

論 文 要 旨

Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment

〔 網膜剥離眼における
high-mobility group box 1 protein の発現と放出 〕

有村 昇

【序論および目的】

High-mobility group box 1 protein (HMGB1)は体細胞の主に核に局在する非ヒストン DNA 結合蛋白であり、核内において転写調節に重要な因子として知られている。また、細胞表面にも存在し、神経系の発生に関連する神経細胞の軸索・神経突起伸長や、癌細胞の転移に関連する細胞遊走などを誘導すると考えられている。HMGB1 は分泌シグナル配列を欠く蛋白質であるが、マクロファージなどの免疫担当細胞や神経細胞などから外的刺激に応じて能動的に細胞外に分泌され、その他の細胞からも細胞死に伴って受動的に細胞外へ放出される。細胞外 HMGB1 は組織損傷と炎症を修飾する分子として注目されており、敗血症や関節リウマチなど種々の疾患の病態へ関与することが報告されている。視細胞の変性という網膜細胞死を病態の主体とする眼疾患である網膜剥離における HMGB1 の関与について検討した。

【材料および方法】

ラット胎仔網膜由来細胞株 R28 を用いて、網膜細胞死における HMGB1 の発現と放出について検討した。培養した R28 細胞株を過酸化水素(1mM)にて処理することで細胞死を誘導し、HMGB1 の発現を免疫染色にて評価した。また、培養上清中の HMGB1 を ELISA にて定量することで、細胞外への放出を確認した。動物実験委員会の承認を得て、ラット網膜剥離モデルを作成し、ラット剥離網膜における HMGB1 発現の経時的变化を免疫組織学的に検討した。網膜剥離後の典型的な視細胞死であるアポトーシスと HMGB1 発現の関連を検討するため、アポトーシス細胞が最大になる剥離後 3 日目のラット網膜を用いて、HMGB1 の免疫染色と TUNEL 染色との共染色を行った。ヒトの網膜剥離への HMGB1 の関与を評価するため、倫理委員会の承認を得て採取された網膜剥離患者硝子体を用いて、眼内液中の HMGB1 濃度と、網膜剥離に関連するケモカインとして既に知られている Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)濃度を ELISA にて測定し、統計学的解析を行った。ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を用いてリコンビナント HMGB1 の細胞遊走活性について検討するため、migration assay を行った。また、HMGB1 の遊走活性に関連するシグナル蛋白として知られている extracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化をウエスタンブロットにて評価し、その阻害剤である U0126 を用いて、細胞遊走が抑制されるか検討した。

【結 果】

R28 細胞株を、細胞死を誘導する酸化ストレス下に置くことで、核内 HMGB1 の発現上昇や細胞質での HMGB1 の発現増強が認められた。細胞死の結果、培養上清中の HMGB1 濃度は上昇し、網膜細胞において HMGB1 は細胞死に依存して細胞外へ放出された。ラット網膜剥離モデルにおいて核内 HMGB1 は3日目に発現上昇し、7日目で元の発現レベルへ戻るとともに、視細胞の崩壊に伴い網膜下への HMGB1 放出が認められた。同モデルでは剥離3日目に視細胞のアポトーシスが最大となるが、TUNEL 染色と HMGB1 免疫染色の共染色にて、アポトーシス細胞では核内 HMGB1 の発現上昇が認められず、逆に TUNEL 陰性の視細胞において HMGB1 の発現上昇は明瞭であった。網膜剥離患者硝子体では、HMGB1、MCP-1 とともに有意に高値を示し ($P < 0.001$ Mann-Whitney U 検定)、互いに相関した ($P < 0.001$ 単回帰分析, Spearman 順位相関係数)。リコンビナント HMGB1 は ARPE-19 に細胞遊走、ERK のリン酸化を誘導し、それらが阻害剤である U0126 にて抑制されることから、HMGB1 による細胞遊走は ERK のリン酸化を介したものであると考えられた。

【結論及び考察】

HMGB1 は網膜剥離後に主に視細胞の核内で発現上昇し、アポトーシス細胞ではそれが認められないことから、「核内」HMGB1 は網膜剥離というストレス下での視細胞の生存において重要な因子であることが示唆された。一方で、視細胞死に伴って細胞外へ放出される、「細胞外」HMGB1 は、網膜剥離における視細胞変性という危険を伝える眼内の危険信号 danger signal として機能している可能性があり、ヒト網膜剥離の病態へも関与するものと考えられた。放出された「細胞外」HMGB1 は眼内において細胞遊走を促進する可能性があり、網膜色素上皮細胞もその構成細胞となる増殖膜の形成に促進的に働いている可能性がある。増殖膜形成は、眼内の病的創傷治癒反応とも言うべき増殖性変化の主体であり、著しく視機能を障害する、外科的処置を要する治療困難な病態である。「細胞外」HMGB1 は、眼内における細胞死とその後の生体反応に関連するメディエーターと考えられ、網膜剥離における増殖性変化への関連を今後さらに検討することで新規の治療標的となる可能性がある。