

炎症性腸疾患におけるリコンビナント・ トロンボモジュリンの効果に関する検討

うえ だ とし ひで
上 田 俊 秀
(消 化 器 病 学 専 攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平 成 2 4 年 度

目 次

第1章 緒言	1
第2章 マウス実験腸炎モデルにおける rTM の効果	
第1節 目的	6
第2節 方法	7
第3節 結果	1 1
第4節 考察	1 3
第5節 小括	1 4
第3章 培養細胞における検討	
第1節 目的	1 5
第2節 方法	1 6
第3節 結果	1 9
第4節 考察	2 1
第5節 小括	2 3
第4章 潰瘍性大腸炎患者の腸管粘膜における HMGB1 の免疫染色	
第1節 目的	2 4
第2節 方法	2 5
第3節 結果	2 6

第4節 考察	2 6
第5節 小括	2 7
第5章 統括的考察	2 8
第6章 結論	3 2
謝辭	3 4
引用文献	3 5
図表	4 5

第1章 緒言

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC)は我が国でその発症率や罹患人数が増加している難治性の炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD)である。20代を中心として若年者から高齢者まで発症する。本邦での有病率は欧米と比較して低率であるが、1970年代から年々増加しその患者数は平成22年度で11万人を超えている¹⁾。UCは主に大腸粘膜が侵される疾患で血性下痢を主症状とし、直腸からの連続性、びまん性のびらん・潰瘍形成が特徴である。その発症原因はいまだ不明であるが、腸管粘膜における防御機構の破綻と免疫異常が病態の中心的な役割をはたすと考えられており、その背景として遺伝的素因、腸内細菌や食事成分などの管腔内因子の変化、サイトカインバランスの異常などが複雑に絡み合うと考えられている²⁾。一方、UCの発症は急激に生じるが、その際には、腸管の微小循環障害や虚血が重要な役割をはたしていると考えられる。すなわち、微小循環障害において、1)接着分子の亢進と白血球の浸潤、2)微小血管内皮傷害(血小板機能亢進、凝固能亢進)が生じ、それが炎症の進展と局所の組織傷害の増悪をもたらす大きな原因となっているのではないかと想定されている³⁾。

トロンボモジュリン (thrombomodulin: TM)は、主に血管内皮細胞上に発現し、内皮細胞上でトロンビン(凝固酵素)から抗凝固酵素へと変換する膜蛋白質である。硫酸化グリコサミノグリカン(硫酸化糖タンパク質)を共有結合する蛋白質をプロテオグリカンと呼ぶ。いくつかの蛋白質においては、硫酸化グリコサミノグリカンが結合したプロテオグリカン型と結合していない非プロテオグリカン型の2つの分子型で

存在し、このような蛋白質をパートタイムプロテオグリカンと呼ぶ。TM は代表的なパートタイムプロテオグリカンのひとつである。TM の生理機能として、血管内皮における抗凝固作用がある。コンドロイチン硫酸側鎖が、その抗凝固活性の制御に関わると考えられている。

TM の構造は、レクチン様ドメイン (D1)、6 個の epidermal growth factor (EGF) 様ドメイン (D2)、O 型糖鎖結合ドメイン (D3)、細胞膜貫通ドメイン (D4)、細胞質内ドメイン (D5)よりなる (図 1)。TM 分子の 4、5、6 番目の EGF 様ドメインにトロンビンが結合するとトロンビンの血小板活性化能や凝固活性が抑制され、抗凝固作用が生じる。さらに、同部へのトロンビンの結合によりプロテイン C 活性化能が著しく増強される。活性化プロテイン C (activated protein C: aPC) は血液凝固第 Va 因子、第 VIIIa 因子を不活化することにより抗凝固作用を発揮する。

近年、リコンビナント・トロンボモジュリン (recombinant TM: rTM)は播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation: DIC)の治療に広く臨床応用されるようになった⁴⁾。DICは感染症、悪性腫瘍、外傷、婦人科疾患などで高頻度に発症する病態で、播種性に全身の微小血管内に血栓が形成され、その結果、虚血などにより臓器障害をきたすとともに、凝固因子の消費性低下と二次線溶亢進により著明な出血傾向を示す症候群である。感染症では、細菌内毒素 (エンドトキシン: lipopolysaccharide: LPS) の生体内侵入により活性化された白血球や血管内皮細胞などに凝固惹起因子の組織因子が発現して発症する。また悪性腫瘍では化学療法などによって腫瘍細胞が崩壊して組織因子が放出され、DICの引き金となると考えられている。

この際に注目すべきことは、TMが抗凝固作用のみならず、抗炎症作用を持つことでも知られてきたことである。TMの抗炎症作用には幾つかの機序が提唱されている。すなわち、トロンビン・TM複合体はプロテインCを活性化するが、aPCには抗凝固作用のみならずその受容体であるendothelial protein C receptor (EPCR)やprotease activated receptor-1 (PAR1)を介した抗炎症作用があることも知られている^{5,6)}。このaPCを介する経路のほかに、直接の白血球の活性化血管内皮への接着の抑制⁷⁾、LPSの吸着などの機序が知られるが、最近特に注目されているのが、high mobility group box protein 1 (HMGB1)の抑制を介する経路である。すなわち、近年TMのNH₂末端のD1ドメインにHMGB1の吸着作用があることの報告があり^{8,9)}(図1)、TMに結合したHMGB1は更にトロンビンにより分解され、TMの抗炎症作用がもたらされる可能性がある。HMGB1は1973年に細胞核内に局在するクロマチン結合性の非ヒストン蛋白質として発見されて以来¹⁰⁾、DNAの立体構造の維持や転写因子の活性調節、DNAの修復に重要な働きをする分子と考えられてきた^{11,12)}。その後1999年にWangらは、エンドトキシンショックの晩期メディエーターの探索において、培養マクロファージやマウスにLPSを投与後8時間以降に放出される因子としてHMGB1を報告した¹³⁾。

HMGB1は核内に構成的に発現する約25 kDaのDNA結合蛋白質であり、3つのドメイン、すなわち、A box、B boxと呼ばれる2つのDNA結合ドメインと酸性カルボキシル末端からなる(図2)^{14,15)}。HMGB1は核内においてnuclear factor- κ B (NF- κ B)、ステロイドホルモン受容体など様々な転写因子の活性を調節するが¹⁶⁾、細胞が傷害を受けたり壊死に陥るとHMGB1は細胞外に放出される¹⁷⁾。また、単球・マクロファージや樹状細胞といった免疫担当細胞はLPSやtumor

necrosis factor- α (TNF- α)などの刺激により能動的に HMGB1 を分泌し炎症反応に寄与する。HMGB1 は receptor for advanced glycation end products (RAGE)や Toll-Like Receptor-2 (TLR-2)、TLR-4、TLR-9 といった受容体を介して免疫細胞に作用し^{18,19,20)}、侵襲局所では自然免疫の賦活や前駆細胞の遊走による損傷部位の修復、組織因子の誘導による止血などに働く。細胞外に放出された HMGB1 はサイトカインとして働き、単球・マクロファージからの TNF- α 、interleukin-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生を増幅する (図 2)²¹⁾。さらに、血管内皮細胞上の intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)や vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)といった接着分子の発現を亢進させるとともに²²⁾、炎症細胞の傷害局所への遊走を促進する。

外来微生物などの病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs)や HMGB1 など自己の損傷細胞由来の danger-associated molecular patterns (DAMPs)は TLR などのパターン認識受容体 (pattern recognition receptor: PRR)で異物として認識され、炎症反応を引き起こす。生体が侵襲にさらされた時に局所で生成され、炎症反応を惹起して周囲の細胞に警報として作用する分子をアラミンと呼ぶことが提唱されており、HMGB1 はその代表的な物質である²³⁾。HMGB1 は局所では自然免疫応答、組織修復に働くが、敗血症や DIC では血行性に全身を廻り致死的に作用する。HMGB1 は敗血症のみならず、急性肺損傷、虚血・再灌流障害、慢性関節リウマチなどの急性・慢性の炎症病態や悪性腫瘍の増殖・転移に関与することが報告されている^{24,25,26,27,28)}。

TM は主に血管内皮細胞に発現し、HMGB1 に結合することで HMGB1 の全身化を防いでいると考えられている。

以上のような背景から、TM がその抗凝固活性や抗炎症作用を発揮することで、白血球の浸潤や血管内皮障害にともなう腸管微小循環障害を生じている IBD の治療に有効性が期待できることが想定される。また実際に、IBD への実験的な治療応用として、aPC による効果がみられたとする報告や²⁹⁾、抗 HMGB1 抗体の投与や HMGB1 の阻害薬であるピルビン酸エチルの投与^{30,31)}により、実験大腸炎が軽減されたという報告がなされている。しかし現在まで、直接 rTM を用いて、その投与が IBD に対して有効であるかどうかを検討した報告はない。そこで今回、rTM がマウス実験腸炎モデルを改善するか、HMGB1 の抑制がその効果に関与している可能性があるかについて焦点をあて検討を行った。さらに、その機序を検討する目的で、マクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞と血管内皮細胞株である bEND.3 細胞を用いた *in vitro* の検討と、HMGB1 の動態に関しての UC 患者大腸粘膜における検討を行った。

第2章 マウス実験腸炎モデルにおける rTM の効果

第1節 目的

IBD の病因は不明であるが、その病態には免疫異常の関与があり、炎症性サイトカインの増加や免疫寛容の破綻が知られている。IBD では腸粘膜での TNF- α などの炎症性サイトカインや ICAM-1、VCAM-1 といった接着分子の発現が亢進しており、これらによる炎症細胞の活性化や浸潤が病態に重要な役割を果たしている^{32,33,34}。

IBD と HMGB1 の関連については、IBD 患者の血中・便中における HMGB1 の増加を認めたという報告がある^{35,36}。IBD では免疫担当細胞の異常に加え、潰瘍や陰窩膿瘍として観察される腸管の組織傷害があり、マクロファージ等の免疫系細胞や壊死細胞から HMGB1 が分泌され病態に関与する可能性がある。

rTM には HMGB1 抑制効果を含め様々な機序による抗炎症作用があるが、IBD での検討はなされていない。そこで本研究では、マウスの IBD モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium: DSS) 誘発大腸炎に対する rTM の治療効果について明らかにすることを目的として検討を行った。マウス DSS 腸炎はヒトの UC に組織像が類似しており、UC のモデル^{37,38})として用いた。その際に、炎症性サイトカインや細胞接着分子の発現に対する rTM の抑制効果についても検討した。また、DSS 腸炎の腸管局所における HMGB1 の発現を免疫染色により検討した。

第2節 方法

(1) 実験動物

20-25g の 6-7 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを日本チャールズ・リバー(株)より購入した。実験は防衛医科大学校の実験動物倫理委員会の承認を得て行った(承認番号 11076)。マウスの飼育は防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水にて行った。

(2) 腸炎の作成

マウスを control 群、rTM 単独群、DSS 群、DSS+rTM 群の 4 群に分けた(n=12、rTM 単独群のみ n=3)。DSS (分子量 36,000-50,000, MP Biomedicals, Solon, OH) は飲料水に 5% (w/v) で溶解し、5 日間自由飲水させ、急性大腸炎モデルを作成した^{37,38)}。DSS+rTM 群には DSS 投与期間中、phosphate buffered saline (PBS) で希釈したリコンビナントヒト TM (ART-123, 旭化成ファーマ, Tokyo, Japan からの提供, 以下 rTM と略す) を、1 日 2 回腹腔内投与した。rTM の投与量は既報に従い 1.8mg/kg とした^{9,39,40)}。rTM はマウスの実験系でも用いられており、有効であると考えた⁴⁰⁾。DSS 群には PBS を投与した。5 日目からは通常の飲料水を投与し、7 日目に検体を採取した。

(3) 体重・腸管長および組織学的評価

DSS 腸炎は体重の減少と腸管長の短縮が特徴であり、観察期間中、毎日同時に体重を記録した。DSS 投与開始後 7 日目にペントバルビタール麻酔下でマ

ウスを安楽死させ大腸を摘出した。腸管長は回盲弁～直腸の長さを測定した。

マウスから摘出した大腸の一部を 10%ホルマリンで固定した後パラフィンで包埋し、hematoxylin and eosin (HE) 染色を実施した。組織の評価はブラインドで実施した。Cooper³⁸⁾らの方法に従い、

grade 0: 陰窩が保たれている、

grade1: 陰窩の消失が粘膜の 1/3 までに留まる、

grade 2: 陰窩の消失が粘膜の 1/3 から 2/3 までに及ぶ、

grade 3: 陰窩の消失が全層に及ぶが、上皮は残存する、

grade 4: 陰窩が消失し、上皮も欠損する、

として組織学的スコアをつけた。

また粘膜筋板 1 mm あたりの炎症細胞浸潤数を評価し、

0: 正常 (浸潤細胞数 <30 /mm)、

1: 軽度 (30-60 /mm)、

2: 中等度 (60-90 /mm)、

3: 高度 (>90 /mm)とした。

(4) HMGB1 の免疫組織学的検討

マウス大腸における HMGB1 の発現と局在を確かめるため、マウス大腸を periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 溶液に 4℃で 12 時間保存した後、10%、20%スクロース含有 PBS で洗浄した。その後、Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek Inc., Tokyo, Japan)で包埋し、液体窒素で凍結した。凍結された組織を 7 μm 幅に薄切りし、非特異的抗体を牛血清アルブミンとヤギ血清でブロッキングし

た後、抗 HMGB1 ウサギモノクローナル抗体 (EPR3507, GeneTex, Irvine, CA)⁴¹⁾ と 4°C で一晩反応させた。2 次抗体としてビオチン化 IgG (550338, BD PharMingen, San Diego, CA) を 90 分間反応させ、その後 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated streptavidin (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) で標識した。ProLong Gold antifade reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて核染色を行った。観察は共焦点顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss, Thornwood, NY) を用いて 200 倍視野で実施した。

(5) RT-PCR 法による mRNA 定量

マウス遠位大腸の全層をただちに RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) に加え、4°C で保存した。保存した組織から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。RNA 濃度は吸光度計を用いて測定した。1.5 µg の RNA と 50 µM の Random primer (Takara, Shiga, Japan) を 1.25 µl 添加し、70°C で 10 分間反応させ、4°C で急冷させた後、5x first strand buffer (Invitrogen, Tokyo, Japan) を 5 µl、0.1 M の DTT (Invitrogen) を 2.5 µl、2.5 mM の dNTP (Takara) を 0.625 µl、40 U/µl の RNase inhibitor (RNasin®, Promega, Madison, WI) を 0.625 µl、Super Script II (Invitrogen) を 1 µl 混和した溶液を添加し、42°C で 15 分間、48°C で 30 分間、20°C で 15 分間逆転写反応させ cDNA を作成した。その cDNA をテンプレートとして、定量 reverse transcription (RT)-PCR 法を行った。炎症性サイトカインとして tumor necrosis factor- α (TNF- α ; Mm00443258, Applied Biosystems, Foster City, CA)、interleukin-1 β (IL-1 β ; Mm00801778, Applied Biosystems)、細胞接着分子として、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; Mm00516023, Applied Biosystems)、

vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; Mm00449197, Applied Biosystems)、内因性 control として GAPDH の Taqman プライマー・プローブセット (Applied Biosystems) を用いた。384 穴プレート上で 2x PCR Master Mix (Eurogentec, Seraing, Belgium) を 5 μ l、5 倍濃度の各種 Taqman プライマープローブを 2 μ l、及び 3 μ l (15 ng) の cDNA を混和して PCR 反応を行った。反応条件は 50°C で 2 分、95°C で 10 分の preincubation の後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分の増幅反応を 40 サイクル行った。結果は、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて ABI 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) で解析した。

(7) 統計処理

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。群間差に関する統計解析は一元配置分散分析法 one-way factorial ANOVA を行ったのち、Scheffe's F test で多重比較検定を行った。有意差検定には Statcel 2 (OMS publishing Inc., Tokyo, Japan)を用い、 $P < 0.05$ を有意と判断した。

第3節 結果

(1) マウスの体重変化

DSS 投与により下痢、血便を認め、4日目から有意な体重減少を認めた(図3)。rTM は DSS による体重減少を有意に抑制した。なお rTM 単独投与では control 群と比較し体重の変化を認めなかった。

(2) 腸管長の短縮

DSS 腸炎では炎症により大腸が萎縮し長さが短縮することを特徴とするが、本実験においても DSS 群では control 群と比較し有意な腸管長の短縮を認めた(図4)。rTM は DSS 群における腸管長の短縮を有意に抑制した。rTM 単独群では腸管長の短縮はみられなかった。

(3) 組織学的評価

マウス大腸粘膜の HE 染色では DSS 群で著明な陰窩の消失と炎症細胞浸潤を認めた(図5)。組織学的スコアは陰窩の消失を反映し DSS 群で増大したが、rTM 投与により有意に減少した(図6)。炎症細胞浸潤に関しても DSS 群で亢進し、rTM 投与により有意に抑制された(図7)。rTM 単独では control 群と比較し変化が認められなかった。

(4) HMGB1 の免疫染色

マウス大腸粘膜における HMGB1 の免疫染色では (図 8)、HMGB1 は血管内皮細胞と浸潤細胞に発現していた。control 群と比較し、DSS 群で多数の HMGB1 陽性の浸潤細胞を認めたが、DSS+rTM 群では DSS 群と比較し HMGB1 陽性の浸潤細胞数の増加は有意に抑制されていた。DAPI による核との二重染色において DSS 群では核のみならず細胞質における HMGB1 の発現が確認された (図 8E)。

(5) 炎症性サイトカインと接着分子の mRNA 発現

マウス大腸粘膜における炎症性サイトカインである TNF- α および IFN- γ の mRNA 発現を定量 RT-PCR 法で測定した。control 群と比較し DSS 群で TNF- α 、IFN- γ ともに発現が亢進し、rTM 投与により発現が抑制された (図 9)。

白血球は細胞表面の接着分子であるインテグリンと血管内皮細胞表面のインテグリンリガンドである ICAM-1 や VCAM-1 の結合を介して局所に接着するが、この接着分子の亢進が炎症細胞浸潤に関与していると想定し、ICAM-1、VCAM-1 の mRNA を測定した。DSS 群では control 群に比較して ICAM-1、VCAM-1 の mRNA 発現が亢進し、DSS+rTM 群では DSS 群に対し有意に抑制されていた (図 10)。

第4節 考察

マウス DSS 腸炎において rTM 投与は体重減少、腸管長の短縮、組織学的な陰窩の消失と炎症細胞浸潤を有意に改善した。免疫染色では HMGB1 は浸潤細胞と血管内皮細胞に強く発現していた。また、浸潤細胞の細胞質に HMGB1 の局在を認めた。HMGB1 は核内に構成的に発現している蛋白質であるが活性化されたマクロファージや好中球などの免疫細胞において細胞質や細胞外に移行することで炎症性サイトカインとして働く^{42,43)}。Bonaldi らによると LPS などの炎症シグナルは単球・マクロファージの核内における HMGB1 の過剰なアセチル化を惹起し、アセチル化された HMGB1 は細胞質に移行し、細胞外に放出されるとされる⁴⁴⁾。本実験でも活性化された炎症細胞において核内蛋白質である HMGB1 が細胞質に移行しているものと考えられた。定量 RT-PCR 法では DSS 群で炎症性サイトカインである TNF- α と、IFN- γ の mRNA 発現の亢進と、接着分子である ICAM-1、VCAM-1 の亢進が認められたが、いずれも rTM 投与で抑制された。これにより、rTM 投与は大腸粘膜の炎症にともなうサイトカイン産生や接着分子の発現亢進、炎症細胞浸潤を抑制することが考えられた。HMGB1 にはサイトカイン産生を亢進させ^{13,21)}、接着分子の発現を亢進させる作用があり²²⁾、rTM が HMGB1 抑制を介して DSS 腸炎の病態を修飾した可能性が考えられた。

第 5 節 小括

rTM はマウス DSS 腸炎を改善した。腸炎粘膜の免疫染色では浸潤細胞や血管内皮細胞での HMGB1 の強い発現を認め、rTM 投与により抑制されたことから、DSS 腸炎の病態に HMGB1 を介した機序が関与している可能性が考えられた。

第3章 培養細胞における検討

第1節 目的

第1章ではDSSによる実験大腸炎において、炎症性サイトカインと血管接着分子ICAM-1、VCAM-1のmRNA発現の亢進が認められたが、いずれもrTM投与で抑制された。炎症性腸疾患では腸内細菌への過剰な免疫応答が生じ、マクロファージなどの炎症細胞からTNF- α が産生される。それが微小血管内皮での接着分子の発現亢進をさらに増強し、炎症の増悪をもたらすと想定されている。実際、抗TNF- α 抗体の投与は炎症性腸疾患に臨床的に有用であることが広く示されている⁴⁵⁾。そこで本章では、マクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞と血管内皮細胞株のbEND.3細胞を用いて、活性化マクロファージからのTNF- α 産生および刺激された血管内皮での接着分子発現に対するrTMの*in vitro*における抑制効果について明らかにすることを目的とした。

また前章において、DSS腸炎の大腸粘膜浸潤細胞と血管内皮細胞にHMGB1の強い発現が認められた。HMGB1は活性化マクロファージから分泌されサイトカインとして働き、単球・マクロファージからのTNF- α などの炎症性サイトカインの産生を亢進させる^{13,21)}。血管内皮細胞においてもHMGB1はICAM-1、VCAM-1などの接着分子発現を亢進させる働きが知られ²²⁾これらの機序を介して炎症の増悪が起こっている可能性も考えられる。そこでrTMの炎症抑制効果へのHMGB1の関与につき、マクロファージと血管内皮のそれぞれのコンポーネントにおける検討を行った。また、DSS腸炎でHMGB1陽性細胞数が増加し

ていたことから、炎症刺激がマクロファージや血管内皮での HMGB1 の mRNA 発現にどのように影響を与えるのかについても検討を行った。

第2節 方法

(1) 細胞の培養について

マウス由来のマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞及び血管内皮細胞株である bEND.3 細胞をそれぞれ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, St Louis, MO)で培養した。培地には 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma)とペニシリン G 50 units/ml、ストレプトマイシン 50 µg/ml を加え 37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。

(2) RAW264.7 細胞での TNF- α の mRNA 発現に関する検討

腸内細菌からの刺激を受けた条件を想定して、マクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を heat killed feces (HKF)及び LPS で刺激した場合に TNF- α の mRNA 産生能が亢進するか、それを rTM や抗 HMGB1 抗体が抑制するかについて検討した。方法として RAW264.7 細胞を 12 ウェルプレート (Corning Inc, Corning, NY)に 2×10^5 /well 撒いて、2 日後に HKF 10 µg/ml もしくは LPS (serotype B55:O5; *E. coli*, Sigma) 5 ng/ml と rTM 200 ng/ml または抗 HMGB1 ニワトリポリクローナル抗体 2 µg/ml (326052233, SHINO-TEST Corporation, Kanagawa, Japan)⁴⁶⁾を加え、その 16 時間後に TNF- α の mRNA 発現を定量 RT-PCR 法で測定した。またその際にリコンビナントヒト HMGB1 500 ng/ml (ID Labs, London, ON,

Canada, 以下 rHMGB1 と略す)を加え rTM の効果が減弱するか検討した。HKF は既報に従い⁴⁷⁾、通常のマウス飼料で飼育した C57BL/6 マウスの便を 100°C で 10 分間煮沸して作成し、-20°C で凍結保存した。

(3) bEND.3 細胞での接着分子の mRNA 発現に関する検討

血管内皮において TNF- α などの炎症性サイトカインや細菌のエンドトキシンは炎症細胞浸潤のリクルートに関与する ICAM-1、VCAM-1 の発現を亢進させる。bEND.3 細胞を LPS や TNF- α で刺激して、接着分子 mRNA の発現を亢進させ、その際に rTM や抗 HMGB1 抗体が抑制的に働くかについて検討を行った。方法として bEND.3 細胞を 12 ウェルプレートに 2×10^5 /well 撒き、2 日後に LPS 5 ng/ml または TNF- α 5 ng/ml と rTM 200 ng/ml または抗 HMGB1 抗体 2 μ g/ml を加え 16 時間インキュベートし、ICAM-1、VCAM-1 の mRNA を定量 RT-PCR 法で測定した。またその際に rHMGB1 500 ng/ml を加え rTM の効果が減弱するか検討した。

(4) RAW264.7 細胞および bEND.3 細胞での HMGB1 の mRNA 発現の検討

TNF- α や LPS などの刺激によりマクロファージから HMGB1 が分泌され、RAGE や TLR-2、TLR-4 等の受容体を介して autocrine 的に炎症の増悪に寄与することが報告された^{18,19)}。また、血管内皮細胞において HMGB1 は ICAM-1、VCAM-1 の発現を亢進させることが報告された²²⁾。HMGB1 は核内から細胞質、細胞外へと切り出し型の分泌を受けていると考えられるが、炎症時の HMGB1 mRNA 発現の変化につき培養細胞を用いて検討した。

すなわち、RAW264.7 細胞に HKF 10 μ g/ml または LPS 5 ng/ml を加え 16 時間インキュベートし、HMGB1 mRNA の測定を定量 RT-PCR 法により実施した。bEND.3 細胞においては LPS 5ng/ml もしくは TNF- α 5 ng/ml を加え 16 時間インキュベートし、HMGB1 mRNA の発現を定量 RT-PCR 法により測定した。HMGB1 のプライマーは Mm00849805_gH (Applied Biosystems)を用いた。

(5) 統計処理

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。群間差に関する統計解析は一元配置分散分析法 one-way factorial ANOVA を行ったのち、Scheffe's F test で多重比較検定を行った。有意差検定には Statcel 2 (OMS publishing Inc.)を用い、 $P<0.05$ を有意と判断した。

第3節 結果

(1) RAW264.7 細胞での TNF- α mRNA の発現検討 (図 11)

RAW264.7 細胞に rTM を単独投与した場合には、無処置の control 群と比較して TNF- α mRNA 発現に有意な差を認めなかった。一方、HKF にて 16 時間処理した後は、RAW 細胞において著明な TNF- α mRNA 発現の亢進が観察され、HKF+rTM 群では、完全な抑制とはいえないが、HKF 群に比べて有意に TNF- α mRNA 発現亢進の減少がみられた。抗 HMGB1 抗体でも同様に TNF- α の抑制がみられた。また rHMGB1 を加えた群では rTM による TNF- α の抑制効果が消失した (図 11A)。

LPS 刺激でも同様の結果であった。rHMGB1 を加えた群では rTM による TNF- α の抑制が有意に阻害された (図 11B)。

(2) bEND.3 細胞における接着分子 mRNA 発現の検討 (図 12、13)

LPS 刺激により control 群に比較し著明な ICAM-1、VCAM-1 の mRNA 発現の亢進が認められた。rTM や抗 HMGB1 抗体の投与は、LPS による ICAM-1、VCAM-1 の mRNA 発現の亢進を抑制した。rHMGB1 を加えた群では LPS 刺激下の rTM による ICAM-1 発現抑制を有意に阻害した。TNF- α 刺激でも同様の結果であったが、rHMGB1 を加えた群では rTM による ICAM-1 および VCAM-1 の mRNA 発現抑制はともに減少傾向を示した。

(3) RAW264.7 細胞および bEND.3 細胞における HMGB1 mRNA の発現

図 14A に RAW 細胞を HKF あるいは LPS で刺激した際の、RAW 細胞における HMGB1 の mRNA 発現を示す。RAW 細胞では恒常的な HMGB1 mRNA の発現が見られた。HKF や LPS 刺激により RAW 細胞での HMGB1 mRNA 発現は著明に減少した。

図 14B に bEND.3 細胞を LPS あるいは TNF- α で刺激した際の、bEND.3 細胞における HMGB1 の mRNA 発現を示した。bEND.3 細胞においても恒常的な HMGB1 mRNA の発現が見られた。LPS あるいは TNF- α のいずれの刺激によっても内皮細胞での HMGB1 mRNA 発現は有意に減少した。

第4節 考察

マクロファージ細胞株の RAW264.7 細胞を HKF や LPS で刺激すると TNF- α の mRNA 発現の亢進が認められた。HKF の投与は腸内細菌による総合的な刺激を想定しており、TLR-2 や TLR-4 などの多種の認識シグナルを介すると思われる。一方 LPS は主に TLR-4 を介するエンドトキシン刺激を表すと考えられる。今回は両者で同様な TNF- α の mRNA 発現増加がみられ、共に rTM 投与により有意に抑制された。これらの成績から、rTM は直接 RAW264.7 細胞に働き、TLR-4 などを介する細胞内シグナル伝達を抑制することにより、TNF- α mRNA の増加を抑制することが考えられた。マクロファージが刺激を受けた状態下では活性化マクロファージから HMGB1 が産生され、TNF- α の発現を増強させることが報告されており¹³⁾、今回はそれに矛盾しない結果となった。すなわち、抗 HMGB1 抗体によって TNF- α mRNA 発現が抑制されることや、rHMGB1 を添加した実験において、rTM の TNF- α 発現抑制効果が減少することから、炎症時には活性化マクロファージから産生される HMGB1 の役割は大きいのではないかと想像できた。今回は実施しなかったが、rTM の効果を検討する上で HKF または LPS に rHMGB1 を加えた群も必要であったと考えられる。

このように活性化マクロファージから産生される HMGB1 の増加を介した TNF- α mRNA 発現増強などの催炎症効果が大きいと考えられたので、次に HKF や LPS 刺激の HMGB1 産生能自身に及ぼす影響について検討した。しかし、マクロファージが細菌抗原刺激を受けて活性化した際には、むしろ HMGB1 mRNA 発現は低下しており、rTM の作用も HMGB1 合成能への影響を介すものではな

いと考えられた。

血管内皮細胞株の bEND.3 細胞では TNF- α の刺激により接着分子である ICAM-1、VCAM-1 の発現の亢進がみられ、いずれも rTM で抑制された。このことから、rTM はマクロファージのみならず炎症局所において血管内皮細胞における接着分子の発現を抑制することによっても抗炎症作用を発揮する機序が考えられた。

同様に、炎症時の血管内皮での HMGB1 発現の亢進が腸炎モデルでみられるため、LPS や TNF- α 刺激下の血管内皮の HMGB1 産生能について検討した。しかし、血管内皮細胞がそれらの刺激を受けると、むしろ HMGB1 合成能力はマクロファージ同様落ちることが示唆された。

しかし、以上の HMGB1 mRNA の動態は、HMGB1 が炎症局所で病態に大きな関与をきたしている可能性や、rTM が HMGB1 の炎症の場における制御を通じて、抗炎症効果をきたしていることを否定するものではない。何故ならば、HMGB1 は核内において転写因子の活性を調節しているが¹⁶⁾、細胞が傷害を受けたり壊死に陥ると細胞質を経て細胞外に放出される性質を持つものだからである¹⁷⁾。単球・マクロファージなどは LPS や TNF- α などの刺激により能動的に HMGB1 を分泌することが知られており、従って mRNA 合成は低下するとしても、局所での分泌された濃度は高まると考えられる。さらに、炎症局所では ICAM-1 や VCAM-1 の接着分子の発現亢進が生じており、HMGB1 を分泌することができる新たな炎症性の単球・マクロファージが多数浸潤してくることが可能になるのではないかと考えられる。

第5節 小括

rTM 添加はマクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞において HKF や LPS 刺激による TNF- α の mRNA 発現の亢進を抑制した。また、血管内皮細胞株である bEND.3 細胞において接着分子である ICAM-1、VCAM-1 の mRNA 発現の亢進を抑制した。rTM はマクロファージに作用して炎症性サイトカインを抑制し、血管内皮細胞では接着分子の発現を抑制するという両方の機序を介して抗炎症効果を発揮しているものと考えられた。また、その抑制機序に HMGB1 のはたす役割が大きいのではないかと考えられた。

第4章 潰瘍性大腸炎患者の腸管粘膜における HMGB1 の免疫染色

第1節 目的

IBD と HMGB1 の関連については IBD 患者の血中・便中における HMGB1 の増加を認めた報告がある^{35,36)}。第1章の検討では、DSS 腸炎モデルにおいて、浸潤細胞や血管内皮細胞での HMGB1 の強い発現を認め、それが rTM 投与により抑制されたことより、腸炎の病態に HMGB1 を介した機序が働き、rTM の効果がその抑制と関係している可能性を示した。さらに第2章では、炎症によって局所の活性化マクロファージや血管内皮細胞では、HMGB1 の合成ではなく分泌の増加が生じ、更に HMGB1 を分泌する新たな炎症性の単球・マクロファージの浸潤を惹起しているのではないかと考えられた。

そこで、実際に UC 患者の人腸生検組織を用いて、炎症部位と非炎症部位における HMGB1 の発現について免疫染色を用いて検討し、とくに HMGB1 を発現する浸潤細胞数がヒトにおいても増加しているかどうか、さらにその浸潤細胞における HMGB1 の局在に相違がみられるかについて明らかにすることを目的とした。

第2節 方法

(1) 対象患者

対象は当院にて治療中の活動期 UC 患者である。内視鏡検査施行時に同一患者における炎症部位と非炎症部位を採取し蛍光免疫染色を実施した (n=5)。

この5例の臨床的背景は男性3例、女性2例、平均年齢は35.1歳(19-52歳)で、1例は直腸炎型、2例は左側大腸炎型、2例は全大腸炎型であった。内服中の薬剤は2名でプレドニゾロン(5-15 mg/日)、5名でサラゾピリン(3-8 g/日)もしくは5-アミノサリチル酸(5-aminosalicylate, 5-ASA)(2.25 g/日)、3名でアザチオプリン(25-50 mg/日)が用いられていた。本研究は防衛医科大学校倫理委員会で承認された(承認番号 984)。また、対象者へ文書を用いて説明を行い、すべて書面で同意を得た。

(2) 免疫染色

HMGB1の免疫染色法は第1章と同様の方法で実施した。

(3) 統計処理

結果は平均値±標準誤差で表した。群間差に関する統計解析は student の t 検定を用いた。有意差検定には Statcel 2 (OMS publishing Inc.)を用い、 $P<0.05$ を有意と判断した。

第3節 結果

非炎症部位と比較して炎症部位では HMGB1 陽性の炎症細胞浸潤の有意な増加を認めた (図 15、16)。またこれらの炎症部位の浸潤細胞においては、核での発現のみならず、細胞質において HMGB1 を発現している細胞が多数認められた。

第4節 考察

UC 患者の炎症部位では著明な HMGB1 陽性細胞の増加が認められ、これは DSS 腸炎で観察された所見とも一致し、UC の腸管炎症に HMGB1 が関与している可能性を示唆した。血中や便中の HMGB1 が疾患活動性と相関したという報告もあり^{35,36)}、HMGB1 は IBD の活動性の指標となる可能性がある。その一方で Vitali らは腸管局所での HMGB1 の蛋白、mRNA の発現は亢進しておらず、細胞質分画でのみ HMGB1 の増加を認めたと報告している³⁶⁾。本研究でも *in vitro* において HMGB1 の mRNA の発現の亢進を認めなかった。従って炎症に際し HMGB1 は合成よりむしろ、核内から細胞質、細胞外への分泌が主体であると考えられた。それを裏付けるように UC 患者の炎症部位からの生検組織では HMGB1 は浸潤細胞の細胞質においても多く局在していた。さらに UC の大腸の炎症局所では HMGB1 陽性の浸潤細胞が数多く浸潤しているので、接着分子の亢進を介して HMGB1 陽性細胞の盛んなリクルートが生じている可能性が考えられた。

第 5 節 小括

UC 患者の大腸粘膜の炎症部位においても HMGB1 陽性の浸潤細胞の増加を認めた。その浸潤細胞の多くは HMGB1 を核のみならず細胞質に表出しており、炎症局所では HMGB1 の放出が生じている可能性が考えられた。

第5章 統括的考察

UC の治療には寛解導入療法と寛解維持療法があり、軽症～中等症には5-アミノサリチル酸製剤が用いられ、中等症ではステロイド剤の併用が行われる。重症例では大量ステロイド療法が行われるが、大量ステロイド投与でも改善しないステロイド抵抗例が存在する。また、ステロイドの減量・中止により再燃するステロイド依存例もあり、長期のステロイド使用による副作用の問題がある。ステロイド抵抗例での寛解導入やステロイド依存例でのステロイド減量、寛解維持のためシクロスポリン、タクロリムス、アザチオプリン等の免疫抑制剤や抗 TNF- α 抗体製剤、白血球除去療法等が臨床で用いられている^{45,48)}。しかし免疫抑制剤や抗 TNF- α 抗体製剤の問題点として、免疫低下による易感染性やアレルギー反応などの副作用が挙げられる。現在、炎症性腸疾患の病因は明らかにされておらず、原因療法が望めない現状であり、より効率的で安全な抗炎症療法の重要性が認識されている。

本検討では、rTM 投与はマウス DSS 大腸炎において組織学的な陰窩の消失、炎症細胞浸潤を改善し、炎症性サイトカインである TNF- α や IFN- γ 、接着分子である ICAM-1、VCAM-1 の発現を抑制した。*in vitro* においても TNF- α や接着分子の mRNA 発現を抑制した。このように rTM は炎症性サイトカイン分泌の抑制、炎症細胞のリクルートの抑制、アラームインである HMGB1 の抑制²³⁾を介して腸管炎症を抑制し、抗炎症効果を発揮するのではないかと考えられ、従来使用されている薬物療法との併用による炎症の更なる改善効果も見込めるのではないかと期待される。

他にも rTM は多彩な機序により抗炎症作用を発揮する。プロテイン C はトロンビンによって aPC に活性化されるが、TM はこの活性を 1000 倍以上に増強する⁴⁹⁾。この経路はさらにプロテイン C の受容体であり血管内皮細胞上に発現している EPCR と結合することによって増強される⁵⁰⁾。aPC には抗炎症作用があり、炎症性サイトカインの抑制や血管透過性亢進の抑制、白血球の接着を阻害する作用などが報告されている^{51,52)}。トロンビン自体にも血管透過性の亢進や単球からの TNF- α の産生を増加させる作用があり⁵³⁾、TM はトロンビンと結合することでトロンビン自体の持つ炎症作用を抑制していると考えられる。また、rTM のレクチン様ドメインは HMGB1 だけでなく LPS を吸着することで細菌を凝集させる作用があり、マクロファージによる貪食を促進させる⁸⁾。レクチン様ドメインには好中球の内皮細胞への接着を阻害する作用⁵⁴⁾や補体の活性化阻害作用もある⁵⁵⁾。トロンビン・TM 複合体は線溶阻害作用を持つ thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) を活性化するが、活性化 TAFI (TAFIa) は、炎症性メディエーターとして知られるブラジキニンや補体経路で生成されるアナフィラトキシンである C3a、C5a を失活させることでも抗炎症効果を発揮する⁵⁶⁾。このように凝固と炎症は密接にクロストークが行われていると考えられている。本研究では主に HMGB1 を介する機序から TM の抗炎症効果について検討を行ったが、他の多くの機序が総合的に加わる事により、rTM の腸炎への抗炎症効果が発揮されたものと考えられた。

rTM を UC の治療に用いる場合、トロンビン抑制作用などの抗凝固活性から考えて、腸管からの出血をより悪化させるのではないかと、その副作用が懸念される。しかし、TM は血中トロンビン濃度に依存して抗凝固活性を発揮するた

め過剰な抗凝固作用を呈しにくいと考えられており、ヘパリンに比較して出血の有害事象が少ないことが報告されている⁴⁾。また本研究でも rTM 投与により DSS 腸炎マウスの出血が悪化したという結果は認めなかった。しかし、今後 UC 患者への実際の投与に際しては、その用量や使用するタイミングに関して更なる検討を要すると思われる。

今回は rTM の多面的な抗炎症作用の中から HMGB1 阻害作用に着目して検討を行った。核内蛋白質である HMGB1 は活性化されたマクロファージや樹状細胞、好中球において細胞質、さらには細胞外に移行し炎症のメディエーターとして機能する。また壊死細胞や障害を受けた細胞からも放出される。本研究においてもマウス大腸炎、UC の炎症粘膜における免疫染色では浸潤細胞の細胞質に HMGB1 の局在を認め、核内から細胞質への移行が起きているものと考えられた。HMGB1 により血管内皮細胞での接着分子の発現が亢進するが、HMGB1 は好中球・単球など炎症細胞を遊走させる作用もあり、炎症局所における細胞浸潤の亢進を介して炎症の増悪因子として重要な役割を果たしている可能性が考えられた。事実、今回の培養活性化マクロファージを用いた検討においても抗 HMGB1 抗体投与によって TNF- α 産生が抑制され、さらに TNF- α 産生における rTM の抑制効果が外からの HMGB1 投与により阻害される現象がみられ、HMGB1 が促炎症性に働いていることが確認できた。また、炎症細胞のリクルートに重要な役割をはたす血管内皮接着分子の刺激下での発現亢進においても HMGB1 の関与が証明できた。

本研究で UC 患者の大腸粘膜の炎症部位でも HMGB1 陽性の浸潤細胞を多数認めた。IBD 患者の便中 HMGB1 が亢進していたという報告³⁶⁾や HMGB1 が腸管

粘膜透過性を亢進させるという報告があり⁵⁷⁾、TM のみならず HMGB1 が IBD の創薬のターゲットとなる可能性も大いに考えられる。この方面の検討としては TM のレクチン様ドメインの投与⁸⁾の他に、HMGB1 抗体³⁰⁾、HMGB1 レセプターである RAGE の抗体、可溶性 RAGE(sRAGE)、HMGB1 抑制作用を持つ HMGB1 断片(HMGB1 A Box)⁵⁸⁾、ピルビン酸エチル³¹⁾、コリン作動薬⁵⁹⁾の投与等が炎症の制御に有用であったという報告がみられ、その中には実験腸炎での有効性がみられた報告も存在する。

以上より rTM およびその HMGB1 阻害作用は、既存の UC の治療薬とは異なる様々な機序を介して腸管炎症を抑制することが考えられ、今後の炎症性腸疾患治療に有効である可能性が示唆された。

第 6 章 結論

1. rTM 投与はマウス DSS 腸炎において体重の減少、腸管長の短縮、組織学的陰窩の消失を改善し、炎症細胞浸潤を抑制した。また rTM 投与は腸管での炎症性サイトカインや接着分子の mRNA 発現を低下させた。DSS 群では免疫染色において HMGB1 に強く染まる浸潤細胞の増加を認めたが、rTM 投与により抑制された。
2. *in vitro* の検討ではマクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞において rTM は HKF や LPS による TNF- α の亢進を抑制した。血管内皮細胞株である bEND.3 細胞において rTM は TNF- α 刺激による接着分子 ICAM-1、VCAM-1 の mRNA 発現の亢進を抑制した。従って rTM はマクロファージからの炎症性サイトカインの放出抑制と血管内皮細胞での接着分子の発現の低下の両方の機序を介して炎症細胞のリクルートを制御している可能性が考えられた。また、その抑制機序に HMGB1 の果たす役割が大きいのではないかと考えられた。
3. UC 患者の大腸粘膜において非炎症部位と比較して炎症部位で著明な HMGB1 陽性細胞の浸潤を認めた。HMGB1 は核内のみならず浸潤細胞の細胞質で陽性であり、核内から細胞質への移行が起こっているものと考えられた。

4. 以上より腸管炎症の制御に rTM は有効である可能性があり、その機序として HMGB1 の抑制が関与している可能性が考えられた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座教授 三浦総一郎博士に衷心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました穂苅量太講師をはじめとする防衛医科大学校内科学講座教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

また本研究の一部は防衛医科大学校振興会と厚生労働省難治性疾患克服研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」からの助成金により実施しました。この場を借りて深謝いたします。

本研究の主旨は第 39 回日本潰瘍学会（2011 年 11 月、茨城）、第 30 回サイトプロテクション研究会（2012 年 3 月、京都）、米国消化器病学会（2012 年 5 月、サンディエゴ）において発表した。

引用文献

1. 厚生労働省大臣官房統計情報部編 一般財団法人 厚生労働統計協会. 平成 22 年度 衛生行政報告例 第 67 表 特定疾患 (難病)医療受給者証所持者数, 性・年齢階級・対象疾患別. 366-7.
2. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008. 14:390-400.
3. Danese S, Papa A, Saibeni S, Repici A, Malesci A, Vecchi M. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens. *Am J Gastroenterol* 2007. 102:174-86.
4. Saito H, Maruyama I, Shimazaki S, Yamamoto Y, Aikawa N, Ohno R, Hirayama A, Matsuda T, Asakura H, Nakashima M, Aoki N. Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double-blind clinical trial. *J Thromb Haemost* 2007. 5:31-41.
5. Esmon CT. Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med* 2001. 29:S48-51; discussion 51-2.
6. Guitton C, Cottreau A, Gérard N, Quillard T, Chauveau A, Devallière J, Tonnerre P, Charreau B. Protective cross talk between activated protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells: implication of EPCR, noncanonical NF- κ B, and ERK1/2 MAP kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011. 300:C833-42.

7. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, Weitz JI, Weiler H, Hellings PW, Schaeffer P, Herbert JM, Collen D, Theilmeier G. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med* 2002. 196:565-77.
8. Shi CS, Shi GY, Hsiao SM, Kao YC, Kuo KL, Ma CY, Kuo CH, Chang BI, Chang CF, Lin CH, Wong CH, Wu HL. Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced inflammatory response. *Blood* 2008. 112:3661-70.
9. Abeyama K, Stern DM, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M, Uchimura T, Ida N, Yamazaki Y, Yamada S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Iino S, Taniguchi N, Maruyama I. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high mobility group-B1 protein. *J Clin Invest* 2005. 115:1267-74.
10. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973. 38:14-9.
11. Bianchi ME, Beltrame M, Paonessa G. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science* 1989. 243:1056-9.
12. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999. 19:5237-46.

13. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999. 285:248-51.
14. Weir HM, Kraulis PJ, Hill CS, Raine AR, Laue ED, Thomas JO. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J* 1993. 12:1311-9.
15. Hardman CH, Broadhurst RW, Raine AR, Grasser KD, Thomas JO, Laue ED. Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1995. 34:16596-607.
16. Melvin VS, Edwards DP. Coregulatory proteins in steroid hormone receptor action: the role of chromatin high mobility group proteins HMG-1 and -2. *Steroids* 1999. 64:576-86.
17. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002. 418:191-5.
18. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, Morser J, Stern D, Marie Schmidt AM. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 1995. 270:25752-61.

19. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004. 279:7370-7.
20. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007. 8:487-96.
21. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000. 192:565-70.
22. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, Suffredini AF. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003. 101:2652-60.
23. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 2007. 81:59-66.
24. Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, Kobayashi A, Maruyama I, Yamada S, Hasegawa N, Soejima J, Koh H, Ishizaka A. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004. 170:1310-6.

25. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005. 201:1135-43.
26. Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Rosas-Ballina M, Huston JM, Czura CJ, Lee DC, Ward MF, Bruchfeld AN, Wang H, Lesser ML, Church AL, Litroff AH, Sama AE, Tracey KJ. Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock* 2006. 25:571-4.
27. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S, Nakajima T, Komiya S, Maruyama I. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003. 48:971-81.
28. Kusume A, Sasahira T, Luo Y, Isobe M, Nakagawa N, Tatsumoto N, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Suppression of dendritic cells by HMGB1 is associated with lymph node metastasis of human colon cancer. *Pathobiology* 2009. 76:155-62.
29. Scaldaferri F, Sans M, Vetrano S, Graziani C, De Cristofaro R, Gerlitz B, Repici A, Arena V, Malesci A, Panes J, Grinnell BW, Danese S. Crucial role of the protein C pathway in governing microvascular inflammation in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007. 117:1951-60.
30. Yamasaki H, Mitsuyama K, Masuda J, Kuwaki K, Takedatsu H, Sugiyama G, Yamada S, Sata M. Roles of high-mobility group box 1 in murine experimental colitis. *Mol Med Report* 2009. 2:23-7.

31. Davé SH, Tilstra JS, Matsuoka K, Li F, DeMarco RA, Beer-Stolz D, Sepulveda AR, Fink MP, Lotze MT, Plevy SE. Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis. *J Leukoc Biol* 2009. 86:633-43.
32. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993. 34:1705-9.
33. Vainer B, Nielsen OH. Changed colonic profile of P-selectin, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-2, and ICAM-3 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2000. 121:242-7.
34. Koizumi M, King N, Lobb R, Benjamin C, Podolsky DK. Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992. 103:840-7.
35. McDonnell M, Liang Y, Noronha A, Coukos J, Kasper DL, Farraye FA, Ganley-Leal LM. Systemic Toll-like receptor ligands modify B-cell responses in human inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011. 17:298-307.
36. Vitali R, Stronati L, Negroni A, Di Nardo G, Pierdomenico M, del Giudice E, Rossi P, Cucchiara S. Fecal HMGB1 is a novel marker of intestinal mucosal inflammation in pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2011. 106:2029-40.
37. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990. 98:694-702.

38. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993. 69:238-49.
39. Iba T, Nakarai E, Takayama T, Nakajima K, Sasaoka T, Ohno Y. Combination effect of antithrombin and recombinant human soluble thrombomodulin in a lipopolysaccharide induced rat sepsis model. *Crit Care* 2009. 13(6):R203.
40. Gomi K, Zushi M, Honda G, Kawahara S, Matsuzaki O, Kanabayashi T, Yamamoto S, Maruyama I, Suzuki K. Antithrombotic effect of recombinant human thrombomodulin on thrombin-induced thromboembolism in mice. *Blood* 1990. 1;75(7):1396-9.
41. Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR, Zetoune FS, Gerard NP, Cianflone K, Köhl J, Gerard C, Sarma JV, Ward PA. Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* 2008. 14:551-7.
42. Tang D, Shi Y, Kang R, Li T, Xiao W, Wang H, Xiao X. Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1. *Leukoc Biol* 2007. 81:741-7.
43. Ito I, Fukazawa J, Yoshida M. Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem* 2007. 282:16336-44.
44. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 2003. 22:5551-60.

45. Ford AC, Sandborn WJ, Khan KJ, Hanauer SB, Talley NJ, Moayyedi P. Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011. 106:644-59
46. Yamada S, Inoue K, Yakabe K, Imaizumi H, Maruyama I. High mobility group protein 1 (HMGB1) quantified by ELISA with a monoclonal antibody that does not cross-react with HMGB2. *Clin Chem* 2003. 49:1535-7.
47. Takebayashi K, Hokari R, Kurihara C, Okada Y, Okudaira K, Matsunaga H, Komoto S, Watanabe C, Kawaguchi A, Nagao S, Tsuzuki Y, Miura S. Oral tolerance induced by enterobacteria altered the process of lymphocyte recruitment to intestinal microvessels: roles of endothelial cell adhesion molecules, TGF-beta and negative regulators of TLR signaling. *Microcirculation* 2009. 16:251-64.
48. Meier J, Sturm A. Current treatment of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2011. 17:3204-12.
49. Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 1982. 257:7944-7.
50. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93:10212-6.
51. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005. 105:3178-84.

52. Schuepbach RA, Feistritz C, Fernández JA, Griffin JH, Riewald M. Protection of vascular barrier integrity by activated protein C in murine models depends on protease-activated receptor-1. *Thromb Haemost* 2009. 101:724-33.
53. Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996. 16:488-96.
54. Ito T, Kawahara K, Okamoto K, Yamada S, Yasuda M, Imaizumi H, Nawa Y, Meng X, Shrestha B, Hashiguchi T, Maruyama I. Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008. 28:1825-30.
55. Van de Wouwer M, Plaisance S, De Vriese A, Waelkens E, Collen D, Persson J, Daha MR, Conway EM. The lectin-like domain of thrombomodulin interferes with complement activation and protects against arthritis. *J Thromb Haemost* 2006. 4 :1813-24.
56. Leung LL, Myles T, Nishimura T, Song JJ, Robinson WH. Regulation of tissue inflammation by thrombin-activatable carboxypeptidase B (or TAFI). *Mol Immunol* 2008. 45:4080-3.
57. Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002. 123:790-802.

58. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. 101:296-301.
59. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 2004. 10:1216-21.

図 表

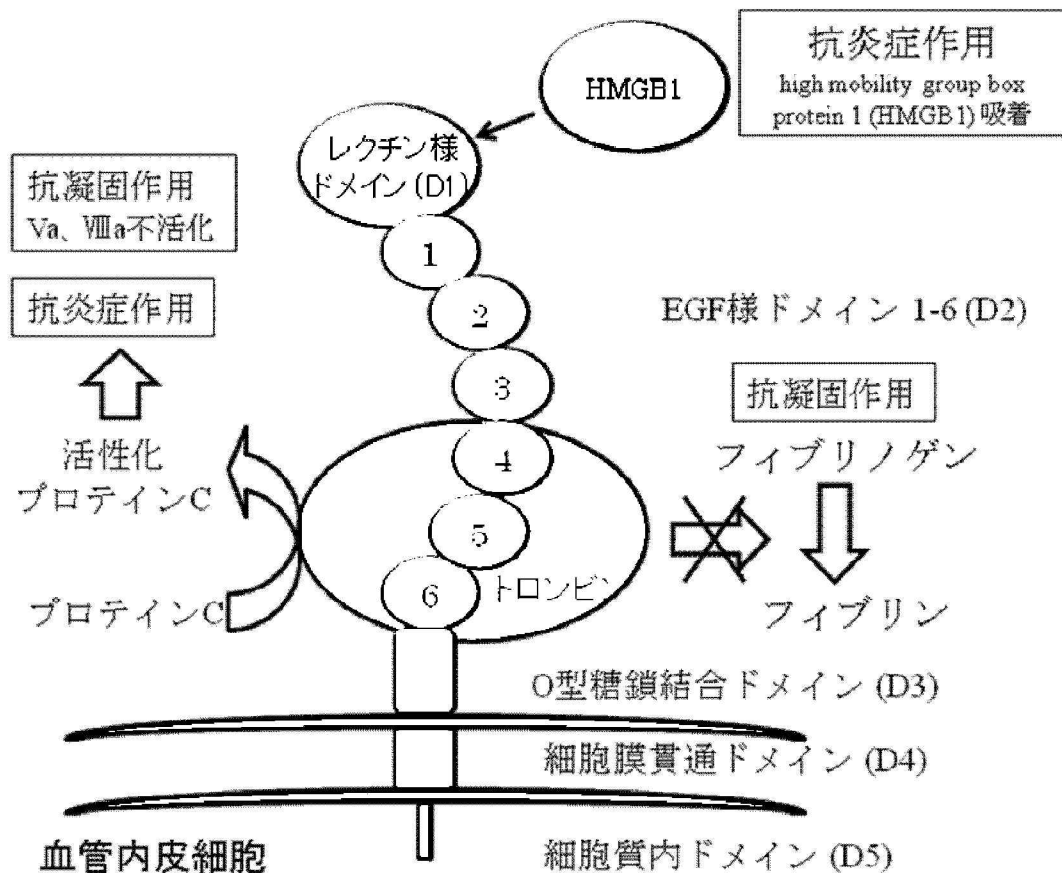


図1 トロンボモジュリン(TM)の構造と機能について

TMの構造は、レクチン様ドメイン (D1)、6個のepidermal growth factor (EGF) 様ドメイン (D2)、O型糖鎖結合ドメイン (D3)、細胞膜貫通ドメイン (D4)、細胞質内ドメイン (D5)よりなる。TMはトロンビンと結合し抗凝固に働く。さらに、トロンビン・トロンボモジュリン複合体はプロテインC活性化能を著しく増強し、活性化プロテインCは抗凝固作用に加えて抗炎症作用を有する。TMのD1ドメインには炎症性メディエーターであるhigh mobility group box protein 1 (HMGB1)の吸着作用があり、抗炎症作用を発揮する。

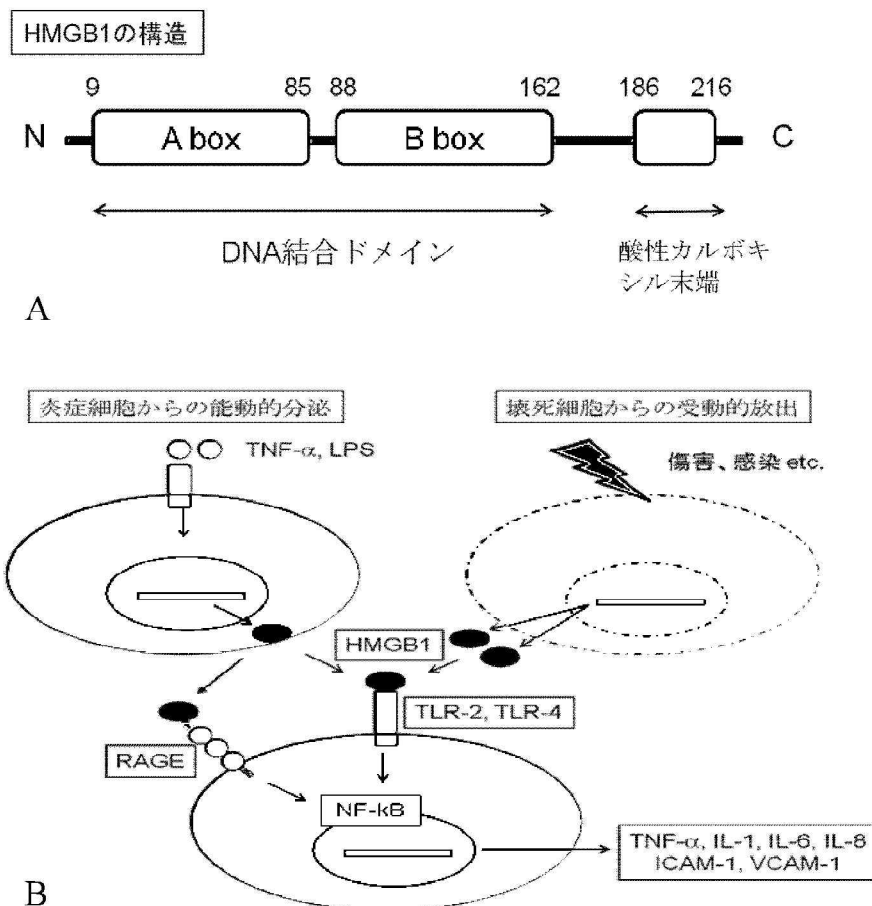


図2 high mobility group box protein 1 (HMGB1)の構造と分泌

A: HMGB1は核内に構成的に発現する約25 kDaのDNA結合蛋白質であり、A box、B boxの2つのDNA結合ドメインと酸性カルボキシル末端からなる。

B: HMGB1は活性化された炎症細胞や壊死細胞から細胞外に放出される。HMGB1はreceptor for advanced glycation end products (RAGE)やToll-Like Receptor-2 (TLR-2)、TLR-4、TLR-9といった受容体を介して作用し、単球・マクロファージからのTNF- α 、interleukin-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカインの産生を増幅する。さらに、血管内皮細胞上のintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)やvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)といった接着分子の発現を亢進させる。NF- κ B: nuclear factor- κ B

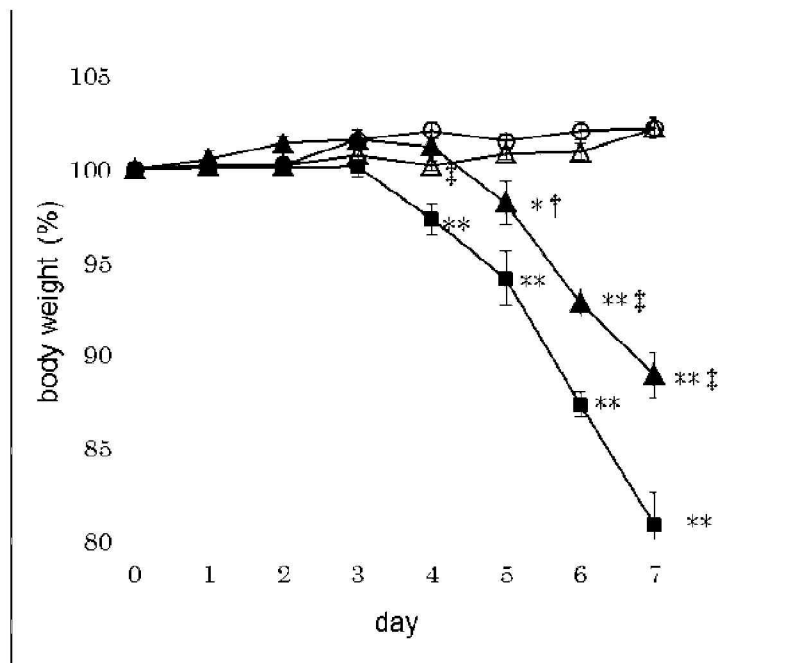


図3 マウスの体重変化

経時的な体重変化を示す。各データは平均値±標準誤差で表した (n=12、rTM 単独群のみ n=3)。

○ : control 群、△ : rTM 単独群、▲ : DSS+rTM 群、■ : DSS 群

* P<0.05 対 control 群、** P<0.01 対 control 群、† P<0.05 対 DSS 群、‡ P<0.01 対 DSS 群

DSS 投与により有意な体重減少を認めた。rTM は DSS による体重減少を有意に抑制した。rTM 単独投与では control 群と比較し体重の変化を認めなかった。

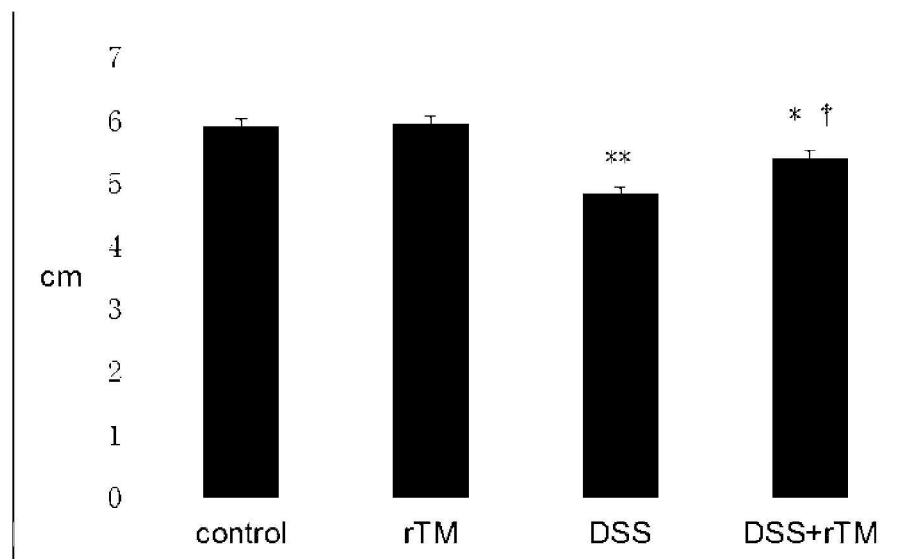


図4 腸管長の評価

腸管長は回盲弁～直腸までを計測した。各データは平均値±標準誤差で示した (n=12、rTM 単独群のみ n=3)。* P<0.05 対 control 群、** P<0.01 対 control 群、† P<0.01 対 DSS 群

DSS 群では control 群と比較し有意な腸管長の短縮を認めた。rTM は DSS 群における腸管長の短縮を有意に抑制した。rTM 単独群では腸管長の短縮はみられなかった。

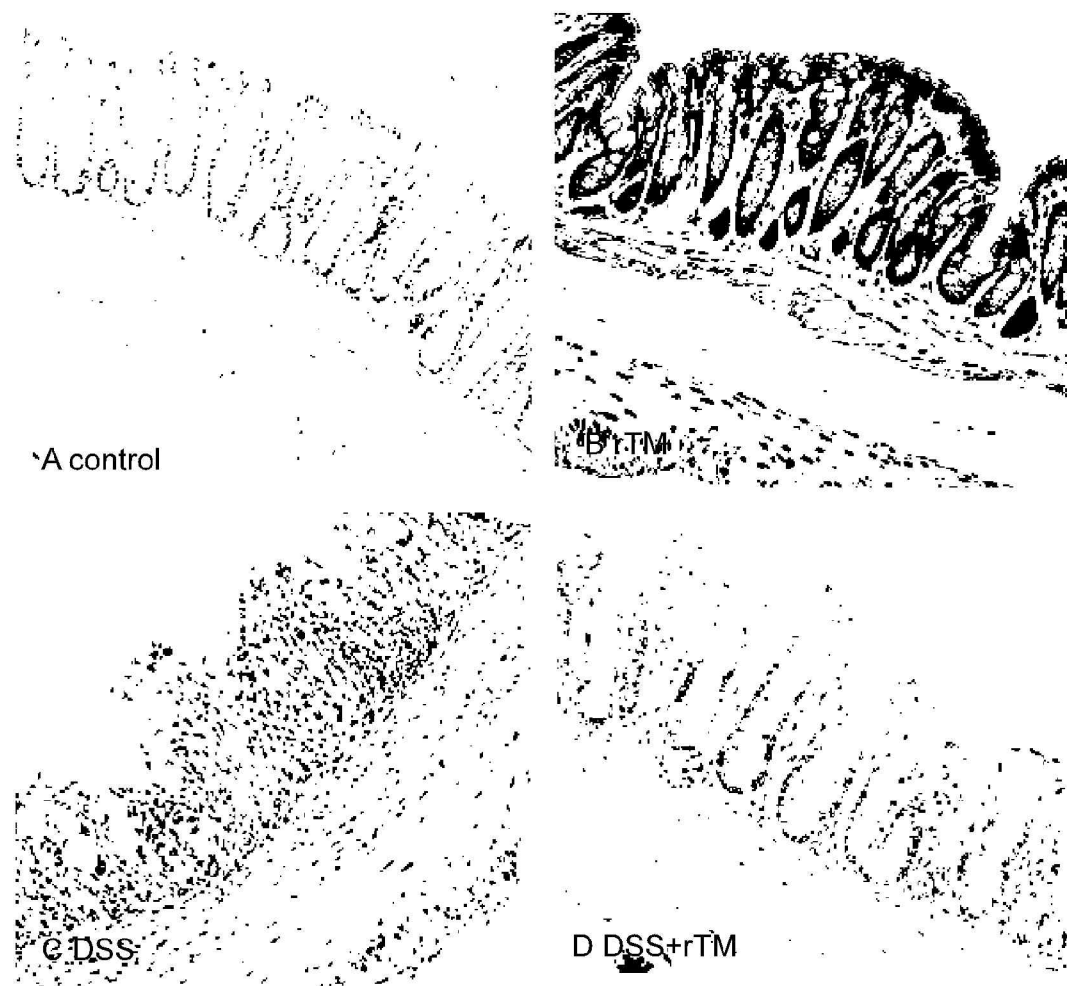


図5 マウス大腸のHE染色

A : control 群、B : rTM 単独群、C : DSS 群、D:DSS+rTM 単独群 (200 倍)

HE 染色では DSS 群で著明な陰窩の破壊と炎症細胞浸潤を認めた。rTM 投与は DSS による陰窩の破壊と炎症細胞浸潤を抑制した。rTM 単独群では control 群と比較し変化が認められなかった。

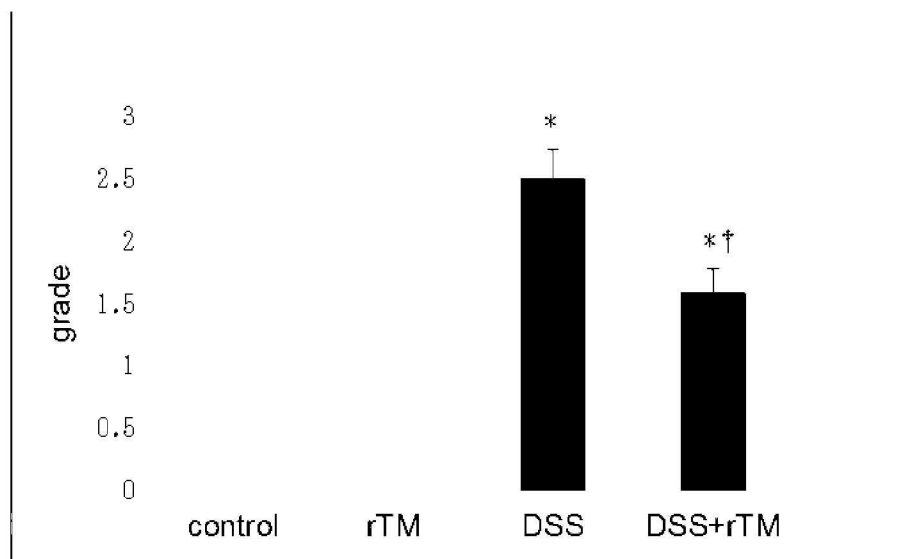


図 6 組織学的スコア

各データは平均値±標準誤差で表した (n=12、rTM 単独群のみ n=3)。

* $p<0.01$ 対 control 群、† $P<0.01$ 対 DSS 群

組織学的スコアは陰窩の破壊を反映し DSS 群で増大したが、rTM 投与により有意に減少した。rTM 単独群では control 群と比較し変化が認められなかった。

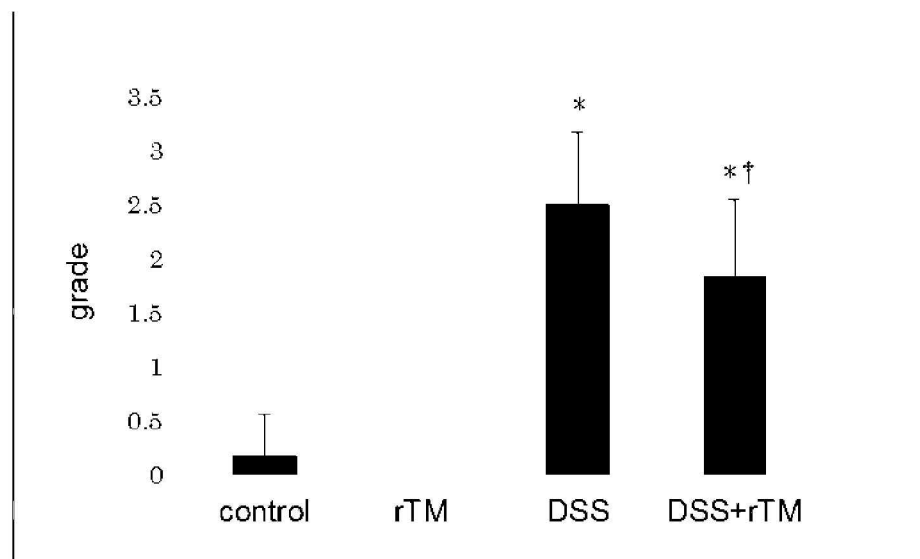


図 7 炎症細胞浸潤の程度

各データは平均値±標準誤差で示した (n=12、rTM 単独群のみ n=3)。

* P<0.01 対 control 群、† P<0.05 対 DSS 群

炎症細胞浸潤は DSS 群で亢進し、rTM 投与により有意に抑制された。rTM 単独群では control 群と比較し変化が認められなかった。

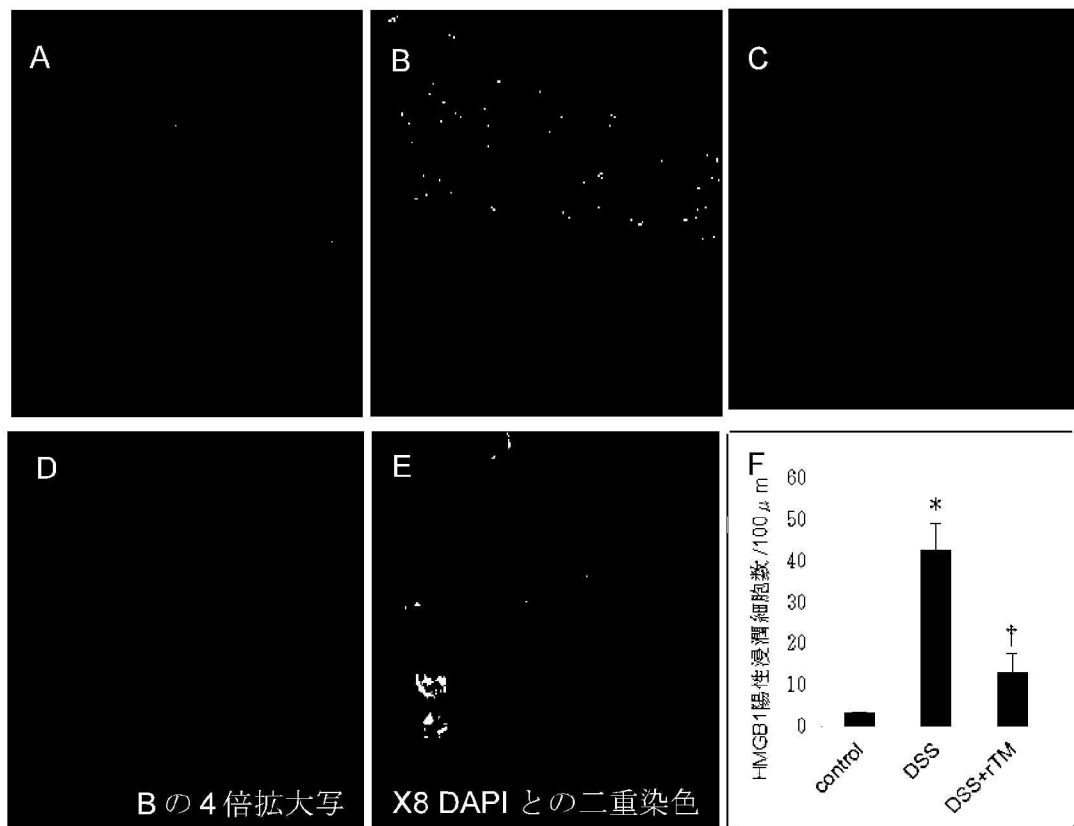


図 8 HMGB1 の免疫染色

A : control 群、B : DSS 群、C : DSS+rTM 群。HMGB1 を FITC で緑色に蛍光標識した (200 倍)。D : B の 4 倍拡大写真。E : DSS 群において核を DAPI で二重染色した (さらに 8 倍に拡大)。F: 粘膜筋板 100 μ m あたりの HMGB1 陽性浸潤細胞数を示した。各データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した (n=4)。* P<0.01 対 control 群、† P<0.01 対 DSS 群

HMGB1 は血管内皮細胞と浸潤細胞に発現していた。DSS 群で多数の HMGB1 陽性の浸潤細胞を認めたが、DSS+rTM 群では DSS 群と比較し HMGB1 陽性の浸潤細胞数の増加は有意に抑制されていた(F)。DAPI による核との二重染色において DSS 群では核のみならず細胞質における HMGB1 の発現が確認された(E)。

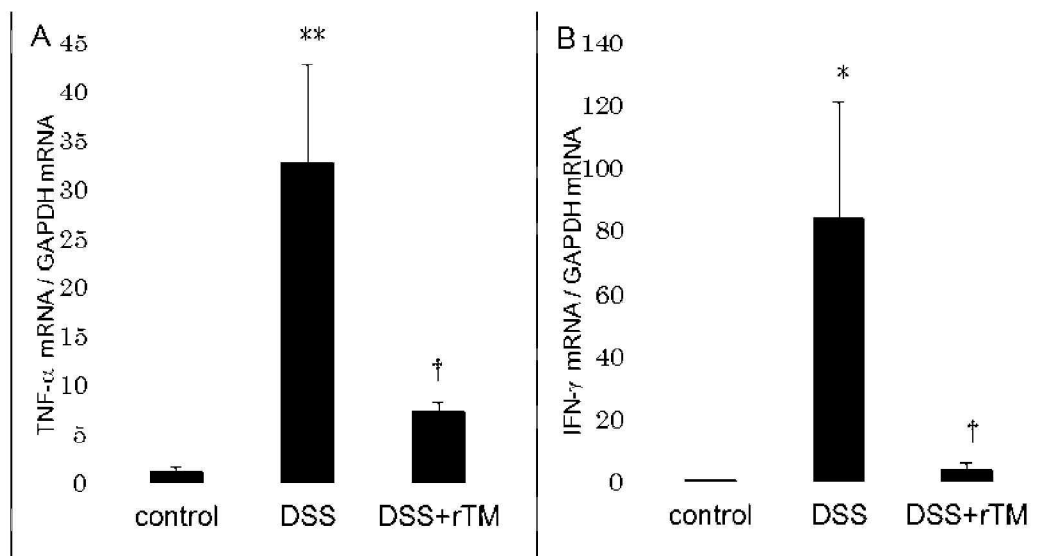


図9 マウス大腸における TNF- α 、IFN- γ の mRNA 発現

各データは平均値 $\pm$ 標準誤差 で示した(n=9)。

* P<0.05 対 control 群、** P<0.01 対 control 群、† P<0.05 対 DSS 群

control 群と比較し DSS 群で TNF- α 、IFN- γ ともに発現が亢進し、rTM 投与により発現が抑制された。

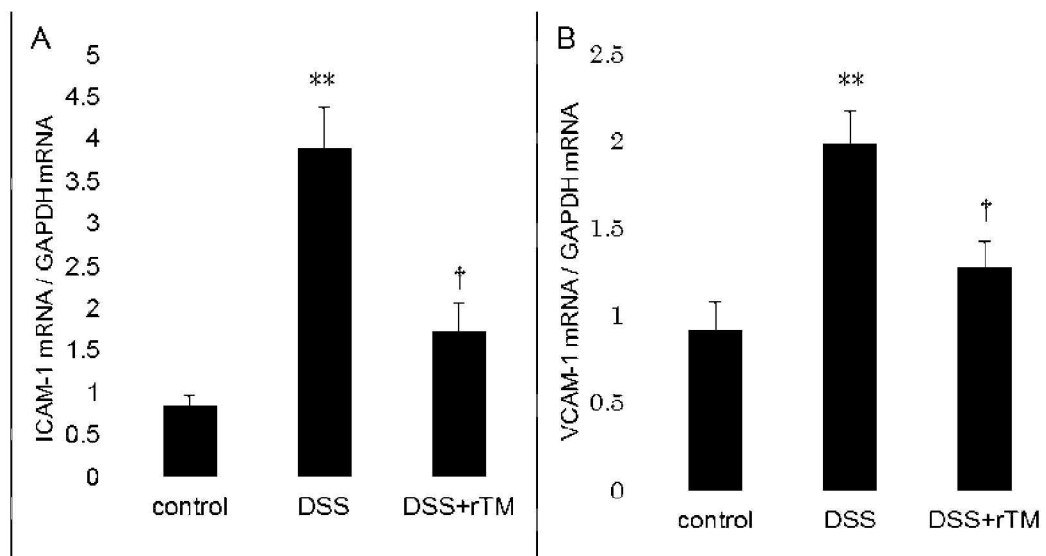


図 10 マウス大腸粘膜における ICAM-1、VCAM-1 の mRNA 発現

各データは平均値±標準誤差で示した (n=5)。

* $P < 0.04$ 対 control 群、** $P < 0.01$ 対 control 群、† $P < 0.01$ 対 DSS 群

DSS 群では control 群に比較して ICAM-1、VCAM-1 の mRNA 発現が亢進し、DSS+rTM 群では DSS 群に対し有意に抑制されていた。

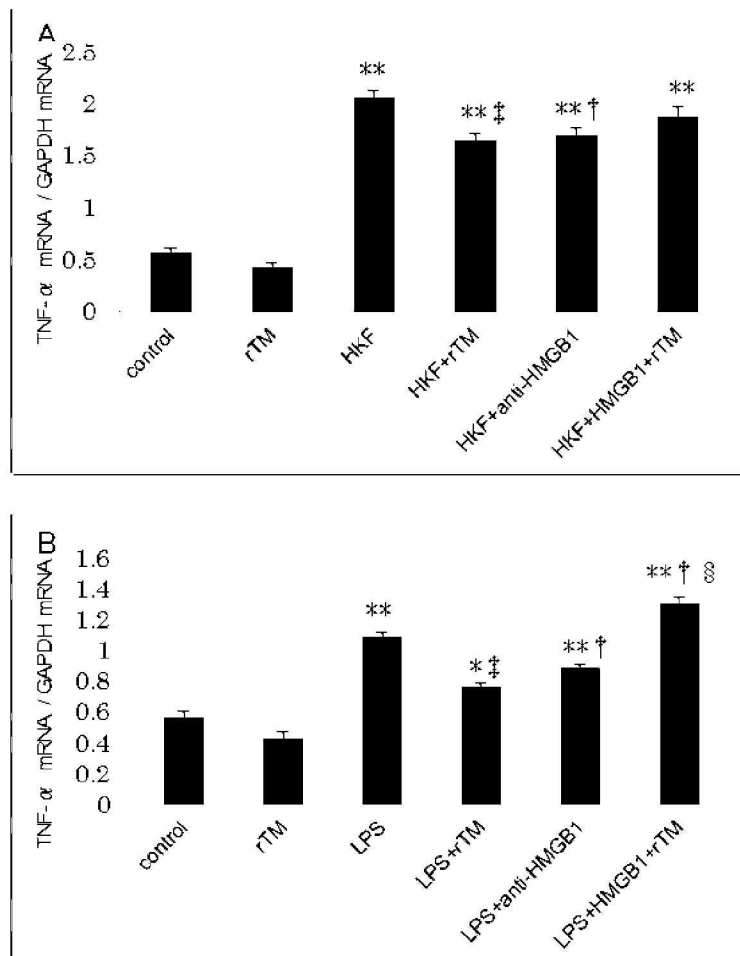


図 11 RAW264.7 細胞における TNF- α の発現

各データは平均値±標準誤差で示した (n=6)。* P<0.05 対 control 群、** P<0.01 対 control 群、† P<0.05 対 HKF または LPS 群、‡ P<0.01 対 HKF または LPS 群、§ P<0.01 対 LPS+rTM 群

HKF 群では TNF- α mRNA 発現の亢進が観察され rTM 投与は HKF による TNF- α mRNA 発現の亢進を減少させた。抗 HMGB1 抗体でも同様に TNF- α の抑制がみられた。またリコンビナント HMGB1 を加えた群では rTM による TNF- α の抑制効果が減少傾向を示した。LPS 刺激でも同様の結果であり、リコンビナント HMGB1 を加えた群では rTM による TNF- α の抑制効果が消失した。

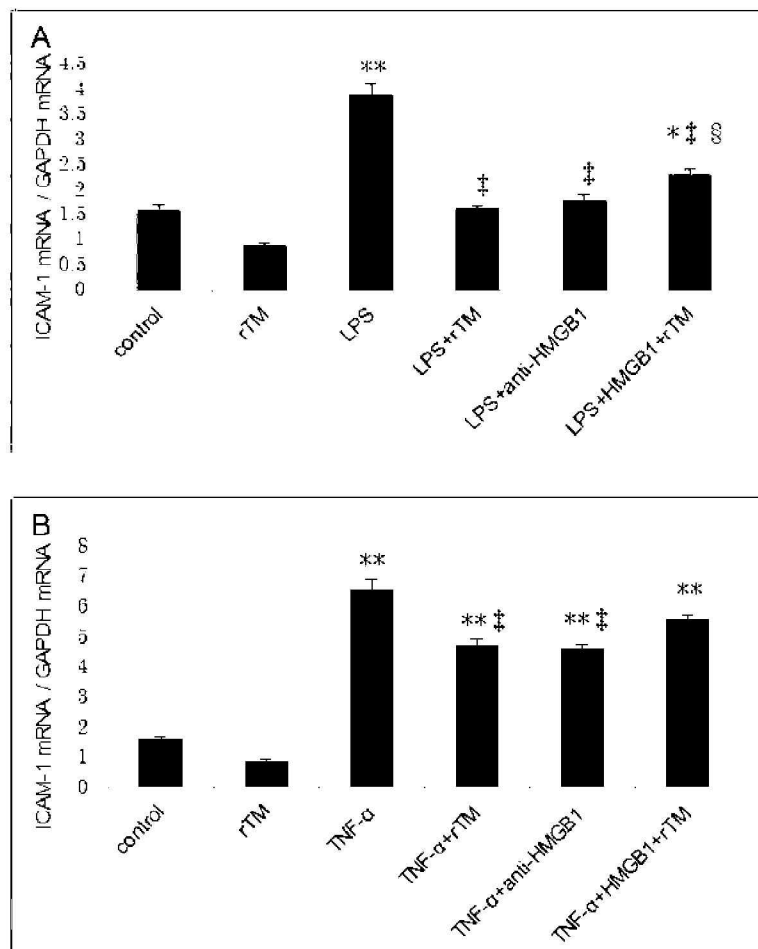


図 12 bEND.3 細胞における ICAM-1 の mRNA の発現

各データは平均値±標準誤差で示した (n=6)。

* P<0.05 対 control 群、** P<0.01 対 control 群、‡ P<0.01 対 LPS または TNF-α 群、§ P<0.05 対 LPS+rTM 群

LPS 刺激により control 群に比較し ICAM-1 の mRNA 発現の亢進が認められた。rTM や抗 HMGB1 抗体の投与は、LPS による ICAM-1 の mRNA 発現の亢進を抑制した。リコンビナント HMGB1 を加えた群では rTM による ICAM-1 の抑制を有意に阻害した。TNF-α 刺激でも同様の結果であったが、リコンビナント HMGB1 を加えた群で rTM による ICAM-1 の発現抑制は減少傾向を示した。

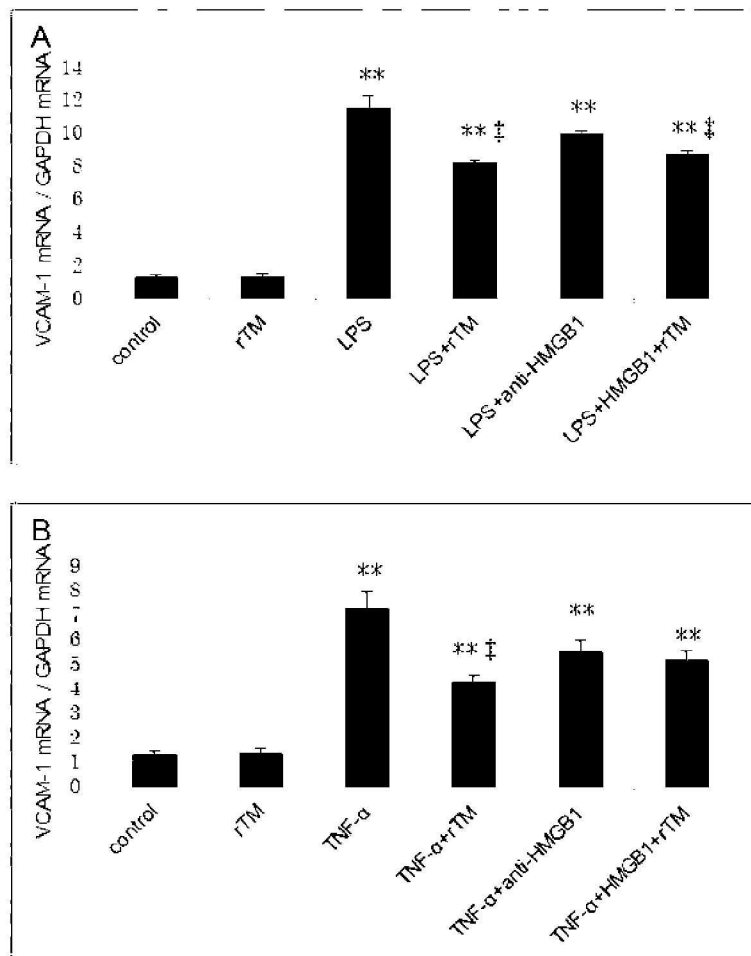


図 13 bEND.3 細胞における VCAM-1 の mRNA の発現

各データは平均値±標準誤差で示した (n=6)。

** P<0.01 対 control 群、‡ P<0.01 対 LPS または TNF-α 群

LPS 刺激により control 群に比較し VCAM-1 の mRNA 発現の亢進が認められた。rTM や抗 HMGB1 抗体の投与は、LPS による VCAM-1 の mRNA 発現の亢進を抑制した。リコンビナント HMGB1 を加えた群では rTM による VCAM-1 の抑制効果に大きい影響を与えなかった。TNF-α 刺激でも同様の結果であったが、リコンビナント HMGB1 を加えた群で rTM による VCAM-1 の mRNA 発現抑制は減少傾向を示した。

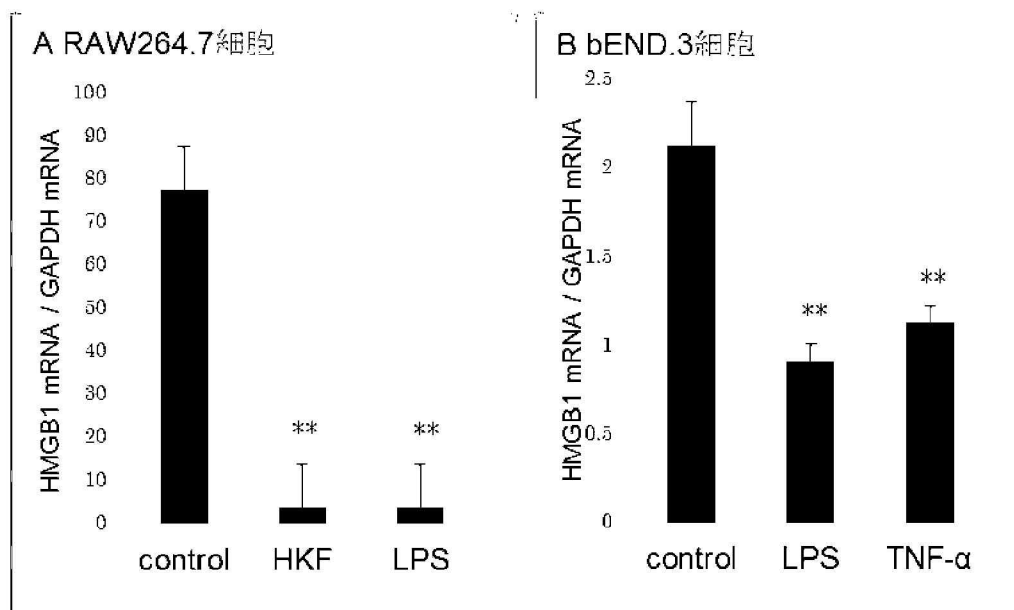


図 14 bEND.3 細胞、RAW264.7 細胞における HMGB1 の mRNA の発現

各データは平均値±標準誤差で示した (n=6)。

* P<0.05 対 control 群、** P<0.01 対 control 群

A : RAW 細胞では恒常的な HMGB1 mRNA の発現が見られた。HKF あるいは LPS 刺激により RAW 細胞での HMGB1 mRNA 発現は著明に減少した。

B : bEND.3 細胞においても恒常的な HMGB1 mRNA の発現が見られた。LPS あるいは TNF-αのいずれの刺激によっても内皮細胞での HMGB1 mRNA 発現は有意に減少した。

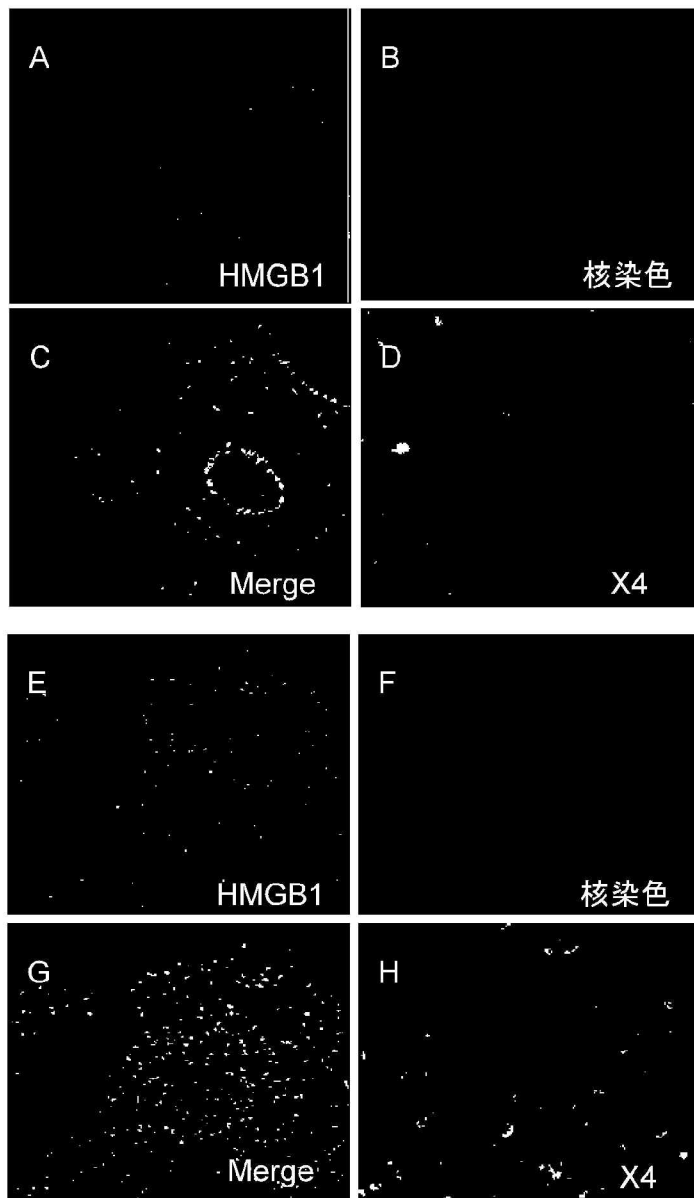


図 15 UC 患者の大腸粘膜の免疫染色

A～D:非炎症部位、E～H：炎症部位（200 倍）

非炎症部位と比較して炎症部位では HMGB1 陽性の炎症細胞浸潤の増加を認めた。炎症部位の浸潤細胞においては、核での発現のみならず、細胞質において HMGB1 を発現している細胞が多数認められた。

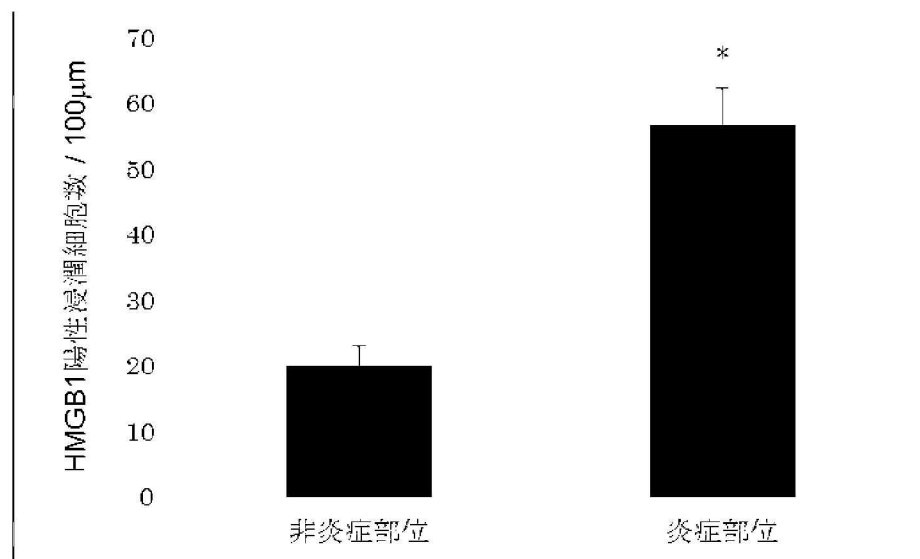


図 16 UC 患者の生検検体における HMGB1 陽性浸潤細胞数

各データは平均値±標準誤差で示した (n=5)。* P<0.01 対 非炎症部位

非炎症部位と比較して炎症部位では HMGB1 陽性の炎症細胞浸潤の有意な増加を認めた。