

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10263

研究課題名(和文) ヒト歯髄細胞および歯髄由来多能性幹細胞に由来するエクソソームの性質と機能の検索

研究課題名(英文) Research of properties and functions of exosomes derived from human dental pulp cells and pulp-derived pluripotent stem cells.

研究代表者

畠山 大二郎 (HATAKEYAMA, Daijiro)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60377653

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)：我々は樹立・保有する約300人分のヒト智歯歯髄細胞(DPC)から多能性幹細胞(induced Pluripotent Stem Cell)iPS細胞を誘導し、誘導したiPS細胞のエクソソームを用い、単離・精製するエクソソームに、血清由来成分やフィーダー細胞由来成分などが含まれないようにするため、DPCを無血清の培養条件のもとで準備し、これらの細胞からiPS細胞をフィーダー細胞なしの無血清の培養条件で準備し、これらの培養上清をエクソソーム精製にもちいて、エクソソームを精製・解析し、今後の応用へつなげることを目的に、安全性や再生治療、特に骨の再生能への影響について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄細胞のエクソソームを用いて骨の再生や治癒を検討した研究はまだ報告がなく独自性があると考えられる。そのために、我々が樹立したヒト歯髄細胞株が約300ラインをすでに保管されていること、また、無血清条件下での細胞培養法と無血清・フィーダー細胞を用いないiPS細胞誘導・培養法を我々が確立していることは、本研究を進めるうえでその意義は大きく、再生治療への応用に向けて歯髄細胞の医療資源としての価値は高いと考える。

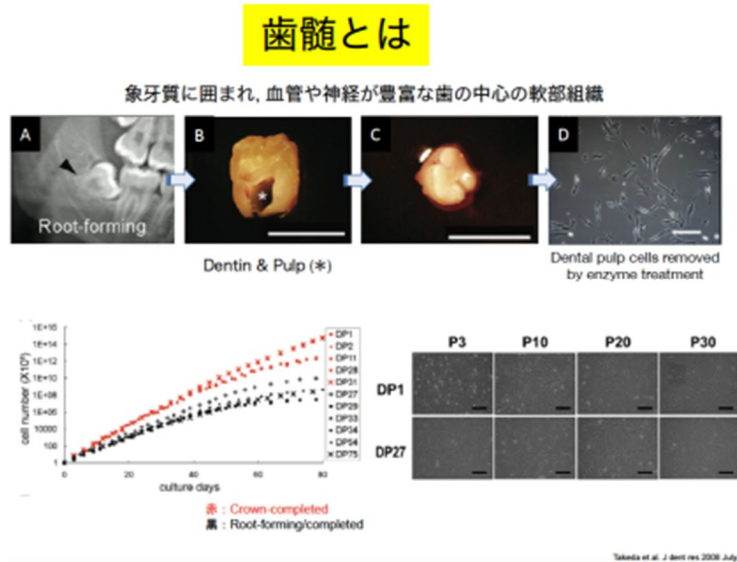
研究成果の概要(英文)：We induced induced pluripotent stem cells (iPS cells) from about 300 human dental pulp cells (DPCs) that we have established and possess. To ensure that the exosomes of induced iPS cells do not contain serum-derived components or feeder cell-derived components, DPCs were prepared under serum-free culture conditions, and iPS cells were prepared from these cells under serum-free culture conditions without feeder cells. The safety and effects of exosomes on regenerative therapy, especially on bone regeneration, were investigated for future applications.

研究分野：外科系歯学

キーワード：歯髄細胞 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

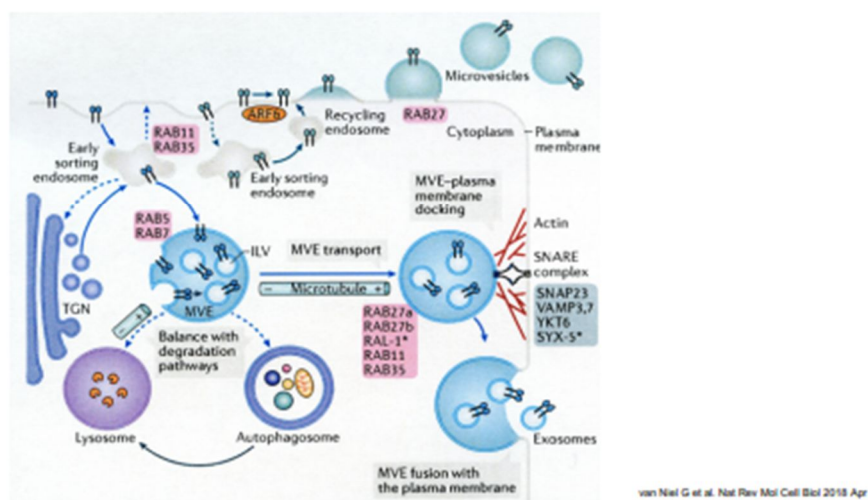
われわれは、これまでに約 300 人のヒト智歯由来歯髄細胞株(DPC)を樹立・保有しており、これらの細胞から多能性幹細胞(induced Pluripotent Stem Cell: iPS 細胞)を誘導し、再生医療資源として利用するための研究を続けている。近年、間葉系細胞の培養上清に含まれる小胞(エクソソーム)が、様々な生理活性を示すことが分かってきているものの、その詳細は未だ不明なところが多い。



2. 研究の目的

本研究では、ヒト智歯由来歯髄細胞株(DPC)とヒト智歯由来歯髄細胞株(DPC)に由来する多能性幹細胞(induced Pluripotent Stem Cell: iPS 細胞)を培養した培養上清に含まれるエクソソームを精製し、こうして得られたエクソソームを網羅的に解析し、安全性や再生治療、特に骨の再生能への影響について検討を行い、今後の応用へつなげることを目的とする。

エクソソームとは

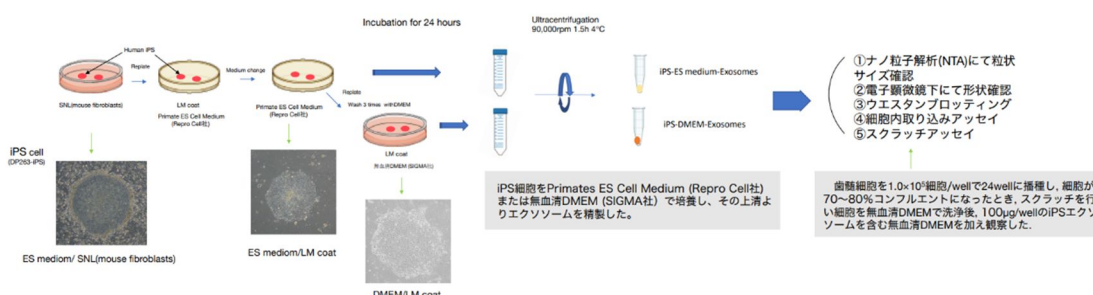


3. 研究の方法

これまでの研究において、単離・精製するエクソソームに、血清由来成分やフィーダー細胞由来成分などが含まれないようにするため、これまで報告したとおり、ヒト智歯由来歯髄細胞株(DPC)を無血清の培養条件のもとで準備し、これらの細胞から多能性幹細胞(induced Pluripotent Stem Cell: iPS細胞)をフィーダー細胞なしの無血清の培養条件で準備し、これらの培養上清をエクソソーム精製にもちいて、エクソソームを精製し特製の評価を行った。

エクソソームの精製方法は、Repro Cell社のPrimate ES Cell Mediumを用いてマウスSNL上でiPS細胞を起こし、リプレートする際にラミニンコート上に播種した。SNLの混入を除くため再度リプレートをし、24時間後の培養上清を回収し、超遠心にてiPS-ES mediumエクソソームとして回収した。別に無血清のDMEMで24時間培養して回収したエクソソームをiPS-DMEMエクソソームとした。精製したiPSエクソソームをナノ粒子解析(NTA)、電子顕微鏡(SEM)、およびウエスタンブロッティング(WB)で確認、また細胞遊走に対して評価した。

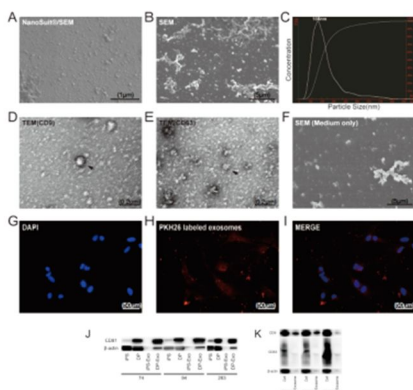
さらに、ヒト智歯から歯髄細胞(DPC)を樹立後、その培養上清からエクソソームを精製し、絹糸結紮歯周炎モデルマウスによる歯槽骨量減少を抑制することを見出したことから、DPCエクソソームをマウス骨芽細胞(MC3T3-E1)および破骨細胞誘導時に添加した際に及ぼす影響について評価した。



4. 研究成果

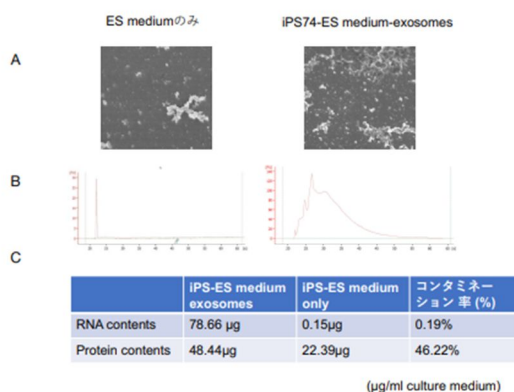
iPS-ES medium エクソソームは、WBでエクソソームのマーカであるCD81、CD9およびCD63の発現を認め、NTA、SEMにおいてサイズの不均一性が高いことがわかった。大きな粒子の混入の可能性も考え、iPS細胞培養液のみのSEMを行ったところ、培養液のみでも不均一なサイズの粒子の存在を認めた。それが、RNAではなく、約46%のたんぱく質の混入が認められた。無血清DMEMで培養したエクソソームでは、NTA,SEMにおいて、サイズが小さく均一な集団が採取できた。また、iPS-ES mediumエクソソームを添加した細胞は、純度の高いエクソソームの転嫁により細胞の郵送抑制が認められた。

Fig.1 HHH-iPS細胞培養上清からのエクソソームの精製と特性評価



(A) iPS74の上清から分離されたエクソソームのNanoSuit処理後の走査型電子顕微鏡画像。(B) iPS74エクソソームの従来の走査型電子顕微鏡画像。(C) NTAによるiPSCエクソソームの粒子サイズ。(D, E) 抗ヒトCD9およびCD63抗体を結合した金粒子で標識されたiPS74エクソソームの免疫電子顕微鏡画像。(F) iPS74培養液の従来の走査型電子顕微鏡画像。(G-I) iPS74エクソソームのDP94細胞への取り込み。PKH26標識iPS74エクソソームは、DP94に取り込まれた。(J) iPS74およびそれら由来するエクソソームにおけるCD81タンパク質の発現。5µgの量のCD81およびβ-アクチンタンパク質を各レーンにロードした。(K) iPS74およびそれら由来するエクソソームにおけるCD9およびCD63タンパク質の発現。20µgの量の(CD9およびCD63、β-アクチン)タンパク質が各レーンにロードされた。

Fig.2 iPS培養液中のタンパク質およびRNA含有量の定量化



(A)電子顕微鏡像(SEM)
(B)Agilent 2100 BioAnalyzer分析結果
(C) 定量

Fig.3 無血清DMEMで培養したiPSエクソソームとの比較

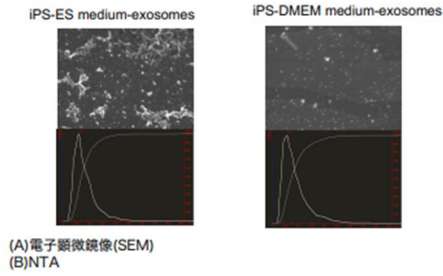
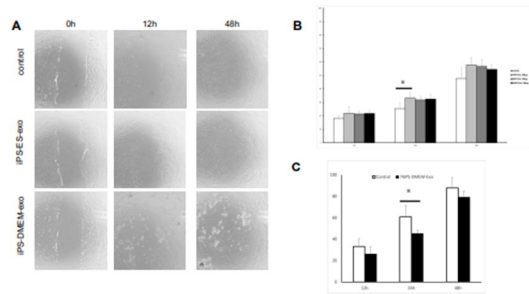


Fig.4 iPSエクソソームにおける細胞遊走能の確認



MC3T3-E1 細胞に DPC エクソソームを添加し、スクラッチアッセイにて細胞遊走能を評価した。また、マウス骨髄細胞とストローマ細胞 ST2 を共培養し、その過程に DPC エクソソームを添加した際の破骨細胞形成能を TRAP 染色および定量的 RT-PCR にて RANKL、TNF- α 発現遺伝子を確認した。その結果、DPC エクソソームを添加することにより、MC3T3-E1 細胞の遊走能を促進し、破骨細胞形成系において、TRAP 陽性コロニー形成に抑制傾向が見られ、コロニーサイズが小さかった。また、発現遺伝子を定量的 RT-PCR で確認したところ、RANKL、TNF- α は、発現の低下傾向を示した。これらのことより、DPC エクソソームは、MC3T3-E1 細胞の遊走能を増加させ、破骨細胞形成や RANKL、炎症性サイトカインの発現を減少させることにより、骨のリモデリングや歯周組織の再生に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川口知子、清水雄太、飯田一規、畠山大二郎、手塚建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞由来iPS細胞からのエクソソームの精製
3. 学会等名 第57回 日本口腔組織培養学会 学術大会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口知子、清水雄太、黒田依澄、飯田一規、畠山大二郎、國貞隆弘、柴田敏之、手塚建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞由来iPS細胞からのエクソソームの精製
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水雄太、川口知子、小足周平、柴田敏之、國貞隆弘、手塚健一
2. 発表標題 HLAハプロタイプホモiPS細胞からのエクソソームの精製
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Shimizu, Tomoko Kawaguchi, Shuhei Otari, Izumi Kuroda, Yuki Kuranaga, Hideya Kawasaki, Takahiko Hariyama, Toshiyuki Shibata, Takahiro Kunisada, Toshiaki Shibutani, Yukihiro Akao, Ken-ichi Tezuka
2. 発表標題 Characterization and miRNA expression profiles from HLA homozygous haplotype dental pulp cells and iPS cells
3. 学会等名 ANNUAL MEETHING ISEV 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水雄太、川口知子、小足周平、黒田依澄、堀田康明、柴田敏之、國貞隆弘、手塚健一
2. 発表標題 HLAハプロタイプホモ歯髓細胞由来エクソソームの特性評価および生物学的効果
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019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	川口 知子 (武田知子) (Kawaguchi Tomoko) (30509815)	岐阜大学・医学部附属病院・医員 (13701)	
研究分担者	飯田 一規 (Iida Kazuki) (30585237)	岐阜大学・大学院医学系研究科・講師 (13701)	
研究分担者	柴田 敏之 (Shibata Toshiyuki) (50226172)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	

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