

敗血症増悪因子DAMPsを標的にした分子標的治療法の開発戦略

就実大学薬学部 大学院医療薬学研究科

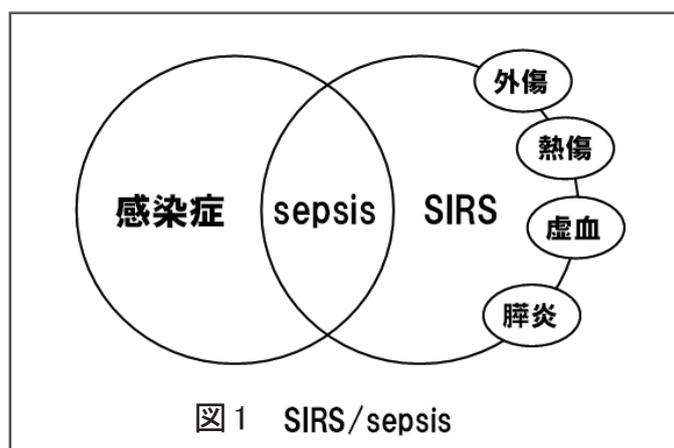
教授 森 秀治

(共同研究者)

就実大学薬学部 助教 豊村 隆男

はじめに

敗血症 (sepsis) は、感染を主たる原因とする全身性炎症反応症候群 (SIRS、systemic inflammatory response syndrome) であり、生体侵襲をともなった全身性の非特異的自然免疫炎症応答である⁽¹⁾ (図1)。敗血症の中でも臓器障害をともなうものをsevere sepsis、ショックをともなうものをseptic shockと言い、その死亡率は、それぞれSIRS 7%、sepsis 16%、severe sepsis 20%と段階的に上昇し、特にseptic shockでは46%と格段に高い死亡率を示すことが報告されている⁽²⁾。



加えて、敗血症病態を早期に正確に診断することは、その後の治療を適正に行う上で極めて重要であるが、敗血症関連の178種類の指標候補に対する検討結果から現時点で敗血症病態を正確に反映し得るバイオマーカーは存在しないのが現状であり⁽³⁾、日常診療に汎用されているCRPやプロカルシトニン等も他の炎症性疾患との区別や病態予後を推測するための指標としては不十分であるとされている。更に、1979～2000年に米国で行われた敗血症の大規模疫学調査⁽⁴⁾から、敗血症の発生率は22年間に人口10万人あたり、82.7から240.4症例へと大幅な増加を示すこと、臓器障害合併率も1.58倍に増大することも明らかとされ、病態重症化への歯止めができていないことが示されている。これらの知見は、敗血症が現代の集約的先端治療を駆使しても極めて難治性の疾患病態であり、その根治的治療法の確立は、

21世紀の医療が解決すべき最先端課題の一つと位置付けられることを意味している。

近年、敗血症時の多臓器不全の病態形成に、DAMPs (damage associated molecular patterns) と称される一連の分子群が増悪化因子として重要な役割を果たしていることが明らかになってきた^(5, 6)。すなわち、DAMPs分子群はToll様受容体などのパターン認識受容体を刺激することで炎症応答を惹起し、敗血症病態の重症化に寄与する。DAMPs分子群の中でも、特にHMGB1 (high mobility group box 1) は、侵襲や刺激に応じて細胞内から細胞外へ放出されると、細胞外でパターン認識受容体であるRAGE受容体などを刺激するサイトカイン様因子として振る舞い、NF- κ B活性化を介して炎症増悪化や臓器障害に働く。実際に、敗血症の臨床研究において、敗血症生存症例と死亡症例を比較した場合に血液中のHMGB1濃度は死亡症例で有意に高値かつ持続することが報告されている⁽⁷⁾。また、敗血症以外の様々な疾病（脳外傷、脳梗塞、動脈硬化など）においてもHMGB1が病態の進展に重要な働きをしていることも明らかにされている^(8, 9, 10, 11)。HMGB1受容体であるRAGEは、元来、生体内糖化反応によって生じる最終糖化産物 (AGEs, advanced glycation end products) の受容体として見出された分子であり、糖尿病の合併によって敗血症病態が重症化するなどの知見からAGEs-RAGE間のシグナル反応系を遮断することが、敗血症のリスク軽減につながることが示唆されている。

このような背景の下、本研究ではDAMPs受容体であるRAGEに対するシグナル遮断薬の開発を目指して、AGEs-RAGE間結合アッセイ系を構築して遮断薬の探索を行うとともに、AGEs刺激による炎症応答を解析するための細胞評価系を構築し、これらの病態生理学的意義を明らかにすることを目的に以下の実験を行った。

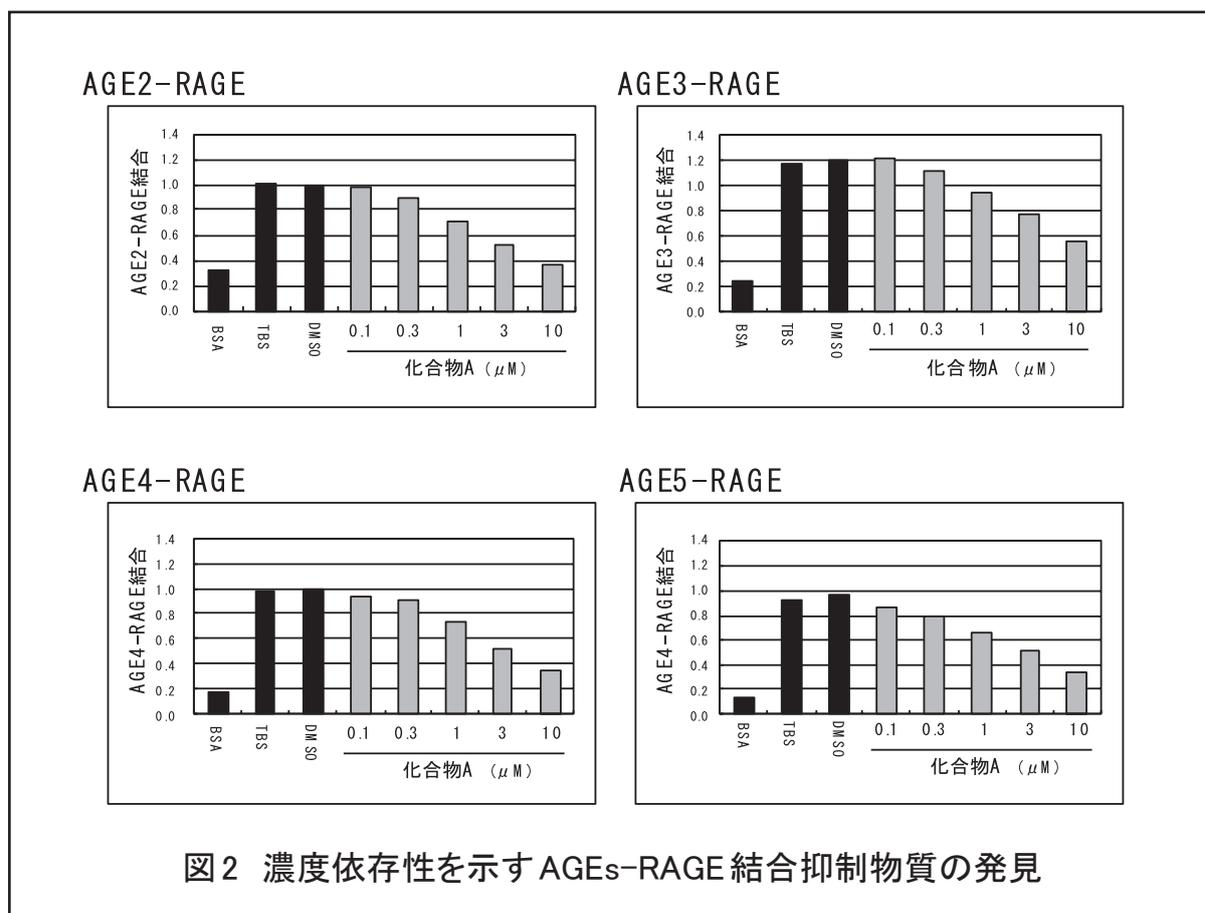
方 法

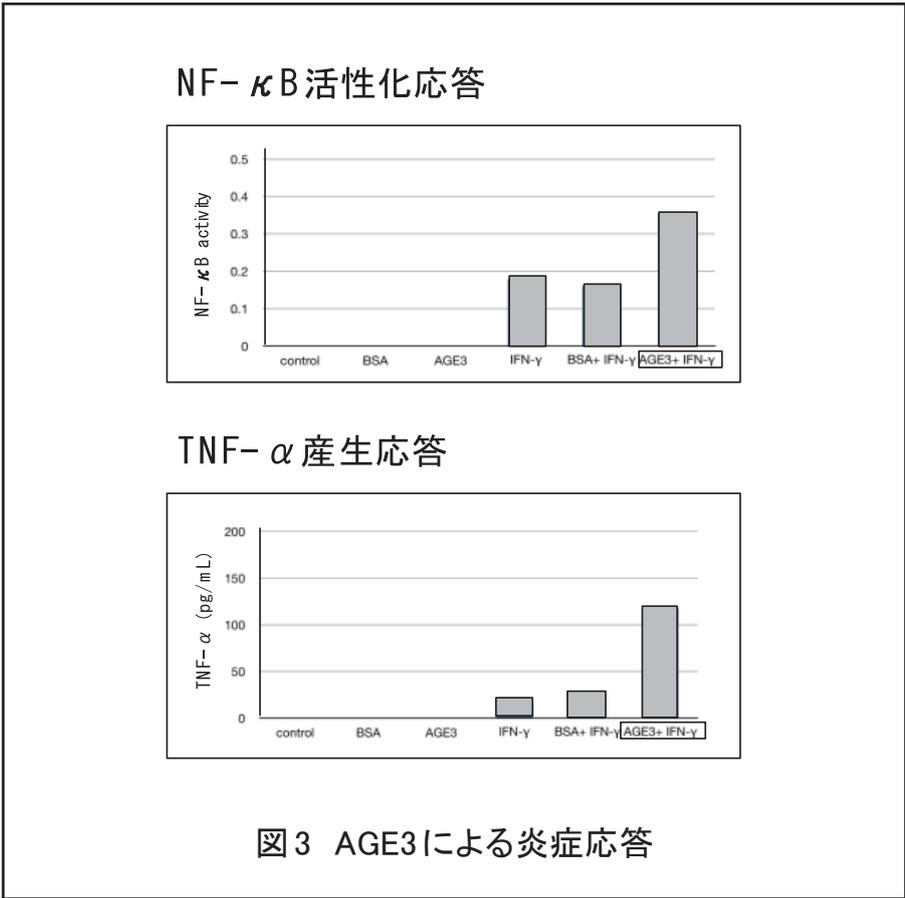
DAMPs受容体であるRAGEに対する遮断薬の開発を目指して、AGEsならびに遺伝子組換え体RAGEから構成される結合アッセイの構築を以下の手順で行った。はじめに、AGEsはモデルタンパク質（アルブミン）と糖代謝物（グリセロアルデヒドをはじめとする種々の反応性糖代謝物）を無菌条件下で37°Cでインキュベートした後に、PBSに対して透析することによって調製した。この際、反応に用いた糖代謝物の違いによって、4種類のAGEs (AGE2、AGE3、AGE4、AGE5) を調製した。組換え体RAGEは、大腸菌発現ベクターにRAGE遺伝子を組み入れ、RAGEの細胞外領域 (AGEs結合領域) のC末端に人工的にHisタグを付加した精製標品を調製した。C末端にHisタグを付加した組換え体RAGEの精製は、TALON樹脂を用いたアフィニティクロマトによって行った。96穴プレートに順にAGEs、BSA (ブロッキング)、C末端にHisタグを付加した組換え体RAGE を反応させ、最後に発色プローブとしてNi-NTA-PODを添加し、AGEs-RAGE間の結合度を比色にて評価できる系を確立した。続いて、この評価系を使ってAGEs-RAGE間結合を抑制する物質の探索を行い、敗血症治療の候補物質の探索を行った。

加えて、マクロファージ系細胞（RAW細胞、THP-1細胞）にNF- κ Bレポーター遺伝子を形質導入した細胞を用いて、AGEsによる細胞刺激にともなうNF- κ B活性化やサイトカイン産生について評価可能なアッセイ系を確立し、AGEsによる炎症応答ならびに病態生理学的作用について検討した。

結果と考察

本研究の結果、組換え体RAGEとAGEs分子は濃度依存性を持って結合することが明らかとなり、上記の実験手法によって固相法の原理に基づいたAGEs-RAGE間結合評価系の確立に成功した。この結合評価系を応用してRAGE遮断物質の探索を実施するに際して、その至適条件は、それぞれAGEs濃度：0.6～6.7 μ g/mL、組換え体RAGE濃度：2.67 μ g/mL、Ni-NTA-POD希釈度：2,000倍希釈となることが明らかとなった。この反応条件下で様々な化合物の中から結合抑制を示す物質を網羅的に探索したところ、糖化合物の中に効果的に結合抑制を示す低分子物質（化合物Aとする）を見出すことができた（図2）。この糖化合物（化合物A）は、検討したすべてのAGEs（AGE2～5）に対して、 μ Mオーダーで濃度依存的に結合を抑制することが明らかとなり、本物質がRAGEシグナル遮断薬としての創薬シーズの可能性を有することが明らかとなった。





また、細胞を用いた実験で、AGEs（特にAGE3）は、単独ではマクロファージ系免疫細胞を刺激しないにもかかわらず、IFN- γ と共に刺激を行うとIFN- γ の炎症性刺激作用を増強することが明らかとなった（図3）。すなわち、AGE3を共存させることによってNF- κ B活性化応答は約2倍に、炎症性サイトカインであるTNF- α 産生応答は約8倍にも増大することが示され、AGEs分子が炎症性アジュバント効果を示すことが明らかとなった。これらの知見は、様々な炎症病巣などでのAGEs蓄積が、炎症反応を亢進かつ長期化（慢性化）させている要因であることを示しており、敗血症病態の軽減を目的とした治療薬開発を行う上で、AGEs-RAGE系が薬物にて制御することが可能な新たな標的分子になり得ることを示唆するものであった。

要 約

敗血症の増悪化因子としてのDAMPsとその受容体RAGEに焦点をあて、RAGEとその特異的リガンドであるAGEsとの結合アッセイを構築し、これを用いてRAGE遮断物質の探索を行った。その結果、糖誘導体の中に、結合抑制活性を示す物質を見出すことが出来た。また、マクロファージ系細胞を用いてAGEsとIFN- γ の共刺激が相乗的な炎症応答をもたらすことを見出し、AGEsによる炎症性アジュバント作用を明らかにすることができた。

文 献

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ : Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-1655 (1992)
2. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP : The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) . A prospective study. *JAMA* 273: 117-123 (1995)
3. Pierrakos C, Vincent JL : Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 14 : R15 (2010)
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M : The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348: 1546-1554 (2003)
5. Bianchi ME : DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81: 1-5 (2007)
6. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT : PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 249: 158-175 (2012)
7. Hatada T, Wada H, Nobori T, Okabayashi K, Maruyama K, Abe Y, Uemoto S, Yamada S, Maruyama I : Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 94: 975-979 (2005)
8. Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Otani N, Tomura S, Shima K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M : Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol*. 72: 373-384 (2012)
9. Kanellakis P, Agrotis A, Kyaw TS, Koulis C, Ahrens I, Mori S, Takahashi HK, Liu K, Peter K, Nishibori M, Bobik A : High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 313-319 (2011)
10. Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M : Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke* 42: 1420-1428 (2011)
11. Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M : Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J*. 21: 3904-3916 (2007)