

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20601

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞由来エクソソームとナノゲルを併用した末梢神経障害の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for peripheral neuropathy using dental pulp stem cell-derived exosome

研究代表者

足立 哲也 (Adachi, Tetsuya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10613573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔外科領域の手術の合併症である末梢神経障害の治療法は未だに確立されていない。近年、細胞から分泌されるエクソソームが核酸やタンパク質を内包し、様々な生命現象に關与するため、多くの研究分野で大きな注目を集めている。なかでも歯髄幹細胞由来のエクソソーム(DP-Exo)は、抗炎症効果等を有することが報告されている。我々は、このDP-Exoとナノキャリアを併用することで、末梢神経障害に対する新規ドラッグデリバリーシステムの開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：Treatment of peripheral neuropathy, a complication of surgery in the field of oral surgery, has not yet been established. In recent years, exosomes secreted from cells encapsulate nucleic acids and proteins and are involved in various biological phenomena, so they attract much attention in many research fields. Among them, it has been reported that exosome (DP-Exo) derived from dental pulp stem cells has an anti-inflammatory effect and the like. We aim to develop a novel drug delivery system for peripheral neuropathy by using this DP-Exo and nanocarrier in combination.

研究分野：生体材料学

キーワード：エクソソーム 歯髄幹細胞 末梢神経障害 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域の手術の合併症である末梢神経障害の治療法は未だに確立されていない。近年、細胞から分泌されるエクソソームが核酸やタンパク質を内包し、様々な生命現象に関与するため、多くの研究分野で大きな注目を集めている。なかでも歯髄幹細胞由来のエクソソーム (DP-Exo) は、抗炎症効果等を有することが報告されている。我々は、この DP-Exo と多糖ナノゲルを併用することで、末梢神経障害に対する新規ドラッグデリバリーシステムの開発を目指す。

2. 研究の目的

口腔外科領域の手術の合併症である末梢神経障害の治療法は未だに確立されていない。歯科分野での神経損傷は、腫瘍切除・嚢胞摘出、抜歯やインプラント埋入術で偶発症で起こり得る。下顎神経の損傷により、知覚麻痺や炎症に伴う神経因性の疼痛が引き起こされ QOL に大きな影響を与える。これらの治療法に、末梢神経を標的とした薬物療法やレーザー療法、自家神経移植等があるが、まだ確立されていない。歯髄幹細胞 (DPSC) は末梢神経損傷ラットモデルにおける、損傷部への移植は、末梢神経の再生を促すと報告されている。しかしながら、幹細胞移植の実用化は安全性が確立されておらず、法規制、費用、GMP に準拠した細胞プロセッシングセンターの設置など解決すべき課題多い。近年、エクソソームと呼ばれる細胞外小胞が注目されている。エクソソームは、直径 100nm 程度の小胞であり、他の細胞へ運ぶ細胞間コミュニケーションを司る。DPSC の培養上清中のエクソソーム (DP-Exo) は、再生効果や抗炎症効果を有することが報告されている。DP-Exo 投与は歯髄幹細胞移植と同様の効果が期待され、細胞を移植するよりも安全だと考えられる。また、DP-Exo は抗炎症効果を有することから、神経損傷部位の炎症応答の増悪を引き起こす好中球やマクロファージの活性化を阻害することで、神経性の疼痛に対しては治療効果が期待できる。

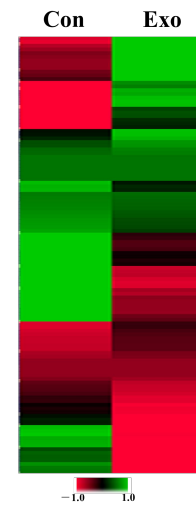
3. 研究の方法

DPSC の細胞上清より、超遠心法でエクソソームを分離した。採取したエクソソームの性状は、電子顕微鏡、ウエスタンブロット、動的光散乱法 (DLS) で確認した。DPSC から、約 77nm の球形のエクソソームが分取できることを確認した。この、DPSC 由来のエクソソームを実験に使用した (DP-Exo)。DP-Exo を神経系の細胞 (ニューロン・グリア細胞) に添加し、これらの細胞に対し有益な効果を及ぼすかを検討した。

4. 研究成果

申請者等は、DPSC の培養上清からエクソソームを超遠心法で単離した。その結果、

DPSC は、他の細胞株以上 (RAW264.7 等) にエクソソームを分泌することを確認した。DPSC より得られた DP-Exo は WST-8 アッセイにおいてヒトグリア細胞の増殖を促進し、アネキシンアッセイにおいて抗アポトーシス効果を有することを確認した。抗アポトーシス効果のシグナル伝達経路を明らかにす



マイクロアレイの結果。DP-Exo群(右)とコントロール(左)間では、遺伝子の発現パターンが異なっている。

るため、マイクロアレイで網羅的遺伝子解析を行った。解析の結果、DP-Exo 群ではコントロールと比較し、免疫系の遺伝子が働いていることを見出した。今後は、DP-Exo とナノキャリアであるナノゲルを併用することで、末梢神経損傷モデルでの治療効果を検討する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

2017

1: "Silicon nitride surface chemistry: a potent regulator of mesenchymal progenitor cell activity in bone formation"

Pezzotti G, Bock RM, Adachi T, Rondinella A, Boschetto F, Zhu W, Marin E, McEntire BJ, Bal BS, Mazda O.

Applied Materials Today. 査読有 In press

2: "Vibrational monitor of early demineralization in tooth enamel after in vitro exposure to phosphoric liquid" Pezzotti G, Adachi T, Gasparutti I, Vincini G, Zhu W, Boffelli M, Rondinella A, Marin E, Ichioka H, Yamamoto T, Marunaka Y, Kanamura N. Spectrochimica Acta Part A. 査読有 173:19-33. 2017.

3: "Development of a SiYAlON glaze for improved osteoconductivity of implantable medical devices."

Bock RM, Marin E, Rondinella A, Boschetto F, Adachi T, McEntire BJ, Bal BS, Pezzotti G.

J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有 In press

4: "Bioactive silicon nitride: A new therapeutic material for osteoarthropathy."

Pezzotti G, Marin E, Adachi T, Rondinella A, Boschetto F, Zhu W, Sugano N, Bock RM,

McEntire B, Bal SB.
Scientific Reports. 査読有 7:44848. 2017
5: "Development of a SiYAION Glaze for Improved Osteoconductivity of Implantable Medical Devices. "
Bock RM, Marin E, Rondinella A, Boschetto F, Adachi T, BalBS, Pezzotti G, McEntire BJ.
Materials Science & Technology 2017. October 8-12. 2017. Pittsburgh,USA.

2016

6: "Biomaterial force induces the growth factor production in human periodontal ligament-derived cells. "

Ichioka H, Yamamoto T, Yamamoto K, Honjo K, Adachi T, Oseko F, MazdaO, Kanamura N, Kita M.

Odontology. 査読有 104:27-34.2016.

7: "Silicon Nitride Bioceramics Induce Chemically Driven Lysis in Porphyromonas Gingivalis. "

Pezzotti G, Bock RM, McEntire BJ, Jones E, Boffelli M, Zhu W, Baggio G, Boschetto F, Puppulin L, Adachi T, Yamamoto T, Kanamura N, Marunaka Y, Bal BS.

Langmuir. 査読有 32.3024-3035.2016

8: "In situ spectroscopic screening of osteosarcoma living cells on stoichiometry-modulated silicon nitride bioceramic surfaces with enhanced osteoconductivity"

Pezzotti G , B J McEntire, R Bock, W Zhu, F Boschetto, A Rondinella , E Marin, Marunaka Y, Adachi T, Yamamoto T, Kanamura N, Bal BS.

ACS Biomaterials Science & Engineering 査読有 2. 1121-1134. 2016

9: " Silicon Nitride: A Synthetic Mineral for Vertebrate Biology."

Pezzotti G, McEntire BJ, Bock RM, Boffelli M, Zhu W, Vitale E, Puppulin L, Adachi T, Yamamoto T, Kanamura N, Bal BS. Scientific Reports. 査読有 19;6:31717. 2016

10: "Altered T cell phenotypes associated with clinical relapse of multiple sclerosis patients receiving fingolimod therapy."

Fujii C, Kondo T, Ochi H, Okada Y, Hashi Y, Adachi T, Shin-Ya M, Matsumoto S, Takahashi R, Nakagawa M, Mizuno T. Scientific Reports. 査読有 6:35314. 2016

11: "羊膜の基質上で培養したヒト骨膜由来細胞シートの開発"

雨宮 傑, 遠藤 悠美, 浅井 拓, 足立 哲也, 足立 圭司, 西垣 勝, 大迫 文重, 山本 俊郎, 金村 成智

〔学会発表〕(計7件)

1: "The Antimicrobial Resistance of Oxide and Non-Oxide Ceramics"

McEntire BJ, Pezzotti G, Bock R, Adachi T, Marin E, Boschetto F, Zhu W, B. Bal BS. The ORS

2018 Annual Meeting

March 10-13.2018. New Orleans, Louisiana, USA
2: "Osteoinductive potential of silicon nitride ceramics versus mesenchymal stem cells"

Adachi T, Horiguchi S, Rondinella A, Boschetto F, Marin E, Yamamoto T, McEntire BJ, Mazda O, Kanamura N, Pezzotti G.

AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition 2018. March 21-24, 2018. Fort Lauderdale, Fla., USA

3: "Application of Silicon Nitride Ceramics Stimulate Bone Regeneration in Dental Implants. "

Adachi T, Yamamoto T, Amemiya T, McEntire BJ, Bal BS, Mazda O, Kanamura N, Pezzotti G.

The 2017 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. March 22-25, 2017. San Francisco, Calif, USA

4: " Human Periosteal-derived Cell Sheets Cultured on Amniotic Membrane Substrate "

Amemiya T, Adachi T, Asai T, Adachi K, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N.

The 2017 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. March 22-25, 2017. San Francisco, Calif, USA

5: 市民公開講座. 「歯の健康と長寿について」
足立 哲也 2017年4月1日, 京都市

6: "In situ Monitoring of Porphyromonas Gingivalis on Chemistry-Modulated Silicon Nitride Bioceramics"

Pezzotti G, Bock RM, McEntire BJ, Jones E, Boffelli M, Zhu W, Puppulin L, Adachi T, Yamamoto T, Kanamura N, Marunaka Y, Bal BS.

Innovations in Biomedical Materials 2016. July 29-31, 2016, Chicago, US

7: "Enhanced Osteoconductivity on Surface-Modulated Silicon Nitride Bioceramics Monitored by in situ Raman Spectroscopy"

Pezzotti G, Bock RM, McEntire BJ, Jones E, Boffelli M, Zhu W, Baggio G, Boschetto F, Puppulin L, Adachi T, Yamamoto T, Kanamura N, Marunaka Y, Bal BS.

Innovations in Biomedical Materials 2016. July 29-31, 2016, Chicago, USA

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kpu-m.ac.jp/doc/classes/igaku/kinou/65.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 哲也 (Adachi Tetsuya)

京都府立医科大学,

医学(系)研究科(研究院), 助教

研究者番号: 10613573

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()