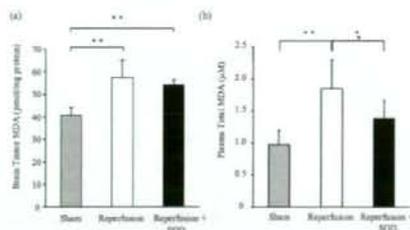
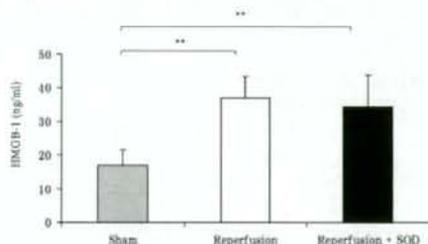


図4. Malondialdehyde levels in forebrain tissue (a) and in plasma (b) at one hour after reperfusion.



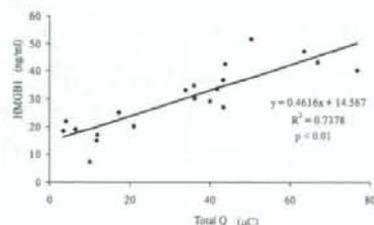
再灌流 1 時間後の血清中の HMGB-1 濃度を図 5 に示す。虚血再灌流群および虚血再灌流+SOD 群の HMGB1 濃度は対照群に対して有意に高値であった ( $p < 0.01$ )。虚血再灌流群および虚血再灌流+SOD 群の間には有意差を認めなかった。

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



再灌流後 1 時間の  $O_2^-$  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  $O_2^-$ .



以上の

結果から、前脳虚血再灌流モデルの脳灌流血中で  $O_2^-$  が検出され、その産生量は HMGB1 と相関が

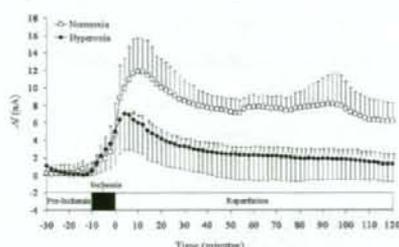
あった。脂質過酸化の程度は血流中の  $O_2^-$  値とほぼ一致し、 $O_2^-$  値が酸化ストレスの指標となることが示唆された。したがって、HMGB1 は酸化ストレスの予測因子と考えることができ、また経時的な  $O_2^-$  値は HMGB1 値を反映しうることを示された。

## ②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

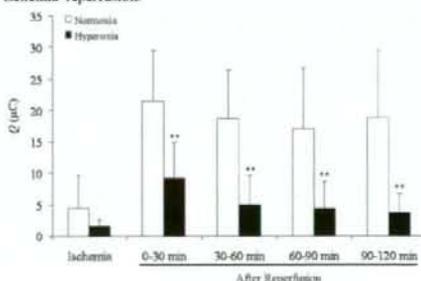
図 7 に頸静脈血中の  $O_2^-$  電流値の上昇値  $\Delta I$  を示す。虚血後から 2 群ともに電流値の上昇を認め、再灌流直後から正常酸素濃度群では電流値の更なる上昇を認めた。高濃度酸素投与群では再灌流後電流値上昇の抑制を認めた。

図7. The actual measured current of the superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



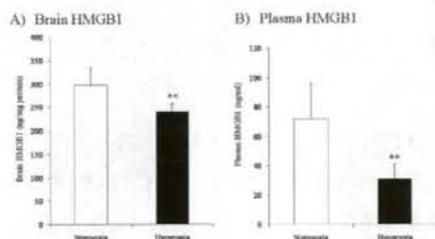
虚血中および再灌流後 30 分毎の電荷量 Q を図 8 に示す。再灌流後すべての期間で、高濃度酸素投与群では、正常酸素濃度群に比べ有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。

図8. Differences in the quantity of electricity (Q) derived from the generation of superoxide anion radicals ( $O_2^-$ ) in rats with forebrain ischemia-reperfusion.



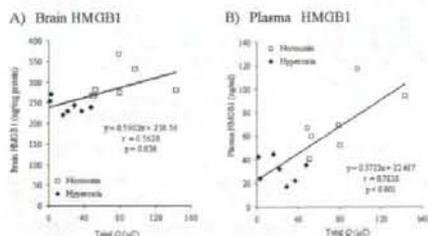
脳組織中および血清 HMGB1 を図 9 に示す。高濃度酸素投与群の脳組織中および血清中の HMGB1 は正常酸素濃度群に対して有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。

図9. High-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations in the forebrain tissue and plasma 2 h after reperfusion.



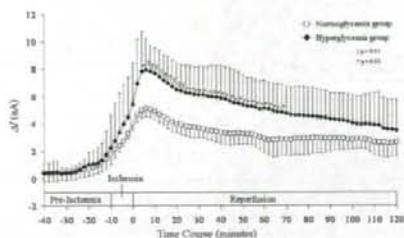
再灌流後 2 時間の  $O_2^-$  量を反映する Total Q と HMGB1 濃度との相関を図 10 に示す。脳組織中および血清 HMGB1 はともに Total Q と有意な正の相関を認めた ( $p < 0.01$ )。

図10. The relationship between total Q and brain or plasma high-mobility group box 1 (HMGB1).



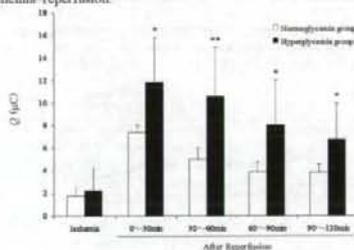
(2) 高血糖状態の影響について  
図 11 に頸静脈中の  $O_2^-$  電流値の上昇値  $\Delta I$  を示す。再灌流直後から高血糖群では正常血糖群に比べ電流値の更なる上昇を認めた。

図11. The actual measured current of the superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



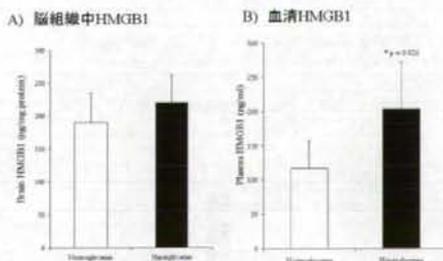
虚血中および再灌流後 30 分毎の電荷量 Q を図 12 に示す。再灌流後すべての期間で、高血糖群では、正常血糖群に比べ有意に高値であった。

図12. Differences in the quantity of electricity (Q) derived from the generation of superoxide anion radicals ( $O_2^-$ ) in rats with forebrain ischemia-reperfusion.



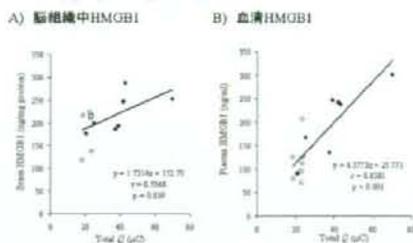
脳組織中および血清 HMGB1 を図 13 に示す。高血糖群の血清中 HMGB1 は正常血糖群に対して有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。

図13. 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 14 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 ( $p < 0.01$ )。

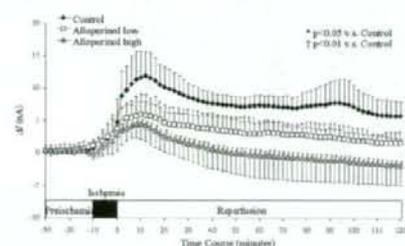
図14. The relationship between total Q and brain or plasma high-mobility group box 1 (HMGB1).



### (3) アロプリノールの効果について

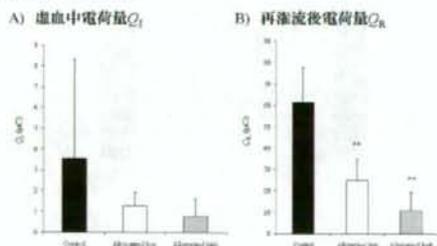
図 15 に頸静脈中の  $O_2^-$ ・電流値の上昇値  $\Delta I$  を示す。再灌流直後からアロプリノール投与群では対照群に比べ濃度依存性に電流値の抑制を認めた。

図15. The actual measured current of the superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) in the rat forebrain ischemia reperfusion model.



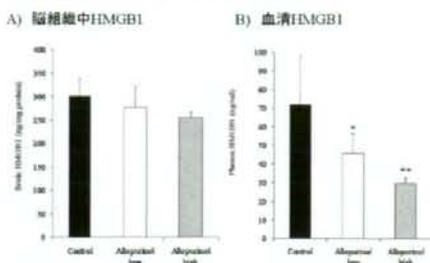
虚血中および再灌流中の電荷量 Q を図 16 に示す。再灌流後、アロプリノール投与群では対照群に比べ濃度依存性に Q 値の抑制を認めた。

図16. Differences in the quantity of electricity (Q) derived from the generation of superoxide anion radicals ( $O_2^-$ ) in rats with forebrain ischemia-reperfusion.



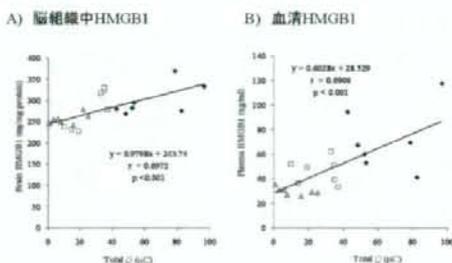
脳組織中および血清 HMGB1 を図 17 に示す。アロプリノール群の血清中 HMGB1 は対照群に比べ濃度依存性に有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。

図17. 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 18 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18. 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. 臨床研究

①重症頭部外傷患者における血清および髄液中 HMGB1 の検討

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

	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 Severe Head Trauma 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

次に、重症頭部外傷患者18例の血清でHMGB1、neuron specific enolase (NSE)、S100β protein (S100B)、glial fibrillary acidic protein (GFAP)を測定した。血清HMGB1の値を表4に示す。血清NSE、S100B、GFAPの値を表5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4)

Serum HMGB1 in Severe Head Trauma Patients (ng/ml) Mean ± SD

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

Control: Peripheral venous blood of healthy volunteers

(表5)

Serum NSE, S100B, GFAP in Severe Head Trauma Patients

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

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。

以上の結果から、血清 HMGB1 は中神経障害のマーカーとなることが確認された。

## ②心肺停止蘇生後患者における血清および髄液中 HMGB1 の検討

心肺停止蘇生後患者予後良好群と予後不良群における動脈血、内頸静脈血、CSF の HMGB1 の値をそれぞれ表6, 7, 8に示す。動脈血中 HMGB1 は心肺蘇生後6時間、24時間に上昇し、48時間後には正常化した。内頸静脈血中 HMGB1 は予後良好群では6、24時間に上昇し、48時間後に正常化した。予後不良群では6時間後に上昇し、24時間後には正常化し、48時間後には再上昇する傾向がみられた。CSFは48時間後にはのみ、HMGB1を測定したが、6ヶ月後の予後良好群では、対照群

と有意差がなかったが、予後不良群では顕著な上昇を示した。

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

(表6)

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

Arterial Blood (ng/ml)  
Mean±SD

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

(表7)

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

Internal Jugular Blood (ng/ml) Mean±SD

	6hr	24hr	48hr
Control (n=35)	3.9±3.8	3.9±3.8	3.9±3.8
Good Outcome (n=5)	11.9±6.2	10.7±4.7	5.5±9.6
Poor Outcome (n=5)	7.4±6.0	2.8±3.4	6.8±3.6

(表8)

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

Cerebro-Spinal Fluid (ng/ml) Mean±SD

	48hr

Control (n=35)	0.4±0.4
Good Outcome (n=5)	0.2±0.4
Poor Outcome (n=7)	34.0±43.4

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

### ③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 3 2 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 19 に髄液中 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19. HMGB1 in CSF of SAH Patients

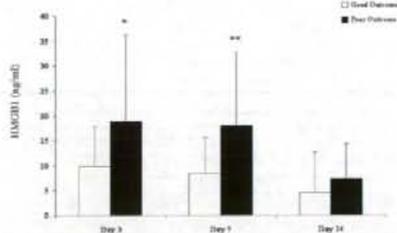


図 20 に髄液中 NSE、S100B、GFAP、malondialdehyde (MDA) の値を示す。NSE は予後不良群の day3, 7 で高い傾向にあり、S100B は day3, 14 で予後不良群で有意に高値であった (day3 :  $p < 0.05$ , day14 :  $p < 0.05$ )。GFAP は day3, 7 で予後不良群で有意に高値であり (day3 :  $p < 0.05$ , day7 :  $p < 0.01$ )、MDA は day14 で予後不良群で有意に高値であった (day14 :  $p < 0.01$ )。

図20. Biochemical Markers of Brain Injury and Oxidative Stress in CSF of SAH

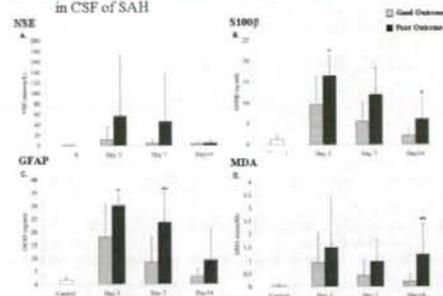
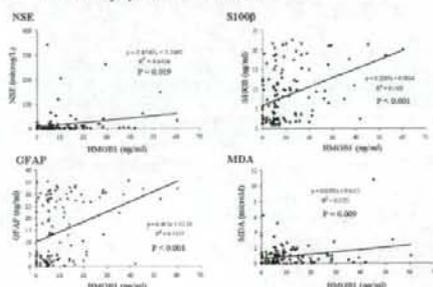


図 21 に HMGB1 と NSE、S100B、GFAP、MDA の相関を示す。髄液中 HMGB1 は NSE、S100B、GFAP、MDA とそれぞれ有意に正の相関があり、HMGB1 が神経細胞傷害および酸化ストレスに関与していることが示唆された。

図21. Correlation between HMGB1 and Biochemical Markers of Brain Injury and Oxidative Stress



以上の結果より、くも膜下出血患者の髄液中の HMGB1 は中枢神経障害および酸化ストレス障害を反映しており、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. 評価

### 1) 達成度

基礎研究では、ラット前脳虚血再灌流モデルで HMGB1 と  $O_2^-$  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  $O_2^-$  産生による二次的な障害にも起因することが分かった。高濃度酸素投与、高血糖状態、アロプリノール投与の HMGB1 と  $O_2^-$  にあ

える効果を検討した結果、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  $O_2^{\cdot-}$  を増加させ、病態を増悪させることが示唆された。

臨床研究では、ヒト重症頭部外傷患者における血中・髄液中 HMGB1 の動態を明らかにした。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。また、急性重症脳障害をきたすその他の代表疾患である心肺停止蘇生後患者の血中・髄液中 HMGB1、クモ膜下出血患者の髄液中 HMGB1 の動態も明らかにし、急性重症脳障害において HMGB1 が中枢神経障害の神経学的予後予測因子となり、また予後判定マーカーとして有用であることが示唆された。

臨床研究・基礎研究の結果、HMGB1 が活性酸素種である  $O_2^{\cdot-}$  との間に相関関係があり、HMGB1 は中枢神経障害の増悪因子および神経学的予後予測因子であることが示された。

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  $O_2^{\cdot-}$  の相関や高濃度酸素、高血糖、アロプリノール投与の効果を経験したものはなく、また臨床例において急性中枢神経障害患者（重症頭部外傷患者、心肺停止蘇生後患者、くも膜下出血患者）の血清および脳脊髄液中 HMGB1 を測定した報告もほとんどなく、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大きい。

## E. まとめ

本研究ではラット前脳虚血モデルで HMGB1 と

$O_2^{\cdot-}$  の有意な相関関係を明らかにし、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 は急性中枢神経障害患者（重症頭部外傷患者、心肺停止蘇生後患者、くも膜下出血患者）の血清（重症頭部外傷患者を除く）および脳脊髄液中で著明に上昇し、また中枢神経障害の神経学的予後予測因子および予後判定マーカーとして有用であることを証明した。

## 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 の拒絶反応、特に移植膵島障害の主因となる自然免疫拒絶反応における役割ならびに制御法を見出した。本研究成果の臨床応用により臨床膵島移植の成績向上に画期的成果をもたらすことが期待できる。

### 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 の役割をマウス膵島移植実験系で解析した。

（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以下の知見を得た。

# 1. 抗HMGB1抗体投与により早期移植膵島障害が制御でき、糖尿病マウスの血糖は正常化した。

# 2. HMGB1 が膵島核内に豊富に存在し、移植後に移植膵島の細胞質から細胞外へ放出された。

# 3. 膵島移植の代わりにHMGB1を投与すると膵島移植後と同様に肝内浸潤細胞、特にNK細胞、好中球のIFN- $\gamma$ 産生が増強した。

# 4. HMGB1の直接作用をin vitroで検索した。

HMGB1は肝内クッパー細胞、好中球に直接作用し、それぞれIL-12, IL-6を産生させた。

# 5. IL-12はNKT細胞を活性化し、INF- $\gamma$ 産生を増強、その作用により好中球はIFN- $\gamma$ ならびにIL-6を産生した。

# 6. 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。

# 7. 移植膵島障害を有するHMGB1の受容体はTLR-2ならびにRAGEであることが判明した。

### D. 評価

#### 1) 達成度について

HMGB1を介した移植早期膵島障害の機序、ならびにその制御法を明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画期的成果をもたらすことが期待できる。

#### 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、既に他疾患の治療で臨床使用されている薬剤を見出

し、膵島移植の臨床に導入する。

## E. 結論

現在の臨床膵島移植では一人のレシピエントの治療に2-3人のドナーを必要としていることが上げられ、この課題の克服が最も重要な課題となっている。本研究ではHMG B 1を標的にした治療法でこの問題が解決できることを示した。今後の臨床応用での成果が期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#1. T Iwai, Y Tomita, I Shimizu, Y Yasunami, T Kajiwara, S Okano, M Yoshikai, M Taniguchi, K Nomoto, H Yasui. Regulatory roles of NKT cells in the induction and maintenance of cyclophosphamide-induced tolerance. *J Immunol* 177(12): 8400-8409, 2006

#2. 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  $\alpha$ -galactosylceramide. *Transplantation in press*

#3. 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  $\alpha$ -galactosylceramide. *Transplantation* 83:184-192, 2007

#4. 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

#5. 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

#6. 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. 国際学会発表

#1. Itoh T, Yasunami Y, Nakano M, Matsuoka N, Nitta T, Ono J, Ikeda S. Anti-IL-6 receptor antibody down-regulates pro-inflammatory cytokine production of Gr-1+CD11b+ cells and prevents early loss of islet grafts in the liver of mice in association with engraftments. *World Transplant Congress 2006*. Boston, USA July 22-27, 2006

#2. Yasunami Y. Current progress of pancreatic islet transplantation in Fukuoka University and future perspectives. *The 7th Symposium of Korean Society of Study for  $\beta$ -cell-Pancreatic Islet Transplantation*. Seoul, Korea, December 1, 2007.

#3. Itoh T, Matsuoka N, Nitta T, Nakano M, Mera T, Yamashita Y, Ono J, Yasunami Y. Successful islet transplantation from one donor to one recipient by targeting IL-6 /IL-6 receptor signaling in mice. *CTS, IPITA, IXA 2007 Joint Conference*. Minneapolis, MN, USA, September 15-20, 2007.

#4. Matsuoka N, Itoh T, Nitta T, Nakano M, Anzai K, Ono J, Yamashita Y, Taniguchi M, Yasunami Y. Timing of the second grafts is crucial in sequential islet transplantations to prevent early loss of islets in the liver of mice in relation to induction of hypo-responsiveness of NKT cells. *67th Scientific sessions of American Diabetes Association (Diabetes 56 suppl. 1 A523-A524, 2007)*. Chicago, IL, USA, June 22-26, 2007.

#5. 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

#6. 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

抗 HMGB1 抗体による移植臓器障害の制御に関し、特許申請を行った。

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

## 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

ショックに陥った患者を究明するための医療を確立し、整備することは、厚生労働行政における喫緊の課題である。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。HMGB1 の放出を制御することは、多臓器不全患者の救命率を高めることができる。本研究では、各種細胞の HMGB1 の放出機構について調べるとともに、その制御法について検討した。その結果、低酸素下において動脈血管内皮細胞 (HAEC) から 1 時間以内に HMGB1 の放出がみられた。低酸素下で誘導される HMGB1 の放出は、NOS 阻害剤 L-NANE あるいは NSF 阻害剤 (TAT-NSF800) で抑制されなかった。次に、Raw 細胞に gp96 siRNA を導入し、同分子を knock-down した後、HMGB1 の放出について調べた。その結果、gp96 の knock-down によって HMGB1 の放出が 50%程度抑制された。さらに、アセチル化酵素阻害剤である Anacardic acid (AA)によって、HMGB1 の放出が部分的に抑制されることが明らかになった。以上の結果から、HMGB1 の細胞外放出は、SNARE 分子等介して起こる分泌経路を経ないことが明らかになった。また、GP96 の制御ならびにアセチル化の制御は、敗血症性ショックにおける HMGB1 の放出制御に有効である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

ショックに陥った患者を究明するための医療を確立し、整備することは、厚生労働行政における喫緊の課題である。ショックのメディエーターである HMGB1 の放出を制御することは、多臓器不全患者の救命率を高めることができる。本研究では、各種細胞における HMGB1 の放出機構について調べるとともに、その制御法について検討することを目的とした。

### B. 研究方法

動脈由来血管内皮細胞 (HAEC) およびマクロファージにおける HMGB1 の分泌様式を ELISA, western blot、および RT-PCR 法で検討した。また、一酸化窒素 (NO) および

TAT-NSF peptide、GP96 阻害およびアセチル化制御薬とうによる分泌制御の可能性を検討した。  
(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

低酸素下で HAEC を培養すると、1 時間以内に HMGB1 の放出がみられた。低酸素下で誘導される HMGB1 の放出は、NOS 阻害剤 L-NANE あるいは

いはNSF阻害剤 (TAT-NSF800) で抑制されなかった。

次に、Raw 細胞に gp96 siRNA を導入し、同分子を knock-down した後、HMGB1 の放出について調べた。その結果、gp96 の knock-down によって HMGB1 の放出が 50%程度抑制された。さらに、アセチル化酵素阻害剤である Anacardic acid (AA)によって、HMGB1 の放出が部分的に抑制されることが明らかになった。

#### D. 考察

HMGB1 の放出機序は未だ不明な点が多いが、NO および NSF はその放出制御に関わっていない可能性が示唆された。また、ER シャペロンの一種である gp96 は LPS による HMGB1 の放出を制御することが明らかになった。Gp96 は LPS や LTA の受容体である TLRs の発現を制御して、エンドトキシンに対する細胞応答を制御している可能性が考えられる。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 の放出を阻害する可能性が示唆された。

#### E. 結論

HMGB1 の細胞外放出は、SNARE分子等介して起こる分泌経路を経ないことが明らかになった。また、GP96の制御ならびにアセチル化の制御は、敗血症性ショックにおけるHMGB1の放出制御に有効である可能性が示唆された。

#### 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. *Mol Cell Biol.* 28(4):1338-47 (2008)

2. 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)
  3. 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)
  4. 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)
  5. 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)
  6. 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)
- ##### 2. 学会発表

1. 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
  2. 松下 健二：エキソサイトーシス制御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。
  3. 松下 健二：高血圧が炎症を惹起する仕組み。第6回松本ボーンフォーラム。塩尻。2007年5月12日。
  4. 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。
  5. 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。
  6. 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
  7. 松下健二 血管機能を改善する天然由来成分。岐阜県工業会平成19年度第1回生物食品技術研究会。岐阜。2007年6月9日。
  8. 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。
  9. 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 バ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。
  10. 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
  11. 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
  12. 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。
  13. 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
- 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. M. Watanabe, N. Hasegawa, A. Ishizaka, K. Asakura, Y. Izumi, K. Eguchi, M. Kawamura, H. Horinouchi, K. Kobavashi. 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. Kobavashi. [Prognosis of surgically treated thymic epithelial tumors] *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 2006 Nov; 107(6):262-7.
3. 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. Anti-High-Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 Antibodies Improve Survival of Rats with Sepsis. *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, Eunhyung Bae, Sayumi Toriyama, Rie Ikeda, Lei Zhang, Kazuko Fujitani, Eunhyung 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 Kajiwaru, 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, Kakihana 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 **Kobavashi 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 **Kobavashi 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, **小林紘一** 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, **小林紘一**, **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. 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.
29. 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
30. 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.
31. 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.
32. 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)
33. 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
34. 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
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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  $\alpha$ -galactosylceramide. *Transplantation* 83:184-192, 2007
40. 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
41. 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
  42. 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)
  43. 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)
  44. 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)
  45. 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)
  46. 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)
  47. 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)
  48. 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.
  49. 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

50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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)
56. 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)
57. 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)
58. 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. (Epub ahead of print)
59. 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