

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390274

研究課題名(和文) トロンボモジュリン-HMGB1 軸による生体防御の新機構

研究課題名(英文) Defense system by thrombin-HMGB1 axis

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

研究成果の概要

血管内皮細胞上のトロンボモジュリン(TM)はトロンビン(T)を凝固酵素から抗凝固酵素へと変換するのみならず、“死の因子”として同定されたHMGB1をそのN末端に吸着する。吸着されたHMGB1はT・TMによって分解され、*des*-HMGB1として遊離する。HMGB1は侵襲局所では止血・自然免疫・修復のメディエーターとして作用するが、その全身化はTMによって防がれていることになる。このようにTMによるHMGB1の吸着分解は、閉鎖循環系を局所の炎症や凝固から守る新たな生体防御システムの一環である。

研究成果の概要(英文)：

An endothelial membrane protein, Thrombomodulin(TM) converts thrombin(T) from a procoagulant protease to an anticoagulant. We found that N-terminus of TM also can bind and neutralize death mediator HMGB1. T-TM complex degrades the HMGB1 bound to TM forming *des*-HMGB1. HMGB1 acts as triggering factor for hemostasis, innate immune and repair at injury sites. However systemic HMGB1 acts as a mediator for DIC, shock and MOF. Thus TM and HMGB1 is form a self-defense system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：循環器・高血圧、感染症、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 多臓器生物循環器系の統合性とホメオステシス機構：ヒトなど多細胞生物は、各臓器に血液をすばやく配給する必要がある。多臓器生物は閉鎖循環系を創ることで、これを乗り越えてきた。これにより、数分以内に血液を全身の各臓器に配給できる仕組みが

出来上がった。この閉鎖循環系は海から上陸した時に喪失した“海”というミネラルに富んだ環境を封じ込めるプールであり、かつ酸素や炭酸ガス、栄養素を円滑に各臓器に運搬するライフラインである。しかしこの閉鎖循環系の機能を維持するためには、以下のようないくつかの条件を満たすことが必要とな

った。それらは、

- ①閉鎖循環系を作る血管が破綻しないこと、
万一破綻しても直ちに止血すること、
- ②閉鎖循環器内を血液は円滑に循環すること
- ③閉鎖循環器内は無菌的であること、
- ④局所の反応(炎症や止血反応など)を局所に
限局化して、閉鎖循環系を介して全身化し
ないこと、

などの条件である。多臓器生物は、閉鎖循環系を「しなやかで丈夫な血管を創り」、「その中を、破綻してもただちに破綻部位のみで、かつ破綻時のみ作動する on demand 型の止血システム」とし、かつ「血管内を無菌的に保持できる免疫システム」で防御することで上記の条件を克服してきた。しかし血管外環境となると、始終、炎症や、止血反応、障害が起きている。これらの部位では、止血のためのトロンビンや、かつ壊死細胞からは種々の生理活性因子、フリーラジカルなどが産生されている。

(2) ヤーヌスの顔を持った 新規サイトカイン HMGB1: ごく最近、これらの血管外の侵襲局所では、HMGB1 (High Mobility Group Box B Protein 1)が遊離放出されることが判明してきた。HMGB1 は本来、核内 DNA 結合蛋白であるが、壊死細胞、あるいは活性化されたマクロファージ、樹状細胞からは細胞外に放出され【自然免疫】、【創傷治癒】のアジュバントとして働く。それに加えて、我々は HMGB1 が【止血】のアジュバントとしても働くことを最近明らかにした (Ito, T et al. J.Thromb. Haemost. 2007;5:109) (図 1)。この HMGB1 の受容体は RAGE(Receptor for Advanced Glycation Endproducts) であるが、TLR-2, -4 も受容体として働くことを我々は明らかにした (Am.J. Physio Cell Physiol 2006;290:C917) (図 2)。しかしこの HMGB1 が血管内に侵入し、循環すると、肺や腎臓などの遠隔臓器細胞の RAGE, TLR-2, -4 に作用し、炎症や止血反応などの“転移”を惹起し、多臓器不全、DIC などの原因となるということを、我々のグループと、Bianchi, ME(Milan University), Tracey, KJ(New York University) らのグループが明らかにしている(図 3)。すなわち局所性の HMGB1 は生体防御と修復に働くが、全身性の HMGB1 は臓器不全のメディエーターとして作用するという、すなわち“HMGB1 はヤーヌスの顔をしている”ということが判明してきた。

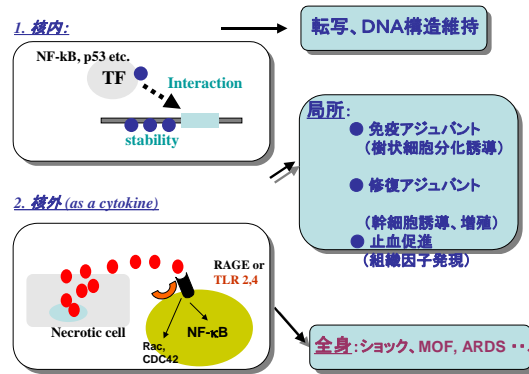


図 1. 核内 DNA 結合蛋白 HMGB1 は細胞外でも活性を発揮する

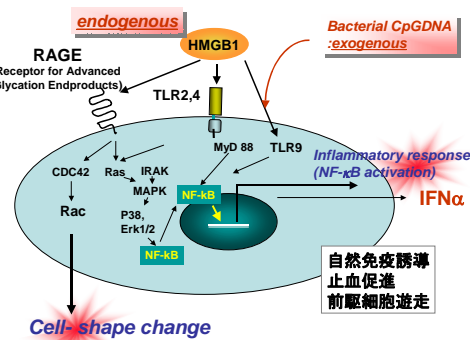


図 2. HMGB1 とその受容体システムと細胞生理活性

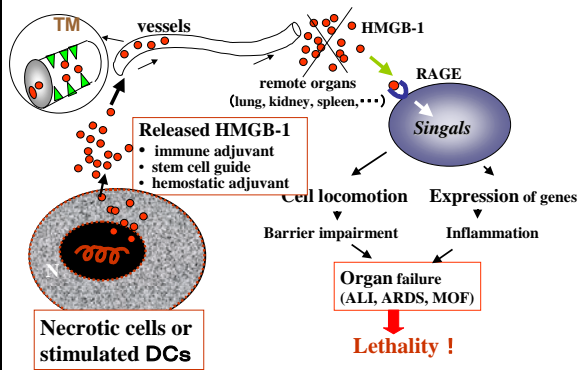


図 3. 局所に遊離された HMGB1 は内皮細胞性 TM によって全身化 が防御されている

(3) HMGB1 のモジュレーターは内皮細胞性のトロンボモデュリンである: それではこの 2 面性を持った HMGB1 はどのような仕組みで、【侵襲-障害部位局所】に封じ込められて“benign mediator”として働き、その全身化, “bad mediator”化は制御されているのであろうか? 我々は驚くべきことに内皮細胞上の抗凝固蛋白トロンボモデュリン(thrombomodulin, TM) の M 末端レクチン様ドメインが HMGB1 を吸着・中

和することを最近発見した (Abeyama, K. et al. J. Clin. Invest 2005;115:1267)。そのあとこの HMGB1 は TM 上のトロンビンによって分解されることも明らかにした (Ito, T. et al. Submitted and Revised in Atheroscle Thromb Vasc Biol)。またさらに、TM の EGF 様配列にラディカルスカベンジャー活性もあることを明らかにしている (投稿準備中)。このように、内皮細胞上の TM は単にトロンビンのベクトル変換のみならず、幅広いスペクトラムで血管内と外の論理を峻別していることが示唆される。

これらの背景を基に、今回の研究では以下のことを目的として研究を展開し、多細胞生物が血管内と外の反応を相互に制御する機能を血管内皮細胞上の TM 分子に付加することで、血管内の抗血栓、抗炎症、抗細胞増殖機能を発揮し、多臓器間の円滑なネットワーク形成と、インテグリティを保持していることを検証する。

2. 研究の目的

トロンボモデュリンによる HMGB1 の局所封印と全身化防御の仕組みとその意味論

我々がこれまでに明らかにしてきた TM の構造と機能の全体像は図 4 のようなものである。すなわち、TM 分子の Epidermal Growth Factor Like Structure (EGF) の 4、5、6 番目にトロンビンが結合すると、もはやこのトロンビンには血小板、フィブリノゲン、F.V, F.VIII はアクセスできなくなり、逆に Protein C (PC) の結合性が著しく増強され、activated PC (APC) へと変換される。APC は F.Va, VIIIa を分解し、凝固をネガティブ制御する。このように TM は内皮細胞上で、トロンビンのベクトルを凝固酵素から抗凝固酵素への変換する特殊な受容体として作用する。さらに最近の我々の一連の研究で、局所性 HMGB1 は TM のレクチン様ドメインで全身化が抑制され、HMGB1 は障害局所に enrich されて、局所で自然免疫、止血、創傷治癒のアジュバントとして機能する、というあと一つの重要な TM の機能が明らかになった (図 3)。

3. 研究の方法

今回の研究計画は以下のような手順と内容で行う。すなわち、

(1) TM に結合した HMGB1 の運命 (図 4-①)

局所の侵襲部位、損傷部位の壊死細胞や活性化樹状細胞から細胞外に遊離した HMGB1 が局所では、自然免疫、創傷治癒 (progenitor cell の遊走と増殖による)、そして止血のアジュバントとして作用するが、この HMGB1 が血管内に侵入し、循環すると、遠隔臓器に炎症や止血反応が“転移”し、SIRS/DIC/MOF の

病態基盤を形成する。このような炎症や止血反応が局所に封じ込める仕組みが内皮細胞の TM であることを我々は明らかにしたことは上述した。それは機能の不明であった TM の N 末端レクチン様ドメインに HMGB1 が吸着されることで完遂される。“それでは TM の N 末端に結合した HMGB1 の機能と運命はどのようなのであろうか?”これは CT.

Esomon が我々の論文を紹介解説しつつ投げかけたクエスチョンでもある (CT. Esmon. Nat. Med. 11:475:2005)。我々は TM に結合した HMGB1 は TM 上のトロンビンによって分解されることを *in vitro*, *in vivo* で明らかにしている (Ito, T. et al. Submitted and Revised in Atheroscle Thromb Vasc Biol)。しかしその詳しい分子起序には不明の点が多いので、それを解明する。特に TM 分子の EGF-like structure の 4、5、6 番目に結合したトロンビンが N 末に結合した HMGB1 をどのように分子接近して分解するのかということがまだ判明していないので、この点を明らかにする。

(2) HMGB1 側の結合部位 (図 4-②)

次の疑問は、HMGB1 のどのドメインが、TM のレクチン様ドメインに結合するのか? 結合様式はどのような結合か? という問題である。そこで変異型 HMGB1 を作成し、HMGB1 の TM への結合ドメインとその様式を明らかにする。

(3) TM の機能変化 (図 4-③)

TM の N 末端に HMGB1 が結合すると、TM にはどのような機能変化が現れるのであろうか?

われわれは、HMGB1 が TM 存在下でのトロンビンによるプロテイン C (PC) 活性化を抑制することを見出している (Ito, T et al. J. Thromb. Haemost. 2007;5:109)。しかしトロンビン、トロンボモデュリン、PC、HMGB1 の分子間の相互作用に関しては未だ不明の点が多いので、そこを解明する。また PC 受容体などが関係する可能性もあるので、それぞれの変異体、ノックダウンした細胞などを使って、HMGB1 による TM 側の機能の変化を明らかにする。

(4) Mini-HMGB1 の生理活性 (図 4-④)

われわれは、トロンビン・トロンボモデュリン複合体は HMGB1 をその N 末端の 11 番目のアルギニンの位置で切断することを見出している。結果 mini-HMGB1 が生ずる

(Ito, T. et al. Submitted and Revised in Atheroscle Thromb Vasc Biol)。この mini-HMGB1 は RAGE に結合するものの、その NF- κ B 活性化作用は弱いことをすでに見出しているが、その他の生理活性があるか否かを解明する。標的細胞には血管内皮細胞、マクロファージ系細胞などを選ぶ。

(5) HMGB1 刺激の TM 発現への影響 (図 4-⑤)

HMGB1 は各細胞に発現している RAGE に作用して機能を発揮するが、TLT-2, -4 にも作用し、Rac, CDC42 などを通じ、細胞運動とラディカル産生を、あと一つは NF-κB を活性化することを、我々を含む欧米のグループが明らかにしている。それではこの HMGB1 刺激は、TM 発現に影響するであろうか？一般的に内皮細胞上の TM は、TNFα やエンドトキシンなど NF-κB を活性化する刺激で、ダウンレギュレーションされるが、HMGB1-RAGE, HMGB1-TLR2, 4 経路の TM 発現に対する影響に関しては不明であるので、この点を明らかにする。

(6) 動物を使用した in vitro 実験での検証

【トロンボモデュリン-HMGB1 枢軸による生体防御】の全体像の描出と検証には、これらの分子の欠損動物を使って in vivo のデータで裏を取る必要がある。これに関しては、HMGB1 ノックアウトマウスをイタリアミラノ大の Banchi, ME 教授から供与を受けることが決まっており、その移入手続き中であるので、これを使って解明してゆく予定である。また TM 遺伝子操作マウスも作成予定である。さらにリコンビナント TM を各種実験の動物 (エンドトキシン投与ラット、ブタ、移植ラットなど) に投与してその効果を検証しつつあるので、局所の HMGB1 が、局所で侵襲に対する免疫と止血と修復に作用し、循環血中へ侵入し、毒性を発揮するということが、内皮細胞性 TM によって防御されているという【TM と HMGB1 の分子間共同による生体防御の機構】の全体像を明らかにしてゆく。すなわち血管外の局所では HMGB1 が損傷部位の修復と感染・止血の防止に、TM が結果的に HMGB1 の機能を持ち込むことを制御していることを証明する。

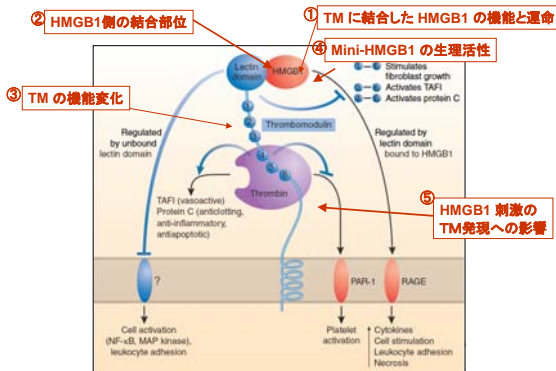


図 4. 我々の研究成果 (JCI. 2005;115:1267-74) を解説紹介した Nat. Med の図 (Esmon, CT. Nat Med. 2005;11:475-478) (四角内) に今後の本研究の計画を外に書き込んだ (外、赤四角囲み)

4. 研究成果

本研究で明らかにしたことは以下の点である。

(1) TM に結合した HMGB1 の運命

TM の N 末端レクチン様ドメインに結合した HMGB1 は催炎症活性を消失する。そのあと in vitro の試験では HMGB1 は N 末端側 11 残基の箇所 (Arg-Gly) で切断され、切断断片 (des-HMGB1 と命名) は TM から遊離することが明らかになった。

(2) Des-HMGB1 の生理活性

Des-HMGB1 の催炎症活性は intact の HMGB1 に比較して 30% 以下であった。これは Des-HMGB1 の受容体 RAGE への結合能の低下のためと考えている。

(3) HMGB1 側の TM 結合部位

TM に結合した HMGB1 はトロンビンで切断され、des-HMGB1 が遊離してくるので、HMGB1 はその N 末端 10 残基目までの部位で結合することが推定された。

(4) 遺伝子組み換え TM 投与時の HMGB1 のダイナミクス

DIC (播種性血管内凝固症候群) 患者に遺伝子組み換え TM を投与したヒトの症例では速やかに血中の HMGB1 が激減する症例が見られた。これらの患者血中においては des-HMGB1 が観察された。

しかし症例によっては HMGB1 が減少しないケース、横ばいのケースなどが観察されたが、これは、

- 1) 開発した HMGB1 測定 ELISA が des-HMGB1 をも計りこむため、
- 2) 活動性病変由来

などが考えられた。

現在 des-HMGB1 のみの測定キットを開発中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Oyama Y, Hashiguchi T, Maruyama I, et al. High-mobility group box-1 protein promotes granulomatous nephritis in adenine-induced nephropathy. Lab Invest. 査読有 90(6):853-66. 2010.
2. Takano K, Maruyama I, Kitagawa Y. et al. Protective effect of high-mobility group box 1 blockade on acute liver failure in rats. Shock 査読有 34(6) 573-579. 2010
3. Suda K, Takeuchi H, Maruyama I, Kitagawa Y, et al. Spherical sulfated cellulose adsorbs high-mobility-group box chromosomal protein 1 in vitro and in vivo. ASAIO J. 査読有 56(3) 210-214. 2010

4. Kawabata H, Setoguchi T, Yone K, Souda M, Yoshida H, Kawahara K, Maruyama I, Komiya S. High mobility group box 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 査読有 35(11):1109-15. 2010
5. Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, Sekine-Kondo E, Nagata N, Okamoto K, Mera T, Yamamoto H, Yamada S, Maruyama I, Taniguchi M, Yasunami Y. High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J Clin Invest*. 査読有 120(3):735-43. 2010
6. Yamamoto T, Ono T, Ito T, Yamanoi A, Maruyama I, Tanaka T. Hemoperfusion with a high-mobility group box 1 adsorption column can prevent the occurrence of hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Crit Care Med*. 査読有 38(3):879-85. 2010
7. Fujita M, Tsuruta R, Kaneko T, Otsuka Y, Kutsuna S, Izumi T, Aoki T, Shitara M, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T. Hyperoxia suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats: laboratory study. *Shock*. 34(3):299-305. 査読有 2010
8. Suda K, Takeuchi H, Hagiwara T, Miyasho T, Okamoto M, Kawasako K, Yamada S, Sukanuma K, Wada N, Saikawa Y, Fukunaga K, Funakoshi Y, Hashimoto S, Yokota H, Maruyama I, Ishizaka A, Kitagawa Y. Neutrophil elastase inhibitor improves survival of rats with clinically relevant sepsis. *Shock*. 査読有 33(5):526-31. 2010
9. Tsuruta R, Fujita M, Ono T, Koda Y, Koga Y, Yamamoto T, Nanba M, Shitara M, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T. Hyperglycemia enhances excessive superoxide anion radical generation, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats. *Brain Res*. 査読有 1309:155-63. 2010
10. Kikuchi K, Kawahara K, Hashiguchi T, Maruyama I, et al. Minocycline attenuates both OGD-induced HMGB1 release and HMGB1-induced cell death in ischemic neuronal injury in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 385(2) 132-6. 2009
11. Kikuchi K, Kawahara K, Hashiguchi T, Maruyama I, et al. The free radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 査読有 329(3) 865-74. 2009.
12. Ono T, Tsuruta R, Fujita M, Aki HS, Kutsuna S, Kawamura Y, Wakatsuki J, Aoki T, Kobayashi C, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T. Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res*. 査読有 1305:158-67. 2009
13. Nakahara T, Tsuruta R, Kaneko T, Yamashita S, Fujita M, Kasaoka S, Hashiguchi T, Suzuki M, Maruyama I, Maekawa T. High-mobility group box 1 protein in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*. 査読有 11(3):362-8. 2009
14. Aki HS, Fujita M, Yamashita S, Fujimoto K, Kumagai K, Tsuruta R, Kasaoka S, Aoki T, Nanba M, Murata H, Yuasa M, Maruyama I, Maekawa T. Elevation of jugular venous superoxide anion radical is associated with early inflammation, oxidative stress, and endothelial injury in forebrain ischemia-reperfusion rats. *Brain Res*. 査読有 1292:180-90. 2009
15. Eguchi T, Nomura Y, Hashiguchi T, Masuda K, Arata M, Hazeki D, Ueno K, Nishi J, Kawano Y, Maruyama I. An elevated value of high mobility group box 1 is a potential marker for poor response to high-dose of intravenous immunoglobulin treatment in patients with Kawasaki syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 査読有 28(4):339-41. 2009
16. Kawahara K, Hashiguchi T, Maruyama I, and et al. Induction of high mobility group box 1 release from serotonin-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med*. 査読有 22(5) 639-44. 2008
17. Ito T, Kawahara K, Maruyama I, et al.

Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes. *Biochem Biophys Res Commun.*
査読有 377(2) 642-7.2008

18. Ito T, Kawahara K, Maruyama I, and et al. Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
査読有 28 (10) 1825-30.2008

〔学会発表〕（計 1 件）

1. Maruyama I. Therapeutic strategy for circulating “bad” HMGB1 in septic shock. 第2回HMGB1会議2009年9月25日 ハンブルグ（ドイツ）

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：70250917

川原 幸一 (KAWAHARA KOICHI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：10381170

清水 利昭 (SHIMIZU TOSHIAKI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
医員
研究者番号：50468055