

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月21日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659798

研究課題名（和文） PAMPs-DAMPsの包括的制御システムとしてのTM-PC/EPCR装置

研究課題名（英文） Comprehensive regulatory system of PAMPs/DAMPs by TM-PC/EPCR system

研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA IKURO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：20082282

研究成果の概要（和文）：培養血管内皮細胞上のトロンボモジュリン（TM）分子のN末端レクチン様ドメインには DAMPs：HMGB1, histones が, PAMPs：エンドトキシン（LPS）が結合して、それぞれそれらの活性を制御した。そこで今回の研究では特に HMGB1 のダイナミズムについて研究した。TMのN末端のレクチン様ドメインに結合した HMGB1 は、トロンビン・TM 複合体によって、N 末端の Arg(10)-Gly(11) 部位で切断され、HMGB1 は遊離されて、活性の低下した *des*-HMGB1 が生成された。この *des* 体は intact HMGB1 の受容体（RAGE, TLRs-2,-4）への結合を阻害したことから、体内では HMGB1 とその受容体系のネガティブフィードバック系を形成しているものと推定された。そこでこの *des*-HMGB1 を即位的に認識する ELISA を樹立した。このアッセイ法は90%の *des*-HMGB1 を検出したが、10%は intact HMGB1 がコンタミネーションを起こしていた。本方法で諸疾患、特に遺伝子組換え体のTMで治療された患者の血中の *des*-HMGB1 した。遺伝子組換えTM投与で、速やかに *des*-HMGB1 が上昇する患者検体が観られた。しかし遺伝子組換えTMの投与でも *des*-HMGB1 の上昇しない症例、あるいはただちに低下する例などが観察され、遺伝子組換えTM治療に対し、レスポンドと非レスポンドがあること、あるいは *des*-HMGB1 の体内ターンオーバーの個体差の存在が推定された。

研究成果の概要（英文）：Endothelial thrombomodulin(TM) binds DAMPs(Damage Associated Molecular Patterns);HMGB1,a representative DAMPs, histones. Moreover TM also binds PAMPs(Pathogen Associated Molecular Patterns) ;lipopolysaccharide(LPS), a representative PAMPs, onto the lectin-like domain of the molecule and neutralizes their cytopathic activities, including proinflammatory and procoagulant activities. HMGB1 bound to TM, degraded by thrombin/TM complex and generated the N-terminus deleted HMGB1, named as *des*-HMGB1. *Des*-HMGB1 bound onto the receptors RAGE and TLR2-2,-4. However the binding affinity was weak compared to intact HMGB1, suggesting *des*-form of the molecule may configure a negative feedback loop among HMGB1 and its receptors regulating the diverse activities of HMGB1. Based on the findings, assay of

des-HMGB1 may provide significant information in such morbid states including Disseminated Intravascular Coagulation(DIC), sepsis, systemic inflammatory response syndrome(SIRS) and so on. Therefore we tried to establish specific assay method of *des*-HMGB1. We got specific monoclonal antibodies to react with the *des*-HMGB1. Using the monoclonal antibody, we established specific enzyme linked immune sorbent assay(ELISA). The ELISA successfully detected *des*-HMGB1 with 10% contamination of intact form. *Des*-HMGB1 was increased the serum from DIC, especially treated with recombinant TM. However the increased *des*-HMGB1 was decreased rapidly suggesting the rapid turn-over of the *des*-form. Moreover some patients showed no increased in *des*-HMGB1 even with recombinant TM treatment, suggesting of the presence or non-responder cases. Thus assessment of *des*-HMGB1 may be expected to provide a novel information in the DIC, SIRS, sepsis and so on with or without treatment.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：PAMPs・DAMPs・トロンボモジュリン・プロテイン C ・HMGB1

1. 研究開始当初の背景

核内DNA結合蛋白 HMGB1 は各種の壊死細胞の核内から細胞外に遊離してきて、受容体 RAGE(Receptor for Advanced Glycation Endproducts, TLR-2, TLR-4 を介して、凝固、免疫（炎症）、樹状細胞や幹細胞の遊走を促進し、生体防禦的（止血）、自然免疫誘導、修復的に働くが、その過剰は播種性血管内凝固症候群（DIC）や敗血症性ショック、急性肺障害、急性呼吸促拍症候群、SIRS(全身性炎症症候群)などの誘因、原因となることを申請者らをはじめとする内外の研究者が報告してきた。この過程で申請者らは、①HMGB1 の特異的測定系の確立、② thrombomodulin(TM) がその N 末に HMGB1 を吸着・中和し、トロンビン・TM 複合体のよって TM 付着部位で切断遊離させることを見出し、これを *des*-HMGB1 と命

名した。

2. 研究の目的

そこで本研究では①*des*-HMGB1 の高感度測定法を確立し、②諸疾患患者の血液や体液中の *des*-HMGB1 を測定し、③HMGB1 の血中でのダイナミズムと治療（特に rTM）の治療効果、などのモニターマーカーとなりうるか、否かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

TMのレクチン様ドメインに結合したHMGB1はTMのE456ドメインに結合しているトロンビンによって、そのN末端 Arg(10)-Gly(11) 部位で分解され、TMから遊離することを突き止めたので、このN末端の一部の残基が離脱したあとの *des* 体と特異的に反応するモノクローナル抗体を作製し、

des-HMGB1 測定のための ELISA を確立した。そしてこの ELISA で、各種疾患、特に DIC 患者、遺伝子組換え体の TM 治療中の DIC 患者の血液中の *des*-HMGB1 を測定し、HMGB1 のダイナミズムと病態への関与を考察した。

4. 研究成果

確立した *des*-HMGB1 測定キットは 10% 程度の intact HMGB1 を検出したが、それを差し引くことで、*des*-HMGB1 濃度を十分評価することが可能であった。

DIC で遺伝子組換え体 TM を投与された患者では一部 *des*-HMGB1 は高値を示したが、その濃度は速やかに低下し、ターンオーバーが速いことが推定された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

(1) Coagulation activity and white thrombus formation in the microminipig. Miura, N.

In Vivo. 27(3) 巻 357-61(2013) 査読有

(2) Analysing responses to aspirin and clopidogrel by measuring platelet thrombus formation under arterial flow conditions

Hosokawa, K. Thromb Haemost. 109 巻 102-11 (2013) 査読有

DOI: 10.1160/TH12-06-0441

(3) Paucity of CD34-positive cells and increased expression of high-mobility group box 1 in coronary thrombus with type 2 diabetes mellitus.

Yamashita, A. Atherosclerosis. 224 巻 511-514(2012) 査読有

DOI : 10.1160/TH12-06-04411

(4) Neutrophil elastase inhibitor improves survival rate after ischemia reperfusion injury caused by supravisceral aortic clamping in rats.

Fujimura, N. J Surg Res. 180 巻 e31-6(2013) 査読有

DOI : 10.1016/j.jss.2012

(5) Increased plasma levels of high mobility group box 1 in patients with acute liver failure.

Oshima, G. Eur Surg Res 48 巻 154-62(2012) 査読有

DOI : 10.1159/00033863

(6) Role of high mobility group box chromosomal protein 1 in ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine.

Kojima, M. J Surg Res. 178(1) 巻 466-71(2012) 査読有

DOI : 10.1016/j.jss.2012.01.044

(7) Immunohistochemical expression of thrombomodulin in vestibular schwannoma

Yamahata, H. Brain Tumor Pathol 30 巻 28-33(2013) 査読有

DOI : 10.1007/s10014-012-0095-z1.

(8) Circulating high-mobility group box a and cardiovascular mortality in unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction

Hashimoto, T. Atherosclerosis 221 巻 490-495(2012) 査読有

DOI : 10.1016/j.atherosclerosis

2012.01.040

株式会社シノテスト

〔学会発表〕（計1件）

Assay method of Des-HMGB1, N-terminus
cleaved out HMGB1 by
thrombin-thrombomodulin and its clinical
significance

Ikuro Maruyama, Takashi Ito,

Shigo Yamada

XXIV Congress of the ISTH, 7/3/2003,

Amsterdam

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA IKURO)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

特任教授

研究者番号：20082282

(2) 研究分担者

伊藤 隆史 (ITO TAKASHI)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

特任講師

研究者番号：20381171

橋口 照人 (TERUTO HASHIGUCHI)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

教授

研究者番号：70250917

(3) 連携研究者

川原 幸一 (KAWAHARA KO-ICHI)

大阪工業大学工学部生命工学科

特任教授

研究者番号：10381170

(4) 研究協力者

山田 晋吾 (YAMADA SHINGO)