

200817002B

---

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～20年度 総合研究報告書

研究代表者 丸山 征郎

平成21(2009)年 3月

## 目 次

I. 総合研究報告	
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. 総合分担研究報告	
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	15
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・小林紘一	20
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	27
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	32
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 海里マリン病院・聖マリアンナ医科大学・中島利博	33
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	35
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	45
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	48
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷	59

# I. 総合研究報告

## 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

研究代表者 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

DNA 結合蛋白 HMGB1 は壊死細胞あるいは、活性化マクロファージから遊離され、局所の【修復因子】として作用する。しかしこれが内皮細胞上のトロンボモデュリン（TM）バリアーを超えて血中を循環すると臓器不全、さらには【生体致死因子】として働く。本研究では、中和抗体、遺伝子組み換えTMを用い、循環血中の HMGB1 を中和・除去することでショックや多臓器不全の救命的治療法の開発を目指す。

### 分担研究者

石坂彰敏 慶應義塾大学医学部・教授  
小林紘一 慶應義塾大学医学部・教授（H18-H19）  
北川雄光 慶應義塾大学医学部・教授（H20）  
野口隆之 大分大学医学部・教授  
中島利博 聖マリアンナ医科大学・教授  
海里マリン病院・部長  
前川剛志 山口大学医学部・教授  
安波洋一 福岡大学医学部・教授  
松下健二 国立長寿医療センター・部長

### A. 研究目的

生体生存は、体内外からの侵襲の連続であるといえる。この侵襲は、体外に開放された病原微生物の侵入を伴う有菌的なものと、体内、あるいは手術など医療行為にともなう無菌的なものに分けて考えることができる。いずれの場合にも、壊死細胞、活性化マクロファージなどの核から遊離してきた HMGB1 が、生体に危険信号“alarmin, アラーミン”：HMGB1 を発することが判明してきた。アラーミンは侵襲【局所】では損傷部位の止血・感染防御、そして修復のアジュバントとし

て働くが、【全身循環性】の場合には、遠隔臓器の炎症と血管内凝固を惹起し、ショック、DIC、多臓器不全などをメディエートすることが判明してきた。本研究では、この侵襲の運命決定因子：HMGB1 を標的分子としたインターベンションによるショックの救命的治療法の確立を目指す。

### B. 研究方法

#### 1) HMGB1 の細胞生物学的研究

##### ①HMGB1 の細胞外遊離機構の解明

DNA 結合蛋白 HMGB1 の細胞外への能動的遊離機構を、脱アセチル化酵素阻害剤、アセチル化酵素阻害剤、あるいは薬物誘導型の変異体遺伝子を作成（細胞外分泌型、非アセチル化型）して研究した。

##### ②虚血・再還流と HMGB1 の細胞外遊離とその制御

ラット脳や肝臓の血管を結紮虚血化、再還流して、HMGB1 の細胞内外での局在とその制御法をラディカルスカベンジャーで検討した。*in vitro* でも神経細胞株 PC12 を培養し、hypoxia と再酸素化の条件下での HMGB1 のダイナミクスを解析

した。

## ②HMGB1 の受容体とシグナル伝達経路の解明

各種のシグナル伝達阻害剤を用いて、【核内】  
⇒【核外】⇒【細胞外】の各ステップを経て、  
HMGB1 の細胞外への遊離するパスウェイを解  
析した。

## 2) HMGB1 の生体に対する作用とそのインター ベンション

### ①動物実験

ラット、マウスにエンドトキシン(LPS)血症モデ  
ル(LPS 投与、盲腸結紮)、誤嚥性肺炎マウスを作  
成して、血中 HMGB1 のダイナミクスと病態との  
関連を検討した。

### ②ヒトの各種病態発生と HMGB1 の関連と検証 と HMGB1 インターベンションのための大型動 物での実験

各種の侵襲（感染性ショック、食道がん、くも  
膜下出血など）患者の血中 HMGB1 を測定し、侵  
襲度合いと HMGB1 の関連を解析した。またヒ  
トの血中 HMGB1 の吸着カラムを試作し、ブタに  
試用した。

### ③トロンボモデュリン (TM) への HMGB1 の吸 着のダイナミクスと運命を解析した

## C. 研究結果 D. 考察

### 1) HMGB1 の細胞生物学的研究

#### ①HMGB1 の細胞外遊離機構の解明

HMGB1 の細胞外への能動的遊離は脱アセチル  
化酵素阻害剤で促進、アセチル化酵素阻害剤で抑  
制された。このことから HMGB1 のアセチル化  
が、HMGB1 の DNA からの離脱と細胞外への遊  
離に重要であることが確認された。またあるいは  
薬物誘導型の変異体遺伝子（細胞外分泌型、非ア  
セチル化型）を導入したトランスジェニックマウ  
スでの研究では、分泌型の場合に、生後間もなく  
マウスが死亡した。これは細胞外に遊離した

HMGB1 が成長を阻害し、死に至ったものと考え  
られた。

#### ②虚血・再還流と HMGB1 の細胞外遊離とその 制御

ラット脳や肝臓の血管を結紮虚血化、再還流し  
た実験では、虚血-再還流刺激で HMGB1 の細胞  
外遊離が惹起された。これはラディカルスカベン  
ジャー (SOD、エダラボン) で抑制された。培養  
神経細胞株 PC12 を用いた実験でも同様の結果が  
再現された。

#### ②HMGB1 の受容体とシグナル伝達経路の解明

3年間の研究で、HMGB1 の受容体としては  
RAGE の他に、Toll Like Receptor-(TLR)2,-4 も機  
能することが証明された。このことより、  
TLR-2,-4 は単に外的病原体のみでなく、生体が  
侵襲にあった際の分子：アラミンにも応答す  
ることが判明してきた。これは danger-stranger  
説を統一的に考える際に重要なステップであ  
ると考えている。

## 2) HMGB1 の生体に対する作用とそのインター ベンション

### ①動物実験

ラット、マウスにエンドトキシン(LPS)血症モデ  
ル(LPS 投与、盲腸結紮)、誤嚥性肺炎マウスで  
は、臓器障害の程度と血中 HMGB1 値は相関し  
た。大腸菌投与敗血症投与モデルラットにおい  
ては、HMGB-1 の中和抗体で著しい救命効果が  
得られた。また血中からの HMGB1 除去カ  
ラムでも救命効果が得られた。

### ②HMGB1 の全身作用に対するトロンビン効果

上記実験的 LPS 敗血症モデルで、HMGB1 が  
増加することが判明したので、ヒトの臨床の状  
況を想定して、HMGB1 ± トロンビン投与実験  
で、HMGB1 に対するトロンビンの影響を検討  
したところ、お互いに単独投与では非致死性の  
投与量でも、HMGB1 にトロンビンを併用して  
投与すると、DIC が惹起され、腎に多数のフィ

プリン血栓、肺に出血が引き起こされた。

## ②ヒトの各種病態発生と HMGB1 の関連と検証と HMGB1 インターベンションのための大型動物での実験

ヒトの各種の侵襲（感染性ショック、食道がん、くも膜下出血など）患者では臨床的重症度と血中 HMGB1 値は相関した。特に食道がん患者の場合には術前の HMGB1 値がその後の合併症や予後を予知するバイオマーカーになりうるものが示めされた。そこでヒトの血中 HMGB1 の吸着カラムを試作し、硫酸セルロファイン、TMを固相化してブタに試用し、抗凝固剤の種類と至適量を検討中である。

またヒト臨床例において、遺伝子組換えトロンボモデュリン (TM) で治療された患者での HMGB1 のダイナミクスを解析中である。in vitro 実験では HMGB-1 は TM の N 末端に結合して活性が中和されたが、その後、HMGB1 はトロンピン・TMによって分解されることが示された。

## E. 結論

動物実験、および臨床例において、侵襲局所の HMGB1 が血中を循環すると、遠隔臓器の障害、多臓器不全、ショックとなることが検証された。実験動物において中和抗体、吸着カラムの有効性がラットにおいて証明されたので、ヒトへの展開を早急にスタートするつもりである。

また血管内皮細胞の TM が局所で障害細胞や活性化免疫細胞から遊離された HMGB1 を局所に封印し、侵襲制御、修復のアジュバントとして利用し、その全身化は防いでいることが明らかとなった。

## G. 研究発表

### 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- $\alpha$ 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
11. Sato F, Maruyama S, Hayashi H, Sakamoto I, Yamada S, Uchimura T, Morita Y, Ito Y, Yuzawa Y, Maruyama I, Matsuo S. High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 in Patients with Renal Diseases. Nephron Clin Pract. 108(3): c194-c201. 2008
12. Hiwatashi K, Ueno S, Abeyama K, Kubo F, Sakoda M, **Maruyama I**, Hamanoue M, Natsugoe S, Aikou T. A novel function of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in association with tumorigenesis and tumor differentiation of HCC. Ann Surg Oncol. 15(3):923-33. 2008.
13. Morimoto Y, Kawahara KI, Tancharoen S, Kikuchi K, Matsuyama T, Hashiguchi T, Izumi Y, **Maruyama I**. Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. J Periodontal Res. 43(1): 76-83. 2008.
14. Kawahara K, Setoyama K, Kikuchi K, Biswas KK, Kamimura R, Iwata M, Ito T, Morimoto Y, Hashiguchi T, Takao S, **Maruyama I**. HMGB1 release in co-cultures of porcine endothelial and human T cells. Xenotransplantation. 14(6):636-41. 2007.
15. Yasuhara D, Hashiguchi T, Kawahara K, Nakahara T, Harada T, Taguchi H, Yamada S, **Maruyama I**, Inui A. High mobility group box 1 and refeeding-resistance in anorexia nervosa. Mol Psychiatry. 12(11):976-7. 2007.
16. Noma S, Matsuyama W, Mitsuyama H, Suetsugu T, Koreeda Y, Mizuno K, Higashimoto I, Kakihiyama Y, Hashiguchi T, **Maruyama I**, Osame M, Arimura K. Two cases of acute exacerbation of interstitial pneumonia treated with polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion

- treatment. Intern Med. 46(17): 1447-54. 2007
17. Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, **Maruyama I**, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H. Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification. Mol Cell Biol. 27(16):5650-63. 2007.
  18. Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, **Maruyama I**. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. Cardiovasc Pathol. 16(3):136-43. 2007.
  19. Taira T, Matsuyama W, Mitsuyama H, Kawahara KI, Higashimoto I, **Maruyama I**, Osame M, Arimura K. Increased serum high mobility group box-1 level in Churg-Strauss syndrome. Clin Exp Immunol. 148(2):241-7. 2007.
  20. 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
  21. Kawahara K, Tancharoen S, Hashiguchi T, Unoshima M, Ito T, Kikuchi K, Morimoto Y, Shimizu T, Oyama Y, Takenouchi K, Arimura S, Taniguchi N, Iwata M, Iwasaka H, **Maruyama I**. Inhibition of HMGB1 by deep ocean water attenuates endotoxin-induced sepsis. Med Hypotheses. 68(6):1429-30. 2007
  22. 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.
  23. 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.
  24. 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, **小林絢一** 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
  25. 渡辺真純, 小林絢一, **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
  26. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 福永興孝, 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.
  27. 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.
  28. Iwasaka H: Three-step research strategies for ARDS: new target molecules—ACE2, HMGB1, and HSP47. *J Anesth* 2007 (21) 122-123
  29. 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.
30. 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
  31. 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.
  32. 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.
  33. 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)
  34. 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
  35. 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
  36. 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.
  37. 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.
  38. 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.
  39. 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.
  40. T Kajiwara, Y Tomita, S Okano, T Iwai, **Y Yasunami**, Y Yoshikai, K Nomoto, R Tominaga, H Yasui. Effects of cyclosporin A on the activation of NKT cells induced by a-galactosylceramide. *Transplantation* 83:184-192, 2007
  41. Masayuki Satoh, **Yohichi Yasunami**, Nobuhide Matsuoka, Masahiko Nakano, Takeshi Itoh, Tomoyuki Nitta, Keizo Anzai, Junko Ono, Masaru Taniguchi, Seiyo Ikeda. Successful islet transplantation to two recipients from a single donor by targeting pro-inflammatory cytokines in mice. *Transplantation* 83(8):1085-1092, 2007
  42. Iwai T, Tomita Y, Kajiwara T, Onzuka T, Okano S, **Yasunami Y**, Yoshikai Y, Nomoto K, Tominaga R. The immunoregulatory role of NKT cells in cyclophosphamide-induced tolerance. *Transplantation* 84(12): 1686-95, 2007
  43. 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. *Mol Cell Biol.* 28(4):1338-47 (2008)
44. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, **Matsushita K**. Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- signalling. *Cardiovasc Res.* 77(1):221-30(2008)
  45. Inomata M., Into T., Ishihara Y., Nakashima M., Noguchi T., and **Matsushita K**. Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. *Microbes Infect.* 9(12-13): 1500-1506 (2007)
  46. Into, T., Dohkan, J., Inomata, M., Nakashima, M., Shibata, K., and **Matsushita, K**. Synthesis and characterization of a dipalmitoylated lipopeptide derived from paralogous lipoproteins of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun.* 75(5): 2253-2259 (2007)
  47. Into, T., Kanno, Y., Dohkan, J., Nakashima, M., Inomata, M., Shibata, K., Lowenstein, C.J., and **Matsushita, K**. Pathogen recognition by Toll-like receptor 2 activates Weibel-Palade body exocytosis in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 282(11): 8134-8141 (2007)
  48. Into, T., and **Matsushita, K**. Recognition of bacterial compounds by aortic endothelial cells activates Weibel-Palade body exocytosis. *Inflammation and Regeneration* 27(2): 112-116 (2007)
  49. 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.
  50. 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
  51. 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.
  52. 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.
  53. 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.
  54. 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.
55. 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.
56. 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)
57. 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)
58. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto 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)
59. Hagiwara S, Iwasaka H, Uchida T, Hasegawa A, Asai N, Noguchi T: *Shock* 2008, Oct 23 (Epub ahead of print)
60. 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)
61. 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
62. 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
63. 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
64. 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
65. 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
66. 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
67. 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
68. 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
69. 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
70. 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
71. 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.
72. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, Matsushita K: Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- signalling. *Cardiovasc Res* 2008, 77:221-230.
73. 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、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, 田淵悟, 安藤崇史, 平岩訓彦, 横田博, 石坂彰敏, 北島政樹: 好中球エラスタ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タ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タ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, 福永興孝, 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, 福永興孝, 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, 福永興孝, 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
11. 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)
  12. 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)
  13. 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)
  14. 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)
  15. 福永興彦: 抗炎症性脂質メディエーター レゾルビンと肺炎炎症性疾患. 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
  16. 福永興彦: 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
  17. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 福永興彦, 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
  18. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 才川義朗, 福永興彦, 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
  19. 須田康一, 竹内裕也, 才川義朗, 宮庄拓, 岡本実, 福永興彦, 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
  20. 須田康一, 北川雄光, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 福永興彦, 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
  21. 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 和田則仁, 才川義朗, 福永興彦, 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
  22. 須田康一, 竹内裕也, 和田則仁, 才川義朗, 宮庄拓, 岡本実, 福永興彦, 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
  23. 須田康一, 竹内裕也, 宮庄拓, 岡本実, 和田則仁, 才川義朗, 福永興彦, 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
  24. 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

25. 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
26. **松下健二**：一酸化窒素制御を基盤とした血管病治療の新戦略。レドックス生命科学第 170 委員会研究会“レドックス研究のフロンティア。大阪。2007 年 3 月 13 日
27. **松下 健二**：エキソサイトーシスを基盤とした血管病治療の新戦略。第 8 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム。金沢。2007 年 6 月 8 日。
28. **松下 健二**：高血圧が炎症を惹起する仕組み。第 6 回松本ポーンフォーラム。塩尻。2007 年 5 月 12 日。
29. 猪俣 恵、引頭 毅、中島 美砂子、野口 俊英、**松下 健二**：第 50 回春季日本歯周病学会学術大会。横須賀。2007 年 5 月 19 日。
30. **松下健二** 血管病としての歯周病の分子病態 第 49 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム IV。札幌。2007 年 8 月 29 日。
31. **松下健二**：公開市民講座 “ステキに歳を重ねるために一歯周病予防から始めるエイジングケア” 第 13 回口腔保健シンポジウム。大阪。2007 年 7 月 7 日
32. **松下健二** ステキに歳を重ねるために一生活習慣病・歯周病予防によるエイジングケア中部ものづくりネットワーク講演会。名古屋。2007 年 8 月 2 日。
33. **松下健二** ステキに歳を重ねるために一歯周病予防から始めるエイジングケア NPO パイオものづくり中部第 1 回医療機器分科会特別講演。名古屋。2007 年 9 月 1 日。
34. **松下健二** ステキに歳を重ねるために一生活習慣病予防から始めるエイジングケア 第 9 回東三河合同産学官技術交流会。名古屋。2007 年 9 月 5 日
35. **松下健二**：Meet the specialist 2007 “エキソサイトーシス制御を基盤とした血管病治療の可能性”。東京 2007 年 11 月 22 日
36. **松下健二**：循環器関連疾患の up-to-date “血管病としての歯周病の治療戦略”名古屋 2007 年 12 月 22 日。
37. **松下健二**：エキソサイトーシス制御を基盤とした新しい脳血栓塞栓症治療法の開発 第 33 回本脳卒中学会総会 2008 年 3 月、京都
38. 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
39. 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
40. 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
41. 高野公徳、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.
42. 高野公徳、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.
43. 高野公徳、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.

44. 篠田昌宏,高野公徳,他 (1/16) . 薬剤誘導性ブ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.
45. 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 $\gamma$ 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
46. 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
47. 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
48. 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 臓・臓移植研究会, 福岡 2/27-28, 2009
49. 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
50. 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,
51. 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
52. 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.
53. 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.
54. 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
55. 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.
56. 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.
57. 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

58. 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 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
2. 抗 HMGB1 抗体を含む臓器移植拒絶抑制剤 日本出願番号：特願 2007-034280
3. 抗 HMGB1 抗体を含む臓器移植拒絶抑制剤 日本出願番号：特願 2007-034293
4. ヒト HMGB1 に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する治療剤 日本出願番号：特願 2007-034325

## II. 総合分担研究報告

## 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

生体は侵襲（外傷、感染など）に際し、以下のような時間的、空間的にヒエラルキーをもった応答をする（図1）。

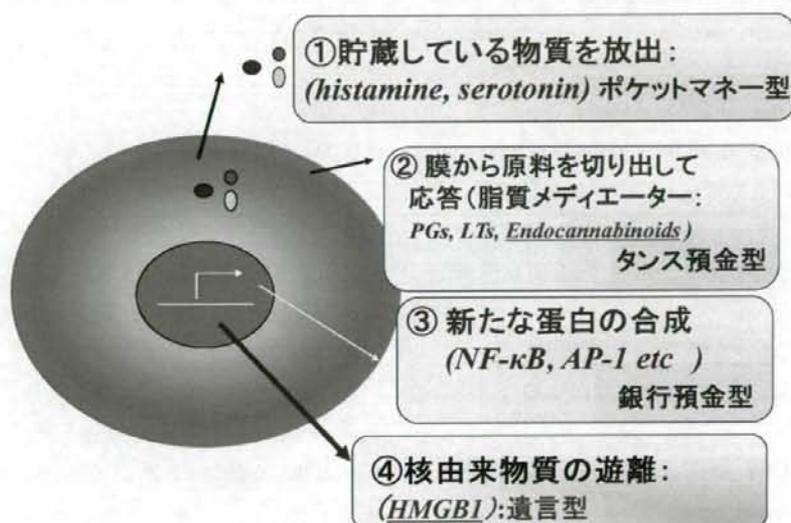


図1. 細胞レベルの対応戦略：ヒエラルキー性応答

- ① 当該局所で血小板や顆粒球のあらかじめ、貯蔵されていた因子（セロトニンやATP, エラスターゼなど）の放出、
- ② 膜脂質からの脂質メディエーター（プロスタグランジン PGs,ロイコトリエン、内因性カンナビノイドなど）の産生、放出
- ③ 転写因子（NF-κB, AP-1 など）を介した生体防御因子類（血液凝固因子、TNFα, IL-1β など）の *de novo* の合成、である。これらは①⇒②⇒③の順番で、局所から全身へ、early phase から late phase へと拡大してゆく。そしてこれらの①、②、③の全てのプログラムが障害されたとき、すなわち細胞壊死の際には核から、DNA 結合蛋白 HMGB1 が遊離放出されて、免疫（特に自然免疫）、止血、幹細胞の動員など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。しかしこの HMGB1 が血

管内に流入して循環すると、反応が遠隔臓器に播種されて、これがショック、DIC、そして多臓器不全のメディエーターとして働くことが判明してきた。

そこで、本プロジェクトでは、「HMGB1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」仕組みとしてのトロンボモデュリン（TM）システムの全貌の解明、そしてさらに得られた知見から、流血中のHMGB1に対してインターベンション法を開発し、生体の侵襲運命の決定因子であるHMGB1によるショックや多臓器不全から、救命する方法を考案することを目的とした。

## A. 研究目的

HMGB1の細胞内外での生理活性、その分子細胞機構、ならびに動態、制御法を研究するために、以下のような事項について研究した。

### 1. 特異的HMGB1測定法の開発

高感度、定量的なHMGB1の測定法を開発する。

### 2. 疾患、病態の成立進展へのHMGB1関与

上記測定法で、ヒトの各種病態とHMGB1のダイナミクスを明らかにし、病態との関連を解明する。

### 3. HMGB1 cofactorの模索

生体内でのHMGB1の反応を増幅するcofactorの検索と同定。

### 4. 局所性HMGB1のベクトル

HMGB1は障害、侵襲局所で細胞外に放出され、生体防衛的に働いているが、血中に侵入し、全身性に循環すると、敗血症の場合にはショック、多臓器不全を引き起こすと発表されている。そこで本研究では、ヒトの臨床において全身循環性HMGB1全身性HMGB1がショック（死）、多臓器不全、DIC（播種性血管内凝固症候群）などを引き起こすことを検証し、さらに障害部位局所で壊死細胞、活性化マクロファージなどから細胞外へ遊離してきたHMGB1の局所封印ー全身化の防御機構を明らかにする。

### 5. 循環血中のHMGB1のインターベンション法の確立

循環血中のHMGB1が遠隔臓器に炎症や血管内

凝固をひき起こすことを検証した後、ついで、この循環血中のHMGB1を標的とした治療法を開発する。

## B. 研究方法

### 1. HMGB1測定ELISA系

HMGB1の合成ペプチドに対して多クローンと単クローン抗体を得て、そのサンドイッチにより、HMGB1特異的ELISA測定系を開発する。

### 2. 臨床検体のHMGB1測定値と臨床病態との関連の検討

諸疾患、病態の患者の臨床検体、動物実験の検体において、上記で確立した測定法を用いてHMGB1を測定し、重症度、病態、病巣の拡がり、予後などとの関連を検討した。

### 3. HMGB1 cofactorの模索

1) HMGB1の活性に対するトロンビンの影響  
エンドトキシン（LPS）敗血症モデルで、HMGB1が増加することが判明したので、ヒトの臨床の状況を想定して、HMGB1±トロンビン投与実験で、HMGB1に対するトロンビンの影響を検討した。

2) HMGB1の活性に対する細菌DNA；CpGDNAの補助作用に関する研究

培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞に対して、1) HMGB1、2) CpG-DNA、3) HMGB1 & CpG-DNAと4) HMGB1&Control CpG-DNA刺激を行った。刺激3時間後の遺伝子発現変化

を各刺激群対非刺激コントロールにて3 D-Gene DNA チップで観察した。さらに、特定の遺伝子に対しては Real time PCR 解析を行った。

#### 4. トロンボモデュリン (TM) 結合HMGB1の運命に関する研究

TMとHMGB1を *in vitro* でインキュベートし、これにトロンピンを添加して、HMGB1分子の経時的変化のプロフィールを電気泳動上に解析した。同時にこのTM処理 HMGB1の炎症促進活性、すなわち TNF $\alpha$ 産生活性を調べた。

#### 5. 循環血中のHMGB1 インターベンション法の検討

HMGB1 中和抗体、HMGB1 除去カラムの作成を試みた。

### C. 研究結果

#### 1. 高感度 HMGB1 測定 ELISA キットを開発した。

これは HMGB2 とはクロス反応せず、血清中の hMGB1 を高感度に測定しえた (ng/ml の濃度)。現在この ELISA キットはシノテスト (株) により、世界 26 カ国以上で発売されている。

#### 2. 諸疾患における血中 HMGB1 値と臨床病態

正常人の血中には HMGB1 は検出されなかったが、重症感染症、外傷、重症炎症、ショック、外科的手術など、生体への侵襲が強い疾患群で血中 HMGB1 は高値を示し、重症度と相関した。また予後を担うバイオマーカーであることも証明された。

#### 3. HMGB1 cofactor の検索

ラットにおいて、HMGB1 とトロンピンを併行して投与すると、単独量では軽微な病変にとどまるのに対し、両者の併用では激しい腎臓糸球体内フィブリン血栓、肺出血などが観察され、凝血学的マーカーでは典型的な DIC のプロフィールを呈した。またこのときに血中の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインも高値を示し、トロンピンが HMGB1 cofactor として生体内では作用

し、凝固と炎症活性を増幅していることが示された。

また細菌 DNA である CpG-DNA も HMGB1 のコファクターとして作用していることを DNA チップ法で確認した。発現が増強した遺伝子は接着因子やサイトカイン・ケモカイン類であった。

#### 4. TM と HMGB1 分子の相互関連

TMと HMGB1 のプレインキュベーションで HMGB1・TM 複合体が形成されたが、それにトロンピンを添加すると、HMGB1 の N 末端側の 11 番目のアミノ酸の部位で分解されることが確認された。

#### 5. HMGB1 インターベンション

中和抗体の投与は実験的 LPS ショックモデルに顕著な救命効果を示した。また HMGB1 除去カラムも 70%以上の救命率であった。ヒトへの応用を考え、小児用のカラムを作成し、ブタ (体重 5 kg 前後) に試用した。現在、抗凝固剤の種類や量を含め、試行錯誤中である。

### D. 考察

#### 1. 侵襲局所で壊死細胞、活性化マクロファージ

から細胞外に放出された HMGB1 は周辺細胞の RAGE, TLR-2,-4 を介して、細胞を活性化し、CDC42, Rac を活性化し、細胞の運動とラジカル産生に働いた。またあと一つは、NF- $\kappa$ B を活性化して、炎症性サイトカインの発現、組織因子の発現 (これは止血反応を促進することを明らかにした)。逆に全身性にはこの経路は、SIRS, DIC の病態形成に関係するものと予想される。

D-Gene DNA チップを用いての HMGB1 刺激による血管内皮細胞の遺伝子発現の解析結果、これまでの報告と同様の遺伝子の変化に加えて、複数のケモカイン等においても発現増強が認められた。

#### 2. HMGB1 は TM の N 末端のレクチン様ドメインと結合し、HMGB1 の炎症促進的な活性は中和