

令和 3 年 6 月 9 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：19K19013

研究課題名(和文)力学誘導歯根膜細胞エクソソームによる抗炎症M2マクロファージ分極制御理論の確立

研究課題名(英文) Establishment of anti-inflammatory M2 macrophage polarization control theory using mechanical stress-induced periodontal ligament cell exosome

研究代表者

丸山 顕太郎 (Maruyama, Kentaro)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：80833805

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)：Interleukin (IL)-4で刺激されたマウスマクロファージ細胞株RAW264.7にメカニカルストレスを付与したヒト歯根膜細胞から分泌されたエクソソームを添加すると、M2マクロファージマーカーであるArginase-1遺伝子発現が増強した。また、Interferon (IFN) とLipopolysaccharide (LPS)で刺激されたRAW264.7に同エクソソームを添加すると、炎症性サイトカインTumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ の遺伝子およびタンパク発現が抑制され、抗炎症性サイトカインIL-10の遺伝子およびタンパク発現が増強された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性M1型マクロファージと抗炎症・組織修復性M2型マクロファージの適切なM1/M2バランスは組織の恒常性の維持に極めて重要であり、その破綻は組織破壊や慢性炎症の持続などの病態形成につながる事が知られている。本研究は、最近申請者らが見出したメカニカルストレス応答性歯根膜細胞エクソソームによるM2マクロファージ分化の制御機構を確立することを目的としており、エクソソームによるマクロファージM1/M2極性バランスの制御理論に基づいた新たな炎症治療薬の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Addition of exosomes secreted from mechanically stressed human periodontal ligament cells to interleukin (IL) -4 stimulated mouse macrophage cell line RAW264.7 enhanced the expression of the M2 macrophage marker Arginase-1 gene. Furthermore, addition of the exosome to Interferon (IFN) and Lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW264.7 suppressed gene and protein expression of the inflammatory cytokine Tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ , and enhanced gene and protein expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10.

研究分野：歯周病学

キーワード：エクソソーム メカニカルストレス 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

歯周病は、プラークバイオフィルムを構成する歯周病原性細菌による歯周組織の炎症性疾患である。特に、マクロファージは炎症を惹起し、自然免疫の中心として働く。近年、炎症を強く誘導する古典的(M1)マクロファージとは異なるフェノタイプ、すなわち「M2 マクロファージ」が注目されている。M2 マクロファージは過剰な炎症反応の抑制や組織修復および再生に関与することが知られており、その誘導法の確立により過剰な炎症を抑制し、創傷治癒および組織再生を促すことが期待できる。

エクソソームは、直径約 50 ~ 200 nm の細胞外小胞であり、あらゆる細胞から分泌される。エクソソームにはタンパク質および microRNA 等の核酸が内包されており、細胞間コミュニケーションに関与している。また、間葉系幹細胞由来エクソソームは抗炎症活性を持つことが知られているほか、エクソソーム内への有益な microRNA 等の封入も研究されており、将来的な炎症性疾患や再生療法等への応用が期待されている。しかし、歯周組織の細胞調節におけるエクソソームの関与についてはほとんど知られていない。

申請者らは最近、歯根膜細胞はメカニカルストレスを受けることでエクソソームを分泌するという新たな事象を見出すとともに、慢性炎症プロセスで多彩な役割を果たすマクロファージに対して抗炎症活性を有することを明らかにした (Front. Immunol. 2019)。このことから、歯周組織において、歯根膜細胞由来エクソソームは、炎症・免疫応答を制御しているものと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、最近申請者らが見出したメカニカルストレス応答性歯根膜細胞エクソソームによる M2 マクロファージ分化の制御機構を確立することである。

### 3. 研究の方法

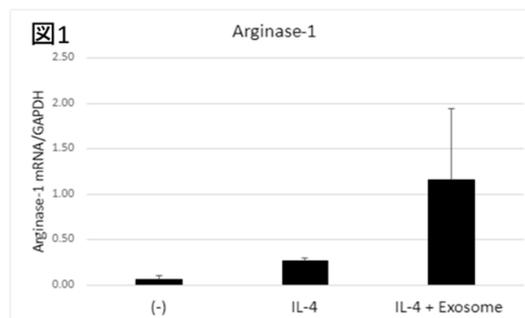
ヒト歯根膜細胞に周期的伸展装置 STB-140 (Strex Co.) を用いてメカニカルストレス付与し、得られた細胞上清から ExoQuick-TC (System Biosciences.) を用いてエクソソームを抽出した。培地はエクソソーム除去済み 10%FBS 添加 MEM を用いた。

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を IL-4 および抽出したエクソソーム存在下で 24 時間培養し、M2 マクロファージマーカーである Arginase-1 の遺伝子発現を、リアルタイム PCR を用いて解析した。

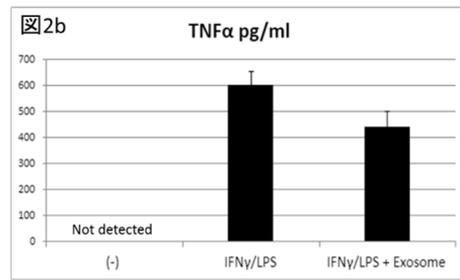
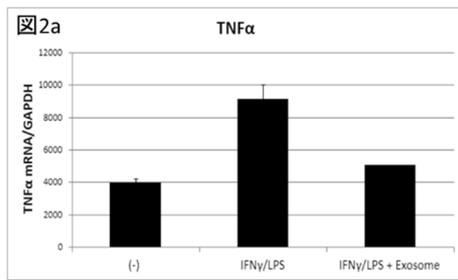
RAW264.7 を IFN $\gamma$  および E. coli 由来 LPS で 3 時間培養し M1 マクロファージを誘導した後、エクソソーム存在下でさらに 15 時間培養した。TNF- $\alpha$  および IL-10 の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析し、培養上清中の TNF- $\alpha$  および IL-10 タンパクを ELISA で測定した。

### 4. 研究成果

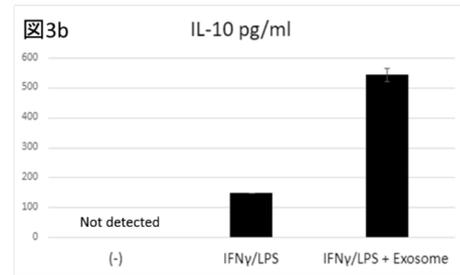
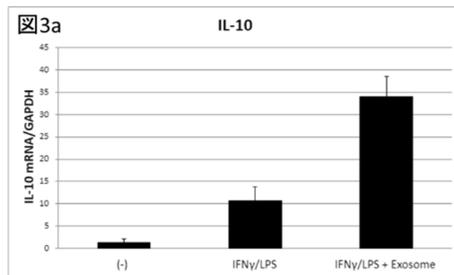
RAW264.7 を IL-4 で刺激すると M2 マクロファージマーカーの Arginase-1 遺伝子発現が誘導されるが、エクソソーム刺激を加えることにより、Arginase-1 発現の増強が確認された(図 1)。



RAW264.7 を IFN $\gamma$  および LPS で刺激すると、M1 マクロファージマーカーの一つとして知られている TNF- $\alpha$  が遺伝子およびタンパク質レベルで誘導されるが、エクソソームを添加することで、TNF- $\alpha$  の誘導が抑制された(図 2)。



一方、抗炎症性サイトカインの一種である IL-10 は、IFN および LPS 刺激により遺伝子およびタンパク質レベルで誘導され、エクソソームはそれらの誘導を増強した (図 3)。



以上の結果から、メカニカルストレス応答性歯根膜細胞エクソソームは、マクロファージの M2 分化誘導および M1/M2 極性転換に関与していることが示唆された。今後、このエクソソーム内に含包する炎症制御に有用なタンパクや miRNA の解析を行うことにより、新たな炎症制御メカニズムや、新規治療薬の開発につながるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jingyu Zhang , Yukihiro Sakisaka , Hiroshi Ishihata , Kentaro Maruyama , Eiji Nemoto , Shigeki Chiba , Masaru Nagamine , Hiroshi Hasegawa , Satoru Yamada	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 (Basel, Switzerland)	6. 最初と最後の頁 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山 顕太郎、根本 英二、鈴木 茂樹、山田 聡
2. 発表標題 周期的伸展刺激を受容したヒト歯根膜細胞はマクロファージからの IL-10産生を促進する
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 令、丸山 顕太郎、向阪幸彦、根本英二、鈴木茂樹、山田聡
2. 発表標題 炎症・メカニカル環境下における歯根膜細胞の新たな抗炎症システム~マクロファージIL-10分泌誘導因子の発現~
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向阪 幸彦、丸山 顕太郎、張 井玉、石幡 浩志、根本 英二、佐々木 啓一、山田 聡、井上 拓、千葉 茂樹、初澤 毅
2. 発表標題 多孔性チタンメンブレンの表面性状による骨分化誘導能の評価
3. 学会等名 生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ZHANG Jingyu、向坂 幸彦、丸山 顕太郎、石幡 浩志、鈴木 茂樹、根本 英二、山田 聡
2. 発表標題 精密マイクロパンチ加工で製作された純チタン多孔膜上における骨芽細胞様細胞培養
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------	---------