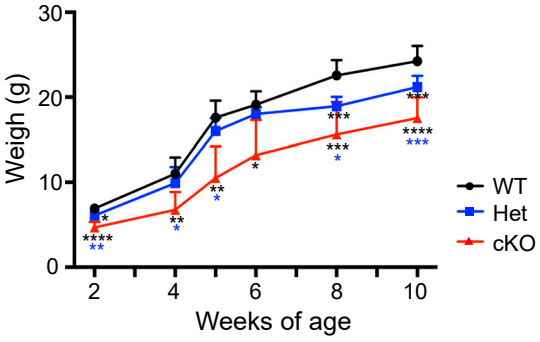
43　神経幹細胞および脳の発達におけるHMGB1の役割の解明	柳井　秀元

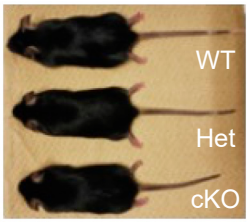
【目的】High-mobility group box 1（HMGB1）は細胞の核内に主要に発現するタンパクであるが、炎症性刺激時、または細胞死に際して核内から細胞外に放出され、それが炎症応答を誘導し、敗血症や免疫疾患等の病態を増悪することが知られている。このように細胞外に放出された HMGB1 の機能について関心が持たれているが、細胞内の HMGB1 の機能については未だ不明な点が多い。HMGB1 を全身性に欠失させたマウスは生後すぐに低血糖の症状を呈して致死となることが知られており、発生初期において重要な機能を担っていることが推測される。これまでの我々の解析から、HMGB1 を神経幹細胞特異的に欠失させたマウスは産仔が得られにくいという知見が得られている。そこで本研究において、HMGB1 の神経幹細胞、および脳の発達における役割について解明する。

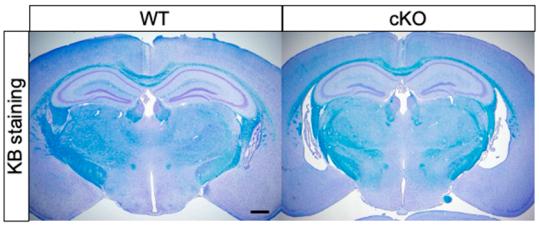
【方法】これまでの報告から、HMGB1 を全身性に欠損させたノックアウトマウスは生後に致死となることが知られている。そこで我々は神経発生における HMGB1 の役割について解析すべく、HMGB1 のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、脳の組織学的解析やマウスの行動解析を行った。

【結果】*Hmgb1* flox マウスを *Nestin1-Cre* マウスと交配させたところ、得られる産仔数が大きく減弱した。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。一方、出生直前での個体数はコントロールマウスと差異はなかった。また、胎児期での脳組織について検討を行ったが大きな異常は認められなかった。少ないながらも得られた *Hmgb1*$^{flox/fxol}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウスについては、体重や個体の大きさが減弱し、また小脳が小さく、脳梁の厚みが薄化していることがわかった（下図）。*Hmgb1*$^{flox/fxol}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウスは過活動や記憶障害を呈することもわかった。これらのことから、HMGB1 は脳の発生において、特に出生後の脳の発達に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Hmgb1$^{flox/fxol}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$ マウス（cKO）は体躯が小さく、小脳や脳梁の発達に異常を示す







43. 神経幹細胞および脳の発達における HMGB1 の役割の解明

柳井　秀元

東京大学 先端科学技術研究センター

Key words：HMGB1，DAMP，神経幹細胞，行動異常，脳梁

緒　言

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）といった自然免疫受容体（パターン認識受容体：PRRs）によって認識される、所謂ダメージ関連パターン（Damage-associated molecular patterns：DAMPs）の代表例として知られている［1］。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、細胞外 HMGB1 の炎症促進作用が注目されているが、細胞内 HMGB1 の役割についてはあまり解析が進んでいなかった。HMGB1 は A-Box および B-Box と呼ばれる DNA 結合ドメインがあり、核内での遺伝子発現制御に関与することが示唆されているが、これらの DNA 結合ドメインの DNA への親和性は強くなく、標的遺伝子や特異的な結合配列についても明確にされていない。

HMGB1 はヒトとマウス間において高度に保存されたアミノ酸配列を有しており、全身性に *Hmgb1* 遺伝子を欠損させたコンベンショナル遺伝子欠損マウスは生後すぐに低血糖の症状を呈し、致死性を示すことが報告されている［4］。したがって、HMGB1 は個体発生に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、私たちおよび海外のグループにより HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスが作製され、肝臓、膵臓を含めて様々な組織、臓器特異的に HMGB1 を欠損させたマウスがこれまでに作製されたが［5］、発生異常を呈したマウスはこれまで報告されておらず、糖代謝も正常であった。したがって、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。

私たちは 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* 遺伝子を神経幹細胞特異的に欠失させたマウス（Nes-cKO マウス）を作製した。交配を進めていったところ、本マウスは生後に多くが致死となることが判明した。このことから HMGB1 は神経幹細胞および脳の発達過程において何らかの機能を発揮している可能性が示唆され、本研究において解明を進めることにした。

方法および結果

1. HMGB1 Nes-cKO マウスは生後に多くが致死となる

私たちは神経幹細胞において発現する *Nestin1* 遺伝子のプロモーター下流において Cre リコンビナーゼを発現させて神経系特異的に *Hmgb1* を欠失させたマウスを作製した。興味深いことに、本マウスは少数しか産仔が得られず（6 週齢にて解析）、致死性を示すことが判明した（図 1A）。本マウスについて胎児期の脳を免疫組織

染色により解析したが、*Hmgb1* 遺伝子の欠損は神経幹細胞やニューロン、アストロサイトの産生や細胞死にほとんど影響していないことがわかった。また生後直後（P0）のジェノタイプには偏りがないことも判明した。胎児期の脳より神経幹細胞を単離し、RNA シーケンスにより網羅的な遺伝子発現解析も行ったが、意外なことに遺伝子発現に大きな差は見られなかった。これらのことから、HMGB1 は生後の脳の発達、機能に重要であることが示唆された。生後のマウスについて、体重の増加や体躯の大きさを観察したところ、生後のマウスでは体が小さく、体重もコントロールのマウスと比較して増えないことが分かった（図 1B、C）。

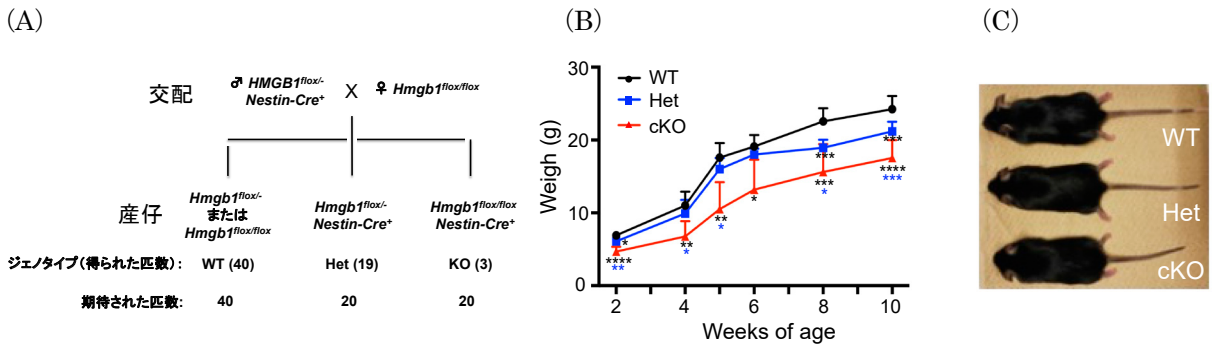


図 1. 神経系特異的 *Hmgb1* 遺伝子欠損マウスの作製

A） *Hmgb1*^{flox} マウス（*Hmgb1*$^{flox/flox}$）と Nestin1-Cre マウス（*Hmgb1*$^{flox/-}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$）との交配を行った。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（3 匹）と期待された匹数（20 匹）とに大きな乖離が見られ、HMGB1 が神経発生に重要であることが示唆された。

B、 C）生後のマウスについて体重の増加（B）と体躯の大きさを比較した（C）。

2. HMGB1 Nes-cKO マウスでは小脳が小さく、また脳梁形成に異常が生じる

胎児期のマウスにおいて、脳の構造等に大きな異常がみとめられなかったため、次に成体期のマウスを用いて解析を進めた。成体期マウス（10 週齢）の組織学的解析を行ったところ、大脳皮質や脳梁の厚さ、小脳のサイズが有意に減少することがわかった（図 2、3）。

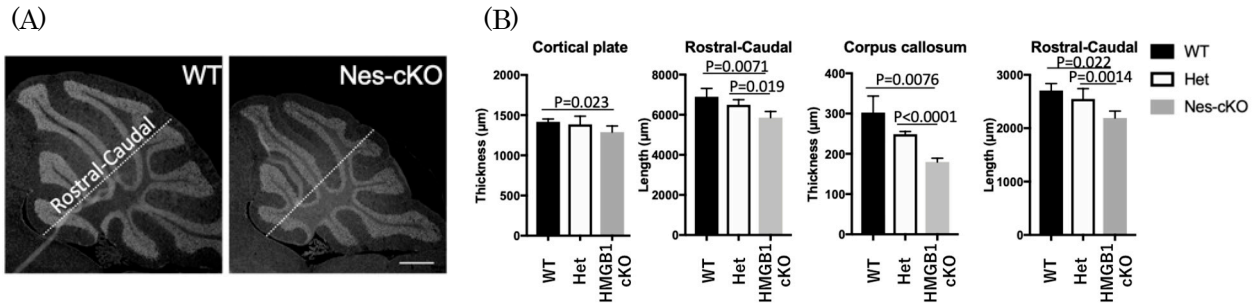


図 2. 成体期における神経系特異的 *Hmgb1* 遺伝子欠損マウスの解析

A） 10 週齢のマウスより摘出した脳の代表例を示す。Scale bar = 2.5 mm。野生型（WT）および Nestin1-Cre マウス（*Hmgb1*$^{flox/-}$ *Nestin1-Cre*$^{+}$；Nes-cKO）の小脳の DAPI 染色図。

B） 皮質板、大脳の前後軸、脳梁、小脳の前後軸のサイズを計測した。

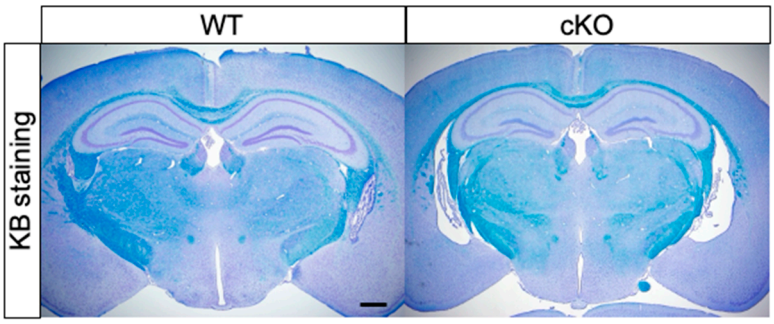


図 3. 成体期コントロールマウス、cKO マウスにおける神経軸索の解析
Control および Nes-cKO マウスの脳組織について Klüver-Barrera（KB）染色を行った。スケールバー：500 μm。

3. HMGB1 Nes-cKO マウスは過活動などの行動異常を示す

成体期の HMGB1 Nes-cKO マウスにおいて小脳や脳梁に異常がみとめられたため、HMGB1 は特に生後の脳の発達に重要であることが示唆された。そこで次に、HMGB1 Nes-cKO マウスを用いて行動異常を示すかどうかについて検討をすすめることにした。オープンフィールドテストや T 字型迷路テストを用いて解析した。その結果、HMGB1 Nes-cKO マウスは活動量の顕著な増加と作業記憶の低下を示すことが分かった（図 4）。

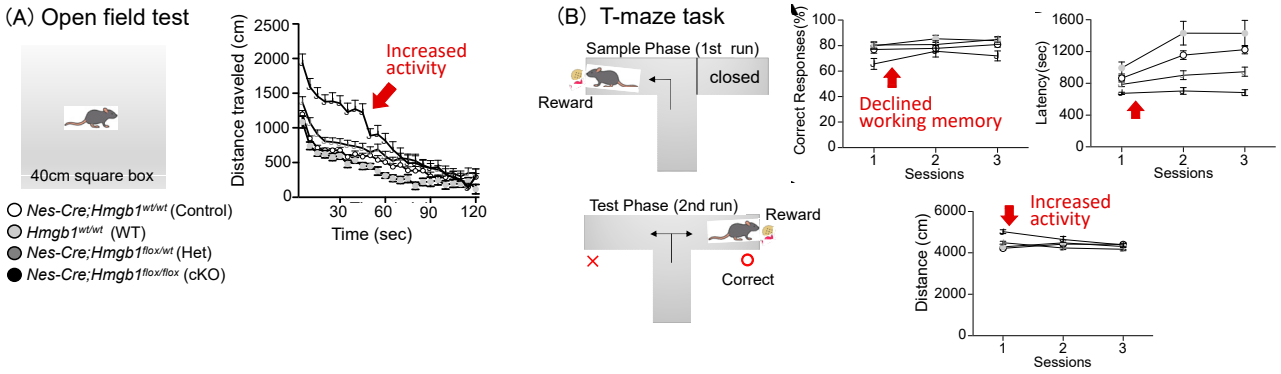


図 4. HMGB1 Nes-cKO マウスの行動バッテリーテスト

A) 運動活動を評価するために、オープンフィールド試験を用いた。総移動距離、中央コンパートメントでの滞在時間、立ち上がりなどの行動回数を測定した。HMGB1 Nes-cKO マウスでは活動性の顕著な増加が観察された。

B) ワーキングメモリーを評価するために、T 字型迷路テストを用いた。1 トライアルは 2 ランで行った。1 回目は、空腹のマウスに左右の空いている通路を 1 本ずつ選ばせ、アームの先で報酬を与えた。2 回目は、自由に通路を選択させ、1 回目と異なるアームを選択した場合に報酬を与えた。テストは少なくとも 1 日の間隔をあけて、10 回の試行を 3 回行った。コントロールマウス、wild-type マウス、ヘテロマウスは 80%以上の反応率を示したが、cKO マウスは有意に反応率が低く、ワーキングメモリーが損なわれていることが示唆された。

考　察

本研究の結果から、HMGB1 は神経系において、特に生後の脳の発達に重要であることが明らかとなった。実際、HMGB1 Nes-cKO マウスは小脳や脳梁の形成に異常を認め、また行動異常も示すことが分かった。細胞外 HMGB1 の機能に関する研究と比較し、細胞内 HMGB1 の機能を明らかにする研究はこれまであまりなされてこなかった。その理由の一つとして、HMGB1 がどのような組織や細胞で重要な役割を果たしているのかが明確でなかったことがある。本研究の結果から、HMGB1 は脳の発達に重要であることが分かりつつあり、今後、どのような細胞種において、またさらに遺伝子発現における役割などの詳細が明らかになるものと期待される。

ヒトにおいては、HMGB1 遺伝子座を含む 13q12.3 微小欠失症候群が小頭症を呈し、多動性や知的障害などの特徴を示すことが報告されている［6, 7］。本研究の結果から、HMGB1 の発現異常が疾患病態発症の原因の一つである可能性が示唆され、今後解析が進むことで本疾患の病理・病態の解明に繋がることが期待される。

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、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。また、Klüver-Barrera（KB）染色は香川大学医学部医学研究科炎症病理学の上野正樹先生との共同研究により、またバッテリー解析は藤田医科大学医科学研究センターシステム医科学研究部門の宮川剛先生との共同研究により、先端モデル動物支援プラットフォームのご支援を得て実施いただいたものであり、ご解析いただけましたことに心より御礼申し上げます。

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 PMID: 20303872

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 PMID: 21219181

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 PMID: 21199932

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 PMID: 10391216

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 PMID: 24302768 PMCID: PMC3870753

6） Uguen K, Krysiak K, Audebert-Bellanger S, *et al.* Heterozygous HMGB1 loss-of-function variants are associated with developmental delay and microcephaly. Clin Genet. 2021 100: 386-395. DOI: 10.1111/cge.14015 PMID: 34164801

7） Bartholdi D, Stray-Pedersen A, Azzarello-Burri S, *et al.* A newly recognized 13q12.3 microdeletion syndrome characterized by intellectual disability microcephaly and eczema/atopic dermatitis encompassing the HMGB1 and KATNAL1 genes. Am J Med Genet A. 2014 164A: 1277-1283. DOI: 10.1002/ajmg.a.36439 PMID: 24664804