

# 主論文

## Combined effect of anti-high-mobility group box-1 monoclonal antibody and peramivir against influenza A virus-induced pneumonia in mice

(インフルエンザ肺炎モデルマウスに対する抗 HMGB1 抗体とペラミビル併用療法の治療的効果)

### 【諸言】

重症インフルエンザは依然として高い罹患率と致死率を有する。抗インフルエンザウイルス薬であるノイラミニダーゼ阻害薬 neuraminidase inhibitors (NAIs)は治療の第一選択肢である。しかし、2009年の H1N1 インフルエンザパンデミックでは効果が不十分である症例が少なからず存在した。今後発生しうるパンデミックに備え新たな治療選択肢の確立が急務である。重症インフルエンザでは過剰に産生される炎症性サイトカインがその病態に深く関与しており、抗ウイルス薬に抗炎症療法を併用することが有用と考えられる。我々は以前、マウスモデルを用いてインフルエンザ肺炎に対し Anti-high-mobility group box-1 monoclonal antibody (抗 HMGB1 抗体)が治療薬として期待できることを報告した。HMGB1 は細胞傷害や壊死により細胞核から放出され、炎症性サイトカインとして働くサイトカイン様のメディエーターである。今回我々は、NAI 単独では救命できない重症インフルエンザ肺炎モデルを作成し、このモデルに対する抗 HMGB1 抗体の併用投与の効果を検討した。

### 【材料と方法】

#### 倫理的配慮

本研究は岡山大学動物実験委員会の承認を受け実施した (No. OKU-2015424)。

#### NAI 単独では効果不十分なインフルエンザ肺炎モデルマウスの作成

マウス(C57BL/6、オス 9 週)にケタミン(50mg/kg)とペントバルビタール(30mg/kg)を腹腔内投与して鎮静・鎮痛を施した。インフルエンザウイルスはマウスに強毒性をもつ A/Puerto Rico/8/34(H1N1)を使用した。H1N1 を 25 $\mu$ l

のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に浮遊させ 1500PFU を経鼻感染させた。ウイルスを感染させた日を感染後 0 日とした。H1N1 を感染させた後、マウスを 1 : 対照抗体群、 2 : 抗 HMGB1 抗体群、 3 : ペラミビル+対照抗体群、 4 : ペラミビル+抗 HMGB1 抗体群の 4 群に分けた。感染後 1、2、3 日に対照抗体 (抗 Keyhole Limpet ヘモサイアニンモノクローナル抗体) または抗 HMGB1 モノクローナル抗体 (#10-22、免疫グロブリン G<sub>2a</sub>)をそれぞれ 7.5mg/kg ずつ尾静脈に投与し、さらに感染後 2、3 日にペラミビル (ラピアクタ<sup>®</sup>) 10mg/kg を筋肉注射にて投与した。

### 生存率解析

感染後 28 日までの生存率を解析した。

なお、我々のインフルエンザ肺炎モデルは非常に重症な肺傷害を呈し、ペラミビル治療をしていない群 (上記 1 と 2 群) では有用なサンプルが採取できなかったため、以下の実験はペラミビル治療群 (上記 3 と 4 群) にて施行し、ペラミビルに加えての抗 HMGB1 抗体の治療効果を調べた。

### 病理学的解析

感染後 5 日と 7 日に血液と気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、サイトカインとヒドロペルオキシドを測定し、肺の病理学的解析を施行した。BALF 採取は以下の通り施行した。マウスの左排気管支を結紮し気管を 1ml の PBS で洗浄した。得られた肺洗浄液は 4°C、10 分、2000rpm で遠心分離を行った。上清を-80°Cで保存しサイトカイン測定に用いた。沈渣を 200 $\mu$ l の PBS に浮遊させ総細胞数を測定した。Diff-Quick 染色を施行し細胞分類を行い、好中球数を算出した。

### 免疫染色

免疫染色は抗 podoplanin 抗体、抗 pan-cytokeratin 抗体、抗 ATP-binding cassette sub-family A member 抗体、抗 TLR4 抗体、抗 HMGB1 抗体を用いて施行した。

### リアルタイム PCR

マウス左肺中部から RNA を抽出し逆転写して cDNA を合成し、目的のプライマー（インフルエンザ A/PR8 ウイルス(H1N1)(M gene))を用いて遺伝子を増幅し、リアルタイム PCR 法にて遺伝子発現量を定量した。

#### TLR4、サイトカイン、ヒドロキシペルオキシドの測定

G-CSF、TNF- $\alpha$ 、CXCL1、MCP1、CCL3、CXCL10、RANTES は Luminex 法を用いて測定した（米国 Millipore 社）。TLR-4、IL-6 は ELISA キットを用いて測定した（TLR-4：中国 USCN Life Science 社；IL-6：米国 R&D 社）。血清中ヒドロキシペルオキシドはフリーラジカル解析装置を用いて測定した。測定単位は CARR U であり、1 CARR U は 0.08mg/dl hydrogen peroxide である。

#### 統計解析

データの比較には Mann-Whitney の U 検定を、生存曲線解析には log-rank(Mantel-Cox) 法を用いた。p<0.05 を統計学的有意と判断し、すべての統計学的解析には Prism6.0（米国 Graphpad ソフトウェア社）を使用した。

### **【結果】**

#### 抗 HMGB1 抗体併用により生存率を改善した

ペラミビルを使用しない群は感染 7、8 日でほぼ死亡した。HMGB1 抗体併用群（ペラミビル+抗 HMGB1 抗体）は 90.9%生存したのに対し、ペラミビル単独群（ペラミビル+対照抗体群）は 45.5%しか生存しなかった。感染後 5 日目と 7 日目における肺組織中のウイルスコピー数は HMGB1 抗体併用群とペラミビル単独群で有意差を認めなかった。BALF 中の TLR4 濃度は抗 HMGB1 抗体併用群にて低値であった。

#### 抗 HMGB1 抗体併用により肺傷害を抑制した

ペラミビル単独群では感染後 5 日以降、びまん性浮腫・肺胞と肺間質への炎症細胞浸潤・出血・気道の肥厚が認められた。抗 HMGB1 抗体併用群ではこれらの肺組織学的変化が軽減していた。

#### 抗 HMGB1 抗体併用により肺への好中球とマクロファージの浸潤を抑制した

抗 HMGB1 抗体併用群では感染後 5 日目において BALF 中の好中球数、マク

ロファージ数とも有意に減少していた。免疫染色でも同様の変化が認められた。

#### 抗 HMGB1 抗体併用により肺胞 1 型上皮細胞からの HMGB1 のトランスロケーションを抑制した

BALF 中の HMGB1 の起源を探るため、肺胞 1 型上皮細胞、肺胞 2 型上皮細胞、気管上皮細胞を免疫染色した。肺胞 1 型上皮細胞核からの HMGB1 のトランスロケーションが認められた。抗 HMGB1 抗体投与群では HMGB1 は核内に留まっていた。肺胞 2 型上皮細胞と気管上皮細胞からの明らかな HMGB1 の放出は認められなかった。

#### 抗 HMGB1 抗体併用によりサイトカイン反応と酸化ストレスを抑制した

抗 HMGB1 抗体併用群では、感染後 5 日目の BALF 中の TNF- $\alpha$ 、IL-6、G-CSF、CXCL-1、MCP-1、CCL3、RANTES、CXCL10 を抑制した。また、感染後 5 日目の血漿中のヒドロペルオキシドを抑制した。

#### **【考察】**

重症インフルエンザ肺炎に対して、抗ウイルス療法と抗炎症療法が重要な治療戦略である。我々は NAI 単独では効果が不十分なインフルエンザ肺炎モデルを作成し、NAI と抗 HMGB1 抗体の併用投与の効果を調べた。抗 HMGB1 抗体併用投与により、各種サイトカインや TLR4、酸化ストレスなどを抑制することで肺傷害を抑制し、生存率を改善した。なお、興味深いことに本抗体治療は肺におけるウイルスコピー数は減らさなかった。

TLR4 は HMGB1 の主なレセプターの一つである。インフルエンザ肺炎に対する TLR4 アンタゴニストの投与の効果が報告されており、今回は抗 HMGB1 抗体投与により TLR4 を抑制したことで HMGB1-TLR4-NF  $\kappa$ B-TNF $\alpha$  といった経路が抑制された可能性がある。

抗 HMGB1 抗体併用投与により、G-CSF、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CXCL1、MCP1、CCL3、CXCL10、RANTES といった各種サイトカインやケモカインも抑制された。G-CSF、TNF- $\alpha$ 、IL-6 はインフルエンザ患者の死亡率と関係している。CXCL-1 は好中球を炎症部位に誘導するケモカインとして働く。重症インフルエンザ患者では軽症の患者と比べて MCP1 の上昇が認められる。CCL3 はマクロファージの活性化に関係している。CXCL10 は T 細胞の活性化に関係してい

る。RANTES はインフルエンザ感染において気管支上皮細胞に誘導される。これらのサイトカイン、ケモカインを抑制したことで肺への好中球やマクロファージといった炎症細胞の浸潤を抑制し、肺傷害を抑制したと考えられる。

重症インフルエンザに対する抗炎症薬として、エタネルセプト、副腎皮質ステロイド、COX2 阻害薬、TLR4 アンタゴニスト、抗 HMGB1 抗体などが研究されている。臨床において NAI はインフルエンザ治療の第一選択であり、NAI を使用しない理由はかなり限定的である。そこで、我々は NAI に加えてのこれらの抗炎症療法の治療効果を検討する必要があると考えた。しかし、NAI と抗炎症療法併用効果を評価した研究は少ない。オセルタミビル+TLR4 アンタゴニスト、ザナミビル+COX2 阻害薬、オセルタミビル+スフィンゴシンアナログなどの併用効果が報告されている。これらの研究に加えて我々の研究は重症インフルエンザに対する新たな治療戦略の可能性を示している。

また、抗 HMGB1 抗体併用投与により、肺胞 1 型上皮細胞からの HMGB1 のトランスロケーションを抑制した。これまでタバコ煙やリポポリサッカライドによる肺傷害マウスモデルにて肺胞 1 型上皮細胞からの HMGB1 のトランスロケーションが報告されている。今回使用したインフルエンザウイルス (H1N1, PR8) は肺胞 1 型上皮細胞、肺胞 2 型上皮細胞ともに広く感染するが、肺胞の 98%は肺胞 1 型上皮細胞であることを考えると、肺胞 1 型上皮細胞が炎症の主体であり、抗 HMGB1 抗体はここに作用したと推察される。

今回我々は重症インフルエンザ肺炎モデルに対する NAI と抗 HMGB1 抗体の併用効果を示したが、NAI 耐性のインフルエンザも重大な問題である。今後 NAI 耐性のインフルエンザに対する抗 HMGB1 抗体の効果調べる必要もある。

## 【結論】

抗 HMGB1 モノクローナル抗体は、重症インフルエンザ肺炎に対して抗ウイルス薬の追加治療薬として期待できる。