

博士論文

論文題目 コンディショナルノックアウトマウスを用いた
HMGB1 の感染・炎症における役割の解析

氏 名 松田 淳志

| | |
|--|----|
| 要旨 | 1 |
| 第 1 章 序論 | 2 |
| 第 2 章 結果 | 10 |
| (1) $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{fl/fl}$ マウスを用いた LPS 誘導性エンドトキシンショックモデル での解析 | 10 |
| (2) HMGB1 によるインフラマソームの制御 | 14 |
| (3) HMGB1 のオートファジーにおける役割 | 16 |
| (4) 細菌感染における HMGB1 の役割 | 20 |
| (5) 全身性 $Hmgb1$ 遺伝子欠損マウスにおける LPS 誘導性エンドトキシンショックモデルの検討 | 22 |
| (6) HMGB1 の細胞遊走への関与 | 25 |
| 第 3 章 考察 | 29 |
| 図 | 40 |
| 材料・方法 | 69 |
| 謝辞 | 85 |
| 略語一覧 | 87 |
| 引用文献 | 91 |

要旨

炎症は病原体感染や外傷等に際して誘導され、生体の恒常性維持に寄与する一方、種々の炎症性疾患とも関連することが知られている。本研究では、炎症の制御という視点から注目されている HMGB1 (High-mobility group box 1) について、HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスを用い、LPS 誘導性エンドトキシンショック、及び感染応答における役割を解析した。その結果、ミエロイド系細胞特異的に HMGB1 を欠失させたマウスにより、細胞内 HMGB1 が炎症抑制・感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかとなる一方、全身性に欠失させたマウスにより細胞外 HMGB1 の炎症促進への関与が示された。

第 1 章 序論

炎症は細菌やウイルスなどの感染に際して、また外傷や過剰な細胞死を伴う応答に付随して誘導され、病原体の排除に寄与するだけではなく、臓器・組織の修復を促進するなど生体の恒常性を維持する上でも重要である¹⁻⁴。またその一方で、炎症は組織や臓器の破壊、過剰なサイトカイン産生等を誘導し、敗血症や自己免疫疾患など、種々の病態と深く関連することも報告されている^{1,5-8}。そのため、炎症応答の惹起とその制御機構を明らかにすることは、これらの病態発症の機序の解明に繋がるだけではなく、疾患の治療に向けた分子機構を考察する上で重要であると考えられる。

近年における自然免疫受容体やそのシグナル伝達機構についての解析から、外来病原体を認識し免疫応答を活性化する機構が急速に明らかになりつつある^{9,10}。これまでToll様受容体 (TLRs; Toll-like receptors) に代表されるような、シグナル伝達を担う種々の自然免疫受容体が同定されており、これらの受容体は病原体が有する特徴的な分子パターン (PAMPs; pathogen-associated molecular patterns) を認識し、インターフェロン制御因子 (IRFs; Interferon regulatory factors) やNF- κ B (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells) などの

転写因子群を活性化し、TNF- α (Tumor necrosis factor- α) やIL-6 (Interleukin-6)、IL-8といった炎症性サイトカインやケモカインを誘導することが知られている⁴。

一方、NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) やNLRC4 (NOD-like receptor family, CARD domain containing 4) などの自然免疫受容体はアダプタータンパクであるASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxyl-terminal CARD) と会合して、インフラマソームと呼ばれる集合体を形成する。このインフラマソームの形成により、pro-caspase-1やpro-caspase-11などのカスパーゼ前駆体のプロセッシングを介してpro-IL-1 β やpro-IL-18などの炎症性サイトカイン前駆体を成熟型のサイトカインへと変換することも広く知られている^{11,12} (図 1.1)。自然免疫系においてはこれら一連の受容体活性化により、好中球や単球、マクロファージの集積、食作用の増強、適応免疫系の活性化促進などを介して病原体などの排除に寄与するとともに、幹細胞の遊走等を促進し、組織の修復にも関与することが知られている^{1,3}。

一方で、このような応答機構の異常は、種々の疾患とも密接な関わりがあることが明らかとなりつつある。例えば、リポ多糖 (LPS; Lipopolysaccharide) に代表されるエンドトキシンに対する過剰な炎症応答、または重篤な細菌感染は、

サイトカインストームや敗血症などの症状を引き起こし、これらは時に致死性であることが知られている^{7,13}。また、TLR7の過剰な活性化やDNaseの欠失により、死細胞等から生じる不要な自己核酸の処理が適切に行われず、結果的に過度な炎症を伴う自己免疫疾患が発症することも報告されている^{14,15}。

このように炎症に関わる自然免疫受容体シグナルについて解析が進んできているものの、その全貌の解明には未だ程遠い状態である。実際、最近の解析により、自然免疫受容体は外来病原体に由来する分子だけではなく、自己に由来する分子をも認識することが明らかとなりつつある。HMGB1 (High-mobility group box 1) タンパクはその代表例であり、LPSやIL-1 β 、IFN- γ などの炎症性刺激によって、または細胞死などのダメージに伴って細胞外に放出されることからDAMPs (damage-associated molecular patterns) と呼ばれている¹⁶ (図 1.1)。特にHMGB1は炎症病態と密接な関わりがあることが指摘されており、大きく注目されている。

HMGB1タンパクはHMGB2、HMGB3とともにHMGBファミリーを構成するタンパクであり、ほ乳類から節足動物に至るまで様々な生物種で高度に保存されている¹⁷⁻¹⁹ (図 1.2)。HMGB1はN末領域にA-box、B-boxと呼ばれるDNA結合ドメ

インを、C末領域に酸性アミノ酸に富んだacidic tail構造を有する約30 kDaの低分子タンパクである¹⁷。HMGB2、HMGB3に限られた時期または組織でしか発現していないのに対し、HMGB1はほぼ全ての有核細胞において主に核内に恒常的に発現している^{18,20}。核内において、HMGB1はゲノムDNAのminor grooveをA-box及びB-boxのDNA結合ドメインで挟みこむように結合し、クロマチン構造を安定化させること、また、RAG1 (Recombination activating gene 1) やRAG2と共役し、抗体やT細胞受容体遺伝子の組換えに関与することが示唆されている²¹⁻²³。

このような核内における作用に加えて、HMGB1はその一部が細胞質にも存在し、機能することが明らかとなっている。当研究室における解析から、HMGB1は細胞質内において免疫原性核酸の認識機構に重要な役割を担っていることが明らかとなっている²⁴。また、細胞質内HMGB1はオートファジーにも関与していることを示す報告もある²⁵。核内HMGB1は炎症性刺激に伴い、細胞質に移行し、オートファジー形成に必須の分子であるBeclin-1 (Bcl-2 interacting coiled-coil protein) と結合してオートファジー誘導を促進するほか、ERK (Extracellular signal-regulated kinase) を活性化することでBcl-2 (B cell lymphoma-2) のリン酸

化を誘導し、Beclin-1からの解離を促進させることによってオートファジーを増強することが報告されている (図 1.3)²⁵。

このように、核内及び細胞質内の両方においてHMGB1は機能を持つことが知られているが、近年、細胞の壊死またはLPSや炎症性サイトカインの刺激に伴って、特にマクロファージなどの細胞においてHMGB1が核内より細胞外にまで放出され、炎症の促進に寄与することが注目されるようになってきた²⁶⁻²⁸。実際、組換えHMGB1タンパクはTLR2やTLR4、RAGE (Receptor for advanced glycation endproducts) といった自然免疫受容体を活性化し、TNF- α 、IL-6といった炎症性サイトカインを誘導することが示されている^{16,29}。またさらに、敗血症モデルにおいて抗HMGB1中和抗体の投与により末梢血中サイトカイン量が減少することが報告されていることから、細胞外HMGB1は*in vivo*においても同様の機構でseptic shockに関与していると考えられている³⁰。また、ヒストンや自己核酸、或いはIL-1 β 、CXCL12 (C-X-C motif chemokine 12) などのサイトカインやケモカイン、さらにはLPSなどと複合体を形成し、それらの作用を増強させることも報告されている^{31,32}。HMGB1はA-boxとB-boxにそれぞれ1つずつ (C23、C45) とさらに1つ (C106) 、計3つのシステイン残基を持ち、これらの酸化還元状態に依存し

て細胞外での機能が変化することが報告されている。すなわち、C23とC45間においてジスルフィド結合を形成し、かつC106が還元された状態では上述のように炎症性サイトカインやケモカインを誘導するのに対し、3つのシステイン残基全てが還元された状態では好中球などの細胞遊走を促進させるケモカイン様の活性を示すことが報告されている^{33,34}。このような翻訳後修飾の違いによってHMGB1は複数の作用を発揮し、炎症の促進に寄与していると考えられている。

このように、細胞外に放出されたHMGB1には炎症性サイトカインやケモカインの誘導を介して、または好中球などの炎症性細胞の集積を惹起して炎症を促進させる作用があることから、敗血症や関節リウマチ、自己免疫疾患などの病態を増悪させる要因の一つと考えられている³⁵⁻³⁷。実際、敗血症や種々の炎症性疾患の患者の血清には、健常者由来の血清と比較して多量のHMGB1が含まれていることが報告されており、また、敗血症のモデルの一つであるLPS誘導性エンドトキシンショックにおいて、抗HMGB1中和抗体やHMGB1に対する阻害剤の投与によりマウスの生存率が上昇することや、関節リウマチや腸炎など種々の疾患の病態を抑制することも報告されている^{31,38-41}。また、当研究室においてもHMGB1の機能を阻害するデコイオリゴ核酸ISM ODNを作製し、

このデコイ核酸がLPS誘導性エンドトキシンショックやヒトの多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE; experimental autoimmune encephalomyelitis) の病態を抑制することを見出している⁴²。

このように、HMGB1は細胞内外において様々な応答に関与し、その応答が種々の疾患とも関わりがあることから、HMGB1の生理的機能についてその詳細を明らかにしていくことは、HMGB1を標的とした薬剤の開発において重要な課題であると考えられる。しかしながら、*Hmgb1*遺伝子欠損マウスは生後間もなく低血糖により死亡することから、これまで遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルでの解析が行われておらず、HMGB1の病態における役割についてもマウス個体を用いた解析ができない状態であった⁴³。また、高純度に精製された組換えHMGB1タンパクにはサイトカインやケモカインの誘導能がないことなども報告されており、HMGB1の炎症促進作用について再検討が必要な状況が生じている⁴⁴⁻⁴⁶。

最近、当研究室において、*Hmgb1*遺伝子コンディショナルノックアウトマウスが樹立され、マクロファージなどのミエロイド系細胞群において*Hmgb1*を欠損させた*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl/f}*マウスの作製にも成功している。このマウスにおいて

はLysozyme Mプロモーターの制御下でCreリコンビナーゼが発現し、マクロファージや好中球でCreリコンビナーゼが発現するが、T細胞、B細胞、樹状細胞ではほとんど発現が見られないことが報告されている⁴⁷。これまでの解析から、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}*マウスでは、意外なことに、LPS誘導性ショックに対する生存率が低下するという予備的知見が少数のマウスを用いた解析から得られていた。しかしながら、その原因は不明なままであった。そこで、私はこの原因についてまず明らかにし、炎症・免疫応答におけるHMGB1の役割について、本マウスを用いてさらに解析を行うことにした。

第 2 章 結果

HMGB1 はマクロファージ等の細胞において、LPS 刺激時に細胞外に放出されることが知られており、また、マウスに LPS を尾静脈投与した際、末梢血中に HMGB1 が放出され、高いレベルで検出されること、抗 HMGB1 中和抗体または HMGB1 に対する阻害剤の投与によって LPS により誘導される炎症病態が抑制されることも報告されていた^{38,39}。一方で、これまでの当研究室における先行研究より、マクロファージを含むミエロイド系細胞群において *Hmgb1* を欠損させたマウス ($LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}$ マウス) に LPS を投与した結果、予想に反し、野生型コントロール群 ($LysM^{+/+}-Hmgb1^{ff}$) に比して $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}$ マウス群では生存率が低下する結果が得られていた⁴⁸。しかしながらそのメカニズムが不明であったため、さらに解析を行うことにした。

(1) $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}$ マウスを用いた LPS 誘導性エンドトキシンショックモデルでの解析

先行研究より、 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}$ マウスは野生型コントロールと比較し、LPS

投与によるショックに脆弱性を示す知見が得られている⁴⁸。私は本研究の遂行にあたりまず、LPS を尾静脈より投与した際の $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{f/f}$ マウスの生存率について再検討を行い、先行研究と一致した結果を得た (図 2.1 a)。またこのときの肺組織の HE 染色像から、 $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{f/f}$ マウス肺において炎症性細胞の顕著な集積が認められ、実際に炎症が亢進していることが観察された (図 2.1 b)。従って、HMGB1 はこれまでの報告からは予想できなかった、抗炎症に機能する可能性が考えられた。

この HMGB1 の機能について明らかにするため、まず、マクロファージなどのミエロイド系細胞群において、HMGB1 の欠失がミエロイド系細胞の分化等に影響を与え、それが LPS 誘導性エンドトキシンショックによる応答に関与している可能性があるのではないかと考え、検討を行った。検討に際し、チオグリコレート誘導性腹腔マクロファージを調製し、HMGB1 の発現について解析を行ったところ、 $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{f/f}$ マウス由来の腹腔マクロファージでは HMGB1 の発現は全く認められなかった (図 2.2 a)。一方で、本マウスの脾臓から単離した T 細胞、B 細胞においては、HMGB1 の正常な発現が認められたことにより、HMGB1 はマクロファージなどのミエロイド系細胞特異的に欠失していること

が確認された⁴⁸ (図 2.2 a)。次に、腹腔内、脾臓、末梢血、骨髄におけるミエロイド系細胞の細胞集団についてフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、野生型コントロール及び $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgbl^{ff}$ マウス間の比較において、単球やマクロファージ、好中球などの存在比率に特に異常は見られず、これらの細胞は正常に分化、分布しているものと考えられた (図 2.2 b)。最近の報告から、マクロファージには M1 型 (iNOS、IL-12p40 を発現) 及び M2 型 (ARG1、IL-10 を発現) の分化型があることが知られている^{49,50}。そこで野生型コントロール及び $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgbl^{ff}$ マウスから骨髄細胞を調製し、M1 型及び M2 型マクロファージに *in vitro* での培養系を用いて分化させ、qRT-PCR 法にて M1 型、M2 型遺伝子の mRNA の発現レベルを検討したところ、野生型コントロール及び HMGB1 欠失細胞間でこれらの mRNA の発現には差異はなく、HMGB1 が欠失していてもこれらの細胞の分化は正常に誘導されることが判明した (図 2.3)。以上の結果から、 $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgbl^{ff}$ マウスにおいて、HMGB1 はマクロファージなどミエロイド系細胞群特異的に欠失しており、各臓器におけるこれらの細胞の存在比率、細胞の分化は正常であることが明らかとなった。よって、LPS 誘導性エンドトキシンショックにおける $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgbl^{ff}$ マウスの脆弱性は、細胞の分化や存在比率の異常に起因するものではないことが示唆された。

次に、LPS 投与時の末梢血における炎症性サイトカイン量について検討を行った。LPS 投与後、血漿サンプルを調製し、TNF- α 、IL-6、IL-12p40 などの炎症性サイトカインの末梢血中濃度について ELISA 法を用いて検討を行った。これらのサイトカインは様々な炎症性疾患においてその病態を増悪させることが知られているが⁵¹⁻⁵³、その末梢血中でのレベルは野生型コントロール群と *LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{f/f}* マウス群において差異が認められなかった (図 2.4 a)。一方で、興味深いことに、IL-1 β 、及び IL-18 濃度は *LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{f/f}* マウスにおいて有意な増加が認められた (図 2.4 a)。IL-1 β 及び IL-18 の両方を欠失したマウスでは LPS 誘導性ショックモデルに対して抵抗性を示すことが報告されていることから、*LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{f/f}* マウスで IL-1 β 、IL-18 の産生が亢進したことは、LPS 投与時の生存率低下の原因の一つであると考えられた^{54,55}。

また一方で、このとき末梢血中に放出される HMGB1 についても ELISA 法を用いて検討を行ったところ、*LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{f/f}* マウス群において、野生型コントロールマウス群と比較し、若干の減弱は認めるものの、顕著な差は見いだすことができなかった (図 2.4 b)。従って、LPS 誘導性エンドトキシンショックモデルにおける末梢血中 HMGB1 はマクロファージなどのミエロイド細胞群のみに

由来するわけではないことが明らかとなった。これらことから、末梢血中 IL-1 β 及び IL-18 の増加は細胞外 HMGB1 の作用によるものではなく、細胞内 HMGB1 の機能によるものであることが示唆された。

(2) HMGB1 によるインフラマソームの制御

興味深いことに、LPS を投与した *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウスにおいて、末梢血中 IL-1 β 、IL-18 濃度が有意に増加していた (図 2.4 a)。先行研究より、IL-1 β 、IL-18 の産生には 2 つのシグナルが必要であることが知られている。1 つ目のシグナルでは TLRs などによる PAMPs の認識と pro-IL-1 β 、pro-IL-18 といった前駆体の産生が行われる。2 つ目のシグナルとしてインフラマソームと呼ばれる機構が関与しており、感染や炎症などに伴って細胞質内に形成されることが報告されている⁵⁶。代表例として細胞外 ATP が挙げられ、ATP がその受容体である P2X7 に作用して細胞から K⁺の流出を促進することが刺激となって、細胞質内にアダプタータンパクである ASC を介してインフラマソームというタンパク複合体が形成され、pro-caspase-1 を会合させることが知られている^{56,57}。会合した pro-caspase-1 は互いに自己消化することにより活性型 caspase-1 となり、pro-IL-1 β 、

pro-IL-18 をプロセッシングし、これらのサイトカインを成熟型へと変換させる

12。
。

HMGB1 とインフラマソーム活性化との関連について解析するため、
LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff} マウスから腹腔マクロファージを調製し、インフラマソームの
活性化を誘導する代表的な実験系として知られている LPS の前処理後に ATP 刺
激を行う系を用いてインフラマソームの活性化について検討を行った。まず、
LPS の前処理による IL-1 β 、IL-18 の mRNA の誘導、及び TNF- α 、IL-6、IL-12p40
の mRNA の誘導について、qRT-PCR 法を用いて検討したところ、それらの mRNA
の誘導には、野生型コントロール及び *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}* 細胞間において差が認
められず (図 2.5 a)、また、pro-IL-1 β 及び pro-IL-18 のタンパク発現量について
も検討を行ったところ、それらの発現にも差が無かった (図 2.5 b)。すなわち、
LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff} 細胞は LPS 刺激に正常に応答し、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 タンパ
クも正常に発現しているものと考えられた。次に、LPS の前処理後、ATP 刺激
を行い、培養上清中の IL-1 β 、IL-18 濃度を比較した。その結果、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}*
マウス腹腔マクロファージにおいて、IL-1 β 及び IL-18 の産生量に有意な増加を
認め (図 2.5 c)、インフラマソームの活性化の指標として用いられている活性型

caspace-1 についても、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}* マウス腹腔マクロファージにおいて増加が認められた (図 2.5 d)。このことはすなわち、HMGB1 欠失マクロファージにおいてはインフラマソームの活性化が亢進していることを示しており、HMGB1 は細胞内でインフラマソームの活性化を抑制することを示唆しているものと考えられた。

(3) HMGB1 のオートファジーにおける役割

これまでの解析から、インフラマソームの活性化が HMGB1 によって抑制されている可能性が示唆されたが、そのメカニズムはいったいどのようなものだろうか。最近の報告から、オートファジーがインフラマソームを制御することが明らかとなりつつあり、オートファジー誘導が減弱することによるミトコンドリアの品質管理の低下が活性酸素 (ROS; reactive oxygen species) の産生を亢進させ、インフラマソームの活性化に繋がることなどが報告されている^{58,59}。また、オートファジー誘導に必須の分子である、Beclin-1 や ATG16L1 (Autophagy-related protein 16-like 1)、LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) を欠失したマウスでは、LPS 投与時において末梢血中の

TNF- α 、IL-6 などのサイトカイン濃度には差がないものの、IL-1 β 及び IL-18 濃度が増加し、LPS 誘導性エンドトキシンショックモデルに高感受性を呈することが報告されている^{60,61}。また、HMGB1 は Beclin-1 と結合し、オートファジーを促進するという報告もある²⁵。これらの報告を合わせて考えると、LPS 刺激時において HMGB1 はオートファジーの促進に関与し、結果としてインフラマソームの活性化を抑制している可能性が考えられた。そこで、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}* マウス由来腹腔マクロファージを用いてオートファジーについて検討を行った。LC3 はユビキチン様タンパクとして同定され、特にオートファゴソーム膜に局在する膜結合型の LC3-II がオートファジーの誘導の指標として用いられている⁶²。そこで、腹腔マクロファージに LPS 刺激を行い、LC3-II の存在量を検討した。その結果、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}* マクロファージでは野生型コントロールの細胞と比較して LC3-II の存在量が有意に低下していることが判明し、HMGB1 が LPS 刺激時のオートファジー誘導に関与していることが見出された (図 2.6)。

さらに、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}* マクロファージでオートファジーの誘導が減弱していることを確認するために、腹腔マクロファージに LC3-GFP を発現させ、LPS 刺激時の LC3-GFP の凝集体形成を蛍光顕微鏡を用いて検討した。2 回検討を行

った結果、いずれの検討においても LC3-GFP を発現させただけで凝集体が多数観察されたため、ベクターの導入自体が刺激となってしまう可能性が考えられ、この系では評価することができなかった。

オートファジーの誘導の低下は、時に細胞死を誘導することが多く報告されている^{63,64}。実際に、炎症性刺激時においてオートファジーが ROS の産生を抑制して炎症を緩和させることや、飢餓ストレスを受けて自己タンパクを分解してアミノ酸を供給することで抗ストレス応答を引き起こし、細胞の生存に寄与していることが知られている。そこで次に、HMGB1 を欠失したマクロファージでオートファジー誘導が減弱しているなら、それに伴い細胞死が亢進しているのではないかと予想した。LPS 刺激に加えてカスパーゼ阻害剤である z-VAD-fmk を同時に添加しておくことで autophagic cell death が誘導されることが報告されており^{65,66}、この刺激において $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}$ マウス由来腹腔マクロファージの細胞死を検討したところ、細胞死が有意に亢進していることが示された (図 2.7 a)。また、 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}$ マウスの腹腔内に LPS を投与し、腹腔の細胞集団についてフローサイトメーターを用いて解析したところ、 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}$ マウスでは腹腔マクロファージの割合が顕著に低下していることが見出された

(図 2.7 b)。

オートファジーは様々な細胞種において機能することが知られている⁶⁷。このため、HMGB1 がオートファジーの制御を介してインフラマソームの活性化に関与しているのであれば、他の細胞種でも HMGB1 を欠失することで IL-1 β 及び IL-18 の産生が亢進するのではないかと予想した。このことについて検討するため、樹状細胞 (*Cd11c^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}*)、或いは肝細胞 (*Alb^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}*) において HMGB1 を欠失したマウスを作製し、それぞれのマウスに LPS の投与を行い、末梢血中のサイトカイン濃度について ELISA 法にて検討を行った。その結果、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}* マウスと同様に、TNF- α 、IL-6 及び IL-12p40 濃度には差異がなかったものの、IL-1 β 及び IL-18 濃度に有意な増加が認められた (図 2.8)。以上の結果もまた、HMGB1 がオートファジーを促進し、IL-1 β 及び IL-18 の産生を抑制している、という仮説を支持しているものと考えられる。これら一連の解析から、LPS 刺激時において HMGB1 はオートファジーの促進に関与し、細胞死やインフラマソームの活性化を抑制することが示唆された。

(4) 細菌感染における HMGB1 の役割

オートファジーは細菌感染に対する防御応答に重要であることが指摘されており、特にリステリア菌やサルモネラ菌、結核菌といった細胞内に侵入して増殖する細菌の排除に寄与していると考えられている^{61,68,69}。このような細胞内寄生細菌は、マクロファージなどにおいてファゴサイトーシスによって細胞内に取り込まれるが、細菌はファゴソームを破壊して細胞質内に侵入する。細胞質に侵入した細菌は、細胞質に形成されるオートファゴソームに再捕獲され、リソソームとの融合によりオートリソソームの形成を経て分解される⁷⁰。前節の結果から、HMGB1 欠失マクロファージではオートファジーの誘導が減弱することから、細菌の排除を効率的に進めることができず、細菌が増殖しやすくなり、結果として HMGB1 欠失マウスは感染に対して脆弱になると考えられた。このことを検討するため、細胞内寄生細菌であるリステリア菌の感染モデルを用いて解析を行った。野生型コントロール及び $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ マウスにリステリア菌を腹腔内投与により感染させ、その生存率について検討した。その結果、 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ マウスはリステリア菌感染に対して脆弱性を示すことがわかった(図 2.9 a)。この時、脾臓及び肝臓を採取し、臓器におけるリステリア菌のタイターを測定したところ、野生型コントロール群と比較して $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$

マウス群の脾臓と肝臓それぞれにおいて、リステリア菌増殖の有意な増加が見られた(図 2.9 b)。

またさらに、リステリア菌感染時のオートファジー誘導について解析するため、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}* マウスより調製した腹腔マクロファージにリステリア菌を感染させ、LC3-II の存在量を検討した。その結果、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}* マクロファージでは LC3-II の存在量が有意に減少しており、オートファジーの誘導に減弱が認められた (図 2.10 a)。一方で、リステリア菌感染によって誘導される炎症性サイトカインの mRNA 量には差が見られず、野生型コントロール細胞と *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}* マクロファージにおいてリステリア菌の感染によるサイトカイン mRNA の誘導は正常に起きることが明らかとなった (図 2.10 b)。

HMGB1 は通常多くが核に存在しているが、オートファジーは細胞質で起きるため、LPS 刺激やリステリア菌感染時には HMGB1 が細胞質に移行し、機能していることが予想された。そこで LPS 刺激、またはリステリア菌感染時の HMGB1 の局在について免疫染色にて検討した。その結果、定常状態で核内に多く存在している HMGB1 が、これらの刺激・感染時には細胞質に分布することが観察された (図 2.11)。興味深いことに、DNA を検出する DAPI 染色と HMGB1

の免疫染色を同時に行ったところ、リステリア菌に由来すると思われる細胞質内の DNA スポットに HMGB1 が共局在する像が観察された(図 2.11 矢印)。

HMGB1 はリステリア菌周囲に集積し、オートファゴソームの形成等に関与している可能性が示唆される。これらの検討から、LPS 刺激またはリステリア菌の感染に伴って HMGB1 は細胞質内に移行し、オートファジーの誘導促進に関与していることが示唆された。

上記の一連の解析から、 $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{f/f}$ マウスでは、マクロファージなどの細胞においてリステリア菌感染に際し、オートファジー誘導の減弱により菌を効率的に排除できず、菌の大量増加を伴い、脆弱性を示したものと考えられた。

(5) 全身性 *Hmgb1* 遺伝子欠損マウスにおける LPS 誘導性エンドトキシンショックモデルの検討

前述までの結果から、マクロファージなどミエロイド系細胞において HMGB1 を欠失させたマウスにおいては、予想に反し、LPS 誘導性ショックに脆弱性を示すことが明らかとなった。またその際、末梢血中 HMGB1 量には野生型コン

コントロールと比較して顕著な差が認められず、脆弱性は細胞内 HMGB1 の機能の喪失によるものと考えられた。従って、末梢血中に放出される HMGB1 はミエロイド系細胞以外の細胞・臓器によってその多くが担われていると考えられる。

そこで、末梢血中に放出された HMGB1 が炎症や病態においてどのような機能を有するかを検討するために、全身性に HMGB1 の発現を欠失させたマウスを作製することにした。まず、*Hmgbl*^{ff}マウスを CAG-*Cre* マウスと交配し、胚発生の段階で全身性に HMGB1 を欠失するマウスを作製したところ、過去のコンベンショナルな *Hmgbl* 遺伝子欠損マウスの報告から予想されるように、本マウスは6週齢までに全て死亡することがわかった (図 2.12)。そこで次に、タモキシフェン依存的に全身性に HMGB1 を欠失できる *Cre-ER*^{T2+}-*Hmgbl*^{ff}マウスを用いて検討を行うことにした。実際に本マウスを用いて各臓器で HMGB1 の発現を欠失させることができることがわかっており⁴⁸ (図 2.13)、また、タモキシフェン投与後、半年間の経過観察を行ったが、マウスが死亡する等の異常は見出されなかった。

そこで、このマウスを用いて LPS 誘導性エンドトキシンショックに関する検討を行った。まず末梢血中に放出される HMGB1 について ELISA 法を用いて検

討したところ、 $Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{ff}$ マウスにおいて、野生型コントロール ($Cre-ER^{T2-}-Hmgb1^{ff}$) に比して HMGB1 濃度が顕著に低下することが判明した (図 2.14 a)。このような条件下において $Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{ff}$ マウスの生存率ならびに末梢血中サイトカインについて検討した。その結果、 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}$ マウスで見られた結果とは異なり、 $Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{ff}$ マウスでは野生型コントロールとほぼ同じ生存率を示すことが判明した。そして末梢血中における $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-12p40$ といったサイトカインの発現誘導にも差異は見出されなかった (図 2.14 b)。一方で、 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}$ マウスでの検討結果と同様に、末梢血中 $IL-1\beta$ は、野生型コントロールと比較して $Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{ff}$ マウスでは有意に高いレベルで検出された (図 2.14 b)。

以上の結果から、全身性に HMGB1 を欠失させたマウスにおいて、LPS 投与によって血中に放出される HMGB1 が顕著に減少することが明らかとなった。このように血中の HMGB1 濃度が顕著に低下するにもかかわらず、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-12p40$ 濃度、及び生存率は野生型コントロールと比較して有意な差が認められなかった。これまでの報告から予想される現象とは異なり、HMGB1 はこれらのサイトカイン産生には寄与しないことが示唆される。一方で、

Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f} マウスにおいては *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}* マウスと同様に、末梢血中 IL-1 β の産生に亢進が認められた (図 2.14 b)。この際、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}* マウスは野生型コントロールより LPS 誘導性エンドトキシンショックに脆弱性を示すことを考えると (図 2.1 a)、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウスのは野生型コントロールと同程度にショックに抵抗性を示した、とも考えることができる。そして、末梢血中の HMGB1 量が減少していることがこの抵抗性に寄与している可能性があると考えられる。

(6) HMGB1 の細胞遊走への関与

上述の結果から、末梢血中に放出された HMGB1 は LPS 誘導性エンドトキシンショックに対する脆弱性に関与することが示唆された。従って、細胞外に放出された HMGB1 のどのような機能がこの脆弱性に関与するのか、さらに解析することにした。HMGB1 は炎症性サイトカイン産生の促進に寄与する他に、好中球等の炎症性細胞の遊走・浸潤にも関与することが報告されている^{33,34}。そこで次に、HMGB1 の炎症性細胞の遊走・浸潤における役割について検討することにした。まず、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウスに LPS を投与して 4 時間後に肺を採取

し、細胞集団をフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウス由来の肺では野生型コントロールに比して、好中球を含む CD11b⁺細胞集団の割合が減少することが判明した (図 2.15)。一方で、減少が見られた CD11b⁺細胞集団において、好中球 (CD11b⁺Ly6G⁺) と単球 (CD11b⁺Ly6C⁺) の割合を検討したところ、野生型コントロールと比較し、これらの細胞集団の割合自体には差は見られなかった (図 2.15)。すなわち、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウスでは、特定の細胞集団ではなく、CD11b⁺細胞全体の浸潤が低下していることが明らかとなった。この原因について CD11b⁺細胞自体の遊走能が減弱している可能性、肺における CD11b⁺細胞の遊走に関わるケモカインの産生が減弱している可能性、そして細胞外 HMGB1 が CD11b⁺細胞の遊走を促進しているという3つの可能性が考えられたため、続いてこれらを検討した。HMGB1 を欠失したことにより、ケモカイン受容体等の発現等、CD11b⁺細胞自体に異常があることが考えられたため、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウスの骨髓より好中球を調製し、*Cxcr1*、*Cxcr2*、*Cxcr4* の発現を qRT-PCR 法にて検討したところ、これらのケモカイン受容体の発現は正常であった (図 2.16 a)。同じく好中球を用いて migration アッセイを行ったところ、HMGB1 を欠失した好中球は、rCXCL1、fMLP に野生型コントロール細胞と同程度に応答し、遊走することが見出された

(図 2.16 b)。HMGB1 欠失好中球はケモカイン等に正常に応答することができる
と考えられた。従って、*Cre-ER^{T2+}-Hmgbl^{ff}* マウス肺において CD11b⁺細胞の浸潤
が減弱する原因は、浸潤する細胞側にあるのではないことが示唆された。次に、
LPS 投与後のマウス肺から total RNA を調製し、ケモカイン遺伝子の発現を検討
したところ、これらの遺伝子の発現は野生型コントロール及び
Cre-ER^{T2+}-Hmgbl^{ff} マウス間において差が認められなかったが (図 2.17)、興味深
いことに、高純度に精製した rHMGB1 を野生型マウスに投与した際、肺におけ
る細胞集団をフローサイトメーターにて解析したところ、rHMGB1 投与群にお
いて CD11b⁺細胞の割合が増加する結果が得られた (図 2.18)。

以上の結果より、LPS 投与時に細胞外に放出された HMGB1 は好中球等の炎
症性細胞の遊走に關与する可能性が考えられた。この作用の低下により、
Cre-ER^{T2+}-Hmgbl^{ff} マウスは *LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{ff}* マウスと比較して、LPS 誘導性エ
ンドトキシンショックに対してより抵抗性を示すようになった可能性が考えら
れる。HMGB1 がどのように CD11b⁺細胞の遊走に關わっているのか、その詳細
は不明であり、今後明らかにしていきたい課題であると考えている。

以上の結果のうち、図 2.11、図 2.16、図 2.17 の結果は安健博 博士 (東京大

学生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門) の御協力により得られた。

第3章 考察

HMGB1 は敗血症や種々の炎症性疾患の患者の血清中に高値に検出され、病態の悪化に関与すると考えられており、HMGB1 中和抗体の投与によりこれらの病態が抑制されることから、治療標的の一つとして注目がなされている。そのため、HMGB1 の病態における機能について精力的な解析が為され、TLRs など自然免疫受容体シグナルを活性化し、炎症を促進する作用を有していることが示されるに至った。これらの検討では、大腸菌における発現系を用いて精製された組換え HMGB1 タンパクが用いられてきたが、HMGB1 には LPS と結合しやすい性質があり⁷¹、最近の解析では、高純度に精製され LPS を含まない組換え HMGB1 タンパクには、炎症性サイトカインの誘導能が無いことなどが示されている⁴⁴⁻⁴⁶。このように、HMGB1 が炎症を誘導しうるかどうかについてはまだ結論が出ておらず、さらなる検討が必要である。また一方で、コンベンショナルな *Hmgb1* 遺伝子欠損マウスは生後間もなく死亡してしまうことも報告されている。このような状況から、HMGB1 の炎症、疾患における生理的機能・役割については未だ多くが不明なままであった。そこで私は本研究において、当研究室で近年樹立された *Hmgb1* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス

を用いて、HMGB1 の生理的機能・病態における役割について検討を行った。

HMGB1 は LPS 刺激に伴ってマクロファージなどのミエロイド系細胞から主に放出され则认为られていた。ミエロイド系細胞群において HMGB1 を欠失するマウス ($LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{ff}$ マウス) を作製し、LPS 誘導性エンドトキシンショックモデルを用いて検討を行ったところ、予想に反し、このマウスは末梢血中 IL-1 β 、IL-18 濃度の増加を伴い、脆弱性を示した (図 2.1 a)。また、このとき、LPS 投与により末梢血中に放出される HMGB1 量は野生型コントロールと比較して若干の減少は認められるものの、顕著な減少は見られなかった。LPS 刺激には様々な細胞が応答することが知られているので、末梢血中 HMGB1 はミエロイド系細胞群のみによって主に担われているわけではなく、全身の様々な細胞から放出されている可能性が考えられる。実際、肝細胞や血管内皮細胞などで特異的に HMGB1 を欠失させたマウスに LPS 誘導性エンドトキシンショックを行った場合も、末梢血中での HMGB1 濃度は $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{ff}$ マウスと同様に、有意差はないもののわずかながら低下するという予備的知見を得ている。

このように $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{ff}$ マウスにおいて、末梢血中の HMGB1 濃度には大きな減少が見られなかったので、マウスの脆弱性は細胞内の HMGB1 の機能の

喪失によるものではないかと考えられた。IL-1 β 、IL-18 はインフラマソームの活性化に伴って caspase-1 によるプロセッシングを受け、放出されることが知られているが、最近の報告では LPS 誘導性エンドトキシンショックモデルにおいて caspase-11 を介したインフラマソーム経路がその病態の悪化に重要な役割を果たすことが示されており、caspase-11 には NLRP3 インフラマソーム非依存的な IL-1 β 誘導経路と細胞死誘導経路を持つことが報告されている¹¹。一方で *in vitro* においては IL-1 β 産生に caspase-1 が必須の役割を担うことが知られているなど、caspase-1 と caspase-11 の両方がインフラマソームの活性化に重要であると示唆されているが、これらがどのように LPS 誘導性エンドトキシンショックモデルの病態に寄与しているのか、その全貌は依然として明らかではなく、今後の重要な課題の一つであると考えられる。本研究において、HMGB1 はこのような caspase-1 または caspase-11 を介したインフラマソームの活性化の制御に関与していることが明らかとなった。また、LPS 刺激時のインフラマソーム活性化制御にオートファジーが関与していることが報告されており^{60,61}、実際、HMGB1 欠失マクロファージにおいて LPS 刺激時のオートファジーに減弱が見られ、インフラマソームの活性化にも亢進が見られたことから、細胞内 HMGB1 はオートファジーを介してインフラマソームを制御していることが示唆された。オー

トファジーはストレスを受けた際、ミトコンドリアの品質管理を行い、ROS の過剰産生を抑制する役割があることが指摘されており^{58,59}、ROS の産生を抑制することでインフラマソームの過剰活性化を防いでいると考えられているため、HMGB1 がオートファジーを介してこのような過程を制御することにより、インフラマソームの活性化を抑制しているのではないかと考えられる。一方で、HMGB1 欠失マクロファージでは LPS 刺激時の細胞死が亢進することも明らかとなった。この細胞死にもオートファジーが関与することが指摘されているが、このように細胞死が亢進することにより、死細胞から放出された分子群が DAMPs として周囲の細胞に作用し、インフラマソームを活性化している、という可能性も考えられる。HMGB1 によるオートファジー制御の詳細な機構、或いは、HMGB1 がオートファジー非依存的な系に関与してインフラマソームの活性化制御を行っている可能性など、今後詳細を明らかにしていきたい課題であると考えている。尚、当研究室における先行研究においても *LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{fl/f}* マウスは LPS 誘導性エンドトキシンショックに脆弱性を示すという予備的知見が得られており、本研究での最初の検討においても類似の検討において同様の結果を得ることができた。しかしながら、先行研究では腹腔内投与であったのに対し、初期のサイトカイン産生の検討において再現性を得やすいという理由か

ら本研究では尾静脈投与で行ったため、実験条件が全く異なる。また、先行研究では LPS 投与量が 1.0 mg/20 g weight と多量に投与しなければマウスが死亡せず、このような多量投与のプロトコルは他に類を見ない。これについては C57BL/6J マウスとの交配がほとんど進んでおらず、129/Ola マウスの遺伝的背景の影響を大きく受けている可能性があったため、本検討では C57BL/6J 背景を持つマウスと 6 回掛け合わせたマウスを用いて検討を行った。さらに、先行研究では LPS 投与時に末梢血中 TNF- α 量が増加することを示したが、本研究では TNF- α の産生には全く差が無いことを示し、また、先行研究では検討していなかった IL-1 β 、IL-18 産生が亢進していることを明らかにしたものであり、結論も異なっている。先行研究において TNF- α の産生の検討は C57BL/6J マウスとの交配がほとんど進んでいないマウスを用いて限られた回数のみ行われた検討であることが差異に繋がった原因として考えられるが、詳細は不明である。本研究は交配が進んだマウスを用いて行われたものであり、再現性もきわめて良い。

以上のことから、本研究は先行研究と比較し、マウスの LPS 誘導性エンドトキシンショックにおける脆弱性、という表現型は一致するものの、アプローチ及び結論が全く異なるものである。

オートファジーはほとんどの真核細胞に備わっているシステムであり、自食作用と呼ばれるように、不要となった自身のタンパクやオルガネラを分解し、飢餓時にはそのような分解産物を再利用するための機構であることが知られている。一方で、オートファジーは細菌の排除に機能することも報告されており、リステリア菌などの種々の細胞内寄生細菌の排除に重要であることが知られている⁶⁷。本研究における解析から、リステリア菌感染時において、HMGB1 欠失マクロファージではオートファジー誘導に減弱が認められ、また本マウスはリステリア菌の多量の増殖を伴い、感染に対して脆弱性を示すことが明らかとなった。従って、HMGB1 はオートファジーの制御を介して感染防御にも役割を担っていることが明らかとなった (図 2.9 a, b)。興味深いことに、リステリア菌感染時において、HMGB1 は細胞質内にスポット状の局在を示すことがわかった (図 2.11)。このスポットは菌に由来する DNA と共局在すると考えられたが、このスポットがオートファジーマーカーとも共局在するかどうか、興味ある課題であると考えている。また、HMGB1 は LPS だけではなく、他の菌体成分とも結合する可能性もあるのではないだろうか。もしそのようなことがあるとすれば、HMGB1 はリステリア菌の表面分子と結合し、細胞内においてユビキチン化のような目印として、或いは菌が細胞外に放出された際、食細胞に

よる取り込みを促進する目印として、菌の排除に寄与している可能性が考えられる。これらの可能性についても今後検討して行きたいと考えている。またさらに、LPS 刺激に伴って核内の HMGB1 はアセチル化やリン酸化等の翻訳後修飾を受け、細胞質に移行することが報告されているが⁷²、細菌感染そのものによる核から細胞質への移行についてはこれまで報告が無く、検討がなされていない。従ってどのようなシグナルによってこの細胞質への移行が制御されているのか、またその際の HMGB1 の修飾等について明らかにすることで、感染症に対する薬剤の開発に繋がる可能性も考えられる。これらについても今後検討を行っていきたい。

以上のように、細胞内の HMGB1 は炎症抑制、感染防御に重要な役割を担っていることが本研究の解析から明らかとなった (図 3.1)。ミエロイド系細胞群において HMGB1 を欠失したマウスにおいても、LPS 投与時に末梢血中において HMGB1 量の顕著な増加が起きることが判明したことから、本マウスを用いて細胞外 HMGB1 の機能についてアドレスすることは困難であることが判明した。そこで、タモキシフェン依存的に全身性に HMGB1 を欠失する *Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{fl/f}* マウスを用いて解析を行った。コンベンショナルな *Hmgb1* 遺

伝子欠損マウスは生後すぐに死亡することが報告されており、また、発生初期において全身性に HMGB1 を欠失する CAG-*Cre* マウスとの交配においてもマウスを得ることができなかったため、全身性に HMGB1 を欠失させることは難しいと考えられたが、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウスではタモキシフェン投与により全身性に HMGB1 を欠失させることができ (図 2.13)、マウスはその後も生存し続け、目立った異常は認められなかった。コンベンショナル *Hmgb1* 遺伝子欠損マウスは肝酵素の発現異常による低血糖により死亡すると考えられているが、興味深いことに、肝細胞特異的に HMGB1 を欠失するマウス (*Alb^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}* マウス) は正常に発育することを見出している。また、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウスにおいても肝臓における HMGB1 の発現は顕著に低下していた⁴⁸。従って、HMGB1 欠失マウスの致死性は肝酵素の発現異常ではない可能性がある。コンベンショナル *Hmgb1* 遺伝子欠損マウスがなぜ致死性を示すのかという点について、胚発生における HMGB1 の機能など、今後明らかにしていきたいと考えている。

タモキシフェン依存的に HMGB1 を全身性に欠失するマウスを作製し、LPS 誘導性エンドトキシンショックモデルについて検討を行ったところ、本マウスでは末梢血中に放出される HMGB1 量に顕著な減少が見られた。一方でこのよ

うな状況であるにも関わらず、このマウスは野生型コントロールと同程度の生存率を示した。本結果から、末梢血中に放出された HMGB1 は、一見してマウスの生存率に全く影響を及ぼしていないように考えられた。しかしながら、*LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{ff}* マウスは IL-1 β の高産生を伴って全例死亡したことを考慮すると、全身性での HMGB1 欠失マウスはミエロイド系細胞において HMGB1 を欠失させたマウスと比較し、生存率が上昇した、と捉えることもできる。では、細胞外に放出された HMGB1 は炎症にどのように関与しているのだろうか。

HMGB1 は好中球等の炎症性細胞の遊走に関与することも報告されており、実際に *Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{ff}* マウスにおいて好中球を含む CD11b⁺ 細胞の肺への浸潤が低下していることを見出した。LPS の投与により損傷を受けた肺から放出された HMGB1 がこれらの細胞の浸潤に関与していることが考えられる。次に、どのような機構によって HMGB1 は CD11b⁺ 細胞の浸潤に関与しているのだろうか。

興味深いことに、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{ff}* マウスにおいて、肺への浸潤の低下は好中球のみではなく、単球など CD11b⁺ 細胞全体において見られた。このことから、HMGB1 は特定の細胞種の遊走に関与する、というよりは、血管内皮細胞等に作用し、種々の細胞の浸潤を促進している可能性が考えられる。この機構の詳細について、今後は是非明らかにしていきたい。

Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{fl/fl} マウスにおいてなぜ生存率が上昇するのか、なぜ $CD11b^+$ 細胞の浸潤が低下するのか、細胞外に放出された HMGB1 の標的細胞は何か、また、HMGB1 は単独で作用しているのか、或いは他の因子と共役して作用するのか等、未解決な課題が多々残されている。今後、これらについて解析し、HMGB1 の生理的機能や病態における役割について明らかにしていきたい。

HMGB1 は炎症性刺激や病原体感染に伴って細胞外に放出され、複数の自然免疫受容体を活性化することで、炎症の促進、病態の増悪に寄与すると考えられてきた。*Hmgb1* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを用いた本研究の解析から、末梢血中に放出された HMGB1 は、 $CD11b^+$ 細胞の遊走に関与するなど、炎症と関わりがあることが強く示唆された。一方で、本マウスを用いた解析により、これまで予期できなかった細胞内 HMGB1 の炎症抑制、感染防御における作用が明らかになった (図 3.1)。このように、HMGB1 は細胞内外において様々な機能を有するため、*Hmgb1* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを用いて得られた表現型の解釈は慎重に行わなければならないことがわかった。

今後、LPS 誘導性エンドトキシンショック時に HMGB1 を主に放出する細胞群の特定を行い、その細胞において HMGB1 を欠失させたマウスを用いるなどの工夫を行うことで、細胞外 HMGB1 の機能に焦点を当て、炎症応答における役

割、病態への関与について明らかにしていきたいと考えている。

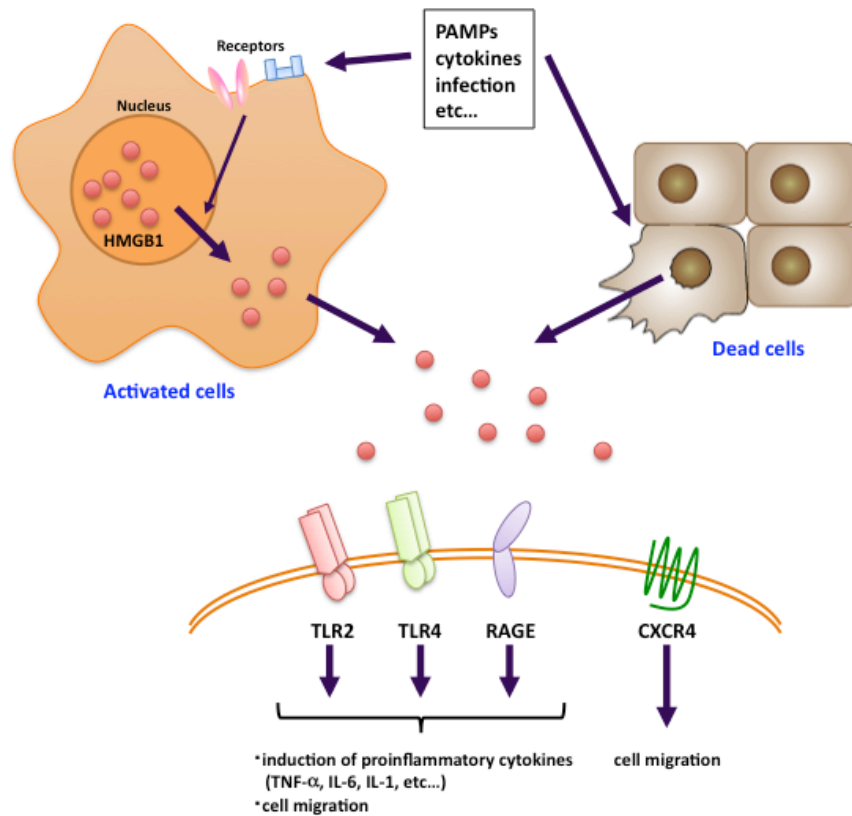


図 1.1 HMGB1 の放出と細胞外 HMGB1 の機能

核内 HMGB1 は炎症性刺激等を受けて細胞質に移行し、細胞外に能動的に放出、または感染や炎症によって生じた死細胞から受動的に放出される。細胞外 HMGB1 は DAMPs として表中に示した複数の自然免疫受容体を介して炎症性サイトカインの産生、炎症性細胞の遊走に関与していることが知られている。

略語：HMGB1; High-mobility group box 1, PAMPs; Pathogen-associated molecular patterns, DAMPs; Damage-associated molecular patterns, TLR; Toll-like receptor, RAGE; Receptor for advanced glycan endproducts, CXCR4; C-X-C motif chemokine receptor 4.

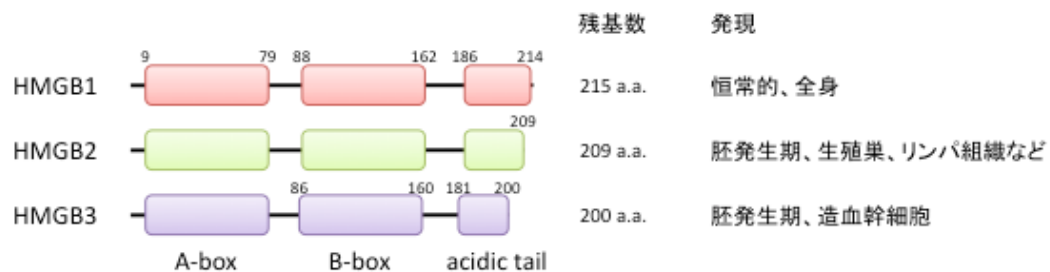


図 1.2 HMGB ファミリータンパク

HMGB ファミリーは HMGB1、HMGB2、HMGB3 の 3 つの高い相同性を持つタンパクからなり、N 末に DNA 結合ドメインである A-box、B-box を、C 末に酸性アミノ酸に富んだ acidic tail を有する。HMGB1 は恒常的に全身の細胞に発現するが、HMGB2 は胚発生期にはほぼ全細胞に発現するが、成体では生殖巣・胸腺などに限られる。HMGB3 は胚発生期に発現が限られることが報告されている。
略語：HMGB; High-mobility group box, a.a.; Amino acids.

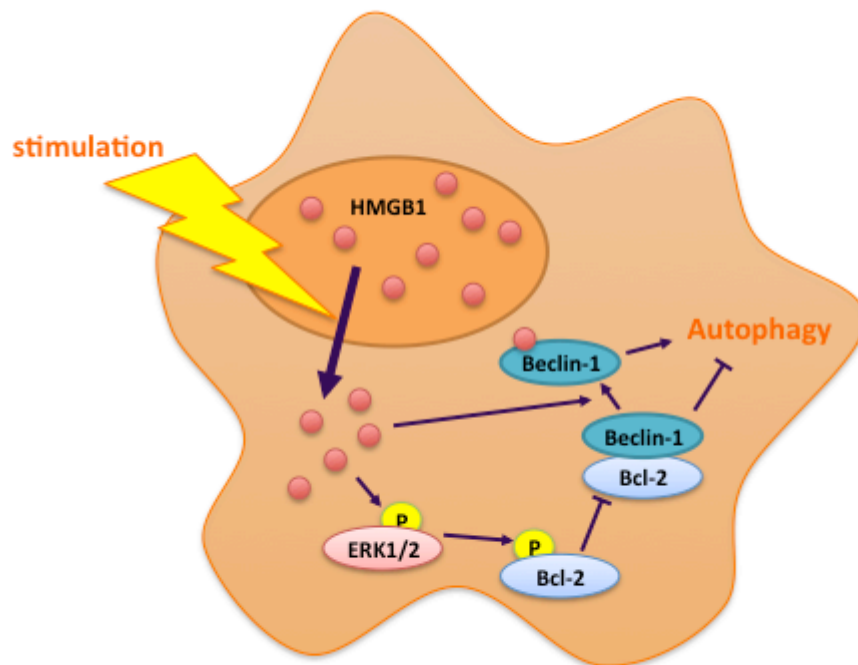


図 1.3 炎症性刺激等における細胞内 HMGB1 のオートファジーの促進
核内 HMGB1 は炎症性刺激等を受けて細胞質に移行し、Beclin-1 と結合してオートファジー誘導を促進する。また、細胞質に移行した HMGB1 は ERK1/2 をリン酸化することで、Beclin-1 と結合してその機能を抑制している分子である Bcl-2 のリン酸化を誘導し、Beclin-1 からの解離を促進させてオートファジーを増強する。図中の P はリン酸化修飾を示す。

略語：HMGB1; High-mobility group box 1, ERK1/2; Extracellular signal-regulated kinase 1/2, Bcl-2; B cell lymphoma-2, Beclin-1; Bcl-2 interacting coiled-coil protein.

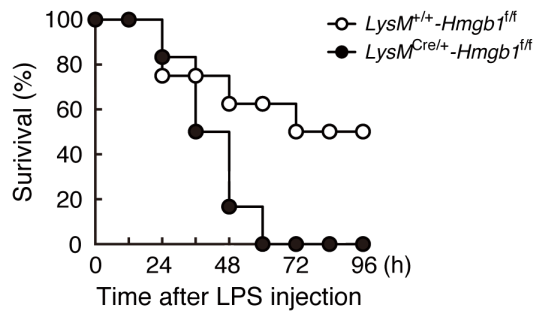
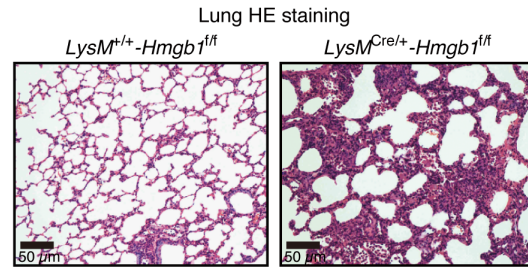
a**b**

図 2.1 LPS 投与時の *LysM*^{Cre/+}-*Hmgb1*^{f/f} マウスの生存率と肺における炎症像
(a) 野生型コントロールマウス (N = 8) と *LysM*^{Cre/+}-*Hmgb1*^{f/f} マウス (N = 6) に LPS (17.5 mg/kg) を尾静脈より投与し、12 時間ごとに経過観察を行った。マウスは 8~12 週齢で、同じ親由来の仔を用いた。
(b) *LysM*^{Cre/+}-*Hmgb1*^{f/f} マウスに LPS (17.5 mg/kg) を尾静脈より投与し、12 時間後のマウス肺を採取し、4% PFA で固定後、組織切片を作製して HE 染色を行った。マウスは同腹仔を用いた。スケールバーは 50 μm を示す。

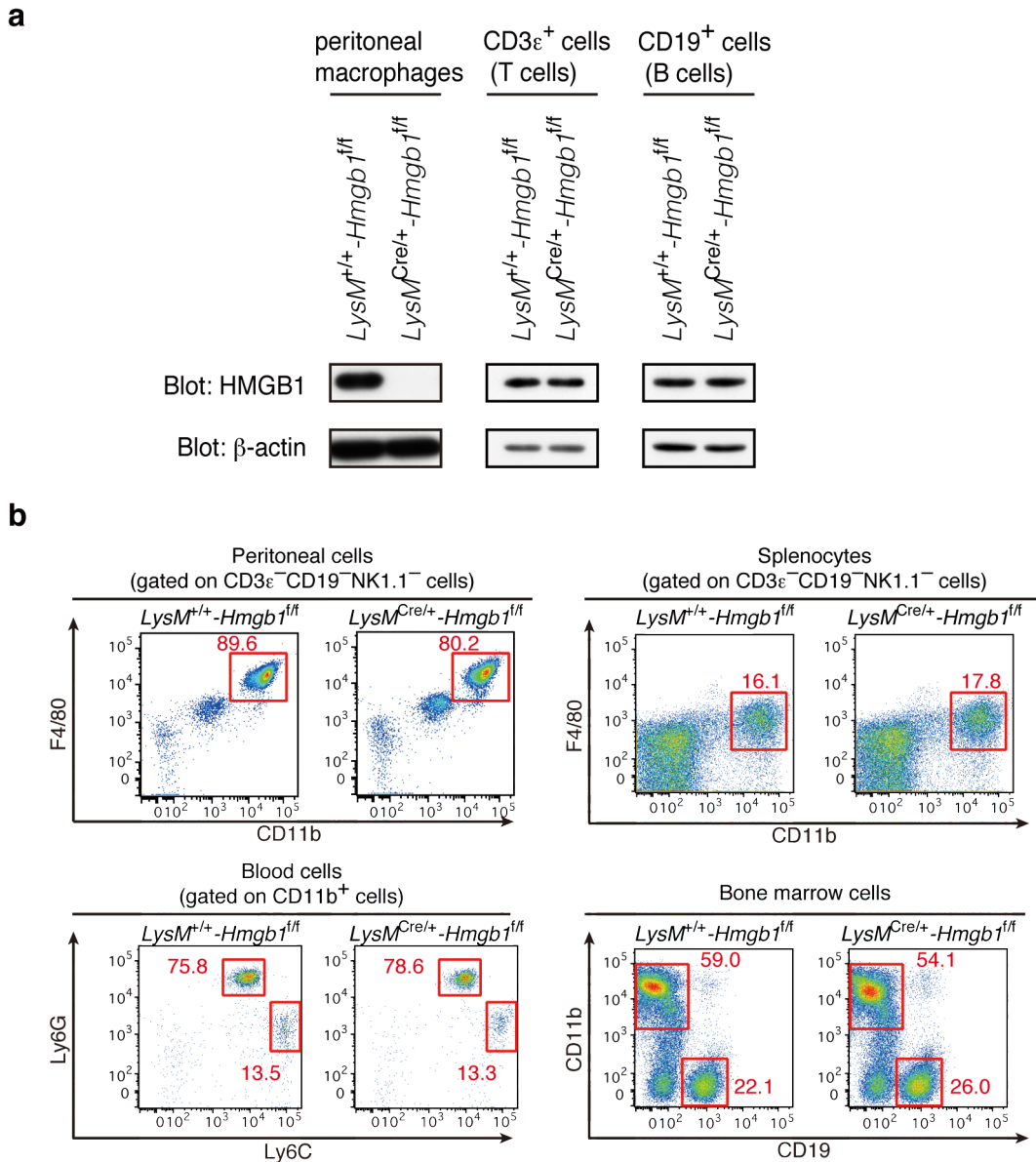


図 2.2 *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウスの血球系細胞における HMGB1 の発現解析
 (a) *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウスからチオグリコレート誘導性腹腔マクロファージ (peritoneal macrophages) を調製して細胞溶解液を調製し、抗 HMGB1 抗体を用いて HMGB1 の発現量を検討した (左図)。定常状態の *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウスから脾臓を採取し、脾細胞を得たあと、CD3 ϵ MicroBead kit、及び CD19 MicroBead kit を用いてそれぞれ T 細胞、B 細胞を単離した。得られた T 細胞と B 細胞から細胞溶解液を調製し、抗 HMGB1 抗体を用いて HMGB1 の発現量を検討した (中図、右図)。検討は 2 回行い、同様の結果が得られている。

(b) 定常状態の $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{fl}$ マウスの腹腔 (左上図)、脾臓 (右上図)、末梢血 (左下図)、骨髓 (右下図) よりそれぞれ細胞を調製し、赤血球を除去して得られた細胞をフローサイトメーターによって解析した。マウスは同腹仔を用いた。検討は2回行い、同様の結果が得られている。

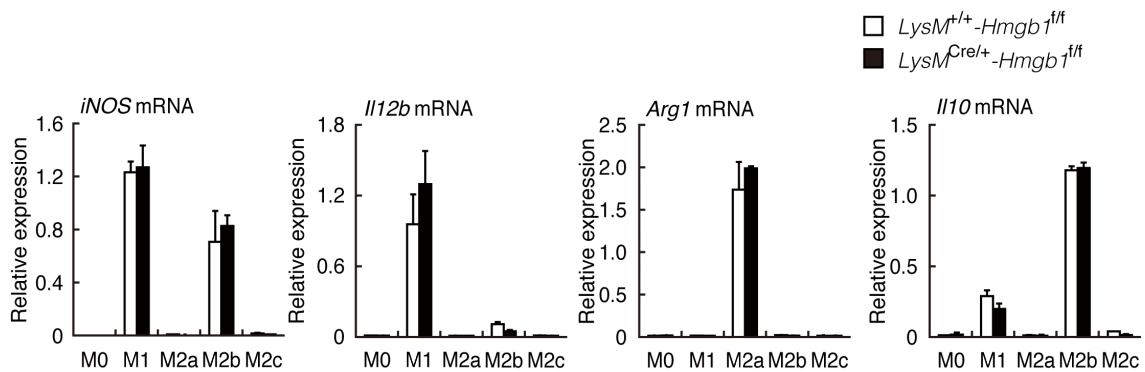


図 2.3 M1、M2 マクロファージへの分化における HMGB1 の関与
LysM^{Cre/+}-*Hmgb1*^{f/f} マウスより調製した骨髄細胞を M-CSF 添加培養液中で培養し (M0)、その後 LPS (50 ng/ml) + IFN- γ (100 ng/ml) を添加 (M1 マクロファージへ分化)、または IL-4 (20 ng/ml) を添加 (M2a マクロファージへ分化)、または LPS (50 ng/ml) + OVA (15 μ g/ml) + 抗 OVA 抗体 (150 μ g/ml) を添加 (M2b マクロファージへ分化)、または IL-10 (20 ng/ml) を添加 (M2c マクロファージへ分化) した培養液で 7 時間培養し、それらの細胞から total RNA を回収し、qRT-PCR 法によって各 mRNA の発現レベルを解析した。データは triplicate で検討した結果の平均値と標準偏差を示した。細胞は同腹仔のマウスから調製し、独立して 2 回検討を行った。それぞれ同様の結果が得られており、そのうちの 1 回の結果を示した。

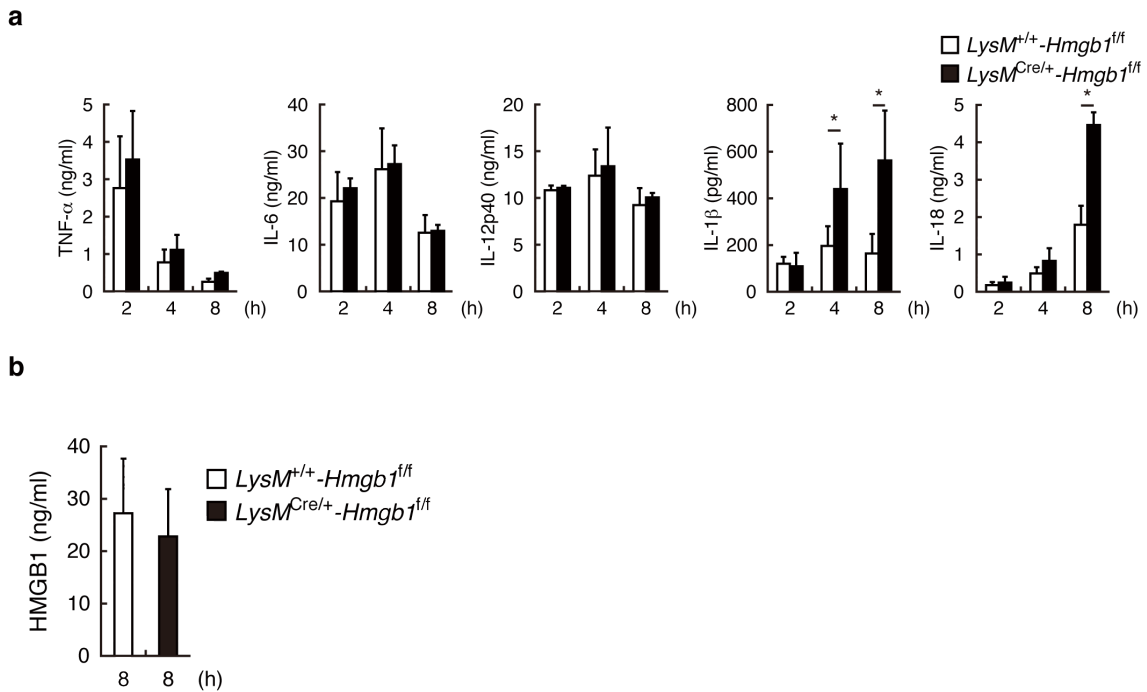
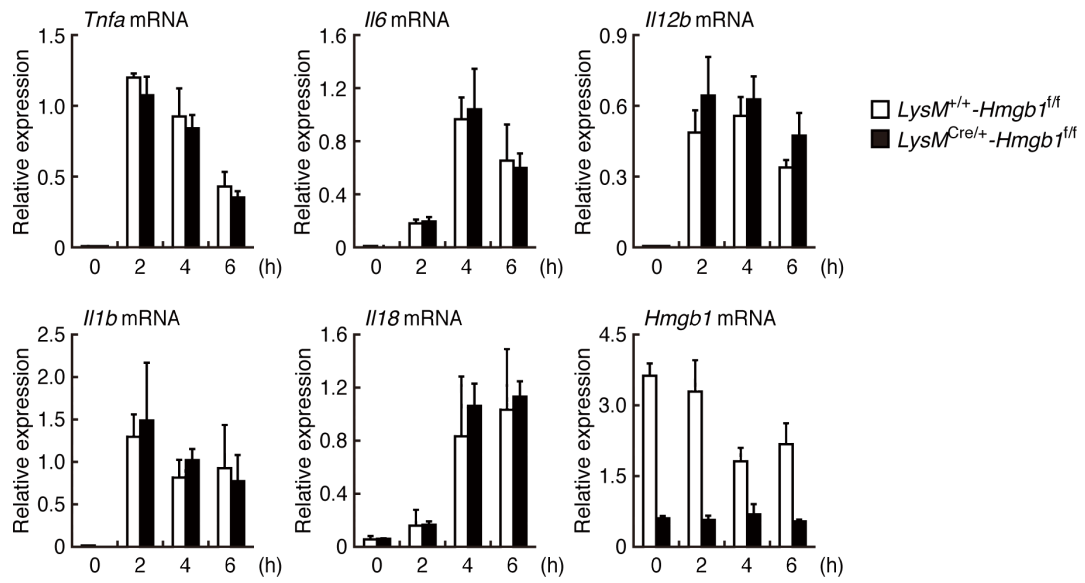
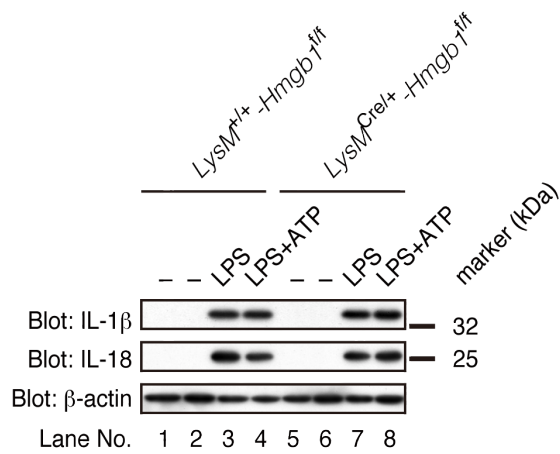
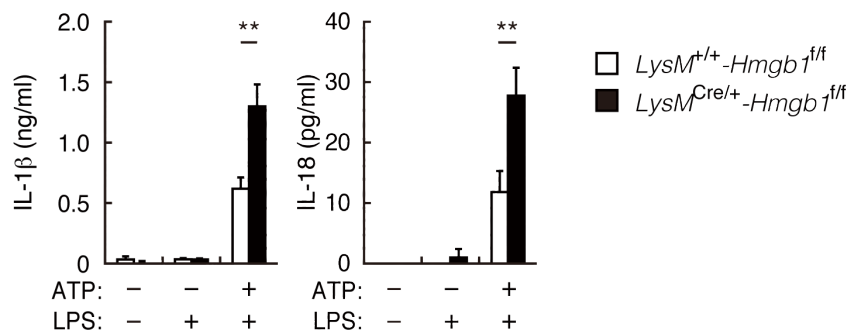


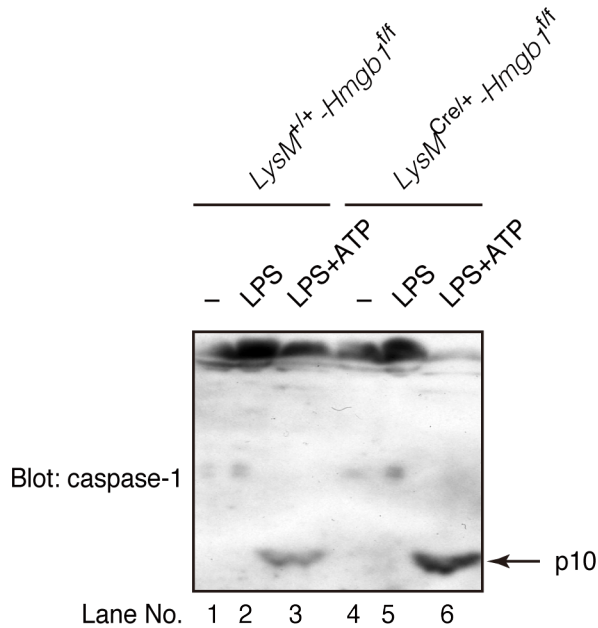
図 2.4 LPS 投与時の $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ マウスの末梢血中 HMGB1 濃度の検討

(a) $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ マウスに LPS (17.5 mg/kg) を尾静脈より投与し、2、4、8 時間後に血液を採取して末梢血中の各サイトカイン量を ELISA 法によって測定した。データは平均値と標準偏差を示した (野生型 $N = 5$ 、 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ $N = 5$)。* : $P < 0.05$ 。

(b) $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ マウスに LPS (17.5 mg/kg) を尾静脈より投与し、8 時間後に末梢血を採取して ELISA 法によって HMGB1 量を測定した。データは平均値と標準偏差を示した (野生型 $N = 5$ 、 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ $N = 5$)。

a**b****c**

d



- 図 2.5 *LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{f/f}* マクロファージでのインフラマソーム活性の検討
- (a) *LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{f/f}* マウス由来腹腔マクロファージを LPS (200 ng/ml) で刺激し、2、4、6 時間後に細胞を回収して qRT-PCR 法によって各遺伝子の mRNA 量を測定した。データは triplicate で検討した結果の平均値と標準偏差を示した。細胞は同腹仔のマウスから調製し、独立して 2 回検討を行った。それぞれ同様の結果が得られており、そのうちの 1 回の結果を示した。
- (b) *LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{f/f}* マウス由来腹腔マクロファージを LPS (500 ng/ml) 刺激、或いは LPS 刺激 4 時間後に ATP (5 mM) を加えてさらに 30 分間培養した後に細胞を回収し、サンプルを調製した。Immunoblot 法により pro-IL-1 β 、pro-IL-18、 β -actin を検出した。検討は 2 回行った。
- (c) *LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{f/f}* マウスの腹腔より調製したチオグリコレート誘導性マクロファージを LPS (500 ng/ml) で刺激し、4 時間後に ATP (5 mM) を加えてさらに 24 時間培養した後、培養上清を回収して ELISA 法によって IL-1 β 、IL-18 の濃度を測定した。データは triplicate で検討した結果の平均値と標準偏差を示した。細胞は同腹仔のマウスから調製し、独立して 2 回検討を行った。それぞれ同様の結果が得られており、そのうちの 1 回の結果を示した。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。
- (d) *LysM^{Cre/+}-Hmgbl^{f/f}* マウス由来腹腔マクロファージを LPS (500 ng/ml) で刺激し、4 時間後に ATP (5 mM) を加えてさらに 30 分間培養した後、サンプルを回

収した。Immunoblot 法により caspase-1 p10 サブユニットを検出した。検討は 2 回行った。本結果は **b** の検討と同じサンプルを用いて解析しており、Lane No. 1～6 はそれぞれ **b** の Lane No. 2, 3, 4, 6, 7, 8 に相当し、pro-IL-1 β 、 pro-IL-18、及び β -actin の発現量には差が無いことを確認している。

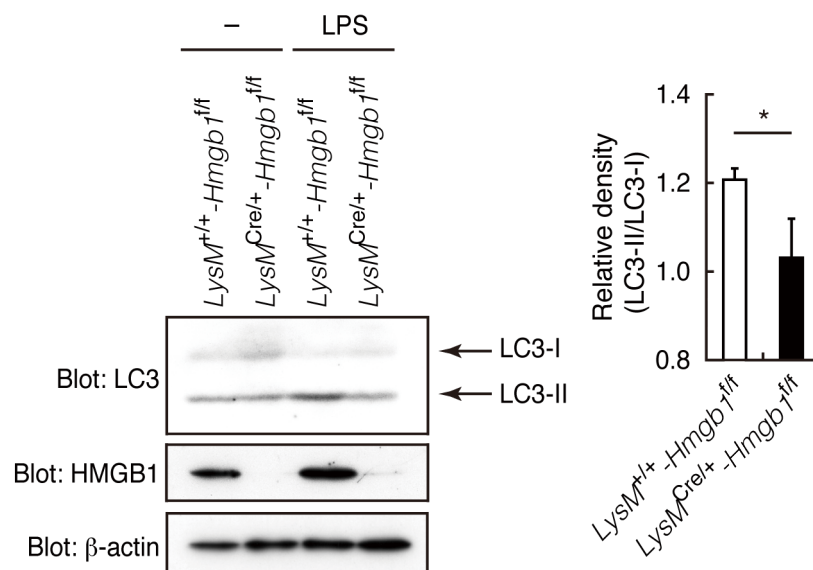


図 2.6 マクロファージ HMGB1 のオートファジーにおける役割
LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl/fl} マウスの腹腔より調製したチオグリコレート誘導性マクロファージに LPS 刺激 (1 μ g/ml) を行い、1 時間後に細胞を回収し、サンプルを調製した。これを用いて Immunoblot 法により、LC3、HMGB1、 β -actin を検出した (左図)。また、得られた LC3-II のバンド強度を解析ソフト Image J を用いて測定した。検討は triplicate で行い、データはその平均値と標準偏差を示した (右図)。* : $P < 0.05$ 。

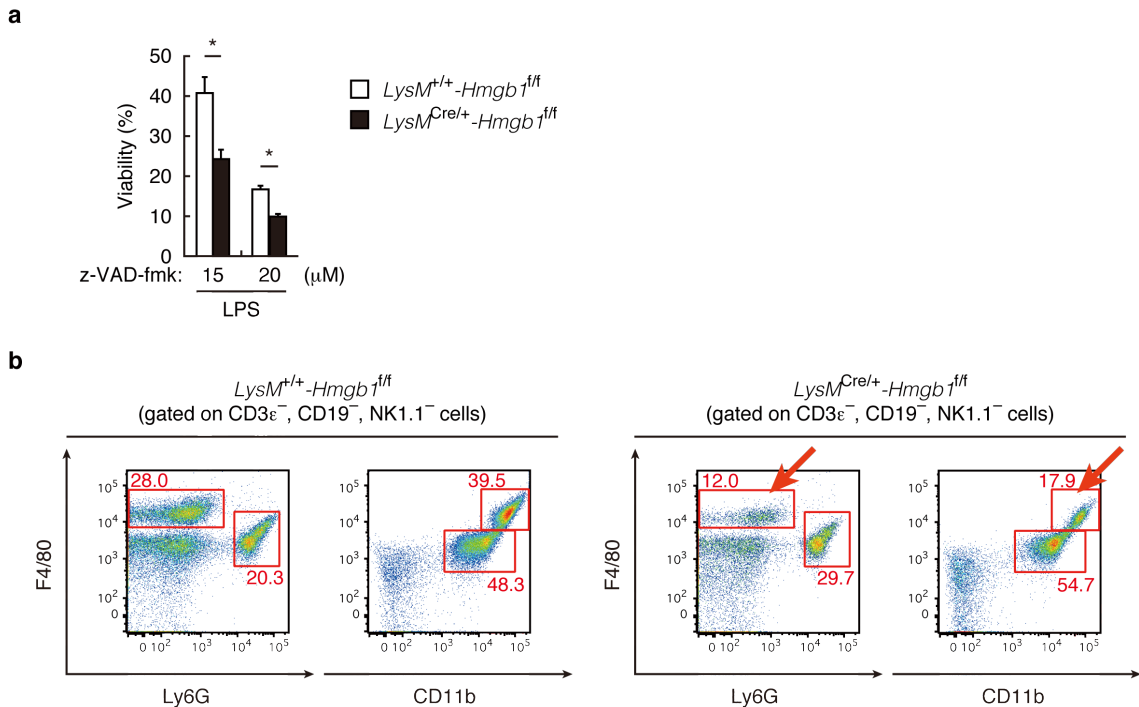


図 2.7 マクロファージ HMGB1 の細胞死における役割

(a) *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウスの骨髄より調製した M-CSF 分化誘導マクロファージにカスパーゼ阻害剤である z-VAD-fmk (15、20 μM) を添加した下で、LPS (500 ng/ml) 刺激を行い、24 時間後に細胞を回収してクリスタルバイオレットで染色し、染色細胞 (死細胞) と非染色細胞 (生細胞) との比率を求めた。データは triplicate で検討した結果の平均値と標準偏差を示した。細胞は同腹仔のマウスから調製し、独立して 2 回検討を行った。それぞれ同様の結果が得られており、そのうちの 1 回の結果を示した。* : $P < 0.05$ 。

(b) *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウスに LPS を尾静脈より投与し、12 時間後に腹腔細胞を調製して蛍光色素結合抗体により染色し、フローサイトメーターによって解析した。矢印は *LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl/fl}* マウスにおけるマクロファージ細胞群を示す。マウスは同腹仔を用い、検討は 2 回行った。

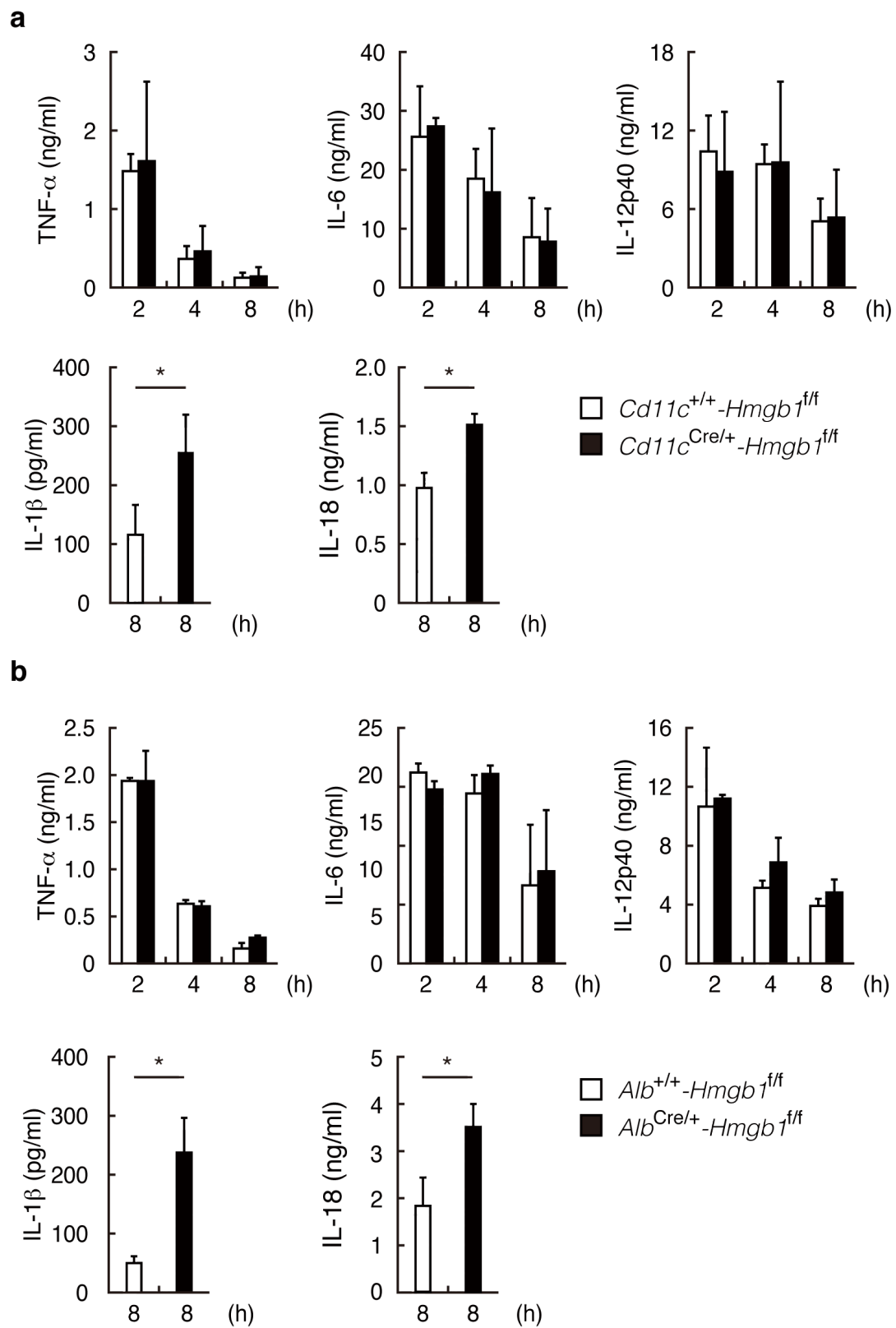


図 2.8 エンドトキシンショックと樹状細胞・肝細胞 HMGB1 との関係

8～12 週齢の $Cd11c^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{f/f}$ マウス (a)、または $Alb^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{f/f}$ マウス (b) に LPS (17.5 mg/kg) を尾静脈より投与し、2、4、8 時間後に血液を採取して、末梢血中の各サイトカイン量を ELISA 法によって測定した。データは平均値と標準偏差を示した (野生型 N = 5、 $Cd11c^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{f/f}$ 或いは $Alb^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{f/f}$ N = 5)。* : $P < 0.05$ 。

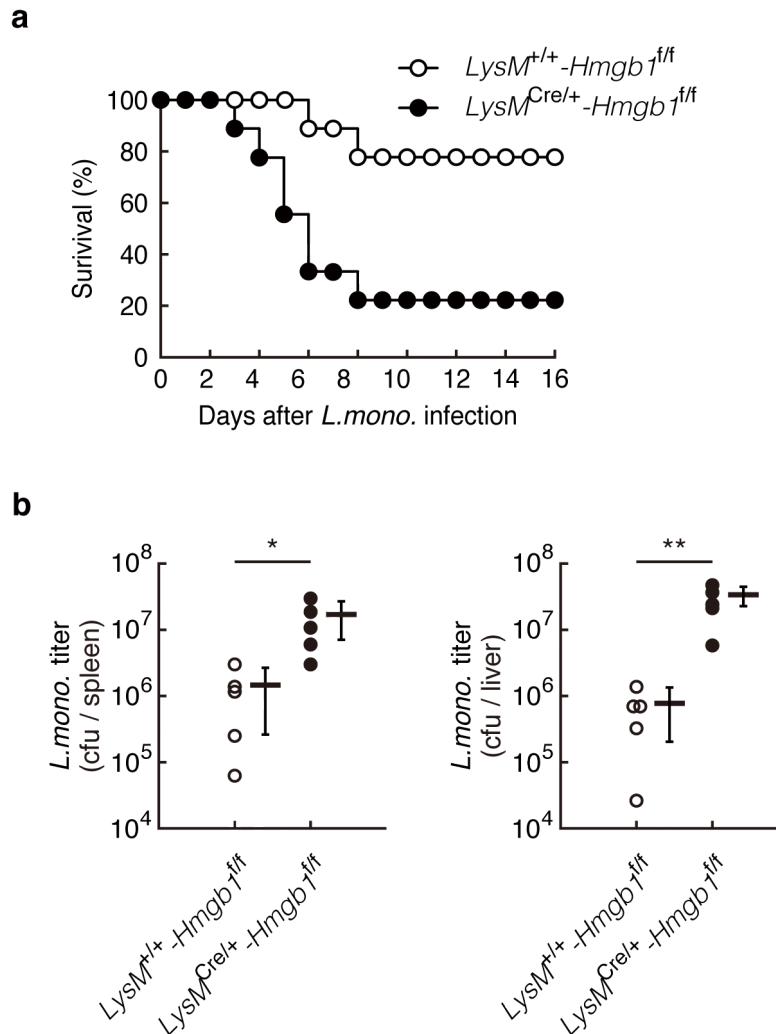


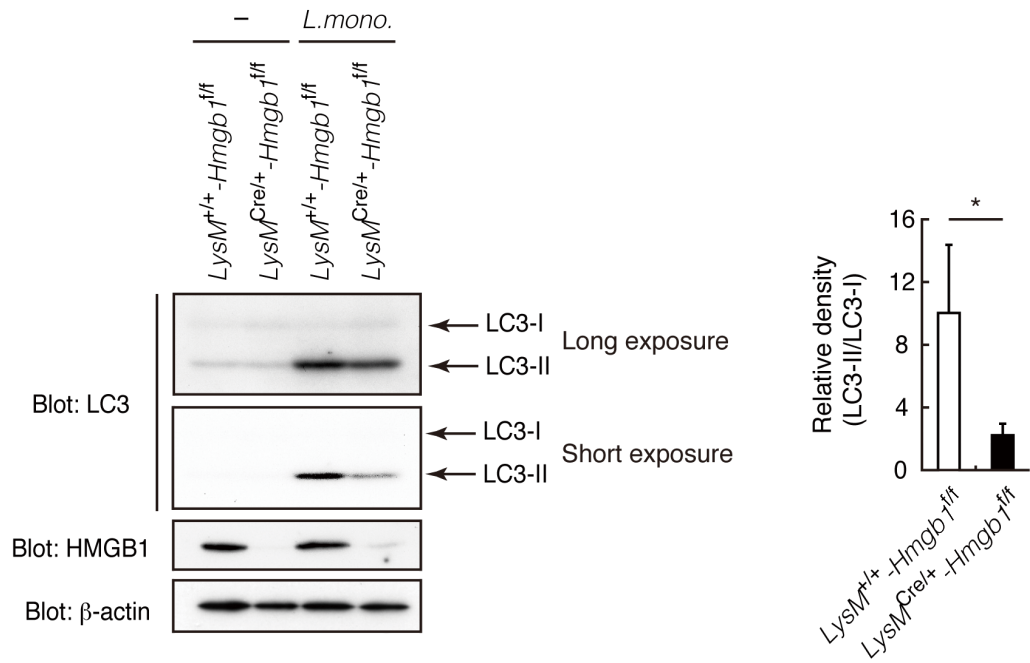
図 2.9 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ マウスを用いたリステリア菌感染の検討

(a) 野生型コントロールマウス (N=9)、 $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ マウス (N=9) にそれぞれリステリア菌 (*L.mono.*、 5×10^5 cfu/25 g weight) を腹腔内投与により感染させ、24 時間ごとに経過観察を行った。マウスは 8~12 週齢で、同じ親由来の仔を用いた。

(b) $LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{f/f}$ マウスにリステリア菌 (5×10^5 cfu/25 g weight) を感染させ、3 日後のマウスの脾臓 (左図) または肝臓 (右図) を採取し、PBS をそれぞれ 1 ml または 2 ml 加えてすり潰して臓器懸濁液を調製した。この懸濁液を希釈して無菌寒天培地のプレートに塗り、37°C でインキュベーション後、コロニー数を計測して臓器あたりの菌数を算出した。ドットはそれぞれの個体由来であることを示している。全てのマウスは同腹仔を用いた。データは各個体由来の値をド

ットで示し、その平均値と標準偏差を示した (N = 5)。* : $P < 0.05$ 。** : $P < 0.01$ 。

a



b

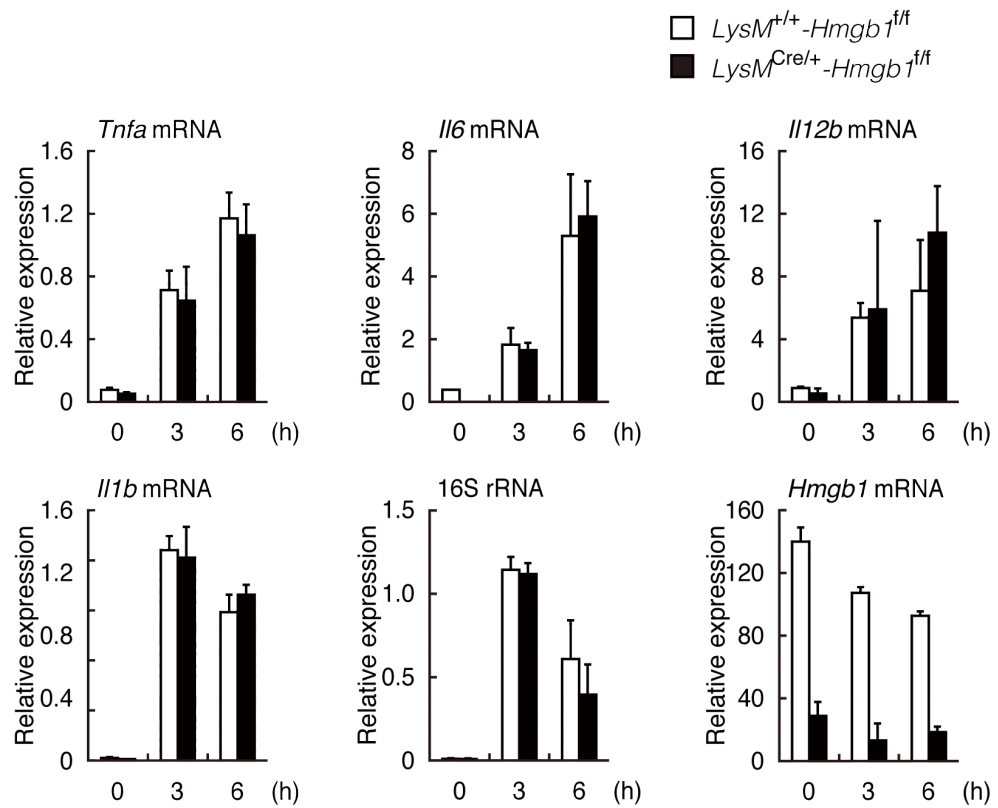


図 2.10 HMGB1 欠失マクロファージのリステリア菌感染時におけるオートファジー・サイトカイン誘導

(a) $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{fl/fl}$ マウスの腹腔より調製したチオグリコレート誘導性マクロファージにリステリア菌 (*L.mono*, m.o.i. of 1) を感染させ、1 時間後に細胞を回収してサンプルを調整した。これを用いて Immunoblot 解析により、LC3、HMGB1、 β -actin を検出した (左図)。また、得られた LC3 のバンド強度を解析ソフト Image J を用いて測定した。検討は triplicate で行い、データはその平均値と標準偏差を示した (右図)。* : $P < 0.05$ 。

(b) $LysM^{Cre/+}$ - $Hmgb1^{fl/fl}$ マウスの腹腔より調製したチオグリコレート誘導性マクロファージにリステリア菌 (m.o.i. of 1) を感染させ、3、6 時間後に細胞を回収して total RNA を精製し、qRT-PCR 法にて解析した。データは triplicate で検討した結果の平均値と標準偏差を示した。細胞は同腹仔のマウスから調製し、独立して 2 回検討を行った。それぞれ同様の結果が得られており、そのうちの 1 回の結果を示した。

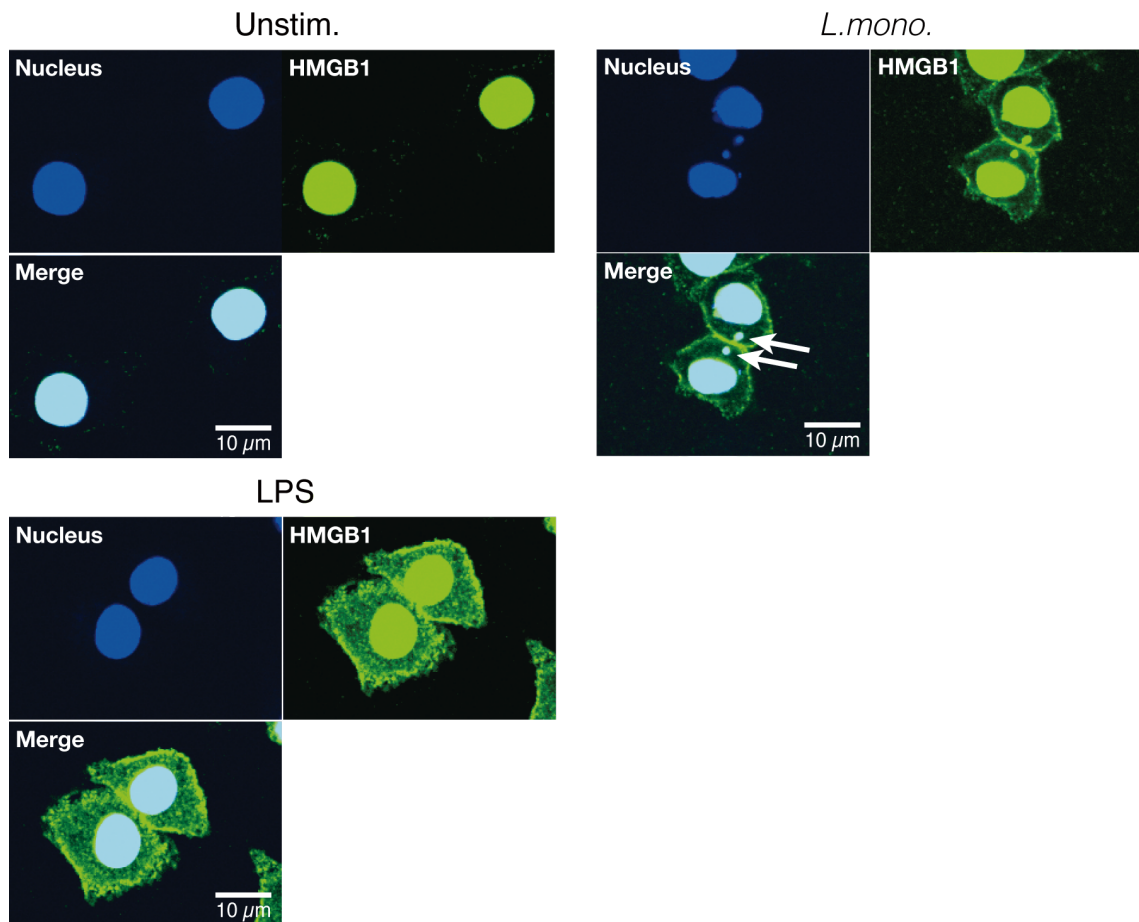


図 2.11 LPS 刺激・リステリア菌感染時の細胞内 HMGB1 の分布
RAW264.7 細胞株に LPS 刺激 (1 μg/ml) (左下図)、或いはリステリア菌感染 (m.o.i. of 1) (*L. mono.*、右上図) を行い、1 時間後に細胞を固定して核 (Nucleus) と HMGB1 をそれぞれ DAPI と抗 HMGB1 抗体を用いて染色し、顕微鏡観察を行った。Unstim.は無刺激コントロールを指す。スケールバーは 10 μm を示す。検討は 2 回行い、同様の結果が得られている。

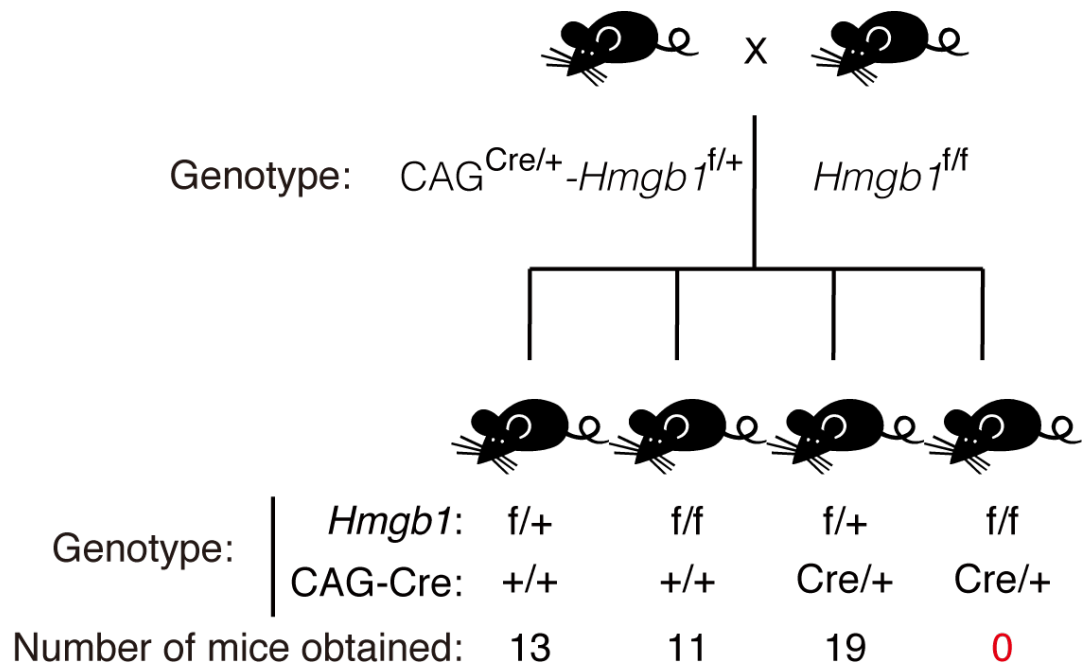


図 2.12 CAG-Cre による *Hmgb1* 遺伝子全身性欠損と致死性
CAG^{Cre/+}-*Hmgb1*^{f/+}マウスを *Hmgb1*^{f/f}マウスと掛け合わせて、産まれた仔の中で 6 週齢まで生存した個体数を記録した。

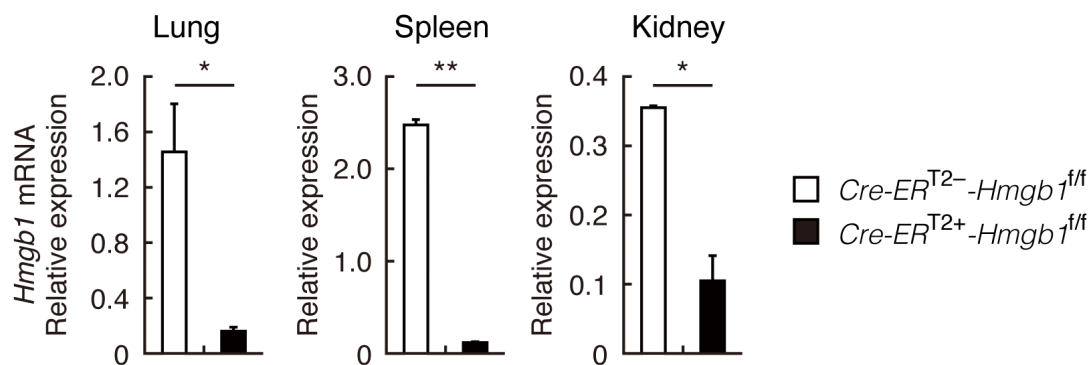


図 2.13 *Cre-ER^{T2+/-}-Hmgb1^{f/f}* マウスの各臓器における *Hmgb1* mRNA の発現
Cre-ER^{T2+/-}-Hmgb1^{f/f} マウスに tamoxifen (9.0 mg/40 g weight) を 1 日おきに 3 回腹腔
 内投与後、さらに 1 週間おいてから各臓器を採取して total RNA を調製し、
 qRT-PCR 法を用いて *Hmgb1* mRNA 量を測定した。データは平均値と標準偏差を
 示した (野生型 N = 3、*Cre-ER^{T2+/-}-Hmgb1^{f/f}* N = 3)。* : $P < 0.05$ 。** : $P < 0.01$ 。

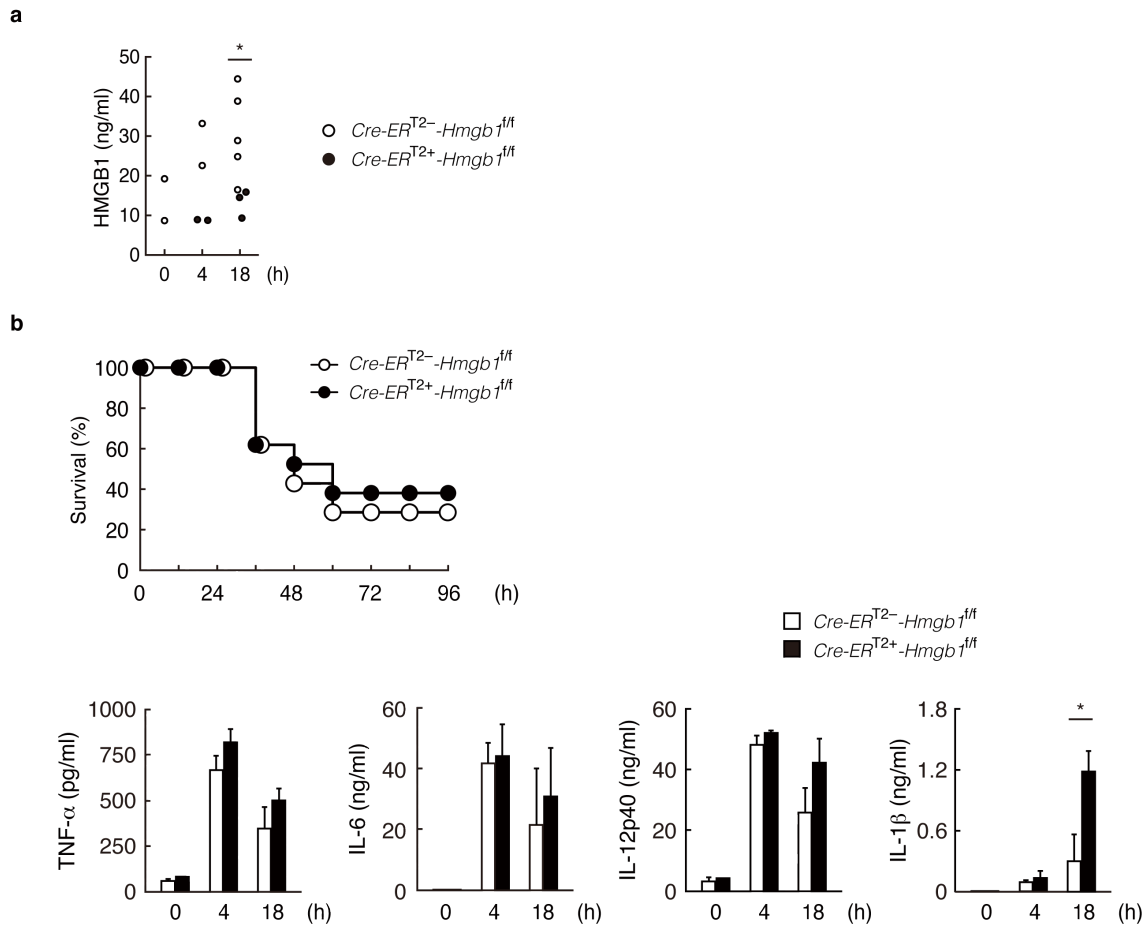


図 2.14 *Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウスにおける LPS 誘導性エンドトキシンショック

(a) *Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウスに LPS (22.5 mg/kg) を尾静脈より投与し、4、18 時間後に血液を採取して血漿を回収し、末梢血中の HMGB1 濃度を ELISA によって測定した。同腹仔のマウスを用いて検討を行い、ドットはそれぞれの個体由来であることを示している (0 時間 : 野生型 N = 2、4 時間 : 野生型 N = 2、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* N = 2、18 時間 : 野生型 N = 5、*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* N = 3)。* : $P < 0.05$ 。

(b) 野生型マウス (N = 21) および *Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウス (N = 21) に LPS (22.5 mg/kg) を投与し、12 時間ごとに経過観察を行った。マウスは 8~12 週齢で、同じ親由来の仔を用いた (上図)。*Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウスに LPS (22.5 mg/kg) を尾静脈より投与し、4、18 時間後に血液を回収した。末梢血中の TNF-α、IL-6、IL-12p40、IL-1β 濃度を ELISA によって測定した。データは平均値と標準偏差を

示した (野生型 $N = 5$ 、 $\text{Cre-ER}^{\text{T2+}}\text{-Hmgb1}^{\text{flf}}$ $N = 5$) (下図)。* : $P < 0.05$ 。

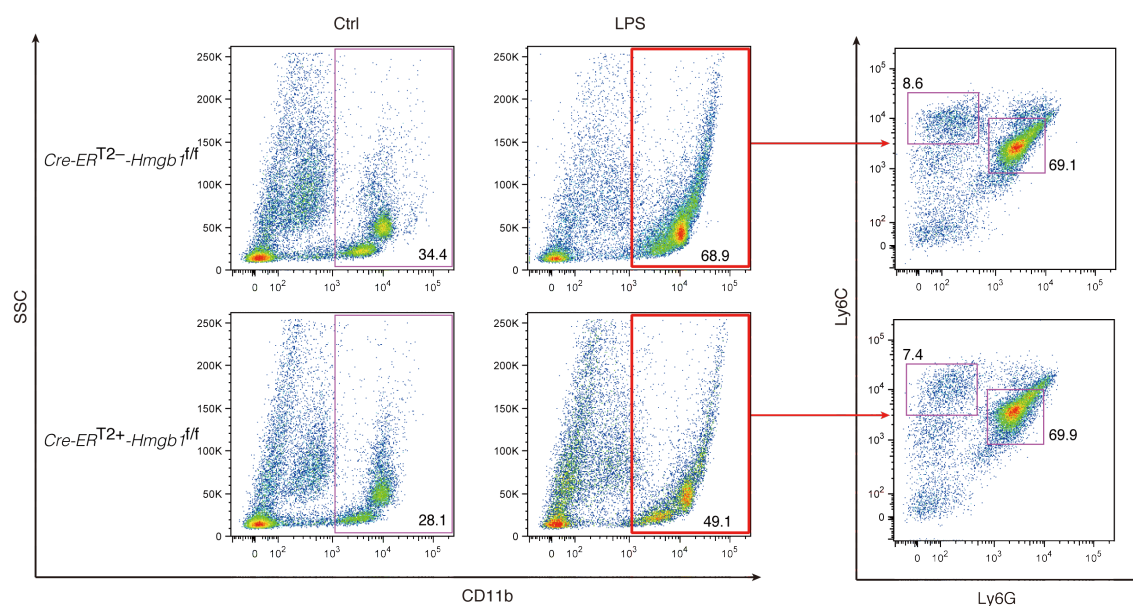


図 2.15 *Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウスにおける肺への炎症性細胞の遊走
Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f} マウスに LPS (22.5 mg/kg) を尾静脈より投与し、4 時間後に肺を採取した。すり潰した後、コラゲナーゼ処理によって細胞を単離させ、得られた細胞群の割合を図に示した蛍光色素結合抗体により染色し、フローサイトメーターによって解析した (左図)。また、各 LPS 投与群の CD11b⁺細胞のみを抽出し、Ly6G、Ly6C に対する蛍光色素結合抗体を用いて CD11b⁺Ly6G⁺細胞、CD11b⁺Ly6C⁺細胞を展開した (右図)。マウスは同腹仔を用いた。検討は 3 回行い、同様の結果が得られている。

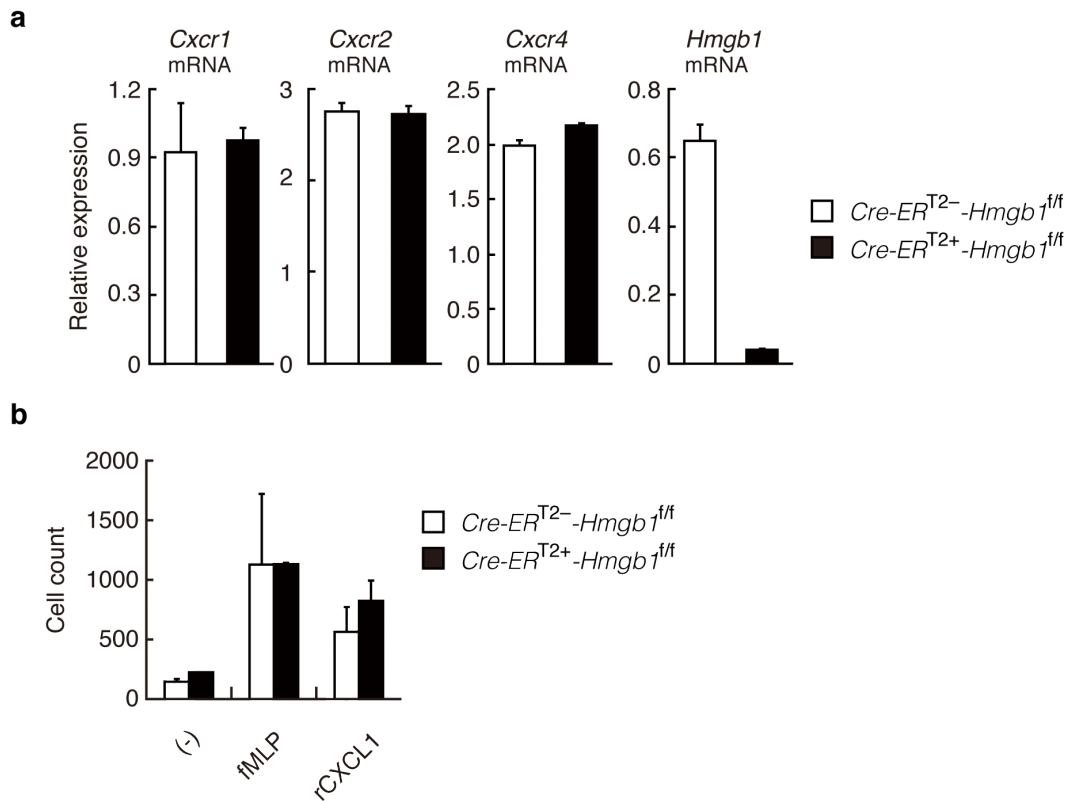


図 2.16 HMGB1 欠失好中球のケモカイン受容体発現と遊走能の検討

(a) 定常状態の Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f} マウスの骨髄より調製した好中球から total RNA を調製し、それぞれの遺伝子について qRT-PCR 法を用いて解析を行った。マウスは同腹仔を用いた。データは平均値と標準偏差を示した (N=3)。

(b) Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f} マウスの骨髄より調製した好中球を用いて、migration アッセイを行い、カラムを通過した細胞数をフローサイトメーターにより測定した。刺激には fMLP (1 μM)、rCXCL1 (10 ng/ml) を用いた。データは triplicate で検討した結果の平均値と標準偏差を示した。細胞は同腹仔のマウスから調製し、独立して 2 回検討を行った。それぞれ同様の結果が得られており、そのうちの 1 回の結果を示した。

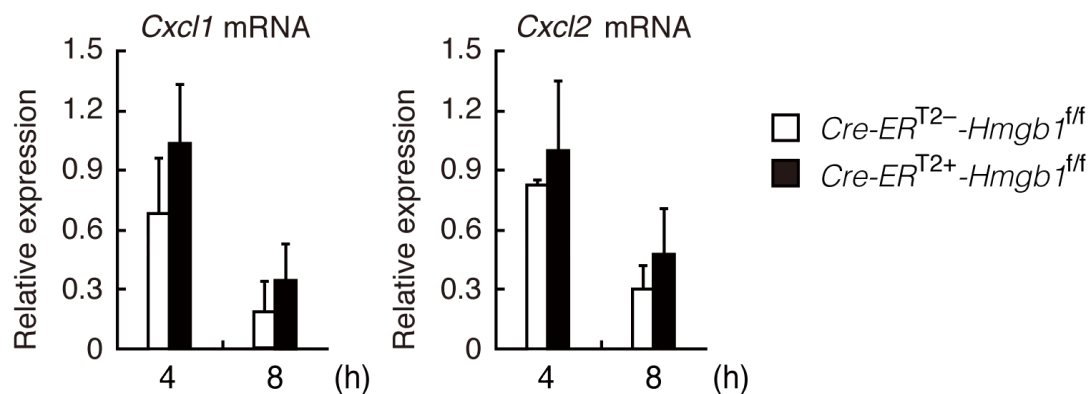


図 2.17 *Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f}* マウスにおける肺での炎症性サイトカイン産生
Cre-ER^{T2+}-Hmgb1^{f/f} マウスに LPS (22.5 mg/kg) を尾静脈より投与し、4、8 時間後に肺を採取して total RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて mRNA 量を測定した。マウスは同腹仔を用いた。データは平均値と標準偏差を示した (N=3)。

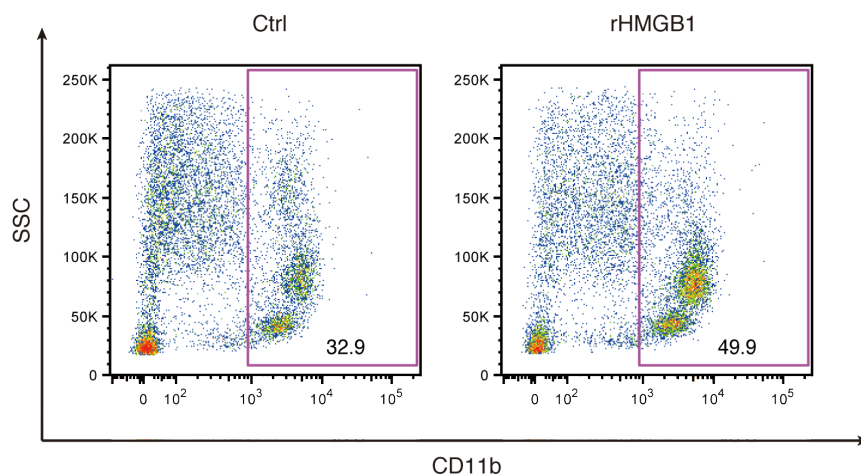


図 2.18 rHMGB1 投与時における肺への炎症性細胞の遊走

Cre-ER^{T2+}-*Hmgbl*^{f/f} マウスに rHMGB1 (1 µg/20 g weight) を尾静脈より投与し、4 時間後に肺を採取した。すり潰した後、コラゲナーゼ処理によって細胞を単離させ、得られた細胞群の割合を図に示した蛍光色素結合抗体により染色し、CD11b⁺細胞の割合をフローサイトメーターを用いて解析した。マウスは同腹仔を用いた。この検討は 4 回行い、同様の結果が得られている。

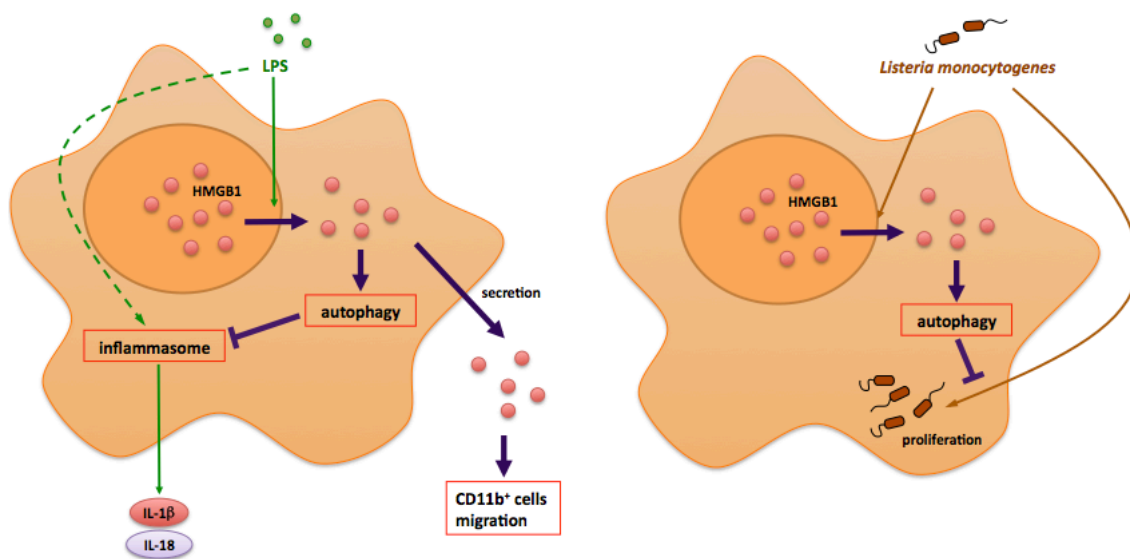


図 3.1 HMGB1 の炎症・感染における役割

Hmgb1 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを用いた本研究より、LPS 誘導性エンドトキシンショック時にインフラマソームが活性化して IL-1 β 、IL-18 が産生されるが、このとき HMGB1 は細胞質に分布し、オートファジーの誘導促進を介してインフラマソーム活性を抑制していることがわかった (左図)。また、HMGB1 は細胞外にも放出され、CD11b⁺細胞の肺への遊走にも関与している (左図)。リステリア菌感染時には HMGB1 が細胞質に分布し、同じくオートファジー誘導を促進して細胞内に侵入した菌の排除に関与していることが示唆された (右図)。

材料・方法

試薬・マウス

Escherichia coli O55:B5 株由来 LPS (Lipopolisaccharide)、z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp(O-methyl)-fluoromethylketone)、fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) は Sigma 社より購入した。Ultrapure LPS、ATP (adenosine triphosphate) は InvivoGen 社より購入した。Recombinant mouse C-X-C motif chemokine 1 (rCXCL1) は R&D Systems 社より購入した。Recombinant mouse High-mobility group box 1 (rHMGB1) は HMGBiotech 社より購入した。C57BL/6J マウスは日本クレア社より購入した。*Alb-Cre* マウス、*Cd11c-Cre* マウス、*CAG-Cre* マウス、*Cre-ER*^{T2} マウス (C57BL/6 バックグラウンド) は Jackson Laboratory 社より購入した。*LysM-Cre* マウスは竹田潔 博士 (大阪大学) より御供与頂いた。マウスを用いた実験においては、東京大学医学系研究科動物実験委員会により実験の承認を頂いており (医-P10-122 および医-P10-123)、「東京大学動物実験実施規則」ならびに「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守しながら、動物愛護の観点に基づき遂行した。

細胞

腹腔マクロファージについて、2 ml の 4% チオグリコレート培地 (Becton Dickinson 社) をマウスの腹腔に投与し、3.5 日後に腹腔に PFE (1 x PBS (Invitrogen 社)、2% FCS (fetal cauf serum、Hyclone 社)、1 mM EDTA (和光純薬社)) を 6 ml 注入して再回収することで腹腔内細胞を得た。その後ペトリディッシュ (Becton Dickinson 社) に播種し、10% FCS を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社) で 1 時間培養 (37°C、5% CO₂) した後、上清を除去して PBS で洗浄し、接着した細胞を回収して腹腔マクロファージとして用いた。

M-CSF 分化誘導マクロファージは、マウス後肢にある大腿骨及び脛骨を採取して内腔に PFE を注入し、骨髓細胞を押し出して回収し、1 x RBC Lysis Buffer (eBioscience 社) を用いて赤血球を溶血させ、70 µm cell strainer (Corning 社) に通して赤血球の残渣を除去し、さらに PFE で 2 回洗浄後、終濃度が 100 ng/ml となるように M-CSF (macrophage colony-stimulating factor、R&D Systems 社) を添加した 10% FCS を含む RPMI1640 培地 でペトリディッシュ (Becton Dickinson 社) に播種した (マウス 1 匹あたり 10 cm ディッシュ 2 枚、各 10 ml で培養)。6 日間培養 (37°C、5% CO₂) 後に接着した細胞を M-CSF 分化誘導マクロファージ (M0) として用いた。

培養は3日おきに培地の半量を 100 ng/ml M-CSF を含む RPMI1640 培地で交換した。

脾細胞の調製について、ハサミで細かく砕いた脾臓を、1 mg/ml の Collagenase D (Roche 社) と 20 µg/ml の DNase I (Roche 社) を含む PBS 中で 37°C、30 分間インキュベーションし、70 µm cell strainer を通して細胞を得た。1 x RBC Lysis Buffer で赤血球を溶血し、PFE で2回洗浄後、再度 cell strainer に通して赤血球の残渣を除去し、脾細胞として使用した。

CD3 ϵ ⁺細胞、CD19⁺細胞の調製にはそれぞれ CD3 ϵ MicroBead kit (Miltenyi Biotec 社)、CD19 MicroBead kit (Miltenyi Biotec 社) を用いた。1 x 10⁷ の脾細胞を 100 µl の PFE に懸濁し、10 µl の CD3 ϵ MicroBead、或いは CD19 MicroBead を加えて 4°C で 10 分間置いた。1 ml の PFE で2回洗浄後、500 µl の PFE に懸濁し、LD column (Miltenyi Biotec 社) にアプライし、磁気ラベルされた CD3 ϵ ⁺細胞、CD19⁺細胞を磁石を用いてカラム内にトラップした。トラップした細胞は、カラムを磁石から外し、5 ml の PFE を2回通して回収した。

骨髓由来好中球の調製は、マウス後肢にある大腿骨及び脛骨を採取して内腔に PFE を注入し、骨髓細胞を押し出して回収し、1 x RBC Lysis Buffer を用いて赤血球を溶血させ、70 µm cell strainer に通して赤血球の残渣を除去し、さらに PFE で2回洗

浄後、2% FCSを含むHBSS (Hank's balanced salt solution、Lifetechnologies 社) に懸濁した。Percoll (GE Healthcare 社) を HBSS で希釈することにより 72%、64%、52% Percoll を作製し、15 ml チューブに濃度の高い順に 2 ml ずつ入れ、その上から骨髓細胞を含む HBSS 2 ml をアプライして、室温、1000 x g、30 分間遠心した。遠心後、72% Percoll と 64% Percoll との間に位置した細胞を回収し、骨髓由来好中球として使用した。

末梢血由来の細胞の調製は、安楽死させたマウスの心臓よりフローマックス (25 G、ニプロ社)、1 ml テルモシリンジ (テルモ社) を用いて全血を採取し、400 x g、4℃、5 分間遠心して血球を含むペレットを得た。上清を除去したペレットに 1 x RBC Lysis Buffer を加えて赤血球を溶血し、PFE で 2 回洗浄後、70 μ m cell strainer に通して赤血球の残渣を除去し、末梢血細胞として使用した。

免疫組織染色

アッセイの前日に 6 cm 細胞培養ディッシュ (Becton Dickinson 社) にオートクレーブ済みの 15 mm マイクロカバーガラス (松浪硝子工業) を入れ、その上に細胞を播種した。マイクロカバーガラスだけを取り出し、PBS で 1 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (和光純薬社) に浸して室温で 10 分間

の固定を行った。再度 PBS で 1 回洗浄し、0.2% Triton X-100 (ナカライテスク社) を加えた PBS に浸して室温で 10 分間置いた。さらに PBS で 1 回洗浄後、5% BSA (Sigma 社) を加えた PBS に浸して室温で 15 分間おいた (ブロッッキング)。抗 HMGB1 抗体 (ab18256、Abcam 社) を前述のものと同じブロッッキング溶液で 1000 倍希釈したものに浸して室温で 1 時間おき、PBS で 3 回洗浄後、Alexa fluor 488 goat anti rabbit IgG (Invitrogen 社) をブロッッキング液で 1000 倍希釈したものに浸してさらに室温で 1 時間おいた。PBS で 3 回洗浄後、70% グリセロール (和光純薬社)、0.1% DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole、Sigma 社) を含む PBS を 1 滴垂らしたスライドガラス (松浪硝子工業) 上に、カバーガラスを細胞が播いてある面を下にして乗せ、トップコート (KATE エナメルスライコート、カネボウ社) でマイクロカバーガラスの周囲をシールした。共焦点蛍光顕微鏡 (FV-1000、OLYMPUS 社) を用いて観察した。

ヘマトキシリン・エオジン (HE; Hematoxylin-eosin) 染色

安楽死させたマウスから摘出した臓器を 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定した。パラフィン包埋切片の作製と HE 染色は川崎臨床病理研究所にて行った。

RNA 解析

細胞からの total RNA の抽出は、Nucleospin RNA II (MACHEREY-NAGEL 社) を用いて行った。細胞に 2-メルカプトエタノール (ナカライテスク社) を 1% 添加したキットに添付の Lysis Buffer を 350 μ l 加え、溶液に粘性がなくなるまでピペティングした。ここにエタノールを 350 μ l 加え、さらにピペティングした後、この溶液を付属のフィルターカートリッジに全量添加して 8,000 x g、4°C、1 分間遠心してフロースルーを除去後、添付の MDA Buffer を 350 μ l 加えて再度遠心した。ここに rDNase I を 5 U 含む溶液を 95 μ l 加えて室温で 15 分置き、添付の Wash Buffer A2 を 200 μ l 加えて遠心した。さらにエタノールを 10% 添加したキットに添付の Wash Buffer A3 を 600 μ l 加え、遠心することより洗浄した。フィルターカートリッジのメンブレン部分に、RNase-free water を 50 μ l 添加し、遠心後、溶出液を total RNA として回収した。

前述のプロトコルに従って得た total RNA からの cDNA 合成は、PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa 社) を用いた。Total RNA 400 ng を、氷上で Master Mix 2 μ l および添付の RNase-free water と混合して終容量を 10 μ l とし、37°C で 15 分間

反応させ、続けて逆転写酵素を失活させるため 85℃で 5 秒間加熱した。得られた反応液は 30 倍に希釈して qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) 解析のサンプルとして用いた。qRT-PCR 解析の PCR には SYBR *Premix Ex Taq* (TaKaRa 社) および LightCycler 480 (Roche 社) を用いた。SYBR *Premix Ex Taq* 8 μ l と 5 μ M sense primer および 5 μ M reverse primer を各 0.64 μ l ずつ混合して終容量を 14 μ l とし、ここに希釈した cDNA サンプルを 2 μ l 添加して LightCycler 480 にて qRT-PCR 反応を行った。qRT-PCR は 95℃、1 分間保温の後、95℃ 10 秒、57℃ 5 秒、72℃ 10 秒のサイクル反応を用いた。各遺伝子の mRNA 発現量は *Gapdh* 遺伝子の mRNA の発現量を用いて標準化した。本研究において使用した qRT-PCR プライマーの配列は以下の通りである。IL-1 β sense: 5'-GCTTCAGGCAGGCAGTATCAC -3' 、 IL-1 β reverse: 5'-CGACAGCACGAGGCTTTTT -3'、IL-6 sense: 5'- ACGATGATGCACTTGCAGAA -3'、IL-6 reverse: 5'- GTAGCTATGGTACTCCAGAAGAC -3'、IL-10 sense: 5'-TGCCTGCTCTTACTGACTGG -3' 、 IL-10 reverse: 5'-TCGGTTAGCAGTATGTTGTCCA -3' 、 IL-12p40 sense: 5'-GACACGCCTGAAGAAGATGAC -3' 、 IL-12p40 reverse: 5'-TAGTCCCTTTGGTCCAGTGTG -3' 、 IL-18 sense: 5'-

AGACAGCCTGTGTTCGAGGA -3' 、 IL-18 reverse: 5'-
 GGGTCACAGCCAGTCCTCTT -3' 、 TNF- α sense: 5'-
 TCATACCAGGAGAAAGTCAACCTC -3' 、 TNF- α reverse: 5'-
 GTATATGGGCTCATACCAGGGTTT -3' 、 ARG1 sense: 5'-
 GCAACCTGTGTCCTTTCTCC -3' 、 ARG1 reverse: 5'-
 GCAAGCCAATGTACACGATG -3' 、 16S rRNA sense: 5'-
 GATGCATAGCCGACCTGAGA -3' 、 16S rRNA reverse: 5'-
 CTCGTCAGACTTTCGTCCA -3'、 iNOS sense: 5'- CACCTTGGAGTTCACCCAGT
 -3'、 iNOS reverse: 5'- ACCACTCGTACTTGGGATGC -3'、 HMGB1 sense: 5'-
 TGTATCCCCAAAAGTGTGAGC -3' 、 HMGB1 reverse: 5'-
 TTACAGCCAGCGTTCTTGTG -3' 、 GAPDH sense: 5'-
 CTCATGACCACAGTCCATGC -3' 、 GAPDH reverse: 5'-
 CACATTGGGGGTAGGAACAC -3'。

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

末梢血中、或いは培養上清中の TNF- α 、IL-6 および IL-1 β の定量はそれぞれ

DuoSet ELISA Development kit mouse TNF- α (R&D Systems 社)、DuoSet ELISA

Development kit mouse IL-6 (R&D Systems 社) および DuoSet ELISA Development kit mouse IL-1 β (R&D Systems 社) を用いた。96 穴プレート (Becton Dickinson 社) に PBS で 180 倍に希釈した Capture Antibody を 100 μ l 加えて室温で 18 時間おいた後、PFE で 3 回洗浄し、1% BSA を含む PBS (Reagent Diluent) を 100 μ l 加えてさらに 24 時間おいた。Reagent Diluent を除いて血漿或いは培養上清を 100 μ l 加えて室温で 2 時間おいてそれらを除き、Reagent Diluent で 3 回洗浄後、Reagent Diluent で 50 倍希釈した Detection Antibody を 100 μ l 加えてさらに室温で 1 時間おいた。Reagent Diluent で 3 回洗浄し、Reagent Diluent で 50 倍希釈した Streptavidin-HRP を 100 μ l 加えて室温で 1 時間おき、さらに Reagent Diluent で 3 回洗浄後、Substrate Solution を 100 μ l 加えて発色させた。1 規定の硫酸 (和光純薬社) を 50 μ l 加えて発色を停止させ、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 社) を用いて 565 nm の吸光度を測定し、検量線から濃度を算出した。IL-18 の定量は mouse IL-18 ELISA kit (MBL 社) を用いて、添付のプロトコルに従って行った。

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

細胞を PBS で 1 回洗浄した後、再度 PBS を加えて Cell Lifter (Corning 社) を用いてチューブに回収し、2,000 x g、4℃、1 分間遠心の後、上清を注意深く取り除き、ペレットに細胞溶解液 (50 mM Tris-aminomethane (pH 8.0) (ナカライテスク社)、300 mM NaCl (和光純薬社)、20 mM β -グリセロリン酸ナトリウム *n* 水和物 (和光純薬社)、2 mM EDTA、1.0% NP-40 (ナカライテスク社)、1 mM Na₃VO₄ (和光純薬社)、10 μ g/ml Aprotinin (TaKaRa 社)、10 μ g/ml Leupeptin (和光純薬社)、1 mM APMSF (和光純薬社)) を加えて混合し、氷上で 1 時間静置した。これを 17,000 x g、4℃、20 分間遠心し、上清を回収した。これに 6 x Loading Buffer (330 mM Tris-aminomethane (pH 6.8)、9.5% SDS、600 mM dithiothreitol (和光純薬社)、0.12% bromophenol blue (和光純薬社)) を加えて SDS-PAGE サンプルとした。

各臓器は PBS で洗浄した後、3.5 ml の細胞溶解液中で POLYTRON (Bohemia 社) によりホモジナイズした。破碎後の細胞懸濁液を氷上で 1 時間静置し、17,000 x g、4℃、20 分間遠心して上清を回収し、6 x Loading Buffer を加えて SDS-PAGE サンプルとした。

ポリアクリルアミドゲルの分離ゲルは 10% または 12% (1.5 M Tris-aminomethane (pH 8.8)、0.1% SDS (ナカライテスク社)、33% (10% gel) また

は 40% (12% gel) 30%(w/v)-Acrylamide/Bis mixed solution (29:1) (ナカライテスク社)、0.1% ammonium peroxodisulfate (ナカライテスク社)、0.03% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (ナカライテスク社)) を用い、濃縮ゲルは 4% (0.4 M Tris-aminomethane、0.1% SDS、13.3% 30%(w/v)-Acrylamide/Bis mixed solution (29:1) 、0.1% ammonium peroxodisulfate 、0.03% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) を用いた。1 x Running Buffer (25 mM Tris-aminomethane (pH 8.0)、192 mM グリシン (ナカライテスク社)、1% SDS) 中で電気泳動 (50 mA 定電流) した。

インフラマソームの解析

腹腔マクロファージ 1×10^6 細胞を 12 穴プレート (Becton Dickinson 社) に播種し、培地を Opti-MEM (Lifetechnologies 社) に交換して LPS (500 ng/ml) で刺激し、4 時間後に ATP (5 mM) を加えてさらに 30 分間培養した後、培養上清を回収した。培養上清は $800 \times g$ 、 4°C 、1 分間遠心して上清のみを回収した。ここに 4 倍量の冷アセトン (和光純薬社) を加えて激しく攪拌し、 -20°C で 24 時間静置した後、 $17,000 \times g$ 、 4°C 、15 分間遠心して沈殿を得た。風乾させた沈殿に細胞溶解

液と 6 x Loading Buffer を加え溶解して SDS-PAGE サンプルとし、Immunoblot 解析によって活性型 caspase-1 を検出した。

Immunoblot 解析

PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride membrane, Millipore 社) をメタノール (和光純薬社) に室温で 1 分間浸した後、transfer buffer (50 mM Tris-aminomethane (pH 8.0)、80 mM グリシン、0.04% SDS、20% メタノール) 中で泳動後のゲルとともに室温で 30 分間振盪し、これらを transfer buffer に浸した濾紙に挟んでブロッキングを行った (200 mA 定電流、55 分間)。PVDF 膜は blocking 溶液中 (200 mM Tris-aminomethane (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.1% Tween-20 (和光純薬社)、5% skim-milk (Beckton Dickinson 社)) にて振盪 (室温、60 分間) した後、その都度 TBS-T (200 mM Tris-aminomethane (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.1% Tween-20) による洗浄を 3 回行い、1 次抗体 (1 μ g/ml) を添加した blocking 溶液で振盪し (室温、60 分間)、TBS-T で 3 回洗浄後、2 次抗体 (0.1 μ g/ml) を添加した blocking 溶液で振盪し (室温、60 分間)、さらに TBS-T で 3 回洗浄した。基質 (Enhanced luminal reagent (PerkinElmer 社) と Oxidizing reagent (PerkinElmer 社) を等量混合

したもの)と反応させ、X線フィルム(富士フイルム社)を用いて検出した。1次抗体としては以下のものを用いた。抗 β -actin抗体(AC15、Sigma社)、抗HMGB1抗体(ab18256、Abcam社)、抗LC3抗体(PM036、MBL社)、抗IL-1 β 抗体(sc-1251、Santa Cruz社)、抗IL-18抗体(sc-6177、Santa Cruz社)、抗caspase-1 p10抗体(sc-514、Santa Cruz社)。2次抗体としては以下のものを用いた。

Anti rabbit IgG HRP 結合抗体 (GE Healthcare 社)、Anti mouse IgG HRP 結合抗体 (GE Healthcare 社)、Anti goat IgG HRP 結合抗体 (Sigma 社)。

フローサイトメトリー解析

解析に用いた細胞は、 1×10^6 細胞あたり 50 μ l の PFE に懸濁し、PFE にて 500 倍希釈した抗体を 50 μ l 加えて 4°C で 20 分間反応させた。PFE で 3 回洗浄後、500 μ l の PFE に懸濁して 35 μ m ナイロンメッシュ (NBC 社) を通したものをサンプルとして用いた。解析は LSRII Fortessa (フローサイトメーター、BD Bioscience 社) 及び FlowJo (TOMY digital Biology 社) を用いた。使用した抗体は以下の通りである。

Pacific Blue (PB)-conjugated 抗体：抗 NK1.1 抗体 (PK136、BioLegend 社)、抗 CD3ε抗体 (145-2C11、BioLegend 社)、抗 CD19 抗体 (6D5、BioLegend 社)。
Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated 抗体:抗 Ly6C 抗体 (HK1.4、BioLegend 社)、抗 CD19 抗体 (6D5、BioLegend 社)。Alexa Fluor 488-conjugated 抗体:抗 Ly6C 抗体 (HK1.4、BioLegend 社)。Allophycocyanin (APC)-conjugated 抗体：抗 CD11b 抗体 (M1/70、BioLegend 社)。Phycoerythrin-Cyanine-7 (PE-Cy7)-conjugated 抗体：抗 Ly6G 抗体 (1A8、BioLegend 社)。Peridinin-Chlorophyll-Cyanine-5 (PerCP-Cy5)-conjugated 抗体：抗 F4/80 抗体 (BM8、BioLegend 社)。

リステリア感染

生後 8～12 週齢のマウスに対してリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*; 本文中では *L.mono.*と略す、笹川千尋 博士 (東京大学) より御供与頂いた) を 5×10^5 cfu/25 g weight で腹腔内投与し、感染させた。リステリア菌タイターの測定は、マウスの臓器をスライドガラスで擦り合せてすり潰し、1 ml の PBS 中に懸濁の後、PBS で 100 倍または 10000 倍希釈した。これを 1.5% 寒天末 (ナカライテスク社) と 3.7% Bacto™ Brain Heart Infusion (Becton Dickinson 社) を添加した無菌

寒天培地に塗布して 37℃のインキュベーターで 10～14 時間おき、コロニー数を計測して臓器当たりのタイターを算出した。

Tamoxifen 投与

Tamoxifen (Sigma 社) は corn oil (Sigma 社) に 20 mg/ml となるように溶解した。生後 6～10 週齢のマウス 1 個体あたり 9.0 mg/40 g weight となるように腹腔内投与により 1 日おきに 3 回投与し、さらに 1 週間後に実験に用いた。

LPS 誘導性エンドトキシンショック

生後 8～12 週齢のマウスに対して、LPS O55:B5 (Sigma 社) を 17.5 mg/kg または 22.5 mg/kg となるように、PBS で希釈し、尾静脈から投与した。LPS 投与後、麻酔下において心臓より採血し、15 μ l の 5 mM EDTA と混合し、400 x g、4℃、15 分間遠心して血漿を得た。また、マウスの生存については、LPS 投与後 12 時間ごとに経過観察を行った。

Migration アッセイ

12 mm Transwell with 3.0 μ m Pore Polycarbonate Membrane Insert (Corning 社) の
カラムに骨髓細胞より調製した好中球 4×10^5 細胞を 2% FCS を添加した HBSS
600 μ l に懸濁したものをカラムに播種した。そのカラムを 12 穴プレートにセッ
トし、12 穴プレートには rCXCL1、fMLPなどを添加した 2% FCS 入り HBSS を
入れて、インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 3 時間おいた。その後、カラム
を通り 12 穴プレート側に移動した細胞の数をフローサイトメーターで計測した。

統計解析

有意差の有無は Student の t 検定によって判断した。

謝辞

本稿を終えるにあたりまして、本研究遂行の機会を与えてくださり、御多忙であるにも関わらず多大な御指導・御鞭撻を賜りました、東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門 谷口維紹 特任教授に謹んで御礼申し上げます。いつも目をかけて下さり、時に厳しく御指導いただいたことで大きく成長できたと感じております。また、実験手技から論文執筆まで多大な御指導・御助言を賜りました柳井秀元 特任准教授 (同)に深く御礼申し上げます。公私にわたり私が学生生活を充実したものにできたのは柳井先生の御指導のお陰であります。今後も本研究で得た経験を生かして更なる精進を重ねていく所存でございます。また、共同研究者である吉田進昭 教授 (東京大学)、大段秀樹 教授 (広島大学)、尾上隆司 博士 (呉医療センター・中国がんセンター)、安健博 博士 (東京大学)、小柴隆二 博士 (同、現イーピーエス株式会社)、根岸英雄 特任助教 (東京大学)、西尾純子 特任助教 (同)、生島弘彬 特任助教 (同) に心より御礼申し上げますと共に、大学院生の水嶋優 氏 (同) に多大な御協力を頂いたことを深く感謝致します。最後に、本研究を博士論文としてまとめるに際し、多くの御助言、お力添えを頂きました東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連

携研究部門の皆様にご感謝申し上げます。

略語一覽

| | |
|----------|---|
| ASC | Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD |
| ATG16L1 | Autophagy-related protein 16-like 1 |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| Bcl-2 | B cell lymphoma-2 |
| Beclin-1 | Bcl-2 interacting coiled-coil protein-1 |
| CARD | Caspase activation and recruitment domain |
| CDC42 | Cell division cycle 42 |
| cDNA | Complementary DNA |
| CXCL | C-X-C motif chemokine |
| CXCR | C-X-C motif chemokine receptor |
| DAMPs | Damage-associated molecular patterns |
| DAPI | 4'-6'-diamidino-2-phenylindole |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| EAE | Experimental autoimmune encephalomyelitis |

| | |
|---------------|--|
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase |
| FCS | Fetal calf serum |
| fMLP | Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine |
| GFP | Green fluorescent protein |
| HBSS | Hank's balanced salt solution |
| HE | Hematoxylin-Eosin |
| HMGB1 | High-mobility group box 1 |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IL | Interleukin |
| IRFs | Interferon regulatory factors |
| ISM ODN | Immunosuppressive oligodeoxynucleotide mutated in CpG sequence |
| LC3 | Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| M-CSF | Macrophage colony-stimulating factor |
| m.o.i. | Multiplicity of infection |
| mRNA | Messenger RNA |

| | |
|----------------|--|
| NF- κ B | Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells |
| NLRC4 | NOD-like receptor family, CARD domain containing 4 |
| NLRP3 | NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 |
| NOD | Nucleotide-binding oligomerization domain |
| PAMPs | Pathogen-associated molecular patterns |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PVDF | Polyvinylidene difluoride |
| qRT-PCR | Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction |
| RAG | Recombination activating gene |
| RAGE | Receptor for advanced glycation endproducts |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RPMI | Roswell park memorial institute |
| rRNA | Ribosomal RNA |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF- α | Tumor necrosis factor- α |

z-VAD-fmk Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp(O-methyl)-fluoromethylketone

引用文献

- 1 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 2 Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435, doi:10.1038/nature07201 (2008).
- 3 Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* **6**, 1191-1197, doi:10.1038/ni1276 (2005).
- 4 Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022 (2010).
- 5 Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature reviews. Immunology* **6**, 823-835, doi:10.1038/nri1957 (2006).
- 6 Negishi, H. *et al.* Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nature immunology* **13**, 659-666, doi:10.1038/ni.2307 (2012).

- 7 Tisoncik, J. R. *et al.* Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **76**, 16-32, doi:10.1128/MMBR.05015-11 (2012).
- 8 Watts, C., West, M. A. & Zaru, R. TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Current opinion in immunology* **22**, 124-130, doi:10.1016/j.coi.2009.12.005 (2010).
- 9 Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews. Immunology* **6**, 644-658, doi:10.1038/nri1900 (2006).
- 10 Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**, 197-216, doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359 (2002).
- 11 Kayagaki, N. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117-121, doi:10.1038/nature10558 (2011).
- 12 Sollberger, G., Strittmatter, G. E., Garstkiewicz, M., Sand, J. & Beer, H. D. Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate immunity* **20**, 115-125, doi:10.1177/1753425913484374 (2014).

- 13 Wenzel, R. P. Treating sepsis. *New England Journal of Medicine* **347**, 966-967 (2002).
- 14 Deane, J. A. *et al.* Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* **27**, 801-810, doi:10.1016/j.immuni.2007.09.009 (2007).
- 15 Kawane, K. *et al.* Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* **292**, 1546-1549, doi:10.1126/science.292.5521.1546 (2001).
- 16 Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1-5, doi:10.1189/jlb.0306164 (2007).
- 17 Thomas, J. O. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* **4**, 395-401 (2001).
- 18 Ronfani, L. e. a. Reduced fertility and spermatogenesis defects in mice lacking chromosomal protein Hmgb2. *Development* **128**, 1265-1273 (2001).
- 19 Mueller, S., et al. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med* **255**, 332-343 (2004).
- 20 Vaccari, T., et al. Hmg4, a new member of the Hmg1/2 gene family. *Genomics*

- 49**, 247-252 (1998).
- 21 Little, A. J., Corbett, E., Ortega, F. & Schatz, D. G. Cooperative recruitment of HMGB1 during V(D)J recombination through interactions with RAG1 and DNA. *Nucleic acids research* **41**, 3289-3301, doi:10.1093/nar/gks1461 (2013).
- 22 Sawchuk, D. J., et al.,. V(D)J Recombination: Modulation of RAG1 and RAG2 Cleavage Activity on 12/23 Substrates by Whole Cell Extract and DNA-binding Proteins. *J Exp Med* **185**, 2025-2032 (1997).
- 23 Stros, M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochimica et biophysica acta* **1799**, 101-113, doi:10.1016/j.bbagr.2009.09.008 (2010).
- 24 Yanai, H. *et al.* HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* **462**, 99-103, doi:10.1038/nature08512 (2009).
- 25 Tang, D. *et al.* Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *The Journal of cell biology* **190**, 881-892, doi:10.1083/jcb.200911078 (2010).
- 26 Diener, K. R., Al-Dasooqi, N., Lousberg, E. L. & Hayball, J. D. The multifunctional alarmin HMGB1 with roles in the pathophysiology of sepsis and cancer. *Immunology and cell biology* **91**, 443-450, doi:10.1038/icb.2013.25

(2013).

- 27 Pisetsky, D. S. The role of nuclear macromolecules in innate immunity. *Proceedings of the American Thoracic Society* **4**, 258-262, doi:10.1513/pats.200701-027AW (2007).
- 28 Campana, L., Bosurgi, L. & Rovere-Querini, P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Current opinion in immunology* **20**, 518-523, doi:10.1016/j.coi.2008.04.012 (2008).
- 29 Yang, J. *et al.* HMGB1 is a bone-active cytokine. *Journal of cellular physiology* **214**, 730-739, doi:10.1002/jcp.21268 (2008).
- 30 Qin, S. *et al.* Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med* **203**, 1637-1642, doi:10.1084/jem.20052203 (2006).
- 31 Wang, H. HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. *Science* **285**, 248-251, doi:10.1126/science.285.5425.248 (1999).
- 32 Yanai, H., Ban, T. & Taniguchi, T. High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity. *Trends in immunology* **33**, 633-640, doi:10.1016/j.it.2012.10.005 (2012).
- 33 Lee, S. A., Kwak, M. S., Kim, S. & Shin, J. S. The role of high mobility group

- box 1 in innate immunity. *Yonsei medical journal* **55**, 1165-1176,
doi:10.3349/ymj.2014.55.5.1165 (2014).
- 34 Venereau, E. *et al.* Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med* **209**, 1519-1528, doi:10.1084/jem.20120189 (2012).
- 35 Park, J. S. *et al.* Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *The Journal of biological chemistry* **279**, 7370-7377, doi:10.1074/jbc.M306793200 (2004).
- 36 Yang, H. & Tracey, K. J. Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochimica et biophysica acta* **1799**, 149-156, doi:10.1016/j.bbagr.2009.11.019 (2010).
- 37 Yu, M. *et al.* HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* **26**, 174-179, doi:10.1097/01.shk.0000225404.51320.82 (2006).
- 38 Alves, J. N. *et al.* Critical role for CCR2 and HMGB1 in induction of experimental endotoxic shock. *Archives of biochemistry and biophysics* **537**, 72-81, doi:10.1016/j.abb.2013.06.019 (2013).
- 39 Harris, H. E., Andersson, U. & Pisetsky, D. S. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nature reviews*.

- Rheumatology* **8**, 195-202, doi:10.1038/nrrheum.2011.222 (2012).
- 40 Yamasaki, H. *et al.* Roles of high-mobility group box 1 in murine experimental colitis. *Molecular medicine reports* **2**, 23-27, doi:10.3892/mmr_00000056 (2009).
- 41 Yang, M. *et al.* Chloroquine inhibits HMGB1 inflammatory signaling and protects mice from lethal sepsis. *Biochemical pharmacology* **86**, 410-418, doi:10.1016/j.bcp.2013.05.013 (2013).
- 42 Yanai, H., *et al.*,. Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high-mobility group box proteins (HMGBs). *PNAS* **108**, 11542-11547 (2011).
- 43 Calogero, S., *et al.*,. the lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* **22**, 276-280 (1999).
- 44 Hreggvidsdottir, H. S. *et al.* The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *Journal of leukocyte biology* **86**, 655-662, doi:10.1189/jlb.0908548 (2009).
- 45 Jessop, F. & Holian, A. Extracellular HMGB1 regulates multi-walled carbon

- nanotube-induced inflammation in vivo. *Nanotoxicology*, 1-8,
doi:10.3109/17435390.2014.933904 (2014).
- 46 Pullerits, R., Jonsson, I. M., Kollias, G. & Tarkowski, A. Induction of arthritis
by high mobility group box chromosomal protein 1 is independent of tumour
necrosis factor signalling. *Arthritis research & therapy* **10**, R72,
doi:10.1186/ar2445 (2008).
- 47 Takeda, K., et al. Enhanced Th1 Activity and Development of Chronic
Enterocolitis in Mice Devoid of Stat3 in Macrophages and Neutrophils.
Immunity **10**, 39-49 (1999).
- 48 小柴隆二. 細胞質内 DNA 認識受容体としての RIG-I ファミリー分子の同
定及び多機能分子 HMGB1 の免疫応答における役割. 2011 年度博士論文
(2012).
- 49 Biswas, A. *et al.* Use of Sugar on the Healing of Diabetic Ulcers: A Review.
Journal of Diabetes Science and Technology **4**, 1139-1145,
doi:10.1177/193229681000400512 (2010).
- 50 Mantovani, A., et al.,. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages
as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*

- 25**, 549-555 (2002).
- 51 Beutler, B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev* **227**, 248-263 (2009).
- 52 Leonard, J. P., et al.,. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med* **181**, 381-386 (1995).
- 53 Park, H., Bourla, A. B., Kastner, D. L., Colbert, R. A. & Siegel, R. M. Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology* **12**, 570-580, doi:10.1038/nri3261 (2012).
- 54 Li, P., et al.,. mice deficient in IL-1beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* **80**, 401-411 (1995).
- 55 Vanden Berghe, T. *et al.* Simultaneous targeting of IL-1 and IL-18 is required for protection against inflammatory and septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine* **189**, 282-291, doi:10.1164/rccm.201308-1535OC (2014).
- 56 Rathinam, V. A., Vanaja, S. K. & Fitzgerald, K. A. Regulation of inflammasome signaling. *Nature immunology* **13**, 333-342, doi:10.1038/ni.2237 (2012).

- 57 de Alba, E. Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *The Journal of biological chemistry* **284**, 32932-32941, doi:10.1074/jbc.M109.024273 (2009).
- 58 Jin, C. & Flavell, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Journal of clinical immunology* **30**, 628-631, doi:10.1007/s10875-010-9440-3 (2010).
- 59 Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221-225, doi:10.1038/nature09663 (2011).
- 60 Nakahira, K. *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature immunology* **12**, 222-230, doi:10.1038/ni.1980 (2011).
- 61 Saitoh, T. *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* **456**, 264-268, doi:10.1038/nature07383 (2008).
- 62 Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**,

- 2503-2518, doi:10.1016/j.biocel.2004.05.009 (2004).
- 63 Mizushima, N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell death and differentiation* **12 Suppl 2**, 1535-1541, doi:10.1038/sj.cdd.4401728 (2005).
- 64 Ryter, S. W., Mizumura, K. & Choi, A. M. The impact of autophagy on cell death modalities. *International journal of cell biology* **2014**, 502676, doi:10.1155/2014/502676 (2014).
- 65 Sung Ouk, K. & Jiahuai, H. Pan-caspase inhibitor zVAD enhances cell death in RAW246.7 macrophages. *Journal of Endotoxin Research* **7**, 292-296, doi:10.1177/09680519010070041201 (2001).
- 66 Xu, Y., Kim, S. O., Li, Y. & Han, J. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *The Journal of biological chemistry* **281**, 19179-19187, doi:10.1074/jbc.M513377200 (2006).
- 67 Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-741, doi:10.1016/j.cell.2011.10.026 (2011).
- 68 Birmingham, C. L., Smith, A. C., Bakowski, M. A., Yoshimori, T. & Brumell, J. H. Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the

- Salmonella-containing vacuole. *The Journal of biological chemistry* **281**, 11374-11383, doi:10.1074/jbc.M509157200 (2006).
- 69 Ogawa, M., et al.,. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* **307**, 727-731, doi:10.1093/ (2005).
- 70 Noda, T., Yoshimori, T. Molecular basis of canonical and bactericidal autophagy. *Intern Immunol* **21**, 1199, doi:10.1093/intimm/dxp088 For (2009).
- 71 Bianchi, M. E. HMGB1 loves company. *Journal of leukocyte biology* **86**, 573-576, doi:10.1189/jlb.1008585 (2009).
- 72 Bonaldi, T. e. a. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* **22**, 5551-5560 (2003).