

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17498

研究課題名(和文) 糖尿病は歯周病特異的エクソソームで増悪するか？

研究課題名(英文) Do periodontal disease specific exosomes exacerbate diabetes?

研究代表者

鍵谷 忠慶 (Kagiya, Tadayoshi)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：30405774

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)：近年、歯周病の影響は口腔局所にとどまらず、全身へ及ぶことが、次々と明らかになってきている。糖尿病はそのなかの代表的全身疾患である。本研究は、細胞が分泌するナノ粒子のエクソソームに注目し、これまで炎症性サイトカインによるインスリン抵抗性を中心に議論されてきた歯周病と2型糖尿病の病態関係を、全く新しい視点から解明することを目的とする。

本研究では、歯周組織を構成する細胞として、歯肉上皮細胞、口腔上皮細胞、歯根膜線維芽細胞、マクロファージ、および破骨細胞について、ヒト細胞で検討した。これらを使い、エクソソームの「送り手」、あるいは「受け手」としての作用を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、これまで炎症性サイトカインや歯周病原性細菌のLPSを中心に議論されていた歯周病と2型糖尿病の病態関係を、エクソソームという全く新しい視点から解明することにある。その成果は、(1) 歯周病特異的・炎症特異的エクソソームを標的とした新たな糖尿病・歯周病治療の道を開拓し、基礎となる考え方を確立すると期待され、(2) 血液や尿中のエクソソームによる糖尿病の合併症(歯周病)診断マーカーの開発や、(3) 唾液や歯肉溝滲出液中のエクソソームによる新規の歯周病診断基準の確立も可能にするであろう。

研究成果の概要(英文)： In recent years, it has been shown that periodontal disease affects the entire body-not just the oral cavity. Diabetes is a representative systemic disease. To investigate the relationship between periodontal disease and type 2 diabetes, we focused on insulin resistance caused by pro-inflammatory cytokines. To investigate this relationship from a new viewpoint, this study focused on exosomes, which are nano-sized particles secreted by cells. We used gingival keratinocytes, oral keratinocytes, periodontal ligament fibroblasts, macrophages, and osteoclasts as human periodontal tissue cells. These cells were used as exosome donor cells and/or recipient cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 microRNA 糖尿病 歯周病 炎症 インスリン抵抗性 ナノ粒子

## 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40歳を過ぎると、8割以上が罹患する生活習慣病である。これは *P. gingivalis* に代表される歯周病原性細菌が、歯周組織に感染することで起こる。歯周病が進行すると歯槽骨が破壊されて、患者は歯を失う。近年、歯周病の影響は口腔局所にとどまらず、全身へ及ぶことが、次々と明らかになってきている。糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー病、誤嚥性肺炎、慢性閉塞性肺疾患等のリスクファクターや増悪因子であり、早産の原因にもなる。

このうち、歯周病による2型糖尿病の増悪には、単球やマクロファージから分泌される TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  等の炎症性サイトカイン、あるいは歯周病原性細菌の内毒素 (LPS) がインスリン抵抗性を惹起することが原因と考えられているが、これだけでは説明できない事も多い。このため、現在のところ、歯周病がなぜ血糖コントロール不良に拍車をかけて、糖尿病を悪化させるのかは、大部分が謎である。

### 2. 研究の目的

このような状況下で、研究代表者は「歯周病が糖尿病を増悪させる重要なメカニズムが、炎症性サイトカイン以外にもあるのではないかと考えて、血流等を介した全身疾患へ影響を与える可能性のある新規分子としてエクソソームに注目して、研究を進めている。エクソソームは、細胞が分泌するナノ粒子で、血液、唾液、尿等の体液中に幅広く存在する。そして、エクソソームはその中に、mRNA や microRNA を内包しており、新規の細胞間情報伝達物質であると考えられる。本研究は、このエクソソームに注目し、これまで炎症性サイトカインによるインスリン抵抗性を中心に議論されてきた歯周病と2型糖尿病の病態関係を、全く新しい視点から解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 歯周病が進行すると歯槽骨が破壊されるが、その破壊の主役は破骨細胞である。そこでまず、生理的状態での破骨細胞由来のエクソソームについて検討した。ヒト単球である CD14 陽性細胞を M-CSF によってマクロファージへ分化させて、ポリマー沈殿法でエクソソームを含む細胞外小胞を回収した。そして、CD14 陽性細胞から M-CSF/RANKL を使って、破骨細胞を分化させ、同様に細胞外小胞を回収した。マクロファージと破骨細胞から分泌された細胞外小胞の中の microRNA をマイクロアレイ法で網羅的に調べて、qRT-PCR 法でその結果を確認した。

(2) 次に、歯周組織を構成する種々の細胞から分泌される歯周病特異的エクソソームの機能について検討した。

① 初代ヒト歯肉上皮細胞と初代ヒト口腔上皮細胞を培養して、それぞれに歯周病特異的エクソソームを作用させた。細胞内の Total RNA を抽出して、qRT-PCR 法で調べた。

② 他の上皮系細胞でも同様な結果が得られるかどうか調べるため、舌扁平上皮癌細胞株 (SCC-15) へ歯周病特異的エクソソームを作用させて、①と同様に調べた。

(3) 歯は歯槽骨によって支えられるが、歯と歯槽骨の間には、歯根膜（歯周靭帯）と呼ばれる結合組織が介在している。このため歯根膜は、歯周ポケットに住みついた歯周病原性細菌に暴露されやすい。ここでは、永年の予備実験を基に、歯根膜細胞が分泌するエクソソームについて解析した。初代ヒト歯根膜線維芽細胞 (図 1) を 72 時間培養して、培養上清を回収した。上清からデブリを除去し、ポリマー沈殿法によってエクソソームを含む細胞外小胞を回収した。

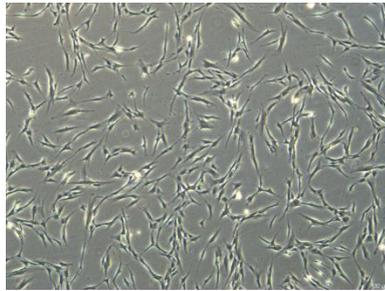


図1 初代ヒト歯根膜線維芽細胞（位相差顕微鏡像）

FBS中の細胞外小胞を filtration によって除去後、10%FBS含有MEM-Alphaで初代ヒト歯根膜線維芽細胞(Lonza社)を72時間培養した。

- ① 得られた細胞外小胞にエクソソームが含まれることを確認するために、エクソソームのマーカータンパク質の発現について、抗体アレイで調べた。
- ② 得られた細胞外小胞に内包されるRNAの性質を調べるために、Total RNAを回収して、Agilent 2100 Bioanalyzerで調べた。
- ③ 更に、上記のRNAをTruSeq small RNA Library Prep kitを用いてライブラリー調整後、small RNA sequencing解析を行った。これによって、細胞外小胞に内包されるsmall RNAの詳細な配列が判る。

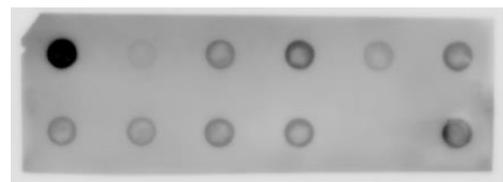
#### 4. 研究成果

(1) マイクロアレイ法では、miR-451aとmiR-6850-5pが破骨細胞由来の細胞外小胞エクソソームで強く発現していたが、qRT-PCR法で確認したところ、マクロファージ由来の細胞外小胞と比べて有意に強く発現していることはなかった。また、miR-214-3pは破骨細胞由来の細胞外小胞で強く発現しているという報告があるが、本実験ではそのような結果は得られなかった。

(2) 当初は、骨格筋細胞と肝細胞が歯周病特異的エクソソームを取り込むかどうか調べる事を中心に計画していた。ところが、予想外にも歯周病特異的エクソソームは、ヒト歯肉上皮細胞とヒト口腔上皮細胞に大きく影響を与えていたので、こちらを優先して解析した。歯周病特異的エクソソームによって、初代ヒト歯肉上皮細胞と初代ヒト口腔上皮細胞は、本来の形態である多角形から、角が取れた形態へと変化した。間葉のマーカーであるVimentinは不変であったが、上皮細胞の接着に関与するE-cadherinは、その発現が減少した。しかし、舌扁平上皮癌細胞株(SCC-15)の細胞形態は変化せず、VimentinもE-cadherinもその発現に変化はなかった。このことから、このような歯周病特異的エクソソームの作用は、口腔上皮細胞や歯肉上皮細胞に対する特異的作用である可能性が示唆された。

- (3) ① ヒト歯根膜線維芽細胞由来の細胞外小胞には、ICAM, CD81, CD63等が比較的強く発現しており(図2)、エクソソームが含まれていることが確認できた。

Positive GM130 FLOT1 ICAM ALIX CD81



CD63 EpCAM ANXA5 TSG101 Blank Positive

図2 エクソソームマーカーの発現

Exo-Check Antibody Arrays, SBI社

- ② 前述の細胞外小胞には、25 塩基長前後の small RNA が最も多く存在し、1,000 塩基長以上の RNA は相対的に少なかった(図3)。



図3 ヒト歯根膜線維芽細胞由来の細胞外小胞に内包される RNA  
縦軸：塩基量(相対値) 横軸：塩基長(nt)

- ③ この細胞外小胞には、miR-22-3p, miR-92a-3p, miR-3182 等が多く存在していた。また、isomiR と呼ばれる small RNA も多く存在していた。これより、ヒト歯根膜線維芽細胞由来のエクソソームを含む細胞外小胞には、成熟 microRNA や isomiR が豊富に存在することが判った。

エクソソームは、ヘテロなナノ粒子の集団であり、回収方法が複数存在する。そして、回収方法が異なれば、得られるエクソソームの性質や性状も異なる。エクソソームの回収方法には、超遠心法、密度勾配遠心法、ポリマー沈殿法、抗体アフィニティー法等がある。例えば、本研究では、ExoQuick-TC を使ったポリマー沈殿法を用いた。この方法は、回収量が多く、実験操作も簡便であるという利点があるが、その一方で、エクソソームだけではなく、夾雑タンパク質も多く回収されてしまうという欠点がある。これに対し、抗体アフィニティー法は、夾雑タンパク質が少ない高純度のエクソソームが回収されるが、特定の抗原(CD9, 63, 81など)を強く表面に発現しているエクソソームだけが回収される偏った粒子集団となってしまう。このように、完璧なエクソソーム回収方法はないというのが現状である。

上述の回収方法の特性を鑑みると、今回用いたポリマー沈殿法では、回収された歯周病特異的エクソソームの中に、細胞から分泌されたサイトカインが含まれていて、それが研究成果(2)のような口腔上皮細胞や歯肉上皮細胞に対する作用となった可能性を否定できない。そこで、サイトカイン等の夾雑タンパク質が少なく、かつ、特定のエクソソームだけが回収される偏った粒子集団とならないような方法で解析する必要がある。

この要件を満たす新しい回収方法として「ホスファチジルセリン(PS) アフィニティー法」が考案された。エクソソームはその膜の外側に PS を発現している(通常は膜の内側に発現する)事を利用した方法である。今後は、PS アフィニティー法で歯周病特異的エクソソームを回収して、各種細胞に対する作用を検討する予定である。

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 鍵谷 忠慶
2. 発表標題 TNF- のヒトマクロファージ由来細胞外小胞エクソソームへの影響
3. 学会等名 岩手医科大学歯学会第49回総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鍵谷 忠慶
2. 発表標題 ヒト歯根膜線維芽細胞由来の細胞外小胞における Small RNA sequencing
3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap <a href="https://researchmap.jp/read0124350">https://researchmap.jp/read0124350</a> 岩手医科大学リポジトリ <a href="https://iwatemed.repo.nii.ac.jp/">https://iwatemed.repo.nii.ac.jp/</a> ResearchGate <a href="https://www.researchgate.net/profile/Tadayoshi-Kagiya">https://www.researchgate.net/profile/Tadayoshi-Kagiya</a> Web of Science <a href="https://www.webofscience.com/wos/author/record/AFB-9227-2022">https://www.webofscience.com/wos/author/record/AFB-9227-2022</a>
--

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
---------	---------