

外傷性脳傷害に対する抗 HMGB-1 抗体治療

大熊 佑,^{*,a,b,c} 伊達 勲,^b 西堀 正洋^a

Anti-high Mobility Group Box-1 Antibody Therapy for Traumatic Brain Injury

Yu Okuma,^{*,a,b,c} Isao Date,^b and Masahiro Nishibori^a

^aDepartment of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences; ^bDepartment of Neurological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences; 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan; and ^cDepartment of Neurological Surgery, Hiroshima City Hospital; 7-33 Moto-machi, Naka-ku, Hiroshima 730-8518, Japan.

(Received December 1, 2013)

Traumatic brain injury (TBI) is one of the major causes of death and aftereffects in young individuals worldwide; however, efficient therapies for TBI are lacking at present. High mobility group box-1 (HMGB-1), which is recognized as a representative of danger-associated molecular patterns (DAMPs), plays an important role in triggering inflammatory responses in many types of diseases. We presented the involvement of HMGB-1 in TBI and evaluated the ability of intravenously administered neutralizing anti-HMGB-1 monoclonal antibody (mAb) to attenuate brain injury. Anti-HMGB-1 mAb may provide a novel and effective therapy for TBI by protecting against blood brain barrier disruption and reducing the inflammatory responses induced by HMGB-1.

Key words—high mobility group box-1; secondary injury; traumatic brain injury

1. はじめに

先進国での若年層の死因の第一位は外傷であり、その中でも半数を占める頭部外傷は、後遺症も含め社会的損失が莫大である一方、治療法はいまだ確立されていない。¹⁻³⁾ われわれは、「脳内炎症」という新しい概念を導入し、生体組織・細胞由来の分子で、生体警告信号として機能する Damage associated molecular patterns の1つであり、脳虚血時の二次的損傷に関与する HMGB-1 に注目した。^{4,5)}

マウス敗血症時にマクロファージから放出される致死性メディエータとして発見された HMGB-1⁶⁾ は非ヒストンタンパクで、A-box, B-box, acid tail から構成されており、通常核内局在する。しかし、壊死により受動的に、あるいは炎症反応によりマクロ

ファージや単球から能動的に、細胞外に放出されると、RAGE あるいは TLR-2, 4 などの受容体と結合し、炎症性サイトカインとして働く (Fig. 1)。⁶⁻⁸⁾ われわれは、虚血後早期の脳内イベントとして神経細胞核に局在する high mobility group box-1 (HMGB-1) の細胞質から細胞外へと至る移動について明らかにするとともに、この HMGB-1 の acid tail を特異的に認識し、中和する抗 HMGB-1 単クローン (#10-22) 抗体を作製し、ラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおいて、脳梗塞領域を縮小させる効果を証明してきた。^{4,5)}

そこで、今回われわれはラット・マウス脳外傷 (traumatic brain injury; TBI) モデルを作製し、HMGB-1 の動態を探るとともに、抗 HMGB-1 抗体をラット・マウス TBI モデルに投与し、抗体の治療効果について検討した (Fig. 2)。

2. 脳外傷に対する抗 HMGB-1 単クローン抗体の効果

Wistar 系雄性ラットを用い、Fluid percussion による TBI モデルを作製した (Fig. 2)。⁹⁾ 受傷後、1) 抗 HMGB-1 抗体又は class-matched control 抗体を

The authors declare no conflict of interest.

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学, ^b岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経外科学 (〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1), ^c広島市立広島市民病院脳神経外科 (〒730-8518 広島市中区基町 7-33)

*e-mail: y8u2bear4@hotmail.com

本総説は、日本薬学会第 133 年会シンポジウム GS-1 で発表した内容を中心に記述したものである。

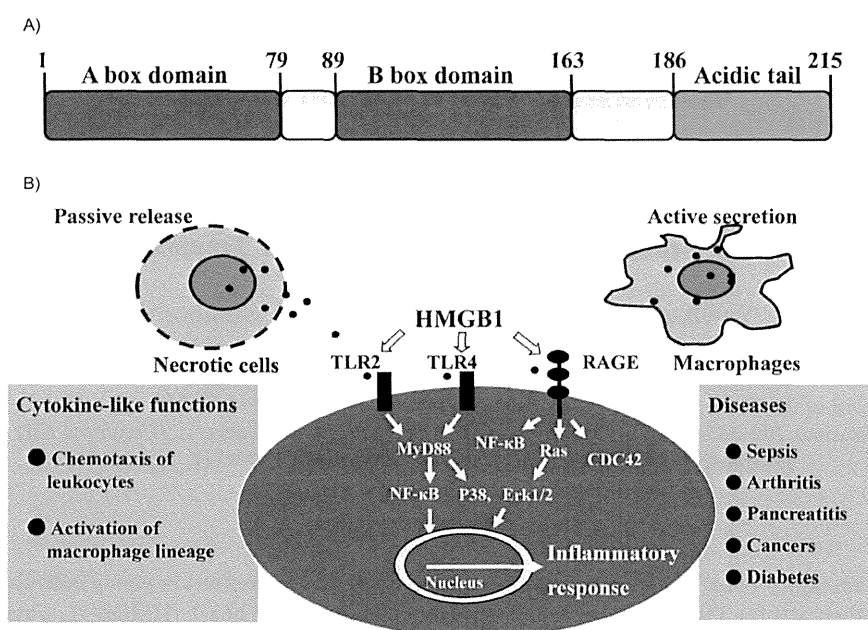


Fig. 1. A) The Structure of HMGB-1, and B) HMGB-1 Triggers the Inflammatory Response through the Activation of Multiple Receptors Such as the RAGE and Toll-like Receptor-4/2

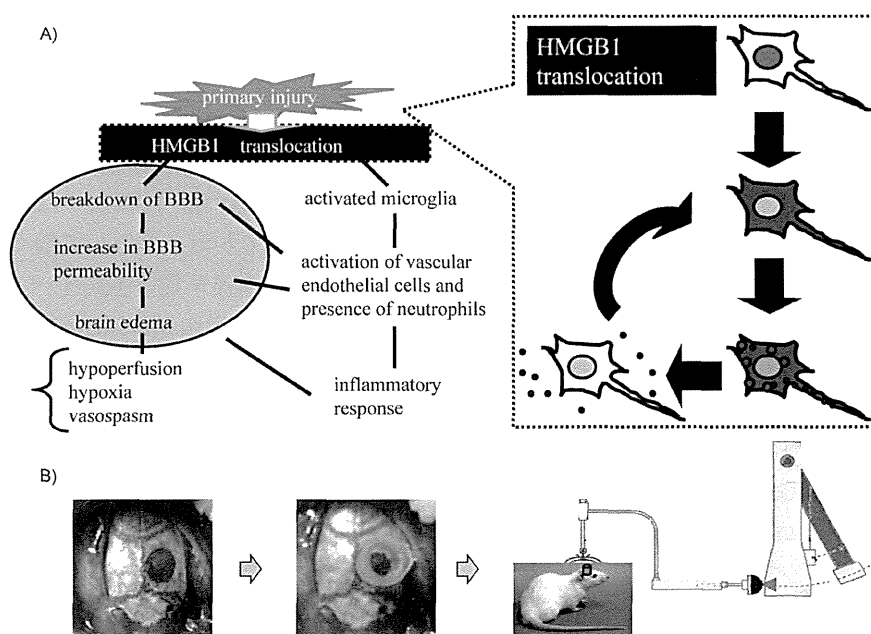


Fig. 2. A) The Translocation of HMGB-1 Appears to Be Phenomena Common to Both Brain Ischemia and TBI, and B) The Fluid Percussion Model

尾静脈から投与した。2) 組換え体 HMGB-1 又はアルブミンを投与した。さらに、C57BL/6J 系雄性マウス、同系統の RAGE, TLR2, TLR4 のノックアウトマウスを用い、Fluid percussion による TBI モデルを作製し、同様に検討した。

2-1. 抗 HMGB-1 抗体が HMGB-1 の translocation を抑制する 脳外傷の受傷部位である大脳皮質と海馬錐体細胞における神経細胞内 HMGB1 の translocation は、脳虚血障害の場合と酷似していた。また、受傷脳部位から HMGB-1 が消失し、神

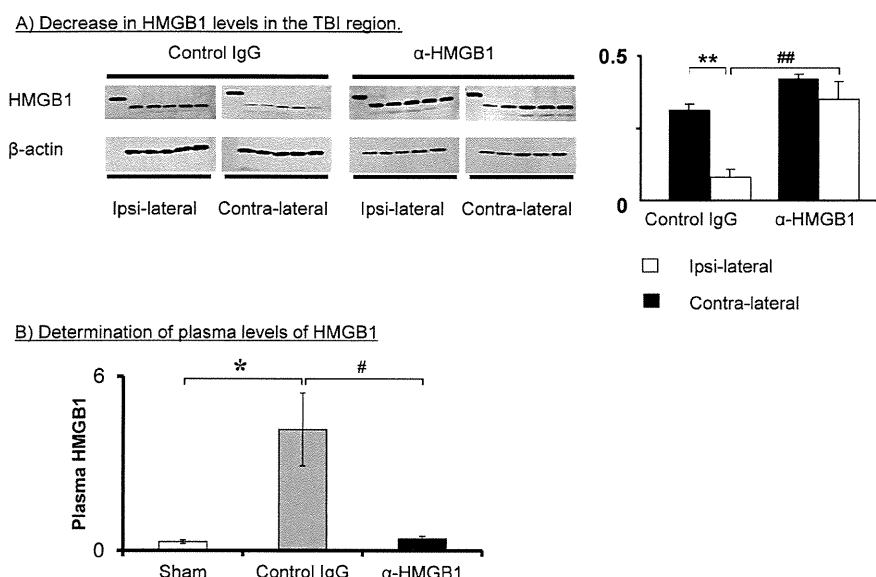


Fig. 3. Translocation of HMGB-1 in Neurons in the Traumatic Brain Injury Site and the Effects of Anti-HMGB-1 Monoclonal Antibody (mAb)¹⁾

A) ** $p < 0.01$ compared with contralateral side. * $p < 0.01$ compared with control rats. B) * $p < 0.05$ compared with noninjured rats (Sham). # $p < 0.05$ compared with control immunoglobulin G (IgG)-treated rats.

経から放出された HMGB-1 の一部は循環血中へ出て血中 HMGB-1 が上昇した。抗 HMGB-1 抗体の投与によってこの translocation そのものが強く抑制されることがわかった (Fig. 3)。

虚血性脳損傷においては、HMGB-1 の translocation が、炎症性反応の惹起、血液脳関門の構造的・機能的破綻、脳の浮腫形成といった二次的損傷を惹起する可能性が、われわれを含め、複数のグループから報告されている。¹⁰⁻¹³⁾ 本研究から、脳外傷の場合にも HMGB-1 によって駆動される同様の脳内炎症が存在するとわかった。

2-2. 抗 HMGB-1 抗体が神経細胞死や血液脳関門破綻、浮腫状変化を抑制する 尾静脈よりアルブミン結合性色素である Evans blue (EB) を投与し、血液脳関門の機能破綻を調べたところ、抗 HMGB-1 抗体投与により、9 割近く抑制された。また、電子顕微鏡により、血液脳関門の機能破綻を調べたところ、抗 HMGB-1 抗体投与により、血液脳関門の構成細胞の 1 つであるアストロサイトの終足部の浮腫状変化が抑制された (Fig. 4)。さらに 3T-MRI により T2 強調画像で脳の浮腫状変化を調べると、受傷後 3、6、24 時間後いずれにおいても、抗 HMGB-1 抗体投与により、受傷部位とその周囲における浮腫状変化は著明に抑制されていた

(Fig. 5)。結果、受傷部位周囲の神経細胞死を示す変化は、抗 HMGB-1 抗体投与により抑制された。

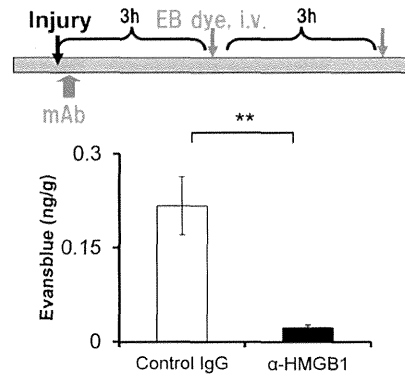
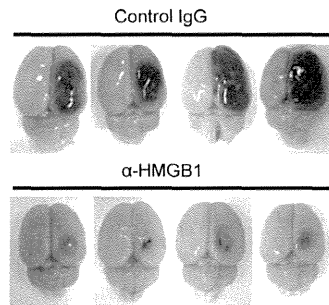
この結果を踏まえ、primary な神経損傷とともに、HMGB-1 の translocation が起こると、細胞外へ放出された HMGB-1 が血管内皮細胞、周皮細胞、ミクログリアに発現する RAGE の刺激を介し、炎症性反応が惹起され、血液脳関門が構造的にも機能的にも破綻する。その結果、脳が浮腫を起し、低酸素症の増悪からさらに HMGB-1 の translocation を引き起こし、二次的な損傷につながり、負のサイクルが回ると考えられた (Fig. 2)。

2-3. 抗 HMGB-1 抗体が運動的障害を抑制する

Rotarod テストにより、協調運動障害を評価したところ、抗 HMGB-1 抗体投与により、投与後 6 時間後以降は有意に機能改善を認めた。また実臨床に沿って、外傷後 3 時間後の TBI モデルに抗 HMGB-1 抗体を投与しても、機能予後は有意に改善した。

このことから、負のサイクルに伴って生じた更なる二次的損傷が、機能予後を悪化させるという流れが推測された。そして、抗 HMGB-1 抗体を投与することで、この二次的損傷の負のサイクルを断ち切ることににより、劇的な治療効果を得られた。¹⁾ さらに、特筆すべきは、受傷後 3 時間後投与においても、血液脳関門の機能に、また行動学的予後に、治

A) The permeability of brain capillary vessels was examined by intravenously injecting Evans blue



B) Transmission electron microscopic observation of capillary vessels

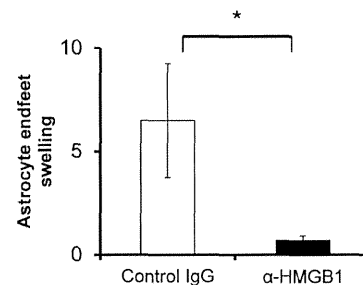
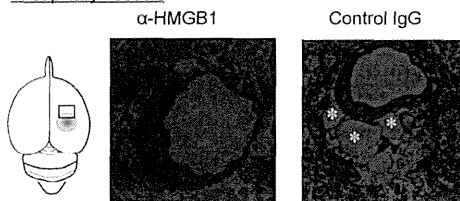
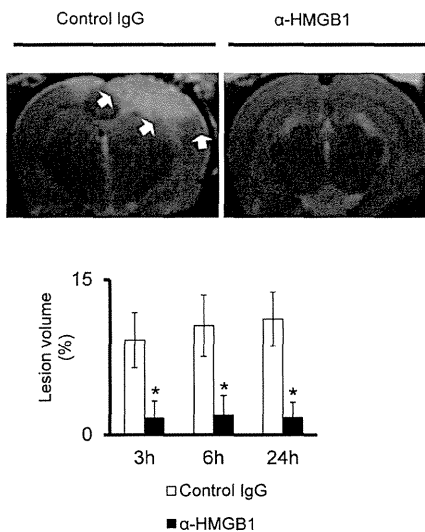


Fig. 4. Effect of Anti-HMGB-1 Monoclonal Antibody on Brain Lesion and Blood-Brain Barrier¹⁾

A) ** $p < 0.01$ compared with the control group. B) * $p < 0.05$ compared with the control.

A) 3T Magnetic Resonance Imaging Examination



B) TBI was induced in RAGE^{-/-}, TLR4^{-/-}, and TLR2^{-/-} mice and their wild type (WT)

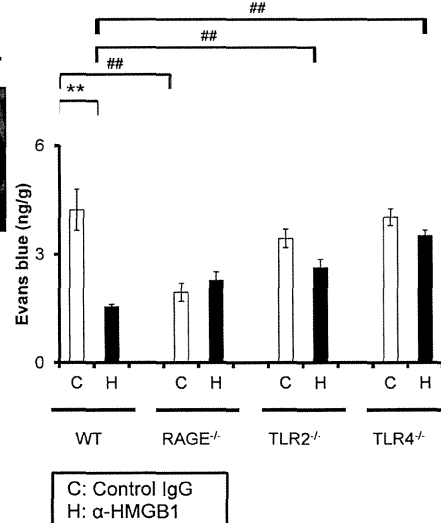


Fig. 5. Evaluation of Brain Edema by T2-weighted MRI and Evaluation of Receptor Involvement Using Gene Knockout Mice¹⁾

A) * $p < 0.01$ compared with the control group. B) ** $p < 0.01$ compared with control IgG-treated group. ** $p < 0.01$ compared with WT mice.

療効果を認めたことである。¹⁾ 治療有効時間帯も実臨床に即しており、今後の臨床応用が期待される。

2-4. 抗 HMGB-1 抗体が RAGE ノックアウトマウスでは効果を示さない HMGB-1 の受容体と考えられる RAGE, TLR2, TLR4 のノックアウトマウスでの TBI モデルに、¹⁴⁾ 抗 HMGB-1 抗体を投与すると、血液脳関門の機能破綻、協調運動障害、いずれも野生型マウスに比し、改善効果が減弱した。特に、RAGE ノックアウトマウスでは、有意な効果を示さないどころか、増悪させる傾向があった

ウスでの TBI モデルに、¹⁴⁾ 抗 HMGB-1 抗体を投与すると、血液脳関門の機能破綻、協調運動障害、いずれも野生型マウスに比し、改善効果が減弱した。特に、RAGE ノックアウトマウスでは、有意な効果を示さないどころか、増悪させる傾向があった

(Fig. 5).

脳外傷後の HMGB-1 と RAGE 発現の変化については、Gao らも報告している¹⁵⁾が、HMGB-1 の作用受容体として RAGE が最も重要な 1 つであることがわかった。

3. おわりに

二次的損傷を抑制することで、抗 HMGB-1 抗体治療は、劇的な治療効果を示した。今後、前臨床研究や作用メカニズムを含めた更なる検討が必要だが、抗 HMGB-1 抗体は頭部外傷に対する新しい治療戦略になるものと期待が持たれる。

REFERENCES

- 1) Okuma Y., Liu K., Wake H., Zhang J., Maruo T., Date I., Yoshino T., Ohtsuka A., Otani N., Tomura S., Shima K., Yamamoto Y., Yamamoto H., Takahashi H. K., Mori S., Nishibori M., *Ann. Neurol.*, **72**, 373–384 (2012).
- 2) Rockett I. R. H., Smith G. S., *Am. J. Public Health*, **77**, 1345–1346 (1987).
- 3) Daly K., Thomas P., *Injury*, **23**, 393–396 (1992).
- 4) Liu K., Mori S., Takahashi H. K., Tomono Y., Wake H., Kanke T., Sato Y., Hiraga N., Adachi N., Yoshino T., Nishibori M., *FASEB J.*, **21**, 3904–3916 (2007).
- 5) Zhang J., Takahashi H. K., Liu K., Wake H., Liu R., Maruo T., Date I., Yoshino T., Ohtsuka A., Mori S., Nishibori M., *Stroke*, **42**, 1420–1428 (2011).
- 6) Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat J. M., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., Manogue K. R., Faist E., Abraham E., Andersson J., Andersson U., Molina P. E., Abumrad N. N., Sama A., Tracey K. J., *Science*, **285**, 248–251 (1999).
- 7) Lotze M. T., Tracey K. J., *Nat. Rev.*, **5**, 331–342 (2005).
- 8) Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M. E., *Nature*, **418**, 191–195 (2002).
- 9) Otani N., Nawashiro H., Fukui S., Nomura N., Shima K., *J. Neurotrauma*, **19**, 1587–1596 (2002).
- 10) Shlosberg D., Benifla M., Kaufer D., Friedman A., *Nat. Rev. Neurol.*, **6**, 393–403 (2010).
- 11) Weiss N., Miller F., Cazaubon S., Couraud P. O., *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 842–857 (2009).
- 12) Lenzlinger P. M., Morganti-Kossmann M. C., Laurer H. L., McIntosh T. K., *Mol. Neurobiol.*, **24**, 169–181 (2001).
- 13) Unterberg A. W., Stover J., Kress B., Kiening K. L., *Neuroscience*, **129**, 1019–1027 (2004).
- 14) Myint K. M., Yamamoto Y., Doi T., Harashima A., Yonekura H., Watanabe T., Shinohara H., Takeuchi K., Tsuneyama K., Hashimoto N., Asano M., Takasawa S., Okamoto H., Yamamoto H., *Diabetes*, **55**, 2510–2522 (2006).
- 15) Gao T. L., Yuan X. T., Yang D., Dai H. L., Wang W. J., Peng X., Shao H. J., Jin Z. F., Fu Z. J., *J. Trauma Acute Care Surg.*, **72**, 643–649 (2012).

招待講演

脳神経障害と high mobility group box-1 (HMGB1)
—脳梗塞, 脳外傷, 脳血管攣縮, 神経因性疼痛—

西堀 正洋*

キーワード high mobility group box-1 (HMGB1), 脳梗塞, 脳外傷, 神経因性疼痛, 脳血管攣縮

はじめに

脳神経外科領域において、脳虚血や脳外傷に続発する脳浮腫は生命予後に関わる重大な問題であり、これをいかに抑制するかは長年の課題となっている。特に広範な脳挫傷を伴う著明な脳浮腫は、脳ヘルニアを引き起こし急性死亡の原因となるばかりではなく、脳低酸素症を惹起する結果、重大な神経後遺症を残すこともまれではない。脳外傷の場合、一次脳損傷とそれに続発する二次脳損傷とに分けて病態が理解されるが、実際連続する2つの損傷過程の相対的比重や発症メカニズムの詳細については多くの基礎的ならびに臨床的研究がなされてきたにもかかわらず、不明な点が多い¹⁾。

また、くも膜下出血後の脳血管攣縮は、脳動脈瘤の血管内アプローチによるコイル塞栓やクリッピング技術が向上したのとは対照的に、その制御のための薬物治療法は確立されておらず、遅延性の脳虚血が術後患者の予後悪化因子の第一原因に挙げられる。このように、臓器組織としての脳を低酸素、浮腫、虚血からいかに護るかという問題は、依然として大きな課題として残っている。

脳梗塞については、1990年代に開発されわが国でも2005年から臨床使用されている血栓溶解薬の組織型プラスミノゲンアクチベータに大きな期待がかけられた。組織型プラスミノゲンアクチベータは発症後3時間以内の血栓溶解を目指して投与されるが、わが国における実施率は現在も

5%以下にとどまっている。このため、救急搬送システムの整備や発症時の症状に対する社会啓蒙などが必要とされている。また、副作用としての脳内出血は専門医でも予測が難しく、治療法の障壁ともなっている。脳梗塞治療の場合にも、新規の治療法開発が求められるゆえんである。

神経障害を原因として生じる疼痛過敏は、神経因性疼痛と呼ばれる。神経因性疼痛は、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) はいうに及ばず、麻薬性鎮痛薬を用いても制御が難しいことが多い。がん性疼痛についてもそのことは当てはまる。神経因性疼痛の病態については、動物モデル実験を通じて知見が少しずつ増えてきているが、有効な薬物の開発には依然としてつながっていない。神経因性疼痛の原因は多岐にわたるが、いずれの場合も生活の質を著しく損なう。最悪のケースでは自殺企図もまれではない。したがって、現行使用の薬物リポジショニングを含めて薬物開発の模索が続いている。

high mobility group box-1 (HMGB1) は、1999年、ニューヨークのKevin Traceyらの研究グループ²⁾によって、敗血症性死の遅延性メディエータとして報告された因子である。その後、HMGB1は組織損傷や組織壊死に伴って細胞外へ放出され、自然免疫応答を惹起する代表的な damage-associated molecular pattern (DAMP) と認識されるようになっていく³⁾。著者も Tracey らの研究に触発され HMGB1 の研究を開始したが、当初想像していたレベルを超えて各種中枢神経系の障害において HMGB1 が重要な働きをすることを明らかにすることができた^{4)~8)}。本稿では、HMGB1 の

* 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体薬物制御学講座
薬理学分野

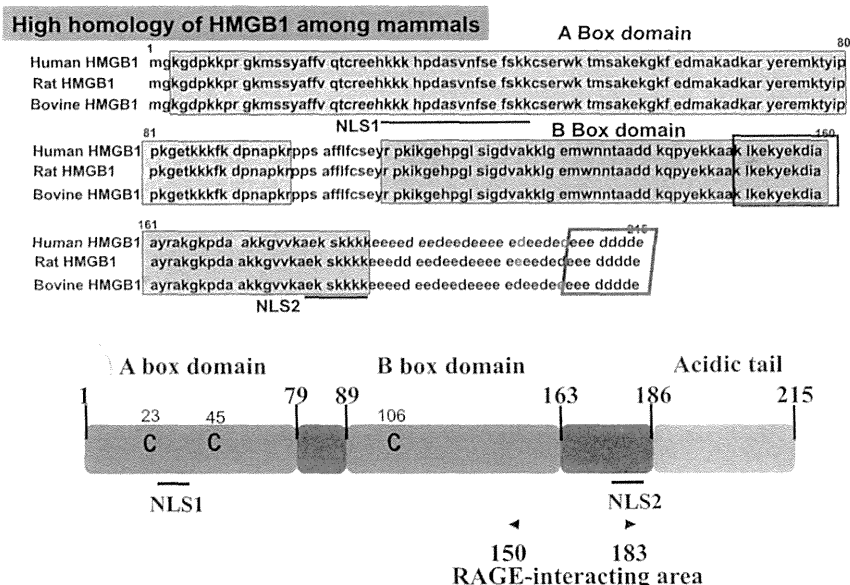


図 1 HMGB1 のドメイン構造と抗 HMGB1 単クローン抗体の作製
ヒト, ラット, ウシ HMGB1 のアミノ酸配列の比較。HMGB1 は高度に
保存性の高いタンパクであることが分かる。太枠で囲った配列が, 単ク
ローン抗体エピトープであった。

再発見から基本的な特徴についてまず概説し, その後, 著者らが見出した脳虚血, 脳外傷, 脳血管攣縮, 神経因性疼痛における HMGB1 の役割と, 抗 HMGB1 単クローン抗体の優れた治療効果について紹介する。

1 HMGB1 の再発見

先述した Kevin Tracey らの研究は, 臨床における敗血症の新規メディエータの探索・同定研究¹⁾であった。彼らは, 患者の経過観察からヒントを得て, IL-1 β や TNF- α のように炎症の超急性期に産生されるメディエータとは産生の時間経過の異なる因子の同定を試みた。そしてマウスマクロファージ系細胞株 RAW264.7 を用いた研究で, LPS で刺激後, 一定の時間をおいて培養上清中に出現する因子として HMGB1 をまず同定した。マウスに LPS を静注すると, 8 時間後から血中 HMGB1 レベルが上昇したことは, RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* での HMGB1 産生の時間経過と合致した。作製された抗 HMGB1 ウサギ抗体は, 致死性エンドトキシン血症によるマウスの死亡率を低下し, 逆に HMGB1 の投与は死亡率を上昇さ

せた。これら一連の結果から, Tracey らは HMGB1 がエンドトキシン血症の重要な遅延性メディエータであるとの可能性にたどり着いた。実際, ICU 内敗血症患者における血中レベルの測定で, 患者グループは健常人グループと比べ高値を示すこと, 生存患者と死亡患者を比較すると死亡患者で血中 HMGB1 レベルが有意に高いことが報告された。

Tracey らの研究報告は, 基礎と臨床の両面に大きなインパクトを与えた。基礎研究の面では, これまで細胞外に存在する生理活性物質は, 神経伝達物質, オータコイド, サイトカイン, 栄養・成長因子, ガス活性物質などのグループに分類されてきたが, HMGB1 はこれらのいずれにも属していなかった。HMGB1 はほとんどすべての細胞に構成的に発現し, 細胞核のクロマチン DNA と結合して転写制御, クロマチン構造の維持や DNA の修復に関与すると考えられてきたのである。その HMGB1 が DNA との結合を解除され, 細胞質経路で細胞外へ放出されると, まったく新規の活性を発揮するというビジョンは, これまでの生物学にはまったくなかった発見であった。著者もマクロファージ系細胞から放出される

表 1 単クローン抗体の比較

クローン名	エピトープ	抗原特異性	平衡解離定数 (Kd) 表面プラズモン共鳴法
#10-22 (IgG2a)	C 末端	HMGB1	$1.5 \times 10^{-8} \text{M}$
#11-19 (IgG2a)	B-box	HMGB1/2	$3.0 \times 10^{-7} \text{M}$
#4-1 (IgG1)	B-box	HMGB1/2	$2.2 \times 10^{-7} \text{M}$

起炎症の物質に注目して研究を進めていたが、核内因子が細胞外環境で活性を発揮するという発見に驚いた一人である。

2 HMGB1 の構造、トランスロケーションと
レドックスによる活性特性

HMGB1 は、215 アミノ酸残基からなる単鎖ペプチドで、糖鎖修飾は持たない。図 1 に示すように DNA と結合する A-box, B-box と C 末端の酸性アミノ酸が 30 残基連続する特徴的テイルの 3 つのドメインから構成される。分子内に 2 か所核移行シグナル配列を持っている。X 線結晶構造解析による高次構造の解明はこれまで試みられてきたが、分子全体の結晶化には成功していない。A-box, B-box と低分子薬物結合⁹⁾や、p53 との結合¹⁰⁾が解析されている。当初、HMGB1 の細胞外への放出は主に壊死細胞で生じるとされたが、現在では生存細胞からの放出が種々の細胞で確認されている³⁾⁵⁾。生細胞からの放出・分泌様式の詳細は明らかにされていないが、HMGB1 分子上のリジン残基アセチル化やメチル化あるいはリン酸化などの化学修飾が、HMGB1-DNA 結合の解除に働くと推定されている³⁾。その後、核内から細胞質経由で細胞外へとなんらかの機構で輸送され则认为られている。著者らの研究室でも神経細胞における輸送について分析し、細胞質オルガネラを経由する分泌を観察している（劉ら、投稿準備中）。HMGB1 は分子内に 3 個のシステイン残基を持っている。最近 Yang ら¹¹⁾は、システイン残基のジスルフィド結合を含む還元一酸化状態で HMGB1

の生物活性が大きく変化することを示唆した。組み換え体 HMGB1 を実験に用いる場合を含め、留意すべきであろう。

著者らは、活性化体の HMGB1 を抑制する方法として、単クローン抗体による活性の中和を目指した。HMGB1 阻害薬として HMGB1 のトランスロケーションを抑制する可能性のある薬物の報告はある¹²⁾が、薬物効果の特異性の面で抗体より劣っている。著者らの作製したラット単クローン抗体は 3 種類で、その認識エピトープ、抗原親和性、HMGB1 特異性は表 1 のようになっている。得られた 3 クローンの中で、親和性をもっとも高く HMGB1 特異的な C 末端を認識する #10-22 クローン（図 1）を治療抗体候補として選んだ⁴⁾。抗体のほかに、最近人工合成ペプチドを用いた HMGB1 活性の中和が報告された¹³⁾。新しいアプローチとして注目される。

3 虚血脳障害と HMGB1

ラットの中大脳動脈 2 時間閉塞・再灌流モデルで脳梗塞を作製すると、前頭部から頭頂部にかけの脳皮質領域と線条体の広範囲に梗塞巣を作ることができる。抗 HMGB1 単クローン抗体（#10-22）を再灌流直後と 6 時間後の 2 回、尾静脈から末梢投与すると、24 時間あるいは 48 時間後に形成される脳梗塞巣が対照抗体投与ラットに比べ、それぞれ 90% と 75% 抑制された⁴⁾。このような劇的な脳梗塞巣縮小効果と一致して、運動麻痺症状も著しく軽減された。虚血部位における HMGB1 の動態を詳しく調べてみると、再灌流 24

時間後の対照ラットの虚血コア部分では神経細胞核からほとんど HMGB1 が消失しており、ペナンプラ領域でも細胞核より細胞質に免疫陽性構造物を持つ神経が多く見られた。再灌流早期の HMGB1 トランスロケーションに注目して動態を観察すると、最初神経細胞の核膜直下に移動した HMGB1 が、その後細胞質へ移動し、一部顆粒状の形態をとったのち細胞外へ放出されると推定された⁵⁾。顆粒状形態の一部は、細胞質オルガネラの局在と一致していた(劉ら、投稿準備中)。神経細胞とは対照的にアストログリアやミクログリアでは HMGB1 トランスロケーションは再灌流早期にはほとんど認められなかった。抗 HMGB1 抗体を投与されたラットでは、神経細胞に見られる HMGB1 トランスロケーションが強く抑制されていた。逆に、HMGB1 を脳室内に投与したラットでは、脳梗塞の増悪が認められた。以上の実験結果から、脳虚血急性期に神経細胞核内にある HMGB1 が細胞質経由で細胞外へ輸送されること、細胞外へ放出される HMGB1 は脳梗塞形成に加担するように機能していることが強く示唆された。また、脳虚血モデルラットの脳脊髄液中と血中 HMGB1 を測定したところ、いずれの体液中でも再灌流後濃度上昇が認められ、抗 HMGB1 抗体の投与で上昇は著明に抑制された。抗 HMGB1 抗体治療は HMGB1 のトランスロケーションを強く抑制するとともに、いったん体液中に出た HMGB1 のクリアランスに働く可能性も示唆された。

抗 HMGB1 抗体によって、これまでの低分子薬では認められなかった高いレベルの梗塞巣縮小効果が得られたので、その作用機序を詳細に解析した⁴⁾⁵⁾。まず、虚血領域における血管透過性の亢進をエバンスブルーの漏出で測定し、抗体効果を評価した。その結果、虚血領域に認められる血管透過性の亢進が抗体の投与で著明に抑制されることが分かった。血管透過性亢進は、毛細血管レベルで生じるので、脳血管の場合は特徴的な血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の構造変化を調べることが重要になる。再灌流 3 時間の時点で透過電子顕微鏡で観察した BBB の構造変化は、以下の 3 点にまとめることができた。1) アストロサイト終足の著明な腫脹、2) アストロサイト終足細胞形

質膜の血管基底膜からの解離、3) 血管基底膜の電子密度の低下と膨化。以上 3 点の BBB 形態における変化が抗 HMGB1 抗体の投与によって著明に抑制された。BBB の構造変化そのものが虚血早期に出現していることから、これを防ぐことの重要性が強く示唆された。著明な腫脹が認められたアストロサイトの終足には、アクアポリン 4 の発現亢進があり、抗 HMGB1 抗体の投与で抑制された。

以上の結果は、虚血時に神経細胞核から細胞外へ放出された HMGB1 が直接 BBB 構成細胞に働いて、BBB の構造的ならびに機能的破綻を来す可能性を示唆している。この可能性を検証するために *in vitro* BBB 再構成系を用いて、組み換えヒト HMGB1 の血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトに対する効果を調べた。その結果、組み換えヒト HMGB1 は血管内皮細胞と周皮細胞に収縮性変化を惹起すること、この変化が血管透過性の亢進につながることを示唆された⁵⁾。

虚血脳部位では BBB の構造ならびに機能的破綻とともに、ミクログリアの活性化が観察された⁴⁾。同時に炎症反応に密接に関与する TNF- α 、iNOS、MMP-9 の発現上昇が検出された。これらの変化も抗 HMGB1 抗体の投与によってすべて抑制された。臨床治療を考えた場合、有効治療時間帯が問題になる。本実験モデルを用いた抗 HMGB1 抗体治療の場合、発症後約 4 時間と判定された。

4 脳外傷と HMGB1

脳虚血障害と並んで脳外傷性障害では、障害部位に脳浮腫を生じる。脳浮腫形成の機序は虚血脳と同様に BBB 破綻による脳血管透過性の亢進と考えることができる。つまり、脳虚血と脳外傷では一次的な障害の原因は異なっているが障害急性期の脳浮腫形成にはかなりの共通性が見られる可能性があると考えた。そこでラットの fluid percussion injury モデルを用いてまず障害誘導後の HMGB1 トランスロケーションについて検討した。非常に驚いたことに、脳外傷部位における神経細胞の HMGB1 トランスロケーションは、脳虚血部位のそれと区別できないほど酷似してい

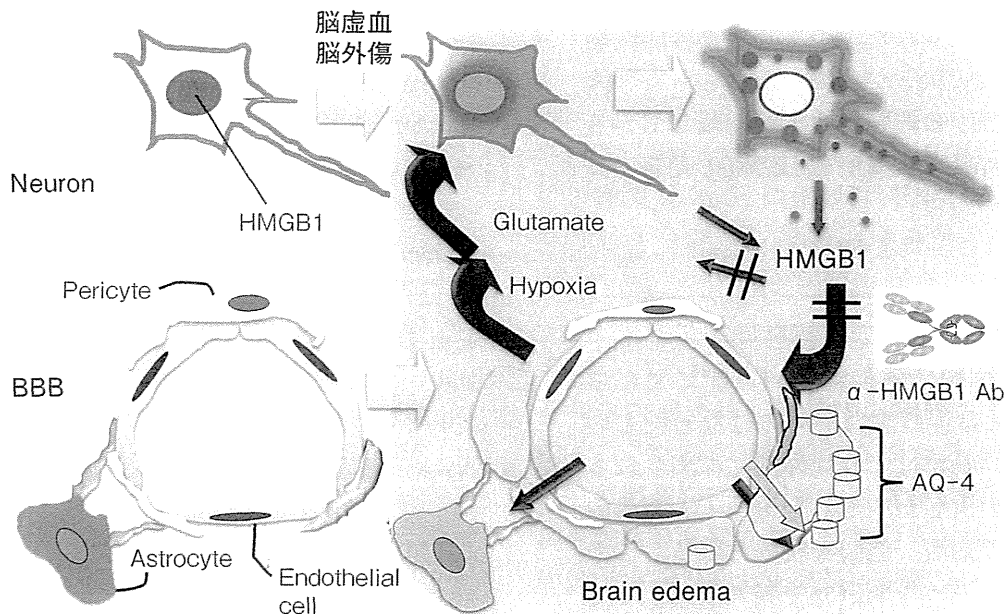


図 2 神経細胞からの HMGB1 の遊離と BBB 破綻

脳虚血あるいは脳外傷による神経細胞障害と HMGB1 トランスロケーション・遊離と BBB 破綻の関係を示す。

た⁷⁾。BBB の電子顕微鏡観察による形態変化も同様であった。さらに、抗 HMGB1 抗体の投与は、虚血障害の場合と同様にこれらの変化を劇的に抑制した。リアルタイムに MRI T2 強調画像の撮影で脳浮腫部位を同定したが、MRI でも抗体の優れた効果が確認された⁷⁾。脳浮腫の改善と並行して、運動機能の著明な改善が Rotarod と前肢壁着きの左右差評価で明らかにされた。

HMGB1 の受容体として、これまで RAGE と Toll-like receptor-4/2 の存在が知られている。脳浮腫形成に関与する受容体を検討する目的で RAGE ならびに Toll-like receptor-4 ノックアウトマウスをそれぞれ用いて調べたところ、RAGE ノックアウトマウスでは抗 HMGB1 抗体の効果が消失した。この実験結果から、放出された HMGB1 が作用し BBB 破綻の誘導に関与する受容体は主に RAGE であると推論された¹⁴⁾。脳虚血と脳外傷に共通する BBB 破綻の概念図を図 2 に示す。

5 脳血管攣縮と HMGB1

くも膜下出血後の脳血管攣縮の制御は、脳外科領域に残されている重要な課題である。ウサギの

自己血を大槽内に注入するくも膜下出血モデルを用いて、出血後の脳底動脈収縮を脳血管造影で評価した。対照の PBS 投与群と対照抗体投与群では約 48% の収縮が認められたが、抗 HMGB1 抗体投与群では収縮が約半分に抑えられた（有光ら、未発表データ）。現在、抗体投与効果の機序について解析中である。

6 神経因性疼痛と HMGB1

神経因性疼痛は“針のムシロ”と形容される場合があるように、軽微な接触性の刺激が激しい痛みを誘発する。発症の分子基盤についての研究は種々続けられているが、有効な薬物開発には至っていない。著者らはラットの坐骨神経結紮モデルを用いて、いったん疼痛過敏状態を完成させた後、抗 HMGB1 抗体の神経因性疼痛抑制効果を評価した⁸⁾。抗 HMGB1 抗体の急性投与は、完成された疼痛過敏状態に対し有効であった。このような治療プロトコルは、臨床治療場面と相似するものであり、本治療法の可能性を示唆する。脊髄後角の二次知覚神経では HMGB1 のトランスロケーションが生じており、周辺部位のミクログリ

ア活性化が認められるが、抗 HMGB1 抗体の投与によってそれが抑制された。つまり、神経因性疼痛においては、過敏状態が完成したのちも脊髄後角において HMGB1 の細胞外放出が持続していると推定される。神経障害局所の HMGB1 動態について現在解析中である。

■おわりに

HMGB1 が細胞外因子として再発見されて 15 年が経過した。この間に中枢神経内炎症における HMGB1 の重要性は揺るぎないものになったといえる。脳や脊髄は骨格により物理的に保護されるが、いったん強い炎症が内部に発生すると頭蓋内圧亢進を生じ、低灌流、低酸素状態に陥る。このような病態は今回扱った脳虚血や脳外傷ばかりでなく、ウイルス性脳症にも共通する。例えばインフルエンザ脳症の病態はいまだ解明されていないが、動物感染モデル実験で HMGB1 動態について検討する必要がある。HMGB1 の化学修飾とトランスロケーションがどのような細胞内シグナリングで駆動されるのかは重要な問題であるがほとんど解明されていない。今後の研究が必要である。

引用文献

- 1) Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 2010 ; 6 : 393-403.
- 2) Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999 ; 285 : 248-51.
- 3) Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* 2011 ; 29 : 139-62.
- 4) Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, et al. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB Journal* 2007 ; 21 : 3904-16.
- 5) Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, et al. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke* 2011 ; 42 : 1420-8.
- 6) Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nature Med* 2012 ; 18 : 911-7.
- 7) Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, Date I, et al. Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol* 2012 ; 72 : 373-84.
- 8) Nakamura Y, Morioka N, Abe H, Zhang FF, Hisakawa-Nakashima K, Liu K, et al. Neuropathic pain in rats with partial sciatic nerve ligation is alleviated by intravenous injection of monoclonal antibody to high mobility group box-1. *PLoS One* 2013 ; 8 : e73640.
- 9) Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, Dallacosta C, Pennacchini D, Zamai M, et al. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol* 2007 ; 14 : 431-41.
- 10) Rowell JP, Simpson KL, Stott K, Watson M, Thomas JO. HMGB1-Facilitated p53 DNA binding occurs via HMG-Box/p53 transactivation domain interaction, regulated by the acidic tail. *Structure* 2012 ; 20 : 2014-24.
- 11) Yang H, Lundback P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi ME, et al. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol Med* 2012 ; 18 : 250-9.
- 12) 西堀正洋. HMGB1 を標的とした治療. *日本臨床* 2014 ; 72 (増刊号-最新臨床脳卒中学上) : 417-22.
- 13) Kim ID, Shin JH, Lee HK, Jin YC, Lee JK. Intranasal delivery of HMGB1-binding heptamer peptide confers a robust neuroprotection in the postischemic brain. *Neurosci Lett* 2012 ; 525 : 179-83.
- 14) Okuma Y, Liu K, Wake H, Liu R, Nishimura Y, Hui Z, et al. Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing. *Neuropharmacology* 2014 ; 85 : 18-26.

