

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16972

研究課題名(和文) アメロジェニンによるエピジェネティック制御機構の解明と難治性疾患への挑戦

研究課題名(英文) Elucidation of Epigenetic Control mechanisms by amelogenin and challenge for refractory diseases

研究代表者

四本 かれん (Yotsumoto, Karen)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：00898322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究にてアメロジェニン(rM180)がマクロファージ核内に取り込まれた後、MHCクラスIIの発現を抑制し、抗原提示能を低下させることを報告した。本研究ではマウス間で他家皮膚移植を行う目的で、B6マウスから採取した皮膚にrM180を塗布しBALB/cマウスに移植した結果、PBS塗布対照群と比較して移植片の生存期間が6日間延長し、移植片壊死面積も減少した。皮膚組織像では対照群で著しい炎症性細胞浸潤が確認されたが、rM180塗布群では免疫細胞数とMHC II+細胞数が有意に減少した。以上の結果から、将来的にアメロジェニンが臓器移植医療の場などで免疫抑制剤として応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

元来歯のエナメル質の石灰化と成熟にのみ関与するはずのアメロジェニンが免疫抑制作用を有するという現象は、歯の発生時に特殊な免疫システムが作動している可能性を示唆するものであり、発生期の歯胚防御の分子機構を解明する研究の発端となるかもしれない。さらに、使用したアメロジェニンは組み換え蛋白質であり、プリオン等の未知の病原蛋白質を含まないため、生体に安全に使用できる。昨今の免疫抑制剤には重篤な副作用が認められるものが多数確認されており、将来的にアメロジェニンが臓器移植を始め、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチなどのMHC II関連自己免疫疾患に対する安全な免疫抑制剤として応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Previous studies reported that amelogenin inhibits the expression of MHC class II with reduced antigen presentation. This study aimed to investigate the influence of amelogenin on skin graft rejection among the mice with different haplotype antigens. Recombinant amelogenin (rM180) was applied to the skin from C57BL/6J mice, followed by the transplantation onto recipient sites of BALB/c mice. The median survival period of the grafts was extended by up to 6 days compared to a PBS control group, accompanied by a reduction in necrotic area. Histological analysis of skin tissues at day 7 after transplantation showed significantly decreased inflammatory cell infiltration and MHC II+ cells in test group, while massive immune cell infiltration was observed in the control group. These findings may also suggest potential use of amelogenin for the prevention of rejection after organ transplantation.

研究分野：歯周病学

キーワード：アメロジェニン 免疫抑制 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

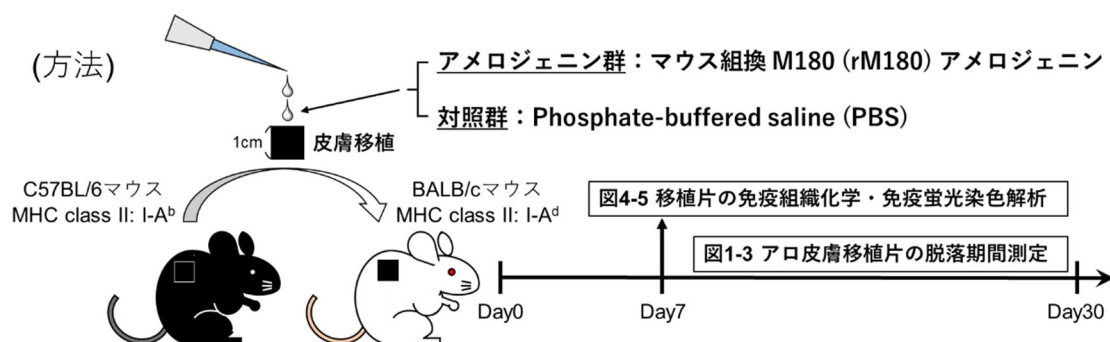
先行研究で次の重要な知見を得ている。アメロジェニンは刺激後 15 分でマクロファージの核内に集積し、MHC II 分子の転写活性化因子である MHC II トランス活性化因子 (CIITA) のプロモーター 4 領域において転写活性に重要な H3K27 アセチル化および H3K4 トリメチル化 (ヒストン修飾におけるユークロマチン) を抑制した。その結果、CIITA の転写・翻訳が阻害されることで、MHC II 分子の細胞表面発現およびヘルパー T 細胞の活性化やサイトカイン産生が抑制を受けた。つまり、アメロジェニンは Th1 細胞による細胞性免疫を中心とした免疫応答の発動を抑制し、結果的に歯周外科処置後の創傷治癒を促進する可能性が示唆された。よってアメロジェニンは、歯周組織の再生だけでなく、自己免疫疾患等に対しての標的治療、ならびに臓器移植に対して副作用の無い拒絶抑制剤として応用できる可能性があると考えた。ただ、アメロジェニンが核内移行した後、どのようなエピジェネティック制御を介して免疫寛容・創傷治癒を誘導するのかは、依然不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究はアメロジェニンの核内作用点をエピジェネティック解析により割り出すことで、免疫寛容、創傷治癒等の細胞機能に与える影響やそこに至るまでの詳細な分子メカニズムを解明し、アメロジェニンの免疫抑制効果を人為的にさらに増強できるか否かを検証することを第一の目的としている。本研究ではハプロタイプ抗原の異なるマウス間で皮膚移植を行い、アメロジェニンが移植片拒絶反応に与える影響を検証した。

3. 研究の方法

- (1). C57BL/6J マウスから採取した背面皮膚にマウス組換えアメロジェニン (rM180) 10 μ g/mL を塗布し BALB/c マウス受容部に移植。対照群は PBS を塗布
- (2). 免疫組織化学染色 (ヘマトキシリン & エオジン染色) 免疫蛍光染色



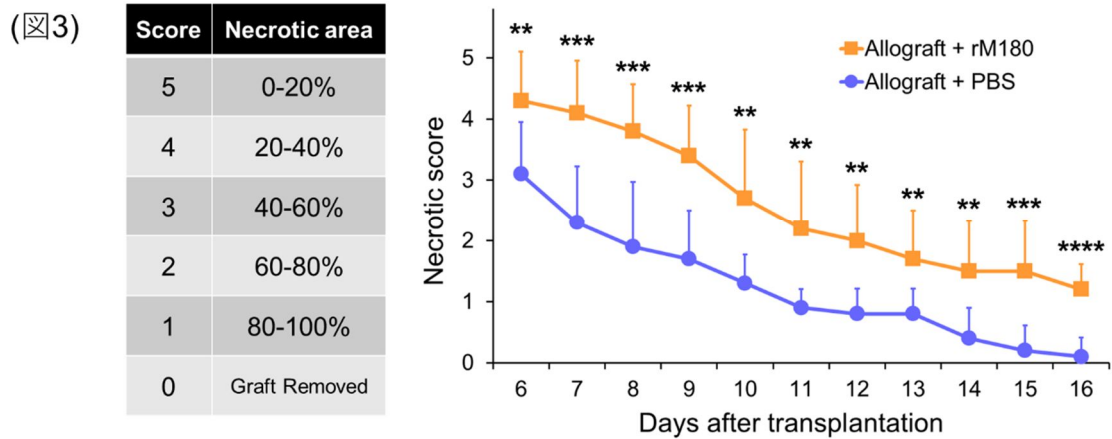
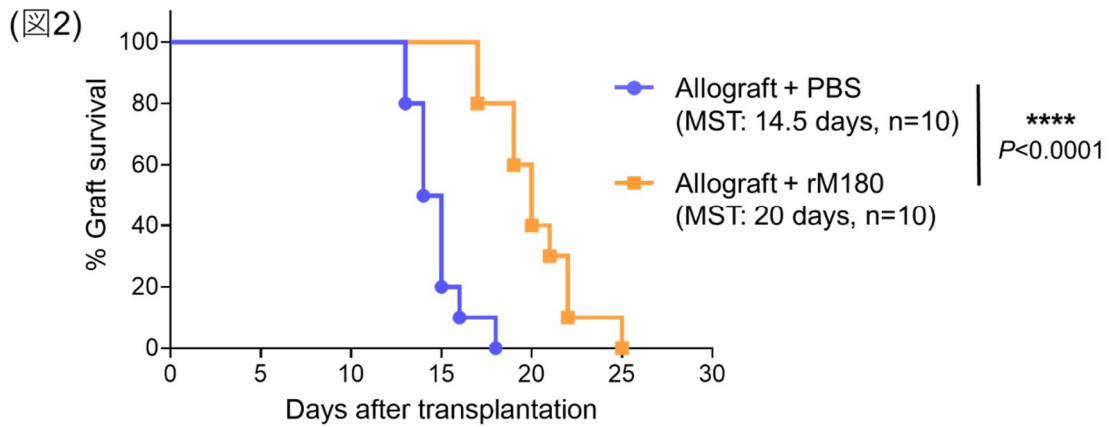
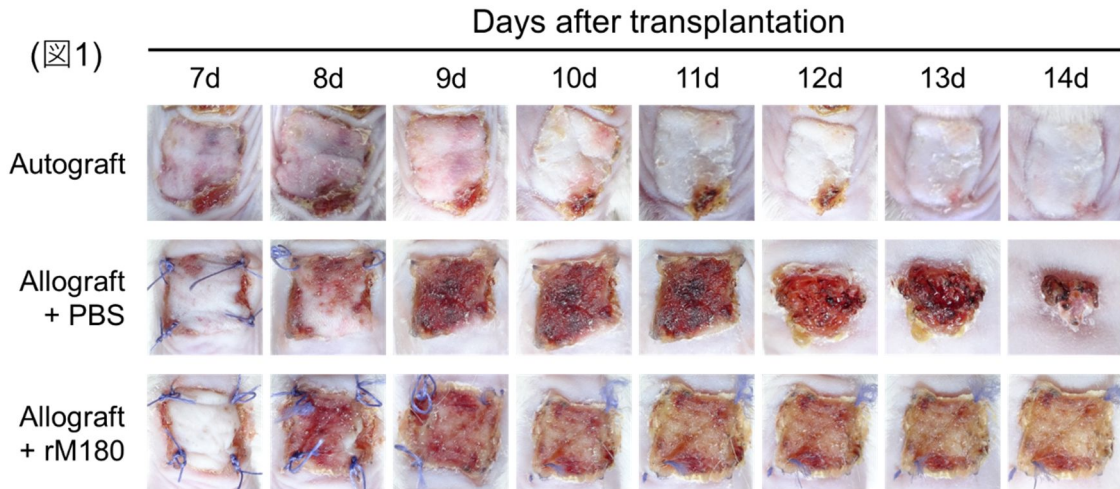
4. 研究成果

歯周組織再生療法に用いられるエナメル基質蛋白質は処置後の炎症反応に乏しく治癒機転が良好であることが経験的に知られている。先行研究にて、アメロジェニンがマクロファージ核内に取り込まれた後、ヒストン H3 のユークロマチン抑制を介して、主要組織適合遺伝子複合体クラス II (MHC II) の発現を抑制し、結果的に抗原提示能を低下させることを報告した。しかしながらその生理的意義は不明である。本研究ではハプロタイプ抗原の異なるマウス間で皮膚移植を行い、アメロジェニンが移植片拒絶反応に与える影響を検証した。

C57BL/6J マウスから採取した背面皮膚に組換えアメロジェニンを塗布し BALB/c マウス受容部に移植した結果、PBS 塗布対照群と比較して移植片の生存期間中央値が 6 日間延長【図 1・2】し、移植片壊死面積も減少した【図 3】。

移植 7 日後の皮膚組織像では対照群で著しい炎症性細胞浸潤が確認されたが、アメロジェニン塗布群では免疫細胞数【図 4】と CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、CD19⁺細胞、F4/80⁺細胞および MHC II⁺細胞数【図 5】が有意に減少した。

以上の結果から、アメロジェニンによる歯周外科術後の創傷治癒促進機序や、根面被覆のための歯肉移植術におけるアメロジェニン応用の科学的根拠の一端が説明でき、将来的にアメロジェニンが臓器移植医療の場などで免疫抑制剤として応用できる可能性が示唆された。



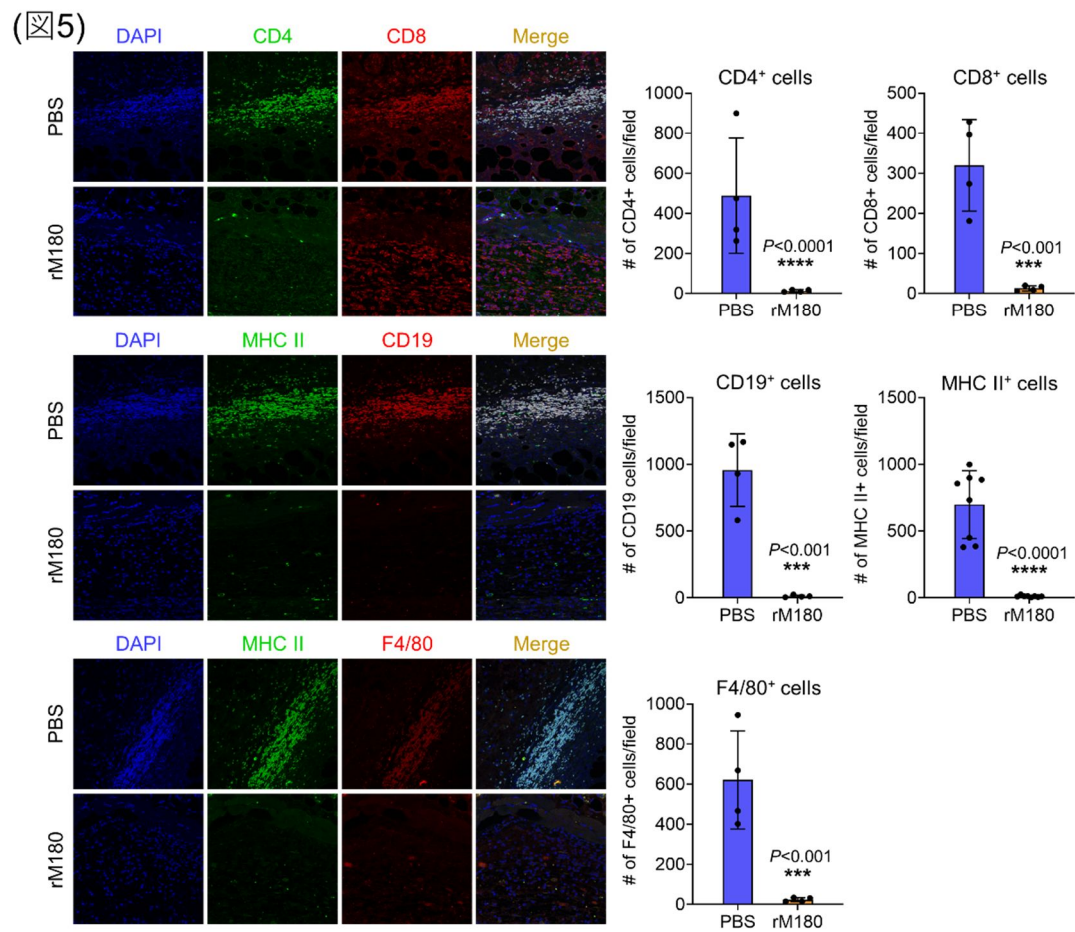
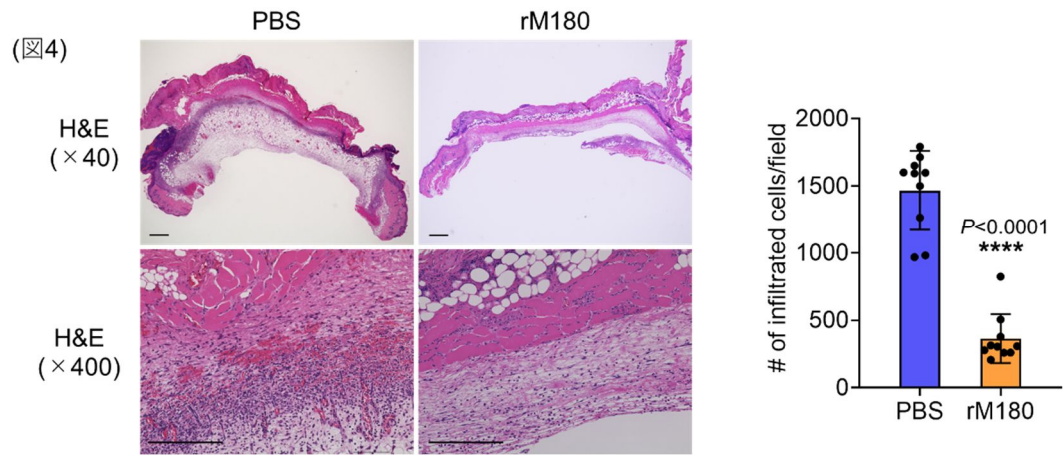
結果 1. アメロジェニン他家皮膚移植片の拒絶を遅らせる。

(図1) [自家移植群]・[PBS 塗布+他家移植群]・[rM180 塗布+他家移植群]における移植片拒絶の経過写真(移植7日~14日後)。

(図2) 他家移植片のカプラン-マイヤー生存曲線。

(図3)移植後6~16日目の壊死面積スコア。

N=10. **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001



結果 2. アメロジェニンは他家皮膚移植片への炎症性細胞浸潤を抑制する。

(図 4) 移植後 7 日目における皮膚移植片周囲組織のヘマトキシリン-エオジン染色切片。

(図 5) 上段：同日皮膚移植片周囲組織における CD4 および CD8 陽性細胞の免疫蛍光染色像
中段：MHCIIおよび CD19 陽性細胞。

下段：MHCIIおよび F4/80 陽性細胞。

スケールバー：500 μ m. N=10. *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watanabe Y, Fukuda T, Hayashi C, Nakao Y, Toyoda M, Kawakami K, Shinjo T, Iwashita M, Yamato H, Yotsumoto K, Taketomi T, Uchiumi T, Sanui T, Nishimura F.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Extracellular vesicles derived from GMSCs stimulated with TNF- and IFN- promote M2 macrophage polarization via enhanced CD73 and CD5L expression.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-17692-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi C, Fukuda T, Kawakami K, Toyoda M, Nakao Y, Watanabe Y, Shinjo T, Sano T, Iwashita M, Yotsumoto K, Shida M, Taketomi T, Sanui T, Uchiumi T, Kanematsu T, Nishimura F.	4. 巻 10
2. 論文標題 miR-1260b inhibits periodontal bone loss by targeting ATF6 mediated regulation of ER stress.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 1061216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.1061216. eCollection 2022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamato H, Sanui T, Yotsumoto K, Nakao Y, Watanabe Y, Hayashi C, Aihara R, Iwashita M, Tanaka U, Taketomi T, Fukuda T, Nishimura F	4. 巻 122(7)
2. 論文標題 Combined application of geranylgeranylacetone and amelogenin promotes angiogenesis and wound healing in human periodontal ligament cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 716-730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.29903.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakao Y, Fukuda T, Zhang Q, Sanui T, Shinjo T, Kou X, Chen C, Liu D, Watanabe Y, Hayashi C, Yamato H, Yotsumoto K, Tanaka T, Taketomi T, Uchiumi T, Le Anh D, Shi S, Nishimura F.	4. 巻 122
2. 論文標題 Exosomes from TNF- -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomater	6. 最初と最後の頁 306-324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2020.12.046.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 豊田真顕、梶岡俊一、福田隆男、渡辺ゆかり、林千華子、川上賢太郎、中尾雄紀、四本かれん、大和寛明、讃井彰一、西村英紀
2. 発表標題 バイオ3Dプリンターを用いた、間葉系幹細胞からの骨様立法構造物作製への挑戦
3. 学会等名 第65回日本歯周病学会春季学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林千華子、福田隆男、渡辺ゆかり、川上賢太郎、豊田真顕、中尾雄紀、四本かれん、大和寛明、新城尊徳、讃井彰一、西村英紀
2. 発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソーム内包miR-1260bによる小胞体ストレス応答制御を介した歯周炎骨吸収抑制効果
3. 学会等名 第65回日本歯周病学会春季学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺ゆかり、林千華子、川上賢太郎、豊田真顕、中尾雄紀、大和寛明、四本かれん、新城尊徳、岩下未咲、讃井彰一、福田隆男、西村英紀
2. 発表標題 TNF- α /IFN- α 共刺激した歯肉幹細胞由来エクソソームはCD73とCD5Lを介して抗炎症性M2マクロファージを誘導する
3. 学会等名 第156回日本歯科保存学会2022年度春季学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toyoda M, Kajioka S, Fujimoto R, Hayashi C, Kawakami K, Watanabe Y, Nakao Y, Yotsumoto K, Sanui T, Fukuda T, Nakayama K, Nishimura. F.
2. 発表標題 Fabrication of stem cell-based scaffold-free bone-like 3D structures.
3. 学会等名 The 108th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayashi C, Kawakami K, Toyoda M, Watanabe Y, Nakao Y, Yotsumoto K, Yamato H, Shinjo T, Sanui T, Fukuda T, Nishimura F.
2. 発表標題 miR-1260b inhibits periodontal bone loss by targeting ATF6 .
3. 学会等名 The 108th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田真顕、梶岡俊一、川上賢太郎、林千華子、渡邊ゆかり、中尾雄紀、四本かれん、讃井彰一、福田隆男、西村英紀
2. 発表標題 バイオ3Dプリンターを用いた、間葉系幹細胞からの骨様立法構造物作製への挑戦
3. 学会等名 令和4年度日本歯周病学会九州五大学 日本臨床歯周病学会九州支部合同研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林千華子、福田隆男、渡邊ゆかり、川上賢太郎、豊田真顕、中尾雄紀、四本かれん、大和寛明、新城尊徳、讃井彰一、西村英紀.
2. 発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソーム内包miR-1260bによる小胞体ストレス応答制御を介した抗炎症作用.
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大和寛明、讃井彰一、四本かれん、中尾雄紀、渡邊ゆかり、林千華子、相原良亮、岩下未咲、田中麗、福田隆男、西村英紀
2. 発表標題 ゲラニルゲラニルアセトンとアメロジェニンの歯周組織再生への複合的効果
3. 学会等名 2021年度日本歯科保存学会春季学術大会(第154回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林千華子, 福田隆男, 渡邊ゆかり, 川上賢太郎, 豊田真顕, 中尾雄紀, 四本かれん, 大和寛明, 新城尊徳, 讃井彰一, 西村英紀
2. 発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソーム内包miR-1260bによる小胞体ストレス応答制御を介した歯槽骨吸収抑制作用
3. 学会等名 2021年度日本歯科保存学会秋季学術大会(第155回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Nakao, Yukari Watanabe, Chikako Hayashi, Hiroaki Yamato, Karen Yotsumoto, Terukazu Sanui, Takanori Shinjo, Takao Fukuda, Fusanori Nishimura.
2. 発表標題 Exosomes from TNF- α -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss.
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center 5th Joint International Symposium (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chikako Hayashi, Takao Fukuda, Yukari Watanabe, Kentaro Kawakami, Masaaki Toyoda, Yuki Nakao, Karen Yotsumoto, Hiroaki Yamato, Takanori Shinjo, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura
2. 発表標題 Chikako Hayashi, Takao Fukuda, Yukari Watanabe, Kentaro Kawakami, Masaaki Toyoda, Yuki Nakao, Karen Yotsumoto, Hiroaki Yamato, Takanori Shinjo, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center 5th Joint International Symposium (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------