

受賞対象論文

Fu L, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Yoshino T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M : Therapeutic effects of anti-HMGB1 monoclonal antibody on pilocarpine-induced status epilepticus in mice. *Sci Rep* (2017) 7, 1179.

富 麗

Fu Li

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬理学

Department of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences



<プロフィール>

昭和62年生まれ

平成22年7月 中国武漢生物エンジニアリング大学製薬学科卒業
 平成22年9月 中国大連医科大学薬学(薬理学一般コース) 修士課程入学
 平成23年10月 O-NECUS プログラム短期留学
 平成25年7月 中国大連医科大学薬学(薬理学一般コース) 修士課程修了
 平成25年10月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学
 平成29年9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29年12月 香港科技大学生命科学研究科 ポスドク
 現在に至る

研究の背景と経由

私は岡山大学と中国東北部5大学の留学交流プログラム(略称O-NECUS)のお陰で、留学生として薬理教室の西堀正洋教授のご指導の下に研究を始めました。てんかん治療には、多くの種類の薬物が開発されていますが、イオンチャンネルに直接作用するものがほとんどです。難治性てんかんは、てんかん患者の20~30%を占め、このグループに対しては現行の治療薬は効きません。近年、細胞核内タンパク質HMGB1が、神経細胞外へ放出されると病原体に対する免疫応答の主要な受容体の1つTLR4と結合して、てんかん発作を引き起こす可能性が報告されました¹⁾。我々の研究グループは、抗HMGB1抗体を作製しており、脳卒中(脳梗塞、脳出血、くも膜下出血)の動物モデルを用いて、抗HMGB1単クローン抗体(mAb)の効果を評価してきました²⁻⁶⁾。抗HMGB1抗体の作用機序解析から、抗体は血液-脳関門保護と脳内炎症抑制に働き、劇的な脳浮腫抑制作用を発揮することを証明しました。今回炎症性サイトカインであるHMGB1が、特に血液-脳関門の破綻及び炎症プロセスの誘導を介して、てんかん発症に関与する可能性があるという仮説を立てました。本仮説を検証するために、薬物誘発てんかんにおけるHMGB1の動態と抗HMGB1抗体投与の効果を評価しました。

研究結果の内容

本研究では、薬物誘発てんかんモデル動物を用いて、血液-脳関門の破綻と脳内炎症反応におけるHMGB1の役割を検討し、抗HMGB1抗体のてんかん治療薬の可能性を評価しました。末梢性ムスカリン受容体遮断のため、メチルスコポラミン(1mg/kg/IP)を30分前に投与し、ムスカリン受容体アゴニストのピロカルピン(350mg/kg/IP)末梢投与によるマウス脳の興奮性を生じさせ、てんかん誘発モデルを作製しました。その後、抗HMGB1抗体及び対照抗体は1mg/kgの用量を静注し、抗HMGB1抗体の効果を検討しました。

1. 誘発てんかん発症の潜伏期の延長効果

ピロカルピン誘発されたてんかん発作の行動をRacineステージ分類で評価しました。ピロカルピン誘発てんかんの4時間前に抗HMGB1抗体の前処置を行うことにより、Racineステージ5への潜伏期と死亡までの時間を短縮させ、さらにピロカルピン投与直後に抗HMGB1抗体処置することで、てんかん発症までの時間及びRacineステージ5への潜伏期を延長させる効果がみられました。

2. 血液-脳関門の透過性亢進の抑制効果

血管透過性に対する抗HMGB1抗体の効果について、エバンスブルー漏出を指標として評価しました。対照抗体と比較すると、ピロカルピン誘発てんかん動

物モデルの脳の視床から周囲へ広がったエバンスブルーの漏出を抗 HMGB1 抗体投与により抑制しました。リコンビナント HMGB1 末梢から投与すると、エバンスブルーの漏出が増加しました。

3. HMGB1 のトランスロケーションの抑制効果

てんかんモデル動物の脳を抗 HMGB1 抗体を用いて免疫組織化学的に染色しました。対照抗体投与群ではピロカルピン投与 4 時間後、細胞核内 HMGB1 陽性を示す細胞数が大脳皮質ならびに海馬領域ともに低下していましたが、抗 HMGB1 抗体投与群ではこのような低下は認められませんでした。さらに、循環血液中の HMGB1 を測定しました。ピロカルピン投与群では血中 HMGB1 レベルの有意な上昇が見出されました。一方、抗 HMGB1 抗体投与群では上昇は認められませんでした。てんかん発症によって細胞核内局在の HMGB1 は細胞外へ移動することが確認できました。HMGB1 のトランスロケーションは中和抗体で抑制されました。

4. 炎症性サイトカインの抑制効果

リアルタイム PCR 法を用いて、脳皮質と海馬領域の炎症性サイトカインを調べました。その結果、MCP-1, CXCL-1, TLR-4, 及び IL-6 の発現は、ピロカルピン投与群にて増加傾向にあり、一方、抗 HMGB1 抗体投与群ではいずれも抑制効果が認められました。

5. 誘発てんかん発作後、神経細胞のアポトーシスの改善効果

てんかん発作の急性期に炎症反応に深く関与する IL-1 β の発現は、海馬の CA3 領域および視床の広い範囲に分布していました。抗 HMGB1 抗体投与群では IL-1 β の陽性細胞数が著明に減少しました。

研究結果の意義

てんかんは、日本において全人口の約 1 % の人に発症する慢性神経疾患であり、発症年齢、発症原因、症状は様々です。薬剤治療が有効でないてんかんは難治てんかんと呼ばれています。現在、てんかんの治療は薬物治療が主流で、難治性てんかんに対しては外科手術による治療も検討されています。患者家族の精神的・経済的負担は大きく、その社会的支援の必要性が問われています。

てんかん発症における HMGB1 の関与を解明できれば、そのメカニズム及び治療に新しい展開が期待されます。単にてんかん発作の治療にとどまることなく、患者および保護者や家族の精神的・経済的な負担の軽減につながります。

今後の展開や展望

今回の研究は、薬物誘発てんかんの急性期における

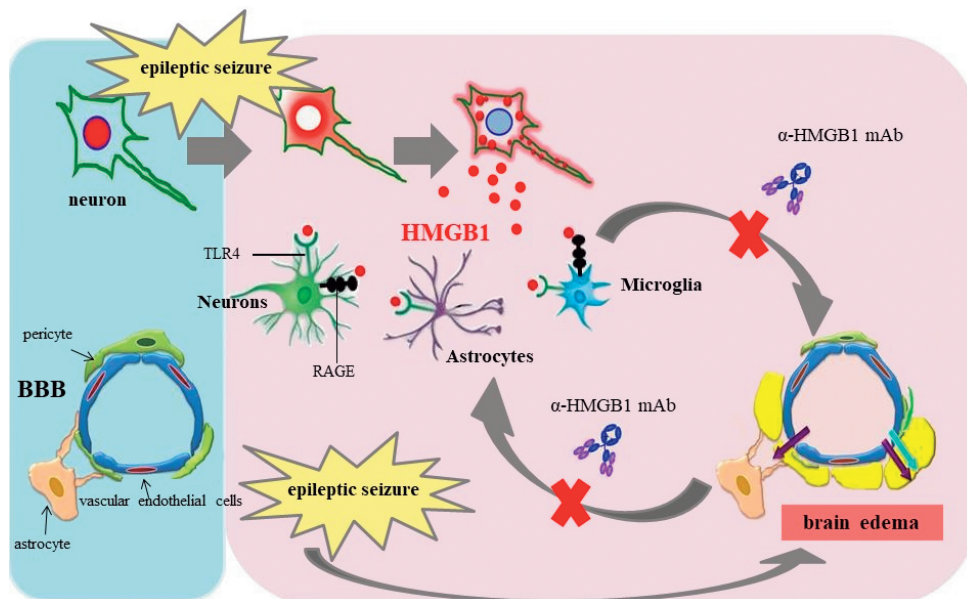


図 薬物誘発てんかんモデルにおける抗 HMGB1 抗体の作用機序

抗 HMGB1 抗体の治療効果を示しました。脳の一部に傷がついたことで起こるてんかんは症候性てんかんと呼ばれています。このような脳の慢性疾患に起因したてんかんに対する抗 HMGB1 抗体治療の可能性を検討することが、今後の課題と考えています。

文 献

- 1) Maroso M, Oby E, Batra A, Uva L, De Curtis M, et al. : Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med* (2010) 16, 413-419.
- 2) Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, et al. : Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* (2007) 21, 3904-3916.
- 3) Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, et al. : Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke* (2011) 42, 1420-1428.
- 4) Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, et al. : Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* (2012) 18, 911-917.
- 5) Haruma J, Teshigawara K, Hishikawa T, Wang D, Liu K, et al. : Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody attenuates delayed cerebral vasospasm and brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Sci Rep* (2016) 6, 37755.
- 6) Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, et al. : Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol* (2012) 72, 373-384.

平成30年11月29日受稿
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話：086-235-7138 FAX：086-235-7138
E-mail：yakuri@md.okayama-u.ac.jp