

受賞対象論文

Takahashi Y, Wake H, Sakaguchi M, Yoshii Y, Teshigawara K, Wang D, Nishibori M: Histidine-Rich Glycoprotein Stimulates Human Neutrophil Phagocytosis and Prolongs Survival through CLEC1A. *J Immunol* (2021) 206, 737-750.

ハイライト

- ・精製ヒト HRG はヒト好中球に対し、球状化作用、細菌貪食促進作用、生存時間延長作用を示した。
- ・HRG による好中球への作用は、好中球上の CLEC1A 受容体を通じて発現していた。
- ・HRG/CLEC1A シグナリングが明らかにされたことにより、新たなアプローチの敗血症治療薬の開発が期待される。

高橋 陽平

Yohei Takahashi



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬理学

Department of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

<プロフィール>

平成17年3月 岡山理科大学理学部生物化学科卒業
 平成17年4月 岡山済生会総合病院 中央検査科
 平成25年4月 岡山療護センター
 平成28年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学
 令和2年4月 岡山済生会総合病院 中央検査科
 令和3年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了

研究の背景と経緯

敗血症は世界における患者数が年間約2,700万人といわれ、そのうち、約800万人が死亡していると報告されている。敗血症の制圧は世界的にも喫緊の課題である。過去に種々の観点から創薬が試みられてきたが、十分な効果を認める薬は開発されていない。その要因として、敗血症の病態が依然として十分に理解されていないことが考えられる。このような状況下、我々はマウスの敗血症モデルの解析から、血漿タンパクである 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な異常をもたらすことを明らかにし、またそれらの症状は 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¹⁾。また、ヒト好中球に対しても球状化作用、細胞外 reactive oxygen species (ROS) 産生抑制作用、微小血管様流路の通過性向上作用を見出している¹⁾。しかしながら、このような状態の好中球は一見して活性を失っている様にも見える。敗血症を含めた細菌感染症において、好中球活性の維持は重要であると考え、そこで今回我々は好中球機能解析を行いヒト精製 HRG (HRG) およびコン

ビナント体 HRG (rHRG) が好中球に対し、どのように作用しているかを解析した。また併せて HRG の作用に関して、受容体およびそのシグナリングに関しても検討を行った。

研究成果の内容

好中球機能解析として、好中球の主たる機能である貪食に関する解析（好中球貪食能解析）を実施した。方法は、ヒト好中球と各被験試薬（ヒトアルブミン (HSA)、HRG など）が含まれる溶液と、酸性環境下のみで蛍光発色する色素で標識した細菌の菌体 (*E. coli*, *S. aureus*) をプレート上で反応させ、ファゴソーム内に取り込まれた菌体を観察する方法で行った。貪食量の評価は1細胞当たりの平均取り込み面積で評価した (total area: $\mu\text{m}^2/\text{cell}$)。何も添加しなかった群 (HBSS 群)、HSA 添加群ではほとんど貪食を認めなかった (*E. coli*: 0.14, 0.17, *S. aureus*: 0.80, 2.45) のに対し、HRG では有意な貪食量の増加を認めた ($1\mu\text{M}$ 時 = 14.2, 11.2)。タイムラプス動画においても HRG 添加群の好中球は活発な遊走像や仮足を伸ばす様子が観察された。HRG 添加による貪食量の増加

は、細菌だけでなく真菌成分の Zymosan A においても観察された。好中球生存能解析は、カルセインにて染色された好中球をカウントする方法で実施した。0 時間時点でカウントされたカルセイン染色細胞の数を 100% として 24 時間後までの細胞数の変化を観察した。HBSS, HSA 添加群では 12 時間時点で生存率が大幅に低下していることが確認された (0.2%, 3.4%)。対して HRG 添加群では有意な生存時間の延長を認めた (55.8%)。次にイソルミノールおよびホースラディッシュ・ペルオキシダーゼを用いて、HRG の作用により細胞外 ROS 産生が抑制された好中球に対し、刺激薬を添加し ROS 産生量の変化を観察した。TNF- α , Zymosan A および *E. coli* の死菌を添加した群において ROS 産生の増加を認めたことから、HRG が作用した好中球は活性を失い ROS 産生が低下しているわけではなく、適切な刺激があれば ROS が誘導されることを確認した。好中球球状化作用、貪食能亢進作用、生存時間延長作用、細胞外 ROS 産生抑制作用については、いずれも用量反応性を認め、また rHRG においても同様の作用を示すことが確認された。またこれらの HRG の作用について抗 HRG 抗体を添加することでその作用が有意に抑制されることを確認した。

次に HRG とその受容体についての検討であるが、すでにわれわれは好中球の球状化に関する受容体が C-type lectin domain family 1 member A (CLEC1A) であることを報告している²⁾。しかしながらその他の作用との関係およびシグナリングについては明らかにできていない。今回はその他の作用と CLEC1A との関係およびシグナリングについて検討した。CLEC1A と HRG の関係を検証するため、抗 CLEC1A 抗体を用いる方法と、CLEC1A のデコイ分子であるリコンビナント CLEC1A-Fc 融合タンパク (rCLEC1A-Fc) を用い、HRG の作用が抑制されるかを確認した。好中球球状化作用、貪食能亢進作用、生存能延長作用、細胞外 ROS 産生抑制作用についていずれも、抗 CLEC1A 抗体を添加することで作用が抑制されることを確認した。また一部の作用においては別の CLEC 抗体でも抑制されることを確認した。また rCLEC1A-Fc の添加では、いずれの作用においても用量反応性に HRG の作用が抑制されることを確認した。このことからいずれの HRG の作用も CLEC1A を介していることが確認された。HRG/CLEC1A のシグナリングに関しては、HEK293T-CLEC1A 発現細胞を用いアミノ酸のリン酸化が起こ

るかどうかを検証した。HEK293T-CLEC1A 発現細胞を HRG で刺激し変化を確認したところチロシンおよびセリンのリン酸化シグナルが増強することが確認された。

研究成果の意義

過去に我々は、HRG がヒト好中球に対して、球状化作用、細胞外 ROS 産生抑制作用、微小血管様流路の通過性向上作用があることを示していたが、それが好中球機能に対して有効であるかは提示できていなかった。今回の研究では、HRG の作用により好中球貪食機能亢進作用、生存時間延長効果を示した。また抑制されていた細胞外 ROS 産生は一部の炎症性サイトカインや菌体成分により誘導されることを示した。このことから、HRG の作用により球状化した好中球は活性を失っているわけではなく、安定的な基底状態を維持しながら、一旦細菌などの接触が生じると細菌貪食を強く促進する状態であることが明らかにされた (図 1)。

HRG の受容体については Gao らが、HRG が CLEC1A を通じて好中球を球状化させていることを報告している²⁾。併せて今回の報告で貪食能、生存能、細胞外 ROS 産生抑制についても CLEC1A との結合を抑制することで、HRG の作用が減弱することから、CLEC1A が HRG の受容体であることは明白である。CLEC1A は過去にリガンドやシグナリングが特定されていない受容体である³⁾。今回はリガンドが HRG であることに加え、シグナリングの一部であるチロシンおよびセリンのリン酸化シグナルが増強することを見出したことは、今後の CLEC1A 受容体解析の一步として重要であると思われる。

今後の展開や展望

好中球は血中で最も多く含まれる白血球分画であり、主な役割として体外より侵入してきた細菌、真菌等に反応し、それらを貪食、破壊し、宿主を感染から守ることである。好中球機能の向上は敗血症病態の改善に有効であると考えられる。このことから、HRG 補充療法による敗血症病態改善には、好中球機能の向上が寄与しているのではと考えた。ヒトにおいても敗血症により血中濃度が有意に低下することが報告されており⁴⁾、敗血症診断薬としての研究も進んでいる。HRG につい

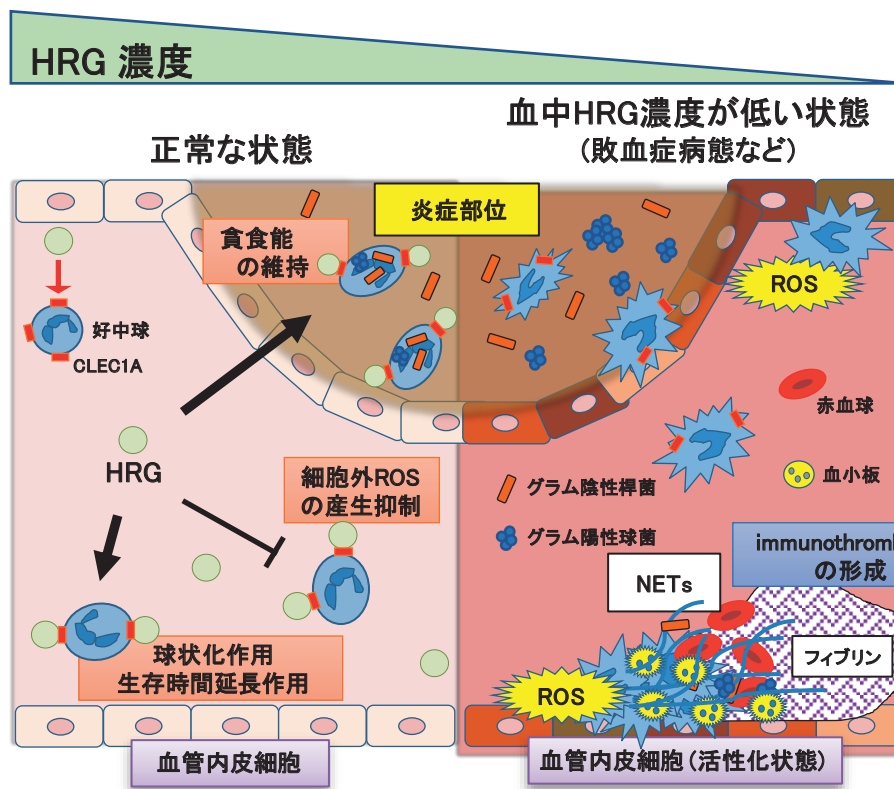


図1 体内における好中球に対するHRGの働き

では、産学連携イノベーション創出プログラム基本スキーム (ACT-M)「敗血症治療のためのHRG血液製剤の創出」においても研究開発がなされており、新たな日本発の敗血症治療薬として期待されている。また、ヒト精製HRGだけでなく、リコンビナント体のHRGにおいても同様の効果を認めたことから、感染等のリスクが軽減されたリコンビナント製剤の創出も期待できる。今回の報告は、治療薬としてのHRGの効果をサポートするものであり、また、HRGの作用がCLEC1A受容体を介することが明らかにされたことは、新たなアプローチによる好中球機能制御薬の開発が期待される。

文献

- 1) Wake H, Mori S, Liu K, Morioka Y, Nishibori M, et al.: Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through

regulation of immunothrombosis and inflammation. EBioMedicine (2016) 9, 180-194.

- 2) Shangze G, Wake H, Sakaguchi M, Wang D, Nishibori M, et al.: Histidine-rich glycoprotein inhibits high-mobility group box-1-mediated pathways in vascular endothelial cells through CLEC-1A. iScience (2020) 23, 101180.
- 3) Chiffolleau E: C-Type lectin-like receptors as emerging orchestrators of sterile inflammation represent potential therapeutic targets. Front. Immunol (2018) 9, 227.
- 4) Kuroda K, Wake H, Mori S, Nishibori M, Morimatsu H, et al.: Decrease in histidine-rich glycoprotein as a novel biomarker to predict sepsis among systemic inflammatory response syndrome. Crit. Care Med (2018) 46, 570-576.

令和3年5月6日受稿

〒700-8511 岡山市北区国体町2-25

岡山済生会総合病院 中央検査科

電話：086-252-2211 FAX：086-252-7375

E-mail：st.orange.jam.yohey@gmail.com