様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　５　月　２４　日現在

機関番号：　３４４１９
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2015～2017
課題番号：　１５Ｋ０８２５３

研究課題名（和文）ホメオダイナミクス再生促進創薬の基礎的研究

研究課題名（英文）Research for homeodynamics regeneration-promoting drug discovery

研究代表者
高橋　英夫（TAKAHASHI, Hideo）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：６０３３５６２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：ホメオダイナミクスは、マクロファージの分化・活性化を介する血管内皮細胞の障害と再生・修復で表現される。担い手のDAMPsの内、IL-18やadvanced glycation end product(AGE)、histidine-rich glycoprotein(HRG)、high mobility group box1(HMGB1)に着目し、ホメオダイナミクス破綻状態である組織障害効果と、再生誘導活性を検証した結果、マクロファージの分化・活性化の決定因子ではなく、増強因子であることがわかった。DAMPs濃度は障害範囲に比例し、この活性を制御することはホメオダイナミクス回復に有効である。

研究成果の概要（英文）：Homeodynamics is one of the fundamental life phenomena in the fields of neurology, immunology, endocrinology, tissue repair and stem cells. During homeodynamics, the differentiation and activation of macrophages is involved in impairment of endothelium and angiogenesis. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) are thought to play roles in the homeodynamics. Among DAMPs, interleukin(IL)-18 and advanced glycation end product(AGE) as well as high mobility group box protein1 (HMGB1) promote the differentiation and activation of macrophages. Especially, HMGB1, a ubiquitous chromatin component, is released by necrotic cells, apoptotic cells, and cells in profound distress. HMGB1 plays a critical role as a proinflammatory mediator. HMGB1 represents an important new target for drug development in a variety of inflammatory disorders, including stroke, brain injury, arteriosclerosis, and cancer.

研究分野：　創薬、免疫薬理

キーワード：　ホメオダイナミクス　組織修復機構　血管内皮細胞　HMGB1　マクロファージ

１．研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

神経、免疫、内分泌、循環を含むネットワーク相互の恒常性維持機構(ホメオダイナミクス)に着眼した内在性幹細胞賦活化療法が提唱されている。マクロファージサブセットには組織障害作用をもつ M1 と組織再生に関与する M2 がある。ホメオダイナミクス影響下での M2 マクロファージ分化・増殖と活性化による(M2 polarization)、幹細胞の分化・増殖を含む組織修復機構が注目されている。

High mobility group box1(HMGB1)は、元々クロマチンに結合する構造蛋白あるいは遺伝子の転写・調節に関与する核内蛋白として知られてきたが、組織障害時に壊死組織から受動的放出され、サイトカイン様作用を示す。一方、HMGB1 は炎症部位への幹細胞や血管内皮前駆細胞の遊走作用を促進し、血管新生を介して組織再生を誘導することが報告された。申請者らは、HMGB1 が生活習慣病の原因因子で、抗 HMGB1 抗体で抑制できることを報告し(<引用文献>①Liu, Takahashi et al. FASEB J 2007: ②Zhang, Takahashi et al. Stroke 2011: ③Bobik, Takahashi et al. Circulation 2009)、抗体療法として特許成立させた(特許第 3876325 号、特許第 3882090 号)。しかし、HMGB1 や M2 polarization の血管新生誘導機序への関与について、ホメオダイナミクスの視点からの研究報告はない。

(2) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

申請者らは、血管新生実験動物モデルを用いて、HMGB1 の血管新生誘導効果を検討し、条件によって HMGB1 が自家組織再生誘導因子となりうると考えた。M1/M2 マクロファージの血管障害又は新生効果について、培養系実験で、Th1/Th2 サイトカインの種類や HMGB1 との併用刺激によって誘導された M1/M2 細胞膜抗原発現パターンは様々であることを発見した。

本研究で、M2 マクロファージ細胞膜抗原発現と血管新生効果の相関を明らかにする。また、M2 マクロファージの血管新生効果と Th1/Th2 サイトカインや HMGB1 の相互作用について検討することを想起した。

(3) この研究の発展性について

近年注目されるマクロファージと独自に特定した再生誘導因子を標的として血管新生機序を解明する。研究からの知見が、すでに開発した薬物や、新しい創薬研究に繋がると考える。

２．研究の目的

申請者らは、damage-associated molecular patterns(DAMPs)の内、ホメオスタシスを担う key メディエーターとして知られる、Interleukin(IL)-18、advanced glycation end product(AGE)、 HMGB1 などの組織障害効果と共に、再生誘導因子としての生理活性を検証してきた。本研究で、M2 マクロファージ細胞膜抗原発現と血管新生効果の相関を明らかにする。また、M2 マクロファージの血管新生効果と DAMPs の相互作用について検討する。細胞培養系と脳組織再生モデルを用いて、DAMPs が M2 polarization を誘導して、ホメオダイナミクス再生に関与する機序を解析して、組織再生創薬の基礎的研究を行うことを目的とする。

３．研究の方法

ホメオダイナミクス影響下の組織修復機構への再生誘導因子の関与について以下の通りに研究する。①M2 マクロファージ

の血管新生効果:サイトカイン刺激の種類変えて、M2 マクロファージ細胞膜抗原発現パターンと血管新生効果の変化を *in vitro* 実験で検討する。②核内蛋白質のサイトカイン様作用による血管新生効果: サイトカインと核内蛋白質の併用刺激による M2 マクロファージ細胞膜抗原発現パターンと血管新生効果の変化を *in vitro*、*in vivo* 実験で検討する。③SHRSP を用いた再生機序解析: M2 マクロファージとグリア細胞や障害局所から放出された HMGB1 の再生機序への関与について検討する。④HRG の血管新生誘導効果:HRG の M2 マクロファージを介する血管新生誘導効果を *in vitro*、*in vivo* 実験で検討する。

4.研究成果

(1)血管新生の条件には、Th2 環境と M2 polarizationが必要であることが知られる。血管新生 *in vitro* モデルを用いた検討の結果、M2 マクロファージ単独で血管新生能を有し、血管新生促進因子といわれるメディエーターは M2 polarization 促進因子であることがわかった。これらには、先述の DAMPs が当てはまる。M2 マクロファージへの分化決定には、同由来の内因性血管新生誘導性メディエーターとして知られるオステオポンチンやトロンビンが関与して、M2 マクロファージの血管新生誘導効果には、同膜抗原の CD163 が関与することがわかった(雑誌論文① Frontiers in Immunology,2018 より図 1)。

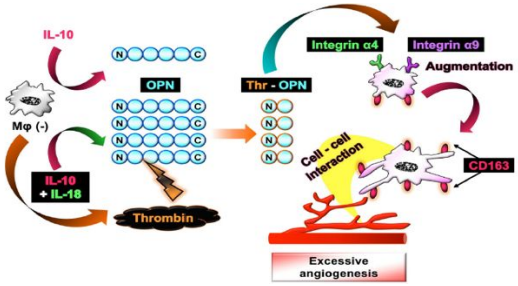


図 1　M2 マクロファージ分化と血管新生

(2)血管新生 *in vivo* モデルを用いた検討の結果、血管新生部周囲に M2 polarization 促進因子としての HMGB1 を確認した。

(3)高血圧症自然発症モデル動物 SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rat)を用いた長期観察では、運動群では発症以降の経過を見ると、非運動群に比べて著明に血管新生と生存率が改善し(<引用文献>④Niwa,Takahashi et al, Brain Struct Funct. 2016)、M2 マクロファージ増加と HMGB1 を認めた。HMGB1 は脳神経再生を誘導して生存率を向上させていることを示唆した。

(4)共同研究グループで、抗 HMGB1 抗体にかわる、HMGB1 の作用を調節しうる histidine-rich glycoprotein(HRG)を同定してリコンビナント体を開発が出来た(PCT/JP2013/64779)。好中球活性化が血管内皮細胞障害を誘導する機序を解明し、HRG が好中球活性化を制御することを見出した(雑誌論文⑥EbioMedicine,2016 より図 2)。

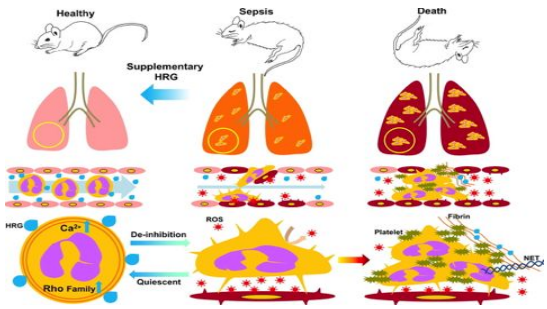


図 2　HRG と敗血症

<引用文献>

① Liu K, Takahashi HK, Nishibori M,et al. (代表者 11 人中 3 番目) Anti-high mobility group box 1 Monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. ***FASEB J*** 21:3904-3916, 2007.

② Zhang J, Takahashi HK, Liu K, M, et al. (代表者 12 人中 2 番目、共同筆頭)

Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. ***Stroke***. 42 :1420-28, 2011.

③ Bobik A, Takahashi HK, Liu K, Nishibori M,et al. (代表者 10 人中 8 番目) A Proatherogenic Role for HMGB1 in Atherosclerosis. ***Circulation,*** 120:S1155, 2009.

④ Niwa A,Nishibori M, Liu K, Takahashi H., et al. (代表者 10 人中 10 番目)corresponding author)Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle.
Brain Struct Funct. 2016 221(3):1653-66

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者には下線）

〔雑誌論文〕（計 8 件）

① Kobori T, Hamasaki S, Kitaura A, Yamazaki Y, Nishinaka T, Niwa A, Nakao S, Wake H, Mori S, Yoshino T, Nishibori M, Takahashi H
Interleukin-18 Amplifies Macrophage Polarization and Morphological Alteration, Leading to Excessive Angiogenesis. ***Frontiers in immunology*** 2018,9:334 査読有 doi: 10.3389/fimmu.2018.00334.

② Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S
Advanced glycation end products attenuate the function of tumornecrosis factor-like weak inducer of apoptosis to regulate the inflammatory response. ***Molecular and cellular biochemistry*** 2017,434:153-162 査読有 doi:10.1007/s11010-017-3045-6.

③ Gao Y, Wake H, Morioka Y, Liu K, Teshigawara K, Shibuya M, Zhou J, Mori S, Takahashi H, Nishibori M
Phagocytosis of Advanced Glycation End Products (AGEs) in Macrophages Induces Cell Apoptosis. ***Oxidative medicine and cellular longevity*** 2017,2017:8419035 査読有 doi:10.1155/2017/8419035.

④ Fu L, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Yoshino T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M. Therapeutic effects of anti-HMGB1 monoclonal antibody on pilocarpine-induced status epilepticus in mice. ***Scientific reports***, 2017,7: 1179. 査読有 doi: 10.1038/s41598-017-01325-y

⑤ Haruma J, Teshigawara K, Hishikawa T, Wang D, Liu K, Wake H, Mori S, Takahashi HK, Sugiu K, Date I, Nishibori M.Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody attenuates delayed cerebral vasospasm and brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. ***Scientific reports*** 2016 6:37755 査読有. doi: 10.1038/srep37755

⑥ Wake H, Mori S, Liu K, Morioka Y, Teshigawara K, Sakaguchi M, Kuroda K, Gao Y, Takahashi H, Ohtsuka A, Yoshino T, Morimatsu H, Nishibori M. Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic Lethality through Regulation of Immunothrombosis and Inflammation. ***EBioMedicine*** 2016, 9:180-194 査読有. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.003

⑦ Niwa A, Nishibori M, Hamasaki S, Kobori T, Liu K, Wake H, Mori S,

Yoshino T, Takahashi H. Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle. *Brain structure & function* 2016,221:1653-1666 査読有. doi: 10.1007/s00429-015-0995-x

⑧Sugihara M, Sadamori H, Nishibori M, Sato Y, Tazawa H, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Nobuoka D, Utsumi M, Ohno K, Nagasaka T, Yoshino T, Takahashi HK, Yagi T, Fujiwara T. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody improves ischemia/reperfusion injury and mode of liver regeneration after partial hepatectomy. *American journal of surgery* 2016, 211:179-188 査読有. doi:10.1016/j.amjsurg.2015.06.025.

〔学会発表〕（計 1 件）

① 国立病院機構 福山医療センター オープンカンファレンス ホメオダイナミクス創薬～生体内恒常性維持機の活性化を目指して～ 広島、髙橋英夫 2015

〔図書〕（計 1 件）

① 髙橋英夫､西堀正博 日本臨牀 HMGB1 とその受容体系研究の現状と展望 2016,74：703-714

〔産業財産権〕

○取得状況（計 4 件）

① 名称： 好中球活性化に起因する疾患の治療薬、治療方法及び検査方法
発明者：西堀正洋、髙橋英夫、森秀治、和気秀徳、劉克約、友野靖子、勅使河原匡、阪口政清
権利者：国立大学法人 岡山大学
種類：特許
番号：6227601
出願年月日：平成 25 年 5 月 28 日
取得年月日：平成 29 年 10 月 20 日
国内外の別：国内

② 名称：外傷性神経障害治療剤
発明者：西堀正洋、森秀治、髙橋英夫、和気秀徳、友野靖子、大熊佑、伊達勲、劉克約
権利者：国立大学法人 岡山大学
種類：特許
番号：6154135
出願年月日：平成 23 年 12 月 1 日
取得年月日：平成 29 年 6 月 9 日
国内外の別：国内

③ 名称： RAGE と AGE の結合抑制剤のスクリーニング方法
発明者：：西堀正洋、髙橋英夫、森秀治、和気秀徳、劉克約
権利者：国立大学法人 岡山大学
種類：特許
番号：特許第 5904945 号
出願年月日：平成 23 年 9 月 22 日
取得年月日：平成 28 年 3 月 25 日
国内外の別：国内

④ 名称：アテローム動脈硬化抑制剤
発明者：西堀正洋、髙橋英夫、森秀治、友野靖子、和気秀徳
権利者：国立大学法人 岡山大学
種類：特許
番号： 5467313
出願年月日：平成 21 年 9 月 28 日
取得年月日：平成 26 年 2 月 7 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.kindai.ac.jp/pharma/

６．研究組織
(1)研究代表者
高橋 英夫 (TAKAHASHI,Hideo)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：60335627

(2)研究分担者
丹羽 淳子 (NIWA, Atsuko)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号： 60122082

小堀 宅郎 (KOBORI, Takuro)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号： 60734697

西堀 正洋 (NISHIBORI, Masahiro)
岡山大学・医歯薬総合研究科・教授
研究者番号： 50135943

劉 克約 (RYU, Katsuyaku)
岡山大学・医歯薬総合研究科・非常勤研究員
研究者番号： 40432637