69　炎症性疾患・神経発生におけるHMGB1の役割の解明	柳井　秀元

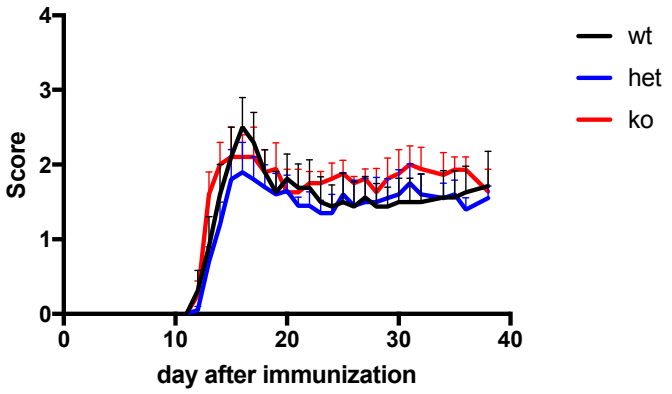
【目的】High-mobility group box 1（HMGB1）は主に有核細胞の核内に発現しているタンパクであるが、炎症性刺激時、または細胞死に際して核内から細胞外に放出され、それが炎症応答を誘導し、敗血症や免疫疾患等の病態を増悪することが知られている。このように細胞外に放出された HMGB1 の機能について関心が持たれているが、細胞内の HMGB1 の機能については未だ不明な点が多い。HMGB1 遺伝子欠損マウス上記に加え、我々は最近、HMGB1 が神経発生に重要であるという知見を得た。HMGB1 の炎症・神経疾患との役割について HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスを用いて解明する。

【方法】これまでの報告から、High-mobility group box 1（HMGB1）を全身性に欠損させたコンベンショナルノックアウトマウスは生後すぐに、低血糖の症状を呈して致死となることが知られている。そこで我々は炎症性疾患・神経発生における HMGB1 の役割について解析すべく、HMGB1 のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、種々の臓器・細胞で HMGB1 を欠損したマウスを作製した。作製したマウスにおいて、炎症性疾患のマウスモデルを適用し、HMGB1 の役割について解析を行った。

【結果】これまで作製した HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスについて、肝臓、膵臓、ミエロイド系細胞やリンパ球系細胞などで HMGB1 を欠損させても、致死となるようなマウスはおらず、正常に発育することが分かった。また、タモキシフェンの投与依存的に全身性に HMGB1 を欠損させたマウスを作製し、半年の経過後に観察を行っても、特段の異常は見られなかった。一方で、*Hmgb1* flox マウスを *Nestin1-Cre* マウスと交配させたところ、得られる産仔に顕著な減弱が見られた。HMGB1 は神経系細胞など、Nestin1 を発現する細胞集団において、マウス発生初期に大事な役割を果たしている可能性があることが判明した。

少ないながらも得られた、*Hmgb1*$^{flox/fxol}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$マウスについて、血糖値などを測定したが、特段の異常は見られなかった。しかしながら、これらのマウス個体は発育の遅滞と体重の減少が見られた。またこのように得られたマウスを用いて、ヒトの多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental autoimmune encephalomyelitis：EAE）を誘導し検討を行ったところ、興味深いことに、野生型マウスと比較し、HMGB1 欠損マウスにおいて病態スコアに差異を認めなかった（図）。したがって、Nestin 陽性細胞において発現している HMGB1 は、炎症性疾患の一つと考えられる EAE の病態には大きく関与せず、マウスの発達や成熟に重要であることが明らかとなった。

神経系細胞（Nestin1 陽性）において HMGB1 を欠損させたマウスにおける EAE の病態スコア



69. 炎症性疾患・神経発生における HMGB1 の役割の解明

柳井　秀元

*東京大学 生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門

Key words：HMGB1，DAMP，炎症性疾患，Nestin1，EAE

緒　言

免疫系は病原体などの外来からの異物の侵入や組織及び臓器の損傷に際し、生体の恒常性を維持する機能を担っている。免疫系は自然免疫系と適応免疫系の 2 つに大別され、自然免疫系は Toll 様受容体（Toll-like Receptors、TLR）を始めとしたパターン認識受容体（Pattern recognition receptors：PRRs）によって病原微生物が有する特定の分子パターン（Pathogen-associated molecular patterns、PAMPs）を認識し、外来病原体を排除すべく免疫応答を活性化する。一方で、最近の研究から、PRRs はこのような外来微生物に由来する分子のみならず、自己細胞から放出される細胞障害関連分子（Damage-associated molecular patterns：DAMPs）と呼ばれる自己由来分子の認識にも関与し、免疫応答を活性化することが明らかとなってきた［1］。

HMGB1（High-mobility group box 1）は主に核内に存在する非ヒストン性クロマチン結合タンパクとして知られているが、炎症や細胞死に伴って核内から細胞外にまで放出され、TLR2 や TLR4、RAGE（Receptor for advanced glycosylation end products）といった PRRs によって認識される DAMPs の代表例として知られている［2］。最近の報告から、細胞外に放出された HMGB1 は自然免疫応答を介して炎症を促進し、敗血症や自己免疫疾患、神経疾患など種々の炎症性疾患の病態を増悪させると考えられており、抗 HMGB1 中和抗体の投与など、HMGB1 の機能を阻害することによりこれらの病態が軽減されることも報告されている［2］。したがって、HMGB1 の炎症促進メカニズムを解明することは重要であると考えられる。しかしながら、組換え HMGB1 タンパクに精製時のエンドトキシンの混入の可能性なども指摘されており［3］、HMGB1 による炎症性サイトカインの誘導機構については再度の検証が必要であるとも考えられている。一方、DAMPs としての HMGB1 の機能が注目されているが、細胞内 HMGB1 の役割については、ゲノムの安定性への寄与、オートファジーへの関与などが報告されているが、それ以外についてはあまり解析が進んでいない。

HMGB1 の機能について検討するために、*Hmgb1* 遺伝子欠損マウスを利用することは重要なツールであると思われるが、これまでの報告から全身性に *Hmgb1* を欠損させたコンベンショナル *Hmgb1* 遺伝子欠損マウスは生後すぐに低血糖の症状を呈して死亡することが報告されている［4］。我々は最近、*Hmgb1* コンディショナル欠損マウス（*Hmgb1* cKO）マウスを作製した［5］。本マウスを用いたこれまでの解析から、肝臓や膵臓、大腸、免疫担当細胞において HMGB1 を欠損してもマウスは正常に発生することが確認された。従って、代謝系における HMGB1 の機能喪失が致死の原因ではないと考えられた。そこで我々は、Nestin1 プロモーター下流において Cre リコンビナーゼを発現する系を用いて *Hmgb1* 遺伝子を欠失させたマウスを作製したところ、本マウスは致死性を示すことが判明した。胎児期における神経系の発生において、細胞内の HMGB1 は何らかの機能を発揮している可能性が考えられた。一方で、HMGB1 は脊髄小脳失調症、アルツハイマー病、神経障害性疼痛、脳梗塞など、神経関連疾患・病態において重要な役割を果たしていることが報告されている［6，7］。ここには細胞外に放出された HMGB1 が DAMPs として炎症を促進し、病態を悪化させる作用を持っていると考えらえる。そこで本研究では、炎症性疾患・神経発生における HMGB1 の役割について、*Hmgb1* cKO マウスを用いて解明することを目指した。

*現在の所属：東京大学　先端科学技術研究センター 炎症疾患制御分野 社会連携研究部門

方法および結果

1. *Nestin1-Cre* 発現マウスとの交配による *Hmgb1* cKO マウスの作製

炎症性の神経疾患における HMGB1 の役割について検討するため、*Hmgb1-flox* マウスと *Nestin1-Cre* マウスとの交配を行なった。*Nestin1-Cre* マウスは The Jackson Laboratory より購入した。Nestin1 はⅣ型中間径フィラメントの一つであり、胚発生過程において中枢神経系（Central nervous system：CNS）の幹細胞や筋細胞で発現することからこれらの細胞中で HMGB1 を欠失させることができる。*Albumin-Cre*（肝臓）や *Insulin-Cre*（膵臓）などと *Hmgb1-flox* マウスとの交配では、マウスは正常に発育し、特段の異常は認めなかった。一方で、*Nestin1-Cre* マウスとの交配では、産仔の数に減弱が見られることがわかった。遺伝子型を詳細に解析したところ、*Hmgb1*$^{flox/flox}$-*Nestin1-Cre*$^{+}$マウスがほとんど得られていないことが判明した（図 1）。

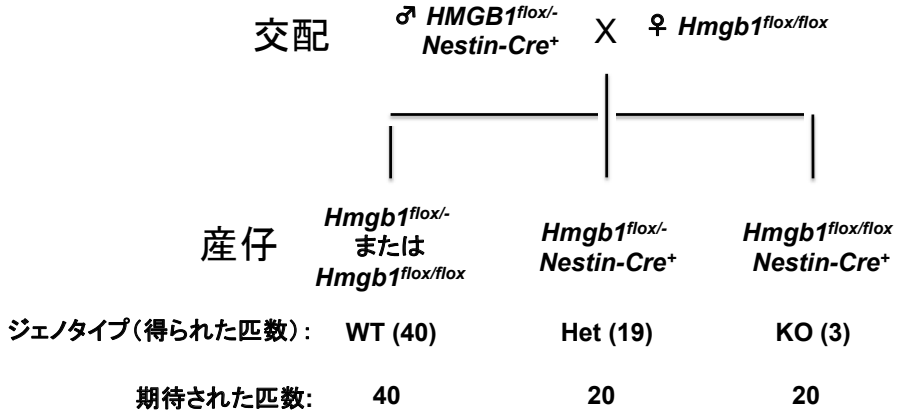


図 1. *Hmgb1*^{flox}マウスと *Nestin1-Cre* マウスとの交配

Hmgb1^{flox}マウス（♀*Hmgb1*$^{flox/flox}$）と Nestin1-Cre マウス（♂*Hmgb1*$^{flox/-}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$）との交配を行なった。得られた産仔について、ジェノタイプと匹数を検討したところ、*Hmgb1* 欠損マウス（*Hmgb1*$^{flox/flox}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$）の数について、得られた匹数と期待された匹数とに大きな乖離が見られた。

E15、E18、P0 においては *Hmgb1*$^{flox/flox}$-*Nestin1-Cre*$^{+}$マウスの数は期待値通りであったことから、*Hmgb1*$^{flox/flox}$-*Nestin1-Cre*$^{+}$マウスは生後すぐに死亡すると考えられる。このことは、コンベンショナル *Hmgb1* 欠損マウスが生後すぐに致死となるというこれまでの報告と一致していた。一方で、少ないながらも得られた *Hmgb1*$^{flox/flox}$-*Nestin1-Cre*$^{+}$マウスの血糖値について検討を行なったところ、野生型マウスと比較して、血糖値に有意な差は見られなかった。本マウスが致死となる理由は低血糖によるものではない可能性が高いと考えられた（図 2）。また、*Hmgb1*$^{flox/flox}$-*Nestin1-Cre*$^{+}$マウスは野生型マウスと比較し、尾が短く、体躯が小さいことも判明した。

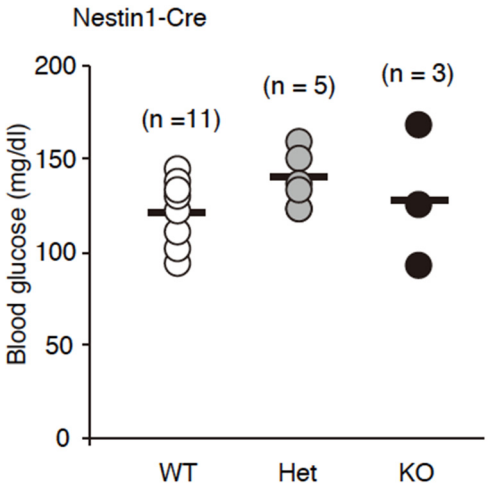


図 2. *Hmgb1*$^{flox/-}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウスにおける血糖値の測定

Hmgb1$^{flox/flox}$ マウス（WT）、*Hmgb1*$^{flox/-}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウス（Het）、および *Hmgb1*$^{flox/flox}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウス（KO）から採血し、血糖値の測定を行なった。測定には血糖自己測定器（キッセイ薬品工業株式会社）を使用した。WT、Het、KO マウス間において、血糖値に有意な差は見られなかった。有意差の検定においては Student の t 検定を用いた。

2. 実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental autoimmune encephalomyelitis：EAE）における HMGB1 の役割

次に、得られた *Hmgb1*$^{flox/flox}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウスを用いて炎症性の神経疾患である実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE）における HMGB1 の役割について検討を行なった。ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパクを模した MOG ペプチド(35～55) (Operon) を完全フロイトアジュバント (DIFCO) と混合し、エマルジョンをマウスに投与した。投与日、および 2 日後に百日咳毒素（pertusis toxin：Sigma-Aldrich）を投与し、EAE の病態スコアを測定した（図 3）。興味深いことに、*Hmgb1*$^{flox/flox}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウスの EAE スコアは、HMGB1 の WT マウスおよび Het のマウスと比較し、有意な差が見られなかった。これらの結果から、HMGB1 の発現の有無は EAE の病態に関与しないことが明らかとなった。

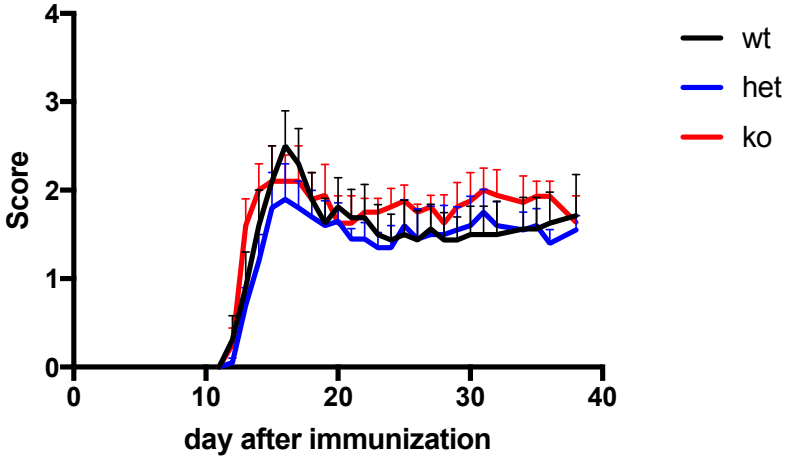


図 3. 神経系細胞（Nestin1 陽性）において HMGB1 を欠損させたマウスにおける EAE の病態スコア

Hmgb1$^{flox/flox}$ マウス（WT）、*Hmgb1*$^{flox/-}$マウス（WT）、*Hmgb1*$^{flox/-}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウス（Het）、および *Hmgb1*$^{flox/flox}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウス（KO）に MOG ペプチドを用いて免疫し、EAE を発症させた。EAE の病態スコアについて検討を行なった。WT、Het、KO マウス間において、EAE の病態スコア値に有意な差は見られなかった。有意差の検定においては one way ANOVA を用いた。

考　察

本研究の結果から、Nestin1 陽性の細胞に発現する HMGB1 は、マウス個体の発達、生存に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。Nsetin1 は神経幹細胞に発現することが知られており、HMGB1 は神経系の発達に重要であることが示唆される。一方で、最近の報告から、Nestin1 は筋や間葉系幹細胞にも発現していることが報告されているため、神経細胞種を含め、どの細胞に発現している HMGB1 が重要なのかはさらに詳細を解析する必要がある。これまでの報告、および我々の知見から、コンベンショナル *Hmgb1* 欠損マウスは全てのマウスが生育しないが、Nestin1-Cre マウスとの交配で得られるマウスはその大部分が死亡するが、一部は生育することが判明した。Nestin1 陽性細胞以外にも HMGB1 には重要な機能を果たしている細胞種があることが示唆される。細胞内 HMG1 の機能は、細胞外 HMGB1 の機能と比較して、まだあまり解明が進んでいない。今後さらにその詳細が明らかになるものと期待される。

HMGB1 は神経疾患を含めた様々な炎症性疾患において、細胞外に放出され、疾患病態を増悪させることが示唆されている［2］。本研究では Nestin1-Cre マウスとの交配によって神経系細胞において HMGB1 を欠失させたマウス（*Hmgb1*$^{flox/flox}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウス）を作製し、炎症性の神経疾患モデルである EAE における HMGB1 の役割について解析を行なった。HMGB1 欠損マウスでは EAE の病態スコアが減弱するものと期待されたが、予想に反し、野生型マウスと HMGB1 欠損マウス間で全く差異を認めなかった。HMGB1 の欠損は EAE の病態においては、あまり重要な役割を果たしていないことが判明した。

本研究から、神経系細胞において HMGB1 の発現を欠損させたマウスを作製することができた。アルツハイマーのマウスモデルを含め［2］、その他の神経疾患における HMGB1 の役割について、今後さらに検討を進めていきたい。

共同研究者・謝辞

まず、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。本研究の共同研究者である東京大学先端科学技術研究センター炎症疾患制御分野の中島由希さん、井上明日香博士、半谷匠先生、谷口維紹先生、東京大学大学院薬学系研究科の岸雄介先生、東京大学生産技術研究所分子細胞工学分野の池内与志穂先生に深く御礼申し上げます。

文　献

1） Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010; 140:805-820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022

2） Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. Annu Rev Immunol. 2011; 29:139-162. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101323

3） Tsan MF. Heat shock proteins and high mobility group box 1 protein lack cytokine function. J Leukoc Biol. 2011; 89:847-853. DOI: 10.1189/jlb.0810471

4） Calogero S, Grassi F, Aguzzi A *et al.* The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. Nat Genet. 1999; 22:276-280. DOI: 10.1038/10338

5） Yanai H, Matsuda A, An J *et al.* Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110:20699-20704. DOI: 10.1073/pnas.1320808110

6） Fujita K, Motoki K, Tagawa K *et al.* HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. Sci Rep. 2016; 6:31895. DOI: 10.1038/srep31895

7） Ito H, Fujita K, Tagawa K *et al.* HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. EMBO Mol Med. 2015; 7:78-101. DOI: 10.15252/emmm.201404392