

201409029A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

新規血漿因子 HRG による好中球制御を介した
敗血症と多臓器不全の治療法開発

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西 堀 正 洋

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

新規血漿因子 HRG による好中球制御を介した 敗血症と多臓器不全の治療法開発	1
西堀 正洋	

II. 分担研究報告

1. HRG の抗敗血症機序解析とヒト好中球を用いた モデル実験	9
和氣 秀徳 他 (資料) Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic Lethality through Neutrophil Regulation.	
2. ヒト組換え HRG の哺乳動物細胞発現系の確立	117
阪口 政清	
3. 新規敗血症バイオマーカーの開発	121
森松 博史 他	
4. HRG によるマスト細胞活性化の制御	127
田中 智之	
5. 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する HRG 効果の検討	131
鵜殿 平一郎	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	135
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

新規血漿因子 HRG による好中球制御を介した
敗血症と多臓器不全の治療法開発

研究代表者 西 堀 正 洋 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

マウスの盲腸結紮穿刺(CLP)敗血症モデルを用いて、敗血症性 ARDS の原因が NETosis を生じた好中球の血管壁接着を契機とする免疫血栓形成にあることを証明し、HRG の ARDS と肺炎炎症抑制ならびに致死性軽減作用を解明した。ヒト組換え HRG 発現 CHO 安定発現細胞株の樹立に成功し、単離ヒト好中球を用いた試験管内実験でヒト native HRG と同等の活性を証明した。ICU 内患者 66 名の血中 HRG 測定を実施し、血漿 HRG 値が患者予後予測の極めて優れた臨床マーカーとなる可能性を明らかにした。

研究分担者

森 秀治（就実大学薬学部・教授）
西村 多美子（就実大学薬学部・教授）
阪口 政清（岡山大院医歯薬学・准教授）
森松 博史（岡山大院医歯薬学・教授）
高橋 英夫（近畿大学医学部・教授）
劉 克約（岡山大院医歯薬学・助教）
勅使川原 匡（岡山大院医歯薬学・助教）
和氣 秀徳（岡山大院医歯薬学・助教）
平田 泰三（呉医療センター・腫瘍内科医長）
吉田 研一（岡山大学・知的財産マネージャー）
桐田 泰三（岡山大学・産学官連携コーディネーター）
樋之津 史郎（岡山大学病院新医療研究開発・教授）
鵜殿 平一郎（岡山大院医歯薬学・教授）
田中 智之（岡山大院医歯薬学・教授）

A. 研究目的

Histidine-rich glycoprotein (HRG) は、分子量約 75KD の血漿タンパクであり、血液凝固系の制御、免疫・炎症応答の制御、血管新生の抑制など種々の生体反応に関与することが示されている。これらの多機能的な働きは、HRG が種々の生体内分子、例えば C1q、Heme、トロンボスポンジン、フィブリノーゲン、プラスミノーゲンアクチベータ、HMGB1、Zn²⁺ などとの結合を介して発現すると考えられている。研究代表者は前年度までの研究で、マウスの盲腸結紮穿刺(CLP)敗血症モデルを用いてヒト血漿から精製した HRG がマウスの致死率を著明に低下させることを明らかにしてきた。その作用機序を解析する中で、単離したヒト好中球に対する作用として、1) 好中球の形態を表面微絨毛構造のない平滑で径の縮小した正球形に保つ作用、2) 血管内皮細胞と人工基質に対する好中球の接着性を低いレベルに保つ作

用、3) 好中球の微小流路通過性を維持する作用、4) 好中球の活性酸素分子種 (ROS) 産生を抑制する作用、等を証明してきた。また、CLP 敗血症マウス肺において、変形した好中球が微小血管床に NETosis 像を作って接着していることを見出した。これらの成果に基づき、現在提唱されている NETosis 好中球が起点となって進行する血栓形成 (Immunothrombosis) が敗血症モデル肺で生じているかどうか、またそれを HRG が抑制できるかどうかを知ることは、HRG の作用機序を考える上で極めて重要な課題である。本年度において、HRG 投与効果のさらに詳細な機序解析として、Immunothrombosis、敗血症性 DIC 病態、サイトカINSTORM に注目する。

ヒト組換え HRG は、阪口 (研究分担者) が作製した 4 種類のプラスミドベクターを用いて、HEK293 細胞と CHO 細胞で発現に成功した。前々年の PMDA 面談において、CHO 細胞の汎用性が示唆されたことより、CHO 細胞だけにしぼって安定発現細胞株を確立するとの方針を決定した。阪口によって開発された発現ベクターの発現効率ならびに収量の検討を行い、最大収量を得るための条件を探索することとした。

上述の CHO 発現系で得られたヒト組換え HRG を精製し、SDS-PAGE 後のクマシーブルー染色のパターンを native protein と比較すると共に、その生物活性を単離ヒト末梢血好中球の正球化活性、活性酸素産生抑制活性で評価することとした。

動物実験で得られた敗血症病態における HRG の動態をヒト患者において確認することは、ヒトでの POC を確立する上で極めて重要である。前年度から開始した岡山大学病院 ICU 内患者の入室第 1 病日における血漿 HRG 値の測定を蓄積し、同時に測定される

APACHE II スコア、SOFA スコア、血漿 CRP、血球細胞カウント、フィブリノーゲン、LDH、アルブミン、ビリルビン等との相関性について解析することとした。

In vivo での HRG の作用をさらに詳しく知るために、マウスの培養肥満細胞の抗原-IgE 依存的分泌と実験的アレルギー性脳炎 (EAE) 発症に対する HRG の効果を評価する。

B. 研究方法

1. HRG のマウス CLP 敗血症 Immunothrombosis に対する効果の検証

前年度までに確立した CLP 敗血症モデルマウスの肺を作製 1 日後に灌流固定し、パラフィン薄切片としたのち、好中球 (anti-Gr-1 抗体)、血小板 (anti-CD42 d 抗体)、フィブリン (anti-フィブリン抗体)、細胞核 (4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)) を 4 重染色し、それぞれのマージ率を算出する。

CLP 敗血症モデルマウスにおける敗血症性 DIC の発症を評価するため、血球カウントと凝固系反応と因子に関する検査を実施し、HRG 投与効果を評価する。CLP 敗血症モデルマウスにおける血中サイトカINSTORM を把握するために、代表的な起炎症ならびに抗炎症性サイトカインの測定を同一検体で実施し (ビーズ測定法)、サイトカINSTORM 全般に対する HRG の効果を評価する。新発見が得られた場合には、知財権利化することを考慮する。

2. CHO 細胞を用いた高収量ヒト組換え HRG 産生系の確立

研究分担者の阪口によって開発された安定発現株作製のための各種ベクターによる HRG 産生量の比較を実施する。さらに、その収量について飛躍的な産生増に繋がる可能性のあるカセットベクター構築について検討を加える。

3. ヒト好中球の正球化と活性酸素分子種産生抑制を指標にした組換え HRG の生物活性の評価

2. で作製した組換え HRG は、ヒト血漿中の native protein 精製に用いられた Ni-NTA アフィニティクロマトと MonoQ 陰イオンクロマトを用いて実施する。精製品の純度を SDS-PAGE クマシーブルー染色とウェスタンブロットで確認する。精製品の生物活性を、1 nM から 1 microM の濃度範囲でヒト好中球の正球化と活性酸素分子種産生抑制で評価し、native protein の活性と比較する。

4. 敗血症患者の血中 HRG の測定と予後評価マーカーとしての意義の解析

岡山大学病院臨床研究倫理審査委員会承認されたプロトコールに則り、患者あるいは患者家族への説明の後、同意の得られた症例で研究を実施する。ICU 入室 1 日目に採血を行い、血漿を分離する。血漿は Elisa 測定を実施するまで、-30 °C で保存する。同日の採血で、血漿 CRP、血球細胞カウント、フィブリノーゲン、LDH、アルブミン、ビリルビン値の測定を実施し、APACHE II スコア、SOFA スコアとともに HRG 低下との相関性解析と単・多変量解析を実施する。期間内に得られた症例で、血漿 HRG 低下の mortality 予測因子としての意義を解析する。

5. マウスの培養肥満細胞分泌と実験的アレルギー性脳炎に対する HRG の効果解析

マウス骨髄幹細胞の分化誘導によって得られた培養肥満細胞を IgE 受動感作し、抗原 TNP チャレンジによる分泌応答を定量する。異なった濃度の HRG を添加し、分泌に対する効果を評価する。

マウスをミエリン鞘ペプチドで免疫し、実験的アレルギー性脳炎を発症させる。脳炎の程度を四肢麻痺症状のスコアリングで評価し、HRG 末梢投与の効果について検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験は岡山大学動物実験指針に則り、実験計画書を動物実験管理委員会に提出し、承認を受けてから実施した。実験に際しては、動物に対する痛みとストレスに対し、十分注意を払った。

実験の一部に組換え体タンパク質を用いているが、組換え体実験は大学の安全審査委員会で審査を受け（課題番号：13101）実験の許可を得ている。

敗血症患者から末梢血の提供を受けるために、岡山大学病院内の倫理審査委員会にあらかじめ研究内容に関する審査書式を提出し、承認を得た。同時に同意書様式も審査を受けた。患者の同意を得る場合には、患者あるいはその家族に対し、研究内容の詳細な説明と危険、不利益、個人情報の保護に関する説明を十分尽くしている。その際、研究への不参加は治療にいかなる変化ももたらさないことをよく説明している。

C. 研究結果

CLP 敗血症モデルマウスの肺組織において、典型的と思われる Immunothrombus 形成を見出した。これは、肺血管内に Gr-1 陽性の好中球接着部位に、血小板凝集を認め、さらに同部位にフィブリン析出を観察したものである。このような Immunothrombus 形成部位には、HRG が高濃度存在することも確認された。Immunothrombus をカウントすることで評価すると、HRG 投与は Immunothrombus 数を著明に低下させることがわかった。同モデルにおける血小板数低下、APTT/PT 延長は、DIC 病態であることを示しており、これらの変化を HRG 投与は有意に抑制した。血漿中 IL-6, TNF- α , IL-10 は、本モデルで Sham グループと比較し著増したが、HRG の投与は、各増加の大部分を抑制した。

CHO 細胞による安定発現株の作製に成功し、その収量として 250 ml スケール培養で約 4mg の精製タンパクを得た。得られたタンパクの SDS-PAGE 後クマシーブルー染色では、ヒト血漿からの native protein 精製品とほぼ同じ移動度を示すタンパクバンドを検出した。さらに、組換え HRG の収量を向上させるために、新規ベクターの構築とスクリーニングに取り組み、モデルタンパクの発現では極めて優れた発現量に到達することができた。

組換え HRG 精製品の生物学的活性をヒト好中球に対する正球化活性と活性酸素分子種 (ROS) 産生抑制活性で調べたところ、用量作用曲線が native protein のそれとほぼ一致することを確認できた。この結果は、CHO 細胞で作製した組換え HRG が、native protein と同等の効力 (Potency) を有することを示している。

岡山大学病院の ICU 患者 66 名の血漿中

HRG レベルを Elisa 法で測定したところ、SIRS 患者は健常人と比較し、低値であることが明らかとなった。さらに、臨床的に敗血症と診断されたグループと非敗血症のグループを比較すると、敗血症グループが有意に低く、死亡患者と生存患者を比較した場合も、死亡患者で有意に低かった。HRG の低下は、APACHE II スコア、SOFA スコア、血漿 CRP 上昇、血小板低下、フィブリンノーゲン上昇、LDH 上昇と相関することが示された。敗血症患者の予後 (死亡) 予測マーカーとして、血漿 HRG 値の測定は APACHE II スコア、SOFA スコアと同等の感度を有することがわかった。

予備的な実験結果として、HRG がマウス肥満細胞や、免疫担当細胞に作用する可能性が示唆された。

D. 考察

CLP 敗血症モデルマウスの肺組織において、典型的な Immunothrombus 形成を証明したのは、世界的に我々が最初であると考ええる。ヒト好中球を用いた in vitro 実験で示された HRG の消失による好中球の表面微絨毛の増加、血管内皮細胞接着性の亢進、活性酸素産生の亢進、微小流路通過性の障害は、そのいずれもが血中 HRG レベルの低下した敗血症マウスの循環血中、特に肺微小血管内で生じている可能性が高い。接着性の亢進した好中球は NETosis 像を呈していたことから、まず、NETosis を生じた好中球の接着が起点となり、その上に血小板の凝集が加わり、最後に凝固反応が進行すると考えられるが、これらの過程は、相互に促進的に働く可能性もある。HRG 投与は総 Immunothrombus 数を有意に抑制したが、各好中球の接着部位では Immunothrombus 形成にまで進行していることもわかった。CLP 敗血症モデルマ

ウスでは、検査データの結果から明らかな敗血症性 DIC の病態であることがわかったが、HRG 投与はこれを改善した。従って、肺における Immunothrombus 形成抑制とともに、DIC の抑制が、生存率の改善に寄与していると推定される。起炎性サイトカインと抗炎症サイトカインが共に上昇するサイトカインストームが、HRG 投与によって著明に抑制された。この作用が好中球の沈静化のみでもたらされているかどうか検討する必要がある。

CHO 細胞のヒト組換え HRG 安定発現細胞株の樹立に成功したが、前半のベクターでは 250 ml の培養スケールで精製タンパクが約 4 mg にとどまっていた。この収量を改善するために、新規のベクター構築を検討し、EGFP モデルタンパクの発現では数十倍の量産が期待できるベクター条件を見出すことに成功した。現在、そのミックス培養から、最大産生細胞をクローニングする作業に入っている。その完了によって、原薬選定の条件に近づくと考えている。CHO 細胞で産生されたヒト組換え HRG は、ヒト好中球に対する正球化活性と活性酸素分子種 (ROS) 産生抑制活性の両アッセイにおいてヒト血漿由来の精製 native protein と同等の効力 (Potency) を有したことから、患者治療に適した製剤であると判断される。SDS-PAGE 後のクマシー染色パターンも両タンパクは近似しており、糖鎖付加量にも大きな差はないと推定される。今後、さらに厳密に糖鎖付加の均一性について解析する予定である。

ICU 内の患者について血漿中 HRG を測定した結果は、敗血症患者ではマウス CLP 敗血症モデルと同レベルの HRG 低下があることを明らかに示しており、敗血症時のヒトにおける HRG の動態がマウスにおけるそれと近似していることを強く示唆している。血漿

HRG レベルは、ICU 内患者の重症度が高いほど低下しており、また後方視的に解析したとき、患者の mortality を予測する因子としてきわめて優れていることが明らかになった。一つの因子の測定値の意義としては群を抜いており、APACHE II スコアと SOFA スコアに匹敵すると判断できたことは、今後の臨床診断・治療における有用性を強く物語っている。

HRG の作用細胞プロファイルを知るために実施されたモデル細胞 (マウス培養肥満細胞)・疾患モデル動物 (EAE マウス) を使った実験で、HRG の一定の効果が検出されたことは、これらの応答細胞種に対する HRG の直接・間接作用があることを強く示唆しており、今後さらに追求していく必要がある。

E. 結論

CLP 敗血症マウスに対する HRG の救命効果には、肺微小循環系における Immunothrombus 形成の抑制、DIC の抑制、サイトカインストームの抑制の 3 つの機序が相乗的に貢献していることを明らかにした。ヒト治療薬としてのヒト組換え HRG タンパクの製造は、CHO 細胞での安定発現株の作製に成功し、原薬選定の条件を決定する直前まで来た。ICU 内の敗血症患者の血漿中 HRG の測定結果は、マウスモデルにおいて得られた結果と完全に一致するものであり、患者の予後予測因子として血漿中 HRG の測定が極めて有用であることを示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Wake H, Mori S, Liu K, Morioka Y, Teshigawara K, Sakaguchi M, Kuroda K, Gao Y, Takahashi H, Ohtsuka A, Yoshino T, Morimatsu H, Nishibori M.
Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through neutrophil regulation.
(submitted)
- ② Okuma Y, Wang F, Toyoshima A, Kameda M, Hishikawa T, Tokunaga K, Sugiu K, Liu K, Haruma J, Nishibori M, Yasuhara T, Date I.
Mannitol enhances therapeutic effects of intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells into the brain after traumatic brain injury.
Neurosci Lett, 554:156-161, 2013.
- ③ Okuma Y, Liu K, Wake H, Liu R, Nishimura Y, Zhong H, Teshigawara K, Haruma J, Yamamoto Y, Yamamoto H, Date I, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M.
Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction.
Neuropharmacology, 85: 18-26, 2014.
- ④ Hanakawa H, Orita Y, Sato Y, Takeuchi M, Takao S, Ohno K, Kohno T, Iwaki N, Marunaka H, Tamamura R, Nishibori M, Nagatsuka H, Nishizaki K, Yoshino T.
Does HMGB1 predict occult neck lymph node metastasis in early tongue carcinoma? A case-control study of 26 patients.
J Laryngol Otol, 128:926-931, 2014.
- ⑤ 西堀正洋.
HMGB1 を標的とした治療.
日本臨牀, 72-増刊号;最新臨床脳卒中学上:417-422, 2014.
- ⑥ 大熊佑, 伊達勲, 西堀正洋.

外傷性脳傷害に対する抗 HMGB1 抗体治療.

薬学雑誌, 134(6):701-705, 2014.

- ⑦ 西堀正洋.
脳神経障害と High mobility group box-1 (HMGB1) .
麻酔, vol.63 増刊号: S89-S94, 2014.

2. 学会発表

1) 国際学会

- ① Nishibori M, Liu K, Takahashi HK, Mori S.
Anti-HMGB1 Antibody Therapy for Brain Ischemia, Brain Injury and Neuropathic Pain.
International Drug Development Science & Technology 2014. Suzhou, 2014.
- ② Nishibori M, Wake H, Mori S, Liu K, Morioka Y, Teshigawara K, Sakaguchi M, Kuroda K, Takahashi H, Ohtsuka A, Yoshino T, Morimatsu H.
Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through neutrophil regulation.
SEPSIS 2014. Paris, 2014.
- ③ Kawabata A, Kawaishi Y, Nishida T, Yamanishi H, Kamitani N, Tsubota M, Sekiguchi F, Ishikura H, Nishibori M.
High mobility group box 1 as a target for prevention and therapeutic treatment of chemotherapy-induced neuropathic pain.
Pharmacology 2014. London, 2014.
- ④ Kuroda K, Morimatsu H, Wake H, Mori S, Nishibori M.
Plasma levels of Histidine-Rich Glycoprotein in Critically Ill Patients.
IARS 2015 Annual Meeting and International Science Symposium, Honolulu, Hawaii, 2015.

2) 国内学会

① 西堀正洋.

好中球の制御による敗血症、多臓器不全の治療法開発.

BIO tech 2014 アカデミックフォーラム, 東京, 2014.

② 寺尾欣也、和氣秀徳、森岡祐太、勅使川原匡、劉克約、森秀治、高橋英夫、西堀正洋.

Endotoxin 血症併発急性膵炎に対する Histidine Rich Glycoprotein (HRG) の効果.

第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.

③ 濱崎真一、丹羽淳子、小堀宅郎、西堀正洋、高橋英夫.

HMGB1 によるヒスタミン誘導性免疫応答調節効果.

第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.

④ 山口薫、田中潤一、坪田真帆、関口富美子、関由加里、石倉宏恭、西堀正洋、川畑篤史.

Cyclophosphamide 誘起マウス膀胱炎モデルにおける膀胱痛発症メカニズムの解析: 核内蛋白 HMGB1 と内因性 H_2S の役割.

第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.

⑤ 久保里紗、坪田真帆、関口富美子、石倉宏恭、西堀正洋、川畑篤史.

可溶性トロンボモジュリンおよび抗 HMGB1 中和抗体は lipopolysaccharide あるいは substance P 膀胱内注入により誘起される膀胱痛を抑制する.

第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.

⑥ 森秀治、和氣秀徳、劉克約、勅使川原匡、

高橋英夫、西堀正洋、豊村隆男.

HMGB1 結合因子による AGEs-RAGE 結合阻害解析.

第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014.

⑦ 和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋.

好中球活性化制御に着目した敗血症病態解析と治療法開発.

第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014.

⑧ 和氣秀徳、森秀治、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋.

循環好中球制御不全による敗血症性 ARDS と HRG 補充効果.

第 126 回日本薬理学会近畿部会, 和歌山, 2014.

⑨ 山嵜大智、関由加里、山西広樹、坪田真帆、関口富美子、八木秀樹、益子高、西堀正洋、川畑篤史.

マクロファージ由来 HMGB1 の炎症性痛覚過敏への関与と分子作用メカニズムの解析.

第 126 回日本薬理学会近畿部会, 和歌山, 2014.

⑩ 阪口政清.

高機能 REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターの開発.

岡山大学機能強化戦略プロジェクトー難治固形がんの遺伝子治療ー第 2 回シンポジウム, 岡山, 2014.

⑪ 王登莉、劉克約、西堀正洋.

抗 HMGB1 抗体による脳内出血とクモ膜下出血後の脳血管攣縮治療.

第 88 回日本薬理学会年会 (シンポジウム), 名古屋, 2015.

⑫ 富麗、劉克約、和氣秀徳、西堀正洋.

ピロカルピン誘発性てんかんモデルマウスにおける抗 HMGB-1 抗体の効果.

第 88 回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.

- | | |
|---|--|
| <p>⑬ 高遠、森岡祐太、森秀治、和氣秀徳、劉克約、西堀正洋。
マクロファージによる advanced glycation end products (AGEs)の細胞内取り込み。
第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.</p> <p>⑭ 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)の敗血症時血管内好中球流動性に対する効果。
第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.</p> <p>⑮ 山嵜大智、関由加里、山西広樹、坪田真帆、八木秀樹、益子高、西堀正洋、川畑篤史。
マクロファージ由来 HMGB1 は NF-κB 系を介して炎症性痛覚過敏に寄与する。
第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.</p> <p>⑯ 黒田浩佐、森松博史、和氣秀徳、森秀治、西堀正洋。
SIRS 患者における Histidine-Rich Glycoprotein について
第 42 回日本集中治療医学会学術大会, 東京, 2015.</p> | <p>2. 実用新案登録
該当なし</p> <p>3. その他
該当なし</p> |
|---|--|

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① 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, US14/406191, EP13801138.2 (2013.5.28 出願)
WO/2013/183494 (2013.12.12 公開)
西堀正洋、森秀治、和氣秀徳、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、阪口政清
- ② サイトカインストーム抑制剤
特願 2014-258546 (2014.12.22 出願)
西堀正洋、森秀治、和氣秀徳

HRG の抗敗血症機序解析とヒト好中球を用いたモデル実験

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
	森 秀 治	就実大学薬学部・教授
	高 橋 英 夫	近畿大学医学部・教授
	吉 田 研 一	岡山大学知的財産本部・知的財産マネージャー

研究要旨

マウスの盲腸結紮穿孔(CLP)敗血症モデルを用いて、敗血症性 ARDS の原因が NETosis を生じた好中球の血管壁接着を契機とする免疫血栓形成にあることを証明し、HRG の NETosis 抑制、ARDS 肺内炎症抑制ならびに致死性軽減作用を解明した。ヒト末梢血好中球を用いて、PI-3 kinase 阻害薬の Wortmannin と p38 MAP kinase 阻害薬 SB239063 が、HRG と同様の正球化を誘導することを示すと共に、HRG による細胞内カルシウムイオンの緩やかな上昇を観察し、細胞内シグナリング経路を示唆した。

A. 研究目的

前年度までの研究で、マウスの盲腸結紮穿孔(CLP)敗血症モデルを用いてヒト血漿から精製した HRG がマウスの致死率を著明に低下させることを明らかにしてきた。その作用機序を解析する中で、単離したヒト好中球に対する作用として、1) 好中球の形態を表面微絨毛構造のない平滑で径の縮小した正球形に保つ作用、2) 血管内皮細胞と人工基質に対する好中球の接着性を低いレベルに保つ作用、3) 好中球の微小流路通過性を維持する作用、4) 好中球の活性酸素分子種(ROS) 産生を抑制する作用、等を証明してきた。また、CLP 敗血症マウス肺において、変形した好中球が微小血管床に NETosis 像を作って接着していることを見出した。これ

らの成果に基づき、現在提唱されている NETosis 好中球が起点となって進行する血栓形成(Immunothrombosis) が敗血症モデル肺で生じているかどうか、またそれを HRG が抑制できるかどうかを知ることは、HRG の作用機序を考える上で極めて重要な課題である。本年度において、HRG 投与効果のさらに詳細な機序解析として、Immunothrombosis、敗血症性 DIC 病態、サイトカインストームに注目する。

HRG の好中球に対する作用の詳細を明らかにするため、ヒト末梢血好中球を使って、細胞内シグナリングと好中球の正球化に対応する細胞骨格系の再構成について調べることは極めて重要である。また、種々のアゴニスト刺激、例えば C5a, IL-8, fMLP 刺激に

よる好中球の細胞応答に対する HRG の作用を明らかにすることは、炎症巣における HRG の機能を知る上で重要である。以上の理由から、単離ヒト末梢血好中球を用いた実験を行うこととした。

B. 研究方法

1. HRG の マウス CLP 敗血症 Immunothrombosis に対する効果の検証

前年度までに確立した CLP 敗血症モデルマウスの肺を作製 1 日後に灌流固定し、パラフィン薄切切片としたのち、好中球 (anti-Gr-1 抗体)、血小板 (anti-CD42 d 抗体)、フィブリン (anti-フィブリン抗体)、細胞核 (4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)) を 4 重染色し、それぞれのマージ率を算出する。

CLP 敗血症モデルマウスにおける敗血症性 DIC の発症を評価するため、血球カウントと凝固系反応と因子に関する検査を実施し、HRG 投与効果を評価する。CLP 敗血症モデルマウスにおける血中サイトカインストームを把握するために、代表的な起炎性ならびに炎症性サイトカインの測定を同一検体で実施し (ビーズ測定法)、サイトカインストーム全般に対する HRG の効果を評価する。新知見が得られた場合には、知財権利化することを考慮する。

2. ヒト末梢血好中球を用いた実験

ヒト末梢血好中球を単離し、HBSS 中に懸濁後、マイクロタイタープレートに分注する。HRG (1 microM) 存在、非存在下あるいは、各種の薬物存在下に一定時間インキュベートし、好中球の形態、活性酸素産生能、細胞形質膜接着分子発現、細胞内シグナリングを測定する。

3. ヒト好中球の正球化と活性酸素分子種産生抑制を指標にした組換え HRG の生物活性の評価

2. で作製した組換え HRG は、ヒト血漿中の native protein 精製に用いられた Ni-NTA アフィニティクロマトと MonoQ 陰イオンクロマトを用いて実施する。精製品の純度を SDS-PAGE クマシーブルー染色とウェスタンブロットで確認する。精製品の生物活性を、1 nM から 1 microM の濃度範囲でヒト好中球の正球化と活性酸素分子種産生抑制で評価し、native protein の活性と比較する。

(倫理面への配慮)

動物実験は岡山大学動物実験指針に則り、実験計画書を動物実験管理委員会に提出し、承認を受けてから実施した。実験に際しては、動物に対する痛みとストレスに対し、十分注意を払った。

実験の一部に組換え体タンパク質を用いているが、組換え体実験は大学の安全審査委員会審査を受け (課題番号: 13101) 実験の許可を得ている。

敗血症患者から末梢血の提供を受けるために、岡山大学病院内の倫理審査委員会にあらかじめ研究内容に関する審査書式を提出し、承認を得た。同時に同意書様式も審査を受けた。患者の同意を得る場合には、患者あるいはその家族に対し、研究内容の詳細な説明と危険、不利益、個人情報の保護に関する説明を十分尽くしている。その際、研究への不参加は治療にいかなる変化ももたらさないことをよく説明している。

C. 研究結果

CLP 敗血症モデルマウスの肺組織において、典型的と思われる Immunothrombus 形

成を見出した。これは、肺血管内に Gr-1 陽性の好中球接着部位に、血小板凝集を認め、さらに同部位にフィブリン析出を観察したものである。このような Immunothrombus 形成部位には、HRG が高濃度存在することも確認された。Immunothrombus をカウントすることで評価すると、HRG 投与は Immunothrombus 数を著明に低下させることがわかった。さらに、接着した好中球の DNA 染色で、Immunothrombus の起点になる好中球は NETosis を生じていることがわかった。同モデルにおける血小板数低下、APTT/PT 延長は、DIC 病態であることを示しており、これらの変化を HRG 投与は有意に抑制した。血漿中 IL-6, TNF- α , IL-10 は、本モデルで Sham グループと比較し著増したが、HRG の投与は、各増加の大部分を抑制した。

ヒト好中球の HRG による正球化とほぼ似た形態変化が PI-3 kinase 阻害薬の Wortmannin と p38 MAP kinase 阻害薬 SB239063 の添加で惹起された。HRG は、C5a, IL-8, fMLP による CD11b, CD62L, CD162 発現に影響しなかったが、基礎レベルとこれらのアゴニストで刺激上昇した活性化 CD11b の発現を抑制した。HRG 添加後 60 分までに細胞内遊離カルシウム濃度は徐々に上昇することが、蛍光色素を用いた遊離カルシウム濃度の測定で明らかになった。細胞内カルシウムのキレーターである BAPTA は、HRG による好中球正球化を有意に抑制した。Small G タンパク Rho family の非特異的阻害薬の ToxinB は、軽度小球化を抑制した。ヒト好中球の微小流路通過性は、HRG の添加によって、PBS やヒトアルブミン対照と比較し、スムーズであった。

D. 考察

CLP 敗血症モデルマウスの肺組織において、典型的な Immunothrombus 形成を証明したのは、世界的に我々が最初であると考ええる。ヒト好中球を用いた in vitro 実験で示された HRG の消失による好中球の表面微絨毛の増加、血管内皮細胞接着性の亢進、活性酸素産生の亢進、微小流路通過性の障害は、そのいずれもが血中 HRG レベルの低下した敗血症マウスの循環血中、特に肺微小血管内で生じている可能性が高い。接着性の亢進した好中球は NETosis 像を呈していたことから、まず、NETosis を生じた好中球の接着が起点となり、その上に血小板の凝集が加わり、最後に凝固反応が進行すると考えられるが、これらの過程は、相互に促進的に働く可能性もある。HRG 投与は総 Immunothrombus 数を有意に抑制したが、各好中球の接着部位では Immunothrombus 形成にまで進行していることもわかった。CLP 敗血症モデルマウスでは、検査データの結果から明らかな敗血症性 DIC の病態であることがわかったが、HRG 投与はこれを改善した。従って、肺における Immunothrombus 形成抑制とともに、DIC の抑制が、生存率の改善に寄与していると推定される。起炎性サイトカインと抗炎症サイトカインが共に上昇するサイトカインストームが、HRG 投与によって著明に抑制された。この作用が好中球の沈静化のみでもたらされているかどうか検討する必要がある。

CHO 細胞のヒト組換え HRG 安定発現細胞株の樹立に成功したが、CHO 細胞で産生されたヒト組換え HRG は、ヒト好中球に対する正球化活性と活性酸素分子種 (ROS) 産生抑制活性の両アッセイにおいてヒト血漿由来の精製 native protein と同等の効力 (Potency) を有したことから、患者治療に適した製剤であると判断される。SDS-PAGE

後のクマシー染色パターンも両タンパクは近似しており、糖鎖付加量にも大きな差はないと推定される。

ヒト好中球を用いた研究から、HRG の正球化誘導作用には、細胞内カルシウムシグナルと Small G タンパク Rho family が関与する可能性が示唆された。HRG は、細胞正球化と表面微絨毛の消失効果を通じて好中球の微小流路通過性維持に働いていることがわかった。HRG が静止レベルとアゴニスト刺激による活性化フォーム CD11b の発現を抑制したことは、HRG が循環血中にある好中球に対し、恒常的に活性化抑制をかけていることを示していると考えられる。

E. 結論

CLP敗血症マウスに対するHRGの救命効果には、肺微小循環系における好中球NETosisの抑制、Immunothrombus形成の抑制、DICの抑制、サイトカインストームの抑制の4つの機序が相乗的に貢献していることを明らかにした。

ヒト好中球を用いて、HRGによって誘導される細胞内シグナリングの概要を示唆した。CHO 安定発現細胞株で産生されたヒト組換えHRGが、ヒト血漿Native proteinと同等の活性を有することを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Wake H, Mori S, Liu K, Morioka Y, Teshigawara K, Sakaguchi M, Kuroda K, Gao Y, Takahashi H, Ohtsuka A, Yoshino T, Morimatsu H, Nishibori M.
Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through neutrophil regulation.
(submitted)

- ② Okuma Y, Wang F, Toyoshima A, Kameda M, Hishikawa T, Tokunaga K, Sugiu K, Liu K, Haruma J, Nishibori M, Yasuhara T, Date I.

Mannitol enhances therapeutic effects of intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells into the brain after traumatic brain injury.

Neurosci Lett, 554:156-161, 2013.

- ③ Okuma Y, Liu K, Wake H, Liu R, Nishimura Y, Zhong H, Teshigawara K, Haruma J, Yamamoto Y, Yamamoto H, Date I, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M.

Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction.

Neuropharmacology, 85: 18-26, 2014.

- ④ Hanakawa H, Orita Y, Sato Y, Takeuchi M, Takao S, Ohno K, Kohno T, Iwaki N, Marunaka H, Tamamura R, Nishibori M, Nagatsuka H, Nishizaki K, Yoshino T.

Does HMGB1 predict occult neck lymph node metastasis in early tongue carcinoma? A case-control study of 26 patients.

J Laryngol Otol, 128:926-931, 2014.

- ⑤ 西堀正洋.

HMGB1 を標的とした治療.

日本臨牀, 72-増刊号;最新臨床脳卒中学上:417-422, 2014.

- ⑥ 大熊佑, 伊達勲, 西堀正洋.

外傷性脳傷害に対する抗HMGB1抗体治療.

薬学雑誌, 134(6):701-705, 2014.

- ⑦ 西堀正洋.

脳神経障害と High mobility group box-1 (HMGB1) .

麻酔, vol.63 増刊号: S89-S94, 2014.

2. 学会発表

1) 国際学会

- ① Nishibori M, Liu K, Takahashi HK, Mori S.
Anti-HMGB1 Antibody Therapy for Brain Ischemia, Brain Injury and Neuropathic Pain.

International Drug Development Science & Technology 2014. Suzhou, 2014.

- ② Nishibori M, Wake H, Mori S, Liu K, Morioka Y, Teshigawara K, Sakagichi M, Kuroda K, Takahashi H, Ohtsuka A, Yoshino T, Morimatsu H.

Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through neutrophil regulation.

SEPSIS 2014. Paris, 2014.

- ③ Kawabata A, Kawaishi Y, Nishida T, Yamanishi H, Kamitani N, Tsubota M, Sekiguchi F, Ishikura H, Nishibori M.

High mobility group box 1 as a target for prevention and therapeutic treatment of chemotherapy-induced neuropathic pain.

Pharmacology 2014. London, 2014.

2) 国内学会

- ① 西堀正洋.

好中球の制御による敗血症、多臓器不全の治療法開発.

BIO tech 2014 アカデミックフォーラム, 東京, 2014.

- ② 寺尾欣也、和氣秀徳、森岡祐太、勅使川原匡、劉克約、森秀治、高橋英夫、西堀正洋.

Endotoxin 血症併発急性膵炎に対する Histidine Rich Glycoprotein (HRG) の効果.

第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.

- ③ 濱崎真一、丹羽淳子、小堀宅郎、西堀正

洋、高橋英夫.

HMGB1 によるヒスタミン誘導性免疫応答調節効果.

第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.

- ④ 山口薫、田中潤一、坪田真帆、関口富美子、関由加里、石倉宏恭、西堀正洋、川畑篤史.

Cyclophosphamide 誘起マウス膀胱炎モデルにおける膀胱痛発症メカニズムの解析: 核内蛋白 HMGB1 と内因性 H₂S の役割.

第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.

- ⑤ 久保里紗、坪田真帆、関口富美子、石倉宏恭、西堀正洋、川畑篤史.

可溶性トロンボモジュリンおよび抗 HMGB1 中和抗体は lipopolysaccharide あるいは substance P 膀胱内注入により誘起される膀胱痛を抑制する.

第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.

- ⑥ 森秀治、和氣秀徳、劉克約、勅使川原匡、高橋英夫、西堀正洋、豊村隆男.

HMGB1 結合因子による AGEs-RAGE 結合阻害解析.

第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014.

- ⑦ 和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋.

好中球活性化制御に着目した敗血症病態解析と治療法開発.

第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014.

- ⑧ 和氣秀徳、森秀治、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋.

循環好中球制御不全による敗血症性 ARDS と HRG 補充効果.

第 126 回日本薬理学会近畿部会, 和歌山, 2014.

- ⑨ 山嵜大智、関由加里、山西広樹、坪田真帆、関口富美子、八木秀樹、益子高、西堀正洋、川畑篤史。
マクロファージ由来 HMGB1 の炎症性痛覚過敏への関与と分子作用メカニズムの解析。
第 126 回日本薬理学会近畿部会, 和歌山, 2014.
- ⑩ 王登莉、劉克約、西堀正洋。
抗 HMGB1 抗体による脳内出血とクモ膜下出血後の脳血管攣縮治療。
第 88 回日本薬理学会年会 (シンポジウム), 名古屋, 2015.
- ⑪ 富麗、劉克約、和氣秀徳、西堀正洋。
ピロカルピン誘発性てんかんモデルマウスにおける抗 HMGB-1 抗体の効果。
第 88 回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.
- ⑫ 高遠、森岡祐太、森秀治、和氣秀徳、劉克約、西堀正洋。
マクロファージによる advanced glycation end products (AGEs) の細胞内取り込み。
第 88 回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.
- ⑬ 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)の敗血症時血管内好中球流動性に対する効果。
第 88 回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.
- ⑭ 山嵜大智、関由加里、山西広樹、坪田真帆、八木秀樹、益子高、西堀正洋、川畑篤史。
マクロファージ由来 HMGB1 は NF- κ B 系を介して炎症性痛覚過敏に寄与する。
第 88 回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- ① 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, US14/406191, EP13801138.2 (2013.5.28 出願)
WO/2013/183494 (2013.12.12 公開)
西堀正洋、森秀治、和氣秀徳、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、阪口政清
- ② サイトカインストーム抑制剤
特願 2014-258546 (2014.12.22 出願)
西堀正洋、森秀治、和氣秀徳
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Manuscript**Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic Lethality
through Neutrophil Regulation**

Hidenori Wake¹, Shuji Mori⁶, Keyue Liu¹, Yuta Morioka¹, Kiyoshi Teshigawara¹,
Masakiyo Sakaguchi², Kosuke Kuroda³, Yuan Gao¹, Hideo Takahashi⁷, Aiji Ohtsuka⁴,
Tadashi Yoshino⁵, Hiroshi Morimatsu³ & Masahiro Nishibori¹

¹Department of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan.

²Department of Cell Biology

³Department of Anesthesiology

⁴Department of Human Morphology

⁵Department of Pathology

⁶Department of Pharmacology, Shujitsu University School of Pharmacy, Okayama
703-8516, Japan.

⁷Department of Pharmacology, Kinki University School of Medicine, Osakasayama
589-8511, Japan.

Correspondence: Dr. Masahiro Nishibori

Department of Pharmacology, Okayama University Graduate School of
Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558,
Japan

Phone/Fax: +81-86-235-7140 Email: mbori@md.okayama-u.ac.jp

Abstract

Sepsis is a major cause of death worldwide. We show that a plasma protein histidine-rich glycoprotein (HRG) was decreased significantly in septic mice with cecal ligation and puncture (CLP) and supplementary treatment of septic mice with exogenous HRG improved survival, with strong inhibition of tight attachment of neutrophils to pulmonary vasculatures, subsequent immunothrombosis, DIC state, lung inflammation, hypercytokinemia and activation of vascular endothelial cells (VECs). In contrast, knockdown of HRG by siRNA exacerbated lethality. Purified human HRG reversibly induced morphological changes in human neutrophils *in vitro*; induction of spherical shape with reduced microvilli and adhesiveness to VECs. HRG maintained the passage of neutrophils through microcapillaries and abolished production of reactive oxygen species. These results suggested that the supplementary therapy with HRG may provide a novel strategy for the treatment of sepsis through suppression of excessive systemic inflammation and immunothrombosis by keeping circulating neutrophils quiescent and preventing uncontrolled activation of VECs.

Introduction

Sepsis is a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) associated with infection. The pathogenesis of sepsis includes the disturbance of blood-vascular homeostasis, which may cause multiple organ failure, circulatory shock, and disseminated intravascular coagulation, leading to high mortality¹⁻⁴. The proinflammatory cytokine response in the acute phase may be triggered by the constituents of invading pathogens and tissue damage-associated molecular patterns^{5,6}, accompanied by the activation of vascular endothelial cells, a pivotal step for inducing the migration of leukocytes into inflammatory sites with pathogen invasion^{7,8}. A recent study suggested that neutrophil adhesion on vascular endothelial cells may trigger platelet aggregation and immunothrombus formation in septic acute respiratory distress syndrome (ARDS)⁹⁻¹⁴. Thus, circulating neutrophils may play important roles in the pathogenesis of septic conditions in addition to infiltrating neutrophils. However, the uncontrolled activation of neutrophils has not been examined in detail due to methodological limitations¹⁵. Neutrophils are easily activated by *in vitro* handling or even by withdrawing from blood vessels. Therefore, it might be rather difficult to know and speculate about the precise features of the circulating neutrophils by an *in vitro* analysis. Also, if any are present, a controlling factor of neutrophils in plasma,

one that might regulate a fundamental state of circulating neutrophils in both healthy and disease conditions, remains to be determined.

Histidine-rich glycoprotein (HRG) is an 80 kD plasma glycoprotein produced in and secreted from the liver¹⁶. The plasma levels of HRG in healthy human were reported to be constant around 1 μ M¹⁷. HRG's primary amino acid sequence has an extraordinary number of histidine residues and typical GHHPH repeats¹⁸. Since HRG binds to a diverse range of ligands including heparin, heparan sulfate, fibrin, fibrinogen, plasminogen, thrombospondin, divalent metal cations, heme, and complement C1q, it has been suggested to be involved in the regulation of coagulation/fibrinolysis¹⁹⁻²², immune response²³⁻²⁵ and angiogenesis²⁶⁻²⁸. Moreover, HRG has been reported to the antibacterial and antifungal activities in acidic pH and high Zn condition²⁹⁻³¹ as well as the neutralizing effect on LPS³². Actually, Shannon et al. demonstrated that HRG decreases mortality of septic mice model with *S. pyogenes*-induced abscess by killing and trapping of bacteria in abscess site³³. However, the effects of HRG on the circulating leukocytes, especially neutrophils in systemic septic condition is poorly understood.

In the present study, we identified and characterized HRG as a factor that maintains a neutrophil's spherical shape with minimal microvilli on the surface. These