

論文要旨

The free-radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells

フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンは神経細胞の HMGB1 放出を減弱させることで脳梗塞ラットを救出する

菊池 清志

【序論および目的】

脳梗塞急性期の虚血再還流状態において、フリーラジカルが脳血管細胞や神経細胞の障害因子として、細胞死を惹起することが知られている。したがって、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが、脳梗塞治療薬として広く普及している。High-mobility group box-1(HMGB1)は、約30年前にDNA結合タンパクとして発見された分子量30kDのタンパクである。1999年のサイエンス誌にWangらは、HMGB1の敗血症におけるlate mediatorとしての機能、重症度のマーカーや治療標的としての有用性を報告した。HMGB1は、様々の重症病態において、壊死に陥った細胞の核内から受動的に分泌される経路、および、活性化されたマクロファージや血小板から能動的に分泌される経路の2つの経路を介して、血中に出現し、receptor for advanced glycation (RAGE)やtoll-like receptor(TLR)-2, 4などの受容体を介して、NF- κ Bを活性化し、炎症反応や細胞遊走を促進する。すなわち、HMGB1は、炎症の遷延、拡大に関わる重要な因子であるといえる。現在、HMGB1は、敗血症、急性肺損傷、外傷、術後、DICなどの急性炎症のみならず、慢性関節リウマチや動脈硬化などの慢性炎症、悪性腫瘍の増殖や浸潤、転移など、様々な病態におけるkey mediatorの一つであることが、明らかになっている。最近、HMGB1が、脳梗塞患者の血中で有意に上昇していることが報告された。さらに脳梗塞動物モデルにおいて、HMGB1抗体やHMGB1 short-hairpin (sh) RNAが、梗塞領域縮小や神経症状の改善などに影響を及ぼすことが報告された。また、 H_2O_2 刺激によって、マクロファージ、単球、好中球からHMGB1が放出されることも報告されている。

我々は、ラットおよび神経様細胞の虚血再還流モデルにおいて、エダラボンがHMGB1に及ぼす影響を調べた。

【材料および方法】

動物モデル; オス Wistar ラット(n=27) の中大脳動脈を intraluminal filament 法にて、一過性(90分間)に閉塞し、再還流と同時にエダラボン(3mg/kg, 6mg/kg)を投与した。梗塞領域は、TTC 染色にて評価した。**細胞モデル;** 神経様細胞であるラット副腎褐色細胞腫由来細胞(PC12細胞)を用いて、無酸素無糖条件(OGD)および H_2O_2 刺激を加えた。**HMGB1の検出;** HMGB1 ELISA kit およびウエスタンブロット法を用いた。**Cell viability;** MTT 試薬を用いて、HMGB1 添加後の細胞の生存をマイクロプレートリーダーにより検出した。**蛍光免疫染色;** 4 ウェルスライドに播種した PC12 細胞に H_2O_2 を添加した。細胞をホルマリンで固定し、ブロッキング試薬を添加した。一次抗体に抗 HMGB1 抗体、nonimmune IgG を用いた。**ERK1/2 assay;** PC12 細胞に H_2O_2 を添加し、12 時間培養した。回収した細胞に SDS 溶解液を添加し、SDS-電気泳動を行った。一次抗体として抗 phospho-ERK 抗体を添加したのち、ECL システムにて ERK1/2 の活性化の検出を行った。**抑制実験;** H_2O_2 を刺激前に U-0126 を添加し、抑制効果を検討した。**アポトーシス実験;** アポトーシスは、蛍光顕微鏡下において Hoechst 33258 染色の観察 および チトクローム C 放出をウエスタンブロット法にて評価した。**脳細胞の同定;** S100 タンパク染色にて、脳の神経細胞やグリア細胞の同定を行った。

【結果】

エダラボンは脳梗塞モデルラットの梗塞体積および神経症状を改善する

ラット脳梗塞モデルにおいて、sham ope 群と比較して、エダラボン群は、体温、尾動脈の血圧、脳血流量に関して、差が見られなかった。エダラボンは、ラット脳梗塞モデルにおいて、濃度依存性に脳梗塞領域 TTC 染色により減少を確認した。また、エダラボンは、脳梗塞モデルラットの神経症状を改善した。

エダラボンは脳梗塞モデルラットのペナンプラの HMGB1 と血中 HMGB1 を抑制する

ラット脳梗塞モデルのペナンプラ領域(Penumbra; 血流量が低下している領域にあって細胞死を免れている部分を指し、速やかな血管再開通により梗塞への移行を阻止できると期待される部位)に注目してみると、sham ope 群の S100 陽性細胞すなわち脳細胞において、HMGB1 の核から細胞質への移行がみられた。しかしながら、エダラボン群において、HMGB1 の核から細胞質への移行が抑制されたことを蛍光免疫染色法にて確認した。また、ラット脳梗塞モデルの血中 HMGB1 は、sham ope 群と比較してエダラボン群は、濃度依存性に有意に抑制することを ELISA 法にて確認した。

エダラボンは虚血モデルの PC12 細胞の HMGB1 放出を抑制する

動物モデルの結果を確実にするためにラット神経様細胞である PC12 細胞を用いてさらに証明した。PC12 細胞において、OGD、または、 H_2O_2 刺激によって、時間依存性に HMGB1 が細胞外、すなわち、培養上清に放出されることをウエスタンブロット法にて確認した。 H_2O_2 刺激の PC12 細胞において、HMGB1 が核内から核外へ放出されることを蛍光免疫染色法にて確認し、その放出をエダラボンが抑制することを確認した。したがって、 H_2O_2 刺激による PC12 細胞内から放出された HMGB1 は、細胞核由来であることが示唆される。PC12 細胞において、 H_2O_2 刺激による HMGB1 の放出が、ERK1/2 を介していることをウエスタンブロット法にて確認した。さらに ERK1/2 inhibitor である U-0126 は、 H_2O_2 刺激による HMGB1 の放出を抑制することをウエスタンブロット法にて確認した。これらの結果より、HMGB1 は、ネクローシスによるのではなく細胞の活性化により放出されたことが示唆される。

エダラボンは PC12 細胞の HMGB1 によるアポトーシスを抑制する

放出された HMGB1 は何をやるのだろうか? 最近、HMGB1 が細胞死を惹起することが報告された。故に、HMGB1 が PC12 細胞にアポトーシスを誘導するかを検討した。HMGB1 刺激によって、PC12 細胞が、濃度依存性に細胞死が起こることを MTT 法にて確認した。また、その細胞死をエダラボンが濃度依存性に抑制することを確認した。さらにその細胞死が、アポトーシスであることを Hoechst 染色により確認した。さらにミトコンドリアに局在しているチトクローム C が細胞質への流出をみることで確認した。

したがって、エダラボンは、HMGB1 刺激による PC12 細胞のアポトーシスを抑制することを確認した。

【結論及び考察】

ラットと神経様細胞 PC12 の虚血モデルを用いて、エダラボンと HMGB1 放出の関係を初めて、報告した。エダラボンは、フリーラジカルスカベンジャーとして、現在、世界で唯一、臨床的に認可されている神経保護薬である。エダラボン同様、ラジカルスカベンジ能をもち脳梗塞の治療薬として大いに期待されていた NXY-059 は、大規模臨床研究で有効性の確認がされなかった。作用機序において、エダラボンは、NXY-059 とは異なり、脳血液関門(BBB)を容易に通過することが報告されている。しかし、それらの作用だけではなく、HMGB1 の放出を抑制することで、脳梗塞の改善に役立っている可能性がある。しかし、その直接的作用を知ることは困難である。脳梗塞に留まらず、クモ膜下出血患者において、脳脊髄液中の HMGB1 値が、予後と相関することも、最近、報告されている。今後、さらなる研究が必要である。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 96 号	学位申請者	菊池 清志
審査委員	主査	有田 和徳	学位
	副査	栄鶴 義人	副査
	副査	堀内 正久	副査
			博士 (医学)
			金蔵 拓郎
			久保田 龍二

The free-radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells

(フリーラジカールスカベンジャーであるエダラボンは神経細胞の HMGB1 放出を減弱させることで脳梗塞ラットを救出する)

【序論および目的】脳梗塞急性期において、フリーラジカルが細胞死を惹起することが知られており、フリーラジカールスカベンジャーであるエダラボンが、脳梗塞治療薬として普及している。High-mobility group box-1(HMGB1)は、DNA 結合タンパクとして発見された分子量 30kD のタンパクである。HMGB1 は、炎症の遷延、拡大化に関わる重要な因子である。最近、HMGB1 が、脳梗塞患者の血中で有意に上昇していることが報告された。さらに脳梗塞動物モデルにおいて、HMGB1 抗体や HMGB1 short-hairpin (sh) RNA が、梗塞領域縮小や神経症状の改善などに影響を及ぼすことが報告された。また、 H_2O_2 刺激によって、マクロファージ、単球、好中球から HMGB1 が放出されることも報告されている。我々は、ラットおよび神経様細胞の虚血再還流モデルにおいて、エダラボンが HMGB1 に及ぼす影響を調べた。

【結果】1) エダラボンは脳梗塞モデルラットの梗塞体積および神経症状を改善する。エダラボンは、ラット脳梗塞モデルにおいて、濃度依存性に脳梗塞領域 TTC 染色により減少を確認した。また、エダラボンは、脳梗塞モデルラットの神経症状を改善した。2) エダラボンは脳梗塞モデルラットのペナンプラの HMGB1 と血中 HMGB1 を抑制する。ラット脳梗塞モデルのペナンプラ領域に注目してみると、sham ope. 群の S100 陽性細胞において、HMGB1 の核から細胞質への移行がみられた。しかしながら、エダラボン群において、HMGB1 の核から細胞質への移行が抑制されたことを蛍光免疫染色法にて確認した。また、ラット脳梗塞モデルの血中 HMGB1 は、sham ope. 群と比較してエダラボン群は、濃度依存性に有意に抑制することを ELISA 法にて確認した。3) エダラボンは虚血モデルの PC12 細胞の HMGB1 放出を抑制する。PC12 細胞(ラット副腎褐色細胞株)において、OGD、または、 H_2O_2 刺激によって、時間依存性に HMGB1 が細胞外、すなわち、培養上清に放出されることをウエスタンブロット法にて確認した。 H_2O_2 刺激の PC12 細胞において、HMGB1 が核内から核外へ放出されることを蛍光免疫染色法にて確認し、その放出をエダラボンが抑制することを確認した。PC12 細胞において、 H_2O_2 刺激による HMGB1 の放出が、ERK1/2 を介していることをウエスタンブロット法にて確認した。さらに ERK1/2 inhibitor である U-0126 は、 H_2O_2 刺激による HMGB1 の放出を抑制することをウエスタンブロット法にて確認した。これらの結果より、HMGB1 は、ネクローシスによるのではなく細胞の活性化により放出されたことが示唆される。エダラボンは PC12 細胞の HMGB1 によるアポトーシスを抑制する。HMGB1 刺激によって、PC12 細胞が、濃度依存性に細胞死が起こることを MTT 法にて確認した。また、その細胞死をエダラボンが濃度依存性に抑制することを確認した。さらにその細胞死が、アポトーシスであることを Hoechst 染色により確認した。さらに ミトコンドリアに局在しているチトクローム C が細胞質への流出をみることで確認した。したがって、エダラボンは、HMGB1 刺激による PC12 細胞のアポトーシスを抑制することを確認した。

【結論及び考察】ラットと神経様細胞 PC12 の虚血モデルを用いて、エダラボンと HMGB1 放出の関係を初めて、報告した。エダラボンは、フリーラジカールスカベンジャーとして、現在、世界で唯一、臨床的に認可されている神経保護薬である。エダラボン同様、ラジカールスカベンジ能力をもち脳梗塞の治療薬として大いに期待されていた NXY-059 は、大規模臨床研究で有効性の確認がされなかった。作用機序において、エダラボンは、NXY-059 とは異なり、脳血液関門(BBB)を容易に通過することが報告されている。しかし、それらの作用だけではなく、HMGB1 の放出を抑制することで、脳梗塞の改善に役立っている可能性がある。しかし、その直接的作用を知ることは困難である。脳梗塞に留まらず、クモ膜下出血患者において、脳脊髄液中の HMGB1 値が、予後と相関することも、最近、報告されている。今後、さらなる研究が必要である。

この論文はエダラボンが細胞からの HMGB1 の放出を抑制し、脳梗塞の病変軽減することを示した論文で、学位論文として価値あるものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 9 6 号		学位申請者	菊池 清志
審査委員	主査	有田 和徳	学位	博士 (医学)
	副査	栄鶴 義人	副査	金蔵 拓郎
	副査	堀内 正久	副査	久保田 龍二

主査および副査の 5 名は、平成 22 年 1 月 25 日、学位申請者 菊池 清志 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、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) 実験のエダラボン投与量は臨床治療の投与量より 1 桁程度、高いのではないか？

(回答) エダラボンは、30mg を 1 日に 2 回、投与する。今回、動物に 3、6mg/kg を 1 回のみ投与した。仮に体重 60kg の患者に 30mg 投与した場合、0.5mg/kg となり、1 桁低い。ヒトと動物では最適投与量が異なり、本実験は、複数の論文の効果的な量を参考にした。

質問 2) S100 を用いているが、S100 陽性細胞とは主にアストロサイトのことか？

(回答) S100 蛋白は、今回、アストロサイト染色に用いた。図には無いが、MAP-2 を用いてオリゴデントロサイトでも、同様の結果を得た。

質問 3) エダラボン投与で、微小循環はどうなるのか？

(回答) イヌモデルにおいて、肺微小循環障害を改善することが、報告されている。

質問 4) ヒトでは、エダラボンは 2 週間投与だが、その間、フリーラジカルが出ていると考えるか？

(回答) 虚血脳における白血球浸潤は、5 週間は持続しているとの報告や酸化 LDL は発症後 14 日間、エダラボン非投与群で有意に低いとの報告がある。また、エダラボンを 2 週間投与した方が、1 週間のみの投与より機能予後が良いとの報告もある。

質問 5) エダラボンの副作用に腎障害があるが、この報告で腎障害の関係を推論できるか？

(回答) 本実験ではメカニズムは不明である。エダラボン単独投与では動物実験では腎障害認められず、絶水状態・抗生剤との併用で腎毒性が増強されたとの報告や抗生剤と同時投与で腎毒性が発現するが、エダラボン前投与では認められなかったとの報告がある。

質問 6) 頸動脈内膜剥離術(CEA)の際に過還流症候群を防ぐためにエダラボンを予防投与するが、そのメカニズムは？

(回答) CEA 中に生成されるフリーラジカルが術後の脳過還流と相関する。よって、エダラボンにより予防可能と予測している。

質問 7) Sham 群における血中 HMGB1 値はどうか？

(回答) Sham 群のデータは示していないが、健康な検体の血中 HMGB1 は 10 ng/ml 以下であり、同様の値であると推察した。

質問 8) H₂O₂ 刺激の場合、ERK1/2 の活性化が起こっているが、OGD のシグナルの系は？

(回答) 我々の別の論文にて、PC12 を OGD 刺激することで、ERK1/2 および p38MAPK の活性化がおこることを報告している。

質問 9) エダラボン投与中のヒト検体での血中 HMGB1 値は、測定しているのか？

(回答) 本実験では行っていないが、今後、さらなる研究を進める予定である。

質問 10) 脳梗塞モデルは血管を縛って作製するのか？

(回答) 血管を縛るのはなく、intraluminal filament 法にて、血管に糸状の物を挿入することによって、モデル作製した。

質問 11) Fig.2A に示されるように HMGB-1 は刺激に反応して核内から細胞質へ移行し、さらに細胞外へ放出されるものと理解しています。然るに Fig.3C で f(edaravone なし) と i(edaravone あり) を較べると edaravone 存在下で HMGB-1 は細胞質にあるように見えます。本文でも (p869, 右カラム中ほど We next used fluorescence で始まる paragraph の最後に edaravone treatment was found to significantly inhibit nuclear translocation of HMGB-1 と記載されています。これは逆ではないでしょうか？

(回答) Fig.3 は不鮮明な画像写真であるが、HMGB 1 は核内に留まっていることを示している。本文の文章は間違いで、下記のごとく、修正文を発表予定である。edaravone treatment was found to significantly inhibit cytoplasm translocation of HMGB-1.

質問 12) Edaravone は free radical scavenger です。In vitro の系で実際に活性酸素を除去していることを示せれば薬理学効果についてより説得力が出ると思います。この点についてお考えを教えてください。

(回答) Edaravone は、主にヒドロキシラジカルを阻害する薬剤であるとの報告があります。

最終試験結果の要旨

質問13)ラジカットの臨床成績について教えてください。CT, MRI等でFig.1Aに相当するような ischemic injury areaの縮小がみられるのですか? そのような臨床研究データがありますか?

(回答) 梗塞領域の縮小を報告した臨床研究データが過去にあります。

質問14) Table 1は示していることは何か?

(回答) エダラボン非投与群, 投与群(3mg/kg および 6mg/kg)において, 中大脳動脈閉塞前後での生理的変化はみられなかった。また, エダラボン投与による生理的変化もみられなかった。

質問15) エダラボン投与の際の血管は?

(回答) cervical vein 経由で静脈投与した。

質問16) Fig.2 B の%表示の分母は?

(回答) 全細胞を分母とした。

質問17) Fig.2 C の HMGB1 値は, 他の報告と比較して, どうか?

(回答) 以前の報告では, 脳梗塞患者の血中 HMGB1 値は約 200ng/ml 程度であった。また, 10ng/ml 以下は, 正常値と考えられている。それらを踏まえると, ラットのエダラボン非投与群にて 60~70ng/ml の HMGB1 値が, エダラボン投与群において, 5~10ng/ml に抑制されるという今回のデータは, 相関性のあるデータであると考えられる。

質問18) Fig.3B の H₂O₂ の刺激時間は 12 時間だが, 他の時間ではどうか?

(回答) 他の濃度や他の時間においても, 予備実験を行い, その結果を踏まえて投与量や時間を決めた。H₂O₂ の濃度差によって, 細胞はアポトーシスやネクローシスを起こすという報告もある。今回は, 細胞が死んでいないかどうか, 顕微鏡にて確認しながら, 細胞死を起こさないような投与量や投与時間を決めた。

質問19) ERK1/2 のシグナルも H₂O₂ の刺激時間でどうなるのか?

(回答) 本実験では, シグナルは他の刺激時間では行っていないが, ERK1/2 の活性化が 5 時間までみられるとの報告がある。

質問20) NXY-059 は脳血液関門(BBB)を通過しないとのことだが, 梗塞巣の BBB は どうなっているのか?

(回答) 脳虚血時には BBB が障害され, エダラボンが BBB を保護するとの報告もある。エダラボンは NXY-059 と異なり, 脂溶性の部分を持つため, 薬剤効果を持つ可能性がある。

質問21) HMGB1 の局所での発現レベルはどうか?

(回答) 非梗塞巣では HMGB1 は核内に留まり, 梗塞巣では核内から細胞質へ移動する。蛋白産生量として増加するわけではない。

質問22) TTC 染色とは?

(回答) TTC 染色を行うことで虚血領域を評価した。生きたミトコンドリアがあれば反応して赤く染まり, 虚血に陥った組織は染まらず, 白く残る。

質問23) *in vitro* と *in vivo* のエダラボンの投与量の相関はどうか?

(回答) 過去の報告を参考にしたものであり, 両者の投与量に相関はある。

質問24) Fig.3A や 3B は, どうやって, 定量化したのか?

(回答) 複数回のウェスタンブロット法を施行し, 定量化した。

質問25) ERK1/2 阻害剤である U-0126 が, HMGB1 放出を抑制しているが, エダラボン投与におけるシグナルは?

(回答) 本実験では, エダラボン投与時のシグナル経路は調べていない。しかし, ラットアストロサイトにおいて, フリーラジカルの一つである NO を放出する作用を持つ SNP が誘導するアポトーシスをエダラボンが抑制し, その際に ERK1/2 を抑えることが報告されている。

質問26) 活性酸素 (ROS) の概念は何か?

(回答) 本実験で用いた H₂O₂ は, ROS の一つである。フリーラジカルの一つであるヒドロキシラジカルも ROS に含まれる。ROS には, フリーラジカルとそうでないものがある。H₂O₂ が Fenton 反応によって, ヒドロキシラジカルが生成される。

質問27) 考察の図にて, HMGB1 放出を抑制したということか?

(回答) コア領域のネクローシス細胞の核内から放出された HMGB1 が, ペナンプラ領域でアポトーシスを誘導し, そのアポトーシス細胞から, また HMGB1 が放出される。その悪循環をエダラボンが, 抑制するのではないかと考えた。

以上の結果から, 5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め, 博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。