

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17050

研究課題名（和文）HMGB1が有する血管新生能，幹細胞遊走能を応用した新規組織再生治療

研究課題名（英文）A novel tissue regeneration treatment applying the angiogenesis and stem cell migration by HMGB1

研究代表者

青柳 浩明（AOYAGI, HIROAKI）

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：10814501

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：High Mobility Group Box 1（HMGB1）は，炎症刺激時に細胞外へと分泌される。以前，我々は分泌HMGB1が炎症の増悪に関わるだけでなく，創傷治癒の初期炎症において重要であると報告しているが，メカニズムは不明である。本研究では，抜歯窩の幹細胞と遺伝子発現量を検討した。その結果，抗HMGB1抗体群の炎症性サイトカイン，幹細胞のマーカーおよび遊走に関連する遺伝子発現は減少していた。また，M1マクロファージを減少させ，CCL2およびCCR2の遺伝子発現量も減少させた。今回の研究では，HMGB1がM1マクロファージの分極およびCCL2産生を促進することが今回の研究で明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HMGB1は，敗血症や脳疾患などに対して抗HMGB1抗体を投与する臨床研究も盛んに行われている。近年では組織修復にも関与することが報告されてきた。我々はこれまでに抜歯窩の治癒過程においてHMGB1を阻害すると，治癒遅延を起こすことを明らかとした。本研究はそれをさらに発展させ，抜歯後に分泌されたHMGB1はマクロファージのM1への分極を促し，さらにCCL2の産生を介して幹細胞の遊走に関わることが明らかとなった。高齢者や免疫が低下した患者は治癒が遅延することが報告されている。今後このような免疫低下した患者に対して，HMGB1を投与する新たな再生療法へとつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：HMGB1 is released from a variety of cells into the extracellular milieu in response to inflammatory stimuli. We reported that secreted HMGB1 is involved in wound healing after tooth extraction, however, we still do not know the detailed mechanism. In this study, we examined that gene expression levels and MSC localization around tooth extraction sockets. The gene expressions related to inflammation, MSC recruitment, MSC markers, bone regeneration were increased after murine tooth extraction, and there were decreased in the anti-HMGB1 antibody administration. The localization of Nanog positive cells was low in anti-HMGB1 antibody administration group compared to the control group. Anti-HMGB1 administration decreased the ration of M1 macrophages and it also decreased CCL2 and CCR2 gene expression. These results suggested that HMGB1 promotes M1 macrophage polarization and CCL2 production and then may cause MSC recruitment during wound healing after tooth extraction.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：HMGB1 抜歯窩創傷治癒 幹細胞 M1マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非ヒストン DNA 結合蛋白質である HMGB1 (High Mobility Group Box 1) は、核内において転写の調整に関わる。しかし、炎症刺激時に細胞外へと分泌されるユニークな一面を有する。分泌された HMGB1 は炎症メディエータとして炎症の増悪、遷延化に関与することが知られている。従って HMGB1 の機能を抑制することにより炎症の改善が期待できると考えられている。申請者らは HMGB1 の機能を抑制するため抗 HMGB1 抗体をマウスに投与し、その効果を検討してきた。抗 HMGB1 抗体投与マウスでは歯周炎の遷延化が抑制された (Yoshihara-Hirata C, *et al.*, *Infect Immun*, 2018)。その一方で、抗 HMGB1 抗体投与マウスの抜歯を行うと治癒が遅延した。抗体投与群の抜歯窩では HMGB1 の分泌が減少し、それに伴い好中球、マクロファージの遊走が減少した。血管新生、新生骨量も有意に低下した (Aoyagi H, *et al.*, *J Cell Biochem*. 2018)。このことから、分泌 HMGB1 は炎症の増悪に関わるだけでなく、創傷治癒の初期炎症において重要な働きをすることが考えられる。しかし、分泌 HMGB1 がどのようなメカニズムで創傷治癒に関与するのか、その詳細なメカニズムについては依然不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HMGB1 が抜歯窩創傷治癒にどのような影響を及ぼしているのか詳細を検討することである。具体的には、マクロファージの分極、幹細胞への影響などを分子生物学的、組織学的に検討することである。

3. 研究の方法

本研究では実験初期の段階で下記の計画を立てた。

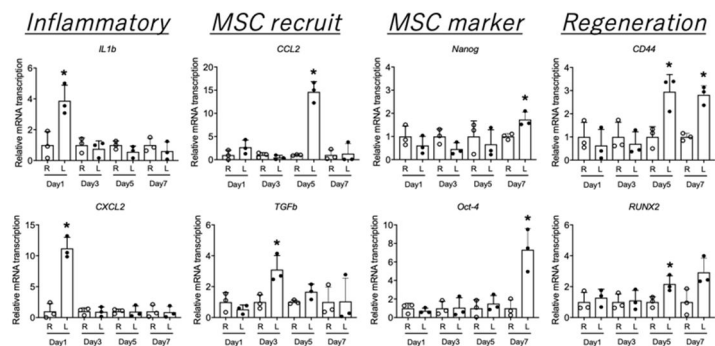
- (1) 骨折モデルマウス作成し、リコンビナント HMGB1 タンパクおよびコントロールとして PBS を徐放性ゲルに浸透後骨折部に埋入する。その治癒過程を組織学的に比較検討する。
- (2) HMGB1 が、骨折治癒過程にどのように関与しているか、そのメカニズムを解明するために、網羅的遺伝子解析および遊走細胞の機能解析を行う。

実際に骨折モデルを作成し、分子イメージング解析、 μ CT 解析を行ったが、個体差のばらつきが大きく再現性が得られなかった。そこで、本研究室で再現性が得られていた抜歯モデルに修正し、下記の実験を行った。

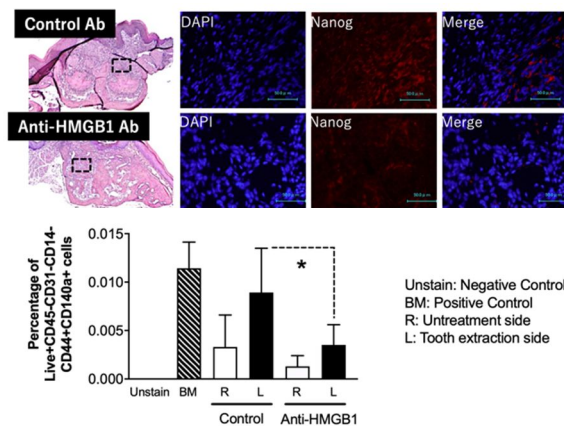
- (1) マウス抜歯モデルの抜歯窩での経時的遺伝子変化を定量 PCR 法で確認する。
- (2) 両群の抜歯窩の免疫染色を行い幹細胞の局在を確認する。またフローサイトメトリー法にて幹細胞の割合を測定する。
- (3) コントロール群 (コントロール抗体投与群) および実験群 (抗 HMGB1 抗体投与群) を作成し、抜歯を行う。それぞれのマウスの抜歯窩での経時的遺伝子変化を定量 PCR 法で確認する。

4. 研究成果

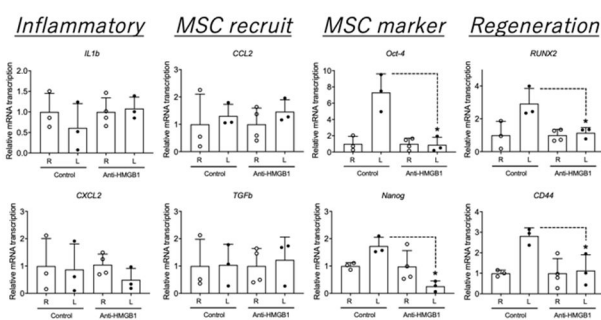
マウス抜歯窩組織の定量 PCR の結果、炎症性サイトカイン (IL-1 β , CXCL2) は抜歯後 1 日、幹細胞遊走に関わる遺伝子 (CCL2, TGF- β) は抜歯後 3, 5 日、幹細胞マーカー遺伝子は抜歯後 7 日目、再生に関わる遺伝子は抜歯後 5, 7 日目に発現があがることが明らかとなった。従って、抜歯直後に炎症が生じ、その後幹細胞を遊走するためのケモカイン産生、幹細胞の遊走、組織の修復へとつながることが示唆された。



次にコントロール群および抗 HMGB1 抗体投与群の抜歯窩において幹細胞 (Nanog 陽性細胞) の局在を免疫染色法で確認した。その結果, コントロール群では幹細胞が抜歯窩に多く局在したのに対して, 抗 HMGB1 抗体投与群ではその局在は明らかに減少していた。また, 抜歯窩の組織を用いてフローサイトメトリーを行った結果, コントロール群と比較して抗 HMGB1 抗体投与群では, 幹細胞マーカー陽性細胞の割合が有意に減少していた。このことは, HMGB1 の機能を阻害することにより, 幹細胞の遊走数が減少することを示している。



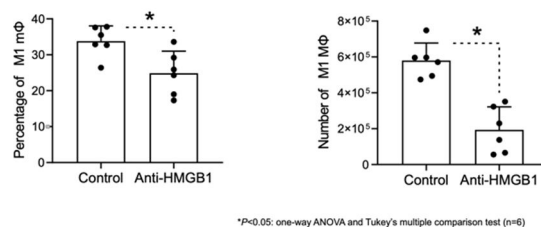
次にコントロール群および抗 HMGB1 抗体投与群の抜歯窩の遺伝子発現の違いを定量 PCR で確認した。その結果, 抗 HMGB1 抗体投与群では幹細胞マーカー (Oct-4, Nanog), 骨マーカー (RUNX2), 血管新生 (CD44) に関わる遺伝子発現量が減少していた。これらの中でも幹細胞の遊走に関わるケモカインである CCL2 の遺伝子発現が, 抗 HMGB1 抗体投与によって減少していることに注目した。



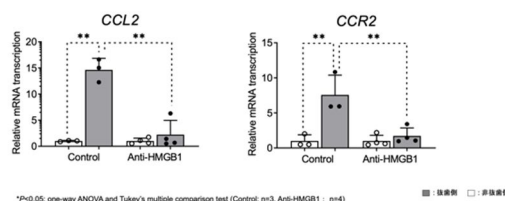
仮説: HMGB1 がマクロファージに CCL2 の発現を促し, 幹細胞の遊走を促進する
そこで次の実験計画を立てた。

- (1) HMGB1はマクロファージの分極 (M1/M2) に関与する
- (2) M1マクロファージはCCL2の産生し, 幹細胞の遊走を促す。

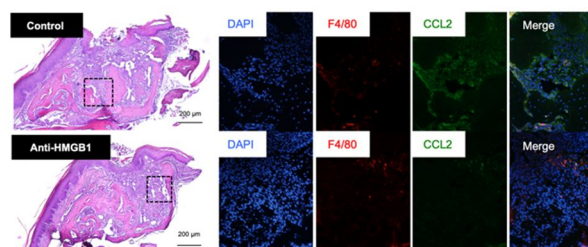
フローサイトメトリーの結果, 抗 HMGB1 投与により M1 マクロファージの割合は減少した。次に定量 PCR 法にて CCL2 および CCR2 の発現量を測定した。その結果, 抗 HMGB1 投与により双方の発現量が有意に減少することが明らかとなった。また免疫染色の結果からの, 抗 HMGB1 投与により CCL2 陽性細胞の割合は減少していることがわかった。



これまでの結果をまとめると, 抜歯窩周囲組織から HMGB1 が分泌され, 初期炎症が生じるが, その際局在するマクロファージは M1 マクロファージが主体であることが予想された。M1 マクロファージは CCL2 を発現し, 幹細胞の遊走を促進することが明らかとなった。



HMGB1 は炎症メディエータとして機能するが, 抜歯後の初期炎症においては治癒を促進するために重要な役割を果たす。その際に HMGB1 が M1 マクロファージの分極および CCL2 産生を促進することが今回の研究で明らかとなった。しかし, 炎症が持続すると, 治癒不全が起こる。CCL2 は M1 マクロファージを M2 に分極させ, 炎症を軽減することも報告されている (Zhuang Z, *et al.*, J DENT RES, 2019)。従って, HMGB1 がマクロファージの M1 分極を促したのち, M1 マクロファージから産生される CCL2 は幹細胞遊走のみならず, M2 マクロファージへの分極を促す, いわば“炎症のブレーキ”になっている可能性がある。今後我々は, 抜歯が治癒過程において CCL2 が M2 マクロファージへの分極を促進し, 炎症が減少しているのかを引き続き検討する予定である。



< 引用文献 >

Yoshihara-Hirata C, *et al.*, Anti-HMGB1 Neutralizing Antibody Attenuates Periodontal Inflammation and Bone Resorption in a Murine Periodontitis Model. *Infect Immun*, 86 , 2018.

Aoyagi H, *et al.*, HMGB1-induced inflammatory response promotes bone healing in murine tooth extraction socket. *J Cell Biochem*. 119, 2018, 5481-5490.

Zhuang Z, *et al.*, Induction of M2 Macrophages Prevents Bone Loss in Murine Periodontitis Models. *J DENT RES*, 98, 2019, 200-208.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aoyagi Hiroaki, Yamashiro Keisuke, Hirata-Yoshihara Chiaki, Ideguchi Hidetaka, Yamasaki Mutsuyo, Kawamura Mari, Yamamoto Tadashi, Kochi Shinsuke, Wake Hidenori, Nishibori Masahiro, Takashiba Shogo	4. 巻 119
2. 論文標題 HMGB1-induced inflammatory response promotes bone healing in murine tooth extraction socket	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 5481 ~ 5490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.26710	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 Ideguchi Hidetaka, Yamashiro Keisuke, Yamamoto Tadashi, Shimoe Masayuki, Hongo Shoichi, Kochi Shinsuke, Yoshihara-Hirata Chiaki, Aoyagi Hiroaki, Kawamura Mari, Takashiba Shogo	4. 巻 23
2. 論文標題 Molecular imaging assessment of periodontitis lesions in an experimental mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 821 ~ 827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-018-2510-2	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 Yoshihara-Hirata Chiaki, Yamashiro Keisuke, Yamamoto Tadashi, Aoyagi Hiroaki, Ideguchi Hidetaka, Kawamura Mari, Suzuki Risa, Ono Mitsuaki, Wake Hidenori, Nishibori Masahiro, Takashiba Shogo	4. 巻 86
2. 論文標題 Anti-HMGB1 Neutralizing Antibody Attenuates Periodontal Inflammation and Bone Resorption in a Murine Periodontitis Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00111-18	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroaki Aoyagi, Keisuke Yamashiro, Chiaki Hirata-Yoshihara, Hidetaka Ideguchi, Mari Kawamura, Hidenori Wake, Mutsuyo Yamasaki, Risa Suzuki, Shinsuke Kochi, Tadashi Yamamoto, Masahiro Nishibori and Shogo Takashiba
2. 発表標題 HMGB1-induced inflammatory response promotes bone regeneration in murine tooth socket
3. 学会等名 IADR/APR General Session & Exhibition
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----