

令和元年6月27日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11380

研究課題名(和文) 幹細胞由来エクソソームによる歯周組織再生効果の検討

研究課題名(英文) Effects of stem cell-derived exosomes on periodontal regeneration

研究代表者

小牧 基浩 (Komaki, Motohiro)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：30401368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：からだを構成するすべての細胞は、エクソソームと呼ばれる膜小胞を分泌して細胞間で情報交換を行うことが明らかになった。これまでがん診断の新たなツールとしてエクソソーム研究が行われてきた。我々は、間葉系幹細胞がエクソソームを分泌し、他の細胞に取り込まれることで、幹細胞の特徴である多分化能や血管新生作用発現に関与することを明らかにし、エクソソームの治療応用への可能性を示した。また、エクソソームのこの作用の一部はエクソソームに内包されるmicroRNAによる可能性が示された。本研究の継続により歯周組織再生における幹細胞エクソソームの役割の解明とエクソソームを応用した歯周再生療法の確立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞治療は、現在、学術的にも社会的にも注目され大きな期待が寄せられている。一方で、安全性など実用化における科学的課題が残る。最近、細胞どうしがエクソソームを介して情報交換していることが明らかになった。本研究では、体性幹細胞が分泌するエクソソームの機能について検討し、体性幹細胞がエクソソームを分泌すること、分泌したエクソソームは他の細胞に取り込まれ機能することを明らかにした。この機能の一部にmRNA発現調節に関与するmicroRNAが関与する可能性を示した。歯周組織再生におけるエクソソームの役割を解明し、エクソソームにより生体の細胞を制御して再生を促す再生誘導法技術の確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：It has become clear that all the cells that make up the body, including cancer cells, secrete membrane vesicles called exosomes and exchange information between the cells. Until now, exosome research has been conducted as a new tool for cancer diagnosis. We clarified that mesenchymal stem cells secrete exosomes, which are taken up by other cells and are involved in the pluripotency and angiogenic activity that are characteristic of stem cells, and the potential for therapeutic application of exosomes are also indicated. In addition, it was shown that the function of exosomes may be due to microRNAs acting in regulation of gene expression contained in exosomes. By continuing this research, we aim to clarify the role of stem cell exosome in periodontal tissue regeneration and establish a new therapeutic method applying the exosome.

研究分野：歯周病学、幹細胞学、血管細胞生物学、骨細胞生物学

キーワード：体性幹細胞 エクソソーム microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌感染により引き起こされる炎症性の歯周組織破壊であり、歯の主な喪失原因である。本邦において高齢者の残存歯の多くが歯周病に罹患していることが報告され(平成23年度歯科疾患実態調査)、高齢の患者にも安心して使える安全で簡便な歯周組織再生療法の確立が望まれる。再生医療には人工多能性幹細胞(iPS)や体性幹細胞を用いる細胞治療と、からだの細胞制御により再生を促す再生誘導がある。現在、細胞治療では体性幹細胞の治療への応用が承認されている。体性幹細胞とくに間葉系幹細胞は組織障害部位へ遊走し、様々な細胞へ分化する能力と、栄養因子を分泌し組織修復に関与する。細胞治療による再生医療は、現在、学術的にも社会的にも注目され大きな期待が寄せられている。一方で、安全性など実用化における科学的課題が山積している。

我々は、動物実験モデルを用いた間葉系幹細胞の移植実験において、細胞移植群は優位に歯周組織再生を示すことを報告した(Iwasaki K, et al, J Periodontol. 2013)。一方、移植された細胞の組織生着率は高くなく、損傷部における移植細胞の増殖・分化以外の作用が示唆された(Iwasaki K, et, Int J Mol Sci. 2019)。我々は、次に移植細胞の分泌する液性因子に注目し、細胞の培養上清を用いて同様の実験を行った結果、細胞を含まない液性因子のみでも細胞移植と同等の歯周組織再生効果が認められ、炎症反応の抑制効果が関与することを報告した(Nagata M, et al, Tissue Eng Part A. 2017)。約30年前に細胞から分泌される膜小胞としてエクソソームが発見された(Johnstone RM, et al, J Biol Chem, 1987)。さらに、エクソソームはタンパク質、mRNA、miRなどを含み、担体として細胞間情報伝達に機能することが報告された。また、エクソソーム内の分子は異なる細胞に共通するものと、分泌する細胞種に特異的なものがあることが明らかになった(Raposo G, et al, J. Exp. Med. 1996, Ratajczak J, et al, Leukemia, 2006, Valadi H, et al, Nat Cell Biol, 2007)。

2. 研究の目的

我々は「高齢の患者にも安心して使える安全で簡便な歯周組織再生療法の確立」を目標に、これまで診断用ツールとして盛んに研究の行われていたエクソソームを再生医療へ応用する為、幹細胞エクソソームの再生誘導能について基礎的検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 幹細胞からのエクソソームの分離と細胞への導入
- (2) in vitro における幹細胞エクソソームの効果検討
- (3) 歯周組織欠損モデルを用いた幹細胞エクソソームの効果検討

4. 研究成果

動的光散乱法、電気抵抗ナノパルス法を用いて細胞培養上清より超遠心法により分離したエクソソームの個数ならびに粒径測定を、またウェスタンブロットと免疫電顕法によりエクソソーム・マーカーの発現確認を行った結果、約100 nmの粒径を有し、CD9, CD63等のエクソソーム・マーカー陽性の微粒子が幹細胞倍上場性中に多数存在することが確認された。さらに、単離されたエクソソームを蛍光標識し、血管内皮細胞や線維芽細胞の培養液に加えると、2時間後より各細胞の細胞質内での蛍光を確認し、経時的にその量が増加することを確認した。歯周組織を構成する細胞への幹細胞エクソソームの効果を検討すると、骨芽細胞、セメント芽細胞では細胞増殖は弱かったが、血管内皮細胞に対して顕著な細胞増殖を促進することが明らかになった。また、幹細胞エクソソームは線維芽細胞に対してOct 4などの幹細胞性マーカー発現を上昇させるとともに、骨芽細胞、脂肪細胞分化刺激に対して分化能を示すように形質変化を起こすことを報告した(Tooi M, et al, J Cell Biochem. 2016)。次に、組織再生において重要な血管新生に対する幹細胞エクソソームの効果を検討した結果、エクソソームは血管内皮細胞の増殖、遊走を促進した。また、血管ネットワーク形成アッセイにおいてネットワーク形成を促進すること、PCR法にて血管新生マーカーの発現を上昇させることが発見された。マウス

耳介血管損傷モデルを作成し、エクソソーム投与後の血管新生をレーザードップラー血流測定器で計測したところ、非投与群に比して有意な血流上昇を示すことが示された(Komaki M, et al, Stem Cell Res Ther, 2017)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Iwasaki K, Akazawa K, Nagata M, Komaki M, Honda I, Morioka C, Yokoyama N, Ayame H, Yamaki K, Tanaka Y, Kimura T, Kishida A, Watabe T, Morita I. The Fate of Transplanted Periodontal Ligament Stem Cells in Surgically Created Periodontal Defects in Rats. Int J Mol Sci. 2019 Jan 7;20(1).

Komaki M, Numata Y, Morioka C, Honda I, Tooi M, Yokoyama N, Ayame H, Iwasaki K, Taki A, Oshima N, Morita I. Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. Stem Cell Res Ther. 2017 Oct 3;8(1):219.

Nagata M, Iwasaki K, Akazawa K, Komaki M, Yokoyama N, Izumi Y, Morita I. Conditioned Medium from Periodontal Ligament Stem Cells Enhances Periodontal Regeneration. Tissue Eng Part A. 2017 May;23(9-10):367-377.

Tooi M, Komaki M, Morioka C, Honda I, Iwasaki K, Yokoyama N, Ayame H, Izumi Y, Morita I. Placenta Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Confer Plasticity on Fibroblasts. J Cell Biochem. 2016 Jul;117(7):1658-70.

〔学会発表〕(計 9 件)

小牧基浩, 岩崎剣吾, 森田育男 ヒト胎盤由来間葉系幹細胞エクソソームによる血管新生促進作用の検討(2017)第16回日本再生医療学会総会、宮城

Komaki M, Tooi M, Yokoyama N, Ayame N, Iwasaki K, Izumi Y, Morita I. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles alter differentiation competence of fibroblasts(2017)6th annual meeting of ISEV, Toronto, ON, Canada

小牧基浩, 遠井政行, 岩崎剣吾, 森田育男 間葉系幹細胞由来エクソソームは線維芽細胞の分化応答性を変える(2016)第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議、大阪

遠井政行, 小牧基浩, 岩崎剣吾, 横山尚毅, 永田瑞, 和泉雄一, 森田育男 ヒト胎盤間葉系幹細胞由来エクソソームは線維芽細胞の分化能力を変化させる(2016)第144回日本歯科保存学会2016年度春季学術大会、栃木

永田 瑞, 岩崎剣吾, 赤澤恵子, 小牧基浩, 横山尚毅, 遠井政行, 和泉雄一, 森田育男 歯根膜幹細胞培養上清は歯周組織の創傷治癒を促進する(2015)第143回日本歯科保存学会2015年度秋期学術大会、第17回日韓歯科保存学会学術大会、東京

Akazawa K, Iwasaki K, Nagata M, Komaki M, Yokoyama N, Ayame H, Yamaki K, Tooi M, Izumi Y, Morita I. Construction of double-layered cell transferred-amnion using osteoblasts and periodontal ligament stem cells by cell transfer technology. (2015) 日歯周誌 57(春季特別号):p42、第57回春季日本歯周病学会、千葉

永田 瑞, 岩崎剣吾, 赤澤恵子, 小牧基浩, 横山尚毅, 遠井政行, 和泉雄一, 森田育男 歯根膜幹細胞由来液性因子による歯周組織再生と濃縮倍率の影響(2015)日歯周誌 57(春季特別号):p40、第57回春季日本歯周病学会、千葉

小牧基浩, 岩崎剣吾, 沼田友里, 遠井政行, 赤澤恵子, 永田 瑞, 森丘千夏子, 本多 泉, 横山尚毅, 菖蒲弘人, 和泉雄一, 森田育男 血管新生に対する胎盤由来間葉系幹細胞培養上清の効果(2015)日歯周誌 57(春季特別号):p26、第57回春季日本歯周病学会、千葉
遠井 政行, 小牧 基浩, 岩崎 剣吾, 横山 尚毅, 菖蒲 弘人, 滝 敦子, 本多 泉, 森丘 千夏子, 久保田 俊郎, 和泉 雄一, 森田 育男 間葉系幹細胞エクソソームの皮膚線維芽細胞分化に対する効果の検討(2015)第36回日本炎症再生医学会、東京

〔図書〕(計 1 件)

Akazawa K, Iwasaki K, Nagata M, Yokoyama N, Ayame H, Yamaki K, Tanaka Y, Honda I, Morioka C, Kimura T, Komaki M, Kishida A, Izumi Y, Morita I. (2017) Cell transfer technology for tissue engineering, Inflamm Regen, 37:1 review

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 1 件）

名称：細胞リプログラミングのための組成物
発明者：森田育男、小牧基浩、岩崎剣吾、横山尚毅、菖蒲弘人
権利者：国立大学法人 東京医科歯科大学、大日本印刷株式会社
種類：特許
番号：特許第 6235795 号
取得年：平成 29 年 11 月 2 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森田 育男
ローマ字氏名：Ikuo Morita
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：大学院医歯学総合研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：60100129

研究分担者氏名：和泉 雄一
ローマ字氏名：Yuichi Izumi
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：歯学部
職名：非常勤講師
研究者番号（8桁）：60159803

研究分担者氏名：岩崎 剣吾
ローマ字氏名：Kengo Iwasaki
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：歯学部
職名：非常勤講師
研究者番号（8桁）：40401351

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。