

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

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）
総括研究報告書

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 ARDS と肺内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、パラフィン薄切切片としたのち、好中球(anti-Gr-1抗体)、血小板(anti-CD42d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、代表的な起炎性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られる。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

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)

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 -
難治固形がんの遺伝子治療 - 第 2 回シン
ポジウム, 岡山, 2014.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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, 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

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 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られる。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。起炎症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

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)

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.

OkumaY, 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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

可溶性トロンプ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.

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.

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.

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.

山嶋大智、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.

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.

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.

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.

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.

山嶋大智、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

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

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

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

研究要旨

ヒト組換え HRG の CHO 細胞を用いた超高効率遺伝子安定発現系を確立するため、前回の遺伝子発現ベクターに関して再改変を行った。試行錯誤から、（１）プラスミドの遺伝子発現ユニットを細胞の染色体内に容易に高効率に挿入する技術、（２）抗生物質でのスクリーニングの過程で、挿入遺伝子発現ユニットのコピー数を高効率に増幅させる技術、これら２つの技術をコンバインした新しいプラスミドベクターを創出するに至った。当ベクターによる HRG 発現の安定株を作成したところ、mix culture のままでもこれまでの発現を遥かに凌ぐ高効率発現が示された。

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、CHO 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。CHO 細胞は、抗体をはじめとする組み換えタンパク質製剤全般の産生の基盤として実用化が認められているからである。

前回使用したベクターは、遺伝子の一過性発現には極めて有効であるものの、安定発現用には向いていないことが判明した。この問題を克服するため、今回、当ベクターを基本に HRG 超高効率安定発現を CHO 細胞に可能にする更なる改変法を見出すことを目的とした。

B．研究方法

CHO 細胞を用いて 10 種類の改変プロトタイププラスミドベクターを用いて、まず GFP-Puro^R の一過性発現について検討した。GFP の発現について、短時間（24h）での発現を一過性発現とし、ピューロマイシンを 3 週間作用させ、耐性細胞を取得した後の mix culture での発現を長期安定発現とし、プロトタイプベクター各々の効能の評価を行った。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験については、大学の安全委員会で審査を受け、承認を得ている(課題番号:13101)。

C. 研究結果

前回使用したベクター pCMViR-TSC は、HRG をはじめとする種々医療用タンパク質製剤の大量発現に有用と考えられたが、検討より一過性発現では、遺伝子の一過性発現には極めて有効であるものの、安定発現用には向いていないことが判明した。哺乳細胞セレクション用の抗生剤耐性遺伝子を同ベクター内に挿入すると、その高発現能力が消失する。あるいは、別に抗生剤耐性遺伝子発現ベクターを用意して、細胞に当ベクターと co-transfection しても、HRG 発現ユニットとして染色体に無傷で組み込まれるコピー数が少ないため、どうしても安定発現に有効とはならなかったのである。

この問題に直面し、試行錯誤を繰り返し、ついに最近、上記技術を進化させた新しい安定発現用超高効率遺伝子発現プラスミドベクターを開発するに至った。上記 pCMViR-TSC による超高効率遺伝子発現の能力を消失させず染色体内に高効率で複数組み込み、更に安定的に増幅させる革新的技術である。即ち、(1)プラスミドの遺伝子発現ユニットを細胞の染色体内に容易に無傷で高効率に挿入する技術(ベクターの導入操作回数を増やせば増やす程、染色体内に無傷で複数挿入されていく)(2)抗生物質でのスクリーニングの過程で、染色体内挿入遺伝子発現ユニットのコピー数を爆発的に増幅させる技術、これら2つの技術を pCMViR-TSC プラスミドベクターにコンバインした新しいプラスミドベクターである。

10 個のプロトタイプベクターを開発し、

CHO 細胞においてスクリーニングを行った結果、1G ベクター(仮称)が最良であることが判明した。当ベクターによる HRG 発現の安定株を作成したところ、mix culture のままでもこれまでの発現を遥かに凌ぐ高効率発現が示された。

D. 考察

HRG の安定発現は、ミックスカルチャーでの評価(様々な発現レベルの細胞の混在)なので、単一の陽性クローンのセレクションを追加するとさらに良好な発現細胞が得られるものと考えている。

また、この技術は、最初のプラスミド導入操作を増やせば増やす程染色体内に挿入される発現ユニットが増えるので、その増えた分全てが、抗生剤セレクションの後の遺伝子増幅につながるというまさに発現の相乗効果を生む非常に優れた革新的技術なのである。

今後、上記 HRG 安定発現細胞の mix culture から最適なクローンを選択する予定である。得られたクローンにおける発現タンパク質の糖鎖付加状態は固定化されているため、毎回同じ品質のものが得られる。当 CHO 細胞クローンで作製されたヒト HRG の生物活性について、付加糖鎖の構造解析を含め、追究していく計画である。

E. 結論

以上、当最新のプラスミドベクターは、HRG を大量調製するための CHO 細胞産生系に新たな光明をもたらすことが期待された。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Sakaguchi M, Watabe M, Kinoshita R, Kaku H, Ueki H, Futami J, Murata H, Inoue Y, Li SA, Huang P, Putranto EW, Ruma IMW, Nasu Y, Kumon H, Huh NH.

Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene.

Mol Biotech, 56: 621-630, 2014.

Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, Ruma IM, Inoue Y, Sakaguchi Y, Yamamoto KI, Kinoshita R, Futami J, Kataoka K, Iwatsuki K, Huh NH.

DNAX-Activating Protein 10 (DAP10) Membrane Adaptor Associates with Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Modulates the RAGE-triggered Signaling Pathway in Human Keratinocytes.

J Biol Chem, 289: 23389-23402, 2014.

Jaiswal JK, Lauritzen SP, Scheffer L, Sakaguchi M, Bunkenborg J, Simon SM, Kallunki T, Jäättelä M, Nylandsted J.

S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells.

Nat Commun, 5: 3795, 2014.

Saito K*, Sakaguchi M*, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH, Kondo E.

Coxsackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells.

Oncogene, 33: 1274-1286, 2014. (Saito K* and Sakaguchi M* were equally contributed to this work.)

Yamamoto H, Higasa K, Sakaguchi M, Shien K, Soh J, Ichimura K, Furukawa M,

Hashida S, Tsukuda K, Takigawa N, Matsuo K, Kiura K, Miyoshi S, Matsuda F, Toyooka S.

Novel germ-line mutation in the transmembrane domain of HER2 in familial lung adenocarcinomas.

J Natl Cancer Inst, 106: djt338, 2014.

2 . 学会発表

1) 国際学会

該当なし

2) 国内学会

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 - 難治固形がんの遺伝子治療 - 第2回シンポジウム, 岡山, 2014.

G . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

該当なし

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

新規敗血症バイオマーカーの開発

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
樋之津 史 郎 岡山大学病院新医療研究開発センター・教授

研究要旨

今回、SIRS 患者において HRG 値を測定し、新規バイオマーカーとしての HRG を評価した。SIRS 患者では血中 HRG 濃度が健常人に比べて有意に低かった。SIRS 患者のうち感染を伴う敗血症群と伴わない群と比較すると、敗血症群でより低値であり、SIRS 患者のうち死亡群と生存群で比較すると死亡群で低かった。また、HRG 値と死亡とに有意な関連を認め、HRG 値の死亡に関しての ROC 分析では死亡予測の感度特異度が共に高いと示唆された。HRG は新規重症度マーカーとなり得る。

A．研究目的

動物実験で示された敗血症における HRG 補充療法の有効性に関し、ヒトにおいても HRG 値の変動の有無やその意義を評価する必要がある。その目的のために、患者にて HRG 値を測定し、患者の病態や病勢、他の検査結果などと比較検討を行い、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 HRG を検証する。また同時に、血漿 HRG を簡便に測定する方法を確立することは不可欠であり、測定法として ELISA を開発、確立する。

B．研究方法

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、承認を得たのち本研究を開始した。

岡山大学病院 ICU に新規入室した患者のうち全身性の炎症を認める患者を対象とした。すなわち、入室 24 時間以内に Systemic

Inflammatory Response Syndrome (SIRS) に陥り、そのクライテリアを満たした成人患者を対象とした。文書による同意を得たのちに採血を行い、速やかに処理を行って血漿を保存した。保存検体を用いて HRG 値を測定した。その他の臨床情報はカルテより得た。また比較検討のため健常人ボランティアからも採血を行い、本研究における HRG 標準値とした。

測定は ELISA 法を新たに開発して行った。抗ヒト HRG モノクローナル抗体と、HRG に親和性の高い Ni-NTA を組み合わせることとで、サンドイッチ ELISA 法を確立した。

（倫理面への配慮）

上記のとおり、倫理審査委員会の承認を得たのち研究を開始した。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

SIRS 患者 70 名から同意が得られ、採血を行った。そのうち 20 例は、SIRS に感染を伴った病態であり、敗血症の状態であった。また、70 例中 8 例は ICU 死亡症例であった。健康人ボランティアとしては、16 名から採血を行った。

健康人($n=16$)に対して SIRS 患者($n=70$)では HRG 値が有意に低下していた(60.18 ± 8.30 vs $28.10 \pm 14.45 \mu\text{g/ml}$; $p<0.01$)。SIRS 患者のうち非敗血症群($n=50$)と敗血症群($n=20$)とで比較すると、敗血症群で HRG 値は有意に低かった(34.85 ± 10.75 vs $11.21 \pm 6.35 \mu\text{g/ml}$; $p<0.01$)。また、SIRS 患者の生存群($n=62$)と死亡群($n=8$)とで比較すると、死亡群で HRG 値は有意に低かった(30.25 ± 13.65 vs $11.40 \pm 8.70 \mu\text{g/ml}$; $p<0.01$)。単変量解析では、HRG 値と死亡とに有意な関連を認めた(死亡対生存オッズ比 0.86($p<0.01$))。多変量解析を行い APACHE

スコアで調整したところ、HRG 値および APACHE スコアの両者が独立因子として有意に死亡と関連するとの結果が得られた。HRG 値の死亡に関しての ROC 分析では AUC 値 0.88 となり、APACHE スコア(AUC 値 0.93)と同等で、死亡予測の感度特異度が共に高いと示唆された。更に、SIRS 患者を ROC 分析での cut off 値 $16.01 \mu\text{g/ml}$ を用いて HRG 高値群と低値群に分け解析すると、低値群の生存率は有意に低かった(HR 9.18; $p<0.01$)。

D．考察

ヒトでの HRG 測定の報告は多くあるが、

炎症に注目し SIRS 患者や敗血症患者にて測定した報告は存在せず、本研究が初の検討である。今回、健康人と比較して SIRS 患者では HRG 値が有意に低く、敗血症患者ではより低いという結果が得られた。この結果は、先のマウス敗血症モデルにおける結果と同様であり、ヒトにおいても HRG の変動があることが示唆された。

今回は ICU 入室時に採血を行っており、SIRS に陥った初期の HRG 値を測定したことになるが、その ICU 入室時 HRG 値と、炎症の指標である CRP や重症度スコアである SOFA スコア、死亡予測因子である APACHE スコアには有意な逆相関があり、患者の重症度が高いほど HRG 値は低いことが考えられ、HRG を重症度の指標とできる可能性が示唆された。

ICU 入室時の HRG 値は死亡と関連を認め、また APACHE スコアと独立した因子であるとの結果が得られた。さらに、ROC 分析において HRG 値は感度特異度ともに高く死亡予測ができるとの結果であった。これらの結果は、確立された死亡予測因子である APACHE スコアと独立した因子として HRG 値は死亡に関連を認め、しかも APACHE スコアと同等の死亡予測因子として HRG 値を捉えることができるとの結果であり、HRG を新たな単一の死亡予測因子として用いることができる可能性が示唆された。

今回は、単回採血で HRG 値を測定しており、HRG 値の時間的な変動をみておらず、病態の変動とともに HRG 値がどう動くのかについては不明である。重症度マーカーとしての HRG を考える上では、刻々と変化する患者の重症度に応じて HRG 値がいかに変化するかを知ることは大変重要であり、今後の課題である。しかし、患者のある時点での

死亡の危険性がどの程度あるのかを予測する予後予測マーカーとしては、ある程度の評価ができたのではないかと考える。

E．結論

健常人と比較して SIRS 患者では HRG 値が有意に低く、敗血症患者ではより低いという結果が得られた。また、HRG 値と死亡とに有意な関連を認め、HRG 値の死亡予測に関する感度特異度が共に高いことも示された。HRG は新規重症度マーカーとなり得ることが示唆された。

F．研究発表

1．論文発表

該当なし

2．学会発表

1) 国際学会

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

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.

G．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

該当なし

2．実用新案登録

該当なし

3．その他

該当なし

Fig 1-a HRG值 (ICU Day1) 健康人 vs SIRS患者

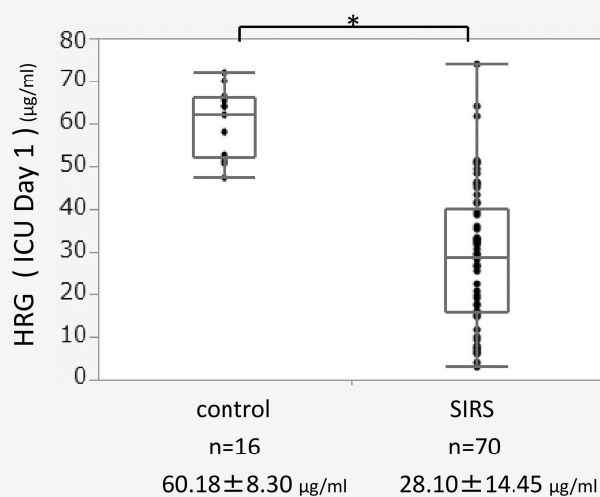


Fig 1-b HRG值(ICU Day1)

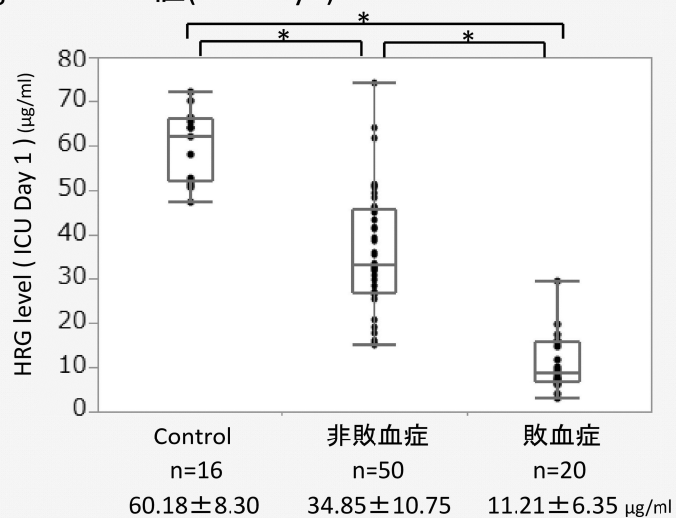


Fig 1-c HRG值(ICU Day1)

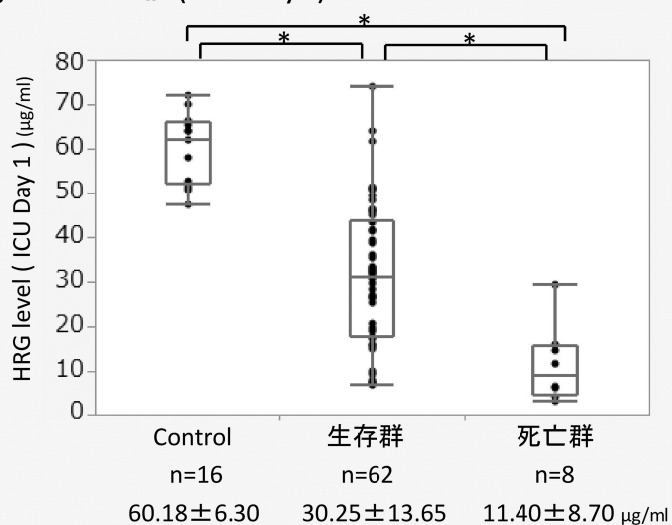


Table 1 A correlation between the HRG level and other markers

	相関係数	P value
HRG level vs		
APACHE II score	— 0.41	< 0.01*
SOFA score	— 0.56	< 0.01*
CRP	— 0.43	< 0.01*
WBC	— 0.06	0.59
Plt	0.36	< 0.01*
Fbg	— 0.08	0.52
Lac	— 0.30	< 0.05*
ALB	— 0.00	0.98
T-Bil	— 0.29	< 0.05*

Table 2 Correlations with mortality

	Odd Ratio	95% C.I.	P value
HRG level	0.86	0.76 – 0.94	< 0.01*
APACHE II score	1.22	1.09 – 1.41	< 0.01*
SOFA score	1.41	1.17 – 1.78	< 0.01*
CRP	1.11	1.00 – 1.23	0.034*
Cr	2.05	1.13 – 4.92	0.013*
WBC	0.91	0.75 – 1.05	0.27
Plt	0.97	0.94 – 0.98	< 0.01*
Fbg	1.00	1.00 – 1.01	0.019*
Lac	1.43	1.04 – 2.14	0.043*
ALB	0.62	0.12 – 2.63	0.53
T-Bil	1.21	0.92 – 1.62	0.12

Table 3 Correlations with mortality
(Multivariate analysis)

	Odd Ratio (Adjusted)	95% C.I.	P value
HRG level	0.90	0.78 – 0.98	0.021*
APACHE II score	1.14	1.01 – 1.31	0.021*

Fig 2 ROC curves for detecting non-survivor

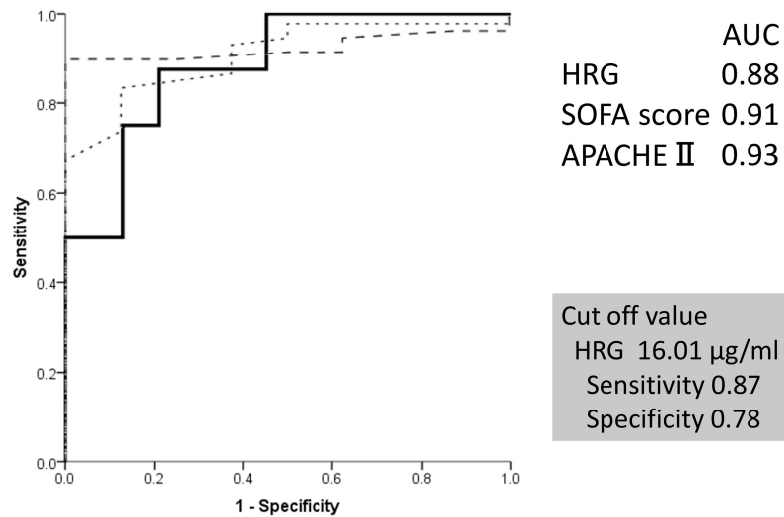
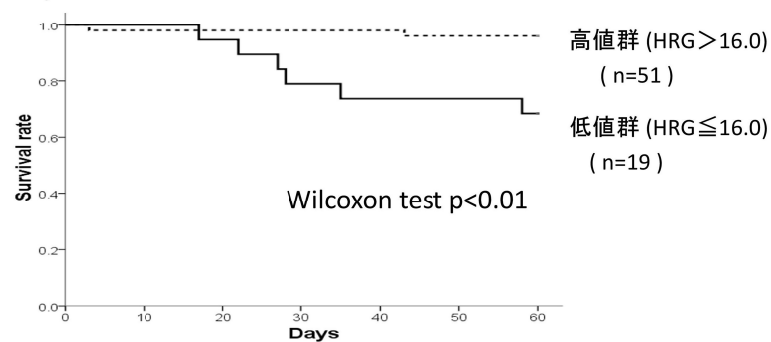


Fig 3 生存時間分析

▪ Kaplan-Meier curve



▪ Cox proportional hazard model

Hazard Ratio (低値群 vs 高値群) : 9.18 (1.85 – 45.5) (p < 0.01)

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

HRG によるマスト細胞活性化の制御

研究分担者 田 中 智 之 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

本研究では、HRG がマスト細胞の機能制御に関わる可能性について検証を行った。標準的なモデルであるマウス骨髄由来培養マスト細胞では、HRG を 30 分間前処理することにより、IgE を介する抗原刺激による 20%程度の脱顆粒率が 40%前後に増大することが明らかとなった。また、脱顆粒応答では低分子量 G タンパク質の Rho ファミリーの活性化レベルの低下が生じることを見いだした。HRG の好中球に対する作用を考慮すると、Rho ファミリーの調節を介して HRG が脱顆粒応答を増強するという仮説が考えられる。

A．研究目的

HRG は血漿タンパク質であり、血管内の細胞や内皮細胞は常時高い濃度の HRG と接していると考えられる。一方、組織側に分布する細胞に関しては、炎症反応や組織傷害といった要因を通じて、接触する HRG の濃度は大きく変化することが予想される。マクロファージが死細胞を取り込む際に HRG が関与するという報告があるが、HRG による組織側の免疫細胞の機能の制御については明らかではない。分担者は、マスト細胞の分化に伴う機能制御を明らかにすることをテーマに研究を進めてきたが、ここでは HRG がマスト細胞の機能制御に関わる可能性について検討を行った。

また、本研究事業において明らかにされている好中球に対する HRG の作用は、HRG の標的分子の下流に低分子量 G タンパク質が関与することを強く示唆している。そこで、HRG による低分子量 G タンパク質の活性制御機構に着目した。

B．研究方法

1．培養マスト細胞

Balb/c マウス（雄性 8 週齢）の脛骨より骨髄細胞を回収し、IL-3 (10 ng/ml)存在下、約 1 ヶ月培養することにより、FcεRI および c-kit とともに陽性の細胞が 95%以上である骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)を得た。

2．マスト細胞の活性化の評価

脱顆粒応答は顆粒酵素である β -hexosaminidase 活性を指標に算出した。脱顆粒応答は PIPES 緩衝液 (25 mM PIPES-NaOH, pH 7.4, 125 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl_2 , 0.1% BSA)中で検出した。

3．低分子量 G タンパク質の活性化の検出

Rac1 および Cdc42 の GTP 型と特異的に結合する Pak の部分配列を glutathione S-transferase (GST)融合タンパク質として大腸菌で発現させ、これを用いて細胞破碎液

中の GTP 型を沈降反応により分離した。イムノプロットにより、全体の低分子量 G タンパク質量、GTP 型の量をそれぞれ定量し、活性化を評価した(Bernard, V et al., *J. Biol. Chem.* 1999)。RhoA については、rhotekin の部分配列を利用して同様の評価を行った (Xiang-Dong, R. et al., *EMBO J.* 1999)。

(倫理面への配慮)

本研究は岡山大学動物実験委員会の審査を経て、承認されたものである。

C. 研究結果

1. HRG によるマスト細胞の脱顆粒応答の増強

マウス骨髄細胞を IL-3 存在下、1 ヶ月培養することにより得られる骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC: IL-3-dependent bone marrow-derived mast cell)は、マスト細胞のモデルとしてしばしば用いられる。培養系では通常 10%のウシ胎仔血清(FCS)が添加するため、FCS に含まれるウシ HRG の影響を除いた系で検証する必要性が考えられた。実験では、抗 TNP (trinitrophenol) IgE 抗体を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 3 時間感作し、PIPES 緩衝液で二回洗浄して遊離 IgE を除去し、その後ヒト HRG を各濃度で 37°C、30 分間処理した。その後、抗原(TNP-BSA, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加し、脱顆粒応答を測定した。その結果、ばらつきはあるものの、1 nM 付近の濃度で脱顆粒応答の増強が認められた(図 1)。血清中に含まれる HRG の濃度を考慮すると、十分な洗浄を通じて残存する HRG レベルを抑えることが、抑制効果の再現性を得る上では重要であることが推察された。

2. 低分子量 G タンパク質の活性化の測定

HRG は好中球の形態変化の誘導や、活性

酸素の産性抑制等の作用を示すことから、細胞骨格を制御する低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの活性化レベルを変化させる可能性が考えられた。そこで、マスト細胞において脱顆粒応答を伴う活性化刺激を与えた際の、Rho ファミリーの活性化を検討した。

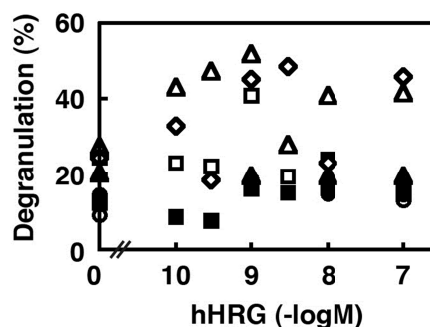


図 1 マウス骨髄由来培養マスト細胞の脱顆粒応答のヒト HRG による増強

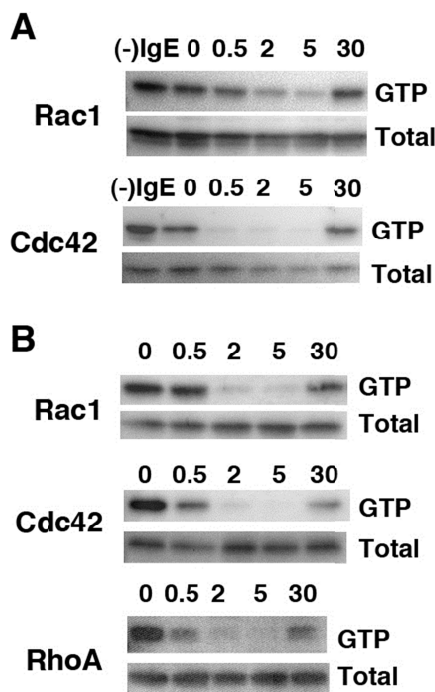


図 2 脱顆粒刺激に対する Rho ファミリーの活性化レベルの変化

A: BMMC を抗 TNP IgE 抗体(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を 12 時間感作後、PIPES 緩衝液で洗浄、抗原(TNP-BSA, 100 ng/ml)を添加し、0.5、2、5、30 分後にそれぞれ細胞を回収した。

B: BMMC を thapsigargin (300 nM)で刺激し、0.5、2、5、30 分後にそれぞれ細胞を回収した。

抗原刺激では、速やかに Rac1、Cdc42 の GTP 型の減少が認められた。一方、小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤である thapsigargin 処理においても同様に速やかな GTP 型の減少が認められ、これは RhoA についても同様であった。これらの結果は、脱顆粒応答時には Rho ファミリーの不活性化が速やかに生じることを示すものである。

D．考察

比較的低い濃度域で HRG の作用が認められたが、血清から残存するウシ由来 HRG の影響を抑制することにより、さらに明瞭な結果が得られる可能性がある。好中球における正球化は、HRG によって Rho ファミリーの活性レベルの低下が生じる可能性を示唆しているが、マスト細胞の脱顆粒応答では Rho ファミリーの活性化レベルが低下することが明らかとなった。即ち、HRG による脱顆粒応答の増強は Rho ファミリーの活性化レベルの調節を介する可能性が考えられた。この点について、さらに HRG 単独刺激における Rho ファミリーの活性化レベルの検討を行う予定である。

マスト細胞は組織に分布することから、通常は低いレベルの HRG に接していることが予想されるが、炎症応答時には血管透過性の亢進により高レベルの HRG に曝露される可能性が考えられる。即時型アレルギーでは抗原刺激によりマスト細胞が脱顆粒応答を起こし、遊離されたヒスタミン等の作用により血管透過性が亢進する。このとき、HRG がマスト細胞に作用することにより、脱顆粒応答が強化され、より強い炎症応答につながるというメカニズムが考えられる。HRG の中和抗体、あるいは RNAi による血中レベルの低下を誘導した際に、即時型応答がどのような影響を受けるかは興味深い問題である。

E．結論

ヒト HRG はマウス骨髄由来培養マスト細胞の抗原刺激による脱顆粒応答を増強した。

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

田中智之、佐藤仁美、山田圭位子、古田和幸.

マウス皮膚型マスト細胞モデルを用いたステロイド性抗炎症薬の評価.

第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015.

田中智之.

マスト細胞による炎症制御.

第135回日本薬学会大会, 神戸, 2015.

G．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

該当なし

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

実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する HRG 効果の検討

研究分担者 鵜 殿 平一郎 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

ヒト多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis:EAE）を用いて HRG 投与効果を検討する。EAE は、中枢神経組織由来の myelin oligodendrocyte glycoprotein(MOG)由来のペプチド MOG35-55 でマウスを免疫することにより活性化される Th17 タイプの抗原特異的 CD4T 細胞を介して発症するが、神経組織を攻撃する最終エフェクター細胞は好中球であると考えられている。CD4T 細胞の樹状細胞によるプライミングと活性化、Th17 への分化、そして Th17 による好中球の活性化と中枢神経局所への遊走という一連の過程を経て発症する当該モデルにおいて、HRG 投与が如何なる効果をもたらすのかを検討し、その分子メカニズムの解析を行なう。

A．研究目的

実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を用いて HRG 投与による効果を検討し、その細胞及び分子メカニズムの解析を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は岡山大学動物実験委員会の審査を経て、承認されたものである。

B．研究方法

フロイト完全アジュバント（CFA）、*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 死菌、MOG35-55 ペプチドをエマルジョン化し、C57BL/6 マウスの皮下に注射する（day 0）。同時に *Pertussis toxin* を day 0, day 2 に投与する。この操作により、10 日頃から尾部の麻痺が始まり後脚麻痺→前脚筋力低下と病状が進行する。臨床スコア（0～5）を毎日記載することにより、中枢神経麻痺の進行或は回復具合を観察する。Day 2 から HRG（50 μ g）を 2 日間隔で静脈内投与し、臨床スコアの推移を観察した。

C．研究結果

予備実験として HRG（50 μ g）を 2 日間隔で 4 回投与した。臨床症状は 30 日に渡って観察を行なった。その結果、HRG 投与により発症そのものは抑制できなかったが、HRG 非投与群に比べ、臨床スコアの軽減が認められた（各群の N 数は 10）。

D．考察

HRG 投与により、EAE の症状を軽減できる可能性が示唆された。1 回当たりの HRG 投与量、投与回数の増加により、さらなる症状の軽減をもたらすことが期待される。

E . 結論

HRG 投与により、EAE の症状を軽減できる可能性がある結論づけた。実験結果の再現性を担保した上で、HRG 効果のメカニズム解析を行なう必要性があると考えられた。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E and Udonon H. Immune-mediated anti-tumor effect by type 2 diabetes drug, metformin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

112(6):1809-1814, 2015.

Uehara T, Fujiwara T, Takeda K, Kunisada T, Ozaki T, Udonon H.

Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas.

BioMed Research International, Article ID 820813, 2014.

Ichianagi T, Ichianagi K, Ogawa A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chuma S, Sasaki H, Udonon H.

HSP90 α plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse.

Nucleic Acids Res, 42(19):11903-11911, 2014.

Eikawa S, Udonon H.

Monitoring multifunctionality of immune-exhausted CD8 T cells in cancer bearing patients.

Methods in Mol Biol, 1142:11-17, 2014.

Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Udonon H, Seto Y, Yamada K, Nishikawa H, Pan L, Venhaus R, Doki Y,

Oka M, Nakayama E.

Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing NY-ESO-1 antigen.

Journal of Immunotherapy, 37(2): 84-92, 2014.

2 . 学会発表

1) 国際学会

該当なし

2) 国内学会

Udonon H, Nishida M, Eikawa S.

Metformin-induced reversion of exhausted CD8T cells in tumor microenvironment.

The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Core-Symposium).

Yokohama, 2014.

鵜殿平一郎、榮川伸吾.

メトホルミンによる腫瘍局所の免疫疲弊解除.

第 87 回日本生化学会大会 (シンポジウム), 京都, 2014.

鵜殿平一郎.

エネルギーセンサーを介したストレス応答と腫瘍免疫の関わり.

第 9 回臨床ストレス応答学会 (シンポジウム), 岡山, 2014.

鵜殿平一郎.

メトホルミンによる腫瘍局所の免疫疲弊解除.

第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会 (教育講演), 東京, 2015.

Eikawa S, Negawa M, Kunisada Y, Uehara T, Ichianagi T, Yamazaki C, Udonon H.

Metformin-induced tumor infiltrating CD8

T cells with effector memory phenotype and multi-functional reversion.

The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (oral presentation).

Yokohama, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

免疫評価方法とその評価 された免疫活性化剤

特願 2014-166593 (2014.8.19 出願)

鵜殿平一郎、榮川伸吾、豊岡伸一

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表

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.	Mannitol enhances therapeutic effects of intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells into the brain after traumatic brain injury.	<i>Neurosci Lett</i>	554	156-61	2013
OkumaY.,et al.	Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction.	<i>Neuropharmacology</i>	85	18-26	2014
Hanakawa H.,et al.	Does HMGB1 predict occult neck lymph node metastasis in early tongue carcinoma? A case-control study of 26 patients.	<i>J Laryngol Otol</i>	128	926-31	2014
西堀正洋	HMGB1 を標的とした治療	日本臨牀	72 増刊 上	417-22	2014
大熊佑 ほか	外傷性脳傷害に対する抗 HMGB1 抗体治療	薬学雑誌	134 (6)	701-5	2014
西堀正洋	脳神経障害と High mobility group box-1 (HMGB1)	麻酔	63 増刊	S89-94	2014