

## 主 論 文

Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody attenuates delayed cerebral vasospasm and brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats

(ラットくも膜下出血後脳血管攣縮と脳障害に対して抗 HMGB-1 抗体は有効である)

### 【緒言】

くも膜下出血(SAH)は病変部位の再出血予防を行っても、出血による脳損傷と脳血管攣縮による脳循環動態の悪化をきたし、重篤な合併症をきたす疾患である。脳血管攣縮の病態は脳血管平滑筋の収縮であり、神経炎症の関与も、基礎研究および臨床研究においてよく知られている。脳血管攣縮治療として、Rhoキナーゼ阻害剤である塩酸ファスジルやトロンボキササン合成酵素阻害剤であるオザグレルナトリウムが標準治療となっている。しかしながら、病態の劇的な改善には至っておらず、さらなる治療薬の開発が期待されている。

High mobility group box 1 (HMGB1) はクロマチン DNA を支えるタンパク質であり、damage-associated-molecular-pattern (DAMP) family に属している。HMGB1 は障害を受けた細胞から受動的に放出され、receptor for advanced glycation end products (RAGE) や toll-like receptors (TLR2, 4) などの受容体を介して、炎症を惹起する。敗血症や急性膵炎などの様々な疾患で HMGB1 の放出が報告されている。中枢神経系疾患である虚血性脳卒中、頭部外傷や脊髄損傷において、HMGB1 は同様に神経炎症の一因子として作用する。抗 HMGB1 抗体は頭部外傷や虚血性脳卒中モデルラットにおいて、放出された HMGB1 を中和し、炎症のカスケードを防止することにより、治療効果を示すと考えられている。今回、我々は

SAH モデルラットに対する抗 HMGB1 抗体の血管攣縮抑制効果について形態学的・行動学的・免疫組織学的に評価し、そのメカニズムについても検討した。

## 【材料と方法】

### 使用動物

300-350g の雌性 Wister ラット 120 匹を実験に用いた。

### SAH モデルラット作製

ペントバルビタール (35mg/kg) の腹腔内注射を行い、尾動脈から 0.3ml の動脈血を採取。腹臥位で頭部固定した後、後頭部の正中を皮膚切開し、大後頭孔を露出。27G 針で髄液を 0.3ml 排出した後に、自己血を 3 分間かけてゆっくりと注入した (single injection)。ゆっくりと針を抜去し、針穴は bone wax で閉鎖し皮膚を縫合し手技を終了とした。

### 抗 HMGB1 抗体の静脈内投与

治療群には抗 HMGB1 抗体 (免疫グロブリン, [IgG] 2a subclass, 1mg/kg, 溶媒: PBS) を、対照群には class matched control 抗体 (Keyhole Limpet hemocyanin に対する抗体) を SAH モデル作製直後、24 時間後にそれぞれ、尾静脈から静脈内投与した。

### Computed Tomographic Angiography (CTA)による血管攣縮の評価

SAH モデル作成 2 日前とモデル作成 2 日後に動物用 CT 装置で撮影を行った。ペントバルビタール (35mg/kg) の腹腔内注射を行った後に、尾静脈に 24G 留置針を留置し、非イオン性造影剤を持続静注し撮影を行った。SAH 前後の脳底動脈の血管径をそれぞれの同一個体で計測した。血管径の計測は両側椎骨動脈合

流部から中枢側へ3mmの血管を均等に計5点計測しその平均値を計測し評価した。

#### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

屠殺直前の心臓から採血を行い、遠心後、血漿を抽出した。プロテアーゼインヒビターと混合させ、HMGB1の測定はHMGB1 ELISA kitを用い、プロトコールに則り測定した。

#### 免疫組織学的検査

HMGB1染色：HMGB1の局在を調べるために、脳底動脈のHMGB1と平滑筋層の重染色と脳実質内のミクログリアの染色をそれぞれ行った。一次抗体としてHMGB1はmouse anti-human HMGB1/HMG-1 antibody、平滑筋は $\alpha$ -smooth muscle actin、ミクログリアはrabbit anti-Iba1 antibodyをそれぞれ使用した。二次抗体としてAlexa fluor 555 F(ab') fragment of goat anti-mouse IgG (H+L)とFITC-conjugated affinity-purified donkey anti-rabbit IgG (H+L)を用いた。SAH作製2日後の脳底動脈平滑筋層におけるHMGB1の核外へ移動した細胞数を計測し、また、脳実質内の活性型ミクログリア細胞数を記録した。

#### Real time polymerase chain reaction (PCR)

SAH後2日後のモデルから脳底動脈を取り出し、RNAの抽出はBio-Robot EZ1を用い、プロトコールに従った。逆転写後、相補的DNAを作成し、SYBR Premix EX Taqを用いてreal-time PCRを行った。TLR4、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS、eNOS、PAR1、TXA2 receptor、AT1 receptor、ETA receptor、 $\alpha$ 1A-ARの発現量を測定した。GAPDHによる補正を行い、評価した。

#### 血管収縮性の評価

SAH後2日後のモデルから脳底動脈を取り出し、両端を緩まないように把持した状態で人工髄液内(アートルセブ)に漬け、トロンビンを少量ずつ投与した。血管収縮反応が生じたトロンビン濃度を測定し、血管収縮反応はforce transducer装置で計測した。

#### 行動学的評価と体重測定

SAH モデル作成後 2 日にオープンフィールドテストを応用して、120cm 四方の亚克力ボックス内にラットを入れ、5 分間の走行距離を CCD カメラで測定し、その距離と平均走行速度を Ethovision XT を用いて解析を行った。

SAH モデル作成後の体重計測を SAH 後 7 日間測定した。

#### ウエスタンブロッティング

摘出脳から脳底動脈を摘出しホモジナイズした。遠心後に得られた上清液を sample buffer に混合させ、20 $\mu$ l を SDS-PAGE に泳動を行った。Membrane への転写とブロッキングを行った後、抗体を反応させた。抗体はペルオキシダーゼ標識した anti-HMGB1 mAb と mouse anti- $\beta$ -actin mAb を使用し、ImageQuant LAS 4000 mini によりシグナルを検出した。

## 統計学的解析

2 群間での比較は Student's t-test を用い、経時的な変化には one-way ANOVA または two-way ANOVA を用いて検討した。統計学的有意差は  $p < 0.05$  とした。平均値は、平均±標準誤差で示した。

## 【結果】

### 抗 HMGB1 抗体の静脈内投与は血管攣縮を抑制し、神経保護効果を示す

抗 HMGB1 抗体の投与により、SAH モデル作製 2 日後の脳底動脈の血管攣縮は、対照群に比べ、有意に抑制されていた。運動症状もその結果に対応して、SAH2 日後のオープンフィールドテストでは、平均運動距離及び平均移動速度も治療群で有意な改善を認めた。また、体重変化も治療群で有意に改善していた。

### 抗 HMGB1 抗体は SAH 後脳血管攣縮を抑制する。

CTA の結果から治療群では対照群と比較して、有意に血管攣縮が抑制されていた。また、対照群において血管平滑筋細胞層で、HMGB1 が核内から細胞質に移動しており、細胞外へ放出が示唆されたが、治療群において、この現象は観察されなかった。

血管収縮反応性の評価において、治療群では低濃度トロンビンに対して血管収縮反応を呈したが、治療群では認められなかった。

### 抗 HMGB1 抗体は血管収縮因子及び炎症性サイトカインの発現を抑制する。

脳底動脈において PAR1 受容体や TXA2 受容体といった血管収縮関連因子が治療群では有意に発現が抑制されていた。また、IL-6、TNF- $\alpha$ 、TLR-4 といった炎症性サイトカインも治療群では上昇が有意に抑制されていた。

### 抗 HMGB1 抗体は脳実質におけるミクログリアの増殖を抑制する

対照群において、SAH モデル作製 2 日後からミクログリア・アストロサイトの数が増加していた。治療群ではミクログリア数の上昇が有意に抑制されていた。形状についても、対照群ではアメーバ状の活性型ミクログリアが認められたが、治療群では樹枝状の非活性型ミクログリアの形態にとどまるものがほとんどであった。

### 抗 HMGB1 抗体投与は SAH 後 3 時間でも血管攣縮を抑制する。

SAH のモデル作製 3 時間後に抗 HMGB1 抗体を投与した場合でも、治療群では対照群と比較して脳血管攣縮が有意に抑制されていた。抗 HMGB1 抗体は SAH 発症後数時間経過した場合でも効果が得られることが示唆された。

### **【考察】**

我々は、抗 HMGB1 抗体の静脈内投与が、SAH モデルラットにおいて、脳血管攣縮効果をもつことを世界で初めて示した。脳血管攣縮の病態には、様々な血管収縮関連因子や炎症性サイトカインの発現が関与すると報告されている。HMGB1 と SAH の病態に関する研究は少ないが、基礎や臨床研究で HMGB1 が炎症性サイトカインを誘導し、脳血管攣縮を誘発することが報告されている。今回の我々の研究でも対照群では SAH 後に血漿中 HMGB1 濃度が上昇しており、また脳血管において血管収縮関連因子や炎症性サイトカインが多く発現していた。一方、治療群においてはこれらの発現が有意に抑制されていた。抗 HMGB1 抗体自体にはこれら血管収縮因子を直接抑制するとの報告はこれまでない。従

って、抗体投与により各炎症性サイトカインが抑制されることで、血管関連収縮因子の発現が抑制されたと思われる。脳底動脈の RT-PCR の結果から抗炎症効果の機序として、抗 HMGB1 抗体の直接的な薬理作用である HMGB1 そのものの中和だけでなく、TLR4 や IL-6 などの炎症性カスケードの抑制も示唆された。様々な疾患においても HMGB1 は様々な炎症性サイトカイン、特に TNF- $\alpha$ 、IL-6 などを活性化するという報告が多く、今回の研究と矛盾しなかった。また、脳実質内においてもミクログリアの集簇・増殖抑制が示された。神経炎症におけるミクログリアの働きはまだ十分に解明されていないが、SAH 後脳実質損傷の病態に関与している可能性は高い。今回の研究では、治療群において SAH 後の神経症状も良好であった。この要因として、抗体投与が SAH 後の血管攣縮を抑制することで良好な脳循環維持に作用し、さらに脳実質内ミクログリアの増殖が抑制する事で神経保護作用にも寄与した可能性が示唆された。

### **【結論】**

SAH モデルラットにおいて、HMGB1 は SAH 後脳血管攣縮に関与しており、抗 HMGB1 抗体の静脈内投与は抗炎症効果に加えて抗血管攣縮・神経保護効果を示した。