

with a reporter plasmid (0.2 µg) carrying the firefly luciferase gene and the reference plasmid pRL-SV40 (0.02 µg) carrying the *Renilla* luciferase gene under the control of the SV40 enhancer and promoter (Promega) with 0.2 µg of each plasmid expressing effector proteins<sup>2,32</sup>. After 30 h, cells were lysed in Passive Lysis Buffer (200 µl; Promega). Firefly luciferase and *Renilla* luciferase activities were measured in cell lysates (10 µl) using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a luminometer (Berthold Technologies). Relative activity was defined as the ratio of firefly luciferase activity to that of *Renilla* luciferase. Values are the means from six independent experiments.

**Electrophoretic mobility shift and Chromatin immunoprecipitation assays.** Electrophoretic mobility shift assay was performed as described previously<sup>2</sup>. The sequences of the oligonucleotides used in the binding were: 5'-AGCTGCCACGGCCAGCGACGTGGCTCCCTCCCCTTCTGT-3' (UPRE-wt) and 5'-AGCTGCCACGGCCAGCGAaGgGGCTCCCTCCCCTTCTGT-3' (UPRE-mt) (lower-case letters indicate mutations). For supershift experiments, samples were treated with an anti-Flag antibody at 4 °C for 1 h before incubation with a radiolabelled probe. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed as described previously<sup>2</sup>. The primers used for the endogenous

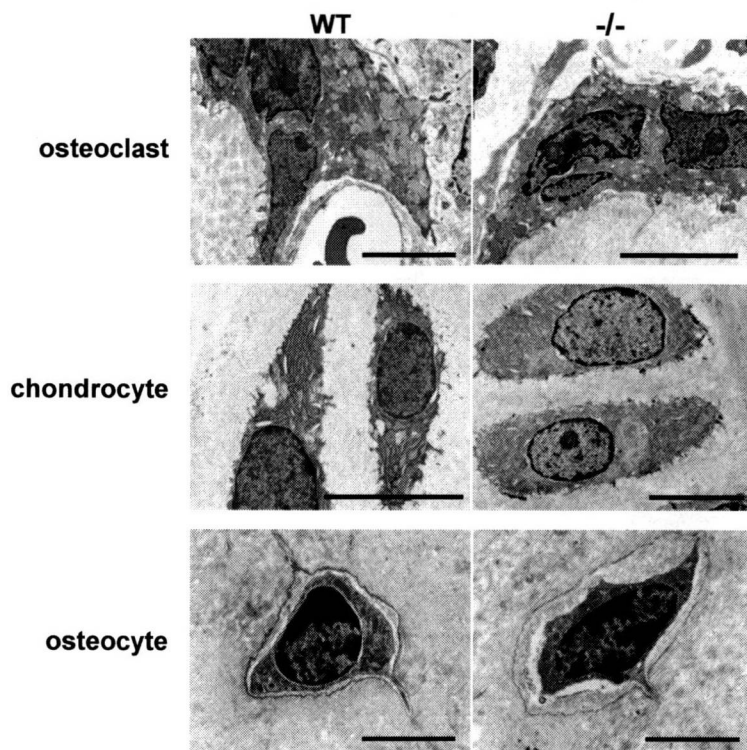
mouse *Col1a1* promoter were: 5'-CATTGCTGTCTCCAGCTCTGCTTC-3' (forward) and 5'-TCCAAACCATCCAAGATTCCATTG-3' (reverse), yielding a 245-bp product. PCR products were electrophoresed in a 4.8% polyacrylamide gel.

**Microarray analysis.** Experimental sample RNAs were isolated using RNeasy (Qiagen) and analysed using Mouse 385K Array (MM8 60mer expr) and Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) by NimbleGen Systems, Inc. and Miyazaki Prefectural Industrial Support Foundation, respectively.

**Accession number of microarray data.** The complete microarray data are available in Gene Expression Omnibus (GEO; accession number, GSE18062).

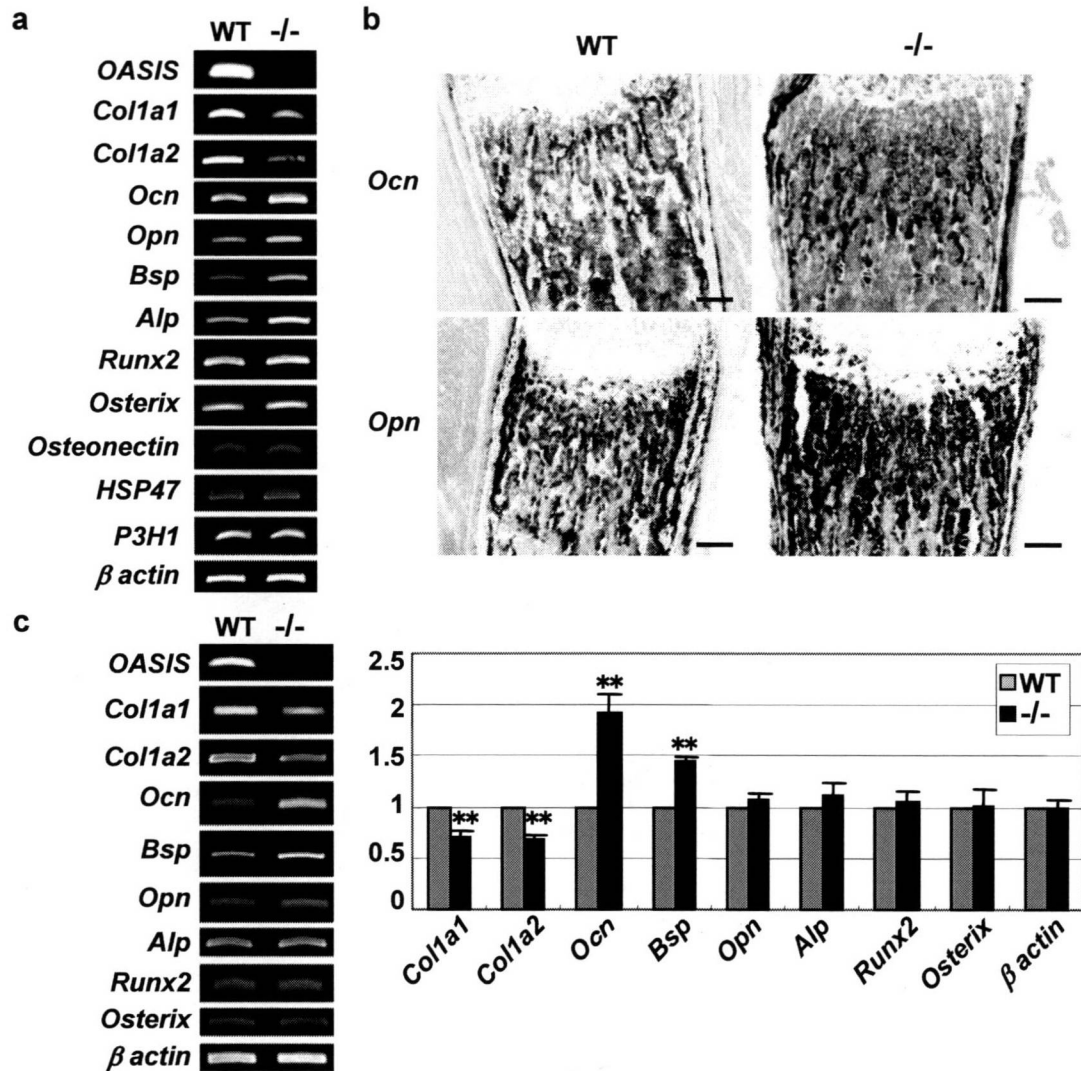
29. Ikeda, F. *et al.* Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J. Clin. Invest.* **114**, 475–484 (2004).
30. Domenicucci, C. *et al.* Characterization of porcine osteonectin extracted from foetal calvariae. *Biochem. J.* **253**, 139–151 (1988).
31. Fisher, L. W. *et al.*, Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* **266**, 61–65 (1995).
32. Xiao, G. *et al.* Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific *osteocalcin* gene expression. *J. Biol. Chem.* **280**, 30689–30696 (2005).

SUPPLEMENTARY INFORMATION



**Figure S2** Electron microscopic analysis in tibiae of 4-month-old WT and *OAS1*<sup>-/-</sup> mice. No structural changes are observed in osteocytes (scale

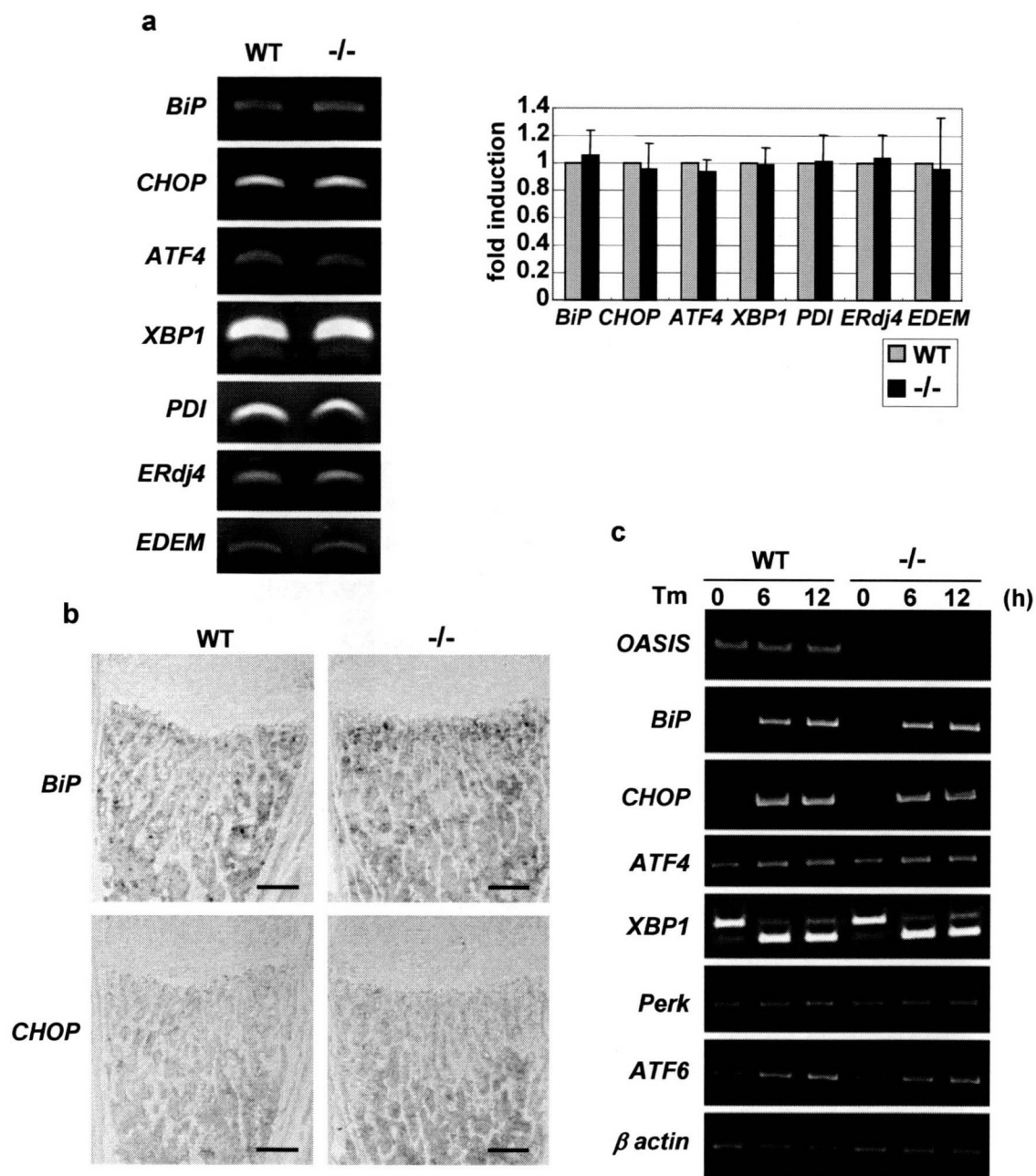
Bar = 3  $\mu$ m), osteoclasts (scale Bar = 6  $\mu$ m), and chondrocytes (scale Bar = 6  $\mu$ m) in *OAS1*<sup>-/-</sup> mice.



**Figure S3** Comparison of gene expressions in bone tissues between WT and *OASIS*<sup>-/-</sup> mice at postnatal 4 days (P4). (a) RT-PCR analysis of P4 calvaria from WT and *OASIS*<sup>-/-</sup> mice. *Col1a1* and *Col1a2* mRNAs are down-regulated, and *Osteocalcin* (*Ocn*), *Osteopontin* (*Opn*), *Bone sialoprotein* (*Bsp*), and *Alkaline phosphatase* (*Alp*) mRNAs are

up-regulated in calvaria of *OASIS*<sup>-/-</sup> mice. (b) *In situ* hybridization analysis of *Ocn* and *Opn* using P4 WT and *OASIS*<sup>-/-</sup> tibiae (scale Bar = 200  $\mu$ m). (c) RT-PCR analysis of various genes in cultured osteoblasts from WT and *OASIS*<sup>-/-</sup> mice. Right panel, quantitative analysis of RT-PCR (mean  $\pm$  SD, N = 3, \*\*p<0.01; t-test).

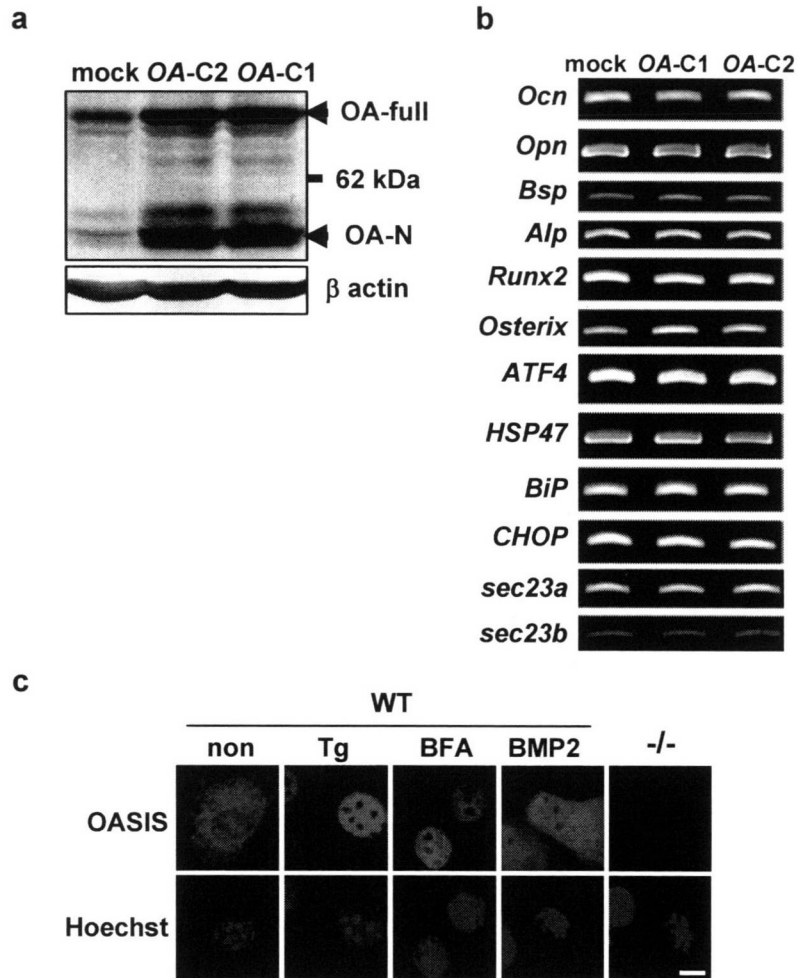
SUPPLEMENTARY INFORMATION



**Figure S4** ER stress response in *OASIS*<sup>-/-</sup> osteoblasts. **(a)** RT-PCR analysis of P4 calvaria in WT and *OASIS*<sup>-/-</sup> mice. The indicated UPR-related genes in *OASIS*<sup>-/-</sup> calvaria are not changed compared with those of WT. A right panel shows the quantitative analysis of RT-PCR (mean ± SD, N = 3). **(b)** *In situ* hybridization analysis of *BiP* and *CHOP* in WT and *OASIS*<sup>-/-</sup> tibiae at P4. There are no differences in the expressions of *BiP* and *CHOP*

between WT and *OASIS*<sup>-/-</sup> tibia (scale Bar = 200 μm). **(c)** RT-PCR analysis of UPR-related genes in primary cultured osteoblasts in WT and *OASIS*<sup>-/-</sup> mice. Osteoblasts were exposed to 3 μg ml<sup>-1</sup> tunicamycin (Tm) for the indicated time, and mRNA was then extracted to examine the inductive level of each gene. The induction of each gene is almost the same in WT and *OASIS*<sup>-/-</sup> osteoblasts.

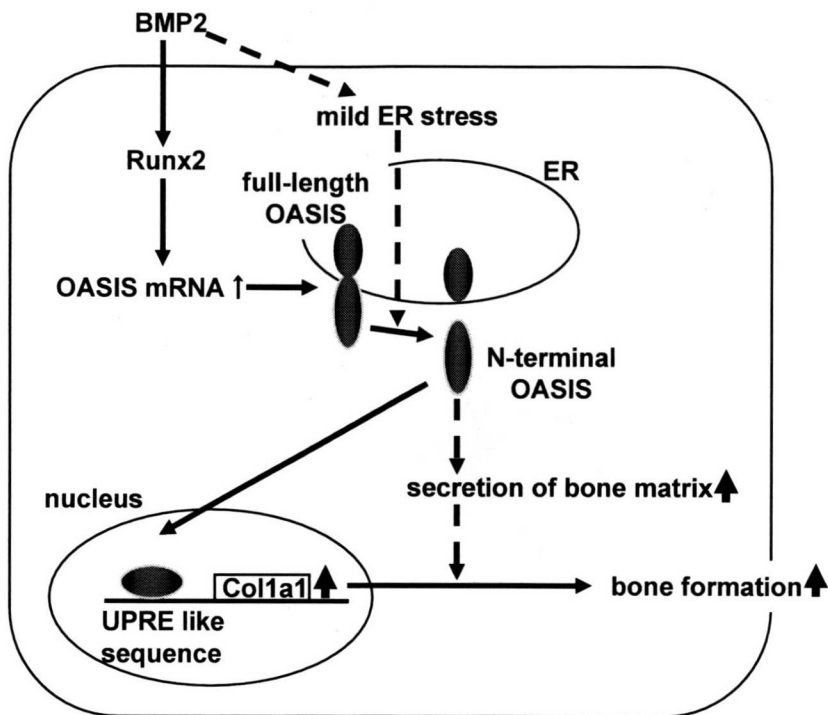




**Figure S5** Alterations of genes in MC3T3-E1 cells infected with adenovirus expressing *OASIS* and immunostaining of *OASIS* in primary osteoblasts. (a) Western blotting of lysates from MC3T3-E1 cells infected with each adenovirus using anti-*OASIS* antibody. *OA-C1* and *C2* are the adenovirus indicated as expressing *OASIS* clone1 and clone2, respectively. The expression levels of *OASIS* in infected cells are shown. (b) RT-PCR analysis of bone formation-related genes and ER stress-related genes in MC3T3-E1 cells infected with adenovirus expressing *OASIS*. The expression levels of these

genes were not affected. (c) Indirect immunofluorescence with anti-*OASIS* antibodies showing the subcellular localization of *OASIS*. Hoechst staining showing the nucleus. Cells were treated with 1  $\mu$ M thapsigargin (TG) or 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> brefeldin A (BFA) for 4 h. For BMP2 treatments, cells were cultured with 100 ng ml<sup>-1</sup> BMP2 for 5 days. Note that the immunoreactivities of *OASIS* are detected in the perinuclear area and also weak signals in nucleus under normal conditions. By contrast, *OASIS* signals accumulate in the nucleus after ER stress or treatments with BMP2 (scale Bar = 10  $\mu$ m). -/-; *OASIS*<sup>-/-</sup> osteoblasts.

SUPPLEMENTARY INFORMATION



**Figure S6** Putative mechanisms responsible for bone formation by OASIS in osteoblasts.

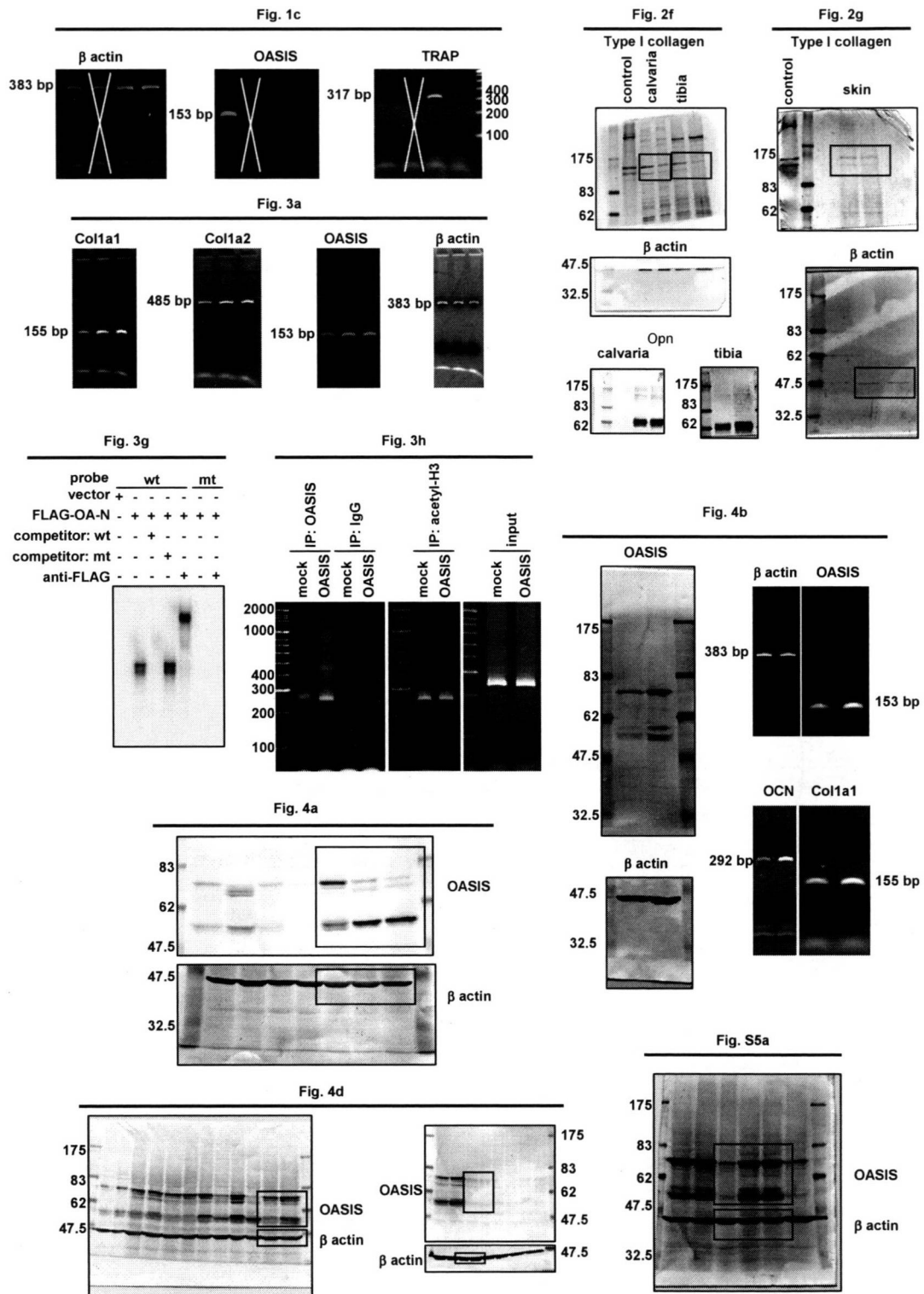


Figure S7 Full scans of key figures

**Supplement table**

OASIS-fwd CCTTGTGCCTGTCAAGATGGAG  
OASIS-rev GCAGCAGCCATGGCAGAGGAG

osteocalcin-fwd AAGCAGGAGGGCAATAAGGT  
osteocalcin-rev AGCTGCTGTGACATCCATAC

beta-actin-fwd TCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC  
beta-actin-rev TCCTGCTTGCTGATCCACAT

TRAP-fwd AAATCACTCTTTAAGACCAG  
TRAP-rev TTATTGAATAGCAGTGACAG

procollagen 1a1-fwd CCCCAACCCTGGAAACAGAC  
procollagen 1a1-rev GGTCACGTTCAAGTTGGTCAAAGG

procollagen 1a2-fwd GCAATCGGGATCAGTACGAA  
procollagen 1a2-rev CTTTCACGCCTTTGAAGCCA

OPN-fwd TCACCATTCCGGATGAGTCTG  
OPN-rev ACTTGTGGCTCTGATGTTCC

ALP-fwd GCCCTCTCCAAGACATATA  
ALP-rev CCATGATCACGTTCGATATCC

Runx2-fwd CCGCACGACAACCGCACCAT  
Runx2-rev CGCTCCGGCCCACAAATCTC

Osterix-fwd CTGGGGAAAGGAGGCACAAAGAAG  
Osterix-rev GGGTTAAGGGGAGCAAAGTCAGAT

osteonectin-fwd ATTTGAGGACGGTGCAGAGG  
osteonectin-rev TCTCGTCCAGCTCACACACCT

HSP47-fwd ACCACAGGATGGTGGACAACCGT  
HSP47-rev ATCTCGCATCTTGTCTCCCTTGGG

P3H1-fwd GTGCAGGCAGATGACCTGGT  
P3H1-rev TCACGCTGCTGACGGCAGCT

BiP-fwd GTTTGCTGAGGAAGACAAAAAGCTC  
BiP-rev CACTTCCATAGAGTTTGCTGATAAT

CHOP-fwd GTCCAGCTGGGAGCTGGAAG  
CHOP-rev CTGACTGGAATCTGGAGAG

XBP1-fwd ACACGCTTGGGAATGGACAC  
XBP1-rev CCATGGGAAGATGTTCTGGG

ATF4-fwd GGACAGATTGGATGTTGGAGAAAATG  
ATF4-rev GGAGATGGCCAATTGGGTTTCC

PDI-fwd CAAGATCAAGCCCCACCTGAT  
PDI-rev AGTTCGCCCAACCAGTACTT

ERdj4-fwd CCCAGTGTCAAAGTGTACCAG  
ERdj4-rev AGCGTTTCCAATTTTCCATAAATT

EDEM-fwd TGGGTTGGAAAGCAGAGTGGC  
EDEM-rev TCCATTCTACATGGAGGTAGAAGGG

PERK-fwd TCTTGGTTGGGTCTGATGAAT  
PERK-rev GATGTTCTTGCTGTAGTGGGGG

ATF6-fwd GGATTTGATGCCTTGGGAGTCAGAC  
ATF6-rev ATTTTTTTCTTTGGAGTCAGTCCAT

BSP-fwd AACAAATCCGTGCCACTCA  
BSP-rev GGAGGGGGCTTCACTGAT

OPG-fwd AACCCCAGAGCGAAACACAGT  
OPG-rev GGCTCTCCATCAAGGCAAGAA

RANKL-fwd CCAGCATCAAATCCCAAGTT  
RANKL-rev TCAAGGTTCTCAGTGGCACAT

Sec23a-fwd GACCTACCACCCATCCAGTACGAG  
Sec23a-rev CTGCATGGACTCCTTCAGAGCCTG

Sec23b-fwd CAGGAGATGCTGGGCCTGACCAAGTC  
Sec23b-rev CCACAGATCTTCCACTGACTTGTG

## 1. 抗 Xa 薬作用

# 2) 抗炎症作用とそのメカニズム



国立長寿医療センター研究所口腔疾患研究部 松下 健二 (Matsushita, Kenji)

### THROMBOSIS and Circulation

#### § 論文のポイント

- [1] 血液凝固反応と炎症反応の間には密接な連関が存在し、その連関の中心的な役割を担うのが protease-activated receptors (PARs) である。
- [2] PAR-2 は、Xa 因子によって活性化され、各種細胞からのサブスタンス P や calcitonin gene related peptide (CGRP), IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-9 などの産生を促し、炎症、疼痛、浮腫、敗血症性ショックなどに関与する。
- [3] 歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* が産生するトリプシン様酵素 gingipain は、PAR-2 を活性化して炎症反応を強力に惹起する。
- [4] Xa 因子および TF/VIIa/Xa 複合体は PAR-1, PAR-2 を限定分解し、PAR を活性化する。次いで、供役 G 蛋白質 (Gq), PLC, PKC を次々に活性化して細胞内カルシウムを動員する。同時に、MAPK を活性化して炎症反応を惹起する。
- [5] Xa 阻害薬 DX-9065 a は、Xa 因子および gingipain による IL-6 および MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-9) の産生誘導を強力に阻害し、抗炎症作用を示す。

#### § キーワード

プロテアーゼ活性化型受容体 (PARs) / 血管内皮細胞 / gingipain / DX-9065 a

## はじめに

活性化血液凝固第 X 因子(Xa 因子)は、内因系(接触因子系)と外因系(組織因子系)の合流点で機能し、血液凝固反応の律速段階を規定する因子である。凝固亢進状態において Xa 因子を効率よく阻害することは血液凝固を制御する上で極めて重要である。また、Xa 因子は血液凝固反応における役割に加え、様々な細胞に作用し多彩な生理活性を示す。したがって、抗 Xa 薬はその応用範囲がさらに広がる可能性を秘めている。特に、凝固反応と炎症反応は密接に関連しており、抗 Xa 薬による炎症制御の可能性が示されている。本稿では、Xa 因子の細胞生理活性、特に炎症惹起作用について述べるとともに、Xa 阻害薬の抗炎症作用について解説する。

## PARs を介した Xa の炎症惹起作用

Xa 因子は、その前駆体である X 因子が活性化されたセリンプロテアーゼであり、軽鎖と重鎖がジスルフィド結合により連結された構造をとる。Xa 因子は  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(Gla)ドメイン( $Ca^{2+}$ 、リン脂質との結合領域)、2つの上皮増殖因子(EGF)様ドメイン(Va 因子結合領域)とセリンプロテアーゼドメインを有する。Xa、Va、 $Ca^{2+}$ 、とリン脂質はプロトロンビナーゼ複合体を形成し、プロトロンビンをトロンビンに変換する。Xa 因子はそれ自体がトロンビン生成能を有しているが、プロトロンビナーゼ複合体を

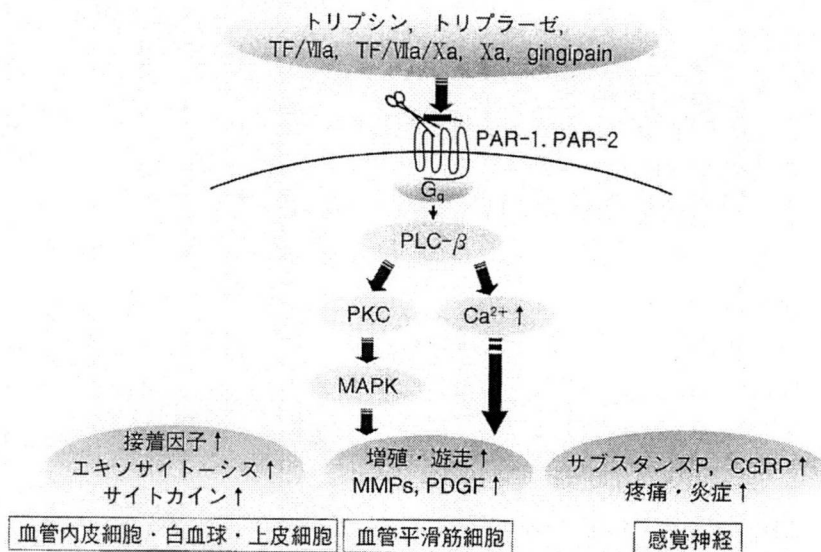


図1 PARを介した炎症惹起作用

形成することによりその生成能は  $10^5$  倍増強される。Xa 因子は血液凝固カスケードの中心的因子の1つであるとともに、プロテアーゼ活性化型受容体(protease-activated receptors: PARs)を介して種々の細胞応答を誘導する生理活性物質でもある。

血液凝固反応と炎症反応との間には密接な連関が存在し、その連関の中心的な役割を担うのが PARs である<sup>1,2)</sup>。現在4種類の PARs がクローニングされている。PARs は血管内皮細胞、血小板、単球、好中球、リンパ球をはじめとした全身の組織・臓器で発現しており多彩な生理作用を示す。トロンビンは、PAR-1、PAR-3、および PAR-4 のリガンドであり、これらの受容体を活性化し、細胞内にシグナルを伝えている。トロンビンは血小板膜上の PAR-1 と PAR-4 を活性化し、血小板の形態変化、脱顆粒、トロンボキサン<sub>2</sub> の生成、GPIIb/IIIa の活性化を惹起して、血小板の凝集を引き起こす。

また PAR-1 は、生体内の様々な臓器、細胞に発現し多彩な生理活性を示す。トロンビンは、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に発現した PAR-1 を活性化し、プロテインC キナーゼ、NF- $\kappa$ B を次々と活性化して、IL-1、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカイン、ICAM-1、P-セレクチンといった細胞接着因子の発現を強力に誘導する。また、PAR-1 シグナルは血管平滑筋細胞の増殖と遊走を惹起する。さらに、フォスフォリパーゼCを活性化し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を増加して、血管内皮細胞からの Weibel Palade 小体のエキソサイトシスを誘導する<sup>3)-6)</sup>。したがって、トロンビンによる PAR-1 の活性化は、動脈硬化や血栓の形成に関わってくる。また、肥満細胞に発現する PAR-1 が活性化されると、ヒスタミン、血小板活性化因子(PAF)、炎症性サイトカインの放出が誘導される。さらに、乳癌細胞上の PAR-1 が matrix metallo-

proteinase-1 (MMP-1) によって活性化されて、同細胞の浸潤・転移が起こることも示唆されている<sup>7)</sup>。このように、PAR-1は止血・血栓形成に重要であるばかりでなく、炎症反応や癌の浸潤・転移にまで関与する分子である。一方、トロンピンは血管内皮細胞上のトロンボモジュリンとも結合し、複合体を形成してプロテインCを活性化する。この活性化プロテインCはEPCR (endothelial protein C receptor)と複合体を形成し、PAR-1を活性化して抗炎症作用を発揮することも報告されている<sup>8)</sup>。

PAR-2は、トリプシン、トリプターゼ、Xa-組織因子複合体、Xa-組織因子-VIIa 因子複合体によって活性化され、各種細胞からのサブスタンスPやCGRP (calcitonin gene related peptide), IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-9などの産生を促し、炎症、疼痛、浮腫、敗血症性ショックなどに関与している(図1)。われわれは、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* が産生するトリプシン様酵素 gingipain が、PAR-2を活性化して歯肉および歯髄に炎症反応を強力に惹起することを明らかにした。すなわち、gingipainは歯髄細胞上のPAR-2を介してMAPKを活性化し、サブスタンスPとCGRPの発現を誘導する。そして、歯髄組織に神経性炎症を惹起し、歯痛を誘発する<sup>9)</sup>。また、gingipainは歯肉繊維芽細胞上のPAR-2を活性化することによって、IL-6, IL-8, MMP-1などの発現を強力に誘導し、歯周病の発症に関わる<sup>10)</sup>。さらに、gingipainはPARの

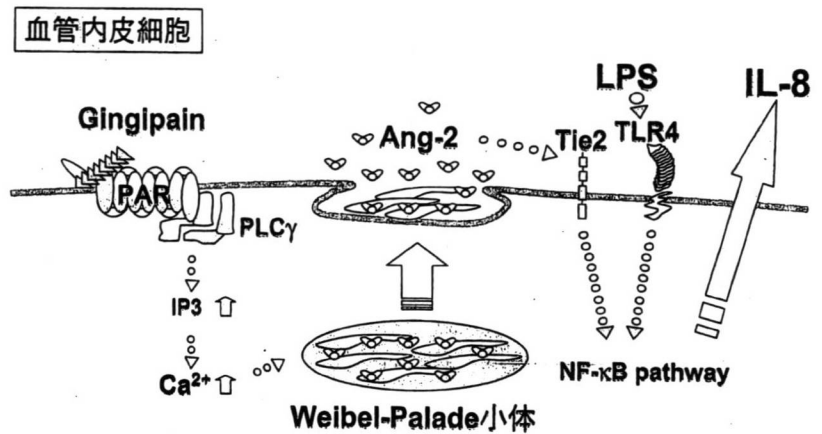


図2 PARシグナルを介した血管内皮細胞の活性化

活性化を介して血管内皮細胞におけるAngiopoietin 2 (Ang 2)の分泌を誘導し、同細胞のLPSに対する感受性を高める(図2)<sup>11)</sup>。このように、PARシグナルは炎症反応に関与すると考えられる。

Xa因子は、そのレセプターを介して動脈硬化、血栓形成、および炎症反応に関わる多様な細胞生理活性を発揮する。現在Xa因子の受容体として、PAR-1およびPAR-2が認知されている<sup>12)</sup>。Xa因子単独でもPAR-1, PAR-2の活性化は起こるが、TF/VIIa/Xa 3分子の複合体の方が5倍以上活性化能が高いことが明らかになっている。また、その複合体による活性化はXa因子の酵素活性部位が重要であることが示されている。Xa因子およびTF/VIIa/Xa複合体はXaの酵素活性によってPAR-1のArg 41-Ser 42の間とPAR-2のArg 34-Ser 35の間を限定分解し、活性化する。次いで、同分子に供役しているG蛋白質(Gq)を活性化し、PLC-β, PKCを活性化して細胞内カルシウムを動員する。同時に、

MAPKを活性化して種々の遺伝子の発現を誘導し、血小板の活性化とともに炎症反応を惹起する(図1)。

Xa因子は血管内皮細胞における各種接着因子(E-selectin, ICAM-1, VCAM-1など)の発現を誘導する<sup>13)14)</sup>。また、Xa因子は血管内皮細胞におけるIL-6, IL-8, macrophage migration inhibitory factorなどの炎症性サイトカインの産生も誘導する<sup>15)</sup>。さらに、Xa因子はTFを強力に誘導する。これらの生理活性はPAR-1およびPAR-2の活性化を介して起こる。Xa因子は血管平滑筋の増殖と遊走を引き起こす。このメカニズムについては、また、Xa因子が同細胞からのPDGF, epiregulin (epidermal growth factor-related ligand)の産生を促す、あるいはfibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1)を活性化することによって誘導されることが示唆されている<sup>16)17)</sup>。また、Xa因子は血管平滑筋からのMMP-2の放出を誘導し、同細胞の浸潤を促す。このような、血管内皮および血管平滑筋に対する



生理活性は Xa 因子が動脈硬化および血栓形成に関わっている可能性を示唆している。また、Xa 因子は、単球・マクロファージにも作用し、TF や炎症性サイトカインの発現を誘導する。また、X 因子は、単球・マクロファージ上に発現している CD 11 b/CD 18 (Mac-1) に結合して Xa 因子となり、同細胞を活性化するとともに凝固系を活性化する。さらに Xa 因子は、脳神経細胞、メサンギウム細胞、および関節滑膜細胞などの遊走、増殖などを惹起して種々の病態形成に関与することが示唆されている(図 1)。

### Xa 阻害による炎症性疾患治療の可能性

Xa 因子などの血液凝固因子は単に血液を固めるだけでなく様々な細胞応答も促し、炎症反応に深く関わっている。Xa 因子はその受容体である PAR-1, PAR-2 を介して炎症反応を惹起する。Xa 因子は炎症メディエーターとしても機能し、凝固と炎症の両方を修飾することが示されている。口腔内の代表的な疾患である歯周病は慢性的な歯肉出血が最も顕著な症状の 1 つである。したがって、歯周病患者の歯周組織においては血液凝固反応が常に亢進している状態であると考えられる。実際に、歯周病患者の患部から採取した歯肉溝滲出液中には同患者の健常部から採取したそれに比べて 5 倍から 10 倍の Xa 活性が認められる<sup>10)</sup>。炎症歯肉においては持続的な X 因子の活性化が起こり、炎症反応が助長されているものと考えられる。歯周病の原因菌である *P. gingivalis* の産

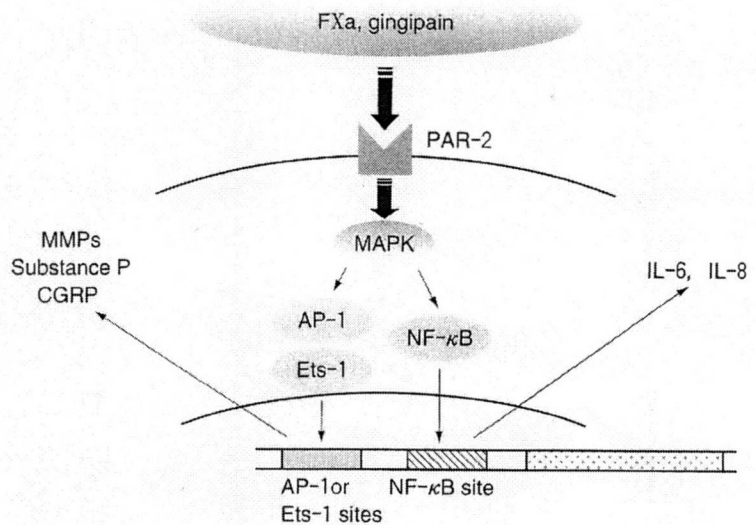


図 3 Xa 因子と gingipain による炎症惹起機序

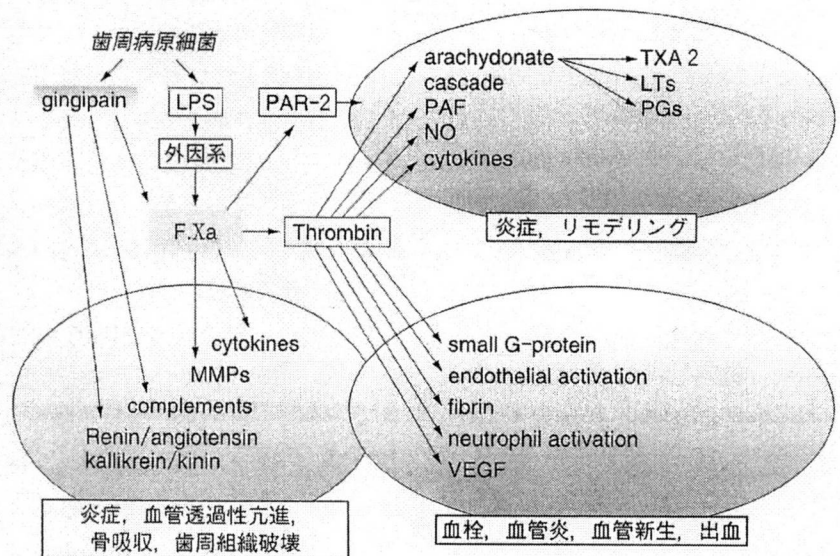


図 4 歯周病原細菌による Xa 因子の活性化と歯周病への関与

生するトリプシン様酵素 gingipain は、X 因子を活性化する<sup>18)</sup>。同酵素は内因性の凝固因子阻害蛋白であるアンチトロンビン III や tissue factor pathway inhibitor (TFPI) で抑制されにくいので、gingipain による Xa 因子の生成は大量にかつ無秩序に行われる。したがって、患部歯肉においては凝固因子の恒常的な活性化に

よって惹起される慢性炎症と凝固因子の消耗による出血が起こると考えられる。

最近われわれは、Xa 因子が培養歯肉線維芽細胞における IL-6 および IL-8 の発現、さらには matrix metalloproteinase (MMP)-1 の発現を強力に誘導することを明らかにした(図 3)<sup>10)</sup>。また、これらの発現誘



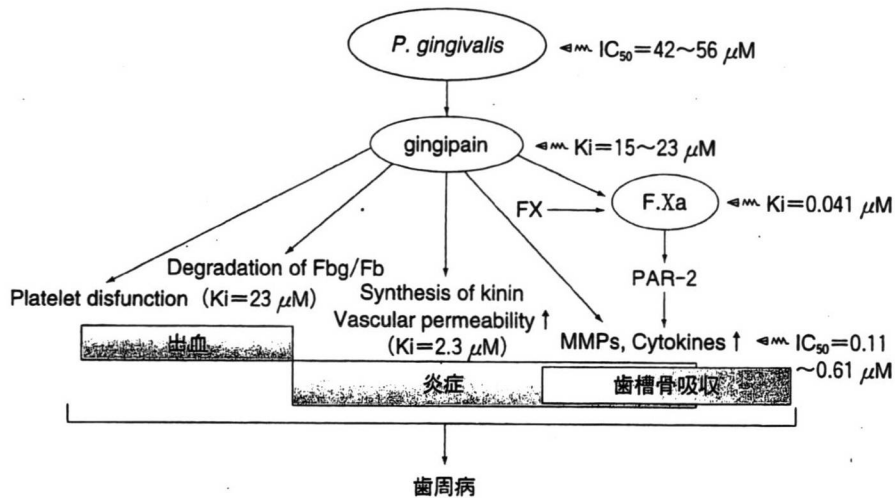


図5 抗 Xa 薬 DX-9065 a の歯周病治療薬としての可能性

導には PAR-2 が必須であること、加えて IL-6 および MMP-1 の誘導には Xa 因子の catalytic activity が必須であった。さらに、Xa 因子は MMP-1 だけでなく、内因性 gelatinase である MMP-2 および MMP-9 もヒト歯肉線維芽細胞系およびヒト好中球培養系においてそれぞれ誘導した。これらの事実は、Xa 因子が歯周病の病態形成に深く関わっていることを示唆している。図4に血液凝固因子特に Xa 因子の歯周病の病態への関与をまとめた。歯周病は、歯槽骨、支持組織を巻き込んだ慢性進行性疾患であり、その成立には Xa 因子が深く関わっている。すなわち、歯周病原菌 *P. gingivalis* の産生する gingipain は、歯肉局所において Xa 因子を多量に生成する。加えて、この菌の LPS によって外因系の凝固カスケードが活性化されてさらに Xa 因子の生成が助長される。局所において多量に生成された Xa 因子は、PAR-2 を介して炎症性サイトカインおよび matrix metalloproteinase

を誘導し、炎症反応を強力に惹起して歯周組織の破壊を促進する。さらに Xa 因子はトロンビンの生成を促す。そして、このトロンビンによる炎症反応も加わって歯周組織破壊がさらに促進されることが考えられる。

このように Xa 因子は歯周病の病態形成に深く関わっている。そこでわれわれは、Xa 因子を制御することによる歯周病治療の可能性を検討するために、Xa 阻害薬 DX-9065 a の歯周病治療薬としての有用性を検討した。その結果、DX-9065 a は Xa 因子および gingipain (RgpA および RgpB) による IL-6 および MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-9) の産生誘導を強力に抑制した ( $IC_{50} = 0.11 \sim 0.64 \mu M$ )<sup>10)</sup>。また、gingipain の酵素活性も強力に抑制すること ( $K_i = 15 \sim 23 \mu M$ ) から、gingipain による炎症惹起作用(コラーゲン分解、補体の活性化、キニン系の活性化等)を阻害することが想定された。さらに、歯周病原菌 *P. gingivalis* の増殖も強力に抑制すること ( $IC_{50} =$

42 ~ 56  $\mu M$ ) から、DX-9065 a が新規の歯周病治療薬として有望であることが示唆された(図5)。

## おわりに

Xa 因子は、血液凝固反応の要の分子として作用するだけではなく、多様な細胞に多彩な生理作用を示す。特に、Xa 因子は PAR を介して炎症反応を惹起する。Xa 因子、トロンビンなどの凝固因子による炎症と凝固反応の連関は、動脈硬化、血栓症、感染症などの慢性炎症が基盤となる病態形成に重要である。抗 Xa 薬は、Xa 因子が関与する炎症性疾患の治療にも有用であろう。

## References

- 1) Coughlin SR : Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature* 407 : 258-264, 2000
- 2) Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, et al : Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of re-

- ceptor activation. *Cell* 64 : 1057-1068, 1999
- 3) Matsushita K, Yamakuchi M, Morrell CN, et al : Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel-Palade-body exocytosis. *Blood* 105 : 207-214, 2005
  - 4) Matsushita K, Morrell CN, Lowenstein CJ : Sphingosine 1-phosphate activates Weibel-Palade body exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 11483-11487, 2004
  - 5) Matsushita K, Morrell CN, Mason RJ, et al : Hydrogen peroxide regulation of endothelial exocytosis by inhibition of N-ethylmaleimide sensitive factor. *J Cell Biol* 170 : 73-79, 2005
  - 6) Matsushita K, Morrell CN, Cambien B, et al : Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* 115 : 139-150, 2003
  - 7) Boire A, Covic L, Agarwal A, et al : PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 120 : 303-313, 2005
  - 8) Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, et al : Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 296 : 1880-1882, 2002
  - 9) Tancharoen S, Sarker KP, Imamura T, et al : Neuropeptide release from dental pulp cells by RgpB via proteinase-activated receptor-2 signaling. *J Immunol* 174 : 5796-5804, 2005
  - 10) Matsushita K, Imamura T, Tomikawa M, et al : DX-9065 a inhibits proinflammatory events induced by gingipains and factor Xa. *J Periodontol* 41 : 148-156, 2006
  - 11) Inomata M, Into T, Ishihara Y, et al : 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 : 1500-1506, 2007
  - 12) Camerer E, Huang W, Coughlin SR : Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 5255-5260, 2000
  - 13) Hezi-Yamit A, Wong PW, Bien-Ly N, et al : Synergistic induction of tissue factor by coagulation factor Xa and TNF : evidence for involvement of negative regulatory signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 12077-12082, 2005
  - 14) Senden NH, Jeunhomme TM, Heemskerk JW, et al : Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 161 : 4318-4324, 1998
  - 15) Busch G, Seitz I, Steppich B, et al : Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes : implications in acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 : 461-466, 2005
  - 16) Koo BH, Kim DS : Factor Xa induces mitogenesis of vascular smooth muscle cells via autocrine production of epiregulin. *J Biol Chem* 278 : 52578-52586, 2003
  - 17) Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, et al : Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 94 : 340-345, 2004
  - 18) Imamura T, Potempa J, Tanase S, et al : Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 272 : 16062-16067, 1997

# 血管障害を基盤とした歯周病と糖尿病の関連性

\* 国立長寿医療センター研究所 口腔疾患研究部

松下健二

歯科臨床の現場では、従来から歯周病は糖尿病合併症として認知されてきた。そして近年、大規模疫学調査の結果から両者の相関関係が明確にされた。一方、両者の因果関係についてはエビデンスが十分ではない。糖尿病患者においては、糖化タンパク質AGEがマクロファージなどの炎症性細胞を活性化するとともに、血管内皮を障害することにより歯周組織の炎症増悪と創傷治癒の遅延が起こっている可能性がある。一方、歯周病原細菌の産生するプロテアーゼやリポ多糖は、TNF- $\alpha$ をはじめとした炎症性サイトカインの産生を促し、歯周組織とともに全身に炎症を波及させることで、全身の血管を障害して糖尿病の病態を増悪する可能性が考えられる。

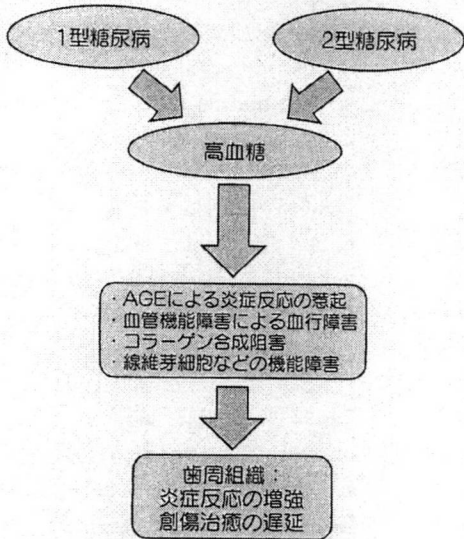


図1 糖尿病が歯周病に及ぼす影響の一例  
糖尿病においてみられる高血糖は、炎症反応の増強、血管障害、代謝障害などを引き起こすことにより歯周組織の炎症増悪と創傷治癒の遅延をもたらす。

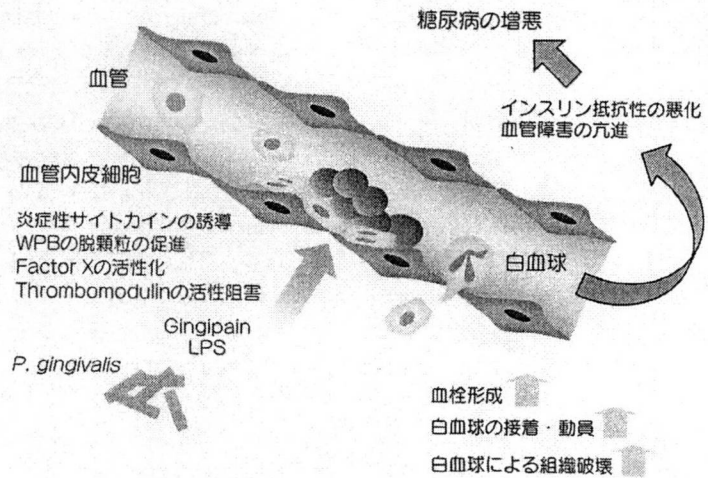


図2 血管を基盤とした歯周病による糖尿病の増悪機序  
歯周病原細菌の産生するトリプシン様酵素gingipainやリポ多糖は、歯周組織および全身の血管に作用し、炎症反応の増強や血栓形成を促進することにより糖尿病の病態を増悪する可能性がある。

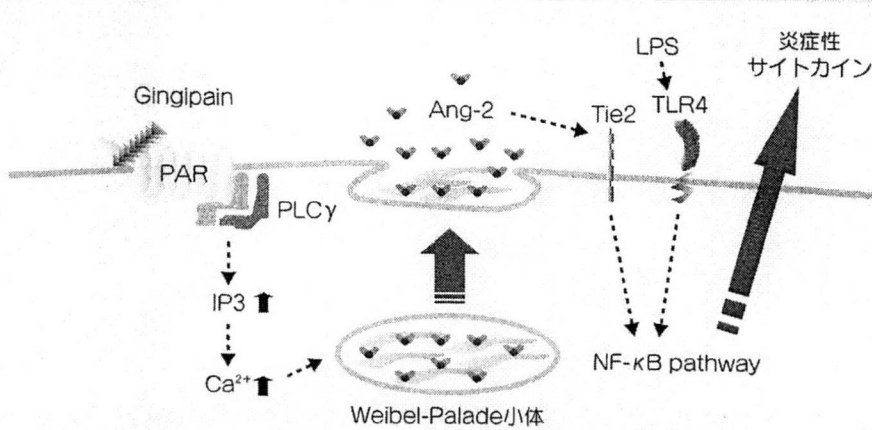


図3 歯周病原細菌由来プロテアーゼによる血管の免疫応答の増幅機序  
歯周病原細菌 *P. gingivalis* の産生するgingipainは血管内皮のエキソサイトーシスを誘導し、LPSに対する血管内皮の免疫応答を増強する。



## はじめに

歯周病は日本国民の約8割が罹患する国民病であり、歯の喪失の最大原因となる疾患である。歯周病は歯周ポケットに生息した一連の細菌群による感染症であるが、生活習慣がその発症と進行を左右する生活習慣病の側面も有する。また、近年歯周病と全身疾患の関連性が明らかになり、歯周医学(Periodontal Medicine)といった学問領域も構築されつつある。これまでの研究結果から歯周病が、糖尿病、肥満、虚血性心脳疾患、早産、低体重児出産などのリスク因子になることが示唆されている。しかし、その一方で両者の因果関係はまだ十分明らかにされていないのが現状である。本稿では、歯周病と糖尿病の関連性について、これまでの知見を総括するとともに血管障害を基盤とした両者の関係についても考察したいと思う。

## I. これまでの疫学研究

糖尿病患者が重度の歯周病に罹患していること、また糖尿病患者の歯周病が難治性であることなどから、歯周病は糖尿病の合併症と考えられている。1型と2型に大別される糖尿病であるが、これまで両タイプの糖尿病と歯周病との関連性が報告されている。欧米で行われたいくつかの横断研究の結果でも、1型糖尿病患者では重度の歯周病を有している患者が多いこと<sup>1)</sup>、また血糖コントロールの悪い患者において高度の歯槽骨が認められること<sup>2)</sup>などが報告されている。ま

た本邦で行われた若年者の1型糖尿病の調査でも、同年代の健常者に比べ、歯周病の罹患率が有意に高いことが報告されている<sup>3)</sup>。以上のことから、1型糖尿病は歯周病のリスクファクターと考えることができる。

一方、2型糖尿病と歯周病についても有意な相関がみられる。米国ピマインディアンを対症にした調査では、2型糖尿病患者では非糖尿病患者に比べて歯周病発症率が2.6倍高いことが報告されている<sup>4)</sup>。加えて、血糖コントロールの悪い2型糖尿病患者では、コントロールが良好な患者に比べ歯周ポケットが深くなる傾向にあることも報告されている<sup>5)</sup>。以上の研究結果は、歯周病が糖尿病の合併症であることを示唆している。また、歯周病を合併している糖尿病患者に対して歯石除去と抗生剤の経口投与などの歯周治療を積極的に施すと、血中のtumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )値やHbA<sub>1c</sub>値が減少したという報告もある<sup>6)</sup>。したがって、歯周病が糖尿病の増悪因子となっている可能性も示唆される。

## II. 糖尿病が歯周病を増悪する機序

多くの疫学調査によって、歯周病と糖尿病の相関関係はある程度解明されたが、両者の因果関係を説明するにはまだ十分なエビデンスが蓄積されていないように思われる。糖尿病が歯周病を増悪する機序について、いくつかのことが想定される。その重要なファクターとして高血糖が挙げられる。高血糖は心血管疾患の主要なリスクファ

クターとして認知されている<sup>7)</sup>が、高血糖は非酵素的に生体のタンパク質を糖化する。これらの糖化最終産物(AGE; Advanced glycation endproducts)は、マクロファージをはじめとする炎症性細胞を活性化する<sup>8)</sup>。AGEによって活性化された炎症性細胞は、動脈硬化巣へ集積し、TNF- $\alpha$ 、interleukin-6 (IL-6)、MCP-1などの炎症性サイトカインや活性酸素を産生し、血管の炎症を増悪して、動脈硬化を進展させる。AGEは、血管内皮細胞における一酸化窒素(NO)の産生を障害し、血管内皮機能を低下させ、大小血管の循環障害を引き起こす<sup>9)</sup>。また、糖尿病患者の歯周組織にはAGEが沈着していることが報告されている<sup>10)</sup>。したがって、AGEによる動脈硬化の進展機序と同様にAGEによる全身性の炎症惹起と細小動脈を含む血管機能の障害によって、歯周組織の炎症の増悪と創傷治癒の遅延が起こっている可能性が考えられる(図1)。

## III. 歯周病が糖尿病を増悪する機序

歯周病は、歯周局所の感染症であり、歯周病原細菌とそれに対する生体応答が全身に波及し糖尿病を増悪する可能性がある。歯周ポケットに形成される細菌性バイオフィームは歯周局所に炎症反応を惹起し、歯周炎を引き起こす。その際、歯周局所には、炎症性サイトカインをはじめとする生理活性物質が多量に産生されるが、それは血行性に全身伝搬される。特にTNF- $\alpha$ はその受容体を介して骨格筋細胞や脂肪細胞によるなどの取

り込みを抑制し、インスリン抵抗性を付与する<sup>11)</sup>。また、慢性の歯周炎患者においては、菌血症が頻繁に起こっていることが報告されている。血管内に侵入した歯周病原細菌も、末梢に伝搬され血管や末梢臓器に定着し、同部位において炎症反応を惹起する可能性が示唆されている。歯周病原細菌の多くはグラム陰性菌であり、その細胞壁成分であるリポ多糖(LPS)は強力な炎症惹起物質である。また、最も重要な歯周病原細菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* は、強力なトリプシン様プロテアーゼ gingipain を産生し、血液凝固反応を亢進するとともに血管の炎症を惹起する(図2)。最近我々は、この gingipain が血管形成調節因子 angiotoxin2 を含む分泌顆粒のエキソサイトーシスを誘導し、LPS に対する血管内皮細胞の感受性を高め、血管の炎症応答を増強することを明らかにした(図3)<sup>12)</sup>。歯周病原細菌由来のこれらの因子は、協調的に作用して歯周局所の炎症を増悪するとともに、全身の血管に作用して血管の炎症を増強し動脈硬化を促進している可能性がある。加えて、それらの因子は糖尿病に合併する微小血管と大血管の障害を増悪する可能性が考えられる。

## おわりに

歯周病と糖尿病の関連性について私見を踏まえて考察した。両者の相関関係についてはこれまでの研究からほぼ立証されたと考えてよい。しかし、因果関係に関しては十分な根拠が得られていないのが現状であり、本稿で述べたことも

推測の域をでないものが多い。今後、医学と歯学の研究者が協力して、両者の因果関係を明らかにするための質の高い研究が推進されることを切に望む。

## 参 考 文 献

- 1) Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, *et al.* Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc* 1982; 104(5): 653-60.
- 2) Rylander H, Ramberg P, Blohme G, *et al.* Prevalence of periodontal disease in young diabetics. *J Clin Periodontol* 1987; 14(1): 38-43.
- 3) Takahashi K, Nishimura F, Kurihara M, *et al.* Subgingival microflora and antibody responses against periodontal bacteria of young Japanese patients with type 1 diabetes mellitus. *J Int Acad Periodontol* 2001; 3(4): 104-11.
- 4) Taylor GW, Burt BA, Becker MP, *et al.* Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 1998; 3(1): 30-9.
- 5) Novaes AB Jr, Gutierrez FG, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I--Probing pocket depth and clinical attachment. *Braz Dent J* 1996; 7(2): 65-73.
- 6) Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, *et al.* The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2001; 72(6): 774-8.
- 7) Ludwig DS. The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *JAMA* 2002; 287(18): 2414-23.
- 8) Schmidt AM, Yan SD, Brett J, *et al.* Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1993; 91(5): 2155-68.
- 9) Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, *et al.* Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006; 114(6): 597-605.
- 10) Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, *et al.* Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontol Res* 1996; 31(7): 508-15.
- 11) Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, *et al.* Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1994; 94(4): 1543-9.
- 12) Inomata M, Into T, Ishihara Y, *et al.* 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* 2007; 9(12-13): 1500-6.



今回の「Dentistry Quo Vadis? 未来歯科医学に向けて」では、まず1日目に齲蝕と歯周病のサイエンスの現状と未来について、花田信弘氏、高橋信博氏、それに座長の山田 正氏と高添一郎氏などが加わり、熱い討論が繰り広げられた。特に、齲蝕の病因論における mutans streptococci の位置づけに関して意見がぶつかった。齲蝕の病因論に関して学者間で見解が異なり、いまだに十分なコンセンサスが得られていないことが浮き彫りになった。

しかしその一方で、齲蝕原性細菌の一つとして *Streptococcus mutans* を捉え、それを指標として齲蝕対策を講ずることで、齲蝕罹患者数が減ってきたという歴史的な事実がある。そのような意味で、ミュータンス菌病因論の果たした役割は大きいのではないかと思う。また、今回のプレゼンテーションのなかで歯周病に関する話題提供がほとんどなく、歯周病の予防に関する十分な議論がなされなかったことは残念であった。

2日目のインプラント治療の現状と課題に関する講演では、インプラント医学の問題点が浮き彫りにされた。歯科用インプラントの開発と応用は、歯科の発展のために非常に重要であるが、その一方でまだ学問として未成熟の部分があり、そこが医療事故などの問題につながっている。学会主導での治療指針の策定と、それをもとした学部学生と歯科医師の教育が早急に行われる必要がある。

また、1日目最後の須田立雄氏の講演は、インプラント学の現状を把握するうえで大変有意義なものだった。インプラント体と生体の相互作用などの基礎研究が十分なされておらず、インプラント治療の予後を左右するその機序に関する研究を早急に進める必要がある。

イノベーションの推進のなかに歯科医学の明るい未来がある。インプラント学は未来歯科医学の中核をなすものであり、再生医学の発展と相まってさらに発展していくものと思われる。しかし、その礎が脆弱であっては歯科の未来もおぼつかない。インプラント学の基盤を整備することが喫緊の課題である。そして、予防歯学を基盤とした再建・再生医学の確立こそが明るい歯科医学の未来を切り開く(図1)。

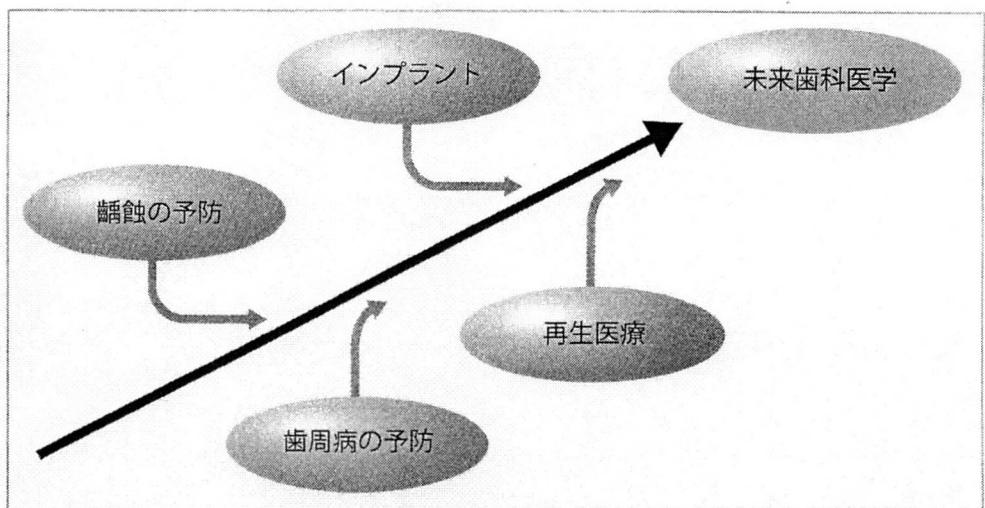


図1 予防歯学を基盤とした効果的な再建・再生歯学の確立

松下健二  
Kenji Matsushita

国立長寿医療センター研究所  
口腔疾患研究部

### 3. ヒストンアセチル化制御薬を用いた HMGB1 の放出制御

杉浦 進介, 江口 傑徳, 小松 寿明, 松下 健二

国立長寿医療センター研究所口腔疾患研究部

#### はじめに：敗血症の死のメディエーター

敗血症は細菌感染を基盤とする全身性炎症反応症候群であり、ショックや多臓器不全に移行する重篤な病態である。敗血症を契機に、本邦では毎年推定5万人以上、米国では毎年約22万人が死亡しており、抗菌剤や抗炎症剤が発達した現在でも、集中治療領域において重大な死因となっている<sup>1)</sup>。

1999年、WangらはHigh Mobility Group Box 1 (HMGB1) が致死性エンドトキシン血症や敗血症のメディエーターであると報告した。彼らは、エンドトキシン血症や敗血症のモデルマウスで血中のHMGB1が発症後16~32時間後に上昇すること、またマウスへの組換えHMGB1投与により発熱や組織破壊が誘導され、敗血症の病態が誘発されることを示した。一方、抗HMGB1抗体やHMGB1阻害剤の投与は、エンドトキシン血症や敗血症マウスの生存率を改善することが明らかにされた<sup>2)</sup>。

#### 1. High Mobility Group Box 1 (HMGB1)

HMGB1は、1976年に仔牛の胸腺より同定された215アミノ酸残基から成るタンパク質で、そのC末端側は負電荷のacidic tail、N末端側はそれぞれ約70残基から成る正電荷の“HMG box A, box B”から構成されており、2つの核移行シグナル(Nuclear Localization Signal: NLS)を有している。HMGB1の受容体としては、Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)やToll Like Receptor (TLR)-2/4が知られている。

HMGB1は、多彩な細胞の核内に普遍的に存在する非ヒストンタンパク質であり、box A, box BによりDNAと親和性を示す。核内ではタンパク質複合体を形成しクロマチン構造の安定性を保持して、さまざまな遺伝子の転写制御に関わっている。HMGB1ノックアウトマウスは、肝臓にグリコーゲンを貯蔵できず、その表現型は野生型に比べ骨格が小さく、脊椎が湾曲し、歩行困難を伴っていた<sup>3)</sup>。またその機序としてHMGB1が骨軟骨組織の形成に関わっていることが示唆されている。さらに、HMGB1が組織の修復や、DNA損傷の修復に寄与するとの報告もある<sup>4, 5)</sup>。

通常核内に存在するHMGB1であるが、炎症反応時に2通りの機構により細胞外へと放出される。それは、壊死した細胞から放出されるpassive releaseと、活性化したマクロファージ(Mφ)や単球、さらには傷害を受けた血管内皮細胞が放出するactive secretionである。核内のHMGB1が、細胞質へ移行し、細胞外へ放出されるためにはHMGB1のNLS中のリジン残基のアセチル化が必要である<sup>6)</sup>。一度、細胞外に放出されたHMGB1は、RAGEやTLR-2/4などと結合し、炎症性サイトカインとして作用して、炎症反応を促進する。このように、HMGB1は核内のクロマチン構造ではDNAに結合しその修飾因子として機能し遺伝子発現を制御する一方で、ひとたび細胞外へ出ると炎症性サイトカインとして機能したり、組織の修復・再生を制御したりする。

#### 2-1. HMGB1と炎症性疾患

これまで、HMGB1はさまざまな炎症性疾患において検出されてきた。実験動物では組換え

HMGB1の投与により炎症反応が誘発されること、また抗HMGB1抗体によりその病態が軽減されることから各種炎症性疾患（肺水腫、肝炎、肝硬変、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、脳梗塞、関節リウマチなど）とHMGB1との関連性が示唆されている。

## 2-2. HMGB1と心血管疾患

アテローム性動脈硬化の病巣部位では高濃度のHMGB1が検出されるが、それは活性化したMφや単球のみならず、傷害された血管内皮細胞からもHMGB1が放出されるためとされている<sup>7)</sup>。HMGB1等のサイトカインの作用でMφや血管平滑筋細胞などが病巣部に遊走し、誘導された単球系細胞がさらにHMGB1やサイトカインを放出することで炎症反応が増強され、血栓形成が促進される。

過剰のHMGB1は組織破壊をもたらす一方、適量のHMGB1は組織保護的に働く可能性がある。

## 3-1. アセチル化修飾

ヒストンのアセチル化などのヒストン修飾が細胞の増殖や分化、遺伝子発現を選択的に調節することが知られている<sup>8)</sup>。

例えば、転写共役因子（転写コアクチベーター）の多くは、ヒストンアセチル化酵素（Histone Acetylase: HAT）活性によりヒストンテイルの特定のリジン残基をアセチル化し、ターゲット遺伝子の発現を促進する。一方、ヒストン脱アセチル化酵素（Histone Deacetylase: HDAC）によるヒストンテイルのアセチル基の除去は、ターゲット遺伝子の発現を抑制する。HATやHDACはヒストンのアセチル化の状態を制御するのみならず、非ヒストン核内タンパク質や転写因子のアセチル化の状態も制御することが知られている。例えば、Trichostatin A (TSA)はNF- $\kappa$ Bサブユニットのアセチル化を促進し、炎症性遺伝子の発現を亢進する。このように、アセチル化制御薬の効果はその細胞が置かれた状態によりさまざまであり、同時に多様な細胞内シグナル伝達経路に関わる。

## 3-2. HDAC阻害薬: Valproic Acid

バルプロ酸 (VPA) は、1963年に抗てんかん薬としての効果が発見され、現在では、GABA分解酵素阻害剤として、抗てんかん薬、抗躁鬱薬として処方されている。VPAの作用点は、コレプレッサー (Nuclear Receptor Corepressor: NCoR) 結合性のHDACsのような普遍的な遺伝子発現調節因子であることが知られる。HDAC阻害剤としてのVPAは、0.5~2 mMでHDAC1, 2, 3, 4, 8を選択的に阻害し、その結果ヒストンH3, H4のアセチル化が起こる<sup>9)</sup>。加えて、VPAはクロマチン構造を制御する遺伝子の発現を変化させる。すなわち、VPAは乳癌細胞においてクロマチン構造維持 (Structural Maintenance of Chromosomes: SMC) タンパク質、SMC関連タンパク質、DNAメチル化酵素、ヘテロクロマチンタンパク質等を減少させ、その結果クロマチンの脱凝集、DNase感受性の亢進、層状のDNA間に挿入されるインターカレーター（アドリアマイシンなどの抗がん剤）とDNAとの相互作用が亢進される。

## 4. アセチル化制御薬によるHMGB1の放出制御

HMGB1の細胞外放出には、NLS中のリジン残基のアセチル化を伴うことが報告された<sup>6)</sup>。そこでわれわれは、ヒストンのアセチル化を制御するHDAC阻害薬とHAT阻害薬に着目し、HDAC阻害薬であるVPAとHAT阻害薬 Anacardic acid (AA) を用いて、Mφ系細胞株 RAW-Blue CellにおけるHMGB1の動態制御を試みた。

RAW-Blue Cellの培養上清中HMGB1濃度はVPA添加で無添加群に比べ4.2倍に増加した。VPAによるHMGB1の放出にはHMGB1 mRNAの発現変動を伴わないこと、また細胞内HMGB1濃度の減少することが明らかになった。以上の結果より、VPAは、核内に既存のHMGB1を細胞外へと放出することが証明された。

さらに、HAT阻害剤AAをVPAと同時に添加し、HMGB1の動態を検討した。その結果VPAとAAの同時添加により、VPA単独添加に比べ23%、HMGB1の放出が抑制された。すなわち、