

マウス CLP 敗血症モデルにおける HRG 動態と
外因性 HRG の治療効果に関する研究

研究分担者 和 氣 秀 徳 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
劉 克 約 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
勅使川原 匡 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究要旨

敗血症モデルとしてマウスの盲腸結紮穿孔刺(CLP)を用いて、急性期における血漿 Histidine-rich glycoprotein (HRG)の低下と HRG 補充療法の著明な致死率改善効果を明らかにした。HRG の投与効果は、肺血管床への好中球接着の抑制とそれに引き続く肺炎症の抑制に基づくことを示した。逆に、siRNA により肝臓での HRG 産生を低下させると、CLP マウスの致死率は増悪することを示した。

A. 研究目的

CLP 敗血症マウスモデルを用いて、血漿 HRG の動態を明らかにし、外因性 HRG の治療効果を評価する。敗血症病態において死亡の原因となる敗血症性 ARDS に注目し、肺組織血管床における好中球の接着と肺組織内への浸潤、肺炎症関連因子の遺伝子発現変化とそれらに対する HRG 治療の効果を明らかにする。In vivo イメージングの手法を用いて、敗血症時の循環血中好中球の動態と HRG 治療によるその変化を明らかにする。

血し、血漿 HRG をウェスタンブロットで定量した。重症敗血症誘導後の致死率を対照動物と HRG 治療群とで比較した。敗血症性 ARDS を評価するため、固定した肺組織の病理的評価（好中球接着・浸潤）と肺における炎症関連因子の遺伝子発現レベルの定量を実施した。肝臓における HRG 産生を低下させる目的で siRNA を設計し、血漿中濃度を約 10%にまで低下させた。その後、軽症敗血症モデルを用いて HRG 低下の致死性に及ぼす効果を評価した。

B. 研究方法

1. マウスの CLP 敗血症モデルにおける HRG の動態解析とヒト HRG の治療効果

マウスの CLP モデルを、2 回盲腸穿孔する重症モデルと 1 回穿孔の軽症モデルの 2 種類作製した。術後一定時間後に採

2. 敗血症マウス血液の微小流路通過性試験

敗血症マウスから採血した全血を抗凝固処理し、Microchannel flow analyser (MC-FAN) で、微小流路における血液通過性を定量した。また、白血球の擬似毛細血管通過状態を形態的に観察した。

3. In vivo イメージングによる敗血症時の循環好中球動態解析

敗血症マウスの循環血中好中球を蛍光標識した抗 Gr-1 の静脈内投与でラベリングした。タイムラプス共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて、腹膜血管内の好中球の動態を In vivo イメージングとして観察した。ヒト HRG の投与効果を好中球動態の上から評価した。

C. 研究結果

マウスの CLP 重症敗血症モデルでは、敗血症誘導後 24 時間の時点で血漿 HRG レベルを測定したところ、健常マウスのレベルの 30%以下に低下していることがわかった。PBS あるいは HAS 投与した対照の重症敗血症マウスは、約 5 日目までに全例死亡した。それに対し、精製ヒト HRG の投与群は用量依存的な致死率の改善作用を示した。その効果は統計学的に有意と判定された。一方、siRNA で肝臓での HRG 産生を抑制し血漿 HRG を低下させた場合には、致死率は逆に上昇した。CLP 重症敗血症マウスでは、肺組織に著明な炎症病変が認められた。その中には、1) 肺胞隔壁の腫脹、2) 多核白血球の浸潤、3) 肺内出血、が含まれていた。ヒト HRG の投与群ではそれらの変化が極めて低いレベルに抑制されていた。肺組織内に存在する好中球を免疫組織化学的に検出したところ、重症敗血症マウスで上昇した細胞数が、HRG 治療で有意に低下した。さらに、IL-6、TNF- α 、iNOS、PAI-1、Neutrophil elastase などの炎症関連因子の肺組織における mRNA 発現を定量 PCR で調べた。その結果、重症敗血症マウスではこれら遺伝子発現がいずれも著明に上昇していたが、ヒト HRG の投与によって上昇が約 90%抑制され

た。腎臓における病変も病理組織学的に検討され、HRG 治療の保護効果が明らかにされた。

敗血症マウス全血の MC-FAN 微小流路での通過性を測定したところ、偽手術対照に比較し、通過性時間の延長が観察された。HRG 治療された敗血症マウスの全血では、有意に通過時間の改善が認められた。抗 Gr-1 抗体で蛍光標識した循環血中の好中球の in vivo イメージングで、敗血症病態においては変形した好中球が静脈系血管床に強く接着し、動かない形態をとっている像がしばしば観察された。動脈系血管内では、血管閉塞により血流停止した像も認められた。一方 HRG 治療群では、好中球の流れは動脈系と静脈系を問わずスムーズであり、偽手術対照の状態に近かった。

D. 考察

マウスの敗血症モデルにおいて明らかにされたのは、敗血症病態では血漿 HRG の著明な低下が生じること、それを外因性 HRG (精製ヒト HRG) で補うことによってマウスの致死率が顕著に改善することである。敗血症の致死性に関与する病態として ARDS が重要であると考えられる。ARDS では、肺血管床への好中球接着と肺組織への浸潤が、肺炎を担うと考えられている。HRG による治療は、この好中球の接着・浸潤を抑制し、炎症関連分子の遺伝子発現を顕著に抑制した。従って、好中球の抑制作用を起点とする肺炎の抑制が HRG の致死率抑制に大きく寄与したのではないかと推測できる。実際、敗血症マウスから採取した全血の微小流路 (疑似毛細血管) 通過性を調べたところ、偽手術のそれに比べ通過時間が延長しており、その主な原因は白血球の流路への接着や流路の閉塞であった。HRG 治療群では、それ

らが著明に改善していた。さらに in vivo イメージング技術で循環血中にある好中球を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、敗血症マウスでは確かに静脈系血管床に多数の好中球が接着し、非常に多様な形態で動くことなく留まっていることがわかった。つまり肺組織切片で創造された病態が実際に動画上証明されたと言える。これらの実験結果を総合すると、HRG の治療効果については動物実験のレベルで Proof of Concept (POC) が確立されたと言える。

E . 結論

マウスの敗血症モデルを用いて、敗血症病態における血漿 HRG レベルの顕著な低下と、HRG の補充による致死率の改善作用を証明した。HRG 治療により、敗血症性 ARDS が抑制できることがわかった。HRG 治療は血管内皮細胞への異常な好中球の接着を抑制することが in vivo イメージングで示唆された。動物実験のレベルでは、HRG 治療の Proof of Concept が確立されたと考える。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Wake H, Mori S, Liu K, Teshigawara K, Sakaguchi M, Takahashi H, Ohtsuka A, Yoshino T, Nishibori M.

Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through neutrophil regulation.

(submitted)

Takahashi H, Sadamori H, Teshigawara K, Niwa A, Liu K, Wake H, Mori S, Yoshino T, Nishibori M.

Histamine inhibits high mobility group box 1-induced adhesion molecule expression on human monocytes.

Eur J Pharmacol, 718:305-13, 2013.

Nakamura Y, Morioka N, Abe H, Zhang FF, Nakashima KH, Liu K, Nishibori M, Nakata Y.

Neuropathic pain in rats with a partial sciatic nerve ligation is alleviated by intravenous injection of monoclonal antibody to high mobility group box-1. *PLOS ONE*, 8(8):e73640, 2013.

Takahashi HK, Sadamori H, Liu K, Wake H, Mori S, Yoshino T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Nishibori M.

Role of cell-cell interactions in high mobility group box 1 cytokine activity in human peripheral blood mononuclear cells and mouse splenocytes.

Eur J Pharmacol, 701: 194-202, 2013.

西堀正洋. HMGB1 を標的とした治療.

日本臨牀, 2014.7 (予定).

大熊佑, 伊達勲, 西堀正洋.

抗 HMGB1 抗体治療の可能性.

- 外傷性脳障害と神経因性疼痛に対する抗 HMGB1 抗体治療 - .

日薬理誌, 143:5-9, 2014.

西堀正洋.

DAMPs: HMGB1 の脳神経障害作用.

Thrombosis Medicine, 3(4):5-11, 2013.

貞森裕, 佐藤康晴, 西堀正洋, 佐藤太祐, 信岡大輔, 杉原正大, 八木孝仁, 藤原俊義. 生体肝移植における high mobility group box-1 の動態解析.

日本消化器外科学会誌, 46(3):232-5, 2013.

2 . 学会発表

1) 国際学会

Zhang J, Jaitpal S, Stopa EG, Vannucci SJ, Nishibori M, Stonestreet BS. Massive HMGB1 Release after Hypoxic-

Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats.
2014 PAS/ASPR Joint Meeting. Canada, 2014.

Nishibori M, Okuma Y, Liu K, Wake H, Maruo T, Teshigawara K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ohtsuka A, Yoshino T, Otani N, Tomura S, Shima K, Takahashi H, Date I, Mori S.

Anti-HMGB1 Monoclonal Antibody Therapy for Traumatic Brain Injury in Rats.
Merinoff World Congress 2013 : HMGB1. New York, 2013.

Nishibori M, Liu K, Okuma Y, Wake H, Teshigawara K, Takahashi H, Date I, Mori S. Protection of BBB disruption in ischemic and traumatic injuries by anti-HMGB1 monoclonal antibody.

Signalling in the Blood-Brain Barriers. Hungary, 2013.

Okuma Y, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Haruma J, Date I, Nishibori M.

Glycyrrhizin therapy for traumatic brain injury.

Shanghai BRAIN 2013. Shanghai, 2013.

2) 国内学会

西堀正洋、和氣秀徳、森秀治。

血漿蛋白 HRG による好中球制御と敗血症治療薬開発。

第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.

衷輝、勅使川原匡、和氣秀徳、劉克約、西堀正洋。

炎症誘発因子 HMGB1 とインスリン抵抗性の関係についての検討。

第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.

和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋。

高ヒスチジン糖タンパク質 (HRG) に

よる敗血症治療の可能性。

第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.
劉克約、王登莉、和氣秀徳、勅使川原匡、高橋英夫、森秀治、西堀正洋。

コラゲナーゼで誘発脳内出血モデルにおける抗 HMGB1 単クローン抗体の効果。

第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.
川石雄大、山西広樹、坪田真帆、関口富美子、西田武司、石倉宏恭、西堀正洋、川畑篤史。

中和抗体と遺伝子組換えヒト可溶性トロンボモジュリンによる HMGB1 不活化はラットおよびマウスにおけるパクリタキセル誘起神経障害性疼痛を抑制する。

第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.
西田武司、川石雄大、山西広樹、坪田真帆、関口富美子、石倉宏恭、西堀正洋、川畑篤史。

ピンクリスチン誘起神経障害性疼痛ラットにおける抗 HMGB1 中和抗体と遺伝子組換えヒト可溶性トロンボモジュリンの予防・治療効果。

第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.
濱崎真一、丹羽淳子、上野浩司、西堀正洋、高橋英夫。

ヒスタミン H2 受容体刺激による HMGB1 誘導性免疫応答調節効果の基礎的検討。

第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.
大熊佑、劉克約、春間純、高橋英夫、森秀治、西野繁樹、西堀正洋、伊達 勲。

頭部外傷モデルを用いた Glycyrrhizin の神経保護効果の検討。

日本脳神経外科学会第 72 回学術総会, 横浜, 2013.

大熊佑、劉克約、春間純、高橋英夫、森

秀治、西野繁樹、伊達勲、西堀正洋.

DAMP としての HMGB1 : 脳外傷と肺
障害.

第 24 回日本急性血液浄化学会学術集会 ,
札幌 , 2013.

川石雄大、山西広樹、坪田真帆、西堀正
洋、石倉宏恭、川畑篤史.

遺伝子組換えヒト可溶性トロンボジ
ュリンは HMGB1 シグナルを抑制する
ことでパクリタキセル誘起神経障害性
疼痛モデルにおいて予防および治療効
果を示す.

第 123 回日本薬理学会近畿部会 ,名古屋 ,
2013.

春間純、大熊佑、劉克約、和氣秀徳、衷
輝、勅使川原匡、伊達勲、西堀正洋.

グリチルリチンは HMGB1 に結合し脳
外傷を抑制する.

第 123 回日本薬理学会近畿部会 ,名古屋 ,
2013.

G . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

好中球活性化に起因する疾患の治療薬、
治療方法及び検査方法

特願 2012-129232 (2012.6.6 出願)

PCT/JP2013/64779 (2013.5.28 出願)

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし