

## 論文要旨

### Extracellular High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 Is a Coupling Factor for Hypoxia and Inflammation in Arthritis

細胞外 HMGB1 蛋白は、組織低酸素と炎症性関節炎の  
Coupling factor である

濱田 隆

#### 【序論および目的】

High mobility group box Chromosomal protein 1 (HMGB1) は核内に存在するタンパク質であるが、壊死細胞や活性型マクロファージから放出され、その結果エンドキシン死のメディエーターとして関節炎を引き起こす炎症性サイトカインとしても報告されている。炎症細胞、滑膜細胞の増殖によって酸素が消費される結果引き起こされる組織低酸素は、関節炎の進行に大きな関係があると言われている。それはサイトカイン、matrix-degrading enzymes、angiogenic factor を誘導することで関節炎を進行させると考えられているが、その低酸素と炎症の直接的な関係は現在ほとんどわかっていない。今回我々は、関節内低酸素が誘導する炎症がその細胞へのストレスや障害として細胞外 HMGB1 の発現を促し、その結果関節炎進行に大きく影響を及ぼしていることを証明するために研究を行った。

#### 【材料および方法】

炎症性関節症患者（関節リウマチ以下 RA、偽痛風以下 PG）、非炎症性関節症患者（変形性関節症以下 OA）の関節液検体を用いて、TNF- $\alpha$ 、IL-6、VEGF、乳酸、LDH、HMGB1 濃度を解析した。コラーゲン誘導関節炎動物モデルを用いて、組織低酸素と HMGB1 の組織局在を組織低酸素検出マーカーであるピモニダゾールによる免疫組織染色で調べた。細胞学的研究において、低酸素状態での HMGB1 発現とその Viability を ELISA 法、MTS 法で、細胞死のパターンはアガロースゲルを用いた DNA ラダー法、フローサイトメトリーで解析した。また低酸素に伴う HMGB1 の細胞内変化を免疫蛍光組織染色及び Western blotting で調べた。さらに低酸素状態での HMGB1 発現の増加を mRNA レベルで確認するために、RT-PCR を行った。最後に低酸素状態でのアセチル化 HMGB1 の発現量の変化を免疫沈降法で調べた。

#### 【結果】

炎症性関節症（RA、PG）では、非炎症性関節症（OA）と比べ PG の TNF- $\alpha$  以外の全ての関節液中の factor において有意に高値を示した。関節液中 HMGB1 高値（非炎症性関節症患者平均より 2 SD 以上の値）の炎症性関節症患者に Focus し、それらの HMGB1 値と他の因子との相関関係を調べると、組織低酸素マーカーである乳酸が HMGB1 と有意な相関性を認めた。コラーゲン関節炎モデルの腫脹関節免疫組織染色において、組織低酸素陽性領域と HMGB1 陽性領域の一致を認めた。細胞学的研究に

において、低酸素による細胞死はアポトーシスパターンを示し、その細胞外 HMGB1 の発現がネクロシスパターンを示す過酸化水素によるものより有意に多かった。

ヒト RA 滑膜繊維芽細胞、ヒト単球系細胞モデル HL60、U937 cell line、マウス軟骨細胞モデル ATDC5 cell line の全ての細胞において HMGB1 を著明に発現し、また ATDC5 以外の細胞は Viability において組織低酸素抵抗性を示した。また組織低酸素濃度を変えて実験を行ったところ、濃度依存性に HMGB1 発現量が増加する傾向を認めた。次に組織低酸素による ATDC5 の細胞死のパターンは、DNA ラダー及びフローサイトメトリー解析でともにアポトーシスパターンを示した。さらに Necrosis パターンを示す H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 過酸化水素刺激、組織低酸素状態における Cell viability と HMGB1 発現を調べると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激よりも組織低酸素状態のほうが有意に HMGB1 を発現した。さらに ATDC5 細胞の免疫蛍光組織染色において、赤色に染色される HMGB1 は通常の状態では核内にしかほとんど認めないが、組織低酸素状態では核外細胞質内にも認められた(×400 倍)。また U937 細胞をそれぞれ刺激した後に回収した蛋白を核成分、細胞質成分に分けたものを Western blotting を行うと、低酸素状態によって核外細胞質内の HMGB1 発現の増加を認めた。さらに U937、HL60 細胞における低酸素状態での HMGB1 発現の増加を mRNA レベルでの確認を行ったが、明らかな発現の増加を認めなかった。ATDC5、U937 細胞において低酸素状態でのアセチル化 HMGB1 の発現量の変化を免疫沈降法で調べてみたが、明らかな増加を認めなかった。

#### 【結論及び考察】

組織低酸素とそれが誘導する細胞外 HMGB1 は、関節炎増悪の重要な要因である。

今まで細胞外 HMGB1 蛋白の発現は、2002 年 Bianchi らが Nature で報告したようにアポトーシスではなく Necrosis 細胞や活性型マクロファージから放出されると考えられていたが、今回の我々の研究では組織低酸素状態において多くの種類の細胞で著明な HMGB1 発現を認めた。これは、“炎症と軟骨破壊”による関節炎形成の新しい特異的な病理学的メカニズムを示唆している。HMGB1 シグナルは、receptor である RAGE を介して隣接細胞の損傷や炎症の悪化を引き起こす。低酸素条件下での“HMGB1 放出ないし分泌”は低酸素が誘導するアポトーシスに先んじて起こるもので、損傷細胞からの“受動的な放出ないし漏出”ではないと思われる。関節炎の進行とともに増加した炎症細胞、滑膜細胞が酸素を消費した結果起こる組織低酸素は、軟骨破壊とともに細胞外 HMGB1 を誘導する。我々は組織低酸素状態が HMGB1 を発現し、それが関節炎をさらに悪化させる重要な原因となることを示した。これらは、“関節炎と軟骨破壊”を改善させる新しい治療(高圧酸素療法のような)の可能性を示唆している。

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 675 号	氏名	濱田 隆
審査委員	主査	松山 隆美	
	副査	河野 嘉文	黒野 祐一

## Extracellular High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 Is a Coupling Factor for Hypoxia and Inflammation in Arthritis

(細胞外 HMGB-1 蛋白は、組織低酸素と炎症性関節炎の coupling factor である)

関節炎の病態と病巣組織の低酸素状態について、何らかの関連性が示唆されているがその詳細については不明な点が多い。今回の研究は、関節炎症によって生じる関節内低酸素が HMGB-1 蛋白の細胞外放出に関与する可能性とそのメカニズム、細胞外 HMGB-1 蛋白の関節炎進行に及ぼす影響について検討した。

関節リウマチ、偽痛風、変形性関節症患者の関節液の生化学的解析、コラーゲン誘導関節炎モデルを用いた免疫組織染色、低酸素状態での様々な細胞の HMGB-1 蛋白放出量と viability を ELISA 法、MTS 法で、細胞死のパターンはアガロースゲルを用いた DNA ラダー法、フローサイトメトリーで解析した。また低酸素に伴う HMGB-1 蛋白の細胞内変化を免疫蛍光組織染色及び Western blotting で、さらに低酸素状態での HMGB-1 mRNA 発現を RT-PCR、低酸素状態でのアセチル化 HMGB-1 蛋白の放出量の変化を免疫沈降法で調べた。

本研究で得られた新知見は次の3点である。

1. 炎症性関節炎の関節液では、低酸素マーカーである乳酸が HMGB-1 と高い相関性を認めた。
2. 関節炎モデルの免疫染色では、低酸素領域と HMGB-1 陽性領域の一致を認めた。
3. 低酸素（酸素濃度 0%）培養では、多種の細胞が HMGB-1 蛋白を著明に放出した。その細胞死パターンは早期アポトーシスであり、ネクローシスパターンを示す過酸化水素刺激とは様相を異にしていた。また低酸素培養下の細胞では HMGB-1 蛋白の放出量が過酸化水素刺激下より有意に多かった。

本研究は、組織低酸素状態が HMGB-1 蛋白を放出し、それが関節炎をさらに悪化させる要因となることを示した。この考えに基づくと、現在イレウスや炎症性疾患で用いられている高気圧酸素療法は関節炎の有効な治療法になり得ると考えられる。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 <b>675</b> 号	氏名	濱田 隆
審査委員	主査	松山 隆美	
	副査	河野 嘉文	黒野 祐一
<p>主査および副査の3名は、平成20年11月20日、学位請求者 濱田 隆に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p>			
<p>質問 1) 炎症関節内では低酸素状態にあると述べられているが、その程度は実際どのくらいの濃度であるのか。また実験系では、どの程度の酸素濃度を用いたのか？</p> <p>(回答) 実際の濃度を我々は測定していないし、文献上での報告も見当たらない。今回の研究においては酸素濃度5%未満とし、酸素濃度と逆相関性に培養細胞からの HMGB-1 蛋白の放出を認めた。</p>			
<p>質問 2) 低酸素培養実験では、実際どのくらいの期間その低酸素濃度環境にあったのか？</p> <p>(回答) 密封した air tight jar に酸素吸収・炭酸ガス発生剤であるアネロパックを使うと、即座に低酸素環境となった。実験では 36~48 時間後まで目的の低酸素濃度環境を設定できた。</p>			
<p>質問 3) 関節液中 HMGB-1 と、血中 HMGB-1 濃度の相関は？</p> <p>(回答) 今回の実験では、血中濃度は測定していない。我々の以前の報告では、関節液中と血中濃度は必ずしも相関していない。</p>			
<p>質問 4) 病態がそれぞれ異なる関節リウマチと偽痛風は、同レベルの炎症と考えてよいのか？</p> <p>(回答) 同レベルの炎症ではない。関節リウマチでは抗リウマチ薬治療にて薬剤修飾がなされており、一方偽痛風は投薬を受けていない急性期の状態と考えられる。</p>			
<p>質問 5) 関節液中 HMGB-1 値が高値の患者と低値の患者の臨床的な違いは？</p> <p>(回答) 統計学的有意差はないが、高値患者の方が関節腫脹が強く罹病期間が短い傾向にあった。</p>			
<p>質問 6) 関節内が低酸素状態であることは、どのような根拠に基づいているのか？</p> <p>(回答) 前述したとおり炎症関節液中酸素濃度の測定は行っていないが、関節液中の乳酸濃度が変形性関節症と比べて高値であったこと、関節炎モデルの増殖滑膜が特異的低酸素マーカーである pimonidazole 染色陽性であったことから炎症関節内は低酸素状態であると判断した。</p>			
<p>質問 7) 炎症性関節炎において、関節液中 VEGF 値が HMGB-1 値ほど高値を示さなかった理由は？</p> <p>(回答) TNF-<math>\alpha</math>, IL-6 などの様々な炎症性サイトカインが上昇している状況では、NF-<math>\kappa</math>B, AP-1 などの VEGF プロモーターが修飾抑制される結果、あまり高値を示さなかったと考えている。また炎症の進行に伴い血管新生が促されその結果低酸素状態が改善され、著明な高値を示さなかった可能性もあると考えている。</p>			
<p>質問 8) 関節炎モデル作成の際に、完全アジュバントと不完全アジュバントを使うことで結果に差はなかったのか？</p> <p>(回答) マウスでは不完全アジュバントで関節炎が作成できない。そのためマウスでは完全アジュバント、ラットでは不完全アジュバントを使って関節炎モデルを作成した。2種類のアジュバント間での比較検討は行っていない。</p>			
<p>質問 9) HMGB-1 以外のサイトカインが偽痛風よりも関節リウマチの方で低値を示している理由は？</p> <p>(回答) 偽痛風は短時間で強い炎症を起こす疾患であり、また検査の段階では治療薬としての薬剤修飾がなされていないことから、偽痛風の方が高値を示したと考えている。</p>			
<p>質問 10) 核内蛋白である HMGB-1 が細胞質へ移動することは図に示されているが、細胞外への放出はどのような状況で起こっているのか？</p> <p>(回答) 詳細なメカニズムは不明である。図では示さなかったが、我々の実験では低酸素培養で sublethal となった細胞がアポトーシスの直前に細胞外へ HMGB-1 蛋白を放出していた。</p>			

質問 11) HMGB-1 の放出は炎症滑膜組織のみではなく、関節内に多く浸潤している好中球からのものもあるではないか？

(回答) その通りと考える。しかし今回の研究では、関節液中の好中球についての解析は行わなかった。

質問 12) TNF- $\alpha$  が細胞外 HMGB-1 を誘導すると考えていたが、今回の研究では偽痛風においては HMGB-1 値が高値であるのにも拘わらず、TNF- $\alpha$  値は高値を示していない。これはどう考えるか？

(回答) 細胞外 HMGB-1 の産生は TNF- $\alpha$  のみに依存せず、今回のように低酸素状態などにも規定されるなど多種のメカニズムがあるため、偽痛風では TNF- $\alpha$  値と HMGB-1 値が相関しなかったと考える。

質問 13) 炎症組織が低酸素状態であることを示すために、Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) による免疫染色を行わなかったのか？

(回答) HIF-1 の下流にある VEGF が臨床検体において HMGB-1 と相関が低かったことから、組織低酸素と HMGB-1 の関連性を示すための免疫染色は HIF-1 ではなく、pimonidazole で評価を行った。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。