

# 論文要旨

## High mobility group box 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis.

〔 急性脊髄損傷における HMGB 1 の発現と  
神経細胞のアポトーシスとの関連 〕

川畑 英之

### 【序論および目的】

急性脊髄損傷にともなう機能障害の形成には、二次的障害として apoptosis による遅発性の細胞死が生じることが示されており、これらに影響を与える因子の1つとして、TNF- $\alpha$  などのサイトカインによる apoptosis の誘導が明らかにされている。そしてまた炎症性反応は、損傷脊髄における病理学的変化の制御において、重要な要素と考えられる。しかしながら、炎症の拡大、波及に影響を与える上流にある因子については、未だ明らかではない。近年、炎症を制御する重要な因子として HMGB 1 (High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1) が、様々な分野において注目を集めている。本研究の目的はラット脊髄損傷モデルにおける HMGB-1 の発現を証明し、apoptosis への関連につき検討することである。

### 【材料および方法】

#### 1) 培養神経細胞における発現

In vitro での HMGB 1 の発現および誘導を検証する目的にて行った。

胎生 14 日 ICR マウスより採取した神経幹細胞を培養、分化させ、これに NMDA (N-Methyl-D-Aspartic Acid) を付加し、apoptosis を誘導した。apoptosis の発現は抗 active-caspase 3 抗体を用いて確認した。この細胞において HMGB 1、RAGE および TNF- $\alpha$  の発現を免疫組織染色にて確認した。

#### 2) ラット脊髄損傷 model における HMGB 1 の発現

In vivo での発現の確認と、時間経過での変化を検証する目的にて行った。

成熟ラットの胸髄を機械的に圧迫損傷させ、脊髄完全麻痺モデルを作成した。これらのラットより損傷脊髄組織を摘出し、以下の検証を行った。

a) RT-PCR における HMGB-1 および TNF- $\alpha$  の発現を確認した。

b) HMGB-1、RAGE、TNF- $\alpha$  の発現を免疫組織染色にて確認し、損傷後時間経過におけるそれぞれの発現の変化を確認した。

## 【結 果】

- 1) ICR マウスより採取した NMDA 付加 apoptosis 誘導細胞では active-caspase 3 と HMGB-1 の発現は、同一細胞において認められ、HMGB1 の apoptosis 細胞における発現が確認できた。また HMGB-1 と RAGE、TNF- $\alpha$  の発現も同一細胞にて認められた。
- 2) ラット脊髄損傷モデルでは PCR にて 24 時間後、72 時間後で HMGB-1 と TNF- $\alpha$  の発現が上昇していた。TUNEL 法および免疫染色では、HMGB-1 は受傷直後に上昇し、ほぼ 12 時間後より 48 時間後にむけて発現のピークが見られた。RAGE、TNF- $\alpha$  は 24 から 48 時間において発現のピークが見られた。一方 TUNEL 法では、それよりやや遅れて、72 時間後にピークが見られた。

## 【結論及び考察】

本研究において HMGB-1 は培養細胞、脊髄損傷ラットにおける PCR および、免疫組織染色において、非損傷群と比較して発現の上昇が認められた。

また経時的にみると、その発現は TNF- $\alpha$  と相同し、TUNEL 陽性細胞の発現に先行していた。この結果より HMGB-1 の脊髄損傷における発現と、関与が示唆された。

(SPINE Vol.35, No.11 2010 年 掲載)

# 論文審査の要旨

報告番号	医論第 1474 号	氏名	川畑 英之
審査委員	主査	中河 志朗	
	副査	有田 和徳	高嶋 博

**High mobility group box chromosomal protein 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis.**

(急性脊髄損傷における HMGB1 の発現と神経細胞のアポトーシスとの関連)

本研究では、急性脊髄損傷モデルにおける HMGB1 の発現上昇を証明し、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを介した、二次的損傷の原因としての神経細胞のアポトーシス誘導との関連性について検討した。

本研究では、in vitro study として、胎生 14 日 ICR マウスより採取した神経幹細胞を培養分化させ、これに NMDA(N-Methyl-D-Aspartic Acid)を付加し、アポトーシスを誘導した細胞においてアポトーシスの発現の有無を抗 active-caspase3 抗体を用いて検討した。

さらに、in vivo study として、胸髄を機械的に圧迫損傷させ、脊髄完全麻痺モデルを作成したラットにおいて、RT-PCR 法を用いて HMGB1 および TNF- $\alpha$  などの mRNA の発現量を経時的に調べるとともに、損傷脊髄における HMGB1 や RAGE(Receptor for Advanced Glycation End products)、TNF- $\alpha$  などの発現の有無を免疫組織学的に検討した。

本研究では、以下のことが明らかになった。

- 1) In vitro study において、NMDA 付加アポトーシス誘導細胞では active-caspase3 と HMGB1 の発現が、同一細胞において認められ、さらに HMGB1 と RAGE、TNF- $\alpha$  の発現も同一細胞にて認められた。
- 2) ラット脊髄損傷モデルでは、RT-PCR 法で 24 時間後および 72 時間後で HMGB1 と TNF- $\alpha$  の発現が上昇し、TUNEL 法および免疫組織染色では、HMGB1 と TNF- $\alpha$  は受傷直後より上昇し、48 時間後に発現のピークが見られたが、RAGE は 24 時間後に発現のピークが見られた。
- 3) 一方、TUNEL 法における陽性細胞のピークは 72 時間後であった。

以上の結果から HMGB1 は、TNF- $\alpha$  の発現誘導を介して、神経細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。

本研究は、急性脊髄損傷時における神経細胞などのアポトーシスが、炎症性サイトカインを介した二次的原因による可能性を明らかにし、今後における脊髄損傷時における新しい治療法の開発につながる可能性を得たもので、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1474 号	氏名	川畑 英之
審査委員	主査	中河 志朗	
	副査	有田 和徳	高嶋 博

主査および副査の3名は、平成22年11月15日、学位請求者 川畑 英之君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) この脊髄損傷モデルは、臨床的に外傷を起点として起こる脊髄損傷の病態を再現するモデルとして妥当であるか。

(回答) ラットを用いたモデルについては、物理的ダメージによる脊髄損傷を再現しており、臨床における脊髄損傷の病態を反映するモデルとして妥当と考える。

質問2) HMGB1の分泌制御について、壊死や損傷細胞より受動的に分泌されたHMGB1がマクロファージなどの細胞を刺激し、TNF- $\alpha$ などのサイトカインを分泌するのであれば、結果としてこれらが再びHMGB1の分泌を行い、カスケードを形成すると考えてよいか。

(回答) 関節リウマチや、敗血症などにおける過去の報告からは、そのような機序が報告されており、HMGB1と炎症性サイトカインの分泌におけるカスケードが形成されていると考える。

質問3) 本研究においてHMGB1がそのカスケードの上流にあると考えた理由は。

(回答) 今回ラット脊髄損傷モデルでは、評価部位が損傷部より近位で実施し、損傷部における壊死細胞や、損傷細胞からのHMGB1の放出が反応のスタートだと考え、上流にあると判断した。

質問4) 24時間後にRT-PCRの結果でTNF- $\alpha$ の発現量がHMGB1よりも強くみられる理由は。

(回答) TNF- $\alpha$ の損傷細胞からの放出による影響が一因と考える。

質問5) HMGB1の発現上昇には損傷部位からの距離において勾配があるのか。損傷部より離れるに従い減少するのか。

(回答) 今回は、HMGB1の発現上昇について損傷部位からの距離による評価は行っていない。しかしながら時間経過による評価は実施しており、発現上昇の差異は確認している。損傷部位において壊死や損傷細胞からの放出が多く存在すると考えると、損上部での発現はかなり上昇していると考えられる。

質問6) HMGB1の免疫組織学的染色において、グリア細胞や神経細胞、血管内皮細胞も陽性となっているのか。

(回答) 予備実験では、神経細胞およびグリア細胞との二重染色は陽性であり、これらの細胞では陽性と考える。組織学的所見からは、血管内皮細胞も陽性と考える。

質問7) HMGB1の抑制が、本当に治療および長期予後に影響するのか。HMGB1は組織の修復や、幹細胞の誘導や増殖にも働くのではないか。

(回答) 確かに過去の報告では、HMGB1は炎症や、損傷時にシグナル伝達として働き、また一方では組織修復の作用についても報告がなされている。今回の研究では、そのいずれの働きが優位であるかは明らかにはしておらず、今後、HMGB1の中和抗体を用いた抑制効果についての研究が必要と考える。

質問8) 圧迫による機械的損傷とは別に、虚血によるHMGB1の発現についてはどう考えるか。また再灌流に際しての反応はどうか。

(回答) 虚血による発現上昇も可能性はあると考える。しかしながら本研究においては虚血によるHMGB1発現の評価は行っていない。

質問9) 先行研究としてエリスロポエチンによるアポトーシスの抑制があったとの報告があるが、このエリスロポエチンの抑制効果と、HMGB1の発現とはなにか関連があるのか。

(回答) 今回は、エリスロポエチンによる抑制効果との関連性については検討を行っていない。

質問 10) エリスロポエチンによる抑制効果は TNF- $\alpha$  よりも下流に位置すると考えるが、それでよいのか。

(回答) そう考える。

質問 11) 72 時間以降の結果は観察しているか。

(回答) アポトーシスについては 7 日後まで評価した。

質問 12) 72 時間以降アポトーシス細胞が減少しているが、これはアポトーシスにより細胞が減少したため、これ以降起こっていないと考えてよいのか。

(回答) 時間的に組織を評価すると損傷部より頭側 10mm の部位において、損傷直後には変化は認められないが、徐々に空砲形成や細胞の減少が認められる。このため組織の細胞の減少も原因であると考えられる。

質問 13) 3 日目動物で細胞の核や形態の変化を確認しているか。細胞が減少しているということは回復している部位をみている可能性があるが、それについてはどうか。

(回答) 今回は細胞の核の形態学的変化は確認していないが、教室の Nakahara, S ら (J Neuropathol Exp Neurol; 1999, 58: 442-50) の先行研究において、損傷 3 日後の同モデルにおける電顕による組織学的所見について検討をおこなっている。今回は、その結果を参考とした。

質問 14) RAGE は細胞のどこに発現していたか。

(回答) 細胞膜の表面と考える。

質問 15) 48 時間後の組織標本では核に染まっているように思えるがそれについてはどうか。非特異的所見ではないか。

(回答) 蛍光染色においては核が染色されておらず、ラット脊髄損傷モデルにおける免疫染色での所見は非特異的な所見の可能性も考えられる。再度検討を行う必要があると考える。

質問 16) TUNEL 法および HMGB1 の発現について、ニューロンとグリア細胞の鑑別、あるいは白質と灰白質の部位による発現の区別は行っているのか。また圧迫に近い部位、後角において発現が強いと考えるが、どうか。

(回答) 今回は、細胞および部位の鑑別は行っていない。しかしながら、細胞の鑑別および発現の部位については重要な要素と考えられ、今後の課題としたい。

質問 17) 臨床における脊髄損傷治療において、ステロイドの大量投与療法はエビデンスレベルにおいて高い評価が得られているのか。

(回答) そのように考える。以前は全例において、メチルプレドニゾロンの大量投与を行っていたが、副作用の問題や、麻痺の改善のレベルより、現在では全例には行っていない。適切な投与量については、まだ検討が必要と考える。

質問 17) HMGB1 を脊髄損傷のクリティカル・ファクターとして取り上げた理由はなにか。

(回答) 先行研究において、我々は脊髄損傷後のアポトーシス誘導に関して、ASK1 や JNK, p38 などの MAPK シグナルが、その経路の一つであることを明らかにした。さらに上流において MAPK を刺激する因子として TNF- $\alpha$  などのサイトカインが分かっている。そこで今回は、さらに上流においてこれらの反応を制御、あるいは増幅する因子として HMGB1 に注目し、研究を実施した。

質問 18) TNF- $\alpha$  はどの細胞から分泌されていると考えるか。ニューロンから分泌されているのか。あるいはマクログリアの可能性は。

(回答) 今回は HMGB1 分泌細胞の同定は行っていない。ニューロンから分泌されていると考えるが、脳虚血モデルにおける過去の報告では、マクログリアからの分泌の報告もみられ (Kim JB, et al. J Neurosci ;2006, 26: 6413-21)、今回の研究モデルにおいてもマクログリアからの分泌の可能性も考えられる。今後、HMGB1 分泌細胞の同定についても検証が必要と考える。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。