

# 論文要旨

## High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats

〔HMGB1はラットにおける血管内血栓形成を加速させる。〕

伊藤 隆史

### 【序論および目的】

敗血症は今なお致死率の高い疾患群であり、その主病態は感染に伴う全身性の炎症反応と凝固反応である。近年、敗血症における死のメディエーターとして High-mobility group box 1 (HMGB1) が同定され、新規治療ターゲットとして注目を集めているが、HMGB1 が個体死を招く機序についてはこれまでのところよくわかっていない。我々は HMGB1 と血管内凝固症候群 (DIC) スコアとの相関関係に注目し、HMGB1 が血液凝固系に影響を及ぼすことで致命的に働いているのではないかと考え、この点について検討した。

### 【方法】

6週齢のオスSDラットを①生食投与群、②トロンビン持続静注群 (1250 U/kg/h)、③HMGB1 静注群 (2.0 mg/kg)、④トロンビン持続静注+HMGB1 静注群の4群に分けた。それぞれに対して、病理検査、生存率検査、血液検査を施行し、比較検討した。

また、HMGB1 が血液凝固時間に与える影響、抗凝固トロンボモジュリン-プロテインC経路に及ぼす影響、単球表面の組織因子および血管内皮細胞表面のトロンボモジュリン発現に与える影響を *in vitro* において検討した。

## 【結果】

HMGB1のみを投与したラットでは、血液凝固学的な異常は認められず、生存率も100%であった。一方、トロンビンによって可逆的なDIC状態を引き起こしたラットでは、HMGB1が加わることで不可逆的なDICが惹起され（糸球体フィブリン沈着が増強し、血液凝固時間の著明な延長を認めた）、生存率は50%にまで低下した。

in vitroの実験においては、健康成人の血漿にHMGB1を添加しても凝固時間に影響はなかった。トロンビン・トロンボモジュリン複合体がプロテインCを活性化する反応に対しては、HMGB1は濃度依存的にこの反応系を抑制した。HMGB1は単球表面の組織因子発現を増強したが、血管内皮細胞表面のトロンボモジュリン発現には影響を及ぼさなかった。

## 【結論及び考察】

HMGB1はDICを立ち上げるイニシエーターとして作用することはないものの、DICを増悪させるプロモーターとして作用し、致死性に関与していると考えられる。DICを増悪させる機序としては、抗凝固トロンボモジュリン-プロテインC経路を抑制することと、単球表面の組織因子発現を増強することが可能性として考えられる。

これまでにHMGB1の炎症惹起作用は多数報告されているが、凝固促進作用については今回の論文が初めてである。敗血症患者の血中では、トロンビンとともにHMGB1が高値を示しており、これらが相乗的に働き、全身性の炎症反応と凝固反応を惹起しているものと考えられる。HMGB1をターゲットとした敗血症治療は、動物実験レベルでは成功を収めており、今後の臨床応用が期待される。

(Journal of Thrombosis and Haemostasis Vol. 5, Issue 1 2007 掲載予定)

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 638 号	氏名	伊藤 隆史
審査委員	主査	上村 裕一	
	副査	愛甲 孝	有馬 直道

## High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats

(HMGB1 はラットにおける血管内血栓形成を加速させる)

Journal of Thrombosis and Haemostasis 2007; 5(1) 109-116

敗血症は感染に伴って引き起こされる全身性の過剰な炎症反応と定義されるが、一方で血液凝固異常という側面も持ち合わせている。近年、敗血症患者の生死を分ける鍵となる分子として HMGB1 (High-mobility group box 1 protein) というタンパク質が同定され、診断マーカーおよび治療ターゲットとして注目を集めている。核内タンパク質 HMGB1 は、細胞の壊死もしくは白血球の活性化に伴って細胞外に放出され、細胞外で炎症反応や免疫反応を惹起することが報告されている。しかしながら、HMGB1 が致死的に作用する機序については未だ十分に解明されていない。本研究は、HMGB1 が多臓器不全ならびに個体死を誘導する機序の解明を目的とし、特に HMGB1 と血液凝固異常との関係に注目して検討している。

本研究では、ラットを用いた動物実験 (in vivo) で HMGB1 が血管内血栓形成に及ぼす影響を検討すると共に、試験管内の実験 (in vitro) で HMGB1 が血栓形成を加速させる機序について検討している。動物実験では、6週齢の雄の SD ラットを生食投与群、トロンビン投与群 (1250U/kg/hr×4時間)、HMGB1 投与群 (2.0mg/kg)、トロンビン+HMGB1 投与群に分け、その病理組織像、血液検査所見、生存率について比較検討している。試験管内の実験では、HMGB1 が凝固時間に及ぼす影響、抗凝固プロテイン C 経路に及ぼす影響、血管内皮細胞および単球に及ぼす影響について検討している。本研究で得られた新知見は次の3点である。

- ① ラットを用いた動物実験において、HMGB1 は単独では有意な血液凝固活性を示さなかったが、トロンビンによる血管内血栓形成を著しく促進し、不可逆的で致死的な播種性血管内凝固症候群 (DIC) を引き起こした。具体的には、トロンビン投与群、HMGB1 投与群の糸球体フィブリン沈着スコアは、それぞれ  $1.2 \pm 1.6$ 、0であったのに対し、トロンビン+HMGB1 投与群は  $3.4 \pm 1.3$  であった。また、単独投与の場合いずれの群においても、一週間後の生存率は 100%であったのに対し、両者を投与した群においては、生存率は 50%にまで低下した。
- ② in vitro の実験において、HMGB1 はプロテイン C の活性化を抑制した。HMGB1 非存在下での活性化プロテイン C 産生量を 100%とすると、1、10、100 nM の HMGB1 存在下では、それぞれ、90%、86%、46%であった。このことは、凝固/抗凝固のバランスが、HMGB1 存在下では凝固に傾くことを意味している。
- ③ in vitro の実験において、HMGB1 は単球表面の組織因子発現を増強した。これにより、HMGB1 存在下では凝固カスケードが加速するものと考えられる。

本研究は、敗血症の致死性因子として知られる HMGB1 が血管内血栓形成を加速させて多臓器不全を引き起こすことを証明し、敗血症の病態解明ならびに新規治療法の開発につながる新しい視点を提供した。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医研第 638 号	氏名	伊藤 隆史
審査委員	主査	上村 裕一	
	副査	愛甲 孝	有馬 直道
<p>主査および副査の3名は、平成19年1月5日、学位請求者 伊藤隆史君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p>			
<p><b>質問1）HMGB1の核内での作用として、DNAを安定化させることや転写を調節することが挙げられるが、これらは相互に関係した事象なのか。</b></p> <p>（回答）HMGB1は幾つかの核内作用を有しているが、その基本となるのはDNAを折り曲げることである。これによってDNA構造を変化させたり、転写を調整したりしている。</p>			
<p><b>質問2）壊死細胞から漏出したHMGB1と白血球が分泌したHMGB1とでは、分子構造上違いがあるのか。</b></p> <p>（回答）白血球がHMGB1を分泌する際には、HMGB1を過剰にアセチル化するため、両者はアセチル化の程度という点で異なるようだが、現時点ではその差異を検出して区別するには至っていない。</p>			
<p><b>質問3）HMGB1のノックアウトマウスはどのような表現型を示すのか。</b></p> <p>（回答）HMGB1のノックアウトマウスは誕生するものの、生後24時間以内に死亡してしまう。死因は低血糖であり、グルココルチコイド受容体の標的遺伝子の活性化が障害されるためである。</p>			
<p><b>質問4）今回使用したHMGB1の純度については、どのように検定しているのか。</b></p> <p>（回答）電気泳動にて単一バンドであり、また、LPS（細菌細胞壁構成成分）の混入は検出感度以下である。</p>			
<p><b>質問5）遺伝子組み換え技術により合成したHMGB1は使用できないのか。</b></p> <p>（回答）HMGB1の遺伝子塩基配列は既知であり、大腸菌に合成させたHMGB1製品も発売されている。今回はウシ胸腺から抽出したHMGB1を使用しているが、純度として劣るものではない。</p>			
<p><b>質問6）動物実験で、トロンピンは持続静注し、HMGB1はワンショットで静注している理由はなぜか。</b></p> <p>（回答）トロンピンをワンショットで静注すると即死するため、播種性血管内凝固症候群（DIC）モデルを作成できない。HMGB1も本来ならば持続静注すべきだが、トロンピンとHMGB1を同一チューブに流すとチューブ内で相互作用してしまうため、技術的制限から今回のような投与方法を選択した。</p>			
<p><b>質問7）病理解析のタイミングは、なぜ6時間という急性期を選択したのか。</b></p> <p>（回答）今回のモデルでは4時間の時点でトロンピンの投与を中止しているため、時間経過とともに回復していくと予想される。一方、トロンピン投与時にはラットを保定器内に固定しているため、4時間以上ラットを拘束することは不適切だと考えた。</p>			
<p><b>質問8）活性化プロテインC（APC）活性を測定する際に使用しているS-2238とはどのようなものか。</b></p> <p>（回答）S-2238は合成基質であり、APCが産生されるとAPCにより切断される。S-2238は切断されると発色するよう設計されているため、APC活性を吸光度として測定することができる。</p>			
<p><b>質問9）動物実験で、HMGB1の投与量を0、0.4、2.0 mg/kgで検討しているが、さらに増やすとどうなるか。また、結果として濃度依存性が認められない点についてはどのように考察するか。</b></p> <p>（回答）HMGB1の投与量は5.0 mg/kgまで増やしているが、2.0 mg/kgと比べて差は認められなかった。HMGB1は単独では凝固活性がほとんどないため、トロンピンの投与量との量的バランスが重要だと考えられる。0.4 mg/kgよりも少ない投与量を検討すれば、濃度依存性が認められたかもしれない。</p>			

質問 10) 血栓を認めたのは腎臓だけか、それとも肝臓などを含めた広範な臓器で認められたのか。

(回答) 血栓を認めたのは腎臓のみで、肝臓には肉眼的にも顕微鏡的にも器質的な異常を認めなかった。腎臓の糸球体は最も血栓を認めやすい臓器である。血流が緩徐であること、組織因子発現が多いこと、トロンボモジュリン発現が少ないこと、線溶活性が低いことが原因として挙げられる。腎臓以外の臓器でも一旦血栓が形成された後に、線溶系によって血栓が溶解された可能性が考えられる。

質問 11) トロンピン+HMGB1 投与群のラットの半数は生存している。生死を分けた違いは何か。

(回答) 今回は生存率の検討と病理学的検討を別個に行ったため、生存したラットがどのような病態を呈していたかは不明である。ただ、一週間の体重の経過を見てみると、他の三群は順調に体重増加しているのに対し、トロンピン+HMGB1 群は著明な体重減少をきたしたので、生き残ったラットも瀕死の状態に陥っていたことが推察される。

質問 12) 腎不全を起こすと体重は増えると予想されるが、トロンピン+HMGB1 群の体重はなぜ減ったのか。

(回答) 体重減少の原因は特定できていない。投与終了直後と比べて、3日後には約 25%の著明な体重減少をきたしていて、一過性に重度の悪液質状態に陥っていたことが予想される。

質問 13) 動物実験で、体温の変化については検討しているか。

(回答) 体温は測定していない。外観的には、トロンピン+HMGB1 投与群では、自発運動の低下、立毛などの所見を認めている。

質問 14) 試験管内の実験において HMGB1 は単球表面の組織因子発現を増強しているが、なぜ動物実験において HMGB1 単独投与群の血液凝固系は変化していないのか。

(回答) HMGB1 による単球表面の組織因子発現増強は、それ単独では血栓を形成したり全身の血液凝固系を動かしたりする程には活性が強くないと考えられる。おそらく、プロテイン C の活性化を抑制する作用と合わさって DIC を惹起していると考えられる。

質問 15) トロンピンの投与量を 2000U/kg/hr に増やし、そこに HMGB1 を投与すると結果はどうなるか。

(回答) トロンピンの投与量を 2000U/kg/hr に増やすと生存率は 20%にまで低下するが、そこに HMGB1 を投与する実験は行っていない。ただ、HMGB1 の投与により DIC は重篤化するので、全例が死亡すると予想される。

質問 16) 凝固優位型 DIC と線溶優位型 DIC とで、HMGB1 の果たす役割に違いがあるか。

(回答) 凝固優位型 DIC を惹起するとされる敗血症でも線溶優位型 DIC を惹起するとされる悪性腫瘍でも、血中 HMGB1 濃度は上昇していることが報告されている。今回の研究で HMGB1 が凝固を進めることが明らかとなったが、過去の研究で HMGB1 が線溶を進める可能性についても報告されている。

質問 17) 将来的に HMGB1 を抑える治療を行う場合 (抗体投与やトロンボモジュリン投与)、治療の開始が敗血症や DIC を起こした後であっても効果を発揮しうるか。また、HMGB1 は局所において生体防御的な働きをしているが、この HMGB1 の良い面を抑えてしまう可能性についてどう考察するか。

(回答) 今回の研究では治療応用について検討していないが、過去の報告では抗 HMGB1 抗体およびトロンボモジュリンを敗血症誘発後に投与することで救命することに成功している。これらの HMGB1 を抑える治療法は、局所における HMGB1 の生体防御的役割をも抑制してしまう可能性が考えられるが、敗血症や DIC のような状態で過剰な炎症や凝固を抑えることは、生存に有利に働くと考えられる。このことは動物実験でも示されている。また、全身循環中の HMGB1 のみを取り除く目的で、血液を HMGB1 除去カラムに通すことは、組織局所の HMGB1 に影響を与えない良い方法かもしれない。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。