

HMGB1 を中心とした新たな炎症の展開とその制御

岩 坂 日出男*

はじめに

ショックのなかでも敗血症性ショックは分配性ショック(血管拡張性ショック)に含まれる重篤な循環抑制の一つであるが、その病態形成に心血管系、血管内皮細胞は重要な役割を果たしている。敗血症性ショックは発症後1ヶ月以内の死亡率が35~40%と高値であり、心血管反応の特徴としては心筋抑制、血管拡張、血流分配異常の3つが代表的である¹⁾。敗血症性ショック時の心筋抑制は心駆出率の低下、心室の拡張、Frank-Starling 曲線の平坦化に特徴づけられる。敗血症性ショックでは一般的には循環血液量は正常の事が多いが、血管拡張のために相対的な循環血液量減少が生じている。循環血液量減少性ショックや心原性ショックに比較して敗血症性ショックは末梢循環での血流の分配異常が生じていることも特徴である。これら心筋抑制、血管拡張による相対的循環血液量の減少、血流分配異常により酸素供給の低下が生じ細胞内低酸素に繋がる。特に全身性炎症の場としての血管内皮細胞の障害は微小血栓、血管透過性の亢進などを生じ、低血圧も重なり微小循環の破綻から臓器機能不全にまで陥ってしまう。したがってショック、特に敗血症性ショックの病態形成の標的として心血管系は重要な位置を占めている。近年、敗血症性ショック時晩期に出現してくる晩期・致死性メディエータとして High Mobility Group Box 1 (HMGB1) 蛋白とこれを指標とした治療法の開発が注目されている²⁾。HMGB1 は齧歯類からヒトまで 95%以上のアミノ酸配列の等しい蛋白質である。分子量約 30kD の核内蛋白質として 30 年程前より知られていた。

核内蛋白質である HMGB1 が核外へ遊離された場合は炎症性サイトカイン類似の作用を発揮し、細胞障害性も有することから敗血症性ショック時の病態形成で重要な位置を占めるメディエータと考えられている。当教室でも HMGB1 を分子標的とした新たな敗血症性ショックの治療法を研究中である。敗血症性ショックにおける HMGB1 の病態形成、心循環系への影響を理解し、これらを標的とした治療ストラテジーを組み立てさらに新たな治療法を開発することが重要であると考えられる。

HMGB1 とは

約 30 年前、核から抽出された非ヒストンヌクレオゾームで電気泳動上迅速に移動する蛋白質を HMGB1 (high mobility group box1) として命名された。HMGB1 は構成的にすべての細胞に発現し、その大部分は核内に存在している。進化的にも真核生物ではよく保存されマウスとラット間では 100%、齧歯類とヒトとの間でも 99%のアミノ酸が同一である。HMGB1 は構造上、陰性に荷電した C 末端と 80 アミノ酸で構成され、HMG box と呼ばれる二つの陽性荷電部分である A box, B box からなる N 末端で構成されている(図1)。このうち B box には後述する HMGB1 のサイトカイン様作用を示す、cytokine domain(アミノ酸 106-123)が含まれている。核内では多彩な作用を持ち、ヌクレオゾームの構造決定や安定性に関係し、転写因子の DNA との結合性にも寄与している。神経細胞においては核内だけでなく、細胞膜にも存在し、受容体としては RAGE (receptor for advanced glycation end products) が考えられている。Wang らは近年、敗血症において HMGB1 が晩期致死性メディエータと報告し、炎症時の生死に関与する key mediator として注目

*大分大学医学部脳・神経機能統御講座麻酔学

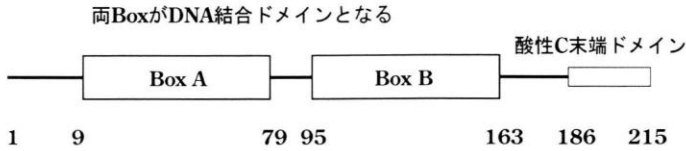


図1 HMGB1の構造

されている³⁾。HMGB1の細胞外への分泌に関しては自然免疫系のマクロファージや単球からの能動的分泌と壊死細胞や傷害細胞からの受動的分泌の二通りの分泌方法がある。エンドトキシンなどの外来細菌産物や炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、INF- γ などの刺激によりマクロファージ、単球、下垂体細胞からは濃度依存性、時間依存性に HMGB1 が分泌される。エンドトキシン刺激による HMGB1 分泌は炎症性サイトカインの分泌に比べ遅れて分泌される。その理由としては HMGB1 の分泌は N 末端での刺激受容ができないため古典的な Golgi 装置を介した分泌経路ではなく、HMGB1 がアセチル化されるため核内から細胞質へ転移し、細胞外へ分泌されるためと考えられている。壊死細胞や傷害細胞から HMGB1 は受動的にも分泌されるがアポトーシス細胞からは分泌されない。受動的分泌を受けた HMGB1 は炎症反応を誘導する能力があり、これにより近隣の細胞へ傷害シグナルを伝達すると考えられる。このため HMGB1 は感染や傷害が加えられた場合に自然免疫系に強固な炎症反応を誘導する重要な因子と考えられる。エンドトキシンや感染に対して晩期のメディエータの性質があるのに対して、虚血再灌流傷害に対しては迅速に遊離されるため早期の炎症メディエータとしても作用するのではないかと考えられている。われわれの脳虚血再灌流傷害モデルでも血中 HMGB1 濃度の上昇はあまり認めないが組織レベルでは虚血後に HMGB1 が過剰に発現した場合には脳障害が強くなることが確認されている。HMGB1 の血中動態はエンドトキシン投与や盲腸結紮穿孔マウスモデルでは 8 時間後より増加をはじめ、16 から 32 時間で最大値を示すようになる。従って TNF- α や IL-1 β などの早期から血中濃度の上昇低下を示す炎症性サイトカインと異なり、敗血症に伴う個体死が生じる頃に遅れて上昇してくることに HMGB1 の特徴があり、このことが疾患の重症度の指標として、あるいは個体死

の原因物質として注目されている所以である。実際、ヒトでも敗血症の重症度が増すにつれて HMGB1 濃度は増加し、非生存群では生存群に比べ有意な高値を示している³⁾。われわれの集中治療部の敗血症患者においても TNF- α や IL-6 が生存群と非生存群で有意差がないのに対して HMGB1 濃度は SOFA スコアと同様に非生存群で有意に高値を示していることが確認されている。出血性ショックモデルや出血性ショック患者でも血中 HMGB1 の上昇が指摘され、感染に伴わない刺激でも壊死細胞や傷害細胞から受動的分泌を受けることで病態形成に関係している可能性もある。

HMGB1 の傷害性

分泌された HMGB1 は単球、血管平滑筋細胞、神経細胞などの細胞表面にある免疫グロブリンスーパーファミリーの一つである RAGE に結合する。RAGE に結合すると MAP キナーゼが活性化され NF- κ B が核内へ移行し種々の炎症性サイトカインが産生される。RAGE 結合部位は HMGB1 の C 末端(アミノ酸 150-183)に存在し、cytokine domain とは一線を画している。その後さらに HMGB1 の結合受容体として Toll 様受容体 4 (TLR4) も関係していることが証明された。われわれも TLR4 中和抗体の使用により HMGB1 の活性が抑制されることを明らかにしている。HMGB1 は p38 や JNK の MAP キナーゼを介してマクロファージや単球、好中球から TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインを遊離するサイトカイン活性を示す。さらに血管内皮細胞では HMGB1 は接着因子である ICAM-1、VCAM-1 などの発現も炎症性サイトカイン同様に亢進させる。これにより感染や傷害中の血管内皮細胞での炎症反応の増幅が HMGB1 によってもたらされる。気管内への HMGB1 投与は局所でのサイトカイン産生をもたらす。脳室内への投与はサイトカイン産生と行動異常をもたらす。さらに坐骨神経への投与は疼痛過敏状態とな



図2 ラット脳虚血再灌流傷害モデル脳組織での HMGB1 の発現 (Western blotting)

り、腹腔内投与は腸管の透過性を亢進させる。このように HMGB1 は局所においてもサイトカイン反応を増幅させ、炎症反応を致死性に関与する程度まで増幅してしまう。

HMGB1 を分子標的とした治療法

HMGB1 はここまで述べてきたように感染症、敗血症時の臓器障害の晩期・致死性メディーエータであることから、臨床的にも疾患の重症度の指標として、また新たな治療目標としての可能性がある。われわれは HMGB1 を制御することによる新たな敗血症の治療法の可能性について検討した^{4)~6)}。HMGB1 を制御するためには HMGB1 の分泌抑制、分泌された HMGB1 の中和、除去、分解の各ステップでのアプローチ法が考えられる。

マクロファージからの HMGB1 の分泌抑制に関してはピルビン酸エチル、ライソフォスファチジルコリン (LPC)、ニコチン受容体刺激薬による効果が報告されている。ピルビン酸エチルは新たな輸液剤としての開発の可能性があり、われわれもラット脳虚血再灌流傷害モデルを使用しピルビン酸エチル輸液剤の脳保護効果について検討した。傷害脳では組織中への HMGB1 の発現が認められるがピルビン酸エチル輸液により脳障害は改善され HMGB1 の発現も抑制されていた。このことは虚血再灌流傷害でも HMGB1 が傷害機構に関係し、ピルビン酸エチル輸液の脳保護効果の一つに HMGB1 の遊離の抑制機構が関係していることを示唆していると考えている (図2)。またわれわれはメシル酸ナファモスタットやアンチトロンビン III がエンドトキシン刺激した培養マクロファージ上清中への HMGB1 分泌抑制効果を示すことを確認している⁷⁾。この機序としてはマクロファージからの HMGB1 の能動分泌の抑制と炎症時の IKK の活性化や MAP キナーゼ系の活性化の抑制による NF- κ B の核内移行の抑制による炎症反応の増幅抑

制効果の2つの側面が関与していることを確認している。いずれの方法も NF- κ B の活性化を抑制することで分泌が抑制されると考えられているが、今後さらなる分泌様式に与える効果の検討や細胞内シグナル伝達系への影響、他の抗炎症作用と結びつく抗凝固薬の効果の検討が必要である。

HMGB1 の中和に関しては中和抗体を用いた結果が報告されている⁸⁾。われわれも HMGB1 に対する抗体投与と受容体である RAGE に対する抗体投与での検討を行った。特に抗体投与時期は HMGB1 が後期メディーエータであることを考え、後投与での実験としたが両抗体投与とも生存率を有意に改善することができた。臨床状況では抗体の前投与は不可能であり、感染成立後も抗体投与の効果が認められることは、より臨床応用が可能であると思われる。つまり敗血症患者さんの治療開始時期には既に多くの炎症性サイトカインストームのみでなく抗炎症性サイトカインの分泌も生じ、炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカインが混在した状態であり、情報伝達物質である個々のサイトカインの作用を追って理解が混沌としてくる。ストレスパラドックスと呼んでも良い状態が生じている。したがって益々、細胞傷害性を持つ HMGB1 を分子標的とすることが重要であると考えられる。

血中 HMGB1 の除去に関しては吸着カラムによる血液浄化療法がふさわしいと考えられる。血液浄化療法は救急・集中治療領域で重要な役割を果たす治療方法である。われわれは HMGB1 を特異的に吸着できるカラムを作成して、その効果の検討を行った。このカラム自体はサイトカインの吸着効果は有さないが1パスで HMGB1 をほぼ 100% 吸着できる性能を持つカラムである。ラットエンドトキシンショックモデルにこの HMGB1 吸着カラムを用い、吸着剤の入っていないベースカラム、体外循環の影響を見るための空カラムと比較検討

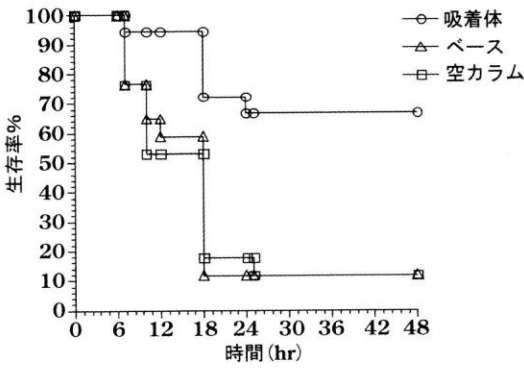


図3 カラム使用時の生存率への影響

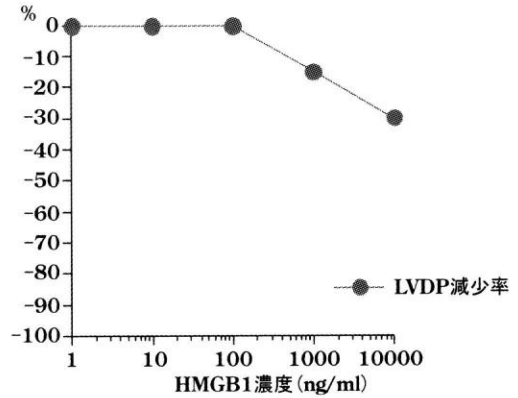


図5 ランゲンドルフ灌流心のLVDP変化

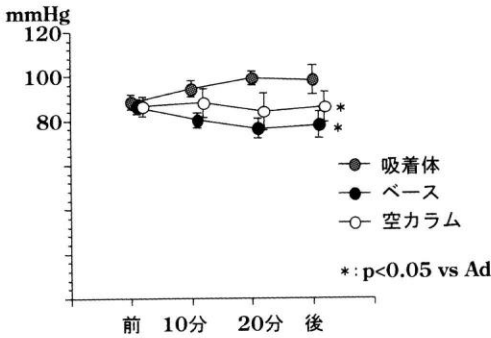


図4 体外循環中の収縮期血圧変動

して見た。この実験設定も抗体投与と同じくエンドトキシンを投与し6時間経過後に吸着療法を実施したので臨床状況に合わせた設定となっている。この吸着カラムを使用することでHMGB1の血中濃度の上昇を抑制でき、その結果生存率を著明に改善することができた(図3)。吸着療法による収縮期血圧の変動をしらべてみると吸着カラムを使用することで収縮期血圧は有意に上昇していた(図4)。敗血症時の心筋抑制の可能性としてはTNF- α の心抑制効果も知られているが既に述べたように初期の炎症性サイトカインストームは鎮静化されているが病状は悪化し続け心機能の抑制も進行していく。この原因の一つにHMGB1の上昇が関係している可能性があると考えられる。そこでわれわれはラットエンドトキシンショックモデルの心筋を摘出しランゲンドルフ摘出灌流を実施しながらHMGB1を灌流液に添加して心機能への直接的影響について検討した。その結果(図5)に示すようにLVDP(Left ventricular developed pressure)がHMGB1の濃度増加により減少し、心機能が抑制されてきて

いることが判明した。HMGB1の受容体について述べたようにTLR4にも結合が可能であり、また敗血症の様な全身の炎症では種々の臓器でTLR4の発現が亢進してくる。同様のラットモデル心の心内膜には正常時に比してTLR4の発現が亢進していることも確認している。したがって敗血症の様な全身炎症では心内膜にTLR4が発現し、これに晚期・致死性メディエータであるHMGB1が結合することで心機能の抑制が生じているのではないかと考えられた。過度なHMGB1の血中濃度の上昇が生体にとって有害であることは明らかであり、HMGB1を血液吸着療法で除去することは技術的にも容易であり、早期の臨床応用が期待される治療法である。

HMGB1の分解に関してはAbeyamaらがトロンボモジュリンのN末のレクチン様ドメインがHMGB1と結合することで中和、分解に関与していることを示し、トロンボモジュリン投与でエンドトキシンショックマウスの生存率の改善効果が得られたことを報告している⁹⁾。前述したようにメシル酸ナファモスタットやアンチトロンビンIIIなどの抗凝固薬もHMGB1の制御に関係することが明らかである。これまで凝固線溶系は組織損傷や出血に対する特異的反応と考えられていた。しかし炎症性サイトカインは血管内皮細胞の抗血栓蛋白であるトロンボモジュリンの発現低下、線溶阻害蛋白PAI-1(plasminogen activator inhibitor-1)の誘導などを通じて抗血栓性状態を凝固促進状態に変化させる。凝固促進により生じたトロンビンなどは種々の細胞でのNF- κ Bの活性化を通じてさらに

炎症系を活性化させる。重症敗血症に対して活性化プロテインCの投与が有意に予後を改善できた臨床治験の成績からも免疫炎症系と凝固線溶系が密接なクロストークを形成していることが伺える¹⁰⁾。HMGB1には凝固能を亢進させる作用のあることが証明されつつあり、炎症、免疫、凝固系のクロストークの中心にはHMGB1が関係しているのではないかと考えられる。今後さらなる研究の進展が期待される。

心血管疾患と HMGB1

動脈硬化症は動脈壁への脂質の緩徐な進行性の蓄積であるが、現代では動脈系の慢性炎症と考えられている。血管内皮の損傷と機能障害は動脈硬化症の起点から病因まで中心的な役割を果たしているが、内皮損傷によって生じる炎症反応は動脈硬化症の起点からプラーク破綻さらには血栓性合併症にいたるまでの病因と考えられるようになってきた。内皮細胞障害によりマクロファージが動脈壁に浸潤してくることが動脈硬化症のもっとも初期に生じてくる。内皮傷害により内皮由来接着因子であるICAM-1やVCAM-1の発現が亢進してくる。これら接着因子は血管壁にマクロファージ、単球や血小板を接着させる。これらの免疫細胞は活性化され炎症性サイトカインやケモカインを遊離することになる。炎症性サイトカインはオートクラインやパラクラインとしてさらに単球を誘導する原因となる。結果的に脂肪を蓄えたマクロファージが蓄積してくることになる。豊富な血管内皮細胞においても損傷が加わった場合にはHMGB1が受動的に分泌される。一旦、細胞外へ出たHMGB1は近傍の血管内皮細胞に炎症性サイトカインであるTNF- α やケモカインであるIL-8、MCP-1さらには接着因子であるICAM-1やVCAM-1、受容体であるRAGEの発現を促すことになる。その結果さらにマクロファージが動員され、さらにHMGB1が増加していくことになる。また内皮の障害はHMGB1の活性調節を内皮上で行っているトロンボモジュリンの発現低下をもたらす。結果的に初期からの内皮傷害に伴う自然免疫系の活性化にHMGB1が関係していると考えられる。血管壁への脂質の蓄積から内膜の局所的肥厚への進展には血管平滑筋細胞の動員が必要であ

るが、HMGB1もその役割を果たしている¹¹⁾。動脈硬化化にはHMGB1、RAGEの発現が亢進しており、可溶性RAGEの投与により動脈硬化の進展が制御されることから、HMGB1は動脈硬化でも中心的役割を担っている可能性がある¹²⁾。

Inflammatory auto injury

HMGB1はもともと核内にあり通常は炎症の進展には関与していない。しかし細胞外へ分泌された場合にはRAGEに結合することで炎症反応を進展させる。近年、HMGB1はRAGEだけでなく、炎症反応の受容体であるTLR2やTLR4に対してもリガンドとして働くことが証明された¹³⁾。HMGB1以外にももともとは細胞内にのみ存在する蛋白質で、分子シャペロンとして働く熱ショック蛋白質(HSP)も細胞外へ遊離された場合はTLRへの結合能のあることも証明されている。HMGB1やHSPのように障害時に細胞外へ遊離した蛋白質がTLRに結合することで感染自体が存在しなくても炎症性サイトカイン遊離による炎症の増幅が進行していくと考えられる。これら内因性のTLRに結合する物質をわれわれは免疫攪乱物質と考えている。図6に示すように外傷、感染、ショックなどを契機として細胞障害が生じるともともと正常細胞内にあるHMGB1やHSPが壊死細胞から細胞外へ受動的に分泌され、TLRの内因性リガンドとして働きTLRに結合することになり、これによりさらなる炎症反応の増幅サイクルが悪性サイクルとして回転してくると考えられる。このように原因感染が消失した後も炎症反応が生じている状態をわれわれはInflammatory auto injuryとして考えている。そしてこのサイクルは急性炎症だけでなく、近年問題となっているメタボリックシンドロームと呼ばれる糖尿病や動脈硬化といった慢性炎症が関係していると思われる病態でも生じているのではないかと考えられる。前項で示したようにHMGB1は動脈硬化症の病因の中心的役割を果たしている可能性があり、高感度CRPの測定では動脈硬化症患者で健常人よりも高値を示すことも事実である。またシシリー島の長寿者とTLR4の突然変異の関係を調べた研究では長寿者であるほどTLR4の変異が多いことが示され、心筋梗塞も生じにくいことが示されている¹⁴⁾。さらに炎症が動

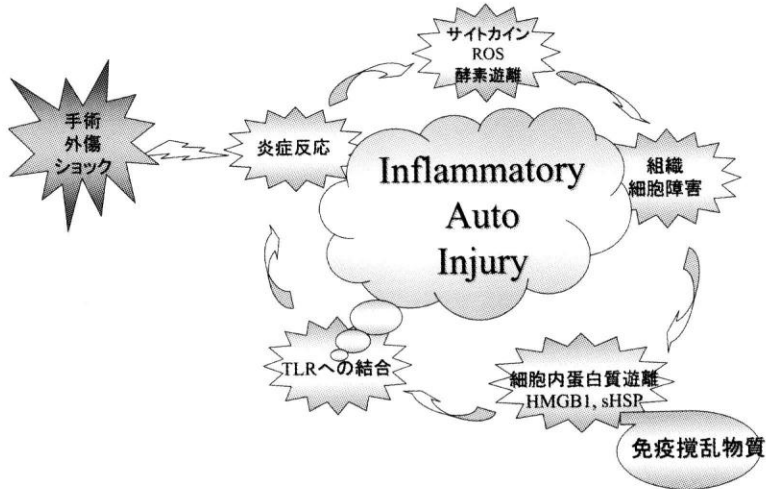


図6 Inflammatory auto injuryの説明

脈硬化症に関係することは事実であるが感染と関係するか否かが重要な問題であるが抗生物質による動脈硬化症の抑制はほぼ不可能であると判定して良いと思われる¹⁵⁾。つまり現代のように衛生環境のととのった環境では感染に対処するに完全な炎症反応を誘導するTLR4は必要でないことと動脈硬化には炎症は関係しているが微生物による感染ではないということが言える。すなわちもともと生体内にTLR4に結合するリガンドが存在することになる。それはここで述べたHMGB1をはじめとする内因性免疫攪乱物質でないかと考えられる。つまりInflammatory auto injuryが緩徐に進行するものがメタボリックシンドロームでないかと考えられる。

結 語

1999年にWangらがHMGB1を敗血症の晩期致死性メディエータとして報告して以来、われわれもHMGB1と敗血症の関係に注目し研究を行ってきた。HMGB1は生体にとって有利な作用も併せ持つが過剰に分泌された場合には炎症反応の増幅、細胞障害と有害な作用がある。HMGB1は多くの臓器に対して障害作用があり、感染症をはじめとする種々の病態への関与も徐々に明らかになってきた。また敗血症から動脈硬化症まで急激な循環障害から慢性の循環障害にまで、その病因の中心的役割をHMGB1が担っているものと考えられる。急性炎症だけでなく慢性炎症、さらにはメタボリ

ックシンドロームにも炎症反応の関与が指摘されている。これら多くの病態に内因性炎症反応の起因为物質としてHMGB1が関与している可能性がある。HMGB1に関する治療戦略も遠からず臨床応用されるのではないかと期待される。

文 献

- 1) Bone RC: Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). JAMA 1992; 268: 3452-5.
- 2) 岩坂日出男, 野口隆之: 侵襲に対する生体防御法の開発. 侵襲と免疫 2006; 15: 41-5.
- 3) Wang H, Bloom O, Zhang M, et al: HMGB-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science 1999; 285: 248-51.
- 4) 岩坂日出男: 敗血症の新規メディエータ: HMGB1とその制御. Surgery Frontier 2004; 11: 119-24.
- 5) 鶴島雅子, 岩坂日出男, 萩原 聡, 他: エンドトキシン血症マウスに対するRAGE抗体投与. 日本ショック学会誌2002; 17: 43-8.
- 6) 萩原 聡, 岩坂日出男, 鶴島雅子, 他: HMGB1その役割と新たな治療法の可能性について. 日本ショック学会誌 2004; 19: 51-6.
- 7) Hagiwara H, Iwasaka H, Matumoto S, et al: Nafamostat mesilate inhibits high-mobility group box 1 by lipopolysaccharide stimulation in murine macrophage RAW 264.6. Shcok (in press)
- 8) Yang H, Ochani M, Li J, et al: Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box1. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 296-301.
- 9) Abeyama K, Stern DM, Ito Y, et al: The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility

- group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest* 2005; 115: 1267-74.
- 10) Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al.: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699-709.
 - 11) Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, et al: The high mobility group (HMG) boxes of cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 2001; 152: 1197-206.
 - 12) Park L, Raman KG, Lee KJ, et al: Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 1998; 4: 1025-31.
 - 13) Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al: Involvement of TLR2 and TLR4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein (HMGB1). *J Biol Chem* 2004; 279: 7370-7.
 - 14) Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, et al: Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA* 2004; 292: 2339-40.
 - 15) Anderson JL: Infection, antibiotics, and atherothrombosis-end of the road or new beginnings? *New Engl J Med* 2005; 352: 1706-1709.