

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

インフルエンザ肺炎モデルにおける抗 HMGB1 抗体の治療効果

主任研究者 森島恒雄（岡山大学大学院特命教授）

研究協力者 野坂宜之 八代将登 藤井洋輔 山田睦子 塚原宏一
（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学）

研究要旨

【背景】今後発生しうるインフルエンザウイルスパンデミックへの対策は緊急の課題である。既存の抗ウイルス薬の効果が低い耐性株や新型ウイルスの出現が危；惧されており、新たな治療選択肢の可能性を探る必要がある。インフルエンザ感染における炎症惹起物質のひとつとして核内 DNA 結合タンパク質である HMGB-1 (High-Mobility Group Box-1) が注目されている。【目的】インフルエンザ肺炎に対する抗 HMGB-1 抗体の治療効果を検証すること。【方法】C57/BL6 マウスにインフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/34 株 (1.0×10^2 PFU) を経鼻接種し、1、24、48 時間後に抗 HMGB-1 単クローン抗体 (2mg/kg/回) を尾静脈投与した。【結果】対照動物(抗 *Keyhole Limpet Hemocyanin* 抗体投与群)と比較し抗 HMGB-1 抗体投与群では肺におけるウイルス増殖に差を認めない一方で、生存率の有意な改善を認めた ($p=0.004$)。また、感染後 3 日、7 日、10 日の時点で気管支肺胞洗浄液中の好中球数や酸化ストレスマーカー、各種炎症性サイトカインが抗 HMGB-1 抗体投与群で有意に抑制された。【考察】抗 HMGB-1 抗体が、インフルエンザ肺炎に対し有望な追加治療選択肢になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

2009 シーズンの新型インフルエンザで多く認めた急性呼吸窮迫症候群は致死的な合併症であった。今後起こりうるパンデミックにむけ、重症合併症に対する対策は喫緊の課題である。既存の抗ウイルス薬の効果が低い耐性株や新型ウイルスの出現が危惧されており、新たな治療選択肢の可能性を探る必要がある。

HMGB-1(High-mobility group box-1)

は炎症性サイトカイン様因子として振る舞う 25kDa の核内 DNA 結合タンパク質である。近年、HMGB-1 が様々な危急病態に関与し、さらに抗 HMGB-1 抗体が敗血症や頭部外傷などの病態改善に有効であることが示され、注目を集めている。

2009 A(H1N1)インフルエンザウイルスによる重症肺炎を呈した小児患者において、血清中 HMGB-1 の増加を認めその病態形成への関与が示された¹⁾。しかし、

インフルエンザ重症肺炎における抗 HMGB-1 抗体の治療薬としての可能性を検討した報告は存在しない。

そこで我々は抗 HMGB-1 抗体によるインフルエンザ肺炎の治療効果をマウスモデルを使用して検討した。

B. 研究方法

C57/BL6マウスにインフルエンザウイルスA/Puerto Rico/8/34株 (1.0×10^2 PFU) を25 μ l 経鼻接種した。感染後1時間後、24時間後、48時間後に抗HMGB-1抗体を2mg/kg (0.1ml) 投与した。対照抗体には抗*Keyhole Limpet Hemocyanin*抗体を用い、2mg/kg(0.1ml)投与した。抗体はいずれも岡山大学大学院薬理学講座(西堀正洋教授、劉克約博士)より供与された。なお、抗HMGB-1抗体はHMGB-1タンパク質にのみ存在するC末端配列(DEEEDDDDE)を認識し、HMGB1活性を中和する単クローナル抗体である。

最初に、対照動物との生存率の相違を確認した。さらに、感染後3・5・7・10日にマウスを解剖し、血清・気管支肺胞洗浄液(右肺)・肺組織(左肺)を採取した。肺組織はHE染色およびGr1染色にて炎症細胞・好中球浸潤の評価を行った。採取した肺組織の一部からRNeasy Plus Miniを用いて総RNAを抽出し、RETROscriptを用いてcDNAに逆転写し、さらにリアルタイムPCR法にて増幅しインフルエンザウイルス量を測定した。気管支肺胞洗浄液中の細胞数は日本光電社製セルタックにて測定した後、検鏡下(ディフ・クイック染色)に細胞分画を確認して好中球数を算出した。採取した血清を用いて酸化ストレスマーカーであるdROMsをFRAS4機器を用いて測定した。

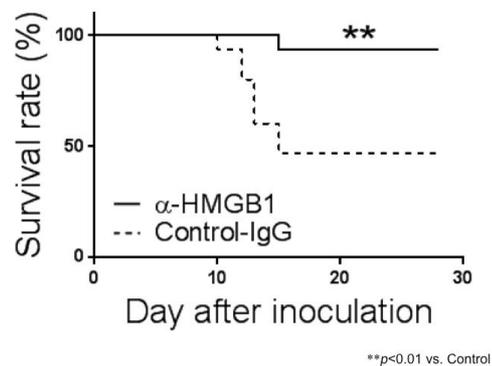
また、MILLIPLEX Kit (MILLIPORE社)を用いて気管支肺胞洗浄液中の tumor

necrosis factor alpha(TNF- α)、interleukin 6(IL-6)、chemokine (C-X-C motif) ligand 1(CXCL-1)を測定した。また、RAGE ELISA kit (R&D社)を用いて気管支肺胞洗浄液中の receptor for advanced glycation end products (RAGE)を測定した。さらにRAGEとNF- κ B(p65)、GAPDHのmRNAの発現量をリアルタイムPCR法で増幅し測定した。

C. 研究結果

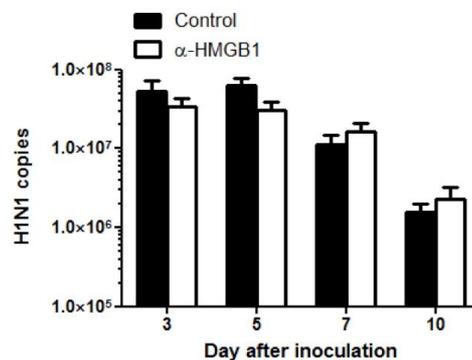
生存曲線

抗HMGB1抗体投与群で93.3%のマウスが生存した一方で、対照群では53.3%のマウスが死亡した。



ウイルス量

肺組織中のインフルエンザウイルス量は対照群と抗HMGB1抗体投与群で有意差は認めなかった。

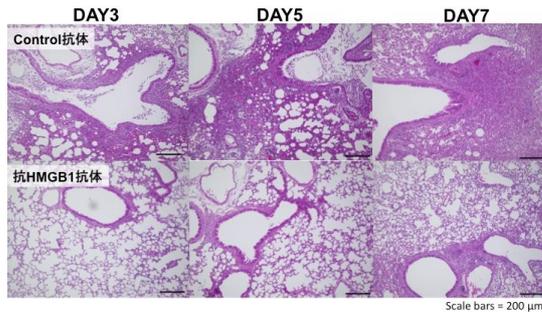


肺組織病理

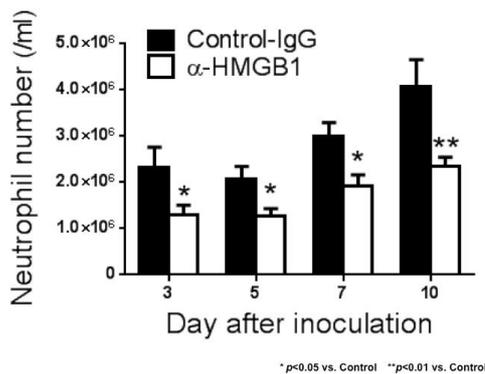
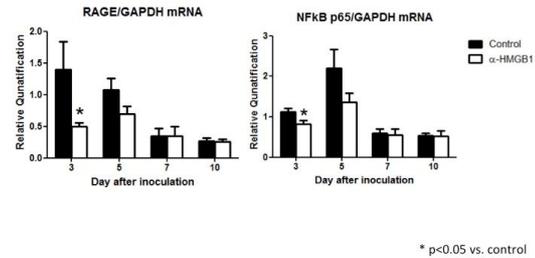
対照群と比較し、抗HMGB1抗体投与群の

肺組織炎症像の軽減を認めた。

また、気管支肺胞洗浄液中の好中球数についても、抗 HMGB1 抗体投与群で有意に抑制されていた。

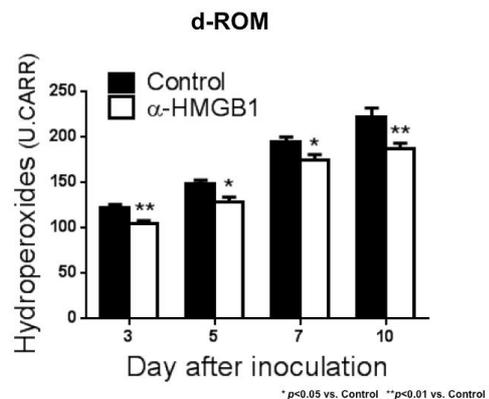


の肺組織中における発現が抗 HMGB1 抗体投与群で感染後 3 日目、5 日目で抑制されていた。同様に NF- κ B(p65)の発現も抑制されていた。



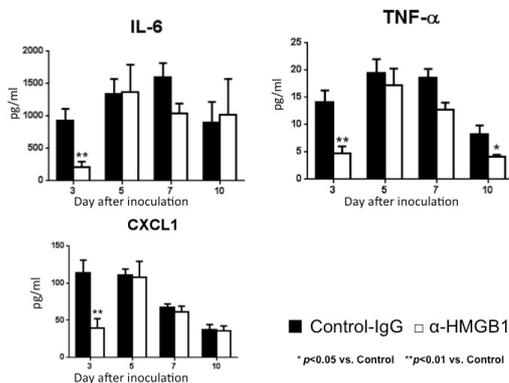
酸化ストレス

血清中の酸化ストレスマーカー (dROM) は抗 HMGB1 抗体投与群において感染後 3 日から 10 日目にかけて有意に抑制されていた。



サイトカイン

気管支肺胞洗浄液中のサイトカイン/ケモカイン (IL-6, TNF- α , CXCL-1) は感染後 3 日目に抗 HMGB1 抗体投与群において有意に抑制されていた。TNF- α については抗 HMGB1 抗体投与群で感染 10 日目にも有意に抑制されていた。



D. 考察

本研究ではマウスインフルエンザ肺炎モデルを使用し、抗 HMGB1 抗体の治療効果を検証した。50%致死率のモデルを作成した後に 2mg/kg の抗 HMGB1 抗体を感染後から 1 日 1 回 3 日間投与した。その結果、ほぼ完全な生存を得るに至った。

RAGE の発現

HMGB1 の代表的なレセプターである RAGE

抗 HMGB1 抗体の投与により、代表的レセプターである RAGE の発現抑制が起こり、そ

の結果インフルエンザ感染における key cytokine の抑制、酸化ストレスの軽減につながり、肺炎症像の改善が得られたものと考えた。一方で今回の実験では抗 HMGB1 抗体の抗ウイルス効果は確認されなかった。したがって、抗炎症・抗酸化作用の抗インフルエンザ治療における重要性が確認できた。

また、この結果は今後発生しうる鳥インフルエンザや SARS コロナウイルス、MERS コロナウイルスにおける急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) の脅威に対しても新たな治療法として期待できる可能性がある。

E . 結論

抗 HMGB1 モノクローナル抗体の静脈投与によりマウスインフルエンザ肺炎モデルの生存率の改善と肺組織病変の改善を得た。抗 HMGB1 モノクローナル抗体は新たな重症インフルエンザ感染に対する治療薬として期待できる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- Nosaka N, Yashiro M, Yamada M, et al. Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Treatment Provides Protection against Influenza A Virus

(H1N1)-Induced Pneumonia in Mice. Crit Care Med (投稿中)

- Tsuge N, Oka T, Yamashita N, et al. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. J Neurovirol .2014;20(1):73-84.

2 . 学会発表

- 津下充 鶴丸靖子 野坂宜之 藤井洋輔 齋藤有希恵 八代将登 山下信子 塚原宏一 森島恒雄 痙攣重積を示したインフルエンザA(H1N1)pdm09及びロタウイルス胃腸炎の宿主遺伝子発現の解析 第46階日本小児感染症学会 東京 2014年(10月)

G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1、特許取得

インフルエンザ治療剤として特許出願中

2、実用新案登録

特になし

3、その他

特になし