

200817002A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山 征郎

平成21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	7
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・北川雄光	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	16
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	19
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	30
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	32
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

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・手術などの生体侵襲は、局所化、終息化するベクトルと、時間的空間的に拡大するベクトルを有する。後者の場合には、侵襲は周辺に拡大するのみか、遷延化し、時として原発臓器以外の第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？
- なぜ局所の病変が全身症状に発展するのであろうか？
- なぜ急性の疾患は慢性化するのであろうか？

これらの病態に介在（メディエート）する因子：いわゆるメディエーターは何であらうか？最近の進歩で、このメディエーターの一つとしてTNF α があげられ、TNF α 抗体やその受容体のインヒビター、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を示している。一方、近年になり、我々を含む海外のグループが、新規のメディエーターとしてHMGB1の関与を検証してきた。DNA結合蛋白HMGB1は多くの有核細胞、あるいは活性化マクロファージ・樹状細胞から遊離・放出されて、血行性、（そして恐らくリンパ行性）に遠隔の第2、第3の臓器に運ばれ、その遠隔臓器細胞の受容体RAGE、あるいはToll Like Receptor-2, -4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、局所障害を慢性化、あるいは拡大すること、すなわちHMGB1こそ、炎症の遠隔臓器への“転移”、そして臓器不全、炎症慢性化の“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証明しつつある。これらの一連の研究で明らかにされてきたことは、HMGB1は局所的には【止血】、【自然免疫】、そして最終的には、傷害組織の【修復】のアジュバントとして働く生体必須のプログラマーであるが、これが局所に留まらず、全身を循環すると、“炎症の転移”を惹起すること、全身を循環しなくとも、局所で消去されず、遷延して存在すると、“炎症の慢性化”因子として働くということである。

さらに我々は内皮細胞上のトロンボモデュリンが、HMGB1を時間的空間的に必要な部位とタイミング内に封じ込め、全身化と遷延化を防ぐことを最近見出し、Nat. Med誌などが大きく紹介・解説するところとなった。トロンボモデュリンは申請者（丸山）らによって純化・同定、クローニングされた分子で、トロンピンを凝固酵素から抗凝固酵素へて変換する内皮細胞上の膜蛋白である。

本研究は上記のように新展開をみせつつあるオンゴーイングの知見を踏まえ、【HMGB1

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開発】を目的とするものである。

A. 研究目的

臓器不全、ショックや播種性血管内凝固症候群（DIC）などの原因として同定されてきている核内 DNA 結合蛋白 HMGB1 を循環血中から除去あるいは生体内で中和することで、上記疾患・病態の救命的治療法を開発することである。これまでの研究で、小動物（ラット、マウス）を使った実験で、

- 1) 【局所性 HMGB1】は傷害部位の感染防御、止血、そして修復のアジュバントであること、しかるにこの“局所性 HMGB1 が血中を循環して遠隔臓器を巡ると、遠隔臓器に“止血、修復、自然免疫”などの反応が“転移”して、DIC、全身性炎症（SIRS）、最終的にはショックと多臓器不全の原因となること、すなわち【全身性 HMGB1】は敗血症性ショックや DIC、多臓器不全のメディエーターであること、
- 2) この循環性 HMGB1 への介入、すなわち中和抗体、あるいは HMGB1 除去カラムで劇的救命効果が得られることを明らかにしてきた、そこで、最終年度は、
- 3) ヒトへの【医師主導型パイロットスタディ】にトランスレーションすることを最終目標とした。

B. 研究方法

- 1) in vitro 研究：HMGB1 の細胞外遊離機構、受容体との相互反応についての分子細胞機構を研究した
- 2) 引き続きヒト化抗体の作成と活性検証
- 3) ブタの体外循環による HMGB1 の除去：ヒトへの展開の前ステップとして、小児と同サイズのブタ用カラム作成し、パイロットスタディを行った。

これは、ビーズに硫酸セルロファインを固相化したもので、先に作成していた中空系にトロンボモデュリン（TM）を固相化したものと比較した

C. 研究結果と考察

- i. HMGB1 の細胞外遊離機構の解明：培養細胞系においてヒストン脱アセチル化剤で HMGB1 遊離の増加、またアセチル化酵素阻害剤で HMGB1 の細胞外への能動的遊離の抑制が観察され、HMGB1 の細胞外能動的分泌にはアセチル化が重要であることが確認された。HMGB1 の遊離に異常を来たす変異体はすべて生後まもなく死亡したので、細胞外に遊離した HMGB1 が胎生期～生後の成長を阻害した可能性が考えられ、細胞内外での HMGB1 の動態は発生段階において重要な役割を果たしているものと推定された。
- ii. ヒト化 HMGB1 は実験に使用する段階までは到達しえなかった。
- iii. 中空系に HMGB1 の吸着効果のあるトロンボモデュリン（TM）固定化カラムにはヘパリン（-）での対外循環と HMGB1 の吸着効果が確認された。ついでビーズに HMGB1 吸着効果のある硫酸化セルロファインを固定化したカラムを作成し、ブタの対外循環に試用し、凝固阻害剤（ヘパリン、メシル酸ナファモスタットなど）の選択と最適化を模索中である。

D. 結論

“局所性 HMGB1”が侵襲局所の止血、自然免疫、修復のアジュバントであること、局所の場合でも遷延性の存在はその臓器の障害を招くこと、さらには HMGB1 の全身化は多臓器不全、ショック、DICなどの原因であること、動物実験において循環血中の HMGB1 の中和・除去で劇的改善と救命が得られる事に関しては、ほ

ば完全に証明しえた。

現在、これをヒトの治療へトランスレーションするための試行中で、当初の計画より6ヶ月～1年の遅れであるが、今年中には医師主導型のパイロットスタディを開始する予定である。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. Kawahara K, Hashiguchi T, Masuda K, Saniabadi AR, Kikuchi K, Tancharoen S, Ito T, Miura N, Morimoto Y, Biswas KB, Nawa Y, Meng X, Oyama Y, Takenouchi K, Shrestha B, Sameshima H, Shimizu T, Adachi T, Adachi M, **Maruyama I**. Mechanism of HMGB1 release inhibition from RAW264.7 cells by oleanolic acid in *Prunus mume* Sieb. et Zucc. *Int J Mol Med*. 2009; 23: 615-20.
2. Kikuchi K, Kawahara KI, Tancharoen S, Matsuda F, Morimoto Y, Ito T, Biswas KK, Takenouchi K, Miura N, Oyama Y, Nawa Y, Arimura N, Iwata M, Tajima Y, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Yoshida Y, Hashiguchi T, **Maruyama I**. The free-radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells. *J Pharmacol Exp Ther*. IN PRESS
3. Arimura N, Ki-i Y, Hashiguchi T, Kawahara K, Biswas KK, Nakamura M, Sonoda Y, Yamakiri K, Okubo A, Sakamoto T, **Maruyama I**. Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment. *Lab Invest*. 2009; 89: 278-89.
4. Kawahara K, Hashiguchi T, Kikuchi K, Tancharoen S, Miura N, Ito T, Oyama Y, Nawa Y, Biswas KK, Meng X, Morimoto Y, Shrestha B, Sameshima H, **Maruyama I**. Induction of high mobility group box 1 release from serotonin-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med*. 2008; 22: 639-44.
5. Ito T, Kawahara K, Okamoto K, Yamada S, Yasuda M, Imaizumi H, Nawa Y, Meng X, Shrestha B, Hashiguchi T, **Maruyama I**. Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 10:1825-30.
6. Kawahara K, Biswas KK, Unoshima M, Ito T, Kikuchi K, Morimoto Y, Iwata M, Tancharoen S, Oyama Y, Takenouchi K, Nawa Y, Arimura N, Jie MX, Shrestha B, Miura N, Shimizu T, Mera K, Arimura S, Taniguchi N, Iwasaka H, Takao S, Hashiguchi T, **Maruyama I**. C-reactive protein induces high-mobility group box-1 protein release through activation of p38MAPK in macrophage RAW264.7 cells. *Cardiovasc Pathol*. 2008; 17: 129-38.
7. Tajima, A., Kohno, M., Watanabe, M., Izumi, Y., Tasaka, S., Maruyama, I., Miyasho, T., and Kobayashi, K. Occult injury in the residual lung after pneumonectomy in mice. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 7: 1114-1120, 2008.
8. Kakizaki, T., Kohno, M., Watanabe, M., Tajima, A., Izumi, Y., Miyasho, T., Tasaka, S., Fukunaga, K., Maruyama, I., Ishizaka, A., and Kobayashi, K. Exacerbation of Bleomycin-Induced Injury and Fibrosis by Pneumonectomy in the Residual Lung of Mice. *J Surg Res*, 2008. (in press)
9. 1) Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hasegawa A, Noguchi T: Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) reduces the levels of inflammatory mediators by inhibiting NF- κ B. *Inflamm Res*. 2009 Jan 27. (Epub ahead of print)

10. Hagiwara S, Iwasaka H, Matumoto S, Hidaka S, Noguchi T: Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the inflammatory response in vivo and in vitro models. *Crit Care Med* 2009 Dec 26 (Epub ahead of print)
11. Hagiwara S, Iwasaka H, Uchida T, Hasegawa A, Asai N, Noguchi T: *Shock* 2008, Oct 23 (Epub ahead of print)
12. Hagiwara S, Iwasaka H, Maeda H, Noguchi T: Landiolol, an ultra short acting beta1-adrenoceptor antagonist, has protective effects in an LPS-induced systemic inflammation model. *Shock* 2008, Sep 11 (Epub ahead of print)
13. Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Koga H, Noguchi T: Effects of hyperglycemia and insulin therapy on high mobility group box1 in endotoxin-induced acute lung injury in a rat model. *Crit Care Med* 2008; 36: 2407-13
14. Hagiwara S, Iwasaka H, Togo K, Noguchi T: A neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, reduces lung injury following endotoxin-induced shock in rats by inhibiting HMGB1. *Inflammation* 2008; 31: 227-34
15. Hagiwara S, Iwasaka H, Uchino T, Noguchi T: High mobility group box1 reduces a negative inotropic effects on the left ventricle in an isolated rat heart model of septic shock: a pilot study. *Circ J.* 2008;72:1012-7
16. Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Asai N, Noguchi T: High-dose intravenous immunoglobulin G improves systemic inflammation in a rat model of CLP-induced sepsis. *Intensive Care Med.* 2008; 34: 1812-9
17. Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hishiyama S, Nguchi T: Danaparoid sodium inhibits systemic inflammation and prevents endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Crit Care* 2008; 12 : R43 Epub 2008 Apr 2
18. Hagiwara S, Iwasaka H, Shingu C, Noguchi T: Comparison of effects of total enteral versus total parenteral nutrition on ischemic/reperfusion-induced heart injury in rats. *Eur Surg Res* 2008; 40: 361-7
19. Hagiwara S, Iwasaka H, Shingu C, Noguchi T: Effects of enteral versus parenteral nutrition on inflammation and cardiac function in a rat model of endotoxin-induced sepsis. *Shock* 2008; 30: 280-4
20. 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* 2008; 34: 361-7
21. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T: Effects of enteral versus parenteral nutrition on LPS-induced sepsis in a rat model. *J Surg Res* 2008; 145: 251-6
22. 安波洋一。NK T細胞の新展開； 脾島移植拒絶反応とNK T細胞。医学のあゆみ 225(2): 151-155, 2008
23. Into T, Inomata M, Nakashima M, Shibata K, Häcker H, Matsushita K: Regulation of MyD88-dependent signaling events by S-nitrosylation retards Toll-like receptor signal transduction and initiation of acute-phase immune responses. *MolCell Biol* 2008, 28: 1338-1347.
24. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, Matsushita K: Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- signalling. *Cardiovasc Res* 2008, 77:221-230.
25. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M: A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells* 2008, 26: 2408-2418.

2. 学会発表

1. 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, and 小林絃一 肺切除により残存肺でのエンドトキシン投与急性肺損傷は悪化する. 第48回日本呼吸器学会学術講演会 2008. 6. 15-17. 神戸
2. 河野光智, 柿崎徹, 田島敦志, 渡辺真純, 江間俊哉, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, and 小林絃一 肺全摘術は術後残存肺での肺線維化を悪化させる マウス肺全摘+プレオマイシン誘発性肺線維症モデルでの検討. 第108回日本外科学会定期学術集会. 2008. 5. 15-17. 長崎
3. 河野光智, 田島敦志, 池田達彦, 江間俊哉, 泉陽太郎, 渡辺真純, 堀之内宏久, 川村雅文, and 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. 第49回日本肺癌学会総会. 2008. 11. 13, 14. 北九州
4. 高野公德, 篠田昌宏, 他 (1/16). プタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB-1 動態の検討. 日本消化器病学会, 福岡, 2008.5.
5. 高野公德, 篠田昌宏, 他(1/16). プタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB1 動態の検討. 日本外科学会, 長崎, 2008.5.
6. 高野公德, 他. プタ劇症肝不全モデルにおける血清中 High-mobility group box 1 動態. 日本消化器外科学会, 札幌, 2008.7.
7. 篠田昌宏, 高野公德, 他 (1/16). 薬剤誘導性プタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB-1 動態の検討. 日本移植学会, 大阪, 2008.9.
8. 吉川貴久, 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 山田晋吾, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光: 敗血症に対する γ グロブリン製剤の有効性に関する基礎的検討. 第63回日本消化器外科学会総会, 北海道, 2008. 口演
9. 吉川貴久, 須田康一, 竹内裕也, 大山隆史, 宮庄拓, 岡本実, 山田晋吾, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光: 食道癌手術患者の HMGB-1 術前値の臨床的意義の検討. 第15回外科侵襲とサイトカイン研究会, 岩手, 2008. 口演
10. 吉川貴久, 須田康一, 竹内裕也, 大山隆史, 宮庄拓, 岡本実, 山田晋吾, 横田博, 丸山征郎, 石坂彰敏, 北川雄光: 食道癌手術患者の HMGB-1 術前値の臨床的意義の検討. 第109回日本外科学会定期学術集会, 福岡, 2009. ポスター
11. 伊東威, 新田智之, 米良利之, 小島大望, 松岡信秀, 中野昌彦, 金城亜哉, 山下裕一, 安波洋一. 移植臓器から HMGB1 が放出され早期グラフト障害を惹起する. 第36回膵・膵島移植研究会, 福岡 2/27-28, 2009
12. 杉浦進介, 江口傑徳, 猪俣恵, 小松寿明, 松下健二: エンドトキシンショック制御を目的とした HMGB1 のアセチル化・放出の制御 第14回日本エンドトキシンショック研究会, 平成20年10月25日, 仙台
13. 猪俣恵, 江口傑徳, 杉浦進介, 小松寿明, 松下健二: Th1 および Th2 由来サイトカインは STAT の活性化を介して Weibel-Palade Body の構成因子の発現を変化させる BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 2008年12月9日, 神戸,
14. 杉浦進介, 江口傑徳, 猪俣恵, 小松寿明, 野口俊英, 松下健二: ヒストンアセチル化制御薬による新規炎症性サイトカイン HMGB1 の放出制御 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会), 2008年12月12日, 神戸

国際学会

1. Takano K, Shinoda M, Tanabe M, et al (1/16). An increased serum level of high-mobility group BOX-1 in the fulminant hepatic failure model. American Society of

- Transplantation 12th Annual Winter Symposium, Palm Springs, 2008.3.
2. Takano K, Shinoda M, et al (1/16) . An increased serum level of high-mobility group box 1 in the pig fulminant hepatic failure model. Digestive Disease Week, San Diego, 2008.5.
 3. Takahisa Yoshikawa, Hiroya Takeuchi, Koichi Suda, Taku Miyasho, Minoru Okamoto, Shingo Yamada, Hiroshi Yokota, Ikuro Maruyama, Akitoshi Ishizaka, Yuko Kitagawa ; Preoperative HMGB-1 levels possibly relate to the occurrence of postoperative complications after esophagectomy. The 3rd International Damaged Associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs) and Alarmins Symposium. PA, USA, 2008. Poster
 4. Takano K, Shinoda M, Tanabe M, et al (1/16) . An increased serum level of high-mobility group BOX-1 in the fulminant hepatic failure model. American Society of Transplantation 12th Annual Winter Symposium, Palm Springs, 2008.3.
 5. Takano K, Shinoda M, et al (1/16) . An increased serum level of high-mobility group box 1 in the pig fulminant hepatic failure model. Digestive Disease Week, San Diego, 2008.5.
 6. T Nitta, N Matsuoka, T Itoh, T Mera, A Kinjo, M Nakano, Y Yamashita, Y Yasunami. Adenosine has an inhibitory effect on NKT cells facilitating to prevent early loss of transplanted islets in association with engraftments. X X I I International Congress of the Transplantation Society (Transplantation 86(2S):447,2008), August 10-14, 2008, Sydney, Australia
 7. T Itoh, R Nakagawa, Matsuoka, N Nagata, T Nitta, T Mera, Y Yamashita, K Okamoto, H Yamamoto, S Yamada, I Maruyama, M Taniguchi, Y Yasunami. A novel mechanism involved in early loss of transplanted islets in the liver mediated by HMGB1. Accepted for oral presentation in 2009 Annual Congress of American Diabetes Association.
- G. 知的財産権の出願。登録状況
特になし

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 鹿児島大学大学院歯学総合研究科・教授

研究要旨

HMGB1の細胞外への分泌は壊死細胞由来の受動的分泌と、活性化免疫細胞などからの能動的分泌がある。この両者には分子的差異はなく、いずれもアセチル化されている。本年度は、特殊ではあるが、その病態への関与が重要な、移植免疫の際のHMGB1の遊離機構について研究した。また細胞外のHMGB1を局所へ封じ込めて全身化をブロックする生体の仕組みについて研究した。前者では培養血管内皮細胞にT細胞が接着することで、双方の細胞からHMGB1が能動的に細胞外に遊離されることを*in vitro*の系で証明した。これは移植片の拒絶反応に関係しているものと考えられた。

また臨床では細胞外に遊離したHMGB1の運命やダイナミクスがとりわけ重要であるが、今回は、トロンボモデュリン(TM)のN末端にHMGB1は吸着・中和され、その後、トロンピン・TM複合体で分解されることを*in vitro*の実験系で証明した。これは遺伝子組換えTMの有効性の分子細胞的基盤となっているものと推定された。

A. 研究目的

本年度の研究は次の2つに分けて記載する。

1. 移植に際する拒絶反応とHMGB1の動態とその制御

免疫応答の一つの典型的な例として異種移植を挙げることができる。この場合の最大の問題点の一つである慢性的拒絶反応をモデルとして研究した。すなわち、移植片内の血管内皮細胞活性化、血栓形成、自然免疫誘導などの発症の分子細胞機構を、HMGB1のダイナミズムの点から検討した。

これまで、HMGB1は、敗血症の後期メディエーターとして報告されており、筆者らも現在までに、HMGB1が様々な慢性疾患(関節リウマチ、動脈硬化、歯周病)の病態に関係することを報告してきた。これらの病

態では細胞外に放出されたHMGB1は、サイトカインの産生、接着因子の活性化、細胞のmigration、を惹起し炎症の遷延・拡大を引き起こす。

移植とHMGB1に関しても、抗HMGB1抗体等により移植片の拒絶が抑制することが報告されている。しかしながら、HMGB1の放出経路、機構は未だ不明なところが多い。したがって、この経路、機構を解明することは新規の移植の治療法の開発につながる。そこで我々は、ヒト白血球とブタ内皮細胞を用いてHMGB1の放出の検討を行った。

【方法】

1. 移植に際するHMGB1の動態

(1)ヒトT細胞、B細胞、単球、好中球は磁気細胞分離システムを用いて単離した。

(2) 単離後、それぞれの細胞とブタ血管内皮細胞の共培養系における培養液中の HMGB1 の動態をウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法にて確認した。

【結果】

1. ヒト白血球とブタ内皮細胞との共培養により HMGB1 の放出を惹起した (図 1)。

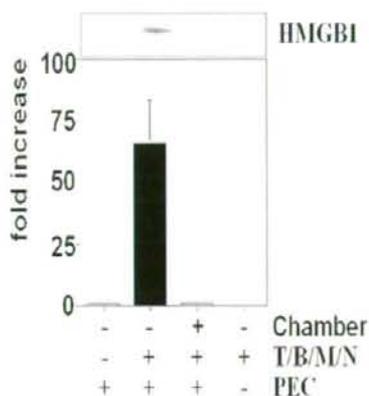


図 1

2. MACS ビーズを用いて、T 細胞、B 細胞、単球、好中球を分離し、それぞれの細胞とブタ血管内皮細胞とを共培養した。その結果、T 細胞とブタ血管内皮細胞の共培養のみが HMGB1 の放出を惹起した (図 2)。

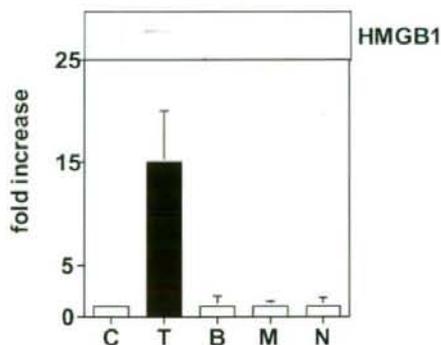
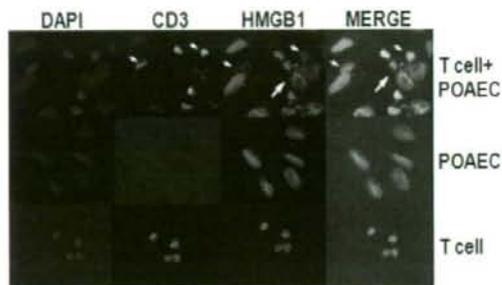


図 2

3. 蛍光免疫染色法において、T 細胞、ブタ血管内皮細胞の両細胞から HMGB1 の核から細胞質への移動を確認した。放出された HMGB1 は、両細胞に由来することが示唆された (図 3)。



【考察】

慢性期における移植片の血管の障害・血栓形成、そして移植片の機能不全・廃絶は、最終的には拒絶につながる大きな問題の一つとして残されてきた。今回我々は、炎症の終期メディエータとして登場してきた HMGB1 と、我々が明らかにした HMGB1 の向血栓活性に焦点を絞り、異種移植の問題を検討した。結果、移植片-宿主間には、血管内皮細胞上の HMGB1 /TM・PC 系の "Perturb(騒乱)" という新たな問題が存在することが判明した。これは、今まで見落とされてきた新たで、重要な視点である。

2. HMGB1 の制御

障害局所で壊死細胞から細胞外に遊離してきた HMGB1 は、自然免疫、止血そして修復のアジュバントとして働く。しかし HMGB1 が血管内に流入し、**全身を循環**すると、炎症や凝固反応を遠隔臓器へ“転移”させ、SIRS, DIC, MOF などのインデューサーとして働く。したがって、HMGB1 を障害局所に留めおく仕組みの解明や全身化の防御策は SIRS, DIC, MOF の制御につながる事が期待される。

我々は、先に、Thrombomodulin (TM) の N 末端レクチン様ドメインが HMGB1 を吸着し、その催炎症を中和することを報告した (Abeyama, K. et al. J.Clin. Invest.)。しかし TM のレクチン様ドメインに結合した後の HMGB1 の運命に関しては不明であった。そこで、今回この点に関して研究した。

【方法および結果】

純化 HMGB1 をトロンビン、あるいはトロンビン、TM存在下でインキュベートし、HMGB1 分子の動態を電気泳動下にフォローし、断片の構造や機能について調べ、かつ DIC や敗血症患者の血中でも HMGB1 分子の動態を解析した。

結果、トロンビン単独の場合と比較して、TM存在下では HMGB1 の分解は促進され、T・TM 複合体は、HMGB1 の N 末側から 10 番目のアルギニンと 11 番目のグリシン結合を効率よく切断した。この 10 残基除かれた HMGB1 (deg-HMGB1) は、pro-inflammatory 活性 (TNF- α 産生) が減弱した。さらに、この deg-HMGB1 は、エンドトキシンショックモデルマウス、そして、ヒト検体中にも検出された。

【考察】

TM は E456 の部位でトロンビンを吸着し、これを抗凝固酵素に変換する一方、炎症サイトカイン HMGB1 を吸着し、さらに T・TM 複合体は、HMGB1 を分解することが示された。これらのことから、TM は抗凝固活性の他に、炎症性サイトカイン HMGB1 の全身化を防御し抗炎症活性をも発揮して病態を制御しているものと考えられる。

G. 研究業績

1. 論文発表

1. Kawahara K, Hashiguchi T, Masuda K, Saniabadi AR, Kikuchi K, Tancharoen S, Ito T, Miura N, Morimoto Y, Biswas KB, Nawa Y, Meng X, Oyama Y, Takenouchi K, Shrestha B, Sameshima H, Shimizu T, Adachi T, Adachi M, **Maruyama I**. Mechanism of HMGB1 release inhibition from RAW264.7 cells by oleanolic acid in *Prunus mume* Sieb. et Zucc. *Int J Mol Med*. 2009; 23; 615-20.
2. Kikuchi K, Kawahara KI, Tancharoen S, Matsuda F, Morimoto Y, Ito T, Biswas KK, Takenouchi K, Miura N, Oyama Y, Nawa Y, Arimura N, Iwata M, Tajima Y, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Yoshida Y, Hashiguchi T, **Maruyama I**. The free-radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells. *J Pharmacol Exp Ther*. IN PRESS

3. Arimura N, Ki-i Y, Hashiguchi T, Kawahara K, Biswas KK, Nakamura M, Sonoda Y, Yamakiri K, Okubo A, Sakamoto T, **Maruyama I**. Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment. *Lab Invest.* 2009; 89: 278-89.
4. Kawahara K, Hashiguchi T, Kikuchi K, Tancharoen S, Miura N, Ito T, Oyama Y, Nawa Y, Biswas KK, Meng X, Morimoto Y, Shrestha B, Sameshima H, **Maruyama I**. Induction of high mobility group box 1 release from serotonin-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med.* 2008; 22: 639-44.
5. Ito T, Kawahara K, Okamoto K, Yamada S, Yasuda M, Imaizumi H, Nawa Y, Meng X, Shrestha B, Hashiguchi T, **Maruyama I**. Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 10:1825-30.
6. Kawahara K, Biswas KK, Unoshima M, Ito T, Kikuchi K, Morimoto Y, Iwata M, Tancharoen S, Oyama Y, Takenouchi K, Nawa Y, Arimura N, Jie MX, Shrestha B, Miura N, Shimizu T, Mera K, Arimura S, Taniguchi N, Iwasaka H, Takao S, Hashiguchi T, **Maruyama I**. C-reactive protein induces high-mobility group box-1 protein release through activation of p38MAPK in macrophage RAW264.7 cells. *Cardiovasc Pathol.* 2008; 17: 129-38.
- E. 知的財産権の出願。登録状況
特になし

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

北川雄光 慶應義塾大学医学部外科・教授

研究要旨

胸腔鏡下肺切除が低侵襲手術として普及してきているが、臨床では標準化した研究の組み立てが困難であり、侵襲の評価が難しい。そこで、マウスにおいて5mmの小さな創で肋間筋以外の筋肉を切断しない小開胸手術と、20mmの創で筋肉切断と肋骨切断を伴う大開胸手術とで左肺全摘術後の回復を比較した。また残存肺に生じる肺損傷を比較し、特に炎症・ショックのメディエーターとして注目されるHigh mobility group box 1(HMGB1)に注目した。術後の摂食量は群間で有意差を認めないが、術後1日から5日目までの体重減少が小開胸群で有意に少なかった。術前体重に回復するまでに要する日数は小開胸群では 3.0 ± 0.6 日、大開胸群では 5.3 ± 0.8 日だった。自発運動量は大開胸群に比較し小開胸群で有意に多かった。術後の残存肺における肺湿乾重量比及び肺血管透過性、肺胞洗浄液中のHMGB1濃度は大開胸群と比較して小開胸群では有意に低値であった。マウス肺切除術モデルにおいて体重減少と自発運動量とで外科的侵襲を評価すると、小開胸では大開胸と比較して低侵襲であった。また、残存肺に生じるoccult lung injuryも小開胸により軽減されており、HMGB1の放出を抑制することによって、術後の呼吸器合併症の発症や重篤化を抑制する可能性が示唆された。

また治療に難渋する劇症肝不全の病態にHMGB1が関与していると考え、HMGB1制御が劇症肝不全の病態を改善するという仮説のもと、マウス劇症肝炎モデルを用いて検討した。結果劇症肝炎モデルではHMGB1の上昇を認め、更にHMGB1阻害が劇症肝不全の生存率において改善を示した。

A. 研究目的

- (1) 胸腔鏡を用いて小さな創で肺切除を行う手術が低侵襲手術として普及してきている。低侵襲であることの評価には、鎮痛剤の投与量が少なくすむこと、術後在院日数が少ないこと、血中のサイトカイン濃度の上昇が抑えられることなどの臨床的報告がある。しかしながら臨床では標準化した研究の組み立てが困難であり、侵襲の評価が難しい。これまでに我々は肺切除術後の残存肺に生じるoccult lung injury が術後呼吸器合併症の発

症や重篤化に影響を及ぼす可能性をマウス肺切除モデルで示しているが、胸腔鏡下手術が残存肺に及ぼす影響は不明である。マウスにおいて、5mmの小さな創で肋間筋以外の筋肉を切断しない小開胸手術と、20mmの創で筋肉切断と肋骨切断を伴う大開胸手術とで左肺全摘術後の回復を比較する。残存肺に生じる肺損傷を比較し、特に炎症・ショックのメディエーターとして注目されるHigh mobility group box 1(HMGB1)に注目する。

- (2) 広範な肝細胞壊死を特徴とする劇症肝不全

においてHMGB1が病態に深く関わっているという仮説のもと、劇症肝不全において新たな治療法を開発すべく本実験に着想した。今回の研究はHMGB1阻害が劇症肝不全の病態改善につながるかどうかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

- (1) C57BL/6マウス(雄性,8週齢)に対し人工呼吸管理下(1回換気量0.2ml、換気回数80/分、PEEP 2cm/H₂O、FiO₂: 0.21)に小開胸(Mini-ThX)或いは大開胸(後側方開胸: PLT-ThX)で左肺全摘術(PNX)を施行する。術後10日間の体重変化と摂食量、自発運動量を比較、評価する。また術後24時間で、残存右肺において肺湿乾重量比と肺血管透過性、肺胞洗浄液中のHMGB1濃度測定を行う。小開胸のみ(Mini-ThX)、小開胸+肺全摘(Mini-ThX+PNX)、後側方開胸のみ(PLT-ThX)、後側方開胸+肺全摘(PLT-ThX+PNX)の4群を作成した。
- (2) <実験1: ラット劇症肝不全モデルにおけるHMGB-1動態の検討> (1) SDラット(体重250-300 g)にイソフルレン全身麻酔下にD-ガラクトサミン(1.4 g/Kg)を陰茎静脈より静脈内投与し、薬剤性劇症肝不全を誘発する。(2) 劇症肝不全誘発後12時間毎に各種パラメータを測定・評価し、HMGB-1動態を検討する。<実験2: ラット劇症肝不全モデルにおける抗HMGB1抗体投与の予後改善効果の検討> (1)<実験1>と同様のラット薬剤性劇症肝不全モデルを作成する。(2)(1)の直後に、治療群に対しては抗HMGB1抗体(6mg/Kg)を、対照群にはコントロール抗体を(6mg/Kg)を静脈内投与し劇症肝不全誘発後12時間毎に各種パラメータを測定・評価し、HMGB1動態および、治療効果を検討する。

C. 研究結果

- (1) 術後の摂食量は群間で有意差を認めないが、術後1日から5日目までの体重減少が小開胸群で有意に少なかった($p < 0.05$) (Figure 1, 2)。術前体重に回復するまでに要する日数は小開胸群では 3.0 ± 0.6 日、大開胸群では 5.3 ± 0.8 日だった。自発運動量は大開胸群に比較し小開胸群で有意に多かった ($p < 0.05$) (Figure 3)。術後の残存肺における肺湿乾重量比(4.2 ± 0.2 vs 6.0 ± 0.7 ; $p < 0.05$) (Figure 4A)及び肺血管透過性(0.006 ± 0.001 vs 0.008 ± 0.001 ; $p < 0.05$) (Figure 4B)、肺胞洗浄液中のHMGB1濃度(49 ± 9 vs 123 ± 30 ng/ml; $p < 0.05$)は大開胸群と比較して小開胸群では有意に低値であった(Figure 5A)。

Figure 1

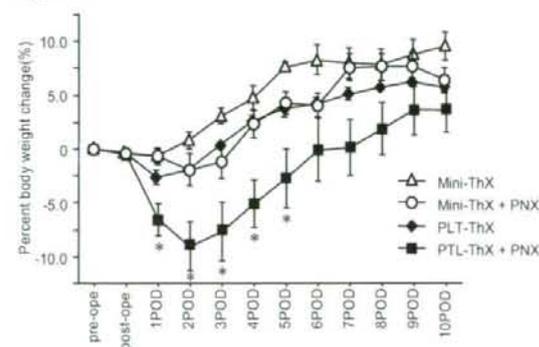


Figure 2

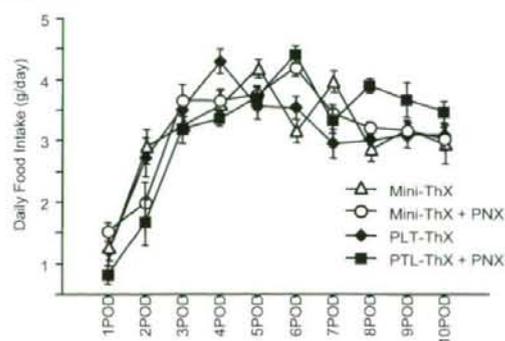


Figure 3

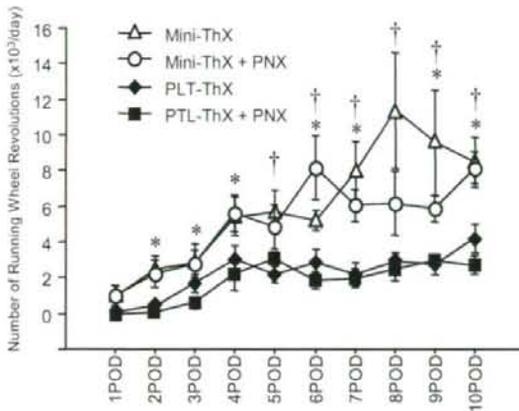


Figure 5A

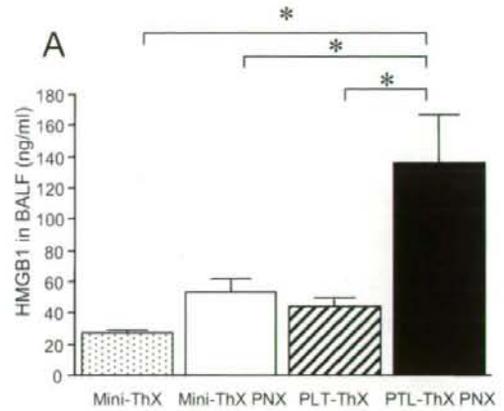


Figure 4A

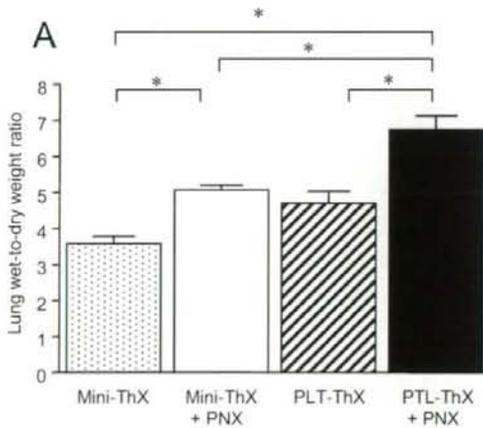


Figure 5B

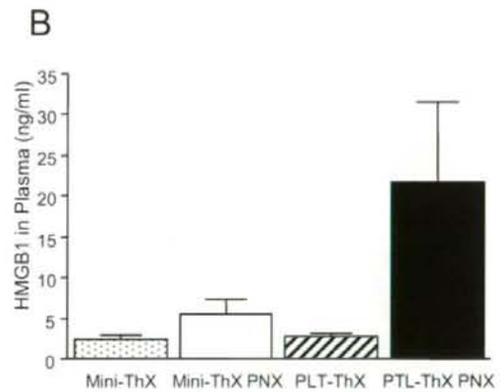
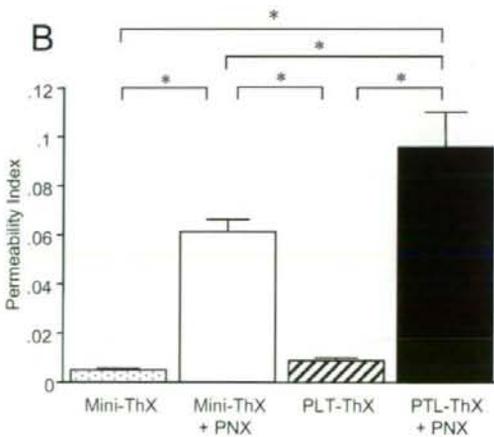
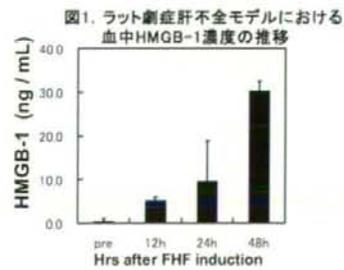


Figure 4B

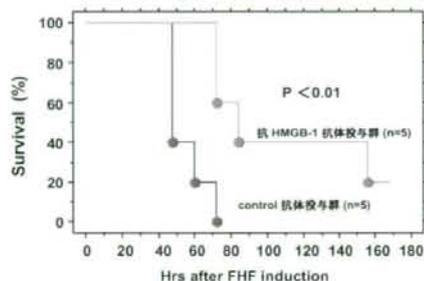


(2) <実験1>劇症肝不全誘導後に経時的に血清HMGB1の上昇が確認された(図1)。



＜実験2＞抗HMGB-1抗体投与群では control 抗体投与群と比較して有意に生存率が改善した (図2)。劇症肝不全誘発48時間後の血清中 HMGB1は、対照群が 39.9 ± 3.54 (pg/mL) であったのに対し、治療群では 11.4 ± 4.68 (pg/mL) と上昇が抑制された。また同採血においてAST(17333 ± 3136 Vs 6746 ± 1698 IU/mL)、ALT(11065 ± 3073 Vs 6373 ± 1427 IU/mL)、LDH(6764 ± 4462 Vs 1879 ± 1050 IU/mL)が、治療群で有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

図2. ラット劇症肝不全モデルに対する抗HMGB-1抗体投与の治療効果 (生存曲線)



D. 考察

(1) 肺切除術施行後の残存肺には肺炎を合併しやすく、また重篤化する率も高い。手術侵襲のためと考えられているが、そのメカニズムの詳細は不明である。これまでに我々は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やブレオマイシン誘発性肺線維症へ及ぼす影響を明らかにしてきた。肺切除は残存肺に HMGB1 を始めとする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やブレオマイシン誘発性肺線維症を悪化させると考えられた。今回の実験では残存肺に生じる occult lung injury が小開胸下に行うことにより軽減されており、肺での HMGB1 濃度の上昇を抑制することによって、術後の呼吸器合併症の発症や重篤化を抑制する可能性が示唆された。

(2) 劇症肝不全の病態に HMGB1 が深く関与しており、HMGB1 制御が劇症肝不全の病態を改善すると考えられた。

E. 結論

(1) マウス肺切除術モデルにおいて体重減少と自発運動量とで外科的侵襲を評価すると、小開胸では大開胸と比較して低侵襲であった。また、残存肺に生じる occult lung injury も小開胸により軽減されており、術後の呼吸器合併症の発症や重篤化を抑制する可能性が示唆された。

(2) HMGB1 制御がラット劇症肝不全モデルの病態と予後を改善した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tajima, A., Kohno, M., Watanabe, M., Izumi, Y., Tasaka, S., Maruyama, I., Miyasho, T., and Kobayashi, K. Occult injury in the residual lung after pneumonectomy in mice. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 7: 1114-1120, 2008.
- Kakizaki, T., Kohno, M., Watanabe, M., Tajima, A., Izumi, Y., Miyasho, T., Tasaka, S., Fukunaga, K., Maruyama, I., Ishizaka, A., and Kobayashi, K. Exacerbation of Bleomycin-Induced Injury and Fibrosis by Pneumonectomy in the Residual Lung of Mice. *J Surg Res*, 2008. (in press)

2. 学会発表

- 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, and 小林絢一 肺切除により残存肺でのエンドトキシン投与急性肺損傷は悪化する。第48回日本呼吸器学会学術講演会 2008. 6. 15-17. 神戸
- 河野光智, 柿崎徹, 田島敦志, 渡辺真純,

江間俊哉, 泉陽太郎, 川村雅文, 堀之内宏久, and 小林絃一 肺全摘術は術後残存肺での肺線維化を悪化させる マウス肺全摘+ブレオマイシン誘発性肺線維症モデルでの検討. 第 108 回日本外科学会定期学術集会. 2008. 5. 15-17. 長崎

3. 河野光智, 田島敦志, 池田達彦, 江間俊哉, 泉陽太郎, 渡辺真純, 堀之内宏久, 川村雅文, and 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. 第 49 回日本肺癌学会総会. 2008. 11. 13, 14. 北九州

国際学会

1. Takano K, Shinoda M, Tanabe M, et al (1/16) . An increased serum level of high-mobility group BOX-1 in the fulminant hepatic failure model. American Society of Transplantation 12th Annual Winter Symposium, Palm Springs, 2008.3.
2. Takano K, Shinoda M, et al (1/16) . An increased serum level of high-mobility group box 1 in the pig fulminant hepatic failure model. Digestive Disease Week, San Diego, 2008.5.

国内学会

1. 高野公德, 篠田昌宏, 他 (1/16) . プタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB-1 動態の検討. 日本消化器病学会, 福岡, 2008.5.
2. 高野公德, 篠田昌宏, 他(1/16). プタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB1 動態の検討. 日本外科学会, 長崎, 2008.5.

3. 高野公德, 他. プタ劇症肝不全モデルにおける血清中 High-mobility group box 1 動態. 日本消化器外科学会, 札幌, 2008.7.
4. 篠田昌宏, 高野公德, 他 (1/16) . 薬剤誘導性プタ劇症肝不全モデルにおける血清中 HMGB-1 動態の検討. 日本移植学会, 大阪, 2008.9.

II. 知的財産権の出願・登録状況

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教室呼吸器内科・教授

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、重度の局所炎症性疾患などがあげられる。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）、これら原因疾患における 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患者の臨床検体を用いて検討を行った。結果、(1) 抗生剤を使用しない CLP ラットに対する γ グロブリン製剤投与実験により、汎発性腹膜炎による敗血症に対する γ グロブリン製剤大量投与の有効性が示唆された。(2) 食道癌手術において手術直前の血清 HMGB1 濃度の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。また、ステロイド投与により高 HMGB1 血症を改善できる可能性が示唆された。

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

我々は今年度以下の点について研究をおこなった。

- (1) 盲腸結紮穿孔(Cecal ligation and puncture; CLP)ラットに対する γ グロブリン製剤投与の有効性と HMGB1 の制御について検討する。
- (2) 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して検討する。
- (3) 片肺全摘手術により残存肺に肺損傷を起こしえる。そこで手術の侵襲の差を小開胸手術と大開胸手術とで比較しその肺損傷の程度を検討し、さらに HMGB1 値の変動について検討する。

- (4) 広範な肝細胞壊死を特徴とする劇症肝不全において HMGB1 が病態に深く関わっているという仮説のもと HMGB1 阻害が劇症肝不全の病態改善し得るかについて検討する。

B. 研究方法

- (1) ラット (SD, 8 週齢, 250-300g, オス) を用いて CLP モデルを作成した。モデル作成 24 時間前, 1 2 時間前, モデル作成直前の計 3 回, 大量投与 (High) 群 (n=11): γ グロブリン 150mg/3ml/回, 通常量投与 (Low) 群 (n=10): γ グロブリン 30mg/3ml/回, コントロール (High) 群 (n=12): 生理食塩水 3ml/