

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18984

研究課題名(和文) 歯根膜エクソソームとWntシグナルを基軸とした次世代歯周組織再生療法の基盤構築

研究課題名(英文) A basic study of a new periodontal regenerative therapy with periodontal ligament cell-derived exosome and Wnt signaling

研究代表者

向阪 幸彦 (SAKISAKA, Yukihiro)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：10760457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では機械的刺激によって歯根膜細胞が細胞外小胞エクソソームの分泌を誘導する知見を基に、機械的刺激誘導性エクソソームとセメント芽細胞への運命決定因子であるWntシグナルを併用することで、セメント芽細胞の分化誘導およびその分子メカニズムを解明することを目的として行われた。本研究から生理的咬合を模倣した周期的伸展刺激によって、前骨芽細胞では経時的なエクソソーム分泌誘導が生じ、セメント芽細胞では機械的刺激受容性イオンチャネルPiezo1を介した分化誘導が生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織の再生において歯根と歯周組織間の強固な付着、すなわち結合組織性付着を得るためにはセメント質の再生が不可欠である。歯周組織は咀嚼による機械的刺激を日常的に受けている組織でありながら、セメント芽細胞の分化誘導における機械的刺激の影響に関しては不明な点が未だ多く存在する。本研究の結果から咬合を模倣した周期的伸展刺激は前骨芽細胞のエクソソーム分泌を誘導し、セメント芽細胞の分化を誘導することが示唆された。本研究により咀嚼運動がセメント質の再生と恒常性の維持に寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the synergistic effect of exosome induced by mechanical stress and Canonical Wnt pathway on differentiation of cementoblast. In this study, the cyclic mechanical stress promoted exosome secretion from preosteoblasts. And it is suggested that the cyclic mechanical stress induces cementoblast differentiation via mechanosensitive ion channel Piezo1.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯学 再生医療 シグナル伝達 エクソソーム メカニカルストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯根膜に未分化間葉系細胞 (MSCs) が存在することが明らかにされ、同細胞の増殖・分化の制御に基づいた歯周組織再生療法の開発が進められている。現在はエナメルマトリックス蛋白や塩基性線維芽細胞成長因子などのシグナル分子を応用した技術が臨床にも広く用いられているが、これらの技術には未だ適応症に制限があり予知性も不十分と言える。歯周組織は骨、セメント質および歯根膜から成り立っているが、歯根と歯周組織の強固な付着、すなわち結合組織性付着を得るためにはセメント質の再生が不可欠である。従って、セメント芽細胞への分化の分子メカニズムを明らかにすることは歯周組織再生医学の発展に大きな意味を持つと考える。申請者は、これまでにセメント芽細胞の分化制御に分泌型糖タンパク Wnt シグナルが関与していることを報告してきた (Exp Cell Res. 2015)。さらに、申請者は、Wnt ファミリーの1つである Wnt3a はセメント芽細胞の前駆細胞である歯小嚢細胞に対して転写因子 Osterix に依存的にアルカリホスファターゼの発現を誘導することを初めて見出した (J Periodontal Res. 2016; Biochem Biophys Res Commun. 2016)。一方で、Wnt シグナルだけで歯小嚢細胞からセメント芽細胞まで分化を誘導することはできず、完全なセメント芽細胞の分化誘導メカニズムを解明することが喫緊の課題である。

(2) エクソソームは細胞が分泌する細胞外小胞で、多くの種類の細胞から分泌されている。エクソソームは内部にタンパク質のみならずメッセンジャーRNA (mRNA) やマイクロRNA (miRNA) などを含有し、脂質二重膜に覆われたこれら核酸分子は細胞外の分解酵素による分解を受けることなく他の細胞に伝達される。また、エクソソーム表面の膜タンパク質が特定の細胞のエンドサイトーシスを誘導することが分かり、生体内ではこれまでは不可能と考えられていた特定の遠隔細胞への mRNA や miRNA の伝達による、より直接的な機能および分化の調節が、エクソソームを介して行われていることが明らかとなった。近年、エクソソームは炎症の制御や組織修復の起点となるなど、組織の恒常性の維持に大きく関与していることが明らかになり、新たな治療法への応用が期待されている。これまで歯周組織におけるエクソソームの発現およびその機能に関する報告は皆無であったが、申請者は歯根膜細胞に対して生理的咬合を模倣した周期的伸展刺激を加えることで、エクソソームの分泌が誘導されるという新たな事象を見出した (Front. Immunol. 2019)。

これらの事実に基づき、本研究では生理的咬合を模倣したメカニカルストレスによって誘導されるエクソソームと Wnt シグナルを基軸とする歯周組織の分化誘導について解析を行った。

2. 研究の目的

本研究は、メカニカルストレス誘導性エクソソームとセメント芽細胞への運命決定因子である Wnt シグナルによるセメント芽細胞の分化成熟作用およびその分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

生理的咬合を模倣したメカニカルストレスを付与する目的で周期的細胞伸展装置 STB-140 (Strex Co.) を使用し、マウス歯小嚢細胞株 SVF4、マウスセメント芽細胞株 OCCM-30、マウス未分化間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 およびマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 に 10/60Hz、伸展率 20% の条件で周期的伸展刺激を加えた。周期伸展刺激専用のシリコンチャンバーは前処理として卓上型真空プラズマ処理装置 (Strex Co.) による親水化処理を施した上で細胞播種を行った。

(1) 周期的伸展刺激によるエクソソーム分泌誘導の解析

各種細胞を周期的伸展刺激を加えた状態で培養し、培養液中に分泌されたエクソソームを ELISA 法を用いて解析した。

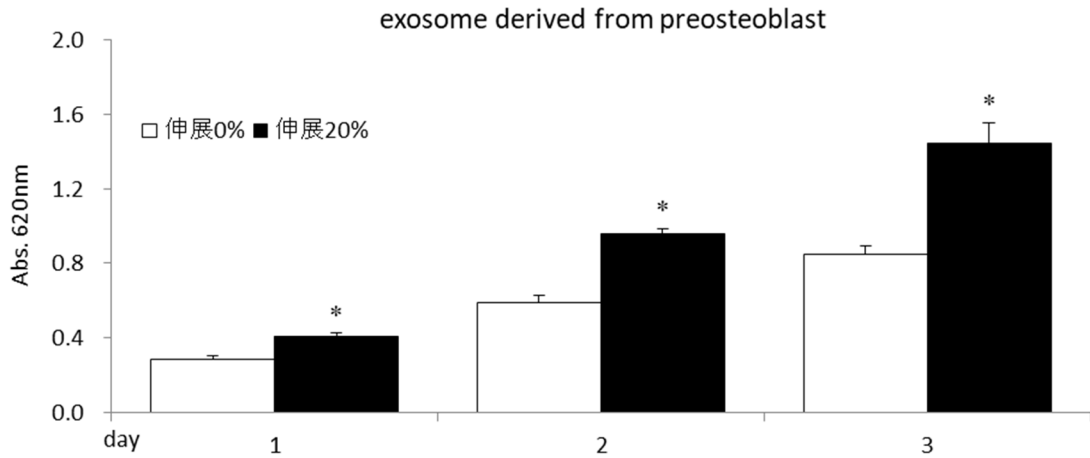
(2) 周期的伸展刺激によるセメント芽細胞の分化誘導能の解析

セメント芽細胞を周期的伸展刺激下で 2 日間培養し、その遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

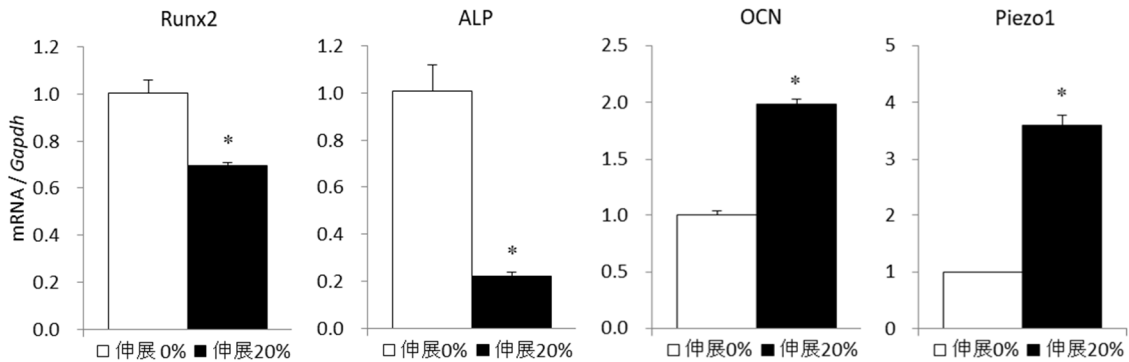
(1) 周期的伸展刺激によるエクソソーム分泌誘導の解析

前骨芽細胞に対して周期的伸展刺激を与えることで、経時的にエクソソームの分泌誘導を認めた。一方で歯小嚢細胞、セメント芽細胞および未分化間葉系幹細胞では周期的伸展刺激によるエクソソームの分泌誘導は認められなかった。



(2) 周期的伸展刺激によるセメント芽細胞の分化誘導能の解析

伸展刺激によりセメント芽細胞において転写因子 Runx2 や初期骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の発現抑制に加え、後期分化マーカーであるオステオカルシン (OCN) の発現誘導が認められた。加えて骨芽細胞および骨細胞での高発現が報告されている機械的刺激受容性イオンチャネル Piezo1 の遺伝子発現誘導も確認された。以上により周期的伸展刺激がセメント芽細胞の後期分化を誘導し、その過程でメカノセンサーである Piezo1 が関与している可能性が示唆された。



以上の結果から、硬組織形成細胞の中でもメカニカルストレスに対する応答性は形成する組織およびその分化段階によって異なり、エクソソーム分泌誘導については前骨芽細胞が周期的伸展刺激に対する高い応答性を示すことが示唆された。一方でセメント芽細胞はエクソソームの分泌誘導に対する反応性を示さなかったが、周期的伸展刺激による分化誘導が生じることが示唆された。今後はセメント芽細胞の分化誘導における Piezo1 の影響について着目し、メカニカルストレスによって生じる分化誘導の分子メカニズムの解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Zhang Jingyu, Sakisaka Yukihiko, Ishihata Hiroshi, Maruyama Kentaro, Nemoto Eiji, Chiba Shigeki, Nagamine Masaru, Hasegawa Hiroshi, Yamada Satoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Evaluation of Preosteoblast MC3T3-E1 Cells Cultured on a Microporous Titanium Membrane Fabricated Using a Precise Mechanical Punching Process	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5288 ~ 5288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma13225288	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 Wang Zhuyu, Maruyama Kentarou, Sakisaka Yukihiko, Suzuki Shigeki, Tada Hiroyuki, Suto Mizuki, Saito Masahiro, Yamada Satoru, Nemoto Eiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Cyclic Stretch Force Induces Periodontal Ligament Cells to Secrete Exosomes That Suppress IL-1 Production Through the Inhibition of the NF- B Signaling Pathway in Macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.01310	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0件

〔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
---------	---------