

令和元年6月4日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08232

研究課題名(和文) 血漿高ヒスチジン糖タンパクの肝発現機序、及び内因性DAMPs抑制因子機能の解析

研究課題名(英文) Functional characterization of histidine-rich glycoprotein (HRG) under the inflammatory conditions.

研究代表者

勅使川原 匡 (Teshigawara, Kiyoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40403737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血漿高ヒスチジン糖タンパク(HRG)の炎症病態における肝HRG遺伝子発現、及び、血漿HRGタンパクの抗炎症作用の解析をおこなった。複数種の慢性・急性炎症モデルを用いて肝遺伝子発現を網羅的に解析したところ、HRG遺伝子の発現変動と相関・逆相関する核内タンパク遺伝子を計14種同定した。これら候補遺伝子には、HRGの遺伝子発現を制御する因子が含まれる可能性が高い。また、敗血症モデルの血漿を用いたプロテオーム解析によって、HRGと結合親和性をもつ血漿タンパクを計3種同定した。これら同定タンパクは、すべて炎症病態に関与する因子であり、その炎症応答機序はHRGによって制御される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、急性炎症病態でみられる恒常性の破綻と障害が、慢性炎症病態ではHRGの中和抑制作用によって緩徐に進行するという病態仮説を提唱しており、炎症病態の学術的解明に対する新しい知見となる可能性がある。また、HRGは、敗血症のような急性炎症への補充療法に著効を示しており、新規バイオ医薬品として期待される。肝HRG遺伝子の発現制御機構や血漿HRGタンパクの動態を解析することは、HRG創薬開発のための前臨床研究として重要である。

研究成果の概要(英文)：Histidine-rich glycoprotein (HRG) is a plasma glycoprotein and secreted from liver. HRG has the multifunctional protective properties against the inflammatory progression, whereas little is known about the regulatory mechanisms of HRG production. In this study, we indicated that the gene expression of HRG was increased in both of spontaneously hypertensive (SHRSP rats) and streptozotocin-induced hyperglycemia (STZ rats) as chronic inflammatory models. The enhanced HRG expression in SHRSP rats was markedly reduced by sepsis-induced condition as acute inflammatory model. In addition, the sepsis condition-specific plasma proteins, which were recovered in HRG purification process from the sepsis-induced SHRSP rat plasma, were identified as HRG-associated protein. These proteins are known to be involved in inflammation pathology. These results suggest that HRG is regulated actively to protect against inflammatory impairments in various pathological conditions.

研究分野：薬理学 生理学 分子生物学

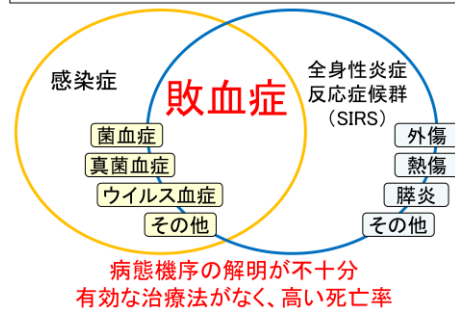
キーワード：高ヒスチジン糖タンパク HRG 急性炎症 慢性炎症 敗血症 血漿タンパク DAMPs 肝

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、細菌感染症による生体侵襲を伴った非特異的な全身性自然免疫炎症応答であり、全身性炎症反応症候群 (SIRS, systemic inflammatory response syndrome) の一つに分類される (図 1)。敗血症は、病原体由来因子である病原体関連分子パターン (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) や自己組織由来因子である傷害関連分子パターン (DAMPs, damage-associated molecular patterns) による刺激が炎症性サイトカインを過剰産生させ、さらに、活性化好中球の組織浸潤、凝血系の亢進による微小血栓形成、ストレス障害によるアポトーシス誘導など様々な病態が進行し、臓器障害や臓器灌流低下を生じさせる。敗血症が重篤化に至る機序には不明な点も多く、現在、臨床的に有効な敗血症の治療法は確立していない。敗血症患者の死亡率は治療をおこなっても 15% 以上と高く、重症化した敗血症は高率で播種性血管内凝固症候群 (DIC, disseminated intravascular coagulation) や多臓器不全、循環性ショックなどを併発し、その死亡率は 40% を超える。

図1:敗血症、及び全身性炎症反応症候群の概念図



核内タンパクの HMGB1 (high mobility group box protein 1) は、敗血症の致死性メディエーターであり、自然免疫を活性化する DAMPs の代表因子である。これまでに我々の研究室は、HMGB1 に対する結合因子として血漿高ヒスチジン糖タンパク (histidine-rich glycoprotein, HRG) を同定し、HRG が HMGB1 の血管新生作用を抑制することを報告した (Eur J Pharmacol. 2009)。さらに、敗血症モデルマウスは、血漿 HRG 量の著しい低下が致死の一因となっており、精製 HRG の補充療法が、臓器不全に進展する微小血栓形成や血管内皮細胞障害などの致死性病態を改善することを報告した (EBioMedicine. 2016)。これらの知見から、自然免疫活性に起因する血管内皮細胞障害や血液凝固・線溶系活性において、HRG は全身性炎症病態の進行を抑制的に制御する主要因子であると考えられる。一方で、HRG の主要産生臓器である肝における HRG 遺伝子の発現制御機構や炎症病態における血中 HRG タンパクの動態については、未解明な点が多い。

2. 研究の目的

全身性炎症反応が末梢臓器障害を引き起こす分子機序の解明を目的とし、HRG 遺伝子の肝における発現制御機構、及び、HRG タンパクが炎症病態の進行を抑制する分子機序の解析をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 肝 HRG 遺伝子発現を制御する因子の探索。(図 2)

肝 HRG 遺伝子の発現を制御する転写調節因子を同定するために、下記実験群から肝 total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いた候補遺伝子の網羅的探索をおこなった。条件が異なる複数の実験モデルにおいて、共通して HRG 遺伝子と相関・逆相関の発現変動をする遺伝子を同定することで、より精度の高い候補遺伝子の絞り込みをおこなう。また、転写調節因子・核タンパクに対象を限定することで、さらに候補遺伝子を選別する。

図2:肝HRG遺伝子発現を制御する因子の網羅的解析

SHRSP ラット+敗血症				遺伝子発現	遺伝子発現
Rats (12 w age)	血圧	CLP	肝HRG発現		
WKY	健常 (-)		(±)	⇒(±)	⇒(±)
SHRSP	高血圧 (-)	増加(↑↑)		⇒増加	⇒減少
SHRSP+CLP	高血圧	敗血症	減少(↓↓)	⇒減少	⇒増加

STZ高血糖ラット				遺伝子発現	遺伝子発現
Wister (8 w age)	血糖		肝HRG発現		
Control	健常		(±)	⇒(±)	⇒(±)
STZ DM	高血糖		増加(↑↑)	⇒増加	⇒減少

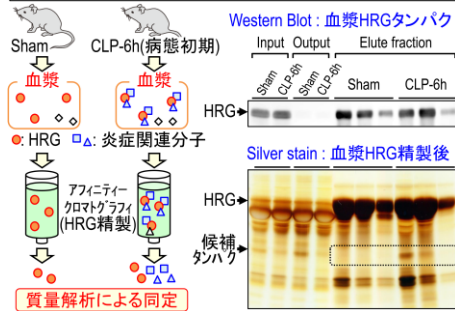
※ 複数の実験モデル群でHRG遺伝子と同様に変動する遺伝子を候補因子として絞り込む。
 ※ 転写調節因子・核タンパクに着目する。 **変動遺伝子(転写調節因子)**

- (a) 健常 WKY ラット ((b) (c) の対照群)
- (b) 高血圧発症 SHRSP ラット (慢性炎症モデル)
- (c) 盲腸結紮穿孔 (CLP) 敗血症処置 SHRSP ラット (急性炎症モデル)
- (d) 健常 Wister ラット ((e) の対照群)
- (e) ストレプトゾトシン投与高血糖ラット (慢性炎症モデル)

(2) 炎症病態に関与する血漿 HRG 結合タンパクの探索。(図 3)

CLP 敗血症ラットを作製し、血漿 HRG が減少する前の初期病態で血液を採取し、Ni-NTA アフィニティク ロマトグラフィーによって血漿 HRG タンパクを精製した。精製過程 (カラムの洗浄、溶出) において HRG タンパクと共に回収される夾雑タンパクの中で、CLP 敗血症群に特異的に検出されるタンパクは、血漿 HRG と結合親和性をもつ炎症関連分子である可能性が高い。このタンパクを質量解析によって同定することで、新規 DAMPs 候補の探索をおこなう。CLP 敗血症モデルには、HRG タンパクの回収効率を上げるために、血漿 HRG を高産生している SHRSP ラットを用いる。(図 2)

図3:CLP敗血症ラットにおける血漿HRG結合タンパクの探索



4. 研究成果

脳卒中易発性高血圧自然発症ラット (SHRSP ラット) は、高血圧を自然発症する慢性炎症モデルである。WKY 対照ラットと SHRSP 高血圧ラットの HRG 産生量を比べると、おそらくは高血圧病態に起因して、血漿 HRG タンパク量・肝 HRG 遺伝子発現量の双方が強く増加していた。また、他の慢性炎症モデルとして、ストレプトゾトシン誘導性高血糖ラット (STZ ラット) を作製した。STZ ラットにおいても、肝 HRG 産生量は増加していた。次に、SHRSP 高血圧ラットに CLP 敗血症処置をすると、重篤な急性炎症によって肝 HRG 産生量は減少した。

これらの実験モデルから肝を採取し、DNA マイクロアレイ解析をおこなった。CLP-SHRSP 実験モデルにおいて、WKY ラットに対して SHRSP 高血圧ラットで発現量が増加し、かつ、SHRSP 高血圧ラットに対して CLP 敗血症-SHRSP ラットで発現量が減少した遺伝子は、469 個存在した。その内、核タンパクは 69 個含まれていた。一方、STZ 実験モデルにおいて、健常ラットに対して STZ 高血糖ラットで発現量が増加する遺伝子は、9512 個存在した。その内、核タンパクは 2280 個含まれていた。さらに、2 つの実験モデルを同時に満たす遺伝子 (HRG 遺伝子と発現変動が相関する遺伝子) を検索すると、144 個に絞込むことができた。この中に核タンパクは 30 個存在し、機能的アノテーションによって転写調節因子として働く遺伝子を 10 個同定した。同様の検索手法で、HRG 遺伝子の発現変動と逆相関する転写調節因子を 4 個同定した。(図 4)

これらの 14 個の遺伝子は、どれも生活習慣病やガンなど少なからず炎症病態に関連した因子だった。今後、これら転写調節因子の中から、HRG 遺伝子発現に関与する因子をさらに探索する予定である。また、本実験において、肝 HRG 産生量は、高血圧や高血糖などの慢性炎症病態で増加していた。本来、血漿 HRG タンパクは、生理的に制御可能な穏やかな炎症症状において、抗炎症作用の役割を担うために産生量を増加させている可能性が示唆された。敗血症のような重篤な急性炎症病態では、肝実質細胞そのものが致死的状态になることで HRG 産生量が低下し、さらに病状が悪化している可能性が考えられた。(図 5)

図4: HRG遺伝子発現を制御する転写調節因子の探索

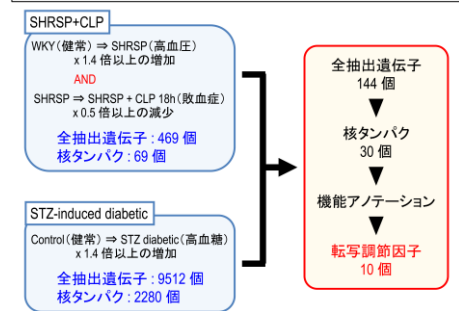
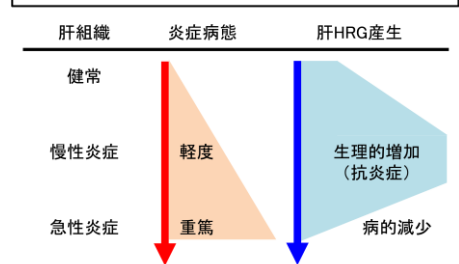


図5: 炎症病態における肝HRG産生



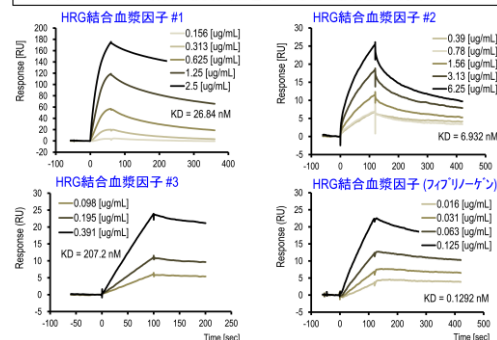
次に、CLP 敗血症-SHRSP ラットと対照 SHRSP 高血圧ラットの血漿から HRG タンパクの精製をおこない、精製過程で回収される夾雑タンパクを SDS-PAGE によって単離した。敗血症の有無によって回収タンパク量が増減する 7 種の血漿因子を、質量解析を用いて同定した。次いで、これらのタンパクと HRG の結合親和性を分子間相互作用解析装置 Biacore システム (GE ヘルスケア) を用いて解析することで、敗血症 (急性炎症) によって HRG タンパクとの結合が増加する血漿因子を 3 個、減少する血漿因子を 1 個同定した (図 6)。これらの血漿因子の 1 つは、既に HRG との結合が報告されているフィブリノーゲンであった。新たに同定した 3 種の HRG 結合血漿因子 (#1~#3) は、どれも炎症病態によって血中量が増加する既知の炎症関連血漿因子であった。今後、同定した血漿因子の機能が、HRG 結合によってどのような影響をうけるか解析していく予定である。

HRG 結合血漿因子#1 は、病態因子 X のクリアランスを亢進させることで、特定の炎症病態に対して保護的に作用することが知られている。HRG は、血漿因子#1 だけでなく、病態因子 X とも結合親和性を示した。この三者間結合の様相が、健常・慢性炎症・急性炎症の条件下においてどのように変化しているか解析することで、血漿因子#1 の機能に対する HRG の役割が明らかになる可能性がある。

HRG 結合血漿因子#2 は、凝血系の活性化に伴って血中量が増加するセリンプロテアーゼである。血漿因子#2 の HRG 結合親和性は、対照 SHRSP 高血圧 (慢性炎症) で強く、CLP 敗血症-SHRSP (急性炎症) で減弱していた。今後、HRG と血漿因子#2 の結合性が炎症病態の重篤度によって変化する機序、HRG と血漿因子#2 の結合による両者の生物活性の変化について解析する。

HRG 結合血漿因子#3 は、HDL の構成成分であり、アテローム性動脈硬化などの血管病態に対して保護的に作用することが知られている。

図6: HRGと結合親和性をもつ炎症関連血漿因子



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

- ① Okuma Y, [Wake H](#), [Teshigawara K](#), Takahashi Y, Hishikawa T, Yasuhara T, Mori S, [Takahashi HK](#), Date I, [Nishibori M](#). Anti-High Mobility Group Box 1 Antibody Therapy May Prevent Cognitive Dysfunction After Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg.* 122:e864-e871 (2019). 査読有.
- ② Watanabe M, Toyomura T, [Wake H](#), [Liu K](#), [Teshigawara K](#), [Takahashi HK](#), [Nishibori M](#), Mori S. The C-terminal region of tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis is required for interaction with advanced glycation end products. *Biotechnol Appl Biochem.* 66(2):254-260(2019). 査読有.
- ③ Terao K, [Wake H](#), Adachi N, [Liu K](#), [Teshigawara K](#), [Takahashi HK](#), Mori S, [Nishibori M](#). Histidine-Rich Glycoprotein Suppresses Hyperinflammatory Responses of Lung in a Severe Acute Pancreatitis Mouse Model. *Pancreas.* 47(9):1156-1164(2018). 査読有.
- ④ Htwe SS, [Wake H](#), [Liu K](#), [Teshigawara K](#), Stonestreet BS, Lim YP, [Nishibori M](#). Inter- α inhibitor proteins maintain neutrophils in a resting state by regulating shape and reducing ROS production. *Blood Adv.* 2(15):1923-1934(2018). 査読有.
- ⑤ 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.* 136(3):97-106(2018). 査読有.
- ⑥ Gao Y, [Wake H](#), Morioka Y, [Liu K](#), [Teshigawara K](#), Shibuya M, Zhou J, Mori S, [Takahashi HK](#), [Nishibori M](#). Phagocytosis of Advanced Glycation End Products (AGEs) in Macrophages Induces Cell Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2017:8419035(2017). 査読有.
- ⑦ Morioka Y, [Teshigawara K](#), Tomono Y, Wang D, Izushi Y, [Wake H](#), [Liu K](#), [Takahashi HK](#), Mori S, [Nishibori M](#). The specific localization of advanced glycation end-products (AGEs) in rat pancreatic islets. *J Pharmacol Sci.* 134:218-224(2017). 査読有.
- ⑧ Watanabe M, Toyomura T, [Wake H](#), [Liu K](#), [Teshigawara K](#), [Takahashi HK](#), [Nishibori M](#), Mori S. Advanced glycation end products attenuate the function of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis to regulate the inflammatory response. *Mol Cell Biochem.* 434(1-2):153-162(2017). 査読有.
- ⑨ Fu Li, [Liu K](#), [Wake H](#), [Teshigawara K](#), Yoshino T, [Takahashi HK](#), Mori S, [Nishibori M](#). Therapeutic effects of anti-HMGB1 monoclonal antibody on pilocarpine-induced status epilepticus in mice. *Sci Rep.* 7(1):1179(2017). 査読有.
- ⑩ Wang D, [Liu K](#), [Wake H](#), [Teshigawara K](#), Mori S, [Nishibori M](#). Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody inhibits hemorrhage-induced brain injury and improved neurological deficits in rats. *Sci Rep.* 10(7):46243(2017). 査読有.
- ⑪ Haruma J, [Teshigawara K](#), Hishikawa T, Wang D, [Liu K](#), [Wake H](#), Mori S, [Takahashi HK](#), Sugiu K, Date I, [Nishibori M](#). Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody attenuates delayed cerebral vasospasm and brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Sci Rep.* 24(6):37755(2016). 査読有.
- ⑫ [Wake H](#), Mori S, [Liu K](#), Morioka Y, [Teshigawara K](#), Sakaguchi M, Kuroda K, Gao Y, [Takahashi HK](#), Ohtsuka A, Yoshino T, Morimatsu H, [Nishibori M](#). Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic Lethality through Regulation of Immunothrombosis and Inflammation. *EBio Medicine.* 9:180-94(2016). 査読有.
- ⑬ Izushi Y, [Teshigawara K](#), [Liu K](#), Wang D, [Wake H](#), Takata K, Yoshino T, [Takahashi HK](#), Mori S, [Nishibori M](#). Soluble form of the receptor for advanced glycation end-products attenuates inflammatory pathogenesis in a rat model of lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Pharmacol Sci.* 130(4):226-34(2016). 査読有.

〔学会発表〕（計 37 件）

- ① 勅使川原匡 他、高ヒスチジン糖タンパク遺伝子欠損マウスにおける妊娠高血圧の病態解析、日本薬理学会（2019年）
- ② 勅使川原匡 他、高ヒスチジン糖タンパク遺伝子欠損マウスにおける妊娠高血圧症候群様表現型の解析、日本薬理学会近畿部会（2018年）
- ③ 兼森玄、勅使川原匡 他、ダメージ関連分子 HMGB1 の糖代謝制御への関与の検討、西日本医学生学術フォーラム 2018（2018年）
- ④ 兼森玄、勅使川原匡 他、炎症惹起因子 HMGB1 の糖代謝制御に対する生理的役割の検討、日本薬理学会近畿部会（2018年）
- ⑤ 勅使川原匡 他、高ヒスチジン糖タンパク（histidine-rich glycoprotein, HRG）と結合親和性をもつ炎症関連血漿タンパクの探索解析、日本生化学会（2018年）
- ⑥ 和氣秀徳 他、新規敗血症治療薬及び診断マーカーHistidine-rich glycoprotein の開発、日本生化学会（2018年）
- ⑦ Kiyoshi Teshigawara et.al., Characterization of histidine-rich glycoprotein (HRG) production under the experimental pathological conditions. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018). (2018)
- ⑧ Masahiro Nishibori et.al., Therapeutic effects of anti-HMGB1 monoclonal antibody on pilocarpine-induced status epilepticus in mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018). (2018)
- ⑨ Hidenori Wake et.al., The role of histidine-rich glycoprotein on immunothrombosis in septic organ failure. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018). (2018)
- ⑩ 勅使川原匡 他、高ヒスチジン糖タンパク（histidine-rich glycoprotein）遺伝子欠損マウスの妊娠期表現型の解析、日本薬理学会近畿部会（2018年）
- ⑪ 和氣秀徳 他、敗血症病態における NETs と免疫血栓形成に対する高ヒスチジン糖タンパク質の役割、日本薬理学会（2017年）
- ⑫ 勅使川原匡 他、Anti-HMGB1 mAb attenuates cerebral vasospasm and brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. 日本薬理学会近畿部会（2016年）
- ⑬ 和氣秀徳 他、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、日本生化学会 2016年）

〔その他〕

研究室 HP : <http://www.okayama-u.ac.jp/user/pharmaco/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：西堀 正洋

ローマ字氏名：Nishibori Masahiro

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：50135943

研究分担者氏名：高橋 英夫

ローマ字氏名：Takahashi Hideo

所属研究機関名：近畿大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60335627

研究分担者氏名：丹羽 淳子

ローマ字氏名：Niwa Atuko

所属研究機関名：近畿大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：60122082

研究分担者氏名：劉 克約

ローマ字氏名：Liu Keyue

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：非常勤研究員

研究者番号（8桁）：40432637

研究分担者氏名：和氣 秀徳

ローマ字氏名：Wake Hidenori

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：60570520

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。