

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791149

研究課題名(和文)皮膚虚血再灌流障害モデルにおける多機能タンパクHMGB1の役割

研究課題名(英文)Role of HMGB1 in skin reperfusion model

研究代表者

糟谷 啓(Kasuya, Akira)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60599421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：褥瘡を始めとする皮膚虚血再灌流障害において、HMGB1が創傷治癒に及ぼす効果を検討した。実験的にマウスに褥瘡を作成し、抗HMGB1抗体の作用を検討した。抗HMGB1抗体の静注は有意に潰瘍の大きさを肉眼的におよび組織学的に縮小させた。さらに抗HMGB1抗体は組織でのiNOSやTNFの発現を抑制し、過剰な炎症を抑えていることが推察された。障害部位で生ずる浮腫を生体イメージングすることに成功した。この浮腫はHMGB1抗体の静注により減弱することを発見した。本研究は、今後、HMGB1をターゲットとした薬剤の開発のための基礎的なデータとして有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：High mobility group box-1 (HMGB1) is capable of activating macrophages in injured tissues during ischemia reperfusion (IR) injury. IR is mediated through tissue ischemia, leading to excessive inflammation and enhanced skin damage. We investigated the role of HMGB1 in the experimental IR injury model. The experimental IR injury induced HMGB1 release in the epidermal keratinocytes. Furthermore, edema was found in the dermis. To investigate the role of HMGB1 on edema, we initially quantified the vascular hyperpermeability in vivo administering fluorescence-labeled nanoparticles. Next, anti-HMGB1 neutralizing antibody was administered in mice 12 hours before IR. We found that blockade of HMGB1 suppressed vascular leakage after IR and accelerated mouse wound healing in the present model. These results indicate that HMGB1 plays a crucial role in the development of cutaneous IR injury, and may be a therapeutic target for pressure ulcer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：褥瘡 虚血再灌流 マウスモデル HMGB1

## 1. 研究開始当初の背景

High mobility group box-1 (HMGB1) は、非ヒストン性の核の骨格の維持に関わるタンパク質である。その働きは、炎症や創傷治癒、糖代謝など多岐にわたる。

HMGB1 は炎症を惹起する作用があり、Tolllike receptor (TLR)2 や TLR 4 へ結合する。また、HMGB1 は単球サイトカイン合成酵素を強力に活性化することにより、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- や interleukin-1 の産生を誘導する。

虚血再灌流障害は、虚血に陥った組織に血流が再開することにより、過剰な炎症が引き起こされ、虚血部位のみならず、虚血の周辺組織へも組織障害が拡大する現象である。障害部では、マクロファージや Natural killer 細胞から、TNF- を始めとする炎症性サイトカインが産生される。さらに、虚血及びその周辺部位では、inducible nitric oxide synthase (iNOS)が産生され、一酸化窒素の発現が亢進し、血管拡張と共に著しい血管透過性亢進が起きる。虚血再灌流障害は、脳梗塞や心筋梗塞における代表的な増悪因子であり、皮膚では褥瘡の増悪因子として近年着目されている (Saito Y et al. J Invest Dermatol 2008)。

虚血再灌流障害モデルでは、壊死した細胞の核より HMGB1 が早期から放出され、過剰な炎症が引き起こされ、組織障害が助長されることが推察されている。実際、ラットを用いた脳虚血再灌流障害モデルでは、抗 HMGB1 抗体を用いて HMGB1 を不活化することにより、虚血部位及びその周辺では組織障害を軽減し得ることが明らかとなった (Liu K et al. FASEB J 2007)。

しかし、この研究グループがラット心臓を用いた虚血再灌流障害モデルを作成し、抗 HMGB1 抗体を用いて HMGB1 の不活性を試みたところ、心臓は脳と異なり、虚血再灌流部位では創傷治癒が遷延した (Oozawa S et al. Circ J 2008)。即ち、心虚血再灌流障害において、HMGB1 は組織障害を軽減し、創傷治癒を促進する因子であることが示唆された。二つの知見をまとめると、虚血再灌流部位における HMGB1 の作用は臓器によって異なり、HMGB1 が組織修復の促進因子なのか、あるいは増悪因子なのか依然不明である。従って、HMGB1 の生物活性を見極めるためには、今後さらに皮膚を始めとする臓器で虚血再灌流障害モデルを作成し、HMGB1 の作用を明らかにしなければならない。ごく最近、マウス皮膚移植を用いた実験から、HMGB1 には創傷治癒を促進する作用があることが明らかにされた (Tamai K et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011)。このモデルでは、移植された皮膚から HMGB1 が細胞外に放出され、HMGB1 が、組織再生に関わる

重要な生理活性があることが見出された。すなわち、細胞外に分泌された HMGB1 は、マウス骨髄に由来する表皮前駆細胞 (Platelet-derived growth factor 陽性細胞) を局所へ動員することを促し、表皮内への遊走を促進する。この結果、マウス創傷治癒過程では、表皮再生が促進することが明らかとなった。

この背景のもと、皮膚の虚血再灌流障害における HMGB1 の作用を検討すべく、申請者は準備実験を開始した。研究計画に詳述するように、マウス皮膚虚血再灌流障害モデルとして背部に褥瘡を作成し、HMGB1 の発現を病理組織学的に検討した。この結果、皮膚の虚血再灌流障害部位には炎症細胞が浸潤し、表皮角化細胞、炎症細胞及び血管内皮細胞において、HMGB1 が豊富に発現していることを見出した。

## 2. 研究の目的

本申請課題の目的は、マウス皮膚の虚血再灌流障害において、HMGB1 の生物活性を明らかにすることである。特に、諸臓器における虚血再灌流障害モデルでは、HMGB1 が創傷治癒促進因子であるのか、あるいは増悪因子であるのか、いまだ結論が出ていない。そこで、本申請課題では、皮膚虚血再灌流障害をマウスに作成し、経時的に評価することにより、HMGB1 の作用機序を解明することを目標に掲げる。また、本申請では HMGB1 に対する中和抗体 #10-22 (本抗体は、西堀正洋博士から供与された) を研究基盤に据え、抗 HMGB1 活性に基づく loss of function study から、マウス生体における HMGB1 の生理機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本申請は、マウス皮膚に虚血再灌流障害モデルを作成し、創傷治癒過程における HMGB1 の作用を検討した。皮膚虚血再灌流モデルは、磁石を用いて皮膚に虚血を誘導した。HMGB1 は、免疫組織化学的手法及び ELISA を用いた定量的手法により、経時的に検出・測定した。血管透過性亢進に関する定量的評価は、Cy5 標識したナノ粒子を用いた。血管外に漏出したナノ粒子の検出は、生体イメージング機器を用いて定量的に行った。HMGB1 に対する中和抗体をマウスに投与し、虚血再灌流障害における HMGB1 の作用を組織修復、炎症助長の両面から評価し、作用を検討した。評価に際しては、～ で構築した研究モデルに基づき、抗 HMGB1 抗体投与群と非投与群の測定値を比較検討した。

抗 HMGB1 抗体は、西堀正洋博士 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学)、劉克約博士 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学)、森秀治博士 (就実大学薬学部薬物情報学)、高橋英夫博士 (近畿大学医学部薬理学)、

友野靖子博士(重井医学研究所)から供与された。

Cy5 標識ポリマーナノ粒子(PICsome)は岸村 顕広博士(九州大学工学研究院)、片岡一則博士(東京大学大学院工学系研究科/医学系研究科)、安楽泰孝博士(東京大学大学院工学系研究科)から供与された。

イメージング機器は小川美香子博士(浜松医科大学メディカルフォトニクス研究センター)、間賀田泰寛(浜松医科大学メディカルフォトニクス研究センター)より貸与された。

#### 4. 研究成果

褥瘡を始めとする皮膚虚血再灌流障害において、HMGB1 が創傷治癒に及ぼす効果を検討した。そこで本課題では、実験的にマウスに褥瘡を作成し、HMGB1 の作用を検討した。我々は、2 つの円筒形マグネットによりマウスの背部を挟むことにより、褥瘡モデルを安定して作成することに成功した。HMGB1 は虚血再灌流後の過剰な炎症に関わっていることが報告されている。

我々は、抗 HMGB1 抗体 100  $\mu\text{g}$  を 1 日おきに合計 5 回、マウスの褥瘡モデルに静注した。抗 HMGB1 抗体は虚血再灌流後の第 9 日目および第 10 日目において、有意に潰瘍の大きさを縮小させた(図 1)。

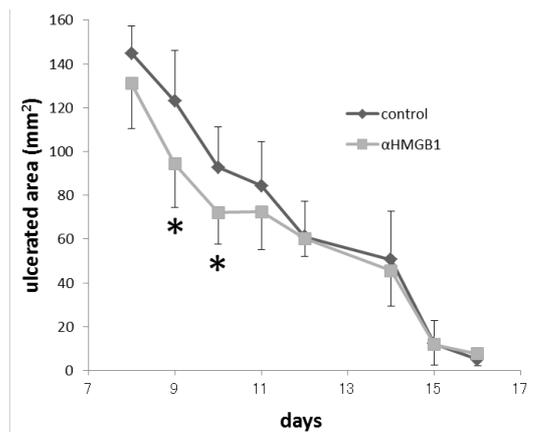


図 1) 抗 HMGB1 抗体による潰瘍面積の縮小の促進

我々は肉眼的におよび組織学的にこのことを確認した。また、抗 HMGB1 抗体は組織での iNOS や TNF の発現を抑制したことから、再灌流後の過剰な炎症を抑えていることが推察された(図 2)。

虚血再灌流後には、障害部位では血管透過性が亢進し、皮膚の著明な浮腫が起こることが報告されていた。我々は蛍光色素である Cy5 で標識した直径 100nm のポリマーナノ粒子を

作成し、これを再灌流直後のマウスに静注した。Cy5 標識ナノ粒子は、障害部位の透過性が亢進した血管より漏出する。我々は、In Vivo で測定可能な蛍光検出器により、漏出した Cy5 標識ナノ粒子の発する蛍光を測定し、再灌流後の浮腫を生体イメージングすることに成功した。我々は、この生体イメージング技術を使用し、虚血再灌流後の浮腫が抗 HMGB1 抗体の静注により減弱することを発見した(図 3)。

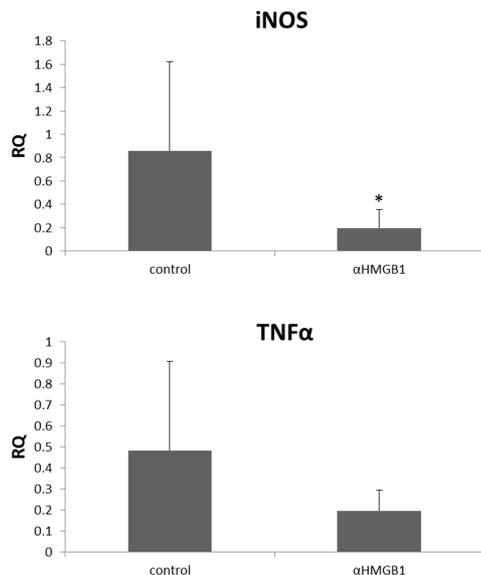


図 2) 抗 HMGB1 抗体を投与した群では褥瘡部での iNOS と TNF の発現が低下していた。

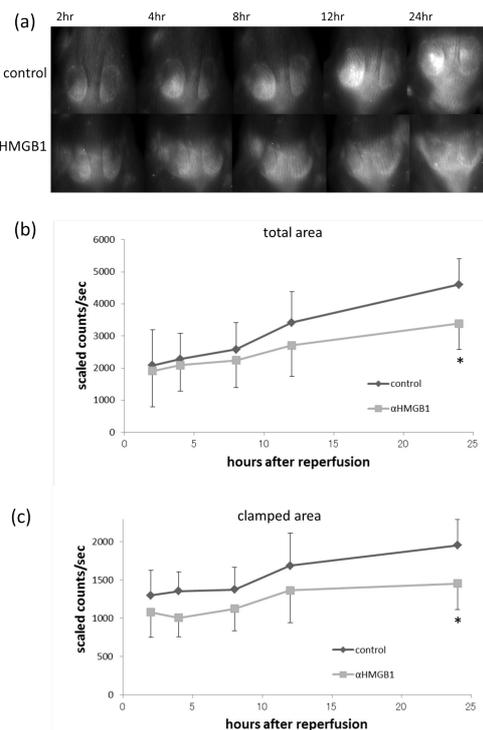


図 3) 抗 HMGB1 抗体を投与した群では褥瘡部の浮腫が改善していた。

これらの結果は抗 HMGB1 抗体が虚血再灌流障害において、過剰な炎症を抑えることで、潰瘍の治癒を促進していることを示唆している。

今後、HMGB1 をターゲットとした薬剤の開発のための基礎的なデータとして有用であると考えられる。

この研究を進めるに当たり、ご助言を賜りました、平川聡史博士、戸倉新樹博士に深謝いたします。

#### 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 8 件)

1. Kasuya A, Hashizume H, Hirakawa S, Tokura Y: Haemodialysis-induced pseudoporphyria successfully treated with glutathione. *Eur J Dermatol* 22: 137-138, 2012.

2. Kasuya A, Fujiyama T, Shirahama S, Hashizume H, Tokura Y: Decreased expression of homeostatic chemokine receptors in intravascular large B-cell lymphoma. *Eur J Dermatol* 22: 272-273, 2012.

3. Kasuya A, Hirakawa S, Tokura Y: Primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8+ T-cell lymphoma: Transformation from indolent to aggressive phase in association with CCR7-positive conversion. *Dermatol Online J* 18: 5, 2012.

4. Kasuya A, Fujiyama T, Hashizume H, Inuzuka M, Tokura Y: Histiocytoid Sweet's syndrome associated with t(9;22)(q34;q11)-positive chronicmyelogenous leukemia: Immature granulocytic origin of histiocytic cells. *Int J Dermatol* 52: 1577-1579, 2013.

5. Kasuya A, Hirakawa S, Hashizume H, Tokura Y: Granulocyte-colony Stimulating Factor-producing Primary Cutaneous Anaplastic Large Cell Lymphoma with Cerebral Metastasis. *Acta Derm Venereol* 93: 87-88, 2013.

6. Kasuya A, Moriki M, Tatsuno K, Hirakawa S, Tokura Y: Clearance Efficacy of Autoantibodies in Double Filtration Plasmapheresis for Pemphigus Foliaceus. *Acta Derm Venereol* 93: 181-182, 2013.

7. Kasuya A, Hamaguchi Y, Fujimoto M,

Tokura Y: TIFly-overexpressing, Highly Progressive Endometrial Carcinoma in a Patient with Dermato-myositis Positive for Malignancy-associated Anti-p155/140 Autoantibody. *Acta Derm Venereol* 93: 715-716, 2013.

8. Sasada K, Sakabe J, Tamura A, Kasuya A, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: Photosensitive drug eruption induced by bicalutamide within the UVB action spectrum. *Eur J Dermatol* 22: 402-403, 2012.

[学会発表](計 3 件)

1. Akira Kasuya, Satoshi Hirakawa, Keyue Liu, Akihiro Kishimura, Yasutaka Anraku, Kazunori Kataoka, Mikako Ogawa, Shuji Mori, Hideo K. Takahashi, Jun-ichi Sakabe, Yasuko Tomono, Masahiro Nishibori, Yoshiki Tokura. Anti-HMGB1 antibody (αHMGB1) promotes wound healing by decreasing vascular hyperpermeability during ischemia-reperfusion (IR) injury  
日本研究皮膚科学会 第 37 回年次学術大会・総会。2012 年 12 月 7 日、那覇。

2. 糟谷 啓、戸倉新樹  
Intravascular large B-cell lymphoma ではケモカイン受容体の発現が低下している  
第 112 回日本皮膚科学会総会 2013 年 6 月 14 日、横浜。

3. 糟谷 啓、戸倉新樹  
Pseudoporphyria の 1 例  
第 34 回日本光医学・光生物学会  
2017 年 7 月 27 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

[その他]  
ホームページ等 なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
糟谷 啓(KASUYA, AKIRA)  
浜松医科大学・医学部付属病院・助教

研究者番号：60599421

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし