

外傷性脳傷害に対する抗 HMGB-1 抗体治療

大熊 佑^{a,b,c*}, 劉 克約^b, 和気秀徳^b, 春間 純^{a,b}, 吉野 正^d, 大塚愛二^e,
高橋英夫^f, 森 秀治^g, 西堀正洋^b, 伊達 勲^a

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a脳神経外科学, ^b薬理学, ^d病理学 (腫瘍病理), ^e人体構成学,
^c広島市立広島市民病院 脳神経外科, ^f近畿大学医学部 薬理学, ^g就実大学薬学部 応用薬学分野

キーワード: HMGB-1, traumatic brain injury (頭部外傷), secondary injury (二次的損傷),
blood brain barrier (血液脳関門)

Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury

Yu Okuma^{a,b,c*}, Keyue Liu^b, Hidenori Wake^b, Jun Haruma^{a,b}, Tadashi Yoshino^d, Aiji Ohtsuka^e,
Hideo K Takahashi^f, Shuji Mori^g, Masahiro Nishibori^b, Isao Date^a

Departments of ^aNeurological Surgery, ^bPharmacology, ^dPathology, ^eHuman Morphology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^cDepartment of Neurological Surgery, Hiroshima City Hospital, ^fDepartment of Pharmacology, Kinki University Faculty of Medicine, ^gShujitsu University, School of Pharmacy

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, 治療法は未だ確立されていない¹⁻³. 我々は, damage associated molecular patterns の一つであり, 脳虚血時の二次的損傷に関与する HMGB-1 に注目した^{4,5}.

HMGB-1 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⁶⁻⁸. 我々は, 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) 抗体を作成し, 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, 今回我々はラット・マウス脳外傷 (traumatic brain injury; TBI) モデルを作成し, 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.

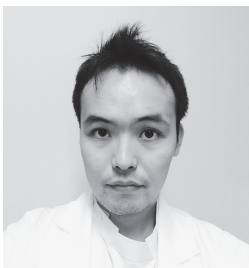
脳外傷に対する抗 HMGB-1 単クローン抗体の効果

Wistar 系雄性ラットを用い, fluid percussion による TBI モデルを作成した⁹. 受傷後, ①抗 HMGB-1 抗体または class-matched control 抗体を尾静脈から投与した. ②組み換え体 HMGB-1 またはアルブミンを投与した. さらに, C57BL6J 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,

平成25年5月受理

*〒730-8518 広島県広島市中区基町7-33
広島市立広島市民病院 脳神経外科
電話: 082-221-2291 FAX: 082-223-1447
E-mail: y8u2bear4@hotmail.com

プロフィール



大熊 佑

昭和56年生まれ

平成19年3月 岡山大学医学部医学科卒業

平成19年4月 広島市立広島市民病院 初期臨床研修医

平成21年4月 岡山大学病院 脳神経外科 医員 (レジデント)

平成25年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了

平成25年4月 広島市立広島市民病院 脳神経外科 医師

現在に至る

fluid percussion による TBI モデルを作成した。受傷後、抗 HMGB-1 抗体または class-matched control 抗体を尾静脈から投与した。

1. 抗 HMGB-1 抗体が HMGB-1 の translocation を抑制する

抗 HMGB-1 抗体と抗 MAP-2 抗体を用いた二重免疫染色において、HMGB-1 が細胞核内→細胞核外→細胞外と translocation することが組織学的に示された (図1)。

また、Western blotting 法では脳組織内の HMGB-1 量が減少し、ELISA 法では血中 HMGB-1 濃度が上昇した。抗 HMGB-1 抗体投与により、これらがいずれも抑制された (図2)。

2. 抗 HMGB-1 抗体が神経細胞死や血液脳関門破綻を抑制する

組織評価により、受傷部位周囲に神経細胞死を示す変化を認めたが、抗 HMGB-1 抗体投与により抑制された。また、尾静脈より色素である Evans blue (EB) を投与し、EB の漏出量を定量すると、抗 HMGB-1 抗体投与により、9 割近く抑制された。電子顕微鏡による観察では、受傷部位周囲において、アストロサイト細胞終足部の浮腫状変化を中心に血液脳関門の構造破綻を認めたが、抗 HMGB-1 抗体投与により、これらの変化が抑制された (図3)。

3. 抗 HMGB-1 抗体が脳損傷後の浮腫状変化を抑制する

3T-MRI の T2WI の結果、受傷部位とその周囲において、浮腫状変化を示唆する high intensity area を認めたが、抗 HMGB-1 抗体投与により、その浮腫状変化が受傷後3時間後、6時間後、24時間後、いずれにおいても著明に抑制された (図4)。

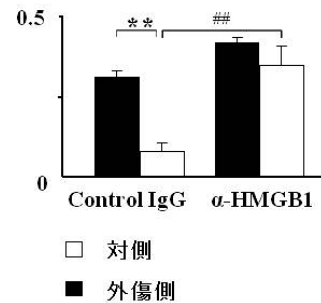
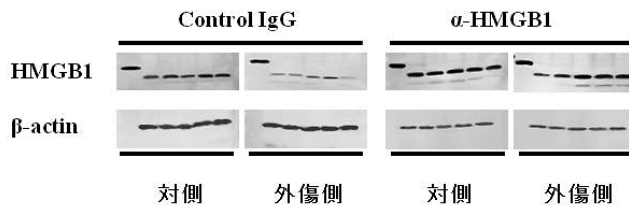
4. 抗 HMGB-1 抗体が炎症性変化を抑制する

Zymography 法ではマトリックスメタロプロテアーゼ-2、9 いずれの活性化も、抗 HMGB-1 抗体投与により抑制された (図5)。また、real time PCR 法においては、HIF-1 α 、COX-2、VEGF-A、IL-8r などの mRNA の発現が、抗 HMGB-1 抗体投与によって有意に抑制されたが、その中でも特に、TNF- α 、iNOS 発現が3時間の段階から、著明に抑制された。また、血管内皮と関連深い PAI-1 や好中球と関連深い neutrophil elastase でも抑制を認めた (図6)。

5. 抗 HMGB-1 抗体が行動学的障害を抑制する

Rotarod テストにて3時間後、6時間後、24時間後の協調運動機能を評価したところ、抗 HMGB-1 抗体投与により、6時間後の段階以後、有意に改善した。また、cylinder テストにて評価した、laterality の優位性では、抗 HMGB-1 抗体投与により、24時間後で有意に改善した (図7)。

外傷後24時間後、脳実質



血中HMGB-1濃度

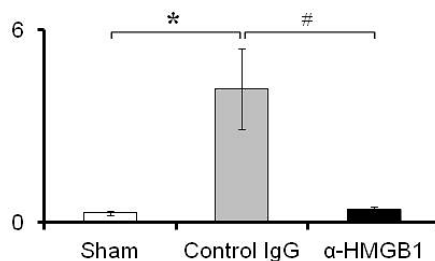


図2 脳実質、血中の HMGB-1 定量 (文献1より改変して引用)

6. 組み換え体 HMGB-1 投与は脳損傷を増悪させる
 軽微な TBI モデルに組み換え体 HMGB-1 を投与すると、EB の漏出量を増加させており、血液脳関門の構造的破綻を増悪させた。また、rotarod テストでの評価でも、機能予後を増悪させた。

7. 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, TLR 2, TLR 4 のノックアウトマウスでの TBI モデルに、抗 HMGB-1 抗体を投与すると、EB の漏出量、rotarod

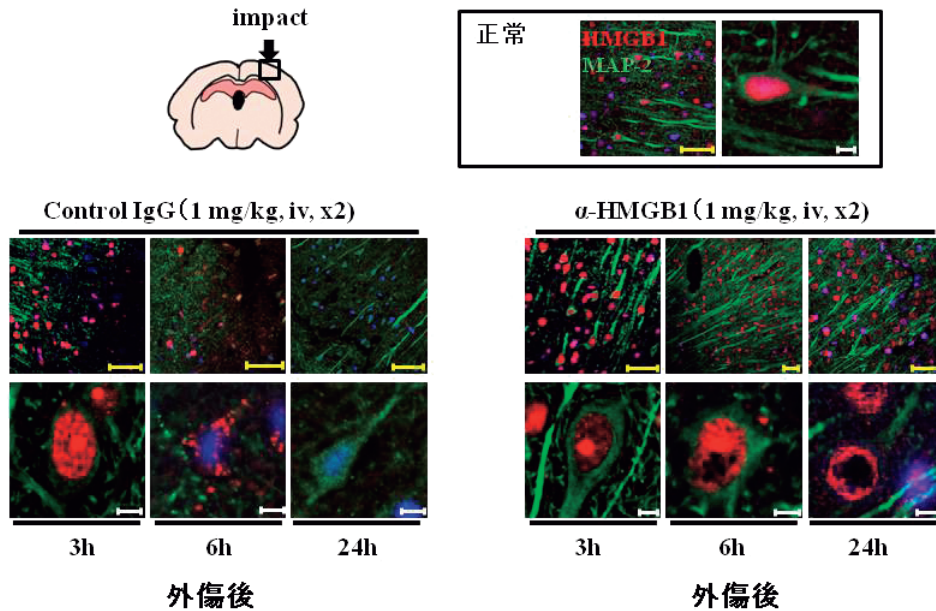


図1 抗 HMGB-1 抗体と抗 MAP-2 抗体を用いた二重免疫染色（文献 1 より改変して引用）

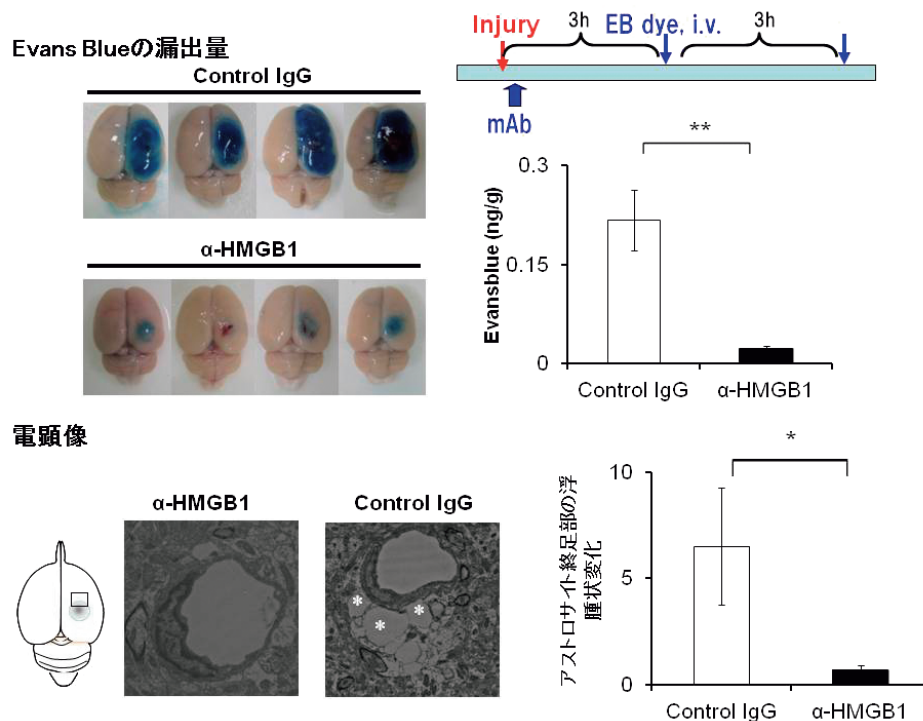


図3 血液脳関門の機能破綻と構造的破綻の評価（文献 1 より改変して引用）

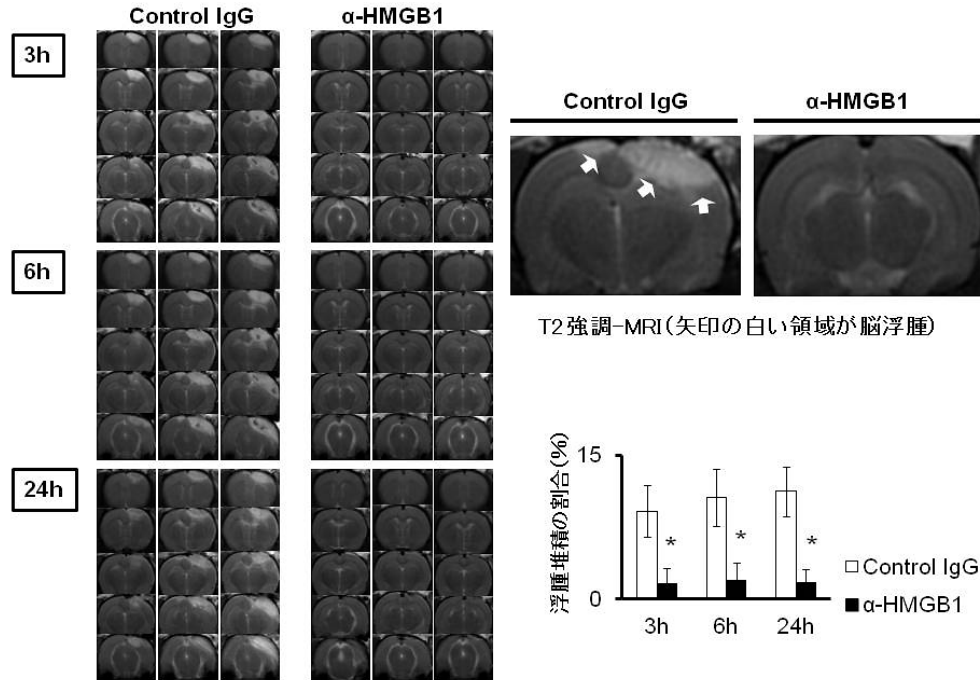


図4 MRIのT2WIを用いた浮腫状変化の推移（文献1より改変して引用）

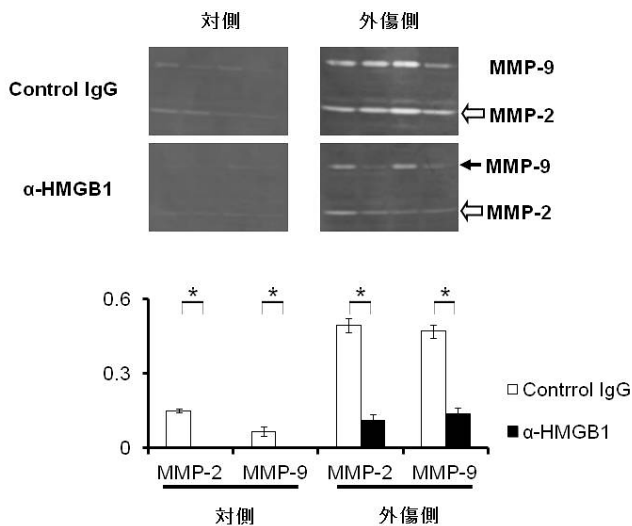


図5 Zymography法を用いたマトリックスメタロプロテアーゼの活性化評価（文献1より改変して引用）

テストでの協調運動機能評価、いずれもワイルドタイプに比し、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。

8. 外傷後3時間後でも抗HMGB-1抗体は治療効果を示す

外傷後3, 6時間後のTBIモデルに抗HMGB-1抗

体を投与すると、EBの漏出量による血液脳関門破綻の評価においては受傷後6時間後まで、またrotarodテストでの運動機能評価においては、受傷後3時間後までは、機能予後を改善させた（図8）。

考 察

我々は、抗HMGB-1抗体投与により、HMGB-1のtranslocationを抑制すること、神経細胞死や血液脳関門の機能的・構造的破綻を抑制すること、脳の浮腫状変化を抑制すること、機能障害を改善させること、炎症性反応の惹起を抑えることを報告した。また、組み換え体HMGB-1投与が脳損傷を増悪させること、RAGEノックアウトマウスでは抗HMGB-1抗体が効果を示さないことも併せて報告した¹⁰⁻¹³。

細胞内のHMGB-1のtranslocationという側面において、核内→核外→細胞外という流れを認めたが、これは、虚血性脳損傷の際と類似している。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、脳の浮腫状変化といった二次的損傷を惹起することは、我々を含め、既に報告されている。我々の抗HMGB-1抗体が、虚血性脳損傷に効果があることも、既に証明している。また、我々の組み換えHMGB-1は、in vitro

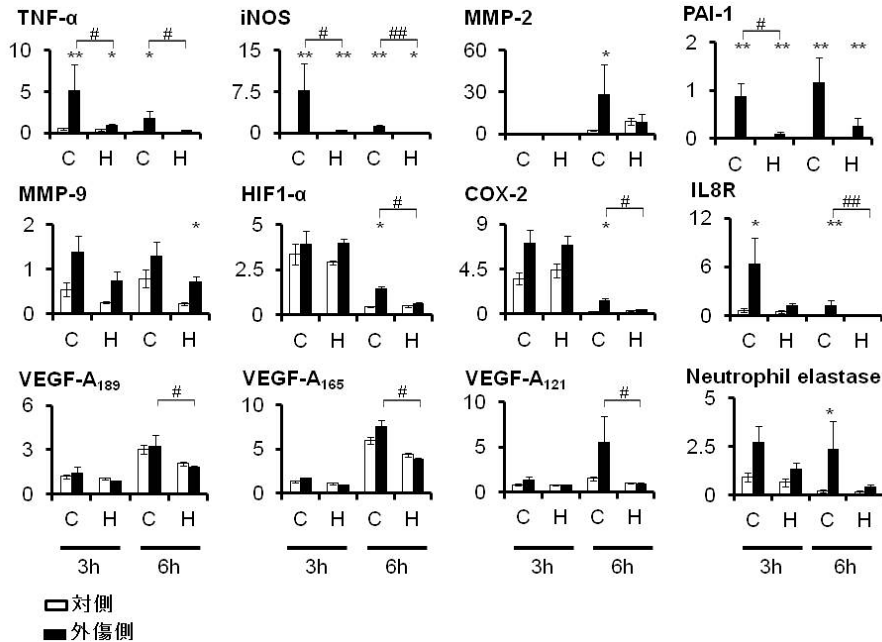
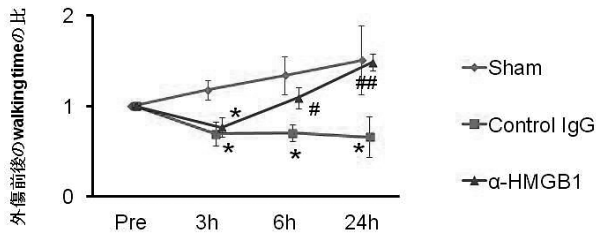


図6 real time PCR 法を用いた炎症関連物質の定量 (文献1より改変して引用)

Rotarod test



Cylinder test

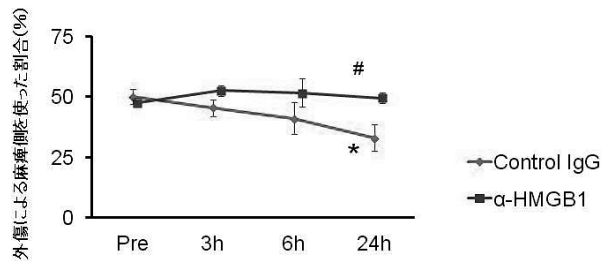


図7 行動学的評価 (文献1より改変して引用)

での血液脳関門モデルでの構造破綻・機能破綻を惹起すること、抗 HMGB-1 抗体投与はそれを抑制することも、それぞれ既に証明している^{4,5)}。

更に、今回の実験により、放出された HMGB-1 の受容体としていくつかの受容体が関与していること¹⁴⁾、特に RAGE が密接に関与していることを証明できた。また血管内皮や好中球が関与することも証明できた。

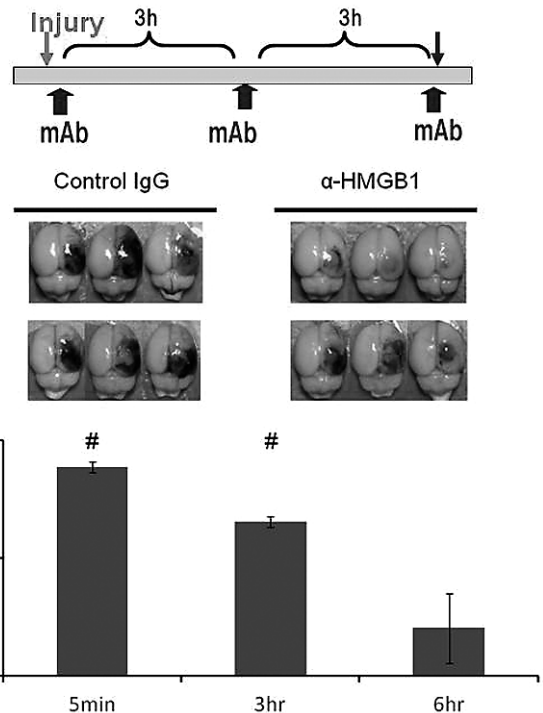


図8 Time window の評価

以上から、外傷性脳損傷において、その受傷に伴う primary な損傷と共に、HMGB-1 の translocation が起こる。それに伴い、ミクロでは RAGE などの受容体が、マクロでは好中球や血管内皮などがそれぞれ関与し、炎症性反応が惹起される。血液脳関門の構造的機

能的破綻，脳の浮腫状変化といった二次的損傷が起こり，その損傷が更に HMGB-1 の translocation を引き起こすという，負のサイクルが回る．その結果，更なる細胞死が起き，機能予後を悪化させる，といった流れが示唆された．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より，劇的な治療効果を得られたと考えた¹⁾．

更に，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，治療効果を認めたことである¹⁾．このことは，実臨床に即しており，今後の臨床応用が期待される．

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期待がもたれる．

文 献

- 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, et al. : Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Therapy for Traumatic Brain Injury. *Ann of Neurol* (2012) 72, 373-384.
- 2) Rockett IRH, Smith GS : Injury related to chronic disease : international review of premature mortality. *Am J Public Health* (1987) 77, 1345-1347.
- 3) Daly K, Thomas P : Trauma death in the south west Thames region. *Injury* (1992) 23, 393-396.
- 4) Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M : Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* (2007) 21, 3904-3916.
- 5) Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, 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* (2011) 42, 1420-1428.
- 6) Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, et al. : HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* (1999) 285, 248-251.
- 7) Lotze MT, Tracey KJ : High-mobility group box1 protein (HMGB1) : nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev* (2005) 5, 331-342.
- 8) Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME : Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* (2002) 418, 191-195.
- 9) Otani N, Nawashiro H, Fukui S, Nomura N, Shima K : Temporal and spatial profile of phosphorylated mitogen-activated protein kinase pathways after lateral fluid percussion injury in the cortex of the rat brain. *J Neurotrauma* (2002) 19, 1587-1596.
- 10) 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.
- 11) Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO : The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1788, 842-857.
- 12) Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK : The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol* (2001) 24, 169-181.
- 13) Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL : Edema and brain trauma. *Neuroscience* (2004) 129, 1021-1029.
- 14) Myint KM, Yamamoto Y, Doi T, Harashima A, Yonekura H, Watanabe T, Shinohara H, Takeuchi K, Tsuneyama K, Hashimoto N, Asano M, Takasawa S, et al. : RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model. Effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin. *Diabetes* (2006) 55, 2510-2522.