

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10301

研究課題名(和文) 脳梗塞急性期における皮質拡延性抑制とHMGB1核外放出の"負の連鎖"に関する研究

研究課題名(英文) Relationship between cortical spreading depression (CSD) and high mobility group box 1 (HMGB1) as synergistic deteriorating factors in cerebral ischemia.

研究代表者

中村 元 (NAKAMURA, Hajime)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80533794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、脳梗塞周囲において炎症誘発物質(HMGB1)と皮質拡延性抑制(CSD)が互いに増幅し合い、脳梗塞を進行させると仮定したが、急性期脳梗塞モデルにおいてこれらの因子に明らかな相関は認めなかった。また、脳梗塞作成後にHMGB1抗体を投与したが、CSD発生数は減少しなかった。これらの結果から、脳梗塞発症後急性期(6時間以内)においては、HMGB1がCSD発生数を増加させ、梗塞巣を増大させるというメカニズムは存在しないと考えた。今後は、炎症反応が著明となる脳梗塞亜急性期(発症後数日程度)にターゲットを絞り、HMGB1とCSDの関連を解明すべく新たな実験系を検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：The Purpose of this study is to survey the relationship between high mobility group box 1 (HMGB1) and cortical spreading depression (CSD), and to develop a new treatment method for cerebral infarction. We supposed that HMGB1 and CSD amplified each other and would make the injured lesion expanded progressively. But, in Mouse focal ischemia model, there was no relationship between these two factors and the administration of HMGB1 antibody did not suppress CSD occurrence. Our conclusion is that HMGB1 will not boost CSD occurrence at least in acute phase in cerebral infarction model. We may have to check the mechanism again in sub-acute phase after cerebral infarction, in which the inflammatory response is more severe.

研究分野：医歯薬学

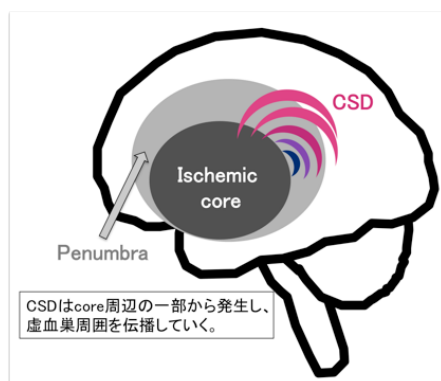
キーワード：脳血管障害 脳虚血 イメージング 皮質拡延性抑制 HMGB1

## 1. 研究開始当初の背景

急激な高齢化が進む日本において、脳梗塞患者は年々増加しつつある。梗塞巣拡大防止を目的とした線溶剤静注療法や血管内治療による血行再建術の普及により、死因別死亡原因では年々その割合が減少しているものの、要介護原因疾患の第1位であり、医療経済的観点からも、革新的な脳梗塞増大予防法の開発が望まれている<sup>1)</sup>。このような背景から、多くの研究者が血行動態・免疫応答・炎症反応など、さまざまな側面から脳梗塞二次性増悪のメカニズムを研究し、治療介入の可能性を模索してきた。

近年、虚血や外傷などの脳損傷が生じると、その周辺領域に High mobility group box 1 (以下 HMGB1) と呼ばれる核内 DNA 結合タンパク質が放出され、虚血巣増大や浮腫増悪を誘発することが明らかになってきた<sup>2)</sup>。HMGB1 は通常神経細胞の核内に存在しているが、壊死細胞から細胞外に放出され、炎症性サイトカインとして働くことがわかっている。HMGB1 以外にも、損傷脳周囲にはペルオキシレドキシニンなどのダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns : DAMPs) と呼ばれる炎症反応惹起物質が放出されることも確認されており<sup>3)</sup>、これらの物質が脳梗塞の増悪因子となっている。

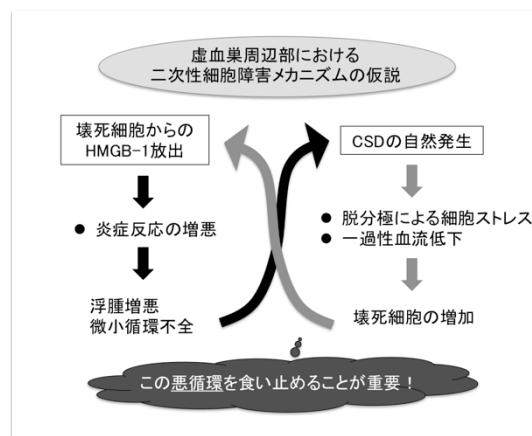
HMGB1 などの炎症誘発物質とは別に、本研究代表者である中村らは皮質拡張性抑制 (cortical spreading depression : 以下 CSD) と呼ばれる脱分極波が脳虚血巣周辺部で自然発生し、これが脳梗塞二次性増悪の一因となっていることを明らかにしてきた<sup>4)</sup>。CSD は従来の画像検査では検知し得ない現象であるが、減圧開頭術を要した脳梗塞患者に脳表電極を留置することにより、虚血巣周辺部変領域において頻繁に発生することが確認されている<sup>5)</sup>。ちなみに、虚血巣の増大機序としては、CSD 伝播に伴う一過性脳血流低下と、再分極のためのエネルギー需要増加により、エネルギー需給バランスの悪化が考えられている。



このように、HMGB1 核外放出と CSD 伝播はいずれも損傷脳周囲に発生し、前者は過

剰な炎症反応、後者はエネルギー需給バランスの悪化、という異なるメカニズムで二次性増悪の原因となっているが、最近の研究により、CSD 自体が HMGB1 をはじめとした炎症誘発物質の核外放出を惹起している可能性が示唆されてきた<sup>6)</sup>。その機序として、カスパーゼ1 活性などが挙げられているが、いまだ不明な点も多い。

いずれにせよ、脳梗塞二次性増悪因子として、別ルートで進められてきた2つの研究が、ここにきて密に関わっている可能性がでてきたことになる。本研究では、その関連を明らかにし、治療介入の可能性を模索することを目的とした。



## <参考文献>

1. 平成 24 年人口動態統計月報年計 (概数) の概況 -厚生労働省-
2. Yang GW et al. High-mobility group protein box-1 and its relevance to cerebral ischemia. *JCBFM*. 2010;30:243-254.
3. Shichita T et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med*. 2012;18:911-917.
4. Nakamura H et al. Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. *Brain*. 2010;133:1994-2006.
5. Dohmen C et al. Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol*. 2008;63:720-728.
6. Karatas H. et al. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science*. 2013;339:1092-1095.

## 2. 研究の目的

これまでの研究結果から推察すると、損傷脳周囲に発生する CSD が HMGB1 核外放出を助長し、それにより炎症反応カスケードが動き出すというストーリーが存在している

のかもしれない。もしくは、HMGB1をはじめとした各種炎症反応性物質がCSDを誘発しているのかもしれない。

これを踏まえ、本研究では以下の2点を解明することを主な目的とした。

1) 虚血巣周辺部で核外放出されたHMGB1とCSD伝播数の関連を明らかにする。

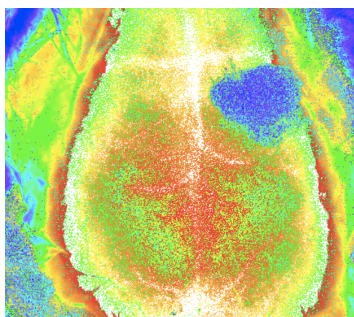
2) HMGB1抗体投与後に起こるCSD発生数の変化(CSD発生数は減るのか?)

### 3. 研究の方法

(1) LSFを用いたマウス脳表血流の連続モニタリング

脳表血流を連続モニタリングするために、2次元レーザー血流計(LSF)としてOMEGAZONE OZ-1(オメガウェーブ株式会社製)を用いた。なお、LSFの測定原理は、均一波長光を脳表に照射する際に発生する模様(スペckルパターン)を解析することで、各ピクセル内の粒子(主に血球)の動きを数値化するというものである。この方法を用いることで、観察エリアの脳表血流を毎秒1~数フレーム程度の時間解像度でリアルタイムモニタリングすることが可能となる。

マウスの場合、頭蓋骨が非常に薄く、レーザー光を遮ることがないため、開頭を行うことなく脳表血流を可視化することができる。(以下にLSF画像を提示する。青い領域は硬膜上に置いた綿花であり、この部分では綿花に遮られて脳表血流が計測できていない。)



(2) KCl塗布によるCSD誘発

マウスはC57BL/6J,雄,8週齢(日本クレアから入手)を使用した。セボフルラン吸入麻酔下に腹臥位とし、直腸温37度前後に保った。頭皮の正中切開を行った後、右前頭部にドリルで2mm程度の穿頭を行い、硬膜を露出させた。ここにKCl(1mol/l)を含ませた綿花をのせることでCSDを誘発した。CSDの発生は、LSFで脳表血流の変化を可視化することで検知した。

(3) HMGB1塗布によるCSD誘発

KClの代わりにHMGB1精製タンパク(10 $\mu$ g/ml)を含ませた綿花を用いることで、CSD誘発を試みた。

(4) マウス脳梗塞モデル(中大脳動脈閉塞モデル:MCAo)

マウスはC57BL/6J,雄,8週齢(日本クレアから入手)を使用した。セボフルラン吸入麻酔下に腹臥位とし、直腸温37度前後に保った。右側頭部頭皮を切開し、一部側頭筋を除去した後、Doppler血流計で側頭骨に接するように固定した。次に、体位を仰臥位にして頸部を正中切開した。顕微鏡下に総頸動脈、内頸動脈、外頸動脈を露出して、総頸動脈近位部を結紮した。その後、総頸動脈上壁を切開してシリコン糸を内頸動脈に向けて挿入し、中大脳動脈を閉塞させた。血管の閉塞はDopplerの血流が10~30%程度まで低下することで確定した。1時間後にシリコン糸は抜去し、再度腹臥位とし、LSFで脳表血流変化を観察し、CSDを検知した。

(5) 抗HMGB1抗体免疫染色法

脳梗塞モデルマウスは中大脳動脈閉塞後4時間後に4%PFAで灌流固定し脳を摘出し凍結切片を作成した。凍結切片に対してHMGB1はGoat anti rabbit IgGを用いて赤色に蛍光染色を行い、GFAPはDonkey anti mouse IgGを用いて緑色に蛍光染色を行った。細胞核はDAPIを用いて蛍光染色を行った。

(6) 抗HMGB1抗体投与

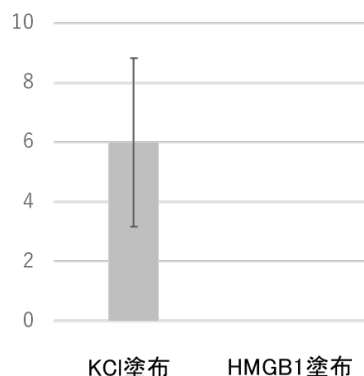
脳梗塞モデルに対し、抗HMGB1抗体(20 $\mu$ g/100ml, 0.1ml)を尾静脈から投与し、その後1時間LSFで観察した。

### 4. 研究成果

(1) 正常脳組織でのCSD誘発数

(個体数, 1時間あたりのCSD発生数:mean $\pm$ SD)

- KCl塗布群 (n=2, CSD=6.0 $\pm$ 2.8)
- HMGB1塗布群 (n=3, CSD=0.0 $\pm$ 0.0)

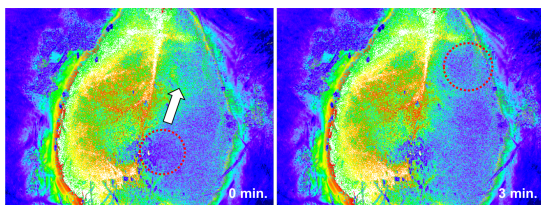


この結果から、HMGB1のみではCSDを誘発できないことが明らかになった。

(2) 脳梗塞周辺領域でのCSD自然発生

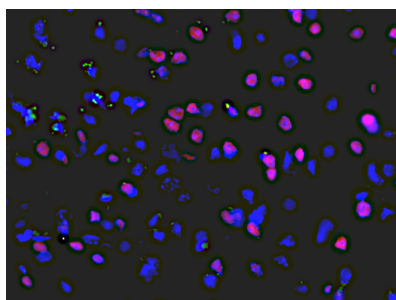
・脳梗塞群 (n=3, CSD=4.9±0.9)

脳梗塞周辺領域において、CSDが自然発生していることが確認できた。



(3) 脳梗塞周辺領域でのHMGB1核外放出の有無

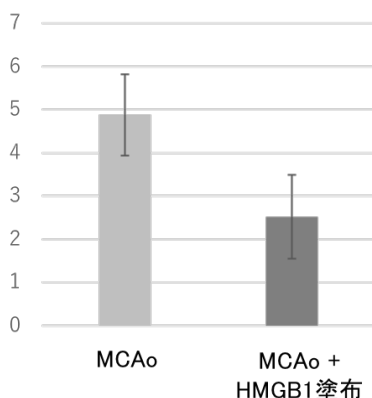
マウス脳梗塞モデルにおいて、虚血巣周辺領域にHMGB1核外放出が起こっていることが確認できた。



HMGB1(赤)は細胞核(青)から核外放出されている。

(4) 脳梗塞周辺領域へのHMGB1塗布

・HMGB1塗布群 (n=4, CSD=2.5±1.0)

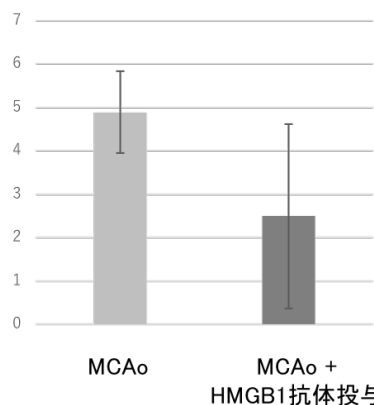


虚血巣周辺部(ペナンプラ)にHMGB1抗原を塗布したが、CSD発生数の増加は認め

られず、HMGB1抗原がCSD発生を増加させることはなかった。

(5) 脳梗塞モデルに対する抗HMGB1抗体投与によるCSD発生数の変化

・抗HMGB1抗体投与群 (n=2, CSD=2.5±2.1)



脳梗塞作成後、抗HMGB1抗体投与を尾静脈投与し、CSD発生数をカウントしたところ、CSD発生数に変化は認められなかった。

(6) 研究結果のまとめと総括

平成27年度は、マウスの脳表血流量をレーザースペックル血流計(以下LSF)で可視化する実験系を作製し、CSD伝播に伴い発生する一過性の脳血流変化を検知することで、CSD発生を観察することとした。

平成28年度は、正常脳組織および虚血巣辺縁領域(ペナンプラ)に種々の濃度のHMGB1抗原を塗布し、CSD発生数がどのように変化するか観察した。3時間の観察時間ではCSD発生数に変化を認めなかったため、観察時間を延長することとした。観察時間延長後もHMGB1抗原投与によるCSD発生数の増加は認められず、少なくともHMGB1抗原脳表塗布がCSDを発生させることはない結論付けた。

平成29年度は、抗HMGB1抗体を尾静脈投与し、虚血巣辺縁領域におけるCSDを観察したが、我々の仮説に反してCSDは減少しなかった。これらの結果から、少なくとも脳梗塞発症後超急性期(数時間以内)においては、核外放出されたHMGB1がCSD発生数を増加させ、梗塞巣を増悪させるというメカニズムは存在しない可能性が示唆された。

今後、脳梗塞亜急性期(発症後数日程度)にターゲットを絞り、HMGB1とCSDの関連を解明すべく新たな実験系を検討する予定である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 元 (NAKAMURA, Hajime)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80533794

(2) 研究分担者

貴島 晴彦 (KISHIMA, Haruhiko)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：10332743

尾崎 友彦 (OZAKI, Tomohiko)  
大阪大学・医学系研究科・招へい教員  
研究者番号：00723123

浅井 克則 (ASAI, Katsunori)  
大阪大学・医学系研究科・招へい教員  
研究者番号：20728977

村上 知義 (MURAKAMI, Tomoaki)  
大阪大学・医学系研究科・特任研究員  
研究者番号：70747427