

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04686

研究課題名(和文)好中球ネットーシス上のマイクロ血栓形成メカニズム解明とARDS治療法開発

研究課題名(英文) Mechanism for microthrombus formation on NETosis and development of therapy for ARDS.

研究代表者

西堀 正洋(Nishibori, Masahiro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50135943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症は感染症に伴う重篤な臓器障害の病態であり、世界的に死因の上位を占め続けている。敗血症の新規開発薬物は過去数十年継続されてきたが、有効な薬物は何一つ見出されることがなかった。本研究では、申請者が見出した敗血症時の血漿タンパクHistidine-rich glycoprotein (HRG) の低下を原因とする免疫血栓の形成の機序を解明し、HRGの補充療法が如何にしてその病態を改善するかを明らかにした。敗血症病態に関与する細胞として、好中球や血管内皮細胞に加え、赤血球の重要性を実験データに基づき指摘した。マウスモデルにおいてHRG補充療法は、敗血症性ARDS病態に対し有効である。

研究成果の概要(英文)：Sepsis is a severe pathological condition with multiple organ failure and has been a leading cause of death worldwide. Although the efforts has been continued for developing specific drugs for the treatment of sepsis for decades, none of them was successful. In the present study, we tried to clarify the mechanism of septic pathophysiological cascade triggered by the decrease in plasma histidine-rich glycoprotein (HRG) in mice and an action mechanism of supplemental treatment with purified HRG. We also suggested the involvement of red blood cells in immunothrombosis in addition to well-known participants, neutrophils and vascular endothelial cells, based on the in vitro experimental results. It was demonstrated that supplemental treatment with HRG was beneficial for septic ARDS in mice.

研究分野：医学(薬理学)

キーワード：HRG 薬理学 トランスレーショナルリサーチ 敗血症 Immunothrombus ARDS

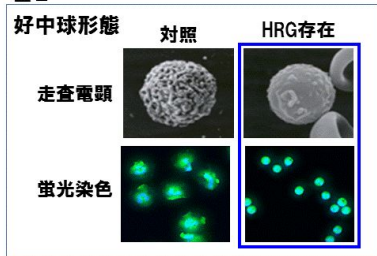
1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染症をきっかけとし、致死性の高い重要臓器障害を伴う病態である。最近数十年間にも敗血症特異的治療薬の開発は続けられてきたが、有効性の明らかにされた薬物は一つとしてない。このような状況下、研究代表者の西堀は敗血症モデルマウスの血漿で著明に低下する血漿タンパクを Histidine-rich glycoprotein (HRG) であると同定し、HRG を補充する治療法がマウスの敗血症による致死性を劇的に改善すること、さらに肝臓における HRG の産生を siRNA でノックダウンすると、致死性が大幅に増悪することを証明した(図1)(Sepsis Symp 2014)。



HRG の生理活性プロファイルを詳細に検討する中で、好中球の正球形態維持機能(図2)や活性酸素分子種産生抑制を始めとする HRG の強い好中球制御作用を見出し、HRG 補充療法を敗血症と重症の全身性炎症症候群の治療法として特許出願した(特許5807937号)。

図2



一連の研究において西堀は、敗血症時の肺炎病態形成に血漿 HRG の低下で脱抑制された好中球が深くかかわっていることを見出した。つまり、形態並びに機能的に活性化された好中球が、肺血管内皮細胞に強固に接着し、同部位に多重免疫染色法で血小板凝集と血液凝固が生じていることが証明された。血漿 HRG の低下を起点として、肺微小血栓形成、内皮細胞障害、敗血症性 ARDS へと進展していることがわかったわけである。

最近、血管内微小血栓の形成における好中球の役割が Immunothrombosis として非常に注目されるようになってきた。Immunothrombosis の中心をなす活性化された好中球は、細胞核内のクロマチン DNA を網状架橋して細胞外へ放出し、その DNA 上にヒストン、Elastase や MPO が存在する。Neutrophil Extracellular Trap (NET) と呼ばれるこの現象は、細菌等を効率よくトラップ・殺菌するための生体防御機構と考えられている。

2. 研究の目的

西堀は、敗血症モデルマウスの血漿で著明に低下するタンパク因子を Histidine-rich glycoprotein(HRG)であると同定し、これを補充する治療法がマウスの敗血症による致死性を劇的に改善することを世界に先駆け明らかにした(Sepsis Symp 2014, EBiomedicine 2016)(特許5807937号)。HRG の効果は血管内微小血栓形成の抑制、つまり循環血中好中球の血管内皮細胞接着、同部位への血小板凝集・フィブリン沈着を抑制することによりもたらされると推定された。この発見は、敗血症病態理解に革新をもたらすものである。本研究の目的は、敗血症性 ARDS 肺における血漿 HRG 低下を起点とする好中球ネットーシスと微小血栓形成メカニズムを解明し、ARDS 治療法を新規に提案することにある。本研究によって、臨床治療法のない敗血症や敗血症性 ARDS の治療法が展望できるようになる。

3. 研究の方法

- (1) マウス敗血症・腹膜炎モデルの作成 ... 開腹したマウスの腹腔内より盲腸を取り出して、盲腸根部を4-0縫合糸により結紮し、18ゲージ注射針を用いて盲腸壁を穿刺して盲腸結紮穿刺 CLP(cecal ligation and puncture)モデルを作製する。
- (2) 敗血症マウスの肺病理標本の検討 NETosis、血小板凝集、血液凝固反応の時空間的関連性... (1)で述べた方法で作製した CLP 敗血症マウスの肺を固定後摘出し、パラフィン包埋ブロックを作製した後、免疫染色法で好中球、NETosis 好中球、血小板、単球、フィブリンをそれぞれ特異染色するとともに、NETosisと血小板凝集反応、TF 陽性単球の接着および凝固反応の時空間的関連性を明らかにするために、多重染色を実施する。
- (3) 敗血症DICの進行とHRG投与効果の解析... 敗血症性 ARDS の進行と並んで致死性を高めている原因は、播種性血管内凝固症(DIC)である。そこで、肺 ARDS が進行する時間帯を含んで、どのような時間経過でDICが進展しているかを、血小板数、プロトロンビン時間、部分トロンボプラスチン時間、TAT、FDPの測定で評価する。
- (4) サイトカイン産生から見た敗血症病体の進行解析... (2)(3)で明らかになる肺微小血栓形成とDIC進展の時間経過と血中サイトカインIL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-18等の上昇経過の関係について明らかにする。
- (5) 血漿中HRG濃度の測定... マウスCLPモデルを作製し、0、3、6、12、24時間後に尾先端の切断により採血を行い、ELISA法を用いて血漿中HRG濃度を経時的に測定する。CLPモデル作製直後に精製ヒトHRG(15mg/kg)を投与し、投与0、3、6、12、24時間後に尾先端の切断により採血を行

い、ELISA 法を用いて投与 HRG 動態を測定する。

- (6) マウス肝実質細胞の初代培養系を用いた HRG の発現解析... マウスの門脈あるいは下大静脈にプラスチックチューブを挿入し、ペリスタポンプでコラゲナーゼを一定時間灌流して、肝臓間質組織を消化する。消化後、プラスチックシャーレで培養を確認する。決定した培養条件下での培養上清を回収し、HRG タンパクの分泌についてウェスタンブロットで確認する。また、培養細胞から総 RNA を抽出し、RT-PCR で HRG mRNA の発現を確認する。
- (7) ヒト血管内皮細胞 EA.hy926 の刺激依存性障害と HRG の保護作用... EA.hy926 細胞を LPS, TNF- α あるいは H₂O₂ で刺激し、細胞障害性に対する HRG の保護効果を明らかにする。
- (8) Zn²⁺ 誘発ヒト赤血球凝集反応と HRG による抑制... ヒト赤血球は Zn²⁺ イオンによって PS 陽性となり、凝集反応を生じる。この PS 発現と凝集反応に対する HRG の効果を *in vitro* で検討する。

4. 研究成果

マウスの盲腸結紮穿孔モデル (CLP) で肺血管床における血栓形成を、ホルマリン灌流固定のパラフィン包埋切片を用いて、Anti-Gr-1 (好中球)、Anti-Citrullinated histone (NETosis)、Anti-CD42d (血小板)、Anti-fibrin (フィブリン) で多重染色することで評価した。その結果、CLP マウスの血管内血栓部位には、NETosis 陽性の好中球、血小板凝集が認められることが分かった。NETosis はシトルリン化ヒストンの存在の他に、細胞外 DNA ネット並びにネット上 MPO の存在でも確認された。以上の CLP マウスの肺内血管床で観察された免疫血栓 Immunothrombosis の像は、精製ヒト血漿 HRG で治療したマウス群では、有意にその数が減少していた。さらに、Immunothrombosis を *in vivo* で観察するため、CLP マウスの好中球と血小板をそれぞれ Alexa Fluor 594 標識 Anti-Gr-1 と DyLight 488 標識 Anti-CD42d でマークし、腸間膜血管における細胞流動態を観察した。その結果、CLP マウスの血管壁内皮細胞には、変形した好中球の接着が多数認められ、接着部位に同時に血小板凝集を伴っていた。

HRG の静脈内投与は、血管内血栓形成を著明に抑制した。ヒト血管内皮細胞培養系で、HRG は LPS, TNF による組織因子発現の上昇と組織因子経路障害因子の発現低下をともに抑制した。ラット肝から調整した肝実質細胞や肝細胞株での HRG 発現レベルは極めて低かった。平成 29 年度の研究で、新たに亜鉛イオン誘発性の赤血球 Eryptosis の誘導に対する HRG の抑制効果を見出した。亜鉛イオンの効果は、赤血球内カルシウムイオンの上昇によってもたらされていた。この結果は、

Immunothrombosis における赤血球の積極的役割と、HRG のさらなる多機能性を示すデータであり、新規創薬の観点から非常に重要である。

総じて HRG の抗敗血症、抗 ARDS 作用を世界で初めて示し、今後のヒト血漿 HRG 製剤の開発に展望を開いた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Kuroda K, Wake H, Mori S, Hinotsu S, Nishibori M, Morimatsu H. Decrease in histidine-rich glycoprotein as a novel biomarker to predict sepsis among systemic inflammatory response syndrome. **Crit Care Med.**, 査読有, 46(4):570-576, 2018.
DOI: 10.1097/CCM.0000000000002947

Zhong H, Wake H, Liu K, Gao Y, Teshigawara K, Sakaguchi M, Mori S, Nishibori M. Effects of histidine-rich glycoprotein on erythrocyte aggregation and hemolysis: Implications for a role under septic conditions. **J Pharmacol Sci.**, 査読有, 136(3):97-106, 2018.
DOI: 10.1016/j.jphs.2017.11.003

Kobori T, Hamasaki S, Kitaura A, Yamazaki Y, Nishinaka T, Niwa A, Nakao S, Wake H, Mori S, Yoshino T, Nishibori M, Takahashi H. Interleukin-18 amplifies macrophage polarization and morphological alteration, leading to excessive angiogenesis. **Front Immunol.**, 査読有, 9:334, 2018.
DOI: 10.3389/fimmu.2018.00334

Shirai A, Sugiyama Y, Rieu JP. Differentiation of neutrophil-like HL-60 cells strongly impacts their rolling on surfaces with various adhesive properties under a pressing force. **Technol Health Care.**, 査読有, 26(1):93-108, 2018.
DOI: 10.3233/THC-171052

Morioka Y, Teshigawara K, Tomono Y, Wang D, Izushi Y, Wake H, Liu K, Takahashi H, Mori S, Nishibori M. The specific localization of advanced glycation end-products (AGEs) in rat pancreatic islets. **J Pharmacol Sci.**, 査読有, 134:218-24, 2017.
DOI: 10.1016/j.jphs.2017.07.005

Gao Y, Wake H, Morioka Y, Liu K, Teshigawara K, Shibuya M, Zhou J, Mori S, Takahashi H, Nishibori M. Phagocytosis of advanced glycation end products (AGEs) in macrophages induces cell apoptosis. **Oxid Med Cell Longev.**, 査読有, 2017:8419035, 2017.
DOI: 10.1155/2017/8419035

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 regulation of immunothrombosis and inflammation. *EBioMedicine*, 査読有, 9: 180-94, 2016.
DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.06.003.

[学会発表](計 52 件)

Htwe SS, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Stonestreet BS, LimYP, Nishibori M
Effects of inter-alpha inhibitor proteins (IAIP) on neutrophil functions.
第 138 回日本薬理学会関東部会
2018 年 3 月 10 日
慶応義塾大学薬学部 (東京都港区)

和氣秀徳、高遠、森秀治、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋
Histidine-rich glycoprotein (HRG)の好中球制御による敗血症治療薬の可能性
第 132 回日本薬理学会近畿部会
2017 年 11 月 24 日
千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)

Arai T, Shirai A, Rieu JP
Rolling experiment of HL-60 cells on patterned PDMS substrate coated by P-selectin.
14th International Conference on Flow Dynamics (ICFD 2017)
2017 年 11 月 3 日
仙台国際センター (宮城県仙台市)

Kuroda K, Morimatsu H, Kawanoue N, Wake H, Mori S, Nishibori M
Histidine-Rich Glycoprotein as a Novel Prognostic Biomarker for Sepsis: Multicenter prospective observational study.
Sepsis2017
Sep.12, 2017. Paris (France)

Wake H, Gao Y, Hui Z, Gao S, Mori S, Morimatsu H, Nishibori M
Histidine-rich glycoprotein protects vascular endothelial cells and red blood cells in sepsis.
Sepsis2017
Sep.12, 2017. Paris (France)

Nishibori M
Novel understanding of cellular and molecular basis of sepsis pathophysiology: a proposal of new treatment strategy.
International Seminar and workshop on Advanced Cellular and molecular Biology Techniques
Jul.7, 2017. Denpasar (Indonesia)

Gao S, Gao Y, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M
Protective effects of histidine-rich glycoprotein on barrier function of vascular endothelial cells.
第 131 回日本薬理学会近畿部会
2017 年 6 月 30 日

ウインクあいち (愛知県名古屋市)

和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋
The role of histidine-rich glycoprotein on NETosis and immunothrombosis in septic condition.

第 90 回日本薬理学会年会
2017 年 3 月 17 日
長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

高尚澤、和氣秀徳、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋
Protective effects of histidine-rich glycoprotein (HRG) on vascular endothelial cells.

第 90 回日本薬理学会年会
2017 年 3 月 16 日
長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

衷輝、和氣秀徳、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋
Histidine rich-glycoprotein regulates erythrocyte PS expression adherent and aggregation.

第 90 回日本薬理学会年会
2017 年 3 月 16 日
長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

高遠、和氣秀徳、劉克約、勅使川原匡、森秀治、西堀正洋
Protective effects of histidine-rich glycoprotein (HRG) on human vascular endothelial cells.

第 90 回日本薬理学会年会
2017 年 3 月 15 日
長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

西堀正洋
敗血症病態の新しい理解と血漿タンパク質 Histidine-rich glycoprotein(HRG)を用いた治療法開発
第 35 回サイトプロテクション研究会
2017 年 3 月 10 日
メルパルク京都 (京都府京都市)

荒井俊貴、白井敦、Rieu JP
凹凸を有する PDMS 基板への P-selectin および BSA のコーティングのための基礎的検討
日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会
2017 年 1 月 19 日
ウインクあいち (愛知県名古屋市)

Shirai A, Rieu JP, Sugimoto R, Yoshino D
Rolling characteristics of neutrophils on PDMS surface mimicking the endothelial topography: PTV analysis of the cells motion on regular hexagonal pattern.
13th International Conference on Flow Dynamics (ICFD 2016)
仙台国際センター (宮城県仙台市)
2016 年 10 月 12 日

Sugimoto R, Shirai A, Yoshino D, Rieu JP

Correlative effect of normal force and P-selectin concentration on rolling behavior of neutrophils.
13th International Conference on Flow Dynamics (ICFD 2016)
仙台国際センター（宮城県仙台市）
2016年10月11日

白井敦、Rieu Jean-Paul、杉本涼太、吉野大輔
血管内皮表面を模擬した PDMS 基板上における HL-60 細胞の挙動解析
日本流体力学会年会 2016
2016年9月28日
名古屋工業大学（愛知県名古屋市）

和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋
敗血症性 ARDS における immunothrombus 形成に対する高ヒスチジン糖タンパク質の役割
第 89 回日本生化学会大会
2016年9月25日
仙台国際センター（宮城県仙台市）

和氣秀徳、森秀治、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋
Histidine rich glycoprotein の敗血症時好中球性微小循環障害に対する影響
第 129 回日本薬理学会近畿部会
2016年6月24日
広島県医師会館（広島県広島市）

和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋
敗血症時好中球微小循環イメージング
第 89 回日本薬理学会年会
2016年3月10日
パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

和氣秀徳、西堀正洋
敗血症性 ARDS における Immunothrombosis
第 89 回日本薬理学会年会
2016年3月10日
パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

⑳ 高遠、和氣秀徳、劉克約、勅使川原匡、森秀治、西堀正洋
ヒト血管内皮細胞における Histidine rich glycoprotein (HRG) の保護効果
第 89 回日本薬理学会年会
2016年3月9日
パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

㉑ 和氣秀徳、森秀治、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋
敗血症病態における微小循環障害に対する高ヒスチジン糖タンパク質の役割
第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会
2015年12月1日
神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

㉒ 和氣秀徳、森秀治、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) の敗血症性 immunothrombosis 形成に対する影響

第 128 回日本薬理学会近畿部会
2015年11月20日
千里ライフサイエンスセンター（大阪府豊中市）

㉓ Shirai A, Rieu JP
Rolling characteristics of neutrophils on PDMS surface mimicking the endothelial topography.
The 15th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI 2015)
2015年10月28日
仙台国際センター（宮城県仙台市）

㉔ 白井敦
傾斜遠心力場における血球の挙動解析
日本機械学会 2015 年度年次大会
2015年9月14日
北海道大学（北海道札幌市）

㉕ Kuroda K, Morimatsu H, Wake H, Mori S, Nishibori M
Histidine-Rich Glycoprotein as a Novel Prognostic Biomarker in Critically Ill Patients.
Euroanaesthesia 2015 (Annual meeting of European Society of Anesthesiology)
Jun.1, 2015. Berlin (Germany)

〔産業財産権〕

出願状況（計 9 件）
名称：赤血球保護剤
発明者：西堀正洋、和氣秀徳、衷輝、森秀治、阪口政清
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：PCT/JP2018/005391
出願年月日：2018年2月16日
国内外の別：外国
番号：特願 2017-028738 号
出願年月日：2017年2月20日
国内外の別：国内

名称：遺伝子発現用カセット及びその産生物
発明者：阪口政清、西堀正洋、公文裕巳、村田等、山本健一、木下理恵
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：PCT/JP2016/079219
出願年月日：2016年10月3日
国内外の別：外国
番号：US15/762564
出願年月日：2016年10月3日
国内外の別：外国
番号：特願 2016-059297 号
出願年月日：2016年3月23日
国内外の別：国内
番号：特願 2015-198160 号
出願年月日：2015年10月6日
国内外の別：国内

名称： サイトカインストーム抑制剤
発明者：西堀正洋、森秀治、和氣秀徳
権利者：岡山大学
種類：特許

番号：PCT/JP2015/085693
出願年月日：2015年12月21日
国内外の別：外国
番号：特願2016-566354号
出願年月日：2015年12月21日
国内外の別：国内
番号：特願2015-154972号
出願年月日：2015年8月5日
国内外の別：国内

取得状況（計2件）

名称： THERAPEUTIC AGENT, METHOD OF TREATMENT AND METHOD FOR PREDICTING THE SEVERITY OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME(SIRS), DISEASES CAUSED OR ACCOMPANIED BY NEUTROPHIL ACTIVATION
発明者：西堀正洋、黒田浩佐、森松博史、森秀治、和氣秀徳、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、阪口政清
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：US9696321
出願年月日：2016年1月14日
取得年月日：2017年7月4日
国内外の別：外国

名称：好中球活性化に起因する疾患の治療薬及び検査方法
発明者：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
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：第6227601号
出願年月日：2015年9月2日
取得年月日：2017年10月20日
国内外の別：国内

〔その他〕

Okayama University Medical Research Updates: Novel Understanding of Sepsis Physiology and a Proposal of New Treatment Strategy
2016年8月8日
http://www.okayama-u.ac.jp/eng/research_highlights/index_id38.html

日刊工業新聞：敗血症の重篤化の仕組み、血漿たんぱくカギ
2016年6月27日

日経産業新聞：敗血症の重症化防ぐ、岡山大たんぱく質を発見
2016年6月21日

RSK ニュース：有効たんぱく質特定、敗血症治療に期待
2016年6月21日

朝日新聞、デジタルニュース：「敗血症」の鍵握るたんぱく質発見、治療薬開発へ 岡大
2016年6月19日

毎日新聞、デジタルニュース：敗血症治療に前進 岡山大、有効たんぱく質と特定
2016年6月19日
<http://mainichi.jp/articles/20160619/k00/00e/040/154000c>

山陽新聞、デジタルニュース（Yahoo ニュース掲載）：敗血症進行抑えるタンパク質特定 岡山大・西堀教授らのグループ
2016年6月18日
<http://www.sanyonews.jp/article/367536>

共同通信、各地方紙に掲載：敗血症を改善する物質特定、治療法開発に期待 岡山大
2016年6月17日

NHK 岡山放送局ニュース：敗血症の治療に血漿タンパク質
2016年6月17日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西堀 正洋 (NISHIBORI, Masahiro)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50135943

(2) 研究分担者

白井 敦 (SHIRAI, Atsushi)
東北大学・流体科学研究所・准教授
研究者番号：20302226

森 秀治 (MORI, Shuji)
就実大学・薬学部・教授
研究者番号：50220009

高橋 英夫 (TAKAHASHI, Hideo)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：60335627

劉 克約 (RYU, Katsuyaku)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・非常勤研究員
研究者番号：40432637

和氣 秀徳 (WAKE, Hidenori)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：60570520

勅使川原 匡 (TESHIGAWARA, Kiyoshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40403737