

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21017

研究課題名（和文）歯肉幹細胞由来エクソソームの分泌機序解明と内包miRNAによる骨吸収抑制効果

研究課題名（英文）Secretory mechanism of GMSC derived exosomes and suppression of bone resorption by internalizing miRNA

研究代表者

中尾 雄紀（Nakao, Yuki）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90906322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：先行研究より、miR-1260bが、歯周炎治療の有用なツールとなり得ると考えた。Database 検索から miR-1260bがERストレス制御遺伝子ATF6 を標的とすることを確認し、miR-1260b による ATF6 を介した歯周炎制御が示唆された。実際に、マウス歯周炎モデルにおいて、ERストレス関連遺伝子ATF6 は強く誘導されていた。さらに、miR-1260bによりERストレス関連遺伝子ATF6 発現及び歯槽骨吸収を有意に抑制する事を確認した。以上の研究結果から、miR-1260b が小胞体ストレス応答を制御することで破骨細胞の分化を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells: MSC）は、再生医療における代表的ソースとして利用されている。これまで、MSCは骨髄のみならず多くの結合組織にも存在していること、とりわけ口腔内では、歯髄、歯肉、歯根膜など多数の部位で存在が確認されている。さらに、現在、MSCから分泌される細胞外小胞には、分泌細胞由来のタンパク質やmiRNAが含まれることが分かり、バイオマーカーや治療への応用で注目を集めている。このようにMSCエクソソーム内容物の特異性や疾患治療標的miRNAについて解明することで、MSC由来細胞外分泌小胞を用いた医療応用の基盤構築が期待される。

研究成果の概要（英文）：Based on previous studies, we hypothesized that miR-1260b could be a useful tool for the treatment of periodontitis. miR-1260b was confirmed to target the ER stress-regulated gene ATF6 by Database search, suggesting ATF6-mediated regulation of periodontitis by miR-1260b. Indeed, the ER stress-related gene ATF6 was strongly induced in a mouse model of periodontitis. Furthermore, we confirmed that miR-1260b significantly suppressed ER stress-related gene ATF6 expression and alveolar bone resorption. These results suggest that miR-1260b suppresses osteoclast differentiation by regulating the ER stress response.

研究分野：歯周病学

キーワード：エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体組織は、恒常性を維持し正常な機能を発揮するために、自己修復能を有している。組織の恒常性維持のための中心的役割を担う細胞として組織幹細胞が知られている。中でも、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSC) は、再生医療における代表的ソースとして利用されている。口腔領域に存在し、他の幹細胞に比べて、採取が容易であり、エクソソームの分泌用量が多いと報告のあるヒト歯肉幹細胞に注目した。エクソソームは、細胞から分泌される 30~200 nm 程度の、脂質二重膜構造を持つ小胞である。最近では、MSC のパラクラインのほとんどを MSC の分泌するエクソソームが担っている等、MSC 細胞移植と同様の治療効果を有する事も報告されるにいたった (Katsuda T *et al. Proteomics.*, 2013)。その中心的役割を担うのが、エクソソームに内包されたタンパクおよび miRNA であり、特に miRNA を介した遺伝子発現制御が重要であることが明らかになりつつある (Bruno S *et al., J Am Soc Nephrol.*, 2009)。

先行研究 (Nakao *et al., Acta Biomater.*, 2021) において、MSC が疾病由来の刺激に応じて治療効果を促進するという報告 (Lai RC *et al., Stem cell Res.*, 2010) をもとに、GMSC を炎症性サイトカイン (TNF- α) 刺激した際に、GMSC の有する抗炎症作用を増強させるネガティブフィードバック機構が生じるという仮説を立て検証した結果、GMSC 由来エクソソームが有する抗炎症作用の増強効果を確認した。具体的には、ヒト歯肉幹細胞 (GMSC) は細胞由来エクソソーム上に発現した CD73 を介して、マクロファージ表現型を炎症性 M1 から修復性 M2 へと誘導し、歯肉幹細胞由来エクソソームによるマウス背面皮下モデルにおける創傷治癒促進効果を確認した。また、歯肉幹細胞由来エクソソームは、*in vitro* において歯周組織再生において中心的な役割を持つヒト歯根膜細胞におけるリポ多糖 (LPS) 誘導性 RANKL 発現を抑制した。

さらに、TNF- α 前刺激歯肉幹細胞由来エクソソーム内包 miRNA をマイクロアレイ解析し、変動上位群を確認した。これら変動上位群 miRNA をヒト歯根膜細胞に導入したところ、miR-1260b は、LPS 誘導性 RANKL 発現を抑制した。

2. 研究の目的

上記背景より、miR-1260b が、歯槽骨吸収という特徴を持つ歯周炎において治療の有用なツールとなり得ると考えられた。また、Database 検索から miR-1260b が ER ストレス制御遺伝子 ATF6 を標的とすることを確認し、miR-1260b による ATF6 を介した歯周炎制御が示唆された。そこで、マウス歯周炎モデルにおいて、miR-1260b の骨吸収抑制効果と ER ストレス関連遺伝子 ATF6 への影響を検証し、破骨細胞の制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

[In vitro]

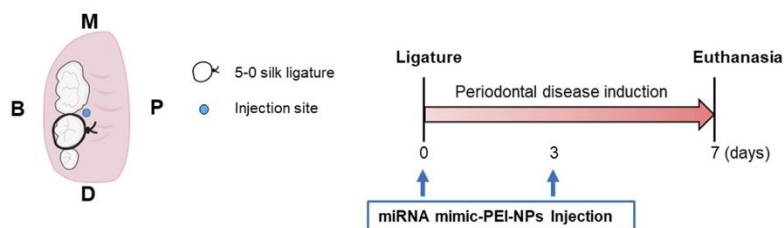
ヒト初代歯根膜細胞 (hPDLcs) を用いて以下の実験を行った。

- ① miR-1260b による ER ストレス関連遺伝子の発現変動の確認
- ② ATF6 -siRNA による骨吸収関連遺伝子の発現および培養上清を用いた単球系細胞 (PBMC, RAW-D) における破骨細胞分化への影響の確認
- ③ miR-1260b/ATF6 による破骨細胞分化への直接的な影響を確認した。

[In vivo]

5-0 絹糸で結紮によるマウス歯周炎モデルを作製し、結紮 1 週間後に回収以下の実験を行った。

- ① 歯牙結紮が惹起した歯周炎による ER ストレス関連遺伝子 (ATF-6) の発現変動を確認する。(qRT-PCR, 免疫組織化学染色)
- ② 結紮周囲歯肉への miR-1260b 注入の有無による骨吸収量の測定、破骨細胞分化への影響を確認する。(Micro CT 解析)



4. 研究成果

マウス歯周炎モデルの歯周組織では ATF6 の発現が強く誘導された。(図1)

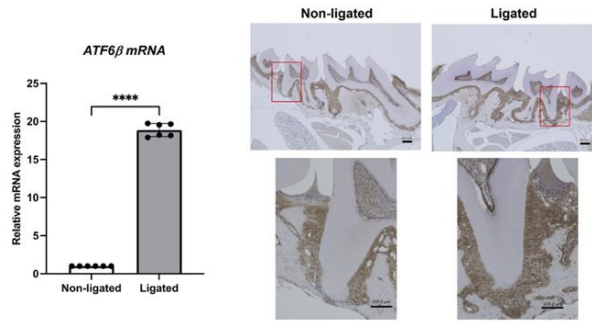


図 1

マウス歯周炎モデルにおいて、結紮周囲歯肉への miR-1260b 局所投与による骨吸収量抑制効果を確認した。(図2)

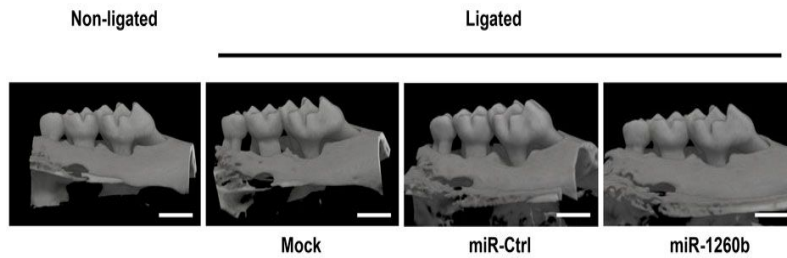


図 2

hPDLcs において miR-1260b 導入により ER ストレス制御遺伝子 ATF6 の発現が有意に抑制された。(図3)

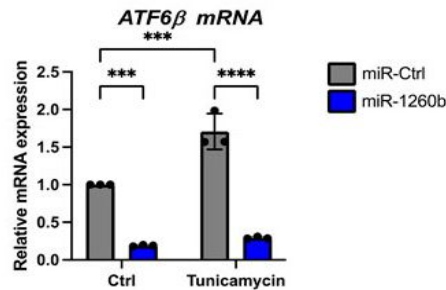
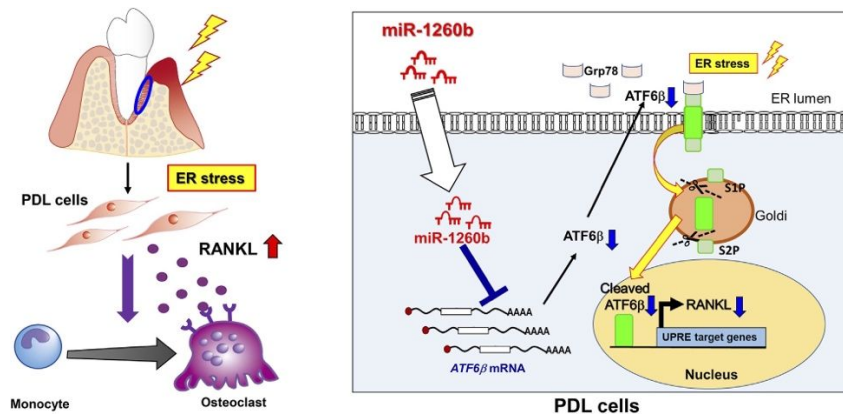


図 3

一方, ATF6 -siRNA による発現抑制で RANKL の発現が有意に減少した。さらに ATF6 -siRNA による破骨細胞分化抑制のみならず, ATF6 ノックダウン hPDLcs 培養上清においても破骨細胞分化抑制を確認した。

以上の研究結果から, miR-1260b が小胞体ストレス応答を制御することで破骨細胞の分化を抑制することが示唆された。



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 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashi Chikako, Fukuda Takao, Kawakami Kentaro, Toyoda Masaaki, Nakao Yuki, Watanabe Yukari, Shinjo Takanori, Sano Tomomi, Iwashita Misaki, Yotsumoto Karen, Shida Miyu, Taketomi Takaharu, Sanui Terukazu, Uchiumi Takeshi, Kanematsu Takashi, Nishimura Fusanori	4. 巻 10
2. 論文標題 miR-1260b inhibits periodontal bone loss by targeting ATF6 mediated regulation of ER stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 open
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.1061216	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 Watanabe Yukari, Fukuda Takao, Hayashi Chikako, Nakao Yuki, Toyoda Masaaki, Kawakami Kentaro, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamato Hiroaki, Yotsumoto Karen, Taketomi Takaharu, Uchiumi Takeshi, Sanui Terukazu, Nishimura Fusanori	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular vesicles derived from GMSCs stimulated with TNF- and IFN- promote M2 macrophage polarization via enhanced CD73 and CD5L expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 open
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-17692-0	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林千華子, 福田隆男, 渡邊ゆかり, 川上賢太郎, 豊田真顕, 中尾雄紀, 四本かれん, 大和寛明, 新城尊徳, 讃井彰一, 西村英紀.
2. 発表標題 歯肉幹細胞由来エクソソーム内包miR-1260bによる小胞体ストレス応答制御を介した歯槽骨吸収抑制作用.
3. 学会等名 2021年度日本歯科保存学会秋季学術大会(第155回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Nakao, Yukari Watanabe, Chikako Hayashi, Hiroaki Yamato, Karen Yotsumoto, Terukazu Sanui, Takanori Shinjo, Takao Fukuda, Fusanori Nishimura.
2. 発表標題 Exosomes from TNF- -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss.
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center 5th Joint International Symposium(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Chikako Hayashi, Takao Fukuda, Yukari Watanabe, Kentaro Kawakami, Masaaki Toyoda, Yuki Nakao, Karen Yotsumoto, Hiroaki Yamato, Takanori Shinjo, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura
2. 発表標題	Exosomal miR-1260b derived from TNF- α -treated hGMSCs inhibits periodontal bone loss by targeting ATF6 β -mediated regulation of ER stress.
3. 学会等名	Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center 5th Joint International Symposium(国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	林千華子、福田隆男、渡邊ゆかり、川上賢太郎、豊田真頭、中尾雄紀、四本かれん、大和寛明、新城尊徳、讃井彰一、西村英紀
2. 発表標題	歯肉幹細胞由来エクソソーム内包mi-1260bによる小胞体ストレス応答制御を介した歯周炎骨吸収抑制効果
3. 学会等名	第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	豊田真頭、梶岡俊一、福田隆男、渡邊ゆかり、林千華子、川上賢太郎、中尾雄紀、四本かれん、大和寛明、新城尊徳、讃井彰一、西村英紀
2. 発表標題	バイオ3Dプリンターを用いた、間葉系幹細胞からの骨様立体構造物作製への挑戦
3. 学会等名	第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	渡邊ゆかり、林千華子、川上賢太郎、豊田真頭、中尾雄紀、四本かれん、新城尊徳、岩下未咲、讃井彰一、福田隆男、西村英紀
2. 発表標題	TNF- α /IFN- γ 共刺激した歯肉幹細胞由来エクソソームは、CD73とCD5Lを介して抗炎症性M2マクロファージを誘導する
3. 学会等名	日本歯科保存学会2022年度秋季学術大会(第156回)
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
---------	---------