

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
- ・ BALF 中及び血中の 23 種のサイトカイン測定 (BioPlex)

C. 研究結果

肺湿乾重量比 (Fig. 1A)

マウス左肺全摘を行った PNx 群と LPS+PNx 群では、24 時間後、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。また LPS 群と比較して LPS+PNx 群では有意に肺湿乾重量比が上昇していた。

肺血管透過性 (Fig.1B)

PNx 群と LPS+PNx 群では、24 時間後、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。また LPS 群と比較して LPS+PNx 群では有意に肺血管透過性が亢進していた。

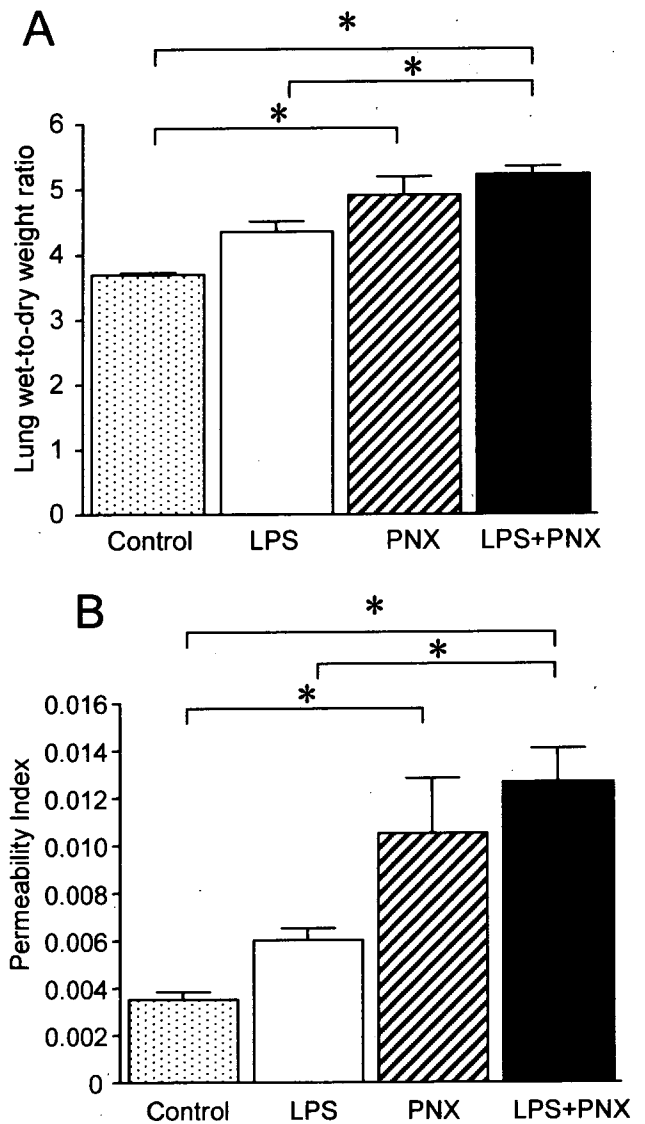


Figure 1: (A) Lung wet-to-dry (W/D) weight ratio. (B) Permeability index : Ratio of albumin concentration in bronchoalveolar lavage fluid to that in plasma (albumin B/P ratio) . There were significant differences in the lung W/D weight ratio and permeability index between the control group and the two groups with pneumonectomy. Values are means \pm SE; n = 6. *P < 0.05.

肺胞洗浄液中細胞数、細胞分画 (Fig.2)

LPS 投与或いは左肺全摘により、コントロール群と比較して、残存右肺において肺胞洗浄液中の好中球、リンパ球、マクロファージ、または総細胞数の増加を認めた。

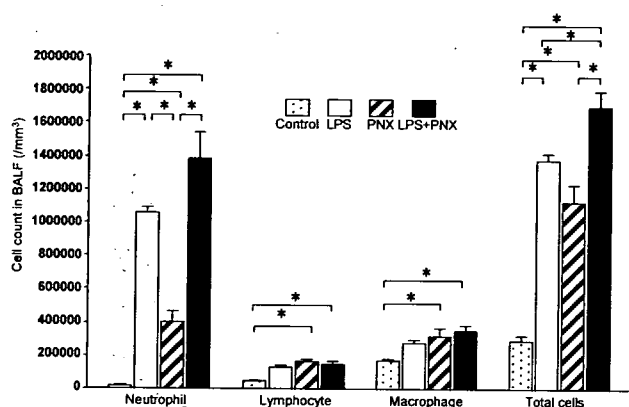


Figure 2: Cell counts in bronchoalveolar lavage fluid. Neutrophils, lymphocytes and macrophages were all increased significantly in the PNx group compared with the control group. In the LPS group, only neutrophils increased significantly, compared with the control group. Values are means \pm SE; n = 6. *P < 0.05.

組織学検討(Fig.3)

PNx 群では残存右肺において、コントロール群と比較して全体に肺胞隔壁が肥厚し、軽度の浮腫の所見を認めた。炎症細胞の浸潤も認められた。LPS 群では著明な細胞浸潤、出血、浮腫所見が認められた。LPS に加え PNx を行った LPS+PNx 群では細胞浸潤、出血、浮腫所見が更に悪化した。

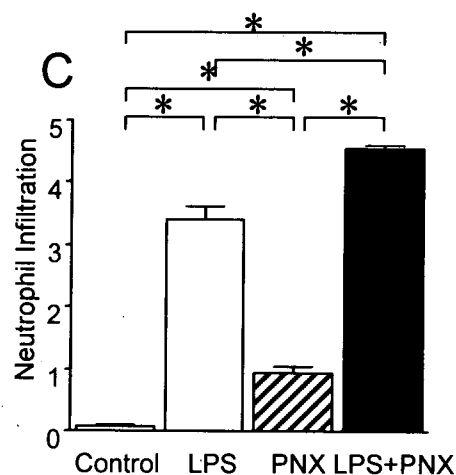
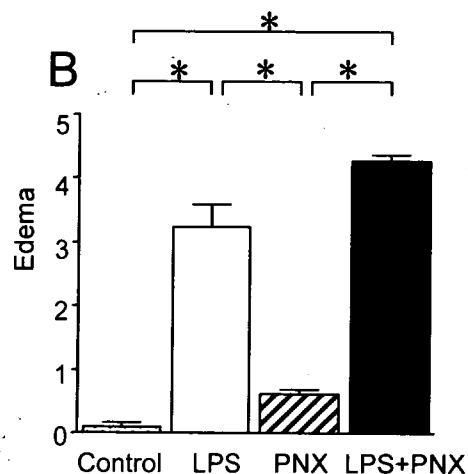
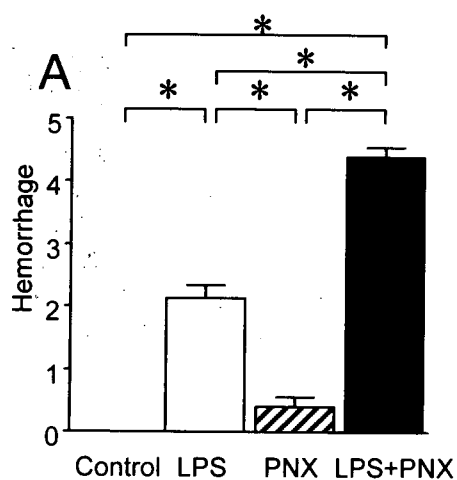


Figure 3: The degree of microscopic injury was scored based on the following variables: hemorrhage (A), edema (B) and neutrophil infiltration (C). The severity of injury was judged according to the following criteria: no injury = 0; injury to 25% of the field = 1; injury to 50% of the field = 2; injury to 75% of the field = 3 and diffuse injury = 4. Values are means \pm SE; n = 6. *P < 0.05.

BALF 中及び血漿中 HMGB1 濃度 (Fig.4)

PNx 群と LPS+PNx 群では残存右肺において HMGB1 濃度は、コントロール群と比較して肺胞洗浄液中では有意に上昇していた。少量の LPS 投与単独ではコントロール群と比較して有意差を認めなかった。LPS 群と LPS+PNx 群との間でも有意差

を認めた。

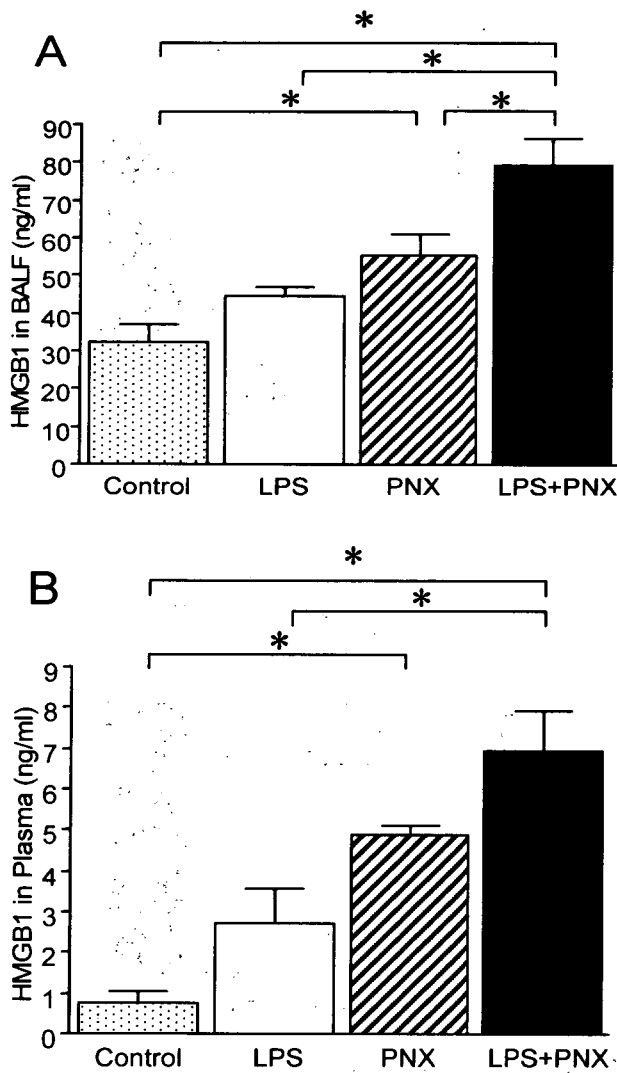
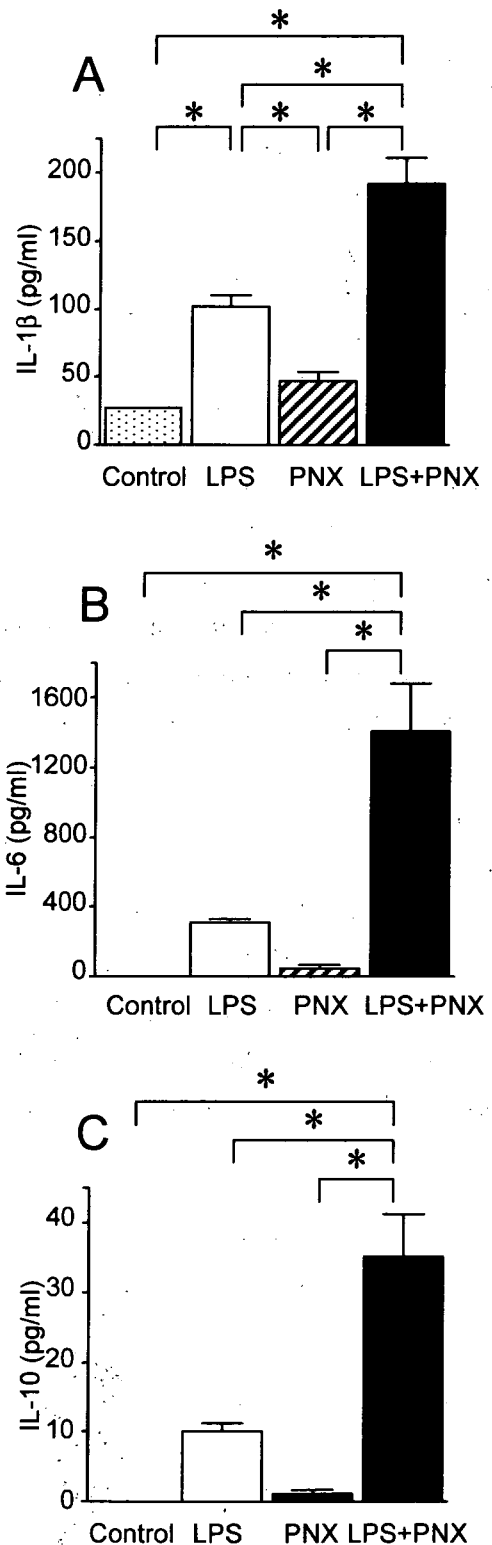


Figure 4: (A) High mobility group box 1 protein (HMGB1) concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). (B) HMGB1 concentration in plasma. HMGB1 increased significantly in both BALF and plasma of the PNx group compared to the control group. Values are means \pm SE; n = 6. *P < 0.05.

BALF 中サイトカイン濃度 (Fig.4)

肺全摘によりコントロール群と比較して BALF 中の IFN- γ の濃度が有意に上昇した。LPS 投与により IL-1 β , INF- γ , TNF- α の濃度が有意に上昇した。LPS+PNx 群において IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , KC, TNF- α の濃度が LPS 群とコントロール群と比較して有意に上昇していた。



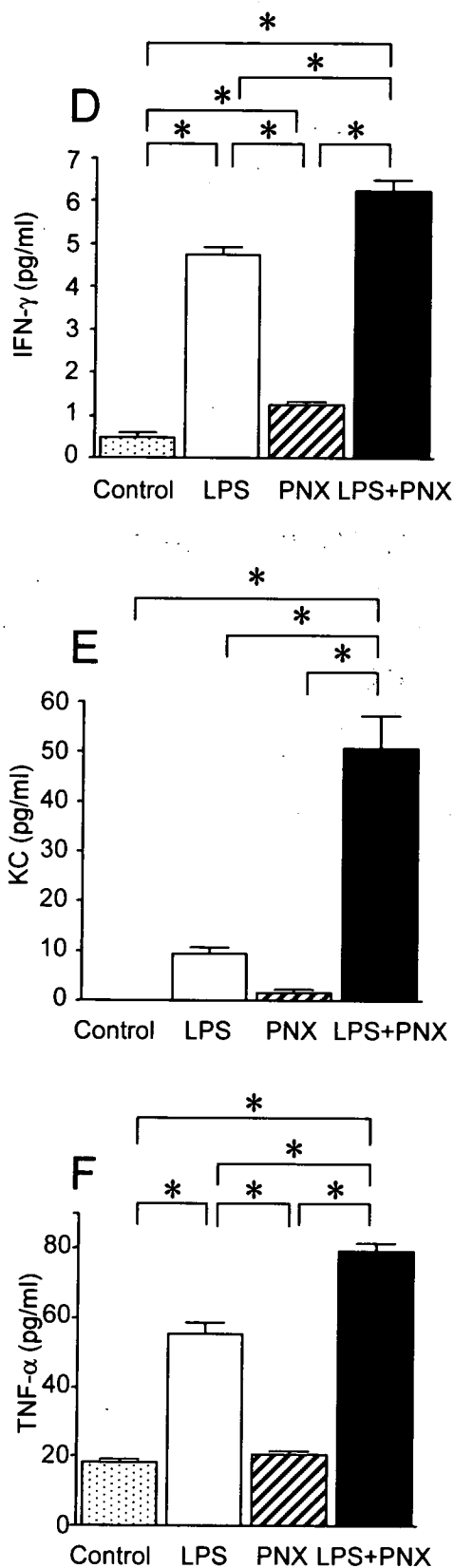


Figure 5: Bio-Plex bead assay of 6 major cytokine profiles in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Bio-Plex mouse cytokine assay for simultaneous

quantitation of interleukin IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), interferon (IFN) - γ (D), keratinocyte-derived chemokine (KC) (E) and tumor necrosis factor (TNF)- α (F) was used according to the recommended procedure. Values are means \pm SE; n = 6. *P < 0.05.

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、或いは潜在的な肺損傷“occult lung injury”の状態にあると考えられた。発生にメカニズムには肺に集積するマクロファージや好中球、HMGB1 濃度の上昇が重要な役割を果たしていると考えられる。PNx 群で HMGB1 の上昇に関与する要因として考えられるのは (1) 手術操作による直接的な組織損傷により損傷細胞内からの HMGB1 の流出する。(2) 肺血管床の減少により肺血行動態が変化し、肺血管内皮が活性化して肺に集積した炎症細胞からの分泌される。(3) 残存肺の過膨張による肺組織 (肺胞上皮細胞や肺血管内皮) の損傷により損傷細胞内から HMGB1 が流出し、また肺に集積した炎症細胞から分泌される。

今回の検討で、肺切除後残存肺の潜在的肺損傷に LPS が比較的少量でも加わると、肺損傷が悪化することが分かった。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。HMGB1 に対する抗体の投与や吸着療法が術後肺炎の予防や治療となりうる可能性がある。

E. 結論

マウス肺切除モデルにおいて、肺切除がエンドトキシン誘発性肺損傷へ及ぼす影響を明らかにした。肺切除を行わない Control 群と比較して、PNx 単独群で残存右肺に有意な血管透過性亢進と肺内水分量の増加、炎症細胞の集積を認めた。PNx+LPS 群では LPS 単独群と比較して肺損傷が悪化した。

また肺切除により BALF 中で IFN- γ や HMGB1 の濃度が有意に上昇した。肺切除は残存肺に種々の炎症性メディエーターの惹起を伴う occult lung injury を生じさせ、これらを介してエンドトキシン誘発性肺損傷を悪化させると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. Izumi Y, Gika M, Shinya N, Miyabashira S, Imamura T, Nozaki C, Kawamura M, and Kobayashi K. Hemostatic efficacy of a recombinant thrombin-coated polyglycolic acid sheet coupled with liquid fibrinogen, evaluated in a canine model of pulmonary arterial hemorrhage. *J Trauma* 63: 783-787; discussion 787, 2007.
2. Izumi Y, Yamamoto M, Kawamura M, Adachi T, and Kobayashi K. Cross-linked poly (gamma-glutamic acid) attenuates peritoneal adhesion in a rat model. *Surgery* 141: 678-681, 2007.
3. 酒井宏水, 堀之内宏久, 山本学, 池田栄二, 武岡真司, 高折益彦, 土田英俊, 小林絃一 ヘモグロビン小胞体(HbV)-リコンビナントアルブミン分散溶液による 40%交換輸血 ラット脾臓内 HbV 代謝と造血に関する 2 週間の観察 *日本輸血細胞治療学会誌* 53 巻 1 号 Page47-55 2007
4. 渡辺真純, 小林絃一, 石坂彰敏 マイクロサンプリング法 *気管支学* 29 巻 5 号 Page309-313, 2007

2. 学会発表

1. 河野光智, 田島敦志, 柿崎徹, 江間俊哉, 渡辺真純, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, 小林絃一 マウス肺切除モデルにおける小開胸と

大開胸の手術侵襲の比較 *日本呼吸器外科学会雑誌* 21 巻 3 号 Page402(2007.04)

1. 田島敦志, 河野光智, 渡辺真純, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, 小林絃一 肺切除術後の残存肺には急性肺損傷が潜在する *日本呼吸器外科学会雑誌* 21 巻 3 号 Page375(2007.04)
2. 河野光智, 田島敦志, 渡辺真純, 田坂定智, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, 石坂彰敏, 小林絃一 肺切除術後の残存肺には急性肺損傷が潜在する *日本呼吸器学会雑誌* 45 巻増 Page149(2007.04)
3. 河野光智, 田島敦志, 渡辺真純, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, 小林絃一 肺切除による外科的侵襲の本態は術後残存肺での HMGB1 をはじめとする炎症性サイトカインの濃度上昇と血管透過性の亢進である *日本外科学会雑誌* 108 巻臨増 2 Page280(2007.03)

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 呼吸器内科・教授

福永興亮 慶應義塾大学医学部 呼吸器内科・助手

須田康一 慶應義塾大学医学部 消化器外科・助手

研究要旨

ALI/ARDS の原因疾患（病態）として敗血症、誤嚥性肺炎、侵襲の大きな外科的手術などがあげられる。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）、これら疾患における HMGB1 を制御することで ALI/ARDS の病態を改善できるのではないかと考え動物疾患モデルおよび食道癌患者の臨床検体を用いて検討を行った。結果、(1)誤嚥性肺炎マウスモデルにおいて抗炎症性脂質メディエーターレゾルビン E1(RvE1)が細菌の増殖を抑制するとともに HMGB1 産生を制御した。(2)盲腸結紮穿刺(cecal ligation and puncture; CLP)ラットに対する γ グロブリン製剤(IVIG)投与したところ大量投与群で生存率の改善と HMGB1 産生制御した。(3)開腹・閉鎖操作による侵襲を加えたラットモデルにおいて硫酸化セルロースカラムはセルロースカラムに比べて HMGB1 吸着率が高かった。(4)食道癌手術において術前ステロイド非投与、投与群のいずれの群においても術後非手術操作関連合併症を発症した症例が発症しなかった症例と比較して有意に術直前の血清 HMGB1 濃度が高値であった。また、術前ステロイド投与群は非投与群に比べて有意に術直前血清 HMGB1 濃度が低値であり、合併症発症率が低い傾向を認めた。

以上より HMGB1 の制御は ALI/ARDS の原因疾患（病態）を改善しうることが示唆され、また侵襲の大きな手術後の合併症の予測マーカーになりうる可能性が考えられた。

A. 研究目的

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てきた。昨年度我々は ALI/ARDS あるいは敗血症の疾患動物モデルにおいて血清 HMGB1 濃度を低下させることが病態進展の制御に有効であることを報告した。

そこで今年度も昨年に引き続き、ALI/ARDS あるいは敗血症における HMGB1 の関

与およびその制御について検討を行った。さらに食道癌手術などの大きな外科的侵襲を要する手術の場合 ALI/ARDS が重篤な合併症のひとつであるが、我々は血清 HMGB1 濃度が臨床経過の予測因子や重症度のマーカーとなることを報告している（K. Suda, *Dis Esophagus*, 2007）。今年度はこれまでの動物モデルを用いた研究の他食道癌患者の臨床検体を用いた以下の4項目について検討を行った。

(1) 誤嚥性肺炎マウスモデルにおける HMGB1 の

発現に対する抗炎症性脂質メディエーターレゾルビン E1(RvE1)による制御についての検討。

- (2) 盲腸結紮穿孔刺(cecal ligation and puncture; CLP)ラットに対する γ グロブリン製剤 (IVIG) 投与の有効性と HMGB1 の制御についての検討。
- (3) 開腹・閉鎖操作による侵襲を加えたラットモデルを用いて硫酸化セルロースカラムによる HMGB1 吸着効果に関する検討
- (4) 食道癌根治術症例における術前 HMGB1 値と術後経過の関係に関する検討。

B. 研究方法

(1) 7 週齢 C57BL/6 雄性マウスに RvE1 (100 ng, 100 μ l 生理食塩液) あるいはコントロールとして生理食塩液 (100 μ l) を尾静脈投与し、その 30 分後に左肺選択的に塩酸 (25 μ l, pH1.0, 0.1N) 投与を行った。12 時間後に再度左肺選択的に大腸菌 (1×10^5 コロニー) を投与した。大腸菌投与 24 時間後にマウスより左肺を採取してホモジナイズした後 agar plate 上で 24 時間培養し、得られた colony forming units (CFU) から左肺内大腸菌数を求め、左肺内大腸菌数/投与した大腸菌数=クリアランス比として RvE1 が肺内での大腸菌の増殖を抑制するかを検討した。さらにホモジナイズした際に得られた上清を用いて好中球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 濃度および HMGB1 産生量について検討した。

(2) ラット (SD, 8 週齢, 250-300g, オス) を用いて CLP モデルを作製した。モデル作製 24 時間前, 12 時間前, モデル作製直前の計 3 回, 大量投与 (High) 群 (n=11) : IVIG 150 mg/3 mL/回, 通常量投与 (Low) 群 (n=10) : 30 mg/3 mL/回, コントロール群 (n=12) : 生理的食塩水 3 mL/回を皮下注射し, 7 日

間生存観察を行った。次に、各群 n=3 ずつにて、血清 HMGB1 値および各種サイトカイン値 (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF α) (術直後、4 時間後、8 時間後、20 時間後、44 時間後) を測定した。さらに、各群 n=3 にて、8 時間後に屠殺して肺を摘出し、病理組織学的検討を行った。) 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。

(3) ラット (SD, 12 週令, 400-450g, オス) の頸動静脈よりカニューレーションを行い、動脈から脱血し、カラムを通して静脈へ返血する体外循環系を作製した。開腹・閉腹操作を行い、モデル作製 2 時間後から 30 分間体外循環を 1.5 ml/min で回し、2 時間後から 2.5 時間後に硫酸化セルロースカラムを回した群 (吸着群 : n=10), および、セルロースカラムを回した群 (control 群 : n=9) において、モデル作製直前, 2 時間後, 2.5 時間後の血清中の各種サイトカイン (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF α), および、HMGB1 濃度を測定した。

(4) 2004 年 8 月~2006 年 5 月に食道癌根治術を施行した 33 例 (術前ステロイド非投与群) および 2006 年 3 月~2007 年 7 月に食道癌根治術を施行した 24 例 (術前ステロイド投与群) の術直前の血清 HMGB1 濃度と術後合併症発症の関係に関して検討を行った。

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承認もと、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。また、食道癌患者血清採取に関しても、慶應義塾大学医学部倫理委員会承認のもと、患者の同意を得た上で施行した。

C. 研究結果

(1) RvE1 投与群ではコントロール (CTL) 群に比べ塩酸投与後の肺内における大腸菌の増殖が約 1/3 に抑制された (RvE1 vs CTL: 0.60 ± 0.21 vs 3.55 ± 1.26 , $p < 0.05$)。また肺の MPO 濃度は RvE1 投与群において有意に低下した (RvE1 vs CTL: 613 ± 333 vs 1010 ± 315 ng/ml, $p < 0.05$)。さらに HMGB1 濃度に関しても有意な低下を認めた

(RvE1 vs CTL: 280.8 ± 43.9 vs 367.0 ± 25.8 ng/ml, $p < 0.05$)。

(2) 7 日間生存率は High 群: 8/11 (73%), Low 群: 4/10 (40%), コントロール群: 4/12 (33%) であり, $p < 0.05$ にて有意差を認めた。各種サイトカイン濃度に関しては、コントロール群において TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 濃度が 4-8 時間後に著増し、8 時間後の肺病理組織所見にて典型的な septic lung の像を呈したのに対し、High 群および Low 群においては同等に血中濃度が抑制され、肺障害も軽減した。HMGB1 濃度は、コントロール群および Low 群において 4 時間後に上昇したのに対し、High 群では 4 時間値が抑制され、そのまま低値で推移する傾向を認めた。

(3) 両群ともに IL-10 濃度が経時的に増加し、2 群間に有意差を認めなかった。HMGB1 濃度は、モデル作製から 2 時間後までの間に両群とも 15ng/ml 程度に上昇し、カラム治療後、セルロースカラム群では濃度が漸増したのに対し、硫酸化セルロースカラム群では濃度が減少し、有意に低値となった。

(4) 術前ステロイド非投与、術前ステロイド投与群のいずれの群においても、術後非手術操作関連合併症を発症した症例が、発症しなかった症例と比較して有意に術直前の血清 HMGB1 濃度が高値であった。また、術前ステロイド投与群は、非投与群に比べて有意に術直前血清 HMGB1 濃度が低値であり、合併症発症率が低い傾向を認めた。

D. 考察

これまで多くの ALI/ARDS に対する基礎的研究は急性期に対する炎症の制御に主眼が置かれ研究が行われてきた。しかし HMGB1 のように病期の亜急性期から慢性期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ある。

炎症収束に関与すると言われている抗炎症性脂質メディエーターのひとつである RvE1 は塩酸肺障害後 2 次的に起こった細菌の増殖を制御しさらに HMGB1 の産生量を抑制した。今回の RvE1 投与は塩酸肺障害が惹起する直前の投与であり、昨年度報告した RvE1 が塩酸肺障害後の好中球の集積を抑制した結果をふまえると RvE1 の予防的投与が炎症の広がりを制御し細菌性肺炎の増悪を防ぐ可能性が考えられる。炎症の増悪の遷延に関与すると言われている HMGB1 の産生も RvE1 が結果的に制御することで誤嚥性肺炎の増悪を防ぐことが示唆された。

次に抗生剤を併用しない CLP ラットに対する IVIG 投与実験により、汎発性腹膜炎による敗血症に対する IVIG 単剤での大量投与の有効性が示唆された。各種サイトカイン濃度や肺病理組織像の検討では、通常量投与、大量投与いずれにおいても同等な効果が得られ、通常量投与群よりも大量投与群で有意に生存率が改善された機序を説明できなかった。これまでの検討により、当 CLP モデルは術後 4-8 時間における高 HMGB1 血症が生存率を規定する重要な因子である。大量投与群においてのみモデル作製 4 時間後以降の血清 HMGB1 が上昇しなかったことが IVIG 大量投与による CLP ラット生存率改善の機序を解明する上で重要な現象である可能性が示唆された。今後、当モデルを用いて肺病理組織像や BAL、経時的採血による血中 mediator の評価等をさらに施行し、生存率改善に至ったメカニズム、特に HMGB1 との関連について検討を行う予定である。

HMGB1 が高いヘパリン結合能を有することに着目し、*in vitro*にて硫酸化セルロースビーズとセルロースビーズの各種サイトカイン(TNF α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、INF γ) および HMGB1 の吸着能を比較したところ、硫酸化セルロースビーズは HMGB1 および IL-8 を高率に吸着する能力を有していることが明らかとなった。次に、手術侵襲によって IL-10 および HMGB1 濃度が経時的に上昇するラット体外循環系を作製し、硫酸化セルロースカラムとセルロースカラムでのラット生体内での HMGB1 吸着効果の相違に関して検討を行った。本動物実験により、ラットにおいては、体外循環を回す操作のみならず、体外循環系を作製する手術操作自体もまた、非常に大きな侵襲となることが明らかとなった。硫酸化セルロースカラム群とセルロースカラム群とでモデル作製により同程度の侵襲が加わっていたこと、硫酸化セルロースカラムによって IL-10 は除去されないことが判明した。硫酸化セルロースカラムは、当実験モデルにおいて、〔カラムを回している時間帯のモデル作製による侵襲〕 + 〔カラムを回す侵襲〕によって産生された分の HMGB1 を吸着する能力を有していることが推測された。ラットでは体外循環モデル作製の侵襲が過大であり、敗血症モデルに対する生存率改善効果や肺障害軽減効果を検討するには不適と考えられる。今後、イヌやブタ等より大きな動物の敗血症モデルを樹立して、硫酸化セルロースカラムを用いた体外循環の有効性に関する検討を早急に施行する予定である。

昨年度、我々が *Dis Esophagus* 2006 ; 19 : 5 にて示唆した術前血清 HMGB1 濃度が術後経過の予測因子として有用である可能性が、今年度の研究結果によりさらに確実なものとなった。また、ステロイド投与によって高 HMGB1 血症の状態を改善できる可能性や、術前からの高 HMGB1 血症を改善することによって術後経過を改善できる可能性

が示唆された。今後、無侵襲状態で高 HMGB1 血症を呈する場合の HMGB1 産生源の探求や、他疾患における検討等、さらなる研究の進展が期待される。

E. 結論

今年度研究の結果として(1) 誤嚥性肺炎マウスモデルにおいて RvE1 は塩酸投与による肺障害後の大腸菌の増殖ならびに肺内への好中球の過剰な浸潤と HMGB1 の産生を抑制した。(2) IVIG 大量投与が HMGB1 を介した機序で敗血症の病態を改善する可能性が示唆された。(3) 硫酸化セルロースカラムによる体外循環が HMGB1 を吸着する機序によって様々な侵襲による臓器障害の治療法として有用である可能性が示唆された。(4)術直前の血清 HMGB1 濃度測定により術後合併症発症の高危険群を予測できる可能性が示唆された。

以上より HMGB1 制御によって ALI/ARDS 病態を改善できる可能性、および、血清 HMGB1 濃度測定によって様々な重症病態進展を予測できる可能性が示唆された。今後更に詳細な検討を加えそれぞれの作用機序を明らかにしていくことで本疾患に対して新たな治療戦略の確立につながることを期待している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1.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, 山田晋吾, 小澤壯治, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北島政樹: ラット敗血症モデルに対する抗 HMGB1 療法の有効性に関する検討. エンドトキシン血症救命治療研究会誌 11(1): 216-222, 2007.

2. Koichi Suda, Yuko Kitagawa, Soji Ozawa, Taku Miyasho, Minoru Okamoto, Yoshiro Saikawa, Masakazu Ueda, Shingo Yamada, Sadatomo Tasaka,

Yosuke Funakoshi, Satoru Hashimoto, Hiroshi Yokota, Ikuro Maruyama, Akitoshi Ishizaka, Masaki Kitajima. Neutrophil elastase inhibitor improves postoperative clinical courses after thoracic esophagectomy. *Dis Esophagus* 2007; 20: 478-486.

2. 学会発表

国内

1. 福永興壺: 抗炎症性脂質メディエーター レゾルビンと肺炎症性疾患. 第 13 回日本エンドトキシン研究会 イブニングシンポジウム
2. 福永興壺: 魚油と抗血栓、抗炎症. 2007 第 5 回日本予防医学会 シンポジウム
3. 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: ラット敗血症モデルに対する抗 HMGB1 療法の有効性に関する検討. 第 11 回エンドトキシン血症救命治療研究会, 東京, 2007. 要望演題
4. 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. ワークショップ
5. 須田康一, 竹内裕也, 才川義朗, 宮庄拓, 岡本実, 福永興壺, 横田博, 石坂彰敏, 北川雄光: ラット手術侵襲モデルを用いた HMGB1 吸着カラムの有効性に関する検討. 第 1 回 iPUC-II (integrated Pulmonary Circulation Research- II), 東京, 2007. 口演

6. 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. ポスター

7. 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 和田則仁, 才川義朗, 福永興壺, 山田晋吾, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光: 侵襲に対する生体反応の予測と制御～HMGB1 を標的とした新たな治療戦略～. 第 13 回日本エンドトキシン研究会, 鹿児島, 2007. シンポジウム

8. 須田康一, 竹内裕也, 和田則仁, 才川義朗, 宮庄拓, 岡本実, 福永興壺, 横田博, 石坂彰敏, 北川雄光: ラット手術侵襲モデルを用いた HMGB1 吸着カラムの性能評価. 第 20 回日本外科感染症学会総会, 東京, 2007. 口演

9. 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 和田則仁, 才川義朗, 福永興壺, 山田晋吾, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光: HMGB1 を標的とした侵襲に対する生体反応の予測と制御. 第 12 回エンドトキシン血症救命治療研究会, 福岡, 2008. ワークショップ

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

HMGB-1 除去カラム、抗体療法によるショック治療法の開発

野口隆之 大分大学医学部脳・神経機能統御講座・教授

研究要旨

ラット敗血症モデルを用いて HMGB1 の制御により、敗血症の治療効果が得られるかを検討する。制御法としては血液吸着療法による血液中からの除去療法を吸着カラムにて実施することを中心に検討する。さらに抗凝固薬等の影響を検討する。

A. 研究目的

敗血症は現在も救急集中治療領域では難治性の高い疾患である。この原因の一つに致死性因子である HMGB1 が関連していることが指摘されている。HMGB1 を吸着カラムを使用することで血液中から除去し、新たな治療法の開発による救命率の向上に繋げることを目的とする抗凝固薬の HMGB1 制御への影響を検討する。

B. 研究方法

HMGB1 吸着カラムを作成し、非吸着カラム、空カラム（体外循環の影響をみるもの）と比較検討する。LPS 投与によりラットエンドトキシンモデルを用いて HMGB1 吸着カラムの血中 HMGB1 濃度、生存率への影響を検討した。また LPS 投与ラットでの抗凝固薬の影響についても検討した。

C. 研究結果

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。また種々の抗凝固薬は HMGB1 の活性を制御した。

D. 考察

敗血症により血中 HMGB1 が上昇してくるが、この HMGB1 を吸着カラムで除去することで血中 HMGB1 濃度の上昇を抑制できた。またこの抑制は生存率の改善にも繋がった。従ってヒトでの吸着カラムの開発は敗血症の新たな救命療法になると考えられる。さらに種々の抗凝固薬も HMGB1 活性を抑制しカラムとの併用も考慮される。

E. 結論

HMGB1 吸着カラムはラットエンドトキシンモデルの生存率が改善でき、有効でありヒトへの開発応用が期待できる。同時に種々の抗凝固薬の臨床応用も期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwasaka H: Three-step research strategies for ARDS: new target molecules—ACE2, HMGB1, and HSP47. J Anesth 2007 (21) 122-123
- 2) Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T: Nafamostat mesilate inhibits high-mobility group box 1 by lipopolysaccharide stimulation in murine macrophage RAW 264.7.

Shock. 2007 Apr;27(4):429-35.

3) Hagiwara S, Iwasaka H, Noguchi T: Nafamostat mesilate inhibits the expression of HMGB1 in lipopolysaccharide -induced acute lung injury. J Anesth 2007 (21) 164-170

4) Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T: Nafamostat mesilate inhibits high-mobility group box 1 by lipopolysaccharide stimulation in murine macrophage RAW 264.7. Shock. 2007. 27(4):429-35.

5) Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T: Changes in cell culture temperature alter release of inflammatory mediators in murine macrophagic RAW264.7 cells. Inflamm Res. 2007. 56(7):297-303.

6) Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T: High dose antithrombin III inhibits HMGB1 and improves endotoxin-induced acute lung injury in rats. Intensive Care Med 2007 Oct 17, (Epub ahead of print)

7) Hagiwara S, Iwasaka H, Shinguu C, Noguchi T: Effect of enteral vs. parenteral nutrition on inflammation and cardiac function in a rat model of endotoxin-induced sepsis. Shock 2008 in press

8) Hagiwara S, Iwasaka H, Uchino T, and Noguchi T: High Mobility Group Box 1 induces a negative inotropic effect on the left ventricle in an isolated rat heart model of septic shock: a pilot study. Circulation Journal 2008 in press

2. 学会発表

国内

1) 岩坂日出男：HMGB1 を標的とした血液浄化療

法の可能性（シンポジウム）第18回日本血液浄化学会学術集会

2) 長谷川輝、岩坂日出男、萩原聡、日高正剛、野口隆之：敗血症の致死性メディエータ HMGB1 に対する HSP の効果 第2回臨床ストレス応答学会

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

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

中島 利博

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター ゲノム医科学研究部門 教授

研究要旨

炎症の後期メディエーターとして知られる HMGB1 は、壊死細胞からの受動的放出とマクロファージや単球細胞などからの能動的分泌の2つの経路により細胞外へと移行する。この2つの経路における HMGB1 には修飾の違いが報告されている。具体的には受動的放出では HMGB1 はアセチル化されず、能動的分泌では HMGB1 はアセチル化されている。HMGB1 の配列中にはいくつかアセチル化される部位があるが、その内の1つは HMGB1 のレセプターの1つ RAGE の認識部位と重なっている。つまり受動的に放出される HMGB1 と能動的に分泌される HMGB1 の間に機能的な差異が存在する可能性がある。そこで本研究では、マウス個体レベルにおける HMGB1 のアセチル化修飾の意義を検証するため、各種 HMGB1 トランスジェニック (Tg) マウスを作製している。

A. 研究目的

HMGB1 配列中の RAGE 認識部位のリジン残基は、能動的に分泌される際にアセチル化される (Bonaldi et.al. EMBO J 2003)。このアセチル化はリジン残基の電荷を変化させ、RAGE との結合力も変化すると予想されるが、これまで細胞外へ移行した後の HMGB1 のアセチル化修飾について検討した報告はない。そこで本研究では、敗血症など、HMGB1 関連疾患における HMGB1 アセチル化修飾の意義をマウス個体レベルで解析する。

B. 研究方法

(1) HMGB1 トランスジェニックマウス作製にあたり、HMGB1 の過剰発現が致死的可能性と強制的な細胞外分泌を考え、昨年度、薬剤誘導性であり且つ分泌シグナルを付加した HMGB1 発現ベクターを構築した。さらに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。本年度はまず薬剤誘導のためにテトラサイクリンリプレッサー (TetR) を導入したマウスを構築し、さらにそのマウスに対して上記の HMGB1 遺伝子の導入を試みた。

また培養細胞レベルでは、RAGE, TNF- α 遺伝子発現に対する各 HMGB1 アセチル化変異体の作用を検証した。

(2) 動物実験において動物組織を採取した際には、文部科学省・動物実験指針、及び聖マリアンナ医科大学大学院・実験動物飼育管理研究施設・動物実験実施指針に従い、麻酔下において実験動物に苦痛を与えないよう配慮した。さらに研究に使用した動物を処分する際は、必ず安楽死 (過量の麻酔薬投与または頸椎脱臼等) させるように配慮した。

C. 研究結果

TetR 遺伝子を導入した Tg マウスを作製した。さらに TetR Tg の雄と野生型のマウスの雌を交配させて得られた卵子を用いて、分泌型 HMGB1 遺伝子を導入し、HMGB1/TetR Tg マウスを1個体得た。TetR Tg の雌と野生型のマウスの雄を交配させて得られた卵子では、HMGB1/TetR Tg マウスを得ることはできなかった。また野生型マウス同士の交配で得られた卵子でも分泌型 HMGB1 遺伝子導入を試みた。独立した4系統を作製し、分泌型 HMGB1 遺伝子を持つ個体が7例得られた。しかし

得られた個体の半数は生後すぐに死亡し、また生存している個体は導入遺伝子のコピー数が少ないという結果が得られた。

分泌型 HMGB1 の野生型、及び各アセチル化変異体を HEK293 細胞に発現させたところ、擬アセチル化型の変異体において RAGE, TNF- α 遺伝子の顕著な発現上昇が認められた。一方、野生型、非アセチル化変異体ではほとんどこれらの遺伝子の発現上昇は認められなかった。

D. 考察

分泌型 HMGB1/TetR Tg マウスが1個体得られ、現在繁殖とタンパク発現の確認のため皮膚細胞を分離中である。TetR Tg の雌を用いた場合は HMGB1/TetR Tg マウスを得ることはできなかったことから、Tg の卵子は、重ねての遺伝子導入にはむかない場合があるのかもしれない。

野生型の卵子に分泌型 HMGB1 を導入した場合、半数が死亡し残る半数もコピー数が少なくタンパク発現が認められない可能性がある（確認中）。やはり分泌型 HMGB1 の過剰発現は致死性である可能性が考えられる。

培養細胞レベルの RAGE, TNF- α 遺伝子発現に対する各 HMGB1 遺伝子の作用から、RAGE に対しては主にアセチル化 HMGB1 が作用し、非アセチル化 HMGB1 はほとんど作用しない可能性が示された。今後、これらの HMGB1 変異体を用いて RAGE シグナルを詳細に検討していきたい。

E. 結論

- ・マウス個体における分泌型 HMGB1 の発現は致死性である可能性が示された。
- ・RAGE に対してはアセチル化 HMGB1 が作用する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yagishita N, Yamasaki S, Nishioka K, **Nakajima T**. Synoviolin, protein folding and the maintenance of joint homeostasis. Nat Clin Pract Rheumatol. 2008; 4(2):91-7.

Yamasaki S, Yagishita N, Nishioka K, **Nakajima T**. The roles of synoviolin in crosstalk between endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and p53 pathway. Cell Cycle. 2007; 6(11):1319-23.

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. 2007;67(3):951-8.

Yamasaki S, Yagishita N, Sasaki T, Nakazawa M, Kato Y, Yamadera T, Bae E, Toriyama S, Ikeda R, Zhang L, Fujitani K, Yoo E, Tsuchimochi K, Ohta T, Araya N, Fujita H, Aratani S, Eguchi K, Komiya S, Maruyama I, Higashi N, Sato M, Senoo H, Ochi T, Yokoyama S, Amano T, Kim J, Gay S, Fukamizu A, Nishioka K, Tanaka K, **Nakajima T**. Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. EMBO J. 2007; 26(1):113-22.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特に無し

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

前川剛志 山口大学大学院医学系研究科救急・生体侵襲制御医学・教授

藤田 基 山口大学医学部附属病院先進救急医療センター・医員

研究要旨

重症頭部外傷症例は多部位の外傷を合併して来院することが多い。脳局所挫傷部位の傷害はもとより、その周辺はスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) などの活性酸素種により二次的にも傷害・修飾される。本年はラット前脳虚血再灌流モデルで HMGB1 と $O_2^{\cdot-}$ の関連を検討すると共に、臨床症例で重症頭部外傷患者の血液と髄液の HMGB1 を測定し、急性中枢神経障害の病態への関与を調べた。その結果、ラット前脳虚血再灌流モデルでは再灌流後に $O_2^{\cdot-}$ の上昇を認め、また血液中の HMGB1 の上昇も認めた。 $O_2^{\cdot-}$ 産生量と HMGB1 濃度には正の相関があった。また臨床例において、神経学的に異常のないヒト CSF 中には HMGB1 は存在せず、重症頭部外傷患者の CSF 中で上昇し、中枢神経障害時の病態と密接に関連することがわかった。また、予後不良例の CSF 中では HMGB1 は著明に上昇し、中枢神経障害の予後予測マーカーとして有用であると考えられた。今後はラット脳障害モデルを用いて、経時的にモニターし、これを抑制する薬剤と HMGB1 との関連を検討し、脳障害に対する治療効果を検討する。

A. 研究目的

HMGB1 の生体侵襲への関与を検討する。重症中枢神経障害をきたす主な疾患として、頭部外傷、脳卒中、心肺停止蘇生後などがあげられる。各病態で二次的中枢神経障害の原因因子として、様々な形で放出される活性酸素種 (ROS) が指摘されている。本研究では、動物実験による脳虚血再灌流時の HMGB1 と代表的な ROS であるスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) の関連および臨床症例における各急性中枢神経障害時の血液や脳脊髄液 (CSF) の HMGB1 を測定し、頭部外傷を含む急性重症中枢神経障害における HMGB1 の動態と生命予後を検討する。

B. 研究方法

①ラット前脳虚血再灌流モデルでの検討

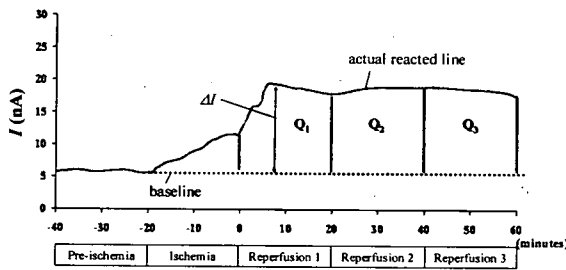
ラットの脳虚血再灌流モデルは全身麻酔、人工呼吸下に血圧、血液ガス等をモニターし、脱血性低血圧と両側総頸動脈結紮で作成した。

対照群は虚血時に脱血性低血圧のみで両側総頸動脈結紮は行っていない。前脳虚血再灌流を行う虚血再灌流群、前脳虚血再灌流を行い再灌流 20 分後に SOD を投与する虚血再灌流+SOD 群、対照群の 3 群で検討を行った。前脳虚血を 20 分間行った後に再灌流を行い、再灌流 60 分後まで観察した。頸静脈中に $O_2^{\cdot-}$ 電極を挿入し、経時的に脳灌流血中の $O_2^{\cdot-}$ 値を測定した。虚血再灌流+SOD 群では、再灌流 20 分後に SOD 5 U/g b.w. を静脈内投与した。再灌流 60 分後に血清を採取後、冷生食で灌流し脳組織を採取した。

$O_2^{\cdot-}$ は電流値として測定し、虚血前のベース値からの上昇分 ΔI (nA) で検討を行った。また、 ΔI を単位時間で積分して得られた電荷量 Q (μC 、単位時間に発生した $O_2^{\cdot-}$ 量を反映) の検討も行った (図1)。

再灌流 60 分後の血清で HMGB1 濃度を ELISA キットで測定し、また脂質過酸化物質であるマロン酸アルデヒド (MDA) を血清および脳組織中で測定した。

図1. Calculation of the difference of the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) current (ΔI) and the quantity of electricity (Q) of $O_2^{\cdot-}$.



②重症頭部外傷患者における血清および髄液中 HMGB1 の検討

臨床では重症頭部外傷患者の脳脊髄液 (CSF)、または血液で HMGB1 を ELISA キットにより測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については本学の生命科学実験施設に動物実験使用に関する倫理委員会の承認を得て実施した。臨床研究については本院の医薬品等治験・臨床研究審査委員会で承認された同意説明書を代諾者に示し、文書および口頭による十分な説明を行い、代諾者の自由意志による同意を文書で得た。

C. 研究結果

①ラット前脳虚血再灌流モデルでの検討

図2に頸静脈中の $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。虚血後から3群ともに電流値の上昇を認め、

再灌流直後から虚血再灌流群、虚血再灌流+SOD群では電流値の更なる上昇を認めた。虚血再灌流+SOD群では、再灌流20分後のSOD投与後から電流値の低下を認めた。

再灌流後20分毎の電荷量 Q を図3に示す。再灌流20分後までは、再灌流群と再灌流+SOD群には差がなかったが、再灌流20分から40分後、40分から60分後では、再灌流+SOD群では、虚血再灌流群に比べ有意に低値であった (Q_2 : $p < 0.05$, Q_3 : $p < 0.01$)。対照群に対し、虚血再灌流を行った2群は、経過中の Q 値は有意に高値であった ($p < 0.01$)

図2. The actual reacted current of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) during forebrain ischemia and reperfusion in rats

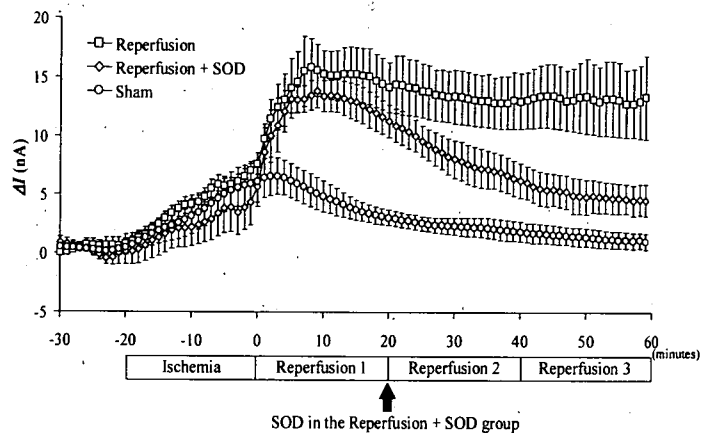
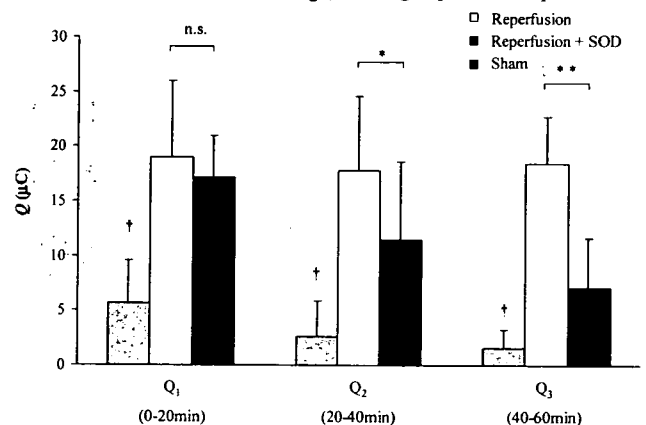


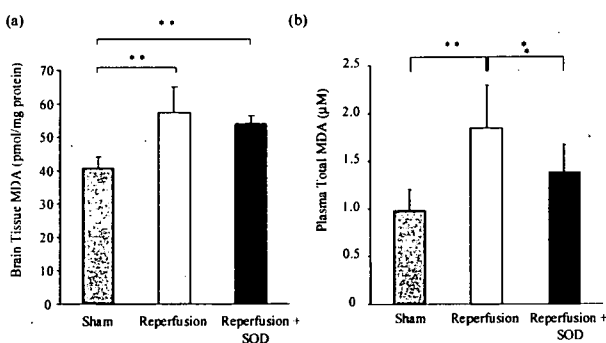
図3. Difference of the quantity of electricity (Q) of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) during reperfusion period.



脳組織中および血清 MDA を図4に示す。虚血

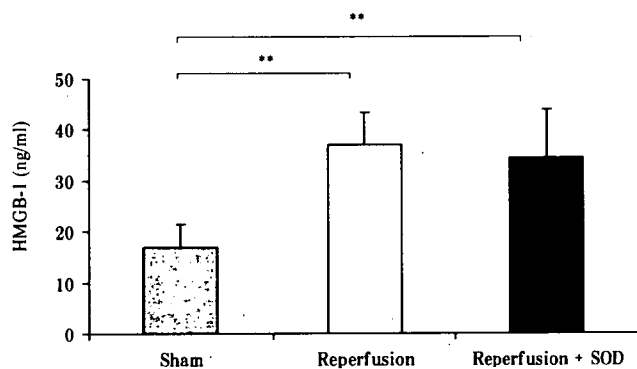
再灌流群および虚血再灌流+SOD群の脳組織中のMDAは対照群に対して有意に高値であった ($p < 0.01$)。虚血再灌流群および虚血再灌流+SOD群の間には有意差を認めなかった。虚血再灌流群の血清MDAは、対照群に対して有意に高値であった ($p < 0.01$)。虚血再灌流+SOD群の血清MDAは、虚血再灌流群に対して有意に抑制された ($p < 0.05$)。

図4. Malondialdehyde levels in forebrain tissue (a) and in plasma (b) at one hour after reperfusion.



再灌流1時間後の血清中のHMGB-1濃度を図5に示す。虚血再灌流群および虚血再灌流+SOD群のHMGB1濃度は対照群に対して有意に高値であった ($p < 0.01$)。虚血再灌流群および虚血再灌流+SOD群の間には有意差を認めなかった。

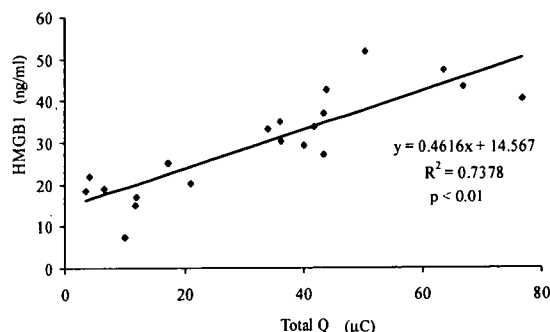
図5. Plasma HMGB-1 levels at one hour after reperfusion.



再灌流後1時間の $O_2^{\cdot-}$ 量を反映するTotal Q ($Q_1+Q_2+Q_3$)とHMGB1濃度との相関を図6に示す。 $y = 0.4616x + 14.567$ 、 $R^2 = 0.7378$ であり、

有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

図6. Correlation between Plasma HMGB-1 levels and total Q value of $O_2^{\cdot-}$.



以上の結果から、前脳虚血再灌流モデルの脳灌流血中で $O_2^{\cdot-}$ が検出され、その産生量はHMGB1と相関があった。脂質過酸化の程度は血流中の $O_2^{\cdot-}$ 値とほぼ一致し、 $O_2^{\cdot-}$ 値が酸化ストレスの指標となることが示唆された。したがって、HMGB1は酸化ストレスの予測因子と考えることができ、また経時的な $O_2^{\cdot-}$ 値はHMGB1値を反映しうることが示された。

②重症頭部外傷患者における血清および髄液中HMGB1の検討について

重症頭部外傷患者12例でHMGB1を測定した。受傷6ヵ月後の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。

動脈血中および内頸静脈血中HMGB1は受傷日、第1病日、第3病日において、健常者に比べ低値であり、予後不良群のほうがさらに低い傾向にあった。CSFは予後良好群と予後不良群ともに受傷日からすでに高値を示し、その後第1病日、第3病日と上昇を認めた。予後不良群では、予後良好群と比較して顕著な上昇を認めた。

以上の結果より、CSF中のHMGB1は重症頭部外傷患者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)

Difference of HMGB1 by Neurological Outcome in Severe Head Trauma Patients

Arterial Blood
(ng/ml) Mean ± SD

	Day 0	Day 1	Day 3
Control (n=35)	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8
Good Outcome (n=7)	3.2 ± 0.7	3.0 ± 1.2	3.3 ± 0.8
Poor Outcome (n=5)	2.5 ± 0.8	2.2 ± 0.4	2.8 ± 1.2

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

(表2)

Difference of HMGB1 by Neurological Outcome in Severe Head Trauma Patients

Internal Jugular Blood
(ng/ml) Mean ± SD

	Day 0	Day 1	Day 3
Control (n=35)	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8	3.9 ± 3.8
Good Outcome (n=7)	3.1 ± 0.8	3.2 ± 0.8	3.5 ± 1.0
Poor Outcome (n=5)	2.7 ± 0.7	2.2 ± 0.3	2.7 ± 0.5

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

(表3)

Difference of HMGB1 by Neurological Outcome in Cardio-Pulmonary Resuscitated Patients
Cerebro-Spinal Fluid (ng/ml) Mean ± SD

	Day 0	Day 1	Day 3
Control (n=35)	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.4
Good Outcome (n=7)	5.4 ± 2.7	7.8 ± 13.1	13.5 ± 27.5
Poor Outcome (n=5)	11.2 ± 8.9	26.1 ± 13.1	93.2 ± 125

Good Outcome: GR, MD, Poor Outcome: SD, VS,

Death by GOS, Control: healthy volunteer

D. 考察

1) 達成度

当初の計画ではラット頭部外傷モデルで HMGB1 の中枢神経障害における病態との関わりを検討し、リコンビナント・トロンボモジュリンによる治療効果を検討する予定であったが、本年度は前脳虚血再灌流モデルで HMGB1 と O₂˙⁻ の関連について検討した。HMGB1 と O₂˙⁻ 産生量には有意な相関がみられ、20 分間の脳虚血による脳障害は虚血だけでなく、再灌流時の O₂˙⁻ 産生による二次的な障害にも起因することが分かった。また、ヒトの重症頭部外傷という急性重症脳障害患者の脳脊髄液中 HMGB1 の上昇が予後予測因子となり得ることを証明し、その意義は非常に大きかった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

ラット脳障害モデルで HMGB1 と O₂˙⁻ の関連を報告したものや、急性中枢神経障害患者（重症頭部外傷患者）の CSF で HMGB1 を測定した報告はなく、これらの結果は学術的・国際的に高く評価されると思われる。また、HMGB1 がこれらの患者の予後予測因子となり得るので、患者の治療方針を立てる上で有用であり、その社会的意義は非常に高い。

3) 今後の展望

HMGB1 が急性中枢神経障害の病態に深く関わり、その濃度上昇が神経細胞死に影響する可能性が高くなり、また O₂˙⁻ との関連も示唆された。今後はラット脳障害モデルを用いて、経時的に測定できる O₂˙⁻ をコントロールする方法で、HMGB1 に関連する障害に対する治療効果を検討する。

E. 結論

本年度の研究ではラット前脳虚血モデルで

HMGB1 と O2- の相関性を証明した。また、HMGB1 は神経学的に異常のないヒト CSF 中には存在せず、重症頭部外傷患者の CSF 中で著明に上昇した。すなわち、HMGB1 は急性中枢神経障害時の病態と密接に関連することが分かった。また、CSF 中の HMGB1 が著明に上昇する患者では、6 ヶ月後の神経学的予後は不良であり、HMGB1 は予後予測マーカーとして利用し得ることを証明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

安波洋一 福岡大学医学部再生・移植医学・教授

研究要旨

膵島の肝内移植時に発現する移植早期の自然免疫拒絶反応による移植膵島障害に HMGB1 が必須の役割を担っていることが明らかになった。更に、HMGB1 を標的にした治療法により移植早期膵島障害が制御できることを見出した。

A. 研究目的

免疫細胞における HMGB1 の発現と拒絶反応との関連を解明し、HMGB1 への介入による拒絶反応の制御法を開発する。

B. 研究方法

自然免疫拒絶反応に於ける HMGB1 の役割をマウス実験系で解析した。

（倫理面への配慮）

本研究プロジェクトは福岡大学アニマルセンター動物実験倫理委員会で承認された。

C. 研究結果

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 HMGB1 が必須の役割を担っていることが判明した。血中 HMGB1 値が膵島移植後早期、6 時間をピークに上昇し、NK T 細胞、Gr-1+CD11b+細胞を活性化、炎症性サイトカイン産生を誘導し、移植膵島を破壊するメカニズムが明らかとなった。また抗 HMGB1 抗体の投与によりこれらの反応が抑制され、移植早期膵島障害が制御できた。今後はマウスで見出された HMGB1 の新規知見がヒトに適用できるかどうかを外科的切除肝臓組織よりの単離肝リンパ球を用いて確認し、HMGB1 を標的にした治療法の臨

床応用を目指す。

D. 評価

1) 達成度について

HMGB1 を介した移植後早期に発現する移植膵島の自然免疫拒絶反応のメカニズム、ならびにその制御法が明らかにすることができ、平成 19 年度の研究目的は達成できた。

2) 研究の意義について

本研究成果の臨床応用によりインスリン依糖尿病の新規治療法である膵島細胞移植の臨床成績の向上に大きく貢献することが期待できる。

3) 今後の展望

ヒト免疫系での HMGB1 を介した膵島拒絶反応の機序を詳細に明らかにし、臨床応用可能な方法を見いだす。

E. 結論

膵島移植早期に発現する自然免疫拒絶反応は HMGB1 を標的にした治療法で制御できることが判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

① T Kajiwara, Y Tomita, S Okano, T Iwai, Y Yasunami, Y Yoshikai, K Nomoto, R Tominaga, H