

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16983

研究課題名（和文）マイクロRNAを最適化した力学応答歯根膜細胞エクソソームによるDDSの基盤構築

研究課題名（英文）Establishment of basic technology of MicroRNA-optimized mechanoresponsive periodontal ligament cell exosome for application to DDS

研究代表者

丸山 顕太郎（Maruyama, Kentaro）

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：80833805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：メカニカルストレスを付与した歯根膜細胞から抽出されたエクソソームに含まれるmiRNA発現量を解析すると、メカニカルストレスを付与しない歯根膜細胞由来エクソソームと比較しhas-miR-146a、has-miR-125a-5pの発現上昇が確認された。一方、has-miR-126-3pの発現に変化は見られなかった。hsa-miR-125a-5p mimicを導入した歯根膜細胞においてhsa-miR-125a-5pの遺伝子発現上昇が確認された。また、mimic導入細胞由来エクソソームにおいてもhsa-miR-125a-5pの遺伝子発現上昇が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病における炎症の制御において、抗炎症型M2マクロファージが炎症を収束させ、組織を治癒に向かわせることが注目されている。申請者らはこれまでに抗炎症作用を有するメカニカルストレス応答性歯根膜細胞エクソソームを見出しているが、本研究では同エクソソームに含まれると推測されるM2マクロファージ分化誘導性microRNAを同定し、それらを高濃度に包含させたエクソソームを用いたDDSへの基盤を構築することを目指した。本研究を通して得られた知見はM2マクロファージ分化誘導機構の解明や、メカニカルストレスを応用した生体細胞由来エクソソームを用いた炎症制御に対する創薬の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the expression levels of miRNAs contained in exosomes extracted from mechanically stressed periodontal ligament cells. Compared to periodontal ligament cell-derived exosomes without mechanical stress, mechanically stressed periodontal ligament cell-derived exosomes showed increased gene expression of has-miR-146a and has-miR-125a-5p. In contrast, no difference in expression of has-miR-126-3p was observed. hsa-miR-125a-5p mimic-transfected periodontal ligament cells showed increased gene expression of hsa-miR-125a-5p. In addition, the upregulation of hsa-miR-125a-5p gene expression was also observed in exosomes derived from mimic-transfected cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：メカニカルストレス エクソソーム 歯根膜細胞 micro RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周病原性細菌により引き起こされる歯周組織の炎症性疾患である。その炎症の場において、マクロファージは自然免疫の中心として機能する。近年、炎症を強く惹起する炎症型 M1 マクロファージとは異なる細胞型の抗炎症型 M2 マクロファージが注目され、過剰な炎症反応の制御や組織修復・創傷治癒に関与し、組織の恒常性を維持することが知られている。歯周病治療の分野においても、効果的な組織再生療法のために炎症制御と創傷治癒の促進が必要であり、M2 マクロファージの誘導を主軸とした炎症制御技術の開発が求められている。

エクソソームは直径 50~200 nm の細胞外小胞であり、生体内のあらゆる細胞から分泌され、細胞間コミュニケーションに関与している。エクソソームにはタンパク質や、マイクロ RNA (miRNA) 等の核酸が内包されており、特に miRNA はエクソソームを介した生体反応の中心的な役割を担うとされる。申請者は、伸展刺激を受容した歯根膜線維芽細胞はエクソソームの分泌が増強することを見出すとともに (Front. Immunol. 2019)、無刺激細胞由来のエクソソームと比べ強い抗炎症活性を有することを発見した。このことから、メカニカルストレス (MS) を付与した歯根膜細胞から分泌されるエクソソームには、抗炎症型 M2 マクロファージへの分化誘導に寄与する有用な miRNA が含包していることが示唆される。そこで、メカニカルストレス (MS) により誘導された抗炎症性 miRNA を同定し、それらを高濃度に含包させたエクソソームを合成することにより、将来的な DDS への応用が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

メカニカルストレス (MS) を付与された歯根膜線維芽細胞由来エクソソームが内包する抗炎症性 miRNA を同定し、有効 miRNA 含有エクソソームを用いた DDS を展開するための基盤を構築することである。

3. 研究の方法

ヒト歯根膜細胞に周期的伸展装置 STB-140 (Strex Co.) を用いてメカニカルストレス (MS) を 24 時間付与し、得られた細胞上清から ExoQuick-TC (System Biosciences.) を用いてエクソソームを抽出した。培地はエクソソーム除去済み 10% FBS 添加 MEM を用いた。

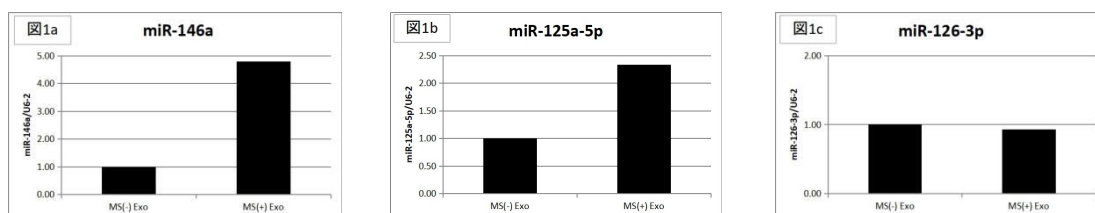
MS を付与したヒト歯根膜細胞および、細胞上清から抽出したエクソソームから RNA を抽出し、has-miR-146a、has-miR-125a-5p、has-miR-126-3p の発現を qRT-PCR にて解析した。

6 well plate に播種したヒト歯根膜細胞に hsa-miR-125a-5p mimic (mirVana™ miRNA mimic)、mirVana miRNA Negative Control を Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入した。導入 24 時間後、エクソソーム除去済み 10% FBS 添加 MEM に培地交換し、さらに 24 時間培養したヒト歯根膜細胞および細胞上清から抽出したエクソソームから RNA を抽出し、has-miR-125a-5p 発現を qRT-PCR にて解析した。

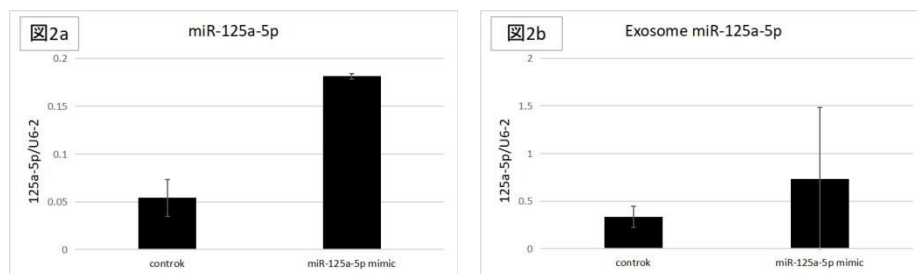
4. 研究成果

歯根膜細胞において発現する miRNA に関して現在までに多くの報告がなされているが、本研究ではその中でも抗炎症に関与するとされる has-miR-146a、has-miR-125a-5p、has-miR-126-3p に注目し解析を進めた。

メカニカルストレス (MS) を付与した歯根膜細胞から抽出されたエクソソームに含包される miRNA 発現量を解析すると、MS を付与しない歯根膜細胞由来エクソソームと比較し has-miR-146a、has-miR-125a-5p の発現上昇が確認された。一方、has-miR-126-3p の発現に変化は見られなかった (図 1)。



MSによる発現上昇がみられた2つのmiRNAのうち、抗炎症性M2マクロファージの分化促進に関与するとされる has-miR-125a-5p の mimic を歯根膜細胞に導入し、エクソソームの改変が可能か解析を行った。hsa-miR-125a-5p mimic を導入した歯根膜細胞において hsa-miR-125a-5p の遺伝子発現上昇がみられた(図2a)。また、mimic 導入細胞由来エクソソームにおいても hsa-miR-125a-5p の遺伝子発現上昇がみられた(図2b)。



これらの結果から、メカニカルストレスは、歯根膜細胞由来エクソソームにおける抗炎症性miRNA、has-miR-146a、has-miR-125a-5pの発現上昇に寄与し、炎症の場において抗炎症型M2マクロファージ分化誘導をターゲットとしたDDSへの応用が期待できることが示唆された。一方で、miRNA mimicを用いた高濃度抗炎症性miRNA含包エクソソーム作製に関しては、期待したほどの導入効率が得られなかった。今後は導入試薬や濃度設定当の検討を継続し、将来的な治療応用への基盤構築を進める予定である。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakisaka Yukihiro, Ishihata Hiroshi, Maruyama Kentaro, Nemoto Eiji, Chiba Shigeki, Nagamine Masaru, Hasegawa Hiroshi, Hatsuzawa Takeshi, Yamada Satoru	4. 巻 16
2. 論文標題 Serial Cultivation of an MSC-Like Cell Line with Enzyme-Free Passaging Using a Microporous Titanium Scaffold	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1165 ~ 1165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma16031165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Rei, Maruyama Kentaro, Nemoto Eiji, Sakisaka Yukihiro, Suzuki Shigeki, Li Jiajun, Numazaki Kento, Tada Hiroyuki, Yamada Satoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Derived From Murine Cementoblasts Possess the Potential to Increase Receptor Activator of Nuclear Factor- B Ligand-Induced Osteoclastogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 825596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.825596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山 顕太郎, 佐藤 令, 向阪 幸彦, 鈴木 茂樹, 根本 英二, 山田 聡
2. 発表標題 周期的伸展刺激を受容したヒト歯根膜線維芽細胞はPGE2を介してM2マクロファージ分化を誘導する
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 令, 丸山 顕太郎, 根本 英二, 向阪 幸彦, 鈴木 茂樹, 黎 家君, 沼崎 研人, 多田 浩之, 山田 聡
2. 発表標題 セメント芽細胞由来エクソソームによる破骨細胞分化制御 RANKL誘導性破骨細胞形成に対する増強作用
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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