

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10104

研究課題名（和文）エクソソーム内物質に着目した口腔扁平苔癬の病因・病態解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of etiology and pathology of oral lichen planus focusing on exosomes and development of novel treatment

研究代表者

豊田 長隆（Toyoda, Nagatake）

鶴見大学・歯学部・学内講師

研究者番号：80257344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は唾液中エクソソームを解析することで口腔扁平苔癬の病態解明および診断を目指すものである。唾液中エクソソームの回収には従来の方法よりも簡便で短時間で安定して回収可能な方法を確立した。唾液の不純物除去後、限外濾過し、サイズ排除クロマトグラフィーを応用した方法である。本法により得られた粒子がエクソソームを十分に含んでいることが確認できた。この方法を用いて健常者と口腔扁平苔癬患者の唾液を対象にさらなる検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はOLPの病態に、これまでに考えられていなかったエクソソームによる細胞間情報伝達に関連している可能性に着目した。その関与を明らかにすることで、新たな診断法を確立するとともに、さらにエクソソームの特徴を利用した新たな治療法の開発につなげることを目指した研究である。本研究が新たな診断・治療法確立の一助となれば、OLP患者のQOLの維持・向上に大きく貢献しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the pathology and diagnosis of oral lichen planus by analyzing exosomes in saliva. We have established a method that is simpler than the conventional method and can be stably collected in a short time for the collection of salivary exosomes. In this method, impurities are removed from saliva, ultrafiltration is performed, and size exclusion chromatography is applied. Using this method, we are conducting further studies on the saliva of healthy subjects and patients with oral lichen planus.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔扁平苔癬 OLP エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

超高齢化の急激な進行と有病高齢者の増加を背景として、これまでその病因や病態について科学的に十分な検証がなされてこなかった、口腔内科的疾患の原因の解明とその治療法の確立に多方面から期待が寄せられている。なかでも口腔扁平苔癬(oral lichen planus;以下 OLP)は、臨床的に、口腔粘膜上皮のレース状の白色病変や紅斑として認められ、また病理組織学的には粘膜上皮の角化、上皮直下のリンパ球帯状浸潤を特徴とする慢性炎症性病変とされている。その病態形成には歯科用金属アレルギーや、喫煙、薬剤、全身疾患、遺伝的素因、微生物感染、慢性的機械的刺激、情緒的因子(精神的ストレス等)などが複合的に作用していると考えられているが、本疾患の炎症性特性を含めその詳細はいまだ明確にされていない。OLPの症状は灼熱感、刺激痛、つっぱり感から来る開口障害など多岐にわたり、食事や会話といった人間にとって重要な文化的生活を障害するものであり、著しいQOLの低下につながることも多い。しかし、その病因・病態が未だ解明されていないことから、治療は主に含嗽や軟膏塗布などの対症療法のみが行われているが、奏効しない症例も多々認められ、病因・病態の解明と根治的な治療法の確立が強く求められている。

これまでの知見で OLP では上皮直下の T リンパ球の浸潤が特徴的であることから、OLP の発症機序において細胞性免疫が関与していることが推測されている。細菌感染や異物、その他様々な原因により惹起された細胞性免疫の不適切な活性化や異常反応が OLP の発症・病態維持に関与しているのであれば、その免疫異常を詳細に解明することにより、病因・病態の解明や治療法の確立につながると考えられる。

一方、近年、癌や炎症性疾患などにおいて新たな細胞間情報伝達機構として細胞外ベシクルが注目されている。ベシクルの種類はその発症機序、サイズによりエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体に分類されている。特にエクソソームは、直径 30~200 nm の脂質二重膜からなる小胞であり、種々の細胞から分泌されることが知られている。エクソソームに含有される物質は、核酸、タンパク質、脂質等様々で、これらの特徴的物質を内含するエクソソームが取り込まれることにより別の細胞に情報が送達されることから、細胞間の新たな物質輸送機構あるいは情報伝達機構として機能していることがわかってきている。一方このエクソソームが、尿、血液、唾液を含む体液中にも含まれており、これを介して様々な疾患の発生や病態が制御されている可能性も示唆されている。

これらの事実を考慮すると、今まで T リンパ球を主体とした細胞性免疫が関与する慢性炎症性疾患としての理解しかされていない OLP について、このエクソソームを詳細に解析することで、新たな着眼点から病因・病態の解明がなされる可能性があると考えられる。事実、エクソソーム研究の発展と共に、癌転移促進や抑制といった、相反するエクソソームの役割が環境によって左右されることが確かめられていること、炎症部位においてはエクソソームの細胞内への取り込みが亢進すること、自己免疫疾患患者、特にリウマチ患者由来の唾液腺上皮が放出するエクソソームには自己抗原 Ro/SSA、La/SSB、Sm RNPs などが含まれていることが明らかとなりつつある。エクソソームの内容物が分泌源である細胞の特徴を反映しているというこれらの知見を踏まえ、OLP 患者の唾液中に分泌されるエクソソームを採集し、このエクソソームに含まれる miRNA などの核酸やタンパク質を解析し健常者と比較検討することにより、OLP の病因・病態の解明につなげ得ると考えられる。加えて、病変部の組織学的特徴、唾液中エクソソーム内物質、病変部より細胞を分離培養し、上清中に分泌されたエクソソーム内物質の 3 者を比較検討することにより、組織採取という侵襲のない、唾液のみを検体とした OLP の新たな診断法(リキッドバイオプシー)確立の可能性を探ることが可能となるものと考えられる。また一個体間での OLP の臨床症状の変化とエクソソーム内物質の変化を含めた診断が可能となれば、OLP に対する治療効果判定法の確立にも寄与するとともに、エクソソームを利用したオーダーメイド治療確立の一助ともなり、今後ますます増加すると考えられる OLP の病因解明、診断法、治療法の開発に大きく貢献するものと考えられる。

2. 研究の目的

ここまで述べてきたように、超高齢社会を迎えるわが国においては、今後口腔粘膜疾患を含めた口腔内科的疾患はますます増加することが予想されているものの、口腔内科的疾患の病態解明と治療法の開発は、これまで十分な科学的検討がなされてこなかったことから、未だ十分な対応がなされているとは言い難い。特に OLP は長年にわたり原因不明の疾患として認知されているにもかかわらず、その病因・病態は未だ不明で、対症療法のみが行われているのが現状である。また、確定診断には外科的侵襲を伴う組織生検が必要であり、加えて客観的な治療効果判定法も無いのが現実である。そこで本研究では、OLP に対する新たな診断法の開発を目的とするとともに、本疾患の病因・病態の解明へとつなげることで、根治的治療法の開発の一助となることを目指したものである。

3. 研究の方法

本研究では、OLP 患者の唾液中及び健常者の唾液中に存在するエクソソーム、さらに OLP 患者の病変部組織(細胞)と健常部の組織(細胞)に由来するエクソソームを解析することにより OLP の病因・病態の解明、さらには新たな診断法の確立が可能か否かについて検討することを将来の課題とする。これを実現するためには、現在標準的に行われているエクソソーム回収法である超遠心法では、実施施設が限定され、長時間を要し、技術的な問題も発生する。そこで、本研究ではまず、簡便に唾液からエクソソームを回収する方法を確立することを目指した。

(1) 唾液を検体とした簡便かつ安定したエクソソーム回収法の確立の試み

唾液からの簡便かつ安定したエクソソーム回収法を確立することを目指して、健常ボランティアより採取した唾液を対象に、希釈、フィルタリング、酵素処理、限外濾過等の前処理とサイズ排除クロマトグラフィー法を組み合わせ、エクソソームの回収を試みた。

(2) 回収したエクソソームの解析

前項(1)により唾液から回収した粒子の粒径と表面抗原を解析し、唾液からのエクソソーム回収に適した条件の確立を試みた。また、回収したエクソソームを電子顕微鏡にて観察し、その特徴について検討した。

(3) OLP 患者及び健常者の唾液中に存在するエクソソームの分離及び解析

OLP 患者の唾液中に分泌されるエクソソームの特徴を明らかにすることを目的に、OLP 患者及び健常ボランティアから唾液を採取し、前項(1)(2)により確立した回収法を用いてエクソソームを回収し、その特徴について解析した。

4. 研究成果

まず健常ボランティアから唾液 2ml を採取し、遠心により不純物を取り除いた。これをそのままサイズ排除クロマトグラフィーに適応したところ、粘性が強く、回収率が非常に低く、回収法として適さないことがわかった。粘性への対応として希釈したところ、回収される粒子数が減少し、適さないことがわかった。さらに粘性への対応としてコンドロイチナーゼ処理の有無により検討したところ、やや回収率は上がるものの、簡便性を犠牲にするほどの回収率の上昇は認められなかった。そこで、唾液中に含まれる不要な内容物を除去するとともに粘性も低下させる方法として、限外濾過を選択した。唾液 2ml を限外濾過し、上清を生理食塩水にて 1.5ml とし、これをサンプルとしてサイズ排除クロマトグラフィーにてエクソソームを含む粒子を回収した。回収したエクソソームを含む回収液を VIDEO DROP にて粒径と粒子数について解析したところ、図 1 に示すように、エクソソームを含む粒子が効率的に回収できた。さらにこの回収液を nanoFCM にて 250nm までの粒径で解析したところ、図 2 に示すような結果となり、本回収法では少量のエクソソーム以外の粒径の大きい粒子が混在することが確認できた。

さらにこの回収液に含まれる粒子について、その表面抗原からエクソソームであるか否かを判断し、その粒子数を計測し、含まれる粒子とエクソソームの数の齟齬について確認した。その結果、図 3 に示すよ

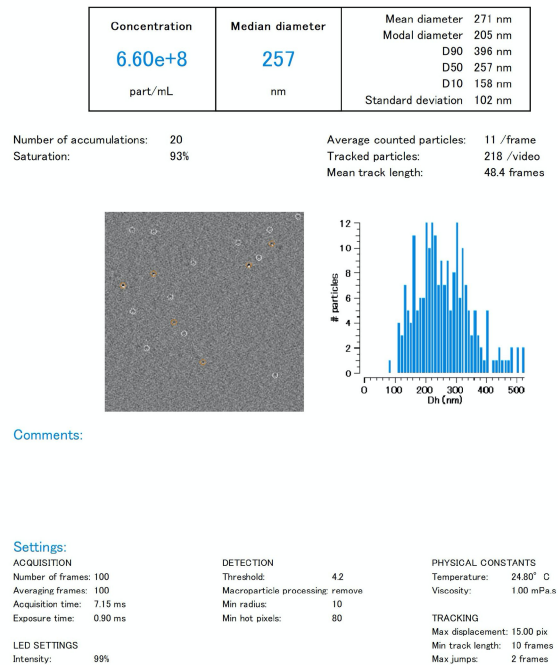


図 1 : Videodropによる粒子系と粒子数の解析

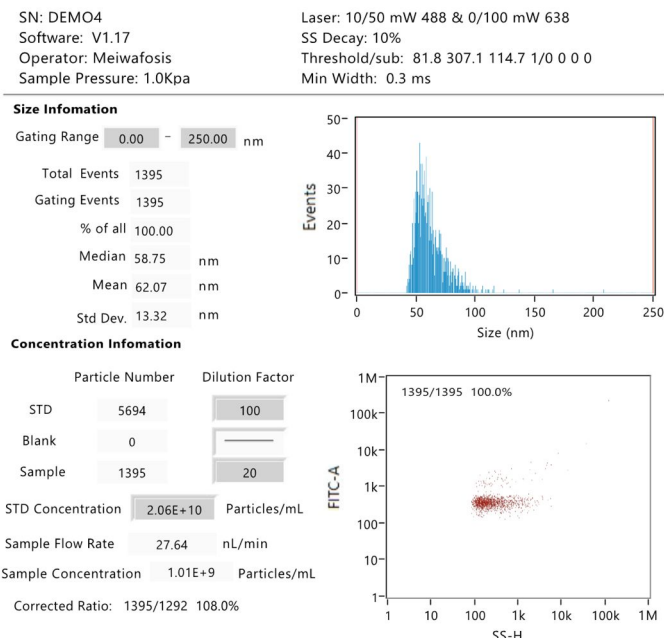


図 2 : nanoFCMの結果

うに、回収されている粒子のほとんどが CD63 および CD9 発言のエクソソームであり、加えて CD81 発現粒子も多いことがわかった。一方で Videodrop および nanoFCM の結果との比較から、ある程度のエクソソーム以外の粒子が含まれることが確認できたが、この程度の誤差であれば、この誤差を認識した上でエクソソームの解析を行えば、エクソソーム回収法として問題ない範囲であると考えられた。

Well No.	Capture Antibody (Disc)	Detection Antibody (Beads)	Sample	Sample dilution	Counts/well	Comments
1	CD63	CD9	サンプル1	原液	9,918,684	
2	CD63	CD9	サンプル1	原液	10,268,193	
3	CD63	CD9	サンプル2	原液	4,010,159	
4	CD63	CD9	サンプル2	原液	3,686,430	
5	CD63	CD9	サンプル3	原液	6,671,476	
6	CD63	CD9	サンプル3	原液	6,914,846	
7	CD81	CD9	サンプル1	原液	5,254,713	
8	CD81	CD9	サンプル1	原液	5,322,409	
9	CD81	CD9	サンプル2	原液	803,502	
10	CD81	CD9	サンプル2	原液	956,267	
11	CD81	CD9	サンプル3	原液	2,407,891	
12	CD81	CD9	サンプル3	原液	2,254,715	
13	コントロールIgG	CD9	サンプル1	原液	627,080	
14	コントロールIgG	CD9	サンプル2	原液	13,007	
15	コントロールIgG	CD9	サンプル3	原液	666,427	
16	CD63	CD9	PBS (Blank)	—	18,408	

図3：表面抗原によるエクソソーム解析

加えて、回収できた粒子を電子顕微鏡にて観察したところ、図4に示すような粒子であることがわかり、回収できた粒子は表面抗原からも電子顕微鏡像からもエクソソームであることが確認できた。

以上の結果から、唾液を検体としたエクソソーム回収法として、遠心により唾液から不純物を取り除いた後、希釈後に限外濾過し、サイズ排除クロマトグラフィーによる回収を行う方法が、最も簡便かつ短時間で安定してエクソソームを回収できる可能性が示唆された。

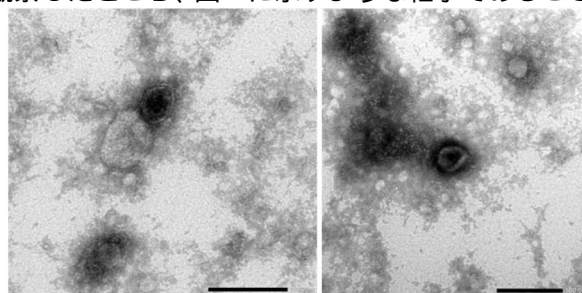


図4：電子顕微鏡像

現在、倫理審査委員会承認のもと、健常ボ

ランティアと OLP 患者から唾液を回収し、これを対象に本法を用いたエクソソーム回収を進めている。簡便で安価で短時間で行えることから、検体の回収にこれまでのような労力を要さず、効率的に回収できている。回収できたエクソソームを対象に、粒径、粒子数、表面抗原、電子顕微鏡による解析を進めている。OLP 患者に特徴的な所見が得られるか否かを慎重に検討しているところである。さらに、このエクソソームを対象に、エクソソーム内 miRNA の検討（各種免疫細胞に関連するエクソソームに特徴的に含有されると報告されている miR-29 と miR-146 (Th1 細胞からの IFN- γ 産生を強力に抑制)、miR-146a (CTL のクロスプライミングを抑制)、miR-155 (CD8+T 細胞のメモリー維持とエフェクター機能調節)、miR-17-92 (iTreg 細胞分化の抑制)、miR-301a と miR-326 (Th17 の機能と増殖に関与、自己免疫疾患患者で増幅)、miR-125a (マクロファージを活性化させ炎症に関与)、miR-142 (マクロファージ分化を抑制)、miR-181 (NKT 細胞の活性化に関与) など)、エクソソーム内タンパク質の検討（細胞接着に重要なインテグリン、炎症各所におけるリンパ球のホーミングに重要なセレクチン、B 細胞の増殖と分化に関わる CD40、細胞における様々なストレスやタンパク質輸送に関与する HSP 90, 70, 60、各種炎症性サイトカインである IL-1b, 2, 4, 10, 17, GM-CSF、さらに HSV や EBV などのウイルスに関連するタンパク質など）を進めているところである。

以上の検討により、本研究では今後、OLP の病因・病態の解明を目指すとともに、OLP に対してエクソソームを対象とした診断が可能か否か、また唾液を対象としたリキッドバイオプシーが可能か否か、今後エクソソームを応用した DDS による新たな治療法の開発に繋がるか否かにつきさらなる検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Reiko Tokuyama-Toda, Hirochika Umeki, Shinji Ide, Fumitaka Kobayashi, Shunnosuke Tooyama, Mai Umehara, Susumu Tadokoro, Hiroshi Tomonari, Kazuhito Satomura	4. 巻 11(3)
2. 論文標題 A New Implantation Method for Orthodontic Anchor Screws: Basic Research for Clinical Applications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines11030665	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 Tokuyama-Toda R, Terada-Ito C, Muraoka M, Horiuchi T, Amemiya T, Fukuoka A, Hamada Y, Takebe Y, Ogawa T, Fujii S, Kikuta T, Sejima S, Satomura K	4. 巻 12(11)
2. 論文標題 Improving the Detection Sensitivity of a New Rapid Diagnostic Technology for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Using a Trace Amount of Saliva	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics12112568	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 Tsutsumi-Arai C, Iwamiya Y, Hoshino R, Terada-Ito C, Sejima S, Akutsu-Suyama K, Shibayama M, Hiroi Z, Tokuyama-Toda R, Iwamiya R, Ijichi K, Chiba T, Satomura K	4. 巻 19(6)
2. 論文標題 Surface Functionalization of Non-Woven Fabrics Using a Novel Silica-Resin Coating Technology: Antiviral Treatment of Non-Woven Fabric Filters in Surgical Masks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 3639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph19063639	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0件

〔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	徳山 麗子 (Tokuyama Reiko) (20380090)	鶴見大学・歯学部・学内講師 (32710)	

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	里村 一人 (Satomura Kazuhito) (80243715)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	
研究分担者	井出 信次 (Ide Shinji) (00611998)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	
研究分担者	梅木 泰親 (Umeki Hirochika) (10552408)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710)	
研究分担者	寺田 知加 (Terada Chika) (40460216)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	

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