

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 認知症に対する HMGB1 抗体医薬の創出
(英語) Development of HMGB1 antibody therapy against dementias

研究開発実施期間: 令和元年8月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 岡澤 均
(英語) Hitoshi OKAZAWA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
脳統合機能研究センター・教授 センター長
(英語) Professor, Medical Research Institute & Director, Center for Brain Integration Research,
Tokyo Medical and Dental University

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

アルツハイマー病においては、細胞外アミロイド（老人斑）の除去を目的としたアミロイド抗体医薬を中心に治療開発が過去15年に亘り行われてきた。死後脳の病理解析あるいは生存中の患者のPETの結果から、細胞外アミロイド除去には十分な効果が認められたものの、認知症の改善には至らなかった。2021年6月には、FDAがAducanumabを迅速承認制度のもとで仮承認をしたものの、clinical benefitについては申請データを認めるまでには至らず、Phase 4の承認後臨床試験を開発企業に求めている。このような状況下において、多くの製薬企業は次の標的分子と分子標的治療を模索している。

研究開発代表者は、アルツハイマー病モデルマウス4種類およびアルツハイマー病ヒト患者死後脳を用いて、網羅的プロテオーム解析を行い、細胞外アミロイド蓄積が見られる時期より早い超早期（発症前・凝集前）から、少数タンパク質のリン酸化が変化していることを明らかにした(Tagawa et al, Hum Mol Genet 2015)。そして、そのなかのMARCKSのリン酸化がシナプス変性に関連していることを報告し、MARCKSのリン酸化をキナーゼ阻害

剤あるいは siRNA によって抑制することでアルツハイマー病モデルマウスのシナプス病態が改善できることを示した (Tagawa et al, Hum Mol Genet 2015)。また、pSer46MARCKS に対する抗体を作成して免疫染色を行うと、変性神経突起が染色された。これをもとに解析を進めた結果、細胞内に A β を蓄積したニューロンがネクローシスを起こした際に放出される HMGB1 が、周辺の神経突起の TLR4 に結合して、MARCKS リン酸化を誘導して、シナプス変性に至ることを発見し、さらに、HMGB1 抗体の発症前投与（皮下注射）に発症抑制効果があることを報告した (Fujita et al, Sci Rep 2016)。

さらに研究を進めた結果、HMGB1 は、シナプス変性のみならず、周辺のニューロンの細胞死 (TRIAD ネクローシス) を誘導すること、そのメカニズムが HMGB1-TLR4-PKC-Ku70 リン酸化のシグナル経路活性化とリン酸化による Ku70 の DNA 損傷修復機能低下であることを発見した (Tanaka et al, Commun Biol 2021 in press)。抗ヒト HMGB1 ヒトモノクローナル抗体（特許出願中）を発症後 AD モデルマウスに投与を行った場合にも、細胞死、シナプス変性、認知機能の全てを正常化することを確認した (Tanaka et al, Commun Biol 2021 in press)。加えて、研究開発代表者は、レヴィー小体型認知症 (DLB) においても pSer46-MARCKS 増加が、 α シヌクレインの凝集前に起きていることを報告した (Fujita et al, eNeuro 2018)。これらの背景から、HMGB1 を介した神経細胞死の拡散が、3 大認知症をはじめとして複数の神経変性疾患に起きていることが推定され、神経細胞死拡散を抑制する抗ヒト HMGB1 ヒトモノクローナル抗体が、3 大変性性認知症や神経変性疾患に対して、一般的に適用可能な治療薬シーズであると考えられる。

そこで、本研究開発では、1) 抗 HMGB1 ヒトモノクローナル抗体 (non-GMP) の投与方法（皮下注射 vs 静脈注射）と投与量の最適化を行うこと、2) アルツハイマー病に次ぐ頻度を持つ前頭側頭葉変性症 (FTLD) のモデルマウス (PGRN 変異-KI マウス、TDP43 変異-KI マウス、VCP 変異-KI マウス、CHMP2B 変異-KI マウス；先行研究において開発済み) に同様の治療実験を行って対象疾患の拡大を図ること、3) 抗 HMGB1 ヒトモノクローナル抗体の実用化を進めるベンチャー企業の設立することを目的とし、4) 合わせて、FTLD における病態メカニズムを詳細に明らかにして、POC の確立を図ることとした。

1) 投与方法・投与量の最適化

皮下投与および静脈内投与により脳組織内へ移行した抗体の定量法を確立する。投与方法、投与量については、以下の通りで行う。皮下注射、静脈注射を投与間隔、投与量を振って実施した。凍結脳をサンプルとし、抗ヒト IgG 抗体を用いた ELISA を行い、同じく、BBB を超えて脳組織に入った HMGB1 ヒトモノクローナル抗体を定量した。同時に、灌流固定パラフィン包埋切片（もしくは凍結切片）の抗ヒト IgG 抗体による免疫組織染色を行い脳組織内の抗体移行を確認した。これらの解析をもとに、BBB 透過率をマウス血液量、投与量、ELISA での脳組織含有量を用いて計算した。また、より正確を期すために、別の測定法も実施した。抗 HMGB1 ヒトモノクローナル抗体を Biotin 標識後に、皮下注射および静脈注射を行い、Avidin-Biotin 反応を利用した免疫染色、ELISA を行って、投与抗体の脳組織内定量を行った。この結果、われわれの抗 HMGB1 ヒトモノクローナル抗体は、通常言われている濃度比率 1% を上回る比率で BBB を通過することを確認した。また、皮下注射、静脈注射ともに良好な血中、脳組織中の滞留・減衰を示した。

2) 前頭側頭葉変性症病態への治療効果の評価

独自に開発した 4 種類の前頭側頭葉変性症 (FTLD) のモデルマウス (PGRN 変異-KI マウス、TDP43 変異-KI マウス、VCP 変異-KI マウス、CHMP2B 変異-KI マウス) (Homma et al, Life Sci Alliance 2021) に、上記の項目 1 から推定される投与方法・投与量で治療実験を行った。発症時期は事前検討において同定済みであるので (Homma et al, Life Sci Alliance 2021)、Morris Water Maze 試験で異常を示す時期を発症時期と定めて、その後から投

与を開始した。コントロールヒト IgG 投与および HMGB1 ヒトモノクローナル抗体を投与した FTLD モデルマウス群について、投与前、および投与開始後 3 ヶ月程度から、すでに論文報告した手法 (Tanaka et al, Mol Psychiatry 2018; Fujita et al, Nat Commun 2018) に準じて Y-maze, Morris water maze, rotarod などの行動解析を行ったのちに、行動解析、2 光子顕微鏡シナプス観察、脳病理所見、生化学解析を行った。その結果、抗 HMGB1 ヒトモノクローナル抗体は、異なる原因遺伝子の変異を KI した 4 種類の FTLD モデルの全てにおいて、3 種類の記憶テストで症候学的に改善を示した。さらに、脳病理所見、生化学解析によって、認知機能障害の基盤となる病理変化の改善を確認した。加えて、有効性を示した投与方法・投与量において、全身臓器の病理学的解析からは副作用は認めなかった。これらの成果は論文としてまとめて発表した (Jin et al, Commun Biol 2021)。

3) HMGB1 抗体の治療薬化および製薬企業への導出検討 (ビジネスプラン策定)

さらに、本研究開発では VC 数社とともに HMGB1 モノクローナルヒト抗体の実用化を行うベンチャー企業のビジネスモデルの検討を行った。DRG 社の調査 (<https://dresources.jp/archives/1776>) によれば 2017 年時点では世界全体で約 3,500 万人のアルツハイマー病患者がいるが、10 年後には患者数は 37%以上増加すると予想される。したがって、市場割合を考えて、1000 万人の患者を対象にして、患者単価を年間 200 万円と推定すれば、年間売上が 20 兆円になる。FTLD でもその 10 分の 1 程度の市場が想定される。本研究開発をもとに、アルツハイマー病、FTLD 等の認知症に対する治療が実現すれば、科学技術イノベーション、製薬企業への経済効果、社会貢献のいずれも極めて大きいものになる。

また、本研究開発では特許網の構築を行った。HMGB1 モノクローナルヒト抗体、HMGB1 モノクローナルマウス抗体ともにアルツハイマー病に対する有効性を持つクローンの塩基配列とアミノ酸配列を特許出願済みである。本研究開発課題の研究項目 1 で得られる最適な投与方法と投与量は、当該知的財産の導出時に製薬企業側から求められる事項と思われる。また、前頭側頭葉認知症モデルマウス (研究開発代表者が開発した PGRN 変異-KI マウス、TDP43 変異-KI マウス、VCP 変異-KI マウス、CHMP2B 変異-KI マウス) を用いて HMGB1 モノクローナルヒト抗体の治療効果を検証した。これらの 4 種のマウスにおける治療効果を特許出願し、対象疾患の拡大によって、特許網の強化を図った。

4) FTLD における病態メカニズムの詳細

本研究開発において、『前頭側頭葉変性症病態への治療効果の評価』を行った際に、合わせて FTLD 病態の詳細を明らかにした。すなわち、遺伝性 FTLD の 4 種のモデルマウス (PGRN 変異-KI マウス、TDP43 変異-KI マウス、VCP 変異-KI マウス、CHMP2B 変異-KI マウス) は、変異遺伝子が異なるにも関わらず、いずれも胎生期の神経幹細胞の段階での DNA 損傷修復機能が低下しており、神経幹細胞から分化したのちも DNA 損傷が正常よりも増加した神経細胞が存在する。これらの DNA ダメージを抱えた神経細胞が発症の前から神経細胞死 (TRIAD ネクロシス) を起こしている (Homma et al, Life Sci Alliance 2021)。TRIAD ネクロシスを起こしたニューロンは周辺に HMGB1 を放出するが、HMGB1 が TLR4 に結合して誘導する細胞内シグナルは、ニューロン生存に必須な DNA 損傷修復因子 Ku70 のリン酸化を起こし、その結果、DNA 損傷修復機能が 2 次的に阻害される (Tanaka et al, Commun Biol 2021 in press)。このような、細胞死→HMGB1 放出→細胞死という悪循環の繰り返しにより、細胞死の拡散が FTLD 病態においても起きていることを解明した。

本研究開発によって、HMGB1 モノクローナルヒト抗体が実用化研究に進むための基盤が確立した。先行研究および本研究開発により、AD と FTLD の複数のマウスモデルに対して、一貫した治療効果を記憶等の認知行動試験、病理解析、生化学解析で確認した。加えて、本研究開発と並行して進めてきた、スパコンを用いたプロテオームビッグデータの分子ネットワーク解析からも、HMGB1-TLR4-PKC シグナルが 2 つの認知症の共通した最重要の中核

病態であることが理論的に示されている (Jin et al, Commun Biol 2021)。今後は、HMGB1 モノクローナルヒト抗体の実用化研究・臨床試験を経て、認知症に苦しむ人々そしてその家族のために臨床現場に届けたい。

Clinical trials for Alzheimer's disease (AD) have repeatedly failed for the last 15 years. Anti-amyloid beta antibodies, the most expected category of anti-AD drugs, developed by Eli-Lilly, Pfizer, J&J and Roche were not sufficiently/statistically effective on cognitive or memory symptoms even though they succeeded in decreasing the burden of amyloid beta in the brain. Very recently, FDA accepted Aducanumab of Biogen/Esai under "accelerated approval" system, while clinical benefit of the anti-amyloid antibody is still discussed, and FDA additionally ordered Phase 4 clinical trial for formal approval. In this situation, pharmaceutical companies are searching for "next target" to develop anti-dementia drugs, and their gathering of information from academia is becoming more active. One of the prevailing ideas is to focus on earlier pathologies before the onset or even before extracellular amyloid aggregation.

Initiated from our previous comprehensive phosphoproteome analyses of cerebral cortex tissues from four mouse AD models (5xFAD, mutant APP-Tg, mutant PS1-Tg, mutant PS2-Tg) and postmortem human AD patients (Tagawa et al, Hum Mol Genet 2015, Ref 2), we have reached to a conclusion that HMGB1, a DAMP molecule released from a small number of intracellular-A β -accumulating neurons during necrosis, triggers secondary necrosis of surrounding neurons (Fujita et al, Sci Rep 2016; Tanaka et al, Nature Commun 2020; Tanaka et al, Commun Biol 2021). In addition, we confirmed that TRIAD necrosis (Hoshino et al, JCB 2006), the subtype of necrosis occurring in AD (Tanaka et al, Nature Commun 2020), initiates in cortical neurons of frontotemporal lobar degeneration across multiple gene mutations from the early pathological stage (Homma et al, Life Sci Alliance 2021). These phenotypes are also confirmed in postmortem brains of human AD and FTLN patients. Based on the HMGB1-mediated cell death expansion hypothesis, we have been trying to develop our human anti-HMGB1 monoclonal antibody (#129) to a therapeutic drug both for FTLN and AD.

For the purpose of developing human anti-HMGB1 monoclonal antibody as a new drug against FTLN, AD and other dementias, we set in this project the following two aims, 1) optimization of the administration method and dose of the antibody and 2) evaluation of the effect of the antibody on frontotemporal lobar degeneration (FTLN) model mice. Consequently, 1) we determine the most appropriate administration method and the necessary dose for the therapeutic concentration in mouse brain tissues. 2) We also confirmed therapeutic effects on four types of cognitive function test, morphological changes in immunohistochemistry, and biochemical changes in western blot and so on. These two points are the most frequently asked questions when we have preliminarily discussed with domestic and global pharmaceutical companies, and we could prepare the answers for them in this project. We also made a business plan with some venture capital companies for the future license-out of this drug to domestic and global pharmaceutical companies.

III 事後評価総合所見

静脈内投与および皮下投与した HMGB1 抗体がマウスの血液脳関門を通過して脳組織に到達することを明らかにし、投与方法・投与量の検証を行った。また、4 系統の FTLD 疾患マウスにおいて、本抗体による一定の認知機能改善効果を認めている。本研究期間内に新規特許出願やベンチャー企業設立を行い、当初の計画を十分に達成できたことも評価された。さらに、本抗体は、神経変性疾患治療薬候補としての新規性・独自性を有していることも望ましい。

治療薬開発の難易度は高いが、今後、臨床試験・事業化を推し進め、社会からの医療ニーズが高い新規変性疾患治療薬の創出に繋がることを期待する。