

氏名	青柳 浩明		
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5698号		
学位授与の日付	平成30年3月23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 (HMGB1) 誘導性の炎症反応はマウス抜歯窩の骨治癒を促進する		
論文審査委員	上岡 寛 教授	浅海 淳一 教授	中野 敬介 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

抜歯窩の創傷治癒は、血液凝固、肉芽形成、幹細胞の遊走および増殖、血管新生、線維芽細胞の増殖およびコラーゲン合成が行われる。そしてリモデリングへと進み骨形成は終了する。この創傷治癒において初期の炎症は、好中球やマクロファージなどが遊走しさまざまなサイトカインを産生し炎症の増幅、宿主防御そして組織修復の機能を有している。このことから創傷治癒の炎症は必須であると考えられる。

一方、High mobility group box 1 (HMGB1) は、真核生物に存在する非ヒストン DNA 結合タンパク質であるが、組織の損傷や壊死によって細胞外へ放出され炎症性サイトカイン遺伝子の発現を増強する炎症メディエーターとして機能する。

近年、HMGB1 は損傷を受けた組織の創傷治癒過程において、組織再生、血管新生そして軟骨内骨化の骨折治癒を促進するとの報告もある。しかし、抜歯後の創傷治癒は軟骨内骨化とは過程が異なるため、HMGB1 がこの創傷治癒過程においてどのように影響を及ぼすか、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。

そこで我々は、抜歯後に創傷組織から分泌された HMGB1 が初期の急性炎症を誘導することで、創傷治癒に関与する免疫細胞の遊走を制御し、その後の治癒を促進すると仮説を立て、HMGB1 が創傷治癒に及ぼす影響の詳細メカニズムについて調べた。

### 【材料および方法】

1. 中和抗体：ラット由来IgG2aの抗HMGB1モノクローナル抗体と、ラット由来IgG2aの対照モノクローナル抗体を用いた。西堀正洋教授（医歯薬学総合研究科 生体制御科学専攻 生体薬物学制御学講座 薬理学分野）から供与を受けた。
2. 抜歯モデルマウスの作製：抗HMGB1抗体群（2 mg/匹）を抜歯の1日前と抜歯の1, 2, 3日後の計4回にそれぞれずつ腹腔内投与した。対照抗体群（2 mg/匹）を同様の日程で腹腔内投与した。そして、全身麻酔を行った後、上顎左側第2大臼歯を抜歯し抜歯モデルマウスを作成した（岡山大学動物実験委員会承認（OKU-2016214））。抜歯から1, 3, 5, 7日が経過したマウスを、炭酸ガスを使用して安楽死させて、以下の解析を行った。
3. ミエロペルオキシダーゼ活性の検出：抜歯窩周囲組織の炎症反応を評価するため、好中球に特異的なミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性の代謝産物と化学的に反応して炎症部位で発光する分子プローブとして使用した分子イメージング解析を行った。
4. 病理組織学的解析
  - ① 抜歯窩組織の HMGB1 の局在：抜歯後 1, 3 日目の HMGB1 の局在は、免疫化学染色法を用いて観察した。
  - ② 抜歯窩組織のマクロファージ（CD68）と血管内皮細胞（CD31）の局在：抜歯後 5 日目の抜歯窩周囲組織の CD68 と CD31 の局在を、免疫化学染色法を行い陽性細胞数をカウントした。

- ③ 抜歯窩組織の破骨細胞とオステオカルシン陽性細胞の局在：抜歯後 7 日目の抜歯窩周囲組織の破骨細胞の局在は TRAP 染色法を、オステオカルシンの局在は免疫蛍光染色法を行い、陽性細胞数をカウントした。
- ④ 抜歯窩組織の新生歯槽骨量の定量：抜歯後7日目の抜歯窩の新生歯槽骨は、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いた。抜歯組織の欠損範囲は、分界線を基準として、抜歯窩内における骨組織の面積の割合をImage Jを用いて、新生歯槽骨の面積を計測した。
- ⑤ 抜歯窩組織の全RNAの抽出および遺伝子発現解析：抜歯後7日目の対照抗体群と抗HMGB1抗体群の抜歯窩組織のmRNAを用いてcDNA Microarray解析を行った。抽出した全RNAは、株式会社DNAチップ研究所に受託し、SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いてcDNA Microarray解析を行った。cDNA Microarrayの結果から、HMGB1と直接的に制御に関わる遺伝子の中で発現量が減少した*IL-1β*, *VEGF-A*に注目し、別サンプルから抽出した全RNAを用いて定量RT-PCR解析を行った。

## 【結果】

1. 抜歯窩組織のHMGB1の動態：抜歯後1日目の対照抗体群では、歯肉上皮細胞と炎症性細胞のHMGB1は核外に移行していた。一方、抗HMGB1抗体群では、歯肉上皮細胞と炎症性細胞のHMGB1は核内に局在していた。抜歯後3日目の対照抗体群では、核外へ移行したHMGB1は核内に局在していた。
2. 抜歯窩組織における抗HMGB1抗体の抗炎症効果：対照抗体群では、抜歯後3日目でMPO活性を示すシグナル値が有意に上昇した。一方で、抗HMGB1抗体群では、対照抗体群と比較して抜歯後3日目のシグナル値に差があった。そして、抜歯後1, 5, 7日目においては、シグナル値の差はなかった。
3. 抗HMGB1抗体投与が抜歯窩のマクロファージと血管内皮細胞に及ぼす影響：対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群では、CD68陽性細胞の数は有意に少なかった。またCD31陽性細胞の数も同様に少なかった。
4. 抗HMGB1抗体投与が抜歯窩の破骨細胞と骨芽細胞に及ぼす影響：対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群では、TRAP陽性細胞数は有意に少なかった。またオステオカルシン陽性細胞は有意に少なかった。
5. 抗HMGB1抗体投与が抜歯窩の歯槽骨新生に及ぼす影響：対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群では、新生歯槽骨の面積は有意に少なかった。
6. 抗HMGB1抗体投与による抜歯窩組織のcDNA Microarray解析：Microarray解析では、56,608遺伝子を対象に発現解析を行った。今回、創傷治癒の遅延に関わる遺伝子は、抗HMGB1抗体投与によって発現量が減少している遺伝子群であると考え、67%以上に減少している遺伝子に注目した。さらに、その遺伝子内でも、HMGB1と直接的に制御に関わる遺伝子の中で発現量が減少した*IL-1β*, *VEGF-A*に注目した。その結果、対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群では、*IL-1β*は29%, *VEGF-A*は42%遺伝子発現量が減少した。
7. RT-PCRを用いたcDNA Microarray解析結果の検証：*IL-1β*と*VEGF-A*は、定量RT-PCR解析においても同様に、対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群では発現量は有意に減少した。

## 【考察】

本研究の結果から、抜歯による組織の損傷によって、歯肉上皮細胞や炎症性細胞でのHMGB1の核外移行が起こり、その後細胞外へ分泌される。抗HMGB1抗体投与によってHMGB1の核外移行が阻害されると、細胞外への分泌も阻害される。その結果、好中球の活動性を示すMPO活性は低下し、創傷治癒初期の炎症反応は抑制された。さらに、マクロファージと血管内皮細胞の損傷組織への集積も阻害された。一方で、血管新生関連因子である*IL-1β*と*VEGF-A*の遺伝子発現量も減少した。*IL-1β*の発現の減少は破骨細胞と骨芽細胞の分化をも阻害し、損傷組織における歯槽骨治癒は遅延したと考察した。

## 【結論】

抗HMGB1抗体を投与すると、抜歯窩周囲組織の歯肉上皮細胞および炎症性細胞でのHMGB1の核外移行および細胞外への分泌が抑制された。その結果、抜歯後の初期炎症が抑制され、その結果、抜歯後の初期炎症が抑制され、マクロファージ、血管内皮細胞の浸潤、破骨細胞、骨芽細胞の活性が抑制された。これらの結果、抜歯窩の歯槽骨治癒は遅延した。

## 論文審査結果の要旨

抜歯窩の創傷治癒は、炎症期、肉芽形成期、増殖期そしてモデリング期へと進むと考えられている。したがって、創傷後直ちに生じる急性炎症は治癒に必須であると考えられる。HMGB1は、真核生物に存在する非ヒストン DNA 結合タンパク質であるが、組織の損傷や壊死によって細胞外へ放出され炎症メディエーターとして機能する。一方、HMGB1は損傷を受けた組織の創傷治癒過程において、組織再生、骨の治癒を促進するとの報告もある。しかし抜歯後の創傷治癒過程において、歯周組織から分泌される HMGB1 がどのような働きをするのかに関しては未だ明らかでない。そこで、抜歯後に創傷組織から分泌された HMGB1 が初期の急性炎症を誘導することで、創傷治癒に関与する免疫細胞の遊走を制御し、その後の治癒を促進すると仮説を立て、HMGB1 が創傷治癒に及ぼす機能についてその詳細を調べた。

1. 抜歯窩組織のHMGB1の動態：抜歯モデルマウスにおいて、対照抗体群では、歯肉上皮細胞と炎症性細胞のHMGB1は核外に移行していた。一方、抗HMGB1抗体群では、核内にHMGB1は局在していた。
2. 抜歯窩組織における抗HMGB1抗体投与による抗炎症効果：対照抗体群では、抜歯後3日目でMPO活性を示すシグナル値が有意に上昇した。一方で、抗HMGB1抗体群では、対照抗体群と比較して抜歯後3日目のシグナル値は有意に低値であった。
3. 抗HMGB1抗体投与が抜歯窩のCD68（マクロファージ）とCD31（血管内皮細胞）に及ぼす影響：抜歯後5日目において、対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群では、CD68陽性細胞の数は有意に少なかった。またCD31陽性細胞数の数も同様に少なかった。
4. 抗HMGB1抗体投与が抜歯窩のTRAP（破骨細胞）とオステオカルシン（骨芽細胞）に及ぼす影響：抜歯後7日目において、対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群では、TRAP陽性細胞数は有意に少なかった。またオステオカルシン陽性細胞は有意に少なかった。
5. 抗HMGB1抗体投与が抜歯窩の歯槽骨新生に及ぼす影響：抜歯後7日目において、対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群では、新生歯槽骨の面積は有意に少なかった。
6. 抗HMGB1抗体投与による抜歯窩組織のcDNA Microarray解析：Microarray解析では、56,608遺伝子を対象に発現解析を行った。今回、創傷治癒の遅延に関わる遺伝子は、抗HMGB1抗体投与によって発現量が減少している遺伝子群であると考え、遺伝子発現の減少率が、対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群の67%以上減少している遺伝子に注目した。さらに、その遺伝子内でも、HMGB1と関連性の報告がある遺伝子の中で発現量が減少した*IL-1 $\beta$* 、*VEGF-A*に注目した。その結果、対照抗体群と比較して抗HMGB1抗体群では、*IL-1 $\beta$* は29%、*VEGF-A*は42%発現量が減少した。

以上のことから、抜歯による組織の損傷によって、歯肉上皮細胞や炎症性細胞の核内の HMGB1 は細胞外へ分泌されたが、抗 HMGB1 抗体投与によって HMGB1 の細胞外への分泌は阻害された。その結果初期の炎症反応は抑制された。さらに、マクロファージと血管内皮細胞の損傷組織への集積も阻害された。一方で、血管新生関連因子である *IL-1 $\beta$*  と *VEGF-A* の遺伝子発現量も減少した。*IL-1 $\beta$*  の発現の減少は破骨細胞と骨芽細胞の分化をも阻害し、損傷組織における歯槽骨治癒は遅延したと考察した。

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た。