

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08325

研究課題名(和文) 神経損傷後の軸索再生過程における核内蛋白HMGB1の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of HMGB1, a nuclear protein, in axonal regeneration after nerve injury

研究代表者

関口 富美子 (Sekiguchi, Fumiko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：90271410

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)：HMGB1はRAGEを介してマウス後根神経節(DRG)の神経突起伸長を促進すること、坐骨神経挫滅数日後のDRG神経の突起伸長増加には、マクロファージから遊離されるHMGB1が関与することが示唆された。また、血管内皮に発現するthrombomodulin(TM)の遺伝子組換え可溶性TM(TM)は、HMGB1吸着とthrombin(TB)によるHMGB1分解を促進することでHMGB1誘起神経突起伸長を抑制すること、この効果はTMとTBの結合を阻害するangiopoietin-1によって消失することが明らかとなった。これらは神経軸索再生の新たな治療方法の確立に役立つ知見となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外へ放出されたHMGB1はRAGEやTLR4を含む数種類の受容体を介して炎症および疼痛の発症に寄与するため、HMGB1の中和抗体や受容体阻害薬、HMGB1の吸着と分解を促進するTMなどが炎症や難治性疼痛の治療を目的とした新薬の候補物質として開発が進められている。しかし、HMGB1/RAGE経路が神経軸索再生において重要な役割を担っていることを示す本研究の結果を考慮すると、神経損傷を伴う炎症や疼痛の治療において、HMGB1そのものの減少は神経再生にマイナスになることが示唆される。本研究で得られた知見はHMGB1を標的とした治療戦略を立てる上で考慮すべき重要な内容である。

研究成果の概要(英文)：The data in the present study suggest that HMGB1 induces neurite outgrowth via activation of RAGE in mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons, and that macrophage-derived HMGB1 contributes to increase in neurite outgrowth observed in DRG neurons after crush of sciatic nerves. In addition, the data also show that thrombomodulin-alfa(TM), which is a recombinant soluble form of TM, a membrane protein expressed in the endothelial cells, suppresses the HMGB1-induced neurite outgrowth via adsorption of HMGB1 and also via facilitation of degradation of HMGB1 induced by thrombin (TB), the effects abolished by antiangiopoietin-1, known to inhibit the binding of TB to TM. The information may be useful for establishment of novel therapeutic strategies for axonal regeneration after nerve injury.

研究分野：薬理学

キーワード：HMGB1 神経突起伸長 thrombomodulin thrombin RAGE 神経損傷 angiopoietin-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核内蛋白 high mobility group box 1 (HMGB1) は、哺乳類のほとんどの細胞で恒常的に発現し、DNA の構造維持や修復などに関与している。一方、炎症などの病的条件下では、死細胞から受動的に、マクロファージを含む免疫系細胞などから能動的に細胞外へ分泌され、炎症や免疫反応、細胞遊走・浸潤、増殖、分化、組織再生など多種多様な反応に寄与する (図 1)。HMGB1 は N 末端から 23、45、106 番目に 3 つのシステイン残基 (C23、C45、C106) を持ち、細胞内ではこのシステイン残基すべてがチオール型の all-thiol-HMGB1 (at-HMGB1) として存在するが、細胞外へ放出された at-HMGB1 の一部は酸化により C23 と C45 がジスルフィド結合した disulfide-HMGB1 (ds-HMGB1) に変化する。HMGB1 の受容体としては RAGE、TLR4、TLR2、TLR5 などが知られている。at-HMGB1 は RAGE に作用するほか、CXCL12 に結合して CXCL12 による CXCR4 活性化を増強する。一方、ds-HMGB1 は TLR4 活性化を介した反応を誘起することが報告されている (図 1)。

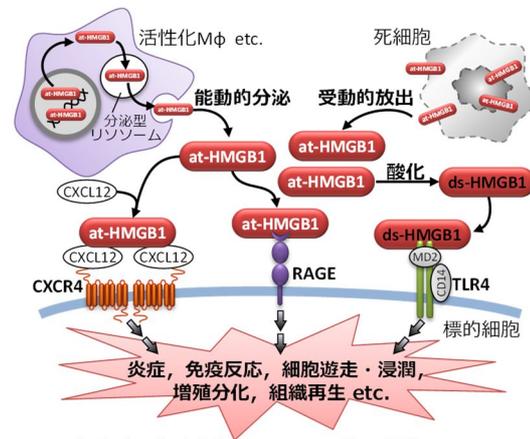


図1 細胞外へ放出されたHMGB1の作用機構。HMGB1, high mobility group box 1; at-HMGB1, all-thiol-HMGB1; ds-HMGB1, disulfide-HMGB1; CXCR4, CXC chemokine receptor 4; RAGE, receptor for advanced glycation end products; TLR4, Toll-like receptor 4; Mφ, マクロファージ。

我々の研究室では、抗 HMGB1 中和抗体 (HMGB1-Ab) あるいは HMGB1 を吸着・分解する遺伝子組換えヒト可溶性 thrombomodulin (TM- α , TM α) を用いた動物実験により、リポ多糖 (LPS) 誘起炎症性疼痛、抗癌剤である cyclophosphamide 誘起膀胱炎関連痛や、paclitaxel あるいは vincristine 誘起神経障害性疼痛の発症および維持に内因性 HMGB1 が大きく寄与することを報告している [1-3]。実際に、HMGB1 をラット後肢足底内に投与すると明らかな機械的痛覚過敏が誘起されること、また at-HMGB1 は RAGE を、ds-HMGB1 は TLR4 を介して痛覚過敏を発症していることを報告している [4]。さらに、ラット坐骨神経の免疫蛍光染色法により、HMGB1 はシュワン細胞および神経軸索において RAGE あるいは TLR4 共発現していること [1]、上記疼痛モデル動物の膀胱や坐骨神経に明らかなマクロファージ集積が認められることを確認している [5]。これらの結果を考え合わせると、内因性 HMGB1 は神経、マクロファージ、シュワン細胞、その他多くの細胞から遊離され、遊離された HMGB1 には数種類の細胞が反応していると考えられ、HMGB1 とその受容体を介した複雑な機構が疼痛の発症・維持に寄与することが示唆される。

2. 研究の目的

最近、坐骨神経挫滅処置ラットの後根神経節 (DRG) 神経において軸索末端の HMGB1 依存性に神経突起伸長が亢進することが報告された [6]。また我々は、神経前駆様 NG108-15 細胞の神経突起伸長が外来性あるいはマクロファージ由来細胞から分泌された HMGB1 により促進され、この反応は TLR4、RAGE、CXCR4 ではなく、NMDA 受容体 (NMDA-R) を介していることを示す予備的実験結果を得ていることから、神経損傷後に見られる神経障害性疼痛および神経軸索再生いずれにも内因性 HMGB1 が関与するが、軸索再生には疼痛発症とは異なった HMGB1 の遊離機構、遊離細胞、受容体、細胞内シグナルが関与する可能性が考えられる。そこで、本研究では、マウス DRG 神経の突起伸長を指標に、神経軸索再生機構における HMGB1 とその受容体、細胞内情報伝達系を明らかにし、神経損傷後の神経再生治療において新たな標的となりうる分子を検討した。さらに、坐骨神経を損傷したマウスの DRG 神経では神経突起伸長が増加することが示されていることから [6]、この反応における HMGB1 の関与とその由来についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス DRG 神経の神経突起伸長測定：成体、雄性 ddY マウスから DRG を摘出し、collagen 処置により単一細胞に分離させた細胞を播種して 2 時間後に at-HMGB1 や ds-HMGB1 で刺激した。阻害薬、HMGB1-Ab、TM α や angiopoietin-1 (Ang-1) は刺激の 30 分前に作用させた。刺激から 24 時間後に parahormaldehyde で細胞を固定した後、神経マーカーの β -tubulin-III に対する抗体で蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞の形態を観察した。神経の細胞体より長い突起を持つ細胞数と視野内の全細胞数を測定し、突起を持つ細胞の割合を算出した。

(2) Thrombin による HMGB1 分解産物の測定：at-HMGB1 200 nM に thrombin 0.1 U/mL、TM α 400 nM あるいは Ang-1 100 nM を様々な組み合わせで加え、37°C で 2 時間反応させた。この反応液に 5 倍濃縮 SDS-sampling buffer を 4 : 1 の割合で加えて、Western blot 用サンプルを調整した。抗 HMGB1 抗体陽性のバンドを Western blot 法で観察し、29 kDa に見られる通常の HMGB1 のバンドと低分子側に認められる HMGB1 の分解産物のバンドの濃さを測定した。

(3) マウスの坐骨神経挫滅処置：イソフルラン麻酔下、露出させたマウスの坐骨神経をピンセットで 15 秒間圧迫した (神経挫滅処置)。神経挫滅処置 6 日後に坐骨神経が入力する L4-L6 レベルの DRG を摘出し、上記と同じ方法で神経突起伸長を測定した。HMGB1-Ab、minocycline、ethyl pyruvate は神経挫滅処置の 1 時間前と処置後 1 から 5 日目に毎日 1 回 1 mg/kg を腹腔内 (i.p.) に投与した。

4. 研究成果

(1) マウス DRG 神経の外來性 HMGB1 による神経突起伸長促進反応と、thrombin、TM α 、Ang-1 による調節

マウス DRG 神経の初代培養細胞を at-HMGB1 で 24 時間刺激すると顕著な突起伸長促進効果がみられたが、ds-HMGB1 ではそのような効果は見られなかった (図 1A)。at-HMGB1 誘起神経突起伸長は、RAGE 阻害薬の FPS-ZM1 で阻害されたことから (図 1B)、他のグループから報告されていた HMGB1 による RAGE 活性化を介した神経突起伸長は at-HMGB1 によるものであることが確認できた。

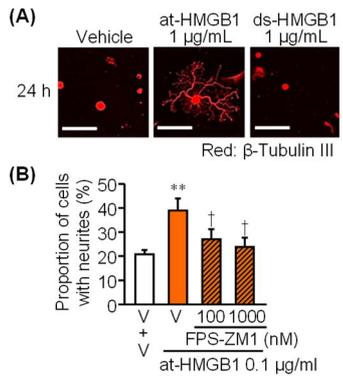


図2 マウスDRG神経におけるRAGEを介したat-HMGB1誘起神経突起伸長反応 (A) 刺激24時間後に神経マーカー β -tubulin-IIIで蛍光免疫染色を行ったDRG神経の代表的な形態写真。(B) RAGE阻害薬FPS-ZM1によるat-HMGB1誘起神経突起伸長の抑制。データは平均値±標準誤差で示している。n=15視野。*P<0.05, **P<0.01 vs. V + V, †P<0.05 vs. V + at-HMGB1.

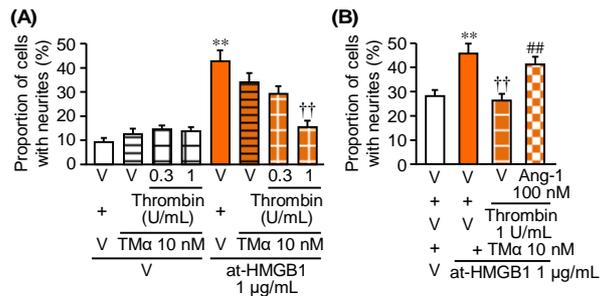


図3 マウスDRG神経のat-HMGB1誘起神経突起伸長反応におよぼすthrombinおよび遺伝子組換えヒト可溶性thrombomodulin (TM α)の相乗的抑制効果とその効果のangiotensin-1 (Ang-1)による消失 at-HMGB1刺激24時間後みられる神経突起伸長は、それぞれ単独では阻害効果を示さないthrombin 1 U/mLとTM α 10 ng/mLを作用させると有意に抑制された(A)。この抑制効果は、TM α とthrombinの結合を阻害するAng-1により消失した(B)。データは平均値±標準誤差で示している。n=10 (A), 25 (B)視野。**P<0.01 vs. V + V + V, ††P<0.01 vs. V + V + at-HMGB1, ###P<0.01 vs. V + thrombin + TM α + at-HMGB1.

TM α はその分子内のD1ドメインにHMGB1を吸着するとともに、D2ドメインにthrombinを結合させることで、thrombinによるHMGB1分解を促進することが知られている。そこで次に、at-HMGB1誘起神経突起伸長におよぼすTM α とthrombinの影響を観察した。TM α 1-100 nMの影響を検討したところ、100 nMではTM α 単独でat-HMGB1誘起神経突起伸長を抑制したが、1および10 nMは無効であった(データ未掲載)。一方、thrombinは検討した0.1-1 U/mLいずれの濃度においても単独ではat-HMGB1誘起神経突起伸長に影響しなかった。そこで、いずれも単独では効果を示さなかったTM α 10 nMとthrombin 1 U/mLを併用して作用させたところ、ほぼ完全にat-HMGB1誘起神経突起伸長を抑制したことから(図3A)、TM α とthrombinは相乗的に抑制効果を示すことが分かった。

脈管形成や血管新生を促進する糖タンパク質のangiotensin-1 (Ang-1)は血管内皮細胞に発現するAng受容体TIE2に作用し、血管のリモデリングや成熟に関与することが示されているが、最近、Ang-1が血管内皮細胞に発現するTMのthrombin結合部位にも作用してthrombinとTMの結合を阻害することが報告された[7]。そこで次に、at-HMGB1誘起神経突起伸長に対するTM α とthrombinの相乗的抑制効果におよぼすAng-1の影響を観察したところ、TM α とthrombinの抑制効果はAng-1により完全に消失した(図3B)。この結果から、TM α とthrombinの相乗的抑制効果には、この2つの分子の結合が必要であることが示唆された。

(2) Thrombinによるat-HMGB1分解におよぼすTM α およびAng-1の影響

高濃度のthrombinは単独でHMGB1をN末から10番目と11番目の間で切断するが、この効果はTM α 存在下で増強されることが知られている。そこで、先に示したTM α とthrombin併用によるat-HMGB1誘起神経突起伸長に対する相乗的抑制効果にHMGB1の分解が関与する可能性をWestern blot法で検討した。at-HMGB1 200 nMにTM α 400 nMあるいはthrombin 1 U/mLを単独で作用させ37°Cで2時間反応させたところ、検出されたat-HMGB1のバンドは、at-HMGB1単独の場合と同じであったが、TM α とthrombinを併用して作用させた場合は、明らかにもとサイズ(29 kDa)のat-HMGB1量が減少し、その下に分解産物と考えられるバンドが認められた(図4A)。また、TM α とthrombin併

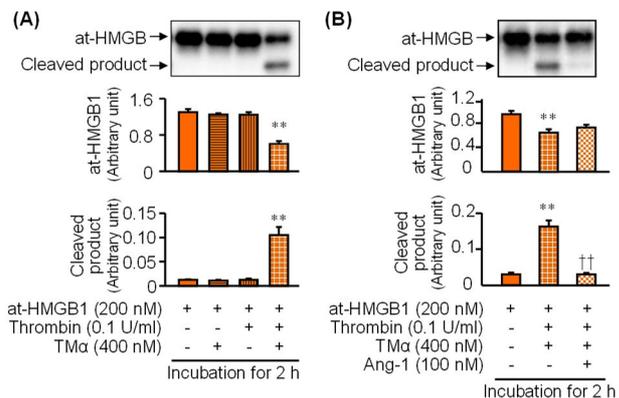


図4 at-HMGB1分解におよぼす遺伝子組換えヒト可溶性thrombomodulin (TM α)とthrombinの相乗的促進効果とその効果のangiotensin-1 (Ang-1)による消失 37°Cで2時間反応させた反応液中のHMGB1をWestern blot法により検出した。データは平均値±標準誤差で示している。n=4 (A), 5 (B)。**P<0.01 vs. at-HMGB1 only, ††P<0.01 vs. at-HMGB1 + thrombin + TM α .

用により増加した at-HMGB1 の分解産物を示すバンドは、Ang-1 100 nM をさらに追加することで消失した(図 4B)。これらの結果より、at-HMGB1 誘起神経突起伸長に対する thrombin と TM α の相乗的抑制効果には、TM α に結合した thrombin により、thrombin の結合部位とは異なった TM α の部位に結合した at-HMGB1 が効率よく分解されることが関与しており、Ang-1 は TM α と thrombin の結合を抑制してこの分解を減少させることが示唆された。

(3) 坐骨神経挫滅処置したマウスの DRG 神経突起伸長増加におよぼす内因性 HMGB1 の影響

坐骨神経挫滅処置 6 日後に摘出した DRG 神経の突起伸長反応は、Sham 処置マウスの DRG 神経に比べ有意に増加していた(図 5A)。この増加は、培養液中に HMGB1-Ab 10 ng/mL を添加しても抑制されることはなかったことから(図 5B)、DRG 神経自体から遊離される HMGB1 がこの神経突起伸長増加に関与しないことが示唆された。

次に、坐骨神経挫滅処置したマウスの生体内において内因性の HMGB1 が関与する可能性を検討するため、坐骨神経挫滅処置の 1 時間前と処置後 1 日から 5 日目に毎日 1 回 HMGB1-Ab を反復腹腔内投与したところ、神経損傷による神経突起伸長の増加は完全に消失した(図 6A)。同様の効果は、マクロファージ/ミクログリア阻害薬の minocyclin 30 mg/kg あるいはマクロファージからの HMGB1 遊離を阻害する ethyl pyruvate 80 mg/kg の反復腹腔内投与することでも認められた(図 6B, 6C)。この結果から、坐骨神経挫滅処置による DRG 神経の突起伸長増加には、損傷した神経周囲に集積したマクロファージから遊離される HMGB1 が関与することが示唆された。

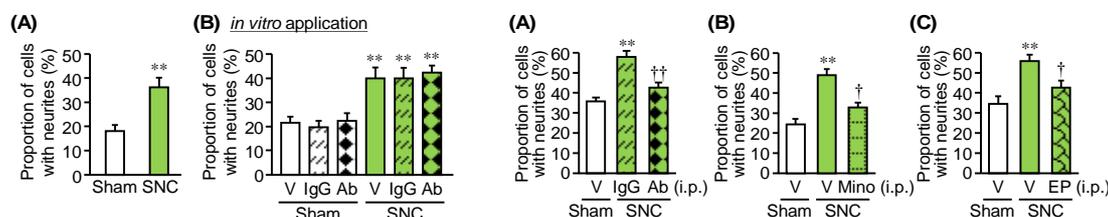


図5 坐骨神経挫滅処理 (sciatic nerve crush, SNC) したマウス DRG 神経における神経突起伸長の増加とその反応に対する抗-HMGB1 中和抗体 (Ab) の効果の欠如

(A) SNC 処置 6 日後に摘出した DRG 神経を 24 時間培養した時の神経突起伸長は偽手術 (Sham) 処置マウスの DRG 神経に比べ有意に増加していた。(B) DRG 神経の培養開始時に抗 HMGB1 中和抗体 (Ab) あるいはコントロール IgG (IgG) を 10 μ g/mL の濃度で作用させたが、いずれも SNC 処置による神経突起伸長の増加に影響しなかった。n=15 視野, **P<0.01 vs. Sham (A) or V in Sham (B)。

図6 坐骨神経挫滅処理 (sciatic nerve crush, SNC) マウス DRG 神経における神経突起伸長の増加におよぼす抗-HMGB1 中和抗体 (Ab)、マクロファージ (M ϕ) / ミクログリア阻害薬 minocycline (Mino) および M ϕ からの HMGB1 遊離を阻害する ethyl pyruvate (EP) の連日腹腔内投与の影響

Ab 1 mg/kg (A), Mino 30 mg/kg (B), EP 80 mg/kg (C) は、SNC 処置の 1 時間前と処置後 1-5 日目に毎日 1 回腹腔内投与した。SNC 処置 6 日後に DRG 神経を摘出し、24 時間培養後の神経突起伸長を測定した。n=25 視野, **P<0.01 vs. V in Sham, †P<0.05, ††P<0.01 vs. V in SNC..

(4) 以上の結果より、HMGB1 による神経突起伸長の促進には、還元型の at-HMGB1 による RAGE 活性化が関与すること、この効果は thrombin による at-HMGB1 分解により抑制され、この分解は TM α により促進的に Ang-1 により抑制的に調節されることが示唆されたことから、生体内において血管内皮に発現する TM と血液中に存在する thrombin や Ang-1 が、神経損傷などで増加した HMGB1 の分解とそれに続く神経軸索再生の調節に寄与している可能性が考えられる。さらに、損傷を受けた神経の軸索再生増加反応には、損傷した神経そのものではなく、損傷部位に集積したマクロファージから遊離される HMGB1 が関与する可能性が示唆され、神経軸索再生へのマクロファージの重要性が明らかとなった。

< 引用文献 >

- [1] Nishida T, Tsubota M, Kawaishi Y, Yamanishi H, Kamitani N, Sekiguchi F, Ishikura H, Liu K, Nishibori M, Kawabata A. Involvement of high mobility group box 1 in the development and maintenance of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in rats. *Toxicology* **365**: 48-58, 2016.
- [2] Tanaka J, Seki Y, Ishikura H, Tsubota M, Sekiguchi F, Yamaguchi K, Murai A, Umemura T, Kawabata A. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents peripheral HMGB1-dependent hyperalgesia in rats. *Br J Pharmacol* **170**: 1233-1241, 2013.
- [3] Tanaka J, Yamaguchi K, Ishikura H, Tsubota M, Sekiguchi F, Seki Y, Tsujiuchi T, Murai A, Umemura T, Kawabata A. Bladder pain relief by HMGB1 neutralization and soluble thrombomodulin in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuropharmacology* **79**: 112-118, 2014.
- [4] Yamasoba D, Tsubota M, Domoto R, Sekiguchi F, Nishikawa H, Liu K, Nishibori M, Ishikura H, Yamamoto T, Taga A, Kawabata A. Peripheral HMGB1-induced hyperalgesia in mice: Redox state-dependent distinct roles of RAGE and TLR4. *J Pharmacol Sci* **130**: 139-142, 2016.
- [5] Sekiguchi F, Domoto R, Nakashima K, Yamasoba D, Yamanishi H, Tsubota M, Wake H, Nishibori M, Kawabata A. Paclitaxel-induced HMGB1 release from macrophages and its implication for peripheral neuropathy in mice: Evidence for a neuroimmune crosstalk. *Neuropharmacology* **141**: 201-213, 2018.

- [6] Merianda TT, Coleman J, Kim HH, Kumar Sahoo P, Gomes C, Brito-Vargas P, Rauvala H, Blesch A, Yoo S, Twiss JL. Axonal amphoterin mRNA is regulated by translational control and enhances axon outgrowth. *J Neurosci* **35**: 5693-5706, 2015.
- [7] Daly C, Qian X, Castanaro C, Pasnikowski E, Jiang X, Thomson BR, Quaggin SE, Papadopoulos N, Wei Y, Rudge JS, Thurston G, Yancopoulos GD, Davis S. Angiopoietins bind thrombomodulin and inhibit its function as a thrombin cofactor. *Sci Rep* **8**: 505, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nakatake, Y., Sekiguchi, F., Tsubota, M., Tsujita, R., Honda, G., Kawabata, A.
2. 発表標題 Effect of extracellular HMGB1 on neuritogenesis in mouse dorsal root ganglion neurons and its inhibition by thrombomodulin alfa.
3. 学会等名 11th FENS Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中武ゆい、関口富美子、坪田真帆、辻田隆一、本田剛一、川畑篤史.
2. 発表標題 マウス脊髄後根神経節細胞におけるHMGB1誘起神経突起伸長とそれに対する遺伝子組み換えヒト可溶性thrombomodulinの効果
3. 学会等名 第131回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中武ゆい、関口富美子、坪田真帆、辻田隆一、本田剛一、川畑篤史
2. 発表標題 マウス後根神経節細胞においてthrombomodulin alfaは還元型HMGB1により誘起される神経突起伸長をトロンビン依存のおよび非依存的に抑制する
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakatake, Y., Sekiguchi, F., Tsubota, M., Tsujita, R., Honda, G., Kawabata, A.
2. 発表標題 HMGB1-induced neurite outgrowth in mouse dorsal root ganglion neurons and its inhibition by thrombomodulin.
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakatake, Y., Sekiguchi, F., Tsubota, M., Tsujita, R., Honda, G., Kawabata, A.
2. 発表標題 Effect of extracellular HMGB1 on neuritogenesis in mouse dorsal root ganglion neurons and its inhibition by thrombomodulin alfa.
3. 学会等名 11th FENS Forum of Neuroscience. 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学薬学部病態薬理学研究室 https://www.phar.kindai.ac.jp/byoutai/index.files/byoutai.htm
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	川畑 篤史 (Kawabata Atsufumi) (20177728)	近畿大学・薬学部・教授 (34419)	