

論文要旨

Tumor Necrosis Factor- α Stimulates Gingival Epithelial Cells to Actively Release High Mobility Group Box 1

Tumor necrosis factor- α 刺激により歯肉上皮細胞からの High Mobility Group Box 1 の放出が活性化される

森元 陽子

【序論および目的】

非ヒストン DNA 結合タンパクである High Mobility Group Box1 (HMGB1)は壊死細胞の核、および Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、Lipopolysaccharide (LPS)などで刺激されたマクロファージ系細胞から細胞外に分泌され、Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE)、Toll-Like Receptor 2,-4 に作用して、諸細胞を活性化し、炎症を促進する。細胞外に放出された HMGB1 が敗血症、リウマチ、動脈硬化などの炎症性疾患において重要な役割を果たしていることが報告されている。歯周炎は細菌刺激によって TNF- α や Interleukin-1(IL-1)など多くの炎症性サイトカイン産生を誘導する炎症性疾患である。しかしながら口腔領域疾患に HMGB1 の発現については、全く知見はない。そこで本研究では、歯肉組織における HMGB1 発現の証明と TNF- α 刺激による歯肉上皮細胞からの HMGB1 放出、および放出シグナル経路を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

1. 慢性歯周炎患者 3 名、健常人 3 名の歯肉溝滲出液中の HMGB1 発現を Western blot 法で確認した。
2. 歯周炎罹患歯肉組織、健康歯肉組織における HMGB1 の局在を免疫組織化学的に検討した。
3. TNF- α 刺激による培養歯肉上皮系株細胞 (Ca9-22) , rat gingival epithelial cells からの HMGB1 放出を Western blot 法で確認した。
4. TNF- α 刺激による培養歯肉上皮系株細胞 (Ca9-22) からの HMGB1 放出シグナル経路を Western blot 法で確認した。

なお、患者検体の解析は全て Informed consent を得た上で、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床研究倫理委員会承認の方法(受付番号 16-101)に基づいて行った。

【結果】

1. 歯周炎患者の歯肉溝滲出液中に HMGB1 が検出された。
2. 免疫組織化学的検討において、歯周炎罹患歯肉組織中では上皮細胞の核内と細胞質双方に HMGB1 が認められ、健康歯肉では核内のみにとどまっていた。
3. 培養歯肉上皮系株細胞 (Ca9-22) , rat gingival epithelial cells を用いた検討では、上皮細胞から TNF- α 刺激濃度、刺激時間依存的に HMGB1 の産生が誘導された。また、TNF- α 刺激は TNF

reseptor 1 を介していることが確認できた。

4. TNF- α 刺激によって MAP キナーゼ (p38MAPK、p44/42、JNK) がリン酸化された。しかし、MAP キナーゼインヒビターを用いることにより、TNF- α 刺激による Ca9-22 からの HMGB1 放出は p38MAPK を介していることが確認できた。

【結論及び考察】

歯周炎は、口腔内疾患の中では、最も罹患率の高い疾患のひとつであり、単に歯の脱落という口腔内局所の問題にとどまらず、動脈硬化や虚血性心疾患など全身疾患の発症病理にも関わることが判明し、重要な臨床的課題の一つとなっている。この歯周炎の発生病理においては、サイトカインが歯周組織の炎症、破壊の中心的な役割を果たしているといわれている。

今回の研究では、慢性関節リウマチや動脈硬化などの炎症性疾患に深く関与している新しい炎症性サイトカイン HMGB1 に着目し、歯周組織における発現を検討した。

その結果、歯周炎患者の歯肉溝浸出液中、歯肉組織中、特に歯肉上皮細胞に HMGB1 の存在が確認でき、炎症組織において HMGB1 は核内から細胞質へ移動し細胞外へ放出されていることが示唆された。また、歯肉上皮細胞を TNF- α で刺激することにより刺激濃度、刺激時間依存的に HMGB1 放出が認められ、その放出経路は p38MAPK を介していることが確認できた。

TNF- α は様々なサイトカイン産生を誘導し、また HMGB1 刺激も TNF- α を含む多様な炎症性サイトカイン産生を促進するとの報告がある。今回の研究で TNF- α が HMGB1 放出を促進することが確認されたことにより TNF- α と内因性 HMGB1 両方がサイトカイン産生、ついでには炎症の増強に深く関与していることが示唆された。

今後は HMGB1 の歯周炎罹患部位における機能、歯周炎の病態発現への関与のメカニズムなどのさらなる解明により新しい歯周炎の予防や新規治療法の開発の展望が開けてくることが期待される。

(Journal of Periodontal Research; in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 // 号	学位申請者	森元 陽子
審査委員	主査	鳥居 光男	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	杉原 一正	副査 米澤 傑
	副査	松口 徹也	副査 町頭 三保

Tumor Necrosis Factor- α Stimulates Gingival Epithelial Cells to Actively Release High Mobility Group

Box 1

(Tumor Necrosis Factor- α 刺激により歯肉上皮細胞からの High Mobility Group Box 1 の放出が活性化される)

歯周炎は、口腔内疾患の中では、最も罹患率の高い疾患のひとつである。歯周炎局所において、歯周病原性細菌の Lipopolysaccharide (LPS) などの刺激を受けたマクロファージや好中球などに加えて、上皮細胞や線維芽細胞などから様々なサイトカインが産生され、複雑なサイトカインネットワークが形成されることにより、炎症が進行し、歯周組織破壊に繋がる。

非ヒストン DNA 結合タンパクである High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は、壊死細胞の核および Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、LPS などで刺激されたマクロファージ系細胞から細胞外に分泌され、Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE)、Toll-Like Receptor 2、4 に作用して、諸細胞を活性化し、炎症を促進する。細胞外に放出された HMGB1 が敗血症、慢性関節リウマチ、動脈硬化などの炎症性疾患において重要な役割を果たしていることが報告されている。歯周炎が慢性疾患のひとつである慢性関節リウマチとよく似た病態を示すことから、学位申請者らは歯周組織における HMGB1 に着目し、歯肉溝滲出液中、歯肉組織における HMGB1 発現を免疫染色と Western blot 法を用いて確認し、歯周炎の病因における重要なサイトカインのひとつである TNF- α 刺激による培養歯肉上皮細胞からの HMGB1 放出、および HMGB1 の放出シグナル経路を Western blot 法を用いて検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 歯周炎患者の歯肉溝滲出液中に HMGB1 が検出された。
- 2) 免疫組織化学的検討において、歯周炎罹患歯肉組織中では上皮細胞の核内と細胞質双方に HMGB1 が認められ、健康歯肉では核内のみにとどまっていた。
- 3) 培養細胞を用いた検討では、上皮細胞から TNF- α 刺激濃度、刺激時間依存的に HMGB1 の産生が誘導された。
- 4) TNF- α 刺激による上皮細胞からの HMGB1 放出は p38MAPK を介していることが確認できた。

HMGB1 刺激は TNF- α を含む多様な炎症性サイトカイン産生を促進し、炎症性疾患の増悪、遷延化と関連があるとの報告がある。今回の研究で、TNF- α が歯肉上皮細胞からの HMGB1 放出を促進することが確認されたことにより、TNF- α と HMGB1 双方がサイトカイン産生、強いては歯周組織での炎症の増強、遷延化に関与している可能性が示唆された。今後は HMGB1 の歯周炎罹患部位における機能、歯周炎の病態発現への関与のメカニズムなどのさらなる解明により抗炎症治療への応用が重要な課題である。

本研究は歯周組織における HMGB1 に着目し、マクロファージなどの炎症性細胞に加えて、歯肉上皮細胞が HMGB1 のソースであり、炎症時にはその産生が増強することを検討した点で非常に興味深い。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	総研第 11 号	学位申請者	森元 陽子
審査委員	主査	鳥居 光男	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	杉原 一正	副査 米澤 傑
	副査	松口 徹也	副査 町頭 三保

主査および副査の5名は、平成19年2月19日、学位申請者 森元 陽子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、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行われ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 歯周病罹患歯肉では、健康歯肉に比べてかなり多くの HMGB1 が血管内皮にも存在しているようであるが、これもやはり炎症と関係して多くなっているのか。

(回答) 炎症の増強に伴って HMGB1 の放出が多くなっていると思われる。動脈硬化巣においても血管内皮細胞で HMGB1 の放出が上昇しているとの報告がある。

質問2) HMGB1 の抗体は、ラットにもヒトにもリンクするのか。

(回答) この抗体はホモロジー99%でトリまで認識するので、同じ抗体を使っている。

質問3) TNF- α で刺激しているが、これは歯周病局所においてどんなもので upregulate されるのか。

(回答) 歯周病原性細菌やその代謝産物、あるいは細菌由来の LPS によりマクロファージなどから産生される。

質問4) 免疫染色所見で、炎症組織では上皮下の炎症性細胞が強く染まると思われるが上皮が強く染まっているのは何故か。上皮への刺激はどこから受けているのか。

(回答) 組織所見において炎症性細胞の浸潤は多くはないが、上皮下のマクロファージなどからのサイトカイン刺激により、上皮で HMGB1 が強発現していると思われる。もともとマクロファージや単球から HMGB1 が放出されているとの報告があり、今回も上皮下の細胞、特にマクロファージでも HMGB1 の発現が認められている。

質問5) 核内タンパクである HMGB1 が上皮組織の基底層で発現が強いことから、炎症により細胞増殖が強くなって HMGB1 の産生が上昇している可能性は考えられないのか。

(回答) 炎症組織のほとんどで上皮の基底層が強く染まっていた。上皮の細胞増殖、上皮の downgrowth との関連があるのかもしれない。

質問6) TNF- α 刺激により細胞上清中の HMGB1 のタンパク量が上昇しているが、これは TNF- α のメカニズムとして、HMGB1 タンパク産生の転写が上昇しているのか、それとも核内からの移行によるものなのか。また、放出経路はどうか。

(回答) HMGB1 のプロモーターサイトには TATA がないため、それほどメッセージレベルは上昇しない。そのため、核内からの移行であると思われる。HMGB1 の輸送経路は IL-1 β などと放出経路は似ていて、培養細胞ではベジクルを作って放出される。

最終試験の結果の要旨

質問 7) Fig.4C で MAPK インヒビター 3 種類を使用して抑制実験を行っており、P38 インヒビターが効果有りとの結果がでていますが、使用したインヒビターの濃度が低かった可能性はないのか。濃度を変えた実験は行ったのか。

(回答) 予備実験で $1 \mu\text{M}$ と $10 \mu\text{M}$ で検討したが、 $10 \mu\text{M}$ ではインヒビターのみを加えただけで細胞傷害性を認めたため、今回は 3 種類とも $1 \mu\text{M}$ を採用した。

質問 8) $10 \mu\text{M}$ で実験したときの細胞障害は 3 種類とも同程度であったのか。

(回答) SP600125 が最も強く、他の 2 種類は同程度であった。

質問 9) 細胞障害があると HMGB1 の産生は上昇するのか。

(回答) 産生が上昇し、インヒビターでの抑制効果の測定が不可能になる。

質問 10) MTT について M&M では reference 光として 630nm の波長についても調べているようだが、結果はバックグラウンドをひいた結果なのか。

(回答) バックグラウンドを既にひいたものを結果としている。

質問 11) MTT assay において、OD が 1.0 前後だが、この細胞では OD がどの程度まで直線的にいくのか。1.0 はプラトーに達しているのではないか。

(回答) 今回使用した測定系において、直線性は 1.5~2.0 まで保たれている。

質問 12) GCF のサンプルはタンパク量等の基準を揃えているのか。

(回答) GCF は採取できる分量が少ないので時間を一定に合わせて、その時間内に取れた分量を入れている。

質問 13) 歯周炎の重症度と GCF の HMGB1 の相関はあるのか。

(回答) 今回は重度歯周炎のみ測定したが、今後歯周炎の重症度、クリニカルパラメータとの相関を検討したいと思う。

質問 14) 上皮細胞以外の線維芽細胞や血管内皮細胞についての検討は行ったのか。

(回答) 歯肉線維芽細胞からの産生は認められなかった。血管内皮細胞からはサイトカイン刺激などにより HMGB1 が産生されるとの報告がある。

質問 15) TNF- α 以外のサイトカイン刺激でも HMGB1 は産生されるのか。

(回答) IL-1 刺激も行ったが、TNF- α 刺激の場合と同様に HMGB1 の産生が認められた。

質問 16) 今後はどのような研究の展開を考えているのか。

(回答) 今後は上皮細胞で産生された HMGB1 が歯周組織の細胞、例えば歯肉上皮細胞や線維芽細胞、マクロファージに対してどのような影響を及ぼすのか、歯周病態の進展においてどのような役割があるのかを検討したいと考えている。現在、歯肉上皮細胞を HMGB1 で刺激すると IL-6 や IL-8 などのサイトカインが産生されるという結果が出ているため、このデータを発展していく予定である。炎症性サイトカインと HMGB1 によるサイトカインネットワークにより歯周炎の炎症は遷延化していることが予想される。

(以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。