

生体肝移植における high mobility group box-1 の動態解析

貞森 裕¹⁾ 佐藤 康晴²⁾ 西堀 正洋³⁾ 佐藤 太祐¹⁾
 信岡 大輔¹⁾ 杉原 正大¹⁾ 八木 孝仁¹⁾ 藤原 俊義¹⁾

¹⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科消化器外科

²⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病理学

³⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学

キーワード: high mobility group box-1

はじめに

High mobility group box-1 (以下, HMGB1 と略記) は, 細胞核内に局在するクロマチン結合性の非ヒストン蛋白として同定され, クロマチン機能の維持や転写活性調節に重要な働きをするとともに, メディエーターとして炎症性疾患の病態に関与している. 臓器移植においては, 阻血再灌流障害の増悪因子¹⁾であるとともに, 同種移植片に対する急性拒絶反応への関与が動物実験モデルにおいて報告されている²⁾が, ヒト肝移植における拒絶反応での HMGB1 の動態は解明されていない. 本研究においては, 生体肝移植後に急性拒絶反応あるいは C 型肝炎再発と組織診断された肝生検検体を用いて, 肝細胞における HMGB1 の動態を検討した.

方 法

2004 年 1 月から 2010 年 12 月の期間に当科にて生体肝移植を施行した 88 症例から採取した移植肝生検 104 検体を対象とし, 抗 HMGB1 モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色検査を行った. 肝細胞における HMGB1 の核内発現は horseradish peroxidase 標識抗体を用いて評価し, grade 分類としては, 0, <10% cells positive; 1+, 11-30% cells positive; 2+, 31-70% cells positive; and 3+, >71% cells positive とした. 肝細胞における HMGB1 の細胞質への translocation は alkaline phosphatase 標識抗体を用いて評価し, grade 分類としては, 0, <10% cells positive; 1+, 11-50% cells positive; and 2+, >51% cells positive cells とした. Hematoxylin-eosin 染色による組織診断の内訳は, moderate-to-severe acute cellular rejection (以下, ACR と略記) 24 検体, mild ACR 27 検体, C 型肝炎再発 34 検体, その他合併症 19 検体であり, 肝細胞における HMGB1 の核内発現と細胞質への translocation をそれら 4 群で検討した. また, ACR と診断された肝生検 51 検体において, HMGB1 免疫染色検査の grade と rejection activity index (以下, RAI と略記) との相関関係を検討した.

結 果

Moderate-to-severe ACR における HMGB1 の肝細胞核内発現の陽性率は, mild ACR, C 型肝炎再発および

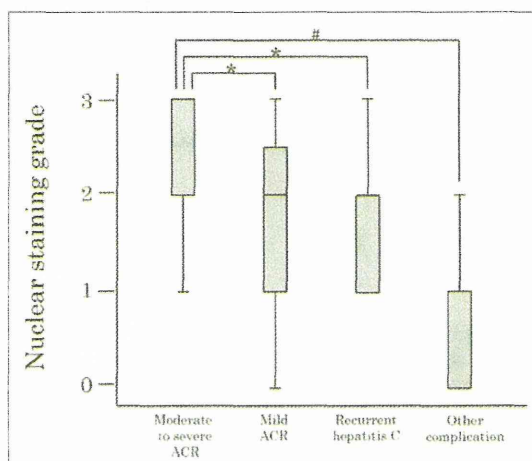


Fig. 1 Immunohistochemical grading of intra-nuclear HMGB1 in four different post-transplant conditions. #: $P < 0.001$, *: $P < 0.01$, ACR, acute cellular rejection.

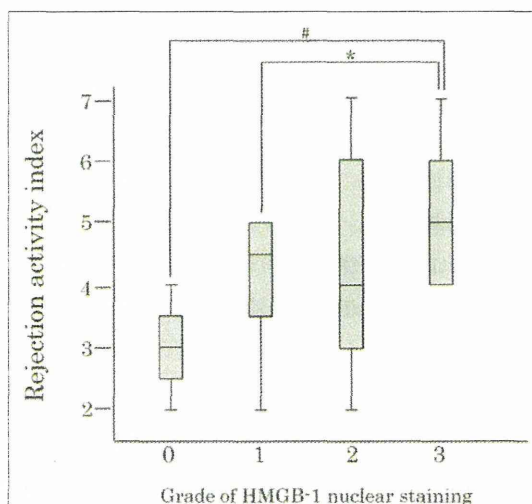


Fig. 2 The grades of intra-nuclear HMGB1 expression and rejection activity index. #: $P < 0.001$, *: $P < 0.01$

その他合併症に比べ有意に高い傾向を認めた (Fig. 1). さらに、肝細胞における HMGB1 の細胞質への translocation も moderate-to-severe ACR において有意に強かった。また、ACR と診断された肝生検 51 検体での検討では、HMGB1 核内発現 grade 3 の RAI は 5.1 ± 1.1 であり、grade 0 (3.0 ± 0.8) および grade 1 (4.1 ± 1.1) に比べ有意に高く、RAI と HMGB1 の核内発現 grade との間に有意な相関関係を認めた ($P < 0.01$; $n = 0.41$) (Fig. 2).

考 察

本研究では、肝移植後の mild ACR および C 型肝炎再発に比べ moderate-to-severe ACR において HMGB1 の肝細胞核内発現と細胞質への translocation が有意に強い傾向を認めた。阻血再灌流障害や急性炎症などによって肝細胞が酸化的ストレスを受けた場合には、HMGB1 の核内から細胞質への translocation が起こると報告されている^{1)~3)}。肝移植後の C 型肝炎再発では小葉内の肝細胞が標的となるが、ACR では門脈域と

中心静脈に炎症細胞の浸潤を認め、肝細胞が直接的な標的となることは少ない⁴⁾。そのため C 型肝炎再発において HMGB1 の強い動態変化を予想したが、本研究での肝細胞における HMGB1 の動態解析結果からは、moderate-to-severe ACR において移植肝の肝細胞が広範かつ高度な酸化的ストレスを受けていると推察された。また、近年 Tang ら⁵⁾は、細胞質に translocation した HMGB1 が autophagy を介して cell survival と apoptosis の両面に関与していることを報告しており、本研究における HMGB1 の細胞内動態が moderate-to-severe ACR における肝細胞の survival に寄与している可能性も考えられる。HMGB1 の動態解析によって、肝移植後の各種病態における肝細胞への酸化的ストレスを評価しえるとともに、今後は細胞質内 HMGB1 の機能解析が重要と考えている。

文献

- 1) Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med*. 2005;201(7):1135-43.
- 2) Huang Y, Yin H, Han J, Huang B, Xu J, Zheng F, et al. Extracellular hmgb1 functions as an innate immune-mediator implicated in murine cardiac allograft acute rejection. *Am J Transplant*. 2007;7(4):799-808.
- 3) Liu A, Dirsch O, Fang H, Dong W, Jin H, Huang H, et al. HMGB1 translocation and expression is caused by warm ischemia reperfusion injury, but not by partial hepatectomy in rats. *Exp Mol Pathol*. 2011;91(2):502-8.
- 4) Banff Working Group; Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Charlotte F, Czaja A, et al. Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology*. 2006;44(2):489-501.
- 5) Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB 1 regulates autophagy. *J Cell Biol*. 2010;190(5):881-92.

PRELIMINARY REPORTS

Kinetics of High-Mobility Group Box 1 after Living Donor Liver Transplantation

Hiroshi Sadamori¹⁾, Yasuharu Sato²⁾, Masahiro Nishibori³⁾, Daisuke Sato¹⁾,
Daisuke Nobuoka¹⁾, Masahiro Sugihara¹⁾, Takahito Yagi¹⁾ and Toshiyoshi Fujiwara¹⁾

¹⁾Departments of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences

²⁾Departments of Pathology, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences

³⁾Departments of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Key Words: high mobility group box-1

[Jpn J Gastroenterol Surg. 2013;46(3):232-235]

Reprint requests: Hiroshi Sadamori Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences
2-5-1 Shikata, Okayama, 700-8558 JAPAN

Accepted: January 16, 2013

VIII 治療戦略を目指した研究

基礎研究

HMGB1 を標的とした治療

The therapy for stroke targeting HMGB1

西 堀 正 洋

Key words : HMGB1, 脳梗塞, 単クローン抗体, 血液脳関門, 脳内炎症

はじめに

炎症反応は、生体に種々の侵襲が加わり障害性となったときに生じる生体反応であり、本来的には損傷を受けた組織の修復・再生を誘導するための初期応答である。侵襲が病原性微生物による場合には、その構成成分の検出により自然炎症がスタートする。病原体侵入の検出は、病原性微生物由来分子のパターン認識によっており、検出受容体としてToll-like receptors (TLRs)が重要な役割を果たす。また、炎症惹起作用を有する分子群を pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) と呼ぶ。一方、生体組織・細胞由来の種々の分子も生体警告信号として機能することが明らかになってきた。これらは、damage-associated molecular patterns (DAMPs) と総称される。DAMPs の代表的な分子を表 1 に示す。

1999 年米国の Tracey らの研究グループ¹⁾は、high mobility group box-1 (HMGB1) がマウス敗血症時にマクロファージから放出される致死性メディエータであると報告した。HMGB1 は核内に局在するクロマチン DNA 結合タンパク質であり、転写制御や DNA の構造維持などの核内機能がそれまで知られていた。その後の研究で、HMGB1 はマクロファージのみならず種

表 1 DAMP 候補分子

HMGB1
histone
heat shock proteins
ATP
ミトコンドリア DNA
尿酸
peroxyredoxins
cold stress-inducible
RNA binding protein
S100 タンパクファミリー
βアミロイドペプチド

々の細胞から放出され、TLR-4/2 や RAGE など複数の受容体刺激を介し炎症惹起作用を発揮することが示された。また細胞外に放出された HMGB1 は多くの疾患病態に関与することが示唆されるようになった。現在では、HMGB1 は DAMPs の代表であると認識されている²⁾。中枢神経系と HMGB1 の関係は、ラット初代神経培養系を用いた新生ラット脳の神経突起伸展因子同定の研究から開始された³⁾。同定された因子は正負の荷電性の強い性質から当初 amphotericin と呼ばれたが、HMGB1 と同一のタンパクであることがわかった。

VIII

治療戦略を目指した研究

Masahiro Nishibori: Department of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体制御科学専攻生体薬物制御学講座 薬理学分野

1 脳虚血とHMGB1

脳の虚血障害とHMGB1の関連性は、ペナンプラ領域において発現上昇する遺伝子の一つとしてHMGB1が同定されたことからスタートした⁴⁾。Kimら⁵⁾は、HMGB1のRNAiを設計し、これをラット虚血脳部位に局所注入した。その結果、ペナンプラ領域のHMGB1タンパク発現誘導抑制と局所ミクログリアの活性化抑制ならびにTNF- α 遺伝子発現の抑制が極めて相関することを明らかにした。彼らは、ミクログリアの活性化の抑制によって神経細胞死の抑制がもたらされると考えた。

Liuら⁶⁾は、脳虚血あるいは虚血-再灌流急性期に種々のDAMPsが障害脳組織から放出され、脳内炎症を惹起すると考えた。HMGB1を含む複数のDAMPsに対するラット単クローン抗体が作製された。3種類の抗HMGB1抗体が得られたが、HMGB1に特異的(HMGB1のC末端配列認識)で最も親和性の高い単クローン抗体が治療抗体として選択された。ラット中大脳動脈閉塞(MCAO)2時間-再灌流による脳梗塞モデルで、選ばれた治療抗体の尾静脈投与は、虚血後の投与でも強力な脳梗塞サイズの縮小効果を示した(図1)。つまり、再灌流24および48時間後のtriphenyltetrazolium chloride(TTC)を用いた染色で、対照動物では虚血側半球のかなりの範囲に広がる梗塞巣が形成されるのに対し、抗HMGB1抗体投与群ではそれぞれ90%および75%抑制された。このとき同時に著明な運動麻痺の抑制効果が観察された。再灌流後24時間まで測定したRota-rod上での歩行時間を指標にした運動麻痺機能の評価で、著明な運動機能改善効果が証明されたのである。以上の結果から、治療用に選択された抗HMGB1単クローン抗体は、卒中発作後の投与によっても脳梗塞サイズの縮小と運動麻痺症状の軽減化を図れる治療法であることが示唆された。

2 脳虚血時のHMGB1動態と抗HMGB1抗体の効果

虚血脳におけるHMGB1の局在が検討された結果、虚血コア領域ではほとんどの細胞核がHMGB1陰性に変化していることがわかった⁷⁾。この知見は、HMGB1が虚血部位細胞の核内から細胞外へ放出されることを想像させる。また、抗HMGB1抗体の投与が形態的に観察されたHMGB1の消失現象を抑制したことは、細胞外に放出されたHMGB1による細胞内HMGB1放出促進(ポジティブフィードバック)の機構が存在することを強く示唆している。その結果、抗HMGB1抗体投与は、ウェスタンブロットで定量された虚血局所におけるHMGB1レベルの低下を抑制した。

Liuら⁸⁾の観察ではMCAO2時間-再灌流モデルで、エバンスブルーを用いた脳血管の透過性の測定において再灌流3時間の時点で明らかな透過性の亢進が認められた。またZhangら⁹⁾は、同時点で脳を固定し脳血管を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、エバンスブルー(アルブミン)の漏出をきたした脳部位では、血液脳関門(BBB)を構成するアストログリア細胞のエンドフィートの腫脹が著明であり、またエンドフィートの細胞形質膜が内皮細胞基底膜から遊離した像がしばしば観察された。このように、脳虚血後の脳血管特にBBBを構成する血管内皮細胞レベルでの著明な変化は、再灌流モデルでは再灌流3時間以内で既に発生していると推測された。ラットモデルにおいて、BBBの構造的ならびに機能的破綻が再灌流3時間後に顕著に認められることは、臨床におけるt-PAの有効治療時間帯が卒中発作後3時間であることとも一致する。この時間帯を越えるとt-PAの脳内移行が増加し、有害作用につながることが十分予想される。抗HMGB1抗体による治療では、この最初期応答としての脳血管透過性亢進を抑制することができるかもしれない。同様に、抗体投与は虚血領域のミクログリアの活性化、MMP-9タンパク発現、TNF- α およびiNOS発現など脳内炎症の進行を促す種々の要因を抑制

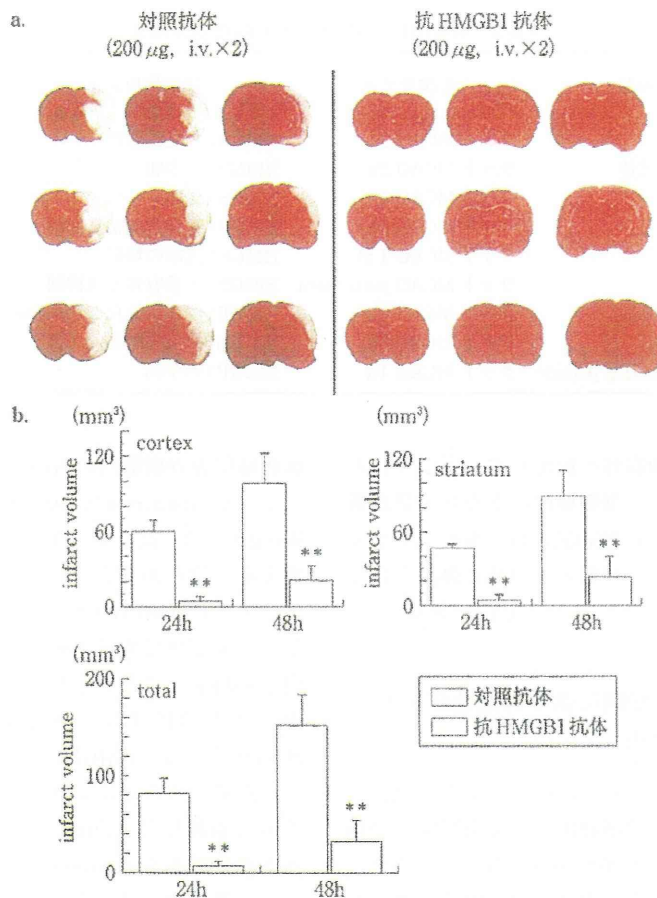


図1 抗HMGB1抗体のラットMCAO脳梗塞に対する効果 (文献⁹⁾より改変)

a. ハロタン麻酔下に、シリコンコーティングを施したナイロン縫合糸を塞栓子として、中大脳動脈(MCA)起始部を2時間閉塞し、その後再灌流した。抗体は再灌流直後とその6時間後の2回、尾静脈より各200 μ gを投与した。再灌流24時間後、前頭断面の2mm厚脳スライスにtriphenyltetrazolium chlorideによる染色を施し、脳梗塞部位を白色領域として同定した。各群、3個体のデータを示す。

b. 再灌流24および48時間後の脳梗塞領域の体積を、大脳皮質と線条体部位について定量化した。** $p < 0.01$ 。

した⁹⁾が、これらの観察は、再灌流後6-12時間後の時点で行われている。再灌流後3時間以内に発生するBBBの破綻現象は、文献的報告を含めて最初期応答の一つととらえることができる。Zhangら⁹⁾は更に*in vitro* BBB再構成系を用いて、組換え体HMGB1が、血管内皮細胞と周皮細胞に直接作用し収縮性変化を起こしたと報

告した。つまり、神経細胞核から細胞質を經由して細胞外へ放出されたHMGB1は、BBB構成細胞成分のうち血管内皮細胞と血管周皮細胞に働き、機能的ならびに構造的にBBBを破綻させることが示唆された。Zhangらの観察⁹⁾によると、HMGB1の細胞内トランスロケーションは中大脳動脈閉塞2時間で既にスタートしてお

表2 HMGB1を標的とする脳梗塞治療法

治療薬	実験モデル	推定作用機序	文献
RNAi	ラット MCAO 1h	HMGB1の発現抑制	4, 10
抗HMGB1抗体	ラット MCAO 2h	HMGB1の中和	5, 6
minocycline	マウス MCAO 4h	HMGB1発現ミクログリア抑制	8
cannabidiol	マウス MCAO 4h	HMGB1発現食細胞抑制	7
edaravone	ラット MCAO 1.5h	HMGB1遊離の抑制	9
atorvastatin	ラット MCAO permanent	HMGB1と受容体発現抑制	11
glycyrrhizic acid	ラット MCAO 1h	HMGB1のリン酸化と分泌抑制	12
cynandione A	ラット MCAO 2h	HMGB1の上昇抑制	13
HMGB1-binding peptide	ラット MCAO 1h	HMGB1の中和	14

り、その一部は細胞外へ放出しているようにみえる。このように、細胞核内にかなりの量が構成的に発現しているHMGB1は、虚血シグナルのセンシングによって極めて早期に動員されるready madeメディエータの可能性もある。

3 HMGB1の抑制に働く可能性のある低分子化合物

RNAiや特異抗体を用いた研究から、脳虚血性障害や脳梗塞の治療標的としてHMGB1が極めて優れていることがわかってきた。つまり、HMGB1を標的とする虚血脳障害治療のターゲットバリデーションがこれらの研究を通じてなされたと考えられることができる。更に多くの低分子治療薬の作用解析の研究から、それらの作用薬の中にはHMGB1の抑制を介して作用している可能性をもつものが報告されてきた。表2にそれらについてまとめた。

Hayakawaら⁷⁾は、マリワナ成分であるcannabidiolがマウスの脳梗塞モデルで用量依存的な抑制効果を発揮することを示し、cannabidiolがMPO活性陽性でHMGB1を高発現する食細胞を抑制することを作用機序として示唆した。また別の研究でHayakawaら⁸⁾は、同じマウスモデルで抗生物質のminocyclineがHMGB1を高発現するIba1陽性ミクログリアを抑制することを見いだした。Kikuchiら⁹⁾は、我が国でラジカルスカベンジャーとして用いられているedaravoneのラット脳梗塞に対する効果を検討し、

虚血部位神経細胞内のHMGB1トランスロケーションがedaravoneで抑制されることを示した。Wangら¹⁰⁾は、高コレステロール血症治療薬で、抗炎症作用があるといわれているatorvastatinが、ラットのMCAO永久閉塞モデルでHMGB1とその受容体であるRAGEならびにTLR-4発現を抑制することを示した。Kimら¹¹⁾は、甘草中の主要活性成分である抗アレルギー薬のglycyrrhizinが、HMGB1のリン酸化と細胞外分泌を抑制することによりラットの脳梗塞を縮小すると報告した。Yueら¹²⁾は、同じく生薬中の活性成分であるcynandione Aが*in vitro*でグルタミン酸毒性を軽減すること、更に*in vivo*で虚血脳部位のHMGB1の上昇抑制と梗塞サイズの縮小効果をもたらすことを示した。Kimら¹³⁾は、HMGB1結合活性を有する7アミノ酸残基長の人工ペプチドをスクリーニング合成し、その*in vivo*での効果を脳虚血ラットへの経鼻投与で評価した。その結果、虚血前1時間前投与で、脳梗塞の抑制効果があることを観察した。以上の報告から、脳内炎症や脳の虚血性障害の抑制に働く薬物は、HMGB1の発現、トランスロケーションならびにHMGB1受容体の発現に対し抑制的に作用することが強く示唆される。このことから、虚血脳障害におけるHMGB1の重要性をうかがい知ることができる。

おわりに

図2に、脳虚血時にみられる神経細胞内のHMGB1トランスロケーションを概念的に示し

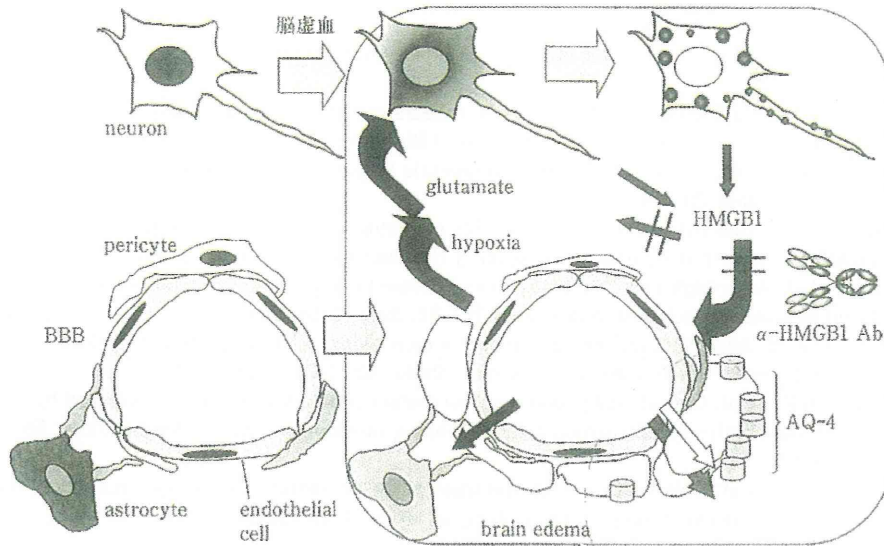


図2 神経細胞からのHMGB1遊離と血液脳関門の破綻

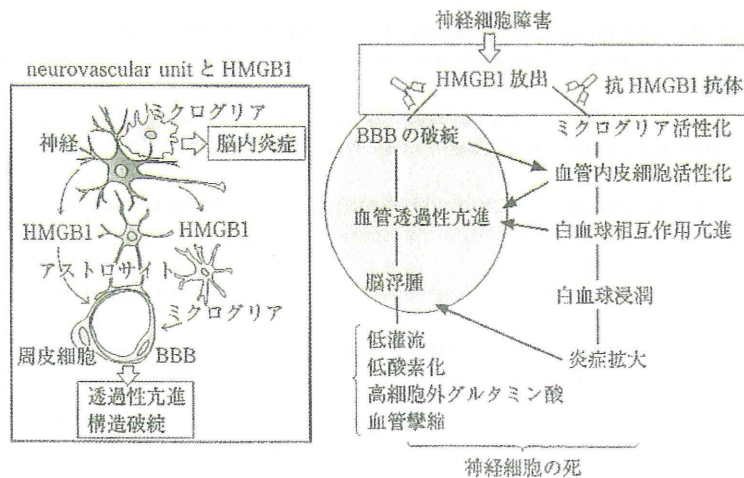


図3 脳虚血時の神経障害カスケードとHMGB1

た。図3には、脳神経障害カスケードにおける初期応答としてのHMGB1放出の意義を、neurovascular unitの概念と対応させて描いた。

BBBの破綻と脳内炎症の理解にHMGB1は不可欠の因子であり、今後の創薬において更に注目されるであろう。

文 献

- 1) Wang H, et al: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**: 248-251, 1999.
- 2) Rauvala H, Pihlaskari R: Isolation and some characteristics of an adhesive factor of brain that enhances neurite outgrowth in central neurons. *J Biol Chem* **262**: 16625-16635, 1987.
- 3) Andersson U, Tracey KJ: HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* **29**: 139-162, 2011.
- 4) Kim JB, et al: HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J Neurosci* **26**: 6413-6421, 2006.
- 5) Liu K, et al: Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* **21**: 3904-3916, 2007.
- 6) Zhang J, et al: Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke* **42**: 1420-1428, 2011.
- 7) Hayakawa K, et al: Cannabidiol prevents a post-ischemic injury progressively induced by cerebral ischemia via a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Neuropharmacology* **55**: 1280-1286, 2008.
- 8) Hayakawa K, et al: Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Stroke* **39**: 951-958, 2008.
- 9) Kikuchi K, et al: The free radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells. *J Pharmacol Exp Ther* **329**: 865-874, 2009.
- 10) Kim ID, et al: Neuroprotection by biodegradable PAMAM ester(*e*-PAM-R)-mediated HMGB1 siRNA delivery in primary cortical cultures and in the postischemic brain. *J Control Release* **142**: 422-430, 2010.
- 11) Wang L, et al: Atrovastatin protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates HMGB1, HMGB1 receptors(RAGE and TLR4), NK-kB expression. *Neurosci Lett* **471**: 152-156, 2010.
- 12) Kim SW, et al: Glycyrrhizic acid affords robust neuroprotection in the postischemic brain via anti-inflammatory effect by inhibiting HMGB1 phosphorylation and secretion. *Neurobiol Dis* **46**: 147-156, 2012.
- 13) Yue, et al: Cynandione A mitigates ischemic injuries in rats with cerebral ischemia. *J Neurochem* **121**: 451-464, 2012.
- 14) Kim ID, et al: Intranasal delivery of HMGB1-binding heptamer peptide confers a robust neuroprotection in the postischemic brain. *Neurosci Lett* **525**: 179-183, 2012.

Copyright © 2014, Elsevier B.V. All rights reserved.