

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18535

研究課題名(和文) 歯周組織の血管内皮細胞から産生されるHMGB1が全身疾患へ及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) The effects of HMGB1 produced by vascular endothelial cells in periodontal tissue on systemic diseases.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1は、RAGEを介して創傷治癒を開始するために必須の反応である炎症反応を誘導する。我々は、栄養不良がこのカスケードを阻害し、異常な炎症を引き起こし、最終的に創傷治癒を遅延させるのではないかと考えた。抜歯後3日目と7日目に、創傷組織を組織学的に観察し、炎症-再生システムのいくつかの因子を分析しました。7日目には、栄養不良の条件下で、再生や間葉系幹細胞(MSC)集積の遺伝子のmRNA発現が減少し、ミエロペルオキシダーゼとIL-1のmRNA発現が明らかに増加、HMGB1レベルの増加、M2マクロファージの割合が上昇した組織でのATP濃度の上昇といった所見を伴う創傷治癒遅延が確認されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年ではHMGB1が組織修復にも関与することが報告されてきた。本研究では、栄養失調状態下でのATP産生およびRAGE経路を介したIL-1分泌の上昇に伴うHMGB1分泌量の著しい増加が、炎症や創傷治癒を阻害する可能性に関わることが明らかとなった。

栄養不良の個体における創傷治癒の遅延のメカニズムに関する研究は、栄養不良に関連する短期的な疾患を目標に促進または抑制するための新しい視点を提供する可能性がある。歯周組織由来のHMGB1が全身疾患に関与していることが明らかとなれば、HMGB1をターゲットとした新規の全身疾患の治療法が確立される可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：HMGB1 induces an inflammatory response, an essential response to initiate wound healing via RAGE. We hypothesized that malnutrition may interfere with this cascade, leading to abnormal inflammation and ultimately delaying wound healing. At 3 and 7 days after tooth extraction, we histologically examined wound tissue and analyzed several factors of the inflammatory-regenerative lineage. 7 days later, under malnutrition, mRNA expression of genes for regeneration and mesenchymal stem cell (MSC) accumulation decreased and mRNA expression of myeloperoxidase and IL-1 clearly increased, delayed wound healing with findings such as increased HMGB1 levels and increased ATP concentrations in tissues with an increased percentage of M2 macrophages.

研究分野：歯周病態学分野

キーワード：低栄養 HMGB1 創傷治癒 幹細胞

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。このことは、治療の各ステージの炎症の調整に HMGB1 が関与していることを意味する。炎症および創傷治癒には血管の拡張、増殖、新生などが起こる。我々は、これらの血管は血球細胞、免疫細胞を輸送する「幹線道路」であると認識していた。しかし、HMGB1 が血管内皮細胞から豊富に産生されること、分泌 HMGB1 に結合しその機能を阻害する抗 HMGB1 中和抗体が、血管周囲に集積することがわかり、幅広く網状に分布された血管内の血管内皮細胞が、これら炎症反応に重要な役割を果たすと考えるに至った。しかし、HMGB1 ノックアウトマウスを用いた研究報告はなく、様々な炎症性疾患の発症のメカニズムについては依然不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血管内皮細胞由来の HMGB1 が、歯周病の遷延化と全身疾患の進行に関与しているかを検証することである。具体的には、血管内皮細胞特異的 HMGB1 ノックアウトマウスを用いた歯周炎モデルマウスを作製し、炎症の定量、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) HMGB1 ノックアウトマウスを用いて歯周炎モデルマウスを作製し、組織学的に比較検討する。
- (2) HMGB1 ノックアウトマウスが、歯周炎の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 HMGB1 ノックアウトマウスを作製し、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) 低栄養マウス抜歯モデルを作製し抜歯窩での経時的遺伝子変化を定量 PCR 法で確認する。
- (2) コントロール群と低栄養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 M1/M2 マクロファージの極性を測定する。
- (3) コントロール群 (栄養良好) および実験群 (低栄養) を作製し抜歯を行う。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

ヘマトキシリン・エオシン染色像に示すように、抜歯後3日目の低栄養群の抜歯窩には、コントロール群では新生血管が形成されていたものの、血球が多かった。また、7日目の低栄養群では、免疫細胞と思われる単核球が抜歯窩を埋めていたが、対照群では新生骨が検出された。

また、間葉系幹細胞 (MSC) および骨芽細胞の遺伝子の mRNA 発現を qRT-PCR で検出したところコントロール群の抜歯窩では、3日目に CD44 および Nanog mRNA が発現する傾向があった。この傾向は7日目に上昇するものの、低栄養群の抜歯窩ではほぼ安定または減少していた。

一方、Runx2 mRNA の発現は、両群とも3日目に低下し、7日目に上昇した。しかし、コントロール群と低栄養群の間に有意な差は認められなかった。また3日目と7日目の抜歯窩内の MSC の集団が増加し低栄養群では減少した。

MPO 活性は、コントロール群では3日に強かったが、7日目にはほとんど消失し、3日目はコントロール群より小さく、低栄養群では7日目に増加した。低栄養群の7日目の活性は、コントロール群の3日目の活性よりも強かった。

炎症性サイトカイン IL-1 の mRNA 発現量は、コントロール群の抜歯窩では3日に増加する傾向があったが、7日目にはベースラインに戻っている。しかし、低栄養群の抜歯窩では、7日目に明らかに増加した。一方、単核球のケモカインである CCL2 の mRNA 発現は、3日目に低栄養群の抜歯窩で明らかに増加したが、7日目にはほぼベースラインに回復した。しかし、この増加は、コントロール群の抜歯窩では有意ではなかった。

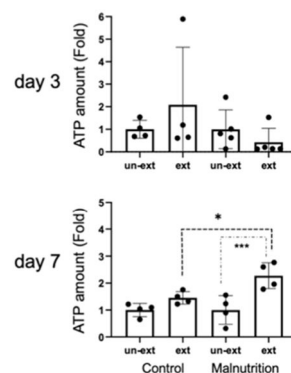
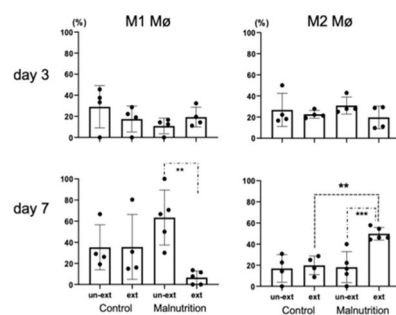
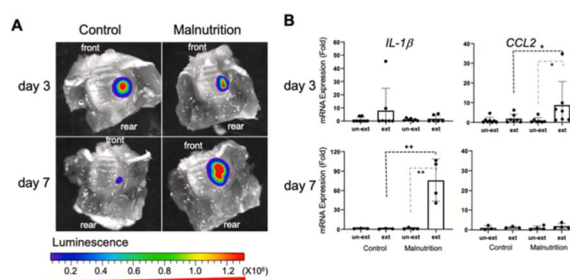
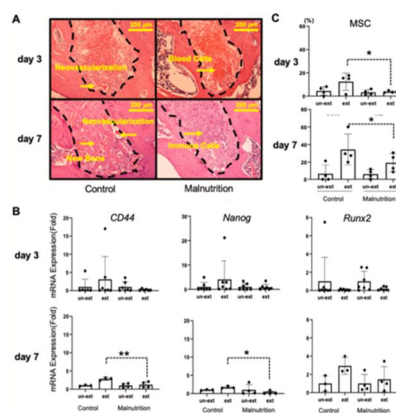
M ϕ の比率を FCM で解析した結果、3日目の M1 M ϕ と M2 M ϕ については、グループ間で差はなかった。7日目には、コントロールグループの M1 M ϕ と M2 M ϕ について、未抜歯組織と抜歯組織の間に差は見られなかった。7日目には、M1 M ϕ は明らかに減少し、M2 M ϕ は明らかに増加した。

仮説：ATP は HMGB1 放出を制御しているため、炎症細胞の動員を調節している。

そこで次の実験計画を立てた。

(1) 両群の ATP 濃度を調べる。

抜歯窩組織の ATP 濃度を測定し、組織内の細胞の活性を評価した。抜歯窩組織で正常化した後、7日目の抜歯窩組織の ATP 濃度は、低栄養群の抜歯窩組織における ATP 濃度の2倍以上となった。この増加は、コントロール群の抜歯窩組織におけるものと比較して有意であった。



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0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平井 杏奈, 井手口 英隆, 山城 圭介, 青柳 浩明, 山本 直史, 高柴 正悟
2. 発表標題 HMGB1はマクロファージをM1タイプに極性化させて 歯周炎の進行に影響を及ぼす
3. 学会等名 春季日本歯周病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井 杏奈, 井手口 英隆, 山城 圭介, Zhang Yao, 青柳 浩明, 山本 直史, 高柴 正悟
2. 発表標題 HMGB1はM1 マクロファージの分化を制御して歯周炎の進行に影響を及ぼす
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

〔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
---------	---------