

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 6日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790447

研究課題名（和文） 核内DNA結合蛋白HMGB1による炎症の時空的拡がり

研究課題名（英文） Spatiotemporal spread of inflammation caused by HMGB1 nuclear DNA-binding protein

研究代表者

大山 陽子 (OYAMA YOKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号：20583470

研究成果の概要（和文）：

遺伝子転写や DNA 安定化など核内で作用すると考えられていた核蛋白が、ひとたび細胞壊死やマクロファージからの分泌などにより細胞外へ放出されると、一転して組織の炎症を惹起し増幅させるという全く新しい核蛋白作用の概念がもたらされている。我々はその代表的核蛋白である High Mobility Group Box-1 Protein (HMGB1)が肉芽腫炎症の一つのメディエーターであり、炎症の慢性化、遷延化の惹起、ひいては臓器不全をも引き起こすことを明らかにしている。本研究では、さらなる肉芽腫炎症発症メカニズムの解明を目指すべく結晶誘発性肉芽腫性腎炎動物モデルを用い検証を行った。

＝腎肉芽腫炎症における HMGB1 の臓器障害メカニズムとその制御機構＝

肉芽腫治療を考慮した際に、その炎症性メディエーターである HMGB1 制御は必要不可欠である。HMGB1 抑制を観点に、通常の腎炎モデルに加え HMGB1 過剰投与群も作成し、下記の検討を行った。

- ① HMGB1 受容体である RAGE(Receptor for Advanced Glycation Endproducts)、Toll-like receptor (TLR) 2、4 の発現および HMGB1 過剰投与下におけるそれら発現の変化
- ② 腎炎動物モデルを用い、抗 HMGB1 抗体投与群を作成。生食投与群をコントロールとして腎機能、炎症性サイトカインの測定、および病理組織像など多角的な検証による抗 HMGB1 抗体の肉芽腫性炎症治療薬としての可能性の探求
- ③ 本肉芽腫炎症における Thrombomodulin(TM)関与の有無
- ④ 本肉芽腫炎症における活性酸素の関与およびその炎症惹起機構の検討

今回の研究結果より、HMGB1 受容体、ならびに TM は肉芽腫炎症の治療のターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

High-mobility group box-1 protein (HMGB1) was originally described as a nuclear DNA-binding protein that facilitates gene transcription by stabilizing nucleosome formation. HMGB1 can also be released or secrete extracellularly from cells as a result of cellular necrosis or activated macrophages/monocytes in response to inflammatory stimuli respectively, and acts as a pro-inflammatory cytokine or alarm signal for tissue damage.

We have revealed that HMGB1 can trigger a potent inflammatory response and accelerates granulomatous inflammation leading to severe tissue injury. In this study, we tried to disclose further mechanism of HMGB1-associated granulomatous inflammation. From a point of view that controlling HMGB1 is essential for treatment of granulomatous nephritis, we studied experiments using a granulomatous nephritis animal model to investigate follows:

1. The relationship between degrees of the nephritis and HMGB1 receptors expression
2. The effect of anti-HMGB1 antibody
3. TM association of the nephritis
4. Reactive oxygen species association of the nephritis

We have found that receptors of HMGB1 and TM could be a target for inhibiting granulomatous nephritis.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：High mobility group box-1 protein, RAGE, TLR2, TLR4, Thrombomodulin, Reactive oxygen species

1. 研究開始当初の背景

1972年に核蛋白質として発見されたHMGB1は、DNAの立体構造維持などその核内での働きが知られていたが、研究が進むにつれて、壊死細胞から受動的に、また活性化マクロファージ・樹状細胞から能動的に細胞外へ遊離されたHMGB1は、炎症性サイトカインの産生や細胞増殖、細胞遊走を促すなど全く新たな一面を持つことが分かり、再び脚光を浴びることになる。その後の研究により、細胞外でのHMGB1は幹細胞活性化および血管新生・増生の促進などから組織修復を促すなど生体に対してプラスに働く一方、接着分子発現増加による炎症細胞の局所浸潤の促進や、サイトカイン産生による炎症反応の増幅をおこし、さらにHMGB1の波及が全身化すると遠隔臓器にまでその炎症や凝固反応を惹起し、肺障害やDIC/SIRS、MOFなどから組織障害に至り、最終的には死の原因となる事

も報告されてきた。慢性炎症のひとつの形態である肉芽腫はマクロファージの集合体であること、さらに活性化マクロファージからHMGB1は能動的に放出されるといった機序に着目し、我々はHMGB1と肉芽腫性炎症との関連について腎肉芽腫モデルを用い検討を行った。結果、HMGB1は肉芽腫内の集簇マクロファージより強く放出されており、それが炎症の進展、遷延化、さらに組織機能不全をもきたすということを明らかにした。

2. 研究の目的

HMGB1は肉芽腫性炎症の進展、遷延化、組織機能不全をもたらすといった働きを明らかにしたことから、我々はHMGB1を肉芽腫炎症増悪のメディエーターと位置付け、HMGB1を軸とした肉芽腫炎症における免疫応答メカニズムの解明をテーマに研究を行った。

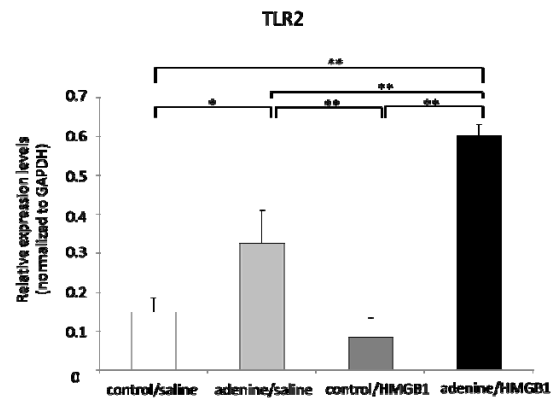
3. 研究の方法

結晶誘発性肉芽腫性腎炎動物モデルを用い、腎組織中の HMGB1 受容体および TM 発現の時間的変化の確認を PCR 法を用い行った。さらに、HMGB1 過剰投与群を用いそれら変化についても検討を行った。また、慢性腎疾患の進行に寄与しており、HMGB1 放出因子でもある活性酸素の関与についても検討を行った。

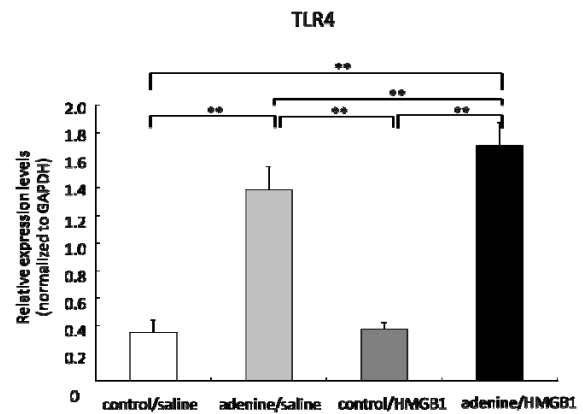
4. 研究成果

＝HMGB1 受容体発現の検証＝

肉芽腫炎症の増悪因子としての HMGB1 の役割を明らかにしてきたが、その受容体の解明は未だ進んでいない。肉芽腫炎症制御を HMGB1 抑制の観点から考慮する際、その受容体の解明は必要不可欠である。そこで HMGB1 受容体として知られる RAGE、TLR 2、4 の発現を確認した。結果、腎炎モデル動物腎組織内での HMGB1 受容体は TLR 4 のみならず TLR 2 の有意な発現増加も認め、肉芽腫炎症における本受容体の関与が考えられた。さらに腎炎に HMGB1 を投与した群においてもそれら受容体を確認したところ、HMGB1 発現と共に、TLR2、TLR4 双方の受容体発現も増加していた(図 1、2)(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。このことは HMGB1 が肉芽腫炎症のメディエーターであることをさらに裏付けるのみならず、これら受容体が肉芽腫の進展に深く関与していることを示すものである。



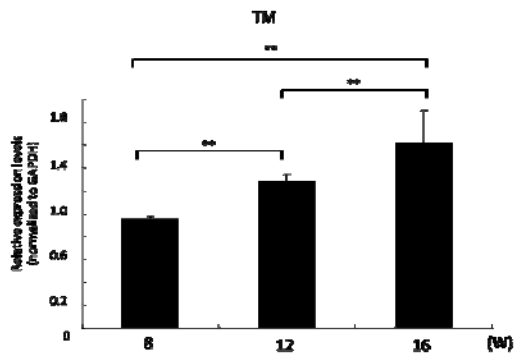
【図 1】



【図 2】

＝TM 発現の検証＝

我々は内皮細胞上の Thrombomodulin (TM) が HMGB1 に結合することで局所に封じ込め HMGB1 の全身化を防ぐことを見いだしている。そこで本腎炎モデルでの HMGB1 と TM の関係を確認するため、HMGB1 の放出および炎症の場である腎臓内の TM の発現を調べた。結果、腎炎経過時間依存性に TM 発現の有意な増加がみられた(図 3)。このことより、肉芽腫内で放出された HMGB1 は局所にとどめるための防御機構が働いている可能性が考えられた。

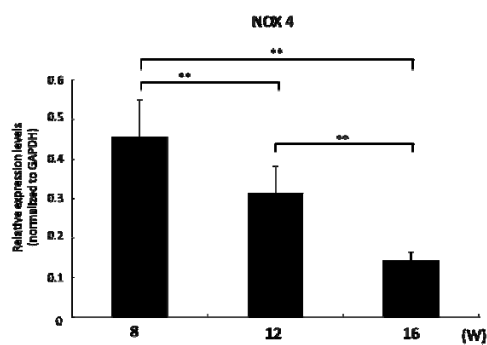


【図 3】

＝活性酸素の関連について＝

酸化ストレスは慢性腎疾患の進行に寄与しており、また活性酸素より HMGB1 が放出されることが報告されている。そこで肉芽腫炎症における HMGB1 関与解明の一つとして、活性酸素との関連について検討を行った。結果、腎組織における活性酸素量の有意な上昇を認めた。

活性酸素生成酵素として、NADPH オキシダーゼ(NOX)が知られている。7つのアイソフォーム(NOX1-7)があり、中でも NOX 4は腎組織に高発現している。腎組織内の活性酸素量が増加していたことから、腎組織内の NOX 4 発現を観察した。結果、時間依存性に有意な減少を認めた(図 4)。



【図 4】

NOX4 は腎障害を悪化させたという報告もある一方、腎保護的に働くといった報告もある。本データの解釈を含め、HMGB1 と NOX 4 発現および肉芽腫性炎症との関連を解明

することが次なる課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 なし

〔学会発表〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 陽子 (OYAMA YOKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・

特任助教

研究者番号：20583470