

論文の内容の要旨

氏名：深澤麻衣

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：脳虚血において脾臓に発現する HMGB-1 陽性細胞はミノサイクリン投与により減少する

Damage-associated molecular patterns (DAMPs) とは、生体内の細胞が障害された時に、その危機的状況を周囲の細胞や組織に知らしめるために、細胞外に放出される物質の総称である。一般に微生物の感染を伴わずに惹起される炎症を sterile inflammation といい、この反応において主役を演じるのが、alarmin である。代表的なものに high mobility group box protein-1 (HMGB-1) がある。

HMGB-1 は、マクロファージを lipopolysaccharide で刺激することにより、細胞外に放出された物質の検索により発見された分子量 30 kDa のタンパク質である。多くの動物種間で高い相動性を示し、A box および B box と呼ばれる 2 つの DNA 結合領域を有しており、両ドメインが揃った状態で機能する。B box はサイトカインを分泌誘導するドメインであるのに対し、A box はレセプターには結合するものの、シグナルを伝達しないことから、B box のアンタゴニストであると考えられている。また、HMGB-1 は非ヒストン DNA 結合タンパク質として核内に存在し、ヌクレオソームの構造を維持することによって遺伝子転写の調節に関与している。そのため、本来は核内に存在する HMGB-1 が細胞の壊死に際して、受動的に核外に放出されることが明らかになって以来、HMGB-1 の DAMPs としての機能に注目が集まっている。

ラットでの片側総頸動脈結紮により誘導される脳虚血に際して、脳内のミクログリアが活性化され、これに伴って脾臓における HMGB-1 陽性細胞が増加すること、末梢血中の HMGB-1 濃度が上昇することを報告した。脳ミクログリアの活性は Ionized-calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1) の発現程度に相関しており、抗 Iba-1 抗体による染色強度の変化と、ミクログリアの形態変化などと合わせて評価するが、同モデルにおいては Iba-1 染色性の増強およびミクログリアの細胞体の膨化が顕著に認められた。

近年樹立されたミクログリア培養細胞株を同モデルに応用することが、上記現象のメカニズム解明の一助になると考えられる。そこで本研究は、ラットと比較し種々の遺伝子変異モデルが存在し、ミクログリア細胞株の応用が可能となるマウスに実験モデルを移行し、マウスにおいても同様の現象が認められるか否かについて検討を行うとともに、ミクログリアの活性を抑制するミノサイクリンを投与することでより詳細に探索することを目的とした。

5 週齢雄性マウスを 1 週間順化させたのち実験を行った。3 種混合麻酔薬による全身麻酔下にて右側総頸動脈を剖出した。4-0 ナイロン糸により 60 分間結紮を行い、脳虚血状態を誘導した。その後結紮を解除し縫合したものを脳虚血モデルマウスとした。術前にミクログリアの活性抑制薬であるミノサイクリン (50 mg/kg) を腹腔内注射し、その作用を検討した。

術後 1, 3, 5 および 7 日目に経心的に生理食塩水を灌流し安楽死させた後、4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定を行い、脾臓を摘出し、後固定を行った。摘出した脾臓の大きさを比較検討した。また、通法に従って切片を作製した。免疫組織化学染色はウサギ抗マウス HMGB-1 抗体を 100 倍に希釈し行った。二次抗体は HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いた。Western blotting 解析に関しては、術後 7 日目に、未固定の脾臓を摘出し細胞溶解液 (1% Triton X, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) を調整しサンプルとした。Protein assay kit を用いてタンパク量を定量した後、10% ポリアクリルアミドゲルを使用して電気泳動した。

その結果、肉眼的に脳虚血群で脾臓の縮小を確認した。また、脾臓において HMGB-1 陽性細胞数は術後、コントロール群と比較し有意に増加した。術後 7 日目の脾臓溶解液を用いた western blotting 解析では、コントロール群および脳虚血群の両方で 30 kDa の位置に HMGB-1 のバンドが検出され、脳虚血群では発現濃度が顕著に増強した。Image J を用いて GAPDH との相対的な発現濃度を測定したところ、脳虚血群で有意な発現増強が確認された。

脾臓における HMGB-1 陽性細胞の発現が、脳ミクログリア活性とどのような関係なのかを検討するため、ミクログリアの活性抑制薬であるミノサイクリンを腹腔内注射し、術後 5 日目の HMGB-1 陽性

細胞数を算出した。その結果、ミノサイクリン投与により非投与群と比較して HMGB-1 陽性細胞数は有意に減少した。

従来の研究より、脳虚血時において末梢血中で HMGB-1 が増加することが報告されており、これは脳の壊死細胞から放出された HMGB-1 が、末梢血中に移行することによるものとされている。一方、アポトーシスによる細胞死では HMGB-1 の細胞外放出は起こらないとされることから、本研究で行ったマウスの片側総頸動脈結紮によっても、脳細胞の一部が壊死を起こした可能性が考えられる。

本研究で確認された脾臓における HMGB-1 陽性細胞数の増加は、脳における障害と脾臓が緊密に関連しているといった近年の報告を支持する結果となった。また、脳虚血の病態の把握に極めて意義深いと考えられる HMGB-1 陽性細胞のキャラクタライゼーションは、今後の検討課題である。さらに、ミノサイクリン以外にもミクログリアに作用する薬剤は複数存在しており、今後は様々な遺伝子変異モデルマウスを使用し、加齢や疾病、各種効果が見込まれる薬剤との関係性や、ミクログリア培養細胞株を応用した詳細な検討が必要と考える。