

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592737

研究課題名(和文) SuperoxideとHMGB1を主眼とした頭部外傷の病態解明と治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Therapy for Traumatic Brain Injury Focused on Superoxide and HMGB1.

研究代表者

藤田 基 (FUJITA, Motoki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50380001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、頭部外傷後、脳挫傷周囲のニューロンおよび脳梁部のオリゴデンドロサイトにおいて、受傷早期に細胞質にHMGB1が発現され、脳脊髄液中にそのHMGB1を放出することが明らかになった。また、細胞質にHMGB1をもつニューロンおよびオリゴデンドロサイトは壊死性の変化をきたしており、細胞質へのHMGB1の発現は壊死(necrosis)の指標となりうることを示唆された。また、低体温療法やGL、rhTMを用いたHMGB1抑制療法により軸索損傷が抑制されたことから、HMGB1が頭部外傷の新たな治療ターゲットとなることを示唆され、今後の頭部外傷治療の発展に貢献する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, HMGB1 translocated from the nucleus to the cytoplasm in neurons and oligodendrocytes as early as 10 min post injury and such cytoplasmic HMGB1 was associated with necrosis in the early phases of lateral fluid percussion injury (LFPI). Therefore, cytoplasmic HMGB1 expression might be a potential marker of necrosis in the acute phases of traumatic brain injury (TBI). In addition, necrotic changes in oligodendrocytes were associated with the onset diffuse axonal injury-mediated Wallerian degeneration in the corpus callosum because these necrotic changes in oligodendrocytes accompanied local axonal damage. Further, hypothermia therapy which suppressed superoxide generation and HMGB1 suppression therapy with glycyrrhizin (GL) or recombinant human thrombomodulin (rhTM) revealed protective effects against axonal injury after LFPI. These findings indicated that HMGB1 might be one of the therapeutic target of TBI and that these therapies might be novel therapies of TBI.

研究分野：救急医学

キーワード：頭部外傷 HMGB1 ニューロン オリゴデンドロサイト 軸索損傷 壊死

### 1. 研究開始当初の背景

重症頭部外傷の病態においてスーパーオキシドアニオンラジカル(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)は酸化ストレスをきたし、組織傷害のイニシエーターとして重要である。また核内の転写調節因子であり、炎症のマーカーでもある high mobility group box1 (HMGB1)との関連が示唆されている。HMGB1 は damage associated molecular patterns (DAMPs)のひとつとして炎症と深くかかわっていることが知られているが、重症頭部外傷における HMGB1 の局在および動態は不明である。

### 2. 研究の目的

ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 の発現を解明し、HMGB1 の抑制を主眼とした治療法の確立を行う。

### 3. 研究の方法

(1)ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 の発現の解析

Sprague-Dawley (SD) ラット (BW: 300-400 g)を用いて、lateral fluid percussion injury (LFPI) モデルで頭部外傷 (TBI) を作成した。

ラットを麻酔下に気管挿管・人工呼吸管理とし、LFPI を作成した。

LFPI の強度は 2.0~2.4 atm とした。

LFPI 後、10 min, 2 h, 6 h, 24 h 後に血清、脳脊髄液(CSF)を採取後、脳組織を灌流固定した (sham, n=5; 10 min, n=8; 2 h, n=7; 6 h, n=7; 24 h, n=6)。

血清、CSF 中の HMGB1 濃度を HMGB1 ELISA kit で測定した。

脳組織は切片作成後、HMGB1、NeuN (ニューロンのマーカー)、CC-1 (オリゴデンドロサイトのマーカー)、 $\alpha$ -amyloid-precursor protein (APP、軸索損傷のマーカー)を用いて免疫染色を行い、ニューロン、オリゴデンドロサイトにおける HMGB1 の発現の経時的変化について解析した。

また、細胞質に HMGB1 を発現したニューロン、オリゴデンドロサイトの形態的变化を電子顕微鏡で解析した。

(2)ラット頭部外傷モデルにおけるスーパーオキシド抑制療法～低体温療法

ラット LFPI モデルを用いて、スーパーオキシド抑制作用を持つ低体温療法を行い、軸索損傷抑制効果を検討した。

ラットを麻酔下に気管挿管・人工呼吸管理とし、LFPI を作成した。

LFPI の強度は 2.0 atm とした。

LFPI 作成 40 分後に 33 °C の低体温療法を導入し、60 分間継続した。

60 分間の低体温後、90 分かけて復温した。

LFPI 作成 24 時間後に血清、CSF を採取後、脳組織を灌流固定した。

脳組織は切片作成後、APP の免疫染色を行い、軸索損傷の評価を行った。

血清、CSF 中の HMGB1 濃度を HMGB1 ELISA kit で測定した。

また、血清中の酸化ストレスマーカーであるマロン酸アルデヒド(MDA)、血管内皮傷害のマーカーである soluble intracellular adhesion molecule 1 (sIACM1)の測定も行った。

(3)ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 抑制療法～グリチルリチン(GL)

ラット LFPI モデルを用いて、HMGB1 抑制作用を持つグリチルリチン(GL) を投与し、HMGB1 抑制による軸索損傷抑制効果を検討した。

(2)と同様に LFPI を作成し、LFPI 作成 5 分後に GL 4 mg/kg を静脈内投与した。

LFPI 作成 24 時間後に血清、CSF を採取後、脳組織を灌流固定し、(2)と同様の評価を行った。

(4)ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 抑制療法～recombinant human thrombomodulin (rhTM)

ラット LFPI モデルを用いて、HMGB1 抑制作用を持つ rhTM を投与し、HMGB1 抑制による軸索損傷抑制効果を検討した。

(2)と同様に LFPI を作成し、LFPI 作成 30 分後に rhTM 3 mg/kg を静脈内投与した。

LFPI 作成 24 時間後に血清、CSF を採取後、脳組織を灌流固定し、(2)と同様の評価を行った。

### 4. 研究成果

(1)ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 の発現について

図 1 に LFPI ラットにおける CSF 中の HMGB1 濃度を示す。

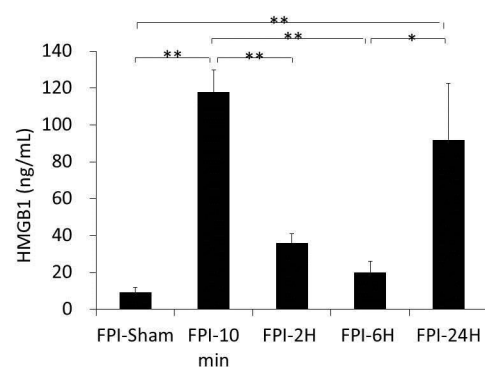


図 1: ラット LFPI モデルにおける脳脊髄液 HMGB1 濃度。  
\*P < 0.05, \*\*P < 0.01

LFPI ラットの髄液中の HMGB1 濃度は受傷 10 分後に高く、経過と共に減少したが、24 時間後に再度上昇を認めた。また、血清中の HMGB1 は経過中特に上昇を認めなかった。

Sham ラットのニューロンにおける HMGB1 の発現を図 2 に示す。正常ニューロンにおいて、HMGB1 は核内に発現を認めた。

これはオリゴデンドロサイトも同様であった。

脳挫傷中心部では、LFPI 作成 10 分後から多くのニューロンで核内、細胞質内ともに HMGB1 の発現を認めなかった。この傾向は 24 時間後まで続いた。

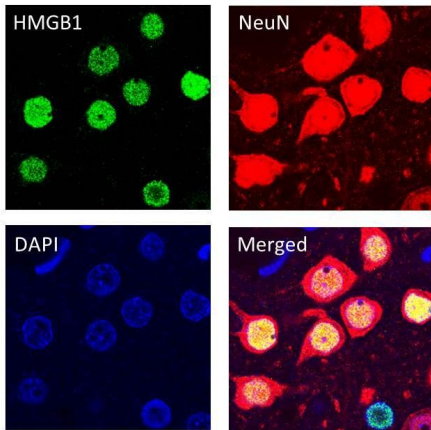


図2: ShamラットのニューロンにおけるHMGB1の発現

図3にLFPI作成10分後の脳挫傷周辺部のニューロンにおけるHMGB1の発現を示す。

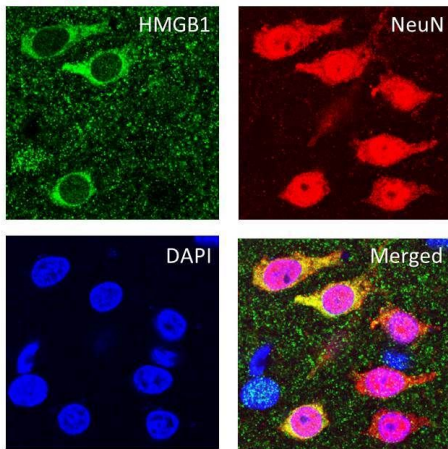


図3: LFPI作成10分後のニューロンにおけるHMGB1の発現

受傷 10 分後には、脳挫傷辺縁部のニューロンに cytoplasmic HMGB1 の発現を認めた。

図4に脳挫傷辺縁部の cytoplasmic HMGB1 を持つニューロンの数を示す。

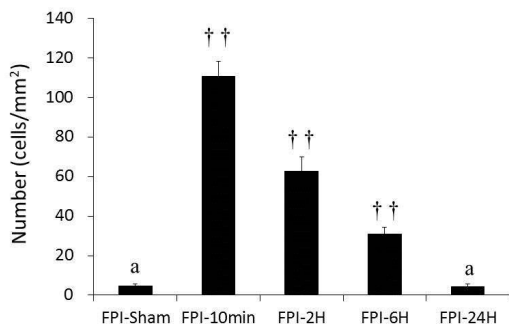


図4: 脳挫傷辺縁部のcytoplasmic HMGB1を持つニューロンの数. ††P < 0.01, compared with each group. a; P < 0.01, compared with FPI-10min, FPI-2H, or FPI-6H.

Cytoplasmic HMGB1 を持つニューロンの数は、受傷 10 分後に最も多く、時間の経過と共に減少を認めた。

図5にLFPI作成10分後の脳梁部のオリゴデンドロサイトにおけるHMGB1の発現を示す。

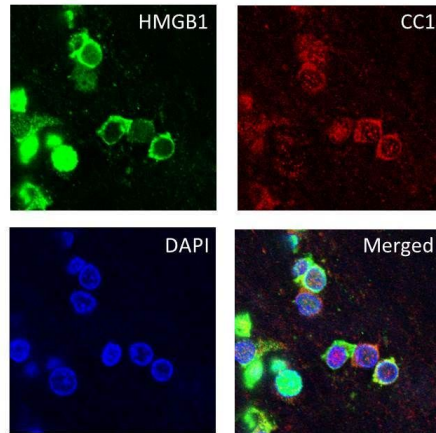


図5: LFPI作成10分後のオリゴデンドロサイトにおけるHMGB1の発現

受傷 10 分後には、脳梁部のオリゴデンドロサイトに cytoplasmic HMGB1 の発現を認めた。

図6に脳梁部の cytoplasmic HMGB1 を持つオリゴデンドロサイトの数を示す。

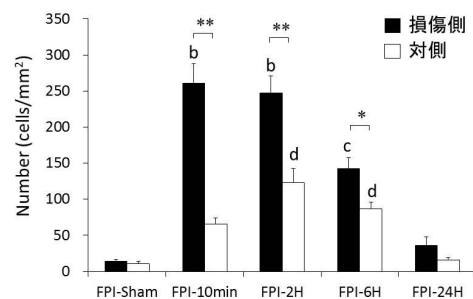


図6: 脳梁部におけるcytoplasmic HMGB1を持つオリゴデンドロサイトの数. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. b: P < 0.01 vs FPI-Sham, FPI-6H, and FPI-24H in the same side. c: P < 0.01 vs FPI-Sham, FPI-10 min, FPI-2H, and FPI-24H in the same side. d: P < 0.01 vs FPI-Sham and FPI-24H in the same side.

損傷側の脳梁内のオリゴデンドロサイトにおいて、受傷10分後、2時間後に cytoplasmic HMGB1 の発現を多く認め、経過と共に減少を認めた。対側では 2 時間後に cytoplasmic HMGB1 を持つオリゴデンドロサイトの数は最大となり、その後減少した。

図7に脳梁部におけるHMGB1とAPP(軸索損傷のマーカー)に共染色の結果を示す。APPスポットは脳梁部の cytoplasmic HMGB1 を持つ細胞の周囲に分布しており、cytoplasmic HMGB1 の発現したオリゴデンドロサイトは損傷した軸索周囲に分布していることがわかった。

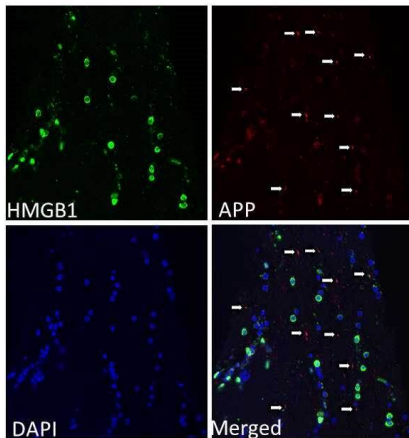


図7: 脳梁部のHMGB1とAPP染色 (LFPI作成2時間後). 矢印はAPPのスポットを示す。

図8、9に cytoplasmic HMGB1 の発現したニューロンとオリゴデンドロサイトの電子顕微鏡所見をそれぞれ示す。

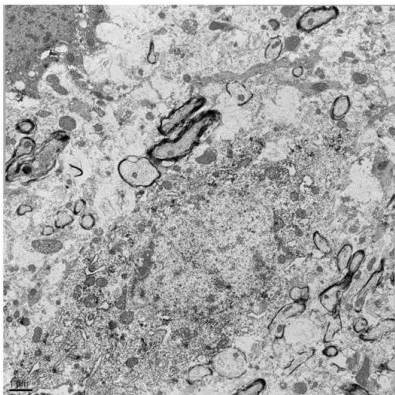


図8: Cytoplasmic HMGB1をもつニューロンの電子顕微鏡所見

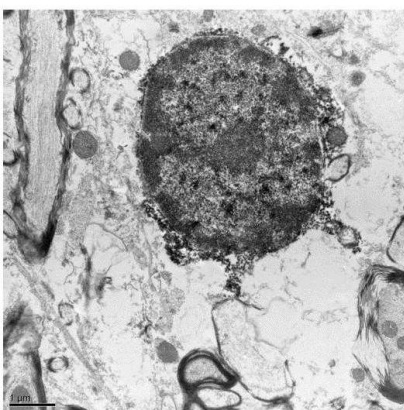


図9: Cytoplasmic HMGB1をもつオリゴデンドロサイトの電子顕微鏡所見

cytoplasmic HMGB1 の発現したニューロンとオリゴデンドロサイトはともに形態上壊死性の変化を認めた。

以上の結果より、頭部外傷においてニューロンおよびオリゴデンドロサイトは受傷早期に細胞質に HMGB1 を発現し、脳脊髄液中

にその HMGB1 を放出することが明らかになった。また、細胞質に HMGB1 をもつニューロンおよびオリゴデンドロサイトは壊死性の変化をきたしており、細胞質への HMGB1 の発現は壊死 (necrosis) の指標となりうることが示唆された。

## (2) ラット頭部外傷モデルにおけるスーパーオキシド抑制療法～低体温療法

図10にコントロール群の脳梁におけるAPP染色の結果を示す。コントロール群では、LFPI 受傷 24 時間後に脳梁に多くの APP スポットを認め、軸索損傷が生じていることが分かった。



図10: コントロール群の脳梁におけるAPP染色. 矢印はAPPスポットを示し、軸索損傷を表す。

図11に低体温群の脳梁におけるAPP染色の結果を示す。低体温群ではコントロール群に比べ、LFPI24時間後の脳梁におけるAPP発現が軽度抑制されており、低体温療法により軸索損傷が抑制されることが示唆された。



図11: 低体温群の脳梁におけるAPP染色. 矢印はAPPスポットを示し、軸索損傷を表す。

LFPI24時間後の脳脊髄液中の HMGB1 濃度はコントロール群  $37.1 \pm 22.9$  (ng/mL)、低体温群  $29.5 \pm 23.8$  (ng/mL) と低体温群で低い傾向にあった。

LFPI24時間後の脳脊髄液中の sICAM1 濃度はコントロール群  $2.4 \pm 3.1$  (ng/mL)、低体温群  $6.1 \pm 6.4$  (ng/mL) と低体温群で高い傾向

にあった。

LFPI24 時間後の血清 HMGB1 濃度はコントロール群  $4.6 \pm 5.1$  (ng/mL)、低体温群  $2.3 \pm 1.1$  (ng/mL)と低体温群で低い傾向にあった。

LFPI24 時間後の血清 sICAM1 濃度はコントロール群  $16.9 \pm 3.7$  (ng/mL)、低体温群  $16.9 \pm 2.1$  (ng/mL)と両群間で明らかな差は認めなかった。

LFPI24 時間後の血清 MDA 濃度はコントロール群  $1.8 \pm 0.3$  (ng/mL)、低体温群  $1.6 \pm 0.2$  (ng/mL)と低体温群で低い傾向にあり、酸化ストレスが抑制されることが示唆された。

以上より、低体温療法により酸化ストレスが抑制され、軸索損傷が軽減されることが示唆された。

### (3) ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 抑制療法 ~ グリチルリチン (GL)

図 12 に GL 投与群の脳梁における APP 染色の結果を示す。GL 投与群では、コントロール群に比べ LFPI24 時間後の脳梁における APP 発現が抑制されており、GL により軸索損傷が抑制されることが示唆された。



図12: GL投与群の脳梁におけるAPP染色. 矢印はAPPスポットを示し、軸索損傷を表す。

LFPI24 時間後の脳脊髄液中の HMGB1 濃度はコントロール群  $37.1 \pm 22.9$  (ng/mL)、GL 群  $79.3 \pm 93.3$  (ng/mL)と GL 群で高い傾向にあった。

LFPI24 時間後の脳脊髄液中の sICAM1 濃度はコントロール群  $2.4 \pm 3.1$  (ng/mL)、GL 群  $1.9 \pm 2.4$  (ng/mL)と GL 群で低い傾向にあった。

LFPI24 時間後の血清 HMGB1 濃度はコントロール群  $4.6 \pm 5.1$  (ng/mL)、GL 群  $3.1 \pm 2.7$  (ng/mL)と GL 群で低い傾向にあった。

LFPI24 時間後の血清 sICAM1 濃度はコントロール群  $16.9 \pm 3.7$  (ng/mL)、GL 群  $17.7 \pm 2.3$  (ng/mL)と両群間で明らかな差は認めなかった。

LFPI24 時間後の血清 MDA 濃度はコントロール群  $1.8 \pm 0.3$  (ng/mL)、GL 群  $2.0 \pm 0.3$  (ng/mL)と GL 群で高い傾向にあった。

以上の結果より、GL は放出された HMGB1 の活性を抑えることにより軸索損傷を抑制し、GL が頭部外傷治療薬となりうることを示唆された。

### (4) ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 抑制療法 ~ recombinant human thrombomodulin (rhTM)

図 13 に rhTM 投与群の脳梁における APP 染色の結果を示す。rhTM 投与群では、コントロール群に比べ LFPI24 時間後の脳梁における APP 発現が抑制されており、rhTM により軸索損傷が抑制されることが示唆された。

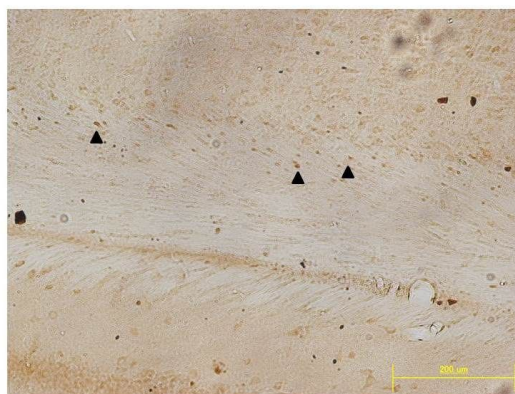


図13: rhTM投与群の脳梁におけるAPP染色. 矢印はAPPスポットを示し、軸索損傷を表す。

LFPI24 時間後の脳脊髄液中の HMGB1 濃度はコントロール群  $37.1 \pm 22.9$  (ng/mL)、rhTM 群  $69.6 \pm 60.8$  (ng/mL)と rhTM 群で高い傾向にあった。

LFPI24 時間後の脳脊髄液中の sICAM1 濃度はコントロール群  $2.4 \pm 3.1$  (ng/mL)、rhTM 群  $6.2 \pm 7.7$  (ng/mL)と rhTM 群で低い傾向にあった。

LFPI24 時間後の血清 HMGB1 濃度はコントロール群  $4.6 \pm 5.1$  (ng/mL)、rhTM 群  $1.7 \pm 2.2$  (ng/mL)と rhTM 群で低い傾向にあった。

LFPI24 時間後の血清 sICAM1 濃度はコントロール群  $16.9 \pm 3.7$  (ng/mL)、rhTM 群  $16.8 \pm 2.7$  (ng/mL)と両群間で明らかな差は認めなかった。

LFPI24 時間後の血清 MDA 濃度はコントロール群  $1.8 \pm 0.3$  (ng/mL)、rhTM 群  $1.8 \pm 0.3$  (ng/mL)と両群間で明らかな差は認めなかった。

以上の結果より、rhTM は放出された HMGB1 の活性を抑えることにより軸索損傷を抑制し、rhTM が頭部外傷治療薬となりうることを示唆された。

本研究の結果、ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 の局在が明らかになった。また、受傷後早期の HMGB1 の細胞質への発現が壊死の指標となることが明らかとなった。ま

た、低体温療法や GL、rhTM を用いた HMGB1 抑制療法により軸索損傷が抑制されたことから、HMGB1 が頭部外傷の新たな治療ターゲットとなることが示唆され、今後の頭部外傷治療の発展に貢献する可能性が示された。

#### 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

Fujita M, Oda Y, Tsuruta R, High Mobility Group Box-1 (HMGB1) Expression in Oligodendrocytes of Rats Subjected to Lateral Fluid Percussion Injury (LFPI), The 32nd Annual National Neurotrauma Symposium, 2014 年 6 月 29 日, San Francisco (USA).

藤田基、ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 の発現～受傷早期の cytoplasmic HMGB1 の局在とその意義について、第 1 回山口県神経損傷クリティカルケア研究会、2014 年 1 月 9 日、ANA クラウンプラザ宇部 (山口県宇部市)。

藤田基、小田泰崇、鶴田良介、ラット頭部外傷モデルにおける受傷早期の HMGB1 の局在とその意義について、第 41 回日本救急医学会総会・学術集会、2013 年 10 月 21 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)。

藤田基、ラット頭部外傷モデルにおける HMGB1 の発現～受傷早期の cytoplasmic HMGB1 の局在とその意義について、第 5 回 Young Investigators Supporting Critical Care Conference、2013 年 6 月 29 日、オリエンタルホテル東京ベイ(千葉県浦安市)。

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

藤田 基 (FUJITA, Motoki)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50380001

##### (2)研究分担者

鶴田 良介 (TSURUTA, Ryosuke)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：30263768

小田 泰崇 (ODA, Yasutaka)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：40397998

##### (3)連携研究者 なし