

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 敗血症治療のための HRG 血液製剤の創出
(英語) A drug development using purified HRG from human blood for the treatment of sepsis

研究開発実施期間: 2017 年 10 月 1 日～2020 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 西堀 正洋
(英語) Nishibori Masahiro

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
(英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry & Pharmaceutical Sciences・Professor

II 研究開発の概要

敗血症の制圧は、世界的に喫緊の課題である。過去 4 半世紀にわたって種々の観点から創薬が試みられてきたが、それらはすべて失敗に終わっている。その原因として、敗血症病態が依然として十分に理解されていないことと、敗血症の重症度を的確に判断し、早期治療を開始するための鋭敏なバイオマーカーが欠如していることを挙げることができる。このような状況下、研究開発代表者の西堀正洋は、マウスの敗血症モデルの解析から、血漿タンパク Histidine-rich glycoprotein (HRG) の急激な低下が呼吸器系、循環系、免疫系、血液凝固系の相互依存的異常をもたらすことを明らかにし、それらの症状が HRG の補充療法によって改善され、死亡率を低下させることを見出した。このような背景に立ち、本研究の目的は敗血症の治療薬としてヒト血漿由来の HRG 製剤を開発することであり、そのために 一般社団法人 日本血液製剤機構 (JB) と産学連携の下に、以下の 3 点について焦点を当て研究を実施した。その結果、概ね当初の計画通りの成果をあげることができた。

1. 岡山大学から JB へのヒト血漿 HRG の精製法に関する技術移転と、JB で精製される HRG の規格選定法の確立
2. HRG の抗敗血症作用の基盤となる細胞機序解明と HRG 薬理活性のプロファイリングならびに HRG 新規受容体同定
3. ICU 内敗血症患者の血漿中 HRG の測定による、重症度と予後予測マーカーとしての意義解析

以下にそれぞれの項目について概要を記す。

1. 岡山大学から JB へのヒト血漿 HRG の精製法に関する技術移転と、JB で精製される HRG の規格選定法の確立

岡山大学で確立された、固定化金属アフィニティクロマトグラフィー (IMAC) と陰イオン交換クロマトグラフィー (AEXC) を組み合わせたヒト血漿 HRG のスモールスケールでの精製法の情報を JB と共有し、岡山大学から技術指導ならびに技術移転を行った。JB 側でまずは、血漿分画工程における HRG の挙動を確認した。その結果、ある未利用画分に豊富に HRG が存在することを確認した。

次いで、岡山大学の精製法を基礎として、製造も見据えた精製法の確立に向けて検討を実施した。第一精製工程には IMAC 工程を採用し、樹脂および金属イオンのスクリーニングを実施し最適化を図った。微量の漏出金属イオン対策については、金属キレート試薬である EDTA を使用することで、最終精製品に含まれる残留金属イオン含量を ICH ガイドライン基準値内に低減できることを確認した。第二精製工程では AEXC 工程を選択し、HRG 分解の主要因であるプロテアーゼを効率的に除去する条件を見出し、プロテアーゼ阻害剤を一切使用することなく HRG 分解を抑制することが可能となった。さらにゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) 工程を追加することで、HRG 凝集体や EDTA 試薬を除去し、医薬品として十分な純度の HRG を取得可能な暫定精製法の確立を達成した。

精製 HRG の特性解析ならびに品質の規格を設定する目的で、物理化学的性状、純度・不純物、生物活性の観点から分析法を構築した。物理化学的性状に関しては、アミノ酸配列、分子量、等電点、粒子径、熱変性温度、N 型糖鎖プロファイルの分析法を構築し、純度・不純物に関しては、凝集体含量、分解物含量、アイソフォーム比率、残留金属イオン含量、エンドトキシン含量の分析法をそれぞれ構築した。生物活性に関しては、好中球正球化活性と好中球 ROS 産生抑制作用に加え、表面プラズモン共鳴法を用いた生体分子との結合解析や、血液凝固因子に対する作用を用いた評価法を新たに構築した。

2. HRG の抗敗血症作用の基盤となる細胞機序解明と HRG 薬理活性のプロファイリングならびに HRG 新規受容体同定

(1) 血管内皮細胞に対する HRG の作用解析

HRG の血管内皮細胞に対する作用を、ヒト培養血管内皮細胞 EA.hy926 を用いて、詳細に検討した。HRG は、LPS や TNF- α による細胞内ストレスファイバーの形成と細胞形態の球形変化を強く抑制した。HRG はまた、細胞間接着に関与する VE-カドヘリンや β -カテニンの LPS や TNF- α 刺激による発現量低下を抑制した。LPS や TNF- α 刺激により、NF- κ B の核内移行と IL-6、IL-8、IL-1 α 、IFN- γ の分泌、さらに炎症関連分子の mRNA 発現誘導が観察されたが、いずれも HRG の添加によって有意に抑制された。細胞内シグナルの解析で、LPS 刺激は p-38、Erk1/2、Rho-GTP の活性化を生じたが、HRG はそれらの反応を抑制した。ボーデンチェンバーを用いた *in vitro* の血管透過性アッセイにおいて、HRG は種々の分子サイズのデキストランの透過性亢進を抑制した。これらの EA.hy926 細胞を用いて得られた結果は、ヒト肺由来の血管内皮細胞培養においても再現された。以上の結果から、HRG は LPS や TNF- α 刺激による血管内皮細胞の収縮性形態変化、サイトカイン類の分泌、炎症性反応の何れも強く抑制し、血管の透過性亢進を抑制するよう機能することが明らかとなった。さらに、LPS や TNF- α 刺激は、細胞核に局在する High mobility group box-1 (HMGB1) を細胞質経路で細胞外に放出することを突きとめた。HRG の添加は、この HMGB1 のトランスロケーションの全体を強く抑制するとともに、ヒト組換え HMGB1 によるサイトカインの産生も同様に抑制した。以上の血管内皮細胞を用いた実験結果は、HRG が血管内皮細胞の過剰な活性化を抑制し、敗血症時には血管内皮細胞の保護因子として働くことを強く示唆している。

(2) 赤血球に対する HRG の作用解析

赤血球は、循環血中で圧倒的多数を占める細胞であるが、血流中の動態は血流に対し受動的であるとの考えから、注目度は低かった。本研究内では、ヒト赤血球が低濃度亜鉛イオンの存在下に凝集反応を起こすことを見出した。この凝集反応は、赤血球細胞表面へのフォスファチジルセリンの発現を伴っており、Annexin V の添加によって抑制されたが、HRG の添加はフォスファチジルセリンの発現と赤血球の凝集反応とともに濃度依存的に抑制することができた。また、HRG で処理された赤血球は培養血管内皮細胞に殆ど結合性を示さなかったが、HRG 非存在下に亜鉛イオンで刺激された赤血球は、凝集塊を形成しながら、血管内皮細胞に強い結合性を示した。後者の赤血球では、細胞内カルシウムイオンレベルの上昇がみられたが、HRG 存在下ではカルシウムイオンレベルの上昇は認められなかった。赤血球凝集塊からは、溶血による遊離ヘモグロビンの放出が考えられる。さらに、遊離ヘモグロビンからはヘムの放出が考えられる。ヘムはそれ自身で細胞膜内に侵入し、細胞毒性を発揮すると想像されている。20mM 濃度のヘムで誘発された赤血球溶血を、1 μ M までの濃度の HRG が濃度依存的に抑制した。1 μ M の HRG で溶血は、ほぼ完全に抑制された。以上の結果から、HRG はある種の条件下に生じる赤血球の凝集反応と赤血球溶血を抑制し、血管内免疫血栓形成の抑制とヘモグロビン毒性の軽減に寄与する可能性が示唆された。

(3) NK 細胞に対する HRG の作用解析

ヒト末梢血から調製した単核球あるいは Natural Killer (NK) 細胞を用いて、NK 細胞の K562 細胞に対する殺細胞効果に及ぼす HRG の作用を解析した。その結果、HRG は濃度依存的に NK 細胞 K562 に対する殺細胞効果を上昇させることが明らかとなり、抗腫瘍効果の作用機序に HRG による NK 細胞上の PD-1 発現の抑制が関与し、NK 細胞から放出されるグランザイム B、IFN- γ 、RANTES の放出増加が関与すると推定された。

(4) HRG の受容体探索と同定

HEK293 細胞に、受容体候補の 1 回膜貫通型受容体あるいは内因性リガンド未知の GPCR 遺伝子を Flag タグ付きで遺伝子導入した。同時に膜貫通配列と HA タグ付き細胞内配列を導入した HRG 遺伝子を細胞内導入し、発現タンパクを可溶化後、抗 HA 抗体で tethered リガンドとなっている HRG を免疫沈降させ、共沈澱する受容体候補を抗 Flag 抗体で検出した。その結果、C-type lectin superfamily に属している細胞膜 1 回貫通型の Clec1A が同定された。HRG と Clec1A との結合性を確認するため、表面プラズモン共鳴法で、HRG と Clec1A の細胞外ドメインならびに Clec1A の細胞外ドメイン-Fc 融合タンパクとの結合を測定・評価し、血中 HRG 濃度に見合う平衡解離定数を得た。さらに、Clec1A と細胞内ドメインを欠失したドミナントネガティブ安定発現 HEK293T 細胞を樹立し、HRG 刺激による特異的な細胞内リン酸化タンパクシグナルを検出した。以上の結果から、Clec1A が HRG 受容体の一つであると結論された。

3. ICU 内敗血症患者の血漿中 HRG の測定による、重症度と予後予測マーカーとしての意義解析

大学病院内の IRB で承認された、敗血症患者 99 例を対象とした多施設（11 施設）臨床研究（第 2 回臨床研究）を実施した。本臨床研究では、敗血症患者の ICU 入室日での血漿中 HRG レベルの測定を行い、28 日死亡、90 日死亡との相関性ならびに他の臨床パラメータとの比較解析を実施した。その結果、ICU 入室日の血漿 HRG 値は、患者の重症度と予後予測の極めて優れたバイオマーカーとなることが明らかとなった。この臨床研究に引き続き、Sepsis-3 の定義による敗血症患者を対象とした第 3 回臨床研究を開始した。目標の 200 症例の登録を完了した。中間データおよび臨床データについて予備的統計解析を実施し、本開発を支持する良好な中間成績が得られた。

【英文研究概要】

Sepsis has been one of the major health problems worldwide. Although there have been many clinical trials for the treatment of sepsis using candidate drugs, all have failed so far. We may be able to raise the possible reasons for the failures; the inappropriate understanding of septic pathophysiology and pathogenesis and lack of an excellent biomarker to evaluate the severity of patients and to start the earlier treatment. Under such background, a principal investigator, Dr. Masahiro Nishibori, found that the rapid decrease in plasma histidine-rich glycoprotein (HRG) triggered the cascade of events in septic mice including respiratory failure, circulatory shock, immune paralysis and DIC and that supplementary treatment with HRG improved the survival rate of septic mice. Based on these findings, we proposed the development of a biomaterial, purified HRG derived from pooled human plasma, for the treatment of sepsis in collaboration with Japan Blood Products Organization (JB). We performed the study focused on three points listed below. We obtained considerable results and achieved the initial purpose of the present study.

1. Technology transfer of the method on HRG purification from Okayama University to JB and establishment of assay methods for regulation of biomaterial.

The information on the metal affinity chromatography and HPLC-anion exchange chromatography for the purification of human plasma HRG in small scale was shared by JB and the method was modified in JB for the larger scale of purification. JB identified the presence of HRG in the fractions in the industrial process of plasma protein purification. JB determined the analytical methods for purified HRG from human plasma.

2. The profiling of biological activities of HRG and the identification of HRG receptor.

The effects of HRG on red blood cell aggregation, activated vascular endothelial cells and NK cells were examined and the functional roles of HRG on these cells were established in addition to the strong regulation of neutrophils. CleclA was identified as a HRG receptor using HEK293 expression system.

3. Clinical studies on septic patients in ICU.

The second clinical study based on Sepsis-2 recruiting 99 patients from 11 hospitals was performed. It was concluded that the determination of plasma HRG levels in patients on admission day in ICU could provide the information on the severity and prognosis of patients. The third clinical study based on Sepsis-3 started and the registration of 200 patients have been completed.

III 事後評価総合所見

敗血症治療薬という開発が難しい創薬領域に挑戦し、アカデミアと参画企業とのしっかりした連携により研究が推進されました。HRGに関する基礎研究及び敗血症の標的分子としてのHRGの研究については課題リーダーらのオリジナルなものが多く、HRG受容体として2分子種が特定され、またHRGの多機能性を示すデータが集積され

たことにより、HRG のバイオロジーが大きく進展し、多くの項目で明確に目標が達成されました。今後の薬事申請に向けた非臨床試験や CMC 関連試験の工程が明確であり、治験原薬の大量調製にも見通しが立ち、臨床研究として敗血症患者の HRG と病態との関連性も研究されています。

今後、「企業負担による事業化の継続」を計画されており、企業による事業化を期待します。