

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390412

研究課題名(和文) トロンビン依存性 HMGB1 の遊離機構と受容体群クラスターによる細胞選別

研究課題名(英文) Cellular mechanism in thrombin mediated HMGB1 release. Effect of cluster formation of HMGB1 on the cell-surface receptors.

研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任教授

研究者番号：20082282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000 円、(間接経費) 4,350,000 円

研究成果の概要(和文)：HMGB1 は DAMPs の代表的分子であるが、多くの壊死細胞、あるいは活性化上皮系細胞などからは生細胞からも放出されて、TLR-2、-4、RAGE に作用する。この場合、先行する刺激によって活性化状態(プライミング)となっている細胞にセカンド刺激となって作用すると、一挙に inflammasome 活性化と NF- κ B 活性化により、IL-1、IL-18 を産生放出して、生体防衛的反応を惹起する。しかしこれはまた SIRS、DIC 等の原因ともなる。セカンド刺激としては トロンビン や エンドトキシン など活性を發揮する。

研究成果の概要(英文)：HMGB1, a representative danger associated molecular patterns, DAMP is released from almost all nucleated necrotic cells and activated epithelial cells including endothelial cells. The HMGB1 released out of the cells acts on Toll Like receptors(TLR)-2, TLR-4 and receptor for advanced glycation endproducts, RAGE. If the cells were primed by preceding PAMPs, pathogen associated molecular patterns, dual signalings from PAMPs and DAMPs generate and secrete IL-1 β and IL-18 resulting self-defensive inflammation and hemostatic reaction. However excessive this dual signaling often reads to systemic and/or fulminant inflammation and coagulation resulting systemic inflammatory response syndrome(SIRS) and/or disseminated intravascular coagulation(DIC). We could present that for example HMGB1 and LPS or thrombin may have a crucial role in these severe conditions. Thus the regulation and intervention of PAMPs and DAMPs are important in preventive medicine in the emergency medicines.

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 HMGB1 inflammasome

1. 研究開始当初の背景

生体は生存している限り、種々の侵襲下にあるが、これに対して robust (しなやかに、したたかに) 応答して生存している。robust な応答は、侵襲「センス(感知)」と最適の「応答」から成る。最適な応答の中には、spatio-temporal な、すなわち時空の適切さが重要である。

申請者は、究極の侵襲であるショックの研究の過程で、PAMPs(Pathogen Associated Molecular Patterns) と DAMPs(Damage Associated Molecular Patterns) が生体の防御(止血と自然免疫誘導)と治癒・修復に大きな役割を果たしていること、そして PAMPs, DAMPs に対する反応の時空性逸脱が臓器不全や全身性炎症、播種性血管内凝固症候群(DIC) 多臓器不全に関することを明らかにしてきた。しかしその臓器 組織 細胞 分子レベルに関しては不明であった。そこで本研究では DAMPs の中から、HMGB1 とトロンピンを選び、これらの spatio-temporal な関係と病態との関連に関して研究した。

2. 研究の目的

DNA 結合蛋白の HMGB1(High Mobility Group Box-1 Protein) は侵襲部位の壊死細胞、あるいは活性化樹状細胞から細胞外に放出され、様々な細胞生理活性を示し、局所では侵襲の修復防御因子として働くが、全身化すると臓器不全、ショックのメディエーターとして働く。本蛋白の特異な点は、受容体が複数個(RAGE, TLR2, 4)存在すること、活性の発現が“コンパニオン”分子(宿主由来(PAMPs): IL-1, トロンピンなど、病原体由来(DAMPs): 細菌性 CpG DNA、エンドトキシンなど)存在下で、増幅、変容されること、である。本研究では我々が発見した新たな HMGB1 放出様式であるトロンピン依存性 HMGB1 放出の仕組みとその意義、そして諸細胞にクラスターを形成して発現している **受容体群をどのように HMGB1 が選別し**つつ多様な活性を發揮し、それをどのようにコンパニオン分子が増幅・修飾し、そしてそれがどのような生理的、あるいは病態的意義を有するののかという点を研究する。

3. 研究の方法

(1) **トロンピン依存性 HMGB1 遊離の仕組み**

の解析: すでに我々はトロンピンがその受容体 PAR-1 を介して CBP/p300 を活性化し、これにより核内 HMGB1 がアセチル化されて、細胞外遊離に遊離されることをヒト、マウスの内皮細胞、血管平滑筋細胞で証明しているが、このモデルにおいて、膜レベルで PAR-1/TM の比がトロンピン依存性の HMGB1 遊離が制御されていること、

(2) ついで放出された HMGB1 が共存コンパニオン (DAMPs, PAMPs, IL-1 β , LPS, トロンピンなど) によってどのように増幅、変容されるかを内皮細胞、RAW 細胞などで解析する (大山ら)

(3) さらに受容体レベルで HMGB1 の細胞効果が、RAGE, TLR2, -4, TM の発現のクラスターにより変容するかを、siRNA で制御した細胞、それぞれの受容体のトランスジェニック、あるいはノックアウトマウス由来細胞を使って検証する (橋口、川原ら)

4. 研究成果

(1) PAMPs, DAMPs signaling の dual 化と反応の増幅

先ず明らかにしたことは、侵襲応答の dual signaling である。すなわちファースト刺激で NF- κ B の活性化が起きて細胞内に pro-IL-18, pro-IL-1 β が蓄積する (priming 状態)。この細胞にセカンド刺激で TLRs からの刺激が入り、inflammasome の活性化が起こり、procaspase-1 が活性化となる。この caspase-1 により、pro-IL-18, pro-IL-1 β が活性化され、一挙に成熟型の IL-1 β , IL-18 が産生されて細胞外に放出されるということである。これによってファーストシグナル活性化状態の細胞にセカンド刺激として DAMPs 刺激が入ると炎症が成立するというステップである。DAMPs の代表である HMGB1 による劇症の炎症はこのシグナルの dual 化によるものであることを明らかにした。これは侵襲の部位、すなわち PAMPs,

DAMPs が複数存在している場で生体防御反応が速やかに誘導されることを示唆している。

しかし逆にいうと最初の臓器にセカンド指摘が入ると、一挙にこの臓器での反応が劇症化する可能性をはらんでいることにもなる。

(2) トロンピンは凝固カスケード活性化の最終産物であるが、血管内皮細胞をはじめとする細胞上に発現している PAR-1 はトロンピンで限定分解されて、シグナルが細胞内に入ることを先に明らかにしていた。このシグナルで細胞からは HMGB1 が細胞外に遊離してくる。この HMGB1 とトロンピン刺激はトロンピンの凝固活性を著しく増強し (in vivo) , DIC の原因となることをあきらかにした。

(3) HMGB1 による DAMPs、PAMPs のソーティング

代表的な DAMPs であるエンドトキシン LPS や幹細胞の遊走因子である SDF-1 と複合体を形成する。これは侵襲部位 HMGB1 のサイトに SDF-1 がソーティングされて活性を發揮していることを示唆している。

またエンドトキシンも HMGB1 と結合するが、LPS の催炎症活性は、HMGB1 で著しく増幅されることを明らかにしたが、これも侵襲部位の炎症と修復に関しては、メリットとなりうるが、エンドトキシンショックのリスクをも包含していることになり、これがエンドトキシンショックの病態形成に役割を果たしているものと考えられた。

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 18 件)

(1) Comparative evaluation of direct thrombin and factor Xa inhibitors with antiplatelet agents under flow and static conditions: an in vitro flow chamber model.

Hosokawa K, Ohnishi T, Sameshima H, Miura N, Koide T, Maruyama I, Tanaka KA.

PLoS One. 2014 Jan 31;9(1):e86491. doi: 10.1371/journal.pone.0086491. (査読有)

(2) Hemoadsorption of high-mobility group

box chromosomal protein 1 using a column for large animals.

Nishiyama R, Shinoda M, Tanabe M, Oshima G, Takano K, Miyasho T, Fuchimoto Y, Yamada S, Inoue T, Shimada K, Suda K, Tanaka M, Hayashida T, Yagi H, Kitago M, Obara H, Itano O, Takeuchi H, Kawachi S, Maruyama I, Kitagawa Y.

Eur Surg Res. 2013;51(3-4):181-90. doi: 10.1159/000357563. (査読有)

(3) Antithrombotic effects of PAR1 and PAR4 antagonists evaluated under flow and static conditions.

Hosokawa K, Ohnishi T, Miura N, Sameshima H, Koide T, Tanaka KA, Maruyama I.

Thromb Res. 2014 Jan;133(1):66-72. doi: 10.1016/j.thromres.2013.10.037. (査読有)

(4) Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism.

Nakahara M, Ito T, Kawahara K, Yamamoto M, Nagasato T, Shrestha B, Yamada S, Miyauchi T, Higuchi K, Takenaka T, Yasuda T, Matsunaga A, Kakihana Y, Hashiguchi T, Kanmura Y, Maruyama I.

PLoS One. 2013 Sep 30;8(9):e75961. doi: 10.1371/journal.pone.0075961. (査読有)

(5) Coagulation activity and white thrombus formation in the microminipig.

Miura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Yamada T, Ito T, Izumi H, Sameshima H, Miyoshi N, Tanimoto A, Maruyama I.

In Vivo. 2013 May-Jun;27(3):357-61. (査読有)

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

Hosokawa K, Ohnishi T, Sameshima H, Miura N, Ito T, Koide T, Maruyama I.

Thromb Haemost. 2013 Jan;109(1):102-11. doi: 10.1160/TH12-06-0441. (査読有)

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

Yamashita A, Nishihira K, Matsuura Y, Ito T, Kawahara K, Hatakeyama K, Hashiguchi T, Maruyama I, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Kitamura K, Shibata Y, Asada Y.

Atherosclerosis. 2012 Oct;224(2):511-4. doi:

10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.027.
(査読有)

(8) Neutrophil elastase inhibitor improves survival rate after ischemia reperfusion injury caused by supravisceral aortic clamping in rats. Fujimura N, Obara H, Suda K, Takeuchi H, Miyasho T, Kawasaki K, Du W, Yamada S, Ono S, Matsumoto K, Matsuda S, Yagi H, Kitago M, Shinoda M, Itano O, Tanabe M, Sakamoto M, Maruyama I, Kitagawa Y. J Surg Res. 2013 Mar;180(1):e31-6. doi: 10.1016/j.jss.2012.04.037. (査読有)

(9) Increased plasma levels of high mobility group box 1 in patients with acute liver failure. Oshima G, Shinoda M, Tanabe M, Ebinuma H, Nishiyama R, Takano K, Yamada S, Miyasho T, Masugi Y, Matsuda S, Suda K, Fukunaga K, Matsubara K, Hibi T, Yagi H, Hayashida T, Yamagishi Y, Obara H, Itano O, Takeuchi H, Kawachi S, Saito H, Hibi T, Maruyama I, Kitagawa Y. Eur Surg Res. 2012;48(3):154-62. doi: 10.1159/000338363. (査読有)

(10) Role of high mobility group box chromosomal protein 1 in ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. Kojima M, Tanabe M, Shinoda M, Yamada S, Miyasho T, Suda K, Hibi T, Obara H, Itano O, Kawachi S, Kitajima M, Maruyama I, Kitagawa Y. J Surg Res. 2012 Nov;178(1):466-71. doi: 10.1016/j.jss.2012.01.044. (査読有)

(11) Immunohistochemical expression of thrombomodulin in vestibular schwannoma. Yamahata H, Yunoue S, Tokimura H, Hanaya R, Hirano H, Tokudome M, Karki P, Yonezawa H, Sugata S, Kawahara K, Maruyama I, Arita K. Brain Tumor Pathol. 2013 Jan;30(1):28-33. doi: 10.1007/s10014-012-0095-z. (査読有)

(12) Circulating high-mobility group box 1 and cardiovascular mortality in unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. Hashimoto T, Ishii J, Kitagawa F, Yamada S, Hattori K, Okumura M, Naruse H, Motoyama S, Matsui S, Tanaka I, Izawa H, Maruyama I, Nomura M, Ozaki Y. Atherosclerosis. 2012 Apr;221(2):490-5.

doi:
10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.040.
(査読有)

(13) Prediction of the neurological outcome with intrathecal high mobility group box 1 and S100B in cardiac arrest victims: a pilot study. Oda Y, Tsuruta R, Fujita M, Kaneda K, Kawamura Y, Izumi T, Kasaoka S, Maruyama I, Maekawa T. Resuscitation. 2012 Aug;83(8):1006-12. doi: 10.1016/j.resuscitation.2012.01.030. (査読有)

(14) Mitigation of occult lung injury by pneumonectomy via minithoracotomy in mice. Kohno M, Watanabe M, Izumi Y, Tasaka S, Kitagawa Y, Maruyama I, Kobayashi K. Thorac Cardiovasc Surg. 2012 Mar;60(2):124-30. doi: 10.1055/s-0030-1271011. (査読有)

(15) 「新規 DIC 治療薬トロンボモジュリン製剤の作用機序」伊藤隆史、丸山征郎 臨床血液、52 巻、356-360、2011 (査読無)

(16) Gradual increase of high mobility group protein b1 in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Ebina M, Taniguchi H, Miyasho T, Yamada S, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Ohkouchi S, Tamada T, Nishimura H, Ishizaka A, Maruyama I, Okada Y, Takashi K, Nukiwa T. Pulm Med. 2011;2011:916486. doi: 10.1155/2011/916486. (査読有)

(17) Valproic acid increases susceptibility to endotoxin shock through enhanced release of high-mobility group box 1. Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Kato Y, Mizutani H, Kawahara K, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K. Shock. 2011 Nov;36(5):494-500. doi: 10.1097/SHK.0b013e31822f7e58. (査読有)

(18) Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation. Ito T, Maruyama I. J Thromb Haemost. 2011 Jul;9 Suppl 1:168-73. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04319.x. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Ikuro Maruyama, Regulation of Danger Signals from HMGB1 and Histones by Endothelial or Circulating Thrombomodulin. The Merinoff World Congress 2013: HMGB1. October 9-11, 2013 Manhasset, NY

(2) Ikuro Maruyama, Takashi Ito, Yoshio Azuma, Mayumi Nakahara, Teruto Hashiguchi, Shingo Yamada

Assay method of des-HMGB1, N-terminus cleaved out HMGB1 by thrombin-thrombomodulin, and its clinical significance XX congress of the ISTH, June 29-July 4, 2013. Amsterdam, The Netherlands

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

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

川原 幸一 (KAWAHARA Koichi)
大阪工業大学工学部生命工学科
特任教授
研究者番号 : 10381170

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

大山 陽子 (OYAMA Yoko)
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
特任助教
研究者番号 : 20583470

橋口 照人 (HASHIGUCHI Teruto)
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 なし