

## 論文審査の結果の要旨

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)

審査委員：(主査) 教授 浅野 正 岳

(副査) 教授 米原 啓 之

教授 川戸 貴 行

教授 鈴木 直 人

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、骨粗鬆症による骨密度の低下や歯周病を原因とする歯槽骨の吸収のリスクが高いことが知られ、さらに創傷治癒が遅延するため、整形外科や歯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、酸化ストレスによる細胞の損傷・壊死、病原性細菌の感染、炎症性サイトカインによる刺激に際して細胞外に放出されることが知られている。細胞外の HMGB1 は終末糖化産物受容体 (RAGE) や Toll 様受容体 (TLR) 2 および TLR4 などに結合することによって、炎症反応を進展させる。糖尿病患者では、健常者に比較して血中の HMGB1 レベルが高く、糖尿病とその合併症の発症と進行に関与しているとされている。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。

こうした背景に基づき、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。

実験には、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 5.5 mM (コントロール) または 25.0 mM (高濃度グルコース) 存在下で培養した。また、細胞外に放出された HMGB1 を阻害することを目的として、1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗 HMGB1 マウスモノクローナル IgG (抗 HMGB1 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 (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。その結果、以下の結論を得た。

1. 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有意に増加した。
2. 免疫蛍光染色像において、核内に存在する HMGB1 は、高濃度グルコース存在下での培養によって、核外に移行する傾向を示した。
3. 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、コントロールに比較して、高濃度グルコース存在下で有意に増加した。
4. 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有意に高かった。
5. 高濃度グルコース存在下における TNF- $\alpha$  発現は、抗 HMGB1 抗体の存在下で、非存在下に比較して約 68%抑制された。
6. IL-6 と  $\alpha$ -SMA の遺伝子発現は、抗 HMGB1 抗体による影響を受けなかった。

以上の結果より、高濃度グルコース存在下では、MG-63 細胞における HMGB1 の発現と細胞外放出が増強すると考えられた。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。本研究の結果は、糖尿病における骨芽細胞での遺伝子発現変化を示唆したものであり、歯科臨床上極めて重要な成果であると考えられる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和6年3月7日