

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：新規血漿因子 HRG による好中球制御を介した敗血症と多臓器不全の治療法開発
2. 研究開発代表者： 西堀 正洋（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）
3. 研究開発の成果

(1) ヒト組換え体 HRG タンパク質の作製と評価

HEK293 細胞を用いた一過性発現系を確立した。ついで、CHO-K1 あるいは CHO-S 細胞を用いて、一過性発現系から安定発現細胞株を樹立し、250 ml の培養スケールで 3 ~5 mg の精製 HRG を得ることに成功した。さらに収量を上げるために新規に構築された 10 種類の発現ベクターの発現効率を GFP 発現系でチェックし、最も高い発現を示したベクターを選択した。これを用いて CHO-S 細胞で組換えヒト HRG の大量発現を評価した。結果は、以前の CMV をプロモータとするベクターでの収量を上回ることができなかった。一方、精製したヒト組換え HRG は SDS-PAGE 上の移動度がヒト Native HRG と略同じで、ヒト好中球の球状化誘導活性と活性酸素産生抑制活性について、同等の効力を示した (EC₅₀ 値はともに約 0.1 μM)。さらに組換え HRG は、CLP 敗血症によるマウスの死亡率を有意に改善することを証明した。SDS-PAGE 上で Native HRG と組換え HRG は、同じ移動度を示し、糖鎖付加の不均一性も極めて低いと推定した。以上の結果から、現在の発現条件で得られている製剤は生物活性の上では原薬としてふさわしい特性であると考えている。

(2) ヒト好中球機能評価とマウス in vivo イメージング

単離したヒト好中球に対する HRG の作用解析で、HRG が Phox47 のリン酸化抑制により、好中球による NADPH Oxidase 依存性 ROS 産生の抑制作用を有することを、in vitro 実験で明らかにした。刺激依存性活性化 CD11b の発現量が、HRG の添加により抑制されることを明らかにした。In vivo イメージングによる敗血症マウスの循環血中好中球の画像化では、血漿 HRG の著明な低下により多型性に変形した好中球が出現し、血管内皮細胞に接着する像が多数観察された。さらに、変形・接着した好中球上には血小板の凝集像が認められ、immunothrombus の形成が強く示唆された。

(3) ヒト敗血症患者における血中 HRG の測定と重症度評価

岡山大学病院 ICU 内の全身性炎症症候群の患者でインフォームドコンセントの得られた総計 71 名の患者について血中 HRG の測定をラボ内で確立した Elisa で実施した。その結果、敗血症の患者 21 名の血中 HRG の低下の程度は、APACHE II と SOFA スコアと相関すること、総 SIRS 患者のサブ解析で、敗血症患者の血中 HRG の低下が、その他の患者群より著明であることを確認した。血漿 HRG 値は、プロカルシトニン値とプレセプシン値より優れた敗血症（感染症の有無）の診断マーカーとなることを明らかにし、さらに ICU 内患者の予後指標として、プレセプシン値と同等の臨床マーカーとなりうることを証明した。

岡山大学病院と市内の関連病院の多施設共同研究として開始した ICU 内の敗血症患者を対象とした血漿 HRG 測定とその臨床的意義の解析研究は、50 症例の中間解析段階で血漿 HRG 値が、患者の重症度を評価（死亡の転帰予測）する上で、APACHE II、SOFA、プレセプシン等を凌ぐ極めて優れた臨床マーカーであることを明らかにした。すでに開始した体外診断薬開発企業との共同研究で、本測定を簡便・迅速な検査法として完成させることで、ICU における早期重症度の判定が可能になり、より集学的な治療で患者を救う道が開けるようになると予想される。

(4) 敗血症病態における血中 HRG 低下の機序解析

マウスの敗血症モデルを用いて、敗血症病態における血中 HRG 低下の機序を、一つは肝実質細胞における HRG mRNA の発現抑制、二つ目は血管内凝固症の進行に伴うトロンビンの活性化による HRG の分解の亢進、三つ目は血管内血栓部位への HRG の沈着による消費であることを明らかにした。