

—— 研究助成報告 ——

脳機能維持と血液—脳関門（BBB）制御： High Mobility Group Box-1（HMGB1）によるBBB 破綻

Brain function and blood-brain barrier (BBB) :
Disruption of BBB by high mobility group box-1 (HMGB1)

西 堀 正 洋

要旨：近年、各種の脳障害時にクロマチンDNAと結合しているHigh mobility group box-1（HMGB1）が劇的な細胞内移動を生じ、細胞外へ放出されることが明らかにされた。HMGB1は一旦細胞外へ出るとサイトカイン様の効果を発揮し、血液—脳関門（Blood brain barrier, BBB）の破綻や脳内炎症を惹起する。本研究は、薬物（ピロカルピン）誘発てんかんモデルマウスにおけるBBBの破綻にHMGB1が関与するかどうかを明らかにし、さらにその保護法を検討するために企図された。その結果、ピロカルピン誘発てんかんでは大脳皮質と海馬の広範囲な領域において、神経細胞の核内から細胞外へのHMGB1 放出が生じ、ミクログリアとアストログリアの活性化を生じることがわかった。HMGB1の放出によってBBBの透過性亢進と脳内炎症の惹起が連動して生じ、脆弱な神経細胞のアポトーシスが誘導された。抗HMGB1抗体の末梢投与による治療は、上記の脳神経の障害に有効である可能性がある。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2015；26：63-68

Key Words : Epilepsy, High mobility group box-1 (HMGB1), Blood brain barrier (BBB), Inflammation, Vascular permeability; Brain edema

はじめに

てんかん症は、脳神経系の異常興奮性に基づく疾患である¹⁻³⁾。約65%のてんかん症患者に対しては、抗てんかん薬による薬物治療が有効であるが、残りの約35%は難治性である。てんかん原性と発作原性の獲得に関与する原因として、遺伝性要素（主にイオンチャンネル変異）、皮質形成異常、脳炎（脳症）、外傷、周産期仮死などが挙げられ、これらの要素が難治性形成にも寄与する。

最近のてんかんモデル動物あるいはヒト患者

での研究で、てんかん症では脳に特徴的な血管構造である血液—脳関門（Blood-brain barrier; BBB）の機能的ならびに構造的破綻が認められることが明らかにされてきた⁴⁻⁶⁾。BBBの破綻は、脳血管の透過性亢進を生じ血漿タンパクの脳実質への漏出と脳浮腫を惹起する。脳浮腫に伴う低灌流と低酸素症は、興奮性アミノ酸神経伝達物質の作用や、抑制系の障害を介しててんかん焦点脳局所の異常興奮性をさらに増悪する可能性がある⁴⁻⁶⁾。

申請者は、これまでに虚血性脳障害時や脳外傷時の脳障害の研究を行い、BBBの機能的な

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬理学分野
〔〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1〕

Masahiro Nishibori, M.D., Ph.D.

Department of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

〔2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan〕

らびに構造的な破綻がそれに引き続いておこる脳内炎症の上流に位置することを突き止め、その解析を行なってきた⁷⁻¹⁰⁾。特に、障害早期に神経細胞核から細胞外へ放出されるHigh mobility group box-1 (HMGB1) がその受容体であるRAGE刺激を介しBBB破綻の原因物質として働いていることを抗HMGB1抗体を用いて証明した^{7,8,10)}。これらの研究において、神経への障害性の刺激が、HMGB1の劇的なトランスロケーションを共通して惹き起こし、脳内炎症性細胞であるミクログリアの活性化と炎症性サイトカインの産生を誘導すること、BBBの破綻と炎症反応の進行が連動して生じる結果、脳障害急性期の脳浮腫につながることを明らかにしてきた¹¹⁾。このようなカスケードとしての脳障害から脳を保護するのに、我々が作製したHMGB1の中和活性を有する抗HMGB1単クローン抗体が極めて有効であることを報告してきた。本研究では上記の実績に基づき、薬物誘発てんかんモデル動物のBBB破綻と炎症反応におけるHMGB1の関与と神経細胞障害の関係を検討し、治療薬としての抗HMGB1抗体を評価した。

実験方法

動物：

10週齢の雌性C57/BL6 NcrLマウスを使用した。マウスは、12時間明暗サイクル下で飼育し、食餌と水は自由摂取させた。

薬物誘発てんかん：

ムスカリン受容体アゴニストのピロカルピン末梢投与 (350 mg/kg, i.p.) で、てんかん症のモデルを作製した。末梢性のムスカリン受容体遮断のためのメチルスコポラミン (1 mg/kg, i.p.) をピロカルピン投与の30分前に投与した。抗HMGB1抗体あるいは対照の抗Keyhole Limpet Hemocyanin抗体あるいは対照溶媒のPBSは、1 mg/kgの用量を、ピロカルピン投与後Racine Stage4の痙攣出現を確認した時点で、1回静注した (Fig. 1)。

脳血管透過性の測定：

脳血管の透過性亢進は、ピロカルピン投与2時間後に尾静脈からエバンスブルー色素を静注し、脳実質内へのエバンスブルー-アルブミン複合体の漏出を測定することで評価した^{7,12)}。

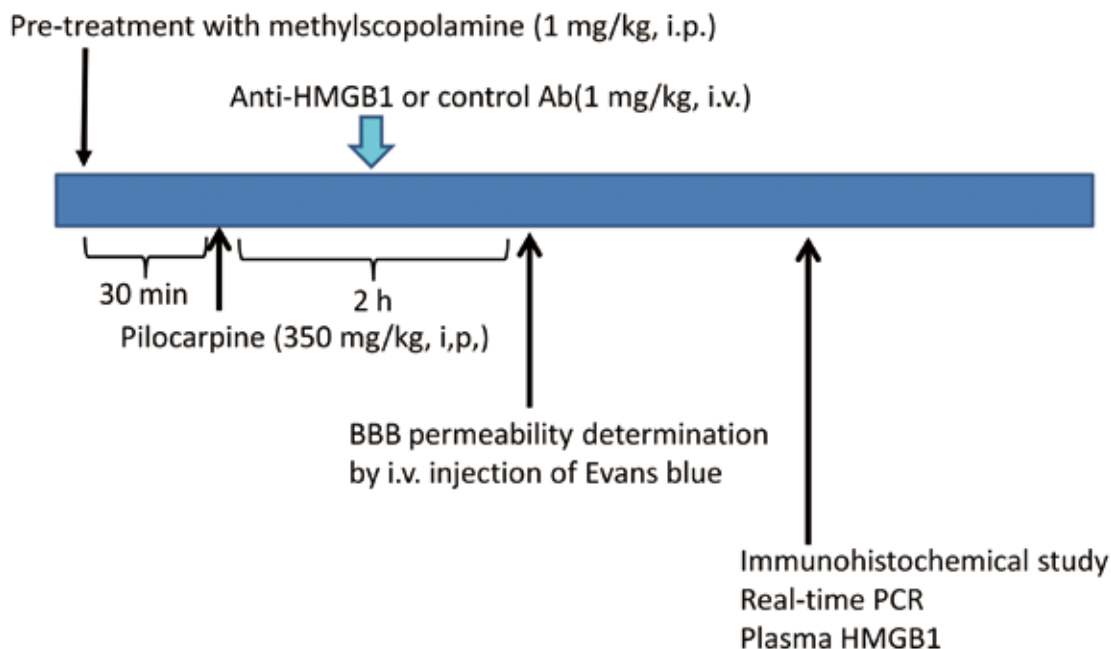


Fig. 1 Experimental protocols of pilocarpine-induced epilepsy in mice.

組織染色：

組織学的検索では、マウスを深麻酔下に経心臓的にホルマリン灌流し脳組織を固定後、パラフィン包埋切片を作製した。脳の薄切切片を作製し、一方はHematoxylin-eosin染色を施した。もう一方は、脳切片を抗HMGB1抗体、抗GFAP抗体、抗Iba-1抗体でそれぞれ蛍光染色し、陰性対照群、ピロカルピン+対照抗体群、ピロカルピン+抗HMGB1抗体治療群の間で大脳皮質と海馬領域を中心に比較検討を実施した。特異的免疫染色の切片について、必要な場合には免疫陽性細胞数をカウントした。

ウェスタンブロットとリアルタイムPCR：

ピロカルピン投与一定時間後に脳を摘出し、海馬と大脳皮質のサンプリングを行った。脳サンプルは、ウェスタンブロット用とリアルタイムPCR用とを区別し、リアルタイムPCR用は直ちにRNAzol中に浸漬し、破碎した。総RNAを抽出後、逆転写酵素でcDNAを合成しPCR反応の鋳型とした。リアルタイムPCRの対照としてGAPDH遺伝子発現を用いた。

採血と血中HMGB1の測定：

採血は、深麻酔下に左心室から実施した。抗凝固処理した後、全血を遠心し、血漿を分離した。血漿中のHMGB1を自家製のサンドイッチ

Elisaで測定した。

統計検定：

2群間の有意差検定には、Student's t-testを用いた。Probability<0.05を有意差ありと判定した。

結果

ピロカルピンの投与後、数時間の間に痙攣発作が誘導された。痙攣発作の頻度は、対照抗体投与群と抗HMGB1抗体投与群の間に差を認めなかった。一方、大脳半球のエバンスブルー漏出量は、対照群にくらべ抗HMGB1抗体投与群で有意に低いことが明らかとなった (Fig. 2)。陰性対照では殆ど漏出は認められなかった。また、末梢投与された組換え体HMGB1は、用量依存的にピロカルピンによるエバンスブルー漏出を増強した。

てんかんモデル動物脳のHMGB1を免疫組織化学的に染色したところ、対照抗体投与群ではピロカルピン投与4時間後、MGB1陽性の核染色を示す細胞数が大脳皮質ならびに海馬領域とともに低下していたが、抗HMGB1抗体投与群では、殆ど低下は認められなかった。てんかんモデル動物における神経細胞核内HMGB1の細胞質分画へのトランスロケーションを、海馬錐体細胞で調べた。その結果、大脳皮質で認めら

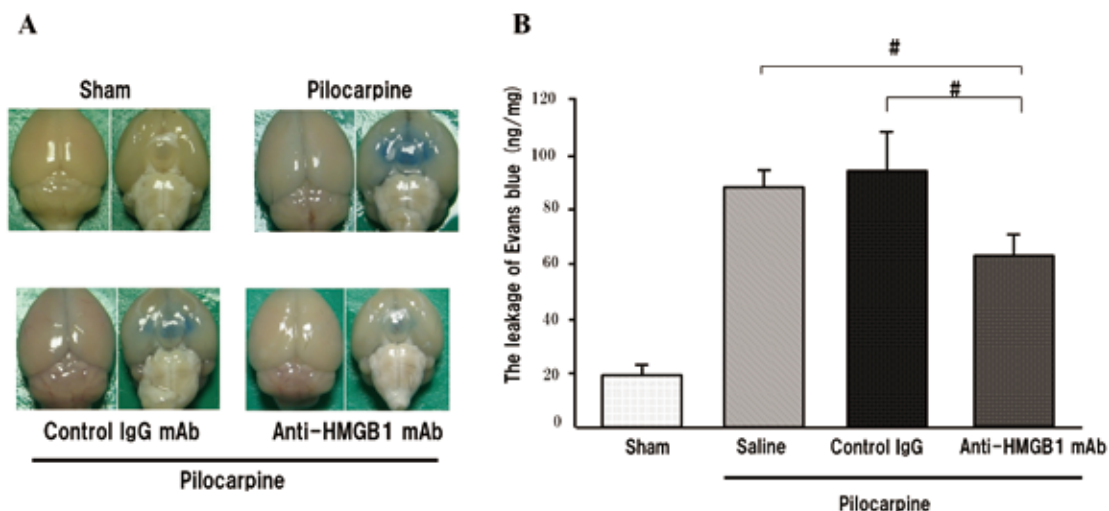


Fig. 2 Effects of anti-HMGB1 mAb on pilocarpine-induced BBB permeability in mice.

れたのと同様のトランスロケーションが対照抗体投与群では明瞭に認められるのに対し、抗HMGB1抗体投与群では、その割合が極めて低かった。上記の結果に加え循環血中のHMGB1の測定を行なった。ピロカルピン痙攣マウスでは血中HMGB1レベルの有意な上昇が見出された。一方、抗HMGB1抗体投与群では上昇は認められず、陰性対照と差はなかった。この上昇したHMGB1レベルは脳神経細胞核由来と考えられたが、同時に末梢組織由来である可能性も考えられたので、まず痙攣を起こした骨格筋におけるHMGB1の免疫組織化学的染色を実施した。その結果、対照群では筋肉組織中に拡散性に拡がるHMGB1の陽性像が認められたのに対し、抗HMGB1抗体投与群では核に局限した像を示した。この結果は、対照動物の場合は骨格筋も血中HMGB1上昇の原因組織となっている可能性を示唆するものである。さらに現在、その寄与について検討している。

ピロカルピン投与4時間後のアストログリア細胞をGFAPの染色で観察したところ、対照抗体群では大脳皮質と海馬領域でともに強陽性細胞数が増加し、突起の長い形態を示した。抗HMGB1抗体投与群では、それらの変化が強く抑制されていた。同様に、活性化ミクログリアを抗Iba-1抗体で検出したところ、対照抗体群では大脳皮質と海馬領域で陽性細胞数が増加していたが、抗HMGB1抗体投与群では抑制されていた。大脳皮質領域と海馬領域のIL-1 β 、IL-6、MCP-1、TNF- α のmRNA発現を調べたところ、ピロカルピン投与対照群では、すべて有意の発現上昇が確認されたが、抗HMGB1抗体投与群では、それらが有意に抑制されていた。以上の結果から、本てんかんモデルにおいて抗HMGB1抗体投与は脳血管の透過性亢進と脳内炎症をともに強く抑制することが明らかにされた。

考察

ラットの中大脳動脈閉塞一再還流モデルにおいて、虚血領域の神経細胞内では、細胞核に存在しクロマチンDNAと結合しているHigh mobility group box-1 (HMGB1) が劇的な細胞

内移動を生じ、細胞外へ放出されることが明らかにされた^{7,8)}。HMGB1は一旦細胞外へ出るとサイトカイン様の効果を発揮し¹³⁾、血液-脳関門 (Blood brain barrier, BBB) の破綻、脳血管収縮や脳内炎症を惹起し、脳浮腫と脳低酸素症の原因となる⁷⁻⁹⁾。本研究において、ピロカルピン誘発マウスでてんかんモデルでは、海馬ならびに大脳皮質の領域で、神経細胞核内のHMGB1染色が減弱あるいは消失しており、脳虚血や脳外傷時と同様のトランスロケーションが惹起されることが証明された。ピロカルピン投与後にはエバンスブルー色素の漏出で検出されるBBBの透過性亢進も同時に観察された (Fig. 2)。脳血管の透過性亢進現象には、炎症性サイトカインであるIL-1 β 、IL-6、MCP-1、CXCL-1の発現上昇を伴っていたことと、海馬で反応性アストログリアとIba-1陽性のミクログリア数が上昇したことから、ピロカルピン誘発てんかんに伴う脳内炎症の進行にアストログリアとミクログリアが関与すると推測された。また、海馬CA領域ではアポトーシス細胞数の上昇が認められた。以上の炎症性反応と神経細胞の細胞死は、抗HMGB1単クローン抗体の投与によって著明に抑制された。脳のHMGB1レベルをウェスタンブロットで検出・定量したところ、ピロカルピンてんかんマウスではそのレベルが低下し、抗HMGB1抗体投与で、低下が抑制された。一方、ピロカルピンてんかんマウスでは血中HMGB1の上昇が認められ、抗HMGB1抗体投与は上昇を抑制した。組換え体HMGB1をピロカルピンてんかんマウスに投与すると投与量依存的な脳血管透過性の亢進が認められた。以上の結果から、ピロカルピン誘発てんかんでは大脳皮質と海馬領域において、神経細胞の核内から細胞外へのHMGB1放出が生じ、ミクログリアとアストログリアの活性化を生じることがわかる (Fig. 3)。以前の研究でHMGB1はBBB構成細胞である周皮細胞と血管内皮細胞に収縮性反応を惹起することを見出している¹¹⁾ので、ピロカルピンてんかんマウスでもHMGB1の広範囲の神経細胞からの放出によってBBBの透過性亢進と脳内炎症の惹起が連動して生じ、脆弱な神経細胞のアポトーシス

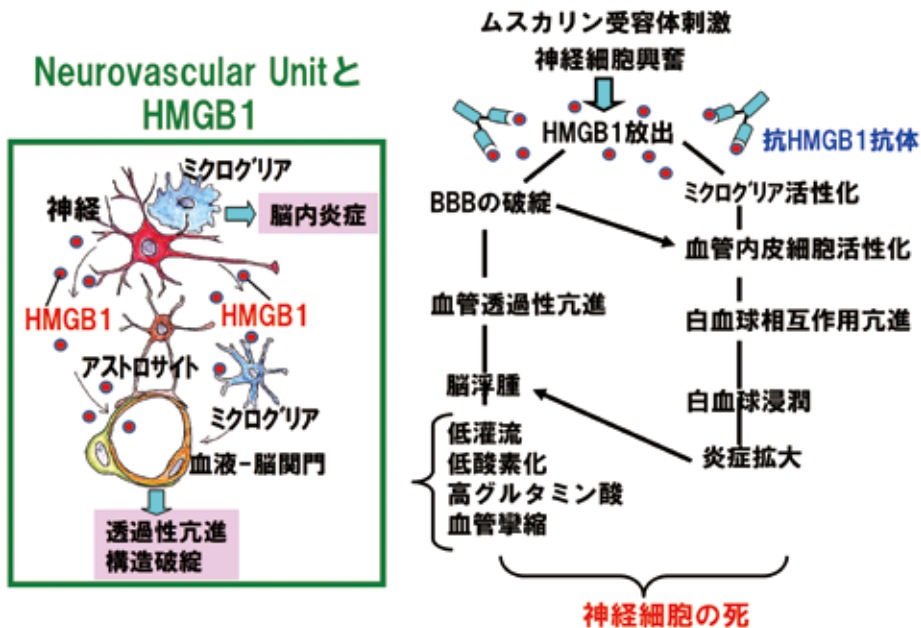


Fig. 3 Cascade reaction of pilocarpine-induced neuronal cell death mediated by HMGB1 in mice.

が誘導されると考えられる (Fig. 3)。抗HMGB1抗体の末梢投与による治療は、そのような脳神経の障害に有効である可能性がある。抗HMGB1抗体の投与効果とHMGB1の役割をさらに詳細に明らかにすることによって、てんかん症の病態についての新しい理解がもたらされると期待できる。

文献

- 1) Staley K. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat Neurosci* 2015 ; **18**(3) : 367-372.
- 2) Dupuis N, Auvin S. Inflammation and epilepsy in the developing brain: clinical and experimental evidence. *CNS Neurosci Ther* 2015 ; **21**(2) : 141-151.
- 3) Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawsky MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 2013 ; **36**(3) : 174-184.
- 4) Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, et al. Lasting blood-brain disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 2004 ; **24**(36) : 7829-7836.
- 5) Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, et al. TGF- β receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 2007 ; **130** : 535-547.
- 6) Tomkins O, Friedman O, Ivens S, Reiffurth C, Major S, Dreier JP, et al. Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. *Neurobiol Dis* 2007 ; **25**(2) : 367-377.
- 7) Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, et al. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* 2007 ; **21**(14) : 3904-3916.
- 8) Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, 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) : 1420-1428.
- 9) Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med*

- 2012 ; **18**(6) : 911-917.
- 10) Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, Date I, et al. Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol* 2012 ; **72**(3) : 373-384.
- 11) 西堀正洋. HMGB1 を標的とした治療. *日本臨牀* 2014 ; **72**増刊号 (最新臨床脳卒中学上) : 417-422.
- 12) Okuma Y, Liu K, Wake H, Liu R, Nishimura Y, Zhong H, et al. Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction. *Neuropharmacology* 2014 ; **85** : 18-26.
- 13) Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* 2011 ; **29** : 139-162.

Summary

Brain function and blood-brain barrier (BBB) : Disruption of BBB by high mobility group box-1 (HMGB1)

Masahiro Nishibori

High mobility group box-1 (HMGB1) has been shown to be translocated from neuronal nuclei and released into extracellular space through cytosolic compartment in ischemic and traumatic brain injuries. Once released, HMGB1 exerts cytokine-like role through the stimulation of plural receptors, facilitating brain inflammatory responses including blood-brain barrier (BBB) disruption and activation of microglia. It has been reported that BBB disruption may play role in epileptogenesis. In the present study, we investigated whether HMGB1 was involved in BBB disruption and resulting neuronal cell damage in pilocarpine-induced epileptic mice. HMGB1 translocation in neurons were observed in the cerebral cortex and hippocampal regions after the i.p. injection of pilocarpine (350 mg/kg) in mice pre-treated with methylscopolamine (1 mg/kg, i.p.). The translocation was strongly inhibited by the treatment with anti-HMGB1 mAb. In scopolamine-epileptic mice, the increase in BBB permeability associated with microglia activation and up-regulation of cytokine expression was detected. These responses were inhibited by anti-HMGB1 mAb. The number of apoptotic neurons in hippocampus in scopolamine-epileptic mice was reduced by the treatment with anti-HMGB1 mAb. We concluded that HMGB1 was released from neuronal nuclei and induced BBB disruption in scopolamine-epileptic mice. Anti-HMGB1 mAb may provide a novel therapy for protecting BBB disruption during epileptogenesis.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2015 ; 26 : 63-68