatant (brain lysate) and mRNA expression levels of inflammatory cytokines in BMDCs were measured. The mRNAs of IL-23p19 as well as those of other inflammatory cytokines were rapidly induced in BMDCs by the brain lysate (**Fig.1a** for IL-23p19 **and Supplementary Fig.1** for IL-12p35, TNF- α and IL-1 β). IL-23p19-inducing activity was detected in both ischemic and sham-operated brain lysates, suggesting that IL-23 inducers were released by the homogenization process of the brain tissue. IL-23p19 mRNA induction in BMDCs was dependent on MyD88 both *in vitro* and *in vivo*, since IL-23 mRNA induction was disappeared in MyD88-deficient BMDC (**Fig.1a**), as it did in the infiltrating immune cells in the ischemic brains of MyD88-deficient mice (**Supplementary Fig.2**). These results suggest that IL-23p19 expression was induced by DAMPs released from destroyed brain tissue in a TLR-dependent manner.

Next, we tried to identify the DAMPs in the brain lysate. The IL-23-inducing DAMPs must be proteins, given that IL-23p19-inducing activity was almost completely diminished by heat or pronase treatment (**Fig.1b**). Fractionation of the brain lysate revealed that IL-23p19-inducing activity was present in the cytosolic fraction, that the protein in question did not bind to the DEAE-Sepharose column, and that its molecular weight was over 10 kDa (**Supplementary Fig.3a,b**). After sucrose density gradient centrifugation, we found that fractions No. 2 and No. 3 contained high IL-23p19-inducing activity (**Fig.1c**). SDS-PAGE revealed that fractions No. 2 and No. 3 contained mostly 15-25 kDa protein (**Supplementary Fig.4**). Further analysis by LC/MS identified more than 15 proteins that appeared more often in the No. 2 and No. 3 fractions than in the No. 1 and No. 4 fractions (**Supplementary Table 1**). Then we generated their recombinant glutathione-S-transferase (GST)-fusion proteins in

bacteria (**Fig.1d**). After extensive washing and filtration through a polymyxin B sepharose column, almost no IL-23p19 mRNA-inducing activity was detected in GST alone or in several GST-fusion protein preparations (**Fig.1d**). We found that peroxiredoxins (Prxs) 5 and 6 had potent IL-23p19-inducing activity compared to HMGB1 (**Fig.1d**).

Characterization of Prx family proteins as IL-23 inducers

Based on these observations, and also because it has been reported that Prx1 has the potential to induce inflammatory cytokines in macrophages via TLR4²⁴, we decided to investigate whether Prx family proteins contribute to IL-23 production in brain lysates. First, we generated specific antibodies to Prx1/2, Prx5, and Prx6 by immunizing rabbit with recombinant proteins. Our anti-Prx1 antibody could be used to detect Prx2 because of the high homology between Prx1 and Prx2, as described in a previous report²⁵ (**Supplementary Fig.5**). Through Western blotting analysis, we confirmed that Prx5 and Prx6 were included most abundantly in the No. 2 and No. 3 sucrose gradient fractions (**Fig.1e**). Although Prx1 and Prx2 were broadly distributed in sucrose gradient fractions, they were also detected in fractions No. 2 and No. 3. The highest incidence of HMGB-1 on the sucrose density gradient was seen in fraction No. 4. HSP90 was mostly included in the No. 9 fraction. HSP60 and HSP70 were not detected. These data suggest that Prx5 and Prx6 and, to a lesser degree, Prx1/2 contributed to IL-23 induction in fractions No. 2 and No. 3.

Then, we characterized the inflammatory cytokine-inducing activity of GST-free cleaved recombinant Prx1, 2, 5, and 6. Among these Prxs, recombinant Prx5 had the greatest IL-23-inducing activity (**Fig.1f,g**). Prx5 was also the strongest inducer of several other inflammatory cytokines in BMDC (**Fig.1f**). However, other Prx family proteins could have the potential to stimulate IL-23 production in