

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04363

研究課題名(和文) Novel therapeutic proposal for DIC/Shock: from Damage-Sensing/-Control to Damage Resolution

研究課題名(英文) Novel therapeutic proposal for DIC/Shock: from Damage-Sensing/-Control to Damage Resolution

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：代表的DAMP：HMGB1には、全還元型、部分酸化型、全酸化型の3形が在り、前2者が炎症細胞遊走と活性化(炎症性サイトカイン産生)即ちDAMP機能を、そして全酸化型は抗炎症・修復活性、即ちPAMPs機能を有する。そこでHMGB1の量のみでなく、質をも評価することが临床上重要である。これまではHPLC法で3アイソフォームと病態との関連を解析してきたが、本研究ではELISA法を確立し、3アイソフォームの分別測定を目標とした。現時点で全還元型と反応性の高い抗HMGB1抗体(単クローン性)を取得することが出来つつある。現在、これを使ったELISA系確立と、他のアイソフォームの抗体の取得研究中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DAMP:HMGB1が生体損傷の運命を決めることに関して、筆者らは世界の本領既の研究をリードしてきた。即ち、測定法の開発を開発し、生体損傷のマーカーであることを検証、発表してきた。しかしHMGB1には3つのアイソフォームが存在し、全酸化型は修復に働くことが判明してきた。そのためHMGB1の質的測定が重要であり、本研究は、生体保護・修復活性のある本分子の測定法の端緒をつかみつつあるという意義深い研究である。

研究成果の概要(英文)：A typical DAMP, HMGB1 has 3-SH groups in its. Therefore, it has 3 types of isoforms based on their redox states, all reduced, partial oxidative and all oxidation type, with different activities. The all reduced type shows the chemoattractant for inflammatory cells, and partially oxidative one activates the inflammatory cells resulting the secretion of inflammatory cytokines. However, all oxidative one expresses the anti-inflammatory activities at the local injury sites. Therefore, it is crucial to evaluate HMGB1 not only by quantitatively but also qualitatively. We have been trying to establish the method to evaluate these isoforms individually. At the first we tried to establish the specific monoclonal antibodies which react specifically react 3 isoforms individually. At present we succeeded in the establishment of the monoclonal antibody which highly specifically react to all reduced HMGB1. Using this, we have started to establish the all reduced type HMGB1 assay kit.

研究分野：血栓止血学

キーワード：HMGB1 DAMPs PAMPs RAMPs 生体損傷 DIC トロンボモジュリン プロテインC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

常に侵襲下に在る我々動物は、まずは、外来性侵襲を“ PAMPs(Pathogen Associated Molecular patterns) ”、さらに生体内部で発生した内因性侵襲を“ DAMPs(Damage Associated Molecular Patterns) ”として認識し、それぞれ防御反応を誘導する。この生体防御反応誘導のイニシエーターとして使われる受容体がTLRs(Toll Like Receptors)で、各分子内の構造がパターンとして認識されるので、Pattern Recognition Receptors (PRRs)である(図1)。

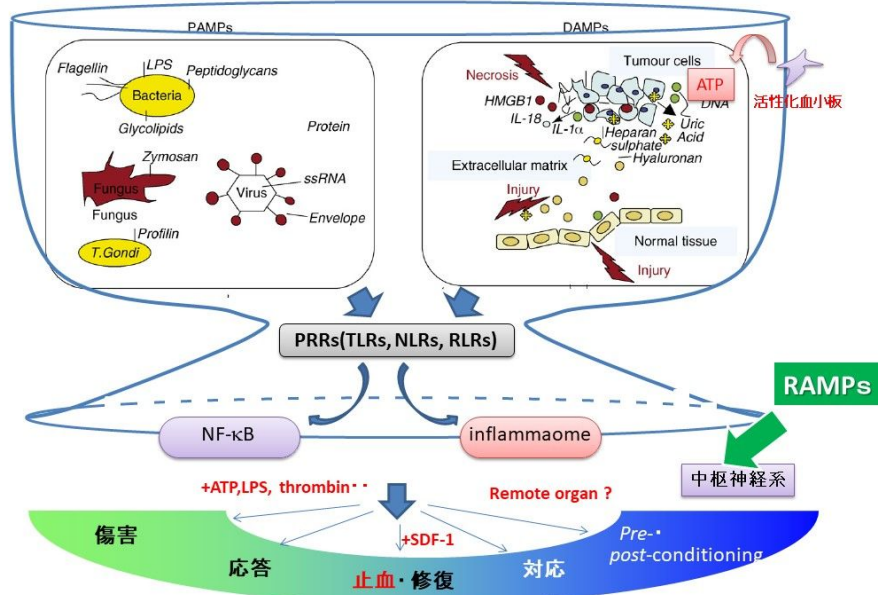


図1. 生体侵襲由来分子群：PAMPs/DAMPs と PRRs による認識と生体応答、RAMPs 誘導の鳥観図

最近になり、侵襲とこれに因って惹起される生体侵襲を防護して、修復を誘導する系も発見され、これらの分子群は RAMPs(Resolution Associated Molecular Patterns)と称される。本研究開始のころは、PAMPs、DAMPs と RAMPs の相互関連には不明の点も多く、臨床的視点から、RAMPs が注目され始めつつあった。特に RAMPs 分子の種類と受容体 シグナル伝達、RAMPs の誘導法などが大きな課題となっていた。我々の研究視点から観ると、活性化プロテイン C (APC) がその受容体 EPCR(endothelial PC receptor)と PAR-1(Protease Activated Receptor-1)を介して、RAMPs として働き、抗炎症と損傷組織の修復に働くことが判明しつつあった(図2)。ただ、RAMPs 機能の内容の詳細は不明な問題として残されていた。

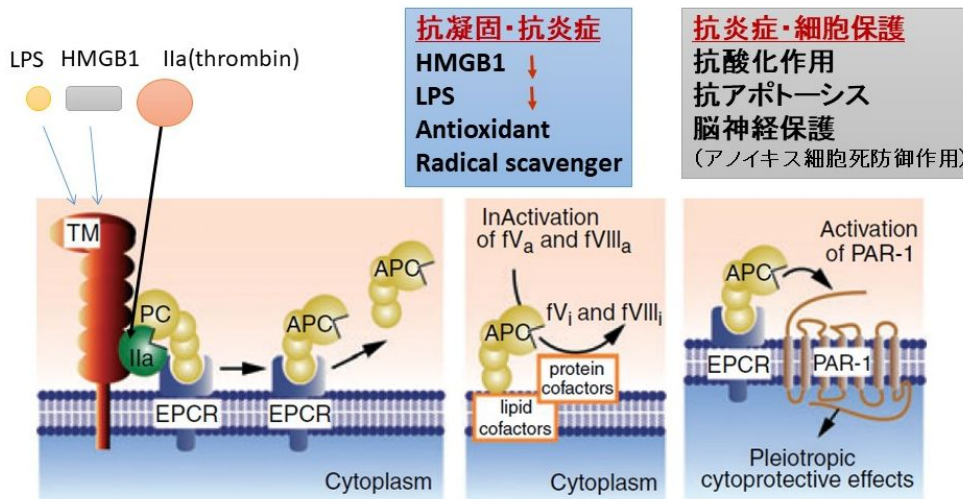


図2. 血管内皮細胞上のトロンボモジュリン-PC-PC 受容体による血管内凝固、炎症の制御と細胞保護。

IIa: トロンピン、TM: トロンボモジュリン、PC: プロテイン C、APC: 活性化 PC、EPCR: PC 受容体、PAR-1: protease activated receptor-1

2. 研究の目的

以上の視点から、第一に PAMPs/DAMPs に対する生体応答とその過不足の病態/メカニズムを解

析する。特に円滑な RAMPs 誘導という点に関しては、トロンピン（以下 T）とトロンボモジュリン (thrombomodulin, TM)、すなわち T-TM によって生ずる activated PC (APC) とその受容体 EPCR、あるいは PAR-1 反応のダイナミズムを解析する。とりわけ DAMPs、PAMPs-TLRs RAMPs 生成と、それ以降の反応経路、T-TM/APC-EPCR、PAR-1、すなわち RAMPs/RAMPs receptor が構築するコヒーレントな連続反応 coherent/sequential processes の異常という視点から解析・研究する。代表的とはいえ、単なる DAMPs の 1 分子にしか過ぎない HMGB1 が、生成・放出され部位の“レドックス環境を読み”全還元、部分酸化、全酸化の 3 アイソフォームに変貌し、DAMPs から PAMPs に機能変化する仕組み(分子細胞メカニズム)と、その意味論を生体防御の視点から明らかにする。そしてその破綻の病態として DIC、MOF、ショックの病態を把握し、DAMPs、PAMPs の制御と、RAMPs 誘導による治療の方法・端緒を見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

上記の目的達成のために HMGB1 の 3 つのアイソフォームを識別して測定する系の確立をめざす。方法はヒト血清、胎盤より、HMGB1 を純化し、HPLC にて全還元型、全酸化型、部分酸化型の HMGB1 を得た。これでマウスを免疫して、ハイブリドーマの中から、全期 3 型の HMGB1 に反応するクローンを選択するという方法を取った。

### 4. 研究成果

(1) 生体は【damage】に際して、【damage sensing】 【damage control】 【damage resolution】という各独立した反応系が、コヒーレントかつなめらかに融合した連鎖反応を取る。

(2) トロンピンは止血反応において中核的役割を果たし、このトロンピン(T)の時間的空間的制御は、内皮細胞上のトロンボモジュリン(TM)に依って営まれていること、T/TM 複合体によって生成された活性化 PC (APC) が、その受容体 (EPCR)、あるいは PAR1 (protease activated receptor-1) を介して修復反応に連鎖することを証明しえた。従って APC/EPCR - PAR1 系の欠損・不全は、単に血栓塞栓のみならず、組織細胞壊死、創傷治癒遷延・不全、習慣性流産を招来することを明らかにした。

(3) 代表的 DAMP : HMGB1 には、全還元型、部分酸化型、全酸化型の 3 形が在り、前 2 者が炎症細胞遊走と活性化 (炎症性サイトカイン産生) すなわち DAMP 機能を、そして全酸化型は抗炎症・修復活性、すなわち Resolution Associated Molecular Patterns (PAMPs) 能を有することが分かった (図 3)。

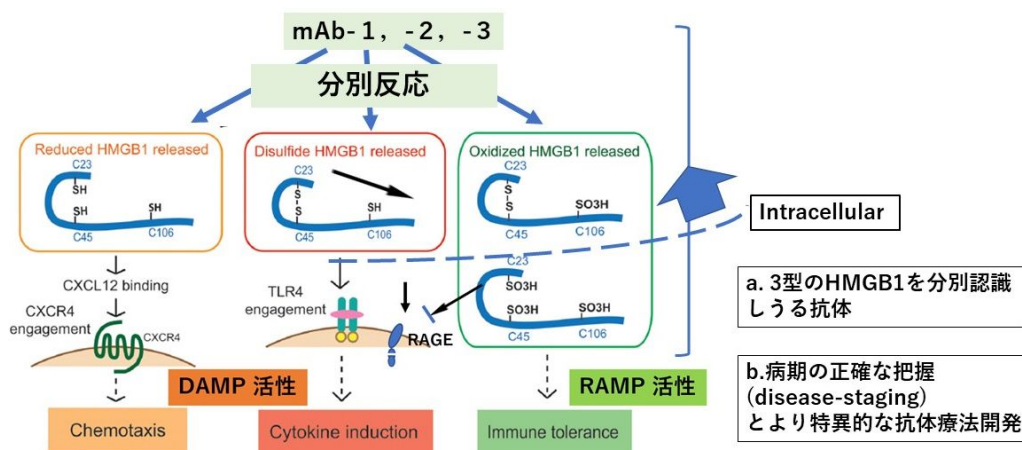


図 3 . HMGB1 の 3 アイソフォームと DAMP、RAMP 活性の機能変換  
oxidized HMGB1 は TLR4、CXCR4、RAGE には作用せず、RAM として働く

本研究では、ELISA 法を確立し、3 アイソフォームを分別測定することを研究目標として研究してきた (図 3)。これは世界中の研究者の課題であり続けてきたが、高感度に HMGB1 の 3 つのアイソフォームを分別反応する単クローン抗体を得ることが難しく、まだ誰も成功していないのが現状である。結論的には現在までの所、我々も 3 アイソフォーム HMGB1 と特異的に反応するクローン分取には成功していない。その原因として、その後の検討から、全還元 部分酸化型 全酸化型のレドックス状態遷移が非常に早いことが原因として浮かび上がってきた。HMGB1 は活性化細胞、あるいは壊死細胞の核から、細胞質→細胞外に放出されると、細胞外の酸・塩基 (レドックス) 状態を読み取り、その環境に最適の反応を取るという特性から、純化精製した HMGB1 も、純化精製のプロセスや保存環境や状態、実験手技の影響を受けるためと考え、この問題を克服すべく、核内から遊離してきた状態の段階で HMGB1 を分離して、抗原とする方法を検討中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Yashima Nozomi, Ito Takashi, Kajiyama Kenji, Maeda Hiroyuki, Kakihana Yasuyuki, Maruyama Ikuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Leukocyte-derived extracellular DNA contributes to abnormal pressure elevation in the extracorporeal circulation circuit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-57173-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Takashi, Totoki Takaaki, Yokoyama Yayoi, Yasuda Tomotsugu, Furubeppu Hiroaki, Yamada Shingo, Maruyama Ikuro, Kakihana Yasuyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Serum histone H3 levels and platelet counts are potential markers for coagulopathy with high risk of death in septic patients: a single-center observational study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Intensive Care	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40560-019-0420-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shrestha Binita, Ito Takashi, Kakuuchi Midori, Totoki Takaaki, Nagasato Tomoka, Yamamoto Mika, Maruyama Ikuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Recombinant Thrombomodulin Suppresses Histone-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Mika, Harada Yoichiro, Suzuki Takehiro, Fukushige Tomoko, Yamakuchi Munekazu, Kanekura Takuro, Dohmae Naoshi, Hori Kanji, Maruyama Ikuro	4. 巻 580
2. 論文標題 Application of high-mannose-type glycan-specific lectin from <i>Oscillatoria Agardhii</i> for affinity isolation of tumor-derived extracellular vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 21 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2019.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Namino Fuminori, Yamakuchi Munekazu, Iriki Yasuhisa, Okui Hideki, Ichiki Hitoshi, Maenosono Ryuichi, Oketani Naoya, Masamoto Izumi, Miyata Masaaki, Horiuchi Masahisa, Hashiguchi Teruto, Ohishi Mitsuru, Maruyama Ikuro	4. 巻 25
2. 論文標題 Dynamics of Soluble Thrombomodulin and Circulating miRNAs in Patients with Atrial Fibrillation Undergoing Radiofrequency Catheter Ablation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1076029619851570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Yayoi, Ito Takashi, Yasuda Tomotsugu, Furubeppu Hiroaki, Kamikokuryo Chinatsu, Yamada Shingo, Maruyama Ikuro, Kakahana Yasuyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Circulating histone H3 levels in septic patients are associated with coagulopathy, multiple organ failure, and death: a single-center observational study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis Journal	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12959-018-0190-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Takashi, Nakahara Mayumi, Masuda Yoshiki, Ono Sachie, Yamada Shingo, Ishikura Hiroyasu, Imaizumi Hitoshi, Kamikokuryo Chinatsu, Kakahana Yasuyuki, Maruyama Ikuro	4. 巻 6
2. 論文標題 Circulating histone H3 levels are increased in septic mice in a neutrophil-dependent manner: preclinical evaluation of a novel sandwich ELISA for histone H3	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Intensive Care	6. 最初と最後の頁 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40560-018-0348-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arishima Takuro, Ito Takashi, Yasuda Tomotsugu, Yashima Nozomi, Furubeppu Hiroaki, Kamikokuryo Chinatsu, Futatsuki Takahiro, Madokoro Yutaro, Miyamoto Shotaro, Eguchi Tomohiro, Haraura Hiroyuki, Maruyama Ikuro, Kakahana Yasuyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Circulating activated protein C levels are not increased in septic patients treated with recombinant human soluble thrombomodulin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thrombosis Journal	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12959-018-0178-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi N, Kawakami Y, Maruyama I, Lotz M.	4. 巻 31 (1)
2. 論文標題 HMGB proteins and arthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Cell	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-017-0182-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka K, Salunya T, Motomiya Y, Motomiya Y, Oyama Y, Yamakuchi M, Maruyama I.	4. 巻 21 (4)
2. 論文標題 Decreased Expression of Thrombomodulin in Endothelial Cells by Fibroblast Growth Factor-23/ - Klotho.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ther Apher Dial	6. 最初と最後の頁 395-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.12524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山 征郎
2. 発表標題 急性血液浄化の新視点: exosomeとRAMP s
3. 学会等名 第29回日本急性血液浄化学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山 征郎
2. 発表標題 病態拡大の新しい使者: exosomeが参画した新しいショック病
3. 学会等名 第33回日本Shock学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山征郎
2. 発表標題 エクソソームとshock、炎症との関わり
3. 学会等名 日本集中治療医学会 第1回東海北陸支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山征郎
2. 発表標題 血管内皮細胞と動脈硬化
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山征郎
2. 発表標題 血管作動因子としてのPAMPs /DAMPs とその作用
3. 学会等名 第47回日本心脈管作動物質学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	垣花 泰之  (KAKIHANA Yasuyuki)  (20264426)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川原 幸一 (KAWAHARA Koichi) (10381170)	大阪工業大学・工学部・教授  (34406)	
研究分担者	山口 宗一 (YAMAKUCHI Munekazu) (20325814)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授  (17701)	
研究分担者	原田 陽一郎 (HARADA Yoichiro) (80464147)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター (研究所)・その他部局等・糖鎖オンコロジー部主任研究員  (84409)	変更：2019年4月1日
研究分担者	伊藤 隆史 (ITO Takashi) (20381171)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師  (17701)	