
厚生労働科学研究費補助金
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

侵襲の運命決定因子 HMGB1 を分子標的とした救命的治療法の開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 丸山 征郎

平成19年3月

目 次

I. 総括研究報告	
侵襲の運命決定因子 HMGB1 を分子標的とした救命的治療法の開発	
鹿児島大学・丸山征郎	1
II. 分担研究報告	
1. 循環血中 HMGB-1 への介入による多臓器不全の治療法の開発	
鹿児島大学・丸山征郎	9
2. 外科的侵襲時における臓器不全と血中 HMGB-1 の動態、臓器不全の関連	
慶應義塾大学・小林紘一	11
3. 重症肺感染症と HMGB-1, HMGB1 遮断による ARDS 予防	
慶應義塾大学・石坂彰敏	15
4. HMGB-1 除去カラム、抗体療法によるショック治療法の開発	
大分大学・野口隆之	20
5. アセチル化／脱アセチル化による HMGB1 の機能変換の分子機構の解明	
聖マリアンナ医科大学・中島利博	21
6. 救急頭部外傷患者における血中・髄液中 HMGB1 の動態と生命予後	
山口大学・前川剛志	23
7. 免疫細胞における HMGB1 発現と拒絶反応の関連の解明。HMGB1 への介入による拒絶反応の制御法の開発	
福岡大学・安波洋一	26
8. HMGB1 の細胞外放出の分子機構とその制御法の研究。特に SNARE, NO 分子との関係	
国立長寿医療センター・松下健二	27
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

I. 総括研究報告

侵襲の運命決定因子HMGB1を分子標的とした救命的治療法の開発

丸山 征郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

感染症、悪性腫瘍、外傷・手術など生体侵襲時には、しばしば原発臓器以外の第2、第3の臓器にドミノ式に傷害が波及し、臨床現場で最大の問題である“多臓器不全（Multiple Organ Failure, MOF）”状態となる。それではなぜ臓器障害が、第2、第3の遠隔臓器に波及してゆくのであろうか？ MOF 発症のメディエーターは何であろうか？その一つとして TNF α があげられ、TNF α 抗体やその受容体の抗体を用いた分子標的療法が慢性関節リウマチなどでは著効している。しかし TNF α は生体防御に必須である為、これへの介入は免疫能低下を招くことが問題となる。申請者らは最近、TNF α による臓器傷害は、実は核内 DNA 結合蛋白 HMGB1 により実行されることを明らかにした。すなわち HMGB1 という核内 DNA 結合蛋白が細胞壊死、あるいは刺激マクロファージ、樹状細胞の DNA から遊離・放出されて、血行性に他臓器に運ばれ、遠隔臓器細胞の受容体 RAGE に作用し、諸細胞を騒乱状態に陥れ、第2、第3の臓器障害を引き起こすこと、すなわち HMGB1こそ、臓器不全の“実行因子”であり、生体侵襲の運命は循環性 HMGB1 の多寡によって決定されるということを実証した。本来、HMGB1 は局所的には免疫アジュバント、幹細胞誘導因子として作用し、組織の修復因子として働く生体必須のプログラム因子であるが、これが局所に留まらず、全身を循環すると、“炎症の転移”を引き起こすわけである。我々は HMGB1 を局所にとどめ、全身化は内皮細胞上のトロンボモデュリンによって防御されていることをごく最近見出し、Nat. Med 誌などが大きく紹介・解説するところとなった。本研究は以上の知見を踏まえ、【MGB1 を分子標的とした多臓器不全の新規診断法と救命療法の確立】を目的とするものである。

A. 研究目的

【目的】ショックの致死性メディエーターとして新規に同定された HMGB1 (High Mobility Group-B1 Protein, Science 1999;285:248) を分子標的とした臓器不全、ショックの救命的治療法を開発することである。HMGB1 は DNA の構造と機能維持に必須の蛋白であるが、壊死細胞、あるいは活性化マクロファージから細胞外に放出される。細胞外では受容体 RAGE と Toll Like Receptor 2, -4 を介し、

幹細胞誘導と樹状細胞の活性化を惹起し、損傷部位の修復と感染防御に働く。しかし、これが全身を循環すると、遠隔臓器の NF- κ B を活性化し、TNF α などの産生・放出を誘導し、激しい炎症を惹起する。すなわち、HMGB1 は、局所では“遺言型”メディエーターとして、障害局所の修復と感染防御的に働く。しかしこれが全身を循環すると、炎症の全身転移/臓器不全を引き起こす。申請者らは、この HMGB1 の局所への封じ込めは内皮細胞上のト

ロンボモデュリン (TM) によって営まれていることを最近見出した (J. Clin. Invest. 2005; 115:1267)。そこで本研究では、中和抗体、あるいは遺伝子組み換えTMにより、循環血中のHMGB1の中和、あるいは抗体やTM固相化吸着除去循環カラムで血中から除去するというコンセプトで、ショックや多臓器不全の救命的治療法の確立を目指す。

B. 研究方法

循環性HMGB1の臓器障害作用とそのインターベンションの効果を動物実験、さらに臨床例で検討する。

1. マウス左肺全摘モデルを作成し、右肺の肺胞液(BALF)と全血中のHMGB1の動態と、右肺の病理像の観察(小林ら)

ラットの左肺を全摘し、右肺の肺胞液中、全血中のHMGB1を測定し、右肺の組織象、血管透過性を検討した。

2. 実験的重症肺感染症とHMGB1、HMGB1インターベンションの効果(石坂ら)

1) ラットに改良型盲腸結紮切断ラット(CLPラット)を作製、抗HMGB1抗体(中和抗体)を3mg/body後前投与し、10日生存率、経時的血清HMGB1値(術前、術直後、4時間後、8時間後、20時間後、32時間後、48時間後、3日後、4日後、5日後、6日後)をコントロール抗体投与群(n=11)と比較した。さらに、中和抗体投与群(n=3)、コントロール抗体投与群(n=3)を作製し、24時間後に屠殺して盲腸、肺を摘出し、病理組織学的検討を行った。

2) 同上モデルに15分後よりシベレスタットナトリウム10mg/kg/hを24時間精密持続点滴静注し、その効果を調べた。

3. 頭部外傷モデルでのHMGB1中枢性神経系障害の検証(前川ら):頭部外傷ラットでのHMGB1を介した脳神経障害拡大化の機構と、これに対するrTMや各種抗体の救命効

果、損傷軽減効果を検討する。またくも膜下出血患者、心肺停止患者の脳脊髄液(CSF)、血液でHMGB1をELISAキットにより測定した(前川ら)。

4. ラットエンドトキシンモデルにおけるエンドトキシン吸着カラムの効果(野口ら):ラット用のエンドトキシン吸着カラムを作成し、体外循環法で透析して、HMGB1の循環血中からの除去効果を検証した。

5. HMGB1の分子カップラーによる臓器障害増幅の解明(丸山ら):HMGB1が血中に高値を示しても、必ずしも臓器障害や病態の重篤化を招来しないことから、HMGB1とカップルして病態を増幅する分子が存在することが予想される。そこで同様の病態で損傷部位局所で発生しうるトロンビンに着目し、ラットにトロンビン±HMGB1投与のモデルを作成し、HMGB1(0.4, 2.0 mg/kg)の病態のエンハンサーとしてのトロンビン(1200 U/kg/hを4時間)、あるいはトロンビンのエンハンサーとしてのHMGB1の役割について検討した。

6. HMGB1の移植片拒絶とそのインターベンションによる拒絶反応克服の検討(安波ら):移植は再生医療とならび、重要性が増加しつつある領域である。しかし移植においては、超急性、急性、慢性の拒絶反応が大きな問題となっている。HMGB1は自然免疫を活性化することから、移植拒絶反応においても、一定の役割を果たしていることが想定されるので、安波らの確立したマウス肝内同種同系膵島移植においてHMGB1がどのような働きをしているか、それに対して抗HMGB1抗体がどのような効果を示すかを検討した。

7. HMGB1の細胞質、細胞外遊離に関する基礎的研究

1) 変異HMGB1発現とそのトランスジェ

ニックマウスに関する研究(中島ら):HMGB1のトランスジェニックマウスの報告がないことから、HMGB1の強制発現が致死性である可能性と強制発現をさせても細胞外への放出が起らず表現形に変化がない可能性が予想された。そこでこれらの可能性を回避するため、HMGB1の遺伝子を薬剤誘導性プロモーターの下流に配置し、さらに強制分泌が可能なように分泌シグナルを付加した遺伝子を構築した。さらに焦点のアセチル化部位に関しては、非アセチル化型の変異とアセチル化状態を模倣する擬アセチル化型の変異を導入した遺伝子を構築した。

2) HMGB1放出の制御とNOの関連に関する研究(松下ら)

活性化細胞からは active にHMGB1が細胞外に放出される。これは活性化血管内皮細胞においても観察される(丸山ら)。一方、NOは内皮細胞活性化を抑制する作用がある。そこで本研究では、動脈由来血管内皮細胞(HAEC)を低酸素条件下で培養したときの、HMGB1の放出とNOおよびNO合成酵素発現との関連性をELISA、western blot、およびRT-PCR法で検討した。

C. 研究結果

1. 左肺全摘術におけるHMGB1のダイナミクスと右肺に及ぼす影響(小林ら)。

1) 肺血管透過性(Fig.1)

①マウス左肺全摘術24時間後では残存右肺において、コントロール群と比較して肺血管透過性の亢進を認めた(Fig.1)。

②肺胞洗浄液中細胞数、細胞分画(Fig.2)

残存右肺において、コントロール群と比較して肺胞洗浄液中の好中球、リンパ球、マクロファージ、そして総細胞数の増加を認めた(Fig.2)。

③BALF中及び血漿中HMGB1濃度(Fig.3&4)

残存右肺においてHMGB1濃度は、コントロール群と比較して肺胞洗浄液中では2倍、血漿中で

は5倍に上昇していた。

④組織学検討

残存右肺において、コントロール群と比較して全体に肺胞隔壁が肥厚し、浮腫の所見を認めた。ところどころでは硝子膜形成の所見もあった。炎症細胞の浸潤も認められた。

2. 実験的重症肺感染症とHMGB1、HMGB1インターベンションの効果(石坂ら)

1) 中和抗体投与群においてコントロール抗体投与群に比して20時間後および32時間後の血清HMGB1値が有意に抑制され($p < 0.05$)、その時間帯に、盲腸および肺の両方において著明に炎症所見およびHMGB1発現が抑制された。10日生存率は有意に改善した(中和抗体投与群;55%,6/11、コントロール抗体投与群;9.1%,1/11; $p < 0.01$)。

2) シベレスタット投与群においては、コントロール群に比してモデル作製4時間後、8時間後に血清IL-10濃度が有意に抑制され($p < 0.05$)、モデル作製12時間後の肺における炎症細胞浸潤数、IL-8陽性細胞数、HMGB1陽性細胞数が有意に減少し($p < 0.001$)、7日生存率が有意に改善した(シベレスタット投与群;82%,9/11、コントロール群;36%,4/11; $p < 0.05$)。

3. 頭部外傷モデルでのHMGB1中枢性神経系障害の検証(前川ら)

HMGB1は神経学的に異常のないヒトCSF中には存在せず、くも膜下出血術後患者および心肺停止蘇生後患者のCSF中で上昇した。すなわち、くも膜下出血患者群では第3病日、第7病日まで高値を示し、第14病日でも検出された。しかし、くも膜下出血後の脳血管攣縮とHMGB1との関連は認めなかった。

心肺停止蘇生後患者予後良好群と予後不良群における動脈血、内頸静脈血、CSFのHMGB1の値をそれぞれ表1,2,3に示す。動脈血中HMGB1は心肺蘇生後6時間、24時間に上昇し、48時間後には正常化した。内頸静脈血中HMGB1は予後良好群では6,24時間に上昇し、48時間後に正常化した。

予後不良群では6時間後に上昇し、24時間後には正常化し、48時間後には再上昇する傾向がみられた。CSFは48時間後のみ、HMGB1を測定したが、6ヶ月後の予後良好群では、対照群と有意差がなかったが、予後不良群では顕著な上昇を示した。

以上の結果より、侵襲の運命決定因子HMGB1は急性中枢神経障害の予後判定マーカーとして有用であることが示唆された。

(表1)

Dirrefence of HMGB1 by Neurological Outcome in Cardio-Pulmonary Resuscitated Patients

Arterial Blood	(ng/ml) Mean ± SD		
	6hr	24hr	48hr
Control (n=35)	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8
Good Outcome (n=6)	8.8 ± 6.7	11.5 ± 3.1	1.9 ± 1.4
Poor Outcome (n=7)	8.2 ± 6.8	8.1 ± 12.5	3.2 ± 2.1

(表2)

Dirrefence of HMGB1 by Neurological Outcome in Cardio-Pulmonary Resuscitated Patients

Internal Jugular Blood	(ng/ml) Mean ± SD		
	6hr	24hr	48hr
Control (n=35)	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8
Good Outcome (n=5)	11.9 ± 6.2	10.7 ± 4.7	5.5 ± 9.6
Poor Outcome (n=5)	7.4 ± 6.0	2.8 ± 3.4	6.8 ± 3.6

(表3)

Dirrefence of HMGB1 by Neurological Outcome in Cardio-Pulmonary Resuscitated Patients

Cerebro-Spinal Fluid	(ng/ml) Mean ± SD
	48hr
Control (n=35)	0.4 ± 0.4
Good Outcome (n=5)	0.2 ± 0.4
Poor Outcome (n=7)	34.0 ± 43.4

Good Outcome : GR, MD, Poor Outcome : SD, VS, Death by GOS, Control : Peripheral venous blood

4. LPSラットショックモデルにおけるHMGB1吸着カラム

HMGB1吸着カラムは非吸着カラム、空カラムに比しLPS投与による血中HMGB1の上昇を抑制することができた。また非吸着カラム、空カラムのラット生存率が11%, 0%であったのに対して吸着カラムでは生存率を66.7%にまで改善できた(野口ら)。

5. HMGB1の分子カップラーによる臓器障害増幅の解明

①死亡率：トロンビン単独群は100%生存した。しかし、トロンビン+HMGB1(0.4mg/kg)では40%が、トロンビン+HMGB1(2.0 mg/kg)群では50%が死亡して、トロンビンがHMGB1の作用を増強したことが観察された。

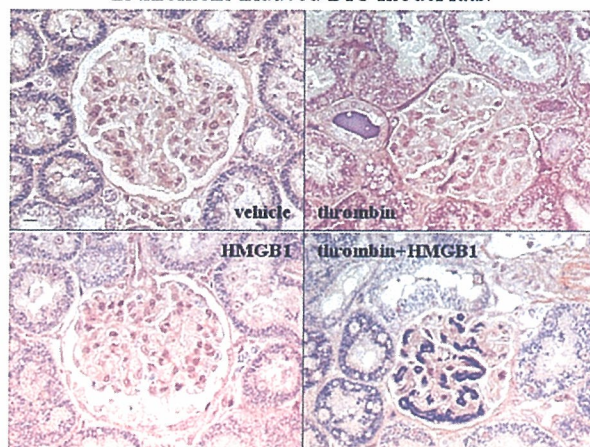
②病理的観察：トロンビン単独投与群では肺には軽度の出血、腎臓の変化も軽微で、わずかに小フィブリン塊の沈着が観察されただけであった。一方、トロンビン+HMGB1群では肺には重度の出血が見られ、腎臓では多数の糸球体にフィブリン塊の沈着が観察された。

③凝血学的解析：トロンビン単独投与群では凝血学的パラメーターの変化は軽微であったが、トロンビン+HMGB1群ではフィブリノゲンと血小板が著明に減少した。

④炎症性サイトカイン解析：トロンビン単独群ではIL-6, TNFαの変動はほとんど観察されなかったが、トロンビン+HMGB1群ではIL-6, TNFαともに著明に増加した。

⑤HMGB1は単球表面への組織因子の発現を著しく増強した(フローサイトメーター解析)。またトロンビン・TM系を抑制し、プロテインCの活性化を抑制した。(下図)

B HMGB1 accelerates glomerular fibrin deposition in thrombin-induced DIC model rats.



PTAH staining of kidney tissue sections
Nuclei and fibrin fibers are stained in dark blue (Scale bar, 10 μm)

6. HMGB1の移植片拒絶とそのインターベンションによる拒絶反応克服

マウス肝内同種同系膵島移植の実験系で肝内での早期移植膵島障害にNK T細胞、Gr-1+CD11b+細胞が、また effector molecule としては炎症性サイトカイン、NOが必須の役割を果たしていることが判明した。別の移植モデルで、移植片の内部、および周辺の炎症細胞はHMGB1発現が増強し、細胞質にもHMGB1が観察された。抗HMGB1抗体で早期移植膵島障害が制御できることが判明した。

7. HMGB1の細胞質、細胞外遊離に関する基礎的研究

1) 変異HMGB1発現とそのトランスジェニックマウスに関する研究

培養細胞レベルにおいて構築した各HMGB1遺伝子は薬剤(テトラサイクリン)により発現誘導可能であった。現在、マウスへ導入するHMGB1遺伝子の発現制御のために、テトラサイクリンリプレッサー(TetR)を発現するマウスを作製し、TetRの発現確認を行っている。

2) HMGB1放出の制御とNOの関連に関する研究

低酸素下でHAECを培養すると、1時間以内にHMGB1の放出がみられた。これは、NOS阻害剤L-NANEあるいはNSF阻害剤(TAT-NSF800)で抑制されなかった。HMGB1は血管内皮細胞培養系においてiNOSおよびNOを強く誘導した。脳虚血モデルマウスの血清中に、経時的にHMGB1の増加が認められた。また、同血清中にNOxの上昇が認められた。脳虚血マウスにおける脳組織傷害は、抗HMGB1抗体の投与で軽減された。さらに、iNOS KOマウスにおける脳虚血では、野生型マウスのそれに比べて有意に脳組織の壊死が軽減された。

D. 考察

小林らの実験の肺切除術後の残存肺では、血管透過性が亢進し、浮腫も生じ、好中球とマクロファージも集積していた。これらのことから、肺切除後の残存肺は不顕性、或いは潜在性の肺損傷"occult lung injury"の状態にあるものと考えられた。もしこの肺切除術後残存肺の"occult lung injury"の状態に細菌感染が加われば、肺損傷が悪化することが予想される。これが臨床において肺切除術後肺炎が生じやすく、重篤化しやすい原因と考えられる。

また、肺切除術後は血漿中と肺胞洗浄液中のHMGB1濃度が上昇していた。他の様々な肺損傷においてと同様に、肺切除術後残存肺の"occult lung injury"が生じるメカニズムにもHMGB1の関与が示唆された。肺切除に限らず、他の臓器への侵襲でも同様の減少がおきるのか否かは今後の大きな問題である。すなわち局所の侵襲が重篤化した場合に、遠隔臓器の「肺」が標的となるのか、否かという問題であり、この後、その研究が重要になってくるものと考えられる。

一方、石坂らは、これまで多くの急性肺障害、ARDSなどの発症病理に関する研究はacute phaseに対する炎症の制御に主眼が置かれて研究が行われてきた。しかしHMGB1のようにlate phaseに関与すると言われている分子の制御が新たな治療の鍵となる可能性が考えられる。そこで今回石坂らは、ALI/ARDSを間接的ならびに直接的肺傷害の検討を行うために敗血症モデルならびに誤嚥性肺炎モデルを作成し、それぞれの病態におけるHMGB1の制御について検討した。盲腸結紮穿刺による腹膜炎によって間接的に肺障害が誘発されるラットCLPモデルでは、血中のHMGB1が著増したが、抗HMGB1抗体投与によって、炎症局所および遠隔臓器である肺障害を軽減し、生存率を有意に改善できることを明らかにした。しかしこの場合にHMGB1は術後4時間目より増加しはじめたことから、HMGB1は必ずしもlate phaseとは限ら

ないことが示唆された。これは細胞壊死の場合には、直接壊死細胞から遊離することから、早期に血中に検出されうるものと考えられる。今回、敗血症モデル作製 15 分後に抗 HMGB1 抗体を投与し、敗血症に伴う間接的肺障害を軽減することができたが、これはメディエーター修飾療法の標的としては、炎症性サイトカインより、HMGB1 がより幅広い治療のタイミングを有するものと考えられる。また、特異的好中球エラスターゼ阻害薬であるシベレスタットナトリウム投与でも、血清中の IL-10 濃度のみならず、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 濃度が低下し、それに遅れて HMGB1 濃度も低下する傾向を示した。

このことから、本剤は、血清 HMGB1 の濃度を低下させ、肺における IL-8 や HMGB1 の発現を抑制し、肺を中心とした重要臓器障害を抑制し、生存率を改善する可能性が示唆され、敗血症のみならず、手術、外傷など種々の侵襲による SIRS から多臓器不全への病態進展の予防に有効である可能性が考えられた。

このような、HMGB1 のよる臓器障害は、髄液内の HMGB1 のダイナミズムから、髄液は HMGB1 によっても惹起されることが前川らによって示されたが、髄液中の HMGB1 は、単なる重篤度のバイオマーカーにとどまらず、中枢障害防御の分子標的となりうるものと考えられる。

さらに丸山らは HMGB1 による臓器障害、なかんずく DIC の発症にトロンピンがエンハンサーとして重要な役割を果たしていることを臨床例、動物実験で証明した。臨床現場の多くの例では、HMGB1 が血中に出現してくるような病態下では、トロンピンも共存していることが多いことから、今回の実験的ならびに臨床例での観察は、多臓器不全、DIC などの治療に大きなインパクトを与えるものと考えられる。このような点からみると、遺伝子組み換え型トロンボモデュリンは、血中 HMGB1 のインターベンションという視点からも、一つの方法として期待されよう。

また安波らの研究で、移植の拒絶反応にも HMGB1 が大きな役割を果たすことが示されたが、移植片、ならびに周囲の HMGB1 のインターベンションは拒絶反応制御につながる可能性が挙げられよう。

基礎的研究では、HMGB1 の細胞外遊離機構を解明するため、変異 HMGB1 を発現したトランスジェニック動物が中島らによって作成中であり、成功が待たれる。

さらに松下らの実験結果では、血管内皮細胞からは、自然に、あるいは虚血刺激で細胞外に放出されることが示されたが、今後、放出に関わる刺激、それを抑制する方法の解明に努めたい。

E. 結論

HMGB1 のダイナミズムが、細胞、臓器、個体レベル（ヒトおよびラット、マウス）で明らかになった。

動物ならびにヒト臨床例での多くの研究から、血中 HMGB1 が炎症の“転移”、多臓器不全、さらにはショックの必要にして十分な条件であることが判明した。そして中和抗体、吸着カラムの有効性がラットにおいて示されたので、次には大型動物、そしてヒトへの展開を期すつもりである。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. M. Watanabe, N. Hasegawa, A. Ishizaka, K. Asakura, Y. Izumi, K. Eguchi, M. Kawamura, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Early Pulmonary Resection for *Mycobacterium Avium* Complex Lung Disease Treated With Macrolides and Quinolones. *Ann Thorac Surg.* 2006 Jun; 81(6):2026-30.
2. H. Horinouchi, K. Asakura, Y. Kimura, K. Takeuchi, M. Kawamura, M. Watanabe, K. Eguchi, K.

- Kobayashi. [Prognosis of surgically treated thymic epithelial tumors] *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 2006 Nov; 107(6):262-7.
3. Anti-High-Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 Antibodies Improve Survival of Rats with Sepsis. Koichi Suda, Yuko Kitagawa, Soji Ozawa, Yoshiro Saikawa, Masakazu Ueda, Masahito Ebina, Shingo Yamada, Satoru Hashimoto, Shinji Fukata, Edward Abraham, Yosuke Funakoshi, Satoru Hashimoto, Ikuro Maruyama, Masaki Kitajima, Akitoshi Ishizaka. *World Journal of Surgery*, 30, 1755-1762, 2006
 4. Wu W, Nishikawa H, Hayami R, Sato K, Honda A, Aratani S, Nakajima T, Fukuda M, Ohta T. BRCA1 Ubiquitinates RPB8 in Response to DNA Damage. *Cancer Res* 67(3): 951-58. 2007
 5. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Takeshi Sasaki, Minako Nakazawa, Yukihiro Kato, Tadayuki Yamadera, Eunkyung Bae, Sayumi Toriyama, Rie Ikeda, Lei Zhang, Kazuko Fujitani, Eunkyung Yoo, Kaneyuki Tsuchimochi, Tomohiko Ohta, Natsumi Araya, Hidetoshi Fujita, Satoko Aratani, Katsumi Eguchi, Setsuro Komiya, Ikuro Maruyama, Nobuyo Higashi, Mitsuru Sato, Haruki Senoo, Takahiro Ochi, Shigeyuki Yokoyama, Tetsuya Amano, Jaeseob Kim, Steffen Gay, Akiyoshi Fukamizu, Kusuki Nishioka, Keiji Tanaka and Toshihiro Nakajima "Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. " *The EMBO Journal* 26:113-122 2007
 6. Satoshi Yamasaki, Naoko Yagishita, Kaneyuki Tsuchimochi, Yukihiro Kato, Takeshi Sasaki, Tetsuya Amano, Moroe Peppu, Haruhito Aoki, Hiroshi Nakamura, Kusuki Nishioka and Toshihiro Nakajima "Resistance to endoplasmic reticulum stress is an acquired cellular characteristic of rheumatoid synovial cells " *International Journal of Molecular Medicine*. 18:113-117 2006
 7. Tomoo Sato, Koji Konomi, Satoshi Yamasaki, Satoko Aratani, Kaneyuki Tsuchimochi, Masahiro Yokouchi, Kayo Masuko-Hongo, Naoko Yagishita, Hiroshi Nakamura, Setsuro Komiya, Moroe Beppu, Haruhito Aoki, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima. "Comparative Analysis of Gene Expression Profiles in Intact Versus Damaged Regions of Human Osteoarthritic Cartilage " *Arthritis and Rheumatism* 54 (3) :808-817. 2006.
 8. Naoko Yagishita, Satoshi Yamasaki, Kusuki Nishioka and Toshihiro Nakajima. "Role of Synoviolin in rheumatoid arthritis: possible clinical relevance" *Future Rheumatology*. 1(1):31-36.2006
 9. Satoko Aratani, Takayuki Oishi; Hidetoshi Fujita, Minako Nakazawa, Ryouji Fujii, Naoko Imamoto, Yoshihiro Yoneda, Akiyoshi Fukamizu, Toshihiro Nakajima "The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- α 3" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340:125-133 2006
 10. T Iwai, Y Tomita, I Shimizu, Y Yasunami, T Kajiwara, S Okano, M Yoshikai, M Taniguchi, K Nomoto, H Yasui. Regulatory roles of NKT cells in the induction and maintenance of cyclophosphamide-induced tolerance. *J Immunol* 177(12): 8400-8409. 2006
- ## 2. 学会発表
1. 河野光智、小林紘一／肺切除術後の残存肺には occult lung injury が生じている－マウス左肺全摘モデルにおける検討－／新呼吸器研究会／2007.3.16／明治記念館 東京
 2. 須田康一、北川雄光、小澤壯治、宮庄拓、岡本実、才川義朗、田坂定智、田渕悟、安藤崇史、平岩訓彦、横田博、石坂彰敏、北島政樹：好中球エラストラーゼ阻害薬によるケミカルメディエーター制御～基礎的および臨床的検討～. 第42回日本腹部救急医学会総会, 東京, 2006.

3. 須田康一, 北川雄光, 小澤壯治, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 田坂定智, 田淵悟, 安藤崇史, 平岩訓彦, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: 敗血症に対する好中球エラストラーゼ阻害薬投与の効果～動物モデルを用いた検討～. 第106回日本外科学会定期学術集会, 東京, 2006.
 4. 須田康一, 北川雄光, 小澤壯治, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 上田政和, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: Septic lung に対する好中球エラストラーゼ阻害薬投与の効果～動物モデルを用いた検討～. 第61回日本消化器外科学会定期学術総会, 横浜, 2006.
 5. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 福永興壺, 小澤壯治, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: High-mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1)を標的とした高度な外科的侵襲に伴う急性肺損傷の予防と対策～基礎的および臨床的検討～. 第19回日本外科感染症学会総会, 東京, 2006.
 6. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 福永興壺, 小澤壯治, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: High-mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1)を標的としたケミカルメディエーター制御～基礎的および臨床的検討～. 第107回日本外科学会定期学術集会, 大阪, 2007.
 7. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 福永興壺, 石川廣記, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: HMGB1を指標としたラット体外循環モデルの侵襲評価. 第62回日本消化器外科学会定期学術総会, 東京, 2007.
 8. Iwasaka H: New therapeutic approach for sepsis with HMGB1 absorber. 6th World Congress of International Society for Apheresis. World Apheresis Association 11th Congress, 27th Annual Meeting of the Japanese Society for Apheresis (2007)
 9. Koichi Suda, Yuko Kitagawa, Soji Ozawa, Taku Miyasho, Minoru Okamoto, Shingo Yamada, Yoshiro Saikawa, Masakazu Ueda, Sadatomo Tasaka, Hiroshi Yokota, Ikuro Maruyama, Akitoshi Ishizaka, Masaki Kitajima.: Neutrophil elastase inhibitor (Sivelestat) suppresses HMGB1 expression in lungs and improves survival of rats with sepsis. EMBO (European Molecular Biology Organization) Workshop On Innate Danger Signals and HMGB1, Milano, Italy, February 8–11, 2006.
 10. Koichi Suda, Yuko Kitagawa, Soji Ozawa, Taku Miyasho, Minoru Okamoto, Yoshiro Saikawa, Masakazu Ueda, Sadatomo Tasaka, Satoshi Tabuchi, Takashi Ando, Kunihiko Hiraiwa, Hiroshi Yokota, Akitoshi Ishizaka, Masaki Kitajima: Effect of neutrophil elastase inhibitor (Sivelestat) treatment for postoperative clinical courses after transthoracic esophagectomy. 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, Adelaide, South Australia, February 22–25, 2006
- H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
- 発明の名称: 抗HMGB1抗体を含む臓器移植拒絶抑制剤出願日: 2007/2/15 出願番号: 2007-34280
 発明者: 安波洋一、丸山征郎、山田晋吾特許出願人: 福岡大学、鹿児島大学、シノテスト

II. 分担研究報告

循環血中HMGB-1 への介入による多臓器不全の治療法の開発

丸山 征郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

生体が侵襲（外傷、感染など）にさらされると、当該局所では、障害壊死細胞や、活性化マクロファージの核から、DNA結合蛋白HMGB 1が遊離放出されて、生体防御反応のアデュバントとして働くことが判明しつつある。すなわち免疫（特に自然免疫）、幹細胞の動員による組織修復、そして止血である。しかしこのHMGB 1が血管内に流入して循環すると、遠隔臓器に反応が播種されて、全身性炎症が惹起され、これが急性肺障害や腎不全など、さらにはショック、多臓器不全に陥ることが我々を始めとする内外の研究により判明してきた。それならば、「HMGB 1を侵襲局所へ“封じ込め”、循環血中への流入を阻止している」仕組みが存在するはずである。我々はこのHMGB 1局所化の仕組みが、内皮細胞膜蛋白のトロンボモデュリン（TM）であることを明らかにした。しかしこの内皮細胞性TMの閾値が低下したり、あるいは閾値を超えてTMが遊離してくると、第2、第3の遠隔臓器に炎症が飛び火することが予想されるが、我々はこの点もほぼ明らかにしえた。

本研究では上記のような事実を背景として、循環血中のHMGB 1への介入による多臓器不全の治療法を開発することである。本年度は、局所HMGB 1の全身化の起序、その阻止について研究した。

A. 研究目的

局所性HMGB 1が全身化する病態としては、

- ① 局所性HMGB 1が内皮細胞TMの制御の閾値を超えた病態、
- ② 何らかの先行する病態で、内皮細胞上のTMが減少しているような病態、
- ③ ①と②の混在した病態

が考えられる。すでに我々はトロンピンが内皮細胞のTMをダウンレギュレーションすることを発表しているので、今回は、②のモデルを作成して、循環性HMGB 1のTMによる「中和能」を評価することとした。

B. 研究方法

- ① 動物実験：ラットを2群に分け、1群には1250 U/kg/hのトロンピンを4時間かけて持続静注した。2群にはトロンピン持続静注1時間後にHMGB 1（0.4、2.0 mg/kg）を単回投与した。コントロールとしてはHMGB 1の代わりに、生食を投与した。
- ② 観察：病理的検索と凝血学的解析をした。
- ③ 血中の炎症性サイトカインを測定した。
- ④ In vivoでHMGB 1の単球とに及ぼすとトロンピン・TM・プロテインC系に及ぼすについて検討した。

C. 研究結果

- ①死亡率：トロンビン単独群は100%生存した。しかし、トロンビン+HMGB1 (0.4 Mg/kg) では40%が、トロンビン+HMGB1 (2.0 mg/kg) 群では50%が死亡して、トロンビンがHMGB1の作用を増強したことが観察された。
- ②病理的観察：トロンビン単独投与群では肺には軽度の出血、腎臓の変化も軽微で、わずかに小フィブリン塊の沈着が観察されただけであった。一方、トロンビン+HMGB1群では肺には重度の出血が見られ、腎臓では多数の糸球体にフィブリン塊の沈着が観察された。
- ③凝血的解析：トロンビン単独投与群では凝血的パラメーターの変化は軽微であったが、トロンビン+HMGB1群ではフィブリノゲンと血小板が著明に減少した。
- ④炎症性サイトカイン解析：トロンビン単独群ではIL-6, TNF α の変動はほとんど観察されなかったが、トロンビン+HMGB1群ではIL-6, TNF α ともに著明に増加した。
- ⑤HMGB1は単球表面への組織因子の発現を著しく増強した(フローサイトメーター解析)。またトロンビン・TM系を抑制し、プロテインCの活性化を抑制した。

D. 考察

局所性HMGB1が全身化するためには、局所でのHMGB1の産生が過剰であるか、あるいは血管内でのHMGB1の除去能が低下しているか、のいずれかと、その双方が混在した病態が考えられる。我々は先に、内皮細胞性抗凝固蛋白トロンボモデュリン(TM)のN末端がHMGB1を結合し、中和することを見出している。そこで今回はこのTMをダウンレギュレーションすることが、循環血中に単回投与したHMGB1の“毒性”に

どのような影響を与えるかについて、ラットを使って実験した。結果、トロンビンで前処理したラットは、HMGB1の作用を著しく増強し、臓器障害、DIC、血中炎症性サイトカインの増加などが観察された。すなわちトロンビンの作用もHMGB1の作用も増強されたことになる。

生体侵襲時には、トロンビンとHMGB1生成の双方が起こることは容易に想定される。今回の研究では、この2つのメディエーターが循環血中では、DICや臓器不全に導くものと考えられた。

E. 結論

トロンビンとHMGB1はお互いに作用を増強して臓器障害を招来するものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. Ito T, Kawahara K, Nakamura T, Yamada S, Nakamura T, Abeyama K, Hashiguchi T, Maruyama I. High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. J Thromb Haemost. 5 (1): 109-16. 2007

H. 知的財産権の出願。登録状況(予定を含む)

該当なし

外科的侵襲時における臓器不全と血中HMGB-1の動態、臓器不全の関連に関する研究

小林 紘一 慶應義塾大学医学部・呼吸器外科・教授
河野 光智 慶應義塾大学医学部・呼吸器外科・助手

研究要旨

肺癌などに対して施行される肺切除術後では残存肺に肺炎などの合併症を生じやすく、またそれは重篤化しやすい。何らかの外科的侵襲が影響していると考えられるが、その本態及びメカニズムの詳細は不明である。そこでマウス左肺全摘モデルにおいて肺切除術後の残存右肺に生じる変化を肺損傷の側面から評価し、外科的侵襲の本態を探るとともに、HMGB1の関与を検討した。24時間後の評価で、肺切除を行わないコントロール群の右肺と比較して、左肺切除術後の残存右肺では有意な血管透過性亢進と肺内水分の増加、炎症細胞の集積を認めた。組織学的に残存肺では浮腫性変化を認めた。HMGB1は肺胞洗浄液中で2倍、血漿中では5倍と有意に上昇していた。肺切除術後の残存肺には急性肺損傷が潜在する状態”occult lung injury”が生じており、これが外科的侵襲の本態であると考えられた。その発生機序にはHMGB1の関与が示唆された。

A. 研究目的

研究者は呼吸器外科医として肺癌を中心とする悪性肺腫瘍の外科的治療のために日々邁進しているが、根治的手術が出来たにもかかわらず、術後の肺炎で患者を失うことを経験している。肺切除術後の患者は残存肺に肺炎を起こしやすく、そして通常の肺炎に比べて悪化しやすく致命的となる率が高いのである。（呼吸器合併症を生じる率は約3%、そのうち40~50%は死に至る。）肺切除の外科的侵襲が存在する状態に肺炎が生じたことにより肺損傷が悪化すると考えられるが、その侵襲の本態及びメカニズムは不明である。残存肺において肺損傷の面から検討した研究も調べた限りでは存在しなかった。

HMGB1蛋白質が炎症、ショックと臓器不全のメディエーターとして注目を集め、特に種々の原因による肺損傷への関与が数多く報告されている。そこで肺切除術後の残存肺に生じる変化にもサイトカインとしてのHMGB1が関与していると仮説を立

てた。マウス左肺全摘モデルを作成し、肺切除術後の残存右肺に生じる変化を肺損傷の側面から評価して外科的侵襲の本態を探るとともに、HMGB1の関与を検討した。

B. 研究方法

1. マウス左肺全摘モデル

C57BL/6マウス、雄性、8週齢を使用し、左肺全摘群と手術を行わないコントロール群とを作成した。

人工呼吸器（麻酔）

両群、人工呼吸器管理を行う。マウスをケタミン（90mg/kg body weight）＋キシラジン（9mg/kg body weight）の皮下注射にて麻酔をかけた後、20Gサーフローにて経口挿管する。FiO₂ 40%、一回換気量0.5ml、換気回数40/分、PEEP 2cm/H₂Oで維持する。挿管からすべての手技が終了するまでの人工呼吸管理の時間は両群で30分とする。

左肺全摘

左第5肋間開胸、左肺門にて気管支、肺動静脈を一括して5-0絹糸にて結紮後切離し左肺全摘術を施行する。

検体採取の手順

肺透過性測定のため、ヒトアルブミン (25 μ g/100 μ l of human serum albumin, Buminat, Baxter Health Corporation, Glendale, CA) を犠牲死させる1時間前に尾静脈から静注する(血漿中ヒトアルブミンとBAL中漏出したヒトアルブミンを測定してその比率を測定することにより、透過性を評価できる)。

手術後24時間でマウスを犠牲死させる(ケタミン(90mg/kg body weight) + キシラジン(9mg/kg body weight)の皮下注射+脱血(採血))。

末梢血

Heparin 100unit/100 μ l を静注後、下大静脈から可能な限り採血する。

生化学

血液の残りはマイクロチューブにとり、氷冷しておく。後に3000 rpm、10分、4℃にて遠心し、上清をクライオチューブに入れ、-70℃で冷凍保存する。plasma中のタンパク、サイトカイン測定に使用する。

気管支肺胞洗浄

肺を摘出、下葉以外の右肺にてBAL(生食0.5mlで2回)を行う。0.8ml程度回収できるはずである(回収量を記録する)。氷冷しておく。後に3000 rpm、5分、4℃にて遠心し、上清をクライオチューブ2本に入れ、-70℃で冷凍保存してサイトカイン測定に使用する。沈渣は100 μ lの生食に溶解しなおし、ウノペットを使用して細胞数を測定する。スライドガラスに塗沫標本を作成してディフクイックで染色し、後に分画をカウントする。

肺湿乾重量比

右下葉は気管支中枢を5-0絹糸にて結紮後、切り離しておく。重量を予め測定しておいたガラスチューブに入れて湿重量を測定しておく。後にvacuum ovenで24時間乾燥させ、乾重量を測定す

る。

組織標本

右肺のいくつかは10%ホルマリンを20cm水柱の圧で気管から注入後、気管を結紮して組織固定する。パラフィン包埋後厚さ5 μ mの切片を作成しHE染色する。

評価項目

- ・ 肺血管透過性 (Permeability index; ヒトアルブミン plasma/BAL ratio)
- ・ 肺湿乾重量比(肺浮腫、lung wet-to-dry weight ratio)
- ・ 気管支肺胞洗浄液 Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) 中細胞数、細胞分画
- ・ BALF中及び血中のHMGB1濃度
- ・ HE染色による組織学的検討

C. 研究結果

肺血管透過性 (Fig. 1)

マウス左肺全摘術24時間後では残存右肺において、コントロール群と比較して肺血管透過性の亢進を認めた。

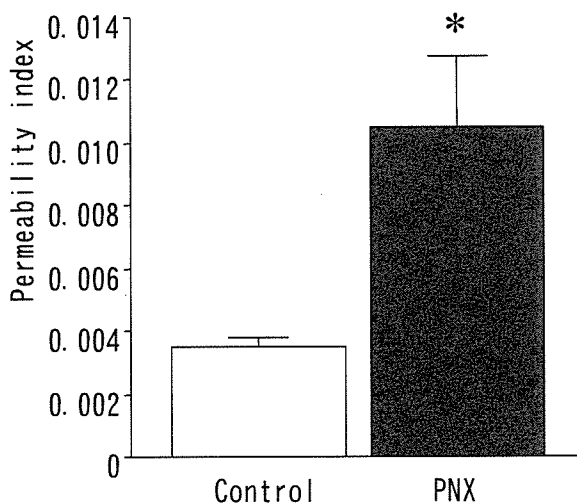


Figure 1. Effects of left pneumonectomy (PNx) on capillary permeability in remaining right lungs on a mouse left pneumonectomy model. * p<0.05

肺湿乾重量比 (Fig. 2)

残存右肺において、コントロール群と比較して肺湿乾重量比の上昇を認めた。肺浮腫が生じていることが示唆された。

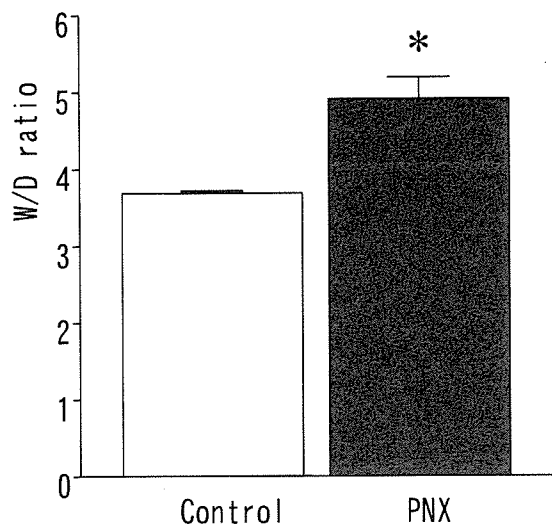


Figure 2. Effects of left pneumonectomy (PNX) on lung wet-to-dry weight ratio in remaining right lungs on a mouse left pneumonectomy model. * $p < 0.05$

肺胞洗浄液中細胞数、細胞分画 (Fig. 3)

残存右肺において、コントロール群と比較して肺胞洗浄液中の好中球、リンパ球、マクロファージ、そして総細胞数の増加を認めた。

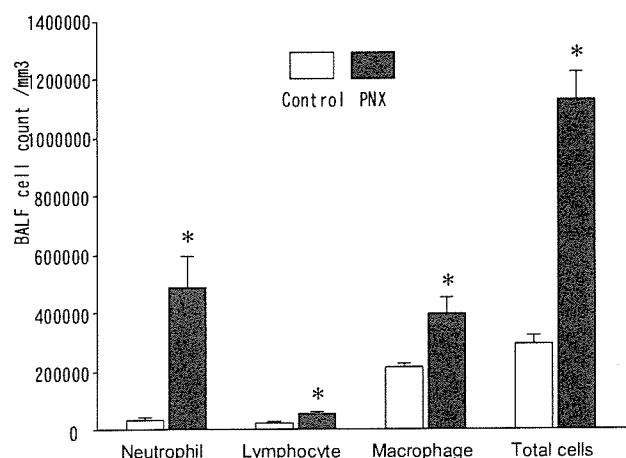


Figure 3. Effects of left pneumonectomy (PNX) on BALF cell count in remaining right lungs on a mouse left pneumonectomy model. * $p < 0.05$

BALF 中及び血漿中 HMGB1 濃度 (Fig. 4 & 5)

残存右肺において HMGB1 濃度は、コントロール群と比較して肺胞洗浄液中では 2 倍、血漿中では 5 倍に上昇していた。

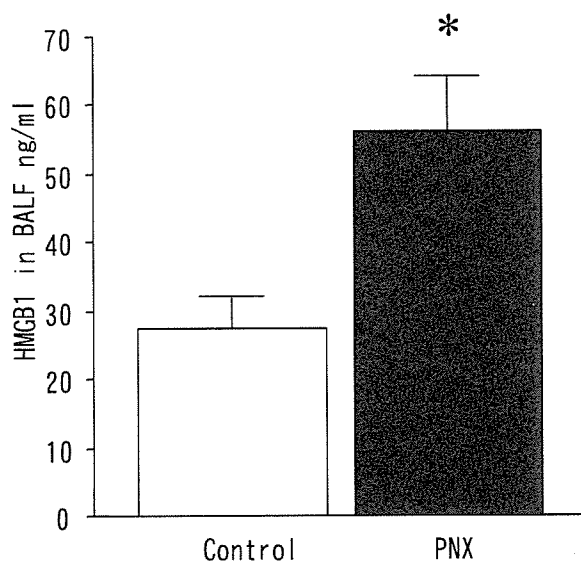


Figure 4. Effects of left pneumonectomy (PNX) on BALF HMGB1 level in remaining right lungs on a mouse left pneumonectomy model. * $p < 0.05$

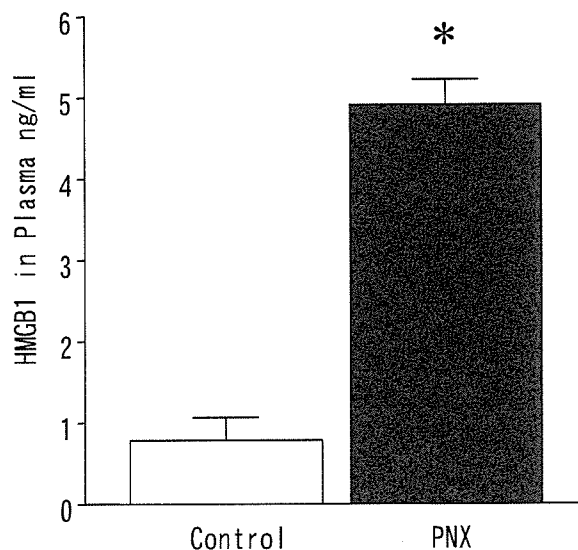


Figure 5. Effects of left pneumonectomy (PNX) on plasma HMGB1 level on a mouse left pneumonectomy model. * $p < 0.05$

組織学検討

残存右肺において、コントロール群と比較して全体に肺胞隔壁が肥厚し、浮腫の所見を認めた。ところどころでは硝子膜形成の所見もあった。炎症細胞の浸潤も認められた。

D. 考察

肺切除術後の残存肺では、血管透過性が亢進し、浮腫も生じ、好中球とマクロファージも集積していた。組織学的にも炎症細胞の浸潤と浮腫が認められた。肺切除後の残存肺は不顕性、或いは潜在性の肺損傷”occult lung injury”の状態にあると考えられた。もしこの肺切除術後残存肺の”occult lung injury”の状態に細菌感染が加われば、肺損傷が悪化することが予想される。これが臨床において肺切除術後肺炎が生じやすく、重篤化しやすい原因と考えられる。

また、肺切除術後は血漿中と肺胞洗浄液中のHMGB1濃度が上昇していた。他の様々な肺損傷においてと同様に、肺切除術後残存肺の”occult lung injury”が生じるメカニズムにもHMGB1の関与が示唆された。HMGB1の濃度上昇の原因としては、1)手術操作により直接的な組織損傷が生じ、細胞が壊死に陥ってHMGB1が流出したり、炎症細胞が浸潤してサイトカインが放出される。2)肺切除によって肺血管床が減少するために肺循環動態が変化し、肺血管内皮が活性化され、炎症細胞が肺に浸潤する。3)残存肺が胸腔内の陰圧によって過度に膨張するため、肺胞上皮や肺血管内皮が損傷してHMGB1が流出したり、或いは細胞間隙が広がって、炎症細胞が血管外に浸潤して、サイトカインが産生される、などが考えられる。

E. 結論

マウス左肺全摘モデルにおいて肺切除術後の残存右肺に生じる変化を肺損傷の側面から評価し、外科的侵襲の本態を探るとともに、HMGB1の関与を

検討した。24時間後の評価で、肺切除を行わないコントロール群の右肺と比較して、左肺切除術後の残存右肺では有意な血管透過性亢進と肺内水分の増加、炎症細胞の集積を認めた。組織学的に残存肺では浮腫性変化を認めた。HMGB1は肺胞洗浄液中で2倍、血漿中では5倍と有意に上昇していた。肺切除術後の残存肺は急性肺損傷が潜在する状態”post-pneumonectomy occult lung injury”が生じており、これが外科的侵襲の本態であると考えられた。その発生機序にはHMGB1の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. M. Watanabe, N. Hasegawa, A. Ishizaka, K. Asakura, Y. Izumi, K. Eguchi, M. Kawamura, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Early Pulmonary Resection for *Mycobacterium Avium* Complex Lung Disease Treated With Macrolides and Quinolones. *Ann Thorac Surg.* 2006 Jun; 81(6):2026-30.
2. H. Horinouchi, K. Asakura, Y. Kimura, K. Takeuchi, M. Kawamura, M. Watanabe, K. Eguchi, K. Kobayashi. [Prognosis of surgically treated thymic epithelial tumors] *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 2006 Nov; 107(6):262-7.

2. 学会発表

河野光智、小林紘一／肺切除術後の残存肺にはoccult lung injuryが生じている－マウス左肺全摘モデルにおける検討－／新呼吸器研究会／2007. 3. 16／明治記念館 東京

H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

該当なし

重症肺感染症とHMGB-1, HMGB1遮断によるARDS予防に関する研究

石坂彰敏 慶應義塾大学医学部・内科学呼吸器内科・教授

研究要旨

Acute lung injury/ Acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS)は生体に加えられた多彩な侵襲に対し、生体の過剰な炎症反応の結果肺の臓器障害を来す。一方で敗血症などの全身性反応の一部分症としてもとらえられている。ALI/ARDSにおいてHMGB1がその病態形成に関与していることが報告されている (Ueno H, Am J Respir Crit Care Med., 2004)。今回我々は ALI/ARDS の間接的、直接的原因となる敗血症ならびに誤嚥性肺炎の動物モデルを作成し ALI/ARDS における HMGB1 制御に関する研究を行った。結果、間接的肺傷害のモデルである腹膜炎後敗血症動物に抗 HMGB1 抗体を投与したところ血清中 HMGB1 の抑制ならびに生存率の改善を示した。更に同モデルに対して好中球エラストーゼ阻害薬シベレスタットナトリウムを用いたところ投与群において肺での炎症細胞、HMGB1 陽性細胞数の抑制ならびに生存率の有意な改善を認めた。また ALI/ARDS 直接的肺傷害のモデルとして塩酸投与による誤嚥性肺炎動物モデルを作成し、これに対して炎症収束に関与する抗炎症性脂質メディエーターである Resolvin E1 (RvE1) を投与したところ、好中球の気道内集積ならびに HMGB1 産生の抑制を認めた。

以上より HMGB1 の制御により ALI/ARDS 病態の改善を認め、今後の新たな治療戦略の一助となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

今回我々は重症肺感染症と HMGB1, HMGB1 遮断による Acute lung injury/ Acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS) 予防を目的として研究を遂行した。ALI/ARDS の原因疾患（病態）として敗血症、誤嚥性肺炎などがあげられるが特にこれら二つが基礎疾患として存在した場合、臨床その治療に難渋させられることがしばしばである。すなわち、このような病態における主たる治療方針として副腎皮質ステロイドの大量投与と抗生剤投与による感染コントロールが行われているが、実際にはステロイドにより免疫系が抑制され二次的におきた感染症によって致命的となることが多い。

また我々は ALI/ARDS において HMGB1 が重要なメディエーターのひとつであることはすでに報告しているが (Ueno H, Am J Respir Crit Care Med., 2004)、敗血症や誤嚥性肺炎において HMGB1 を制御することで ALI/ARDS における生命予後を改善できるのではないかと考え以下の動物疾患モデルを作成し検討を行った。

(1) 腹膜炎を契機に敗血症が惹起されその結果 ARDS を発症する。そこで我々は腹膜炎後敗血症における HMGB1 の病態関与を解明するために盲腸結紮切断による腹膜炎後敗血症動物モデルを作成した。更にこの動物モデルに抗 HMGB1 抗体を投与しその有効性を評価した。

(2) ALI/ARDS の治療薬として開発された好中球

エラスターゼ阻害薬、シベレスタットナトリウムの本疾患に対する有効性が数多く報告され、治療の一助として臨床でも用いられている。その作用機序として好中球エラスターゼを阻害することで急性期における様々な炎症性メディエーターが抑制されることは既に知られているが、後期炎症メディエーターである HMGB1 へ与える影響についての報告はない。そこで我々は前述の敗血症動物モデルを用いてシベレスタットナトリウムの HMGB1 に対する効果を検討した。

(3) 近年抗炎症性作用をもつ脂肪酸由来のメディエーターが炎症性疾患の治癒過程において重要な役割を果たし、炎症の慢性化を防ぐといった新たな知見が散見される。中でも魚脂に多く含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA) 由来の抗炎症性脂質、Resolvin E1 (RvE1) は炎症を早期に収束させるにあたり重要な役割を果たすことが報告されている (Serhan CN, *Pharmacology & Therapeutics*, 2004)。そこで炎症の慢性化を遷延させる因子 HMGB1 に対しその逆の作用をもつと考えられている本メディエーターを投与した際の効果について検討した。

B. 研究方法

(1) 8 週齢雄 SD ラット 250-300g を用いて抗生投与を要さない改良型盲腸結紮切断ラット (CLP ラット) を作製した。CLP 施行 15 分後時間前に経皮的に抗 HMGB1 抗体 (中和抗体) を 3mg/body 後投与した。中和抗体投与群 (n=11) の 10 日生存率、血清 HMGB1 値 (術前、術直後、4 時間後、8 時間後、20 時間後、32 時間後、48 時間後、3 日後、4 日後、5 日後、6 日後) をコントロール抗体投与群 (n=11) と比較した。さらに、中和抗体投与群 (n=3)、コントロール抗体投与群 (n=3) を作製し、24 時間後に屠殺して盲腸、肺を摘出し、病理組織学的検討を行った。

(2) (1) で作成した CLP ラットを用いて、モデル作製 15 分後よりシベレスタットナトリウム 10mg/kg/h を 24 時間精密持続点滴静注した群をシ

ベレスタット投与群 (n=11)、生理的食塩水を投与した群をコントロール群 (n=11) とした。モデル作製直前、4 時間後、8 時間後、20 時間後、32 時間後、48 時間後に血清を採取し、血清中の炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IL-6)、抗炎症性サイトカイン (IL-10) を Multiplex suspension array system (Bio-Plex) にて測定した。また、モデル作製 24 時間後の肺を採取し、炎症像を比較検討した。またシベレスタットナトリウム投与群、非投与群間での生存率についても検討した。

(3) 6 週齢雄マウス (C57BL/6J) に前処置として抗炎症性脂質メディエーター、RvE1 化合物を尾静注し、その 30 分後に麻酔下で左片肺選択的経気道的に塩酸 (pH=1.5, 0.1N) を投与して塩酸肺障害を惹起させた。塩酸投与後 12 時間後に気管支肺胞洗浄 (BAL) を施行し BAL 中 HMGB1 濃度、細胞数、細胞分画について検討した。

なおこれらの動物実験は慶應義塾大学医学部倫理委員会の許可のもと、無用の苦痛を動物に与えないような手段を用いて施行した。

C. 研究結果

(1) 中和抗体投与群においてコントロール抗体投与群に比して 20 時間後および 32 時間後の血清 HMGB1 値が有意に抑制され ($p<0.05$)、その時間帯に、盲腸および肺の両方において著明に炎症所見および HMGB1 発現が抑制された。10 日生存率は有意に改善した (中和抗体投与群 ; 55%、6/11、コントロール抗体投与群 ; 9.1%、1/11 ; $p<0.01$)。

(2) シベレスタット投与群においては、コントロール群に比してモデル作製 4 時間後、8 時間後に血清 IL-10 濃度が有意に抑制され ($p<0.05$)、モデル作製 12 時間後の肺における炎症細胞浸潤数、IL-8 陽性細胞数、HMGB1 陽性細胞数が有意に減少し ($p<0.001$)、7 日生存率が有意に改善した (シベレスタット投与群 ; 82%、9/11、コントロール群 ; 36%、4/11 ; $p<0.05$)。

(3) 誤嚥性肺炎動物モデルとして塩酸を用いた急