

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07167

研究課題名(和文)細胞外HMGB1の炎症促進機構の解明

研究課題名(英文)Role of extracellular HMGB1 in promotion of inflammation

研究代表者

柳井 秀元 (Yanai, Hideyuki)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：70431765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてHMGB1による好中球遊走メカニズムの詳細と炎症性疾患の病態におけるHMGB1の重要性について検討を進めた。HMGB1と強く結合しその作用を阻害するオリゴ核酸ISM ODNをConA誘導性肝炎モデルマウスに投与したところ、肝臓への好中球の浸潤が顕著に阻害された。また、ISM ODNの投与により腫瘍の増大も抑制された。HMGB1による好中球の遊走促進作用は、炎症の促進、腫瘍の増大に関連している可能性が示唆された。また、in vivoでの好中球遊走作用をさらに検討するため、恒常的にHMGB1を細胞外に放出する系を作成し、このコンストラクトを発現するノックインマウスを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HMGB1は炎症疾患病態を増悪するDAMPsの代表的な分子の一つとして捉えられている。HMGB1に対する阻害剤や中和抗体が多数作成され、実際に種々の病態を抑制することも報告されているが、HMGB1が実際にどのように炎症を促進しているのか、そのメカニズムには未だ不明な点が多い。本研究の結果から、HMGB1は好中球の遊走を介して炎症を促進する可能性が示唆された。実際、HMGB1を阻害すると、マウス肝炎モデルおよび腫瘍モデルにおいて好中球の炎症部位への浸潤が阻害された。HMGB1を標的とした治療法の開発において、好中球の割合が指標になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the mechanism of how HMGB1 promotes neutrophil migration and the importance of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory diseases. Interestingly, administration of HMGB1-targeting inhibitor ISM ODN into ConA-treated mice suppressed liver inflammation and neutrophil infiltration. ISM ODN treatment also reduced B16F10 tumor growth, suggesting that the promotion of neutrophil infiltration by HMGB1 augments the liver inflammation and tumor growth. To further study HMGB1-induced neutrophil migration in vivo, we generated knock-in mice that constantly release HMGB1 extracellularly.

研究分野：免疫学

キーワード：HMGB1 自然免疫 腫瘍 炎症 好中球

## 1. 研究開始当初の背景

HMGB1 (High-mobility group box 1) は代表的な DAMPs の一つとして知られており、ネクロシスなどの細胞死によって細胞外に放出され、TLRs などの自然免疫受容体を活性化することで TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) などの炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られている (Scaffidi P. et al., Nature 418: 191-195, 2002)。また、グラム陰性細菌に由来するリポポリサッカライド (Lipopolysaccharide; LPS) の刺激によっても HMGB1 が細胞外に放出されること、LPS をマウスに投与した際、同時に組換え HMGB1 を投与すると血中の炎症性サイトカインの産生が増強され、生存率が著しく低下することが報告されている (Wang H., et al., Science 285: 248-251, 1999)。また同報告においては、HMGB1 中和抗体の投与が、LPS ショックの生存率を顕著に向上することも報告されている。このように、HMGB1 を代表例とする DAMPs によって炎症疾患の病態を増悪させること、また、この作用を抑制する阻害剤の開発が病態の治療に応用できる可能性が強く示唆される。

HMGB1 は、定常状態では主に核に局在しているが、感染や炎症性の刺激、または細胞死によって細胞外に放出される。放出された HMGB1 は TLR2、TLR4、RAGE といった自然免疫受容体の活性化を介して炎症性サイトカインを産生させることが報告されている。しかしながら、最近、HMGB1 による炎症性サイトカインの産生機構について再考を要する報告が多くなされている。これまでの多くの研究において、市販の組換え HMGB1 タンパクが用いられていたが、そのいくつかはエンドトキシンの混入とそれによる TLRs の活性化を検出してしまっている可能性が指摘されている。実際、高純度に精製された HMGB1 にはサイトカイン誘導活性が無いという報告がある (Rouhiainen A. et al., J. Leukoc. Biol. 81: 49-58, 2007; Tsan MF. J. Leukoc. Biol. 89: 847-853, 2011)。また、我々や他の研究グループにおいて HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスが作製され、全身性に HMGB1 を欠損させたマウスに LPS ショックを誘導した際、血中 HMGB1 のレベルはほぼ完全に欠失しているものの、生存率は野生型マウスのそれと変わらないことが判明している (未発表; Huebener P. et al., J. Clin. Invest. 125: 539-550, 2015)。これらの報告は、HMGB1 には従来考えられてきたような炎症性サイトカインの誘導機能がほとんどないことを示しているものと考えられる。

では細胞外に放出された HMGB1 は炎症や疾患において何も機能を果たしていないのだろうか? 最近の報告や我々の解析から、HMGB1 は好中球の遊走を介して炎症に関与している可能性がある。肝細胞において HMGB1 を欠失させたマウスでは、アセトアミノフェン誘導性肝炎に際して、顕著な好中球浸潤の減弱と炎症の低下が認められている (Huebener P. et al., J. Clin. Invest. 125: 539-550, 2015)。HMGB1 は好中球の遊走等を介して炎症を促進することが示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究において、好中球の遊走を含め、HMGB1 の炎症性疾患の病態との関連性について解明を目指す。HMGB1 は炎症病態を増悪する DAMPs として注目されているものの、その機能については未だに再度の検討を要する状況である。HMGB1 に対する中和抗体の投与が様々な疾患モデルの病態を抑制することが報告されており、有望な治療標的分子として HMGB1 は益々着目されるようになってきている。従って、本研究の成果は、それらの疾患に対する治療応用に向けた分子基盤の確立につながることを期待できる。また、HMGB1 以外の DAMPs 分子についても探索を試みる。

## 3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、本研究において HMGB1 による好中球遊走メカニズムの詳細と炎症性疾患の病態における HMGB1 の重要性について検討を進める。腫瘍や炎症モデルを用い、また、HMGB1 の作用を阻害するオリゴ核酸 ISM ODN を用い、好中球の浸潤等を検討する。また、恒常的に HMGB1 を細胞外に放出させる系、細胞株を作成し、細胞外に放出された HMGB1 の DAMPs としての作用について検討する。

## 4. 研究成果

本研究において HMGB1 による好中球遊走メカニズムの詳細と炎症性疾患の病態における HMGB1 の重要性について検討を進めた。組換え HMGB1 タンパクを用いた好中球遊走アッセイの検討からは、HMGB1 が直接好中球の遊走を促進する作用を見いだせなかった。一方で、HMGB1 と強く結合しその作用を阻害するオリゴ核酸 ISM ODN を ConA 誘導性肝炎モデルマウスに投与したところ、肝臓への好中球の浸潤が顕著に阻害された。HMGB1 はケモカインを含め、多種の分子と結合し、その活性を高める作用があることが知られていることから、パートナー分子との結合が好中球の遊走促進に必要である可能性が考えられた。また、さらに、B16F10 担がんマウスモデルにおいて、HMGB1 を欠失させた B16F10 細胞の腫瘍中の好中球の割合は、野生型の B16F10 細胞の腫瘍中のそれと比較し、顕著に減弱することがわかった。HMGB1 に

よる好中球の遊走促進作用は、炎症の促進、腫瘍の増大に関連している可能性が示唆された。また、恒常的に HMGB1 を細胞外に放出する系を作成し、このコンストラクトを発現するノックインマウスを作成した。今後さらに、in vivo での HMGB1 による好中球遊走促進作用について解明を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hangai Sho, Kimura Yoshitaka, Taniguchi Tadatsugu, Yanai Hideyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Signal transducing innate receptors in tumor immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	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) 10.1111/cas.14848	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 Senda Naoyuki, Yanai Hideyuki, Hibino Sana, Li Lei, Mizushima Yu, Miyagaki Tomomitsu, Saeki Mai, Kishi Yusuke, Hangai Sho, Nishio Junko, Sugaya Makoto, Taniguchi Tadatsugu, Sato Shinichi	4. 巻 118
2. 論文標題 HMGB1-mediated chromatin remodeling attenuates IL24 gene expression for the protection from allergic contact dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2022343118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2022343118	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 Negishi H, Endo N, Nakajima Y, Nishiyama T, Tabunoki Y, Nishio J, Koshiba R, Matsuda A, Matsuki K, Okamura T, Negishi-Koga T, Ichinohe T, Takemura S, Ishiwata H, Iemura S, Natsume T, Abe T, Kiyonari H, Doi T, Hangai S, Yanai H, Fujio K, Yamamoto K, Taniguchi T	4. 巻 116
2. 論文標題 Identification of U11snRNA as an endogenous agonist of TLR7-mediated immune pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 23653 ~ 23661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1915326116	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 Kimura Yoshitaka, Negishi Hideo, Matsuda Atsushi, Endo Nobuyasu, Hangai Sho, Inoue Asuka, Nishio Junko, Taniguchi Tadatsugu, Yanai Hideyuki	4. 巻 109
2. 論文標題 Novel chemical compound SINCRO with dual function in STING-type I interferon and tumor cell death pathways	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2687 ~ 2696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13726	査読の有無 無
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 Yanai Hideyuki, Chiba Shiho, Hangai Sho, Kometani Kohei, Inoue Asuka, Kimura Yoshitaka, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Nishio Junko, Taguchi-Atarashi Naoko, Mizushima Yu, Negishi Hideo, Grosschedl Rudolf, Taniguchi Tadatsugu	4. 巻 115
2. 論文標題 Revisiting the role of IRF3 in inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 5253 ~ 5258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1803936115	査読の有無 無
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 Negishi Hideo, Taniguchi Tadatsugu, Yanai Hideyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Biology	6. 最初と最後の頁 a028423 ~ a028423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a028423	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 柳井秀元
2. 発表標題 炎症と免疫老化における細胞障害関連分子 (DAMPs) の役割の解析
3. 学会等名 抗加齢医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳井秀元
2. 発表標題 死細胞由来分子による自然免疫応答調節機構の解析
3. 学会等名 日本インターフェロンサイトカイン学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Yanai
2. 発表標題 HMGB1 and other DAMPs in cancer and inflammatory diseases
3. 学会等名 International DAMPs and Alarmins Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳井秀元
2. 発表標題 日本免疫学会
3. 学会等名 死細胞由来分子による自然免疫応答調節機構
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳井秀元
2. 発表標題 Role of cancer cell-derived HMGB1 in tumor progressions
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Hideyuki Yanai
2. 発表標題 HMGB1 and other DAMPs in cancer and other diseases; therapeutic implication
3. 学会等名 第6回国際インターフェロン・サイトカイン学会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 柳井秀元
2. 発表標題 Cancer cell-derived HMGB1 promotes tumor growth by recruiting MDSCs into the tumor microenvironment
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 柳井秀元
2. 発表標題 C型レクチン受容体によるがん排除機構の解析
3. 学会等名 第29回 日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

炎症疾患制御分野ホームページ <a href="http://mol-immu.umin.jp/">http://mol-immu.umin.jp/</a> 東京大学生産技術研究所 <a href="https://www.iis.u-tokyo.ac.jp/ja/research/department_center/immunology/">https://www.iis.u-tokyo.ac.jp/ja/research/department_center/immunology/</a> 炎症・免疫制御学社会連携研究部門 <a href="http://mol-immu.umin.jp/">http://mol-immu.umin.jp/</a>
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------