

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 **西 堀 正 洋**

平成 26 (2014) 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	
(資料1) HMGB1 結合因子としての Histidine rich glycoprotein (HRG)	
II. 分担研究報告	
1. ヒト血漿 HRG の好中球に対する作用の研究	13
和氣 秀徳 他	
2. 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	17
和氣 秀徳 他	
(資料2) Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through neutrophil regulation.	
(資料3) Endotoxemia 併発急性膵炎モデルに関する研究	
3. ヒト敗血症患者の血漿 HRG 動態に関する研究	99
森松 博史 他	
(資料4) ヒト敗血症患者の血漿 HRG 動態に関する研究	
4. ヒト組換え HRG の哺乳動物細胞発現系の確立	105
阪口 政清 他	
(資料5) HEK293 細胞、HepG2 細胞を用いた rHRG 一過性発現株、安定発現株の作製	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	128
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

ヒト血漿から精製した Histidine-rich glycoprotein (HRG) を用いて、単離したヒト好中球に対する生物活性を明らかにした。マウスの盲腸結紮穿孔刺 (CLP) 敗血症モデルで、急性期における血漿 HRG の著明な低下と、ヒト精製 HRG の治療効果を証明した。In vivo イメージングを用いて、敗血症時の循環血中好中球の異常な動態と HRG の治療効果を証明した。動物実験における POC を確立した。4 種のプラスミドベクターと CHO と HEK293 細胞を用いてヒト組み換え HRG の発現と精製に成功した。ICU 内の敗血症患者の血漿 HRG の測定を行い、健常人の約 25%であることを見出した。

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（岡山大学病院新医療研究開発・准教授）
橋本 和彦（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）

ゲン、プラスミノゲンアクチベータ、HMGB1、Zn²⁺ などとの結合を介して発現すると考えられている。

本研究では、HRG の新規の機能として見出された好中球に対する作用の全貌を明らかにする。特に、単離したヒト好中球に対する作用を 1) 好中球形態に対する作用、2) 血管内皮細胞と人工基質に対する好中球の接着性に対する作用、3) 好中球の微小流路通過性に対する作用、4) 好中球の活性酸素分子種産生に対する作用、に注目し解析する。明らかにされた好中球に対する作用に基づき、マウスの盲腸結紮穿孔刺 (CLP) 敗血症モデルで、急性期における血漿 HRG の動態と、ヒト精製 HRG の治療効果について実証する。治療薬としてのヒト組換え HRG を得るために、哺乳動物細胞を用いた発現系を確立し、その生物活性について明らかにする。

マウスの敗血症モデルで得られた HRG の治療効果をヒトに外挿するためには、実際に敗血症患者のデータが必要である。この目

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

的のために、ICU 内の敗血症患者の血漿 HRG の測定を実施する。同時に健常人対照と、外科手術後の SIRS 病態患者の測定も併せて実施する。

B. 研究方法

1. HRG のヒト好中球形態に対する作用

ヒト好中球を健常人末梢血から単離した。HBSS に懸濁した好中球をマイクロプレートに分注し、一定時間 HRG とインキュベーションした後、その形態を蛍光ラベル後の蛍光顕微鏡観察あるいは走査電顕で観察した。

2. HRG のヒト好中球接着に対する作用

単離したヒト好中球をマイクロプレートに分注し、各種条件化に一定時間インキュベートした後、ポリスチレン基材への接着を測定した。血管内皮細胞への接着能は、EA.hy926 細胞単層培養上での接着で評価した。

3. ヒト好中球の微小流路通過性に対する HRG の効果

単離したヒト好中球を一定時間精製ヒト HRG あるいはヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミンとエッペンドルフチューブ内でインキュベートした後、Microchannel Flow Analyser (MC-FAN) で 100 μ l の好中球懸濁液の微小流路通過時間を測定し、同時に流路スリットへの細胞接着を観察した。

4. ヒト好中球の活性酸素分子種産生に対する HRG の効果

単離したヒト好中球を一定時間精製ヒト HRG あるいはヒト血清アルブミン、

ウシ血清アルブミンとマイクロプレート内でインキュベートし、経時的に活性酸素分子種産生を測定した。細胞内での産生と細胞外への放出を弁別的に測定するため、細胞透過性とは透過性基質をそれぞれ用いた。

5. 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。

6. 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。

7. 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。

8. 哺乳動物細胞を用いたヒト組換え HRG の発現と精製

HepG2、HEK293、CHO の 3 種類の哺乳類細胞と 4 種類のプラスミドベクターを用いて、まず各種条件下におけるヒト組換え HRG の一過性発現について検討した。培地中に分泌された HRG を Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーで精製した。得られた一部精製タンパクの活性を単離ヒト好中球の正球化活性で Native タンパクと比較した。

9. 敗血症患者血漿 HRG の測定

岡山大学病院の ICU に入院する敗血症患者の血漿 HRG を、臨床研究の倫理審査委員会承認された文書による同意を得た後、ウェスタンブロットあるいは独自に開発した ELISA で測定した。健常人対照ならびに外科手術後の患者についても、同様の手続きを経た後血漿 HRG を測定した。

(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、審査を受けた。同時に同意書様式も審査を受けた。患者様の同意を得る場合には、患者様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

NiNTA-アガロースアフィニティクロマトグラフィーと MonoQ 陰イオンクロマトグラフィーを用いて、ヒト血漿(凍結新鮮血漿、日本赤十字社製)から HRG を精製した。精製タンパクは SDS-PAGE クマシーブルー染色で分子量の異なる 2 バンドとして検出され、これまで報告されている遺伝子多型の存在と合致した。HBSS を溶媒コントロールとし、精製 HRG、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、陽性対照として fMLP の各刺激条件を用いて一定時間インキュベート後、細胞形態を観察した。細胞にはあらかじめ Calcein-AM を取り込ませ、細胞質コンパートメントを、Hoechst33342 で細胞核を蛍光標識し形態を観察した。走査電子顕微鏡で観察する場合には、一定時間後常法により細胞を固定した。その結果、HRG でインキュベートされたヒト好中球はインキュベート開始後約 15 分で正球化(In Cell Analyser Workstation software で解析定量化)し、そのままの形態がインキュベータ中保たれた。HRG の効果は可逆的であり、10 nM~1000 nM の広範囲にわたって濃度依存的であった。一方、HBSS、HSA、BSA、fMLP 処理の各好中球は、多様な形態でマイクロプレートに接着し、殆ど正球化の形態は

示さなかった。HRG 処理好中球では、Hoechst33342 陽性の分葉核が細胞中心部に折りたたまれている様子が観察され、細胞質の蛍光強度は他の処置群と比べて高かった。

走査電子顕微鏡での観察では、HRG 処理好中球には細胞表面の微絨毛構造が殆どないことがわかった。それに対し、HBSS、HSA、BSA 処置群では、1 ミクロン弱の微絨毛が多数存在していることが確認された。fMLP 処置群では、細胞全体の変形と細胞表面のおうとつが著明であった。

上記のような特徴的な形態変化を示したヒト単離好中球のポリスチレン人工基質と EA. hy926 血管内皮細胞に対する接着性を定量した。接着性は緩く 3 回洗浄操作を行った後の残存細胞数で評価した。その結果、HBSS、HSA、BSA、fMLP 各処置群はいずれの条件下でも高い接着性を示したが、HRG 処置群のみ他のグループと比較し有意に低い接着性であった。

平均 4.5 μm (高さ) x 7 μm (幅) の擬似毛細血管流路での好中球通過性が MC-FAN を用いて検討された。その結果、HBSS、HSA、BSA、fMLP 各処置群では隔壁スリット上やスリット内に停滞する好中球が一定頻度で観察された。特に fMLP 群ではスリット構造への強い細胞接着が観察された。一方、HRG 処置群では、そのような細胞は殆どなかった。100 μl の好中球懸濁液の通過時間についても、HRG 処置群のみ低い値を示した。

Isoluminol を基質とする化学発光法で測定した細胞外活性酸素分子種の産生実験では、HRG 処置好中球が極めて低いレベルの活性酸素産生状態に誘導されることがわかった。細胞内での活性酸素分子種産生でも同様の結果が得られたが、抑制の程度は幾分低かった。

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。

HEK293、CHO、HepG2 の 3 種類の哺乳動物細胞と 4 種類の一過性発現用プラスミドベクターを用いて 10 cm ディッシュでの発現条件を検討した。その結果、HepG2 細胞ではいずれのプラスミドベクターを用いた場合でも HRG タンパクの発現量が極めて少ないことがわかった。それに対し、HEK293、CHO 細胞では、2 種類のベクターで一定量の HRG タンパクを培地中に分泌することがわかった。分泌は 5 日間持続することがわかったので、この期間に回収された培地から、組換え HRG の Ni-NTA アガロースによるアフィニティ精製を試みた。その結果、組換え HRG は Ni-NTA アガロースによるアフィニティ精製においてヒト Native HRG と略同じ挙動を示すことがわかった。HEK293、CHO それぞれ 10 cm ディッシュの培養細胞より約 20 ~ 30 μg の精製品が得られた。

臨床研究倫理審査委員会承認を得た後、ICU 内の敗血症患者と外科術後患者の血漿 HRG レベルを測定した。現時点での測定患者数は、10 人と 10 人である。健常人のレベルと比較し、敗血症では約 25%、外科術後では約 40% の値を示し、いずれも有意な低下であった。また敗血症患者と外科術後の患者についても有意差があった。

D . 考察

HRG 処理によってヒト単離好中球にもたらされた形態変化は、世界的に報告のない全く新しい調節系の発見である。形態上の変化は、1) 形態の正球化、2) 細胞径の短縮、3) 細胞表面微絨毛の消失、とまとめること

ができる。走査電子顕微鏡による細胞表面の観察から推測されるように、表面円滑で微絨毛のない細胞は、人工基質ならびに EA.hy926 血管内皮細胞に対する接着性が低く抑えられていた。ヒト血漿中には約 1 μM 濃度の HRG が存在するので、循環血中における好中球の形態は本研究で明らかにされた 3 つの特徴を有するものであると推測される。一般的な教科書の記載では、好中球の径は 10 ~ 14 μm と表現されているものが多い。この径は、末梢血スメア染色標本における観察に基づき述べたものが多いと考えられる。HRG 存在下における正球形の好中球径は、赤血球のそれに極めて近いことが走査電子顕微鏡による観察と、蛍光染色された顕微鏡像から明らかとなった。

正球化し、微絨毛構造のない円滑な細胞表面の好中球は、擬似毛細血管の通過性においても、極めて優れていることが実験的に証明された。HRG を欠く溶液中でのインキュベートでは、細胞形態の変化とともに微小流路への接着性が高まっていくことがわかった。したがって、生体内における微小循環系における好中球の通過性維持において HRG は極めて重要な役割を果たすと推測される。

炎症局所に遊走・浸潤した好中球は、生体内への侵入者である病原性微生物を不活化し、殺傷するのに放出するプロテアーゼ群と活性酸素分子を用いている。食後の殺菌過程でも活性酸素は用いられている。一方、循環血中に存在する好中球については、細胞内顆粒の分泌放出や活性酸素の産生活性をできる限り低く押さえ込んでおくことが血管内で不必要な炎症反応を生じさせないために重要である。HRG 処理した好中球で示されたのは、まさに HRG の働きで (HRG のみでも) 好中球活性酸素産生が低く抑えられているという事実である。このことから、

HRG は好中球の形態のみでなく、細胞接着、微小流路通過性、活性酸素産性能という機能面までを制御する重要な血漿因子であるといえることができる。したがって、そのような重要な活性を有する因子が、種々の炎症性疾患においてどのように生体内動態が変化するかを明らかにすることは、極めて重要な課題である。また、好中球の活性化を誘導する IL-8、C5a、fMLP 等のアゴニストで刺激した時の HRG の作用についても明らかにする必要がある。

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。

ICU 内の敗血症患者の血漿 HRG は、健康人のレベルと比較すると約 25% にまで低下していることがわかった。外科術後 1 日目の患者血漿では約 40% であった。現時点では測定患者数が限られているので断定的に結論はできないが、ヒト敗血症患者においても本研究で用いたマウス敗血症モデルと同程度の血漿 HRG 低下が生じている可能性がある。このような敗血症患者の血漿 HRG レベルの報告は世界的に初めてのデータである。ヒト敗血症治療薬として HRG の補充療法を考える上で重要な根拠となるデータである。

3 種類の哺乳動物細胞、HEK293、CHO、HepG2 細胞の内、HepG2 細胞では殆ど組換えヒト HRG の発現は得られなかった。今後の治療用組換え HRG タンパクの作製細胞候補から除外すべきであることがわかった。

E. 結論

ヒト血漿から精製した HRG が、ヒト単離好中球の形態を特徴的な微絨毛のない正球形に保つ働きを持つことを明らかにした。この好中球の形態は細胞の人工基質や血管内皮細胞に対する接着を抑え、微小流路 (疑似毛細血管) 通過性に優れたものであることを証明した。さらに HRG は、好中球の活性酸素分子種の産生を極めて低いレベルに維持することを明らかにした。以上の知見から、血漿タンパク HRG が循環好中球の鎮静的維持に極めて重要な役割を果たしていると推測した。

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。ヒト敗血症患者の血漿 HRG 測定で、マウスで観察された血漿 HRG 低下がヒトでも生じることを確認した。

F . 健康危険情報

特になし

G . 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.

日本臨床, 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モジュリンは 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.

H . 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

ヒト血漿 HRG の好中球に対する作用の研究

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
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

研究要旨

ヒト血漿から精製した Histidine-rich glycoprotein (HRG) を用いて、単離したヒト好中球に対する生物活性を以下のように明らかにした。1)好中球径を短縮し、正球化する、2)細胞表面の微小絨毛を消失させる、3)活性酸素分子種の産生を低下させる、4)血管内皮細胞への接着性を低下させる、5)微小流路の通過性を維持する。これらの効果は、HRG が循環血中に存在する好中球の活性化レベルを基底状態に維持するのに極めて重要であることを示した。

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。

本研究では、HRG の新規の機能として見出された好中球に対する作用の全貌を明らかにする。特に、単離したヒト好中球に対する作用を 1)好中球形態に対する作用、2)血管内皮細胞と人工基質に対する好中球の接着性に対する作用、3)好中球の微小流路通過性に対する作用、4)好中球の活性酸素分子種産生に対する作用、に注目し解析する。

B. 研究方法

1. HRG のヒト好中球形態に対する作用

ヒト好中球を健常人末梢血から単離した。HBSS に懸濁した好中球をマイクロプレートに分注し、一定時間 HRG とインキュベーションした後、その形態を蛍光ラベル後の蛍光顕微鏡観察あるいは走査電顕で観察した。

2. HRG のヒト好中球接着に対する作用

単離したヒト好中球をマイクロプレートに分注し、各種条件化に一定時間インキュベートした後、ポリスチレン基材への接着を測定した。血管内皮細胞への接着能は、EA. hy926 細胞単層培養上での接着で評価した。

3. ヒト好中球の微小流路通過性に対する HRG の効果

単離したヒト好中球を一定時間精製ヒト HRG あるいはヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミンとエップンドルフチューブ内でインキュベートした後、Microchannel Flow Analyser (MC-FAN) で 100 μ l の好中球懸濁液の微小流路通過時間を測定し、同時に流路スリットへの細胞接着を観察した。

4. ヒト好中球の活性酸素分子種産生に対する HRG の効果

単離したヒト好中球を一定時間精製ヒト HRG あるいはヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミンとマイクロプレート内でインキュベートし、経時的に活性酸素分子種産生を測定した。細胞内での産生と細胞外への放出を弁別的に測定するため、細胞透過性と非透過性基質をそれぞれ用いた。

C. 研究結果

NiNTA-アガロースアフィニティークロマトグラフィーと MonoQ 陰イオンクロマトグラフィーを用いて、ヒト血漿(凍結新鮮血漿、日本赤十字社製)から HRG を精製した。精製タンパクは SDS-PAGE クマシーブルー染色で分子量の異なる 2 バンドとして検出され、これまで報告されている遺伝子多型の存在と合致した。HBSS を溶媒コントロールとし、精製 HRG、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、陽性対照として fMLP の各刺激条件を用いて一定時間インキュベート後、細胞形態を観察した。細胞にはあらかじめ Calcein-AM を取り込ませ、細胞質コンパートメントを、Hoechst33342 で細胞核を蛍光標識し形態を観察した。走査電子顕微鏡で観察する場合には、一定時間後常法により細胞を固定した。その結果、HRG

でインキュベートされたヒト好中球はインキュベート開始後約 15 分で正球化 (In Cell Analyser Workstation software で解析定量化) し、そのままの形態がインキュベーター中保たれた。HRG の効果は可逆的であり、10 nM~1000 nM の広範囲にわたって濃度依存的であった。一方、HBSS、HSA、BSA、fMLP 処理の各好中球は、多様な形態でマイクロプレートに接着し、殆ど正球化の形態は示さなかった。HRG 処理好中球では、Hoechst33342 陽性の分葉核が細胞中心部に折りたたまれている様子が観察され、細胞質の蛍光強度は他の処置群と比べて高かった。

走査電子顕微鏡での観察では、HRG 処理好中球には細胞表面の微絨毛構造が殆どないことがわかった。それに対し、HBSS、HSA、BSA 処置群では、1 ミクロン弱の微絨毛が多数存在していることが確認された。fMLP 処置群では、細胞全体の変形と細胞表面のおうとつが著明であった。

上記のような特徴的な形態変化を示したヒト単離好中球のポリスチレン人工基質と EA. hy926 血管内皮細胞に対する接着性を定量した。接着性は緩く 3 回洗浄操作を行った後の残存細胞数で評価した。その結果、HBSS、HSA、BSA、fMLP 各処置群はいずれの条件下でも高い接着性を示したが、HRG 処置群のみ他のグループと比較し有意に低い接着性であった。

平均 4.5 μ m (高さ) x 7 μ m (幅) の擬似毛細血管流路での好中球通過性が MC-FAN を用いて検討された。その結果、HBSS、HSA、BSA、fMLP 各処置群では隔壁スリット上やスリット内に停滞する好中球が一定頻度で観察された。特に fMLP 群ではスリット構造への強い細胞接着が観察された。一方、HRG 処置群では、そのような細胞は殆どなかった。100 μ l の好中球懸濁液の通過時間について

も、HRG 処置群のみ低い値を示した。

Isoluminol を基質とする化学発光法で測定した細胞外活性酸素分子種の産生実験では、HRG 処置好中球が極めて低いレベルの活性酸素産生状態に誘導されることがわかった。細胞内での活性酸素分子種産生でも同様の結果が得られたが、抑制の程度は幾分低かった。

D. 考察

HRG 処理によってヒト単離好中球にもたらされた形態変化は、世界的に報告のない全く新しい調節系の発見である。形態上の変化は、1) 形態の正球化、2) 細胞径の短縮、3) 細胞表面微絨毛の消失、とまとめることができる。走査電子顕微鏡による細胞表面の観察から推測されるように、表面円滑で微絨毛のない細胞は、人工基質ならびに EA.hy926 血管内皮細胞に対する接着性が低く抑えられていた。ヒト血漿中には約 $1 \mu\text{M}$ 濃度の HRG が存在するので、循環血中における好中球の形態は本研究で明らかにされた3つの特徴を有するものであると推測される。一般的な教科書の記載では、好中球の径は $10 \sim 14 \mu\text{m}$ と表現されているものが多い。この径は、末梢血スミア染色標本における観察に基づき述べたものが多いと考えられる。HRG 存在下における正球形の好中球径は、赤血球のそれに極めて近いことが走査電子顕微鏡による観察と、蛍光染色された顕微鏡像から明らかとなった。

正球化し、微絨毛構造のない円滑な細胞表面の好中球は、擬似毛細血管の通過性においても、極めて優れていることが実験的に証明された。HRG を欠く溶液中でのインキュベートでは、細胞形態の変化とともに微小流路への接着性が高まっていくことがわかった。したがって、生体内における微小循環系にお

ける好中球の通過性維持において HRG は極めて重要な役割を果たすと推測される。このことは、特異的抗 HRG 抗体を用いた実験で、HRG の作用が拮抗されたことから支持されると考えられる。

炎症局所に遊走・浸潤した好中球は、生体内への侵入者である病原性微生物を不活化し、殺傷するのに放出するプロテアーゼ群と活性酸素分子を用いている。貪食後の殺菌過程でも活性酸素は用いられている。一方、循環血中に存在する好中球については、細胞内顆粒の分泌放出や活性酸素の産生活性をできる限り低く押さえ込んでおくことが血管内で不必要な炎症反応を生じさせないために重要である。HRG 処理した好中球で示されたのは、まさに HRG の働きで (HRG のみでも) 好中球活性酸素産生が低く抑えられているという事実である。このことから、HRG は好中球の形態のみでなく、細胞接着、微小流路通過性、活性酸素産性能という機能面までを制御する重要な血漿因子であるということが出来る。したがって、そのような重要な活性を有する因子が、種々の炎症性疾患においてどのように生体内動態が変化するかを明らかにすることは、極めて重要な課題である。

E. 結論

ヒト血漿から精製した HRG が、ヒト単離好中球の形態を特徴的な微絨毛のない正球形に保つ働きを持つことを明らかにした。この好中球の形態は細胞接着を抑え、微小流路通過性に優れたものであることを証明した。さらに HRG は、好中球の活性酸素分子種の産生を極めて低いレベルに維持することを明らかにした。以上の知見から、血漿タンパク HRG が循環好中球の鎮静的維持に極めて重要な役割を果たしていると推測した。

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)

2 . 学会発表

1) 国際学会

該当なし

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.

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

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 回盲腸穿孔刺する重症モデルと 1 回穿孔刺の軽症モデルの 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

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）
分担研究報告書

ヒト敗血症患者の血漿 HRG 動態に関する研究

研究分担者 森 松 博 史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
平 田 泰 三 岡山大学病院新医療研究開発センター・准教授
橋 本 和 彦 岡山大学知的財産本部・知的財産マネージャー
桐 田 泰 三 岡山大学新医療創造支援本部
・産学官連携コーディネーター

研究要旨

血漿 HRG 測定のための ELISA 法を確立した。抗 HRG ウサギポリクローナル抗体をマイクロタイタープレートに固相化し検体中 HRG を結合した後、HRP 標識した抗 HRG ラット単クローン抗体で検出した。ELISA 法での測定はウェスタンブロット法での測定結果とよく相関した。ICU 内の敗血症患者の血漿 HRG 測定を実施し、敗血症患者では健常人対照の約 25%に低下していることを明らかにした。

A. 研究目的

動物実験で証明された HRG 補充療法の有効性に関する理論的根拠をヒト敗血症でも得ることが重要である。この目的のために、ヒト敗血症患者の血漿 HRG を測定し、敗血症マーカーならびに重篤度・予後判定マーカーとしての意義を検証する必要がある。本研究では、臨床研究についての倫理審査で承認を得た後、上記の測定を実施する。同時に、血漿 HRG を簡便に測定するための ELISA を開発、確立する。

B. 研究方法

1. ウェスタンブロットによる血漿 HRG の測定

ヒト血漿を 100~500 倍希釈し、その適当量を SDS-PAGE 電気泳動と NC 膜に転写後、特異的抗 HRG 抗体を用いて検出し

た。定量の比較対照としてヒト血漿から精製した HRG 標品を用いた。

2. 血漿 HRG 測定のための ELISA の開発

抗 HRG ポリクローナル抗体、単クローン抗体、HRG 親和性の高い Ni-NTA を組み合わせることで、マイクロタイタープレートでの HRG 測定系を確立するための条件検討を実施した。

3. 敗血症患者血漿 HRG の測定

岡山大学病院の ICU に入院する敗血症患者の血漿 HRG を、臨床研究の倫理審査委員会で承認された文書による同意を得た後、ウェスタンブロットあるいは独自に開発した ELISA で測定した。健常人対照ならびに外科手術後の患者についても、同様の手続きを経た後血漿 HRG を測定した。

C. 研究結果

臨床研究倫理審査委員会で承認を得た後、ICU 内の敗血症患者と外科術後患者の血漿 HRG レベルを測定した。現時点での測定患者数は、10 人と 10 人である。

健常人のレベルと比較し、敗血症では約 25%、外科術後では約 40% の値を示し、いずれも有意な低下であった。また敗血症患者と外科術後の患者についても有意差があった。

D. 考察

ICU 内の敗血症患者の血漿 HRG は、健常人のレベルと比較すると約 25%にまで低下していることがわかった。外科術後 1 日目の患者血漿では約 40% であった。現時点では測定患者数が限られているので断定的に結論はできないが、ヒト敗血症患者においても本研究で用いたマウス敗血症モデルと同程度の血漿 HRG 低下が生じている可能性がある。このような敗血症患者の血漿 HRG レベルの報告は世界的に初めてのデータである。ヒト敗血症治療薬として HRG の補充療法を考える上で重要な根拠となるデータである。

E. 結論

ヒト敗血症患者の血漿 HRG 測定で、マウスで観察された血漿 HRG 低下がヒトでも生じることを確認した。

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)

2. 学会発表

1) 国際学会

該当なし

2) 国内学会

該当なし

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

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）
分担研究報告書

ヒト組換え HRG の哺乳動物細胞発現系の確立

研究分担者 阪口政清 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
和氣秀徳 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
西村多美子 就実大学薬学部・教授

研究要旨

ヒト組換え HRG の哺乳動物細胞を用いた発現系を確立した。3 種類の哺乳動物細胞、HEK293、CHO、HepG2 と 4 種類のプラスミドベクターを用いてヒト組換え HRG の発現条件について検討した。CHO の付着/浮遊細胞ならびに HEK293 細胞を用いて一過性発現に成功し、回収された細胞培養上清から NiNTA-アガロースビーズによるアフィニティ精製に成功した。

A. 研究目的

これまでの研究では、ヒト凍結新鮮血漿から Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーならびに陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製 HRG 標品を得てきた。この精製品を用いて、ヒト好中球に対する構造と機能にわたる基本的な鎮静化作用とマウス敗血症モデルにおける治療効果を明らかにしてきた。

本治療法をヒト敗血症やそれに続発する多臓器不全の治療法とするために、ヒト HRG タンパクを安全な製品として大量に製造する方法を確立する必要がある。この目的のために、哺乳動物細胞にヒト HRG 遺伝子を導入することで組換えヒト HRG タンパクを産生させる。基本的な発現条件について検討し、発現タンパクの生物活性を Native HRG との比較で明らかにする。

B. 研究方法

哺乳動物細胞を用いたヒト組換え HRG の発現と精製

HepG2、HEK293、CHO の 3 種類の哺乳動物細胞と 4 種類のプラスミドベクターを用いて、まず各種条件下におけるヒト組換え HRG の一過性発現について検討した。培地中に分泌された HRG を Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーで精製した。得られた一部精製タンパクの活性を単離ヒト好中球の正球化活性で Native タンパクと比較した。

C. 研究結果

HEK293、CHO、HepG2 の 3 種類の哺乳動物細胞と 4 種類の一過性発現用プラスミドベクターを用いて 10 cm ディッシュでの発現条件を検討した。その結果、HepG2 細胞ではいずれのプラスミドベクターを用いた場合でも HRG タンパクの発現量が極めて

少ないことがわかった。それに対し、HEK293、CHO 細胞では、2 種類のベクターで一定量の HRG タンパクを培地中に分泌することがわかった。分泌は 5 日間持続することがわかったので、この期間に回収された培地から、組換え HRG の Ni-NTA アガロースによるアフィニティ精製を試みた。その結果、組換え HRG は Ni-NTA アガロースによるアフィニティ精製においてヒト Native HRG と略同じ挙動を示すことがわかった。HEK293、CHO それぞれ 10 cm ディッシュの培養細胞より約 20 ~ 30 µg の精製品が得られた。

HEK293 細胞で作製した組換え HRG の活性をヒト単離好中球形態に対す正球化作用で評価した。精製品に限りがあったので高濃度域の濃度-作用曲線を描くことができなかったが、Native HRG より効力が低い可能性が示唆された。

D . 考察

3 種類の哺乳動物細胞、HEK293、CHO、HepG2 細胞の内、HepG2 細胞では殆ど組換えヒト HRG の発現は得られなかった。今後の治療用組換え HRG タンパクの作製細胞候補から除外すべきであることがわかった。HEK293 で作製されたヒト HRG の生物活性は、Native HRG より低いかもしれない。付加糖鎖の構造解析を含め、その原因を追究する必要がある。

E . 結論

組換え HRG の作製細胞として、HEK293 と CHO 細胞が選択された。大量産生条件、安定発現細胞株の確立、生物活性の向上を目指して研究を進める必要がある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

該当なし

2 . 学会発表

1) 国際学会

該当なし

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

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.

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

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wake H.,et al.	Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through neutrophil regulation.				submitted
OkumaY.,et al.	Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction.	<i>Neuropharmacology</i>			in press
Takahashi H.,et al.	Histamine inhibits high mobility group box 1-induced adhesion molecule expression on human monocytes.	<i>Eur J Pharmacol.</i>	718	305-13	2013
Nakamura Y.,et al.	Neuropathic pain in rats with a partial sciatic nerve ligation is alleviated by intravenous injection of monoclonal antibody to high mobility group box-1.	<i>PLOS ONE</i>	8(8)	e73640	2013
Takahashi HK.,et al.	Role of cell-cell interactions in high mobility group box 1 cytokine activity in human peripheral blood mononuclear cells and mouse splenocytes.	<i>Eur J Pharmacol.</i>	701	194-202	2013
西堀正洋	HMGB1 を標的とした治療	日本臨床			印刷中
大熊佑 ほか	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	<i>Thrombosis Medicine</i>	3(4)	5-11	2013
貞森裕 ほか	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