

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21064

研究課題名（和文）歯肉幹細胞由来エクソソームによる膵β細胞機能の保護と糖尿病性歯周炎予防効果の検証

研究課題名（英文）Protection of pancreatic beta cell function and prevention of diabetic periodontitis by exosomes from human gingiva-derived MSCs.

研究代表者

西村 優輝 (Nishimura, Yuki)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40961925

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：まず、マウス膵β細胞(βTC6)に飽和脂肪酸であるパルミチン酸(PA)刺激を行った。PA単独刺激群(PA群)とヒト歯肉幹細胞由来エクソソーム(Exo)を添加したPA刺激群(PA+Exo 群)での比較検討を行い、Xaf1発現を解析した。結果、膵β細胞(βTC6)ではPA群とPA+Exo群間でXaf1発現に有意な差は見られなかった。次に、マウスマクロファージ(RAW264.7)に同様にPA刺激を行った。PA群とPA+Exo群での比較検討を行い、Ifnβ発現を解析した。結果、マウスマクロファージ(RAW264.7)では、PA 群に比較して、PA+Exo群で有意にIfnβ発現が減弱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト歯肉幹細胞由来エクソソームの抗炎症作用は、in vitroにおいてマウスマクロファージ(RAW264.7)で選択的に確認されることを確認した。これを受け、in vivoにおいてもマクロファージを介したエクソソームの抗炎症効果が期待できるとの仮説を得た。すなわち、ヒト歯肉幹細胞由来エクソソームは直接的に膵β細胞のアポトーシス抑制に関与しないが、マクロファージを介する抗炎症効果によって間接的に膵β細胞のアポトーシスを抑制すると思われる。この研究により、将来的にはエクソソームのマクロファージを介した抗炎症効果による糖尿病および歯周病双方の進展抑制を目指した治療薬開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：First, we stimulated mouse pancreatic β-cells (βTC6) with palmitic acid (PA), a saturated fatty acid, and analyzed Xaf1 expression in the PA alone stimulation group (PA group) and in the PA+Exo group, in which human gingival stem cell-derived exosomes (Exo) were added. The results showed that there was no significant difference in Xaf1 expression between the PA and PA+Exo groups in pancreatic β-cells (βTC6). Second, we performed the same PA stimulation on mouse macrophages (RAW264.7) and analyzed Ifnβ expression in the PA and PA+Exo groups. The results showed that Ifnβ expression was significantly attenuated in mouse macrophages (RAW264.7) in the PA+Exo group compared to the PA group.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯肉幹細胞由来エクソソーム 膵β細胞機能 糖尿病性歯周炎

1. 研究開始当初の背景

肥満の脂肪組織でみとめられるマクロファージ浸潤、炎症性サイトカイン産生の亢進は2型糖尿病の基本病態であるインスリン抵抗性を引き起こす。インスリン抵抗性が増大すると、代償的に膵β細胞からインスリンが過剰に分泌される。しかしながら日本人は遺伝的にインスリン分泌の代償能が低く¹⁾、2型糖尿病の発症・進展に膵β細胞機能障害が深く関与している。一方、2型糖尿病患者の膵島ではマクロファージ等の炎症性細胞浸潤が観察されているものの、炎症細胞による膵島機能や膵β細胞減少への影響は明らかではない。申請者らは先行研究において、内毒素によって活性化されたマクロファージからのインターフェロンβ（IFNβ）分泌亢進を介して膵β細胞におけるアポトーシス促進分子 XAF1 の発現が増大し、膵β細胞のアポトーシスが誘導されることを明らかにした²⁾。

糖尿病は我が国の5、6人に一人が罹患、もしくは予備軍とされる国民病であるが、糖尿病との関連が深く、糖尿病以上に有病率が高い国民病が歯周病である。国内外での多くの臨床研究から、糖尿病と歯周病はそれぞれの病態に相互に影響を及ぼしうるということが明らかになっている。血糖コントロール不良は歯周病の罹患増大および重症化のリスク因子であり、糖尿病患者における神経障害、腎症、網膜症などの微小血管合併症の数と歯周病の重症度は有意に相関する³⁾。我が国では高齢者人口の増加に伴い、糖尿病、歯周病、および両疾患を合併する有病者数は今後も高止まりすることが予測される。

様々な細胞が分泌する細胞外小胞「エクソソーム」は、細胞や組織間の情報伝達能を有し近年幅広い分野で研究が進められているが、糖尿病およびその合併症の治療応用においても未知の可能性が期待されている。申請者らは先行研究⁴⁾において、ヒト歯肉幹細胞由来エクソソームが CD73 を介して、マクロファージ表現型を炎症性から修復性へと誘導することを見出した。また、エクソソームに内包される miRNA も抗炎症効果を持ち歯周病治療に有用である可能性を示した。

2. 研究の目的

申請者らは、先行研究²⁾の結果をふまえ、膵β細胞特異的に Xaf1 を過剰発現させたマウスを作製した。本研究の目的は、申請者らが独自に作製した膵β細胞特異的 Xaf1 過剰発現（Xaf1 Tg）マウスを用いて、ヒト歯肉幹細胞由来エクソソームの抗炎症作用が膵β細胞アポトーシスを抑制し、糖尿病および歯周病の病態を改善させるかどうかを明らかにすることである。将来的に、糖尿病および歯周病を併発する患者への臨床応用に向けた橋渡し研究に発展させる。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト歯肉幹細胞由来エクソソームの抗炎症作用が XAF1 を介した膵β細胞アポトーシスを抑制し、糖尿病および歯周病の病態を改善させるかどうかを、「①in vitro での活性化マクロファージ誘導性膵β細胞 XAF1 発現に対するヒト歯肉幹細胞由来エクソソームの作用」および、「②Xaf1 Tg マウスへのヒト歯肉幹細胞由来エクソソーム投与による膵β細胞機能および歯周病態への影響」について検証し明らかにする。

①活性化マクロファージ誘導性膵β細胞 XAF1 発現に対する歯肉幹細胞由来エクソソームの作用

歯肉幹細胞エクソソームは、先行研究⁴⁾にならい、患者から採取した歯肉をI型コラゲナーゼ、II型ディスパーゼで処理した後、70 μm ストレーナーを通してディッシュに播種し、その培養上清から磁気細胞外小胞採取キットによるPSアフィニティー法により単離する。先行研究²⁾と同様の条件で、膵β細胞（βTC6）とマクロファージ（RAW264.7）の共培養を行い、E. coli LPS（1 ng/ml）誘導性のβ細胞 XAF1 発現の亢進に対するヒト歯肉幹細胞由来エクソソーム（5 μg/ml）の影響を、リアルタイムPCRおよびウエスタンブロットにて検証する。

②-i) Xaf1 Tg マウスへのヒト歯肉幹細胞由来エクソソーム投与による膵β細胞機能への影響

4週齢からカロリー比60%高脂肪食を負荷した野生型およびXaf1 Tg マウスに対し、12、13週齢時点でヒト歯肉幹細胞由来エクソソーム（10 μg/kg）または対象群としてPBSを腹腔内注射する（腹腔内投与は尾静脈投与に比べ膵臓への集積率が高い⁷⁾）。14週齢で解剖し、下記項目について遺伝子型間で比較検証する。

1) マウス組織へのエクソソームの集積評価：予備実験の段階で、in vivo イメージアナライザーを用いて、エクソソーム膜蛍光染色キットで蛍光標識したエクソソームの膵臓、歯肉への集積を評価する。集積がみられない場合は、投与量、投与のタイミング等の条件を再検討し最適な条件を決定する。

2) 膵β細胞 Xaf1 発現：リアルタイム PCR、ウエスタンブロット、免疫蛍光染色で確認する。

3) 膵β細胞のアポトーシスの評価：マウス膵島における Xaf1、Cleaved caspase3 発現の解析（リアルタイム PCR、ウエスタンブロット、免疫蛍光染色法）、マウス膵島の TUNEL 染色を行う。

4) 膵島に浸潤したマクロファージの表現型の評価：膵島における CD68、Ly6C、CD206 等のマクロファージマーカーの発現を検証する（フローサイトメトリー、免疫蛍光染色）。

5) 膵島機能の評価：13 週齢、14 週齢（解剖前）において、糖負荷試験、インスリン負荷試験を行い、耐糖能、インスリン抵抗性を評価する。さらに、14 週齢マウス膵臓組織から膵島を単離し、単離膵島を用いてグルコース応答性インスリン分泌能を検証する。

②-ii) Xaf1 Tg マウスへのヒト歯肉幹細胞由来エクソソーム投与による歯周病態への影響

②-i と同条件で飼育した 12 週齢の野生型および Xaf1 Tg マウスに、臼歯結紮による実験的歯周炎を惹起する（②-i と同様に 12、13 週齢時点でエクソソーム/PBS 投与）。14 週齢で解剖し、マイクロ CT での顎骨の形態学的解析、顎骨および歯周組織の組織染色（HE 染色、TRAP 染色）、炎症性サイトカイン発現解析を行い、歯周病態を遺伝子型間で比較検証する。さらに歯周炎症下での膵島機能について②-i と同様に検証する。

4. 研究成果

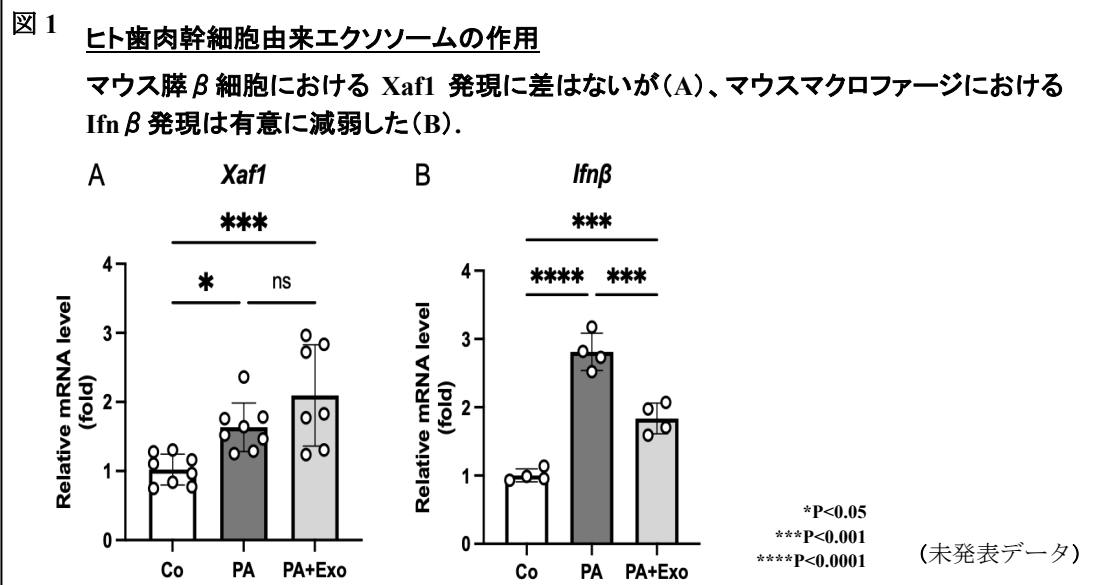
①活性化マクロファージ誘導性膵β細胞 XAF1 発現に対する歯肉幹細胞由来エクソソームの作用

予備実験として in vitro での膵β細胞に対するヒト歯肉幹細胞由来エクソソームの作用について検討を行った。

まず、マウス膵β細胞（β TC6）に飽和脂肪酸であるパルミチン酸（PA; 100 μM）刺激を行った。PA 単独刺激群（PA 群）とヒト歯肉幹細胞由来エクソソーム（Exo; 5 ng/ml）を添加した PA 刺激群（PA+Exo 群）での比較検討を行った。PA+Exo 群では、PA 刺激後 24 時間経過時点で Exo を添加した。Exo 添加後、48 時間経過時点で RNA を回収し、リアルタイム PCR にて Xaf1 発現を解析した。結果、膵β細胞（β TC6）では PA 群と PA+Exo 群間で Xaf1 発現に有意な差は見られなかった。（本頁図 1A）

そこで次に、マウスマクロファージ（RAW264.7）に同様にパルミチン酸（PA; 100 μM）刺激を行い、PA 単独刺激群（PA 群）と歯肉幹細胞由来エクソソーム（Exo; 5 ng/ml）を添加した PA 刺激群（PA+Exo 群）での比較検討を行った。PA+Exo 群では、細胞を Exo で 24 時間前処理した後に PA 刺激した。PA 刺激後、2 時間経過時点で RNA を回収し、リアルタイム PCR にて Ifnβ 発現を解析した。結果、RAW264.7 では、PA 群に比較して、PA+Exo 群で有意に Ifnβ 発現が減弱した。（本頁図 1B）

以上から、ヒト歯肉幹細胞由来エクソソームの抗炎症作用は、in vitro においてマウスマクロファージ（RAW264.7）で選択的に確認されることを確認した。これを受け、in vivo においてもマクロファージを介したエクソソームの抗炎症効果が期待できるとの仮説を得た。すなわち、ヒト歯肉幹細胞由来エクソソームは直接的に膵β細胞のアポトーシス抑制に関与しないが、マクロファージを介する抗炎症効果によって間接的に膵β細胞のアポトーシスを抑制すると考えられる。



今後は、先行研究²⁾と同様の条件下での膵β細胞(β TC6)とマクロファージ(RAW264.7)の共培養系での検討を行う。

②Xaf1 Tg マウスへのヒト歯肉幹細胞由来エクソソーム投与による膵β細胞機能/歯周病態への影響

Xaf1 Tg マウスが野生型マウスと同程度産仔を得られることは確認済みであったが、1年以上産仔が得られない状況が続いた。現在は、IVFを行い、交配するにあたって十分な数の産仔を得た。今後はこれらのマウスを用いて上記の実験を実施予定である。

歯肉幹細胞由来エクソソームの単離、および実験的歯周炎モデルの作製(本頁図2)については繰り返し実験を行い、手技の確立は概ね出来たと考えており、今後はin vivoでの検討を加速させる。

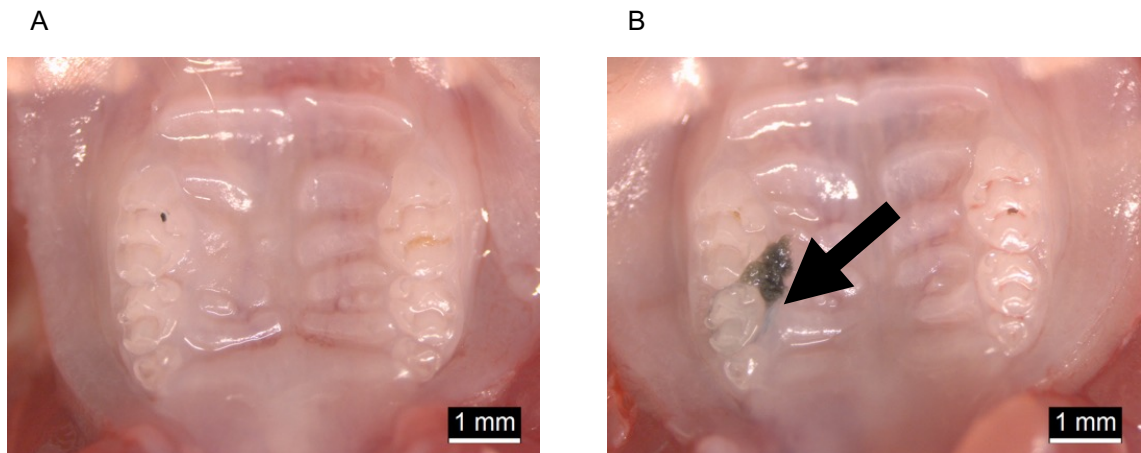
図 2

実験的歯周炎モデルの作製

マウス口腔内写真.

(A) 非結紮群

(B) 結紮群(矢印部)



(未発表データ)

<引用文献>

1) Yabe D et al. Lancet Diabetes Endocrinol. 2016, 4:2-3. 2) Tsuruta M et al. Horm Metab Res. 2018, 50:160-167. 3) Genco RJ et al. Periodontol 2000. 2020, 83:7-13. 4) Nakao Y et al. Acta Biomater. 2021, 122:306-324. 5) Zhu M et al. Biomater Sci. 2022, doi: 10.1039/d2bm00161f. 6) Phu TA et al. Mol Ther. 2022, 12:S1525-0016. 7) Wiklander OP et al. J Extracell Vesicles. 2015, 4:26316.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西村優輝, 岩下未咲, 新城尊徳, 瀬々起朗, 佐野朋美, 山下明子, 西村英紀
2. 発表標題 XAF1の過剰発現は膵β細胞のアポトーシスを促進することで糖尿病を悪化させる
3. 学会等名 2022年度 日本歯科保存学会秋季学術大会(第157回)
4. 発表年 2022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
---------	---------