

## 受賞対象論文

Haruma J, Teshigawara K, Hishikawa T, Wang D, Liu K, Wake H, Mori S, Takahashi HK, Sugiu K, Date I, Nishibori M : 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.

春 間 純  
Jun Haruma

福山市民病院 脳神経外科  
Department of Neurosurgery, Fukuyama City Hospital



## &lt;プロフィール&gt;

昭和56年生まれ  
平成19年3月 久留米大学医学部医学科卒業  
平成19年4月 広島市立市民病院 初期研修医  
平成21年4月 広島市立市民病院 脳神経外科 後期研修医  
平成23年4月 岡山大学病院 脳神経外科 医員  
平成24年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経外科学 研究員  
平成27年11月 岡山大学病院 脳神経外科 医員  
平成29年1月 福山市民病院 脳神経外科 科長  
現在に至る

## 研究の背景と意義

くも膜下出血 (SAH) は病変部位の再出血予防を行っても、出血による脳損傷と脳血管攣縮による脳循環動態の悪化をきたし、重篤な合併症をきたす疾患である。脳血管攣縮の主病態は脳血管平滑筋の収縮であり、その原因の一因として神経炎症の関与も、基礎研究および臨床研究においてよく知られている<sup>1)</sup>。実臨床では脳血管攣縮治療として、Rho キナーゼ阻害剤である塩酸ファスジルやトロンボキサン合成酵素阻害剤であるオザグレルナトリウムが標準治療となっている。しかしながら、病態の劇的な改善には至っておらず、さらなる治療薬の開発が期待されている。

High mobility group box 1 (HMGB1) はクロマチン DNA を支えるタンパク質であり、damage-associated-molecular-pattern (DAMP) family に属している。HMGB1 は障害を受けた細胞から受動的に放出され、receptor for advanced glycation end products (RAGE) や toll-like receptors-2 または 4 (TLR-2, 4) などの受容体を介して、炎症を惹起する。この HMGB1 の放出のメカニズムは敗血症や急性膵炎などの様々な疾患で報告されている<sup>2)</sup>。中枢神経系疾患である虚血性脳卒中、頭部外傷や脊髄損傷において、HMGB1 は同様に神経炎症の一因子として作用すると報告されてい

る<sup>3,4)</sup>。抗 HMGB1 抗体は頭部外傷や虚血性脳卒中モデルラットにおいて、放出された HMGB1 を中和し、炎症のカスケードを防止することにより、治療効果を示すと考えられている。今回、我々は SAH モデルラットに対する抗 HMGB1 抗体の血管攣縮抑制効果について形態学的・行動学的・免疫組織学的に評価し、そのメカニズムについても検討した。

## 研究成果の内容

ラット自己血を用いて、ラットくも膜下出血 (SAH) モデルを作製した。抗体投与は治療群には抗 HMGB1 抗体 (免疫グロブリン, [IgG] 2a subclass, 1 mg/kg, 溶媒: PBS) を、対照群には class matched control 抗体 (keyhole limpet hemocyanin に対する抗体) を SAH モデル作製直後と24時間後にそれぞれ、尾静脈から静脈内投与した。

まず SAH 後の脳血管攣縮評価を行った。方法は動物用 CT 装置を用いた computed tomographic angiography (CTA) を行い、SAH モデル作製2日前とモデル作製2日後に撮影し血管攣縮の程度を同一個体で観察した。観察血管は脳底動脈で評価し、抗 HMGB1 抗体の投与により、SAH モデル作製2日後の脳底動脈の血管攣縮は、対照群に比べ、有意に抑制さ

れており、抗体投与により血管攣縮が抑制されることが示唆された。

次に血管収縮関連因子の評価を行うために、摘出した脳血管を real time polymerase chain reaction (RT-PCR) で血管収縮関連受容体の発現を検出した。抗体投与群において、トロンビン受容体等の発現が有意に抑制されていた。実際に脳底動脈を摘出し、両端を緩まないように把持した状態で人工髄液内に漬け、トロンビンを少量ずつ投与し、トロンビンに対する収縮反応を force transducer 装置で計測した。血管収縮反応が生じたトロンビン濃度を測定し、血管収縮反応は対照群では低濃度トロンビンに対して血管収縮反応を呈したが、治療群では認められなかった。これらの結果から、抗体投与は血管収縮因子発現を抑制し、血管収縮応答を助長させないことが示された。

続いて SAH 後の HMGB1 評価を行うために、血漿中の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) と脳底動脈及び脳実質内の免疫組織評価を行った。脳実質内では対照群において、SAH モデル作製 2 日後か

らマイクログリア・アストロサイトの数が増加していたが、治療群ではマイクログリア数の上昇が有意に抑制されていた。形状についても、対照群ではアメーバ状の活性型マイクログリアが認められたが、治療群では樹枝状の非活性型マイクログリアの形態にとどまるものがほとんどであった。また、血漿中 HMGB1 濃度も抗体群で有意に低下しており、抗 HMGB1 抗体は、SAH 後の脳実質内の炎症反応も抑制する事が示唆された。

また脳血管自体の炎症反応の一因と考えられる HMGB1 の局在を免疫染色によって観察を行い、脳血管の RT-PCR にて炎症関連因子の発現を検出した。脳血管平滑筋層では、対照群において血管平滑筋細胞層で、HMGB1 が核内から細胞質に移動しており、HMGB1 の核外への放出が示唆されたが、治療群において、この現象は観察されなかった。また、Toll-like receptor 4 (TLR4), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) といった炎症関連因子の発現も抗体投与群で有意に抑制されていた。抗 HMGB1 抗体は血管平滑筋層における HMGB1 の核外

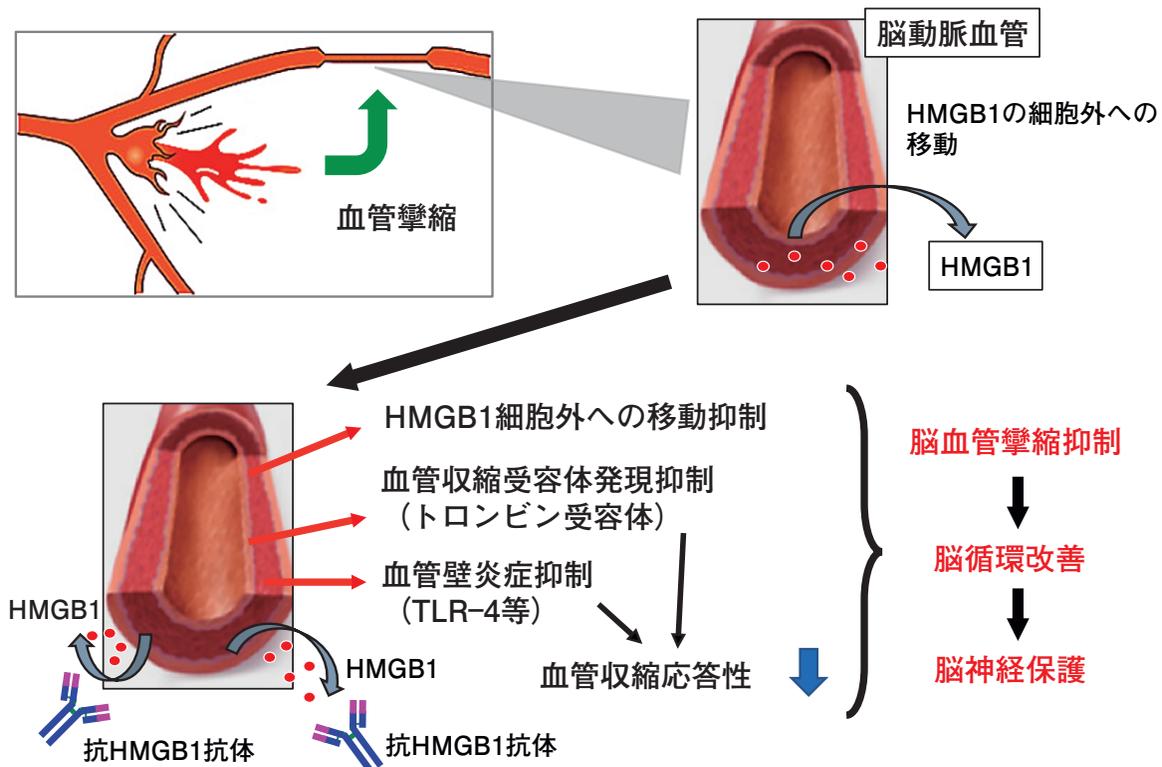


図 クモ膜下出血から脳血管攣縮と脳障害に至る過程

くも膜下出血後は脳血管攣縮をきたす。その一因として脳動脈血管内に存在する HMGB1 が細胞外へ移動し、血管壁炎症や血管収縮受容体発現を惹起する。抗 HMGB1 抗体は、HMGB1 の細胞外移動を抑制することで、血管壁炎症や血管収縮受容体発現を軽減させ、結果的に脳血管攣縮を抑制し、脳循環動態も改善する。これらの過程及び抗 HMGB1 抗体自身の脳実質への抗炎症効果により神経保護効果に寄与する。

移動を抑制することで、血管炎症を生じさせない事が示された。

最後に open field test を応用して5分間の走行距離を CCD カメラで測定し、その距離と平均走行速度の解析を行い、運動機能評価を行った。平均運動距離及び平均移動速度も治療群で有意な改善を認めた。これにより抗 HMGB1 抗体の静脈内投与は血管攣縮を抑制し、結果的に神経保護効果を示す事が示唆された。

## 研究成果の意義と今後の展開や展望

我々は、抗 HMGB1 抗体の静脈内投与が、SAH モデルラットにおいて、脳血管攣縮予防効果をもつことを世界で初めて示した。脳血管攣縮の病態には、様々な血管収縮関連因子や炎症性サイトカインの発現が関与すると報告されている<sup>5)</sup>。HMGB1 と SAH の病態に関する研究は少ないが、基礎や臨床研究で HMGB1 が炎症性サイトカインを誘導し、脳血管攣縮を誘発することが報告されている<sup>6)</sup>。今回の我々の研究でも対照群では SAH 後に血漿中 HMGB1 濃度が上昇しており、また脳血管において血管収縮関連因子や炎症性サイトカインが多く発現していた。一方、治療群においてはこれらの発現が有意に抑制されていた。抗 HMGB1 抗体自体にはこれら血管収縮因子を直接抑制するとの報告はこれまでない。従って、抗体投与により各炎症性サイトカインが抑制されることで、血管関連収縮因子の発現が抑制されたと思われる。脳底動脈の RT-PCR の結果から抗炎症効果の機序として、抗 HMGB1 抗体の直接的な薬理作用である HMGB1 そのものの中和だけでなく、TLR4 や IL-6 などの炎症性カスケードの抑制も示唆された。様々な疾患においても HMGB1 は様々な炎症性サイトカイン、特に TNF- $\alpha$ 、IL-6 などを活性化するという報告が多く、今回の研究と矛盾しなかった<sup>7)</sup>。また、脳実質内においてもミクログリアの集簇・増殖抑制が示された。神経炎症におけるミクログリアの働きはまだ十分に解明されていないが、SAH 後脳実質損傷の病態に関与している可能性は高

い。今回の研究では、治療群において SAH 後の神経症状も良好であった。この要因として、抗体投与が SAH 後の血管攣縮を抑制することで良好な脳循環維持に作用し、さらに脳実質内ミクログリアの増殖が抑制する事で神経保護作用にも寄与した可能性が示唆された。

今回はラットに対して抗 HMGB-1 抗体の有効性を証明した。今後は抗 HMGB-1 ヒト化抗体を作成予定であり、今後とも膜下出血後の症候性脳血管攣縮に対する新しい治療選択肢として期待される。

## 文 献

- 1) Alaraj A, Charbel FT, Amin-Hanjani S : Peri-operative measures for treatment and prevention of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* (2009) 31, 651-659.
- 2) Andersson U, Tracey KJ : HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* (2011) 29, 139-162.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Eisenhut M : Vasospasm in cerebral inflammation. *Int J Inflam* (2014) 2014, 509707.
- 6) Zhu XD, Chen JS, Zhou F, Liu QC, Chen G, et al. : Relationship between plasma high mobility group box-1 protein levels and clinical outcomes of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation* (2012) 9, 194.
- 7) Zhou ML, Wu W, Ding YS, Zhang FF, Hang CH, et al. : Expression of toll-like receptor 4 in the basilar artery after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits : A preliminary study. *Brain Res* (2007) 1173, 110-116.

平成30年5月7日受稿  
〒721-8511 広島県福山市蔵王町5-23-1  
電話：084-941-5151 FAX：084-941-5159  
E-mail：j\_haruma@yahoo.co.jp