

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24年4月27日現在

機関番号：17701
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2011
 課題番号：23659491
 研究課題名（和文） T-TMにより分子修飾されたHMGB1の測定法の確立と生体内ダイナミズムの解析
 研究課題名（英文） Establishment and dynamism of *des*-HMGB1, degraded HMGB1 by thrombin-thrombomodulin.
 研究代表者：丸山 征郎 (MARUYAMA Ikuro)
 鹿児島大学・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）：
 我々はこれまで、壊死細胞核由来の HMGB1 が受容体；RAGE, TLR-2,-4 を介して炎症性サイトカインとして働くこと、細胞外 HMGB1 はトロンボモジュリン (TM) のN末端に活性を失い、さらにトロンビンによって分解され *des*-HMGB1 が生成されること、この *des*-HMGB1 は受容体レベルで HMGB1 と競合して、非炎症性に働くことを明らかにしてきた。そこで今回は、*des*-HMGB1 の特異的 ELISA と、これを用いた HMGB1 のダイナミズムについて研究した。結果、*des*-HMGB1 は DIC やショックの患者の血清中に増加していた。特に遺伝子組換え TM 治療でその傾向が強かった。現在、この *des*-HMGB1 値と治療効果、重症度、予後などとの関連を研究中である。

研究成果の概要（英文）：
 We previously showed that HMGB1 binds to thrombomodulin(TM) and degraded by thrombin-TM at the N-terminus of the molecule cleaving out 10 aminoacid-residue. We named this degraded HMGB1 as *des*-HMGB1. We also have showed that *des*-HMGB1 compete with intact binding to its receptor RAGE, Toll-like receptor-2 and -4 resulting negatively regulating of intact HMGB1 and its receptor signaling.
 In this study, we established the *des*-HMGB1 specific assay ELISA, and investigated its dynamism in various diseases including DIC, sepsis and shock. We showed that the *des*-HMGB1 was increased in the serum from the patients with these pathologic conditions, especially in the cases treated with recombinant TM. We are now further studying relationship between *des*-HMGB1 levels and the efficacy of TM treatment and their prognosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	3,000,000円	900,000円	3,900,000円

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学
 キーワード：血栓・止血学

1. 研究開始当初の背景
- (1) 新たな疾患増悪因子としての HMGB1：HMGB1 は組織侵襲（外傷、感染など）に際し、壊死細胞、あるいは局所の活性化樹状細胞、マクロファージの核内から細胞外に放出され局所の止血、感染防御などの反応を誘導し、最終的に修復に働く。しかしこれが全身化する

ると遠隔臓器に炎症や凝固反応を惹起し、感染症に伴う肺障害、DIC/SIRS, MOF など、そして最終的には死の原因となることが Tracey,KJ ら (Science,1999,285:248)、我々ら (J Clin Invest 2005 115:1267) によって報告されてから、同様の報告が世界中から相次ぎ、HMGB1 はショックや多臓器不全を

はじめとする多くの疾患群の重要な増悪因子として治療標的分子となってきた。

- (2) 申請者らのこれまでの寄与：申請者らは、a)HMGB1 測定法を確立(本測定法は現在米国 NIH を含む 80 ヶ国以上で使用されている)し、b)本蛋白が侵襲重症度、臓器不全と相関すること (J Clin Invest 2010;120:735) を明らかにした。さらに c)内皮細胞上の TM が HMGB1 を吸着・中和すること、d)TM のN末端に結合した HMGB1 はトロンビン・TM 複合体により分解され、そのN末端から 10 残基のアミノ酸が切り離された des-HMGB1 が生じること、e)この des-HMGB1 はその受容体：RAGE, TLR-2, -4(申請者らが検証)など受容体レベルにおいて intact HMGB1 の結合と競合して、その炎症惹起活性をネガティブに制御すること、などを明らかにしてきた。
- (3) 何をどこまで明らかにするか：この一連の研究で、申請者らは、【HMGB1 は侵襲局所で、壊死細胞、活性化樹状細胞、マクロファージから細胞外に放出され、アラミンとしての振る舞い、すなわち局所の自然免疫、止血 (我々の報告)、そして修復に働き、その全身化⇒遠隔臓器の炎症や血栓はトロンビン・TM によってブロックされている】、というコンセプトを提唱した。“次の問題は TM に結合した HMGB1 の運命である”、これは我々の J. Clin. Invest の論文を紹介した Nat Med のコメンタリー (CT.Esmon.Nat Med.2005;11:475) であるが、この点に関して我々は回答を出した (Arterioscler Thromb Vas Biol.2008;28:1825)。すなわち TM の N 末端レクチン様ドメインに結合した HMGB1 は TM の 4,5,6 番目の EGF 様ドメインに結合したトロンビンによって、N 末端 10 残基の部位で切断されて TM から遊離し、des-HMGB1 となり、これがインタクト HMGB1 の制御因子として働くということである。しかし des-HMGB1 の生体内での動態と意義に関してはまだ全く不明であるので、今回は des-HMGB1 のみの特異的測定系を確立し、これを使い、des-HHMGB1 の生体内動態、病態との関連を中心に研究する。
- (4) 学術的特色、予想される結果と意義：すでに rTM の投与で血中に des-HMGB1 上昇することを immunoblot 法で確認しているが、定量的特異的 des-HMGB1 測定法を開発すれば、現在全-HMGB1 を測定して判断している病態や治療効果

判定が一挙に向上するものと期待される。

2. 研究の目的

壊死細胞や活性化マクロファージ由来の HMGB1(High Mobility Group Box-1)に関して申請者らは、(1)HMGB1 測定法の確立、(2)内皮細胞上のトロンボモデュリン(TM)が HMGB1 を吸着し (J Clin Invest 2005 115:1267)、N末端からアミノ酸 10 残基を切断して不活化すること (Arterioscler Thromb Vas Biol.2008;28:1825)、そして(3)この分解 HMGB1(des-HMGB1 と命名)が受容体レベルで intact HMGB1 と競合して、その活性を負に制御すること、また iv) 遺伝子組換え TM (rTM) 投与で、実際に des-HMGB1 が血中に出現すること (Arterioscler Thromb Vas Biol.2008;28:1825)などを明らかにしてきた。しかし、この des-HMGB1 の生体内ダイナミズム、治療効果や病態の消長、予後との関係などは全く不明である。そこで本研究では、i) des-HMGB1 特異的測定法を確立し、ii) des-HMGB1 の生体内代謝過程、iii) 病態、とくに治療効果や予後との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) des-HMGB1 の測定系の確立

我々がこれまでに作製した抗 HMGB1 抗体、ならびに市販の抗体は全て des-HMGB1 とも反応する。したがって申請者らが確立した HMGB1 ELISA は des-HMGB1 をも計りこんでしまう。そのため治療効果や予後の判定には鋭敏さを欠き、特に rTM 治療の効果を必ずしも的確に反映していないという欠点があることが申請者らの最近の研究で判明してきた。そこで今回は des-HMGB1 のみを特異的に測定する方法の確立を目的としたわけである。

- ①des-HMGB1 のみを認識するモノクローナル抗体の作製 (共同研究者川原が担当)
トロンビン・TM 複合体が切断する HMGB1 はトロンビンの基質に広く認められる 11 番目のアルギニン (R10)-12 番目のグリシン (G11) である (図 2b)。そして新たに des-HMGB1 の N 末端 GKMSS・・・が露呈してくる。そこでこの新規 N 末端を認識するモノクローナル抗体を GKMSS から 15 残基合成して作製した。現座 5 種類のモノクローナル抗体を得ている。
- ②des-HMGB1 特異的測定系の確立 (川原が担当)
現在、既に得ている抗 des-HMGB1 モノクローナル抗体の中から des-HMGB1 に対する特異度と Kd を検討中である。この中から一番感度の高い抗体を選別して 2 抗体法を組む。

(2) des-HMGB1 ダイナミズムの解析(橋口、大山が主として分担)

これまでのウエスタンブロットによる解析結果では血中の des-HMGB1 は rTM 投与後 DIC 例で高値を示す傾向が観察されている。これらの患者は DIC スコアでは改善しているため、rTM にレスポンスしてインタクト HMGB1 が分解され、des-HMGB1 が生成されたものと推定している。しかるにトータルの HMGB1 (インタクト HMGB1 + des-HMGB1) 値は一定の傾向を示さないことが多い。そのため致死因子として華々しく臨床に登場してきた HMGB1 の測定意義が薄れ、臨床現場では混乱した状態を生んでいる。ここで、des-HMGB1 のみを定量しえれば、血管内皮細胞の T・T M システム、あるいは投与した rTM・TM が HMGB1 を分解して des-HMGB1 を生成させて、defensive に働いているか否か、などを含め患者の予後などが判定しうることを期待される。この点に関して症例ごとに病態とトータル HMGB1、des-HMGB1 値と病態やその他の検査データと逐次照合して、des-HMGB1 測定の有用性を検証し、内皮細胞上の TM が抗凝固のみならず、抗炎症にも機能を発揮していることを検証する。

4. 研究成果

トロンビン-TM によって分解されて遊離してきた *des*-HMGB1 の特異的測定法 ELISA を確立した。

結果、*des*-HMGB1 は DIC やショックの患者の血清中に増加していた。特に遺伝子組換え TM 治療でその傾向が強かった。現在、この *des*-HMGB1 値と治療効果、重症度、予後などとの関連を研究中である。

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 9 件)

1. 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. Role of high mobility group box chromosomal protein 1 in ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. J Surg Res. 2012 Apr 1. [Epub ahead of print] 査読有
2. 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.

Circulating high-mobility group box 1 and cardiovascular mortality in unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. Atherosclerosis. 2012 Apr;221(2):490-5. Epub 2012 Feb 1. 査読有

3. Kohno M, Watanabe M, Izumi Y, Tasaka S, Kitagawa Y, Maruyama I, Kobayashi K. Mitigation of occult lung injury by pneumonectomy via minithoracotomy in mice. Thorac Cardiovasc Surg. 2012 Mar;60(2):124-30. 査読有
4. Oda Y, Tsuruta R, Fujita M, Kaneda K, Kawamura Y, Izumi T, Kasaoka S, Maruyama I, Maekawa T. Prediction of the neurological outcome with intrathecal high mobility group box 1 and S100B in cardiac arrest victims: A pilot study. 2012 Feb 1. [Epub ahead of print] Resuscitation. 2012 Feb 1. [Epub ahead of print] 査読有
5. Takashi Ito & Ikuro Maruyama. Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 9:168-173. 2011. 査読有
6. 伊藤隆史、丸山征郎 新規 DIC 治療薬 トロンボモジュリン製剤の作用機序 臨床血液 52: 356-360. 2011. 査読無
7. Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Kato Y, Mizutani H, Kawahara K, Maruyama I, Noguchi T, Matsushita K. Valproic acid increases susceptibility to endotoxin shock through enhanced release of high-mobility group box 1. Shock 2011 Nov;36(5):494-500. 査読有
8. Ito T, Maruyama I. Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation. J Thromb Haemost. 2011 Jul;9 Suppl 1:168-73. 査読有
9. 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. Gradual increase of high mobility group protein b1 in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Pulm Med. 2011;2011:916486. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者：丸山征郎 (MARUYAMA Ikuro)
研究者番号：20082282

(2) 研究分担者

川原幸一 (KAWAHARA Koichi)
研究者番号：10381170

橋口照人 (HASHIGUCHI Teruto)
研究者番号：70250917

大山陽子 (OYAMA Yoko)
研究者番号：20583470

伊藤隆史 (ITO Takashi)
研究者番号：20381171