# 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

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

平井 杏奈

# HMGB1 affects progression of periodontitis by macrophage polarization to M1 phenotype.

Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Anna HIRAI

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重症化し、歯周組織の破壊を 伴う慢性炎症性疾患である<sup>1)</sup>。歯肉溝における歯周病原細菌の感染によって補体などの自然 免疫系が活性化され、好中球やマクロファージ、樹状細胞などの炎症性免疫細胞が歯周組織 へ遊走することで、歯周炎の病状が進行する<sup>2)</sup>。そして、歯周炎組織に浸潤した炎症性免疫 細胞は、tumor necrosis factor (TNF) -  $\alpha$ , interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-6, IL-17 などの炎症性サイ トカインを産生し、相互に複雑なネットワークを形成しながら過剰な免疫応答を引き起こす ことで、歯周組織破壊を増悪させる<sup>24)</sup>。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た<sup>5)</sup>。その細胞種の1つであるマ クロファージ (Mo) は、M1 と M2 の 2 つのタイプに大別され、炎症の急性期では M1 タイ ブヘ、慢性期では M2 タイプへ分極する<sup>6)</sup>。歯周炎の歯周組織では、骨髄由来単球細胞が IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$  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<sup>7)</sup>。

High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は、全ての真核細胞に存在し、A ボックス、B ボッ クス、C 末端領域の3 つのドメインから構成される 30 kDa の非ヒストン性のタンパク質であ る<sup>8)</sup>。そして、HMGB1 のアミノ酸配列は、哺乳類間で高度な相同性で保存されている<sup>8)</sup>。 健康な組織では核内に局在し、nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) などの遺伝子の転写制御およ び DNA 修復に関わる<sup>9)</sup>。また、HMGB1 欠損マウスは、グルココルチコイド受容体機能不全 のため、出生後すぐに低血糖で死亡することから、HMGB1 は個体の生存に必須の分子であ る<sup>10)</sup>。一方で、組織の損傷や壊死、および感染が起こると、HMGB1 は細胞の危機を知らせ る damage-associated molecular patterns (DAMPs) としても機能することが知られている<sup>11)</sup>。 炎症性組織においては、HMGB1 がアセチル化されて核外へ移動し、分泌型リソソームと結 合して細胞外へ分泌される<sup>12)</sup>。細胞外へ放出された HMGB1 は、toll-like receptor や receptor for advantage glycation end-products などの受容体に結合し、NF- $\kappa$ B を活性化する<sup>13,14)</sup>。そし て、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの遺伝子発現を増強することで、強力な 炎症性メディエーターとなる<sup>15)</sup>。近年では様々な炎症性疾患における HMGB1 の関与が報告 されており、敗血症<sup>16)</sup> や脳血管疾患<sup>17)</sup> などの急性炎症性疾患のみならず、慢性関節リウマ チ<sup>18,19)</sup> や、動脈硬化<sup>20)</sup> などの慢性疾患についても多くの報告がある。特に脳血管疾患<sup>21)</sup> や 神経因性疼痛<sup>22)</sup> などの分野では、HMGB1 に関連した創薬研究が盛んに行われている。

歯周炎の病態における HMGB1 の免疫学的な関与については、いくつかの報告がある。こ れまでに、歯周炎患者の歯肉溝滲出液中には、HMGB1 が高濃度に検出される<sup>23,24)</sup>ことや、 TNF-α、IL-1β、さらに歯周病原細菌の代謝産物である酪酸などの刺激によって、歯肉上皮細 胞から HMGB1 が分泌されることなどが明らかになっている<sup>25)</sup>。さらに、Yoshihara らは、 HMGB1 が歯肉上皮細胞と比較して Mø からより多く分泌され、歯槽骨吸収だけでなく、歯 周組織における炎症の遷延化に関与していることを報告した<sup>26)</sup>。しかし、歯周炎の病態に HMGB1 が及ぼす免疫学的な作用には、未だ不明な点が多い。 近年,HMGB1 が Mø の M1 または M2 タイプへの極性化を制御する可能性が示唆された。 Son らは,全身性エリテマトーデスの炎症組織において,補体経路の起点物質である Clq と HMGB1 が局在下で,Mø は M2 タイプへと極性化し,疾患の進行に影響を与えることを明ら かにした<sup>5)</sup>。また,Karuppagounder らは,心筋の損傷組織では,炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 などの発現の上昇とともに,HMGB1 と M1 Mø 特異的マーカーである cluster of differentiation (CD) 68 の発現が有意に増加することを報告した<sup>27)</sup>。しかし,歯周炎 の歯周組織における HMGB1 と Mø の関連については報告がない。

本研究では、歯周病原細菌によって炎症が惹起された歯周組織において、核外へ放出された HMGB1 が、Mø を M1 タイプへ極性化させて、過度な免疫応答を誘導しているという仮説を立てた。そこで、抗 HMGB1 抗体 #10-22<sup>28)</sup>(抗 HMGB1 抗体)と Mø 特異的 HMGB1 ノ ックアウトマウス<sup>29)</sup>を用いたモデルにて、HMGB1 が歯周炎組織に及ぼす免疫学的メカニズムを、Mø 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

#### 1. 試薬

ラット由来 IgG2a の抗 HMGB1 抗体 #10-22<sup>28)</sup> は、岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 生体制御科学専攻 生体薬物制御学講座 薬理学分野 西堀正洋教授(現 名誉教授)から供与を 受けた。なお、抗 HMGB1 抗体 #10-22 は、HMGB1 の C 末端領域を認識し、特異性が高い という特徴を持つ<sup>28)</sup>。

#### 2. 細胞とその培養

Tevlin ら<sup>30)</sup>の方法を一部改変して,野生型マウス(C57BL/6J,雄,9週齢,平均体重 30 g,日本クレア株式会社,東京)の脛骨から骨髄を含む細胞溶液を採取した。採取した細胞 溶液から Ficoll-Paque PREMIUM (Cytiva,東京)を用いて分離した単球細胞を,1.0×10<sup>5</sup> 個/ウェルの濃度で 24 ウェルマルチプレート (Corning; Corning, NY, USA) に播種した。 その後,macrophage colony-stimulating factor (20 ng/mL, Biolegend; San Diego, CA, USA) を添加して 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100%湿潤下で培養し,Møへと分化誘導させた。48 時間後にウ ェル底面に付着して増殖した樹状様細胞を,骨髄由来 Møとした。

#### 3. 動物

野生型マウスと Mø 特異的 HMGB1 ノックアウトマウス(LysM<sup>Cre/+</sup>-Hmgb1<sup>ff</sup>)を,室温 23 ± 1°C,人工照明 8:00~22:00 に設定された岡山大学動物資源部門鹿田施設で飼育し,免疫 機能が確立する 8 週齢以降である 9 週齢で実験に用いた。なお、ノックアウトマウスは、理 化学研究所(茨城)から購入した B6.129P2-Hmgb1(tm1Ttg)と Cre-ERT2の2系統を購入して、 Yanai ら<sup>29)</sup>の方法を用いてかけ合わせて作製した(岡山大学動物実験委員会承認:OKU-2016463)。

#### 4. 歯周炎モデルマウスの作製

以下の実験は岡山大学動物実験委員会の指針に従って、同委員会の承認(OKU-2021767) を得て行った。

①野生型マウス(WT), ②抗 HMGB1 抗体(100 μg/匹)を腹腔内投与した野生型マウス (WT + anti-HMGB1), ③Mø 特異的 HMGB1 ノックアウトマウス(LysM<sup>Cre/+</sup>-Hmgb1<sup>ff</sup>)の3 群に対して, Abe ら<sup>31)</sup>の手法を用いて上顎左側第二大臼歯に 5-0 絹糸を結紮することによっ て歯周炎モデルを作製した。3 日後に安楽死させ、上顎骨と歯肉(上顎第一大臼歯近心から 第三大臼歯遠心までの幅1mm ロ蓋側歯肉)を採取した。同時に、腹腔内に5mLの含有イー グル最小必須培地α改変型(αMEM,富士フィルム和光純薬,大阪)を注入して、30 秒後に 腹腔内液を回収し、70 μm のセルストレーナー(Corning)に通して濾過した。

#### 5. フローサイトメトリーによる M1 Mø への極性化度解析

#### 1) サンプルの調整

培養細胞:WT から採取して培養したマウス骨髄由来 Mø に lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* O111: B4 由来, 10 ng/mL, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), Disulfide

rhHMGB1 (10 µg/mL, HMGBiotech, Milano, Italy), 抗 HMGB1 抗体 (10 ng/mL) を添加し た。24 時間後に 0.02%トリプシン-0.05%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA : Life Technologies Gibco, Carlsbad, CA, USA) を用いて全細胞を回収した。

歯肉組織: αMEM に 0.3% (w/v) Collagenase Type IV Powder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と 0.4% DNase I (Sigma Aldrich) を溶解した培地に,補体を 60°C で 30 分間非働化した 1% ウシ胎児血清 (FBS, Life Technologies Gibco) を加えた。そこに採取 した組織を加え,ホモジナイザー (ニッピ,東京) で組織を粉砕し, 37°C で 50 分間振盪し た。そこに 0.5 M EDTA (Thermo Fisher Scientific) を添加し, さらに 37°C で 10 分間震盪させ た。

2) フローサイトメトリーによる解析

培養細胞溶液,腹腔内液または歯肉組織の懸濁液を,500 × g,4℃ で 5 分間遠心し,上 清を除去した後,以下の手順で染色し,解析を行った。

死細胞を除外する目的で,Zombie Violet<sup>™</sup> Fixable Kit (Biolegend)を phosphate-buffered saline (PBS) で 1/1,000 の濃度に希釈して加え,4°C で 15 分間,暗所で反応させた。その後, PBS で洗浄し,500 × g,4°C で 5 分間遠心して上清を除去した。次に,Fc 受容体のブロッキングとして抗 CD16/32 抗体 (Clone : 93, Biolegend)を 5% ウシ血清アルブミン (BSA; heat shock fraction, Sigma Aldrich)含有 PBS で 1/100 の濃度に希釈して添加し,4°C で 30 分間,暗所で反応させた。そこに,BSA 含有 PBS で 1/100 の濃度に希釈した一次抗体を添加し

て、4°C で 60 分間, 暗所で反応させた。M1 Mø が全てに陽性となる一次抗体として,造血 系細胞のマーカーとしての phycocrythrin- Cyanine7 (PE-Cy7) 標識ラット抗マウス CD45 抗体 (0.5 mg/mL, Clone : 30F-11, Biolegend) を, Mø のマーカーとしての Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ラット抗マウス F4/80 抗体 (0.5 mg/mL, Clone : BM8, Biolegend) を, T 細胞活性化に必要な分子マーカーとしての Allophycocyanin (APC) 標識ラット抗マウ ス CD80 抗体 (0.2 mg/mL, Clone : 16-10A1, Biolegend) を用いた。反応後は PBS で洗浄し, 500 × g, 4°C で 5 分間遠心し,上清を除去した。最終的な細胞溶液が 300 µL になるように PBS で希釈し,その後,懸濁液を 70 µm のセルストレーナーに通して濾過した後, Flow Cytometer (MACS Quant X : Miltenyi Biotec 2019, Los Angels, CA, USA) で細胞溶液中の M1 Mø への極性化度を測定した。データ解析は,コンピューターソフトウェアである FLOWJO (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) で行った。

#### 6. 形態学的解析

骨標本の作製と歯槽骨吸収度の解析は、Abe<sup>31)</sup> らの方法を一部改変して行った。すなわち、 採取したマウスの頭部を 10 分間煮沸した後、軟組織を除去した。その後、30%過酸化水素 (ナカライテスク、京都) で 12 時間漂白し、6%次亜塩素酸ナトリウム水溶液(ナカライテ スク) で5秒間中和した後、0.5%エオジン(武藤化学株式会社、東京) で5分間、1%メチレ ンブルー(Merk KGak, Darmstadt, Germany) で 10秒間、染色した。水洗して十分に乾燥し た後、実体顕微鏡(SZ-LW61 T2: OLYMPUS、東京) にて骨吸収度を測定した。測定は、両 隣在歯の骨吸収が波及する部分も含めて、第一大臼歯の遠心口蓋側裂溝、遠心口蓋側咬頭、 第二大臼歯の近心口蓋側咬頭,口蓋側裂溝,遠心口蓋側咬頭,そして第三大臼歯の口蓋側咬 頭の6点からセメントエナメル境での垂直的距離をそれぞれ測定し,骨吸収度を算出した。

#### 7. 遺伝子発現の解析

マウスから採取した歯肉組織を, RNA の安定作用がある RNAlater (QUIAGEN, Hilden, Germany) に直ちに浸漬し, *Il-6 と C-X-C motif ligand (Cxcl) 2* の遺伝子発現量を real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で定量解析した。

- RNA の抽出: RNA は、シリカ膜への吸着を利用した RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。なお、RNA 抽出過程で混入する DNA は、Kit 付属の gDNA Eliminator スピンカラム (QIAGEN)を使用して除去した。RNA の濃度と純度は、Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Science)を用いて 260 nm と 280 nm の波長での吸光度とその比を用いて 測定した。全ての RNA の純度は、A260/A280 の値が 1.8~2.2 の間であることを確認した。
- 2) 逆転写反応:抽出した RNA の濃度を RNase-free Water (QIAGEN) で調整した溶液 16 µL と, SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を混合して、全量 20 µL と した。これを、25°C で 10 分間熱処理してオリゴ dT プライマーをアニーリングした。そ して、42°C で 60 分間熱処理して RNA を DNA へ逆転写した後、85°C で 5 分間酵素を不 活化して、cDNA を合成した。
- 3) RT-PCR 法: PCR 反応は, cDNA 合成後の反応液を 10 倍に希釈した溶液を,表1 に示し たセンスならびにアンチセンス PCR プライマー(10 μM), 2 × PowerSYBER Green PCR

Master Mix (Thermo Fisher Scientific), そして RNase-free Water と混合し, 95°C で 10 分 間の 2 本鎖 DNA の変性後, 95°C で 15 秒間の熱変性, 60°C で 1 分間のアニーリングおよ び伸長反応を 40 サイクル行った。この反応は 7300 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いて行い,その際に PCR 産物が発する蛍光量を SDSv1.X with RQ Software (Thermo Fisher Scientific)にて測定した。なお, *II-6 と Cxcl2* の mRNA 量は, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*)の mRNA 量を内部対照として,比較 Ct 値法にて定量し,相対発現量として示した。*II-6*, *Cxcl2*, さらに *Gapdh* のプライマー は,オンラインソフトウェアである Primer3 (http://Frodo.wi.mit.edu/)を用いて,増幅サ イズ 150~200 bp, プライマーサイズ 20 塩基, GC 含有量 45~55%, Tm 値 57~58°C の条件 で設計して (表 1)合成し,理論上の特異的な増幅をオンラインソフトウェアである NCBI Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)を用いて確認した。

#### 8. 組織学的解析

各群から採取した上顎骨を 4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH7.4:富士フィルム和光純薬) に1日間浸漬して,組織固定を行った。その後,10% EDTA 溶液 (pH 8.0:ナカライテスク) に1週間浸漬させて硬組織を脱灰した。脱灰が終了した組織は,上昇アルコール系列で脱水 後にキシレンに十分浸漬させた後,真空自動固定包埋装置 (VRX-23,サクラファインテッ クジャパン,東京)を用いて,組織固定用パラフィンワックス (ティシュー・テックパラフ ィンワックス II 60,サクラファインテックジャパン)で包埋した。これをミクロトーム (HM335E: MICROM,横浜) にて 4 μm 厚の組織切片に薄切した。切片をアミノシランで コーティングされたスライドガラス(松浪硝子工業,東京)に載せ,キシレンを用いて脱パ ラフィンを行った後,無水エタノールから70%エタノールに浸漬させて再水和を行った。

- 歯周組織の観察:ヘマトキシリン・エオジン染色(H-E 染色:富士フィルム和光純薬) を行った後,70%から無水エタノールおよびキシレンにて脱水し,Entellan New (Merck KGak, Darmstadt, Germany)を用いて封入した。乾燥後,光学顕微鏡 (DP70: OLYMPUS)にて組織像を観察し,撮影(記録画像サイズ 4,080 × 3,072 pixel)した。
- 2) M1 Møの局在の観察:歯周組織のM1 Møは、蛍光免疫染色を用いて、F4/80とCD80の二重 陽性像として観察した。組織切片は0.5 M EDTA溶液 (pH8.0; Thermo Fisher Scientific)を PBSにて1 mMに希釈した溶液に浸漬し、95°Cで15分間保持して抗原の賦活化を行った。 室温で冷却後、5% BSA含有PBS溶液に室温で30分間浸漬して、非特異的抗原のブロッキ ングを行った。PBSで1回洗浄後、5% BSA含有PBS溶液で希釈したFITC標識ラット抗マウ スF4/80抗体(最終濃度1 µg/mL, Clone BM8, Biolegend)とAPC標識ラット抗マウス CD80抗体(最終濃度0.4 µg/mL, Clone 16-10A1, Biolegend)を添加して、4°Cで12時間, 暗所で反応させた。その後、Fluoro-shield Mounting Medium with 4',6-diamidino-2phenylindole (DAPI: Abcam, Cambridge, UK)で核の染色と封入を行った。画像は、蛍 光顕微鏡(DP70: OLYMPUS)を用いて撮影(記録画像サイズ4,080×3,072 pixel)した。

#### 9. 統計処理

各実験系における統計解析は、差の検定には one-way analysis of variance (one-way ANOVA)

11

を用い, さらに多重比較検定を Tukey's multiple comparison test で行った。各々の統計処理に は, GraphPad Prism8 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA)を用いて検定を行い, p<0.05 を有意差ありと判定した。

#### 結果

#### HMGB1 が Mø への極性化に与える影響

1) in vitro における検討

マウスの骨髄由来単球細胞を macrophage colony stimulating factor で分化させた Møに, LPS, Disulfide rhHMGB1, あるいは抗 HMGB1 抗体を添加し, 4 日後に M1 Mø に極性化した細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

rhHMGB1 を添加した群では、無添加群と比較して、マウス骨髄由来 Mø が M1 Mø へ極性 化した割合(M1 Mø; Live<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>細胞の数/全 Mø; Live<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>細胞の数) は有意に増加した。その極性化度は、LPS 添加群と同程度であった。一方、抗 HMGB1 抗体 を添加した群では、無添加群と比較して、マウス骨髄由来 Mø が M1 Mø に極性化した割合に 有意差はなかった(p<0.05)。(図 2)

2) in vivo における検討

各群におけるマウスの腹腔内の M1 Mø の数と,全 Mø における M1 Mø 割合をフローサイ トメトリーで解析した。

LysM<sup>Cre/+</sup>-Hmgb1<sup>ff</sup>群とWT + anti-HMGB1群では,WT 群と比較して,腹腔内液中のM1 Møの数と割合が有意に減少した(p<0.05)。(図3)

#### HMGB1 が歯周組織の M1 Mø への極性化に与える影響

1) 歯肉組織中の全 Mø における M1 Mø の数と割合

各群における,歯肉中の M1 Mø の数と,全 Mø における M1 Mø の割合をフローサイトメトリーで解析した。

WT 群では,結紮によって M1 Mø の数と割合が増加傾向にあった。一方,WT + anti-HMGB1 群では,歯肉組織中の M1 Mø の数が有意に少なく,M1 Mø の割合が増加傾向にあ った。LysM<sup>Cre/+</sup>-Hmgb1<sup>ff</sup>群では,歯肉組織中の M1 Mø の数と割合が増加傾向にあった (p< 0.05)。(図 4)

2) 歯周炎の歯肉組織中における M1 Møの局在

各群における、歯肉中の M1 Møの局在を免疫染色で検討した。

WT 群の歯周炎の歯周組織では、歯肉結合組織に M1 Mø が多く局在した。一方で、

LysM<sup>Cre/+</sup>-Hmgb1<sup>ff</sup>群とWT + anti-HMGB1 群では,WT 群と比較して,歯肉結合組織に局在す

る M1 Mø は減少する傾向にあった。(図 5)

#### HMGB1 が歯周炎の進行に与える影響

1) 歯槽骨吸収度

各群における歯槽骨吸収度を解析した。

WT 群では,結紮によって歯槽骨吸収度が増加した。一方,Lys $M^{Cre'+}$ -Hmgb1<sup>ff</sup> 群と WT + anti-HMGB1 群では,結紮すると歯槽骨吸収度は増加傾向にあったが,WT 群のそれよりも少なかった (p < 0.05)。(図 6)

2) 歯周炎の歯周組織中の炎症性サイトカインとケモカインの遺伝子発現

14

各群における, 歯肉中の *Il-6 と Cxcl2* の遺伝子発現を RT-PCR 法で解析した。

WT 群では,結紮によって *II-6* の遺伝子発現は増加傾向にあり,*Cxcl2* の遺伝子発現は有意に増加した。一方,LysM<sup>Cre/+</sup>-Hmgb1<sup>ff</sup> 群と WT + anti-HMGB1 群では,結紮すると *II-6* と *Cxcl2* の遺伝子発現は増加傾向にあったが,WT 群のそれよりも少なかった(p<0.05)。(図

7)

#### 考察

HMGB1 は、炎症性メディエーターとしてサイトカインの産生を促進し、急性および慢性の様々な炎症性疾患に関与する重要な分子である<sup>15)</sup>。Yoshihara らは、歯周炎においては、抗HMGB1 抗体が炎症と歯槽骨吸収を抑制すると報告した<sup>26)</sup>。しかし、その詳細なメカニズムについては未だ不明である。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 Møと HMGB1 の関連に着目して、HMGB1 が歯周組織に及ぼす免疫学的な影響を、*in vivo* と *in vitro* で検討した。その結果、歯周炎の歯周組織において、HMGB1 を抑制すると、Mø の M1 タイプへの極性化が抑制された。また、歯槽骨吸収が抑制されて、歯周炎の歯周組織 中の炎症性サイトカインの遺伝子発現が減少した。

本研究では,始めに,HMGB1が M1 Møの極性化に及ぼす影響を検討した。歯周炎の歯周 組織では,歯周病原細菌由来の LPS によって骨髄由来 Mø が M1 Møへ極性化する<sup>32)</sup>。本研 究では, *in vitro* で rhHMGB1 タンパクを添加すると,骨髄由来の Mø を M1 タイプに極性化 させることが明らかとなった (図 2)。また, *in vivo* においても,HMGB1 を抑制すると,腹 腔内の M1 Mø の割合が減少した (図 3)。これらの結果から,HMGB1 は,骨髄由来 Mø を M1 タイプに極性化させる重要な因子であることが示された。

次に、歯周炎組織において HMGB1 が M1 Mø の極性化に及ぼす影響を検討した。Alvarez らの報告のとおり、炎症の急性期では歯槽骨破壊は進行し、M1 Mø への極性化が優位である ことが報告されている<sup>7)</sup>。一方で、炎症が遷延して慢性化あるいは消退に向かうと、M2 Mø の極性化が優位な環境へと変化する<sup>7</sup>。そこで本研究では、歯槽骨破壊が急激に進行する炎症の急性期に着目した。歯周炎モデルマウスにおいて HMGB1 を抑制すると、歯周炎の発症から3日後で、歯肉中の M1 Mø の数と、全 Mø 中の M1 Mø の割合が減少傾向にあった(図3)。この時、LysM<sup>Cret</sup>-Hmgb1<sup>67</sup>群と WT + anti-HMGB1 群の歯周炎組織中では、M1 Mø の極性化を抑制する割合は同程度であった。この結果と、Yoshihara ら<sup>25)</sup> が報告した、歯肉上皮細胞と比較して Mø がより多くの HMGB1 を分泌するという結果を合わせて考察すると、歯周炎の病態においては Mø から分泌される HMGB1 が重要な役割を持つと考えられる。また、HMGB1 を抑制すると、歯周炎組織で血管が多い歯肉結合組織において、M1 Mø の局在は減少する傾向にあった(図4)。したがって、M1 Mø は HMGB1 を分泌するという報告<sup>33)</sup> と合わせて考察すると、HMGB1 によって M1 へと極性化した Mø は、オートクライン的に歯周炎組織中の HMGB1 を増加させて、急性炎症をさらに増悪させる可能性がある。

最後に、HMGB1 が歯周炎組織の炎症反応に及ぼす影響を検討した。過去の報告では、歯 周炎組織に浸潤した M1 Mø は、IL-1β、IL-6、IL-12、そして TNF-α などの炎症性サイトカイ ン<sup>34)</sup> や CXCL-2 と CXCL-10 などのケモカインを分泌して<sup>35)</sup> リンパ球を活性化する。活性化 したリンパ球は、近傍の歯肉線維芽細胞、上皮細胞、そして血管内皮細胞に作用することで サイトカインストームと呼ばれる過剰な免疫応答を引き起こす<sup>36,37)</sup> ことが知られている。 本研究では、歯周炎組織で HMGB1 を抑制すると、*II-6 と Cxcl2* の遺伝子発現が減少した(図 5)。IL-6 は、歯周炎の歯周組織において炎症を促進させるサイトカインであることや<sup>38)</sup>、 Th17 細胞を活性化することが明らかとなっている<sup>39)</sup>。また、Th17 細胞は、分泌するサイト カインによって破骨細胞を活性化することで,骨破壊を主兆候とする疾患に関わる重要なリ ンパ球であることが,近年報告されている<sup>40)</sup>。さらに,CXCL-2 は,好中球を化学走化性に 炎症組織に遊走させて,炎症反応を増幅させることが知られている<sup>41)</sup>。以上の報告と本研究 の結果を合わせて考察すると,急性炎症の初期には,HMGB1 が Mø を M1 タイプに極性化 させ, M1 Mø から分泌される IL-6 や CXCL-2 の量を増加させることで炎症を増幅させると 考えた。

歯周炎と同じ炎症性骨破壊疾患である慢性関節リウマチにおいては、HMGB1 が TNF-α, IL-1β, そして IL-6 などの炎症性サイトカインの発現を増強して、炎症を促進することで骨 破壊を誘導する<sup>42)</sup>ことが報告されている。一方で、細胞の傷害などによって DAMPs として 細胞外へ放出された HMGB1 は、細菌感染の有無に関わらず破骨細胞の分化や核の融合を活 性化する<sup>43)</sup>。本研究においても、抗 HMGB1 抗体による HMGB1 の中和と HMGB1 の遺伝子 ノックアウトによる HMGB1 の産生抑制によって、歯槽骨の吸収が抑制された(図 6)。本研 究の結果と合わせて考察すると、歯周炎組織に分泌された HMGB1 は、M1 Mø への極性化を 介してオートクラインおよびパラクライン的に産生されて、炎症を増悪すると同時に、破骨 細胞を活性化させて、歯周組織の破壊を誘導する可能性がある。これらの詳細な関係につい ては、今後さらに検討する必要がある。

本研究の一連の結果から、歯周炎の急性期において、HMGB1は、MøをM1タイプに極性 化させることで、急性期の炎症反応を延長させて、歯槽骨の吸収を促進させる可能性がある。

18

これは、歯周炎の病態における複雑な免疫学的メカニズムに果たす HMGB1 の役割を解明す る一助となる。今後は、歯周炎の歯周組織における遷延化した炎症反応に対する HMGB1 の 影響を検討することで、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

HMGB1は、M1 Møの極性化を促進して炎症反応を増悪させることで、歯周組織の破壊を

進行させる。

#### 謝辞

稿を終えるにあたり,終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総 合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に心から感謝致し ます。また,抗 HMGB1 抗体(#10-22)をご提供下さった岡山大学大学院医歯薬学総合研究 科生体制御科学専攻薬理学講座の西堀正洋名誉教授,様々な面にわたり貴重な御助言と御協 力を下さいました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周 病態学分野の山本直史准教授と井手口英隆助教,元岡山大学病院歯周科講師で現神戸常盤大 学口腔保健学科の山城圭介教授,ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

### 表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態学分野(指導:高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第63回 日本歯周病学会 秋季学術大会(2020年10月,小倉)

第154回 日本歯科保存学会 春季学術大会(2021年6月, 鹿児島)

## 引用文献

- Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* 15: 30-44, 2015.
- 2. Chekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* **64**: 57-80, 2014.
- 3. Offenbacher S. Periodontal disease: pathogenesis. Ann Periodontol 1: 821-878, 1996.
- 4. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* **26**: 230-242, 1991.
- Son M, Porat A, He M, Suurmond J, Santiago-Schwarz F, Andersson U, Coleman TR, Volpe BT, Tracey KJ, Al-Abed Y, Diamond B. C1q and HMGB1 reciprocally regulate human macrophage polarization. *Blood* 128: 2218-2228, 2016.
- 6. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**: 13, 2014.
- Alvarez C, Monasterio G, Cavalla F, Cordova L, Hernandez M, Heymann D, Garlet GP, Sorsa T, Parnanen P, Lee H, Golub L, Vernal R, Kantarci A. Osteoimmunology of oral and maxillofacial disease: Translational applications based on biological mechanism. *Front Immunol* 10: 1664, 2018.
- 8. Bianchi ME, Beltrame M. Upwardly mobile proteins workshop. The role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep* 1: 109-114, 2000.
- Müller S, Ronfani L, Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med* 255: 332-343, 2004.
- Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtländer T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* 22: 276-280, 1999.
- Tsung A, Tohme S, Billiar TR. High-mobility group box-1 in sterile inflammation. *J Intern* Med 276: 425-443, 2014.
- Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 22: 5551-5560, 2003.

- van Zoelen MAD, Yang H, Florquin S, Meijers JCM, Shizuo A, Arnold B, Nawroth PP, Bierhaus A, Tracey KJ van der Poll T. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high mobility group box 1-induced inflammation *in vivo*. *Shock* **31**: 280-284, 2009.
- 14. Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, Han D, Watanabe T, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Shimura S, Karasawa T, Yonekura H, Yamaomoto H. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *J Immunol* 186: 3248-3257, 2011.
- 15. Yang H, Wang H, Chavan SS, Anderson U. MD-2 is required for disulfide HMGB1dependent TLR4 signaling. *J Exp Med* **212**: 5-14, 2015.
- Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. J Intern Med 255: 320-331, 2004.
- 17. Wang D, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M. Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody inhibits hemorrhage-induced brain injury and improved neurological deficits in rats. *Sci Rep* **7**: 46243, 2017.
- Cecchinato V, D'Agostino G, Raeli L, Nerviani A, Schiraldi M, Danelon G, Manzo A, Thelen M, Ciurea A, Bianchi ME Rubarteli A, Pitzalis C, and Uguccioni M. Redox-mediated mechanisms fuel monocyte responses to CXCL12 / HMGB1 in active rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 9: 2118, 2018.
- Kokkola R, Sundberg JL, Aveberger AC, Palmblad K, Yang H, Tracey KJ, Andersson U, Harris HE. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum* 48: 2052-2058, 2003.
- 20. Kanellakis P, Agrotis A, Kyaw TS, Koulis C, Ahrens I, Mori S, Takahashi HK, Liu K, Peter K, Nishibori M, Bobik A. High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced artherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 313-319, 2011.
- 21. Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Otani N, Tomura S, Shima K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M. Antihigh mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol* 72: 373-384, 2012.
- 22. Zhang FF, Morioka N, Harano S, Nakamura Y, Liu K, Nishibori M, Hisaoka-Nakashima K, Nakata Y. Perineural expression of high-mobility group box -1 contributes to long-lasting

mechanical hypersensitivity via matrix metalloprotease-9 upregulation in mice with painful peripheral neuropathy. *J Neurochem* **136**: 837-850, 2016.

- Luo L, Xie P, Gong P, Tang XH, Ding Y, Deng LX. Expression of HMGB1 and HMGN2 in gingival tissue, GCF and PICF of periodontitis patients and peri-implantitis. *Arch Oral Biol* 56: 1106-1111, 2011.
- 24. Yu L, Zhou C, Wei Z, Shi Z. Effect of combined periodontal-orthodontic treatment on NODlike receptor protein 3 and high mobility group box-1 expressions in patients with periodontitis and its clinical significance, *Medicine*, **98**: 17724, 2019.
- 25. Ebe N, Hara-Yokoyama M, Iwasaki K, Iseki S, Okuhara S, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Watanabe A, Akizuki T, Watanabe H, Yanagishita M, Izumi Y. Pocket epithelium in the pathological setting for HMGB1 release. *J Dent Res* **90**: 235-240, 2011.
- 26. Yoshihara-Hirata C, Yamashiro K, Yamamoto T, Aoyagi H, Ideguchi H, Kawamura M, Suzuki R, Ono M, Wake H, Nishibori M, Takashiba S. Anti-HMGB1 neutralizing antibody attenuates periodontal inflammation and bone resorption in a murine periodontitis model. *Infect Immun* 86: 00111-001118, 2018.
- 27. Karuppagounder W, Giridharan VV, Arumugam S, Sreedhar R, Palaniyandi SS, Krishnamurthy P, Quevedo J, Watanabe K, Konishi T, Thandavarayan R. Modulation of macrophage polarization HMGB1-TLR2/TLR4 cascade plays a crucial role for cardiac remodeling in senescence-accelerated prone mice. *PLoS ONE* 11: 0152922, 2016.
- 28. Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* 21: 3904-3916, 2007.
- 29. Yanai H, Matsuda A, Jianbo A, Koshiba R, Nishio J, Negishi H, Ikushima H, Onoe T, Yoshida N, Taniguchi T. Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection *PANS* **110**: 20699-20704, 2013.
- Tevlin R, McArdle A, Chan, C, Pluvinage J, Walmsley GG, Wearda T, Marecic O, Hu MS, Paik KJ, Kshemendra SY, Atashroo DA, Zeilins ER, Wan DC, Weissman IL, Longaker MT. Osteoclast derivation from mouse bone marrow. *J Vis Exp* 6: 52056, 2014.
- 31. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods* **394**: 49-54, 2013.
- 32. Wang J, Li R, Peng Z, Hu B, Rao X, Li J. HMGB1 participates in LPS-induced acute lung injury by activating the AIM2 inflammasome in macrophage and inducing polarization of M1

macrophage via TLR2, TLR4, and RAGE/NF- $\kappa\beta$  signaling pathways. *Int J Mol Med* **45**: 61-80, 2020.

- 33. Lolmede K, Campana L, Vezzoli M, Bosurgi L, Tonlorenzi R, Clementi E, Bianchi ME, Cossu G, Manfredi AA, Brunelli S, Rovere-Querini P. Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways. *J Leukoc Biol* 85: 779-87, 2009..
- 34. Yu T, Zhao L, Huang X, Ma C, Wang Y, Zhang J, Xuan D. Enhanced activity of the macrophage M1/M2 phenotypes and phenotypic switch to M1 in periodontal infection. J Periodontol 87: 1092-1102, 2016.
- 35. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* **14**:33-53, 1997.
- 36. Taylor, J.J. Cytokine regulation of immune response to Porphyromonas gingivalis. *Periodontol 2000* **54**: 160-194, 2010.
- 37. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* **34**: 235-249, 1976.
- 38. Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis* **4**: 43-47,1998.
- 39. Dutzan N, Abusleme L, Bridgeman H, Greenwell-Wild T, Zangerle-Murray T, Fife ME, Bouladoux N, Linley H, Brenchley L, Wemyss K, Calderon G, Hong BY, Break TJ, Bowdish DME, Lionakis MS, Jones SA, Trinchieri G, Diaz PI, Belkaid Y, Konkel JE, Moutsopoulos NM. On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity* 46: 133-147, 2017.
- 40. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: key stone, pathobionts, and host response. *Trends in Immunol* **35**: 3-11, 2014.
- 41. Fillipo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Roojin N, Hartmann K, Gunzer M, Roers A, Hogg N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* **121**: 4930-4937, 2013.
- 42. Nefla M, Holzinger D, Berenbaum F, Jacques C. The danger from within: alarmins in arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **12**: 669-683, 2016.
- 43. Oyama M, Ukai T, Tamashita Y, Yoshimura A. High-mobility group box 1 released by traumatic occlusion accelerates bone resorption in the root furcation area in mice. *J Periodontal Res* **56**: 186-194, 2021.

#### 図の説明

#### 図 1. 歯周炎モデルマウス作製プロトコル

mAbは,抗HMGB1抗体 #10-22を腹腔内投与したことを示す。

#### 図 2. HMGB1 が骨髄由来 Møの極性化に及ぼす影響

骨髄由来 Mø の培養系に lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* O111: B4 由来, 10 ng/mL), Disulfide rhHMGB1 (rhHMGB1, 10 µg/mL), 抗 HMGB1 抗体 (10 ng/mL) をそれぞ れ添加し, 各培養条件下での M1 Mø へ極性化した細胞をフローサイトメトリーで解析した。

(A) 各細胞表面マーカー陽性細胞の分布を示す。

ゲーティング:Live<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>細胞

(B) M1 Mø (Live<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>細胞)の割合を示す。

one-way ANOVA で有意差を認めた (p= 0.0020)。さらに, Tukey's multiple comparison

test を用いて検定した(\*: p<0.05)。

6匹のマウス骨髄由来 Mø を用いた各々独立した実験の平均値と標準偏差を示す。

#### 図3. HMGB1 が腹腔内 Møの極性化に及ぼす影響

腹腔内液中の細胞をフローサイトメトリーで解析した。

(A) 各細胞表面マーカー陽性細胞の分布を示す。

Un-stained は抗体未使用のバックグランドを示す。

ゲーティング:Live<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>細胞

(B) M1 Mø (Live<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>細胞)の数を示す。

one-way ANOVA で有意差を認めた (p<0.0020)。さらに, Tukey's multiple comparison test を用いて検定した (\*:p<0.05)。

(C) 全 Mø に対する M1 Mø の割合を示す。

one-way ANOVA で有意差を認めた (p= 0.0329)。さらに, Tukey's multiple comparison test を用いて検定した (\*: p<0.05)。

6匹のマウスの腹腔内 Møを用いた各々独立した実験の平均値と標準偏差を示す。

#### 図4. HMGB1 が歯周組織の Mø の極性化に及ぼす影響

歯肉組織中の細胞をフローサイトメトリーで解析した。

(A) 各細胞表面マーカー陽性細胞の分布を示す。

ゲーティング:Live<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>細胞

(B) M1 Mø (Live<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>)の数を示す。

one-way ANOVA で有意差を認めた(p= 0.0065)。さらに, Tukey's multiple comparison test を用いて検定した(\*:p<0.05)。

(C) 全 Mø に対する M1 Mø の割合を示す。

one-way ANOVA で有意差を認めなかった (p=0.07736)。

WT に 5 匹, LysM<sup>Cre/+</sup>-Hmgb1<sup>ff</sup>と WT + anti-HMGB1 にはそれぞれ 4 匹のマウスから得た腹 腔内 Mø を用いた,各々独立した実験の平均値と標準偏差を示す。白抜きバー:非結紮側, 黒バー:結紮側

#### 図5. HMGB1 が歯周組織の Mø の局在に及ぼす影響

歯肉組織中の M1 Møの局在を蛍光免疫染色で調べた。

- (A) 観察した歯周組織部位の H-E 染色像(スケールバー: 100 µm) を示す。
- (B) 歯周組織の免疫染色像(スケールバー: 50 µm)を示す。
- T: Tooth, E: Epithelium, C: Connective tissue, B: Bone

いずれも、独立したマウス(各群3匹で3切片ずつ)の代表的組織像である。

#### 図6. HMGB1 が歯周炎組織での歯槽骨吸収に与える影響

マウスの上顎骨の骨標本を用いて、歯槽骨吸収量を調べた。

- (A) 結紮歯周囲の歯槽骨吸収像(第一大臼歯から第三大臼歯までの口蓋側)を示す。
- (B) 歯槽骨吸収量を示す。

one-way ANOVA で有意差を認めた (p<0.0001)。さらに, Tukey's multiple comparison test を用いて検定した (\*:p<0.05)。

WT に 10 匹, LysM<sup>Cre/+</sup>-Hmgb1<sup>ff</sup>と WT + Anti-HMGB1 にはそれぞれ 4 匹のマウスを用い,

各群の代表的像を示した。各々独立した実験の平均値と標準偏差を示す。白色ドット:非結 紫側,灰色ドット:結紮側

#### 図7. HMGB1 が歯周炎組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現に与える影響

歯肉結合組織中の Il-6 および Cxcl2 の mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法で調べた。

(A) Il-6の発現量を示す。

one-way ANOVA で有意差を認めた (p= 0.0311)。さらに, Tukey's multiple comparison test を用いて検定した (\*: p<0.05)。

(B) *Cxcl2* の発現量を示す。

one-way ANOVA で有意差を認めた (p= 0.0003)。さらに, Tukey's multiple comparison test を用いて検定した (\*: p<0.05)。

各遺伝子の発現量を内在性コントロールである Gapdh の発現量で補正し、そして各群内で 非結紮側を基準として結紮側の発現量を示す。各群 4 匹ずつから得られた歯肉結合組織を用 いて各々独立した実験の平均値と標準偏差を示す。白抜きバー:非結紮側、黒バー:結紮側

# 表の説明

# 表 1. RT-PCR 法で用いた PCR プライマー

標的遺伝子	塩基配列	増幅される長さ (bp)
Gapdh	F:5' -CACCATGGAGAAGGCCGGGG- 3'	185
	R:5' -GACAAGCTTCCCGTTCTCAG- 3'	
<i>II-6</i>	F:5' -GCCTTCTTGGGACTGATGCT- 3'	99
	R:5' -GACAGGTCTGTTGGGAGTGG- 3'	
Cxcl2	F:5' -GCTGTCCCTCAACGGAAGAA- 3'	72
	R:5' -CAGGTACGATCCAGGCTTCC- 3'	

プライマー塩基配列および増幅産物を表に示す。F, Forward; R, Reverse