

グリチルリチンによる DAMP:HMGB1 アイソフォームの分別制御と 抗炎症活性のスペクトラムに関する研究

申請代表者	丸山 征郎	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科システム血栓制御学	特任教授
所外共同研究者	大山 陽子	鹿児島大学病院検査部	医員
所内共同研究者	早川 芳弘	病態制御研究部門病態生化学分野	教授

■背景・目的

HMGB1 (High Mobility Group Box-1) は細胞核内で DNA の構造の維持、機能の発現に必須の核内タンパクである。HMGB1 ノックアウトマウスが胎生致死であることから本タンパクの重要性は示されている。

しかし、HMGB1 は、細胞の壊死、あるいは活性化に伴い、核から細胞質、細胞質から細胞外に遊離/放出される。そして細胞外では免疫系細胞を始めとする種々の細胞に発現している Toll Like Receptor (TLR) -4 (TLR-4)、TLR-2、RAGE (Receptor for AGE: Advanced Glycation Endproducts) を介して、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-18 などの炎症性サイトカインや、凝固線溶系因子類 (組織因子、Plasminogen activator Inhibitor-1; PAI-1) などの発現を誘導し、生体防御 (免疫や止血) 系に危険信号因子、いわゆる “alarmins” として作用する。これが時間的、空間的に過剰、遷延、あるいは逸脱して作用すると、全身性炎症反応症候群 (Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS) や播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation; DIC)、敗血症性ショックなどのメディエータとして働く。

このように HMGB1 は、本来は核内に在って核内秩序と諸細胞の機能発現に必須の役割を果たすが、組織損傷などの壊死細胞から細胞外に放出されると、炎症・免疫反応、凝固反応などを誘導する。このことから、HMGB1 は代表的な Damage Associated Molecular Pattern (DAMP) と目され、その制御はショック、全身性炎症症候群 (SIRS)、DIC などの病態での最重要の治療方策となってきた (図 1)。

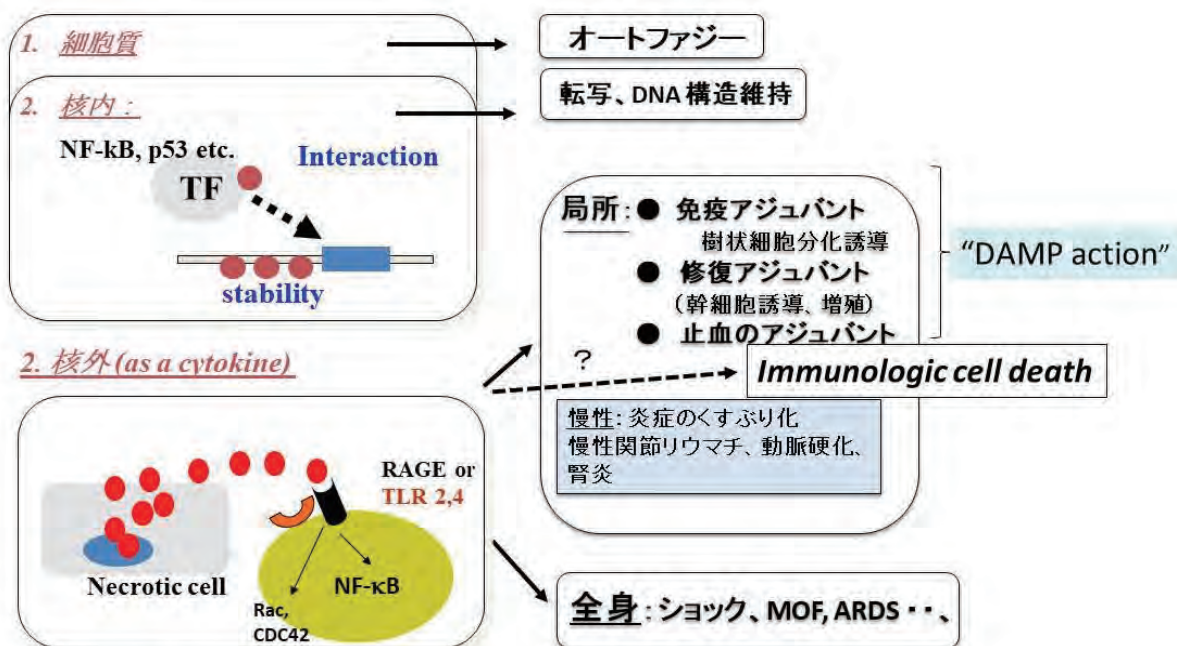


図 1. HMGB1 とは?: High Mobility Group Box-1 protein

そのようななか、Bianchi ME らは、Glycyrrhizin が HMGB1 と結合しその活性を中和することを明らかにした (Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. Chem Biol. 2007 Apr;14(4):431-41)。一方その後には、HMGB1 は3個のSH基を有しており、諸細胞から放出されると全還元型、部分酸化型、全酸化型の3型をとること、そして全還元型は細胞遊走能、部分酸化型は集簇してきた細胞の活性化とケモカイン産生能を、全酸化型はこれらの反応をブロックすることが判明してきた(図2)。

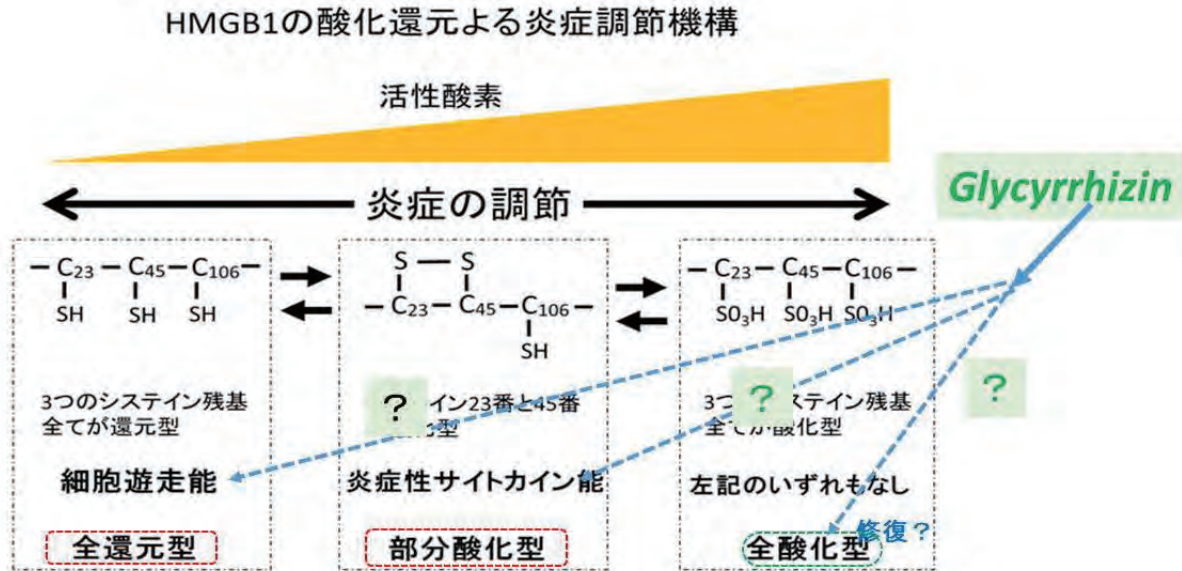


図2. HMGB1の3アイソフォーム

すなわち、全還元型、部分酸化型が DAMP であり、全酸化型は RAMP (Resolution Associated Molecular Pattern) として働くというわけである。さらに最近、免疫系の活性化を誘導する細胞死: Immunologic Cell Death という新規の細胞死の概念も提唱されてきて、癌の治療領域で注目されてきている。この細胞死は、癌において、免疫性抗腫瘍活性を發揮誘導するということから、この免疫誘導性細胞死と HMGB1 の関係性も注目されてきているほか、放射線による癌治療の場合の局所 X 線照射による全身性効果; abscopal effect との関連もあるものと申請者らは想定している。これら immunologic cell death, abscopal effect との関連をも視野に入れて、HMGB1 とグリチルリチンの関係は考察されるべきであろうと筆者らは考えている。

そこで今回の研究では、アデニン投与腎不全ラット(横澤隆子ら、農芸化学雑誌、1981, 95, 811-816)を作製して、①病態形成への HMGB1 の関与、②グリチルリチンの効果、さらにグリチルリチンの HMGB1 の3フォームに及ぼす影響の選択性について検討した。

すなわち③果たして“グリチルリチンが結合して、HMGB1 の向炎症活性、procoagulant 活性を制御するのはどのアイソフォームの HMGB1 か?”ということである(図2)。

また、ex vivo study として、培養腎尿細管細胞、培養単球・マクロファージにおけるサイトカイン、HMGB1 の産生・放出に対するグリチルリチンの影響を検討した。

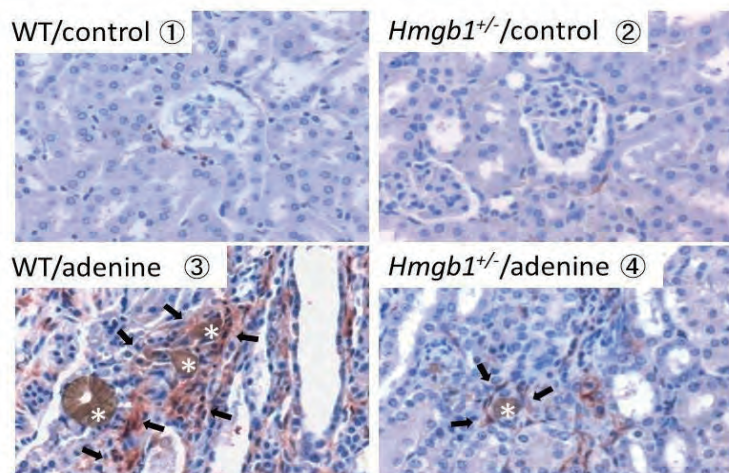


図3. アデニン投与ラットの腎病理像
腎内(糸球体と尿細管)にアデニン結晶の蓄積とマクロファージの集積が観られ(③)、これらの細胞はHMGB1を強く発現していた。HMGB1+/-KOマウスではマクロファージ浸潤が抑制されていた(④)。

■結果・考察

①アデニン投与ラットの病態

横澤の報告に従い水溶液化アデニンを飲水投与した場合のラットは、実験の進行とともに、緩徐進行性の腎障害、さらには腎不全状態に陥り、多飲・多尿を来した。

病理学的検討では、腎内(糸球体内、尿細管)にはアデニン結晶とマクロファージが集簇し(図3)、MCP-1、HMGB1とその受容体(RAGE)、TLR-4(図4)、TNF α (図5)が強く発現していた。

②培養細胞での検討

培養細胞(尿細管、単球・マクロファージ)を用いた検討では、アデニン刺激⇒尿細管細胞⇒MCP-1発現⇒単球/マクロファージ遊走・集簇・活性化⇒TNF α 産生・放出というループを形成して、これがvicious cycleの基盤となっていることが示唆され(図4、図5、図7、図8)、これには全還元型のHMGB1が関与していること(図4)、これに対し、グリチルリチンが抑制的に働いている傾向が示された(図6)。

■結論

①アデニン投与ラット(in vivo)の病態と病理的变化

アデニン投与ラットにおける病理的観察においては、実験の進行とともに、腎臓にアデニン結晶の強い沈着が観察され、加えて生化学的所見より、本ラットは腎不全状態に陥ったものと考えられた。アデニン結晶は糸球体のみならず、尿細管周囲にも沈着していた。これらの尿細管はHMGB1を発現していた。そしてマクロファージの集簇も観察された。これらのマクロファージにおいても、HMGB1が核内のみならず、細胞質にも発現していた。またTNF α 、MCP-1も強く発現していた。

②HMGB1を中核とした炎症性サーキット形成

培養細胞系実験においては、【アデニン⇒尿細管細胞⇒MCP-1、HMGB1放出⇒RAGE, TLR-4発現増強⇒単球集積⇒マクロファージへの分化⇒TNF α 、HMGB1産生・放出】というサーキットが成立しており、これによる悪循環が形成されているものと推定された(図7、図8)。HMGB1の部分ノックダウンマウス(HMGB1^{-/+})ではこれら炎症性細胞とサイトカインループ形成は抑制されていた(図3)。

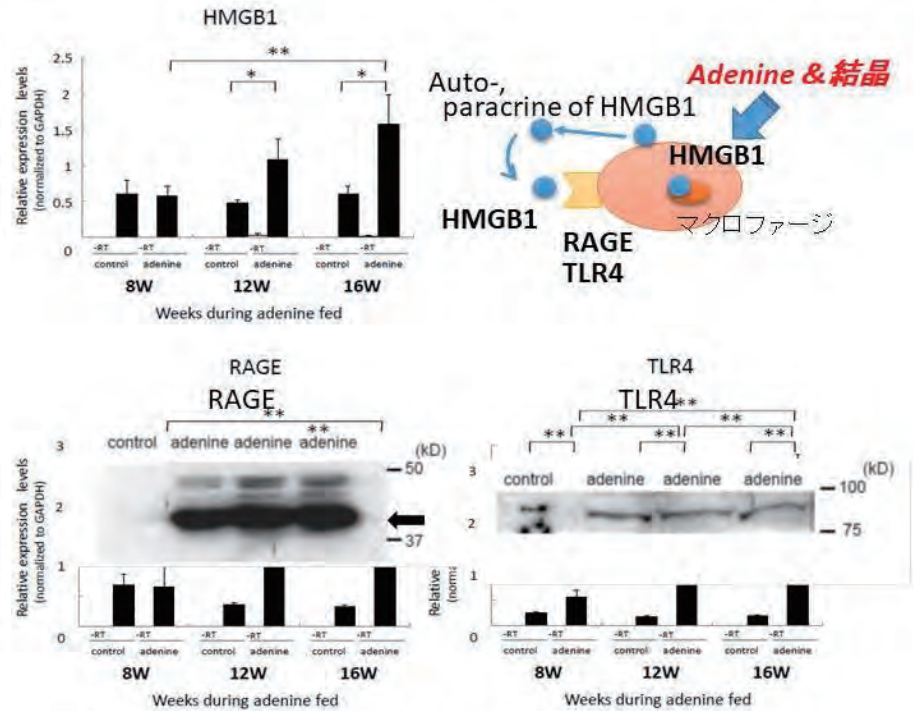


図4. アデニン投与による腎障害の分子細胞病態(推定)とHMGB1-RAGE/TLR4 axis

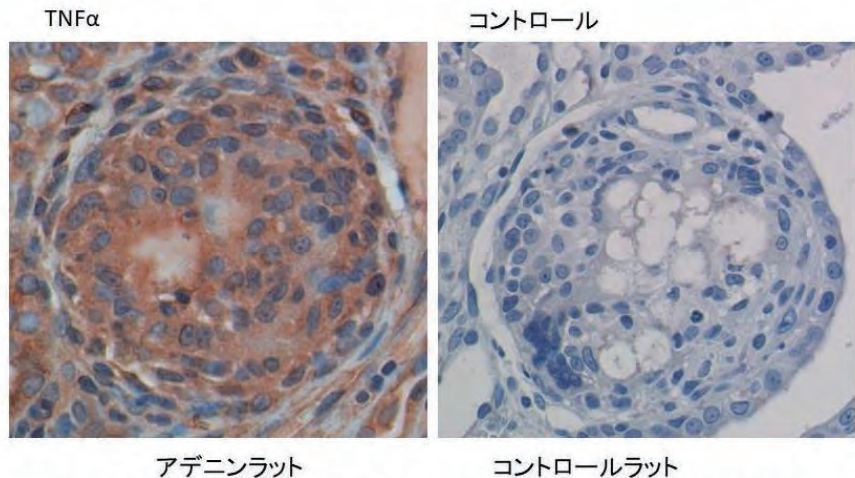


図5. アデニン投与腎不全ラットにおけるTNF α の強い発現

③グリチルリチンの効果、特に HMGB1 の3アイソフォームに対する分別的抑制効果

今回のアデニン慢性投与による HMGB1 を中核とした malignant inflammatory cycle, すなわち【アデニン→尿細管細胞→MCP-1、HMGB1 放出→RAGE, TLR-4 発現増強→単球集積→マクロファージへの分化→TNF α 、HMGB1 産生・放出】というサーキット形成による炎症の悪循環に対して、グリチルリチンが抑制的に働いていることは in vivo, ex vivo の実験から示唆されたが (図6)、果たして HMGB1 の3つのアイソフォームに対して分別して結合・抑制しているのか、否かについては、今回の実験では解明しきれなかった。これは HMGB1 の酸化還元型の厳密な調整が不完全であったためと考えられ、今後検討すべき課題として残った。

④アデニン投与ラットの腎機能不全

一方、アデニン投与ラットは多飲、多尿状態となり、Chronic Kidney Disease (CKD) 状態に陥ったが、これは尿細管へのアクアポリン1 (AQP-1) の発現低下によるものと考えられた (data not shown)。この AQP-1 の発現低下は五苓散投与で一部回復し、ラットの多飲・多尿は軽減した (図8)。

⑤残された課題

今回の実験では確かにグリチルリチンが、培養細胞系において HMGB1 による MCP-1 の発現放出を抑制したが、in vivo のアデニン投与 CKD モデルの病理病態軽減に関しては明確には確認しえなかった。さらにグリチルリチンによる HMGB1 isoform、すなわち全還元型、部分酸化型、全酸化型の分別抑制効果に関しても明確には証明し得なかった。

また、アデニンの慢性的投与により、ヒトにおける CKD 類似の病態を再現しえた。これは現在増加しつつある高齢者の高尿酸血症患者の CKD のモデルになりうるものと考えられた。そして、このような患者においては、高尿酸血症の治療とともに、グリチルリチン、あるいはグリチルリチンを含む漢方薬などの投与が腎機能障害の進行に抑制的に働く可能性が示唆されるものと考えられた。

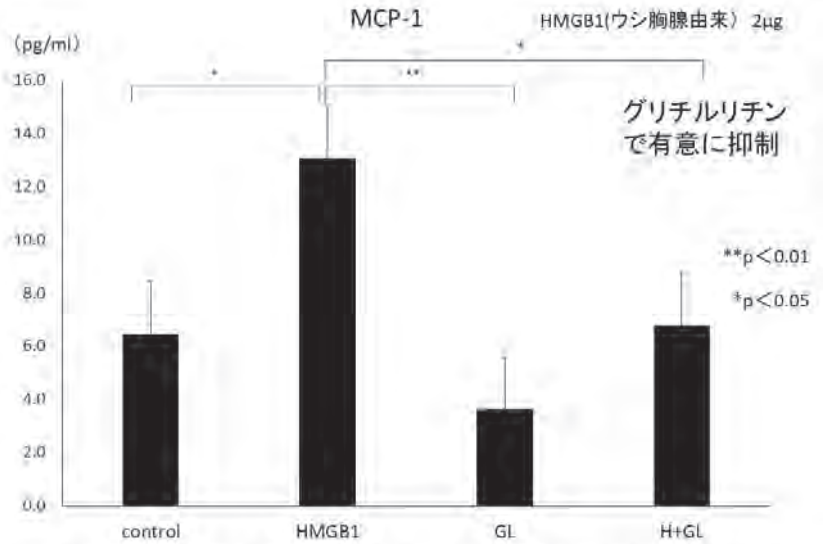


図6. HMGB1によるMCP-1の発現に対するグリチルリチンの抑制効果

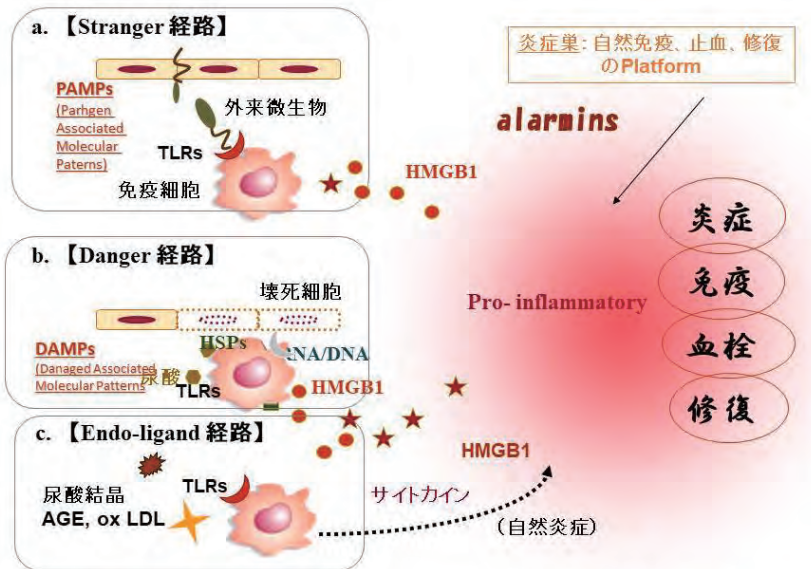


図7. アデニン腎症ラットにおけるDAMP:HMGB1の動態

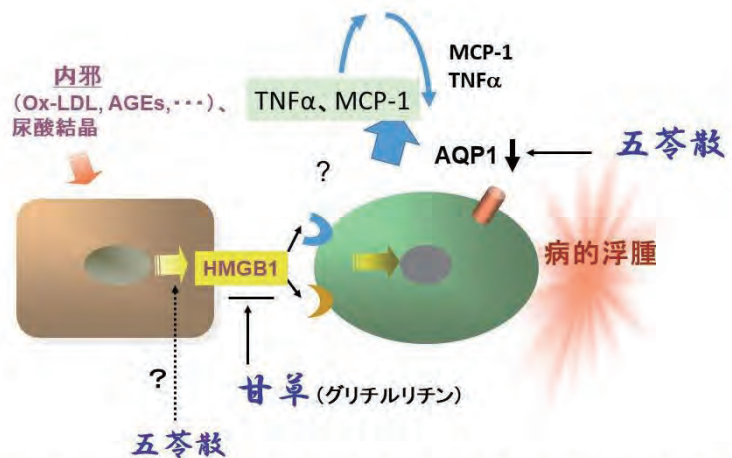


図8. 本モデルにおける腎病態・生理と漢方薬の効果: 五苓散と甘草の効果
甘草と五苓散の投与は本モデルにおける腎病変と尿量増加を抑制した。その作用モデル