

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11682

研究課題名(和文) エクソソームは歯周病における歯槽骨破壊の新しい細胞間情報伝達物質となるか？

研究課題名(英文) Do Exosomes play a role in Alveolar Bone Loss in Periodontal Disease?

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは細胞が分泌するナノ粒子で、その中にはmRNAやmicroRNAが存在する。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やLPSを中心に議論されてきた歯周病の病態を、全く新しい視点から解明することを目的とする。歯周組織を構成する歯根膜細胞などのいくつかの細胞からエクソソームを回収して、RNAを抽出後に、次世代シーケンサーにてsmall RNA-seq解析を行ったところ、エクソソーム内には、細胞種によって特異的なmicroRNAが存在することが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、エクソソームの中には、mRNAやmicroRNAが存在して、これら核酸が「受け手の細胞」へ取り込まれて、実際に機能しているという「エクソソームの新規細胞間情報伝達物質としての働き」の報告が相次いでいる。本研究は、今後さらに検討すべき点があるが、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、唾液、あるいは歯肉溝滲出液中のエクソソームによる新規歯周病診断マーカーの開発と新規診断基準の確立をも可能にする方向へ繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are nano-sized particles, which contain microRNAs, mRNAs, proteins, and lipids. Recent studies have begun to uncover that exosomes play a role in cell-to-cell communication by the transfer of microRNAs to recipient cells. Focusing on alveolar bone loss in periodontal disease, this study aims at revealing functions of microRNAs in exosomes. We analyzed exosomes from periodontal tissue cells, such as periodontal ligament fibroblasts, by small RNA-seq. They abundantly secreted exosomes, which contain specific small RNAs.

研究分野：歯学

キーワード：エクソソーム microRNA 細胞外小胞 破骨細胞 歯周病 炎症 ナノ粒子 リキッドバイオプシー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、microRNA と呼ばれる新しい RNA の存在が明らかとなった (Lagos-Quintana M *et al.*, Science, 2001)。microRNA は、約 22 塩基長からなる 1 本鎖の non-coding RNA で、真核生物のゲノムにコードされており、細胞の分化、増殖、癌化などを制御することが報告されており、遺伝子発現制御を行う新たな分子であると考えられている。microRNA は、ゲノム DNA から転写され、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に結合し、タンパク質への翻訳を制御する。発見当初、生成された microRNA は、細胞内で発現・機能すると考えられていたが、最近、細胞外へも放出され、「受け手の細胞」へ取り込まれて機能するという報告が相次いでおり (Valadi H *et al.*, Nat Cell Biol, 2007, Zhang Y *et al.*, Cell, 2010)、研究代表者もマクロファージや破骨細胞について報告してきた (Kagiya *et al.*, 2013, 2014)。細胞外には RNA 分解酵素が豊富に存在するが、microRNA は細胞外小胞 (Extracellular Vesicles) に包まれて放出され、あるいは Argonaute などのタンパク質と結合して放出されることで分解から免れていると考えられている (Arroyo JD *et al.*, PNAS, 2011)。特に、エクソソーム (Exosomes) と呼ばれる直径約 100nm のエンドソームに由来する小胞は、microRNA 輸送の中心的役割を担っていると考えられている。

歯周病は *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によって引き起こされる。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。現在、この歯槽骨の破壊には、単球やマクロファージから分泌される TNF- α や IL-1 等の炎症性サイトカイン、あるいはグラム陰性菌の LPS が破骨細胞の分化や骨吸収を促進することが主たる原因と考えられているが、これだけでは説明できない現象も多い。例えば、「3mm 以上のアタッチメントロスが起こった歯周病患者では、有意に全身の骨密度が低かった」 (Yoshihara *et al.*, J Clin Periodontol, 2004) という報告があるが、重度の歯周病患者でない限り、全身の骨密度を低下させるほど高濃度に、血中へ炎症性サイトカインが分泌されるとは、考え難い。このような状況下で、新たな視点から歯周病へアプローチするべく、研究代表者は局所の歯槽骨の破壊のみならず、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。

2. 研究の目的

研究代表者は研究を進めるなかで、破骨細胞分化で重要と考えられる microRNA は、歯周病患者の歯肉でも共通して高発現している場合が多い事に気付いた。そこで「歯周病特異的・炎症特異的エクソソームが存在し、それが細胞間をシャトルして microRNA を運搬し、細胞間の情報伝達を担うことで、歯槽骨の破壊が進行する」という作業仮説を立て、これを証明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 歯周組織を構成する細胞が、歯周病に罹患すると、細胞の内外でどのような microRNA の発現変化が起こるかを調べるため、初代ヒト口腔上皮細胞で実験した。初代ヒト口腔上皮細胞を TNF- α 存在下、または *P. gingivalis* 由来の LPS 存在下で 72 時間培養し、細胞内の Total RNA を回収して、マイクロアレイ解析を行った。
- (2) 歯周組織を構成する歯根膜細胞などのいくつかの細胞からエクソソームを回収して、RNA を抽出後に、次世代シーケンサーにて small RNA-seq 解析を行った。
- (3) エクソソームは細胞外小胞の一種であり、ヘテロな小胞の集団である。そのため回収方法によって、その性質が異なる場合がある。そこで、THP-1 細胞由来マクロファージ様細胞を

TNF- α の存在下と非存在下で培養して、得られたエクソソームの表面抗原を抗体アレイで網羅的に解析した。

- (4) 生理的状態と炎症状態では、歯周組織の細胞から分泌されるエクソソームは異なるのか、異なるのならば、歯周病における歯槽骨の吸収にどのような影響を与えるかを調べるために、以下の実験を行った。ヒト歯根膜細胞を TNF- α 存在下および非存在下、*P. gingivalis* 由来の LPS 存在下および非存在下で培養して、培養上清からエクソソームを回収した。ヒト CD14 陽性細胞から M-CSF/RANKL を使って、破骨細胞を誘導する培養系へこの歯根膜細胞から得られた炎症状態のエクソソームと生理的状態で得られたエクソソームを添加して破骨細胞への影響を比較した。

4. 研究成果

(1)

① 初代ヒト口腔上皮細胞を用いたマイクロアレイ解析では、解析した 2,588 種類の microRNA のうち、TNF- α によって 2 倍以上発現が上昇したのは 15 種類、0.5 倍以下に発現が減少したのは 40 種類であった。なかでも、miR-4730, miR-6716-3p, miR-451b は 30 倍以上発現が上昇し、miR-6819-5p, miR-6760-3p, miR-4252 は 0.05 倍以下に発現が減少した。一方、LPS によって 2 倍以上発現が上昇したのは 36 種類、0.5 倍以下に発現が減少したのは 16 種類であった。なかでも、miR-146a-5p, miR-8060, miR-582-5p は 18 倍以上発現が上昇し、miR-1238-5p, miR-335-3p, miR-3149 は 0.1 倍以下に発現が減少した。

② 初代ヒト口腔上皮細胞を TNF- α 存在下、または *P. gingivalis* 由来の LPS 存在下で 72 時間培養して、細胞外へ分泌されるエクソソーム内の microRNA について調べたが、他の歯周組織を構成する細胞、例えば歯根膜細胞と比べて分泌されるエクソソームの絶対量が少なく、データが得られなかった。

- (2) 歯周組織を構成する歯根膜細胞などのいくつかの細胞から、エクソソーム内にある small RNA について、small RNA-seq 解析を行ったところ、エクソソーム内には予想よりもはるかに多くの mRNA 分解産物と考えられる RNA が多かった事で、解析に時間を要したが、細胞種によって特異的な microRNA が存在することが判った。

- (3) 生理的状態の THP-1 細胞由来マクロファージ様細胞から得られたエクソソームでは、解析した CD63, CD81, FLOT1, ICAM, ALIX, EpCAM, ANXA5, TSG101 のうち、CD81 と EpCAM が強く発現していた。CD63 は、テトラスパニンのひとつで、エクソソームのマーカーとしてよく知られるが、生理的状態のマクロファージ様細胞のエクソソームでは、それほど強く発現していなかった。しかし、TNF- α 刺激によって CD63 陽性のエクソソームが増える傾向が認められた。

- (4) TNF- α 存在下で培養したヒト歯根膜細胞由来のエクソソームは、破骨細胞の大きさに影響するような傾向があったが、*P. gingivalis* 由来の LPS 存在下で培養したヒト歯根膜細胞由来のエクソソームでは、破骨細胞の大きさに変化はなかった。これについて、どのようなメカニズムが存在するのか、破骨細胞の骨吸収にどのような影響を与えるのかを、現在検討している。

- (5) 本研究は、今後さらに検討すべき点があるが、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、唾液、あるいは歯肉溝滲出液中のエクソソームによる新規歯周病診断マーカーの開発と新規診断基準の確立をも可能にする方向へ繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鍵谷 忠慶
2. 発表標題 マクロファージ由来の細胞外小胞エクソソームのTNF- α による変化について
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鍵谷 忠慶
2. 発表標題 Tumor necrosis factor alphaとLipopolysaccharideが口腔上皮細胞のmicroRNA発現に与える影響について
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadayoshi Kagiya
2. 発表標題 MicroRNAs are Potential Therapeutic Targets and Biomarkers for Alveolar Bone Loss in Periodontal Disease
3. 学会等名 15th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鍵谷 忠慶
2. 発表標題 TNF- α はヒトマクロファージ様細胞の細胞外小胞の分泌を促進する
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tadayoshi Kagiya	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 -
3. 書名 TNF- Promotes Extracellular Vesicle Release by Human Macrophage-like Cells and Alters Vesicle MicroRNA Expression Profiles. In: Exosomes and Microvesicles: Role in Disease and Clinical Applications	

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/read0124350/ ResearchGate https://www.researchgate.net/profile/Tadayoshi_Kagiya 岩手医科大学リポジトリ https://iwatemed.repo.nii.ac.jp/

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