

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

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

青柳 浩明

**HMGB1-induced inflammatory response promotes bone healing  
in murine tooth extraction socket**

Department of Pathophysiology-Periodontal Science,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Hiroaki AOYAGI

(平成 29 年 12 月 15 日受付)

## 緒 言

抜歯窩の創傷治癒過程は、血液凝固、炎症性浸潤を伴う肉芽形成、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<sup>1)</sup>。創傷治癒において初期の炎症では、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<sup>2)</sup>、宿主防御そして組織修復の機能を有している<sup>3)</sup>。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<sup>3)</sup>。

High mobility group box 1 (HMGB1) は、真核生物に存在する分子量 30 kDa の非ヒストン DNA 結合タンパク質であり、クロマチン構造変換因子として機能し、転写制御および DNA の修復に関与する<sup>4)</sup>。一方、HMGB1 は、組織の損傷や壊死によって細胞外へ放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs)<sup>5)</sup>として機能を促進している。細胞外へ分泌された HMGB1 は、toll-like receptor (toll 様受容体)<sup>6)</sup>や receptor for advanced glycation end-products (RAGE 受容体)<sup>7)</sup>によって認識され、NF- $\kappa$ B を活性化する<sup>8)</sup>。そして、tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) などの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<sup>6)</sup>。

近年、HMGB1は損傷を受けた組織の創傷治癒過程において、組織再生を促進するとの報告がある<sup>9)</sup>。HMGB1と組織再生の関連については、HMGB1が骨髄中のplatelet-derived growth factor receptor A (PDGFR $\alpha$ )陽性細胞の遊走と表皮細胞への分化を促進すると報告がある<sup>10)</sup>。さらに、ヘパリンと複合体を形成することでTNF- $\alpha$ およびvascular endothelial growth factor-A120 (VEGF-A120)の誘導を介して顕著な血管新生を促進することなどが報告されている<sup>11)</sup>。また、骨代謝時にHMGB1は破骨細胞<sup>12,13)</sup>と骨芽細胞の活性に関与することや<sup>14)</sup>、代表的な軟骨内骨化の治癒過程を示す骨折モデルマウスにおいて、HMGB1ゼラチンスポンゼルと結合した幹細胞シートが、骨折の治癒を促進することを報告した<sup>15)</sup>。よって、再生医療の分野においてもHMGB1への関心は高まっていると言える。しかし、抜歯の創傷治癒は、大腿骨骨折などに代表される軟骨内骨化とは治癒の過程が異なり、HMGB1がこのような歯周組織の創傷治癒過程においても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。

そこで本研究では、抜歯後に周囲組織から分泌されたHMGB1が初期の急性炎症を誘導し、創傷治癒に関与する免疫細胞の遊走を制御することによっ

て、治癒を促進するのではと仮説を立てた。そして本研究では、抗 HMGB1 抗体を投与した抜歯モデルマウスを作製し、抜歯窩における創傷治癒の過程を組織学的解析によって検討した。さらに、cDNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行うことによって、HMGB1 が創傷治癒に及ぼす影響のメカニズムの詳細についても検討した。

## 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 のアイソタイプコントロールモノクローナル抗体は，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. 動物

10週齢の C57BL/6J 野生型雌性マウス（平均体重 25 g: 日本クレア株式会社，東京）を，室温  $23 \pm 1$  °C，人工照明 8:00~20:00 に設定された岡山大学動物資源部門飼育施設で飼育し，実験に使用した。

### 3. 抜歯モデルマウスの作製

すべての動物実験は，岡山大学動物実験委員会承認（OKU-2016214）の下で実施した。抜歯モデルマウスは以下の 2 群を設定した。抗 HMGB1 抗体群；抗 HMGB1 モノクローナル抗体（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に投与した。対照抗体群；アイソタイプコントロールモノクローナル抗体（2 mg/匹）を、同様の日程で腹腔内に投与した。両群のマウスの腹腔内に、生理食塩水で 1 : 10 の濃度に希釈したペントバルビタール（ソムノペンチル：共立製薬，東京）0.1 mL/g を投与して全身麻酔を行った後，双眼顕微鏡（10 倍率：菊池光学，長野）下で上顎左側第 2 大臼歯を探針で抜歯し，抜歯モデルマウスを作製した。抜歯から 1（炎症期），3（肉芽期），5（増殖期），7（リモデリング期）日が経過したマウスを炭酸ガス（濃度：100%，5 分間）を使用して安楽死させて，下記の解析を行った（図 1）。

#### 4. ミエロペルオキシダーゼ活性の検出

マウスの抜歯窩周囲組織の炎症反応を評価するため，分子イメージング解析を行った。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 XenoLight Rediject Inflammation Probe (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を分子プローブとして使用した<sup>16)</sup>。分子プローブを 150  $\mu$ L ずつマウスの腹腔内に投与し，速やかに炎症部位および全身に到達する 10 分後に炭酸ガスを使用して安楽死させ，直ちに上顎骨を

摘出した。その後、分子イメージング画像撮影装置（IVIS<sup>®</sup> Spectrum : PerkinElmer）を用いて抜歯窩周囲組織からの発光を撮影した。得られた画像は、分子イメージング画像解析ソフト（Living image<sup>®</sup> software version 4.4 : PerkinElmer）を用いて解析した。発光画像の解析は、上顎左側第 2 大臼歯相当部の抜歯窩周囲組織における最大発光強度を示す部位を計測した。計測値は、計測部位における発光強度の最大値を算出し、各群 5 匹ずつのマウスを比較して検討した。

## 5. 病理組織学的解析

摘出した上顎骨を、4%パラホルムアルデヒド溶液（pH 7.4 : ナカライテスク、京都）中に浸漬して 1 日間の組織固定を行った。その後、脱灰のためにエチレンジアミン四酢酸（0.5 mol/L-EDTA 溶液、pH 8.0 : ナカライテスク）に 3 日に 1 回液を交換し 1 週間浸漬させた。その後、脱灰が終了した組織は、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、上昇アルコール系列で脱水後にキシレンに十分浸透させ、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, 東京）で包埋を行った。マイクロトーム（HM335E,

MICROM, 横浜) にて作製した 4  $\mu\text{m}$  厚の組織切片をコーティングアミノシラ  
ンスライドガラス (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 %エタノールにスライドガラスを  
浸漬させて再水和を行った。その後以下の病理組織解析を行った。

#### (1) 抜歯窩周囲組織の治癒過程の観察

抜歯後の治癒過程の観察は, ヘマトキシリン・エオジン染色(H-E 染色 : 和  
光, 大阪) を用いて行った。染色後に 70 %から無水エタノールおよびキシレ  
ンにて脱水し, Entellan New<sup>®</sup> (Merck KGak, Darmstadt, Germany) を用いて  
封入した。その後, 光学顕微鏡下 (DP70 : OLYMPUS<sup>®</sup>, 東京) にて組織像を  
撮影 (記録画像サイズ : 4,080  $\times$  3,072) し観察した。抜歯組織の骨欠損範囲は,  
分界線を基準とした。さらに, 抜歯窩内のエオジンに染色される領域を骨組  
織として抽出し, 骨組織を黒, 軟組織を白に変換した。そして, 原画を 2 値  
化し分界線を基準とした抜歯窩内における骨組織の面積の占める割合を計測  
した。原画を 2 値化しと面積の測定には Image J (NIH, Bethesda, MD, USA)  
を用いた。なお, 新生歯槽骨面積の計測は, 各群 3 匹ずつのマウスから作製  
した組織切片の中から無作為に 3 枚選択して行った。

## (2) 抜歯窩周囲組織の HMGB1 の局在

抜歯後 1 日目の抜歯窩周囲組織の HMGB1 の局在は、免疫化学的染色を用いて観察した。組織切片は、0.3 %過酸化水素メタノール溶液に室温で 30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を行った。0.5 M EDTA (pH 8.0 ; Thermo Fisher Scientific) をリン酸緩衝液 (PBS ; pH 7.4) で 1 mM に希釈した溶液に浸漬し、マイクロウェーブ (500 W, 2,450 Hz) を 3 分間照射して抗原の賦活化を行い、室温で徐冷した。一次抗体として、抗ウシ HMGB1 ラビットポリクローナル抗体 (1 mg/mL, pH 7.2 : Shinotest, 東京) を PBS で 1 : 100 の濃度に希釈して 4 °C で 24 時間反応させた。そして、avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC kit : Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) のビオチン標識二次抗体とアビジン-ビオチン標識酵素複合体を用いて免疫反応を行った。発色は 0.01 % 3,3'-ジアミノベンチジジン (DAB : ナカライテスク) 含有 0.05 M トリスヒドロキシトリスメチルアミノメタン塩酸バッファー (Tris-HCl, pH 7.6) を用いて行った。対比染色は、マイヤーヘマトキシリン染色液 (Merck KGaA) を用いて行った。蛍光顕微鏡 (DP70) を用いて観察し

た。なお、HMGB1の局在の観察は、各群1匹ずつのマウスから作製した組織切片の中から無作為に3枚選択して行った。

### (3) 抜歯窩周囲組織のオステオカルシンの局在

抜歯後7日目の抜歯窩周囲組織のオステオカルシンの局在を、免疫蛍光染色法を用いて観察した。組織切片を10% Non-Immune Goat Serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて30分間ブロッキングを行った後、0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて、マイクロウェーブ (500 W, 2,450 Hz) を3分間照射して抗原の賦活化を行い、室温で徐冷した。一次抗体として抗マウスオステオカルシンラビットポリクローナル抗体 (2.0 mg/mL, pH 7.4 : Takara-Bio, 東京) をPBSで1:1,000の濃度に希釈して4°Cで24時間反応させた。二次抗体反応、核染色および封入は(2)と同様に行った。

染色後の組織切片は、蛍光顕微鏡 (DP70) を用いて観察した。解析方法は、分界線を基準した抜歯窩組織内におけるオステオカルシン陽性細胞数をImage J (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いてカウントした。なお、陽性細胞数の計測は各群3匹ずつのマウスから作製した組織切片を無作為に3枚選択して行った。

#### (4) 抜歯窩周囲組織のマクロファージと血管内皮細胞の局在

抜歯後5日目の抜歯窩周囲組織のCD68発現を指標としたマクロファージの局在とCD31発現を指標とした血管内皮細胞の局在を、免疫組織化学的染色を用いて観察した。(2)と同様に内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を行った。抗原の賦活化は(3)と同様に行った。一次抗体は、抗CD68ラビットポリクローナル抗体(0.5 mg/mL : Abcam, Cambridge, UK), または抗CD31ラットモノクローナル抗体(0.5 mg/mL : Abcam)を4 °Cで24時間反応させた。そして、(2)と同様に免疫反応、発色そして対比染色を行った。染色後の組織観察および陽性細胞数をカウントは(3)と同様に行った。CD31に関しては、陽性細胞の管腔をカウントした。なお、陽性細胞数の計測は各群3匹ずつのマウスから作製した組織切片を無作為に3枚選択して行った。

#### (5) 抜歯窩周囲組織の破骨細胞の局在

抜歯後7日目の抜歯窩周囲組織の破骨細胞を、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(tartrateresistant acid phosphatase : TRAP)染色法を用いて観察した。組織切片は、通法に従ってTRAP染色液(Primarycell, 札幌)で染色を行った後、(1)と同様に封入した。その後、光学顕微鏡(DP70)を用いて組織像を観察

した。抜歯窩底部または新生歯槽骨表層に存在する 3 核以上である TRAP 陽性細胞を破骨細胞として、その細胞数を計測した。染色後の組織観察および陽性細胞数をカウントは (3) と同様に行った。なお、陽性細胞数の計測は各群 3 匹ずつのマウスから作製した組織切片を無作為に 3 枚選択して行った。

## 6. 全 RNA の抽出および遺伝子発現解析

抜歯後 7 日目の抜歯モデルマウスの抜歯窩周囲組織から全 RNA を抽出した。まず、抽出した上顎骨中の RNA の安定化を図るために、直ちに RNA 安定の作用がある RNAlater (QIAGEN, Hilden, Germany) に浸漬した。その後、トリミングした抜歯窩周囲組織を Lysing Matrix B, 2 mL tube (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) と FastPrep 24 (MP Biomedicals) を用いて粉砕した。組織の粉砕後、シリカ膜への吸着を利用した RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA の抽出を行った。なお、RNA 抽出過程で gDNA Eliminator スピンカラム (QIAGEN) を使用して混入した DNA を除去した。RNA の濃度と純度は、Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) 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、260 / 280 値が 1.8~2.2 の間であることを確認した。

## (1) cDNA Microarray 解析

対照抗体群と抗 HMGB1 抗体群の抜歯窩組織（抜歯後 7 日目）における網羅的遺伝子発現の探索を目的に、採取した抜歯窩の mRNA を用いて cDNA Microarray 解析を行った。抽出した全 RNA は、SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）を用いて cDNA Microarray 解析を行った。なお、アレイ反応および解析は、対照抗体群と抗 HMGB1 抗体群の 1 匹ずつのサンプルを株式会社 DNA チップ研究所（東京）に受託した。

## (2) 定量 RT-PCR 解析

cDNA Microarray の結果から、HMGB1 と関連性の報告があり、機能についてよく知られている遺伝子の中で発現量が減少した *IL-1 $\beta$* , *VEGF-A* に関して、別サンプルから抽出した全 RNA を用いて定量 RT-PCR（quantitative reverse transcription polymerase chain reaction）解析を行った。

- a) 逆転写反応:抽出した RNA 1  $\mu$ g を鋳型として、50  $\mu$ M oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer（Thermo Fisher Scientific）と 10 mM dNTP Mix（Thermo Fisher Scientific）を 1 : 1 で混合した 13  $\mu$ L の溶液を、65 °C で 5 分間熱処理をして、RNA

のステム・ループ構造を破壊した後に、氷上で 1 分間急冷反応させて Primer をアニールした。そして、5×First Strand Buffer, 0.1 M dithiothreitol, SuperScript III Reverse Transcription (全て Thermo Fisher Scientific), および RNase-free Water (QIAGEN) を 4 : 1 : 1 : 1 で混合した 20  $\mu$ L の溶液にて、50 °C で 1 時間の逆転写反応を行って、cDNA を合成した。その後、70 °C, 15 分間の加熱で逆転写酵素を不活化した。

- b) 定量 RT-PCR 法:PCR 反応は、cDNA 合成反応液を 10 倍希釈した溶液を、上記で作成したセンスならびにアンチセンス PCR プライマー (10  $\mu$ M), 2×Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), および RNase-free Water と混合し、95 °C で 15 秒の熱変性、60 °C で 1 分のアニリングと伸長反応のステップを 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 SDS v1.X with RQ Software (Thermo Fisher Scientific) にて測定した。なお、*IL-1 $\beta$*  と *VEGF-A* の mRNA 発現量は *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* の mRNA 量を内部対照として、比較 Ct 法にて定量し、相対発現量として示した。なお、*IL-1 $\beta$* ,

*VEGF-A* , そして *GAPDH* のプライマーは Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) 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 NCBI primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて確認した。

## 7. 統計処理

分子イメージングにおける統計処理は, 3 群間以上の差の検定には one-way analysis variance (one-way ANOVA) を用い, さらに多重比較検定を Tukey-Kramer test で行った。また, 組織学的解析と定量 RT-PCR 解析の統計処理における 2 群間の差の検定には, Student's *t*-test を用いた。

各々の統計処理には, JMP (version 12.0, SAS, Cary, NC, 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

### 抜歯周囲組織における HMGB1 の動態

HE 染色の結果、抜歯後 1 日目の対照抗体群と抗 HMGB1 抗体投与群の抜歯窩周囲組織の上部に多量の炎症性細胞の浸潤が見られた (図 2A, F)。また、

免疫化学染色の結果、抜歯後 1 日目の対照抗体群の抜歯窩組織では、歯肉上皮細胞と炎症性細胞の HMGB1 は核外および細胞質内に移行していた (図 2B, C)。一方、抗 HMGB1 抗体群の抜歯窩組織では、歯肉上皮細胞と炎症性細胞の HMGB1 は核内に局在していた (図 2G, H)。また、抜歯後 1 日目と比較して抜歯後 3 日目の対照抗体群の抜歯窩組織では、歯肉上皮細胞と炎症性細胞の HMGB1 は核内に局在していた (図 2D, E)。一方、抗 HMGB1 抗体群の抜歯窩組織では、歯肉上皮細胞と炎症性細胞の HMGB1 は核内に局在していた (図 2I, J)。

### 抜歯窩周囲組織における抗 HMGB1 抗体の抗炎症効果

対照抗体群の抜歯窩組織の MPO 活性を示すシグナル値では、抜歯後 3 日目で有意に上昇した。さらに、抜歯後 3 日目のシグナル値と比較して抜歯後 1

日目、5日目および7日目のシグナル値は有意に差があった（図 3A, B）。一方で、抗 HMGB1 抗体群の抜歯窩組織のシグナル値では、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差があった。そして、抜歯後 1, 5, 7 日目のシグナル値においては、差がなかった（図 3A, B）。

#### **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**

HE 染色の結果、抜歯後 5 日目の対照抗体群と比較して抗 HMGB1 抗体投与群の抜歯窩周囲組織の上部の炎症性細胞は多かった（図 4A, F）。対照抗体群と比較して抗 HMGB1 抗体群では、抜歯窩組織に集積するマクロファージ（CD68 陽性細胞）の数は有意に少なかった（図 4C, H）。また血管内皮細胞（CD31 陽性細胞）の数も同様に少なかった（図 4E, J）。

#### **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**

HE 染色の結果、抜歯後 7 日目の新生歯槽骨の構造は、層板構造を呈していなかった（図 5A, F）。対照抗体群と比較して抗 HMGB1 抗体群では、抜歯窩組織の骨梁周囲の破骨細胞数（TRAP 陽性細胞数）は有意に少なかった（図 5C, H）。また骨芽細胞の数（オステオカルシン陽性細胞）は有意に少なかった（図 5E, J）。

## 抗 HMGB1 抗体投与が抜歯窩の新生歯槽骨に及ぼす影響

抜歯後 7 日目の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 (図 6C, F)。

## 抗 HMGB1 抗体投与による抜歯窩組織の網羅的遺伝子発現の検討

Microarray 解析では、56,608 遺伝子を対象に発現解析が行われた。今回、創傷治癒に関わる遺伝子は、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、対照抗体群と比較して抗 HMGB1 抗体群での遺伝子発現の減少率が 67%以上<sup>17)</sup>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り、機能についてよく知られている遺伝子である *IL-1 $\beta$*  と *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%以上遺伝子発現量が減少した (図 7A)。

## 定量 RT-PCR を用いた cDNA Microarray 解析結果の検証

cDNA Microarray 解析で、抗 HMGB1 抗体投与によって発現量が減少した *IL-1 $\beta$*  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 (図 7B)。

## 考 察

本研究の結果から、抜歯という創傷によって歯肉上皮細胞と炎症性細胞内の HMGB1 は核内から細胞外へと分泌されることが明らかとなった。また、抗 HMGB1 抗体の投与によって、抜歯後の HMGB1 の核外移行および細胞外分泌が抑制された。これらの結果、抜歯後の初期の炎症が抑制され骨治癒は遅延した。抜歯後に歯周組織から分泌される HMGB1 は、創傷治癒に必要な初期炎症を調節し、骨治癒を促進することが示唆された。

リポ多糖 (LPS) などの細菌の構成成分や炎症性サイトカインの刺激により、核内タンパクである HMGB1 は核外へと移行しその後細胞外へ分泌される<sup>18)</sup>。また、細菌感染だけでなく外傷性脳損傷のような外傷性疾患時にも HMGB1 が細胞外へ分泌されることが知られており、細胞外へ分泌された HMGB1 は周囲の細胞や組織に作用し、さらなる炎症の上昇を引き起こす<sup>19,20)</sup>。また、吉原は、歯周組織の炎症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 はオートクリンおよびパラクリンの両機序で作用し、それぞれの細胞によるサイトカイン産生を促進し、炎症の亢進に作用すると報告がある<sup>21)</sup>。本研究の結果から、抜歯という損傷によって歯肉上皮および抜歯

窩組織内に浸潤した好中球やリンパ球から、多量の HMGB1 が分泌したことが明らかとなった (図 2)。このことから、抜歯の損傷によって歯肉上皮細胞と免疫細胞から分泌された HMGB1 はオートクリンおよびパラクリンの両機序で作用し、治癒過程に必要な初期炎症に深く関わる可能性が示唆された。創傷治癒における初期の炎症は、組織の治癒過程において必須の生体反応である<sup>3)</sup>。

そこで、抜歯窩周囲組織の歯肉上皮細胞と炎症性細胞から分泌された HMGB1 が、初期の炎症反応をどのように制御しているのかを調べるために、抗 HMGB1 抗体を投与した抜歯モデルマウスの抜歯窩組織の炎症強度を、分子イメージング法を用いて解析した。その結果、抜歯後一時的に炎症強度が増強し、その後次第に低減するが、抗 HMGB1 抗体投与により全て時期においてこの炎症が抑制されることが明らかとなった (図 3)。貪食作用を行う間の好中球は MPO 活性を上昇させ、炎症性サイトカインや成長因子を分泌する<sup>22)</sup>。その後、マクロファージ、ケラチノサイト、内皮細胞、線維芽細胞などが遊走し可溶性メディエーターを産生することで炎症反応が持続する<sup>23,24)</sup>。また、MPO 活性は好中球だけでなくマクロファージにおいても存在すると報告

がある<sup>25)</sup>。本研究では、抗 HMGB1 抗体を投与することで、抜歯窩組織における好中球やマクロファージの誘導と活性化が抑制され、初期の炎症反応とその後の免疫反応が抑制されたと考えられる。

次に、抜歯窩組織内におけるマクロファージの局在について検討したところ、抗 HMGB1 抗体投与によって、成熟マクロファージに特異的な表面抗原<sup>26)</sup>である CD68 陽性細胞数が有意に減少したことが明らかとなった (図 4)。

抜歯後の抜歯窩内には、好中球と同時に単球が浸潤し、創傷治癒過程の間に成熟マクロファージへと分化する<sup>3)</sup>。マクロファージの分化・活性化を促進する重要なサイトカインには GM-CSF があり<sup>27)</sup>、吉原は *in vitro* の実験から、歯肉上皮細胞から産生される GM-CSF の量は、抗 HMGB1 抗体投与により抑制されることを報告した<sup>21)</sup>。すなわち、本研究においても、抜歯窩の創傷組織周囲で産生される GM-CSF の産生量が、抗 HMGB1 抗体の投与によって抑制されることで、成熟マクロファージの分化が阻害されていることが推察される。HMGB1 に類似した因子の一つとして、マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor : MIF) があげられる。MIF は炎症のメディエーターの一つであり、活性化 T リンパ球から分泌される最初のサイト

カインとして発見された<sup>28)</sup>。また MIF は、炎症性サイトカインとしての機能の他に、細胞の分化、増殖そして免疫応答の調節因子および創傷治癒過程における重要な調節因子である<sup>29,30)</sup>。興味深いことに、MIF は敗血症においても重要な炎症メディエーターであり HMGB1 と類似の作用を有する<sup>31)</sup>。従って、抗 MIF 抗体を投与することにより急性炎症が抑制され、致死性腹膜炎、外毒血症、内毒血症が改善されたとの報告がある<sup>32)</sup>。しかし HMGB1 が菌周組織の創傷治癒に関して MIF の詳細なメカニズムは一切不明である。我々は将来の研究において、抜歯後の治癒過程で MIF が HMGB1 と同様の機能を有するのか、また HMGB1 と相互関係があるのかなどについても検討する予定である。

創傷治癒過程で最も重要なイベントの一つは血管新生である。先行研究において、HMGB1 は血管新生を誘導することが知られている<sup>11)</sup>。そこで、HMGB1 が抜歯窩内の血管新生に及ぼす影響を検討するために、抗 HMGB1 抗体投与による抜歯窩の血管内皮細胞の局在の変化を調べた。抜歯後 5 日目の抜歯窩組織では、血管内皮細胞に特異的なマーカー<sup>33)</sup>である CD31 陽性細胞は、抗 HMGB1 抗体によって有意に減少した (図 4)。また、抜歯後 7 日目の

抜歯窩組織の網羅的遺伝子解析とリアルタイム PCR 解析では、抗 HMGB1 抗体によって *IL-1 $\beta$*  と *VEGF-A* の発現量は有意に減少した (図 7)。*IL-1 $\beta$*  は、炎症性因子および血管新生を調整し、白血球と内皮細胞を活性化することが知られている<sup>34)</sup>。また、*VEGF-A* は、血管内皮細胞の増殖や血管新生に関与することが広く認知されている<sup>35)</sup>。最近、Bald らは、紫外線照射によって炎症性に誘導された好中球が、血管新生を促進することを報告した<sup>36)</sup>。そのメカニズムの一つとして、紫外線照射を受けた表皮角化細胞から HMGB1 が分泌されることが挙げられている。また、マクロファージも VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-8 などの血管新生に関連したサイトカインや成長因子を産生することが報告されている<sup>37)</sup>。これらのことから、歯肉上皮細胞と炎症性細胞から核外に分泌された HMGB1 は、マクロファージなどの免疫細胞を遊走させることで *VEGF-A* の遺伝子発現を促進し、抜歯窩組織における血管新生を誘導している可能性が示唆された。

一方、マクロファージは破骨細胞を活性化することが知られており、活性化した破骨細胞は骨のリモデリングに関与する<sup>38)</sup>。創傷治癒過程における骨の再生は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨新生のバランスが保た

れることにより促進される。多核で骨吸収能を持つ破骨細胞は、単球またはマクロファージ系統の単核細胞から分化する<sup>39)</sup>。また、骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化する<sup>40)</sup>。HMGB1の特異的な受容体であるRAGEは、破骨細胞、骨芽細胞および内皮細胞において発現していると考えられている<sup>41)</sup>。そこで、抜歯窩組織における破骨細胞と骨芽細胞の発現を調べたところ、抜歯後7日目の抜歯窩組織では、TRAP陽性細胞数とオステオカルシン陽性細胞数は、抗HMGB1抗体により有意に減少した(図5)。また、新生骨の面積は、抗HMGB1抗体群では有意に少なかった(図6)。また、抜歯窩内の*IL-1 $\beta$* と*VEGF-A*の遺伝子発現量は、抗HMGB1抗体群では著しく少なかった(図7)。T細胞とマクロファージから産生される*IL-1 $\beta$* は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を制御している<sup>42)</sup>。VEGFは、血管新生だけでなく骨芽細胞の分化にも関与している<sup>43)</sup>。すなわち、抗HMGB1抗体投与によって創傷治癒過程の*IL-1 $\beta$* と*VEGF-A*の産生が減少したことで、血管新生だけではなく、直接的に破骨細胞と骨芽細胞の活性が抑制されて骨治癒が遅延した可能性がある。

本研究では、抜歯の創傷治癒過程における炎症に関与した血管新生と骨新生に関して検討を行った。しかしながら、組織が再生する過程で最も重要な

因子は幹細胞であると考えられる。Aikawa らは、HMGB1 が骨髄由来の PDGFR $\alpha$  陽性間葉系幹細胞の遊走を促進し、皮膚炎の発症を抑制することを報告した<sup>10)</sup>。本研究においても、抜歯窩組織の治癒過程において HMGB1 の作用を阻害することで、組織再生に必要な幹細胞の遊走を抑制している可能性が考えられる。今後は、抜歯窩における幹細胞の発現を調べることで、HMGB1 が幹細胞の遊走・活性に関与しているか検討する必要がある。また、外因性の HMGB1 と抜歯窩治癒の影響についての検討も行っていない。近年、Xue らは、間葉系幹細胞シートと結合しているゼラチンスポンジのリコンビナント HMGB1 は骨折の治癒を促進すると報告ある<sup>15)</sup>。将来我々は、抜歯窩の骨治癒を促進するかどうかリコンビナント HMGB1 タンパクを使って検討する予定である。

## 結 論

抗 HMGB1 抗体投与によってオートクリンおよびパラクリンの両機序を阻害したとこで、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、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。

## 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いたします。また，抗 HMGB1 抗体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，岡山大学病院歯周科の山本直史講師，大森一弘講師，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城圭介助教，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38回炎症再生医学会（2017年7月，大阪）
- 第60回日本歯周病学会春季学術大会（2017年5月，福岡）
- 第37回炎症再生医学会（2016年6月，京都）

## 参考文献

- 1) Vieira, A.E., Repeke, C.E., Ferreira, Junior, Sde.B., Colavite, P.M., Bigueti, C.C., and Oliveira, R.C.: Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice:micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. *PLoS One.*, **10**, 128021, 2015.
- 2) Reinke, J.M., and Sorg, H.: Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.*, **49**, 35-43, 2012.
- 3) Koh, T.J., and DiPietro, L.A.: Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert. Rev. Mol. Med.*, **11**, 2011.
- 4) Müller, S., Ronfani, L., and Bianchi, M.E.: Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J. Intern. Med.*, **255**, 332-433, 2004.
- 5) Rubartelli, A., and Lotze, M.T.: Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.*, **28**, 429-436, 2007.

- 6) Kawai, T., and Akira, S.: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, **11**, 373-384, 2010.
- 7) Park, J.S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., and Kim, J.Y.: High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **290**, 917–924, 2006.
- 8) Yu, M., Wang, H., Ding, A., Golenbock, D.T., and Latz, E.: HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*, **26**, 174-179, 2006.
- 9) Tamai, K., Yamazaki, T., Chino, T., Ishii, M., Otsuru, S., Kikuchi, Y., Inuma, S., Saga, K., Nimura, K., Shimbo, T., Umegaki, N., Katayama, I., Miyazaki, J., Takeda, J., McGrath, J.A., Uitto, J., and Kaneda, Y.: PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 6609-6614, 2011.
- 10) Aikawa, E., Fujita, R., Kikuchi, Y., Kaneda, Y., and Tamai, K.: Systemic high-mobility group box 1 administration suppresses skin inflammation by

inducing an accumulation of PDGFR $\alpha$ (+) mesenchymal cells from bone marrow.

*Sci. Rep.*, **5**, 11008, 2015.

- 11) Wake, H., Mori, S., Liu, K., Takahashi, H.K., and Nishibori, M.: Histidine-rich glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin-induced angiogenesis in matrigel plug assay. *Eur. J. Pharmacol.*, **623**, 89-95, 2009.
- 12) Zhou, Z., Han, J.Y., Xi, C.X., Xie, J.X., Feng, X., and Wang, C.Y.: HMGB1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis in a manner dependent on RAGE. *J. Bone Miner. Res.*, **23**, 1084-1096, 2008.
- 13) Zhou, Z., and Xiong, W.C.: RAGE and its ligands in bone metabolism. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, **3**, 768-776, 2011.
- 14) Li, M.J., Li, F., Xu, J., Liu, Y.D., Hu, T., and Chen, J.T.: rhHMGB1 drives osteoblast migration in a TLR2/TLR4- and NF- $\kappa$ B-dependent manner. *Biosci. Rep.*, **36**, 300, 2016.
- 15) Xue, D., Zhang, W., Chen, E., Gao, X., Liu, L., Ye, C., Tan, Y., Pan, Z., and Li, H.: Local delivery of HMGB1 in gelatin sponge scaffolds combined with

- mesenchymal stem cell sheets to accelerate fracture healing. *Oncotarget*, **8**, 42098-42115, 2017.
- 16) Gross, S., Gammon, S.T., Moss, B.L., Rauch, D., Harding, J., Heinecke, J.W., Ratner, L., and Piwnicka-Worms, D.: Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat. Med.*, **15**, 455-461, 2009.
- 17) Dalman, MR., Deeter, A., Nimishakavi, G., Duan, ZH.: Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. *BMC. Bioinformatics*, **13**, 2012.
- 18) Qin, S., Wang, H., Yuan, R., Li, H., Ochani, M., Ochani, K., Rosas-Ballina, M., Czura, C.J., Huston, J.M., Miller, E., Lin, X., Sherry, B., Kumar, A., Larosa, G., Newman, W., Tracey, K.J., and Yang, H.: Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J. Exp. Med.*, **203**, 1637-1642, 2006.
- 19) 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, H.K., Mori, S., and Nishibori, M.: Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann. Neurol.*, **72**, 373-384, 2012.

- 20) Okuma, Y., Wang, F., Toyoshima, A., Kameda, M., Hishikawa, T., Tokunaga, K., Sugi, K., Liu, K., Haruma, J., Nishibori, M., Yasuhara, T., and Date, I.: Mannitol enhances therapeutic effects of intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells into the brain after traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.*, **554**, 156-161, 2013.
- 21) 吉原千暁: High Mobility Group Box 1 (HMGB1) の歯周炎惹起および遷延化のメカニズムに関する検討. 岡山歯学会誌雑誌, **33**, 学位論文, 2014.
- 22) Segal, A.W.: How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 197-223, 2005.
- 23) Cernak, I.: The importance of systemic response in the pathobiology of blast-induced neurotrauma. *Front. Neurol.*, **1**, 151, 2010.
- 24) Wilgus, T.A., Roy, S., and McDaniel, J.C.: Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, **2**, 379-388, 2013.
- 25) Sugiyama, S., Okada, Y., Sukhova, G.K., Virmani, R., Heinecke, J.W., and Libby, P.: Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage

- colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am. J. Pathol.*, **158**, 879-891, 2001.
- 26) Holness, C.L., and Simmons, D.L.: Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*, **81**, 1607-1613, 1993.
- 27) Akagawa, K.S., Kamoshita, K., and Tokunaga, T.: Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and colony-stimulating factor-1 on the proliferation and differentiation of murine alveolar macrophages. *J. Immunol.*, **141**, 3383-3390, 1988.
- 28) Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zernecke, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J., and Weber, C.: MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.*, **13**, 587-596, 2007.

- 29) Lanahan, A., Williams, J.B., Sanders, L.K. and Nathans, D.: Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 3919-3929, 1992.
- 30) Wistow, G.J., Shaughnessy, M.P., Lee, D.C., Hodin, J., and Zelenka, P.S.: A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 1272-1275, 1993.
- 31) Mitchell, R.A., Metz, C.N., Peng, T., and Bucala, R.: Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A 2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF) Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J. Biol. Chem.*, **274**, 18100-18106, 1999.
- 32) Nishihira, J.: Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J. Interferon Cytokine Res.*, **20**, 751-762, 2000.

- 33) Treutiger, C.J., Heddini, A., Fernandez, V., Muller, W.A., and Wahlgren, M.: PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Nat. Med.*, **3**, 1405-1408, 1997.
- 34) Voronov, E., Carmi, Y., and Apte, RN.: Role of IL-1-mediated inflammation in tumor angiogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **601**, 265-270, 2007.
- 35) Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodaysky, I., Keshet, E., and Neufeld, G.: VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7151-7158, 1997.
- 36) Bald, T., Quast, T., Landsberg, J., Rogava, M., Glodde, N., Lopez-Ramos, D., Kohlmeyer, J., Riesenberger, S., van den Boorn-Konijnenberg, D., Hömig-Hölzel, C., Reuten, R., Schadow, B., Weighardt, H., Wenzel, D., Helfrich, I., Schadendorf, D., Bloch, W., Bianchi, M.E., Lugassy, C., Barnhill, R.L., Koch, M., Fleischmann, B.K., Förster, I., Kastenmüller, W., Kolanus, W., Hölzel, M., Gaffal, E., and Tüting, T.: Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature*, **507**, 109-113, 2014.

- 37) Schlueter, C., Weber, H., Meyer, B., Rogalla, P., Röser, K., Hauke, S., and Bullerdiek, J.: Angiogenic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenic switch molecule. *Am. J. Pathol.*, **166**, 1259-1263, 2005.
- 38) Feng, X., and Teitelbaum, S.L.: Osteoclasts: New Insights. *Bone Res.*, **1**, 11-26, 2013.
- 39) Teitelbaum, S.L.: Bone resorption by osteoclasts. *Science*, **289**, 1504-1508, 2000.
- 40) Ducy, P., Schinke, T., and Karsenty, G.: The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, **289**, 1501-1504, 2000.
- 41) Charoonpatrapong, K., Shah, R., Robling, A.G., Alvarez, M., Clapp, D.W., Chen, S., Kopp, R.P., Pavalko, F.M., Yu, J., and Bidwell, J.P.: HMGB1 expression and release by bone cells. *J. Cell. Physiol.*, **207**, 480-490, 2006.
- 42) Strand, V., and Kavanaugh, A.F.: The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.*, **3**, 10-16, 2004.

- 43) Hu, K., and Olsen, B.R.: Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J. Clin. Invest.*, **126**, 509-526, 2016.

## 図の説明

### 図 1. 抜歯モデルマウスの作製および解析のプロトコル

抜歯モデルマウスは以下の 2 群を作成した。対照抗体群と抗 HMGB1 抗体群を抜歯の 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に投与し、探針を用いて上顎左側第 2 大臼歯を抜歯した。各時期でサンプルを摘出し分子イメージング解析, 免疫組織化学染色, cDNA Microarray 解析および定量 RT-PCR を行った。

▼ : 対照抗体と抗 HMGB1 抗体を投与

● : 抜歯

■ : 口蓋を摘出

### 図 2. 抜歯窩周囲組織の HMGB1 の局在

A : 対照抗体群 (抜歯後 1 日目), F : 抗 HMGB1 抗体群 (抜歯後 1 日目)

の H-E 染色像を示す。

A : 対照抗体群 (実線の挿入部 : B, D 歯肉上皮細胞, 破線の挿入部 : C, E 炎症性細胞), F : 抗 HMGB1 抗体群 (実線の挿入部 : G, I 歯肉上皮細胞, 破

線の挿入部：H, J 炎症性細胞）における HMGB1 の局在を，免疫化学染色法を用いて調べた。

各群 1 匹から得られた 3 切片の典型例を示す。

### 図 3. 抗 HMGB1 抗体投与による炎症抑制効果

両群の抜歯から 1 および 3, 5, 7 日目に MPO 活性を認識する発光プローブを投与し，炎症強度の測定を行った。A：最大発光強度および B：発光画像の典型像を示す。対照抗体群と抗 HMGB1 抗体群におけるサンプル数はそれぞれ 5 匹である。エラーバーは標準偏差を示す。各群の炎症強度の違いは，ANOVA / Tukey-Kramer test を用いて検定した。図は，各群 5 匹の代表例を示した。

\* $P < 0.001$ （抜歯後 3 日目の対照抗体群間との比較），†  $P < 0.001$ （対照抗体群と抗 HMGB1 抗体群との比較）

### 図 4. 抜歯窩周囲組織のマクロファージと血管内皮細胞の発現変化

両群の抜歯から 5 日目の組織切片における CD68 陽性細胞（マクロファージ）と CD31 陽性細胞（血管内皮細胞）の局在を，免疫化学染色法を用いて調べた。

(A) A と F は H-E 染色像を示す。B, C, D および E は対照抗体群の組織切片像を示し，G, H, I および J は抗 HMGB1 抗体群の組織切片像である。B：

CD68 陽性細胞と D : CD31 陽性細胞は A の破線部の拡大部位における染色像を示す。C と H は B と G の高倍率像である (黒矢印 : マクロファージ)。

G : CD68 陽性細胞と I : CD31 陽性細胞は F の破線部の拡大部位における染色像を示す。E と J は D と I の高倍率像である (黒三角印 : 血管内皮細胞)。

これらは各群 3 匹ずつから得られた実験結果の代表例を示す。

(B) グラフは, 対照抗体群と抗 HMGB1 抗体群における CD68 陽性細胞数と CD31 陽性細胞数をそれぞれ示す。解析方法は, Image J (NIH) を用いて, 抜歯窩組織内の CD68 陽性細胞数と CD31 陽性細胞数をカウントした。これらは各群 3 匹ずつから得られた実験結果の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。\* :  $p < 0.05$ , Student's *t*-test

## 図 5. 抜歯窩周囲組織の破骨細胞と骨芽細胞の発現変化

両群の抜歯から 7 日目の組織切片における TRAP 陽性細胞 (破骨細胞) とオステオカルシン陽性細胞 (骨芽細胞) の発現を, 免疫化学染色法を用いて調べた。

(A) A と F は H-E 染色像を示す。B, C, D および E は対照抗体群の組織切片像を示し, G, H, I および J は抗 HMGB1 抗体群の組織切片像である。B :

TRAP 陽性細胞と D : オステオカルシン陽性細胞は A の破線部の拡大部位における染色像を示す。C と H は B と G の高倍率像である。G : TRAP 陽性細胞と I : オステオカルシン陽性細胞は F の破線部の拡大部位における染色像を示す。E と J は D と I の高倍率像である。これらは各群 3 匹ずつから得られた実験結果の代表例を示す。

(B) グラフは、対照抗体群と抗 HMGB1 抗体群における TRAP 陽性細胞とオステオカルシン陽性細胞をそれぞれ示す。解析方法は、Image J (NIH) を用いて、抜歯窩組織内の TRAP 陽性細胞とオステオカルシン陽性細胞をカウントした。これらは各群 3 匹ずつから得られた実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。\* :  $p < 0.05$ , Student's *t*-test

## 図 6. 抜歯窩内の新生歯槽骨量の変化

両群の抜歯から 7 日目の組織切片を H-E 染色し、ImageJ を用いて新生歯槽骨面積を測定した。

(A) A は対照抗体群、D は抗 HMGB1 抗体群の H-E 染色像を示す。A と D は低倍率像、それらの破線部で示す B と E は高倍率像である。C と D は、B と E の実線部で示す 2 値化し分界線を基準とした抜歯窩内における骨組

織の画像である。これらは各群 3 匹ずつから得られた実験結果の代表例を示す。

(B) グラフは、この 2 値化した画像を、ImageJ を用いて新生歯槽骨面積を算出し、定量解析を行った。独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。\* :  $p < 0.05$ , Student's *t*-test

#### 図 7. 抗 HMGB1 抗体投与による抜歯窩周囲組織における遺伝子発現変化

(A) 両群の抜歯から 7 日目のマウス抜歯窩周囲組織から抽出した全 RNA を用いて Microarray 解析を行った。創傷治癒に関わる遺伝子は、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、対照抗体群と比較して抗 HMGB1 抗体群での発現率が 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 と関連性の報告があり、機能についてよく知られている遺伝子である *IL-1β* と *VEGF-A* に注目し、それらの解析結果を示す。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。

(B) 両群のマウスの抜歯窩周囲組織から、図 7 と同様の方法で全 RNA を抽出して、*IL-1β* および *VEGF-A* の遺伝子発現量を調べた。グラフは、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，対照抗体群の発現量を基準とした比を算出した。なお，各群 3 匹ずつから得られた抜歯窩周囲組織を用いて，独立した 3 回の実験の平均値を示し，エラーバーは標準偏差を示す。\* :  $p < 0.05$  (対照抗体群との比較)，Student's *t*-test

#### 図 8. 抗 HMGB1 抗体投与による抜歯窩治癒遅延のメカニズムの概略図

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，オートクリンおよびパラクリンの両機序が阻害され炎症性メディエーターとしての機能が阻害された。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-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。