

氏 名	平井 杏奈
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6599号
学位授与の日付	令和4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	HMGB1 はマクロファージを M1 タイプに極性化させて歯周炎の進行に影響を及ぼす
論文審査委員	岡村 裕彦 教授 大原 直也 教授 江國 大輔 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周炎は、歯周病原細菌に起因した過度な免疫応答によって、歯周組織が破壊される慢性の炎症性疾患である。歯周炎の初期では、歯周組織に浸潤した免疫細胞から産生される炎症性サイトカインが、相互に複雑なネットワークを形成し、過剰な免疫応答を引き起こすことで歯周組織破壊が生じる。近年、いくつかの免疫細胞種のフェノタイプの変化が、歯周炎の進行に重要な影響を及ぼすことが報告されている。その細胞種の1つであるマクロファージ (M ϕ) は、M1 と M2 の2つのタイプに大別されるが、歯周炎組織においては骨髄由来単球細胞が IL-1 β や TNF- α などの存在下で M1 タイプへと極性化することで、炎症を促進させて歯周組織の破壊を重篤化させることが明らかとなっている。

High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は、転写に関わる非ヒストン性の核内タンパク質で、全ての真核生物に存在している個体の生存に必須の分子である。その一方で、組織の損傷や壊死によって細胞外へ放出された HMGB1 は、ダメージ関連分子パターン (DAMPs) の一つとして機能し、炎症性サイトカインの発現を増強する炎症性メディエーターとなる。近年、HMGB1 は様々な炎症性疾患に関与していることが数多く報告されており、特に脳血管疾患や神経因性疼痛に対しては HMGB1 をターゲットとした創薬研究が盛んである。

所属する研究室ではこれまでに、HMGB1 中和抗体が歯周組織の炎症だけでなく歯槽骨の吸収も抑制することを明らかにしてきた。しかし、HMGB1 が歯周炎の進行にどう関わるのか、詳細なメカニズムは不明なままである。本研究では、歯槽骨の破壊が進行する歯周炎の急性期において、細胞外へ放出された HMGB1 が炎症性免疫細胞の分極を変化させて、過度な免疫応答を引き起こすきっかけとなるのではないかと推測した。そこで、抗 HMGB1 抗体 #10-22 と M ϕ 特異的 HMGB1 ノックアウトマウスを用いることで、HMGB1 が歯周炎組織に及ぼす免疫学的メカニズムを、M ϕ の M1 タイプへの極性化と急性期の炎症反応に着目して検討した。

【材料と方法】

In-vitro : 野生型マウス (C57BL/6J, 雄, 9 週齢) から採取した骨髄単球細胞を M1M ϕ へと分化させ、lipopolysaccharide (*Escherichia coli* 由来, 10 ng/mL), rhHMGB1 (10 μ g/mL), HMGB1 中和抗体 (10

ng/mL) を添加した。48 時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーで M1 M ϕ (Live⁺CD45⁺F4/80⁺CD80⁺ 細胞) への極性化度を解析した。

In-vivo : 野生型マウス群 (WT) , M ϕ 特異的 HMGB1 ノックアウトマウス (LysM^{Cre/+}-Hmg1^{ff}, 岡山大学動物実験委員会承認 : OKU-2016463) 群, そして HMGB1 中和抗体を腹腔内投与した野生型マウス群 (WT+Anti-HMGB1) を用いて, 上顎第二大臼歯を絹糸で結紮した歯周炎モデルを作製した (反対側は対照)。歯周炎症が急性期となる結紮から 3 日後に, 腹腔内液, 第二大臼歯周囲の歯肉, そして上顎を回収した。これらを用いて, HMGB1 が歯周炎に及ぼす影響を, ①フローサイトメトリーによる腹腔内 M ϕ の M1M ϕ への極性化度, ②上顎骨の形態解析による歯槽骨吸収度, ③定量 RT-PCR による歯肉中の炎症性サイトカイン *Il-6* とケモカイン *Cxcl2* の遺伝子発現度, ④フローサイトメトリーと免疫染色による歯周組織に遊走した M1 M ϕ への極性化度とその局在について調べた。全てのデータは, One-way ANOVA と Tukey's multiple comparison test を用いて解析し, $p < 0.05$ を有意差ありとした。(岡山大学動物実験委員会承認 : OKU-2021767)

【結果】

In-vitro : HMGB1 は, M ϕ の M1 タイプへの極性化を促進した。

In-vivo : LysM^{Cre/+}-Hmg1^{ff} 群と WT+Anti-HMGB1 群では, WT 群と比較して, 腹腔内液中と歯周炎組織における M1 M ϕ への極性化度が有意に低下した。さらに, 歯槽骨の吸収と歯周組織における *Il-6* と *Cxcl2* の遺伝子発現が有意に抑制された。

【考察】

本研究では, 多くの炎症性疾患の病態において重要な役割を担う M ϕ と HMGB1 の関連に着目して, HMGB1 が歯周炎組織に及ぼす免疫学的な影響を検討した。

はじめに, HMGB1 が M ϕ の極性化に及ぼす影響を調べた。本研究の結果から, HMGB1 は M ϕ を M1 タイプに極性化させる重要な分子であることが *in-vitro* と *in-vivo* で示された。

次に, 歯周炎組織における HMGB1 の影響を検討した。本研究の結果から, HMGB1 を抑制すると, M ϕ の M1 タイプへの極性化が抑制され, M1 M ϕ の局在は減少する傾向にあった。この時, LysM^{Cre/+}-Hmg1^{ff} 群と Anti-HMGB1 群の歯肉組織中では, M1 M ϕ の極性化を抑制する割合は同程度であった。すなわち, HMGB1 によって極性化した M1 M ϕ は, オートクライン的に歯周炎組織中の HMGB1 を増加させて, 炎症の増悪を誘導している可能性がある。

最後に, HMGB1 が歯周組織の炎症反応に及ぼす影響を検討した。本研究の結果から, HMGB1 を抑制すると, 歯周炎組織において, *Il-6* と *Cxcl2* の遺伝子発現は減少した。*IL-6* と *CXCL2* は, ともに M1 M ϕ が分泌する炎症性サイトカインであり, 近傍の多種な細胞に作用することで過剰な免疫応答を引き起こす。すなわち, 歯周炎の急性期で, HMGB1 は M ϕ の M1 タイプへの極性化を促進することで, M1 M ϕ からの炎症性サイトカインの分泌量を増加させて, 炎症反応を増悪させていると考える。また, HMGB1 を抑制すると, 歯槽骨の吸収が抑制された。HMGB1 は, 炎症性サイトカインの分泌を促

進して歯槽骨破壊を誘導する一方で、直接的に破骨細胞分化を促進して骨吸収に関与することが報告されている（Oyama ら, *J. Periodontal. Res.*, 2021）。これらの報告と本研究の結果を合わせると、歯周炎組織に分泌された HMGB1 は、M1 M ϕ への極性化を介して炎症を制御すると同時に、直接的に破骨細胞を活性化させながら、歯周組織の破壊を誘導する可能性がある。

以上から、歯周炎の急性期において、HMGB1 は M ϕ の M1 タイプへの極性化を促進することで、炎症を増幅させるトリガーになっていることが示された。今後は、歯周炎組織における遷延化した炎症反応に対して HMGB1 がどう影響するのかを解明していくことで、より詳細な歯周炎の病態解明に寄与していきたいと考える。

【結論】

歯周炎組織において、HMGB1 は M1 M ϕ の極性化を促進して炎症反応を増悪させることで、歯周組織破壊の進行に関与する。

論文審査結果の要旨

歯周炎は、歯周病原細菌に起因した過度な免疫応答によって歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患である。歯周炎組織では、Interleukin (IL)-1 β や Tumor necrosis factor- α などにより、骨髄由来単球細胞が M1 タイプのマクロファージ (M ϕ) へと極性化することで組織破壊が重篤化する。High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は、真核生物の転写に関わる非ヒストン性の核内タンパク質である。一方で、組織の損傷や壊死によって細胞外へ放出されることで、ダメージ関連分子パターンとして receptor of advanced glycation end products や Toll 様受容体に結合して炎症性サイトカインの発現を増強する。近年では、HMGB1 の様々な炎症性疾患への関与が報告されている。先行研究によって、HMGB1 が歯周組織の炎症と歯槽骨の破壊に影響を及ぼすことが明らかとなったが、その詳細なメカニズムは不明である。本論文では、HMGB1 が歯周炎組織に及ぼす免疫学的メカニズムを、M ϕ の M1 タイプへの極性化と炎症反応に着目して検討した。

C57BL/6 野生型 (WT) マウス由来の骨髄単球細胞に macrophage colony-stimulating factor を添加して M ϕ へ分化させたあと、lipopolysaccharide, リコンビナント HMGB1, そして抗 HMGB1 抗体 (anti-HMGB1 mAb) を添加し、48 時間後に M1 M ϕ への極性化を解析した。さらに、WT マウス、M ϕ 特異的 HMGB1 をノックアウトした LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl} マウスおよび anti-HMGB1 mAb を腹腔内へ投与した WT マウスを用いて、絹糸結紮歯周炎モデルを作製した。3 日後に、腹腔内と歯周組織中の M ϕ の M1 タイプへの極性化と歯周組織での局在、歯槽骨吸収度、歯肉中の炎症性サイトカインの Il-6 とケモカインの C-X-C motif ligand (Cxcl)2 の遺伝子発現を調べた。

その結果、*in vitro* では、HMGB1 によって、M ϕ の M1 タイプへの極性化を促進した。LysM^{Cre/+}-Hmgb1^{fl} マウス群と anti-HMGB1 mAb 投与マウス群では、WT マウス群と比較して、腹腔内と歯周炎組織中で M ϕ の M1 タイプへの極性化が減少した。さらに、歯肉中での Il-6 と Cxcl2 の遺伝子発現と歯槽骨吸収が抑制された。以上の結果から、HMGB1 は M ϕ の M1 タイプへの極性化を促進することで、歯周組織の炎症を増悪させて歯槽骨吸収を誘導すると考えられる。

本論文の成果は、歯周炎の病態における免疫学的メカニズムと炎症の遷延化における HMGB1 の関与を解明する一助となる重要な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。