

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390402

研究課題名(和文) HMGB1 - バソプレシン連関を機軸とした敗血症性ショックのメカニズムの解明

研究課題名(英文) HMGB1-induced vasopressin deficiency contributes to septic shock

研究代表者

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：20381171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症性ショック患者では、他の原因のショック患者と比べて血漿バソプレシン値が有意に低いことが報告されており、バソプレシンの相対的欠乏状態は敗血症性ショックの主病態の一つと考えられている。しかしながら、バソプレシン欠乏に至る機序はわかっていない。今回我々は、敗血症の際に白血球や壊死細胞から放出される核内タンパク質HMGB1がバソプレシン欠乏の原因因子である可能性について報告する。エンドトキシン血症の早期には、血圧の低下とバソプレシン値の上昇を認めたが、HMGB1の血中濃度を高めると、血圧が低いにも関わらずバソプレシンが上昇しなかった。これに伴い、腎集合管ではアクアポリン2の発現が減少した。

研究成果の概要(英文)：Vasopressin deficiency contributes to the vasodilatation in the later stages of septic shock, and supplementary arginine vasopressin (AVP) infusion is increasingly being used to stabilize cardiocirculatory function in patients with advanced vasodilatory shock. However, the exact mechanism responsible for the vasopressin deficiency remains to be determined. Here we show that high mobility group box 1 protein (HMGB1), a late mediator of endotoxin lethality, is responsible for the vasopressin deficiency in endotoxemic rats. Administration of a neutralizing antibody against HMGB1 increased plasma vasopressin levels in endotoxemic rats, while administration of exogenous HMGB1 decreased plasma vasopressin levels.

研究分野：血栓症

キーワード：敗血症性ショック バソプレシン HMGB1 DAMPs

1. 研究開始当初の背景

血圧の管理は、敗血症治療の中心命題の一つである。敗血症性ショック患者では、他の原因のショック患者と比べて血漿バゾプレシン値が有意に低いことが報告されており、バゾプレシンの相対的欠乏状態は敗血症性ショックの主病態の一つと考えられている (*N Engl J Med.* 2001;345:588-95)。通常、血圧が低下した際には、血中のバゾプレシン値は上昇し、血圧を維持しようとする。エンドトキシン血症の際にも、初期にはバゾプレシン値の上昇を認めるが、発症後 24 時間程経過すると低下に転じる (*Crit Care Med.* 2003;31:1752-8)。これは視床下部 - 下垂体後葉のバゾプレシンが枯渇するためだと考えられているが、詳細なメカニズムはわかっていない。我々は、このバゾプレシン値低下のタイミングが、HMGB1 値上昇のタイミングと一致していることから、HMGB1 がバゾプレシン欠乏の原因因子ではないか、という仮説を立てた。後述するように、実際、ラットを用いた予備実験において、HMGB1 を投与したラットでは血漿バゾプレシン値の低下を認め、エンドトキシン血症 HMGB1 上昇バゾプレシン低下 ショックという流れが推察された。

HMGB1 は細胞の核の中に豊富に含まれているタンパク質で、炎症細胞や壊死細胞から放出されると、細胞外においては炎症・血液凝固反応を促進する。我々はこれまでに、HMGB1 がエンドトキシン血症 (*J Clin Invest.* 2005;115:1267-74)、播種性血管内凝固症候群 (*J Thromb Haemost.* 2007;5:109-16)、肝虚血再灌流障害 (*Crit Care Med.* 2010;38:879-85) の増悪因子として働くこと、トロンボモジュリン製剤が HMGB1 を不活化すること (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1825-30) などを報告してきた。その研究過程において、我々は、HMGB1 が血漿バゾプレシン値を低下させること、尿量を増

加させることを発見した。これらの事象は、細胞外に放出された HMGB1 が、直接もしくは間接的にバゾプレシン欠乏を引き起こし、それによってショックと尿量増加 (循環血液量低下) を誘発している、と考えれば一元的に説明できる。

2. 研究の目的

本研究課題では、エンドトキシン血症の状態において、HMGB1 がバゾプレシン系を抑制してショックを誘発するかどうかを、ラット、マウスを用いて検討する。また、HMGB1 を投与する実験だけでなく、エンドトキシン血症の際に内因性に放出される HMGB1 がバゾプレシンや血圧に及ぼしている影響についても、*Hmgb1* 欠損マウスや抗 HMGB1 中和抗体を用いて検討する。最後に、ヒトにおいても HMGB1 がバゾプレシンや血圧と関連しているかどうかを検討するために、敗血症患者の血漿 HMGB1 値、バゾプレシン値の相関を調べる。

3. 研究の方法

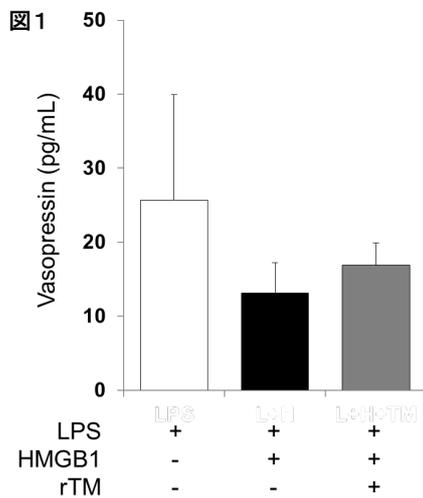
(1) SD ラットにエンドトキシンを投与した後のバゾプレシン値、血圧、尿量を測定し、エンドトキシン投与後に HMGB1 を投与した場合の測定値と比較検討する。また、抗利尿ホルモンであるバゾプレシンによって制御されていて集合管での水再吸収に重要なアクアポリン 2 の発現レベルを、腎臓の組織標本で検討する。

(2) 内因性 HMGB1 の役割を検討するために、エンドトキシン血症ラットに抗 HMGB1 抗体やトロンボモジュリン製剤を投与した場合の測定値を比較検討する。また、*Hmgb1* 欠損マウスと野生型マウスで、エンドトキシン血症の状態がどのように変化するかを検討する。

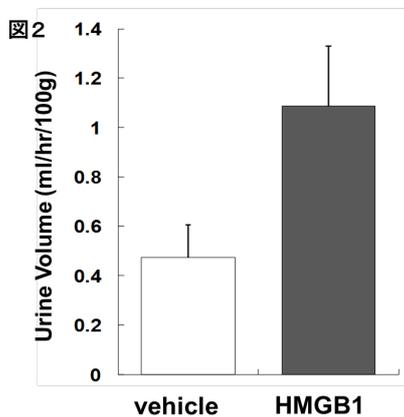
(3) 敗血症患者の血漿バゾプレシン値と HMGB1 値の相関を解析する。

4. 研究成果

エンドトキシンのみを投与したラットと比較して、エンドトキシン投与後に HMGB1 を投与したラットでは、平均血圧の低下の程度が約 22%大きく、HMGB1 がショックの誘発因子となっている可能性が示唆された。また、HMGB1 を投与したラットは血圧値が低いにも関わらず、血漿バソプレシン値の上昇が小さく、ショックに伴うバソプレシン値の上昇を HMGB1 が抑制している可能性が示唆された(図1)。

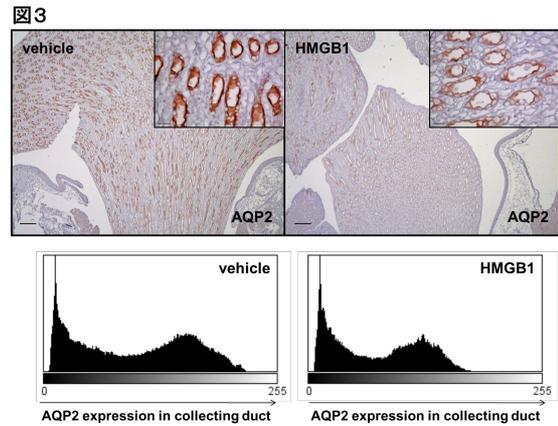


バソプレシンは血管壁の V1 受容体に作用して血管収縮を引き起こすだけでなく、腎集合管の V2 受容体に作用して水の再吸収を引き起こすため、次に、HMGB1 によって尿の再吸収が抑制されるかどうかを検討したところ、HMGB1 を投与したラットでは尿量の増加を認めた(図2)。

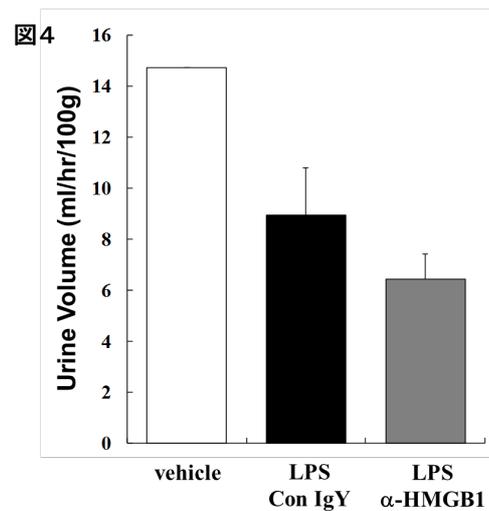


また、HMGB1 を投与したラットでは、腎集

合管でのアクアポリン 2 の発現が低下しており(図3)、HMGB1 によるバソプレシン低下の影響が、アクアポリン 2 の発現低下、水の再吸収の低下、尿量増加、と及んでいた。

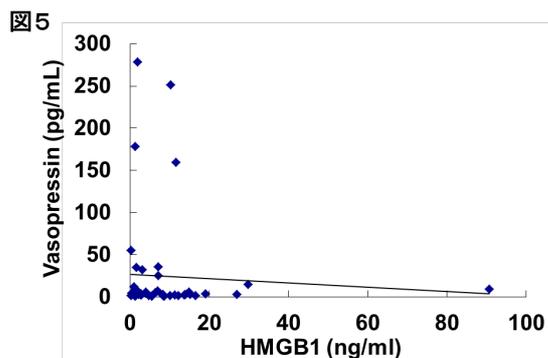


次に、エンドトキシン血症ラットに抗 HMGB1 抗体を投与して内因性の HMGB1 がバソプレシン系に及ぼす影響を解析したところ、抗 HMGB1 抗体の投与によって尿量が減少し、内因性 HMGB1 が腎集合管での水の再吸収を抑制していると考えられた(図4)。



次に、*Hmgb1* ヘテロ欠損マウスと野生型マウスで、エンドトキシン血症の状態がどのように変化するかを検討したところ、*Hmgb1* ヘテロ欠損マウスはベースラインでの HMGB1 発現量が野生型の約半分であったものの、エンドトキシン血症誘発後には HMGB1 の発現が誘導され、野生型との差がほぼなくなった。ヘテロ欠損マウスを用いて HMGB1 の役割を詳細に検討することは困難だと考えられた。

最後に、敗血症患者の血漿バゾプレシン値と HMGB1 値の相関を解析したところ、HMGB1 が高い患者ではバゾプレシン値が低かったが、HMGB1 が低い患者ではバゾプレシン値が高い患者と低い患者が混在していて、HMGB1 以外にもバゾプレシン低下の要因は複数あると考えられた(図5)。



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10件)

Tancharoen S, Matsuyama T, Kawahara K, Tanaka K, Lee LJ, Machigashira M, Noguchi K, Ito T, Imamura T, Potempa J, Kikuchi K, Maruyama I.

Cleavage of host cytokeratin-6 by lysine-specific gingipain induces gingival inflammation in periodontitis patients.

PLoS One. 10(2):e0117775. 2015 査読有

Ito T

PAMPs and DAMPs as triggers for DIC

J Intensive Care 2:67 2014 査読有

Kikuchi K, Tancharoen S, Ito T, Morimoto-Yamashita Y, Miura N, Kawahara K, Maruyama I, et al.

Potential of the Angiotensin Receptor Blockers (ARBs) Telmisartan, Irbesartan, and Candesartan for Inhibiting the

HMGB1/RAGE Axis in Prevention and Acute Treatment of Stroke.

Int J Mol Sci. 14(9) 18899-18924 2013 査読有

Sadamura-Takenaka Y, Ito T, Noma S, Oyama Y, Yamada S, Kawahara K, Inoue H, Maruyama I.

HMGB1 promotes the development of pulmonary arterial hypertension in rats.

PLoS One. 9(7):e102482. 2014 査読有

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

Coagulation activity and white thrombus formation in the microminipig.

In Vivo. 27(3):357-61. 2013 査読有

Yamashita A, Nishihira K, Matsuura Y, Ito T, Kawahara K, Hatakeyama K, Hashiguchi T, Maruyama I, et al.

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

Atherosclerosis. 224(2):511-4 2012 査読有

伊藤隆史

トロンボモジュリンの基礎

日本血栓止血学会誌 25巻1号 55-60 2014 査読なし

伊藤隆史

「トロンボモジュリンによる血管内聖域化」生体侵襲性 HMGB1-RAGE システムと遺伝子組換えトロンボモジュリンによるインターベンション

日本薬理学会誌 143巻1号 18-21 2014 査読なし

伊藤隆史

炎症に起因する血栓症の病態解明～新規メ
ディエーターとしての PAMPs/DAMPs～
日本血栓止血学会誌 24 巻 3 号 675-679
2013 査読なし

伊藤隆史・丸山征郎

PAMPs/DAMPs による血栓形成と自然免疫
日本血栓止血学会誌 23 巻 3 号 241-6 2012
査読なし

[学会発表](計10件)

伊藤隆史

敗血症性 DIC におけるヒストンの net effect
第 42 回日本集中治療医学会学術集会
2015/02/10 東京

Ito T

Extracellular histones and HMGB1 in
sepsis-associated coagulopathy
HMGB1 workshop in Stockholm 2014/10/01
スウェーデン

伊藤隆史

DIC/TMA の新規メディエーター：ヒストン
第 36 回日本血栓止血学会学術集会
(JSTH・救急医学会ジョイントシンポジウム)
大阪市 平成 26 年 5 月

伊藤隆史

血栓と免疫、そして、その制御
第 41 回日本集中治療医学会学術集会 (教育
セミナー18) 京都市 平成 26 年 2 月

Takashi Ito, Mayumi Nakahara, and
Ikuro Maruyama

Massive thrombosis evoked by
extracellular histones: Is it DIC?
59th Scientific and Standardization

Committee Meeting of the ISTH 2013 オ
ランダ 2013 年 6 月

伊藤隆史

炎症に起因する血栓症の病態解明～新規メ
ディエーターとしての PAMPs・DAMPs～
第 35 回日本血栓止血学会学術集会
(DAIICHI-SANKYO SYMPOSIUM FOR
THROMBOSIS UPDATE) 山形市 平成
25 年 5 月

伊藤隆史

生体侵襲性 HMGB1-RAGE システムと遺伝
子組換えトロンボモジュリンによるインタ
ーベンション
第 86 回日本薬理学会年会 (シンポジウム
24) 福岡市 平成 25 年 3 月

伊藤隆史

死細胞由来分子によって引き起こされる凝
固異常とその制御
第 40 回日本集中治療医学会学術集会 (シン
ポジウム 2 重症患者の凝固線溶異常とその
対策)
松本市 平成 25 年 2 月

伊藤隆史

PAMPs/DAMPs から紐解く「敗血症の病態
生理」と「トロンボモジュリンのポテンシャル」
第 34 回日本血栓止血学会学術集会
(JSTH・救急医学会ジョイントシンポジウム)
東京 平成 24 年 6 月

伊藤隆史

The Prothrombotic Roles of PAMPs and
DAMPs
第 34 回日本血栓止血学会学術集会 (SPC
シンポジウム) 東京 平成 24 年 6 月

〔図書〕(計1件)

ファーマナビゲーターDIC 編

伊藤隆史

メディカルレビュー社

分担執筆 Chapter 5 トピックス

PAMPs/DAMPs (148-157) 2014年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 隆史 (ITO TAKASHI)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
講師

研究者番号: 20381171

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

中原 真由美 (NAKAHARA MAYUMI)

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: 90707514

川原 幸一 (KAWAHARA KO-ICHI)

大阪工業大学工学部生命工学科
特任教授

研究者番号: 10381170

(4)研究協力者

永里 朋香 (NAGASATO TOMOKA)

藤森工業株式会社

山田 晋吾 (YAMADA SHINGO)

株式会社シノテスト

竹中 ゆかり (TAKENAKA YUKARI)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科