

歯髓細胞由来エクソソームによる
LPS誘導性歯周炎の緩和効果

しみず ゆうた
清水 雄太

本論文の要旨は、第 226 回朝日大学歯学研究科発表会 (2019 年 10 月 23 日, 岐阜) において発表した。本論文の一部は、第 36 回日本骨代謝学会学術集会 (2018 年 7 月 26 日, 長崎) 第 13 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 (2018 年 11 月 23 日, 愛知) 第 18 回日本再生医療学会総会 (2019 年 3 月 21 日, 兵庫) ANNUAL MEETING ISEV 2019 (2019 年 4 月 24 日, 京都) 第 150 回日本歯科保存学会 (2019 年 6 月 27 日, 石川) 第 62 回日本歯周病学会 (2019 年 10 月 25 日, 福岡) 第 14 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 (2019 年 11 月 10 日, 愛知) において発表した。

緒 言

過去数十年にわたって，再生医療のための幹細胞の研究が数多く報告されており，特に間葉系幹細胞は，細胞自体を移植する臨床研究が行われている^{1,2)}．ヒト歯髄細胞(hDPC)は神経堤に由来する間葉系細胞の一種であり^{3,4)}，それらは医療廃棄物として廃棄された歯から容易に入手することができる．また，ヒト智歯より歯髄細胞を採取し，高い増殖能を長期間維持すること⁵⁾や線維芽細胞増殖因子(FGF)2で前処理したhDPCがラットの脊髄損傷モデルにおいて病状を改善したことを報告した⁶⁾．以上のことより，hDPCは細胞移植治療に応用できることが示唆される．しかしながら，宿主の免疫系によるドナー細胞の拒絶および腫瘍形成の危険性などの問題は依然として残っている．

ヒト細胞はヒト白血球抗原(HLA)といわれる2量体の抗原タンパク質を発現する．HLAは，HLAクラスI分子とHLAクラスII分子に区別され，補助刺激シグナルと共に，T細胞へ非自己抗原を提示して免疫拒絶反応を誘導する機能をもつ．したがって，ハプロタイプが患者の2つのハプロタイプの少なくとも1つに一致する場合，移植細胞のHLAハプロタイプホモ接合性のドナー細胞(HLAハプロタイプホモ：HHH)が免疫拒絶反応の可能性

を少なくすることができる⁷⁻⁹⁾。最近では、細胞表面上に存在する HLA 分子数を最小にして宿主の免疫応答を防ぐユニバーサル iPS 細胞を生成する試みがなされている¹⁰⁾。しかし、これらの細胞がウイルス感染や腫瘍化した場合に、ホストの免疫が効率的にそれを排除できないという別の懸念が生じる。

近年、エクソソームと呼ばれる直径 50 - 100 nm 前後の大きさの小胞がさまざまな種類の細胞から分泌されることが報告されている¹¹⁾。間葉系幹細胞によって分泌されたエクソソームは、腫瘍形成のリスクを伴うことなく心筋傷害、味覚障害、骨折などのさまざまな疾患に対する治療効果がある¹²⁻¹⁴⁾。また、部分的に免疫反応および組織修復における細胞間メッセンジャーとして作用する可能性も示されている¹⁵⁾。しかし、エクソソームは表面に HLA および他の抗原を提示することで免疫原性を保持し続けており¹⁶⁾、肺移植における慢性肺移植片機能不全の原因の 1 つであると考えられている¹⁷⁾。他の研究において、ドナー由来のエクソソームが T 細胞媒介宿主応答を誘導して同種移植片拒絶反応を引き起こすことも報告されている^{18,19)}。

歯周炎は、主に歯周病原性細菌によって産生されるリポ多糖 (LPS) などによって引き起こされる

炎症性疾患であり，炎症が広がって慢性化するにつれて歯槽骨を破壊する^{20,21)}。過去の研究では，歯周炎に伴う炎症や骨量減少を間葉系幹細胞の移植によって抑制できることが報告されている²²⁾。

本研究では，HHH - DPC から分泌されるエクソソームの特性を評価し，LPS 誘導性歯周炎への効果を調べ，移植細胞に変わるより安全な治療法に用いることができるか検討した。

材料および方法

1. 細胞準備

岐阜大学の倫理審査委員会によって承認されたプロトコル（倫理審査委員会承認番号：29-323）を使用して，岐阜大学病院の約300人の患者からインフォームドコンセントを得た後，DPCを収集した⁵⁾．その中から3種のHHH-DPCs（サンプルNo: DP74, 16歳女性: DP94, 16歳女性: DP263, 15歳男性）を選択して使用した．

2. エクソソームの単離

HHH-DPCsを血清培地(MSCGM, Lonza, MD, USA)にて70-80%コンフルエントになるまで培養した．次に，細胞をphosphate buffered saline(-) (PBS)にて3回洗浄し，培養液を無血清培地(Dulbecco's modified Eagle medium, SIGMA-ALDRICH, 東京)と交換し，24時間培養した．その後，培養液を回収し，0.45 μm および 0.22 μm のシリンジフィルター(Minisart, Lower Saxoney, FRG)にて濾過後，4°C, 3時間, 90,000 rpmにて超遠心分離した．分離されたペレットをPBSに再懸濁し，-80°Cで保存した．

3. ナノ粒子解析

ナノ粒子解析 (NTA) は、液体試料中の 30 - 150 nm の範囲の粒子を検出するために使用される方法である。NTA は、エクソソームのサイズ分布および相対濃度の決定を可能にする。NTA 測定は、エクソソーム懸濁液を PBS にて 100 倍希釈し Nanosight LM10 (Nanosight, Wiltshire, UK) を用いて行った²³⁾。そして、NTA バージョン 2.3 (Nanosight, Wiltshire, UK) を用いてデータを捕捉し解析した。

4. ウェスタンブロットティング

タンパク質抽出およびウェスタンブロットティング実験は、以前に記載されている報告に従い実施した²⁴⁾。タンパク質濃度は、DC タンパク質アッセイキット (Biorad, CA, USA) を用いて測定した。5 μ g のタンパク質を SDS - PAGE で分離し、PVDF メンブレン (PerkinElmer Life Sciences, MA, USA) にエレクトロブロットした。5% 脱脂乳 Tris Buffered Saline (TBS) - T にて 1 時間非特異的結合部位を遮断後、メンブレンをさまざまな一次抗体と共に 4°C で一晩インキュベートした。以下のタンパク質に対する抗体を使用した； β - actin (beta Actin Monoclonal antibody, Protein Tech, IL, USA), CD9 (sc-13118: Santa Cruz, ON, CA), CD

81 (sc-166029: Santa Cruz, ON, CA)および HLA class I A,B,C (Anti HLA class I - A,B,C, Mouse Monoclonal antibody Conjugation: HRP, ホクドール, 札幌). メンブレンを TBS - T で洗浄し, 二次抗体 (Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody, Cell Signaling TECHNOLOGY, MA, USA) と共にさらに 1 時間室温でインキュベートした後, 再び TBS - T にて洗浄した. その後, Luminata Forte Western HRP 基質 (WBLUF0500; M-illipore, Merck, Hessen, FRG) を使用して可視化した.

5. 電子顕微鏡観察

DP74 エクソソームをポリ-L-リジンコートガラスプレート ($\phi 10\text{mm}$ 円形カバーガラス, 日清 EM, 大阪) 上に置き, 2.0% グルタルアルデヒド溶液中で 10 分間固定した. 段階的なエタノール系列で脱水した後, HMDS (ヘキサメチルジシラザン, FUJIFILM, 東京) を使用して自然乾燥した. そして, 試料を走査型電子顕微鏡用のアルミ製試験片に固定した. 導電処理はオスミウムコーティング装置 (HP-1S, Vacuum Device, 東京) を用いて行い, 走査型電子顕微鏡 (S-4500, Hitachi, 東京) にて加速電圧 5kV で観察した.

免疫電子顕微鏡観察 (TEM) は, DP74 エクソソームを炭素被覆支持フィルム (Excel support film, 日

清 EM, 大阪)を有する銅グリッド上に置き, 1% BSA 含有 PBS 中に数秒間曝露した. 次に, グリッドを室温で 90 - 120 分間 CD9 (anti CD9 clone 12A12, SHI-EXO-M01: コスモバイオ, 東京)または CD63(anti-CD63 clone 8A12, SHI-EXO-M02: コスモバイオ, 東京)の一次抗体溶液に移した後に室温で 60 - 90 分間, 10nm の金粒子を有するヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (British Bio, Antrim, UK)の二次抗体溶液に移した. 1%BSA 含有 PBS にて洗浄後, 試料を 2%グルタルアルデヒド含有 0.1M リン酸緩衝液中にて固定した. そして, 4%酢酸ウラニル溶液で 1分間ネガティブ染色した後, 透過型顕微鏡 (HT-7700, Hitachi, 東京) 加速電圧 100KV にて超微細構造観察を行った.

NanoSuit 法によるエクソソームの観察は, エクソソームをプラズマ処理したカバーガラス上に接着し, NanoSuit を形成するために, Tween20 ベースの NanoSuit 溶液を塗布した. 続いてカバーガラスをスピコートして過剰の溶液を除去し (2,000rpm, 15 秒)風乾した. FE - SEM は, 加速電圧 1.0 - 5.0 kV で操作し, 走査型電子顕微鏡 (S-4800, Hitachi, 東京)装置を用いて行った. 真空度は, 10^{-3} から 10^{-6} Pa の範囲で調整し, 二次電子の検出は, より低い位置に配置された検出器を用いて行った²⁵⁾.

6. エクソソームの標識および取り込みアッセイ

製造業者のプロトコル²⁶⁾にしたがって、PKH26 Red Fluorescent Cell Linker kit (PKH26GL-1KT, SIGMA-ALDRICH, 東京)を用いて DP74 エクソソームを標識した。まず、1 μ l の PKH26 を 250 μ l の希釈剤 C (キット付属品)と混合した。次に、同容量の PBS に溶解した DP74 エクソソームを混合物に添加し、室温にて 5 分間インキュベートした。その後、0.5% ウシ血清アルブミンを含む 500 μ l PBS を加え、室温にて再び 5 分間インキュベートすることによって標識化を停止させた。試料を 4 $^{\circ}$ C , 3 時間 , 90,000 rpm で超遠心分離し、取り込みアッセイの前に PBS に再懸濁した。事前準備として、取り込みアッセイのために、DP94 を 2well プレートに播種し、5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C にて 24 時間培養した。24 時間後、100 μ g / ml の PKH26 標識エクソソームまたは PBS を well に添加し、24 時間培養した。培養後、細胞を PBS にて 2 回洗浄し、新たに調製した 4% パラホルムアルデヒド含有 PBS にて 15 分間室温で固定した。洗浄後、室温で 15 分間 0.1% Triton X - 100 / PBS と共にインキュベートし、DAPI (1 : 5000; FUJIFILM, 東京)にて 5 分間室温で染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した。

7. miRNA 発現のマイクロアレイ解析

Total RNA の抽出において、HHH - DPCs では RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, CA, USA) を使用し、HHH - DPC エクソソームでは miRCURY™ RNA Isolation Kit - Cells&Plant content (EXIQON, MA, USA) を用いた。Total RNA 発現解析にはアジレントの miRNA 標識システムを使用した。脱リン酸化および変性後、100 ng の total RNA をシアニン 3 - pCp で標識し、miRNA Complete Labeling および Hyb Kit (Agilent Technologies) を使用して Agilent Microarray Sure Print G3 Human miRNA 8 × 60 K miRBase 16.0 アレイとハイブリダイズさせた。20 時間のハイブリダイゼーションの後、スライドを Gene Expression Wash Buffer キットで洗浄し、Agilent スキャナーでスキャンした。画像を処理し、Agilent Feature Extraction ソフトウェアで分析した。また、分析したデータを正規化し、次いで GeneSpring GX ソフトウェア 12.5 (Agilent Technologies) で解析した。

8. 細胞遊走能アッセイ

DP94 遊走能に対する HHH - DPC エクソソームの効果は、スクラッチアッセイによって評価した。DP94 を 24well プレートに 1.0×10^5 cells / well で播種し、血清培地 (MSCGM, Lonza, MD, USA) で培

養した。細胞が約 80% コンフルエントに増殖後、ピペットチップ先端でスクラッチを行なった。その後、細胞を無血清培地液 (Dulbecco's modified Eagle medium, SIGMA-ALDRICH, 東京) にて洗浄し、HHH - DPC エクソソームを $100\mu\text{g} / \text{well}$ 添加した。12 時間、24 時間、48 時間、および 72 時間インキュベートした後、DP94 のスクラッチ領域への移動を光学顕微鏡下で観察した。画像処理ソフトウェア (Image J, National Institutes of Health, MD, USA) を用いてスクラッチした直後、12 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後の細胞の移動範囲のピクセル差を計算し、その平均を求めた。3 サンプルの平均値は統計的に処理した。

9. MTT アッセイ

DP94 を 96well 培養プレートに 1.6×10^4 cells/well で播種し、血清培地 (MSCGM, Lonza, MD, USA) で 24 時間インキュベートした。その後、細胞を HHH - DPC エクソソーム ($20\mu\text{g} / \text{well}$) 含有無血清培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, SIGMA-ALDRICH, 東京) 中で 24 時間処理した。他には、DP74 を 96well 培養プレートに 1.0×10^4 cells/well で播種し、血清培地 (MSCGM, Lonza, MD, USA) 中で 24 時間インキュベートした。その後、DP74 に *Porphyromonas gingivalis* (P.g) 由来

LPS (LPS - PG, ナカライテスク, 京都) ($100\mu\text{g} / \text{well}$)および DP94 エクソソーム ($20\mu\text{g} / \text{well}$)含有無血清培地液 (Dulbecco's modified Eagle medium, SIGMA-ALDRICH, 東京) を添加し 24 時間さらにインキュベートした。処理後, MTT アッセイを Cell Proliferation キット I (Roche Diagnostics, DA, USA)を用いて以下のように実施した。最初に, 3-(4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2, 5 - ジフェニルテトラゾリウムブロミド溶液 (SIGMA-ALDRICH, 東京)を各 well に加え, 4 時間インキュベートした。上清を除去した後, ジメチルスルホキシドを添加してホルマザンを溶解させ, 続いてマイクロプレートリーダー (EnVision™, 和研薬, 京都)を使用して 570nm での吸光度を測定した。

10. LPS 刺激による歯周炎モデルマウスにおけるエクソソームの効果

本実験は岐阜大学動物実験管理規定に従い岐阜大学動物実験専門委員会の承認 (H30 - 170)を得て実施した。実験動物には 13 週齢の C57BL / 6J マウス (平均体重 25g)を用い, ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments)²⁷⁾ のすべての推奨条件にしたがって行った。Blank, 生理食塩水 (PS), LPS + DP94 エクソソーム, P.g 由来 LPS の合計 4 群に分けた。三種混合麻酔

薬にて鎮静後²⁸⁾、開口器を使用しマウス上顎右側臼歯部口蓋歯肉(上顎右側第一、第二大臼歯間)にPS(大塚生食注、大塚製薬、東京)、LPS、DP94エクソソームを6週間かけて週2回の計12回注入した。試液の投与はマウスの口腔内の侵襲を最小限に抑えるために33Gのハミルトンマイクロシリンジ(Hamilton, Reno, USA)を使用した。LPSの用量は、Hiyariらの方法²⁸⁾にしたがって希釈液で100 μ g/ μ lに調製し、マウスには各2 μ l注入した。PS群では、2 μ lのPSが追加投与され、4 μ g/ μ lのDP94エクソソーム溶液2 μ lがLPS+DP94群に追加投与された。12週間後、動物を屠殺し、上顎を摘出後、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。

試料は固定後に μ CT装置(Scanmate-RB090SS150, Comscan, 横浜)を使用して管電圧80.0kV、管電流80.0 μ A、倍率4.2倍の設定で断層撮影を行った。上顎骨の形態は、TRI/3D-BON(Ratok Systems Engineering, 東京)を用いて3次元的に観察した。撮影された画像は、Image Jを用いて、断層画像の矢状断面の歯の表面、歯間接触および歯槽骨に囲まれたピクセル領域を計算した。その後、試料は10%EDTA(DOJIN, 熊本)(PH7.4)溶液で脱灰し、通法に従いパラフィン包埋し矢状方向に厚さ5 μ mの組織標本作製した。そして、切片をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色し、光学顕微鏡を用い

て観察した。

11. 統計学的分析

得られたデータをもとに、一元配置分散分析および Tukey-Kramer methods を行い、 $P < 0.05$ 未満の場合を有意差とした。

結 果

1. HHH - DPC に由来するエクソソームの特性評価

DP74 エクソソームは、電子顕微鏡下で均質な球状膜構造を示し、NTA では約 66, 110 nm に 2 つのピークを示した (図 1 A, B, C). また、これらのエクソソームは、免疫電子顕微鏡により CD9 および CD63 陽性で (図 1D, E), ウェスタンブロット法では、DP94, DP263 のエクソソームとともに CD9 および CD81 の発現が確認された (図 1F).

PKH26 標識 DP74 エクソソームは、DP94 に効率よく取り込まれ (図 1G, H, I), その一部は抗 CD9 抗体でも標識された (図 2). これらの結果から、HHH - DPC より 100nm 前後の球状膜構造を示し、CD9/CD63/CD81 のマーカーを発現するエクソソームを精製することができた.

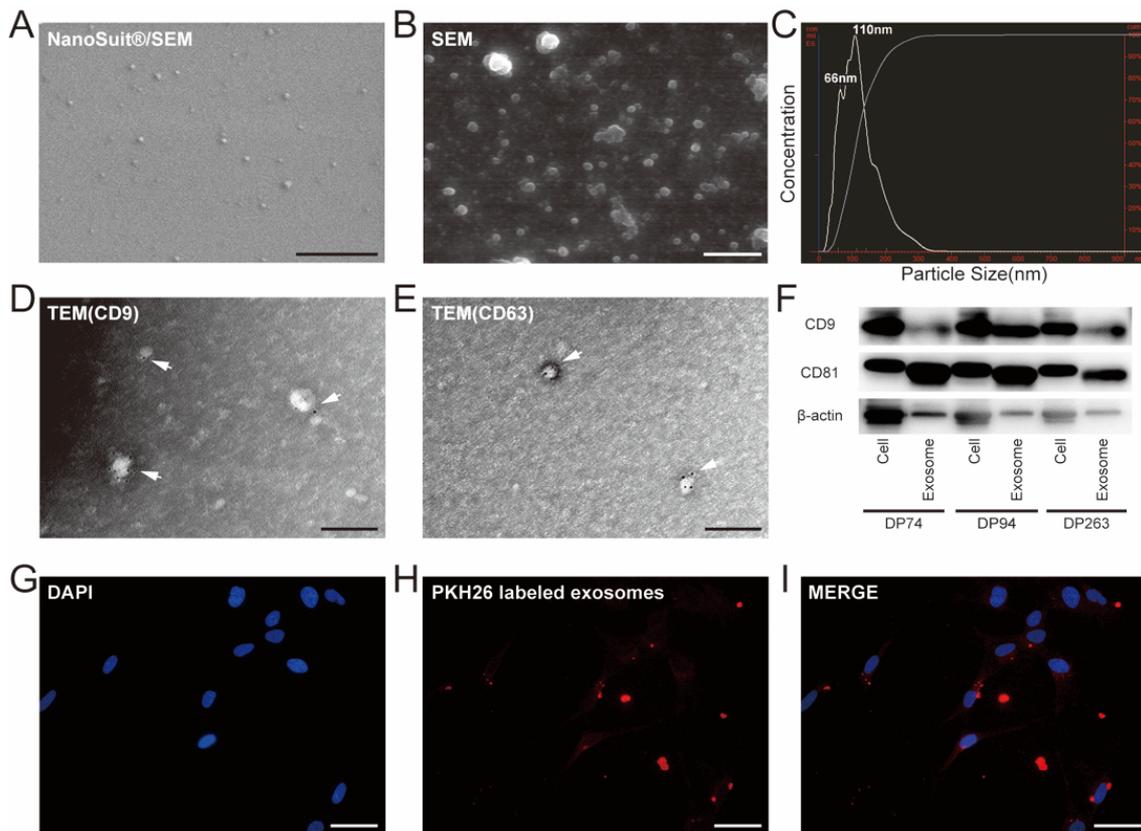


図 1 hDPC からのエクソソームの精製と特性評価。

(A) DP74 エクソソームの NanoSuit 法を用いた走査型電子顕微鏡写真。スケールバー = 1 μ m。 (B) DP74 エクソソームの従来法を用いた走査型電子顕微鏡画像。スケールバー = 1 μ m。 (C) NTA による HHH - DPC エクソソームの粒子サイズ。 (D, E) 抗ヒト CD9 および CD63 抗体を用いた DP74 エクソソームの免疫電子顕微鏡画像。スケールバー = 0.2 μ m。 (F) HHH - DPC およびエクソソームにおける CD9 および CD81 の発現を示すウェスタンブロット。 (G - I) DP74 エクソソームの DP94 細胞への取り込み。スケールバー = 50 μ m。

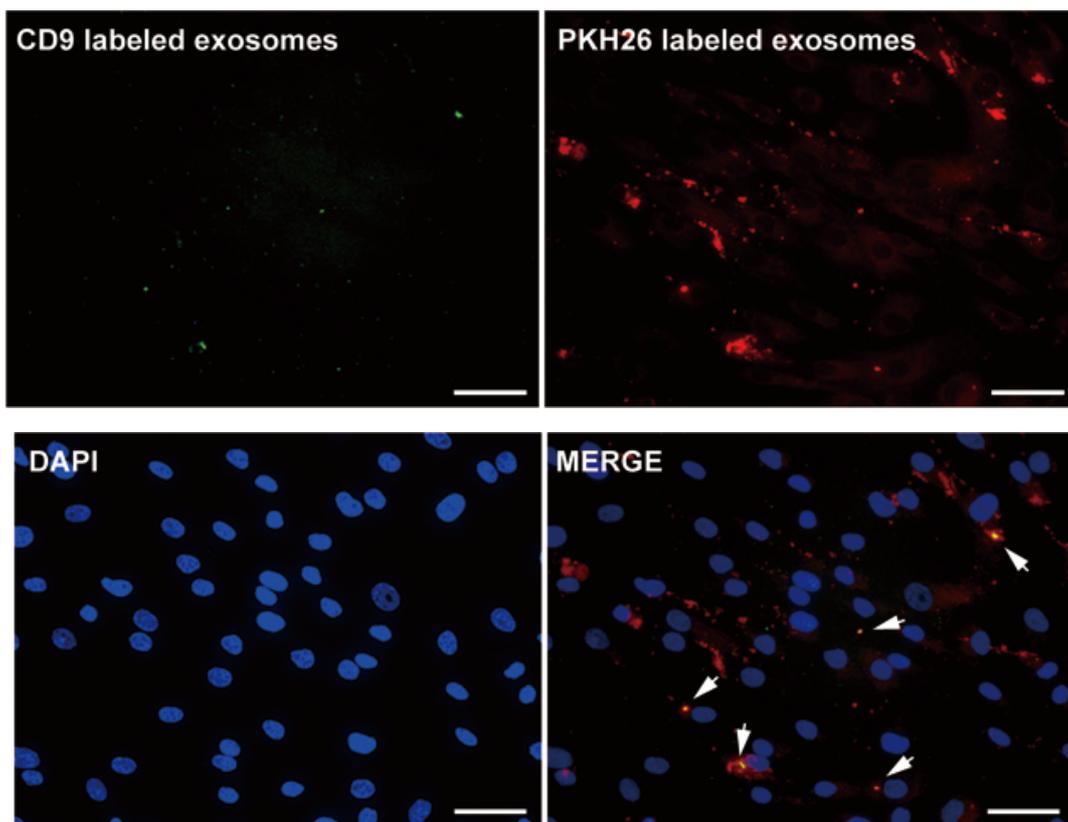


図 2 hDPC への CD9 陽性 DPC エクソソームの取り込み評価。

一部の CD9 陽性 DPC エクソソームの細胞内取り込み。スケールバー = 50 μ m。

2. HHH - DPC エクソソームにおける HLA クラス I の発現

ウエスタンブロットにて、総タンパク量の中で HHH - DPC エクソソームは、由来する HHH - DPCs よりも低いレベルで HLA クラス I 分子を発現していた (図 3).

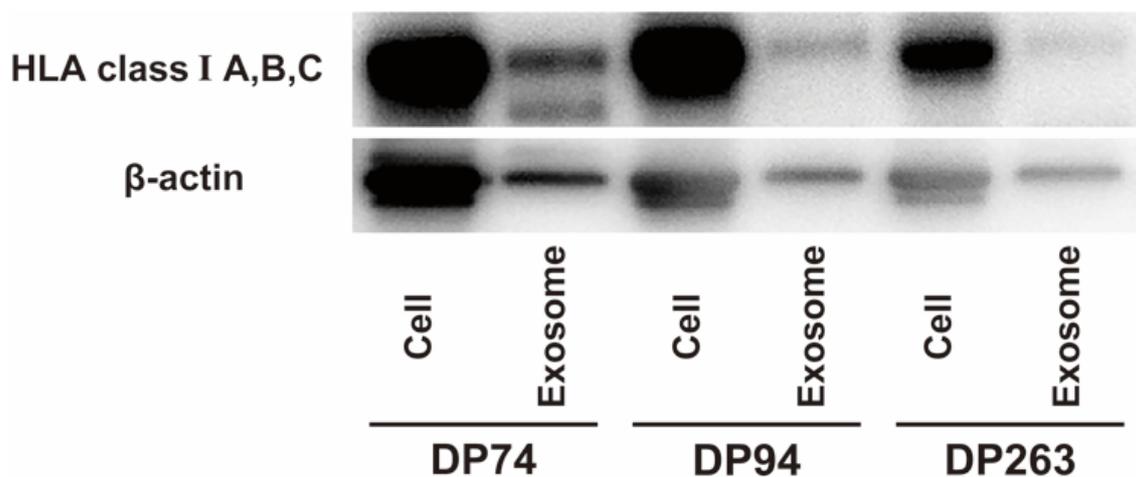


図 3 HHH - DPC エクソソームの HLA クラス I A, B, C 発現評価.

5 μ g のタンパク質量が各レーンにロードされた.

3. miRNA 発現プロファイルの解析

HHH - DPCs の細胞および同細胞由来エクソソームの miRNA 発現プロファイルを解析した。エクソソームの miRNA 発現は、細胞と類似しており、上位 45 種類の内 20 種類が同じ miRNA 発現を示した (表 1)。

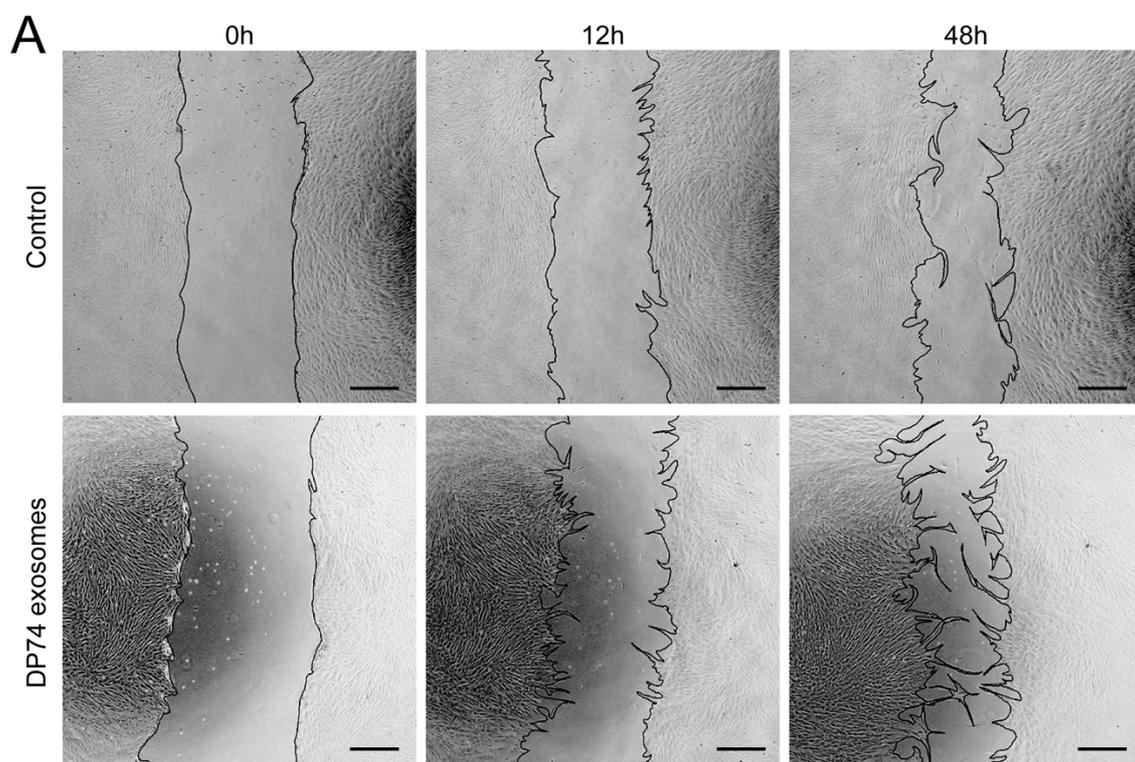
表 1 HHH - DPC エクソソームおよび HHH - DPCs の
上位 45 種類の miRNA 発現 .

HHH - DPC エクソソームおよび HHH - DPCs 内 miRNA
で共通するものを * で示す .

exosomes			Cells		
miRNA	Accession	Raw	miRNA	Accession	Raw
hsa-miR-7975*	MIMAT0031178	8.54	hsa-let-7a-5p*	MIMAT0000062	11.35
hsa-miR-7641	MIMAT0029782	8.65	hsa-let-7b-5p*	MIMAT0000063	10.60
hsa-miR-7977	MIMAT0031180	8.11	hsa-let-7f-5p	MIMAT0000067	10.37
hsa-miR-8069*	MIMAT0030996	7.89	hsa-let-7c-5p*	MIMAT0000064	9.41
hsa-miR-5100	MIMAT0022259	7.89	hsa-miR-125b-5p*	MIMAT0000423	9.34
hsa-miR-494-3p*	MIMAT0002816	6.97	hsa-miR-199a-3p*	MIMAT0000232	8.72
hsa-miR-21-5p*	MIMAT0000076	6.55	hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	8.67
hsa-miR-6089	MIMAT0023714	6.83	hsa-miR-23a-3p*	MIMAT0000078	8.74
hsa-miR-1246*	MIMAT0005898	6.74	hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	8.20
hsa-miR-23a-3p*	MIMAT0000076	7.03	hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	8.08
hsa-miR-1273g-3p	MIMAT0022742	6.72	hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	8.46
hsa-miR-6869-5p	MIMAT0027638	6.58	hsa-miR-221-3p*	MIMAT0000278	7.76
hsa-miR-630	MIMAT0003299	6.46	hsa-miR-29a-3p*	MIMAT0000086	7.64
hsa-miR-29a-3p*	MIMAT0000086	6.35	hsa-miR-8069*	MIMAT0030996	7.96
hsa-miR-125b-5p*	MIMAT0000423	6.12	hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	7.74
hsa-miR-22-3p*	MIMAT0000077	5.86	hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	7.36
hsa-miR-16-5p*	MIMAT0000069	5.96	hsa-miR-24-3p*	MIMAT0000080	7.35
hsa-miR-5703	MIMAT0022496	5.97	hsa-miR-100-5p*	MIMAT0000098	7.08
hsa-miR-199a-3p*	MIMAT0000232	5.73	hsa-miR-23b-3p	MIMAT0000418	7.01
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	6.05	hsa-miR-214-3p*	MIMAT0000271	6.27
hsa-miR-4459	MIMAT0018981	6.14	hsa-miR-4284	MIMAT0016915	5.69
hsa-let-7b-5p*	MIMAT0000063	5.92	hsa-miR-21-5p*	MIMAT0000076	6.32
hsa-miR-7150	MIMAT0028211	5.51	hsa-miR-103a-3p	MIMAT0000101	6.04
hsa-miR-4286	MIMAT0016916	5.25	hsa-miR-16-5p*	MIMAT0000069	6.10
hsa-miR-24-3p*	MIMAT0000080	5.34	hsa-miR-107	MIMAT0000104	6.02
hsa-miR-221-3p*	MIMAT0000278	5.25	hsa-miR-7975*	MIMAT0031178	5.95
hsa-miR-4516	MIMAT0019053	5.73	hsa-miR-199a-5p*	MIMAT0000231	5.97
hsa-miR-100-5p*	MIMAT0000098	5.57	hsa-miR-320d	MIMAT0006764	5.73
hsa-miR-5787	MIMAT0023252	5.09	hsa-miR-1246*	MIMAT0005898	5.61
hsa-miR-642a-3p	MIMAT0020924	5.13	hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	6.29
hsa-miR-6125	MIMAT0024598	5.41	hsa-miR-27b-3p	MIMAT0000419	5.69
hsa-miR-7704	MIMAT0030019	5.12	hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	5.62
hsa-miR-4530*	MIMAT0019069	5.03	hsa-miR-22-3p*	MIMAT0000077	5.59
hsa-miR-6087	MIMAT0023712	4.77	hsa-miR-320e	MIMAT0015072	5.36
hsa-miR-199a-5p*	MIMAT0000231	4.71	hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	5.36
hsa-miR-513a-5p	MIMAT0002877	4.60	hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	5.17
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	4.37	hsa-miR-320b	MIMAT0005792	5.16
hsa-let-7c-5p*	MIMAT0000064	4.24	hsa-miR-320c	MIMAT0005793	5.18
hsa-miR-29b-3p	MIMAT0000100	4.35	hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	5.21
hsa-miR-4299	MIMAT0016851	4.28	hsa-miR-4530*	MIMAT0019069	4.89
hsa-miR-214-3p*	MIMAT0000271	4.78	hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	5.04
hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	4.48	hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	4.94
hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	3.87	hsa-miR-151a-5p	MIMAT0004697	4.62
hsa-let-7a-5p*	MIMAT0000062	4.45	hsa-miR-494-3p*	MIMAT0002816	4.74
hsa-miR-940	MIMAT0004983	3.84	hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	4.59

4. HHH - DPC エクソソームの hDPC に対する遊走能および増殖能に対する効果

hDPC に対する HHH - DPC エクソソームの生物学的活性を評価するために、MTT アッセイおよびスクラッチアッセイを行った。細胞遊走に対する HHH - DPC エクソソームの効果は、スクラッチ領域の閉鎖を測定することにより評価した。HHH - DPC エクソソームは、対照群よりも有意に高い活性を示した(図 4A, B)。また、HHH - DPC エクソソームは、hDPC の増殖を優位に促進した(図 4C)。



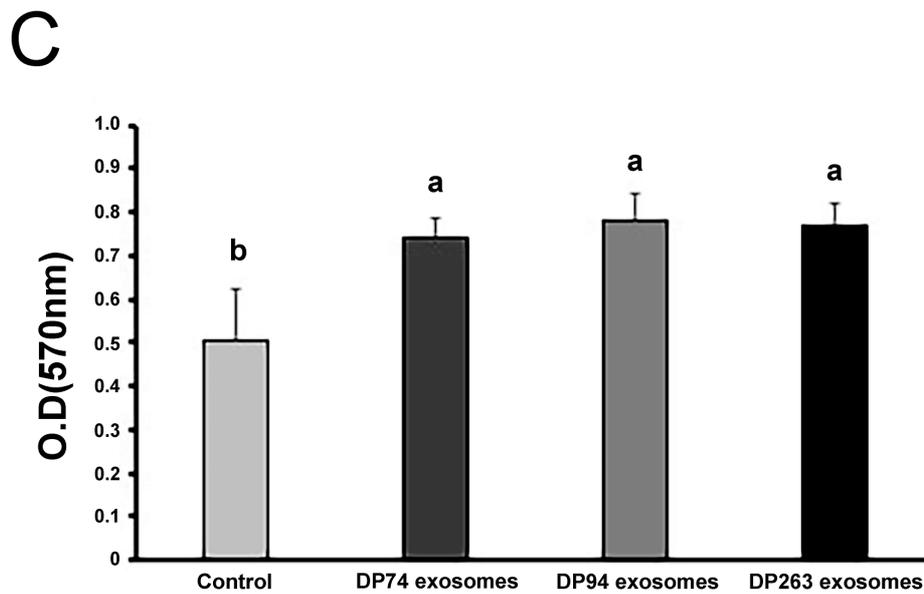
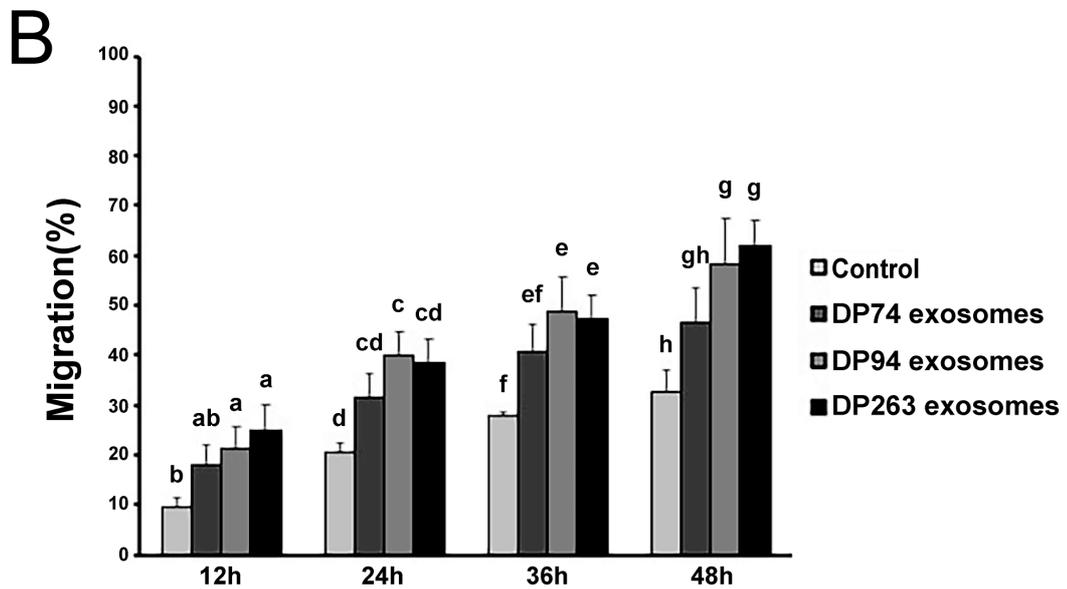


図 4 HHH - DPC エクソソームによる細胞遊走能および増殖能に対する効果。

(A) DP94 を単層培養し，スクラッチ後に DP74 エクソソームを添加した．スケールバー = 10 μ m．(B) DP94 の遊走における HHH - DPC エクソソームの刺激活性の

定量化 (n = 4). (C)DPC の増殖に対する HHH - DPC エクソソームの効果. 無血清培地にて培養した DP94 を HHH-DPC エクソソームで 24 時間処理した (n = 4). グラフ中, 異なるアルファベット間に有意差があることを示す ($p < 0.05$).

5. LPS 誘導性歯周炎に対する DPC エクソソームの効果

LPS は、DPC の増殖を抑制することが報告されている³⁰⁾。そこで、LPS 存在下で HHH - DPC エクソソームを添加した際の増殖能への影響を MTT アッセイにより評価した。hDPC の増殖は LPS によって抑制されたが、LPS 投与群に HHH - DPC エクソソームを加えても増殖抑制効果に変化は見られなかった(図 5A)。また、*in vivo* では上顎大白歯領域への LPS 投与は、矢状断面の歯の表面、歯間接触および歯槽骨に囲まれた領域を増加させ、歯槽骨の骨吸収を誘導したが、HHH - DPC エクソソームを投与した際、有意差は示さなかったが、骨量減少を緩和する傾向を組織像にて観察できた。(図 5B, C, D)。

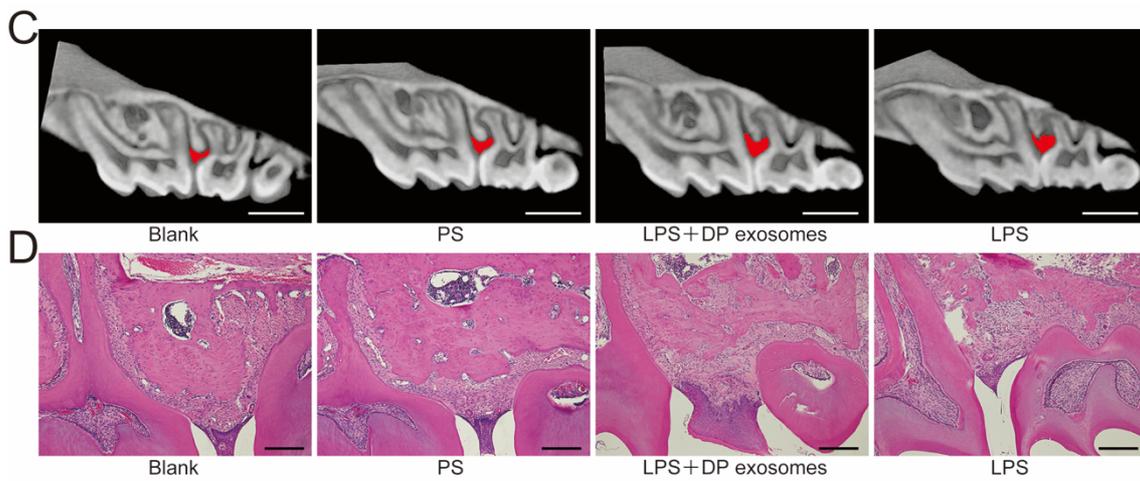
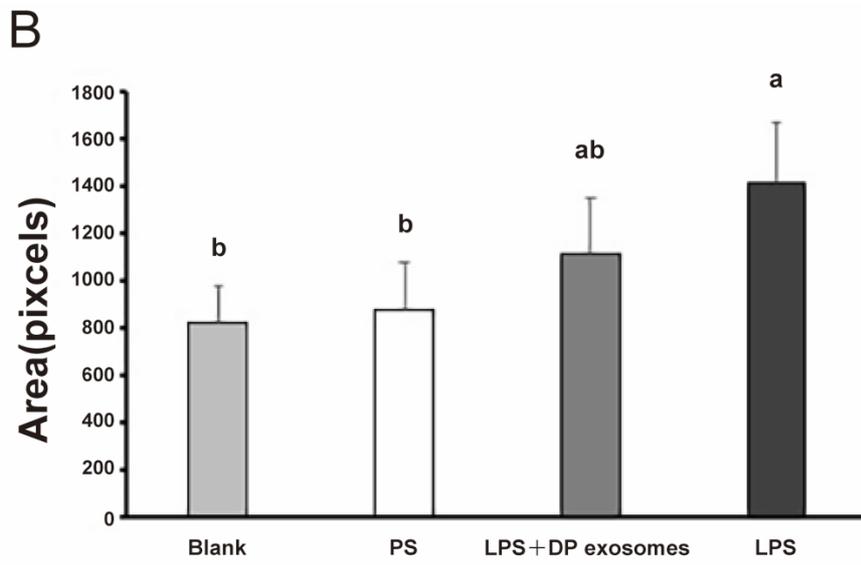
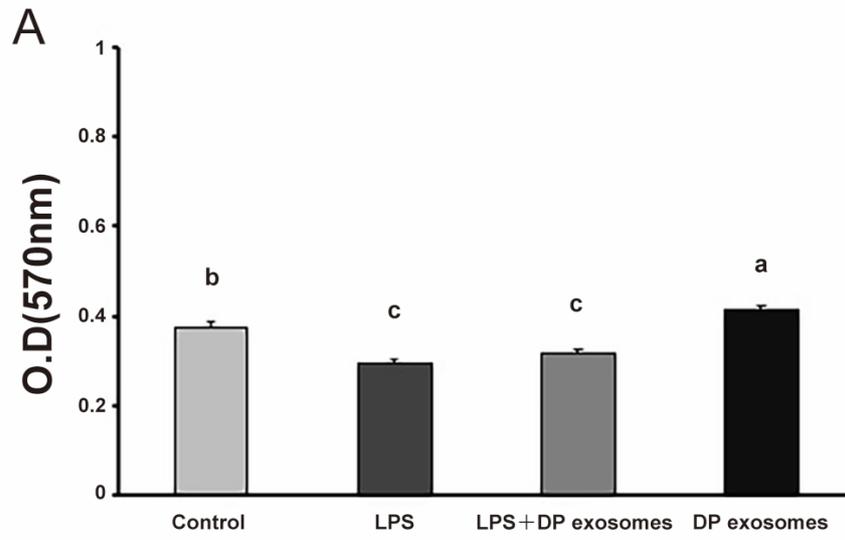


図 5 LPS 誘導性歯周炎モデルマウスにおけるエクソソームの効果。

(A) LPS の細胞増殖阻害効果に対する DP94 エクソソームの拮抗効果。Blank および LPS: $n = 3$, LPS + DP エクソソーム および DP エクソソーム: $n = 4$ 。(B) μ CT 断層画像の矢状断面の歯の表面, 歯間接触および歯槽骨に囲まれたピクセル領域。グラフ中, 異なるアルファベット間に有意差があることを示す ($p < 0.05$)。各グループのサンプル数 n : Blank = 7, PS = 8, LPS + DP エクソソーム = 6, LPS = 9。(C) 上顎の矢状断面の μ CT 画像。B の定量に使用した領域を赤で表示した。スケールバー = $40 \mu\text{m}$ 。(D) ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色像。スケールバー = $200 \mu\text{m}$ 。

考 察

無血清培養下にて培養した HHH - DPC から高い純度でエクソソームを精製することができた。HHH - DPC エクソソームにおける HLA クラス I の低レベルの発現は、HLA が不一致の移植において宿主免疫反応を誘導することが比較的少ない。また、エクソソームは DPC の遊走と増殖を促進し、LPS 誘導性歯周炎モデルにおいては骨量減少の緩和傾向を示した。したがって、HHH-DPC エクソソームは、移植細胞に変わる安全な歯周炎治療薬として利用できる可能性がある。

HHH - DPC エクソソームは分泌細胞である HHH - DPC と miRNA 発現が類似していた。共通して発現が見られた中で、let - 7c - 5p は歯髄炎に対して抗炎症作用および骨形成作用があることが知られており³⁰⁻³²⁾、let - 7c - 5p 模倣体の脳室内注射により、神経炎症と脳炎が改善された報告もある^{33,34)}。Let - 7b は、in vitro にてヒト間葉系幹細胞の神経細胞への分化に寄与した報告がある³⁵⁾。miR - 5100 は骨芽細胞の分化の調節に役割を果たし³⁶⁾、miR - 125b - 5p は活性化マクロファージにおける一酸化窒素産生を減少させ、軟骨細胞の LPS 誘発炎症性損傷を調節することが示されている^{37,38)}。

以上の miRNA プロファイリングの結果より，DPC エクソソームは歯周炎の骨量減少を防ぐことができるのではないかという仮説を立てた．HHH - DPC エクソソームは，*in vitro*にて hDPC の遊走と増殖の両方に刺激効果を示したが，hDPC 増殖に対する LPS の抑制効果に拮抗作用は示さなかった．さらに，DP94 エクソソームを LPS 誘導性歯周炎マウスに同時に投与すると，統計的な有意差はないが歯槽骨量減少に対する緩和傾向が示唆された．

今後の展開として，DPC エクソソームを用いることで LPS 誘導性歯周炎モデルマウスの骨量減少の緩和傾向がみられたため，より適切な評価方法および安全性の確認も含め，エクソソームの最適な投与量，投与期間を探索していくことが必要である．また，DPC エクソソームの発現している miRNA は，エクソソームが由来する DPC と発現が大きく重なっており，細胞が持つ組織修復能や炎症抑制作用を一部代替できる可能性がある．DPC は動物実験において脊髄損傷や創傷治癒といったさまざまな炎症症状に有効な作用を示すことがわかっている．そこで，エクソソームの投与時に，炎症に関するさまざまなパラメータが変化するかどうかを移植組織内で評価し，歯周炎において有効な抗炎症作用を示すかどうかを確認すべきであろう．

結 論

歯髄細胞由来エクソソームによる LPS 誘導性歯周炎の緩和効果について検討した結果、以下の結論を得た。

1 HHH - DPC エクソソームによって hDPC の遊走能および増殖能は上昇した。

2 精製した HHH - DPC エクソソームで発現している miRNA は、同細胞由来の DPCs と発現が類似していることが明らかとなり、共通して発現している miRNA は創傷治癒や抗炎症作用を期待できるものが含まれており、HHH - DPC エクソソームの歯周治療効果が示唆された。

引用文献

- 1) Le Blank K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W and Ringden O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008 ; 371 : 1579-1586.
- 2) Chen C, Hou J. Mesenchymal stem cell-based therapy in kidney transplantation. *Stem Cell Res Ther*. 2016 ; 7 : 16.
- 3) Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP and Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000 ; 127 : 1671-1679.
- 4) Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG and Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002 ; 81 : 531-535.

5) Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, Miyaki S, Kunisada T, Shibata T and Tezuka K. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res*. 2008 ; 87 : 676-681.

6) Sugiyama K, Nagashima K, Miwa T, Shimizu Y, Kawaguchi T, Iida K, Tamaoki N, Hatakeyama D, Aoki H, Abe C, Morita H, Kunisada T, Shibata T, Fukumitsu H and Tezuka KI. FGF2-responsive genes in human dental pulp cells assessed using a rat spinal cord injury model. *J Bone Miner Metab*. 2019 ; 37 : 467-474.

7) Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG and Hansen JA. The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 1995 ; 86 : 1606-1613.

8) Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol*. 2008 ; 26 : 739-40.

9) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H and Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011 ; 8 : 409-412.

10) Xu H, Wang B, Ono M, Kagita A, Fujii K, Sasakawa N, Ueda T, Gee P, Nishikawa M, Nomura M, Kitaoka F, Takahashi T, Okita K, Yoshida Y, Kaneko S and Hotta A. Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell*. 2019 ; 24 : 566-578.

11) Katsuda T, Kosaka N, Takeshita F and Ochiya T. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*. 2013 ; 13 : 1637-1653.

12) Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y and Ochi M. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. *Stem Cells*

Transl Med. 2016 ; 5 : 1620-1630.

13) Adamiak M, Cheng G, Bobis-Wozowicz S, Zhao L, Kedracka-Krok S, Samanta A, Karnas E, Xuan YT, Skupien-Rabian B, Chen X, Jankowska U, Girgis M, Sekula M, Davani A, Lasota S, Vincent RJ, Sarna M, Newell KL, Wang OL, Dudley N, Madeja Z, Dawn B and Zuba-Surma EK. Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Extracellular Vesicles Are Safer and More Effective for Cardiac Repair Than iPSCs. *Circ Res.* 2018 ; 122 : 296-309.

14) Zhang Y, Shi S, Xu Q, Zhang Q, Shanti RM and Le AD. SIS-ECM Laden with GMSC-Derived Exosomes Promote Taste Bud Regeneration. *J Dent Res.* 2018 ; 98 : 225-233.

15) Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 ; 19 : 213-228.

16) Gunasekaran M, Sharma M, Hachem R, Bremner R, Smith MA and Mohanakumar T. Circulating exosomes with distinct properties during chronic

lung allograft rejection. *J Immunol.* 2018 ; 200 : 2535-2541.

17) Ravichandran R, Bansal S, Rahman M, Sharma M, Liu W, Bharat A, Hachem R, Omar A, Smith MA and Mohanakumar T. The role of donor-derived exosomes in lung allograft rejection. *Hum Immunol.* 2019 ; 80 : 588-594.

18) Liu Q, Rojas-Canales DM, Divito SJ, Shufesky WJ, Stolz DB, Erdos G, Sullivan ML, Gibson GA, Watkins SC and Larregina AT. Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft targeting immune response. *J Clin Invest.* 2016 ; 126 : 2805-2820.

19) Marino J, Babiker-Mohamed MH, Crosby-Bertorini P, Paster JT, LeGuern C, Germana S, Abdi R, Uehara M, Kim JI and Markmann JF. Donor exosomes rather than passenger leukocytes initiate alloreactive t cell responses after transplantation. *Sci Immunol.* 2016 ; 1 : pii: aaf8759.

20) Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV and

Kirkwood KL. *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans lipopolysaccharide

mediated experimental bone loss model for

aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2007 ;

78 : 550-558.

21) Ozaki Y, Ukai T, Yamaguchi M, Yokoyama M,

Haro ER, Yoshimoto M, Kaneko T, Yoshinaga M,

Nakamura H, Shiraishi C and Hara Y. Locally

administered T cells from mice immunized with

lipopolysaccharide (LPS) accelerate LPS-induced

bone resorption. *Bone.* 2009 ; 44 : 1169-1176.

22) Takewaki M, Kajiya M, Takeda K, Sasaki S,

Motoike S, Komatsu N, Matsuda S, Ouhara K,

Mizuno N, Fujita T and Kurihara H. MSC/ECM

Cellular Complexes Induce Periodontal Tissue

Regeneration. *J Dent Res.* 2017 ; 96 : 984-991.

23) Shinohara H, Kuranaga Y, Kumazaki M, Sugito

N, Yoshikawa Y, Takai T, Taniguchi K, Ito Y and

Akao Y. Regulated Polarization of Tumor-

Associated Macrophages by miR-145 via Colorectal

Cancer-Derived Extracellular Vesicles. *J Immunol.*

2017 ; 199 : 1505-1515.

24) Shinohara H, Kumazaki M, Minami Y, Ito Y, Sugito N, Kuranaga Y, Taniguchi K, Yamada N, Otsuki Y, Naoe T and Akao Y. Perturbation of energy metabolism by fatty-acid derivative AIC-47 and imatinib in BCR-ABL-harboring leukemic cells. *Cancer Lett.* 2016 ; 371 : 1-11.

25) Kawasaki H, Itoh T, Takaku Y, Suzuki H, Kosugi I, Meguro S, Iwashita T and Hariyama T. The NanoSuit method: a novel histological approach for examining paraffin sections in a nondestructive manner by correlative light and electron microscopy. *Lab Invest.* 2019 ; doi : 10.1038/s41374-019-0309-7.

26) Ding Q, Sun R, Wang P, Zhang H, Xiang M, Meng D, Sun N, Chen AF and Chen S. Protective effects of human induced pluripotent stem cell-derived exosomes on high glucose-induced injury in human endothelial cells. *Exp Ther Med.* 2018 ; 15 : 4791-4797.

27) Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting in vivo experiments: The arrive guidelines. *Br J*

Pharmacol. 2010 ; 160 : 1577-1579.

28) Kawai S, Takagi Y, Kaneko S and Kurosawa T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim.* 2011 ; 60 : 481-487.

29) Hiyari S, Atti E, Camargo PM, Eskin E, Lusic AJ, Tetradis S and Pirih FQ. Heritability of periodontal bone loss in mice. *J Periodontal Res.* 2015 ; 50 : 730-736.

30) Yuan H, Zhang H, Hong L, Zhao H, Wang J, Li H, Che H and Zhang Z. MicroRNA let-7c-5p suppressed lipopolysaccharide-induced dental pulp inflammation by inhibiting dentin matrix protein-1-mediated nuclear factor kappa b (nf-kappab) pathway in vitro and in vivo. *Med Sci Monit.* 2018a ; 24 : 6656-6665.

31) Yan Z, Guo Y, Wang Y, Li Y and Wang J. MicroRNA profiles of bmscs induced into osteoblasts with osteoinductive medium. *Exp Ther Med.* 2018 ; 15 : 2589-2596.

32) Yuan H, Zhao H, Wang J, Zhang H, Hong L, Li H, Che H and Zhang Z. MicroRNA let-7c-5p promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells by inhibiting Lipopolysaccharide induced inflammation via HMGA2 / PI3k / Akt signal blockade. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018b ; doi : 10.1111/1440-1681.13059.

33) Ni J, Wang X, Chen S, Liu H, Wang Y, Xu X, Cheng J, Jia J and Zhen X. MicroRNA let-7c-5p protects against cerebral ischemia injury via mechanisms involving the inhibition of microglia activation. *Brain Behav Immun*. 2015 ; 49 :75-85.

34) Lv J, Zeng Y, Qian Y, Dong J, Zhang Z and Zhang J. MicroRNA let-7c-5p improves neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury by suppressing neuroinflammation and regulating microglial activation. *Brain Res*. 2018 ; 1685 : 91-104.

35) Nishino J, Kim I, Chada K and Morrison SJ. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young, but not old, mice by reducing p16Ink4a and

p19Arf expression. *Cell*. 2008 ; 135 : 227-239.

36) Wang H, Cui Y, Luan J, Zhou X, Li C, Li H, Shi L and Han J. MiR-5100 promotes osteogenic differentiation by targeting Tob2. *J Bone Miner Metab*. 2017 ; 35 : 608-615.

37) Xu Z, Zhao L, Yang X, Ma S, Ge Y, Liu Y, Liu S, Shi J and Zheng D. Mmu-miR-125b overexpression suppresses NO production in activated macrophages by targeting eEF2K and CCNA2. *BMC Cancer*. 2016 ; 16 : 252.

38) Jia J, Wang J, Zhang J, Cui M, Sun X, Li Q and Zhao B. MiR-125b inhibits LPS-Induced Inflammatory Injury via Targeting MIP-1 α in Chondrogenic Cell ATDC5. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 45 : 2305-2316.