

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670464

研究課題名(和文)好中球の活性制御による敗血症治療法開発

研究課題名(英文)Drug development for sepsis by regulation of neutrophils

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：精製したヒト血漿HRGのマウス盲腸結紮穿孔刺(CLP)敗血症モデルにおける抗致死性効果の基本的作用機序について検討した。研究に使用した精製ヒト血漿HRGは、日本赤十字で高ASTあるいは高ALT血症のため使用されなかった凍結新鮮血漿から、Ni-NTAアフィニティクロマトとMonoQ陰イオンクロマトで高純度に精製した。CLP後4-5日で100%の致死性を示すマウス敗血症モデルでは、1日後の血漿HRGレベルが健常動物の約20%に低下した。精製したヒトHRGを20 mg/kgの用量で静注すると致死性が有意に低下した。HRGは、好中球を標的として作用することを、ヒト好中球を用いて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Fundamental mechanisms for the preventive effects of purified human HRG on cecal-ligation and puncture (CLP)-induced sepsis in mice was examined. Human HRG was purified from freshly frozen plasma by Ni-NTA affinity and MonoQ anion exchange chromatographies. Plasma levels of HRG in septic mice decreased dramatically to 20% of sham control at 1 day after CLP and septic mice showed 100% lethality. Treatment of mice with i.v. injection of purified human HRG at 20 mg/kg decreased the lethality significantly. HRG inhibited the adhesion of neutrophils on the lung microvasculatures, lung inflammation and DIC state, leading to the increase in survival rate. The treatment of isolated human neutrophils with HRG induced a spherical shape without microvilli and inhibited adhesion on vascular endothelial cells. HRG also strongly inhibited the production of reactive oxygen species. These results as a whole suggested that neutrophils are the target of HRG supplementary therapy for sepsis.

研究分野：医学(薬理学)

キーワード：HRG 敗血症 ARDS Immunothrombosis 補充療法 組換えタンパク製剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症は、感染を伴う全身炎症症候群と理解されている。敗血症は重症化すると高率に DIC や多臓器不全を伴い、さらに敗血症性ショックに至ると高死亡率となる。世界的な視野では、死因の第一位の原因を占め、世界 Sepsis Campaign では継続してその制圧を目標としている。しかし、2010 年代に実施された敗血症に対する新薬開発の治験は、いずれも完遂されることなく中断あるいは凍結され、新薬開発は進行していない。さらに米国 FDA で承認されていた活性化プロテイン C 製剤が再評価の結果効果なしと判定され、現在治療薬は世界的に存在しない状態が続いている。

(2) 敗血症はアンメットメディカルニーズの極めて高い疾患病態である。上記の状況を打破するには、敗血症病態で観察される血管内皮細胞の全般的活性化、高サイトカイン血症、DIC、好中球の異常活性化による ARDS の基底にある相互連鎖的メカニズムを解明し、新しい治療ターゲットを見出す必要がある。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、申請者はマウス盲腸結紮穿刺(CLP) 敗血症モデルを用いて、血中で著減する血漿タンパク Histidine-rich glycoprotein (HRG) を同定した。HRG はまた、敗血症の致死性メディエーターとして同定された High Mobility Group Box-1 (HMGB1) と結合性を有することを見出した。これらの結果は、敗血症時に低下する血中 HRG が、敗血症病態形成において重要な役割を果たす可能性を強く示唆している。本研究では、HRG 低下の敗血症病態での意義の解析、HRG の薬理作用の解明、外因性 HRG による補充治療の作用機序解析を実施する。

3. 研究の方法

(1) マウス盲腸結紮穿刺(CLP) 敗血症モデルの作製と病態解析

マウスを全身麻酔下に開腹し、盲腸を結紮後注射針による穿孔を作製する。その後、腸管を腹腔内に戻し、腸内容物漏出による腹膜炎病態 (CLP) を作製する。CLP マウスの血液を経時的に採血し、血漿 HRG レベルを測定する。マウスの Sickness scoring と生存率曲線を作成し、精製ヒト血漿 HRG の投与効果を明らかにする。経時的にマウスを灌流固定し、パラフィンブロックを作成後、組織の薄切切片で組織学的検討を実施する。特に、肺組織における敗血症性 ARDS の病態と、Immunothrombus 形成の関係を明らかにする。

(2) ヒト末梢血好中球を用いた HRG の薬理活性の解析

ヒト末梢血から好中球を単離し、ヒト精製 HRG と一定時間インキュベーション後の細胞形態、血管内皮細胞への接着性、微小流路通過性、活性酸素分子種の産生能を評価する。細胞形態変化に關与する細胞内骨格の変化を解明する。HRG によってもたらされる細胞内シグナリング変化について解析する。

4. 研究成果

マウス盲腸結紮穿刺(CLP) 敗血症モデルでは、血中 HRG レベルが時間依存的に低下することがわかった。エンドトキシン LPS の静注でも低下は観察された。この血中レベルの低下は、肝実質細胞における HRG mRNA の著明な低下と血中での消費性分解の両方が關与する可能性が示唆された。CLP 敗血症モデル肺では、好中球の血管内接着像が多数観察され、この接着が核内物質を細胞外に放出する Neutrophil Extracellular Trap (NET) の様式であることがわかった。さらに、好中球の接着部位には血小板の凝集とフィブリン沈着が共存しており、Immunothrombus の像を呈していることが明らかとなった。ヒト HRG の投与は、好中球の接着と Immunothrombus 形成を著明に抑制した。さらに、肺内炎症を評価するために、TNF- α , IL-6, iNOS, PAI-1, Neutrophil elastase の mRNA を測定したところ、CLP マウスではいずれも著明な上昇が観察されたが、HRG 治療群では著明に抑制された。In vivo イメージングの手法で腸間膜血管内の好中球を蛍光標識して観察すると、CLP マウスでは動脈、静脈系ともに変形した好中球が血管壁に強固に接着する像が多数観察され、時に血流を遮断する部位も認められた。HRG 治療群では、強い好中球の接着は殆ど認められなかった。

ヒト好中球を用いた実験で、ヒト血漿から精製した HRG は、1) 好中球の正球化と径の短縮、2) 表面微絨毛構造の消失、3) 血管内皮細胞への接着性の低下、4) 微小流路通過性の維持、5) 活性酸素分子種産生抑制、を誘導することが明らかとなった。これらの機能調節は、全体として好中球の鎮静化と表現することが可能で、正常血中に存在する 1 micromolar の HRG は恒常的に好中球を制御していることが強く示唆された。

HRG による正球化の形態変化は、細胞膜直下にアクチンフィラメントが形成される細胞骨格の変化を伴っていた。その他の細胞機能調節に關与する細胞シグナリングについては、さらに研究が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Oozawa S, Sano S, Nishibori M.
Usefulness of high mobility group box 1 protein as a plasma biomarker in patient with

peripheral artery disease.
Acta Med Okayama, 査読有, 68(3): 157-62, 2014.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Usefulness+of+high+mobility+group+box+1+protein+as+a+plasma+biomarker+in+patient+with+peripheral+artery+disease>.

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, 査読有, 85: 18-26, 2014.
DOI:10.1016/j.neuropharm.2014.05.007.

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, 査読無, 143(1):5-9, 2014.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/143/1/143_5/_article/-char/ja/

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, 査読有, 718:305-13, 2013.
DOI:10.1016/j.ejphar.2013.08.017.

西堀 正洋
DAMPs:HMGB1 の脳神経障害作用
Thrombosis Medicine, 査読無, 3(4):5-11, 2013.
http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=1005

[学会発表](計 1 1 件)

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
Mar. 22, 2015. Honolulu, Hawaii (USA)

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
2015 年 3 月 19 日
名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

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
2015 年 2 月 9 日
ホテル日航東京 (東京都港区)

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
Dec.3-5, 2014. Paris (France)

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
2014 年 10 月 24 日
和歌山県 JA ビル (和歌山県和歌山市)

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
2014 年 10 月 18 日
国立京都国際会館 (京都府京都市)

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
2014 年 6 月 20 日、岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

西堀 正洋 (招待講演)
新しい炎症制御機序と対外循環
第 59 回日本透析医学会学術集会・総会
2014 年 6 月 15 日
神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)

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
2014 年 5 月 14 日
東京ビッグサイト (東京都江東区)

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

2014年3月19日
仙台国際センター（宮城県仙台市）

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
2014年3月19日
仙台国際センター（宮城県仙台市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 2 件）

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：特願 2014-258546 号
出願年月日：平成 26 年 1 2 月 2 2 日
国内外の別：国内

名称：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
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：PCT/JP2013/064779, US14/406191,
EP13801138.2
出願年月日：平成 25 年 5 月 2 8 日
国内外の別：国外

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等 該当なし

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：5 0 1 3 5 9 4 3

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし