

## 論文の内容の要旨

氏名：中 島 諄 哉

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The effect of high glucose concentrations on HMGB1 production in MG-63 osteoblast-like cells

（高濃度グルコースが MG-63 骨芽細胞様細胞の HMGB1 産生に及ぼす影響）

糖尿病は長期に高血糖状態を認める代謝障害であり、多くの臓器に合併症を生じる。糖尿病患者では、骨のリモデリングが阻害されることから、骨粗鬆症による骨密度の低下や歯周病における歯槽骨吸収が著しく増強されることが知られている。また、糖尿病患者では創傷治癒が遅延するため、整形外科や口腔外科領域では治療が制限されることが問題となる。

High-mobility group box (HMGB) 1 は、DNA の複製や翻訳に関与する非ヒストン性クロマチン結合タンパクであり、細胞の損傷や壊死によって細胞外に放出される。また、HMGB1 は、酸化ストレス、病原性細菌、炎症性サイトカインの刺激を受けた細胞からも放出される。細胞外の HMGB1 は終末糖化産物受容体 (receptor for advanced glycation end product: RAGE) や Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 2 および TLR4 など、炎症反応に関連する受容体のリガンドとなることが知られている。HMGB1 は、糖尿病とその合併症の発症と進行にも関与している。糖尿病患者では健常者に比べて血中の HMGB1 レベルが高く、また、動物実験では、高血糖によって網膜の神経節細胞や尿細管上皮細胞の HMGB1 発現が増加することが明らかにされている。

骨組織では、骨芽細胞、骨細胞および破骨細胞がサイトカインネットワークを介して相互に作用している。骨芽細胞は、高アルカリフォスファターゼ活性を示し骨形成に関連するほか、細胞膜上に発現する RAGE や TLR 経路のシグナルにより TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインを産生する。糖尿病では、骨芽細胞も慢性的な高血糖の影響下にあることから、本研究では、骨芽細胞の HMGB1 発現に及ぼす高濃度グルコースの影響を調べることを目的とした。

本研究では、骨芽細胞様細胞としてヒト骨肉腫由来 MG-63 細胞を用いた。細胞を  $5 \times 10^4/\text{cm}^2$  の細胞密度にて 6-well 培養プレートに播種した後、D-glucose 濃度 5.5 mM (コントロール) または 25.0 mM (高濃度グルコース) の培地で培養した。また、細胞外に分泌された HMGB1 を阻害することを目的として、1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗マウス HMGB1 モノクローナル IgG (抗 HMGB)1 抗体 を培地に添加した。HMGB1, RAGE, TLR2, TLR4, TNF- $\alpha$ , IL-6, 熱ショックタンパク (heat shock protein: HSP) 90 AA1 および  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) の遺伝子発現を real-time PCR 法で調べた。また、HMGB1 のタンパク発現は、免疫蛍光染色と ELISA 法で、TNF- $\alpha$  のタンパク発現は Western blotting 法で調べた。

HMGB1 と HSP90AA1 の遺伝子発現は、コントロールに比べて高濃度グルコース存在下で増加した。また、免疫蛍光染色像において、コントロールでは主に核内に存在した HMGB1 が、高濃度グルコース存在下では、核外に移行していた。また、RAGE, TLR2 および TLR4 の遺伝子発現ならびに培養上清中の HMGB1 タンパク濃度は、コントロールに比べて高濃度グルコース存在下で高かった。さらに、TNF- $\alpha$ , IL-6 および  $\alpha$ -SMA の遺伝子発現は、コントロールに比べて高濃度グルコース存在下で高く、抗 HMGB1 抗体は高濃度グルコース存在下における TNF- $\alpha$  発現の約 68% を抑制した。一方、IL-6 と  $\alpha$ -SMA の遺伝子発現に抗 HMGB1 抗体添加の影響は認められなかった。

これまでに、自己食作用の機序において HSP90AA1 が HMGB1 の核から細胞質への移行に関与することが明らかにされている。本研究では、高濃度グルコース存在下での培養で HSP90AA1 の発現増加が認められ、高濃度グルコース存在下では自食作用の機序を介して、核外への HMGB1 放出を誘導する可能性が考えられた。また、本研究では、培地への抗 HMGB1 抗体の添加が高濃度グルコース誘導性の TNF- $\alpha$  発現を抑制したことから、細胞外の HMGB1 が TNF- $\alpha$  発現に関与していると考えられた。一方で、同抗体に高濃度グルコース誘導性の IL-6 発現を抑制する効果は認められず、また、TNF- $\alpha$  発現に対する抑制効果も部分的であった。これらの結果から、高濃度グルコース存在下における炎症性サイトカイン発現には、HMGB1 以外の因子が関与している可能性が示唆された。

高濃度グルコース存在下で培養した骨芽細胞では、骨形成機能が低下することが知られている。本

研究では、筋線維芽細胞マーカーである  $\alpha$ -SMA の発現が高濃度グルコース存在下で増加しており、MG-63 細胞が線維芽細胞様に変化している可能性が考えられた。また、抗 HMGB1 抗体は  $\alpha$ -SMA の発現増加を阻害しなかったことから、高濃度グルコース存在下での  $\alpha$ -SMA の発現は、HMGB1 非依存的に増加すると考えられた。

本研究の結論として、高濃度グルコースは、MG-63 細胞における HMGB1 の発現と細胞外放出を促進すると考えられた。また、細胞外に放出された HMGB1 が高濃度グルコース存在下における TNF- $\alpha$  発現に関与することが示唆された。