

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02904

研究課題名(和文) HMGB1致死性画分を標的とした新規敗血症治療戦略の構築

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy targeting HMGB1 isoforms in sepsis

研究代表者

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：20381171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外に放出された核内タンパク質HMGB1には構造と機能の多様性があり、遠隔臓器障害を引き起こす「致死性因子」としての顔と、組織修復を促す「生体防御因子」としての顔を有する。本研究の目的は、HMGB1サブタイプ特異的抗体を選別することで、新規検査法、新規治療戦略の構築につなげることである。1000を超える抗HMGB1抗体候補の中から特定のHMGB1サブタイプを選択的に認識する抗体をスクリーニングし、従来の抗HMGB1抗体よりも救命効果に優れた新規モノクローナル抗体を同定することができた。また、不活性型のHMGB1と活性型のHMGB1を測り分けられるモノクローナル抗体も同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では敗血症によって年間およそ10万人が命を落としていると推定されている。早期診断と集中治療によって生存率の改善が期待できるが、敗血症に対する特異的な治療法は確立されていない。細胞外に放出された核内タンパク質HMGB1は、有望な治療標的と考えられていたが、良い働きと悪い働きを併せ持ったタンパク質であるが故に、これまで十分な有用性が発揮されずにいた。本研究において、良い働きをするHMGB1と悪い働きをするHMGB1を区別しうるモノクローナル抗体を獲得できたことにより、敗血症の病態把握と新規治療戦略構築が進み、敗血症の生存率改善に寄与できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：During sepsis, high mobility group box 1 protein (HMGB1) can be released from the cellular nucleus to the extracellular space. Extracellular HMGB1 acts as a signal of tissue damage and promotes not only inflammatory responses but also tissue regeneration. Recent studies have suggested that disulfide HMGB1 promotes inflammation whereas all-thiol HMGB1 promotes tissue regeneration. However, to date, there is no reliable way to differentially target these HMGB1 subtypes. In this research project, we have identified monoclonal antibodies that can discriminate between inactive HMGB1 and active HMGB1. We have also obtained a neutralizing antibody against HMGB1 that shows a significant survival benefit over the control antibody in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. These antibodies may be useful for the in-depth analysis of HMGB1-induced pathogenicity as well as HMGB1-targeting therapy.

研究分野：救急・集中治療医学

キーワード：敗血症 核内タンパク質 DAMPs アイソフォーム 抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 損傷を受けた細胞から放出される分子の一部は、周囲の細胞に危機的状況を伝える生理活性物質として作用する。このような分子は傷害関連分子パターン (DAMPs) と総称される。本研究の標的分子である HMGB1 (high mobility group box 1 protein) は DAMPs の代表的分子として知られていて、免疫反応や組織修復反応に深く関わっている。その一方で、HMGB1 は敗血症の際の致死性因子として同定された経緯もあり、“生体防御因子”としての顔と、“致死性因子”としての顔を有すると考えられている。

(2) HMGB1 はアセチル化、リン酸化、ジスルフィド化などの分子修飾を受けることが知られている。構造と機能の連関についても解析が進んでいて、チオール型の HMGB1 は組織修復を促す働きがあり、ジスルフィド型のは炎症を惹起する働きがある。このように、サブタイプによって、HMGB1 は“生体防御因子”としての顔と“致死性因子”としての顔を使い分けている可能性が示唆されるなか、検査対象としても治療標的としてもこれらのサブタイプを区別して狙い撃ちすることが求められる。

2. 研究の目的

特定の HMGB1 サブタイプのみを認識する抗体をスクリーニングし、このような特異抗体を用いることで、HMGB1 サブタイプ特異的検査法の開発、ならびに HMGB1 サブタイプ特異的治療法の開発に繋げることを目的とする。これによって、敗血症の病態把握と新規治療戦略構築への糸口を掴むことが期待される。

3. 研究の方法

(a) チオール型 HMGB1、ジスルフィド型 HMGB1、スルホン型 HMGB1 をプレートに固相化し、1000 を超える抗 HMGB1 抗体レパートリーの中から、ジスルフィド型 HMGB1 には反応するけれどもチオール型 HMGB1 には反応しない抗体をスクリーニングする。

(b) 抗 HMGB1 抗体レパートリーの中から、HMGB1 が標的受容体に結合するのを阻害する活性が高いと考えられる抗体を選別する。

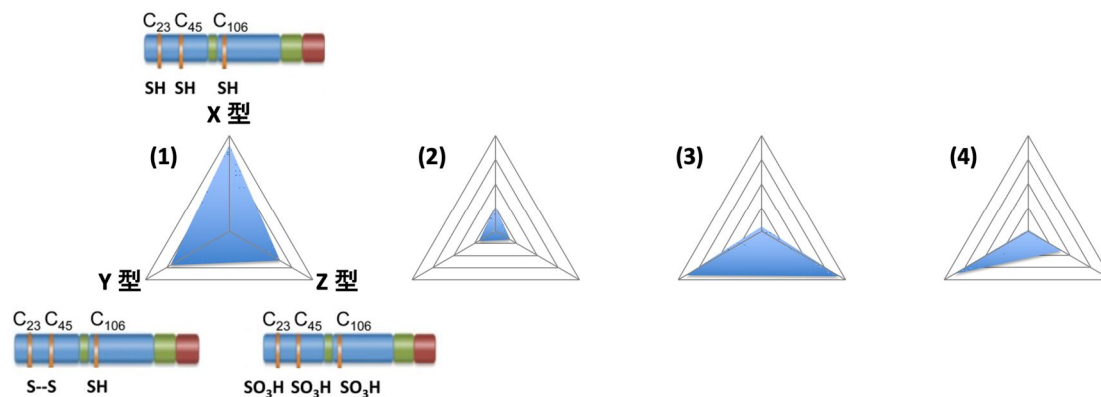
(c) 抗 HMGB1 抗体レパートリーの中から、炎症惹起活性を失っている HMGB1 と保持している HMGB1 とを区別できる抗体を選別する。

(d) 上記過程を経て選別した抗体を用いて、敗血症動物モデルにおける救命効果を検証し、従来の抗 HMGB1 抗体の効果と比較する。

(e) 上記過程を経て選別した抗体を用いて新しい HMGB1 測定法を構築し、目的とした HMGB1 サブタイプのみを特異的に検出できる検査方法であるかどうかを検証する。

4. 研究成果

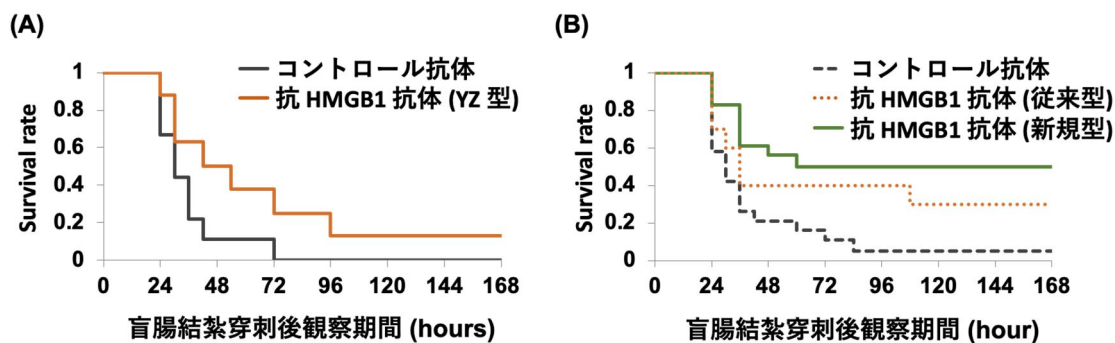
(a) 抗 HMGB1 抗体のレパートリーの中には、下図に示すように、X 型、Y 型、Z 型のいずれにも強く反応する抗体、X 型には反応することなく、Y 型、Z 型のサブタイプ特異的に反応する抗体、Y 型に強く反応するものの、Z 型への反応は弱く、X 型には反応しない抗体などが含まれていることが判明した。このうち、X 型に反応しない抗体を選別し、その抗体可変領域の配列を解析した。その配列情報をもとに、ヒト抗体定常領域と組み合わせたキメラ抗体をデザインし、CHO 細胞での一過性発現により、mg 単位での抗体を確保し、次のステップに進んだ。



(b) 抗 HMGB1 抗体レパートリーの中から、HMGB1 が標的受容体に結合するのを阻害する活性が高い抗体を選別できたので、次のステップに進んだ。

(c) 抗 HMGB1 抗体レパートリーの中から、炎症惹起活性を失っている HMGB1 抗体を特異的に認識する抗体を選別できたので、次のステップに進んだ。

(d) 上記 (a)–(c) の過程を経て選別した抗体の救命効果について、盲腸結紮穿孔による腹膜炎性敗血症モデルマウスで検討した。このモデルでは、盲腸結紮穿孔後およそ 1-4 日ではほぼすべての個体が瀕死状態になってしまうが、抗 HMGB1 抗体を投与して HMGB1 を中和することで、生存率を改善することができる。まず、(a) の過程で得られた Y ならびに Z 型の HMGB1 サブタイプ特異的に反応する抗体は、コントロール抗体に比べてわずかに生存期間を延長したものの、従来型の抗 HMGB1 抗体に対して優位性を示すものではなかった(下図 A)。次に、(b) の過程で選別した抗体の効果を確認したところ、コントロール抗体と比べて有意に生存率を改善し、従来型の抗 HMGB1 抗体よりも効果の上積みが見込めるものであった(下図 B)。 (c) の過程で得られた抗体については、炎症惹起活性を持たない HMGB1 を認識する抗体であり、救命効果は期待できないため、次の項の特異的検査法の開発に使用した。



(e) 上記 (a)–(c) の過程を経て選別した抗体を用い、HMGB1 サブタイプを特異的に検出する新規検査法の開発を試みた。まず、(a) の過程で得られた Y ならびに Z 型の HMGB1 サブタイプ特異的に反応する抗体は、スクリーニング段階では良好な反応性と特異性を示していたが、配列を読み取って遺伝子組換え技術を用いて作製した抗体は、Y ならびに Z 型の HMGB1 サブタイプに対して十分な反応性と特異性を示さず、新規検査法に応用できるものではなかった。次に、(c) の過程で得られた抗体の反応性と特異性を検討したところ、炎症惹起活性を失っている HMGB1 に対する十分な反応性と特異性を示すことが明らかになり、この抗体を用いることで、炎症惹起活性を失っている HMGB1 と保持している HMGB1 とを測り分けることが可能となった。現在、当該抗体を用いて、HMGB1 サブタイプ特異的検査法の構築を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ito T, Totoki T, Yokoyama Y, Yasuda T, Furubeppu H, Yamada S, Maruyama I, Kakihana Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Serum histone H3 levels and platelet counts are potential markers for coagulopathy with high risk of death in septic patients: a single-center observational study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Intensive Care.	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40560-019-0420-2.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ito T, Thachil J, Asakura H, Levy JH, Iba T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Thrombomodulin in disseminated intravascular coagulation and other critical conditions-a multi-faceted anticoagulant protein with therapeutic potential.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Crit Care.	6. 最初と最後の頁 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13054-019-2552-0.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Shrestha B, Ito T, Kakuuchi M, Totoki T, Nagasato T, Yamamoto M, Maruyama I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Recombinant Thrombomodulin Suppresses Histone-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 2535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02535.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Ito T, Nakahara M, Masuda Y, Ono S, Yamada S, Ishikura H, Imaizumi H, Kamikokuryo C, Kakihana Y, Maruyama I	4. 巻 6
2. 論文標題 Circulating histone H3 levels are increased in septic mice in a neutrophil-dependent manner: preclinical evaluation of a novel sandwich ELISA for histone H3	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Intensive Care	6. 最初と最後の頁 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40560-018-0348-y	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Sato Michio, Miyata Keishi, Tian Zhe, Kadomatsu Tsuyoshi, Ujihara Yoshihiro, Morinaga Jun, Horiguchi Haruki, Endo Motoyoshi, Zhao Jiabin, Zhu Shunshun, Sugizaki Taichi, Igata Kimihiro, Muramatsu Masashi, Minami Takashi, Ito Takashi, Bianchi Marco E, Mohri Satoshi, Araki Kimi, Node Koichi, Oike Yuichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Loss of Endogenous HMGB2 Promotes Cardiac Dysfunction and Pressure Overload-Induced Heart Failure in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 368 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-0925	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ito Takashi, Kakuuchi Midori, Maruyama Ikuro	4. 巻 25
2. 論文標題 Endotheliopathy in septic conditions: mechanistic insight into intravascular coagulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Critical Care	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13054-021-03524-6	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takashi Ito
2. 発表標題 Circulating histone H3 as an indicator/inducer of DIC and organ failure
3. 学会等名 9th International DAMPs and Alarmins Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Ito
2. 発表標題 Plasma activated protein C activity in the presence of recombinant thrombomodulin in vivo and in vitro
3. 学会等名 ISTH 2019: The XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤隆史
2. 発表標題 図解 敗血症学
3. 学会等名 第120回 近畿救急医学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤隆史
2. 発表標題 目で見て考える侵襲に対する宿主応答と臓器障害
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤隆史
2. 発表標題 Mechanism-based anticoagulant strategy in sepsis-associated DIC
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤隆史
2. 発表標題 敗血症病態における血栓形成の光と影
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤隆史
2. 発表標題 凝固/抗凝固反応はどこで起きているのか cell-based model の紹介
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Ito
2. 発表標題 Leukocyte-derived extracellular DNA as an underlying cause of extracorporeal circuit obstruction
3. 学会等名 International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤隆史
2. 発表標題 救急疾患に伴う凝固線溶異常のオーバービュー
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Ito
2. 発表標題 Endotheliopathy in septic conditions
3. 学会等名 International Society on Thrombosis and Haemostasis 2020 Virtual Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤隆史
2. 発表標題 好中球の生理と病理と臓器障害
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤隆史
2. 発表標題 ダメージ関連分子パターン（DAMPs）の解析と応用展開
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 伊藤隆史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 435
3. 書名 ファーマナビゲーター DIC編 改訂版	

1. 著者名 伊藤隆史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 268
3. 書名 New Strategy! 超微形態生理学 ICU輸液がみえるグリコカリックス×アトラス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丸山 征郎 (MARUYAMA Ikuro) (20082282)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授 (17701)	
研究分担者	垣花 泰之 (KAKIHANA Yasuyuki) (20264426)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関