

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15580

研究課題名(和文)新規血漿因子HRGによる敗血症Immunothrombosis抑制機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of an inhibitory mechanism of septic immunothrombosis by novel plasma factor:HRG

研究代表者

和氣 秀徳(Wake, Hidenori)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：60570520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Histidine-rich glycoprotein(HRG)は敗血症病態時に低下し、HRGを補充することで生存率改善効果がある血漿糖タンパク質である。HRGは種々の免疫血栓形成促進因子(LPS、亜鉛イオン、活性酸素、ポリリン酸)を消去、中和、あるいは無毒化し、好中球、血小板、赤血球の凝集、血管内皮への接着を抑制することで、無秩序な免疫血栓の形成を抑制・調節していることが明らかとなった。また、その現象を生体内でとらえることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HRGが敗血症病態を改善するより詳細な作用機序を明らかにすることにより、正しい敗血症の理解に寄与するとともに、新たな視点からの敗血症治療薬の開発に貢献する。また、今回構築した生体内イメージングの手法は、より正確な生体内血球細胞動態や血管状態を把握する上で役立つ、敗血症のみならず、他の病態への応用も可能である。

研究成果の概要(英文)：Histidine-rich glycoprotein (HRG) is a plasma glycoprotein. Plasma HRG levels decreased in septic condition and HRG supplementary therapy improves lethality in sepsis. We elucidated that HRG modulates a dysregulated immunothrombus formation by suppression of aggregation of neutrophils, platelets and erythrocytes, and adhesion of these cells to endothelial cells because HRG detoxifies immunothrombosis-inducing factors (LPS, zinc, reactive oxygen species, polyphosphate). Additionally, we were successful in intravital visualization of these phenomena.

研究分野：血管・血液薬理学

キーワード：HRG 敗血症 免疫血栓形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染を伴った全身性炎症症候群(SIRS)として定義されていた難治性疾患で、集中的治療法が発達したにもかかわらず、未だ ICU における死因第一位である。敗血症は、感染により、SIRS や高サイトカイン血症が引き起こされ、多臓器不全となり死に至る病態として理解されている。上記の理解より、炎症性サイトカインや菌体成分そのもの若しくは自然免疫をブロックする治療薬の開発が行われてきたが、成功した事例は存在せず、現在、敗血症治療薬は存在しないのが実状であり、これまでとは全く異なった視点での創薬が必要とされている。さらに 2016 年には、敗血症の定義が更新され、重篤な臓器不全という点が追加された。このように、未だ世界における敗血症に対する認識は変化しており、病態の理解が不十分で、定義さえも定まっていないのが現状である。

我々は敗血症のメディエーターと考えられる High Mobility Group Box1(HMGB1)に関する研究を行う中で、HMGB1 と拮抗する因子 Histidine-rich glycoprotein(HRG)を見出した。さらに敗血症 Cecal ligation and puncture(CLP)モデルマウスにおいて血中 HRG 濃度が著明に低下していること、RNAi により HRG をノックダウンすると生存率が低下し、HRG を補充すると劇的な生存率改善効果があることを明らかにした。また、HRG は肺の浸潤好中球数を減少させ、肺の炎症を改善することを示した。細胞レベルでの検証の結果、HRG は循環血液中の好中球の形態を正球状で細胞表面が平滑化した状態に保つ作用があり、この作用により、微小循環での好中球の通過性をスムーズに保つことが明らかとなった。以上の結果より、HRG は好中球の血管内皮への接着や障害を抑制し、好中球性免疫血栓形成(Immunothrombosis)により惹起される肺炎の発生を抑制することで、敗血症病態を改善することを明らかにした。臨床においては、マウスの結果と同様に敗血症患者血中 HRG 濃度は健常者と比べて優位に低下しており、敗血症の予後予測マーカーとして有用であることを明らかにした。この結果より、HRG はヒトの敗血症病態形成にも極めて重要な役割を担っている事が示唆された。

### 2. 研究の目的

実際に敗血症病態下の生体内循環でどのような変化が生じているか検証した報告は存在しない為、本研究では、in vivo imaging 技術により好中球と血小板の生体内動態を特異的細胞蛍光標識で観察し、血液流動状態や血管内皮障害等の評価を加えることで、どのように微小循環障害を引き起こすかを明らかにする。さらに、HRG 処置時に免疫血栓形成と血液循環がどのように改善するかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 敗血症動物実験モデルには、CLP 敗血症腹膜炎モデルを採用した。作成法としては、まず、腹部を切開し、盲腸を露出させる。次に、盲腸の先端から 1.5cm の部位を絹糸により結紮し、18G 針を用いて盲腸を 2 回刺突する。最後に、少量の糞便をその穴より出したのち、盲腸を腹部に戻し、腹部を閉じる。このモデルを用いて、CLP 処置 24 時間後に好中球を Alexa Fluor 594 標識-抗 Ly6G 抗体(10  $\mu$ g/mouse)、血小板を DyLight488 標識-抗 CD42c 抗体(2  $\mu$ g/mouse)の尾静脈投与により可視化し、腸間膜血管血球細胞動態を in vivo imaging system により観察した。また、CLP 処置を行い、ヒト血漿より生成した HRG(20 mg/kg)の投与を行った後の血球細胞の動態を観察した。

(2) CLP 敗血症腹膜炎モデルは個体間のばらつきが激しく安定性に欠けていたため、より個体間のばらつきが少ない LPS 尾静脈投与(1 mg/kg,i.v.)敗血症モデルマウスにおける腸間膜血管血球動態を(1)の手法により可視化し、観察した。さらに Alexa Fluor 594 標識-IsolectinB4(10  $\mu$ l/mouse)尾静脈投与により血管内皮細胞を染色し、観察した。また、HRG ノックアウトマウスを用いて、同様の実験を実施し、好中球、血小板、血管内皮細胞の状態を観察した。

(3) in vivo imaging system を用いて、肺血管内の好中球、血小板の動態を観察した。マウス人工呼吸器下に胸部を開き、肺を一部露出させる。露出した肺の表面とカバーガラスを生体用接着材にて接着させ、そのマウスとカバーガラスを観察台に固定し、好中球を Alexa Fluor 594 標識-抗 Ly6G 抗体(10  $\mu$ g/mouse)、血小板を DyLight488 標識-抗 CD42c 抗体(2  $\mu$ g/mouse)の尾静脈投与により可視化した。

(4) 活性化した血小板から遊離する亜鉛イオンは赤血球を凝集することが知られている。免疫血栓形成における赤血球に対する HRG の影響を明らかにするために、赤血球を 20 $\mu$ M 亜鉛イオン刺激により凝集させ、さらに HRG を 1  $\mu$ g/ml の濃度で添加した。また、亜鉛で刺激された赤血球は血管内皮細胞(EA.hy926)に接着するが、この接着反応への HRG の影響を明らかにするために、上記と同様に HRG を 1  $\mu$ g/ml の濃度で添加した。

(5) CLP 及び LPS 誘発敗血症病態マウス下における HRG の血管内皮細胞に対する影響を明らかにするために、CLP 処置 24 時間後あるいは LPS(10 mg/kg,i.v.)処置 12 時間後の各臓器の血管透過性亢進を、エバンスブルー(20 mg/kg)を静注し、1 時間後に組織からそのエバンスブルーを抽出することで評価した。

(6) 活性酸素(ROS)や、その産生系への HRG の影響を明らかにするために、HORAC(Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity)アッセイキット、ORAC(Oxygen Radical Antioxidant Capacity)アッセイキット、グルタチオンペルオキシダーゼ活性測定キットを用いて、HRG のヒドロキシラジカル、ペルオキシラジカル、さらにグルタチオンペルオキシダーゼに対する効果を測定

した。

(7) 細菌より放出されるポリリン酸は血液凝固を促進することが知られている。ポリリン酸が HRG により正球化した好中球に与える影響を明らかにするために、ヒト血液より単離した好中球に、HRG(1 μM)単独もしくは HRG(1 μM)+ポリリン酸(100 μg/ml)で 37 °C、1 時間、CO<sub>2</sub> インキュベーター内において刺激を行い、好中球形態を観察した。

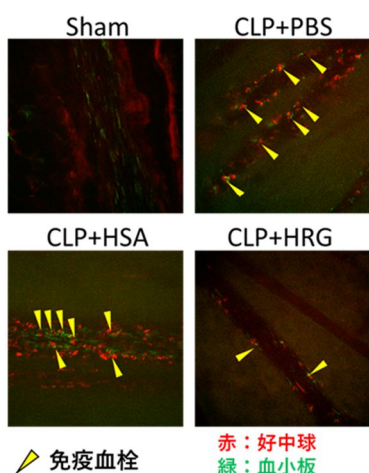
#### 4. 研究成果

(1) CLP モデルマウスの腸間膜血管 in vivo imaging において、多数の好中球や血小板が血管内皮細胞に接着し、免疫血栓を形成している像が確認できた。また、HRG を投与すると、その免疫血栓形成が抑制されることが明らかとなった(図 1)。

(2) LPS 投与モデルマウスにおいて、CLP モデルマウスと同様のマウス腸間膜血管内免疫血栓形成が確認された。また、HRG ノックアウトマウスにおいては、その免疫血栓形成が亢進している像が確認された。さらに LPS 処置マウスの血管は Sham 群と比較して IsolectinB4 陽性血管内皮細胞が減少していたことから、血管内皮が障害されたことが示唆され、LPS 処置 HRG ノックアウトマウスは、さらに血管内皮障害が増悪化することが明らかになった(図 2)(表 1)。

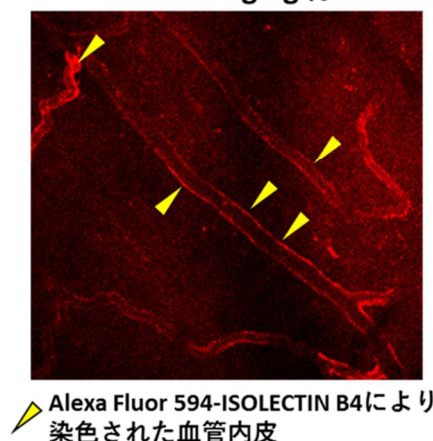
(図1)

CLPモデルマウスの腸間膜血管内免疫血栓形成



(図2)

レクチンによる血管内皮染色  
in vivo imaging 像



(表1)

LPS敗血症モデル腸間膜血管状態の  
野生型、HRGノックアウトマウス間での比較

|              | Wild         | Wild+LPS      | HRG KO        | HRG KO+LPS        |
|--------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| 好中球の血管壁接着(個) | 0.00 ± 0.00  | 1.67 ± 0.44   | 0.09 ± 0.09   | 5.00 ± 1.04*      |
| 血小板凝集(%)     | 0.35 ± 0.19  | 4.68 ± 0.67   | 0.93 ± 0.19   | 6.38 ± 0.68       |
| 血管閉塞(%)      | 1.37 ± 0.013 | 17.76 ± 0.05  | 4.31 ± 0.032  | 23.16 ± 0.046     |
| 血管内皮障害(%)    | 7.57 ± 0.007 | 30.85 ± 0.014 | 16.94 ± 0.014 | 57.94 ± 0.018**,# |

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Wild+LPS  
## $p < 0.01$  vs HRG KO

好中球の血管壁接着：1視野中の血管内腔へ接着した好中球の数

血小板凝集：1視野中に占める血小板の割合

血管閉塞：1視野全血管中の閉塞血管の割合

血管内皮障害：1視野全血管内腔の内、レクチン染色された部位の割合

(3) 肺血管内好中球と血小板の in vivo imaging に成功した(図 3)。

(4) 亜鉛イオンにより刺激を受けた赤血球は凝集や血管内皮細胞への接着が亢進するが、HRG はその反応を抑制することが明らかとなった(Zhong H et al., J Pharmacol Sci, 2018)。

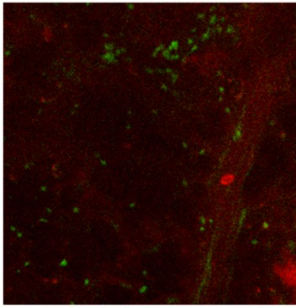
(5) CLP 及び LPS 誘発敗血症病態マウスの各臓器(肺、肝、腎)の血管透過性亢進を HRG は有意に抑制することを明らかにした(Gao S et al., Br J Pharmacol, 2019)。

(6) HRG は 2 価鉄イオンと結合することでフェントン反応を抑制しヒドロキシルラジカルの産生を抑制することを明らかにした。また、HRG はヒドロキシルラジカルやペルオキシラジカルによって効率的に酸化を受け、抗酸化能を発揮していることが明らかとなった。さらに、HRG はグルタチオンペルオキシダーゼと結合することで、その酵素活性を促進することを明らかにした。

(7) ポリリン酸は HRG による好中球正球化反応に拮抗することを明らかにした(図 4)。

(図3)

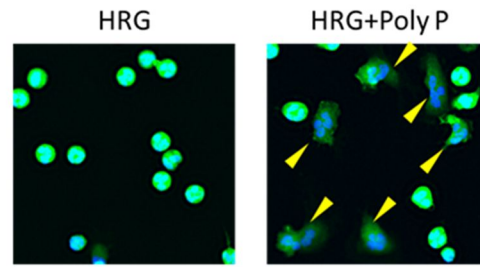
肺における好中球、血小板  
in vivo imaging 像



赤：好中球 緑：血小板

(図4)

ポリリン酸のHRG好中球正球化活性競合作用



Poly P: ポリリン酸 (100µg/ml)  
HRG: histidine-rich glycoprotein (1µM)

以上(1)~(7)の結果より、HRG は種々の免疫血栓形成促進因子(LPS、亜鉛イオン、活性酸素、ポリリン酸)を消去、中和、あるいは無毒化し、好中球、血小板、赤血球の凝集、血管内皮への接着を抑制することで、無秩序な免疫血栓の形成を抑制・調節していることが明らかとなった。また、その現象を生体内でとらえることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Nishibori Masahiro, Wake Hidenori, Morimatsu Hiroshi  | 4. 巻<br>22                |
| 2. 論文標題<br>Histidine-rich glycoprotein as an excellent biomarker for sepsis and beyond  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Critical Care   | 6. 最初と最後の頁<br>209         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s13054-018-2127-5  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Terao Kinya, Wake Hidenori, Adachi Naoto, Liu Keyue, Teshigawara Kiyoshi, Takahashi Hideo, Mori Shuji, Nishibori Masahiro         | 4. 巻<br>47                |
| 2. 論文標題<br>Histidine-Rich Glycoprotein Suppresses Hyperinflammatory Responses of Lung in a Severe Acute Pancreatitis Mouse Model            | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Pancreas  | 6. 最初と最後の頁<br>1156 ~ 1164 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1097/MPA.0000000000001153   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Zhong Hui, Wake Hidenori, Liu Keyue, Gao Yuan, Teshigawara Kiyoshi, Sakaguchi Masakiyo, Mori Shuji, Nishibori Masahiro            | 4. 巻<br>136               |
| 2. 論文標題<br>Effects of Histidine-rich glycoprotein on erythrocyte aggregation and hemolysis: Implications for a role under septic conditions | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Pharmacological Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>97 ~ 106    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jphs.2017.11.003   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Wake Hidenori   | 4. 巻<br>73                |
| 2. 論文標題<br>Histidine-rich Glycoprotein Modulates the Blood-vascular System in Septic Condition  | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Acta Medica Okayama   | 6. 最初と最後の頁<br>379 ~ 382   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.18926/AMO/57366   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Gao Shangze, Wake Hidenori, Gao Yuan, Wang Dengli, Mori Shuji, Liu Keyue, Teshigawara Kiyoshi, Takahashi Hideo, Nishibori Masahiro    | 4. 巻<br>176               |
| 2. 論文標題<br>Histidine rich glycoprotein ameliorates endothelial barrier dysfunction through regulation of NF- $\kappa$ B and MAPK signal pathway | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>British Journal of Pharmacology   | 6. 最初と最後の頁<br>2808 ~ 2824 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/bph.14711   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>和氣 秀徳   |
| 2. 発表標題<br>The involvement of immunothrombosis in septic multiple organ failure. |
| 3. 学会等名<br>第40回日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>和氣 秀徳                       |
| 2. 発表標題<br>炎症関連血管障害に関与するDAMP/anti-DAMP |
| 3. 学会等名<br>CVMW2018心血管代謝週間 (招待講演)      |
| 4. 発表年<br>2018年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Wake H, Mori S, Teshigawara K, Liu K, Wang D, Gao Y, Takahashi HK, Nishibori M.      |
| 2. 発表標題<br>The role of histidine-rich glycoprotein on immunothrombosis in septic organ failure. |
| 3. 学会等名<br>18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)                        |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Zhong H, Wake H, Liu K, Gao Y, Teshigawara K, Sakaguchi M, Mori S, Nishibori M.   |
| 2. 発表標題<br>Effects of histidine-rich glycoprotein on erythrocyte aggregation and hemolysis: implications for a role under septic conditions. |
| 3. 学会等名<br>18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Gao S, Gao Y, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M.  |
| 2. 発表標題<br>Protective effects of histidine-rich glycoprotein on barrier dysfunction of vascular endothelial cells. |
| 3. 学会等名<br>18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>和氣秀徳、西堀正洋   |
| 2. 発表標題<br>血漿タンパクHistidine-rich glycoprotein の多彩な作用とバイオ製剤の臨床応用 |
| 3. 学会等名<br>第92回日本薬理学会年会(シンポジウム)                                |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Gao S, Gao Y, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M.                                     |
| 2. 発表標題<br>Protective effects of histidine-rich glycoprotein on barrier function of vascular endothelial cells. |
| 3. 学会等名<br>第131回日本薬理学会近畿部会  |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>和氣 秀徳                     |
| 2. 発表標題<br>動脈硬化・血栓症とDAMP/anti-DAMP   |
| 3. 学会等名<br>第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2017年                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>和氣秀徳、高遠、森秀治、劉克約、勅使川原匡、西堀正洋                           |
| 2. 発表標題<br>Histidine-rich glycoprotein (HRG)の好中球制御による敗血症治療薬の可能性 |
| 3. 学会等名<br>第132回日本薬理学会近畿部会                                      |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Wake H, Mori S, Takahashi H, Wang D, Teshigawara K, Nishibori M.      |
| 2. 発表標題<br>Histidine-rich glycoprotein regulates neutrophil condition in sepsis. |
| 3. 学会等名<br>第93回日本薬理学会年会  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yoshii Y, Wake H, Teshigawara K, Wang D, Liu K, Takahashi Y, Nishibori M.                |
| 2. 発表標題<br>The effects of histidine-rich glycoprotein on neutrophil-like differentiated cell lines. |
| 3. 学会等名<br>第93回日本薬理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2020年   |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takahashi Y, Wake H, Teshigawara K, Wang D, Nishibori M.  |
| 2. 発表標題<br>Functional Evaluation of Neutrophils Spheroidized by HRG. |
| 3. 学会等名<br>第93回日本薬理学会年会  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Gao S, Wake H, Sakaguchi M, Wang D, Mori S, Liu K, Teshigawara K, Gao Y, Takahashi H, Nishibori M.             |
| 2. 発表標題<br>Histidine-rich glycoprotein inhibits high mobility group box 1-mediated pathway in vascular endothelial cells. |
| 3. 学会等名<br>9th International DAMPs and Alarmins Symposium (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋陽平, 和氣秀徳, 吉井將哲, 阪口政清, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋 |
| 2. 発表標題<br>HRGの作用により球状化したヒト好中球の貪食能解析                           |
| 3. 学会等名<br>第135回日本薬理学会近畿部会                                     |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>吉井將哲, 和氣秀徳, 高橋陽平, 王登莉, 勅使川原匡, 西堀正洋            |
| 2. 発表標題<br>好中球様細胞におけるHistidine-Rich Glycoprotein(HRG)の影響 |
| 3. 学会等名<br>第135回日本薬理学会近畿部会                               |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                                     |                                      |               |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>赤血球保護剤                  | 発明者<br>西堀正洋、和氣秀<br>徳、袁輝、森秀治、<br>阪口政清 | 権利者<br>岡山大学   |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、PCT/JP2018/005391 | 出願年<br>2018年                         | 国内・外国の別<br>外国 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|