

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10158

研究課題名（和文）HLAハプロタイプホモ歯髄細胞由来エクソソームの炎症性疾患への応用

研究課題名（英文）Therapeutic potential of exosomes derived from HLA homozygous haplotype dental pulp cells in inflammatory diseases

研究代表者

川口 知子（武田知子）（Kawaguchi, Tomoko）

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30509815

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）：ヒト白血球抗原(HLA)は、免疫系において自己と非自己の識別に関する重要な免疫機構として働く。近年、組織幹細胞から分泌されるエクソソームは、細胞機能の一部を担っており、免疫反応や組織修復などの細胞間コミュニケーションのツールとして機能していることが報告されています。我々は以前、ヒト智歯からHLAハプロタイプホモ(HHH)歯髄細胞(DPC)を樹立し性状解析を行いました。この研究では、歯周炎マウスモデルにおけるHHH-DPCエクソソームの効果について調べたところ、 μ CT評価にてHHH-DPCエクソソームが歯槽骨吸収を抑制していることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が3種類のHLAハプロタイプホモ歯髄細胞をすでに保管していることは、本研究を進めるうえでの意義は大きく、本研究により、HLAハプロタイプホモ歯髄細胞のエクソソームが歯周炎による骨量減少を抑制すること技術開発が可能となれば、エクソソームは内包する物質がもつ総合的な効果で細胞の性質を変化させる性質をもつ点で、既存の治療薬とは全く概念が異なり、再生医療の資源としてのDPCの価値は更に高くなると考えられる。また再生医療（臨床）に向けより安全な方法と考えられ、その意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Human leukocyte antigens (HLA) play an important role in distinguishing self and non-self in the immune system. In recent years, it has been reported that extracellular vesicles called exosomes are secreted from tissue stem cells, are partly responsible for cellular functions, and serve as a tool in intercellular communications such as those in immune reactions and tissue repair. We previously established and characterized human leukocyte antigen (HLA) haplotype homo (HHH) dental pulp cell (DPC) lines from human wisdom teeth. In this study, we aimed to investigate the effect of local administration of HHH-DPC exosomes in a mouse model of periodontitis. Imaging with μ CT revealed that the exosomes suppressed alveolar bone resorption in the mouse model of periodontitis.

研究分野：口腔外科

キーワード：エクソソーム 歯髄細胞

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は再生医療への貢献を目的に、医療破棄物として処理されていた抜歯後の智歯より約 300 ラインのヒト歯髄細胞(Dental Pulp Cells: DPC)を樹立し(Takeda et al. J Dent Res. 2008)、樹立した DPC より多能性幹細胞(iPS)を誘導した(Tamaoki et al. J Dent Res. 2010、Iida et al. J Dent Res. 2013)。しかし、これらの研究にはウシ血清を添加していた。ウシ血清の使用は、プリオンや病原性ウイルス等の存在の危険がある。このような問題点を回避するために DPC の無血清培養法を確立し、iPS 細胞を誘導した(Kawaguchi et al. PLOS ONE. 2014)。

すべての患者から iPS 細胞を誘導することは、コストと時間の観点から困難であり、今後の細胞移植医療は他家移植について考慮する必要がある。これまで、他家移植は輸血、骨髄移植、臓器移植が行われており、ヒト白血球抗原の不一致が免疫拒絶と有意に相関することがわかっている。長期の移植成績は、抗移植片 HLA 抗体の出現によって顕著に低下する事からも、他家移植において HLA を一致させる事の重要性が再認識されている。我々は DPC について HLA- A, B, DRB1 の 3 ローカスを調べて、3 例の 3 ローカスホモ細胞を樹立し、iPS 細胞誘導も成功している(Tamaoki et al. J Dent Res. 2010)。これらの 3 例の HLA3 ローカスホモ(HHH)細胞は、日本赤十字社が公開しているハプロタイプ頻度から推定して、日本人の約 25%に移植が可能である。このような移植は HLA に起因する移植細胞拒絶を抑制し、移植成績を上げる事が期待される。

現在、細胞分泌小胞であるエクソソームは、細胞や組織に情報を伝達するための役割を担っている可能性が指摘されており、再生医療においてはそのソースとして注目されている間葉系幹細胞(MSC)の分泌するエクソソームが様々な疾患に対して治療効果を示すことが報告されている(Chamberlain et al. Stem Cells. 2007)。さらに MSC エクソソームが、MSC 自身と同様の治療効果を示すことが報告されている(Katsuda et al. Proteomics. 2013)。我々の以前の研究から DPC の移植により脊髄損傷後の運動機能改善効果が認められること(Sugiyama et al. J Bone Miner Metab. 2019)から、間葉系の細胞である DPC の分泌するエクソソームでも DPC と同様の組織修復改善効果が期待される。

2. 研究の目的

近年、間葉系幹細胞からエクソソームと呼ばれる細胞外小胞が分泌され、免疫応答や組織修復などの細胞間のコミュニケーションツールとしての役割を果たすことが知られている。我々は、これまでヒト智歯より HLA ハプロタイプホモ(HHH)歯髄細胞(DPC)ラインを樹立し性状解析を行ってきた。また最近では、より安全な細胞治療を目指して、これらの HHH-DPC から分泌されるエクソソームおよび同細胞から誘導した HHH-iPS 細胞から分泌されるエクソソームを精製し、特性を評価・比較解析してきた。そこで本研究では精製したエクソソームから得られた増殖能・遊走能の促進や miRNA 発現および HLA 分子発現の結果を考慮して、HHH-DPC 由来エクソソームが炎症性疾患(歯周炎、骨髄炎等)へ与える効果を比較検討し、今後の応用につなげる。

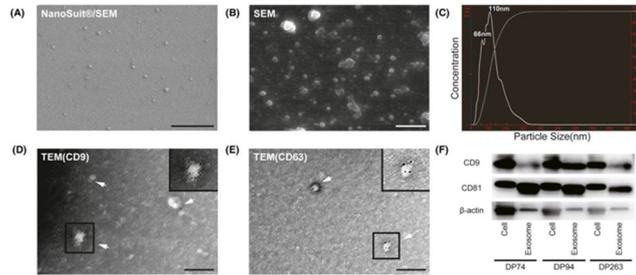
3. 研究の方法

HHH-DPCs よりエクソソームを超遠心法にて精製した。精製したエクソソームは、形状を走査型電子顕微鏡(SEM)およびナノ粒子追跡分析(NTA)にて観察し、エクソソームマーカーの発現をウェスタンブロッティング(WB) / 透過型電子顕微鏡(TEM)にて確認した。また、in vitro において HHH-DPC エクソソームの細胞遊走能、増殖能に対する効果を評価し、in vivo にて絹糸結紮で誘導した歯周炎モデルマウスに対して HHH-DPC エクソソームを滴下し、歯槽骨骨吸収程度を μ CT で、歯周組織をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色にて評価した。

4. 研究成果

HHH-DPC エクソソームは SEM で比較的相同な球状の膜構造を示し、NTA は 66nm と 110 nm に 2 つのピークを示した(図 1A ~ C)。その中でも NanoSuit 法で、HHH-DPC エクソソームを破壊することなく形態を観察することに成功した(図 1A)。この方法では、HHH-DPC エクソソームを真空耐性のある薄い膜に閉じ込めることにより、小胞を濡れた状態に保つことができた。また TEM で CD9 と CD63 が発現しており(図 1D、E)、WB でも CD9 および CD81 の発

現を確認された (図 1F)。



Shimizu et al. J Periodont Res. 2021

図 1 ; HHH-DPC エクソソームの精製と特性評価。(A) 単離された HHH-DPC エクソソームの NanoSuit 処理を使用した SEM。スケールバー: $1\ \mu\text{m}$ 。(B) HHH-DPC エクソソームの従来の SEM。スケールバー: $1\ \mu\text{m}$ 。(C) NTA によって測定された HHH-DPC エクソソーム粒子サイズ。(D、E) 抗ヒト CD9 (D) および CD63 (E) 抗体で標識された HHH-DPC エクソソームの TEM。フレームは、高倍率画像。矢印は染色されたエクソソームを示します。スケールバー: $0.2\ \mu\text{m}$ 。(F) HHH-DPC およびエクソソームにおける WB での CD9 および CD81 発現。

次に我々は、hDPC に対する HHH-DPC エクソソームの生物活性を評価するために、スクラッチアッセイを実施した。HHH-DPC エクソソームは、DP94 DPC (図 2A、B) で、コントロールグループのものよりも有意に高い活性を示しました。

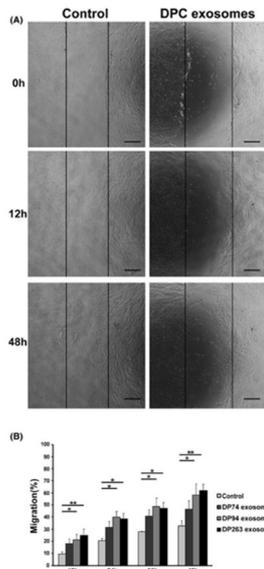


図 2 ; HHH-DPC エクソソームによる hDPC 細胞遊走評価。(A) hDPC 単層をスクラッチし、その後 HHH-DPC エクソソームを添加したもの。黒線は 0 時間の細胞線を示す。スケールバー: $10\ \mu\text{m}$ 。(B) hDPC 遊走に対する HHH-DPC エクソソームの刺激活性 ($n = 4$)。* $p < .05$ 、** $p < .01$

Shimizu et al. J Periodont Res. 2021

そして、HHH-DPC エクソソームの in vivo での効果を見るために、我々はマウスの第二臼歯に絹糸を結紮して歯周炎マウスモデルを作成し、HHH-DPC エクソソームを結紮した部位に滴下した。この結紮誘発性歯周炎マウスモデルでは、 μCT により結紮のみの群の歯槽骨損失が明らかになった (図 3A)。ただし、生理食塩水滴下群 (PS 群) では有意な効果は観察されませんでした。対照的に、DP74、DP94、および DP263 由来のエクソソームでは、骨量減少がそれぞれ 29.2%、33.3%、および 50.0% 減少しました (図 3B)。これらの結果は、HHH-DPC エクソソームが歯周炎中の骨量減少を効果的に防止できることを示す。

さらに、HE 染色によりセメントエナメル境周辺において、エクソソーム滴下群では対照群に比べ角化重層扁平上皮の上皮構造の維持および根分岐部の結合組織に血管が多く観察された (図 4A、B)。ただし、破骨細胞の TRAP 活性における明らかな差は 2 つのグループ間で観察されませんでした (図 4C)。

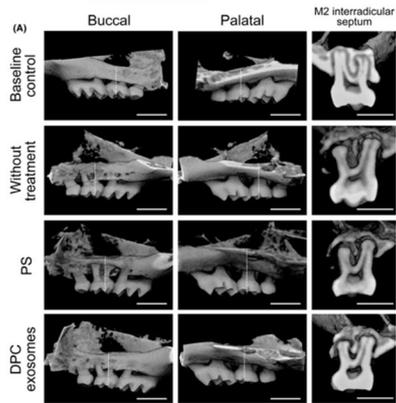
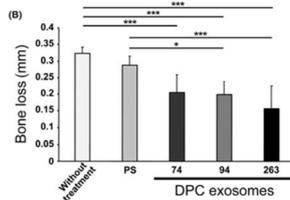


図3；歯周炎のマウスモデルにおける歯髓細胞エクソソームの効果。(A)上顎第二臼歯(M2)の頬側、口蓋側、および歯根間中隔断のμCT像。スケールバー：頬側・口蓋像1mm、M2 歯根間中隔断0.7mm。(B)セメントエナメル境と歯槽骨頂部との間の距離。骨損失は、対照の平均距離と治療側の平均距離との差を定量化。* $p < .05$; *** $p < .005$ 。



Shimizu et al. J Periodont Res. 2021

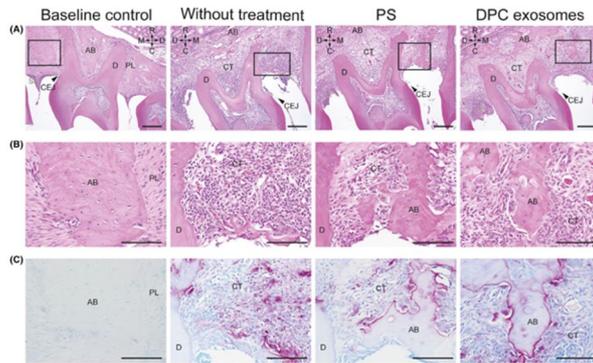


図4；歯周炎マウスモデルにおける歯槽骨に対するDPCエクソソームの組織評価。(A)上顎矢状切片H&E染色。スケールバー：200μm。M；近心。D；遠心。R；歯根側。C；歯冠側。AB；歯槽骨。D；象牙質。SE；歯肉溝上皮。E；上皮。CT；結合組織。CEJ；セメントエナメル境。黒枠は(B)に示す高倍率の位置を示す。(B)H&E染色の高倍率(×40)画像。PL；歯根膜。スケールバー：100μm。(C)TRAP染色の高倍率(×40)画像。スケールバー：100μm。

Shimizu et al. J Periodont Res. 2021

まとめると、HHH-DPC からエクソソームを精製し、マウスモデルを使用して歯周病の進行に対する骨量減少を効果的に防止できること示した。HHH-DPC エクソソームは、歯周炎による骨量減少を抑制し、血管を誘導したことから、骨のリモデリングや歯周組織の再生に与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1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Yuta, Takeda Kawaguchi Tomoko, Kuroda Izumi, Hotta Yasuaki, Kawasaki Hideya, Hariyama Takahiko, Shibata Toshiyuki, Akao Yukihiro, Kunisada Takahiro, Tatsumi Junichi, Tezuka Ken ichi	4. 巻 57
2. 論文標題 Exosomes from dental pulp cells attenuate bone loss in mouse experimental periodontitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 162 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12949	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 雄太, 川口 知子, 黒田 依澄, 飯田 一規, 畠山 大二郎, 辰巳 順一, 手塚 建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞エクソソームは歯周炎の進行を抑制する
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒田依澄, 有本周平, 川口知子, 青木仁美, 本橋力, 國貞隆弘, 手塚建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞のHLA-A領域に対する選択的ゲノム編集
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水雄太, 川口知子, 佐藤 匠, 長谷川徹, 森永啓嗣, 金山圭一, 北後光信, 柴田敏之, 手塚建一, 辰巳順一
2. 発表標題 歯髄細胞エクソソームは歯周炎の進行を抑制する
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

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精製
3. 学会等名 第57回 口腔組織培養学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水雄太, 川口知子, 佐藤 匠, 長谷川徹, 森永啓嗣, 安田 忠司, 金山圭一, 北後光信, 手塚建一, 辰巳順一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞エクソソームは歯周炎の進行を抑制する
3. 学会等名 第15回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水雄太, 川口知子, 黒田依澄, 飯田一規, 畠山大二郎, 辰巳順一, 手塚建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞エクソソームは歯周炎の進行を抑制する
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒田依澄, 有本周平, 川口知子, 青木仁美, 本橋力, 國貞隆弘, 手塚建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞のHLA-A領域に対する選択的ゲノム編集
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口知子、清水雄太、黒田依澄、畠山大二郎、飯田一規、柴田敏之、國貞隆弘、手塚建一
2. 発表標題 歯髓細胞由来エクソソームのLPS誘導性歯周炎モデルでの評価
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手塚建一, 川口知子, 清水雄太, 黒田依澄, 高橋滉平
2. 発表標題 量込みみニュートラルネットワークを用いた培養歯髓細胞密度評価法 : ShizuiAI
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimizu Y, Kawaguchi T, Ikami H, Yasuda T, Shibata T, Tezuka K, Tatsumi J
2. 発表標題 Exosomes from dental pulp cells can suppress periodontitis symptoms
3. 学会等名 第106回アメリカ歯周病学会共催日本歯周病学会・日本臨床歯周病学会2020年大会
4. 発表年 2020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	飯田 一規 (Iida Kazuki) (30585237)	岐阜大学・大学院医学系研究科・講師 (13701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	柴田 敏之 (Shibata Toshiyuki) (50226172)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	
研究分担者	畠山 大二郎 (Hatakeyama Daijiro) (60377653)	岐阜大学・医学部附属病院・講師 (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