

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09895

研究課題名(和文) 糖尿病関連歯周炎における歯周組織細胞由来エクソソームの総合的研究

研究課題名(英文) Study of exosomes from cells in periodontal tissues with diabetes-associated periodontitis

研究代表者

生田 貴久 (IKUTA, Takahisa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：00746563

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)：通常、高グルコースまたは高グルコース培地に対して浸透圧を調整したマンニトール添加通常培地に培養したヒト歯根膜線維芽細胞(HPdLF)やヒト歯肉上皮細胞(OBA-9)からExosomeを分離し、粒子径および粒子数測定を測定するとともにタンパク量を定量した。また、分離したExosome中にExosome markerであるCD9、CD63およびTSG101を検出され。さらに、高グルコース培地で培養したHPdLFから分離したHG-Exo (10 µg/mL)で24時間刺激後のHPdLF細胞から炎症性サイトカインIL-6及びIL-8の産生増強を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者での歯周炎(糖尿病関連歯周炎)は重篤な病態を示す。近年、細胞から分泌されるExosomeは細胞内の核酸や蛋白質等を含み、周囲細胞へ運ばれ、細胞間や臓器への情報シグナル伝達の役割を担っており、バイオマーカーや治療の標的分子として注目されている。しかしながら、Exosomeによる糖尿病関連歯周炎への影響を調べた研究はない。糖尿病状態を模した高グルコース条件下で培養した細胞由来のexosomeが炎症性サイトカイン産生増強を誘導した本研究成果は、Exosomeに視点を置いた糖尿病関連歯周炎の病態の解明を目指すことに繋がることから、学術的意義に加えて、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes were isolated from human periodontal ligament fibroblasts (HPdLF) and human gingival epithelial cells (OBA-9) cultured in normal, high glucose, or normal medium supplemented with mannitol with osmotic pressure adjusted for high glucose medium, and particle size and particle number measurements were performed, as well as protein content was quantified. Exosome markers CD9, CD63, and TSG101 were detected in the isolated exosomes. Furthermore, enhanced production of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 was observed in HPdLF cells after 24-hour stimulation with HG-Exo (10 µg/mL) isolated from HPdLF cultured in high glucose medium.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エクソソーム 糖尿病関連歯周炎 高グルコース 歯周医学 炎症反応 サイトカイン 歯根膜線維芽細胞 歯肉上皮細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病関連歯周炎では重篤な歯周炎病態を示すことがあり、この重症化機構が研究されており、糖尿病関連歯周炎の重症化には病態の主因である高グルコースや合併症の原因物質である Advanced Glycation End Products (AGEs) が深く関与している。我々は、これまでに高グルコース (High Glucose: HG) が歯肉線維芽細胞の IL-1 $\beta$  や MMP-1 発現を増加させ、AGEs が IL-6, ICAM-1 や酸化ストレス (ROS) を増加させること、また、AGEs が口腔上皮細胞において炎症関連蛋白質であるリポカリン 2 の発現を増加させることを報告した。

(2) また、AGEs は、骨細胞で骨形成を抑制するスクレロスタチンの産生を増加させ、骨芽細胞でのアルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性や骨様結節の形成を抑制させること等を示した。さらに、これらの AGEs の作用は、*Porphyromonas gingivalis* 由来リポ多糖 (Pg-LPS) との共作用により増強された。このような結果は、高血糖や AGEs が歯周病原細菌等の病原因子と共に作用し、糖尿病関連歯周炎の病態形成に関与している可能性を示唆しているが、その詳細な機構については未だ不明な点が多い。

(3) 最近、複数の細胞や細菌から分泌されたエクソソームが周辺の別の細胞に対して様々な情報を伝達し、生理的あるいは病理的な作用を示すことが報告されている。歯周組織においても、歯根膜線維芽細胞を Pg-LPS で刺激した時、分泌されるエクソソームが骨芽細胞の IL-6 や TNF- $\alpha$  の発現を増加させ、ALPase 活性やコラーゲン合成を抑制し、また、口腔上皮細胞が分泌するエクソソームが別の上皮細胞や線維芽細胞の増殖を抑制することが報告されている。一方、腎臓のメサンギウム細胞を高グルコース状態で培養した際に分泌されるエクソソームの成分はコントロールのエクソソームと比較し異なることや間葉系間質細胞を AGEs で処理した場合、血管平滑筋細胞の石灰化を抑制することが示された。これらの報告は、糖尿病合併症の病態形成に関与する HG や AGEs がエクソソーム中の成分や量を変化させ、他細胞への作用に影響を与えることを示唆している。しかし、高グルコース (HG) や AGEs は、歯周組織細胞が分泌するエクソソームの成分や量をどのように変え、周囲細胞にどのような影響を及ぼすかは明らかではない。

(4) HG や AGEs 刺激による歯周組織細胞での炎症関連因子の発現制御については、我々や他の研究者らによって研究され、歯周組織の炎症反応や組織破壊の誘導の可能性が示されている。また、歯根膜線維芽細胞や口腔上皮細胞によるエクソソーム分泌とその他細胞への影響、さらに HG や AGEs による他組織細胞からのエクソソームの分泌などは報告されているが、歯肉線維芽細胞や上皮細胞において HG や AGEs の刺激によりどのような成分や量から成るエクソソームが分泌されるのかを網羅的に検討した研究は未だない。このように糖尿病関連歯周炎の病態に関連して歯周組織細胞から分泌されるエクソソームの影響について検討した研究はこれまでに無く、分泌されたエクソソームに関連して細胞レベルと生体レベルの両点から総合的に検討するところも独創的な研究であると言える。

(5) そこで、糖尿病の病態下や歯周病の病原因子で刺激された歯周組織細胞が分泌するエクソソームが糖尿病関連歯周炎の病態機構に関与する可能性が強く示唆され、本研究を発想するに至った。

### 2. 研究の目的

エクソソームが糖尿病での血栓症や神経障害に影響を与える事は示唆されているが、糖尿病関連歯周炎への影響を調べた研究はないことから、本研究では、高グルコースや AGEs 刺激により

歯周組織細胞から分泌されるエクソソーム成分を分析し、分泌されたエクソソームがその他の歯周組織細胞に対してどのような作用を示すかを調べる。すなわち、本研究の目的は、歯周組織細胞を高グルコース(HG)や AGEs で刺激した際に分泌されるエクソソーム中の核酸や蛋白質の成分や量の変化を調べ、この変化が周囲の細胞の生理的 / 病理的機能にどのような影響を与えるかを検討することにより、エクソソームに視点を置いた糖尿病関連歯周炎の病態の解明を目指すことである。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞培養：ヒト歯根膜線維芽細胞(Human Periodontal Ligament Fibroblasts; HPdLF)を 10% Fetal Bovine Serum (FBS)添加αMEM 培地でコンフルエントまで培養後、通常の Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) +10%FBS 培地、高グルコース DMEM+10%FBS 培地または高グルコース培地に対して浸透圧を調整した Control としてマンニトール添加通常 DMEM+10%FBS 培地にそれぞれ交換し、さらに 2 日間培養を継続した。その後、培地除去して PBS で細胞洗浄し、さらに Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) +10%FBS 培地、高グルコース DMEM+10%FBS 培地またはマンニトール添加通常 DMEM+10%FBS 培地で 2 日間培養をした。

また、ヒト歯肉上皮細胞(OBA-9)を Bovine Pituitary Extract (BPE)および Epidermal Growth Factor (EGF)添加無血清 Keratinocyte-SFM 培地でコンフルエントまで培養後、培地除去して PBS で細胞洗浄し、さらに、通常、高グルコース培地または高グルコース培地に対して浸透圧を調整した Control としてマンニトール添加通常培地にて 4 日間培養した。

(2) エクソソーム分離：培地を回収し、遠心分離(3,000 x g, 15 min, 4°C)後、Exosome 分離キット：Pure Exo Exosome Isolation Kit にて Exosome を分離した。通常培地の培養液から分離したものを NG-Exo、高グルコース培地の培養液から分離したものを HG-Exo、また、マンニトール添加通常培地の培養液から分離したものを Mannitol+NG-Exo とし、以下の実験に用いた。また、Exosome 分離のために上清を回収後、細胞画分は RIPA Lysis Buffer を用いて抽出した。

さらに、MagCaptureExosome Isolation Kit PS Ver.2 および EV-save (細胞外小胞ブロッキング試薬)を用いて Exosome の分離も試みた。

(3) 粒子径および粒子数測定：ゼータサイザーナノあるいはゼータサイザーUltra により粒子径および粒子数を測定した。測定サンプルは、測定用キュベットに加える前に 5 分間超音波振動を加えた。

(4) エクソソームマーカーの検出：Exosome 中のタンパク量は、TaKaRa BCA Protein Assay Kit を用いて定量した。分離した Exosome 中の Exosome marker の検出は、Western Blotting 法により行った。Exosome marker として TSG101、CD9 ならびに CD63 の各抗体を、Golgi marker (Negative Control)として GM130 抗体を、Loading control としてβ-actin 抗体を用いた。

(5) サイトカイン産生量の解析：分離した Exosome (10 μg/mL)で 24 時間刺激後の HPdLF 細胞から培養上清中に産生されたサイトカイン量は、サイトカインアレイ・Periodontal Disease Array C1 (RayBiotech, Inc., AAH-PDD-1-8)を用いて解析した。また、分離した Exosome (10 μg/mL)で 48 時間刺激後の HPdLF 細胞から培養上清中に産生された IL-6 および IL-8 量を ELISA Kit (DuoSet ELISA DEVELOPMENT SYSTEM)にて定量した。

#### 4. 研究成果

(1) 粒子径および粒子数測定：NG-Exo, HG-Exo および Mannitol+NG-Exo いずれも約 100 nm をピーク値としたシングル波形が観察された。超音波未処理の Exosome サンプルでは、複数のピークが観察されたため、分離した Exosome は凝集していたが、超音波振動により解消された可能性があり、分離した exosome は、100nm 前後の微粒子であることが示された。

また、OBA-9 細胞から MagCaptureExosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて分離したいずれの Exosome も 100 nm 前後をピーク値としたシングル波形が観察された。

さらに、粒子数に関しては、 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{12}$  particles/mL の exosome が得られた。

(2) エクソソームマーカーの検出：分離した Exosome 中の Exosome marker を Western blotting 法で確認した結果、全ての群において、Exosome marker である CD9, CD63 および TSG101 のバンドが検出されたが、Negative control としての Golgi marker である GM130 は、全ての群でバンドは検出されず、細胞分画中のみバンドが検出された(図 1)。

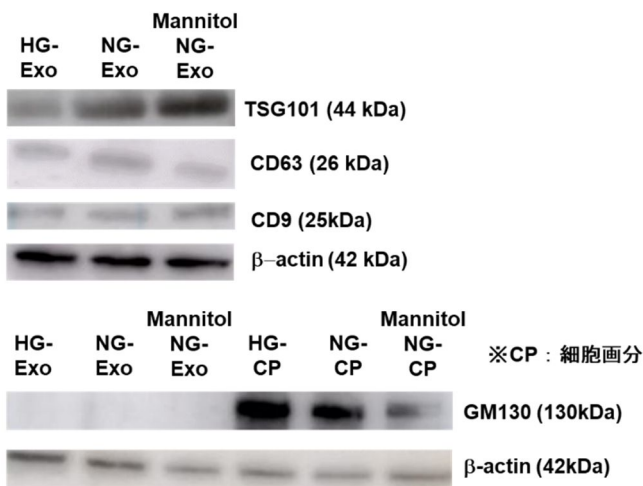


図1 分離したExosome中のエクソソームマーカーの検出

(3) サイトカイン産生量の解析：サイトカインアレイ解析により、分離した HG-Exo (10  $\mu$ g/mL) で 24 時間刺激後の HPdLF 細胞から培養上清中に炎症性サイトカイン IL-6 及び IL-8 の産生増強を認めた(図 2)。また、ELISA による定量解析により、分離した HG-Exo (10  $\mu$ g/mL) で 48 時間刺激後の HPdLF 細胞から培養上清中に炎症性サイトカイン IL-6 の産生増強を認めた。

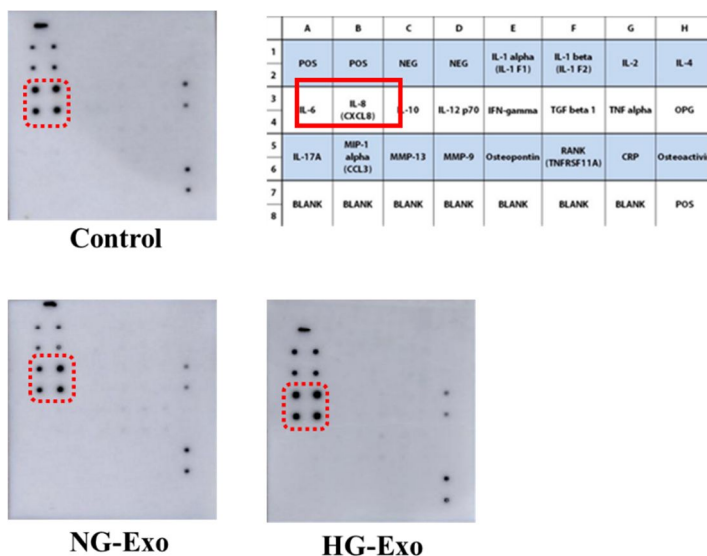


図2 分離したExosomeにて24時間刺激後のHPdLF細胞培養上清中の炎症性サイトカイン産生

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木戸理恵, 廣島佑香, 木戸淳一, 吉田賀弥, 生田貴久, 湯本浩通
2. 発表標題 人工合成したSecretory leukocyte protease inhibitorの抗菌活性とリポソーム封入
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 船木真理, 秦明子, 吉田光輝, 宮本直輝, 生田貴久, 植村勇太, 秋月皆人, 丹黒章, 湯本浩通, 小川博久, 尾矢剛志
2. 発表標題 休眠状態の脂肪組織由来間葉系幹細胞による細胞老化随伴分泌現象の解除と糖尿病性合併症治療への応用の可能性
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Makoto Funaki, Akiko Hata, Mitsuteru Yoshida, Naoki Miyamoto, Takahisa Ikuta, Yuta Uemura, Minato Akizuki, Akira Tangoku, Hiromichi Yumoto, Hirohisa Ogawa, Takeshi Oya
2. 発表標題 Quiescence Recovers Adipose Tissue-Derived Stromal Cells from Senescence-Associated Secretory Phenotype, Leading to Enhanced Angiogenesis and Diabetic Wound Healing
3. 学会等名 83nd Scientific Sessions presented by the American Diabetes As (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	木戸 淳一  (KIDO Jun-ichi)  (10195315)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授    (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	稲垣 裕司  (INAGAKI Yuji)  (50380019)	徳島大学・病院・講師    (16101)	
研究分担者	湯本 浩通  (YUMOTO Hiromichi)  (60284303)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授    (16101)	
研究分担者	廣島 佑香  (HIROSHIMA Yuka)  (60545143)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・講師    (16101)	
研究分担者	木戸 理恵  (KIDO Rie)  (60876027)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教    (16101)	

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