

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11987

研究課題名(和文) 歯肉幹細胞由来エクソソームを用いた新規歯周病治療の開発

研究課題名(英文) Development of new periodontal treatment targeting using GMSC-derived exosomes

研究代表者

福田 隆男 (Fukuda, Takao)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80507781

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)：歯肉幹細胞(GMSC)由来エクソソームによる歯周病治療への応用の検証のため、主に組織修復性(M2)マクロファージの誘導能およびマウス歯周炎モデルでの確認を行った。その結果、GMSCはTNF刺激によりエクソソームでのCD73の発現亢進を介してM2マクロファージの誘導をを行うことが明らかとなった。一方、マウス歯周炎モデルにおいてもエクソソームによる歯槽骨吸収抑制効果が認められた。さらに歯根膜細胞において、hGMSCs由来エクソソームのmiRNAを介したRANKKL抑制効果が確認された。以上より、GMSC由来エクソソームが歯周炎治療に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

近年、歯周組織の再生を目的とした再生療法が精力的に行われている。ただ大きな欠損や水平性欠損に対する効果的な再生療法は未だに確立されていない。この問題を解決する方法として、近年注目されている幹細胞を中心とした細胞移植による細胞治療はめざましい成果をあげつつも、必要設備・コストなどの面から、歯科臨床への普及には多くのハードルが課せられているのが現状である。歯肉幹細胞は、他組織のMSCに比べ採取が容易であるうえにエクソソームの分泌量が有意に高いという特性を持つため、最小限のMSCから歯周組織再生シグナルをより効果的に誘導する、安全性の高い次世代の幹細胞治療の開発基盤として期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells from gingiva (GMSCs) are easier to isolate, and appear to secrete higher amounts of exosome than other MSCs. Our preliminary data demonstrated that exosome from TNF-stimulated GMSCs markedly drove macrophage polarization toward anti-inflammatory (M2) phenotype, suggesting that this negative feedback loop could be beneficial for better wound healing. To further investigate the therapeutic potential of exosomes from GMSCs, we investigated its effect on alveolar bone loss from the viewpoint of exosomal miRNA.

Exosomes from GMSCs markedly suppressed alveolar bone resorption in mice model of periodontitis. Exosome from GMSC significantly inhibited RANKL expression in LPS-treated PDLCs, and the effect was further enhanced by prior treatment of GMSCs with TNF. Exosomes derived from GMSCs suppressed bone loss, and TNF-induced exosomal miRNA was essential for the suppression of RANKL expression.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯肉幹細胞 エクソソーム miRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新たな再生療法として幹細胞移植が盛んに研究されているが、従来の細胞治療の概念に加え、幹細胞が分泌する微粒粒子による効果に注目が向けられている。すなわち、幹細胞による疾病治療効果には、幹細胞から分泌されるエクソソームと呼ばれる細胞分泌小胞が中心的役割を果たしており、エクソソームに内包される microRNA (miRNA) が損傷組織の遺伝子発現を制御することで治癒を促進することが明らかにされつつある。

2. 研究の目的

申請者は歯肉幹細胞(GMSC)が分泌するエクソソームの有する著明な抗炎症・創傷治癒促進効果を確認したが、その詳細な分子基盤は未だ不明である。本研究は、歯肉幹細胞由来エクソソーム miRNA を新たな核酸創薬ターゲットとした新規歯周治療の分子基盤を確立することを目的とした。申請者は予備実験において、TNF- α 刺激が GMSC 由来エクソソームによる抗炎症性(M2)マクロファージの誘導を促進することを確認した。すなわち、GMSC 由来エクソソームに自然免疫を担う細胞に対して抗炎症効果を発揮すると考えられたが、歯周炎における歯槽骨吸収に対する影響は不明である。そこで本研究では、GMSC 由来エクソソームの抗炎症効果と歯槽骨吸収の確認とその機序解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト歯根膜細胞(PDLC)における骨吸収関連因子 RANKL 発現に着目し、GMSC 由来エクソソームが RANKL の発現に及ぼす影響について、エクソソーム内包 miRNA に注目した検証を行った。

ヒト GMSC を受理し、同細胞の培養上清から単離したエクソソームおよびヒト初代 PDLCs 用いて、以下の実験を行った。

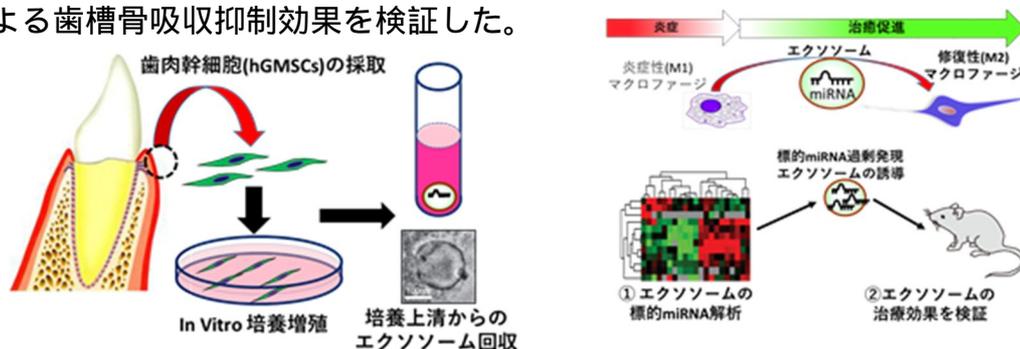
GMSC の幹細胞マーカーの発現状況の確認：Flow cytometry

GMSC 由来エクソソームの観察：TEM 撮影および Nanosight 粒子径分布解析
PDLC における RANKL 発現の検証 (LPS およびエクソソーム処理時)

TNF- α 刺激誘導性のエクソソーム由来 miRNA のスクリーニング：マイクロアレイ解析

エクソソーム内包 miRNA の機能解析：標的 miRNA mimic 導入により比較シグナル経路の検証

さらに、5-0 絹糸結紮によるマウス歯周炎モデルにおいても、エクソソーム注入による歯槽骨吸収抑制効果を検証した。

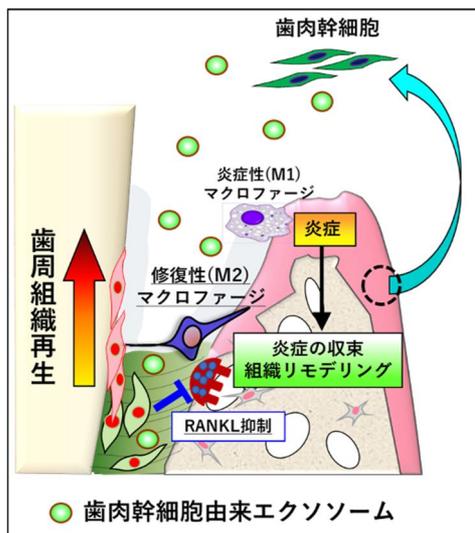


4. 研究成果

ヒト PDLC では LPS 刺激により RANKL 発現が誘導されたが、GMSC 由来エクソソーム前処理により、その発現は抑制された。この効果は、GMSC を TNF- α 刺激後に回収したエクソソームでの処理で著明に増強された。マイクロアレイ解析で抽出された、TNF- α 刺激エクソソームにおける発現変動上位群 miRNA を PDLCs へ導入した結果、miR-1260b による RANKL の発現抑制効果が確認された。miR-1260b は炎症歯肉において発現の減少が報告されているだけでなく、miRNA 標的検索 (TargetScan, miRanda) においても Wnt を標的遺伝子とすることが確認されている。GMSCs 由来エクソソームは、PDLC への LPS 誘導性 RANKL 発現に重要な Wnt5a のみならず、TRL シグナルとのクロストークを担う IRAK1 発現や JNK リン酸化を阻害したが miR-1260b mimic の導入によっても同様の効果が認められた。

5-0 絹糸結紮によるマウス歯周炎モデルにおいて、対照群は著明な歯槽骨吸収が惹起されたが、GMSC エクソソーム注入群では骨吸収の抑制効果が認められた。さらに、TNF- α 刺激 GMSC 由来エクソソーム群では、骨吸収抑制効果の増強効果が確認された。

以上から、歯肉幹細胞由来エクソソームは、抗炎症効果のみならず歯槽骨吸収抑制効果を有することが確認された。また、歯根膜細胞においては Wnt5a-IRAK1-JNK 経路の抑制を介して RANKL 発現抑制に働き、エクソソーム内包 miR-1260b がその活性の中心を担っていることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki S, Fukuda T, Nagayasu S, Nakanishi J, Yoshida K, Hirata-Tsuchiya S, Nakao Y, Sano T, Yamashita A, Yamada S, Ohta K, Shiba H, Nishimura F.	4. 巻 9
2. 論文標題 Dental pulp cell-derived powerful inducer of TNF- α comprises PKR containing stress granule rich microvesicles.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40046-2.	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 Yamamichi K, Fukuda T, Sanui T, Toyoda K, Tanaka U, Nakao Y, Yotsumoto K, Yamato H, Taketomi T, Uchiumi T, Nishimura F.	4. 巻 83
2. 論文標題 Amelogenin induces M2 macrophage polarisation via PGE2/cAMP signalling pathway.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol.	6. 最初と最後の頁 241-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2017.08.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taketomi T, Onimura T, Yoshiga D, Muratsu D, Sanui T, Fukuda T, Kusakawa J, Nakamura S.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Sprouty2 is involved in the control of osteoblast proliferation and differentiation through the FGF and BMP signaling pathways.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Biol Int.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.10876.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takano A, Fukuda T, Shinjo T, Iwashita M, Matsuzaki E, Yamamichi K, Takeshita M, Sanui T, Nishimura F.	4. 巻 69
2. 論文標題 Angiopoietin-like protein 2 is a positive regulator of osteoblast differentiation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Metabolism.	6. 最初と最後の頁 157-170.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2017.01.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sanui T, Takeshita M, Fukuda T, Tanaka U, Alshargabi R, Aida Y, Nishimura F.	4. 巻 50
2. 論文標題 Roles of serum in innate immune responses of human leukocytes to synthetic lipopeptide.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int Immunopharmacol.	6. 最初と最後の頁 61-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2017.06.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sanui T, Takeshita M, Fukuda T, Tanaka U, Alshargabi R, Aida Y, Nishimura F.	4. 巻 222
2. 論文標題 Adhesion attenuates respiratory burst induced by different modes of triggering in resting or LPS-primed neutrophils.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunobiology.	6. 最初と最後の頁 8-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imbio.2017.05.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sanui T, Fukuda T, Yamamichi K, Toyoda K, Tanaka U, Yotsumoto K, Taketomi T, Nishimura F.	4. 巻 7
2. 論文標題 Microarray Analysis of the Effects of Amelogenin on U937 Monocytic Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 10.4236/ajmb.2017.72009	6. 最初と最後の頁 107-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/ajmb.2017.72009	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13件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福田隆男
2. 発表標題 分子基盤に基づいた歯周組織再生療法の確立に向けて
3. 学会等名 第51回 日本歯周病学会若手研究者の集い (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中尾雄紀, 福田隆男, 讃井彰一, 田中麗, 渡邊ゆかり, 大和寛明, 四本かれん, 西村英紀
2. 発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソームによる抗炎症性マクロファージ誘導機序の検討 ~間葉系幹細胞培養上清の有する抗炎症作用に注目して~
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中尾雄紀, 福田隆男, 讃井彰一, 田中麗, 渡邊ゆかり, 大和寛明, 四本かれん, 西村英紀
2. 発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソームによる抗炎症性マクロファージ誘導機序の検討 ~間葉系幹細胞培養上清の有する抗炎症作用に注目して~
3. 学会等名 平成30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・合同研修会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中尾雄紀, 福田隆男, 渡邊ゆかり, 林千華子, 四本かれん, 大和寛明, 田中麗, 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は歯根膜細胞の RANKL 発現を抑制する
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾雄紀, 福田隆男, 渡邊ゆかり, 林千華子, 四本かれん, 大和寛明, 田中麗, 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由来 miR-1260b は Wnt5a を介して歯根膜細胞における RANKL 発現を抑制する
3. 学会等名 第151回秋季日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田隆男
2. 発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソームによる炎症制御
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会 2019年度秋季学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞田大樹、佐野朋美、福田隆男、岩下未咲、山下明子、藤田剛、讃井彰一、栗原英見、西村英紀
2. 発表標題 炎症脂肪/歯周組織における抗炎症分子の探索研究
3. 学会等名 第148回日本歯科保存学会2018年度春季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rehab Alshargabi, Aiko Takano, Akiko Yamashita, Misaki Iwashita, Takao Fukuda, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura
2. 発表標題 The role of proteoglycans in the pathogenesis of drug induced gingival overgrowth (DIGO).
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田隆男
2. 発表標題 歯周組織再生療法の変遷と展望
3. 学会等名 日本歯周病学会第1回佐賀地区臨床研修会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田隆男
2. 発表標題 プロテオーム解析と歯肉幹細胞エクソソームを応用した新規歯周病治療の分子基盤構築
3. 学会等名 第60回 日本歯周病学会春季学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田隆男
2. 発表標題 プロテオーム解析と歯肉幹細胞エクソソームを応用した歯周病治療の開発に向けて
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田隆男
2. 発表標題 頭脳循環派遣者報告会
3. 学会等名 九州大学歯学部創立50周年記念シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 5.福田 隆男, 中尾 雄紀, 讃井 彰一, 豊田 敬介, 田中 麗, 西村 英紀
2. 発表標題 広汎型侵襲性歯周炎患者に対し歯周組織再生療法を含む包括的治療を行った一症例
3. 学会等名 日本歯周病学会60周年記念京都大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野
<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/period/index.html>
「歯の神経が短期間に死滅するしくみを解明」歯周病学分野、東北大学、広島大学の共同研究の成果
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/324>
九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野
<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/period/>

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
研究分担者	西村 英紀 (Nishimura Fusanori) (80208222)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	讃井 彰一 (Sanui Terukazu) (70507780)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	武富 孝治 (Taketomi Takaharu) (10553290)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	