

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第3882090号
(P3882090)

(45) 発行日 平成19年2月14日(2007.2.14)

(24) 登録日 平成18年11月24日(2006.11.24)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01) A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 9/00 (2006.01) A 6 1 P 9/00

請求項の数 5 (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2006-140773 (P2006-140773)</p> <p>(22) 出願日 平成18年5月19日 (2006.5.19)</p> <p>審査請求日 平成18年8月17日 (2006.8.17)</p> <p>早期審査対象出願</p>	<p>(73) 特許権者 504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号</p> <p>(74) 代理人 100075409 弁理士 植木 久一</p> <p>(74) 代理人 100115082 弁理士 菅河 忠志</p> <p>(74) 代理人 100125184 弁理士 二口 治</p> <p>(74) 代理人 100125243 弁理士 伊藤 浩彰</p> <p>(72) 発明者 西堀 正洋 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山 大学大学院医歯薬学総合研究科内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 脳血管攣縮抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗HMGB1モノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とする脳血管攣縮抑制剤

【請求項2】

クモ膜下出血後、複数回投与するものである請求項1に記載の脳血管攣縮抑制剤。

【請求項3】

抗HMGB1モノクローナル抗体を、1回当たり0.2~2mg/kg投与するものである請求項2に記載の脳血管攣縮抑制剤。

【請求項4】

クモ膜下出血後、持続的に投与するものである請求項1に記載の脳血管攣縮抑制剤。

【請求項5】

静脈注射投与するものである請求項1~4の何れかに記載の脳血管攣縮抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クモ膜下出血の後に発生する脳血管攣縮を抑制するための薬剤に関するものである。

【背景技術】

【0002】

クモ膜下出血は主として40～60歳台の壮年層に発症し、主に動脈瘤の破裂により脳を取り囲んでいるクモ膜と脳の間に出血が生じた状態をいう。かかる出血により瞬時に頭蓋内圧が上昇して障害を与え、統計によれば約10%が発症直後に死亡、約25%が重篤となる。また、初回の発症で生存しても、約20%で2週間以内に再出血が起こるといわれている。このクモ膜下出血の治療としては、血腫の除去や、破裂した動脈瘤の再破裂の予防などが行われる。

【0003】

この様にクモ膜下出血自体が非常に恐ろしい疾患であるが、クモ膜下出血の処置が終了した後も、半数以上の患者で脳血管攣縮という特異な病態が生じる場合がある。この脳血管攣縮は、クモ膜下出血から3～14日後に発生し、1～2週間継続する脳主幹動脈の可逆的な狭窄である。これが原因で脳虚血が生じる結果、約40%の患者が死亡して約30%の人に重篤な後遺症が残り、社会復帰できるのは結局約30%にとどまることから、深刻な問題となっている。

10

【0004】

ところが、この脳血管攣縮に関する研究は十分に進んでおらず、その予防法や治療法は確立されていない。例えば、クモ膜下出血から脳血管攣縮に至る機序は未だ明らかにされていないが、フリーラジカル、脂質過酸化反応、アラキドン酸カスケード、血管周囲神経の障害、内皮依存性弛緩反応の障害、血管壁の構造的変化などの複数の因子が複雑に関与しているといわれている。従って、上記因子の何れかを阻害することにより脳血管攣縮を予防または治療するのは困難であると考えられる。

20

【0005】

現在、脳血管攣縮に対する全身的薬物療法としては、塩酸ファスジルやオザグレルナトリウムの投与が行われている。また、クモ膜下出血の手術中における組織プラスミノゲンアクチベータの脳槽内投与も行われている。しかし、これらの効果は十分なものではなかった。

【0006】

ところで、HMG1 (High Mobility Group box 1。以下、「HMG B1」という) は、げっ歯類からヒトまで95%以上のアミノ酸配列が等しいタンパク質である。このHMG B1は正常細胞にも存在するが、敗血症(全身性炎症反応症候群)において放出される菌体内毒素であるLPS(リポ多糖)による刺激によって血中濃度が上昇し、最終的な組織障害をもたらす。よって、特許文献1記載の技術では、炎症性サイトカインカスケードの活性化を特徴とする症状を治療するために、HMG B1アンタゴニストを投与している。しかし当該特許文献1には、炎症性サイトカインカスケードにより媒介される疾患や症状が治療対象として多数例示されているものの、脳血管攣縮については記載も示唆もされていない。

30

【0007】

また、特許文献2には、壊死組織により誘導される副作用の治療のための組成物として、HMG B1抗体等を含む組成物が開示されている。しかし、当該副作用としては、近傍の生存細胞の活性化、骨髄細胞の動員および活性化、内皮のバリア機能の喪失、浮腫のみが例示されており、脳血管攣縮については記載も示唆もされていない。

40

【特許文献1】特表2003-520763号公報(特許請求の範囲、段落[0008]、[0009]、実施例)

【特許文献2】特表2005-537253号公報(請求項11と14)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上述した様に、クモ膜下出血の後に発生する脳血管攣縮は、死亡に至ったり重篤な後遺症の原因になるにも関わらず、確立した抑制手段はなかった。

【0009】

そこで、本発明が解決すべき課題は、クモ膜下出血の後に発生する脳血管攣縮に対して

50

有効であり、且つ副作用の少ない脳血管攣縮の抑制剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、脳血管攣縮の抑制に有効な薬剤につき種々検討を進めた。その結果、抗HMGB1モノクローナル抗体が、過去に報告されているいかなる薬剤よりも優れた効果を有することを見出して、本発明を完成した。

【0011】

即ち、本発明の脳血管攣縮抑制剤は、抗HMGB1モノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とする。

【0012】

上記脳血管攣縮抑制剤は、クモ膜下出血後、複数回投与することが好ましい。脳血管内における抗HMGB1モノクローナル抗体を継続的に維持し、脳血管の攣縮を効果的に抑制できるからである。また、抗HMGB1モノクローナル抗体の投与量としては、後述する実験結果より、1回当たり0.2~2mg/kgが好適である。

【0013】

また、同じく脳血管内における抗HMGB1モノクローナル抗体を継続的に維持するために、上記脳血管攣縮抑制剤を、クモ膜下出血後、持続的に投与するのも好適な態様である。

【0014】

上記脳血管攣縮抑制剤の投与形態としては、静脈注射が好適である。抗HMGB1モノクローナル抗体を静脈注射により速やかに脳血管に送達すれば、脳血管攣縮を効果的に抑制できる。

【発明の効果】

【0015】

本発明の脳血管攣縮抑制剤は、クモ膜下出血後に遅発的に発生して患者に重篤な悪影響を及ぼし得る脳血管攣縮を効果的に抑制することができる。また、現在使用されている抗体薬剤を考慮すれば、重篤な副作用を生じる可能性は極めて少ないと考えられる。従って、本発明の脳血管攣縮抑制剤は、これまで特に有効な処置手段のなかった脳血管攣縮を抑制して後遺症を防ぎ、患者の社会復帰を促進できるものとして、極めて有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明の脳血管攣縮抑制剤は、抗HMGB1モノクローナル抗体を有効成分とする。抗HMGB1モノクローナル抗体は、組織障害因子の1つであるHMGB1のみに作用し、その作用機序は明らかではないが、クモ膜下出血の後に発生する脳血管攣縮を抑制する。その一方で、基本的に他の化合物等には作用しない。よって、副作用が生じる可能性はないか、極めて少ないと考えられる。

【0017】

抗HMGB1モノクローナル抗体の調製は、常法に従えばよい。例えば、市販のHMGB1を用いてマウスやラット等を免疫し、その抗体産生細胞や脾細胞と骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを得る。このハイブリドーマをクローニングし、HMGB1へ特異的に反応する抗体を産生しているクローンをスクリーニングする。このクローンを培養し、分泌されるモノクローナル抗体を精製すればよい。

【0018】

本発明で使用する抗HMGB1モノクローナル抗体の種類は、特に制限されない。例えば、ヒト型抗体や完全ヒト抗体を用いることができる。

【0019】

本発明に係る脳血管攣縮抑制剤の剤形は特に問わないが、有効成分である抗HMGB1モノクローナル抗体がペプチドであることを考慮すれば、注射剤としての投与を志向して、溶液やエマルジョン製剤などの液状製剤とすることが好ましい。

【0020】

10

20

30

40

50

液状製剤の溶媒としては、pHを調整した生理食塩水やグルコース水溶液など、血漿の等張液を用いることができる。また、抗体を塩類等と共に凍結乾燥した場合には、純水、蒸留水、滅菌水等も使用できる。その濃度も通常の抗体製剤のものと同程度、一般的には0.1~1mg/mL程度、点滴用では0.02~0.2mg/mL程度とすることができる。但し、注射剤の浸透圧は、血漿と同等にする必要がある。

【0021】

本発明における「抑制」には、脳血管攣縮の発生の抑制、即ち「予防」と、発生した脳血管攣縮の軽減、即ち「治療」の両方の概念が含まれる。従って、本発明の脳血管攣縮抑制剤は、クモ膜下出血後から脳血管攣縮の発生前に予防的に投与してもよいし、脳血管攣縮の発生後に治療的に投与してもよい。

10

【0022】

脳血管攣縮は、クモ膜下出血から3~14日後において患者の半数以上に見られる。しかしクモ膜下出血から脳血管攣縮に至る機序は、いくつかの要因が指摘されているものの複数の因子が複雑に関与していると考えられており、必ずしも明らかになっていない。よって、クモ膜下出血以降、或いは脳血管攣縮の発生以降に、脳血管における本発明の脳血管攣縮抑制剤の血中濃度を維持すべきである。従って、本発明の脳血管攣縮抑制剤は、クモ膜下出血後、複数回投与するか或いは持続的に投与することが好ましい。

【0023】

複数回投与する場合における投与頻度や投与量は、脳血管攣縮の発生前か発生後であるかや患者の状態などにより適宜調整すればよい。後述する実施例で示す通り、体重約3kgのクモ膜下出血モデルウサギに対して1回当たり2mgの抗HMG B1モノクローナル抗体を2回投与した場合に、顕著な脳血管攣縮の抑制効果が得られた。斯かる結果から考えると、ヒトに対する投与量は、1回当たり抗HMG B1モノクローナル抗体を0.1~2mg/kgとし得、より好適には0.2~2mg/kgとし、1日当たり2回投与することができる。投与形態も特に制限されず、例えば静脈注射することができるが、緊急を要する場合などでは、クモ膜下出血手術で設けられた脳槽ドレナージを通じて投与してもよい。

20

【0024】

持続的に投与する場合における製剤濃度や投与量なども適宜調整すればよいが、例えば濃度0.02~0.2mg/mLの液状製剤を2~4時間かけて、1日当たり2回程度点滴投与することができる。

30

【0025】

脳血管攣縮患者がクモ膜下出血から14日間程度以降まで生存した場合には、通常、脳血管攣縮は自然に解消される。よって、クモ膜下出血から14日間程度経過した後は、患者の状態等を考慮して、本発明の脳血管攣縮抑制剤の投与量を次第に低減等することができる。

【0026】

以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとより下記実施例により制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適宜に変更を加えて実施することも可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に含まれる。

40

【実施例】

【0027】

実施例1 抗HMG B1モノクローナル抗体の調製

(a) ラットの免疫

市販のウシ胸腺由来HMG B1とHMG B2との混合物(和光純薬工業社製、コード番号:080-070741)1mg/mLを2mLガラス製注射筒にとり、別の2mLガラス製注射筒にとった等容量のフロイント完全アジュバンドと連結管を通じて徐々に混和することによって、エマルジョンとした。セボフルレンにより麻酔したラットの後肢足蹠に、得られたエマルジョンを0.1mLずつ、計0.2mL注射投与した。2週間後、頸静脈から試験採血し、抗体価の上昇を確認した。次いで、腫大した腸骨リンパ節を前記注

50

射投与から5週間後に無菌的に取り出した。得られた2個のリンパ節から、約 6×10^7 個の細胞を回収することができた。

【0028】

(b) 細胞融合とクローニング

上記腸骨リンパ節細胞とマウスミエローマSP2/O-Ag14(SP2)細胞を、ポリエチレングリコールを用いて融合させ、得られた融合細胞を96穴マイクロプレートに蒔いた。1週間後、最初のELISAスクリーニングを行ない、陽性ウェルについて、ウェスタンブロットにより二次スクリーニングを行なった。陽性を示すウェル細胞を24穴マイクロプレートに移し、細胞をほぼコンフルエントな状態(約 2×10^5)に殖やしてから、0.5 mLの凍結培地(GIT培地にウシ胎児血清を10%とジメチルスルホキシドを10%添加したものを)を用いて、液体窒素中で凍結保存した。この凍結保存細胞を解凍した後、96穴マイクロプレートでクローニングした。

10

【0029】

(c) 抗体の精製

回転培養装置(Vivascience社製)により上記陽性細胞を2週間大量培養し、濃度2~3 mg/mLの抗体液を得た。この抗体液をアフィニティゲル(インビトロジェン社製、MEP-HyperCel)と中性pH下で混和し、抗HMGB1抗体をゲルへ特異的に結合させた。特異的にゲルに結合した抗体を、グリシン-塩酸バッファー(pH4)により溶出した。溶出液を限外濾過装置により濃縮した後、セファロースCL6Bゲル濾過カラム(直径2 cm×長さ97 cm)によって、さらに精製した。

20

【0030】

得られたモノクローナル抗体は、HMGB1タンパク質のC末端配列である208 E E D D D D E 2 1 5 (Eはグルタミン酸を示し、Dはアスパラギン酸を示す)をエピトープとして特異的に認識する抗体である。例えば、HMGB1に類似するタンパク質としてHMGB2があるが、HMGB2には211以下のD D D D Eの配列が存在しないため、本発明に係るモノクローナル抗体はHMGB2に結合せず、HMGB1のみを特異的に認識して結合することができる。

【0031】

実施例2

日本チャールズ・リバー社より得た雄性ウサギ(体重約3~3.5 kg)12匹をクモ膜下出血モデルとする一週間前に、塩酸ケタミン(50 mg/kg、筋肉投与)とペントバルビタール(20 mg/kg、静脈投与)で麻酔した後、右大腿動脈から左椎骨動脈起始部まで挿入したカテーテルから造影剤を注入し、その脳底動脈を血管造影撮影した。クモ膜下出血モデル作製当日は、塩酸ケタミン(50 mg/kg、筋肉投与)とペントバルビタール(20 mg/kg、静脈投与)で麻酔した後に動脈血を1 mL採取し、採取した当該動脈血を同ウサギの大槽内(小脳延髄槽内)へ注射した。次に、頭部を低位にして30分間保つことによりクモ膜下出血モデルとした。

30

【0032】

別途、実施例1で精製したラットの抗ウシHMGB1モノクローナル抗体2 mgを1 mLのリン酸緩衝液に溶解して抗体溶液を得た。当該抗体溶液1 mL(抗ウシHMGB1モノクローナル抗体2 mg)を、擬似クモ膜下出血から1時間後と24時間後に、4匹のクモ膜下出血モデルウサギへ静脈注射した。

40

【0033】

擬似クモ膜下出血から3日後に、上記と同様に脳底動脈を撮影した。また、比較のために、抗ウシHMGB1モノクローナル抗体を投与しなかったウサギ4匹(無処置群)と、多くの抗体活性を有するラット正常ポリクローナル免疫グロブリンG(2 mg)を同様に投与したウサギ4匹(IgG投与群)についても、同様の撮影を行った。得られた各4例、合計12例の写真を図1~3に示す。図1は無処置の例、図2はポリクローナル免疫グロブリンGを投与した例、図3は本発明に係る抗HMGB1モノクローナル抗体を投与した例である。また、NIHイメージJ(米国国立衛生研究所)を用いて、得られた写真が

50

ら脳底動脈の9箇所内で径の測定を行い、クモ膜下出血後における内径の収縮率を求め、その平均値を各個体について算出した。さらに、各個体の平均値から、各群における収縮率の平均値を算出した。各群間の有意差は、t-テストにより検定した。結果を表1と図4に示す。なお、図4中、「**」は無処置群に比して $p < 0.01$ で有意であった場合を示し、「##」はIgG投与群に比して $p < 0.01$ で有意であった場合を示す。

【0034】

【表1】

	血管収縮率(%)	平均値(%)
無処置群	47.46	38.07
	30.23	
	27.95	
	46.64	
IgG投与群	47.22	40.53
	40.33	
	43.45	
	31.11	
抗HMGB1 モノクローナル抗体 投与群	10.83	18.57
	13.04	
	23.96	
	26.43	

10

20

【0035】

図1の通り、抗体を投与しなかったウサギの脳底動脈は、擬似クモ膜下出血後に細くなっており脳血管攣縮を強く起こしていた。また、図2の通り、IgGを投与したウサギでも同様に脳血管攣縮を強く起こしていた。それに対して、図3の通り、本発明に係る抗HMGB1モノクローナル抗体を投与したウサギの脳底動脈の太さはかなりの程度維持されており、脳血管攣縮は顕著に抑制されている。また、本発明に係る抗HMGB1モノクローナル抗体による脳血管攣縮の抑制作用は、無処置の場合とIgGを投与した場合に比して統計上有意に優れていた。従って、本発明の脳血管攣縮抑制剤は、脳血管攣縮を顕著に抑制できることが実証された。

30

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】クモ膜下出血モデルウサギの無処置群におけるクモ膜下出血前後の脳底動脈の造影写真である。図中、各組において、左側(前)はクモ膜下出血前の写真を示し、右側(後)はクモ膜下出血前の写真を示す。各組において、クモ膜下出血後(右側)では明らかに血管径が細くなっており、強い脳血管攣縮が見られる。

【図2】クモ膜下出血モデルウサギのIgG投与群におけるクモ膜下出血前後の脳底動脈の造影写真である。図中、各組において、左側(前)はクモ膜下出血前の写真を示し、右側(後)はクモ膜下出血前の写真を示す。各組において、クモ膜下出血後(右側)では明らかに血管径が細くなっており、強い脳血管攣縮が見られる。

40

【図3】クモ膜下出血モデルウサギの本発明抗体投与群におけるクモ膜下出血前後の脳底動脈の造影写真である。図中、各組において、左側(前)はクモ膜下出血前の写真を示し、右側(後)はクモ膜下出血前の写真を示す。各組において、クモ膜下出血後(右側)では脳血管攣縮は、図1の無処置群と図2のIgG投与群に比して、明らかに抑制されている。

【図4】無処置群、IgG投与群、および本発明に係る抗HMGB1モノクローナル抗体群において、血管収縮率を比較するための図である。本発明に係る抗HMGB1モノクローナル抗体場合における脳血管攣縮の抑制作用は、無処置の場合とIgGを投与した場合に比して、有意に優れている。

50

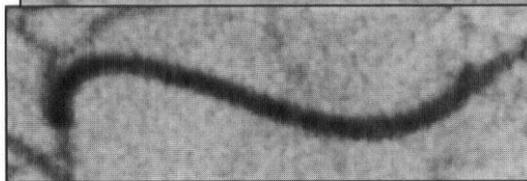
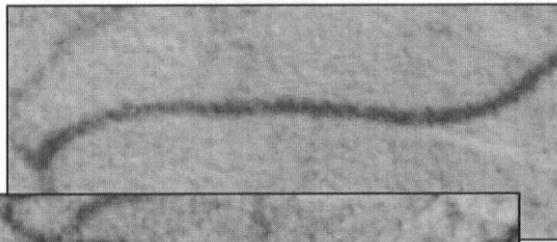
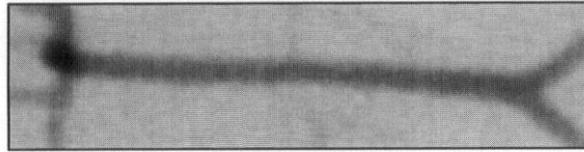
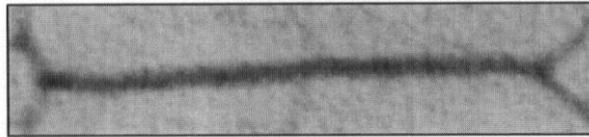
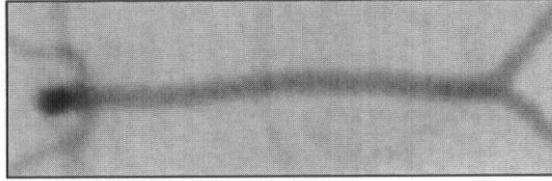
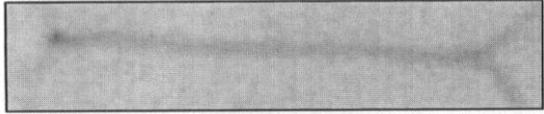
【要約】

【課題】本発明は、クモ膜下出血の後に発生する脳血管攣縮に対して有効であり、且つ副作用の少ない脳血管攣縮の抑制剤を提供することを課題とする。

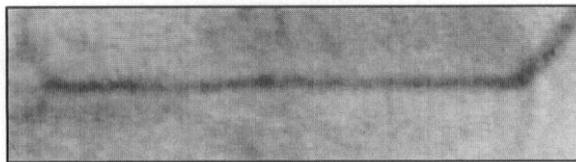
【解決手段】本発明に係る脳血管攣縮の抑制剤は、抗HMG B 1モノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とする。

【選択図】なし

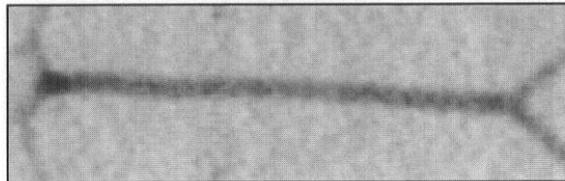
【図 1】



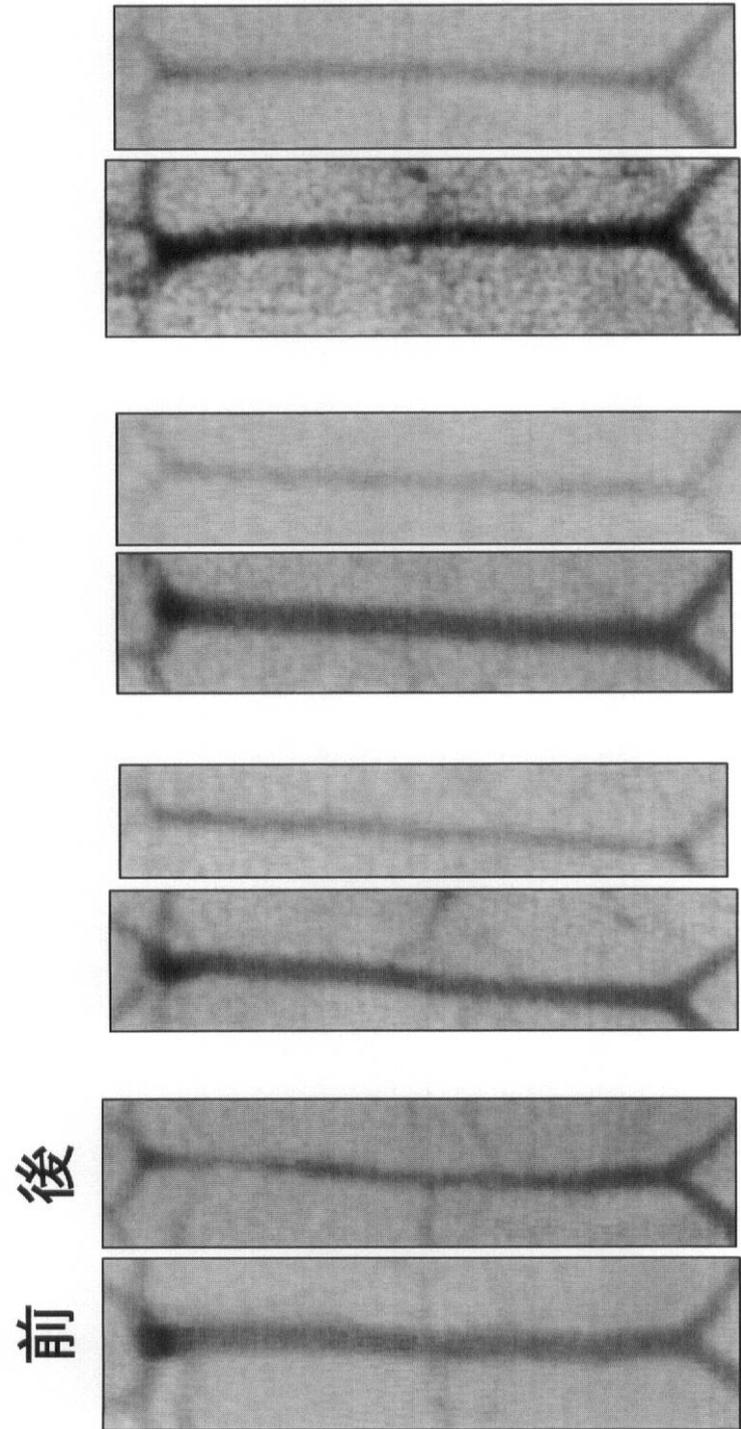
後



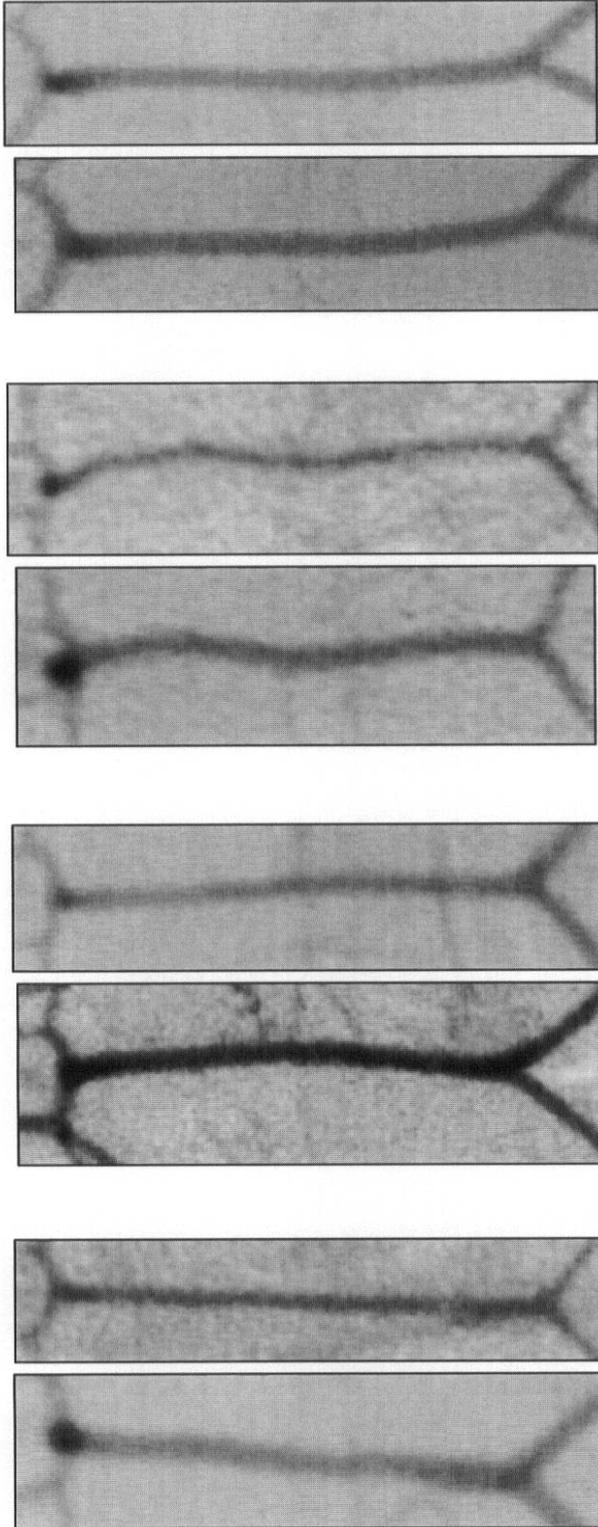
前



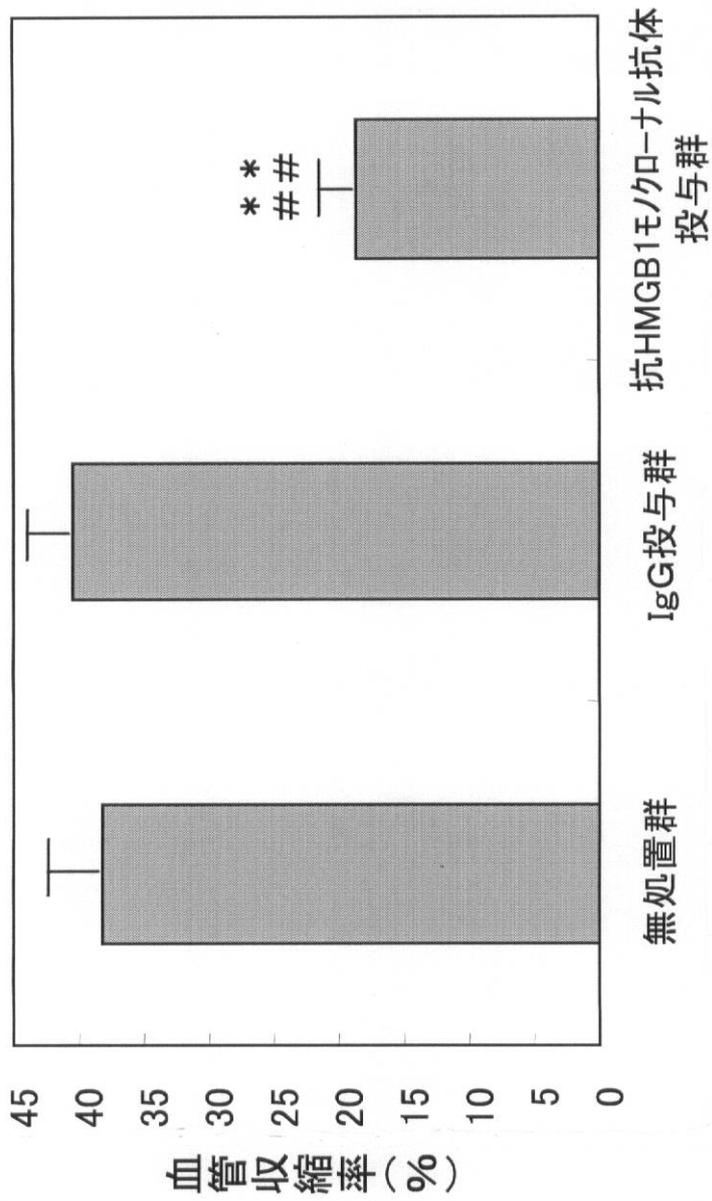
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

- (72)発明者 森 秀治
岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内
- (72)発明者 高橋 英夫
岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内
- (72)発明者 友野 靖子
岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内
- (72)発明者 伊達 勲
岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内
- (72)発明者 小野 成紀
岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

審査官 川口 裕美子

- (56)参考文献 特表2000-520763(JP,A)
伊達勲ら, くも膜下出血後の脳血管攣縮に対する遺伝子治療, 脳と循環, 2002年 1月, Vol.17 No.1, p.47-51
丸山征郎, 生体侵襲とHMGB1:遅れてやってきた生体致死因子, 侵襲と免疫, 2006年 3月31日, Vol.15, No.1, p.31-36

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/395

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/EMBASE(STN)

JMEDPlus/JSTPlus(JDream2)