

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19191

研究課題名(和文) 幹細胞由来エクソソームによる新規唾液腺組織再生法の開発

研究課題名(英文) Regeneration of novel salivary gland tissue by stem cell-derived exosomes

研究代表者

酒井 陽 (SAKAI, KIYOSHI)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80772425

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)：歯科領域において、難病にも指定されているシェーグレン症候群は自己免疫疾患とされ、慢性化した病態であり修復・再生不可能な組織であるとされる。私たちはこれまでの研究で、損傷した組織で重要な役割を果たすと考えられる幹細胞由来エクソソームに含まれるいくつかのmicro RNA (miRNA)を同定した。それらのエクソソームは自己免疫疾患マウスモデルにおいて唾液腺組織が損傷していく過程で幹細胞の老化抑制、損傷細胞の生存率促進に関与し、口腔乾燥症状(ドライマウス)を改善した。これらの結果から幹細胞の“若返り”に関わっている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、超高齢者社会において、高齢者の多くは口腔乾燥症状(ドライマウス)を示し、虫歯、細菌感染、嚥下障害さらにはQOLの低下などの口腔乾燥症を引き起こす。現在の口腔乾燥症の治療法は対症的であり、唾液腺機能障害を修復することはできない。唾液を産生する唾液腺には組織を構成する細胞を供給する源となる幹細胞が存在するが、唾液腺幹細胞については不明な点が多く、解明されていない。本研究では、内在性唾液腺幹細胞および前駆細胞に着目し、加齢に伴う唾液腺幹細胞の老化機構の解明および幹細胞由来エクソソームによる老化抑制機構を検討したことで、新たな治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In dentistry, Sjogren's syndrome, an intractable disease, is considered an autoimmune disease, a chronic condition in which tissues are unable to repair or regenerate. In our previous studies, we identified several microRNA (miRNA) in stem cell-derived exosomes that are thought to play essential roles in damaged tissues. These exosomes may be involved in stem cell "aging" by inhibiting stem cell senescence and promoting the survival of damaged cells during tissue damage.

研究分野：外科系歯学

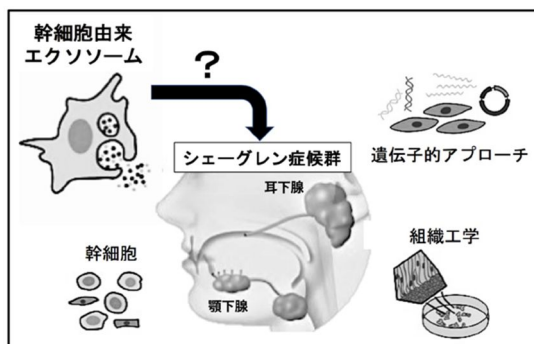
キーワード：幹細胞 エクソソーム 唾液腺 細胞老化

### 1. 研究開始当初の背景

近年シェーグレン症候群 (SS) 患者の唾液腺において唾液腺細胞の老化が起こっていることが報告された。しかしその現象が病態の成立や進行にどのように関わっているのかは不明であり、その解明や治療標的としての可能性が期待されている。NOD マウスは SS 様の病態を自然発症することから最も広く使用される SS モデル動物の一つであるが、細胞老化に着目した研究の報告はない。

#### 細胞老化抑制を介した幹細胞由来細胞外小胞の効果

幹細胞培養上清より分離した細胞外小胞 (EVs) が様々な疾患に対し治療効果を持つことが知られている。EVs 中に存在する直径 50-150nm で CD9、CD63、CD81 を発現する分画はエンドソーム由来のエクソソームと考えられており、細胞間コミュニケーションに重要な役割を持つとされる。SS に対しては免疫調整効果を介して病態の予防や改善に寄与する可能性を支持する研究が多い。われわれはこれまでにラット BRONJ モデルにおいてヒト歯髄幹細胞由来細胞外小胞 (hDPSC-EVs) が細胞老化抑制効果を介してその発症を予防することを見出し、SS に対しても同様の効果を持つのではないかと考えた。



### 2. 研究の目的

現在、超高齢者社会において、高齢者の多くは口腔乾燥症状(ドライマウス)を示し、虫歯、細菌感染、嚥下障害さらにはQOLの低下などの口腔乾燥症を引き起こす。現在の口腔乾燥症の治療法は対症的であり、唾液腺機能障害を修復することはできない。唾液を産生する唾液腺には組織を構成する細胞を供給する源となる幹細胞が存在するが、老化に伴い様々な組織に存在する組織幹細胞の機能が低下していることが報告されている。しかしながら、唾液腺幹細胞については不明な点が多く、唾液腺幹細胞と加齢に伴う唾液腺の機能低下との関係については解明されていない。そこで本研究では、内在性唾液腺幹細胞および前駆細胞に着目し、加齢に伴う唾液腺幹細胞の老化機構の解明および幹細胞由来エクソソームによる老化抑制機構を検討し、内在性唾液腺幹細胞および前駆細胞の新たな再生機序を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト歯髄幹細胞の培養上清より超遠心法で hDPSC-EVs を分離し粒径測定、電子顕微鏡、ウェスタンブロッティングでその性状解析をした。当初予定していた顎下腺結紮モデルマウスを作成はせずシェーグレン症候群を自然発症する NOD マウスに変更した。NOD マウスに対し 8 週齢より週に 1 度 hDPSC-EVs もしくは PBS を静脈内投与した。4 週毎に唾液分泌量を測定し、22 週齢で顎下腺を摘出し組織学的評価、sphere formation assay をした。

### 4. 研究成果

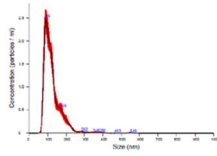
hDPSC-EVs の投与が NOD マウスにおける SS 様病態に対し予防効果を持つことが明らかとなった。hDPSC-EVs 投与群において focus score が減少しており、過去の報告にあるように hDPSC-EVs の免疫調整効果を反映した機序が考えられた。

組織学的な評価で PBS 群では hDPSC-EVs 群と比較し老化細胞が多く検出され、sphere 形成能が有意に低下していた。Sphere における SA-β-gal 活性、p16INK4a の mRNA 発現量に差が見られたことから、細胞老化が関連している可能性が示唆された。

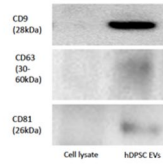
hDPSC-EVs が直接唾液腺細胞に対して作用し細胞老化を抑制するのか、免疫調整作用を介した作用の結果として老化する細胞が減少したのかは不明であり、今後その解明が必要である。

## Characterization of hDPSC-EVs

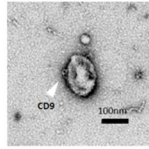
### 1. Nanoparticle tracking



### 2. Western blotting

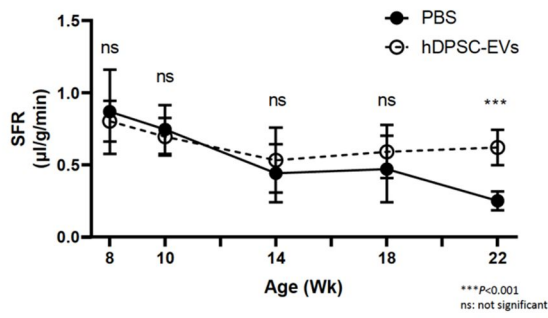


### 3. TEM (CD9 標識)



分離したhDPSC-EVsは直径  $89\text{nm} \pm 48.9\text{nm}$  であった。またエクソソームのマーカーであるCD9, CD63, CD81を発現しており、分離したhDPSC-EVsにはエクソソームの分画が含まれていた。

## Salivary flow rate (SFR)



全身麻酔下で塩酸ピロカルピン  $0.3\mu\text{g/g}$  を皮下投与し、唾液流出開始から10分間マイクロピペットで唾液を回収して  $\text{SFR} = \text{唾液量 } \mu\text{l} / \text{体重g} / \text{min}$  として算出した。18週齢までhDPSC-EVs群とPBS群における唾液分泌量の有意な差はなかったが、22週齢時点でPBS投与群の唾液分泌量がhDPSC-EVs群と比較し有意に低下した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe J., Sakai K., Urata Y., Toyama N., Nakamichi E., Hibi H.	4. 巻 99
2. 論文標題 Extracellular Vesicles of Stem Cells to Prevent BRONJ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 552 ~ 560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034520906793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 He B., Chiba Y., Li H., de Vega S., Tanaka K., Yoshizaki K., Ishijima M., Yuasa K., Ishikawa M., Rhodes C., Sakai K., Zhang P., Fukumoto S., Zhou X., Yamada Y.	4. 巻 98
2. 論文標題 Identification of the Novel Tooth-Specific Transcription Factor AmeloD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 234 ~ 241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034518808254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshiro Koma, Kiyoshi Sakai, Dong Jiao, Junna Watanabe, Hideharu Hibi
2. 発表標題 Effects of hDPSCs-derived Exosomes in Novel Salivary Gland Disease Model
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小間義朗, 酒井陽, Dong Jiao, 丸山裕, Liu Kehong, 渡邊純奈, 日比英晴
2. 発表標題 マウス唾液腺原基・脾細胞共培養系を用いた ex vivo シェーグレン症候群モデルにおけるヒト歯髄幹細胞由来細胞外小胞の効果
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kiyoshi Sakai, Takeshi Tsuruta, Junna Watanabe, Yukiko Sugimura, Kohei Sakaguchi, Wataru Katagiri, Hideharu Hibi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 213
3. 書名 Peripheral Nerve Regeneration in a Novel Rat Model of Dysphagia	

〔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
---------	---------