

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

植 木 皓 介

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導：外木 守雄 教授, 篠塚 啓二 助教, 浅野 正岳 教授)

要旨

細胞が障害されると damage associated molecular patterns (DAMPs) と呼ばれる物質を放出し、脳組織内では炎症性細胞であるマイクログリアの活性化に関与している。DAMPs の一種である high mobility group box protein 1 (HMGB1) は核内に存在するタンパク質であるが、細胞障害に際して核内から細胞質へさらに細胞外へ放出される。こうして放出された HMGB1 は炎症反応を増強することから、様々な病態との関係が注目されてきた。その中で脳梗塞における HMGB1 の機能が着目されているが、脳梗塞発症時の全身諸臓器における HMGB1 発現の報告はない。そこで本研究は脳虚血モデルラットの全身諸臓器ならびに末梢血中の HMGB1 発現変化について検索することを目的とした。

片側の総頸動脈を 30 分間結紮した後、この結紮を解除し脳虚血モデルとした。術後 24 時間で脳を摘出し、マイクログリアの特異的マーカーの抗 Iba1 抗体により蛍光染色を行った結果、対照群と比較して結紮群ではマイクログリアの細胞突起が顕著に膨化していた。また HE 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 発現について検討した結果、結紮群では、側脳室を裏装する脈絡叢、心筋線維間、肝細胞細胞質、肺胞マクロファージ、尿細管上皮およびボウマン嚢上皮に HMGB1 陽性細胞が認められ、脾臓ではリンパ濾胞周囲に HMGB1 陽

性細胞数が顕著に増加していた。さらに末梢血中の HMGB1 濃度について ELISA による測定を行った結果、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。

脳虚血モデルにおける HMGB1 発現は脳のみならず全身諸臓器において変化する事が明らかとなった。このことは脳虚血に伴伴する病態の発症に何らかの関連があるものと考えられた。

キーワード：脳虚血, DAMPs, HMGB1, マイクログリア

緒言

日本人の死因の第3位は脳血管疾患であり、その多くは脳梗塞である。脳梗塞の予後は患者の年齢や性別、基礎疾患の有無など、多くの因子により左右される。現在までのところ、脳梗塞に対する治療は tissue plasminogen activator などが主体であり¹⁾、予後向上のためには発症後に脳内で生じる組織学的変化などについて詳細に解析する必要がある。一般に生体内の細胞が障害され、これに応じて細胞外に放出される物質を damage-associated molecular patterns (DAMPs) と呼ぶ²⁾。DAMPs の放出は障害の状況を周囲の細胞・組織に伝達する役割があると考えられ、この放出が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。従って障害部位における炎症は生体にとって必要不可欠なものと考えられる。脳梗塞では低酸素状態に置かれた神経細胞などが障害され、脳梗塞巣においても炎症が起こるが、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ーファージ系の細胞であり、脳梗塞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すことが知られている^{3,4)}。近年、脳梗塞におけるマイクログリアの活性化に DAMPs が関与しているとする報告が蓄積しつつあり、その機能的な役割が注目されている^{5,6)}。

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、遺伝子構造の維持に関係する分子である⁷⁾。興味深いことに HMGB1 は、細胞の壊死に伴って細胞外に放出される DAMPs の一種であることが明らかにされ⁸⁾、HMGB1 の病態との関係が注目されてきた。しかし、脳梗塞に際して全身諸臓器における HMGB1 の発現状況について比較した報告はない。そこで本研

究では、ラット総頸動脈結紮による脳虚血モデルにおいて全身諸臓器で HMGB1 発現がどのように変化しているか検討した。

材料および方法

1. 実験動物

実験には、体重 200~300 g の Wistar 系雌性ラット (5~6 週齢) を用いた。ラットは、12 時間の明暗サイクルの環境下、恒温室 (23°C) で自由に食物および水分摂取ができる状態で飼育した。本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認 (AP16D026) を受け、国際疼痛学会のガイドラインに従って行った。

2. 脳虚血モデルラットの作成

5%イソフルラン吸入による麻酔導入後、三種混合麻酔薬 (塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg + ミタゾラム 2 mg/kg + 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg) を腹腔内注射し全身麻酔を施した。麻酔施行後、尾静脈より採血 (~500 μ l) を行った。頸部の剃毛後、メスにより正中線を約 1.5 cm 切開し気管を露出させた。気管後背面に位置する右側総頸動脈を剖出し、4-0 ナイロン絹糸を用いて結紮し、30 分間血流を遮断した (図 1)。処置後、結紮を解除し創部を縫合後、ラットをケージに戻し再び飼育した。虚血再灌流後 24, 72, 120 および 168 時間において、上記と同様の方法で全身麻酔を施し、尾静脈より採血を行った。さらに開胸し、経心的に生理食塩水を灌流させ脱血により安楽死させた後、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。灌流固定後、全身の緒臓器を摘出し、同様の固定液で室温にて 2 日間の固定を行った。固定後の組織は半割し、一方を 20%ショ糖溶液に 48 時間浸漬し凍結切片を、また他方を以下の方法に従ってパラフィン切片を作製した。

3. 免疫組織染色

灌流固定後の脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓をパラフィン包埋し、ミクロトームにより厚さ 4 μm の切片を作成した。キシレンによる脱パラフィンとこれに続く透徹の後、内因性ペルオキシダーゼの活性を 3% H_2O_2 -メタノールにより不活化した。切片を流水により洗浄し、1%ウシ血清アルブミン加リン酸緩衝液 (1% bovine serum albumin-phosphate buffered saline; 1% BSA-PBS) に室温で 1 時間浸漬した。その後、1 次抗体としてウサギ抗ラット HMGB1 抗体 (100 倍希釈, abcam 社製) により 24 時間反応させた。反応後、切片を PBS により洗浄し、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 (500 倍希釈, Thermo Fisher Scientific 社製) を 1 時間反応させた。PBS による洗浄の後、Envision system anti-mouse and rabbit (Dako 社製) を室温で 10 分間反応させ発色を行った。蛍光染色は凍結切片を用いて行った。切片を流水により洗浄した後、1% BSA-PBS に室温で 1 時間浸漬した。1 次抗体としてウサギ抗ラット Iba-1 抗体 (100 倍希釈, abcam 社製) により 24 時間反応させた。反応後、切片を PBS により洗浄し、2 次抗体として green fluorescence protein (GFP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (100 倍希釈, Thermo Fisher Scientific 社製) を 1 時間反応させた。切片を封入後、蛍光顕微鏡 (KEYENCE 社製) により組織像を観察した。

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

採血した血液は 25°C で 30 分間静置したのち、4°C にて 24 時間反応させた。反応後、4°C で 3500 \times G, 10 分間遠心分離し、上清を新しいエッペンドルフチューブに採取し、血清サンプルとした。血清中の HMGB1 濃度は HMGB1 ELISA Kit II (シノテスト社製)

を用いて測定した。吸光度の測定は 3550 型 micro plate reader (Bio-Rad 社製) を用いた。

5. 統計学的処理

統計分析は Mann-Whitney U-test を用いて行った。結果は平均値 \pm SD で示した。P 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

結果

1. 脳虚血におけるマイクログリア細胞の形態変化

虚血再灌流後 24 時間の凍結切片を用いた抗 Iba1 抗体による染色の結果、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（図 2A）、結紮群では細胞および突起が共に顕著に膨化していた（図 2B）。HE 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（図 2C）。

2. 各臓器における HMGB1 の発現変化

免疫染色により各臓器における HMGB1 の染色性について検討した。その結果、脳では、結紮群では側脳室の脈絡叢に HMGB1 陽性反応が認められた（図 3A）。心臓においては心筋線維間の間質に強い陽性反応が認められた（図 3B）。肝臓では、肝細胞の細胞質に弱い陽性反応を認め、この反応は広範囲にわたっていた（図 3C）。肺においては、肺胞上皮に極めて弱い陽性反応を見るが、肺胞マクロファージの一部に極めて強い陽性反応が認められた（図 3D）。また、腎臓においては尿細管上皮とボウマン囊上皮の一部に極めて強い陽性反応が認められた（図 3E）。いずれの臓器においても対照群では明瞭な陽性反応は認められなかった。脾臓においても同様の検討を行ったが、結紮群では顕著に HMGB1 陽性細胞数が増加していた（図 3F, G）。同細胞は正常脾臓においても若干数観察されたが、結紮群において濾胞周囲における陽性細胞数の増加は明らかであった。

3. 末梢血における HMGB1 濃度の変化

末梢血中の HMGB1 濃度について ELISA による測定を行った。その結果、図 4 に示すよ

うに対照群の血清においては 20 ± 20 pg/ml の濃度を示したが、脳虚血後は時間経過とともに HMGB1 濃度は上昇する傾向にあった (図 4)。脳虚血後 120 時間で 120 ± 20 pg/ml の最高濃度に達し、168 時間後には若干減少するものの、同レベルに維持されていた。

考察

マイクログリアは突起をシナプス部に伸展させることによるシナプス監視⁹⁾、損傷を受けた運動神経でシナプス終末を引きはがす synaptic stripping¹⁰⁾、また神経回路の pruning¹¹⁾などの多彩な作用を有する。こうした作用の中でマイクログリアはその形態を変化させることが知られており^{3,4)}、これは正常脳の 2 光子励起顕微鏡による観察から明らかにされている^{12,13)}。本研究では、脳虚血再灌流障害と言われる病態を想定し、ラット片側総頸動脈を 30 分間結紮することにより脳虚血状態とした後、結紮を解除するモデルを用いた。再灌流後、マイクログリアの特異的マーカーである抗 Iba1 抗体を用いた免疫染色から、突起および細胞体の膨化が観察された。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している。一般にマイクログリアの活性化に伴った形態変化は ATP やグルタミン酸の濃度などに応じて変化すると報告されている^{3,4,13)}。本研究で観察されたマイクログリアの形態変化とこれらの物質との関連については今後さらに検討が必要と考えられる。

脳虚血では alarmin の一種である HMGB1 が増加することが報告されており⁷⁾、この分子が梗塞巣の範囲やマイクログリアの活性化を調節しているとされている^{15,16)}。本研究でも末梢血中の HMGB1 濃度は虚血再灌流後 72 時間以降で顕著に増加していた。この結果は脳虚血により放出された HMGB1 は、脳においては濃度が減少し末梢に移行するとの報告¹⁵⁾と一致するものであった。

HMGB1 の細胞外放出には active secretion と passive release がある。前者では lipopolysaccharide 刺激などに応じて分泌が促進されるのに対し、後者では壊死に陥る細胞

から放出されることが明らかとなっている⁷⁾。また、興味深いことにアポトーシスによって死滅する細胞からは放出されない⁷⁾。脳虚血において HMGB1 を放出する細胞については神経細胞が主体と考えられるが、虚血による神経細胞壊死の結果、放出された HMGB1 は標的細胞の膜上に表出されている toll-like receptor 4 に結合し、その後の炎症反応を拡大していくものと考えられている¹⁷⁾。本研究では脳における炎症像について HE 染色による観察を行ったが、リンパ球などの浸潤は顕著には認められなかった。一般的に、脳梗塞においては脳血液関門が破壊され、脾臓などからのリンパ球の流入により、脾臓の縮小が観察される¹⁸⁾。本モデルにおいても脾臓のリンパ球数の減少が認められたが、脳血液関門の構造が一定程度維持され、脳外部からのこれら炎症性細胞の浸潤を防いでいる可能性が考えられた。

本研究では、全身諸臓器の免疫染色を行い HMGB1 の局在について観察を行ったが、脳では側脳室を裏装する脈絡叢において HMGB1 陽性反応を認めた。また、全身諸臓器においては心筋線維間、肝細胞、肺胞マクロファージ、尿細管上皮細胞およびボウマン嚢上皮などに HMGB1 の陽性反応が認められた。また、脾臓における陽性細胞数の増加は極めて顕著であり、この細胞の性質については今後の検討課題である。陽性反応が見られた部位にはマクロファージ系の細胞が存在していたが、脳で放出され、血流により末梢に移行した HMGB1 が、マクロファージ系の細胞に貪食された結果であると考えられる。脳における炎症は一定期間の後に終息される必要があり、本研究で観察された各臓器における HMGB1 の局在はこうした現象を裏づけるものであると考えられる。

結論

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、脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓の各臓器ならびに血中の DAMPs の一種である HMGB1 発現変化について検討した。以下にその結果、結論を得た。

1. 脳虚血後再灌流することによって、マイクログリアが活性化することが確認でき、脳内の炎症反応の可能性が示唆された。
2. 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、ボウマン囊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。
3. 結紮群における ELISA による末梢血液中 HMGB1 濃度は脳虚血再灌流後 72 時間で有意に上昇し、120 時間で最高濃度に達し、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。

以上より、脳虚血モデルにおける HMGB1 発現は脳のみならず全身諸臓器において変化する事が明らかとなった。

謝辞

稿を終えるにあたり、格別なるご指導を賜りました日本大学歯学部口腔外科学講座の外木守雄教授に心より感謝申し上げます。本研究をご指導およびご校閲賜りました日本大学歯学部病理学講座の浅野正岳教授に謹んで深く感謝申し上げます。最後に本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました、日本大学歯学部口腔外科学講座の篠塚啓二助教を始め、日本大学歯学部口腔外科学講座また日本大学歯学部病理学講座の皆様に感謝いたします。

文献

1. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333, 1581-1587.
2. Yang D (2005) Current Opinion in Immunology Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Oppenheim J* 17, 359-365.
3. 林良憲, 中西博 (2013) 見えてきたミクログリア突起の動きと働き 注目されるミクログリアのシナプス再編における役割 *日薬理誌* 142, 231-235.
4. Fontainhas AM, Wang M, Liang KJ, Chen S, Mettu P, Damani M, Fariss RN, Li W, Wong WT (2011) Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One* 6, doi: 10.1371/journal.pone.0015973.
5. Shichita T (2018) Molecular and cellular mechanisms underlying the sterile inflammation after ischemic stroke. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 151, 9-14.
6. Gülke E, Gelderblom M, Magnus T (2018) Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther Adv Neurol Disord* 11, 1-14.
7. Frank MG, Weber MD, Watkins LR, Maier SF (2015) Stress sounds the alarmin: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun* 48, 1-7.
8. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic

- cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
9. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29, 3974-3980.
 10. Blinzinger K, Kreutzberg G (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85, 145-157.
 11. Hong S, Dissing-Olesen L, Stevens B (2016) New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 36, 128-134
 12. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
 13. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8, 752-758.
 14. Yang QW, Xiang J, Zhou Y, Zhong Q, Li JC (2010) Targeting HMGB1/TLR4 signaling as a novel approach to treatment of cerebral ischemia. *Frontiers in bioscience* 2, 1081-1091.
 15. Kim JB, Sig Choi J, Yu YM, Nam K, Piao CS, Kim SW, Lee MH, Han PL, Park JS, Lee JK (2006) HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J Neurosci* 26, 6413-6421.
 16. Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M (2007) Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody

ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* 21, 3904-3916.

17. Laird MD, Shields JS, Sukumari-Ramesh S, Kimbler DE, Fessler RD, Shakir B, Youssef P, Yanasak N, Vender JR, Dhandapani KM (2014) High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. *Glia* 62, 26-38.
18. Seifert HA, Hall AA, Chapman CB, Collier LA, Willing AE, Pennypacker KR (2012) A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into system iccirculation. *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 1017-1024.



図1：総頸動脈をナイロン糸で結紮した脳虚血モデルラット

矢印は右側総頸動脈を示す

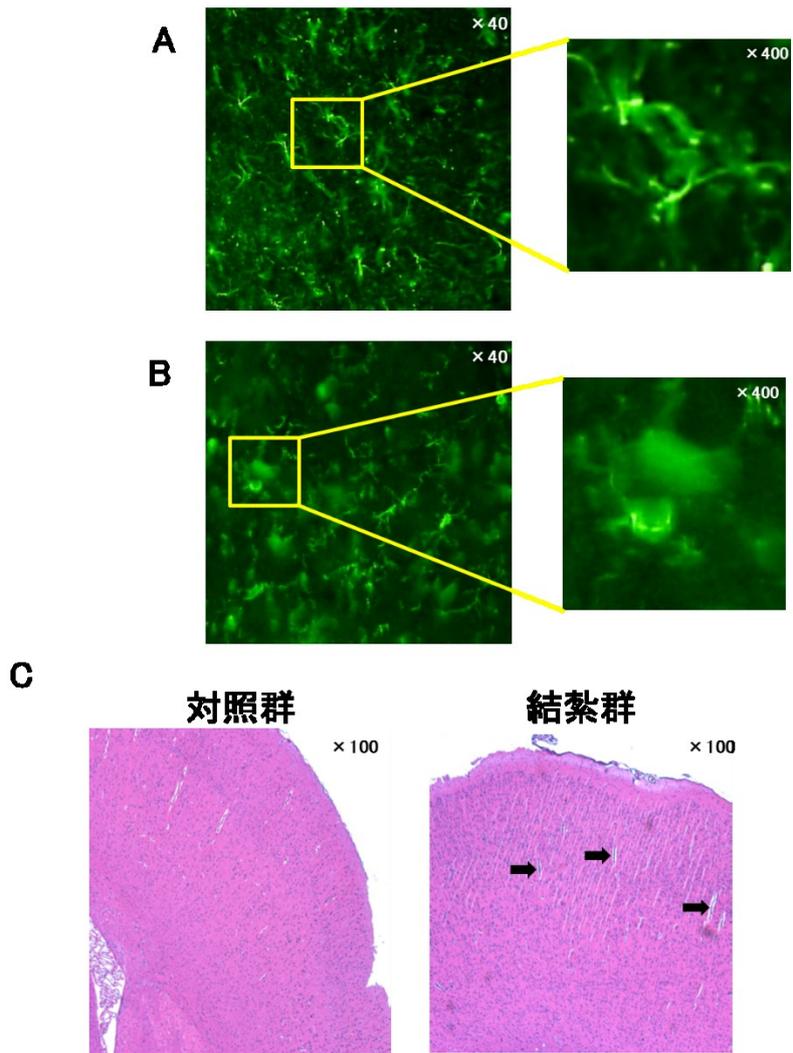


図 2 : 脳虚血モデルラットの組織学的観察標本

A : 対照群

マイクログリア細胞体とその拡大像を示す

B : 結紮群

マイクログリア細胞体とその拡大像を示す

C : モデルラットの脳における HE 染色像

矢印は間質部の拡張した血管を示す

対照群

結紮群

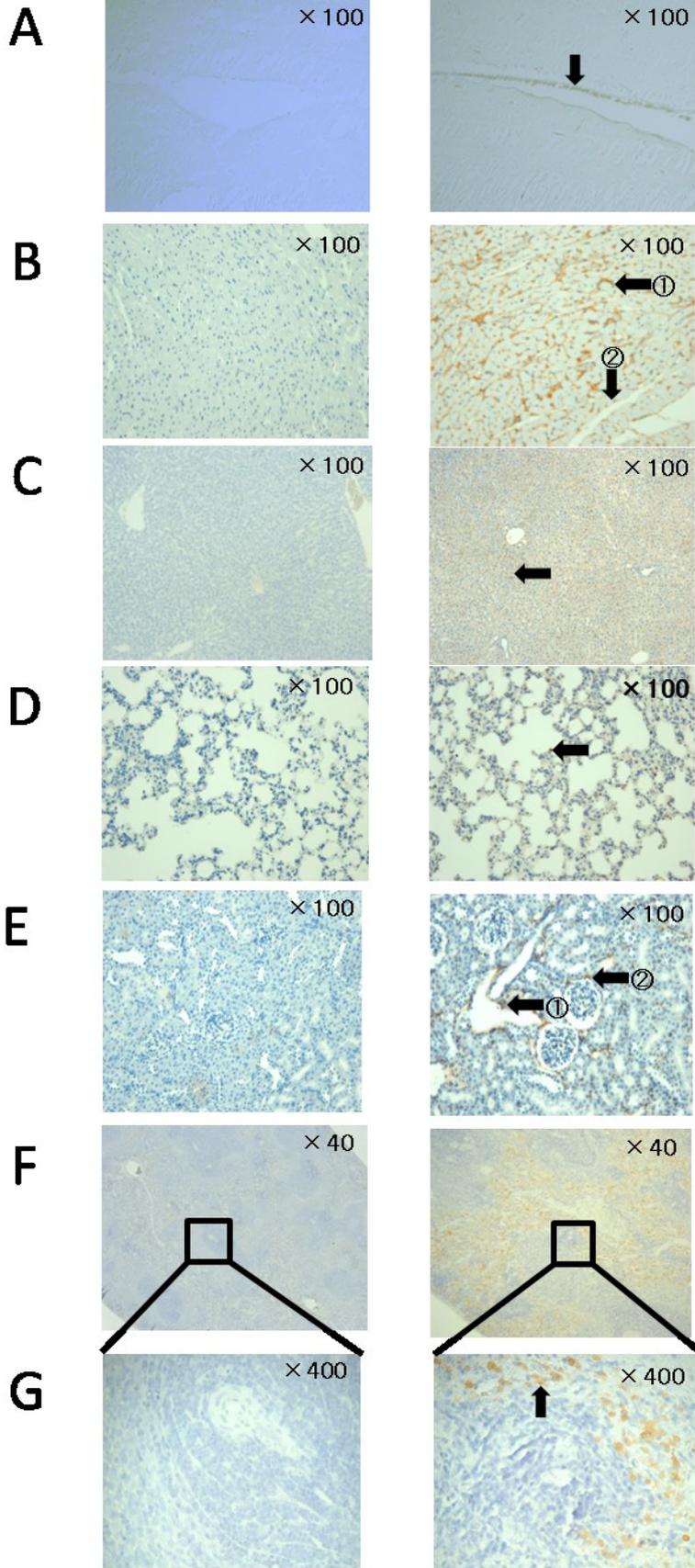


図3：免疫組織染色による各臓器における HMGB1 の発現

A：脳

矢印は側脳室の脈絡叢における代表的な HMGB1 陽性細胞を示す

B：心臓

矢印①は HMGB1 陽性を認めた代表的な心筋間線維を示す

矢印②は HMGB1 陽性を認めた代表的な毛細血管内皮細胞を示す

C：肝臓

矢印は HMGB1 陽性を示した代表的な肝細胞を示す

D：肺

矢印は HMGB1 陽性を示した代表的な肺胞マクロファージを示す

E：腎臓

矢印①は HMGB1 陽性を認めた代表的な尿細管上皮を示す

矢印②は HMGB1 陽性を認めた代表的なボウマン嚢上皮を示す

F：脾臓

G：濾胞構造強拡大像

矢印は濾胞構造周辺に出現した代表的な HMGB1 陽性細胞を示す

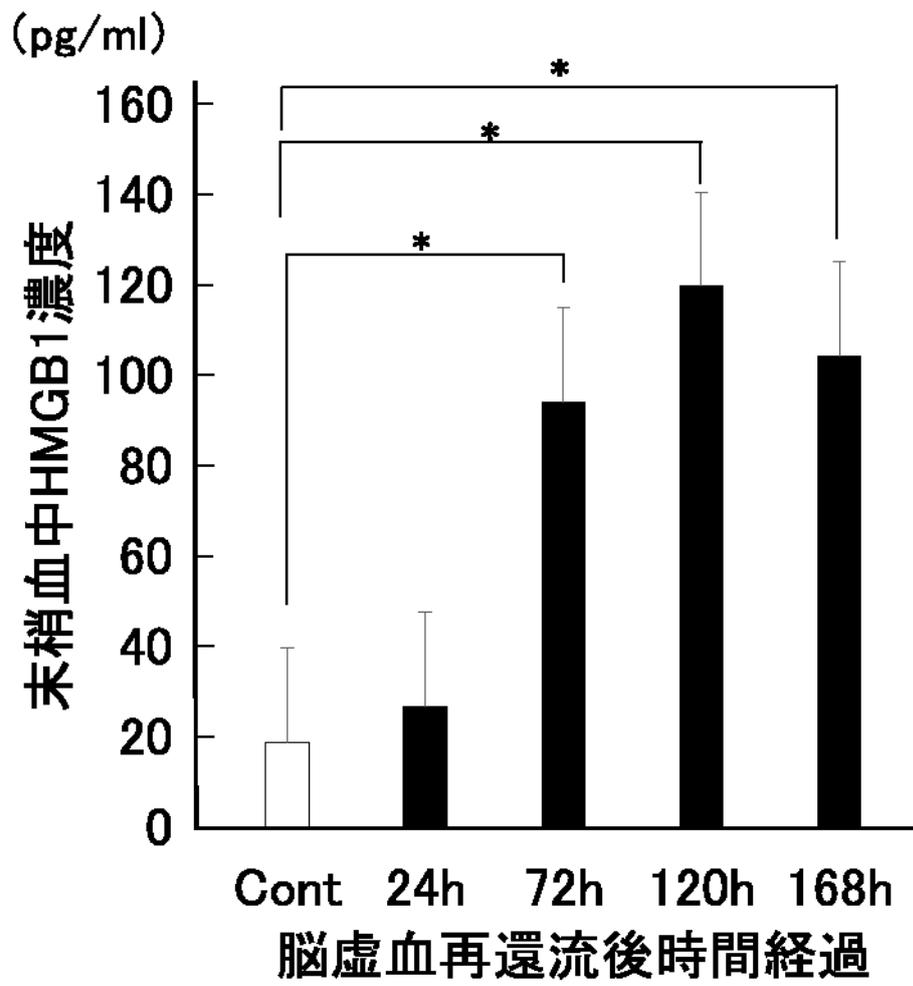


図4：ELISAによる末梢血中HMGB1濃度測定結果

* $P < 0.05$