

論文の内容の要旨

氏名：植 木 皓 介

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：脳虚血モデルラットにおける全身諸臓器の high mobility group box protein 1 発現の変化

生体内の細胞が障害されることによって細胞外に放出される物質を damage associated molecular patterns (DAMPs) と呼ぶ。DAMPs の放出は周囲の細胞・組織に障害の状況を伝達する役割があると考えられており、障害因子の除去と組織の修復を目的とした炎症を惹起させる。正常脳組織内に存在する炎症性細胞はマイクログリアと呼ばれるマクロファージ系の細胞であり、脳虚血においてはマイクログリアが活性化され形態変化を起こし、この反応に DAMPs が関与するとの報告が蓄積され、その役割が注目されている。

DAMPs の一種である high mobility group box protein 1 (HMGB1) は、本来核内に存在する非ヒストン DNA 結合タンパク質であり、細胞の壊死に伴って HMGB1 が細胞外に放出されることが報告されている。しかし、脳虚血に際して全身諸臓器における HMGB1 の発現状況についての報告はない。そこで本研究では、ラット総頸動脈結紮による脳虚血（脳虚血再灌流障害）モデルを作成し、各臓器ならびに血中の HMGB1 発現変化について検討した。

実験には、Wistar 系雌性ラットを用い、右側総頸動脈を剖出した後、30 分間縫合糸により結紮し血流を遮断した。その後、結紮を解除し再灌流させることで脳虚血モデルとした。結紮後 24 時間で全身麻酔を施し、経心的に 4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行った。この後、脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓を摘出し、さらに後固定を行った。固定後、パラフィン包埋し、4 μm の薄切切片を用い H&E 染色を行った。同時に、1 次抗体としてウサギ抗ラット HMGB1 抗体および 2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて免疫染色を行った。発色には Envision system anti-mouse and rabbit を用い、室温で 10 分間反応させた。また、脳組織については組織を半切し、スクロース溶液により処理後、凍結切片を作製し、1 次抗体としてウサギ抗ラット Iba1 抗体を、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。さらに、結紮後 24 時間、72 時間、120 時間および 168 時間の血液を採取し、血清中の HMGB1 濃度を HMGB1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した。

抗 Iba1 抗体を用いた、術後 24 時間の脳におけるマイクログリア染色の結果、対照群では細胞体から突出した細い細胞突起が見られたのに対し、結紮群では細胞及び突起が共に顕著に膨化していた。これは本モデルによってマイクログリアが活性化されていることを示すものであった。脳組織の H&E 染色による観察では間質部の血管拡張を認めたが、顕著なリンパ球浸潤などは認められなかった。

各臓器における HMGB1 の発現について免疫染色により検討したところ、脳では側脳室を裏装する脈絡叢の細胞に陽性反応を認めた。その他の臓器においては心筋間質、肝細胞、肺泡マクロファージ、尿細管上皮細胞、ボウマン嚢上皮などに陽性反応が認められた。また、脾臓における濾胞周囲の陽性細胞数の増加は極めて顕著であった。ELISA による末梢血中 HMGB1 濃度測定の結果から、対照群では 20 ± 20 pg/ml であった HMGB1 濃度は、脳虚血再灌流後 72 時間で顕著に増加し始め、120 時間で 120 ± 20 pg/ml の最高濃度に達し、168 時間後にはわずかに減少したものの、同水準に維持されていた。

本研究の結果、脳虚血モデルラットの各臓器で HMGB1 の染色性が増大していることが明らかとなった。HMGB1 は本来核内タンパク質であり、生体を構成するすべての細胞に ubiquitous に発現しているものとされているが、本研究においては限られた細胞にのみ発現を確認することができた。これは細胞種によって発現の強度が異なる可能性を示唆するものであった。免疫染色の結果、細胞形態などから類推して、HMGB1 陽性を示した細胞には、それぞれの臓器を構成する肝細胞、尿細管上皮やボウマン嚢上皮などの実質細胞または心筋間質部の毛細血管内皮細胞などと、当該臓器以外の部位から移行したと考えられる肺泡マクロファージや脾臓内に集簇するマクロファージ様の細胞があった。いずれの細胞においても陽性反応は結紮後 24 時間で認められた。ELISA の結果では、末梢血中に顕著に HMGB1 が増加するのは結紮 72 時間後であり時間的にずれがあった。これまでの報告から、脳虚血により障害された神経細胞などから放出される HMGB1 は、血流を介して末梢組織に移行するとされ

ており、72 時間後に観察された末梢血中の HMGB1 濃度の上昇は、マクロファージ系の細胞の貪食能力が飽和したことを示している可能性が考えられた。脳における炎症は一定時間の後に終息される必要があり、本研究で観察された HMGB1 陽性細胞の存在は、末梢血中の余剰な HMGB1 をこれらの陽性細胞が吸収した結果であり、炎症の終息を意味している可能性がある。一方、脳梗塞においては脳血液関門が破壊され、脾臓などからリンパ球が脳実質内に流入するとされている。これら流入する細胞は脾臓などから移行すると考えられており、実際に脳梗塞後には脾臓の縮小が観察される。本モデルにおいては、脳実質におけるリンパ球浸潤などは観察されなかったが、脾臓におけるリンパ球数の減少とこれに伴う脾臓の縮小が観察された。これは、本研究で用いた脳虚血モデルでは、血流の遮断が僅か 30 分間であったことから、脳血液関門の構造が一定程度維持され、脳外部からの炎症細胞の浸潤を防いでいること、また、中大脳動脈閉鎖などにより得られる明瞭な脳梗塞巣が形成されないことなどから、リンパ球集簇が特定の部位に惹起されず組織学的に検出しにくかった可能性が考えられた。

本研究の結果、脳虚血モデルにおいて体内の各臓器における HMGB1 陽性細胞が総頸動脈結紮後比較的早期に顕著に増加することが確認された。末梢血中の HMGB1 濃度の上昇とは時間的に異なることから、HMGB1 陽性細胞の増加の生物学的意義については、今後さらに検討していく必要があるものと考えられた。