

回を皮下注射し、7日間生存観察を行った。次に、各群 n=12 において血清 HMGB1 値および各種サイトカイン値(TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10)を手術4時間後、8時間後、20時間後、44時間後に測定した。さらに、各種臓器機能を評価するために採血(alb, LDH, AST, ALT, BUN, Cr, エンドトキシン値, 手術4時間後, 各群 n=6), 肺の病理組織像(手術8時間後, 各群 n=3)についても検討した。

- (2) 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HMGB1濃度と術後合併症の関係に関して検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

動物実験に関しては慶應義塾大学医学部倫理委員会承認のもと、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。また、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) 手術7日後の生存率はHigh群:8/11(73%), Low群:4/10(40%), コントロール群:4/12(33%)であり、Low群では生存率の改善を認めなかったが、High群では有意に生存率が改善した(p=0.037)。

手術4時間後の採血では腎機能の指標となるBUN, Cr値の上昇がHigh群で有意に抑制された(p<0.05)。肺組織像を含む他の臓器機能およびエンドトキシン値においても同様の傾向が見られたが、有意差は認めなかった。

経時採血におけるサイトカインの評価では、手術4時間後におけるHMGB1値の上昇

がHigh群では有意に抑制された(p<0.05)。他のサイトカイン(TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10)においては同様の傾向は見られなかった。

- (2) 術前ステロイド非投与、術前ステロイド投与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、重篤な合併症の発症率が低い傾向を認めた。

### D. 考察

- (1) 抗生剤を使用しないCLPラットに対する $\gamma$ 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 $\gamma$ グロブリン製剤大量投与の有効性が示唆された。肺組織像を含む各種臓器機能の評価では、 $\gamma$ グロブリン製剤を投与することによりdose-dependentに臓器障害を抑制できる傾向があり、血清BUN, Cr値においては有意差を認めた。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ことが推測されている。今回の検討においても術後8時間以内に死亡する重症度の高いラットでは生存例に比し、手術後4時間におけるHMGB1値が有意に高かった。一方、他のサイトカインでは同様の傾向は見られず、術後のHMGB1値の上昇が $\gamma$ グロブリン製剤の大量投与により抑制されたことが、臓器障害を軽減できた要因のひとつと考えられた。

- (2) これまでに我々が示唆した術前血清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、今回の研究結果により裏付けられた。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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし

### 2. 学会発表

国内

1. 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
2. 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
3. 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

海外

1. 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 3<sup>rd</sup> International

Damaged Associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs) and Alarmins Symposium. PA, USA, 2008. Poster

2. 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.
3. 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.

## 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、高血糖等の影響を検討する。

#### A. 研究目的

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。

#### (倫理面への配慮)

本研究での動物実験に際して、動物の愛護及び管理に関する法律、実権動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準を遵守するとともに、大分大学規定の動物実験の実施に関する基本指針、動物の処分方法に関する指針に基づき、実験計画書を動物実験委員会に申請し、委

員会の承認を得て、適正な飼育保管基準に即し、本研究を実施した。

#### 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。高血糖の管理も HMGB1 制御に重要と考えられた。

## 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) Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hasegawa A, Noguchi T: Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) reduces the levels of inflammatory mediators by inhibiting NF- $\kappa$ B. *Inflamm Res*. 2009 Jan 27. (Epub ahead of print)
- 2) 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)
- 3) Hagiwara S, Iwasaka H, Uchida T, Hasegawa A, Asai N, Noguchi T: *Shock* 2008, Oct 23 (Epub ahead of print)
- 4) 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)
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hishiyama S, Noguchi T: Danaparoid sodium inhibits systemic inflammation and prevents endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Crit Care* 2008; 12 : R43 Epub 2008 Apr 2
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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

### 2. 学会発表

- 1) 岩坂日出男 : HMGB1 吸着カラム (シンポジウム) 第 29 回日本アフェレーシス学会学術大会

## 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

海里マリン病院 中島 利博 部長

### 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分泌される。これらの経路における HMGB1 には転写後修飾の違いがあることが報告され、能動的分泌される HMGB1 はアセチル化されていることが明らかにされている。アセチル化修飾を受けるリジン残基はそのレセプターの1つである RAGE 結合領域内にあることから、受動的に放出される HMGB1 と細胞壊死により分泌された HMGB1 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マウスを作製した。また血清中に放出された HMGB1 の機能を明らかにするため、様々な病態モデルマウスを作製し HMGB1 の発現量を検討した。

### 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。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。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。また HMGB1 は細胞の増殖や免疫応答においても機能することから、様々な病態モデル動物を用いて HMGB1 の関与さらにはアセチル化による調節についても検討していく。

### B. 研究方法

薬剤誘導型 HMGB それぞれの変異体遺伝子（細胞外分泌型、非アセチル化型、疑アセチル化型）を野生型マウスの受精卵および

HMGB1 の発現を非誘導時に抑制する tet リプレッサーマウスの受精卵に挿入しトランスジェニックマウスの作製を行った。

病態モデルマウス（骨粗鬆症モデル、コラーゲン誘導型関節炎、腎繊維化モデル、遅延型アレルギーモデル）を作製し、マウスの血清および組織を採取した。血清中の HMGB1 量を ELISA を用いて測定した。

### C. 研究結果

細胞分泌型 HMGB1 を導入した結果得られた個体はほとんど野生型であり、HMGB1 遺伝子をもったほとんどの個体は生後 3 週間以内に死亡した。生存しているマウスからは外来の分泌型 HMGB1 のタンパク質発現は認められなかった。また tet リプレッサー遺伝子と HMGB1 を同時に持つ個体は得られなかった。

病態マウスで血清中 HMGB1 の発現量を調べたところ、塩化ピクリル誘導のアレルギー皮膚炎のマウスにおいて同時にユビキチン化酵素を抑えた場合に炎症と発現量に逆相関が見られた。

#### D. 考察

分泌型 HMGB1 導入個体は得られなかったことから、細胞外での HMGB1 の発現が細胞に対して毒性を示していることが示唆された。このことから発現誘導型のトランスジェニックマウスを確立する必要があると考えられる。病態モデルの解析においてタンパク質の分解調節が HMGB1 と関与、もしくは表現系を検出しやすくしている可能性が示唆された。

#### E. 結論

HMGB1 遺伝子導入マウスの結果から HMGB1 は個体内において重要な機能を担っていることが示唆された。また HMGB1 は敗血症以外の病態モデルにおいても変化が見られたことから、HMGB1 の機能解析において新たな知見が得られると期待される。

#### G. 研究発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 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 山口大学大学院医学系研究科救急・生体侵襲制御医学・助教

### 研究要旨

重症頭部外傷は、脳挫傷後の虚血や出血などにより発生した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傷害・修飾される。本年はラット前脳虚血再灌流モデルで高濃度酸素投与、高血糖状態、アロプリノール投与における high mobility group box-1: HMGB1 と  $O_2^{\cdot-}$  への影響を検討した。また、臨床症例で重症頭部外傷患者の血液とくも膜下出血患者の髄液の 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高濃度酸素投与、アロプリノール投与により再灌流後の  $O_2^{\cdot-}$  の産生抑制を認め、また脳組織中および血液中 HMGB1 の抑制も認めた。高血糖状態では  $O_2^{\cdot-}$  の異常産生亢進を認め、脳組織中および血液中 HMGB1 も増加していた。また臨床例において、重症頭部外傷患者の血液およびくも膜下出血患者の髄液では HMGB1 が上昇し、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。そして、各種中枢神経障害マーカーと HMGB1 に正の相関が認められたことから、中枢神経障害の予後予測マーカーとして HMGB1 は有用であると考えられた。

### 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 ( $O_2^{\cdot-}$ ) に与える高濃度酸素投与、高血糖状態、アロプリノール投与の効果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

ラットの前脳虚血再灌流モデルは全身麻酔、人工呼吸 (吸入酸素濃度  $F_iO_2: 0.4$ ) 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。

前脳虚血を 10 分間行った後に再灌流を行い、再灌流 120 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。再灌流 120 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  $\Delta I$  (nA) で検討を行った。また、 $\Delta I$  を単位時間で積分して得られた電荷量  $Q$  ( $\mu C$ 、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)。

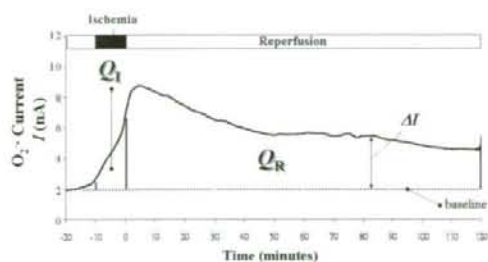
再灌流 120 分後の脳組織および血清で HMGB1 濃度を ELISA キットで測定した。

(1) 高濃度酸素投与の影響について  
前脳虚血再灌流を行い再灌流後も  $F_iO_2$  を 0.4 に保つ正常酸素群、再灌流後から  $F_iO_2$  を 1.0 に上昇させる高濃度酸素群の 2 群で検討を行った。

(2) 高血糖状態の影響について  
虚血作成前に 20%ブドウ糖液を投与し血糖 300 mg/dL 以上を達成した高血糖群、および生食を投与した正常血糖群の 2 群で検討を行った。

(3) アロプリノールの効果について  
虚血作成の 24 時間前および 1 時間前にアロプリノール 100  $\mu$ g/g を投与するアロプリノール低濃度群、アロプリノール 200  $\mu$ g/g を投与するアロプリノール高濃度群、生食を投与する対照群の 3 群で検討を行った。

図1 Evaluation of  $O_2^{\cdot -}$  Current



②重症頭部外傷患者における血清およびくも膜下出血患者の髄液中 HMGB1 の検討

臨床では重症頭部外傷患者の血清およびくも膜下出血患者の脳脊髄液 (CSF) で HMGB1 を ELISA キットにより測定した。また、各種神経障害マーカー (neuron specific enolase : NSE、S-100  $\beta$  protein : S100B、glial fibrillary acidic protein : GFAP) と酸化ストレスマーカー

(malondialdehyde : MDA) を測定し、HMGB1

との相関を検討した。

### (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。

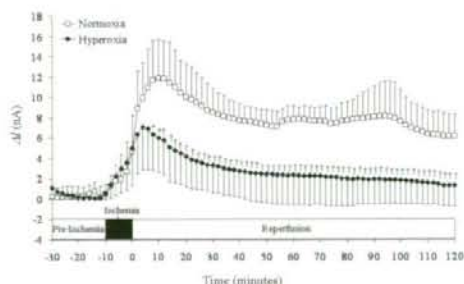
### C. 研究結果

#### ①ラット前脳虚血再灌流モデルでの検討

(1) 高濃度酸素投与の影響について

図2に頸静脈中の  $O_2^{\cdot -}$  電流値の上昇値  $\Delta I$  を示す。虚血後から 2 群ともに電流値の上昇を認め、再灌流直後から正常酸素濃度群では電流値の更なる上昇を認めた。高濃度酸素投与群では再灌流後電流値の有意な上昇抑制を認めた。

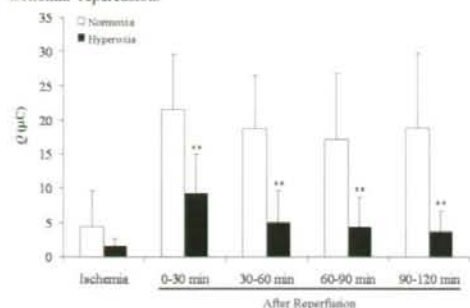
図2. The actual measured current of the superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot -}$ ) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



虚血中および再灌流後 30 分毎の電荷量  $Q$  を図3に示す。再灌流後すべての期間で、高濃度酸素投与群では、正常酸素濃度群に比べ有意にその上昇は抑制された ( $p < 0.01$ )。

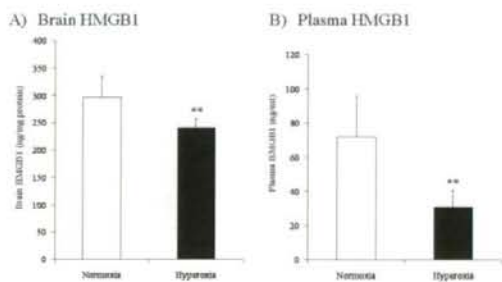


図3. Differences in the quantity of electricity ( $Q$ ) derived from the generation of superoxide anion radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ) in rats with forebrain ischemia-reperfusion.



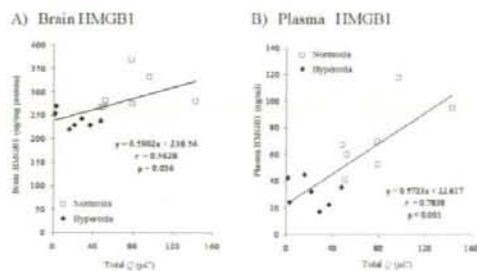
脳組織中および血清 HMGB1 を図 4 に示す。高濃度酸素投与群の脳組織中および血清中の HMGB1 は正常酸素濃度群に対して有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。

図4. High-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations in the forebrain tissue and plasma 2 h after reperfusion.



再灌流後 2 時間の  $O_2^{\cdot-}$  量を反映する Total  $Q$  と HMGB1 濃度との相関を図 5 に示す。脳組織中および血清 HMGB1 はともに Total  $Q$  と有意な正の相関を認めた ( $p < 0.01$ )。

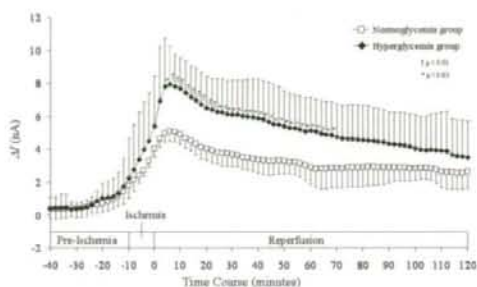
図5. The relationship between total  $Q$  and brain or plasma high-mobility group box 1 (HMGB1).



### (1) 高血糖状態の影響について

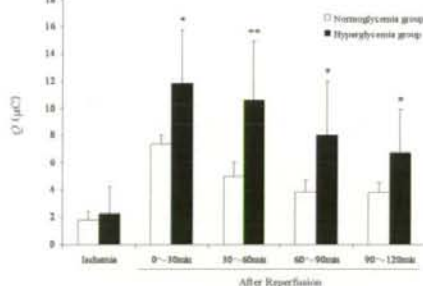
図 6 に頸静脈中の  $O_2^{\cdot-}$  電流値の上昇値  $\Delta I$  を示す。再灌流直後から高血糖群では正常血糖群に比べ電流値の更なる上昇を認めた。

図6. The actual measured current of the superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



虚血中および再灌流後 30 分毎の電荷量  $Q$  を図 7 に示す。再灌流後すべての期間で、高血糖群では、正常血糖群に比べ有意に高値であった。

図7. Differences in the quantity of electricity ( $Q$ ) derived from the generation of superoxide anion radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ) in rats with forebrain ischemia-reperfusion.



脳組織中および血清 HMGB1 を図 8 に示す。高血糖群の血清中 HMGB1 は正常血糖群に対して有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。

図8. High-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations in the forebrain tissue and plasma 2 h after reperfusion.

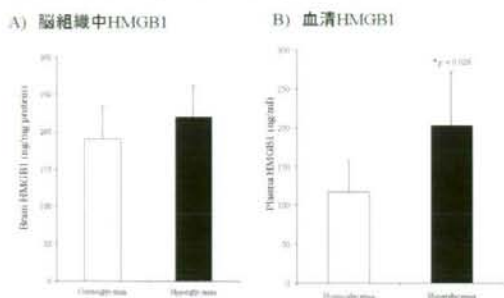
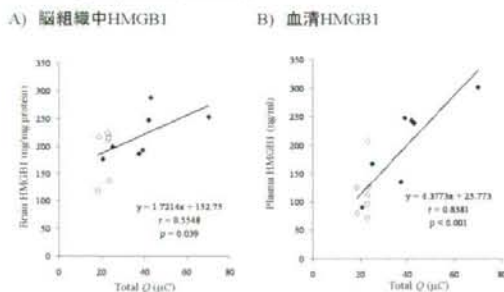


図9. The relationship between total Q and brain or plasma high-mobility group box 1 (HMGB1).

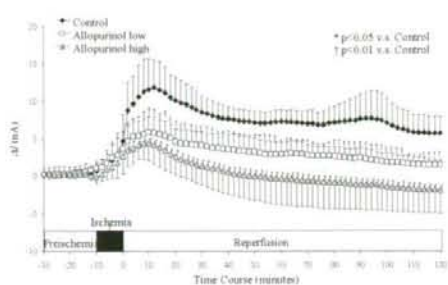


再灌流後 2 時間の  $O_2^{\cdot-}$  量を反映する Total Q と HMGB1 濃度との相関を図 9 に示す。脳組織中および血清 HMGB1 はともに Total Q と有意な正の相関を認めた ( $p < 0.01$ )。

(3) アロプリノールの効果について

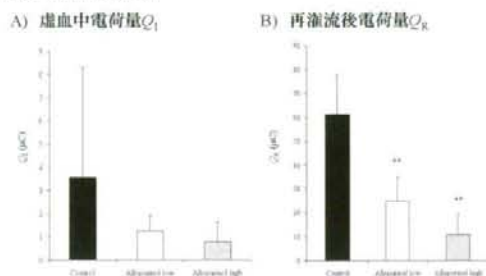
図 10 に頸静脈中の  $O_2^{\cdot-}$  電流値の上昇値  $\Delta I$  を示す。再灌流直後からアロプリノール投与群では対照群に比べ濃度依存性に電流値の抑制を認めた。

図10. The actual measured current of the superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



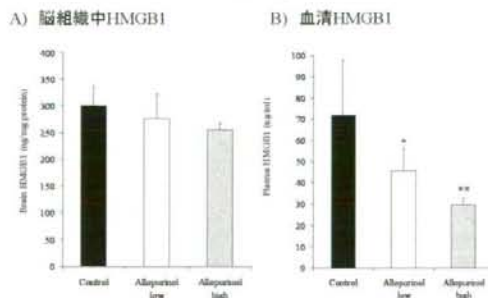
虚血中および再灌流中の電荷量 Q を図 11 に示す。再灌流後、アロプリノール投与群では対照群に比べ濃度依存性に Q 値の抑制を認めた。

図11. Differences in the quantity of electricity (Q) derived from the generation of superoxide anion radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ) in rats with forebrain ischemia-reperfusion.



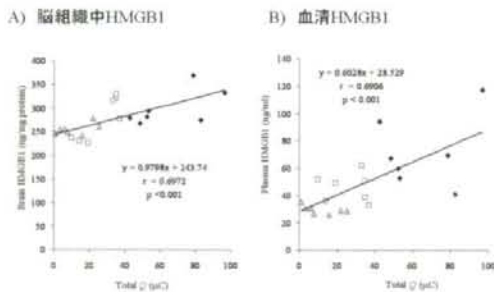
脳組織中および血清 HMGB1 を図 12 に示す。アロプリノール群の血清中 HMGB1 は対照群に比べ濃度依存性に有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。

図12. High-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations in the forebrain tissue and plasma 2 h after reperfusion.



再灌流後 2 時間の  $O_2^-$  量を反映する Total Q と HMGB1 濃度との相関を図 13 に示す。脳組織中および血清 HMGB1 はともに Total Q と有意な正の相関を認めた ( $p < 0.01$ )。

図13. The relationship between total Q and brain or plasma high-mobility group box 1 (HMGB1).



以上の結果から、ラットの前脳虚血再灌流モデルにおいて、高濃度酸素、アロプリノールにより再灌流後の  $O_2^-$ 、HMGB1 が抑制された。また、高血糖により、再灌流後の  $O_2^-$ 、HMGB1 が増加した。

高濃度酸素、高血糖、アロプリノールで HMGB1 と  $O_2^-$  発生量に有意な相関があり、相互作用が示唆された。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  $O_2^-$  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くも膜下出血患者の髄液中 HMGB1 の検討

### (1)重症頭部外傷患者における血清 HMGB1 の検討

重症頭部外傷患者 18 例の血清で HMGB1、NSE、S100B、GFAP を測定した。血清 HMGB1 の値を表 1 に示す。血清 NSE、S100B、GFAP の値を表 2 に示す。

血清 HMGB1 は受傷日において、健常者に比べ高値であった。神経障害マーカーである NSE、S100B、GFAP は受傷日で最も高値であった。

(表 1)

Serum HMGB1 in Severe Head Trauma Patients

(ng/ml) Mean  $\pm$  SD

	Day 0	Day 1	Day 2
Control (n=35)	3.9 $\pm$ 3.8	3.9 $\pm$ 3.8	3.9 $\pm$ 3.8
Head Trauma (n=18)	7.4 $\pm$ 7.4	3.5 $\pm$ 2.8	3.0 $\pm$ 2.0

Control: Peripheral venous blood of healthy volunteers

(表 2)

Serum NSE, S100B, GFAP in Severe Head Trauma Patients

Mean  $\pm$  SD

	Day 0	Day 1	Day 2
NSE (ng/mL)	12.8 $\pm$ 14.5	7.9 $\pm$ 16.2	8.3 $\pm$ 16.6
S100B (ng/L)	3.7 $\pm$ 5.1	1.9 $\pm$ 4.5	1.6 $\pm$ 3.9
GFAP (ng/mL)	12.1 $\pm$ 13.3	4.6 $\pm$ 8.5	2.3 $\pm$ 7.2

血清 HMGB1 と NSE の間には、 $y = 1.27x + 3.75$ ;  $r = 0.412$ ;  $p < 0.01$  で有意な相関を認めた。血清 HMGB1 と S100B、GFAP との間には有意な相関は認められなかった。

(2) くも膜下出血患者の髄液中 HMGB1 の検討  
当院高度救命救急センターに入室し、動脈瘤クリッピング術を施行されたくも膜下出血患者 76 名中、day 3, 7, 14 の脳脊髄液を採取し、発症 6 ヶ月後の神経学的予後を追跡できた 32 名を対象とした。発症 6 ヶ月後の神経学的予後が GR のものを予後良好群、MD、SD、VS、D のものを予後不良群として検討した。

図 14 に髄液中の HMGB1 を示す。髄液中 HMGB1 は day 3, 7 で予後不良群で有意に高値であった (day3:  $p < 0.05$ , day7:  $p < 0.01$ )。

図14. HMGB1 in CSF of SAH Patients

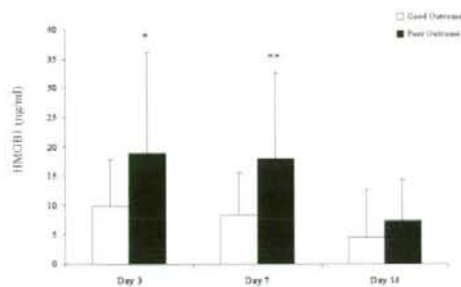


図 15 に髄液中 NSE、S100B、GFAP、MDA の値を示す。S100B は day3、14 で予後不良群で有意に高値であった (day3:  $p < 0.05$ , day14:  $p < 0.05$ )。GFAP は day3、7 で予後不良群で有意に高値であった (day3:  $p < 0.05$ , day7:  $p < 0.01$ )。MDA は day14 で予後不良群で有意に高値であった (day14:  $p < 0.01$ )。

図15. Biochemical Markers of Brain Injury and Oxidative Stress in CSF of SAH

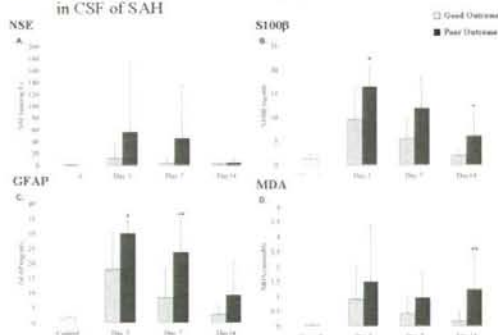
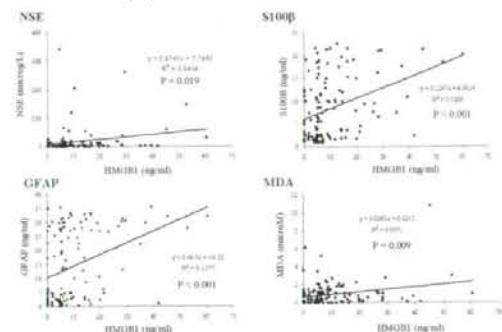


図 16 に HMGB1 と NSE、S100B、GFAP、MDA の相関を示す。髄液中 HMGB1 は NSE、S100B、GFAP、MDA とそれぞれ有意に正の相関があり、HMGB1 が神経細胞傷害および酸化ストレスに関与していることが示唆された。

図16. Correlation between HMGB1 and Biochemical Markers of Brain Injury and Oxidative Stress



以上の結果より、急性重症中枢神経障害患者における血清中 HMGB1 は神経細胞傷害を反映していることが判明した。また髄液中の HMGB1 はくも膜下出血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。

#### D. 考察

##### 1) 達成度

本年度は前脳虚血再灌流モデルで高濃度酸素投与、高血糖状態、アロプリノール投与 HMGB1 と  $O_2^{\cdot-}$  にあたえる効果を検討した。高濃度酸素投与およびアロプリノール投与は HMGB1 および  $O_2^{\cdot-}$  を抑制し、病態を改善した。高血糖状態は HMGB1 および  $O_2^{\cdot-}$  を増悪させ、病態を増悪させることが示唆された。また、HMGB1 と  $O_2^{\cdot-}$  産生量には有意な相関がみられ、相互作用が示唆された。また、ヒトの重症頭部外傷患者の血清中の HMGB1 が神経障害と相関していることが判明し、またくも膜下出血患者の脳脊髄液中 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  $O_2^{\cdot-}$  に与える高濃度酸素、高血糖、アロプリノール投与の効果を経験したものや、急性中枢神経障害患者

(重症頭部外傷患者、くも膜下出血患者)の血清および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。

#### E. 結論

本年度の研究ではラット前脳虚血モデルで高濃度酸素およびアロプリノール投与のHMGB1と $O_2^{\cdot-}$ の抑制効果および、高血糖のHMGB1と $O_2^{\cdot-}$ の増悪効果を証明した。また、HMGB1は重症頭部外傷患者の血清中およびくも膜下出血患者のCSF中で著明に上昇し、各種神経障害マーカーとの間に有意な正の相関が認められた。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、くも膜下出血患者の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

特になし

#### 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

HMGB1 の肝単核球への直接効果を *in vitro* 実験系で検討した。その結果、HMGB1 が直接的にクッパー細胞に作用し、IL-12 を産生、IL-12 が NKT 細胞を活性化し、NKT 細胞が IFN-g を産生、IFN-g が好中球に作用し、好中球が IFN-g ならびに IL-6 を産生、この IFN-g と IL-6 により移植膵島が障害される一連の機序が判明した。本研究により、HMGB1 を介した肝内移植膵島障害の全貌があきらかになった。

### 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。本年度は HMGB1 の肝単核球に対する *in vitro* での直接作用を明らかにすることを目的にした。

### B. 研究方法

単離マウス肝単核球に対する HMGB1 の直接作用を解析した。

(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

単離マウス肝単核球より FACS で分離した各細胞群を用いて HMGB1 の直接作用を *in vitro* 実験系で検討し、以下の知見を得た。

- # 1. HMGB1 刺激により肝単核球は NKT 細胞依存性に IL-12, IL-6, IFN-g を産生した。
- # 2. FACS 分離細胞群を用いた解析で、H

MG B 1 刺激によりクッパー細胞が IL-12 を好中球が IL-6 を産生した。NK, NKT, T, B 細胞からのサイトカイン産生はなかった。IFN-g はいずれの細胞群からも産生されなかった。

- # 3. HMGB1 存在下にクッパー細胞、好中球をそれぞれ NKT 細胞と共培養すると IL-12, IL-6 産生が増強し、IFN-g 産生も認められた。
- # 4. 上記において IFN-g 産生は NKT 細胞が担い、その IFN-g が好中球からの IFN-g ならびに IL-6 産生を増強した。
- # 7. 抗 IL-12, 抗 IL-6 抗体投与により移植膵島障害は制御できた。
- # 8. HMGB1 の移植膵島障害は KO マウスを用いた実験より TLR-2 ならびに RAGE を介していることがわかった。

### D. 評価

1) 達成度について

HMGB1 の肝単核球に対する直接作用をあきら

かにすることができ、研究目的は達成できた。

## 2) 研究の意義について

本研究成果によりHMGB1を介した移植早期膵島障害の全貌が明らかになり、新たな治療戦略の開発に貢献することが期待できる。

## 3) 今後の展望

本研究で明らかになったHMGB1を介した移植膵島障害の機序ならびに制御法に基づき、臨床応用可能な制御法を見出す。

3. 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。移植膵島から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

## H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

## E. 結論

HMGB1を標的にした新規治療法の開発、その臨床導入により臨床膵島移植の成績向上が期待できる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 安波洋一。NKT細胞の新展開：膵島移植拒絶反応とNKT細胞。医学のあゆみ 225(2): 151-155, 2008

### 2. 学会発表

1. 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. XXII International Congress of the Transplantation Society (Transplantation 86(2S):447,2008), August 10-14, 2008, Sydney, Australia
2. 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.

## HMGB1 の細胞外放出の分子機構とその制御法の研究

松下 健二 国立長寿医療センター研究所・口腔疾患研究部・部長

### 研究要旨

血管内皮細胞およびマクロファージにおける HMGB1 のアセチル化制御による同分子の放出制御の可能性について検討した。アセチル化制御薬は、HMGB1 の細胞外放出を有意に抑制することが明らかになった。

### A. 研究目的

High mobility group box 1(HMGB1)は、ショックのメディエーターであるとともに、サイトカインとして炎症反応に関わっていることが示唆されている。また、近年 HMGB1 制御による脳血管障害が改善されることが明らかにされつつある (Hayakawa K et al. stroke 39:951-958, 2008)。HMGB1 は翻訳後修飾としてアセチル化を受け、核内から細胞外へと放出される。そこで本研究では種々のアセチル化制御薬を用い、同薬剤による HMGB1 放出制御の可能性を検討した

### B. 研究方法

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であるバルプロ酸 (VPA)、トリコスタチン A (TSA)、またヒストンアセチル化酵素 (HAT) 阻害剤である Anacardic acid (AA)、Garcinol (GC) を RAW-Blue 細胞に作用させた。NF- $\kappa$ B 活性化はレポーターアッセイで、HMGB1 放出量は ELISA で定量した。細胞障害性を LDH 活性で、Apoptosis を Caspase 3/7 活性でそれぞれ解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる遺伝子操作や疾患モデル動物については、所属研究機関の各専門委員会の承認を受けて行った。また、疾患モデル動物の処置については動物愛護精神にのっとり慎重に行った。剖検脳の解析にあたっては所属研究機関の倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

RAW-Blue 細胞に VPA を添加したところ、培養上清中の HMGB1 濃度は 24 時間まで上昇を続け 30.3 ng/ml に達した。それに対し、TSA 添加では僅か 3 時間後に 5 ng/ml に到達した後、それ以上の放出を認めなかった。両薬剤による、NF- $\kappa$ B 活性化についても同様の傾向を認めた。これらの HDAC 阻害剤による HMGB1 放出は HAT 阻害剤である AA 添加により部分的に抑制されたが、一方で GC 添加では Apoptosis が誘導された。

### D. 考察

本研究によりアセチル化制御薬で HMGB1 の放出を制御できることが示唆され、HMGB1 を介した炎症応答の制御による虚血性神経細胞障害の治療の可能性が明らかになった。核内に存



在する HMGB1 は低酸素、炎症性サイトカイン、あるいは細菌毒素等の刺激によりアセチル化修飾を受けた後、細胞外へ放出される。アセチル化阻害剤は、HMGB1 のアセチル化を制御することにより、HMGB1 の放出を阻害し、血管内皮の活性化と炎症反応の進展を抑制することが考えられた。

## E. 結論

アセチル化制御薬は HMGB1 の放出制御に有用である可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.

2. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, Matsushita K: Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- signalling. *Cardiovasc Res* 2008, 77:221-230.

3. 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. 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

2. 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、

3. 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

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. Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hasegawa A, **Noguchi T**: Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) reduces the levels of inflammatory mediators by inhibiting NF- $\kappa$ 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 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, **Noguchi 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