

学位論文内容の要旨

論文提出者	清水 雄太
論文審査委員	(主査) 朝日大学歯学部 教授 辰巳順一 (副査) 朝日大学歯学部 教授 近藤信夫 (副査) 朝日大学歯学部 教授 柏俣正典 (外部審査) 岐阜大学大学院医学系研究科 准教授 手塚建一
論文題目	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
論文内容の要旨	<p>【目的】</p> <p>近年、エクソソームと呼ばれる細胞外小胞が間葉系幹細胞から分泌され、免疫応答や組織修復など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。また、間葉系幹細胞由来エクソソームはさまざまな疾患に対する治療効果があり、細胞移植療法の代替療法として期待されている。本研究では、ヒト智歯から樹立した HLA ハプロタイプホモ (HHH) 歯髄細胞 (DPC) 3 ラインを使って、HHH-DPC から分泌されるエクソソームの特性を評価し、LPS 誘導性歯周炎に対する効果を調べ、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。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>HHH-DPCs (DP74, DP94, DP263) 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、NanoSuit 法・走査型電子顕微鏡にて観察し、エクソソームマーカの発現をウエスタンブロットティング (WB)・免疫電子顕微鏡法にて、HLA クラス I の発現を WB で調べた。得られたエクソソームは蛍光ラベルし、細胞への取り込みを評価した。また、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。その後、培養 DPC に対する HHH-DPC エクソソームの細胞遊走能、リポ多糖 (LPS) 存在下と非存在下での増殖能への影響を評価した。さらに、マウスモデルにて LPS 誘導性歯周炎に対する効果の評価を行った。</p> <p>【結果】</p> <p>HHH-DPC から精製されたエクソソームは、NanoSuit 法によって均質な球状膜構造を示し、各種エクソソームマーカと HLA クラス I 分子の有意な発現を示した。HHH-DPC エクソソームの miRNA 発現プロファイルは、由来する HHH-DPCs と類似し、複数の Let-7 ファミリーを含有していた。HHH-DPC エクソソームは、効率よく細胞に取り込まれ、DPC の遊走を促進したが、LPS によって誘導される DPC の増殖抑制に変化は見られなかった。また、歯周炎マウスモデルにおいては骨破壊を緩和させる傾向を示した。</p>

【考 察】

HHH-DPCs からエクソソームを精製した. HHH-DPC エクソソームは, 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. HHH-DPC エクソソームの miRNA 発現プロファイルは, 分泌細胞である HHH-DPCs と類似していた. その中で, 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報告されている. 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という報告もある. 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, また miR-5100 は骨芽細胞の分化の調節に役割を果たし, 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. よって, 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, *in vitro* と *in vivo* の解析によってその効果の一部が確認できた. これらの結果は, DPC エクソソームが細菌感染によって引き起こされる歯周炎の炎症を軽減し, 歯槽骨吸収を緩和させる傾向を示している. 今後, この作用のメカニズムは, さらなる解析が必要がある.

【結 論】

無血清培養下において培養した 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かもしれない. しかし, 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, 細胞移植によらない安全な歯周炎治療薬として利用できる可能性がある.