

ラット一過性脳虚血モデルにおける全身臓器の
HMGB1 の発現

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

梶原 遼

修了年 2021 年

指導教員 大島 秀規

目次

1	概要	1
2	略語集	3
3	緒言	4
4	材料と方法	
4.1	一過性脳虚血モデル	8
4.2	組織染色	10
4.3	Western blotting	11
4.4	Polymerase chain reaction	12
4.5	統計解析	12
5	動物取り扱い及び実験における倫理的配慮	13
6	結果	
6.1	各臓器の組織染色	14
6.2	脳組織染色	14
6.3	GFAP の定量	14
6.4	CD11b の定量	15
6.5	MMP-9 の測定	15
6.6	PKC δ の測定	15
7	考察	
7.1	軽微脳損傷と頭蓋内環境	16
7.2	軽微脳損傷と全身の炎症反応	17
8	結論	19
9	謝辞	20
10	図表	21
11	引用文献	34
12	研究業績	38

1 概要

一過性脳虚血発作は軽症の脳虚血性疾患と一般的には捉えられており、「局所的な脳、脊髄、網膜の虚血によって発症したものの新鮮な梗塞を有さない一過性の神経症状」と定義される。患者、医師共に啓蒙が十分とは言えず、他の脳卒中疾患より軽症と考えられる傾向にあるが、近年脳虚血発作後に認知機能の低下や疲労感、生活水準の低下などを起こすことが報告され、今後どのような対応が必要か注目されている。つまり一過性脳虚血発作後に迅速かつ適切な治療が行われれば、続発する脳梗塞の発症を大幅に抑制できる。脳卒中後に全身性の合併症を伴うことは临床上頻繁におきることであり、前述の報告は一過性脳虚血発作においても全身性の合併症を伴う可能性を示している。一過性脳虚血発作は従来考えられているより人体にとって重要な反応を引き起こしている可能性がある。今回敗血症における致死性に関するメディエーターとして報告された damage associated molecular patterns の一種である high mobility group box-1 (HMGB1) に注目した。虚血モデルにおいて HMGB1 の全身臓器での発現が観察されている。今回きわめて軽度の虚血負荷を加えた一過性脳虚血モデルで同様に HMGB1 の全身性の発現が起こるかを観察した。さらにこのモデルで脳内にどのような変化が起こっているかを観察した。

マイクロ血管クリップによる一過性の総頸動脈遮断を行い、ラット一過性脳虚血モデルを作製した。片側遮断群と両側遮断群を作製し、3日後に脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、大腸、小腸を摘出した。正常対象群として皮膚切開のみを行った Sham 群を作製した。免疫染色で脳及び全身臓器の HMGB1 発現を観察した。また一過性脳虚血後の脳内の細胞応答を観察した。アストロサイトの発現定量のために glial fibrillary acidic protein (GFAP)、炎症細胞であるマイクログリアの発現定量のために CD11b を Western blotting で定量した。Polymerase chain reaction にて組織炎症の指標である protein kinase C δ (PKC δ)、組織破壊の指標である matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) を測定した。

全身臓器の免疫染色において、心臓、腎臓以外の臓器で HMGB1 陽性を示す細胞を認めた。肺胞腔の細胞、肝細胞、脾臓リンパ球、大腸粘膜固有層細胞、小腸の粘膜固有層細胞が HMGB1 陽性

を示した。肺、肝臓、脾臓、大腸、小腸では、Sham 群や片側遮断群に比べ、両側遮断群で HMGB1 陽性細胞の増加が見られた。また、脳組織中にも両側遮断群で HMGB1 陽性細胞を認めた。GFAP の発現量は脳皮質において両側遮断群では Sham 群に比べ有意に高い値を示した。CD11b の発現量も脳皮質において両側遮断群で Sham 群に比べ有意に高い値を示した。PKC δ 、MMP-9 の発現も遮断群は Sham 群に比べ高い傾向にあった。

軽微な脳虚血モデルであるラット一過性脳虚血モデルにおいて、脳内の神経障害と炎症反応が生じるだけでなく、全身臓器でも炎症反応が引き起こされることがわかった。今後、一過性脳虚血発作と全身臓器の障害との関連を解明するにあたり重要な結果と考えられた。

2 略語集

DAMPs: damage associated molecular patterns

DIC: disseminated intravascular coagulation

DWI: diffusion weighted image

FLAIR: fluid attenuated inversion recovery

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HMGB1: high mobility group box-1

IL-1 β : interleukin-1 β

MRI: magnetic resonance imaging

MMP-9: matrix metalloproteinase -9

mRNA: messenger ribonucleic acid

PCR: polymerase chain reaction

PKC δ : protein kinase C δ

RAGE: receptor of advanced glycation end product

TLR-4: toll like receptor-4

TNF α : tumor necrosis factor α

3 緒言

一過性脳虚血発作は軽症の脳虚血性疾患とされ、かつては「24時間以内に神経学的所見が消失する血管の病変が疑われるもの」と定義されていた。しかし画像検査の進歩に伴い前述の定義で一過性脳虚血と診断された患者の約半数に magnetic resonance imaging (MRI) の diffusion weighted image (DWI) にて新鮮な梗塞巣を認めることがわかり定義が変更された。米国心臓協会、米国脳卒中協会の発表を引用すれば、「局所的な脳、脊髄、網膜の虚血によって発症したものの新鮮な梗塞を有さない一過性の神経症と定義された [1]。従来、一過性脳虚血発作は脳梗塞、くも膜下出血、脳出血などと比べ軽症と考えられており、患者、医師共に重症疾患と考えられない傾向にある。しかし、近年一過性脳虚血発作後の悪影響の報告が相次いでおり、2018年に Bivard らは一過性脳虚血後に脳萎縮、高次機能障害を引き起こすことを報告している [2]。しかし前述の通り、一過性脳虚血が及ぼす悪影響に比して患者の関心は高いとは言えない。一過性脳虚血発作を起こした患者の3割は24時間以内に医療機関を受診しないという報告もあり、これは医療機関、患者ともに適切な啓蒙がされていないためと考えられる [3]。

一過性脳虚血発作と脳梗塞を同一の概念でとらえるべきとの観点より、Uchiyama らは急性脳血管症候群 (acute cerebrovascular syndrome) という概念を提案した [4]。一過性脳虚血発作を疑えば、発症機序の確定とその後の脳梗塞発症予防のための抗血小板薬をはじめとした速やかな治療の開始が望まれる [5]。Rothwell らは報告によれば、脳梗塞患者の発症当日に17%、前日に9%、7日以内に43%の患者が一過性脳虚血発作を発症した [6]。一過性脳虚血後脳梗塞を発症した患者の半数は2日以内に発症していた。Johnston らは一過性脳虚血の脳梗塞発症リスク評価として ABCD² スコアを提唱した [7]。ABCD² スコアは年齢 (Age: 60歳以上)、血圧 (Blood pressure: 収縮期140mmHg、拡張期90mmHg以上)、臨床症状 (Clinical feature: 片麻痺または呂律障害)、症状持続時間 (Duration of symptoms)、糖尿病 (Diabetes) の各項目を点数化したものである。ABCD² スコアは48時間以内の脳梗塞の発症を予測し、0-3点で1.0%、4-5点で4.1%、6-7点では8.1%に及ぶと報告された。一過性脳虚血発作の多くは抗血小板薬で加療されるが、短期のうちに脳梗塞を

発症するリスクがあるため、一過性脳虚血は症状が消失していても速やかに精査と治療を開始すべきであると考えられる。また、Rothwell らは Early Use of Existing Preventing Strategies for Stroke 研究で一過性脳虚血患者の迅速な診断と治療を行うことで脳梗塞の発症を有意に抑制できると報告した [8]。Coutris は一過性脳虚血発作に対し緊急の治療が開始できれば、その後の脳梗塞の発症を 8 割軽減できると報告している [9]。

Simmons らによると一過性脳虚血の繰り返しにより脳機能の低下、異常行動が発症することが報告されている [10] [11]。また、画像検査においては臨床現場では DWI での高信号の有無が重要視されているが、一過性脳虚血発作後 24 時間以内の DWI で責任病変が検出されない場合でも、30 日後の MRI の fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) 画像で症状を説明しうる病変が検出される場合があると報告されている [12]。また、一過性脳虚血発作において FLAIR で異常信号の見られない場合であっても functional MRI で神経回路の断裂、局所的な脳皮質の崩壊が見られるという [13]。脳波検査においても一過性脳虚血発作後局所的徐波を認め、脳磁図でも一過性脳虚血発作の責任病変と考えられた部位に徐波や β 波を認めたという報告もある [14] [15]。これは一過性脳虚血において何らかの病理学的変化を示唆していると考えられる [16]。また、一過性脳虚血の患者は疲労を感じていることが多い [17]。さらに一過性脳虚血患者の 26% に 90 日後の modified Rankin Scale の低下が見られたと報告されている [18]。これらの報告は一過性脳虚血が全身性の何らかの反応を引き起こしている可能性を示唆している。

脳卒中や脳外傷直後に全身の合併症を生じることが臨床の場でよく見かける事象であり、代表的なものはタコつぼ型心筋症 [19] と神経原性肺水腫である [20]。これらは脳への損傷のみで頻繁に観察される全身合併症である。脳卒中は我が国で死因の上位を占めている。脳卒中は死因として悪性新生物、心疾患、肺炎に次ぎ第 4 位であり、その多くを脳虚血性疾患が占めている。また、脳卒中は患者の日常生活動作を大幅に低下させ、その社会的損失は計り知れない。脳卒中の危険因子として年齢、男性、高血圧、糖尿病、脂質異常、喫煙、心房細動、大量飲酒などがあり、一次、二次予防が重要である。しかし急性期虚血性疾患の投薬治療は限られており、新規の治療の

開発が望まれている。脳虚血による細胞壊死で炎症が惹起されることが知られており、細胞が障害に反応して放出する物質を damage associated molecular patterns (DAMPs) と呼ぶ [21]。High mobility group box-1 (HMGB1) は DAMPs の一つであり、様々な炎症性疾患に関与している。HMGB1 は警報の役割を持つ alarmin 分子として細胞より放出された後 receptor of advanced glycation end product (RAGE)、toll like receptor-4 (TLR-4) などの受容体を経て炎症性サイトカインである interleukin-1 β (IL-1 β) や tumor necrosis factor α (TNF α) などの放出を促し、炎症を引き起こす [22] [23]。HMGB1 は局所的には自然炎症、自然免疫などに寄与し、全身性に発現するとショックや播種性血管内凝固症候群 disseminated intravascular coagulation (DIC) を引き起こす。また、局所的であっても慢性的な作用により関節リウマチ、急性呼吸窮迫症候群、間質性肺炎、再灌流障害、動脈硬化などに関与すると報告されている [24] [25] [26] [27]。もともと HMGB1 は全ての有核細胞に存在する非ヒストン核タンパク質であり、様々な転写因子の活性の間接的な調節に関係することが知られていた [28] [29]。しかし、Wang らにより HMGB1 が敗血症においてエンドトキシン血症の死亡率に関わっていることが報告されて以降、様々な炎症性疾患への関与が報告されている [30]。その後の報告により様々な細胞から細胞障害性の刺激で HMGB1 が放出されることがわかってきた。脳虚血性疾患においても HMGB1 の放出は中枢神経の炎症に関与している可能性が報告されており、臨床的な治療の標的として期待されている [31]。

軽症な脳虚血と考えられている一過性脳虚血において全身性の炎症反応が惹起されている可能性を示す報告は限られている [32]。本研究ではラットにきわめて軽度の虚血負荷を加えた総頸動脈一過性遮断モデルを作製し [33]、全身性の炎症反応が起きるかを観察した。特に全身性の炎症に関係していると考えられている HMGB1 の全身臓器における発現に注目した [30]。HMGB1 は脳梗塞において血中濃度が上昇することが報告されている [32]。また脳内の細胞反応に着目し、アストロサイトの発現定量のために glial fibrillary acidic protein (GFAP)、炎症細胞であるマイクログリアの発現定量のために CD11b を Western blotting で定量した。さらに脳組織炎症や脳組織破壊が起こっているかを確認するために、組織炎症の指標である protein kinase C δ (PKC δ)、組織破壊

の指標である matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) を測定した。本研究の仮説は「一過性脳虚血発作においても全身性の炎症反応が惹起される」である。

4 材料と方法

4.1 一過性脳虚血モデル

一過性脳虚血モデルには 250-300 グラムの雄性 Sprague-Dawley ラットを使用し、マイクロ血管クリップを用いた総頸動脈一過性遮断モデルを作製した。ラット一過性脳虚血モデルとしては Ejaz らが報告している開頭下でのマイクロ血管クリップによる遠位中大脳動脈の 15 分遮断モデル [34]、Fan らの報告している縫合糸による中大脳動脈遮断モデル [35] などがある。またラット両総頸動脈の永久遮断モデルが慢性の脳の低灌流モデルとして用いられており [36]、今回用いた総頸動脈一過性遮断モデルは、後方循環系から前方循環系への血流が保たれている点で前述の中大脳動脈遮断モデルより軽症な脳虚血モデルである。まずラットをイソフルレン 4% で吸入麻酔を導入し、十分な深度の麻酔を確認し、仰臥位で保温パッドに留置した。術中はイソフルレン 1% で維持麻酔した。直腸内に体温測定プローブを挿入し、術中は保温パッドで体温を 37 度に維持した。エタノールを用いて皮膚切開部を消毒した。局所麻酔には 10 万倍エピネフリン入り 1% キシロカインを用いた。頸部皮膚正中を頭尾方向に約 30 mm 切開し、軟部組織を展開後、甲状腺を損傷しないように上方に展開した。顎二腹筋と胸鎖乳突筋の間を展開し総頸動脈、総頸静脈を同定、剥離した。総頸動脈から迷走神経を十分に剥離した後マイクロ血管クリップで総頸動脈を遮断した。片側遮断群の場合は左側のみ、両側遮断群の場合は両側の総頸動脈を露出した後同時に、正確に 30 分の血流遮断を行った。遮断解除後に皮膚を縫合した。ラットをランダムに表 1 のように群分けした。麻酔導入後頸部の皮膚に切開を加え、30 分後に縫合した Sham 群、片側遮断群、両側遮断群の 3 群を作製した。

Western blotting 用および polymerase chain reaction (PCR) 用の脳検体は、それぞれの群で血流遮断から 3 日後に 5% イソフルレンを用いて深麻酔を行い、断頭後に脳を摘出した。脳を摘出後氷冷のまま 2 mm 間隔に薄切し、皮質と海馬を分離した。凍結乾燥機 (FDU-12AS: AS ONE, JAPAN) で Western blotting 用の脳検体を真空乾燥させた。乾燥重量の 4 倍量の超純水を加え、氷上で超音波破砕機を用いて組織を破砕し毎分 15,000 回転で 15 分間遠心分離した。上清を採取し -80 度で保存

した。同時に採取した PCR 用の脳検体はメスで細断し、RNALater (AM7024: Thermo Fisher Scientific, USA) 内に同様に-80 度で保存した。

モデル作製 3 日後に組織染色用の脳検体採取を行った。深麻酔には塩酸メデトジン 0.15 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg の三種混合薬を用いた。疼痛刺激への反応がなくなったことを確認した後開胸を行い、左心室内に留置針を留置した。200 mL の生理食塩水を用いて脱血し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し臓器検体を摘出した。灌流液と同じ 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した後、脳以外の臓器検体はそのまま 4%パラホルムアルデヒド内に保存した。脳検体に関しては 10%、20%、30%のスクロース加里ン酸緩衝溶液でそれぞれ 24 時間ずつ段階的にクライオプロテクションした。液体窒素で瞬間凍結し組織を-80 度内に保存した。当研究チームの報告において脳虚血ラットで 3 日目に最も HMGB 血中濃度が高く、それぞれの検体については 3 日後群を選択した。

4.2 脳組織染色

採取した脳を凍結状態のままクライオスタットで 20 μm に薄切した。リン酸緩衝液中に組織切片を浮遊させた状態で免疫染色を行った。3%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼの除去を行い、2%ウマ血清を用いてブロッキングを行った。一次抗体として 100 倍希釈のウサギ抗ラット HBGB1 抗体 (ab18256 : abcam, UK) 、100 倍希釈のウサギ抗ラット MMP-9 抗体 (ab38898: abcam, UK) を使用し、4 度内で 24 時間感作した。二次抗体反応には、EnVison+ (K4002: Dako, USA) を使用した。発色はジアミノベンジジン (D426: SIGMA, USA) で行った。発色後に組織をスライドガラス上にマウントし、脱水、透徹後にカバースリップした。

4.3 全身臓器の組織染色

ラットを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、採取した心臓、肺、腎臓、脾臓、小腸、大腸をパラフィン包埋した。マイクロトームで 4 μm の切片を作成した。キシレンを用いて脱パラフィンし 3%過酸化水素溶液を用いて内因性ペルオキシダーゼの阻害を行った。リン酸緩衝液で洗浄した後 1%ウシアルブミン加リン酸緩衝液 (011-15144: FUJIFILM Wako Pure Chemical, JAPAN) を用いて室温で 1 時間のブロッキングを行った。その後一次抗体に 100 倍希釈のウサギ抗ラット HBGB1 抗体 (ab18256: abcam, UK) を用い、4 度内で 24 時間感作した。リン酸緩衝液で切片を洗浄し、二次抗体として EnVison+ (K4002: Dako, USA) を用い室温で 1 時間反応させた。リン酸緩衝液で洗浄しジアミノベンジジン (D426: SIGMA, USA) で発色させた。スライドを脱水、透徹後にカバースリップした。

4.4 Western blotting

20 倍に希釈した上清検体を用い、RC DC Protein assay Kit (5000122JA: Bio-Rad, USA) を用いて総タンパク量の測定を行った。吸光度計 (Model680: Bio-Rad, USA) を使用しタンパク濃度を測定した。Laemmli sample buffer (1610737: Bio-Rad, USA) と beta-mercaptoethanol (1610710: Bio-Rad, USA) を用いてサンプルを溶解し、1 ウェルあたり 15 ug のタンパク質を注入した。4-20%濃度勾配ゲル (567-1095: Bio-Rad, USA) を用いて、120 V、400 mA で 70 分間泳動しタンパク分離を行った。プレシジョンプラスプロテイン 2 色スタンダード (1610374: Bio-Rad, USA) を分子量マーカーに使用した。iBlot システム (IB401001: Thermo Fisher Scientific, USA) を使用し、転写を行った。一次抗体反応は抗 CD11b 抗体 (bs-1014R: Bioss, USA) を 500 倍希釈で、抗 GFAP 抗体 (ab7260: abcam, UK) を 20,000 倍希釈で、internal control として抗 beta-Actin 抗体 (GTX109639: GeneTex, USA) を 20,000 倍希釈で使用した。一次抗体の感作に関しては、抗 CD11b 抗体は 4 度内で 48 時間、抗 GFAP 抗体は 4 度内で 24 時間、抗 beta-Actin 抗体は 4 度内で 24 時間行った。二次抗体反応には抗ウサギ IgG 抗体 (AP182P: Millipore, USA) を使用し、室温で 2 時間感作させた。ECL 法 (WP20005: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて発色させ、検出器 (ChemiDocXRS: Bio-Rad, USA) でバンドの検出を行った。Image Lab ソフトウェア (version 6.0: Bio-Rad, USA) を使用し測定を行った。全てのゲルに同一脳から精製した陽性コントロールサンプルを多段階濃度 (25%、50%希釈) でのせた。ゲル間の染色性の補正を行い、バンドの濃淡は internal control に対する比として表示した。結果は目的タンパク濃度/beta-Actin 濃度として表示した。

4.5 Polymerase chain reaction

RNA Later から脳検体組織を取り出し、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (74804: Quiagen, GERMANY) を用いて messenger ribonucleic acid (mRNA) を精製した。RNA 量の測定には超微量分光光度計 (NanoDrop Lite: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit (18090010: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて逆転写を行い、complementary deoxyribonucleic acid を作製した。PCR には Platinum Taq (10966-034: Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。各プライマーを表 2 のように設計し、サーマルサイクラー (T100 Thermal Cycler: Bio-Rad, USA) で増幅した。GelRed (41003: Biotium, USA) 添加 2% アガロースゲルを使用し、120 V、400 mA で 38 分間の電気泳動を行った。バンド検出には検出器 (ChemiDoc XRS: Bio-Rad, USA) を用いた。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を internal control に使用した。

4.6 統計解析

SPSS statistics (version 21: IBM, USA) を使用し統計解析を行った。多群間の比較には one way analysis of variance を使用し、要因に有意差があった場合のみ post-hoc 検定として Tukey の方法を使用した。分散が等しくないデータに関してはイプシロンにより自由度を補正し、Games-Howell の方法を用いて解析した。すべての検定で p 値が 0.05 未満を有意とし、すべてのデータは平均±標準偏差で示した。

5 動物取り扱い及び実験における倫理的配慮

実験動物の取り扱い及び実験は日本大学医学部実験指針を遵守して行い、日本大学動物実験マニュアルに準じた（承認番号: AP19MED36-1）。実験動物の苦痛を最小限にするため最大限の配慮を行った。実験動物の飼育は上記で認定された施設で行った。飼育環境は、気温 22-23 度、湿度 50-60%の室内で、飼育室の明暗設定は午前 8 時から午後 8 時を明期、午後 8 時から午前 8 時を暗期として 12 時間毎の明暗サイクルを設けた。実験中は食事、水分を自由に摂取させた。経過中に過侵襲と判断された場合の人道的エンドポイントの設定を行った上で研究を行った。研究者は上記委員会が制定する年 1 回の講習会を受講している。

6 結果

6.1 各臓器の組織染色

両側遮断群の心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、大腸、小腸を抗 HMGB1 抗体で染色した (図 1)。心臓では、全群で HMGB1 の発現を認めなかった。肺では、Sham 群、片側遮断群では HMGB1 の発現を認めず、両側遮断群で HMGB1 陽性を示す細胞を認めた。肝臓では、Sham 群、片側遮断群では HMGB1 の発現を認めず、両側遮断群で HMGB1 陽性を示す細胞を認めた。脾臓では、全群で HMGB1 陽性細胞を認めた。Sham 群、片側遮断群と比べ、両側遮断群で HMGB1 陽性を示す細胞の著大な増加を認めた。腎臓では、全群で HMGB1 の発現を認めなかった。大腸では、全群で HMGB1 陽性細胞を認めた。Sham 群、片側遮断群と比べ、両側遮断群で HMGB1 陽性を示す細胞の著大な増加を認めた。小腸では、全群で HMGB1 の発現を認めた。Sham 群、片側遮断群と比べ、両側遮断群で HMGB1 の発現を示す細胞の著大な増加を認めた。

6.2 脳組織染色

脳の両側遮断群切片を抗 HMGB1 抗体、抗 MMP-9 抗体を用いて染色した (図 2)。大脳皮質、白質に 160 倍視野に 12 ヶ所程度の HMGB1 陽性細胞が観察された。抗 MMP-9 抗体を用いた免疫染色も行い、同様に大脳皮質、白質に 160 倍で 1 視野に 10 ヶ所程度の MMP-9 陽性細胞が認められた。Sham 群ではいずれも陽性細胞を認めなかった。

6.3 GFAP の定量

アストロサイトの発現を定量化するため、大脳皮質および海馬を検体として抗 GFAP 抗体を用いた Western blotting を行った (図 3)。大脳皮質の Sham 群の値は 1.08 ± 0.31 であった。片側群左脳、片側群右脳、両側群はそれぞれ 1.24 ± 0.31 、 1.40 ± 0.36 、 1.88 ± 0.62 であった。両側群は Sham 群と比べ有意な差を持って高い値を示した ($p < 0.05$)。片側群と Sham 群間には有意差は認めなかった。海馬の Sham 群の値は 1.32 ± 0.63 であった (図 4)。片側群左脳、片側群右脳、両側群はそれ

ぞれ 1.29 ± 0.44 、 1.07 ± 0.52 、 1.46 ± 0.37 であった。片側、両側遮断群共に Sham 群と比べ有意な差を認めなかった。

6.4 CD11b の定量

マイクログリアの発現を定量化するため、大脳皮質および海馬を検体として抗 CD11b 抗体を用いた Western blotting を行った (図 5)。大脳皮質の Sham 群の値は 0.87 ± 0.56 であった。片側群左脳、片側群右脳、両側群はそれぞれ 0.81 ± 0.55 、 0.99 ± 0.64 、 1.77 ± 0.72 であった。両側群は Sham 群と比べ、有意に高い値を示した ($p < 0.001$)。片側群と Sham 群間には有意差は認めなかった。海馬の Sham 群の値は 0.82 ± 0.65 であった (図 6)。片側群左脳、片側群右脳、両側群はそれぞれ 1.25 ± 0.54 、 1.05 ± 0.50 、 1.28 ± 0.77 であった。片側、両側遮断群共に Sham 群と比べ有意な差を認めなかった。

6.5 MMP-9 の測定

大脳皮質および海馬検体を用いての組織損傷の指標である MMP-9 の mRNA の発現を観察した (図 7)。大脳皮質、海馬の両検体において片側群、両側群で MMP-9 の発現上昇を認めた。MMP-9 は遮断を行った全群において Sham 群と比べより多く発現する傾向が認められた。

6.6 PKC δ の測定

組織炎症の指標として、大脳皮質および海馬の PKC δ の mRNA の発現を観察した (図 8)。大脳皮質、海馬の両検体において片側群、両側群で PKC δ の発現を認めた。遮断を行った全群において Sham 群と比べより多く発現する傾向が認められた。

7 考察

7.1 軽微な脳虚血発作と頭蓋内環境

一過性脳虚血は比較的軽症の脳虚血性疾患と考えられており、その研究は重症脳卒中である脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などに比べ少ない傾向にある[37]。くも膜下出血など重症脳卒中中で全身の合併症を生じることは珍しいことではなく、臨床的によく見る現象である。中枢神経系疾患による全身性合併症に関しては、脳血管障害、頭部外傷などの経過中に肺水腫が認められることが良く知られ、神経原性肺水腫と呼ばれている [20]。神経原性肺水腫の原因は詳細には明らかにされていないが、交感神経の緊張によるカテコールアミンの放出に続く血管収縮による肺への負荷の増強や、肺血管内皮障害による透過性の亢進が作用していると考えられている [38]。これまでの報告にあるように神経原性肺水腫を合併したくも膜下出血は重症度の高い症例に多く、本来重症の中枢神経疾患で全身の炎症シグナルの伝達が起きることが示唆される[39]。

一方、脳では細胞虚血に伴う壊死による炎症は DAMPs により惹起される [40]。虚血壊死に陥った細胞から DAMPs の一つとして知られる HBGB1 が放出されると、血液脳関門を破壊させ、脳内へ免疫細胞の浸潤を促す。実際に脳梗塞患者の血清中 HMGB1 濃度が高いことが報告されている [41]。HMGB1 のシグナルは RAGE を代表とする pattern recognition receptors を介して伝達される [42]。続いてマクログリア、マクロファージなどの免疫細胞が脳梗塞内で炎症因子を産生し梗塞を拡大させ [43]、脳内に浸潤した好中球やマクロファージは IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインを放出することで炎症が惹起される。脳梗塞でグリオシスが起きることはよく知られた事項である。脳損傷の急性期に観察される GFAP の発現が反応性グリア細胞の増加を反映していると考えられており、本研究でもアストロサイトのマーカーである GFAP の増加が認められたことから軽微な脳虚血単独でも脳細胞の変化を起こしうることを示している[44]。また、脳内唯一の免疫細胞であるマクログリアのマーカーである CD11b の増加もみられ[45]、脳内の炎症反応が惹起されていることも示された[46]。実際に脳検体の PCR では組織障害指標である MMP-9、炎症の指標である PKC δ の発現が確認され、脳内に炎症反応が惹起していることを示している。

これは従来考えられているよりも一過性脳虚血は脳細胞に多大な影響を与える病態であることを示している。今回両側遮断モデルでのみアストロサイト、マイクログリアに有意差が見られた原因は片側のみの遮断では対側からの血流が担保されており今回のモデルでは脳細胞は虚血に至らなかったものと考えられた。また、大脳皮質にのみ差が見られ、海馬では見られなかった理由としては、海馬では前方循環からの血流が遮断されても後方循環系からの血流供給のみで、虚血に到らないためと推察される。PCR において海馬も大脳皮質と同様に炎症所見に上昇が見られた理由は今後検討が必要である。

7.2 一過性脳虚血と全身性の炎症反応

HMGB1 は前述のように非ヒストンタンパク質であり全ての有核細胞に存在している。HMGB1 は核内ではデオキシリボ核酸と結合し転写因子の調節を行う [28] [29]。また、癌細胞の浸潤、転移などにも関わっていることが報告されている [47] [48] [49]。一方、1999 年に Wang らが HMGB1 を敗血症における死のメディエーターとして報告すると全身の炎症に関与する物質として HMGB1 が注目された。敗血症のエンドトキシンショックで死亡した患者では HMGB1 が血中で増加することが報告されている [30]。Lipopolysaccharide をはじめとし、IL-1 β や TNF α なども HMGB1 の発現を増加させる [50]。細胞外に放出された HMGB1 は好中球、単球の遊走を促し、炎症を惹起する [51]。また、HMGB1 は RAGE、TLR-4 などへの刺激を介して免疫細胞からの炎症性サイトカインの産生を促進する [29]。HMGB1 と DIC score の相関が認められたとの報告もあり、HMGB1 が全身性の炎症に深く関与していることがわかる [52]。

本研究で示された重要な事項は軽微な脳虚血と考えられる一過性脳虚血発作においても全身の炎症反応を惹起するということである。脳内で観察された HMGB1 が全身臓器において発現の増加を示したということは血流によってその炎症のシグナルが全身に伝達されたことを意味する。これは従来考えられているより一過性脳虚血発作は全身に影響を及ぼす反応を引き起こす重篤な疾患であることを示している。死のメディエーターと言われたほど重症患者で発見された HMGB1

が軽症脳虚血性疾患と考えられている一過性脳虚血発作でその全身性の分布が観察された事は非常に興味深い。また近年、一過性脳虚血発作により二次性神経変性を生じた結果遅延性の脳萎縮を生じ、認知機能の低下につながる事が報告されている[2]。これは従来考えられているより一過性脳虚血発作の影響は長期間に渡って持続することを示唆している。HMGB1 は慢性疾患である関節リウマチなどでもその関与が報告されており、一過性脳虚血発作では脳内のみならずHMGB1 の全身性の分布による慢性の炎症性疾患に関わっている可能性を意味する。昨今各種疾患において HMGB1 を治療対象とした臨床応用について注目されている。一過性脳虚血でもその全身への影響が明らかにされたことで、従来と比べより厳格な治療が必要であり、また全身性の影響に注目した治療により軽症脳虚血発作の予後をより改善しうることを示唆している。動物実験ではHMGB1 の拮抗により様々な臓器で炎症を抑制できることが報告されている [53] [54] [55]。また、全身性の炎症が起きているとすればステロイド療法による炎症の抑制も効果的である可能性がある。今後も本研究の結果を踏まえた一過性脳虚血発作の病態の詳細な解明、今後の臨床への応用が望まれる。

当研究の限界としては免疫染色において脳内の陽性細胞の 2 重染色を行っておらず、HMGB1、MMP9 陽性細胞の種類が特定できていないこと、PCR 結果の定量ができていないこと、今回のモデルにおいて脳梗塞が起きていないことを確認していないことが挙げられる。本研究の結論の証拠は、全身の臓器の HMGB1 の免疫染色のみであり、その結果も全ての細胞に発現するはずの HMGB1 が陽性にならない臓器があるというものであった。また、HMGB1 の客観的定量、下流の炎症性サイトカインの発現、分布の検討も行っておらず、今後の検証が必要である。

8 結論

ラット一過性脳虚血モデルでは、脳内の細胞障害と炎症反応に加えて、全身性の炎症反応が生じていることが示唆された。今後さらなる研究により、一過性脳虚血発作と全身臓器の障害との関連を解明することで、臨床における一過性脳虚血発作の治療成績の向上に寄与できると考える。

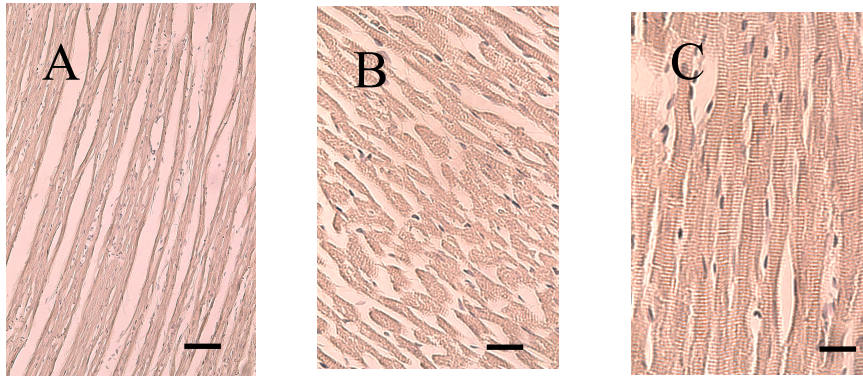
9 謝辞

本研究の遂行におきまして、懇切なご指導を賜りました日本大学医学部脳神経外科学系主任教授の吉野篤緒先生、日本大学歯学部病理学講座教授の浅野正岳先生、日本大学医学部脳神経外科学系准教授の大島秀規先生に深く感謝申し上げます。

10 図表

図1 HMGB1の全身臓器における発現

1-1 心臓

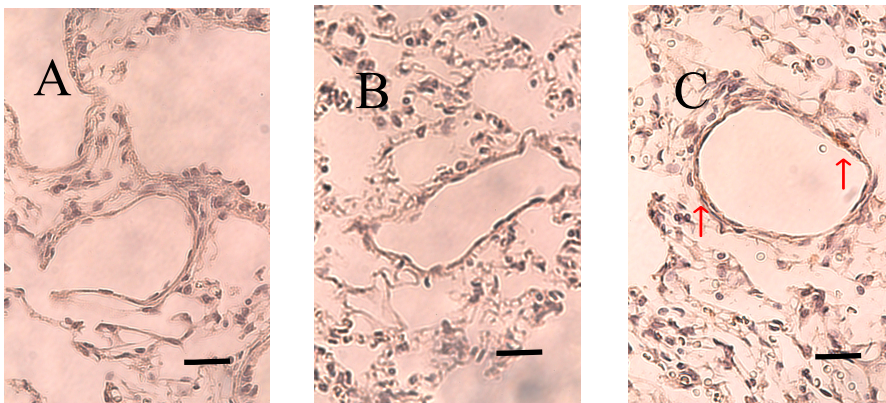


スケールバーは 25 μ m

Sham 群(A)、片側遮断群(B)、両側遮断群(C)。いずれも 160 倍。

全群で HMGB1 の発現を認めなかった。

1-2 肺

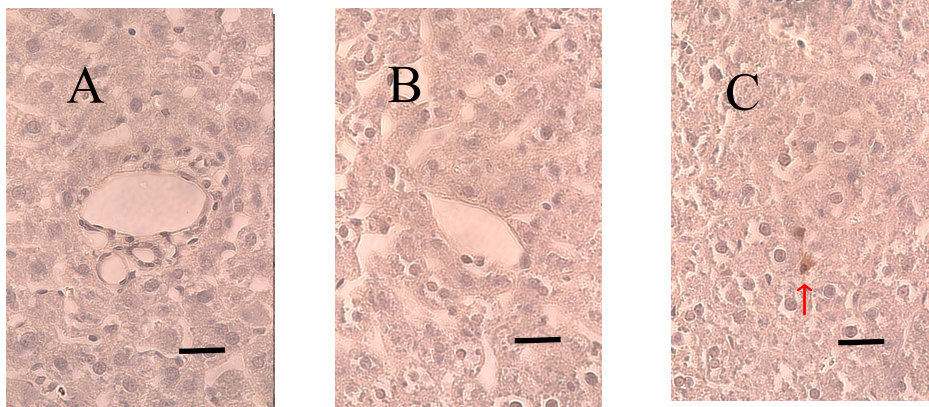


スケールバーは 25 μ m

Sham 群(A)、片側遮断群(B)、両側遮断群(C)。いずれも 160 倍。

矢印は HMGB 陽性を示した肺胞腔の細胞を示す。Sham 群、片側遮断群では HMGB1 の発現を認めず、両側遮断群で HMGB1 陽性を示す細胞を認めた。

1-3 肝臓

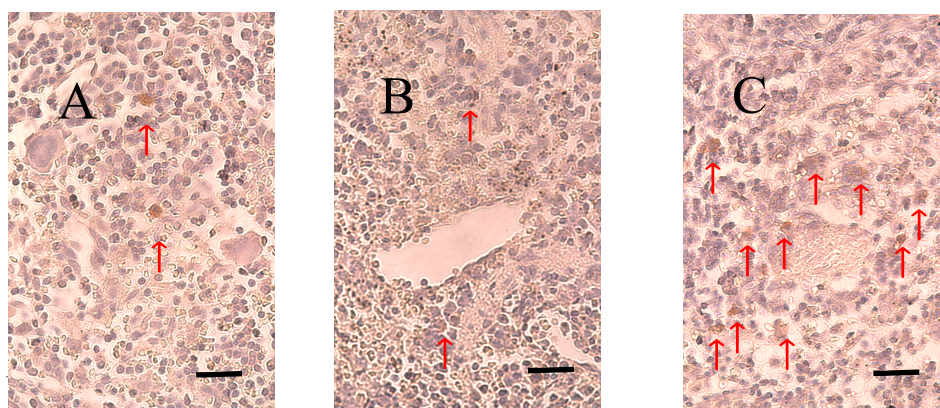


スケールバーは 25 μm

Sham 群(A)、片側遮断群(B)、両側遮断群(C)。いずれも 160 倍。

矢印は HMGB1 陽性を示した肝細胞を示す。Sham 群、片側遮断群では HMGB1 の発現を認めず、両側遮断群で HMGB1 陽性を示す細胞を認めた。

1-4 脾臓

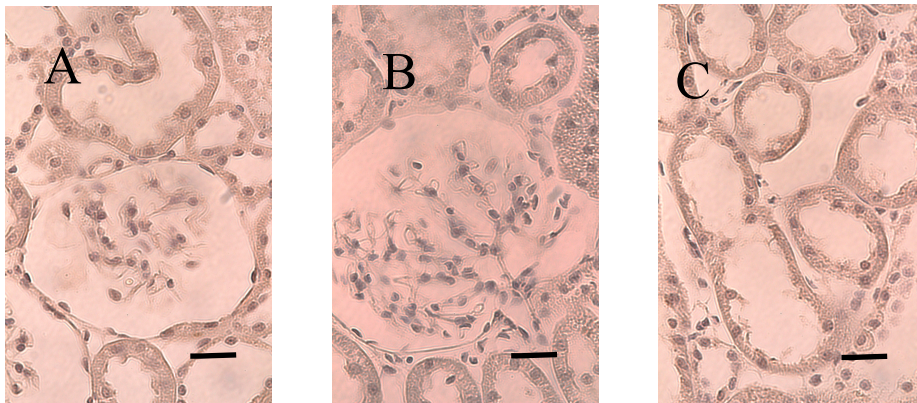


スケールバーは 25 μm

Sham 群(A)、片側遮断群(B)、両側遮断群(C)。いずれも 160 倍。

矢印は HMGB1 陽性を認めたリンパ球を示す。全群で HMGB1 陽性細胞を認めた。Sham 群、片側遮断群と比べ、両側遮断群で HMGB1 陽性を示す細胞の著名な増加を認めた。

1-5 腎臓

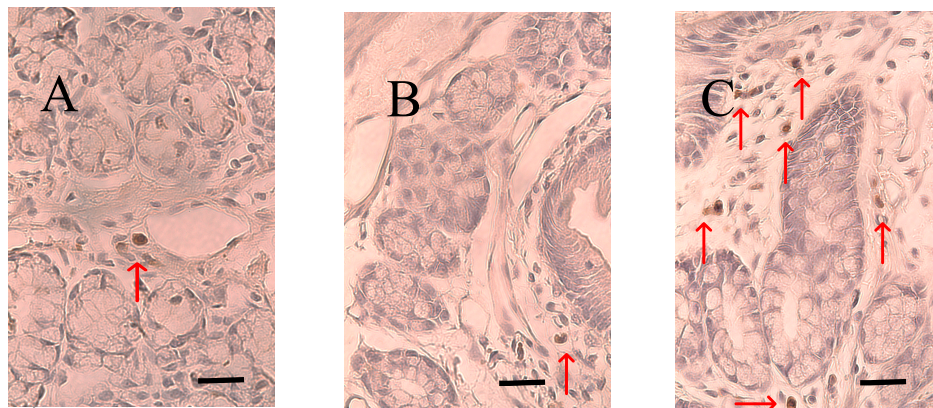


スケールバーは 25 μ m

Sham 群(A)、片側遮断群(B)、両側遮断群(C)。いずれも 160 倍。

全群で HMGB1 の発現を認めなかった。

1-6 大腸

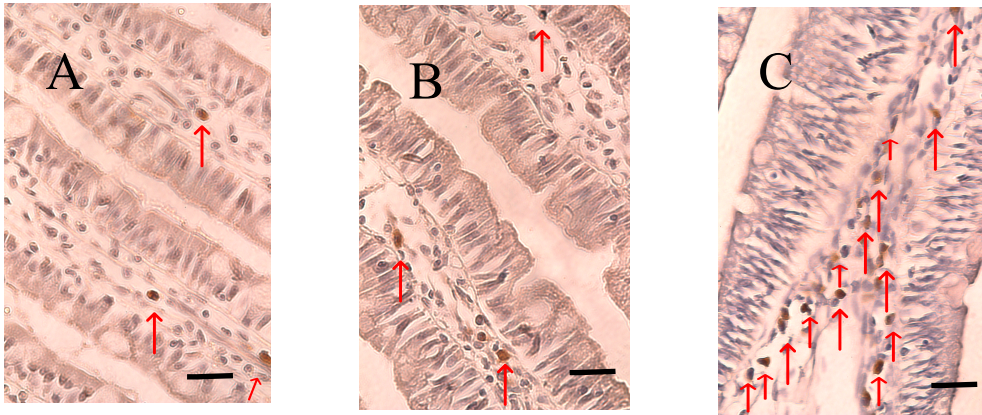


スケールバーは 25 μ m

Sham 群(A)、片側遮断群(B)、両側遮断群(C)。いずれも 160 倍。

矢印は HMGB1 の発現を示した粘膜固有層の細胞を示す。全群で HMGB1 陽性細胞を認めた。Sham 群、片側遮断群と比べ、両側遮断群で HMGB1 陽性を示す細胞の著名な増加を認めた。

1-7 小腸



スケールバーは 25 μ m

Sham 群(A)、片側遮断群(B)、両側遮断群(C)。いずれも 160 倍。

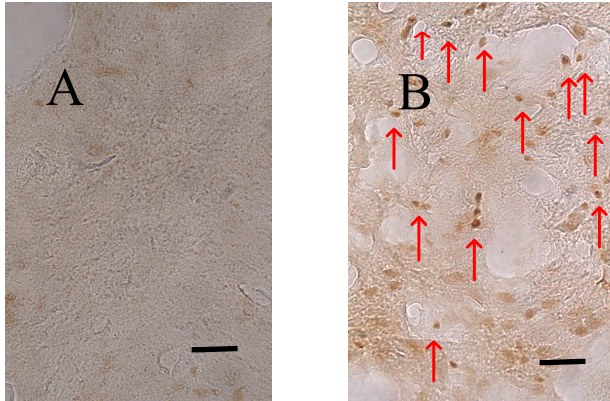
矢印は HMGB1 の発現を認めた粘膜固有層の細胞を示す。全群で HMGB1 の発現を認めた。Sham 群、片側遮断群と比べ、両側遮断群で HMGB1 の発現を示す細胞の著大な増加を認めた。

1-8 臓器染色のまとめ

	心臓	肺	肝臓	脾臓	腎臓	大腸	小腸
Sham 群	-	-	-	+	-	+	+
片側群	-	-	-	+	-	+	+
両側群	-	+	+	+++	-	++	+++

図2 脳検体の免疫染色による HMGB1、MMP-9 発現細胞の観察

2-1 HMGB1

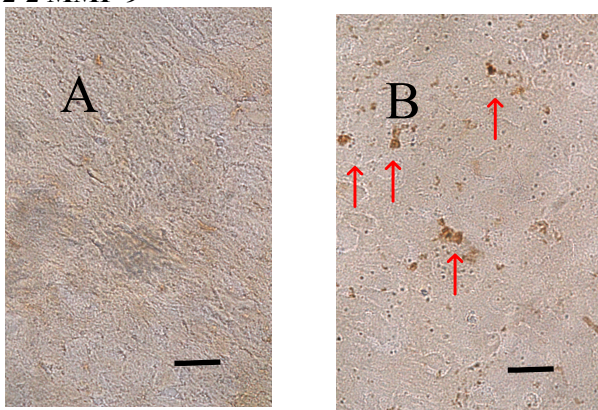


スケールバーは 25 μ m

Sham 群 (A)、両側遮断群 (B)。いずれも 160 倍。

矢印は HMGB1 陽性細胞を示す。Sham 群では HMGB1 の発現を認めなかった。陽性細胞は脳全体に分布していた。

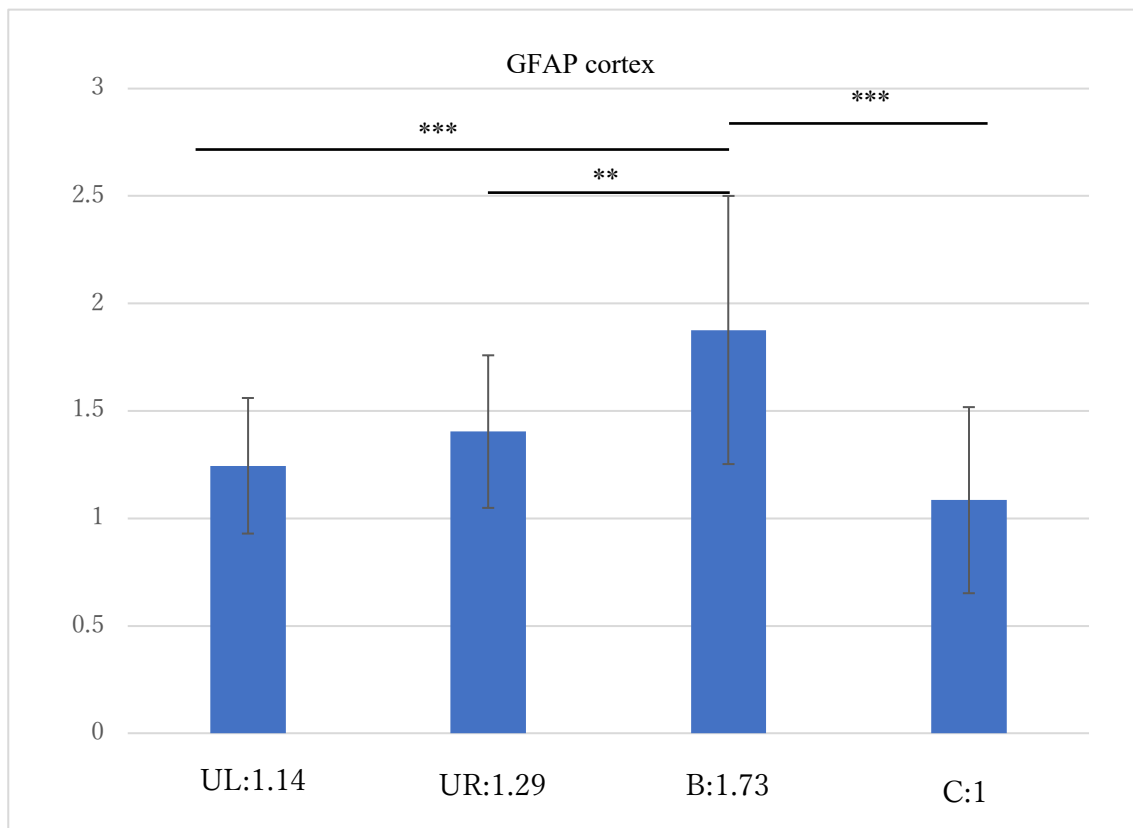
2-2 MMP-9



スケールバーは 25 μ m

Sham 群 (A)、両側遮断群 (B)。いずれも 160 倍。矢印は MMP-9 陽性を示した細胞。Sham 群では HMGB1 の発現を認めなかった。

図3 Western blotting による大脳皮質 GFAP の定量



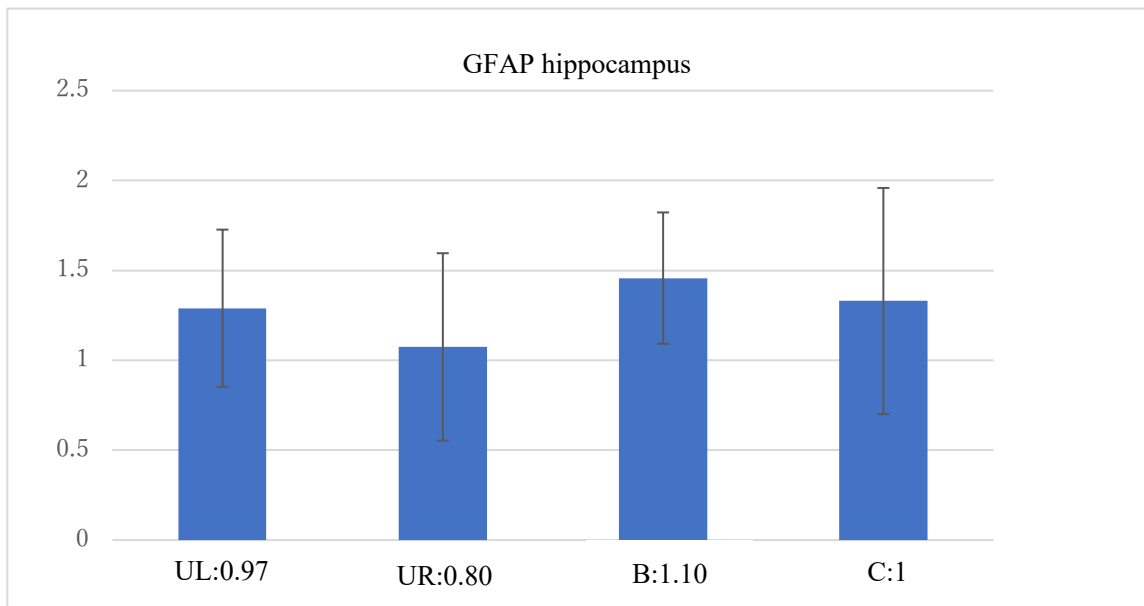
UL: 片側群左脳 UR: 片側群右脳 B: 両側群 C: コントロール群 (Sham 群)
群名の横の数字はコントロールの値を1としたときの値を表す。

両側群と片側群左脳 ($p<0.001$)、両側群と片側群右脳 ($p=0.001$)、両側群とコントロール群 ($p<0.001$) の間に有意差を認めた。

: $p<0.01$ 、*: $p<0.001$

GFAP: glial fibrillary acidic protein

図4 Western blotting による海馬 GFAP の定量



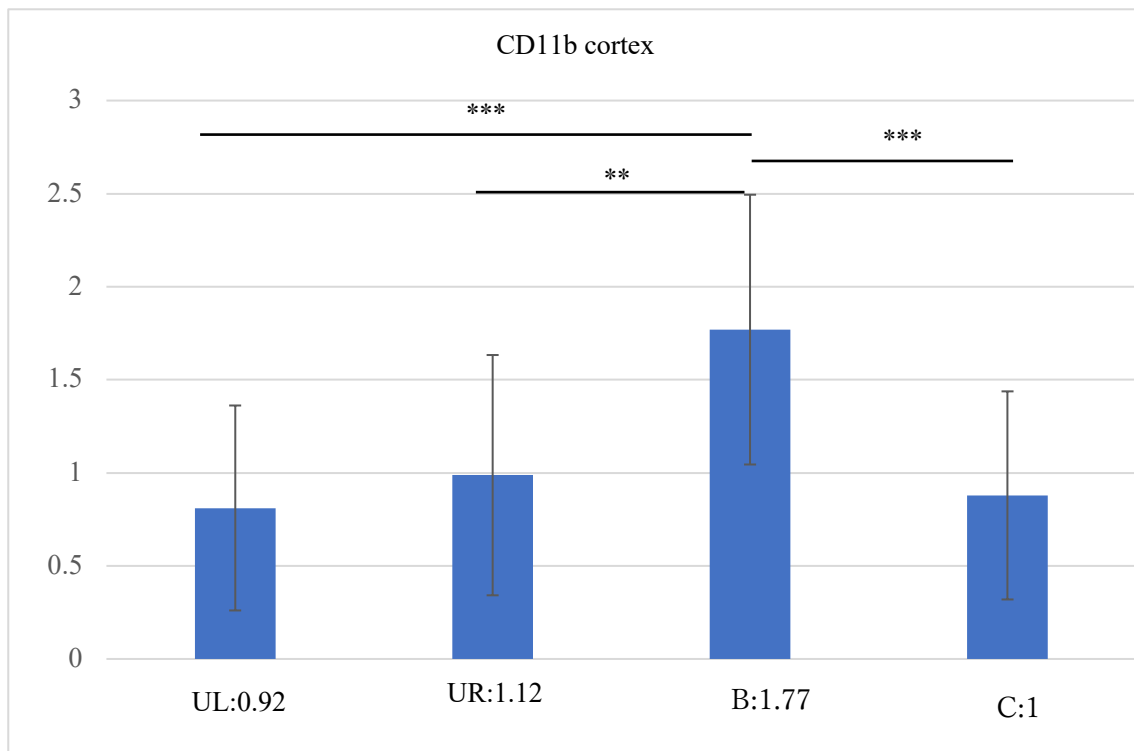
UL: 片側群左脳 UR: 片側群右脳 B: 両側群 C: コントロール群 (Sham 群)

群名の横の数字はコントロールの値を1としたときの値を表す。

どの群間にも有意な差を認めなかった。

GFAP: glial fibrillary acidic protein

図5 Western blotting による大脳皮質 CD11b の定量

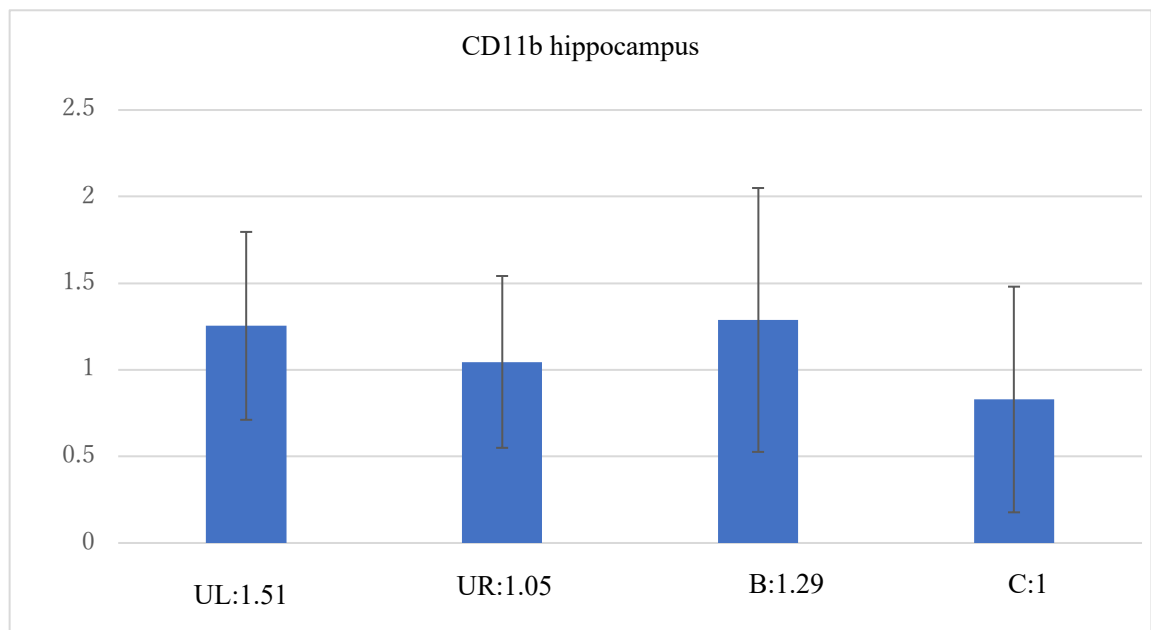


UL: 片側群左脳 UR: 片側群右脳 B: 両側群 C: コントロール群 (Sham 群)
群名の横の数字はコントロールの値を1としたときの値を表す。

両側群と片側群左脳 ($p<0.001$)、両側群と片側群右脳 ($p<0.001$)、両側群とコントロール群 ($p<0.001$) の間に有意差を認めた。

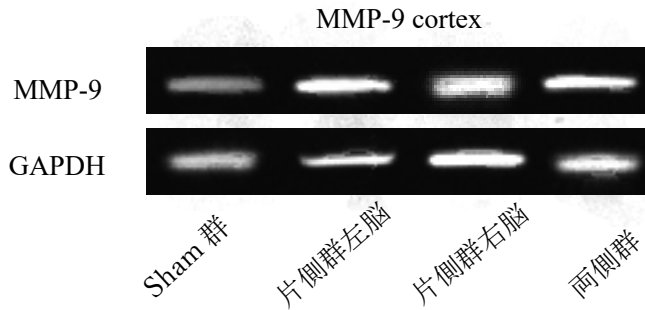
** : $p<0.01$ 、*** : $p<0.001$

図6 Western blottingによる海馬 CD11b の定量



UL: 片側群左脳 UR: 片側群右脳 B: 両側群 C: コントロール群 (Sham 群)
群名の横の数字はコントロールの値を1としたときの値を表す。
どの群間にも有意な差を認めなかった。

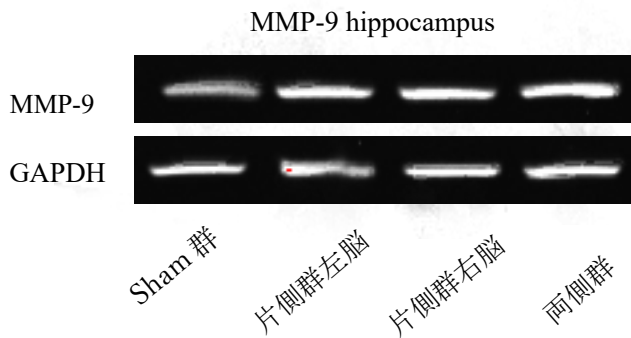
図7 PCRによるMMP-9の発現



遮断を行った全群で Sham 群と比べより多く発現する傾向が見られた。

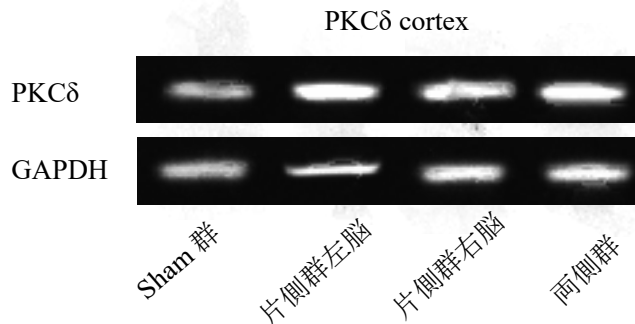
MMP-9: matrix metalloproteinase-9

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



遮断を行った全群で Sham 群と比べより多く発現する傾向が見られた。

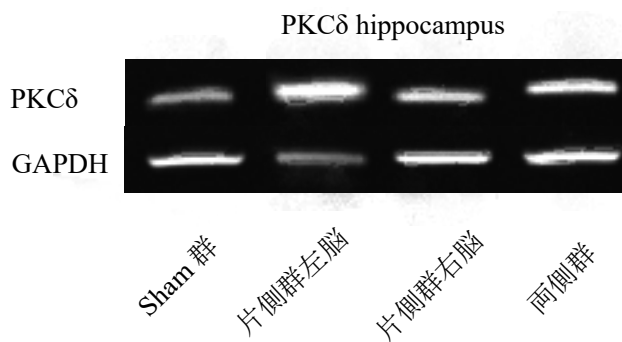
図 8 PCR による PKC δ の発現



遮断を行った全群で Sham 群と比べより多く発現する傾向が見られた。

PKC δ : Protein kinase C delta

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



遮断を行った全群で Sham 群と比べより多く発現する傾向が見られた。

表 1 本研究に使用した一過性脳虚血モデルの内訳

	組織染色用	Western blotting、PCR 用
Sham 群	n=3	n=6
片側遮断群	n=3	n=6
両側遮断群	n=3	n=6

表2 本研究に使用したプライマーとその条件

	Forward	Reverse	AT	Cy
MMP-9	GATCCCCAGAGGCGTTACTCG	GTTGTGGAAACTCACACGCC	63	31
PKC δ	TGAGATCATCTGCGGACTGC	AGGACTCTAGGGGCGATGTA	55	35
GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	63	23

AT: Annealing temperature

Cy: Cycle

MMP-9: matrix metalloproteinase-9

PKC δ : Protein kinase C delta

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

11 引用文献

1. Easton, J.D., J.L. Saver, G.W. Albers, et al., *Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for the Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists*. Stroke, 2009. **40**(6): p. 2276-93.
2. Bivard, A., T. Lement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Stroke, B. Marechal, et al., *Transient Ischemic Attack Results in Delayed Brain Atrophy and Cognitive Decline*. Stroke, 2018. **49**(2): p. 384-390.
3. Dolmans, L.S., A.W. Hoes, M.E.L. Bartelink, et al., *Patient delay in TIA: a systematic review*. J Neurol, 2019. **266**(5): p. 1051-1058.
4. Uchiyama, S., *[New definition and concept of TIA]*. Rinsho Shinkeigaku, 2010. **50**(11): p. 904-6.
5. Clissold, B., T.G. Phan, J. Ly, et al., *Current aspects of TIA management*. J Clin Neurosci, 2020. **72**: p. 20-25.
6. Giles, M.F. and P.M. Rothwell, *Risk of stroke early after transient ischaemic attack: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Neurol, 2007. **6**(12): p. 1063-72.
7. Johnston, S.C., P.M. Rothwell, M.N. Nguyen-Huynh, et al., *Validation and refinement of scores to predict very early stroke risk after transient ischaemic attack*. Lancet, 2007. **369**(9558): p. 283-92.
8. Rothwell, P.M., M.F. Giles, A. Chandratheva, et al., *Effect of urgent treatment of transient ischaemic attack and minor stroke on early recurrent stroke (EXPRESS study): a prospective population-based sequential comparison*. Lancet, 2007. **370**(9596): p. 1432-42.
9. Coutts, S.B., *Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack*. Continuum (Minneapolis, Minn), 2017. **23**(1, Cerebrovascular Disease): p. 82-92.
10. Coutts, S.B., J. Modi, S.K. Patel, et al., *What causes disability after transient ischemic attack and minor stroke?: Results from the CT and MRI in the Triage of TIA and minor Cerebrovascular Events to Identify High Risk Patients (CATCH) Study*. Stroke, 2012. **43**(11): p. 3018-22.
11. van Rooij, F.G., R.P. Kessels, E. Richard, et al., *Cognitive Impairment in Transient Ischemic Attack Patients: A Systematic Review*. Cerebrovasc Dis, 2016. **42**(1-2): p. 1-9.
12. Sylaja, P.N., S.B. Coutts, A. Krol, et al., *When to expect negative diffusion-weighted images in stroke and transient ischemic attack*. Stroke, 2008. **39**(6): p. 1898-900.
13. Guo, J., N. Chen, R. Li, et al., *Regional homogeneity abnormalities in patients with transient ischaemic attack: a resting-state fMRI study*. Clin Neurophysiol, 2014. **125**(3): p. 520-5.
14. Stippich, C., J. Kassubek, H. Kober, et al., *Time course of focal slow wave activity in transient ischemic attacks and transient global amnesia as measured by magnetoencephalography*. Neuroreport, 2000. **11**(15): p. 3309-13.
15. Bentes, C., P. Canhao, A.R. Peralta, et al., *Usefulness of EEG for the differential diagnosis of possible*

- transient ischemic attack*. Clin Neurophysiol Pract, 2018. **3**: p. 11-19.
16. Britton, J.W., L.C. Frey, J.L. Hopp, et al., in *Electroencephalography (EEG): An Introductory Text and Atlas of Normal and Abnormal Findings in Adults, Children, and Infants*, E.K. St. Louis and L.C. Frey, Editors. 2016: Chicago.
 17. Winward, C., C. Sackley, Z. Metha, et al., *A population-based study of the prevalence of fatigue after transient ischemic attack and minor stroke*. Stroke, 2009. **40**(3): p. 757-61.
 18. Makin, S.D., F.N. Doubal, M.S. Dennis, et al., *Clinically Confirmed Stroke With Negative Diffusion-Weighted Imaging Magnetic Resonance Imaging: Longitudinal Study of Clinical Outcomes, Stroke Recurrence, and Systematic Review*. Stroke, 2015. **46**(11): p. 3142-8.
 19. Talahma, M., A.M. Alkhachroum, M. Alyahya, et al., *Takotsubo cardiomyopathy in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Institutional experience and literature review*. Clin Neurol Neurosurg, 2016. **141**: p. 65-70.
 20. Saracen, A., Z. Kotwica, A. Wozniak-Kosek, et al., *Neurogenic Pulmonary Edema in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage*. Adv Exp Med Biol, 2016. **952**: p. 35-39.
 21. Ooboshi, H. and T. Shichita, [*DAMPs (damage-associated molecular patterns) and inflammation*]. Nihon Rinsho, 2016. **74**(4): p. 573-8.
 22. Harris, H.E. and A. Raucci, *Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1*. EMBO Rep, 2006. **7**(8): p. 774-8.
 23. Muhammad, S., W. Barakat, S. Stoyanov, et al., *The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage*. J Neurosci, 2008. **28**(46): p. 12023-12031.
 24. Zhang, J., H.K. Takahashi, K. Liu, et al., *Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats*. Stroke, 2011. **42**(5): p. 1420-8.
 25. Park, S.Y., S.W. Lee, H.Y. Kim, et al., *HMGB1 induces angiogenesis in rheumatoid arthritis via HIF-1 α activation*. Eur J Immunol, 2015. **45**(4): p. 1216-27.
 26. Shu, X., Q. Peng, X. Lu, et al., *HMGB1 May Be a Biomarker for Predicting the Outcome in Patients with Polymyositis /Dermatomyositis with Interstitial Lung Disease*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161436.
 27. Qu, L., C. Chen, Y. Chen, et al., *High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) and Autophagy in Acute Lung Injury (ALI): A Review*. Med Sci Monit, 2019. **25**: p. 1828-1837.
 28. Bianchi, M.E. and M. Beltrame, *Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia*. EMBO Rep, 2000. **1**(2): p. 109-14.
 29. Lotze, M.T. and K.J. Tracey, *High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 331-42.
 30. Wang, H., O. Bloom, M. Zhang, et al., *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*. Science, 1999. **285**(5425): p. 248-51.
 31. Liu, K., S. Mori, H.K. Takahashi, et al., *Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats*. FASEB J, 2007. **21**(14): p. 3904-16.

32. Goldstein, R.S., M. Gallowitsch-Puerta, L. Yang, et al., *Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia*. Shock, 2006. **25**(6): p. 571-4.
33. Durukan Tolvanen, A., E. Tatlisumak, E. Pedrono, et al., *TIA model is attainable in Wistar rats by intraluminal occlusion of the MCA for 10min or shorter*. Brain Res, 2017. **1663**: p. 166-173.
34. Goncalves, J., F. Carvalho, and S. Guimaraes, *Uptake inhibitors do not change the effect of imidazoline alpha 2-adrenoceptor agonists on transmitter release evoked by single pulse stimulation in mouse vas deferens*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1989. **339**(3): p. 288-92.
35. Fan, C., L. Zhang, Z. He, et al., *Reduced Severity of Outcome of Recurrent Ipsilateral Transient Cerebral Ischemia Compared with Contralateral Transient Cerebral Ischemia in Rats*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017. **26**(12): p. 2915-2925.
36. Farkas, E., P.G. Luiten, and F. Bari, *Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases*. Brain Res Rev, 2007. **54**(1): p. 162-80.
37. Duran Ferreras, E., J. Viguera Romero, and C. Martinez Parra, *[Transient ischemic attack]*. Rev Clin Esp, 2007. **207**(10): p. 505-7.
38. Theodore, J. and E.D. Robin, *Pathogenesis of neurogenic pulmonary oedema*. Lancet, 1975. **2**(7938): p. 749-51.
39. Kimura, T., T. Kamide, K. Onodera, et al., *Clinical Features of Neurogenic Pulmonary Edema in Patients with Subarachnoid Hemorrhage*. World Neurosurg, 2020. **135**: p. e505-e509.
40. Shi, K., D.C. Tian, Z.G. Li, et al., *Global brain inflammation in stroke*. Lancet Neurol, 2019. **18**(11): p. 1058-1066.
41. Kim, J.B., J. Sig Choi, Y.M. Yu, et al., *HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain*. J Neurosci, 2006. **26**(24): p. 6413-21.
42. Andersson, U., H. Yang, and H. Harris, *High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells*. Semin Immunol, 2018. **38**: p. 40-48.
43. Kim, S.W., H. Lee, H.K. Lee, et al., *Neutrophil extracellular trap induced by HMGB1 exacerbates damages in the ischemic brain*. Acta Neuropathol Commun, 2019. **7**(1): p. 94.
44. Norden, D.M., P.J. Trojanowski, E. Villanueva, et al., *Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge*. Glia, 2016. **64**(2): p. 300-16.
45. Shen, B., T. Gu, H. Chen, et al., *CDK11p58 Promotes Microglia Activation via Inducing Cyclin D3 Nuclear Localization*. Inflammation, 2017. **40**(2): p. 636-644.
46. Bussy, C., K.T. Al-Jamal, J. Boczkowski, et al., *Microglia Determine Brain Region-Specific Neurotoxic Responses to Chemically Functionalized Carbon Nanotubes*. ACS Nano, 2015. **9**(8): p. 7815-30.
47. Liu, Y., M. Du, Y. Song, et al., *NAC1/HMGB1 Signaling Pathway Is Associated with Epithelial-mesenchymal Transition, Invasion, and Metastasis of Lung Cancer Cell Line*. Ann Clin Lab Sci, 2018.

- 48(5):** p. 559-564.
48. Wang, K., S. Shan, S. Wang, et al., *HMGB1-containing nucleosome mediates chemotherapy-induced metastasis of human lung cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **500(3):** p. 758-764.
 49. Gao, R. and N. Sang, *Quasi-ultrafine particles promote cell metastasis via HMGB1-mediated cancer cell adhesion*. *Environ Pollut*, 2020. **256:** p. 113390.
 50. Lu, B., C. Wang, M. Wang, et al., *Molecular mechanism and therapeutic modulation of high mobility group box 1 release and action: an updated review*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014. **10(6):** p. 713-27.
 51. Pedrazzi, M., L. Raiteri, G. Bonanno, et al., *Stimulation of excitatory amino acid release from adult mouse brain glia subcellular particles by high mobility group box 1 protein*. *J Neurochem*, 2006. **99(3):** p. 827-38.
 52. Hatada, T., H. Wada, T. Nobori, et al., *Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation*. *Thromb Haemost*, 2005. **94(5):** p. 975-9.
 53. Tong, S., L. Zhang, J. Joseph, et al., *Celastrol pretreatment attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein expression via the PI3K/Akt pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **497(3):** p. 843-849.
 54. Hirakawa, Y., M. Tsuchishima, A. Fukumura, et al., *Recombinant thrombomodulin prevented hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting high-mobility group box 1 in rats*. *Eur J Pharmacol*, 2019. **863:** p. 172681.
 55. Yan, S., C. Fang, L. Cao, et al., *Protective effect of glycyrrhizic acid on cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting HMGB1-mediated TLR4/NF-kappaB pathway*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2019. **66(6):** p. 1024-1030.

12 研究業績

I 発表 ①一般発表	2	(筆頭 2/共同 0)
②特別発表	なし	
II 論文 ①原著論文	なし	
②症例報告	なし	
③総説	なし	
III 著書	なし	

I 発表

一般発表

- 1 梶原遼、落合祐之、栗原淳：2歳時に診断された非定型脈絡叢乳頭腫の一例，第136回日本脳神経外科学会 関東支部会，東京，2018年9月
- 2 梶原遼、渋谷浩司、茂呂修啓、前田剛、吉野篤緒：急性硬膜下血腫の出血源による違い，第42回日本脳神経外科学会，淡路，2019年3月