

氏 名	吉原 千暁
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第5310号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	High mobility group box 1 の歯周炎惹起および遷延化のメカニズムに関する検討
論文審査委員	森田 学 教授 西田 崇 准教授 高柴正悟 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

High mobility group box 1 (HMGB1) は、当初は細胞核内に恒常的に発現する非ヒストン DNA 結合タンパク質として発見された。しかし近年では、局所に侵襲を受けると細胞外に分泌され、炎症性サイトカイン産生を促進することが報告されたことにより、様々な炎症性疾患の病態解明および治療に重要な分子として注目されている。歯周炎においても、ヒト歯周組織や歯肉溝浸出液から検出されることから病態への関与が示唆されているが、歯周組織での詳細な機序は未だ不明な点が多い。本研究では、歯周炎により歯肉上皮細胞およびマクロファージから分泌された HMGB1 が、炎症性サイトカイン産生を促進して歯周炎を惹起、遷延化するという仮説のもと、HMGB1 の歯周炎への影響を調べるために、抗 HMGB1 抗体を用いて in vivo と in vitro での検討を行った。

【材料および方法】

1. 試薬：ラット由来 IgG2a 抗 HMGB1 抗体 #4-1, #10-22 は、医歯薬学総合研究科薬理学講座の西堀正洋教授から供与を受けた。in vitro では組換えヒト tumor necrosis factor (TNF) - α , 抗 HMGB1 抗体 #4-1 を用い、in vivo では抗 HMGB1 抗体 #10-22 を用いた。
2. 細胞とその培養：歯肉上皮細胞 (Human Gingival Epithelium Progenitors, Pooled ; HGE) およびヒト単球性白血病由来株 (THP-1) を用いた。THP-1 は phorbol 12-myristate 13-acetate にて 48 時間刺激しマクロファージ様に分化させた。
3. 細菌とその培養： *Porphyromonas gingivalis* W83 株は 37 °C, 5 % CO₂ 下で培養した後、リン酸緩衝生理食塩水にて調整し、A₆₆₀ を 0.6 に調整した菌液を作製した。
4. 細胞傷害性の検討：試薬の細胞傷害性を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium 法にて調べた。
5. 遺伝子発現解析：HMGB1 の遺伝子発現量をリアルタイム reverse transcription polymerase chain reaction 法にて定量した。
6. タンパク質発現解析：HMGB1 産生量を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて定量した。また、サイトカイン産生量を抗体アレイにて網羅的に半定量した後、HGE 培養上清中の granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), THP-1 培養上清中の interleukin (IL) -1 β , TNF- α , そ

して IL-6 を ELISA 法にて定量した。

7. **マウスモデルの作製**：10 週齢 C57BL/6 雌性マウスの歯頸部に絹糸を結紮し、*P.gingivalis* 菌液を 3 日毎に絹糸に浸透させた歯周炎モデルマウスに、対照抗体（10 $\mu\text{g}/\text{匹}$ ）あるいは抗 HMGB1 抗体#10-22（10 $\mu\text{g}/\text{匹}$ ，25 $\mu\text{g}/\text{匹}$ ）を 3 日毎に腹腔投与し，7 日および 21 日後に組織解析を行った。
8. **ミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性の検出**：歯周炎モデルマウスに発光プローブを腹腔投与し，上顎骨を摘出して MPO 活性を検出した。
9. **歯槽骨量の測定**：上顎骨をマイクロ CT にて撮影し，歯槽骨量を定量した。
10. **組織学的解析**：歯周組織パラフィン切片を作製し，ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。
11. **蛍光免疫染色**：歯周組織切片および培養細胞における HMGB1 の局在を蛍光免疫染色法にて検出した。

【結果】

1. **細胞傷害性の検討**：TNF- α は THP-1 に対して 100 ng/mL で細胞傷害性を示した。抗 HMGB1 抗体は両細胞に対して 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で細胞傷害性を有する傾向を示した。
2. **HMGB1 の遺伝子およびタンパク質の発現解析**：TNF- α 添加により，両細胞で遺伝子発現量が一過性に増加し，分泌量は経時的に増加した。分泌量は HGE よりも THP-1 の方が多かった。また，両細胞ともに TNF- α 添加により，細胞質における HMGB1 の局在シグナルが強まった。
3. **HMGB1 の組織内局在解析**：健常群の歯肉上皮では HMGB1 は核内で強く発現した。歯周炎群では核内の発現が著しく減弱し，抗 HMGB1 抗体投与群では抗体濃度依存的に核内の発現が強まった。
4. **歯周炎モデルマウスにおける抗 HMGB1 抗体の炎症抑制効果**：炎症強度は，7 日目の方が 21 日目よりも強かった。また 7 日目，21 日目とも，抗 HMGB1 抗体は濃度依存的に炎症を抑制した。
5. **歯周炎モデルマウスにおける抗 HMGB1 抗体の歯槽骨吸収抑制効果**：7 日目では歯槽骨吸収は生じなかった。21 日目では歯槽骨吸収が生じ，抗 HMGB1 抗体は濃度依存的に歯槽骨吸収を抑制した。
6. **抗 HMGB1 抗体によるサイトカイン産生抑制効果**：網羅的解析により同定されたサイトカインのうち，抗 HMGB1 抗体は HGE における GM-CSF 産生量を抑制した。また，THP-1 における IL-1 β ，TNF- α 産生量を抑制したが，IL-6 産生量は抑制しなかった。

【考察】

本研究から，歯肉上皮細胞およびマクロファージから分泌された HMGB1 は，オートクリンおよびパラクリンの機序でサイトカイン産生を促進し，歯周炎の惹起，遷延化に関わることが分かった。すなわち，歯肉上皮細胞から分泌された HMGB1 は GM-CSF の産生を促進することで，免疫担当細胞の分化と活性化を促進し，歯周炎を惹起する。その後，局所へ遊走したマクロファージから分泌された HMGB1 が IL-1 β および TNF- α の産生を促進することで，炎症を深部へ波及させるとともに，破骨細胞の分化と活性化を促進し，歯槽骨吸収を促す。また，HMGB1 はさらなる HMGB1 の分泌により炎症の遷延化に関与することが示唆された。

今後は，HMGB1 誘導性のサイトカイン産生シグナル伝達経路を解明する必要がある。また，網羅的解析により同定されたその他のサイトカイン，ケモカインに対する HMGB1 の作用を明らかにすることで，複雑な自然免疫機構を解明する一助となると考える。

【結論】

HMGB1 は，歯肉上皮細胞からの GM-CSF，マクロファージからの IL-1 β および TNF- α の分泌を促進し，歯周炎を惹起・遷延化する。

論文審査結果の要旨

High mobility group box 1 (HMGB1) は、当初は恒常的に発現する非ヒストン DNA 結合タンパク質として発見された。しかし近年では、局所に侵襲を受けると細胞外に分泌され、炎症性サイトカイン産生を促進することが報告されたことにより、様々な炎症性疾患の病態解明および治療に重要な分子として注目されている。歯周炎においても、ヒト歯周組織や歯肉溝浸出液から検出されることから病態への関与が示唆されているが、歯周組織での詳細な機序は未だ不明な点が多い。本研究では、歯周炎によって歯肉上皮細胞およびマクロファージから分泌された HMGB1 が、炎症性サイトカイン産生を促進して歯周炎を惹起、遷延化するという仮説のもと、HMGB1 の歯周炎への影響を調べるために、抗 HMGB1 抗体を用いて *in vitro* と *in vivo* での検討を行った。

研究結果は、以下の内容であった。

1. 細胞傷害性の検討：TNF- α はマクロファージ様細胞に対して100 ng/mLで細胞傷害性を示した。抗HMGB1抗体はマクロファージ様細胞および歯肉上皮細胞に対して50 μ g/mLで細胞傷害性を有する傾向を示した。
2. HMGB1の遺伝子およびタンパク質の発現、細胞内局在解析：TNF- α 添加により、両細胞ともにHMGB1の遺伝子発現量が一過性に増加した。その後、その局在は核内から細胞質へ移行し、細胞外へ分泌された。分泌量は歯肉上皮細胞よりもマクロファージ様細胞の方が多かった。
3. 歯周炎モデルマウスにおけるHMGB1の組織内局在解析：HMGB1は歯肉内縁上皮に最も強く発現した。健常群では核内で強く発現したが、歯周炎群では核内の発現が減弱した。抗HMGB1抗体投与群では抗体濃度依存的に核内の発現が強まり、健常群に近い像を示した。
4. 歯周炎モデルマウスにおける抗HMGB1抗体の炎症抑制効果：歯周炎モデルマウス作製開始から7日目の方が21日目よりも強い炎症を呈した。また、7日目、21日目ともに、抗HMGB1抗体は濃度依存的に炎症を抑制した。
5. 歯周炎モデルマウスにおける抗HMGB1抗体の歯槽骨吸収抑制効果：7日目では歯槽骨吸収は生じなかった。21日目では歯槽骨吸収が生じ、抗HMGB1抗体は濃度依存的に歯槽骨吸収を抑制した。
6. 抗HMGB1抗体によるサイトカイン産生抑制効果：抗HMGB1抗体は、歯肉上皮細胞からのGM-CSF産生を抑制した。また、マクロファージ様細胞からのIL-1 β , TNF- α 産生を抑制したが、IL-6産生量は抑制しなかった。

以上の所見から、本論文では HMGB1 は歯肉上皮およびマクロファージからのサイトカイン産生を促進し、歯周炎の惹起および遷延化に関与する可能性が示された。また、今後さらなるメカニズム解明を行うことによって複雑な自然免疫系制御機構を解明する一助となることを、今後の課題として示した。

以上にに基づき、審査委員会は本申請論文に博士（歯学）の学位論文として価値があるものと認めた。