

抗ヌクレオカイン (抗 HMGB1) 単クローン抗体の脳梗塞治療への応用

森 秀治,^{*,a} 劉 克約,^b 高橋英夫,^b 西堀正洋^b

Therapeutic Effect of Anti-nucleokine Monoclonal Antibody on Ischemic Brain Infarction

Shuji MORI,^{*,a} Keyue LIU,^b Hideo K TAKAHASHI,^b and Masahiro NISHIBORI^b^aSchool of Pharmacy, Shujitsu University, 1-6-1 Nishigawara, Okayama 703-8516, Japan, and^bDepartment of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan

(Received August 5, 2008)

Ischemic brain infarction is high among the causes of death in Japan, and the medical and social burden by severe sequelae is also extremely serious. In this symposium, we show that treatment with anti-high mobility group box 1 (HMGB1) monoclonal antibody (mAb) remarkably ameliorated brain infarction induced by 2-hour occlusion of the middle cerebral artery in rats, even when the mAb was administered after the start of reperfusion. Whereas HMGB1 is usually localized in nucleus, after stimulation it is secreted into extracellular space by an unknown non-classical pathway, and exhibits an inflammatory cytokine-like activity. Treatment with mAb reduced infarct size, and the accompanying neurological deficits in locomotor function were significantly improved. In addition, some biochemical markers such as permeability of the blood-brain barrier, the expression of tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 were altered by mAb injection. These findings indicate the usefulness of HMGB1 as a novel therapeutic to target ischemic stroke.

Key words—antibody therapeutics; ischemic brain infarction; target therapy

1. はじめに

脳梗塞をはじめとする虚血性脳障害は、現代の集約的先端治療をもってしても未だに死亡原因の上位を占め、重篤な後遺症のために要する介護などの医療経済的損失も極めて甚大であることから、21世紀において克服すべき最重要課題の1つである。

脳梗塞 (虚血) に伴う細胞障害の程度は、虚血時間や血液再灌流の有無などの様々な要素が複雑に関係している。脳梗塞 (虚血) 中心部すなわち「コア領域」では、直ちに脳血流量や脳代謝の低下が生じることとなるが、虚血の周辺部ではしばらくは細胞壊死に陥らず生き残っている領域が存在し「ペナンブラ領域」と呼ばれている。脳梗塞 (虚血) 後、速やかに血流を回復させたり組織保護的な処置を行うことが、ペナンブラ領域の保護すなわち細胞壊死や

梗塞領域の拡大防止につながる可能性を持つことになる。¹⁾

血栓形成に伴う血流途絶によって、酸素とグルコースの供給がストップし ATP の枯渇が生じる。その後、細胞膜イオンポンプの破綻により細胞膜脱分極が起り、膜電位依存性 Ca^{2+} チャネル活性化やグルタミン酸受容体の活性化による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大が生じる。その後、細胞内フリーラジカル産生増大やカスパーゼ活性化、ADP リボースポリメラーゼ活性化などのカスケードを通じて細胞死が引き起こされると考えられている。

また、脳梗塞 (虚血) 後の生じる病態解析から、血液-脳関門の破綻、血管内皮細胞の活性化、白血球の接着・遊走、血小板凝集、ミクログリア活性化、活性酸素の産生亢進、マトリックスメタロプロテアーゼ活性化、各種の炎症性サイトカイン産生などの炎症・免疫反応系の異常亢進が病態の進展・増悪化に深く関与していることが明らかになっている。

われわれは、脳梗塞 (虚血) 病巣において炎症・免疫反応の亢進に関与する因子が存在するとの作業

^a就実大学薬学部応用薬学分野生体情報学 (〒703-8516 岡山市西川原 1-6-1), ^b岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学 (〒700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1)

*e-mail: morimori@shujitsu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第128年会シンポジウム S14 で発表したものを中心に記述したものである。

仮説を立て、中でも、近年、エンドトキシンショックや慢性関節リウマチなどへの関与が示唆されている high mobility group box-1 (HMGB1)^{3,4)}に着目した。本稿においては、実験的脳梗塞モデル動物を用いて、脳梗塞病態における HMGB1 の意義や特異的単クローン抗体による脳梗塞治療の可能性²⁾について論述したい。

2. 代表的ヌクレオカイン, HMGB1 とは

細胞内局在を示すと考えられていたタンパク質が、なんらかの刺激を受けて細胞外に分泌したり、細胞壊死に伴って放出し、細胞外にて炎症性因子(ヌクレオサイトカイン)として機能する知見が蓄積しつつある。これまでに S100 タンパク質ファミリー⁵⁾や HMGB1^{3,4)}などが知られており、これらはシグナルペプチドを持たず、細胞刺激後は未知の non-classical pathway によって細胞外に分泌される。

その中でも、HMGB1 は従来からクロマチン構成分子として知られ DNA の立体構造の維持に重要な働きを示す DNA 結合タンパク質であり、特定の遺伝子転写を調節するなどの機能を持つ核内タンパク質である。また、脳由来のヘパリン結合性の神経突起伸長因子として単離されていたアンフォテリンも HMGB1 と同一分子であることも判明している。⁶⁾ 1999 年に Wang と Tracey らはエンドトキシンショックの病態進展に遅発性の致死性メディエータとしての HMGB1 の意義を見出し、⁷⁾ この報告が契機になって HMGB1 の炎症免疫系の亢進への注目が高まっている。

HMGB1 は、通常は核内タンパクとして機能しているにも関わらず、刺激を受けて活性化した単球やマクロファージ、樹状細胞から分泌したり、あるいは障害を受けて壊死に陥った細胞から放出されることにより、病巣局所ひいては循環血中に出現し、炎症性サイトカイン様因子として振る舞う。したがって、HMGB1 の機能をなんらかの方法で制御することができれば、炎症性病態の増悪・進展の抑止につながると考えられる。

以下に、脳梗塞モデル動物を用いた HMGB1 特異的単クローン抗体の治療効果についての解析成果²⁾を紹介する。

3. 脳梗塞モデルにおける HMGB1 の増悪因子としての役割と HMGB1 特異的単クローン抗体による治療効果

はじめに HMGB1 をラットに免疫し、単クローン抗体を確立した。得られた抗体の結合特異性を調べるために HMGB1 由来のペプチド (# 1-41) を合成し、ドットプロットによる検討を行った [Fig. 1 (A)]. その結果、単クローン抗体は HMGB1 の C 末端部分 (# 41) とのみ反応することが明らかとなった [Fig. 1 (B)]. この抗体を用いてラット脳ホモジネートをウエスタンブロットに掛けると、分子量が約 29 kDa の HMGB1 分子のみを検出し、その結合特異性が証明された [Fig. 1 (C)]. またデータには示さないが、単球細胞を HMGB1 で刺激すると細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現が濃度依存的に増大し、この ICAM-1 増大反応は単クローン抗体を共存させることによって抑えられることも明らかとなり、確立した単クローン抗体が HMGB1 に対して機能的にも中和活性を持つことが判明した。

ラットの右側中大脳動脈をシリコンコートしたナイロン糸で 2 時間閉塞(虚血)し、その後に血流を再灌流させることによって脳梗塞を実験的に惹起することができる。この脳梗塞惹起モデル系を用いて、HMGB1 特異的単クローン抗体の影響を検討した。Fig. 2 に実験プロトコールの概略を示した。2 時間の中大脳動脈閉塞の終了時(すなわち再灌流開始時)と再灌流開始 6 時間後の 2 回に渡って、単クローン抗体 (200 μ g/匹/回) を静脈投与した。24 又は 48 時間後に脳を摘出し、triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色を行って梗塞部位の大きさを見積もった。このときに用いた抗体投与量 (200 μ g/匹/回) は、実際に臨床に用いられているいくつかの抗体医薬の投与量が約 1 mg/kg であることを基にして設定された。その結果、HMGB1 特異的単クローン抗体を投与することによって脳梗塞領域が劇的に縮小



森 秀治

就実大学薬学部応用薬学分野生体情報学教授。1962 年徳島県生まれ。1989 年岡山大学大学院自然科学研究科博士課程修了。岡山大学医学部助教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科助教授を経て、2006 年より現職。組織リモデリングや再生に働く活性因子群の分子機能解析と創薬。

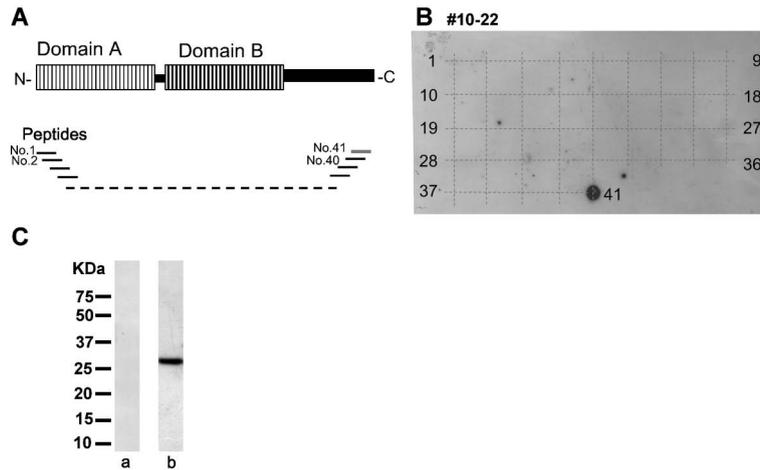


Fig. 1. Epitope Determination and Characterization of Rat Anti-HMGB1 Monoclonal Antibody

(A) The domain structure of HMGB1 and the synthetic overlapping peptides 15 amino acids in length (# 1-41) for determining epitopes were shown. (B) The epitope of anti-HMGB1 monoclonal antibody was determined by dot blotting. (C) Detection of rat brain HMGB1 by Western blotting. The whole rat brain homogenate was subjected to SDS-PAGE, blotted, and detected with anti-HMGB1 monoclonal antibody and HRP-conjugated 2nd antibody. In lane a, 1st antibody (anti-HMGB1 monoclonal antibody) was omitted. cited from Ref. 2).

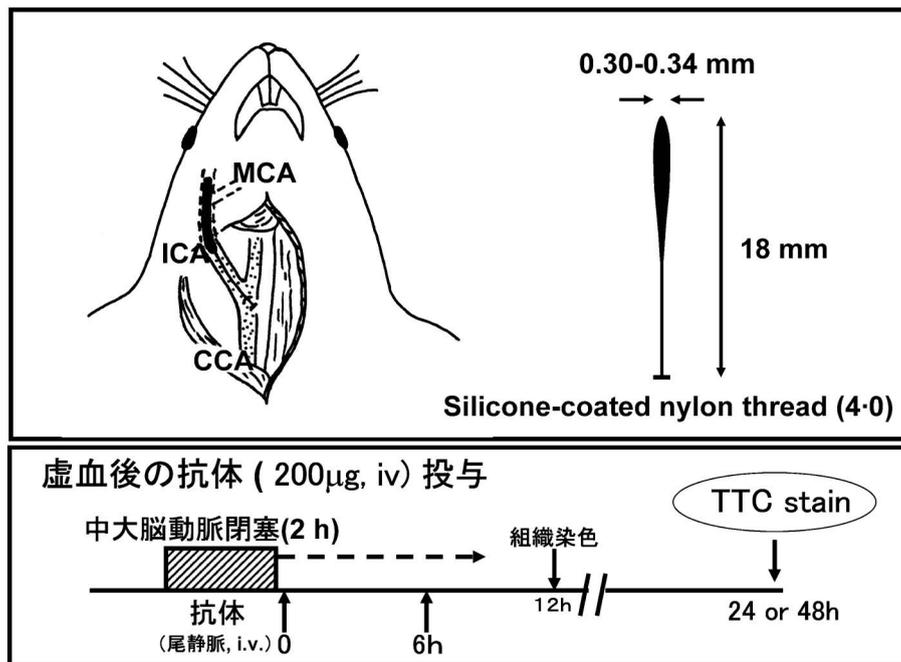


Fig. 2. Protocol for Preparation of Ischemic Brain Infarction Model in Rat

していることが分かった [Fig. 3(A)], 白い部分が梗塞領域). 脳梗塞領域面積を画像解析したところ, 等量のコントロール抗体 (抗 *Keyhole Limpet hemocyanine* 特異的単クローン抗体, サブクラス (IgG2a) 一致) を投与した場合に比べて, 抗 HMGB1 特異的単クローン抗体の場合は, 大脳皮質及び線条体の両領域において, 脳梗塞面積が約 90% (再灌流 24 時間後) 及び約 75% (再灌流 48 時

間後) にまで抑えられていた [Fig. 3(B)].

次に, 脳梗塞発症に伴って生じる神経症状に対する単クローン抗体の効果を検討した (Fig. 4). はじめに, ローターロッドを用いた解析を行ったところ, HMGB1 特異的単クローン抗体を投与された群は, コントロール群に比べてローターロッド上体を長時間保持することができた [Fig. 4(A), (B)]. 特に, 高回転 (15 rpm) でロッドを回転さ

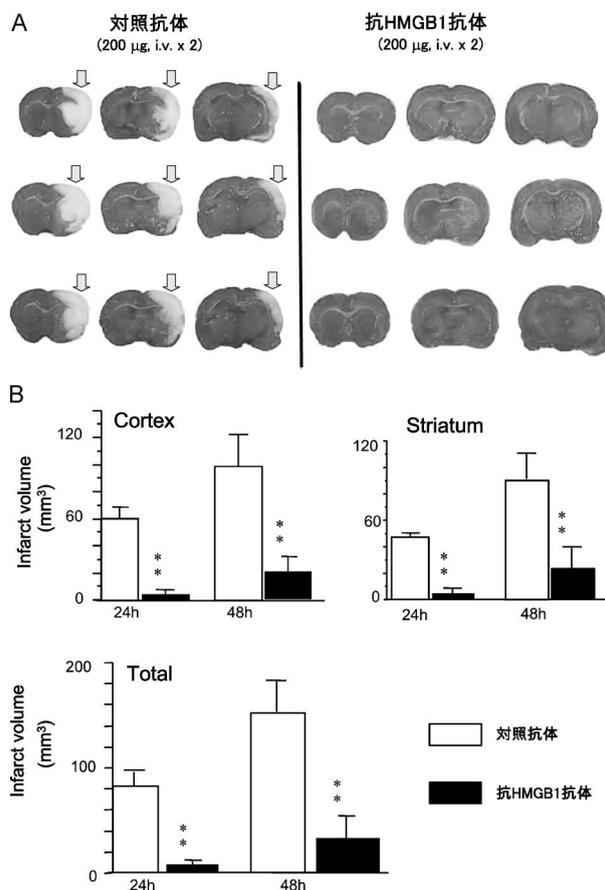


Fig. 3. Effect of Anti-HMGB1 Monoclonal Antibody on Brain Infarction by Middle Cerebral Artery (MCA) Occlusion in Rat (A) Brain infarction induced by right MCA occlusion was evaluated by TTC staining of brain slices from rats treated with anti-HMGB1 or control monoclonal antibody 24 h after reperfusion. (B) The infarct volumes in the striatum and cerebral cortex 24 or 48 h after reperfusion were quantified. cited from Ref. 2).

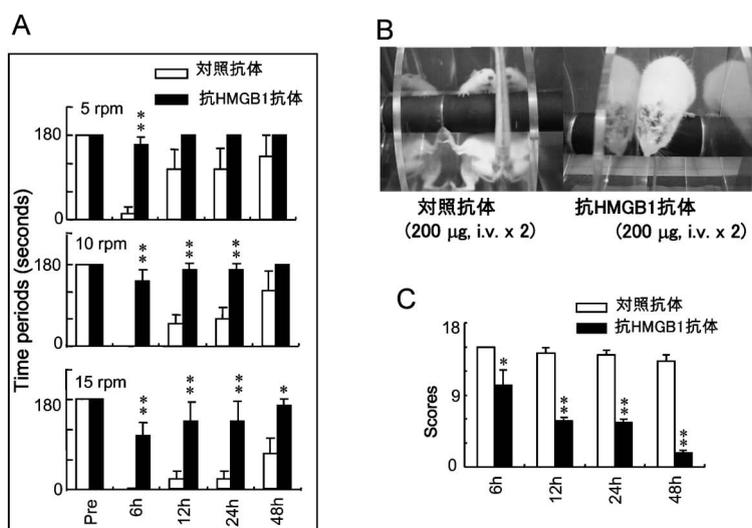


Fig. 4. Effect of Anti-HMGB1 Monoclonal Antibody on Neurological Deficit (A) Neurological deficit in rats after MCA occlusion were examined using the rotarod test (A, B) and by neurological scoring (C). In the rotarod test, trials were performed at 3 different speeds and the time intervals running on the rod were determined. cited from Ref. 2).

せた場合に、より顕著な差が認められた。加えて、Bederson らの方法⁸⁾を用いて、神経症状の重症度をスコア化したところ、コントロール群に比べて HMGB1 特異的単クローン抗体投与群の場合に神経症状の有意な抑制が認められた [Fig. 4(C)]. データには示さないが、ラット脳梗塞モデルの脳組織を HE 染色したところ、コントロール抗体投与群では大脳皮質と線条体ともに著しい組織破壊が認められたが、HMGB1 特異的単クローン抗体投与群の場合は、そのような組織破壊は観察されなかった。

次に、HMGB1 の脳梗塞増悪因子としての意義をより明確にするために、ラット脳梗塞モデル作成時に HMGB1 分子自体を脳質内に投与し、その効果を検討した (Fig. 5)。その結果、脳質内に HMGB1 を投与した群ではコントロール群 (緩衝液投与群) に比べて梗塞領域の有意な増大が認められた [Fig. 5(A)]. また、ローターロッドを用いた神経症状解析においても、HMGB1 脳質内投与群が有意に神経症状の悪化傾向を示すことが明らかとなった [Fig. 5(B)-(D)].

次に、ラット脳梗塞時の血管透過性亢進に対する HMGB1 特異的単クローン抗体の影響について検討を加えた (Fig. 6)。ラット脳右側中大脳動脈を 2 時間閉塞し、再灌流直後に抗体投与と同時にエバンスブルーを静脈投与した。再灌流 3 時間後に生理食塩水で全身還流したのちに脳を摘出し、脳梗塞に伴

う血管透過性を組織学的、生化学的に解析した。その結果、脳梗塞惹起 (+コントロール抗体投与) 群では広範にエバンスブルーの血管から組織への溢出が観察されたが、脳梗塞惹起 (+HMGB1 特異的単クローン抗体投与) 群では、エバンスブルーの溢出は少なく、このことから HMGB1 特異抗体によって血管透過性亢進をも抑えられることが明らかとなった [Fig. 6(A)]. 脳組織を 2 mm 厚でスライスし、溢出したエバンスブルーを定量したところ、組織学的な検討と同じく HMGB1 特異抗体投与群で有意なエバンスブルー溢出量の低下が認められた [Fig. 6(B)].

いくつかの炎症関連分子のラット脳梗塞時における発現変化を RT-PCR 法にて解析した (Fig. 7)。その結果、大脳皮質と線条体ともに脳梗塞惹起にともなって inducible nitric oxide synthase (iNOS) 並びに tumor necrosis factor- α (TNF- α) の発現増大が認められ、この増大反応は HMGB1 特異的単クローン抗体投与によって有意に抑えられた。また、データには示さないが、ゼラチンゼイモグラフィによる解析から、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の活性化も HMGB1 特異的単クローン抗体投与によって同様に抑えられることも明らかとなった。

4. おわりに

本稿において、ラット脳梗塞モデル (中大脳動脈 2 時間閉塞再灌流モデル) の系を用いて、HMGB1

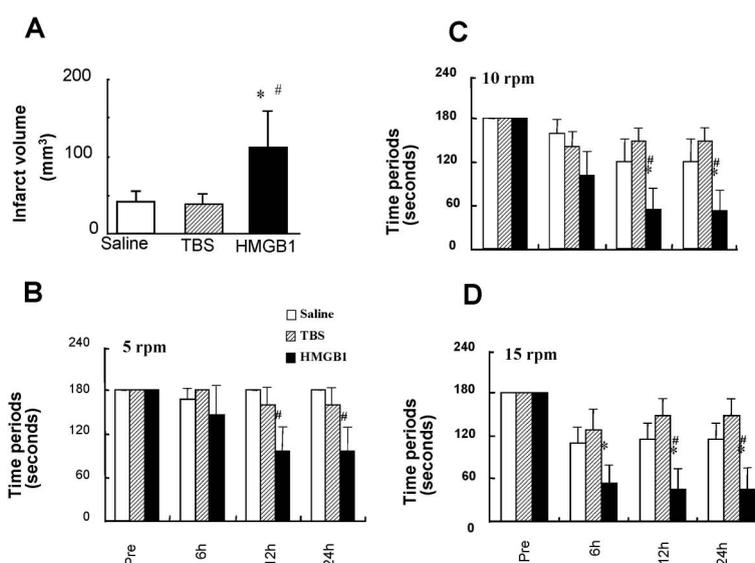


Fig. 5. Effect of Intracerebroventricular Injection of HMGB1 on Brain Infarction induced by MCA Occlusion

(A) Effect of intracerebroventricular injection of HMGB1 on brain infarction by MCA occlusion was determined by TTC staining. (B-D) Neurological deficits in rats treated with intracerebroventricular injection of HMGB1 were examined by rota-rod test. cited from Ref. 2).

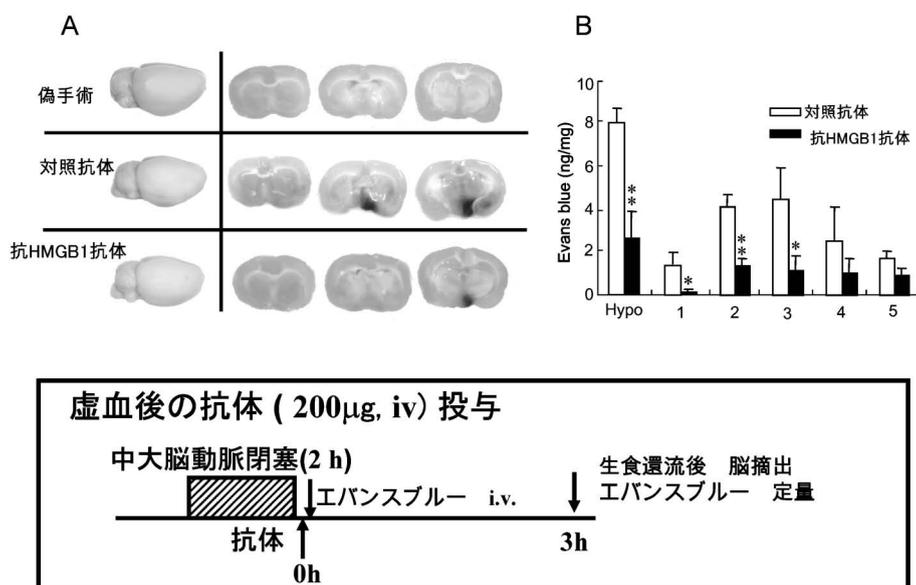


Fig. 6. Effect of Anti-HMGB1 Monoclonal Antibody on Evans Blue Leakage in Brain of MCA-Occluded Rats

(A) Evans Blue was administered intravenously immediately after reperfusion, and dye leakage was measured 3 h after reperfusion. (B) Evans Blue leakage was determined spectrophotometrically after extraction. cited from Ref. 2).

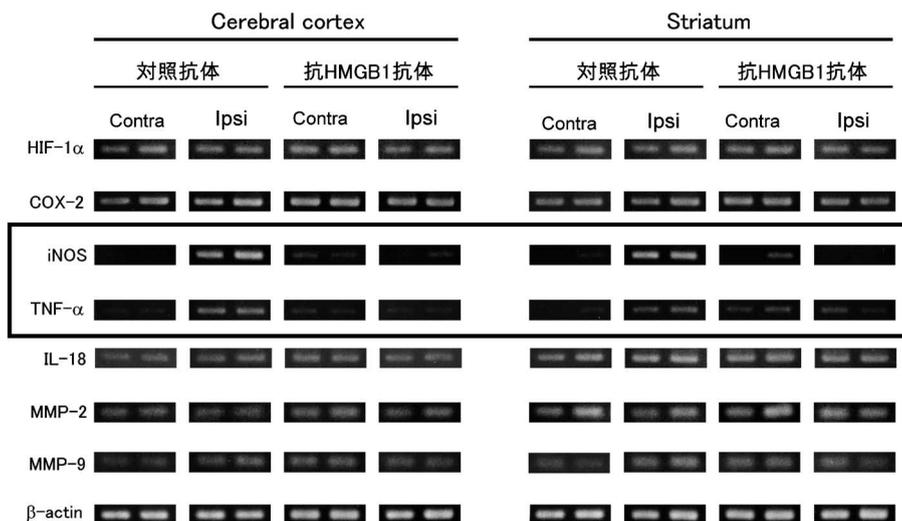


Fig. 7. RT-PCR Analysis of Expression of Inflammation-Related Molecules in Brain of MCA-Occluded Rats

Total RNA was extracted from brain of MCA-occluded rat, and RT-PCR was performed using the primer pairs. cited from Ref. 2).

が脳梗塞病態の増悪化因子として働くこと、並びに HMGB1 特異的単クローン抗体の静脈投与が梗塞病態の進展を劇的に抑制することを示した。驚くべきことに、単クローン抗体によるこの脳保護作用は、再灌流後に抗体を投与しても効果を発揮し得るものであった。解析の結果、HMGB1 特異的単クローン抗体の投与によって、脳梗塞領域の縮小、神経症状や組織破壊の軽減化、血管透過性亢進の抑制、iNOS, TNF- α , MMP-9 の発現・活性化の抑制など

が観察された。MMP-9 活性化が血液脳関門の破綻に関与し、脳梗塞の増悪化を引き起こすことが報告されている。^{9,10)} したがって、抗 HMGB1 抗体による MMP-9 活性化の抑制作用は、脳梗塞領域における微小循環系や神経-マトリックス間の相互作用を破壊することによって生じる脳梗塞病態を抑え、結果的に脳梗塞治療につながっていると考えられる。

脳梗塞をはじめとする虚血性脳疾患は、本邦における死因の上位を占めるだけでなく、いったん発症

すると再発のリスクも高く、医療的・社会的損失も極めて大きい。現在、梗塞治療を目的としたいくつかの臨床治験候補（ラジカルスカベンジャー、グルタミン酸受容体拮抗薬、PPAR- γ 阻害剤など）が既に報告¹¹⁻¹⁴⁾されているものの、いずれも治療効果は高いとは言えず、実用化に向けてのハードルが高いのが現状である。したがって、本稿にて示した HMGB1 特異的単クローン抗体による脳梗塞治療は、モデル実験において梗塞領域の縮小（再灌流 24 時間後で約 90% の縮小）や梗塞時の運動機能麻痺の軽減化などで著効性を示しており、このことは HMGB1 を標的とする治療法の開発が極めて有望であることを裏付ける知見と言える。^{2,15)} 現在のところ、HMGB1 がいかなる経路を介して、脳梗塞病態の増悪化に関与しているかについては不明であるが、HMGB1 の受容体として、これまでに Toll 様受容体-4 や 2 などが報告^{16,17)}されているので、培養細胞などを用いた HMGB1 の細胞内シグナル伝達研究を推進して行くことは、これからの研究課題として重要である。また、今後の抗体医薬としてのヒトへの臨床応用を考えた場合に、ヒト化抗体の作製並びに中動物モデル系を用いた抗体の体内動態や治療効果の検証がこれからの課題となるであろう。また、抗体以外の HMGB1 を標的とした低分子遮断薬の開発も全く新しい虚血性脳障害治療薬開発の道を拓くと言う意味で極めて意義あるものと思われる。

謝辞 本稿で紹介しました研究において、ご協力とご指導を賜りました友野靖子先生（重井医学研究所）、吉野 正先生（岡山大学）、足立尚登先生（愛媛大学）、五味田 裕先生（就実大学）、下村恭一先生（就実大学）、渡辺雅彦先生（就実大学）に、この場をお借りして感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Astrup J., Siesjo B. K., Symon L., *Stroke*, **12**, 726-730 (1981).
- 2) 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).
- 3) Lotze M. T., Tracey K. J., *Nat. Rev. Im-*

- munol.*, **5**, 331-342 (2005).
- 4) Ulloa L., Tracey K. J., *Trends Mol. Med.*, **11**, 56-63 (2005).
- 5) Marenholz I., Heizmann C. W., Fritz G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **322**, 1111-1122 (2004).
- 6) Parkkinen J., Rauilo E., Merenmies J., Nolo R., Kajander E. O., Baumann M., Rauvala H., *J. Biol. Chem.*, **268**, 19726-19738 (1993).
- 7) 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).
- 8) Bederson J. B., Pitts L. H., Tsuji M., Nishimura M. C., Davis R. L., Bartkowski H., *Stroke*, **17**, 472-476 (1986).
- 9) Aoki T., Sumii T., Mori T., Wang X., Lo E. H., *Stroke*, **33**, 2711-2717 (2002).
- 10) Asahi M., Wang X., Mori T., Sumii T., Jung J. C., Moskowitz M. A., Fini M. E., Lo E. H., *J. Neurosci.*, **21**, 7724-7732 (2001).
- 11) Maeda M., Furuichi Y., Ueyama N., Moriguchi A., Satoh N., Matsuoka N., Goto T., Yanagihara T., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 1205-1211 (2002).
- 12) Nishi H., Watanabe T., Sakurai H., Yuki S., Ishibashi A., *Stroke*, **20**, 1236-1240 (1989).
- 13) Roussel S., Pinard E., Seylaz J., *Hypertension*, **19**, 40-46 (1992).
- 14) Shimazu T., Inoue I., Araki N., Asano Y., Sawada M., Furuya D., Nagoya H., Greenberg J. H., *Stroke*, **36**, 353-359 (2005).
- 15) Oozawa S., Mori S., Kanke T., Takahashi H., Liu K., Tomono Y., Asanuma M., Miyazaki I., Nishibori M., Sano S., *Circ. J.*, **72**, 1178-1184 (2008).
- 16) Park J. S., Gamboni-Robertson F., He Q., Svetkauskaite D., Kim J. Y., Strassheim D., Sohn J. W., Yamada S., Maruyama I., Banerjee A., Ishizaka A., Abraham E., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **290**, C917-924 (2006).
- 17) Yu M., Wang H., Ding A., Golenbock D. T., Latz E., Czura C. J., Fenton M. J., Tracey K. J., Yang H., *Shock*, **26**, 174-179 (2006).